

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 461 246**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2006 E 06716320 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 1879916**

54 Título: **El epítipo de CD43 específico de la leucemia aguda y del linfoma linfoblástico y sus usos**

30 Prioridad:

11.05.2005 US 679910 P
24.08.2005 KR 20050077906
20.12.2005 US 312126

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.05.2014

73 Titular/es:

DINONA INC. (100.0%)
65, WOomyeon-Dong
Seochoguo, Seoul 137-140, KR

72 Inventor/es:

PARK, SEONG-HOE;
JUNG, KYEONG-CHEON;
CHOI, EUN-YOUNG y
PARK, SEONG-PYO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 461 246 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

El epítipo de CD43 específico de la leucemia aguda y del linfoma linfoblástico y sus usos

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un epítipo de CD43 expresado en las células de leucemia humana aguda y linfoma linfoblástico y su uso. Más concretamente, la presente invención se refiere a un epítipo de CD43 expresado en las células de leucemia humana aguda y del linfoma linfoblástico, pero no en las células hematopoyéticas maduras y las células madre hematopoyéticas, y a sus aplicaciones diagnósticas y terapéuticas en la leucemia aguda y el linfoma linfoblástico.

Antecedentes de la invención

- 10 La molécula CD43, también llamada sialoforina o leucosialina, es una molécula de la superficie celular expresada en la mayoría de las células hematopoyéticas a excepción de los eritrocitos. La CD43 humana tiene un dominio extracelular similar a la mucina de 235 aminoácidos (aa), un dominio transmembrana de 23 aa y un dominio intracitoplasmático de 123, todos ellos codificados por un exón (Pallant et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1989, 86:1328-32; Shelley et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1989, 86:2819-23). El dominio extracelular de la CD43 humana es rico en los aminoácidos serina (46 residuos) y treonina (47 residuos), la mayoría del cual lleva cerca de 80 cadenas de carbohidratos O-ligados. Además, la CD43 contiene una cadena de carbohidratos N-ligados. La estructura de estos O-glicanos varía de un tipo de célula a otro (Carlsson et al., J Biol Chem. 1986, 261:12787-95).

- 20 El gen CD43 se compone de dos exones, separados por un intrón de 378 pb, por lo que el producto completo de la traducción se codifica por el segundo exón (Shelley et al., Biochem J. 1990, 270:569-76). Se ha pensado que CD43 es un marcador específico de tipo leucocito restringido a la mayoría de los leucocitos, las plaquetas y las células madre hematopoyéticas, a excepción de los eritrocitos (Remold-O'Donnell et al., Blood. 1987, 70:104-9; Fukuda, Glycobiology. 1991, 1:347-56). Sin embargo, la expresión de CD43 en células tumorales humanas de origen no hematopoyético, como en una línea celular de cáncer de cuello de útero humano (CaSKI), una línea celular de cáncer de pulmón humano (A549), una línea celular de adenocarcinoma de mama humano (MCF7), una línea celular de fibrosarcoma humano (HT 1080), y las líneas celulares de adenocarcinoma de colon humano (COLO 205, HT 29, Caco-2, DLD-1 y SW480), ha sido demostrada (Fernández - Rodríguez *et al.*, *Tumor Biol.* 2002 23:193-201). CD43 también se expresa en el tejido de cáncer de colon humano (Sikut *et al.*, *Int J Cancer.* 1999, 82:52-8; Jung et al, *Korean J Pathol* 38:8-14).

- 30 Los estudios biosintéticos muestran que el precursor de CD43, de un tamaño previsto de alrededor de 40 kDa (incluyendo un N-glicano), migra con una masa molecular aparente de 54 kDa tras la electroforesis. Este precursor se convierte posteriormente en una molécula glicosilada madura con un tamaño desde 115 kDa hasta más de 200 kDa debido a la glicosilación variable. Los timocitos, los linfocitos T CD4+ y los monocitos expresan más una isoforma 115 kDa, mientras que una forma 130 kDa se encuentra principalmente en células T CD4+ activadas, en células T CD8+ en reposo y activadas, en neutrófilos, en plaquetas y en células B (Rosenstein et al., Immunol Res. 1999, 20:89-99). Parece que más de una isoforma puede coexpresarse en la superficie de la misma célula. Un patrón de O-glicosilación postraducciona estrictamente regulado tiene como resultado estas isoformas de peso molecular característico que se expresan diferencialmente en distintos tipos celulares. Especialmente, la expresión del núcleo 2 β -1, 6-N-acetilglucosaminiltransferasa (C2GnT) resulta en la expresión de la isoforma de 130 kDa de CD43 en los timocitos y las células T (Piller et al., J Biol Chem. 1988, 263:15146-50).

- 40 Hasta hace poco, se han descrito más de 17 anticuerpos anti-CD43 humano. La mayoría de estos anticuerpos reaccionan con epítipos de carbohidratos en el dominio extracelular y todos los anticuerpos anti-CD43 conocidos detectar la proteína CD43 expresada en las células hematopoyéticas maduras (Tabla 1). Por lo tanto, no son eficientes en la detección o erradicación de las células de leucemia o linfoma.

TABLA 1

Anticuerpo anti-CD4	Células CD43 positivas	Células CD43 negativas	Epítipo	*Referencia
T305	Células T CD4 ⁺ activadas, células T CD8 ⁺ , timocitos, precursores mieloides en la médula ósea	Granulocitos, eritrocitos, plaquetas	Carbohidrato núcleo-2	del 1, 2
L10	Células T, timocitos, líneas de células B, monocitos, neutrófilos, plaquetas	Eritrocitos	1-78 resistente a la sialidasa	3
L2	Células T, timocitos, líneas de células B, monocitos, neutrófilos, plaquetas	Eritrocitos	1-78	
84-3C1	Células de la médula ósea, timocitos, células T, monocitos, granulocitos	Plaquetas, eritrocitos	Carbohidrato sensible a la sialidasa	4
MEM-59	La mayoría de los leucocitos, células de la médula ósea CD43 ⁺		Carbohidrato sensible a la neuraminidasa	5, 6
MT-1, L60	Células T, monocitos	Células B	Carbohidrato sensible a la neuraminidasa	7
DFT1	Células T, monocitos	Células B		
1G10	Células T, células NK, granulocitos	Células B, eritrocitos		8
CBF.78	Células T, subconjuntos de monocitos y granulocitos		Resistente a la neuraminidasa	
RDF7AD-	Células T, monocitos, granulocitos	Células B	Carbohidrato sensible a la neuraminidasa	9
161-46	Células T, monocitos, granulocitos	Células B	Resistente a la neuraminidasa	
4D2	COLO 205, K562, Jurkat		(337-343) intercelular	10
4D1	Células T CD4 ⁺ activadas, monocitos	Células B	Carbohidrato núcleo-2	del Mukasa et al., 1999

*1. Fox et al., *J Immunol.* 1983, 131: 762-7; 2. Saitoh et al., *Blood.* 1991, 77: 1491-9; 3. Remold-O'Donnell et al., *Blood.* 1987, 70: 104-9; 4. Borche et al., *Eur J Immunol.* 1987, 17: 1523-6; 5. Stefanova et al., *Folia Biol (Praha).* 1988, 34: 255-65; 6. Alvarado et al., *Eur J Immunol.* 1995, 25: 1051-5; 7. Stross et al., *J Clin Pathol.* 1989, 42: 953-61; 8. Horejsi et al., 1997, *In Kishimoto T, et al, Leucocyte Typing, Vol. VI: White Cell Differentiation Antigens 494.* Garland, New York and London; 9. Tkaczuk et al., *Tissue Antigens.* 1999, 54: 1-15; 10. Sikut et al., *Int J Cancer.* 1999, 82: 52-8; 11. Mukasa et al, *Int Immunol.* 1999, 11: 259-68.

Compendio de la invención

10 Un objeto de la presente invención es proporcionar un epítipo de CD43 asociado a la leucemia aguda, la leucemia crónica con crisis blástica y linfoma linfoblástico donde el epítipo está expuesto en las células de leucemia aguda humana y el linfoma linfoblástico, pero no en las células hematopoyéticas maduras y células madre hematopoyéticas. Por lo tanto, la presente invención proporciona un polipéptido aislado del epítipo de CD43 que comprende una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y siendo de longitud menor de 100 aminoácidos, donde el

15 epítipo de CD43 se expresa específicamente en timocitos, en un subconjunto de precursores hematopoyéticos en la médula ósea, células de leucemia aguda, células blásticas de leucemia crónica con crisis blástica y linfoma linfoblástico.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar material que reconoce el epítipo de CD43. Por lo tanto, la presente invención proporciona el anticuerpo o sus fragmentos que se une específicamente a un epítipo de CD43 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

20

Un tercer objeto de la presente invención es proporcionar un método para la producción de los materiales que reconocen el epítipo de CD43. Por lo tanto, la presente invención proporciona un anticuerpo o sus fragmentos que se unen a un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

5 Un cuarto objeto de la presente invención es proporcionar material para el diagnóstico de leucemia aguda , leucemia crónica con crisis blástica, y el linfoma linfoblástico.

