

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 735**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)  
**G01N 33/577** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04707230 .1**  
96 Fecha de presentación: **02.02.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1587542**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.10.2005**

54 Título: **Uso de anticuerpos anti-CD100**

30 Prioridad:  
**31.01.2003 EP 03290247**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.10.2012**

73 Titular/es:  
**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA  
RECHERCHE MEDICALE (INSERM)  
101, RUE DE TOLBIAC  
75013 PARIS, FR**

72 Inventor/es:  
**BELIN, Marie-Françoise;  
GIRAUDON, Pascale;  
BOUMSELL, Laurence y  
BENSUSSAN, Armand**

74 Agente/Representante:  
**Curell Aguilá, Mireia**

ES 2 388 735 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**

Uso de anticuerpos anti-CD100.

5 La presente solicitud se refiere al uso de anticuerpos anti-CD100 para el tratamiento o el diagnóstico de enfermedades neuroinflamatorias.

10 CD100 es un homodímero humano de 150 kDa expresado en la superficie de la mayoría de las células hematopoyéticas, y su gen pertenece a las familias de genes de Ig y semaforina (Bougeret *et al.*, 1992; Herold *et al.*, 1995). Los genes de semaforina codifican proteínas solubles y unidas a la membrana, la mayoría de las cuales se ha demostrado que actúan como quimiorrepelentes sobre la guía del cono de crecimiento. Delaire *et al.*, 1998, sugirieron que CD100 desempeña un papel en la activación de linfocitos T. Se demostró además que CD100 soluble inhibe la migración de células inmunitarias (Delaire *et al.*, 2001). Esta CD100 semaforínica inmunitaria humana (Hall *et al.*, 1996; Bismuth *et al.*, 2002) es liberada en grandes cantidades por linfocitos T con la activación a través de proteólisis mediante una metaloproteínasa (Elhabazi *et al.*, 2001). Se demostró además que se expresa en oligodendrocitos durante la mielinización (Moreau-Fauvarque, 2002).

20 Se ha teorizado que CD100 podría desempeñar un papel crítico en interacciones inmunitarias neuronales en situación inflamatoria.

25 Las enfermedades neuroinflamatorias, incluyen esclerosis múltiple (MS), la enfermedad desmielinizante inflamatoria principal del SCN, y la mielopatía asociada con infección por HTLV-1 (HAM/TSP), se caracterizan por la destrucción de mielina y la pérdida de oligodendrocitos y axonal en el cerebro y en la médula espinal. La presencia de linfocitos T activados, junto con una mayor expresión de citocinas inflamatorias y metaloproteinasas, corresponde bien a lesiones activas en el sistema nervioso central (SNC) de los pacientes. Se sospecha que linfocitos T infiltrantes toman parte en la citotoxicidad, síntesis de moléculas inflamatorias, desregulación de la homeostasia oligodendrocítica y daños axonales.

30 Se investigó *in vitro* el efecto de células T crónicamente activadas que expresan sCD100, y sCD100 recombinante, sobre precursores neuronales pluripotentes humanos y sobre oligodendrocitos de ratas. Estos contactos celulares imitan interacciones que se producen durante la neuroinflamación entre linfocitos T y oligodendrocitos o precursores neuronales pluripotentes todavía capaces de generar neuronas u oligodendrocitos en el cerebro adulto (Zhang *et al.*, 1999).

35 Se ha analizado particularmente la supervivencia celular y las extensiones del proceso oligodendrocítico. Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales específicos anti-CD100, denominados BD16 y BB18, fueron capaces de bloquear la interacción de CD100 soluble con su receptor en células T activadas, con lo que evitaron la apoptosis de oligodendrocitos en la enfermedad asociada a HTLV-1.

40 Para apoyar la relevancia funcional de los resultados experimentales, también se exploró la presencia de sCD100 en el fluido cerebroespinal (CSF) y linfocitos T activados que expresan CD100 en cerebros post-mortem procedentes de pacientes con HAM/TSP.

45 Sobre esta base, ahora se propone usar los anticuerpos específicos anti-CD100, y especialmente los anticuerpos monoclonales denominados BD16 y BB18, en el tratamiento o diagnóstico de enfermedades neuroinflamatorias.

50 Los métodos de tratamiento o de diagnóstico de la solicitud son útiles para cualquier sujeto o paciente. "Tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Los que necesitan tratamiento incluyen los que ya poseen el trastorno, así como los que tienen tendencia a sufrir el trastorno, o aquellos en los que se va a prevenir el trastorno. El paciente es preferentemente un ser humano, preferentemente un adulto, pero los métodos según la presente solicitud también se pueden aplicar a otros mamíferos o vertebrados.

Anticuerpos monoclonales anti-CD100

55 Los anticuerpos anti-CD100 preferidos usados según la presente invención son unos anticuerpos monoclonales denominados BD16 y BB18.

60 BD16 es un anticuerpo monoclonal de ratón que es producido por un hibridoma depositado en ECACC (número de depósito 92-01 0801) como se describe en la solicitud de patente internacional WO 93/14125. El asilamiento de este anticuerpo se describe en Herold *et al.*, 1995. Este anticuerpo también se puede adquirir de Beckman-Coulter. Este anticuerpo se ensayó sobre la migración de células inmunitarias en Delaire *et al.*, 2001.

65 BB18 es otro anticuerpo monoclonal de ratón que es producido por un hibridoma depositado en ECACC (número de depósito 92-01 0802) como se describe en la solicitud de patente internacional WO 93/14125. El asilamiento de este anticuerpo se describe en Bougeret *et al.*, 1992.

5 Ambos anticuerpos, que son IgA, reconocen la forma humana de la semaforina CD100, vía epítomos conformacionales. Mientras que BB18 induce la internalización de CD100, BD16 promueve su liberación. Mientras que BB18 mantiene CD100 en asociación con cinasas, BD16 disocia estos complejos. BD16 es co-mitogénico con CD2 y CD3, mientras que BB18 es co-mitogénico con PMA (éster de forbol). A pesar de estas características y propiedades diferentes, ambos anticuerpos BD16 y BB18 son útiles como anticuerpos de bloqueo.

Las formas híbridas y recombinantes de estos anticuerpos, así como sus fragmentos (por ejemplo, Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv), también son útiles según la presente solicitud, en tanto que muestren la actividad biológica deseada.

10 Esto significa que los anticuerpos o sus fragmentos útiles según la invención son capaces de unirse a CD100 humana con esencialmente la misma afinidad y especificidad que el anticuerpo BD16 o BB18, y, cuando se usan con fines preventivos o de tratamiento de un trastorno inflamatorio del sistema nervioso central o del sistema nervioso periférico, presentan esencialmente la misma propiedad de bloqueo con respecto a la actividad de CD100 humana que el anticuerpo BD16 o BB18.

15 Anticuerpos quiméricos o humanizados anti-CD100

Especialmente con respecto a la terapéutica en seres humanos, puede ser ventajoso usar formas quiméricas o humanizadas de los anticuerpos BD16 o BB18.

20 Los anticuerpos híbridos y recombinantes se pueden producir mediante corte y empalme de un dominio variable (incluyendo hipervariable) de un anticuerpo anti-CD100 con un dominio constante (por ejemplo anticuerpos "humanizados"), o una cadena ligera con una cadena pesada, o una cadena de una especie con una cadena de otra especie, o fusiones con proteínas heterólogas, independientemente de la especie de origen o designación de la clase o subclase inmunoglobulínica, en tanto que presenten la actividad biológica deseada (véanse, por ejemplo, Cabilly *et al.*, patente U.S. nº 4.816.567; Mage y Lamoyi, en *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, p. 79-97 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

30 Un aspecto de la presente solicitud engloba el uso de anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o cadena ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos.

35 Las formas "humanizadas" de los anticuerpos BD16 o BB18 son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas inmunoglobulínicas o sus fragmentos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígenos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina de ratón. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región que determina la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por restos de una CDR de la especie no humana (anticuerpo donante) que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos del armazón de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias importadas de CDR o del armazón. Estas modificaciones se realizan para refinar y optimizar adicionalmente el comportamiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprende 45 sustancialmente todos de por lo menos un, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de la inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprende de forma óptima por lo menos una porción de una región constante inmunoglobulínica (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana (véase Berger *et al.*, 2002 para un repaso de 50 las técnicas disponibles).

Anticuerpos anti-CD100 completamente humanos

55 En otro aspecto de la solicitud, se pueden usar anticuerpos anti-CD100 humanos, es decir, anticuerpos anti-CD100 humanos que reconocen un epítomo o epítomos similares o estrechamente relacionados con BD16 o BB18. Estos anticuerpos son obtenibles a partir de una genoteca de inmunoglobulinas humanas.

60 En la solicitud de patente internacional WO 01/040306, por ejemplo, se describen varios métodos para producir anticuerpos humanos.

65 Estos métodos incluyen los métodos de presentación de fagos y los ratones transgénicos no humanos que expresan genes del sistema inmunitario humano. Los métodos funcionan típicamente inmunizando un animal transgénico no humano que tiene genes inmunoglobulínicos humanos. El animal expresa un intervalo diverso de anticuerpos humanos que se unen al antígeno. Los ácidos nucleicos que codifican los componentes de las cadenas de anticuerpos de dichos anticuerpos se clonan entonces a partir del animal en un vector de presentación. Típicamente, se clonan poblaciones separadas de ácidos nucleicos que codifican las secuencias de las cadenas pesadas y

ligeras, y las poblaciones separadas se recombinan entonces en inserción en el vector, de manera que cualquier copia del vector recibe una combinación al azar de las cadenas pesadas y ligeras. El vector se diseña para expresar cadenas de anticuerpos de manera que se pueden ensamblar y presentar en la superficie exterior de un paquete de presentación que contiene el vector. Por ejemplo, las cadenas de anticuerpos se pueden expresar como proteínas de fusión con una proteína de revestimiento de fagos desde la superficie exterior del fago. Después, los paquetes de presentación se pueden identificar en busca de la presentación de anticuerpos que se unen a una diana.

También se pueden construir y expresar librerías de ADNc útiles para las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera de inmunoglobulinas humanas en una variedad de diferentes hospedantes, tales como bacterias (por ejemplo *E. coli*) o virus, tales como un poxvirus (Smith *et al.*, 2001) o un fago.

En el método de presentación de fagos, las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera de las inmunoglobulinas humanas se pueden clonar, se pueden reafirmar combinatoriamente, expresar y presentar como fragmentos Fab o scfv ("región variable monocatenaria") humanos que se unen a antígenos sobre la superficie de fago filamentosos, especialmente el fago M13, Fd y F1. Véanse Rader *et al.*, (1997); Aujame *et al.*, (1997); Hoogenboom, (1997); de Kruij *et al.*, (1996); Barbas *et al.*, (1996); Winter *et al.*, (1994). Los fragmentos humanos de unión a antígenos, presentados en fagos se pueden identificar entonces en busca de su capacidad para unirse a un antígeno seleccionado.