10 Un quinto objeto de la presente invención es proporcionar un método de diagnóstico de la leucemia aguda, la leucemia crónica con crisis blástica , y el linfoma linfoblástico. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para diagnosticar la leucemia aguda que comprende células de leucemia en una muestra biológica con un anticuerpo anti-epítipo de CD43, y la detección de la reacción positiva del anticuerpo anti-epítipo de CD43. La presente invención proporciona un método para diagnosticar la leucemia crónica con crisis blástica que comprende la incubación de células de leucemia en una muestra biológica con un anticuerpo anti-epítipo de CD43, y la detección de la reacción positiva del anticuerpo anti-epítipo de CD43. La presente invención proporciona un método para diagnosticar el linfoma linfoblástico que comprende la incubación de células de linfoma en una muestra biológica con un anticuerpo anti-epítipo de CD43 de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 y la detección de la reacción positiva del anticuerpo anti-epítipo de CD43.

15 Un sexto objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que puede matar las células tumorales de la leucemia aguda, leucemia crónica con crisis blástica y el linfoma linfoblástico.

Un séptimo objeto de la presente invención es proporcionar un método de diagnóstico mediante el uso del material de diagnóstico de la presente invención.

20 Además, la presente invención proporciona un método de tratamiento mediante el uso del material terapéutico de la presente invención .

Breve descripción de los dibujos

25 Una apreciación más completa de la invención, y muchas de las ventajas concomitantes de la misma, serán fácilmente evidentes a medida que la misma se entienda mejor en referencia a la siguiente descripción detallada cuando se considera junto con los dibujos adjuntos, en donde:

La figura 1 es una fotografía de la tinción inmunohistoquímica del timo por sobrenadante del clon de hibridoma que produce un específico contra el epítipo de CD43.

La figura 2 es una fotografía de la reactividad del anticuerpo monoclonal EB-1 en la superficie de los timocitos humanos utilizando citometría de flujo tricolor.

30 La figura 3 es una fotografía de la reactividad del anticuerpo monoclonal EB-1 en la superficie de leucocitos de sangre periférica humanos y células madre hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical utilizando citometría de flujo tricolor.

La figura 4 es una fotografía de la reactividad del anticuerpo monoclonal EB-1 en la superficie de células de médula ósea humanas usando citometría de flujo tricolor.

35 La figura 5 es una fotografía de la reactividad del anticuerpo monoclonal EB-1 en la superficie de la línea de células 29T humanas transfectadas con CD43 usando citometría de flujo de un color.

La figura 6 es una fotografía de la reactividad del anticuerpo monoclonal EB-1 en la superficie de la línea de células Molt-4 humanas con o sin tratamiento con sialidasa usando citometría de flujo de un color.

40 La figura 7 es una fotografía del análisis SDA-PAGE de un lisado de timocitos y una línea de células Molt-4 humanas con o sin tratamiento con sialidasa, seguido de inmunotransferencia con el anticuerpo monoclonal EB-1.

La figura 8 es un diagrama esquemático de 11 tipos de mutaciones de delección de CD43.

La figura 9 es una fotografía del análisis de SDA-PAGE de 11 tipos de mutaciones de delección de CD43, seguido de inmunotransferencia con el anticuerpo monoclonal EB-1 y el anticuerpo policlonal anti-GST.

45 La figura 10 es una fotografía de la reactividad del en la superficie de células de leucemia humanas utilizando citometría de flujo un color.

La figura 11 es una fotografía de la tinción inmunohistoquímica de tejido de linfoma linfoblástico por el anticuerpo monoclonal EB-1.

La figura 12 es una fotografía de la reactividad de EB - 1 y anticuerpos monoclonales anti-MHC de clase I humana utilizando citometría de flujo de dos colores en la superficie de las células de leucemia de sangre periférica de

ratones con deficiencia de RAG-1 en los cuales se inyectaron células CCRF-CEM por vía intravenosa tratada y tratados con EB-1 o anticuerpo de control.

5 La figura 13 es una fotografía de la reactividad de los dos anticuerpos anti - CD43 adicionales (EB-2 y EB-3) , los cuales fueron producidos por la inmunización de ratones con epítomos de CD43, en la superficie de la línea de células ETA transfectadas con CD43, timocitos humanos, leucocitos de sangre periférica humanos, y una muestra la leucemia humana utilizando citometría de flujo de un color.

La figura 14 es una fotografía del análisis de SDA-PAGE de 5 tipos de mutaciones de delección de CD43, seguido de inmunotransferencia con anticuerpos monoclonales EB-2 y EB-3.

Descripción detallada de las realizaciones

10 La presente invención proporciona un epítomo de CD43 expuesto en las células tumorales de la leucemia aguda, la leucemia crónica con crisis blástica y el linfoma linfoblástico, pero no en las células hematopoyéticas maduras y las células madre hematopoyéticas. El CD43 de la presente invención es un CD43 preferiblemente humano, cuya secuencia se había presentado al NCBI GenBank con el número de acceso M61827. El epítomo de CD43 es cualquier polipéptido que incluya la secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO: 1 (de ahora en adelante, EP6), y más
15 preferiblemente que incluya la secuencia de aminoácidos en SEQ ID NO: 2 (de ahora en adelante, EP9).

EP6: Pro Leu Thr Ser Ile (SEQ ID NO: 1)

EP9: Glu Gly Ser Pro Leu Trp Thr Ser Ile (SEQ ID NO: 2) .

20 Según la presente invención se proporciona un polipéptido de menos de 100 aminoácidos de longitud, preferiblemente menos de 50 aminoácidos de longitud, que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

La presente invención también proporciona un polipéptido que consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. La presente invención también proporciona un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

25 El epítomo de CD43 (EP6 y EP9) se podría purificar a partir de tejidos humanos, sintetizar químicamente, o producir por biotecnología.

Además, la presente invención proporciona reconociendo el epítomo de CD43 de la presente invención. El material se selecciona del grupo que está compuesto de un anticuerpo, su fragmento, y ligandos, y el anticuerpo se selecciona preferiblemente del grupo que está compuesto de anticuerpo monoclonal y anticuerpo policlonal, y más preferiblemente son de origen humano y animal.

30 Los anticuerpos comprenden partes de anticuerpos incluyendo la región de reconocimiento del antígeno (V_H y V_L), por lo que tiene la capacidad de reconocer el antígeno preferentemente. Además, también incluye fragmentos de anticuerpos, tal como F(ab')₂, Fab y Fv. Preferentemente el fragmento de anticuerpo (Fv) comprende un fragmento de anticuerpo de una única cadena polipeptídica, denominado Fv de cadena sencilla, que se prepara mediante la inserción de un péptido de unión entre dos polipéptidos, V_H y V_L para aumentar la estabilidad al calor.

35 La presente invención además proporciona anticuerpos quiméricos que reconocen el epítomo de CD43 de la presente invención. Como se emplea en esta memoria, el término "anticuerpo quimérico " se refiere a al anticuerpo en el que las regiones variables de los anticuerpos derivados de una especie se combinan con las regiones constantes de los anticuerpos derivados de una especie diferente o alternativamente se refiere a anticuerpos injertados con CDR. Los anticuerpos quiméricos se construyen por tecnología de ADN recombinante, y se describen en Shaw, et al., J. Immun., 138:4534 (1987), Sun, LK., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:214-218 (1987), por ejemplo.
40

Se pueden utilizar otras técnicas conocidas para generar anticuerpos injertados con CDR y quiméricos. "CDR" o "región determinante de la complementariedad" o "región hipervariable" se define como las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo que forman la estructura de bucle tridimensional que contribuye a la formación del sitio de unión al antígeno.
45

Como se emplea en esta memoria, el término anticuerpo "injertado con CDR" se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos en la cual al menos partes de una o más secuencias de CDR en el dominio ligero y/o variable se han sustituido por partes análogas de secuencias de CDR de un anticuerpo que tiene distinta especificidad de unión para un determinado antígeno o receptor.