## Terapia

En un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para la prevención o tratamiento de un trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (SNC) o periférico (SNP), método el cual comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD100 BD16 y/o BB18, o de una forma quimérica o humanizada del mismo, o una forma humana del mismo, así como sus fragmentos, a un paciente que necesite dicho tratamiento.

Otro objeto de la invención es el uso de un anticuerpo anti-CD100 BD16 y/o BB18, o de una forma quimérica o humanizada del mismo, o una forma humana del mismo, así como sus fragmentos, para la preparación de un medicamento útil en la prevención o tratamiento de un trastorno inflamatorio del sistema nervioso central o periférico.

La infiltración del SNC o SNP por linfocitos T activados puede sostener el comienzo y progresión de enfermedades inflamatorias. Se señala en la presente memoria el papel principal de semaforina inmunitaria en la desmielinización ya que CD100 soluble, producido por linfocitos T activados víricamente, indujo la muerte apoptótica de precursores neuronales humanos (con capacidad de diferenciación de oligodendrocitos) y la disminución progresiva en extensiones del proceso seguido de la muerte de oligodendrocitos inmaduros. La expresión específica de sCD100 en CSF de pacientes con HAM/TSP, y la presencia de numerosos linfocitos T infiltrantes CD100/CD45R0-positivo en su médula espinal (en contraste con otros casos neurológicos), corrobora el efecto potencial nocivo de CD100 en enfermedades desmielinizantes neuroinflamatorias. Los anticuerpos anti-CD100 pueden ser útiles además para evitar la alteración de oligodendrocitos o la alteración de otras células mielinizantes periféricas, y por lo tanto la extensión de los trastornos neurológicos.

En consecuencia, el trastorno inflamatorio del SNC o SNP es preferentemente un trastorno de mielina o una enfermedad que afecta a oligodendrocitos u otras células mielinizantes, por ejemplo células mielinizantes periféricas. Más particularmente, se engloba la prevención o tratamiento de esclerosis múltiple o mielopatía asociada a HTLV-1.

También se pueden citar trastornos neuroinflamatorios de modo más general, así como oligodendrogliomas y leucodistrofias, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Alexander, enfermedad de Canavan, enfermedad de Krabbe, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedad de Zellweger, enfermedad de Refsum, enfermedad de CACH, adrenoleucodistrofia ligada a X, adrenoleucodistrofia, adrenomieloneuropatía o leucodistrofias de origen indeterminado, o polirradiculoneuritis, así como, polirradiculoneuritis crónica.

En otro aspecto de la solicitud, el trastorno es un trastorno de mielina post-traumático, así como lesiones del SNC o SNP, por ejemplo provocadas por lesión o golpe de la médula espinal.

Otro objeto de la solicitud es de este modo un método para estimular la mielinización axonal, método el cual comprende administrar a un paciente que necesite dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente activa de un anticuerpo anti-CD100 BD16 y/o BB18.

## Composiciones farmacéuticas

Los anticuerpos anti-CD100 se pueden formular en composiciones farmacéuticas, para una administración tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraocular, y similar.

Preferentemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada, opcionalmente de forma directa en el sistema nervioso central o en el cerebro, por ejemplo mediante inyección intracerebroventricular para dispersión en otras áreas.

5 Las composiciones farmacéuticas adecuadas pueden ser en particular disoluciones isotónicas, estériles, salinas (fosfato monosódico o disódico, cloruro sódico, potásico, cálcico o magnésico, y similar, o mezclas de dichas sales), o composiciones especialmente liofilizadas, secas, que con la adición de agua o disolución salina fisiológica, dependiendo del caso, permiten la constitución de disoluciones inyectables.

10 Las dosis de anticuerpos anti-CD100 usadas para la administración se pueden adaptar como función de diversos parámetros, y en particular como función del modo de administración usado, de la patología relevante, o alternativamente de la duración deseada del tratamiento.

15 Para preparar composiciones farmacéuticas para terapia de anticuerpos, se puede disolver o dispersar una cantidad eficaz de la proteína en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable.

Los ejemplos de formulaciones farmacéuticas se proporcionan a continuación.

15 Las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD100 en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable.

20 "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción contraria cuando se administra a un animal, o un ser humano, según sea apropiado.

25 Tal como se usa en la presente memoria, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas es bien conocido en la técnica. Excepto en tanto cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar en las composiciones ingredientes activos suplementarios.

30 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o suspensiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o suspensiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el grado en que exista una capacidad de carga fácil en la jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y se debe de conservar frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

35 Las disoluciones de los compuestos activos como base libre o como sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y sus mezclas, y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

40 El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similar), sus mezclas adecuadas, y aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño requerido de partículas en el caso de dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede llevar a cabo mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similar. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede provocar mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

45 Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos de los otros ingredientes enunciados anteriormente, según se requiera, seguido de la esterilización mediante filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enunciados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado a vacío y liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier otro ingrediente deseado a partir de una disolución del mismo filtrado previamente de forma estéril.

50 También se contempla a preparación de disoluciones más concentradas o altamente concentradas para inyección directa, en las que se prevé el uso de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida, suministrando concentraciones elevadas de los agentes activos a una pequeña área tumoral.

Con la formulación, las disoluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad de forma que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármaco y similares.

Para la administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución se debería tamponar adecuadamente si es necesario, y el diluyente líquido se debería hacer en primer lugar isotónico con disolución salina suficiente o con glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, intratecal, intracerebroventricular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que se pueden emplear serán conocidos por los expertos en la materia a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, se podría disolver una dosis en 1 ml de disolución isotónica de NaCl, y se podría añadir a 1000 ml de fluido de hipodermoclasia, o se podría inyectar en el sitio propuesto de infusión (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Será necesario que se produzca alguna variación en la dosificación dependiendo del estado del sujeto a tratar. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

El anticuerpo anti-CD100 se puede formular en una mezcla terapéutica para comprender alrededor de 0,0001 a 1,0 miligramos, o alrededor de 0,001 a 0,1 miligramos, o alrededor de 0,1 a 1,0, o incluso alrededor de 10 miligramos por dosis aproximadamente. También se pueden administrar múltiples dosis.

Además de los compuestos formulados para la administración parenteral, tal como la inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; formulaciones liposómicas; cápsulas de liberación en el tiempo; y cualquier otra forma usada actualmente, incluyendo cremas.

Se contemplan otras vías de administración, incluyendo disoluciones nasales o pulverizaciones, aerosoles o inhalantes, o supositorios y pesarios vaginales o rectales.

En ciertas formas de realización, se contempla el uso de liposomas y/o nanopartículas para la introducción de los anticuerpos. La formación y uso de liposomas es generalmente conocida por los expertos en la materia, y también se describe más abajo.

Las nanocápsulas pueden atrapar generalmente compuestos de una manera estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debido a la sobrecarga polimérica intracelular, se deberían diseñar partículas ultrafinas (de un tamaño de alrededor de 0,1  $\mu\text{m}$ ) usando polímeros capaces de ser degradados in vivo. Se contemplan nanopartículas de polialquilcianoacrilato biodegradables que satisfacen estos requisitos para su uso en la presente solicitud, y dichas partículas se pueden obtener fácilmente.

Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilaminares (también denominadas vesículas multilaminares (MLVs)). Las MLVs tienen generalmente diámetros de 25 nm a 4  $\mu\text{m}$ . El tratamiento con ultrasonidos de las MLVs da como resultado la formación de vesículas unilaminares pequeñas (SUVs), con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å, que contienen una disolución acuosa en el núcleo.

La siguiente información también se puede utilizar para generar formulaciones liposómicas. Los fosfolípidos pueden formar una variedad de estructuras distintas de liposomas cuando se dispersan en agua, dependiendo de la relación molar de lípido a agua. A relaciones bajas, la estructura preferida es el liposoma. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, de la fuerza iónica y de la presencia de cationes divalentes. Los liposomas pueden mostrar una baja permeabilidad a sustancias iónicas y polares, pero a temperaturas elevadas sufren una transición de fase que altera notablemente su permeabilidad. La transición de fase implica un cambio desde una estructura ordenada, estrechamente empaquetada, conocida como estado de gel, a una estructura menos ordenada, débilmente empaquetada, conocida como estado fluido. Esto se produce como una temperatura característica de transición de fase, y da como resultado un incremento en la permeabilidad a iones, azúcares y fármacos.

Los liposomas interactúan con células mediante cuatro mecanismos diferentes: endocitosis mediante células fagocíticas del sistema reticuloendotelial, tales como macrófagos y neutrófilos; adsorción a la superficie celular, ya sea mediante fuerzas hidrofóbicas o electrostáticas débiles no específicas, o mediante interacciones específicas con componentes de la superficie celular; fusión con la membrana celular plasmática mediante inserción de la bicapa lipídica del liposoma en la membrana plasmática, con liberación simultánea de los contenidos liposómicos en el citoplasma; y mediante transferencia de lípidos liposómicos a la membrana celular o subcelular, o viceversa, sin ninguna asociación de los contenidos liposómicos. Variando la formulación liposómica se puede alterar cuál mecanismo está operativo, aunque puede operar más de uno al mismo tiempo.

#### Diagnóstico

Se demostró la presencia de sCD100 en el fluido cerebroespinal (CSF) y linfocitos T activados que expresan CD100

en cerebros post-mortem de pacientes con HAM/TSP.

Basándose en esto, la presente solicitud proporciona un método *in vitro* para diagnosticar o determinar la evolución de un trastorno inflamatorio del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP), método que comprende evaluar una semaforina CD100 en una muestra biológica de un sujeto de ensayo, en comparación con el nivel de una semaforina CD100 en una muestra biológica de un sujeto control, en el que un mayor nivel de CD100 es indicativo de dicho trastorno o de un mal pronóstico, en el que el ensayo es un inmunoensayo que emplea un anticuerpo anti-CD100 BD16 y/o BB18, una forma quimérica o humanizada del mismo, o un fragmento del mismo.

Una "muestra biológica" es un fluido procedimiento de un sujeto, incluyendo suero, plasma, sangre, fluido espinal, fluido cerebroespinal, orina, ascitis, efusión pleural, fluido amniótico, lágrimas o saliva, o un extracto tisular o una biopsia de tejido u órgano tal como cerebro, médula espinal o nervios.