50 Los términos "región variable de cadena ligera" y "región variable de cadena pesada" se refieren a las regiones o dominios en la porción N-terminal de las cadenas ligera y pesada respectivamente que tienen una secuencia de aminoácidos primaria variada para cada anticuerpo. La región variable del anticuerpo consiste en el dominio amino terminal de las cadenas ligera y pesada al plegarse conjuntamente para formar un sitio de unión tridimensional para un anticuerpo.

Las secuencias análogas de CDR se dice que son "injertadas" en el sustrato o anticuerpo receptor. El anticuerpo "donante" es el anticuerpo que proporciona la secuencia de CDR, y el anticuerpo que recibe las secuencias sustituidas es el anticuerpo sustrato. Un experto en la técnica puede producir fácilmente estos anticuerpos injertados con CDR utilizando las técnicas proporcionadas en esta memoria combinadas con métodos bien conocidos en la técnica (véase Borrebaeck, C.A., *Antibody Engineering: A Practical Guide*, W.H. Freeman and Company, New York, 1992).

Esta invención proporciona además anticuerpos humanizados reconociendo el epítipo de CD43 de la presente invención. Como se emplea en esta memoria, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (p. ej., murino), así como de anticuerpos humanos. Dichos anticuerpos son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Véase p. ej., Cabilly U.S. Pat. 4.816.567; Queen et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:10029-10033; y *ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH* (Oxford University Press 1996).

En una realización preferente de la presente invención, el anticuerpo se une a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1.

El anticuerpo o su fragmento pueden además comprender un material de etiquetado seleccionado del grupo que consiste en radioisótopos, toxinas, materiales fluorescentes y materiales de tinción. Los ejemplos de los materiales fluorescentes son fluoresceína-5-isotiocianato (FITC), ficoeritrina (PE), alofocianina (APC), y la biotina, pero no se limita a los mismos.

El anticuerpo o su fragmento pueden además comprender además un material tóxico seleccionado del grupo que consiste en radioisótopos, productos químicos tóxicos, proteínas tóxicas y agentes antitumorales. El anticuerpo o fragmento se combina con las proteínas tóxicas para producir una proteína de fusión. Los ejemplos de las proteínas tóxicas incluyen ricina, saporin, gelonina, momordina, toxoide diftérico y toxina de *Pseudomonas*, pero no se limita a los mismos.

La presente invención también proporciona un método para producir el material, y proporciona células que producen los anticuerpos. El método de producción de un anticuerpo o su fragmento incluye las etapas de (a) inmunizar un animal con un polipéptido, proteína o fragmento de proteína que contiene o las células que expresan el epítipo de CD43, (b) extraer los esplenocitos del animal inmunizado, (c) fusionar los esplenocitos con células de mieloma, y (d) cribar las células de hibridoma que producen anticuerpos contra el epítipo de CD43. El material se puede obtener por cultivo *in vitro* o la inyección de células que producen el material en los animales. El material se puede obtener de la ascitis de animales en los que las células que producen los materiales se inyectan por vía intraperitoneal. El material se puede purificar del sobrenadante del cultivo o de la ascitis por cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de afinidad de columna.

En una realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento de la leucemia aguda, la leucemia crónica con crisis blástica, el linfoma linfoblástico que consta de un anticuerpo anti-epítipo de CD43 o su fragmento, y un transportador farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con la invención la administración del anticuerpo o su fragmento se puede llevar a cabo utilizando cualquiera de los modos aceptados de administración de composiciones farmacéuticas. Por lo tanto, la administración puede ser, por ejemplo, el material de reconocimiento del antígeno se puede administrar por vía oral o más preferiblemente por vía parenteral a los pacientes, en forma de sólido, semi-sólido, polvo liofilizado, o formas de dosificación líquidas, tales como, por ejemplo, comprimidos, supositorios, píldoras, cápsulas de gelatina blandas elásticas y duras, polvos, soluciones, suspensiones, o aerosoles, o similares, preferiblemente en formas de dosificación unitarias adecuadas para la administración sencilla de dosis precisas. Las composiciones farmacéuticas generalmente incluirán un transportador o excipiente farmacéutico convencional y el anticuerpo de la invención como el/un agente activo, y, además, puede incluir otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, transportador, adyuvantes, diluyentes, vehículos, o combinaciones de los mismos. Dichos excipientes farmacéuticamente aceptables, transportadores o aditivos, así como métodos de preparación de composiciones farmacéuticas para diversos modos de administración son bien conocidos por los expertos en la técnica. La dosificación adecuada del compuesto activo se puede seleccionar dependiendo de la condición del sujeto, por ejemplo, 3 mg a 6000 mg al día 1.

En una realización, la presente invención se refiere a un método de tratamiento de la leucemia aguda, la leucemia crónica con crisis blástica, el linfoma linfoblástico utilizando el anticuerpo o su fragmento, que se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo, fragmento de anticuerpo, fragmento de anticuerpo de cadena polipeptídica sencilla y ligando. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo es seleccionado preferiblemente del grupo que consiste en anticuerpos monoclonales y policlonales, y más preferiblemente se originó a partir de humano y animal.

Preferiblemente, el anticuerpo o su fragmento incluye además material tóxico que se selecciona del grupo que consiste en radioisótopos, sustancias químicas tóxicas, proteínas tóxicas y agentes antitumorales.

Además, la presente invención proporciona un método para el diagnóstico de la leucemia aguda, la leucemia crónica con crisis blástica y el linfoma linfoblástico utilizando el anticuerpo o su fragmento. El método incluye las etapas de
5 (a) incubar el anticuerpo o su fragmento con una célula en una muestra biológica, y (b) detectar la muestra que muestra reacción positiva contra el anticuerpo. El tumor es preferiblemente la leucemia aguda, la leucemia crónica con crisis blástica o el linfoma linfoblástico.

Además, la presente invención proporciona un kit de diagnóstico para la leucemia aguda, la leucemia crónica con crisis blástica y el linfoma linfoblástico usando el material. El kit de diagnóstico podrían incluir el método para la
10 detección de la reacción antígeno-anticuerpo además del material. El método de detección se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en citometría de flujo, inmunohistoquímica, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo enzimático (EIA), inmunoensayo de fluorescencia (FIA) y el inmunoensayo por luminiscencia (LIA). El método de detección incluye el material de etiquetado, que se podrían seleccionar del grupo de enzimas (por ejemplo la peroxidasa de rábano (HRP)),
15 materiales fluorescentes (por ejemplo el FITC), materiales luminiscentes (por ejemplo el luminol, el isoluminol y la lucigenina), e isótopos (por ejemplo ^{125}I , ^3H , ^{14}C y ^{131}I), pero de ninguna forma no se considera limitado a los mismos. La reactividad del material de reconocimiento del antígeno se puede confirmar utilizando un dispositivo de detección de la reacción enzimática, fluorescencia, luminiscencia, o radiación. El kit de diagnóstico se puede hacer en un kit de citometría de flujo, un kit de inmunohistoquímica, un kit de ELISA o un kit de tira que incluya el anticuerpo o su fragmento.
20

La presente invención se explica adicionalmente en más detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos, sin embargo, no debe interpretarse como una limitación del alcance de la presente invención de ninguna manera.

Ejemplo 1

25 Con el fin de descubrir una proteína de superficie celular específica en los timocitos, se administraron timocitos humanos a ratones Balb/c para producir anticuerpos contra los timocitos humanos mediante los siguientes ejemplos.

Se administraron por vía intraperitoneal 10^7 timocitos humanos y se inmunizaron ratones Balb/c en intervalo de dos semanas durante seis semanas. Se extirpo el bazo de los ratones Balb/c 3 días después de la última administración para preparar la suspensión de células de bazo. Los anticuerpos monoclonales se produjeron mediante la fusión de
30 las células de bazo de ratones Balb/c inmunizados con timocitos humanos con células de mieloma de ratón SP2/0-Ag14 resistentes a la 9-azaguanina. El método de fusión celular seguido del método de Koeler y Milstein (Kohler & Milstein *Nature*, 1975, 256, 495-497). Se fusionaron 10^8 células de bazo con 10^7 células de mieloma usando polietilenglicol 4000 al 50%. Las células se lavaron y se volvieron a suspender en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contiene 20% de albúmina de suero bovino, 100 μM de hipoxantina, 0,44 μM de aminopterina y 16 μM de timidina (medio HAT). Las células se introdujeron en cuatro placas de 96 pocillos y se cultivaron a 37 °C,
35 y en una incubadora con 5% de CO_2 . Cuando se formaron las colonias después de dos semanas, se preparó el sobrenadante y se observó la reactividad de anticuerpos usando inmunohistoquímica y citometría de flujo.

Los pocillos que contenían más el 10^5 células por pocillo se consideraron como grupo positivo. Las células se extrajeron del pocillo que contenía anticuerpos altamente reactivos, y se subclonaron 0,5 células por pocillo
40 mediante ensayo de dilución limitante para producir un clon de hibridoma estable con alta reactividad de anticuerpo. Este clon de hibridoma secreta anticuerpos al medio y el sobrenadante se almacenó para las siguientes.

Ejemplo 2

Con el fin de descubrir un clon que secreta anticuerpos que reconoce el antígeno de superficie celular específico de los timocitos entre los clones de hibridoma producidos en el ejemplo 1, se llevó a cabo la tinción con
45 inmunoperoxidasa que llevó a cabo en el portaobjetos de 4 μm de grosor de tejido fresco y tejido fijado en formol e incluido en parafina utilizando el sobrenadante del clon de hibridoma producido con el ejemplo 1 de acuerdo con el complejo avidina-biotina (ABC) método de tinción por la unión de avidina con biotina. El sobrenadante de célula monoclonal se utilizó como anticuerpo primario. El tejido incluido en parafina se trató con suero de ratón normal y se dejó reposar durante 1 hora prevenir una tinción de fondo inespecífica tras la eliminación de la parafina. Después de
50 añadir un anticuerpo primario, se les dejó reposar durante la noche y se lavó tres veces con tampón fosfato salino (PBS). Se añadió una inmunoglobulina anti-ratón biotinilada de cabra utilizada como anticuerpo secundario. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora, se lavó tres veces con PBS. Entonces se añadió conjugado de estreptavidina y peroxidasa de rábano. Se añadió tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina (DAB) y la solución de H_2O_2 fabricada por DAKO para teñir las células, se trató durante 20 minutos y se lavó tres veces con PBS. Se
55 observó con microscopía de luz después de cubrirlo con un cubreobjetos.

Se seleccionaron líneas de clones de hibridoma productor de anticuerpos específicos para los timocitos humanos. Uno de los clones cuyo anticuerpo reconoció los timocitos se llamó EB-1. La figura 1 es una fotografía de la tinción inmunohistoquímica del timo con el sobrenadante del clon de hibridoma que produce el anticuerpo EB-1. Como se

muestra en la figura 1, la mayoría de los timocitos se tiñen positivamente. La superficie celular de los timocitos se tiñó considerablemente por lo que el antígeno reconocido por el anticuerpo EB-1 es un antígeno de superficie celular.

Ejemplo 3

5 Para evaluar la reactividad del anticuerpo EB-1 de acuerdo con las etapas de desarrollo de los timocitos, se llevó a cabo citometría de flujo. Timos humanos, los cuales se extirparon de los pacientes durante cirugía cardíaca, se trituró finamente, y se preparó la suspensión de células individuales. Se suspendieron 1×10^6 células en 100 μ l de PBS, y se distribuyeron en tubos de ensayo. Se añadieron 100 μ l de cultivo EB-1 sobrenadante y se agitó. La solución se hizo reaccionar a 4°C durante 30 minutos, se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 minutos, y el sedimento se lavó dos veces con PBS para eliminar el anticuerpo sin reaccionar. El sedimento se suspendió en 50 μ l de una solución que contiene anticuerpo secundario diluido (Ig anti-ratón 30 de cabra conjugado con FITC fabricado por Zymed, se hizo reaccionar a 4°C durante 30 minutos en una habitación oscura. Después de lavarlo dos veces, el sedimento se suspendió en 50 μ l de una solución que contiene anticuerpo anti-CD(conjugado con ficoeritrina (PE) y anticuerpo anti-CD4 conjugado con aloficocianina (APC), se hizo reaccionar a 4°C durante 30 minutos en un cuarto oscuro, y después se lavó dos veces. Finalmente se añadieron 200 μ l de PBS al sedimento celular después de la centrifugación. Los timocitos se clasifican en cuatro subconjuntos de acuerdo con patrón de expresión de CD4 y CD8 (es decir, timocitos CD4 CD8 doble negativo, timocitos CD4⁺ CD8⁺ doble positivo, y timocitos CD4⁺ CD8⁺ CD4 CD8⁺ positivo simple) y la proporción de células EB- 1-positivas y la intensidad y la tinción EB-1 se analizaron por citometría de flujo. La figura 2 muestra los resultados del análisis con citometría de flujo tricolor que muestra la reactividad de EB-1 en frente a todos los subconjuntos de timocitos, en particular la mayor intensidad de tinción en los timocitos doble positivo. En la figura 2, la línea continua representa la tinción por el anticuerpo EB-1, y el perfil de tinción negativa por un anticuerpo irrelevante se muestra como histograma relleno.

Ejemplo 4

25 Con el fin de obtener una alta concentración del anticuerpo secretado por el clon de hibridoma que secreta EB-1, se prepararon ascitis. Tres semanas después de administrar 0,5 ml de pristina por vía intraperitoneal a ratones Balb/c, se cultivaron 10^7 clones de hibridoma EB-1 en DMEM que contiene suero bovino al 10%. Después de 2 a 3 semanas, se recogieron las ascitis. Entonces la concentración de anticuerpo era de 5 a 10 mg/ml. Sólo se purificaron las inmunoglobulinas que responden a los timocitos humanos porque hay muchas proteínas contaminantes como la albúmina de la ascitis. Para purificar el anticuerpo de la ascitis que contiene alta cantidad de anticuerpos obtenidos a partir de ratón Balb/c en los que se administraron células de hibridoma de EB-1 monoclonal por vía intraperitoneal, se realizó cromatografía de Q-Sepharose y cromatografía de hidroxipatita (Gel de Bio-gel HTP fabricado por Pharmacia).

35 Se agregaron lentamente 3,14 g de sulfato de amonio por cada 10 ml de ascitis en hielo (precipitado con 50% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). La mezcla se centrifugó a 15.000 rpm durante 30 minutos, se volvió a suspender en agua desionizada y se dializó en 1 litro de disolución tampón (fosfato 20 mM, pH 7,4). La disolución se pasó y absorbió por una columna Q-Sepharose equilibrada previamente con una disolución tampón (fosfato 20 mM, pH 7,4), y después la disolución tampón se volvió a pasar a través de la columna para eliminar las proteínas libres en la columna, después de lo cual la proteína absorbida en columna se eluyó con un gradiente lineal de 0 M a 0,8 M de NaCl utilizando una disolución tampón I (fosfato 20 mM, pH 7,4) y una disolución tampón II (fosfato 20 mM y NaCl 8,5 M , pH 7,4). Cada fracción se sometió a electroforesis en SDS-PAGE y se recogieron las fracciones que contenían anticuerpo EB-1.

45 Las fracciones se dializaron en una disolución amortiguadora (fosfato 20 mM, pH 6,8), y se pasaron a través de una columna de hidroxipatita equilibrada previamente con una disolución amortiguadora (fosfato 20 mM, pH 6,8). La fracción en la disolución amortiguadora (fosfato 20 mM, pH 6,8) se pasó a través de la columna para eliminar las proteínas libres y se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 0,3M de fosfato utilizando la disolución amortiguadora III (fosfato 20 mM, pH 6,8) y la disolución amortiguadora (fosfato 300 mM, pH 6,8). Cada fracción se sometió a electroforesis en SDS -PAGE y se recogieron las fracciones que contenían más del 95% de anticuerpo EB-1. El anticuerpo EB- 1 recogido se dializó en una disolución amortiguadora apropiado y se almacenó. Se prepararon de 5 a 10 mg de anticuerpo EB- 1 a partir de 1 ml de ascitis por experimentos repetidos.

Ejemplo 5

50 El presente ejemplo se llevó a cabo de acuerdo con la citometría de flujo del ejemplo 3 para investigar si el anticuerpo EB-1 es reactivo frente a los leucocitos normales excepto el timo utilizando el anticuerpo EB-1 purificado del Ejemplo 4 como anticuerpo primario. Para este análisis, la anticuerpo EB- 1 purificado se combinó directamente con FITC o PE, en cuyo caso no fue necesario usar el anticuerpo secundario para fluorescencia, o se utilizó el anticuerpo EB-1 conjugado con biotina combinado con estreptavidina conjugada con un fluorescente.