"Un sujeto" o "un paciente" es un vertebrado, por ejemplo un mamífero, preferentemente un ser humano, independientemente de su edad, sexo y estado general. También están englobados los niños e infantes. El sujeto de ensayo puede estar asintomático, o se puede considerar que es probable que desarrolle la enfermedad o afección. Los sujetos con sospecha de trastorno mielínico, o los sujetos que ya han mostrado síntomas de la enfermedad o afección, también se pueden ensayar. Los sujetos que están predispuestos a desarrollar naturalmente un trastorno inflamatorio del SNC o SNP son una diana preferida.

El "sujeto de control" puede ser un sujeto sano o un sujeto sin ningún trastorno mielínico. A fin de determinar la evolución de una enfermedad inflamatoria del SNC o SNP, puede ser muy útil ensayar un sujeto para determinar la expresión de CD100 o de un receptor del mismo, y monitorizar el efecto de un fármaco o la diseminación de la afección, ensayándolo una segunda vez, por ejemplo unas pocas semanas más tarde. En este caso, los resultados del segundo ensayo se comparan con los resultados del primer ensayo, y en general también con los resultados obtenidos con un sujeto "sano". El "sujeto de control" se refiere entonces al mismo sujeto de ensayo o a un "sujeto sano".

"Un trastorno inflamatorio del SNC o SNP" incluye cualquier trastorno neuroinflamatorio, trastorno mielínico, o enfermedad que afecta a oligodendrocitos, o a otras células periféricas mielinizantes como se describe anteriormente. Se contempla más particularmente el diagnóstico o monitorización de la evolución de esclerosis múltiple o mielopatía asociada a HTLV-1. El método *in vitro* proporcionado en la presente memoria es particularmente ventajoso para este fin, por cuanto hace posible ensayar fácil y rápidamente CD100 en una muestra de fluido, tal como por ejemplo una muestra de CSF.

En una forma de realización preferida, la solicitud proporciona un método *in vitro* para diagnosticar o monitorizar en un paciente una mielopatía asociada a HTLV-1, en el que se ensaya la semaforina CD100 en una muestra de CSF del paciente por medio de una técnica ELISA que emplea un anticuerpo anti-CD100 BD16 y/o BB18, una forma quimérica o humanizada del mismo, o una forma humana del mismo, así como sus fragmentos.

El término "diagnóstico" se refiere a la determinación o a la confirmación de una enfermedad o afección en un sujeto. La expresión "mal pronóstico" significa que la afección ha empeorado.

Los métodos para inmunoensayar la proteína semaforina CD100 o un receptor de la misma son bien conocidos por un experto en la materia. Dichos ensayos incluyen ensayos de competición, de reacción directa, o de tipo sándwich. Se pueden emplear diversas técnicas que incluyen transferencias Western, inmunoensayos marcados y mediados por enzimas, tales como ELISA; radioinmunoensayos; inmunolectroforesis; inmunoprecipitación, etc. Se prefieren los ELISA. Las reacciones generalmente incluyen revelar marcadores tales como marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes, radioactivos, enzimáticos, o moléculas colorantes, u otros métodos para detectar la formación de un complejo entre el antígeno y el anticuerpo o anticuerpos que han reaccionado con él.

Los ensayos mencionados anteriormente implican generalmente la separación de CD100 sin unir en una fase líquida de un soporte en fase sólida al que se unen los complejos de antígeno-anticuerpo. Los soportes sólidos que se pueden usar en la práctica de la solicitud incluyen sustratos tales como nitrocelulosa (por ejemplo, en forma de membrana o de pocillo de microtitulación); policloruro de vinilo (por ejemplo, láminas o pocillos de microtitulación); látex de poliestireno (por ejemplo, perlas o placas de microtitulación); polifluoruro de vinilideno; papel diazotado; membranas de nailon; perlas activadas; perlas magnéticamente sensibles, y similares.

Típicamente, en primer lugar se hace reaccionar un soporte sólido con un componente de fase sólida (es decir, un anticuerpo anti-CD100) en condiciones de unión adecuadas de manera que el componente se inmoviliza suficientemente al soporte según métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Después de hacer reaccionar el soporte sólido con el componente de fase sólida, se eliminan del soporte mediante lavado cualesquiera componentes de fase sólida no inmovilizados, y el componente unido al soporte se pone en contacto entonces con una muestra biológica que se sospecha que contiene restos ligandos (es decir, moléculas CD100 para los anticuerpos inmovilizados) en condiciones de unión adecuadas. Después de lavar para eliminar cualquier ligando no unido, se añade un resto ligante secundario en condiciones de unión adecuadas, en el que el ligante secundario es

capaz de asociarse selectivamente con el ligando unido. La presencia del ligante secundario se puede detectar entonces usando técnicas bien conocidas en la técnica.

Más particularmente, se puede usar un método de ELISA, en el que los pocillos de una placa de microtitulación se revisten con un anticuerpo anti-CD100. Entonces se añade a los pocillos revestidos una muestra biológica que contiene o se sospecha que contiene moléculas CD100. Después de un período de incubación suficiente para permitir la formación de complejos de anticuerpo-antígeno, la placa o las placas se pueden lavar para eliminar restos no unidos, y se puede añadir una molécula de unión secundaria marcada detectablemente. La molécula de unión secundaria se deja reaccionar con cualquier molécula CD100 de la muestra capturada, la placa se lava, y se detecta la presencia de la molécula de unión secundaria usando métodos bien conocidos en la técnica.

De este modo, en una forma de realización particular, se puede detectar fácilmente la presencia de moléculas CD100 unidas a partir de una muestra biológica usando un ligante secundario que comprende otro anticuerpo, que se puede conjugar fácilmente a un marcador enzimático detectable, tal como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o ureasa, usando métodos conocidos por los expertos en la materia. Entonces se usa un sustrato enzimático apropiado, para generar una señal detectable. En otras formas de realización relacionadas, se pueden usar técnicas de ELISA de tipo competitivo usando métodos conocidos por los expertos en la materia.

Los ensayos también se pueden llevar a cabo en disolución, de manera que los polipéptidos antigénicos y los anticuerpos específicos para estas proteínas forman complejos en condiciones precipitantes. En una forma de realización particular, los anticuerpos se pueden adherir a una partícula de fase sólida (por ejemplo, una perla de agarosa o similar) usando técnicas de acoplamiento conocidas en la técnica, tal como acoplamiento químico directo o acoplamiento indirecto. La partícula revestida con el anticuerpo se pone en contacto entonces en condiciones de unión adecuadas con una muestra biológica que se sospecha que contiene moléculas CD100. Los complejos de partícula-antígeno-anticuerpo se agregan y se pueden hacer precipitar y se separan de la muestra usando lavado y/o centrifugación. La mezcla de reacción se puede analizar para determinar la presencia o ausencia de complejos de anticuerpo-antígeno usando cualquiera de un número de métodos estándar, tales como los métodos de inmunodiagnóstico descritos anteriormente.

Los reactivos de los ensayos descritos anteriormente, incluyendo los anticuerpos anti-CD100, se pueden proporcionar en kits, con instrucciones adecuadas u otros reactivos necesarios, a fin de llevar a cabo inmunoensayos como se describe anteriormente. El kit también puede contener, dependiendo del inmunoensayo particular usado, marcadores adecuados y otros reactivos y materiales empaquetados (es decir, tampones de lavado y similares). Los inmunoensayos estándar, tales como los descritos anteriormente, se pueden llevar a cabo usando estos kits.

Las figuras y ejemplos ilustran la invención.

### Leyendas de las figuras

Figura 1: Muerte inducida por CD100 en precursores neuronales humanos. Esta figura muestra muerte apoptótica en precursores neuronales humanos tras el contacto transitorio con linfocitos T productores de CD100 (células positivas para TUNEL) o tratamiento con proteína recombinante CD100 soluble (células positivas a caspasa-3 activa) (48 h post-tratamiento). Se representa (media  $\pm$  SEM, experimento representativo) el recuento (AnalySIS®) de células totales (barra no rayada) y células positivas a caspasa-3 activa (barra rayada).

Figura 2: Alteración del proceso oligodendrocítico inducida por CD100. Esta figura muestra la pérdida progresiva de extensiones del proceso en oligodendrocitos (OL) de rata inmaduros tras el contacto transitorio con linfocitos T productores de CD100 o el tratamiento con proteína recombinante CD100 soluble (24 h y 48 h post-tratamiento). La medida del proceso de OL se representa después de cada tratamiento (media  $\pm$  SEM, 10-20 medidas, 3 experimentos).

Figura 3: Muerte de OL inmaduros inducida por CD100. Esta figura muestra que el contacto transitorio con linfocitos T productores de CD100 o el tratamiento con proteína recombinante CD100 soluble indujo la pérdida de OL (48 h post-tratamiento). Se representa la pérdida total de OL después de cada tratamiento (media  $\pm$  SEM OL por campo, experimento representativo).

Figura 4: Implicación de CD100 en la muerte inducida por células T en precursores neuronales y oligodendrocitos. Esta figura muestra la reducción de la muerte inducida por células T en precursores neuronales (Figura 4A) y oligodendrocito mediante tratamiento con anticuerpo BD16 que bloquea CD100. Las Figuras 4B y 4C muestran que el tratamiento con proteína recombinante sCD100 imitó la muerte inducida por células T de precursores neuronales (B) y de oligodendrocitos (C) de manera dependiente de la dosis.

Figura 5: Implicación de plexina-B en la muerte de precursores neuronales inducida por células T. A - Reducción de la muerte de células neuronales por anticuerpo anti-plexina-B1; ningún efecto de anticuerpo anti-neuropilina 1 (recuento de células positivas a caspasa-3 activa: media  $\pm$  SEM por campo). B - Detección, mediante RT-PCR, de

Sema3A mRNA en células neuronales pero no en células T. C - Detección mediante RT-PCR y digestión con enzimas de restricción de ARNm de la familia de plexinas B en células neuronales humanas: Pst1 y Sau-3AI generaron productos de 171 pb y 129 pb, o 205 pb y 95 pb, respectivamente, a partir del producto de 300 pb común al gen de plexina-B1, plexina-B2 y plexina-B3. D - Plexina-B1 inmunodetectada (análisis FACS) en precursores neuronales humanos.

Figura 6: Niveles de sCD100 UI/ml en sujetos normales o pacientes con enfermedades neuroinflamatorias (MS = esclerosis múltiple; PRN = polirradiculoneuritis).

**Ejemplos**

**Ejemplo 1: Bloqueo de progenitor neuronal y apoptosis de oligodendrocitos por anticuerpo BD16 anti-CD100 en mielopatía asociada a HTLV-1**

Métodos

Para imitar una conversación cruzada entre células neuronales e inmunitarias, se usó un paradigma experimental que consiste en cocultivos transitorios de linfocitos T crónicamente activados (infectados con HTLV-1, no productores de virus) con precursores neuronales multipotentes humanos u oligodendrocitos primarios de rata. Dicho contacto celular imita la interacción que se produce en el cerebro entre células T activadas y oligodendrocitos o progenitores neuronales multipotentes capaces de diferenciarse, en adulto, en oligodendrocitos. La importancia fisiológica de los datos experimentales se examinó analizando la médula espinal y CSF post-mortem de pacientes que sufren enfermedad neuroinflamatoria, mielopatía asociada con HTLV-1 (HAM/TSP).