55 La tabla 2 a continuación muestra la reactividad del anticuerpo EB-1 en la superficie celular de leucocitos de sangre periférica normales, de células mononucleares de sangre periférica activadas cultivadas en un medio que contiene 10 μ g/ml de fitohemaglutinina (PHA) o 5 μ g/ml de anticuerpo anti-CD3, de células de bazo normales, de timocitos normales, células madre hematopoyéticas CD34⁺ AC 133⁺ de sangre de cordón umbilical. Todas ellas eran

negativas para el anticuerpo EB-1, a excepción de los timocitos. Los resultados representativos de análisis de citometría de flujo de los leucocitos normales se muestran en la figura 3, en la cual la línea continua representa la tinción por anticuerpo EB-1, y el perfil de tinción negativa por un anticuerpo irrelevante se muestra como histograma relleno.

5

TABLA 2

Células	Positivo para EB-1
Células de sangre periférica	-*
Eritrocitos	-
Linfocitos	-
Monocitos	-
Granulocitos	-
Sangre periférica activada PHA (10 µg/ml)	-
Anticuerpo anti-CD3 (5 µg/ml)	-
Esplenocitos	-
Timocitos	+++*
Células madre hematopoyéticas de sangre de cordón umbilical CD34 ⁺ AC 133 ⁺	-

*Tinción negativa

**Tinción positiva en más del 90% de las células PHA, fitohemaglutinina

Ejemplo 6

10

El presente ejemplo se llevó a cabo de acuerdo con el ensayo inmunohistoquímico del ejemplo 2 para confirmar si el anticuerpo EB-1 reacciona contra los tejidos normales excepto el timo utilizando anticuerpo EB-1 purificado del ejemplo 4 como anticuerpo primario. La tabla 3 a continuación es la reactividad del anticuerpo EB-1 en cada uno de los diversos tejidos. A excepción de los timocitos, todos los otros tejidos incluyendo el tejido linfoide periférico, cerebelo, páncreas, ovario y testículo, piel, pulmón, suprarrenal y riñón eran negativos para la tinción.

TABLA 3

Órgano	Nº de casos	Nº de positivos para EB-1
Sistema linfoide		
Nódulo linfático	18	0
Amígdala	3	0
Timo	6	6
Bazo	4	0
Sistema nervioso		
Cerebro	4	0
Cerebelo	4	0
Sistema digestivo		
Esófago	3	0
Estómago	10	0
Intestino delgado	2	0
Intestino grueso	2	0
Hígado	7	0
Páncreas	4	0
Apéndice vermiforme	4	0
Sistema reproductor		
Testículo	2	0
Ovario	8	0
Útero	4	0
Los otros		
Pulmón	8	0
Riñón	9	0
Glándula suprarrenal	5	0
Piel	4	0

Ejemplo 7

El presente ejemplo se llevó a cabo de acuerdo con el análisis de citometría de flujo del ejemplo 3 por si el anticuerpo EB-1 reacciona contra las células normales de la médula ósea utilizando anticuerpo EB-1 purificado del Ejemplo 4 como anticuerpo primario. Para este análisis, se utilizó anticuerpo EB-1 conjugado con biotina y estreptavidina conjugada con APC en combinación con anti-CD10 conjugado con FITC, anti-CD33, anti-CD38, anti-CD71, o anti-AC133, y anti-CD34 conjugado con PE. La figura 4 es el resultado del análisis de citometría de flujo de tres colores, en el que se depuraron las células CD34⁺. Las células madre pluripotentes se definieron como células CD34⁺ AC133⁺ (figura 4A) o CD34⁺ CD38^{-dim} (Fig. 4B) en la médula ósea o sangre del cordón umbilical y no mostraron reactividad alguna contra el anticuerpo EB-1. Además, las células CD34⁺ CD33⁺ (Fig. 4D) que contenían prácticamente la totalidad de las células formadoras de colonias tales como las células progenitoras capaces de formar los granulocitos, eritrocitos, monocitos, megacariocitos (CFU-GEMM), CFU-GM, unidades formadoras de brotes de eritrocitos, y células progenitoras precursoras de eritrocitos CD34⁺CD71^{bright} tampoco se tiñeron con el anticuerpo EB-1. Por el contrario, la tinción positiva del anticuerpo EB-1 que se observa en el de la mayoría de los precursores CD34⁺CD10⁺ de linfoides (Figura 4C).

En resumen de los resultados, la reactividad de EB-1 está restringida a los timocitos y algunos precursores hematopoyéticos en la médula ósea, pero no se encuentra en ninguna otra célula hematopoyética incluyendo las células maduras de sangre periférica y células madre hematopoyéticas y los tejidos no hematopoyéticos.

Ejemplo 8

Con el fin de aclarar el antígeno reconocido por el anticuerpo EB-1, se preparó una biblioteca de ADNc de timocitos humanos utilizando ARN poli(A)+ y el vector de expresión pcADN3 fabricado por Invitrogen. Esta biblioteca contenía 3,5x10⁶ colonias independientes. La cepa de la bacteria hospedadora utilizada fue la *Escherichia coli* MC1061/P3. El plásmido pMIK/D3T 31 se construyó insertando el fragmento XhoI del clon de ADNc de la sintasa Gb3, pD3T 31 (Haraguchi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S. A. 1994, 91: 10455-9), en el vector de expresión pMIK/Neo.

Los plásmidos de la biblioteca de ADNc y se amplificaron una vez y transfectaron en células 293T junto con el plásmido pMIK/D3T-31 utilizando DEAE-dextrano como se describe anteriormente (Davis et al., Methods in Molecular Biology, Elsevier Science, New York 1986:285-289). Se cotransfectaron células 293T subconfluentes, 1.5x10⁶ en placas de 10 cm con 8 µg cada una del plásmido de la biblioteca de ADNc y pMIK/D3T-31. Después de 60 h, las células transfectadas se separaron de las placas y se incubaron con anticuerpo EB-1 a una dilución 1:200 en hielo durante 45 minutos. Las células se sembraron en placas revestidas con IgM anti ratón de cabra anti como se describe anteriormente (Wysocki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1978, 75:2844-8). Se rescató ADN del plásmido de las células cribadas y se transformó en 293T. El ADN del plásmido ampliado se transfectó de nuevo, y el mismo procedimiento repitió cuatro veces más. Después de eso se prepararon 96 grupos que contenían 30 colonias cada uno y se seleccionaron por la reactividad a EB-1. Por último, se seleccionaron 17 clones de dos grupos positivos, y se aislaron tres colonias individuales que dirigían la reactividad de EB-1 a 293T utilizando transfección con DEAE-dextrano a microescala y ensayo de inmunofluorescencia.

Un plásmido de ADNc aislado fue digerido por XhoI y HindIII y se clonó en un vector fagémido BlueScript (pBSK) KS(+). Se prepararon mutantes de delección de este clon con un kit de delección de Kilo-secuencia. Se realizó la secuenciación de terminación didesoxinucleotídica bien cebadores de tinción T3/T7 o cuatro terminadores didesoxi adicionales a medida con el kit de secuenciación cíclica determinador de tinción PRISM y el secuenciador de ADN modelo 377 fabricados por Applied Biosystems. Una búsqueda blast de la secuencia de ADN identificada a través de este procedimiento reveló que el antígeno reconocido por el anticuerpo EB-1 es CD43 humano.

Para confirmar qué el anticuerpo EB-1 reconocía los antígenos CD43 humanos, se tiñeron células 293T transfectadas con CD43 humano con anticuerpo EB-1 y un bien conocido anticuerpo anti-CD43, DFT- 1. Como se muestra en la figura 5, el anticuerpo EB- 1 no era reactivo contra células 293T silvestres, mientras que las células 293T transfectadas con CD43 se tiñeron con anticuerpos EB-1 y DFT 1. Por lo tanto, EB-1 es un anticuerpo monoclonal contra la CD43 humano.

Como la CD43 es una proteína muy glicosilada, se investigó si el tratamiento sialidasa de moléculas CD43 modifica la inmunorreactividad del anticuerpo EB-1 contra el antígeno CD43. La figura . La figura 6 muestra un análisis de citometría de flujo de células Molt-4 con o sin tratamiento con sialidasa. La línea de puntos representa el perfil de tinción negativa por un anticuerpo irrelevante, y las líneas continuas finas y gruesas representan la inmunorreactividad del anticuerpo EB-1 sobre las células Molt-4 no tratadas y tratadas con sialidasa, respectivamente. La inmunorreactividad del anticuerpo EB-1 sobre las células Molt-4 no se vio afectado por el tratamiento con sialidasa.

Para confirmar estos resultados, le llevó a cabo SDS- PAGE e inmunotransferencia de Western. Se suspendieron 1x10⁷ timocitos humanos o células tumorales Molt-4 con o sin tratamiento con sialidasa en 1 ml de disolución amortiguadora lítica (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 al 0,5% p/v y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM), se agitó a 4°C durante 30 minutos, y se centrifugó a 13.000 g durante 15 minutos para eliminar los núcleos. El sobrenadante se separó por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-

PAG) al 10% en las condiciones reducidas. La concentración de acrilamida de los geles de separación era del 10% y se utilizaron marcadores de peso molecular apropiados. La transferencia electroforética de las proteínas a membranas de nitrocelulosa se realizó a 45 V durante 16 horas. Después de la transferencia de proteínas, las membranas de nitrocelulosa se incubaron durante dos horas con un tampón de bloqueo que contenía 5% de leche desnatada y 0,05% de Tween-20 en PBS, y después se incubaron durante la noche con anticuerpo EB-1 diluido en un tampón de bloqueo con una concentración de 1 g/ml. Las membranas se lavaron tres veces con un tampón de lavado (PBS con 0,05% de Tween 20) y se incubaron durante 1 h con inmunoglobulina G anti-ratón de cabra purificada por afinidad conjugada con peroxidasa de rábano diluida a 1:3000 en un tampón de bloqueo. Después de tres lavados, cada banda de proteína reactiva se detectó con un kit de quimioluminiscencia mejorada (ECL) fabricado por Amersham Pharmacia Biotech. La figura 7 muestra el análisis por SDS-PAGE e inmunotransferencia de Western de lisado de timocitos (A & B) y células Molt- 4 células (C & D) con anticuerpo EB-1. Los carriles A y C representan la electroforesis del lisado celular no tratado con sialidasa, mientras que los carriles B y D representan la electroforesis del lisado tratado con sialidasa. El anticuerpo EB-1 reconoció tanto las moléculas CD43 tratadas con sialidasa como las no tratadas. Esto sugiere que el anticuerpo EB-1 podría reconocer la región no glicosilada de la molécula CD43.

Ejemplo 9

Con el fin de definir el epítipo de CD43 reconocido por el anticuerpo EB-1, se construyeron mutantes de CD43. La secuencia de codificación del gen de la CD43 humana se amplificó a partir de un ADNc de CD43 y se utilizó para la construcción de vectores de expresión. Por ejemplo, para producir la proteína de fusión glutatión-S-transferasa (GST), se construyeron plásmidos recombinantes de CD43 mediante la clonación de fragmentos de PCR en el vector pGEX-2T fabricado por Pharmacia. Los cebadores usados para la amplificación de PCR se seleccionaron en base a la secuencia en GeneBank y modificados para contener BamHI y los sitios de restricción o EcoRI, o BglII para facilitar la clonación tanto los productos de PCR purificados como el vector pGEX -2T fueron digeridos con BamHI y o bien BglII o EcoRI a 37°C durante la noche, se ligaron utilizando la T4 ADNligasa fabricada a 16°C durante la noche, y después utilizados para transformar células TOP10F' competentes de *E. coli*. La figura 8 muestra un diagrama esquemático de 11 mutantes de delección de CD43. Por ejemplo, la pGEX1-253 representa el vector pGEX-2T que contiene del 1° al aminoácido 253 de la CD43 humana.

Para expresar las proteínas de fusión GST que contenían secuencias de CD43 humanas, se cultivaron células TOP10 de *E. coli* transformadas con los plásmidos recombinantes a 37°C durante la noche en un medio de Luria broth (LB) que contenía ampicilina a 50 µg/ml. Las células cultivadas durante la noche se diluyeron 20 veces con medio LB fresco que contenía la misma concentración de ampicilina y se cultivaron a 37° C durante 3 a 4 h hasta que se alcanzó un un valor de densidad óptica de 0,6. La expresión génica se indujo añadiendo IPTG en el cultivo hasta una concentración final de 1 mM. Después de 4 h de incubación a 37°C con agitación constante, las células se sedimentaron por centrifugación a 6000 g durante 15 minutos a 4°C y luego se volvieron a suspender con 3 ml de tampón de lisis (Tris-HCL 50 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM) por cada gramo de células empaquetadas. La suspensión se incubó en hielo durante 30 min con una concentración final de 0,2 mM de PMSF.

Para la inmunotransferencia de Western de los mutantes de CD43 con anticuerpo E -1, se separaron partes alícuotas de cada lisado de proteína de fusión GST-CD43 por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% seguido por transferencia a membranas de nitrocelulosa. La membrana de nitrocelulosa se tiñó con anticuerpo EB-1 o anticuerpo policlonal anti-GST y cada banda de proteína reactiva se detectó por quimioluminiscencia aumentada de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 8. La figura 9 muestra el análisis de inmunotransferencia de Western del mutante de CD43 con anticuerpos EB-1 (A) y anti-GST (B). El carril 1 representa pGEX1-253, el carril 2 pGEX1-98, el carril 3 pGEX1-87, el carril 4 pGEX1-81, el carril 5 pGEX1-75, el carril 6 pGEX1-70, el carril 7 pGEX70-99, el carril 8 pGEX71-81, el carril 9 pGEX73-81, el carril 10 pGEX76-81, el carril 11 pGEX73-80, el carril 12 pGEX2T, y el carril 13 el lisado de timocitos humanos. Como se muestra en la figura 9, pGEX73-81 contiene la secuencia mínima de reconocimiento del antígeno CD43 por EB-1 y por lo tanto el epítipo de CD43 para el anticuerpo EB-1 es la secuencia del aminoácido 73 al 81 de CD43. La secuencia es la siguiente, Glu Gly Ser Pro Leu Trp Thr Ser Ile (SEC ID NO: 2). Por tanto, esta secuencia es muy útil en cuanto a que el epítipo reconocido por el anticuerpo EB-1 no se expresa en células sanguíneas maduras, células madre hematopoyéticas, subconjuntos de precursores hematopoyéticos en la médula ósea o cualquier tejido no hematopoyético.

Ejemplo 10

Los ejemplos 3, 5, 6 y 7 muestran que la inmunoreactividad de EB-1 está restringida a subconjuntos de precursores hematopoyéticos en la médula ósea excepto las células madre hematopoyéticas. En este ejemplo la expresión del epítipo de CD43 reconocido por el anticuerpo EB-1 en las células de leucemia se investigó de acuerdo con el análisis de citometría de flujo del ejemplo 3. La sangre periférica se recogió en tubos de EDTA de pacientes de leucemia y se retiraron los eritrocitos y granulocitos maduros por centrifugación utilizando Ficoll-Hypaque fabricado Amersham Pharmacia Biotech. Las células purificadas se tiñeron con EB-1 conjugado con FITC y analizadas mediante citometría de flujo. La tabla 4 a continuación es el resultado del análisis de los marcadores de muestras de leucemia utilizando anticuerpo EB-1 con citometría de flujo. En 31 de 38 casos de leucemia (81,6%), que incluye leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica aguda (LLA) y la leucemia mieloide crónica (LMC) con crisis blástica, las células tumorales se tiñeron con el anticuerpo EB-1. La figura 10 muestra el patrón de tinción de

citometría de flujo representativo de las células de leucemia utilizando anticuerpo EB-1. La línea continua representa la tinción por el anticuerpo EB-1, y el perfil de tinción negativa por al anticuerpo irrelevante se muestra como histograma relleno.

TABLA 4

Tipo de leucemia	Nº de casos	Positivo para EB-1	
		Nº de casos	%
LMA	22	20	90,9
M1	6	6	100,0
M2	8	7	87,5
M3	1	1	100,0
M4	4	4	100,0
Otras	3	2	66,7
LLA	13	9	69,2
LMC con crisis blástica	3	2	66,7
Total	38	31	81,6

5

El presente ejemplo también se llevó a cabo de acuerdo con el análisis inmunohistoquímico del Ejemplo 2 para investigar si el anticuerpo EB-1 es reactivo frente a las células del linfoma linfoblástico utilizando el anticuerpo EB-1 purificado del Ejemplo 4 como anticuerpo primario. La figura 11 muestra el patrón de inmunotinción por el anticuerpo EB-1 representativo del tejido del linfoma linfoblástico. En su conjunto, 4 de los 9 (44,4%) casos de linfoma linfoblástico mostraron tinción positiva por el anticuerpo EB-1.