Modelo de interacción de célula T con célula neuronal: La estirpe celular de precursor neuronal pluripotente humano Dev tiene la capacidad para diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Derrington *et al.*, 1998; Buzanska *et al.*, 2001). El cultivo primario de gliocitos de rata (Szymocha *et al.*, 2000) contenía 35-54% de oligodendrocitos, correspondiendo las células restantes a astrocitos positivos a proteína fibrilar ácida glial (GFAP). Los oligodendrocitos (OL) comprendían las distintas etapas fenotípicas de oligodendrocitos identificadas mediante un panel de anticuerpos específicos de células (inmunoquímica o citometría de flujo, véase más abajo): pre-OL (precursor de OL) que expresa NG2 (10-15%), OL inmaduro que expresa galactocerebrósido (GalCer, 17-25%) y fosfodiesterasa nucleotídica cíclica (CNPasa), OL maduro (OL premielinizante) que expresa glucoproteína asociada a mielina ((MAG, 3-15%) y proteína básica de mielina (MBP).

Estas células neuronales se cocultivaron transitoriamente (Giraudon *et al.*, 2000) con: 1 - la estirpe de células T no productora de virus CD4+CD25+ humana C8166/45 activada mediante infección con HTLV-1 (Popovic *et al.*, 1983) que liberó CD100 soluble (sCD100) detectada mediante ELISA (Hall *et al.*, 1996) (1400 ng/ml); 2 - la estirpe de células T CD4+ no activadas CEM. Las células T se eliminaron mediante lavado del cultivo neuronal, y su eliminación se verificó mediante la ausencia del antígeno CD4 (citometría de flujo). Las células neuronales también se trataron con CD100 soluble recombinante (sCD100r) (concentración 0,6-10 ng/μl) procedente de células Jurkat transfectadas (que producen 800 ng/ml), usada como tal o purificada en una columna de mAb BB18 anti-CD100. Los experimentos se repitieron tres veces.

Pacientes: Las muestras de tejido de SNC procedentes de 3 pacientes con HAM/TSP y 2 pacientes no infectados (enfermedad de Parkinson, accidente de coche) se examinaron en busca de células T que expresan CD100. Las médulas espinales embebidas en parafina se examinaron usando detección habitual (hematoxilina-eosina-azafrán) y Luxol Fast Blue para la detección de mielina. La médula espinal de estos pacientes presentó atrofia moderada a notable a nivel torácico, engrosamiento de las leptomeninges, infiltrados perivasculares de células inmunitarias, como se describió previamente en Cartier *et al.*, 1997. En los tres casos se observó degeneración de los tractos corticoespinal lateral y espinocerebeloso, pérdida difusa de mielina y axones y astrocitosis. Características de los pacientes con HAM/TSP:

	Edad/sexo	Duración de la enfermedad	Causa de la muerte	inflam.	Neuropatología del SNC Pérdida de mielina/axonal	atrofia
Caso 1:	62/F	15 años	Embolia pulmonar	+++	+++	+++
Caso 2:	35/H	4 años	Trombosis mesentérica	++	+++	++
Caso 3:	65/F	8 años	Neumonía	+	+	+

El CSF de pacientes que sufre TSP/HAM (9), meningitis (4) o encefalomiелitis (3) se examinó para determinar la presencia de sCD100 mediante un ELISA de sándwich como se describe previamente en Delaire *et al.*, 2001. Todos los pacientes que sufren HAM/TSP ensayados fueron positivos para el provirus HTLV-1.

Inmunodetección: Los astrocitos y oligodendrocitos se identificaron mediante inmunofluorescencia, en citometría de flujo o en soportes de cultivo (Bougeret *et al.*, 1992; Herold *et al.*, 1995), con anticuerpos monoclonales (anti-CNPasa, Sigma; anti-GalCer, anti-NG2, Chemicon Int.; anti-MAG, Boehringer Mannheim; anti-MBP, Serotec) o anticuerpo policlonal de conejo (anti-GFAP, Dako). Los receptores de semaforina se detectaron con anticuerpo monoclonal anti-

plexina-B1 humana (N18-Tebu) y anticuerpo policlonal de conejo que bloquea neuropilina-1 anti-MAM (Bagnard *et al.*, 2001). Los linfocitos T se detectaron en secciones de médula espinal en pacientes que sufren HAM/TSP mediante inmunofluorescencia con anticuerpo monoclonal anti-CD45RO (clon UCHL1, Dako), y un antisuero policlonal anti-CD100, dirigido contra la porción intracelular de la proteína (AA799-813). Después de desparafinar con tolueno y etanol, las secciones se incubaron en disolución de bloqueo (1% de BSA, 0,3% de triton, 1 h), y después con anticuerpos específicos (4°C/toda la noche). Entonces se aplicaron los anticuerpos marcados con Alexa546 anti-ratón o marcados con Alexa488 anti-conejo (Molecular Probes).

Detección de ARN: Los ARNm se detectaron mediante extracción seguido de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y transferencia Southern usando sondas oligonucleotídicas internas marcadas en el extremo 5' con [<sup>33</sup>P]dATP, como se describe previamente en Szymocha *et al.*, 2000. Los cebadores oligonucleotídicos se escogieron de sus secuencias de ARNm (números de acceso de GenBank HSU60800 para CD100, NM002663 para plexina-B1, NM012401 para plexina-B2, AF149019 para plexina-B3, L26081 para Sema-3A, NM01101 para β-actina, usado como control). Se seleccionó un conjunto de oligómeros para la amplificación de un amplicón común de 300 pb en el ARNm de las tres plexinas-B.

Análisis de apoptosis: En cada experimento, se detectó la muerte apoptótica mediante el método TUNEL (marcaje con dUTP de los extremos terminales cortados mediado por desoxinucleotidil transferasa) llevado a cabo en soportes de cultivo (Promega), inmunodetección de la caspasa ejecutora, caspasa-3 activa (suero de conejo - Pharmigen) y detección de anticuerpos apoptóticos con Dapi (4',6-diamidino-2 fenilindol, Sigma, 1 µg/ml) que tiñe el núcleo. También se llevó a cabo la codetección de marcadores de OL, caspasa-3 activa y TUNEL.

Análisis estadístico: Se contaron las células totales (que se tiñen con Dapi), las células de TUNEL y las células positivas a caspasa-3 activa en precursores neuronales y gliocitos primarios (15-20 campos del microscopio, 800-1000 células, 3 experimentos) usando el software AnalySiS 3.2. La medida del número y longitud del proceso de oligodendrocitos se llevó a cabo usando el mismo software. Los valores se expresaron como media ± SEM. La diferencia entre grupos se calculó con la prueba de la t de Student.

## Resultados

Se investigó el efecto de CD100 soluble sobre precursores neuronales pluripotentes humanos y sobre oligodendrocitos primarios de rata analizando la morfología y supervivencia de células neuronales tras el contacto con células T crónicamente activadas que producen un nivel elevado de sCD100, C8166/45, o las células T no activadas y no productoras de CD100, CEM. La muerte apoptótica de los precursores neuronales humanos se indujo mediante las células T C8166/45, como se pone de manifiesto a las 48 h después del contacto con las células T mediante la presencia de cuerpos apoptóticos en células positivas a TUNEL y mediante detección, usando inmunofluorescencia, de un mayor número de células positivas a caspasa-3 activa (25,5 ± 8,8 células positivas por campo frente a 11,3 ± 3,7 en células no tratadas) en tres experimentos independientes (figura 1, un experimento representativo). Esto corroboró la disminución del número de células totales (pérdida de células neuronales de 24,4 ± 4,4% a las 48 h después del contacto con células T, y 58,5 ± 9,2% a las 72 h). Las células T CEM no tuvieron ningún efecto sobre estos precursores neuronales.

Las células T que producen CD100 también indujeron daños en cultivo de gliocitos primarios de rata. Se observó un colapso progresivo y pérdida de extensiones del proceso en células positivas para GalCer (OL inmaduro). La longitud y número de extensiones del proceso de estos OL inmaduros se redujo progresivamente 24 h y 48 h después del contacto (figura 2), como se revela en tres experimentos independientes mediante la medida relativa de su longitud (1,1 ± 0,1 µm frente a 2,7 ± 0,2 µm en cultivo de gliocitos no tratados a 48 h) y el recuento de los procesos (1,3 ± 0,2 procesos por célula frente a 4,3 ± 0,5 en cultivo de gliocitos no tratados a 48 h). Además, se observó muerte apoptótica a 48 h mediante la detección de células positivas a TUNEL y el recuento de las células positivas a caspasa-3 activa (19,7 ± 8,1 por campo frente a 7,3 ± 5,5 en cultivos no tratados, 3 experimentos). Esto dio como resultado la pérdida de una parte de la población oligodendrocítica, como se muestra mediante el número reducido de oligodendrocitos por campo (figura 3-, un experimento representativo) y la reducción del porcentaje de oligodendrocitos totales en el cultivo de gliocitos (pérdida de 26,8 ± 3,6% a 48 h, 3 experimentos). De forma interesante, pre-OL (positivos para NG2) y OL maduro (positivos para MBP, figura 3-B) no fueron sensibles a muerte apoptótica inducida por células T, en contraste con OL inmaduro (positivos para GalCer). El número y morfología de astrocitos no cambió. Las células T CEM no tuvieron ningún efecto sobre los precursores neuronales ni sobre el cultivo de gliocitos.

Varias líneas de pruebas indican que sCD100 estuvo implicado en estos daños inducidos por células T. El mAb BD16 anti-CD100 fue capaz de antagonizar los efectos inducidos por células T sobre precursores neuronales y OL inmaduro cuando se añade en cocultivos. De hecho, el anticuerpo BD16 disminuyó drásticamente, de manera dependiente de la dosis, el número de precursores neuronales apoptóticos a las 48 h después del contacto con las células T (figura 4-A) y redujo la pérdida celular (41,5 ± 0,7% a 72 h frente a 62 ± 7,1% en cocultivo no tratado con anticuerpo). De forma similar, el tratamiento del cocultivo de rata con anticuerpo BD16 redujo el número de células positivas a TUNEL y OL inmaduro rescatado (células positivas para CNPasa). Esto dio como resultado una disminución de la pérdida de oligodendrocitos inducida por células T (15,5 ± 4,9% frente a 26,4 ± 5,4% en cocultivo

no tratado con anticuerpo).