10

Por lo tanto, el anticuerpo EB-1 y su epítipo de CD43 podrían ser potentes herramientas de diagnóstico y terapéuticas para los distintos tipos de leucemia aguda, leucemia crónica con crisis blástica y linfoma linfoblástico.

Ejemplo 11

Con el fin de determinar el potencial terapéutico del anticuerpo EB-1, se desarrollaron la inmunotoxina EB-1 y un modelo de leucemia humana en ratones. Para producir la inmunotoxina, se conjugaron saporina fabricada por Sigma, y anticuerpo EB-1 a través de un puente disulfuro entre grupos sulfhidrilo (SH) químicamente insertados (Polito et al., 2004). El modelo de leucemia humana en ratones se estableció mediante la inyección de 2×10^5 células CCRF-CEM en un volumen de 300 μ l de PBS en la vena de la cola de ratones RAG-1 deficientes. Una semana más tarde, cada ratón fue tratado con cuatro dosis de 100 μ g de ya sea anticuerpo EB-1, inmunotoxina saporina EB-1, o un anticuerpo irrelevante como una inyección en bolo (en un volumen de 300 μ l de PBS) en la vena de la cola cada dos días (i. e. los días 7, 9, 11 y 13). Cuatro semanas después de la inyección intravenosa de las células CCRF-CEM, una muestra de sangre del plexo retro-orbital se tiñó con anticuerpo EB-1 conjugado con FITC y anticuerpo anti-MHC de clase I humana conjugado con PE de acuerdo con el análisis de citometría de flujo de los ejemplos 3 y 10. La figura 12 es el resultado representativo del análisis de citometría de flujo de células de leucemia en la sangre de los ratones. En los ratones de control, el 23,4 % de las células de la sangre periférica eran tanto células humanas CD43 como células CCRF-CEM MHC de clase I positivas humanas, donde las células CCRF-CEM se redujeron hasta el 1,3% en ratones tratados con inmunotoxina saporina EB-1. La carga de células de leucemia también decreció como el doble en los ratones tratados sólo con anticuerpo EB-1, en comparación con los ratones de control. Por lo tanto, el anticuerpo EB-1 podría proporcionar herramientas eficaces para el tratamiento de las células de leucemia aguda a través del suministro de material tóxico en las células tumorales, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), u otros mecanismos.

30

Ejemplo 12

El anticuerpo EB-1 reconoce la secuencia de aminoácidos del aminoácido 73 al 81 de CD43, Glu Gly Ser Pro Leu Trp Thr Ser Ile (SEC ID NO: 2). El presente ejemplo se llevó a cabo para desarrollar nuevos anticuerpos anti-CD43 que son útiles para el diagnóstico y tratamiento de la leucemia y el linfoma. El fragmento de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos del aminoácido 70 al 98 de CD43 que incluye SEQ ID NO:2 fue clonado en el vector pQE-40, y luego se utilizó para transformar células TOP10F' competentes de *E. coli*. Las células TOP10F' transformadas se cultivaron según los métodos del ejemplo 9, y la proteína de fusión CD43 se purificó a partir del lisado de *E. coli* pasando el lisado de *E. coli* a través de la columna de níquel fabricada por Amersham Pharmacia Biotech. Se mezclaron 100 μ g de proteína de fusión SY-CD43 con adyuvante de Freund completo y se administró por vía intraperitoneal y se inmunizó en los ratones Balb/c. Cuatro semanas más tarde, dos dosis adicionales de 100 μ g de proteína de fusión SY-C43 mezclada con coadyuvante de Freund incompleto se administraron por vía intraperitoneal con intervalos de dos semanas. Tres días después del estímulo final, se extirpó el bazo de los ratones y se prepararon células de hibridoma de acuerdo con el método de fusión del ejemplo 1. El sobrenadante del cultivo de células de hibridoma se seleccionó utilizando células murinas EL4 transfectadas con CD43 humanas por citometría de flujo, y se seleccionaron dos clones de hibridoma reactivos contra las células EL4 transfectadas con CD43 y se nombraron como EB-2 y EB-3, respectivamente. La figura 13 muestra el análisis de citometría de flujo de

45

5 la línea celular EL4 transfectada con CD43 humana, timocitos humanos, células de sangre periférica humanas, y células de leucemia aguda humana por anticuerpos EB-2 y EB-3. La línea celular EL4 transfectada con CD43, los timocitos humanos y las células de leucemia humanas eran positivas, pero las células de sangre periférica humana eran negativas para los anticuerpos EB-2 y EB-3. Por lo tanto, el patrón de tinción de los anticuerpos EB-2 y EB-3 es similar al de EB-1.

Ejemplo 13

10 El presente ejemplo se llevó a cabo para determinar el epítipo de CD43 reconocido por los anticuerpos EB-2 y EB-3 de acuerdo con SDS-PAGE y la inmunotransferencia de Western del Ejemplo 9 utilizando mutantes de delección CD43. La figura 14 muestra el análisis de inmunotransferencia de Western de mutantes CD43 con EB-2 y EB-3. El epítipo de CD43 para los anticuerpos EB-3 es similar al de EB-1. Es decir, el epítipo mínimo para los anticuerpos EB-1 y EB-3 es la secuencia de aminoácidos de CD43 del aminoácido 73 al 81 (SEQ ID NO: 2; Glu Gly Ser Pro Leu Trp Thr Ser Ile). Sin embargo, el anticuepo EB-2 podría reconocer una secuencia de péptidos menor que EB-1 y EB-3. El epítipo mínimo para EB-2 es la secuencia de aminoácidos de CD43 desde el aminoácido 76 al 81. La secuencia es la siguiente, Pro Leu Trp Thr Ser Ile (SEQ ID NO: 1).

15 El epítipo de CD43 de la presente invención es útil para el diagnóstico de la leucemia aguda, la leucemia crónica con crisis blástica, y el linfoma linfoblástico por determinación de si este epítipo de CD43 se expresa en la exanimación de tejido o de sangre periférica debido a que este epítipo de CD43 de la presente invención no se encuentra en el tejido normal no hematopoyético, en las células sanguíneas maduras, ni en la sangre periférica activada excepto los timocitos. El epítipo de CD43 de la presente invención se puede utilizar como material diana para el tratamiento de la leucemia aguda, la leucemia crónica con crisis blástica, y el linfoma linfoblástico debido a que no se expresa en las células madre hematopoyéticas ni en tejido normal excepto timocitos y subconjuntos de precursores hematopoyéticos en la médula ósea.