El efecto directo de CD100 se demostró tratando las células neuronales con sCD100 recombinante (sCD100r, 0,6-10 ng/μl, tres experimentos), liberado como un dímero a partir de células Jurkat transfectadas (Delaire *et al.*, 2001). De forma similar al contacto con células T productoras de CD100, el tratamiento con sCD100r indujo apoptosis de precursores neuronales como se demuestra por el mayor número de células positivas a caspasa-3 activa (25,3 ± 3,6 por campo en cultivo tratado con 4,2 ng/μl sCD100r frente a 11,1 ± 2,3 en cultivo no tratado) (figura 1- un experimento representativo) y pérdida de estos precursores (43,5 ± 13,4% de pérdida celular a las 72 h). sCD100r indujo apoptosis de precursores neuronales de una manera dependiente de la dosis como se muestra en la figura 4-B. El tratamiento de cultivo primario de gliocitos con sCD100r (tres experimentos) también dio como resultado daño y apoptosis de oligodendrocitos (figuras 2, 3, 4). Se detectó una disminución en el número de procesos (1,4 ± 0,2 procesos por oligodendrocito a 48 h frente a 5,3 ± 0,4 en cultivo sin tratar) y su longitud relativa (1 ± 0,2 μm a 48 h frente a 2,1 ± 0,3 μm en cultivo no tratado) en OL inmaduro (positivos para GalCer, figura 2). Esto fue seguido de un mayor número de oligodendrocitos que expresan caspasa-3 activa (15 ± 2,3 células positivas por campo en cultivo tratado con 4,2 ng/μl sCD100r frente a 6 ± 1,9 células positivas en cultivo no tratado). De hecho, sCD100r redujo el número de oligodendrocitos por campo, como se muestra en la figura 3 (un experimento representativo), y el número de oligodendrocitos totales (29 ± 4% de pérdida a 48 h después del tratamiento). Una mayor dosis de sCD100r (10 pg/μl) indujo la muerte del 37% de oligodendrocitos totales y el 64% de precursores neuronales a las 72 h. El marcaje doble (marcadores de TUNEL y de OL) indicó que el OL inmaduro fue sensible a sCD100r de forma similar a las células T productoras de CD100. También se observó que sCD100r indujo apoptosis de oligodendrocitos de una manera dependiente de la dosis (figura 4-C). Por el contrario, no se observó ningún cambio detectable en astrocitos. El tratamiento de estas células neuronales humanas y de rata con un sobrenadante de Jurkat transfectado permanentemente con una molécula no relacionada, CD27 (sControl), no indujo ningún cambio.

CD100 pudo mediar su efecto a través de receptores de las familias de neuropilinas y plexinas presentes en células inmunitarias y neuronales. Las neuropilinas actúan como correceptores con plexinas, mientras que las plexinas solas se comportan como transductores de señales completamente funcionales para las formas tanto transmembránicas como segregadas de semaforinas (Tamagnone *et al.*, 1999). Puesto que neuropilina-1 está presente en precursores neuronales humanos y media la apoptosis de estas células inducida por Sema 3A (Bagnard *et al.*, 2001), la neuropilina-1 y Sema-3 se podrían sospechar en la apoptosis de precursores neuronales inducida por células T. Sin embargo, cuando se añade en el cocultivo de células neuronales con células T, el anticuerpo que bloquea neuropilina-1 anti-MAM (anti-NPL-1), que se demostró que bloquea la muerte de precursores neuronales inducida por Sema 3A (Bagnard *et al.*, 2001), no tuvo ningún efecto significativo sobre la tasa de muerte inducida por células T productoras de CD100 (figura 5-A). Además, se descartó la posibilidad de un efecto del anticuerpo BD16 anti-CD100 sobre la actividad de Sema 3A (Delaire *et al.*, 2001), por la ausencia de la expresión de Sema 3A en células T (RT-PCR, figura 5-B). Estas observaciones excluyeron la implicación de neuropilina-1/Sema 3A en la muerte mediada por células T. Se investigó adicionalmente la implicación de plexinas, en particular plexina-B1 identificada como un receptor para sCD100 (Derrington *et al.*, 1998). La presencia de ARNm que codifica plexina-B1, B2 o B3 en precursores neuronales humanos y en la corteza fetal humana (usada como control positivo) se comprobó mediante RT-PCR. Teniendo en cuenta la elevada homología de la secuencia de ARN entre estas tres plexinas, se seleccionaron oligómeros en busca de su capacidad para amplificar un amplicón común de 300 pb en precursores neurales y cerebro fetal humano. Los amplicones se identificaron adicionalmente mediante las enzimas de restricción PstI y Sau-3AI, que pueden generar productos de 171 pb y 129 pb en los amplicones de plexina-B1 y de plexina-B3, y productos de 205 pb y 95 pb en los amplicones de plexina-B1 y de plexina-B2, respectivamente. Como se muestra en la figura 5-C, PstI generó los productos esperados a partir del amplicón de 300 pb, demostrando la presencia, en precursores neuronales humanos, de ARNm de plexina-B1 o -B3, y en menor medida de -B2, como se muestra en la corteza fetal humana. La presencia de plexina-B1 en la membrana celular se confirmó mediante inmunodetección en precursores neuronales vivos y mediante citometría de flujo en 50-54% de células (figura 5-D). El tratamiento de precursores neuronales con el anticuerpo anti-plexina-B1, a través del cocultivo, redujo significativamente el número de células neuronales apoptóticas (figura 5-A) y la pérdida celular (5% frente a 25,4% en cocultivo no tratado, a las 48 h), indicando su posible implicación en esta apoptosis mediada por células T productoras de CD100. La ausencia de efecto anti-plexina-B1 sobre la apoptosis de oligodendrocitos mediada por células T (a pesar de la expresión de plexina-B1) podría ser debida a la incapacidad del anticuerpo anti-plexina-B1 humana para bloquear plexina-B1 de rata, o a la implicación de otro receptor de plexina.

De este modo, estas observaciones demostraron que sCD100 producida por linfocitos T activados altera gravemente OL inmaduros y precursores neuronales humanos, identificando a la semaforina como una molécula de la conversación cruzada de células T con células neuronales durante la inflamación. La importancia funcional de estos datos experimentales se investigó en pacientes que sufren enfermedad neuroinflamatoria, en comparación con pacientes con otra enfermedad neurológica.

Se estudiaron particularmente pacientes que sufren HAM/TSP, puesto que sCD100 es liberada en grandes cantidades por linfocitos T infectados crónicamente con HTLV-1. La expresión de sCD100, analizada en el fluido cerebroespinal (CSF) de pacientes con HAM/TSP (n = 9), meningitis (n = 4) o encefalomiелitis (n = 3) mediante ELISA, reveló la presencia de sCD100 a un nivel de 97,7 ± 23,1 μg/ml en CSF con HAM/TSP (Tabla 1).

Tabla 1: CD100 soluble en el CSF de pacientes con HAM/TSP detectada mediante ELISA (Hall *et al.*, 1996). Los pacientes con otras enfermedades neurológicas fueron negativos para la detección de CD100 en CSF

Nº de paciente con HAM/TSP	CD 100 (ng/ml)
1	132,6 ± 29,9
2	66,6 ± 14,2
3	158,3 ± 17,2
4	79,6 ± 36,3
5	123,9 ± 42,7
6	60 ± 9,9
7	62,9 ± 14,2
8	57,9 ± 16,3
9	75 ± 27,6

5 Esto contrastó enormemente con CSF con meningitis y encefalomielitis, en el que CD100 fue indetectable. De forma interesante, estos niveles de sCD100 son comparables a los encontrados en células T activadas con reticulación de CD3 (40 ng/ml). Las células T presentes en CSF de pacientes con HAM/TSP, que son activadas crónicamente por la proteína vírica Tax (Moritoyo *et al.*, 1999), y producen un nivel elevado de MMP, podrían ser una fuente de expresión de sCD100 detectable en estos pacientes, y no en pacientes con enfermedad no neuroinflamatoria. Además, se detectaron células infiltrantes positivas para CD100 en SNC post-mortem procedente de tres pacientes con HAM/TSP. En estos pacientes, el nivel de infiltración de células inmunitarias se correlaciona con el grado de pérdida mielínica/axonal y atrofia de la médula espinal (véase la sección de Materiales). El análisis de células inmunitarias que se infiltran en la médula espinal de estos pacientes, usando anti-CD100 y anti-CD45RO, un marcador de células T activadas, mostró la coexpresión de estas moléculas. La densidad más elevada de linfocitos T doblemente marcados se encontró en las meninges y alrededor de los vasos sanguíneos. También se observaron linfocitos T doblemente marcados en parénquima tanto en las materias gris como blanca. De forma interesante, se reveló astrocitosis en la materia blanca y alrededor de los vasos sanguíneos mediante inmunotinción con GFAP, y se detectó la metaloproteínasa MMP-9 en astrocitosis en uno de estos pacientes con HAM/TSP en un trabajo previo<sup>22</sup>. Por el contrario, hay pocos linfocitos T positivos para CD45RO pero todos negativos para CD100 en médulas espinales de pacientes no infectados.

Estos resultados muestran que los linfocitos T que producen sCD100 indujeron apoptosis de progenitores neuronales y oligodendrocitos inmaduros tras una disminución progresiva de sus extensiones del proceso. El bloqueo por anticuerpos específicos de sCD100 procedente de células T activadas demostró que esta semaforina inmunitaria tiene la capacidad para disparar la alteración del proceso de oligodendrocitos y la apoptosis de células neuronales probablemente a través del receptor de la familia de plexinas. La presencia de sCD100 en el CSF y de linfocitos T que expresan CD100 que se infiltran en la médula espinal de pacientes con HAM/TSP indican el efecto nocivo potencial de sCD100 en el SNC durante la inflamación.

30 **Ejemplo 2: BB18 induce la internalización de CD100**

Debido a que CD100 de la membrana (mCD100) está disminuida desde la superficie de células T en reposo por la adición de mAb BD16 o BB18 anti-CD100, se estudió el destino de CD100 tras su marcaje de superficie con biotina.

35 PBMC humanas recientemente aisladas se marcaron en la superficie con biotina. Las células se incubaron entonces con el mAb del ascitis indicado (dilución final 1/100) o con PMA (1 ng/ml). Después de 1 hora de incubación, los sobrenadantes celulares se recogieron y se suplementaron con inhibidores de proteasas, se sometieron a filtración para eliminar el desecho celular, seguido de inmunoprecipitación con una mezcla de mAb BD16 y BB18. Paralelamente, las células se lavaron dos veces con PBS enfriado con hielo, y se lisaron en tampón de lisis a base de NP40 más inhibidores de proteasas antes de la inmunoprecipitación con la mezcla BD16/BB18. La CD100 ipp se sometió a SDS-PAGE y transferencia Western usando el método de detección de estreptavidina conjugada con peroxidasa. Se obtuvieron resultados similares con PBMC aisladas de la mayoría de los individuos ensayados.

45 De este modo, se detectó una forma soluble de CD100 (sCD100) a partir de los sobrenadantes de cultivo de células incubadas con BD16, o con el éster de forbol PMA, mientras que la incubación de células T en reposo con BB18 provocó más bien la internalización de la molécula.

**Ejemplo 3: Detección de sCD100 en enfermedades neuroinflamatorias**

50 Se ensayaron (ELISA) adicionalmente 45 sueros y 22 plasmas (recogidos en EDTA) procedentes de individuos normales para determinar la presencia de CD100 soluble. Mientras que el nivel de sCD100 en plasma fue indetectable en la mayoría de ellos (18/22), se pudo medir el nivel de sCD100 en el suero con una media de 121 nanogramos/ml y una desviación estándar de 26 ng/ml. Esto se llevó a cabo en comparación con una sCD100 estándar tras la purificación de sCD100 procedente de una estirpe celular transfectada, que produce niveles elevados de sCD100 que se purificó en una columna de afinidad con mAb BB18.

Seguidamente se usó un ensayo con una sCD100 patrón diferente (liofilizada), dando el valor de CD100 en Unidades Internacionales (UI) por ml. De este modo, se pudieron medir los niveles de sCD100 en los sueros de pacientes con esclerosis múltiple (MS). El nivel de sCD100 en suero con MS (21,66 UI/ml, SD 4,52) fue por lo menos doble del nivel observado en individuos normales (5,60 UI/ml, SD 3,55). Además, se ensayó el plasma de 5 pacientes con polirradiculoneuritis (PRN) en crisis. El nivel de sCD100 fue incluso mayor (33,84 UI/ml, SD 22,88), mientras que el nivel de sCD100 en personas normales fue insignificante (1,91 UI/ml, SD 1,38). Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 6.

Estos datos confirman que sCD100 tiene un efecto nocivo sobre el sistema nervioso, particularmente en enfermedades neuroinflamatorias que implican células mielinizantes tales como HAM (mielopatía asociada A HTLV1), MS y PRN.

Estos datos apoyan además el uso de anticuerpos neutralizantes anti-CD100, tales como anticuerpos monoclonales BD16 o BB18, para prevenir o inhibir el efecto de sCD100.

El método de ELISA anterior proporciona una forma fácil para monitorizar la evolución y crisis que se produce por ejemplo con MS o HAM.

## 20 Referencias

- Aujame *et al.*, Human Antibodies 8:155-168 (1997)
- Bagnard D, Vaillant C, Khuth ST, *et al.* Semaphorin 3A-vascular endothelial growth factor-165 balance mediates migration and apoptosis of neural progenitor cells by the recruitment of shared receptor. J Neurosci 2001;21(10): 3332-41.
- Barbas *et al.*, Trends in Biotechnol. 14:230-234 (1996)
- Berger M, Vidya S, Abbas V, Therapeutic applications of monoclonal antibodies. Am J Med Sci., 2002; 324(1):14-30
- Bismuth G, Bousnell L. Controlling the immune system through semaphorins. Sci STKE 2002; 2002(128):RE4.
- Bougeret C, Mansur IG, *et al.* Increased surface expression of a newly identified 150-kDa dimer early after human T lymphocyte activation. J. Immunol. 1992;148(2):318-23
- Buzanska L, Spassky N, Belin MF, *et al.* Human medulloblastoma cell line DEV is a potent tool to screen for factors influencing differentiation of neural stem cells. J Neurosci Res 2001; 65(1):17-23
- Cartier LM, Cea JG, Vergara C, Araya F, Born P. Clinical and neuropathological study of six patients with spastic paraparesis associated with HTLV-I: an axomyelinic degeneration of the central nervous system. J Neuropathol Exp Neurol 1997; 56(4):403-13.
- Delaire S, Elhabazi A, *et al.* CD100 is a leukocyte semaphorin, Cell Mol. Life Sci., 1998; 54:1265
- Delaire S, Billard C, Tordjman R, *et al.* Biological activity of soluble CD100. II. Soluble CD100, similarly to H-Semalll, inhibits immune cell migration. J Immunol 2001; 166(7):4348-54
- Derrington EA, Dufay N, Rudkin BB, Belin MF. Human primitive neuroectodermal tumour cells behave as multipotent neural precursors in response to FGF2. Oncogene 1998; 17(13):1663-72.
- Elhabazi A, Delaire S, Bensussan A, Bousnell L, Bismuth G. Biological activity of soluble CD100. I. The extracellular region of CD100 is released from the surface of T lymphocytes by regulated proteolysis. J Immunol 2001; 166(7): 4341-7
- Giraudon P, Szymocha R, Buart S, *et al.* T lymphocytes activated by persistent viral infection differentially modify the expression of metalloproteinases and their endogenous inhibitors, TIMPs, in human astrocytes: relevance to HTLV-I-induced neurological disease. J Immunol 2000; 164(5):2718-27.
- Hall KT, Bousnell L, Schultze JL, *et al.* Human CD100, a novel leukocyte semaphorin that promotes B-cell aggregation and differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(21):11780-5
- Herold C, *et al.*, Activation signals are delivered through two distinct epitopes of CD100, a unique 150 kDa human lymphocyte surface structure previously defined by BB18 mAb, Int Immunol, 1995, 7(1):1-8

- Hoogenboom, Trends in Biotechnol. 15:62-70 (1997)
- de Kruif *et al.*, 17:453-455 (1996)
- 5 - Moreau-Fauvarque C, CD100/Sema4D is expressed in oligodendrocytes during myelination, abstract submitted at the EMBO-FMI conference "Organizing the brain: genes, neurons, and circuits", Febrero de 2002.
- 10 - Moritoyo T, Izumo S, Moritoyo H, *et al.* Detection of human T-lymphotropic virus type I p40tax protein in cerebrospinal fluid cells from patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. J Neurovirol 1999; 5(3):241-8
- Ostberg *et al.* (1983), Hybridoma 2:361-367
- 15 - Popovic M, Lange-Wantzin G, Sarin PS, Mann D, Gallo RC. Transformation of human umbilical cord blood T cells by human T-cell leukemia/lymphoma virus. Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80(17):5402-6.
- Rader *et al.*, Current Opinion in Biotechnology 8:503-508 (1997)
- 20 - Smith *et al.*, Nature Medecine, 2001, 7:967-972
- Szymocha R, Akaoka H, Dutuit M, *et al.* Human T-cell lymphotropic virus type 1-infected T lymphocytes impair catabolism and uptake of glutamate by astrocytes via Tax-1 and tumor necrosis factor alpha. J Virol 2000; 25 74(14):6433-41
- Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, *et al.* Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. Cell 1999; 99(1):71-80.
- 30 - Winter *et al.*, Ann. Rev. Immunol. 433-455 (1994)
- Zhang SC, Ge B, Duncan ID. Adult brain retains the potential to generate oligodendroglial progenitors with extensive myelination capacity. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96(7):4089-94

35

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Anticuerpo neutralizante anti-CD100 que inhibe CD100 soluble (sCD100), o un fragmento del mismo que se une al antígeno, para su uso en la prevención o el tratamiento de trastornos mielínicos neuroinflamatorios seleccionados de entre el grupo constituido por esclerosis múltiple, mielopatía asociada a HTLV-1, y polirradiculoneuritis.
- 10 2. Anticuerpo neutralizante anti-CD100 según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende un anticuerpo BD16 y/o BB18 anti-CD100, o una forma quimérica, forma humanizada, o fragmento del mismo que se une al antígeno.
- 15 3. Anticuerpo neutralizante anti-CD100 según la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo BD16 anti-CD100.
- 20 4. Anticuerpo neutralizante anti-CD100 según la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo BB18 anti-CD100.
- 25 5. Anticuerpo neutralizante anti-CD100 según la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo es una forma quimérica de un anticuerpo BD16 anti-CD100.
- 30 6. Anticuerpo neutralizante anti-CD100 según la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo es una forma quimérica de un anticuerpo BB18 anti-CD100.
- 35 7. Anticuerpo neutralizante anti-CD100 según la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo es una forma humanizada de un anticuerpo BD16 anti-CD100.
- 40 8. Anticuerpo neutralizante anti-CD100 según la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo es una forma humanizada de un anticuerpo BB18 anti-CD100.
- 45 9. Método *in vitro* para el diagnóstico o la determinación de la evolución de un trastorno mielínico inflamatorio del sistema nervioso central (SNC) o del sistema nervioso periférico (SNP), método que comprende evaluar una semaforina CD100 en una muestra biológica de un sujeto de ensayo, compararla con el nivel de una semaforina CD100 en una muestra biológica de un sujeto de control, en el que un nivel incrementado de CD100 es indicativo de dicho trastorno o de que la afección del sujeto de ensayo ha empeorado, en el que el ensayo es un inmunoensayo que emplea un anticuerpo BD16 y/o BB18 anti-CD100, o una forma quimérica, forma humanizada, o fragmento del mismo que se une al antígeno, en el que la determinación de la evolución de un trastorno mielínico inflamatorio del SNC o del SNP comprende evaluar una semaforina CD100 en una muestra biológica de un sujeto de ensayo en un primer punto en el tiempo y comparar el nivel de una semaforina CD100 en una muestra biológica del mismo sujeto de ensayo en un segundo punto en el tiempo, en el que el trastorno mielínico inflamatorio se selecciona de entre el grupo constituido por esclerosis múltiple, mielopatía asociada a HTLV-1, y polirradiculoneuritis.
- 50 10. Método según la reivindicación 9, en el que se evalúa la semaforina CD100 por medio de una técnica de ELISA.
11. Método según la reivindicación 10, en el que se evalúa la semaforina CD100 en muestras de CSF.
12. Método según la reivindicación 9, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo BD16 anti-CD100.
13. Método según la reivindicación 9, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo BB18 anti-CD100.
14. Método según la reivindicación 9, en el que dicho anticuerpo es una forma quimérica o una forma humanizada de un anticuerpo BD16 anti-CD100.
15. Método según la reivindicación 9, en el que dicho anticuerpo es una forma quimérica o una forma humanizada de un anticuerpo BB18 anti-CD100.

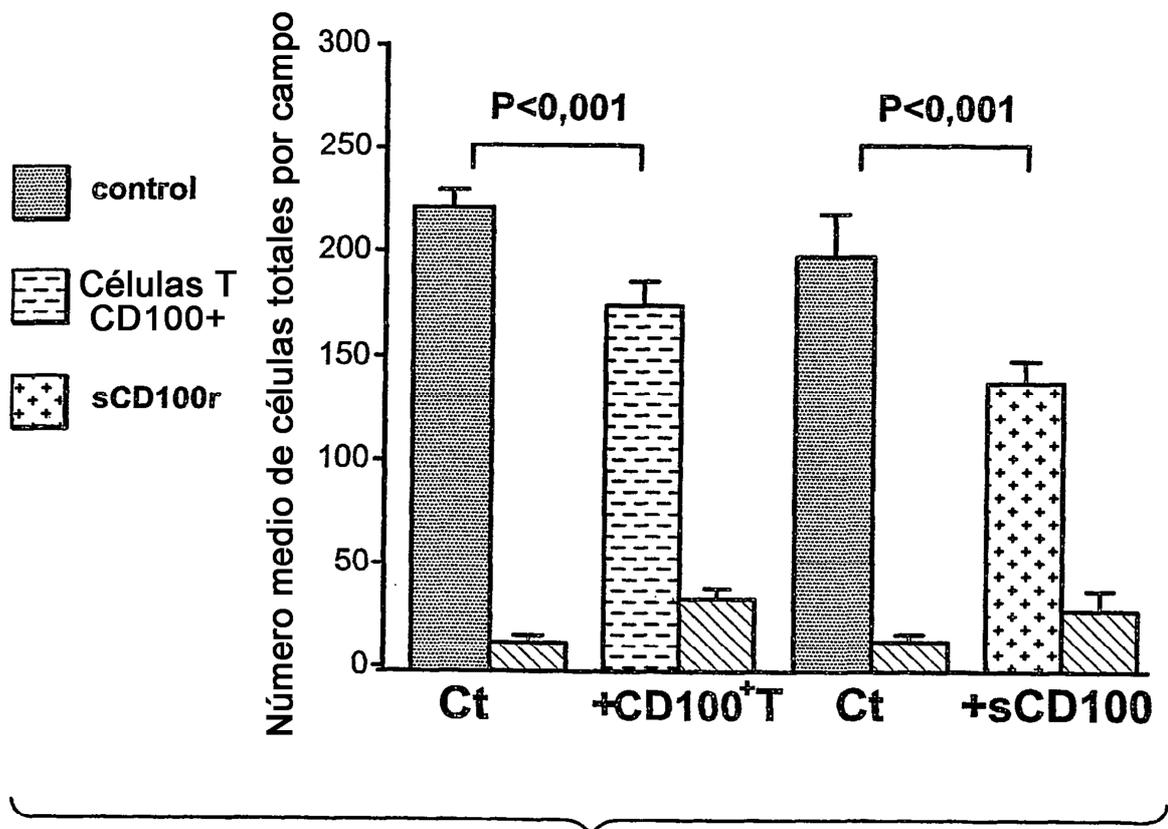
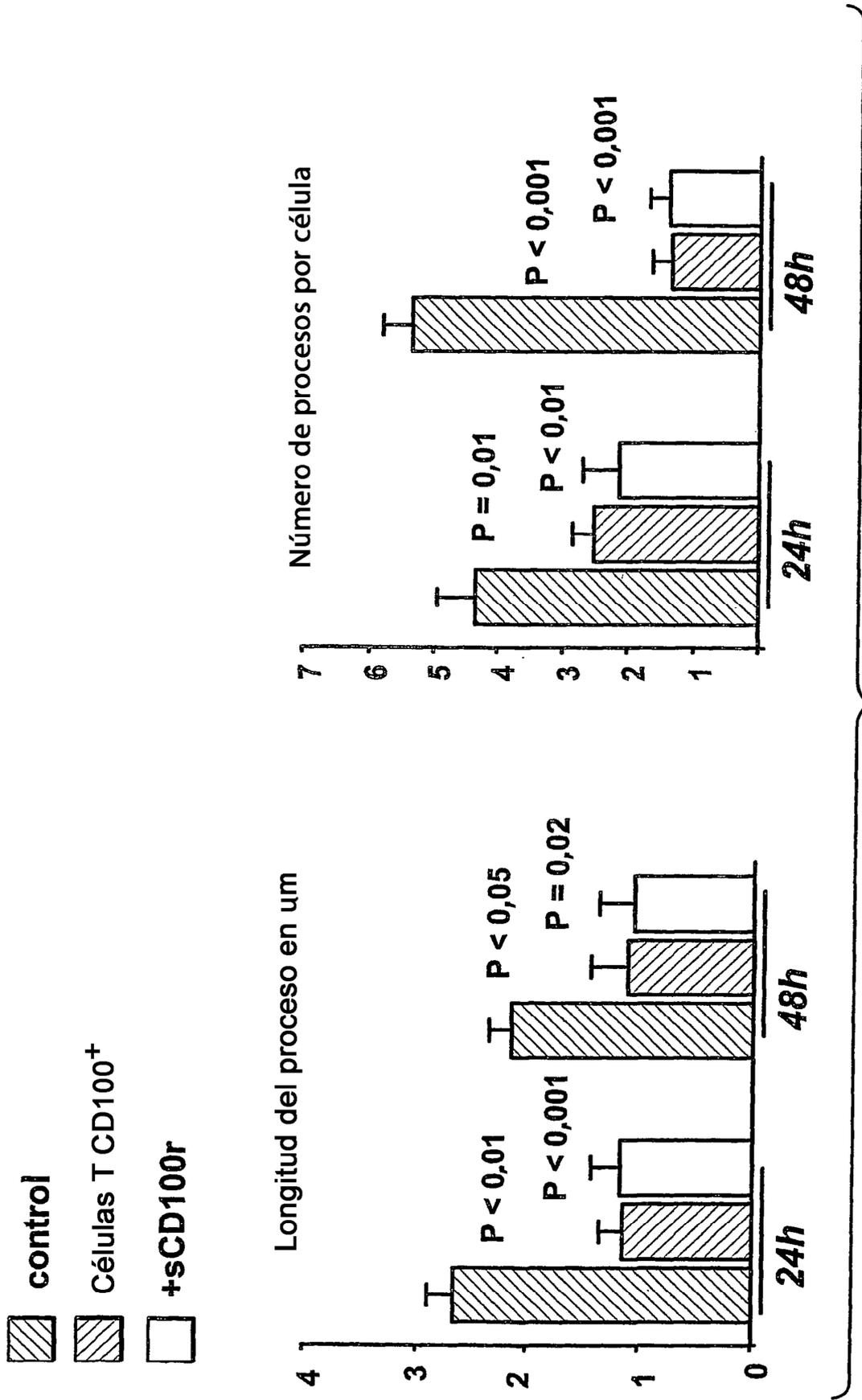


FIG.1



**FIG.2**

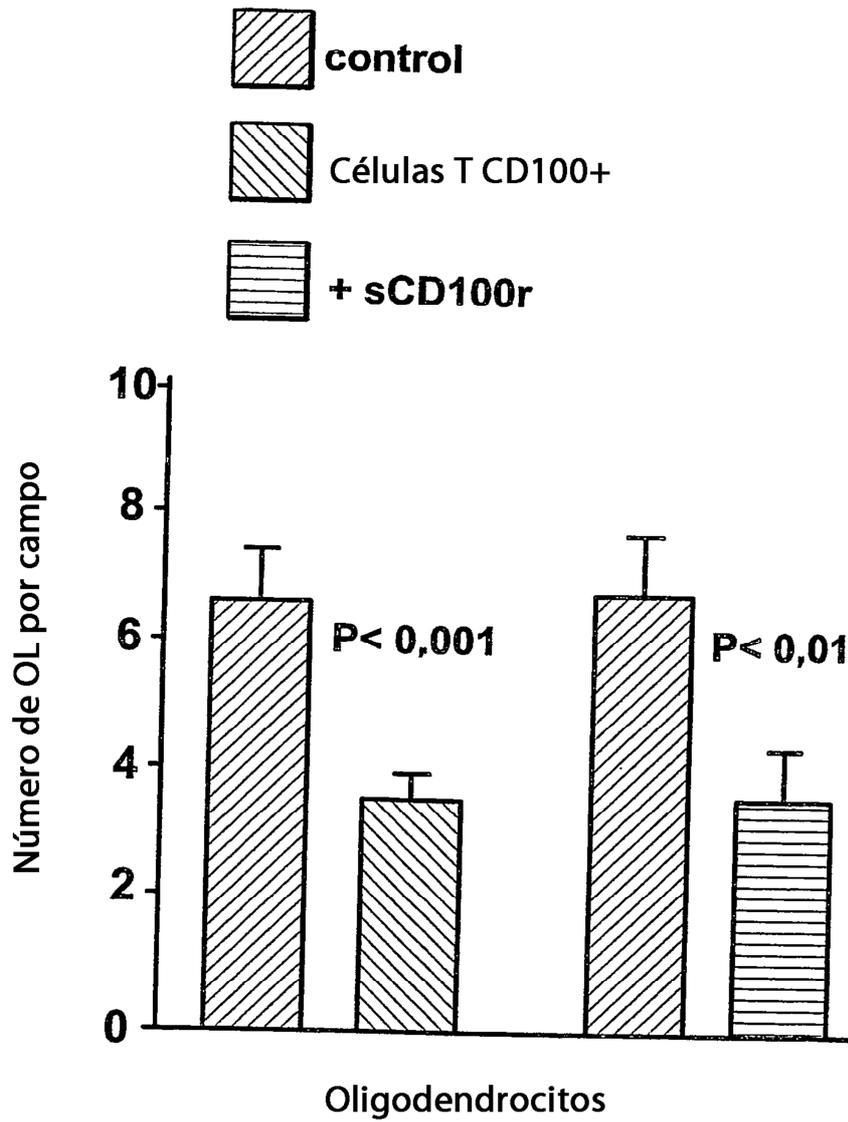
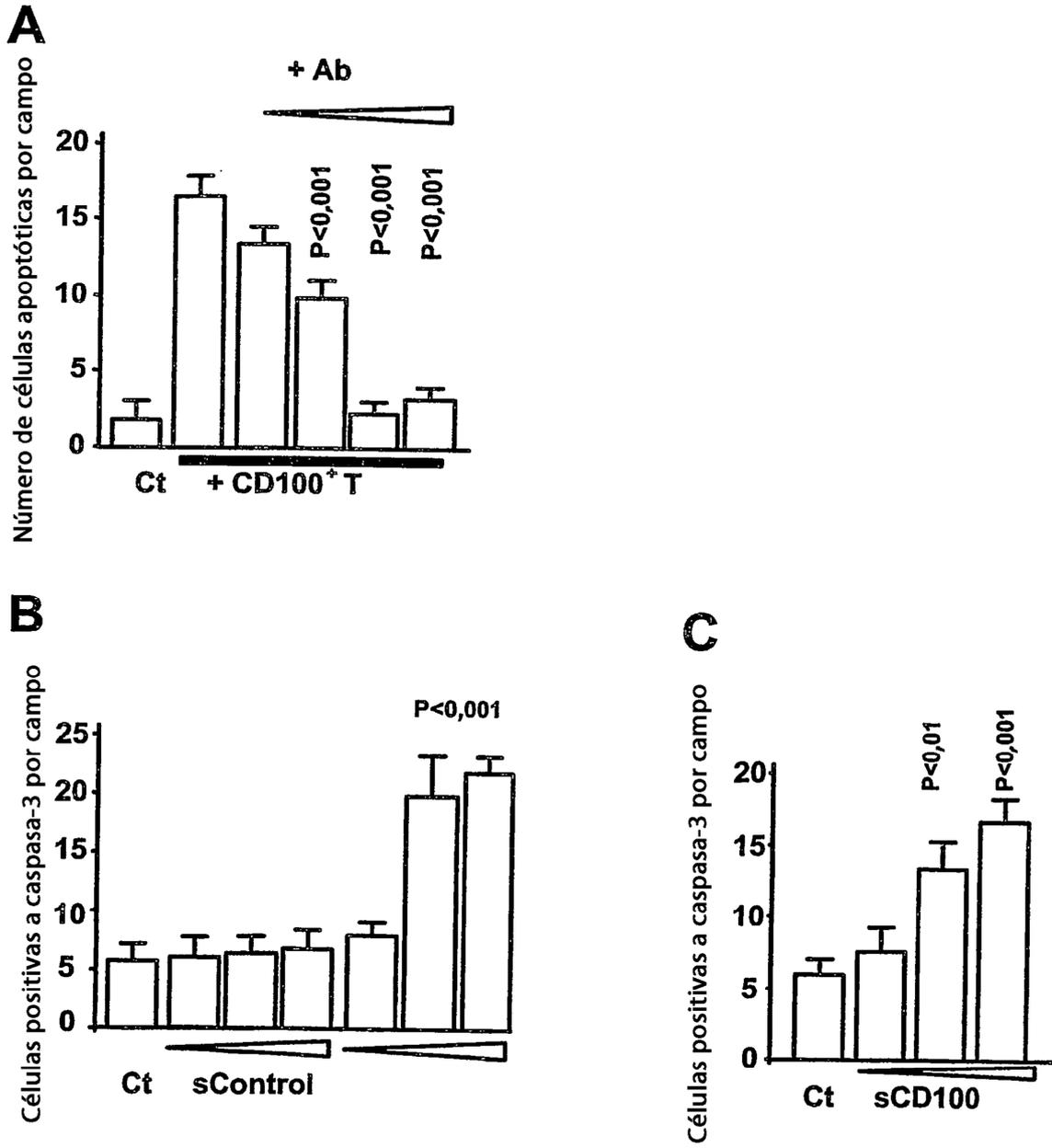
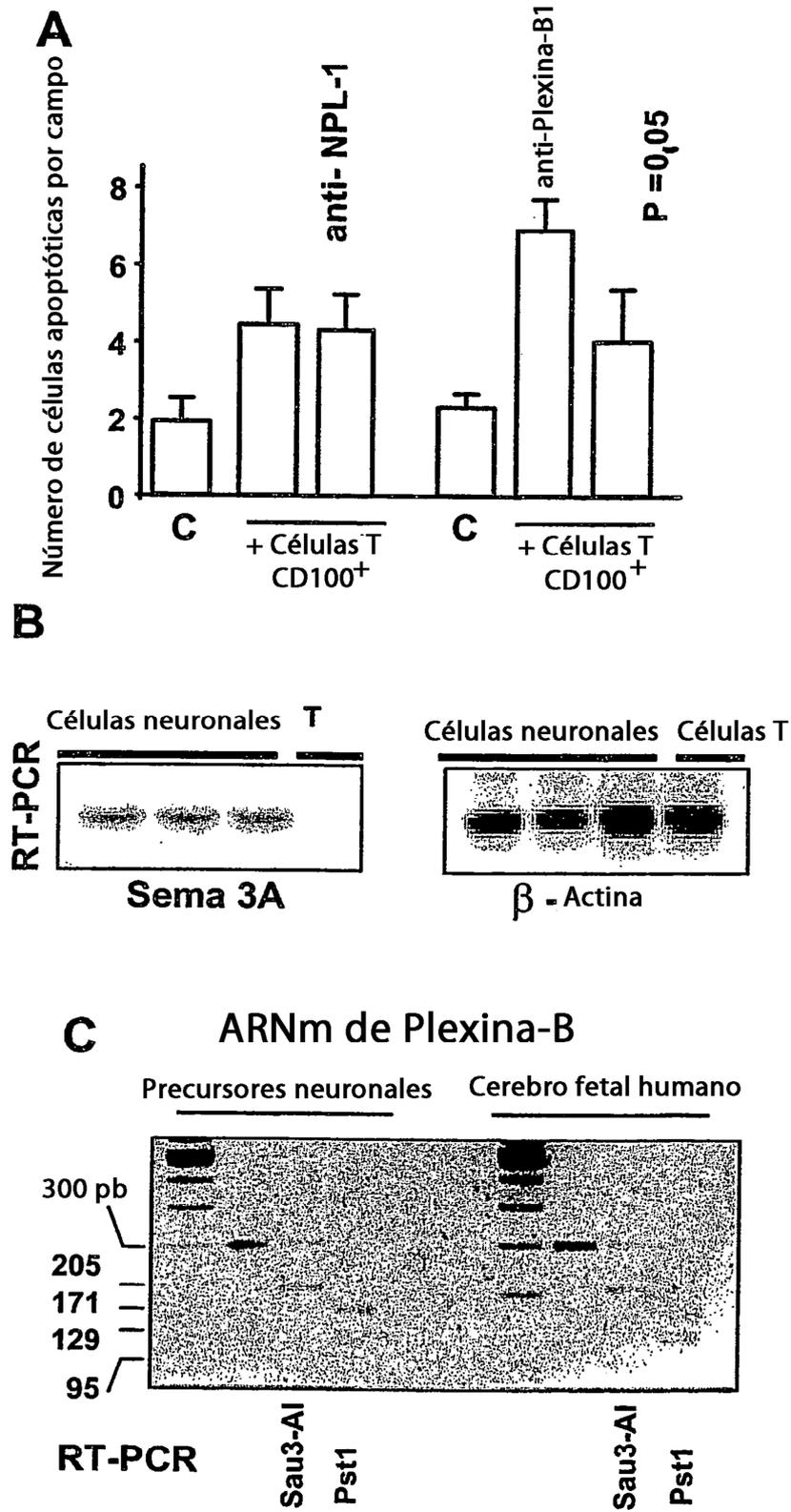


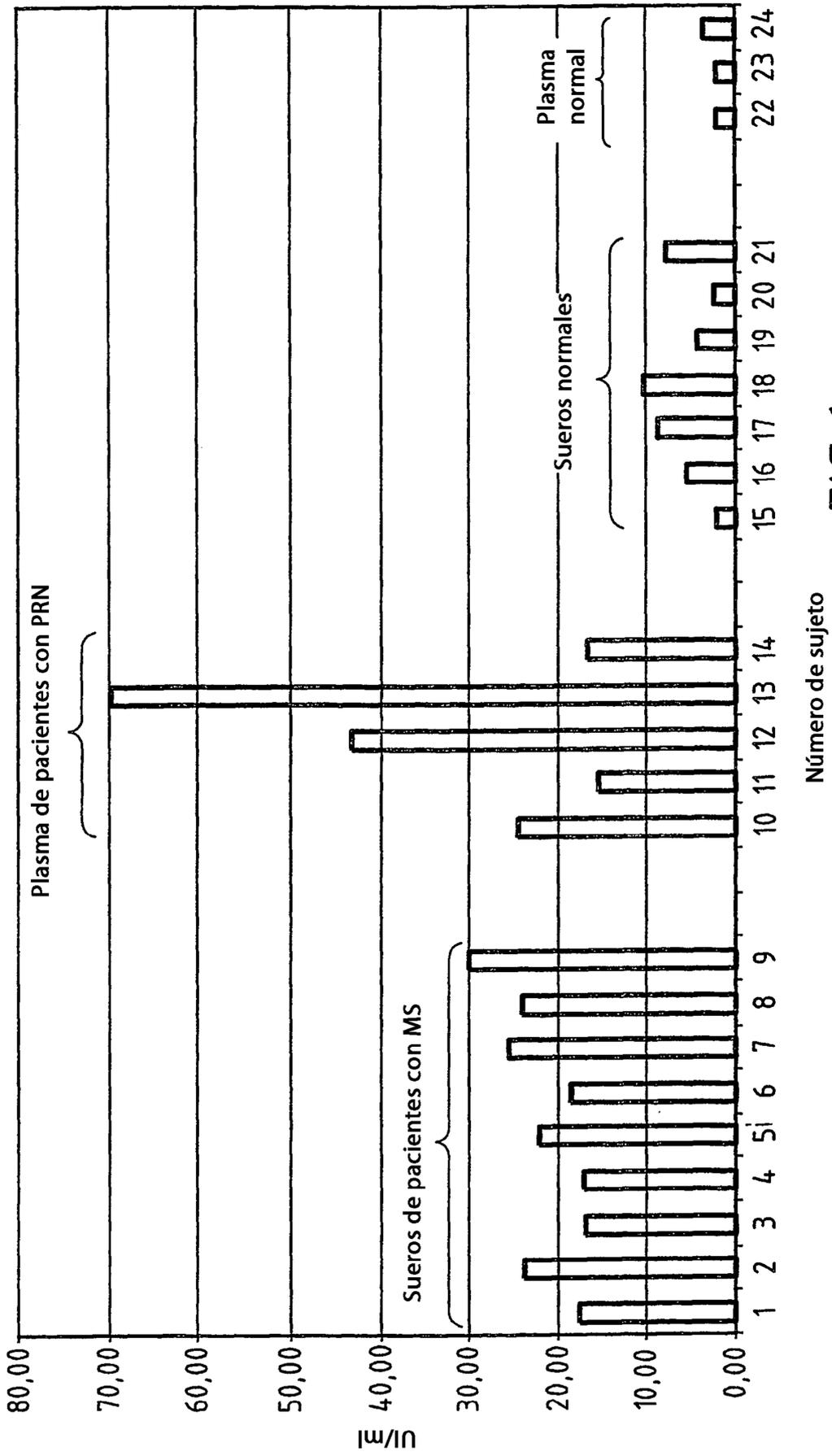
FIG.3



**FIG.4**



**FIG.5**



**FIG.6**