25 La descripción de las realizaciones ejemplares de polipéptidos biológicamente activos es ilustrativa de la presente invención. Debido a la variación que será evidentes para los expertos en la técnica, sin embargo, la presente invención no pretende limitarse a las realizaciones particulares descritas anteriormente. El alcance de la invención se define en las siguientes reivindicaciones.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> DiNonA Inc.
- <120> EPÍTOPO DE CD43 ESPECÍFICO DE LA LEUCEMIA AGUDA Y DEL LINFOMA LINFOBLÁSTICO Y SU USO
- 5 <130> OP060571KR
- <150> US 60/679,910
- <151> 11/05/2005
- <150> KR 10-2005-0077906
- <151> 24/08/2005
- 10 <150> US 11/312,126
- <151> 20/12/2005
- <160> 2
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- 15 <211> 6
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> EP 6
- 20 <400> 1
- Pro Leu Trp Thr Ser Ile
- 1 5
- <210> 2
- <211> 9
- <212> PRT
- 25 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> EP 9
- <400> 2
- Glu Gly Ser Pro Leu Trp Thr Ser Ile
- 1 5
- 30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido aislado que es un epítipo de CD43 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y que tiene menos de 100 aminoácidos de longitud, donde el epítipo de CD43 se expresa específicamente en timocitos, el subgrupo de precursores hematopoyéticos de la médula ósea, células de leucemia aguda, células blásticas de leucemia crónica con crisis blástica y células de linfoma linfoblástico.
2. El polipéptido aislado según la reivindicación 1 que tiene menos de 50 aminoácidos de longitud.
3. El polipéptido aislado según la reivindicación 1, donde el epítipo de CD43 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
- 10 4. Un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a un epítipo de CD43 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
5. Un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 15 6. El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, donde el epítipo de CD43 está expuesto específicamente en los timocitos, el subgrupo de precursores hematopoyéticos de la médula ósea, células de leucemia aguda, células blásticas de leucemia crónica con crisis blástica y células de linfoma linfoblástico, pero no en células hematopoyéticas maduras, células troncales hematopoyéticas, y células no hematopoyéticas.
- 20 7. El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, donde el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
8. El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, donde el anticuerpo se produce inmunizando de un animal con un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y seleccionando el anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 25 9. El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, donde el anticuerpo es un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal.
10. El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 9, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano o animal.
11. El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.
- 30 12. El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, donde el anticuerpo o el fragmento del mismo está etiquetado con el compuesto seleccionado del grupo que consiste en un radioisótopo, material fluorescente, material luminiscente, enzimas, y material teñido.
- 35 13. El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, donde el anticuerpo o fragmento del mismo está unido a un material tóxico seleccionado del grupo que consiste en radioisótopos, productos químicos tóxicos, proteínas tóxicas y agentes antitumorales.
14. El anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 13, donde el anticuerpo o fragmento del mismo se combina con las proteínas tóxicas para producir una proteína de fusión.
- 40 15. Una célula que produce el anticuerpo o fragmento del mismo según la reivindicación 4 o la reivindicación 5.
16. Un método de diagnóstico de la leucemia aguda que comprende incubar células de leucemia en una muestra biológica con el anticuerpo anti-epítipo de CD43 según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, y detectar la reacción inmune positiva del anticuerpo anti-epítipo de CD43.
17. El método de diagnóstico de leucemia aguda según la reivindicación 16, donde la detección de la reacción inmune positiva se podría confirmar utilizando un dispositivo que detecta la reacción enzimática, fluorescencia, luminiscencia o radiación.
- 45 18. Un método de diagnóstico de la leucemia crónica con crisis blástica que comprende incubar las células de leucemia en una muestra biológica con un anticuerpo anti-epítipo de CD43 según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, y detectar la reacción inmune positiva del anticuerpo anti-epítipo de CD43.
- 50 19. Un método de diagnóstico del linfoma linfoblástico que comprende incubar células de linfoma en una muestra biológica con anticuerpos anti-epítipo de CD43 según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, y detectar la reacción inmune positiva del anticuerpo anti-epítipo de CD43.

20. Uso de un anticuerpo anti-epítopo de CD43 según la reivindicación 4 o la reivindicación 5 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la leucemia aguda.
21. Uso de un anticuerpo anti-epítopo de CD43 según la reivindicación 20, donde el anticuerpo anti-epítopo de CD43 está unido a un material tóxico seleccionado del grupo que consiste en radioisótopos, productos químicos tóxicos, proteínas tóxicas o agentes antitumorales.
22. Uso de un anticuerpo anti-epítopo de CD43 según la reivindicación 4 o la reivindicación 5 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la leucemia crónica con crisis blástica.
23. Uso de un anticuerpo anti-epítopo de CD43 según la reivindicación 4 o la reivindicación 5 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del linfoma linfoblástico.
24. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de la leucemia aguda que comprende un anticuerpo anti-epítopo de CD43 según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, y un vehículo aceptable para uso farmacéutico.
25. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de la leucemia crónica con crisis blástica que comprende un anticuerpo anti-epítopo de CD43 según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, y un vehículo aceptable para uso farmacéutico.
26. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento del linfoma linfoblástico que comprende un anticuerpo anti-epítopo de CD43 según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, y un vehículo aceptable para uso farmacéutico.
27. Un kit de diagnóstico para leucemia o linfoma que comprende un anticuerpo anti-epítopo de CD43 según la reivindicación 4 o la reivindicación 5.

FIG. 1



FIG. 2

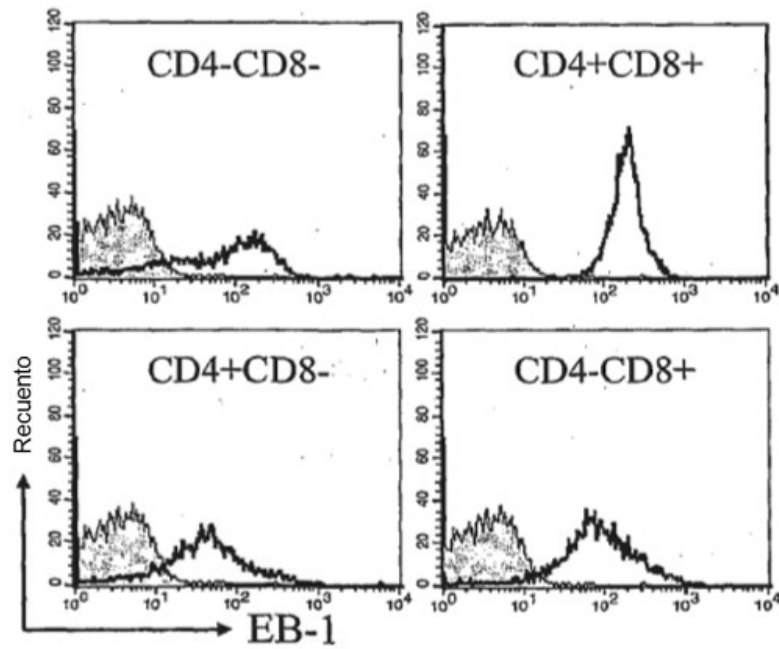


FIG. 3

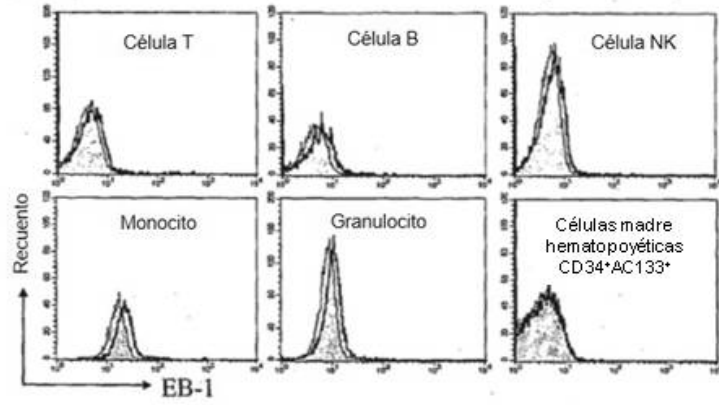


FIG. 4

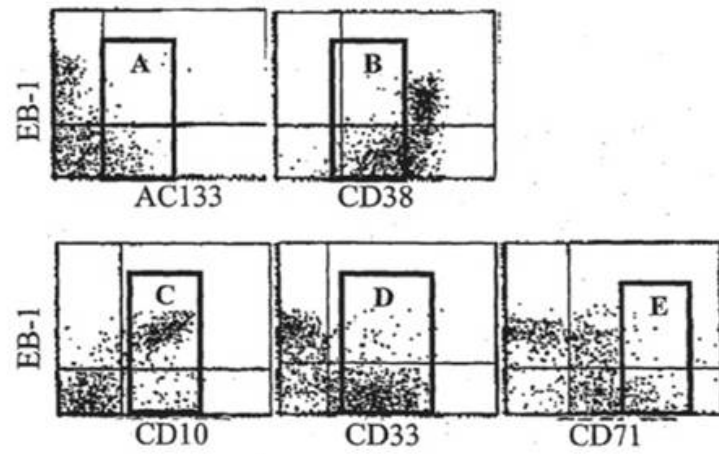


FIG. 5

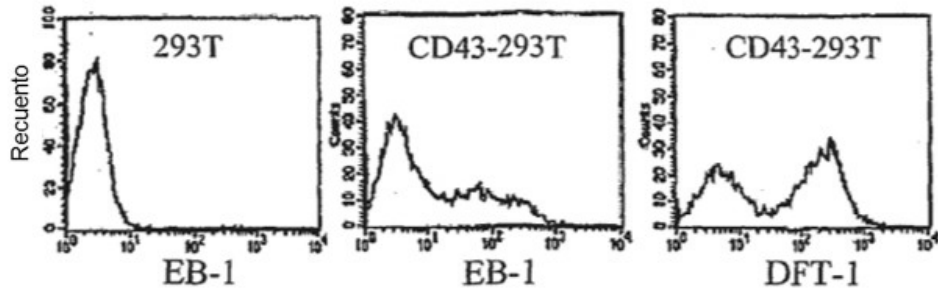


FIG. 6

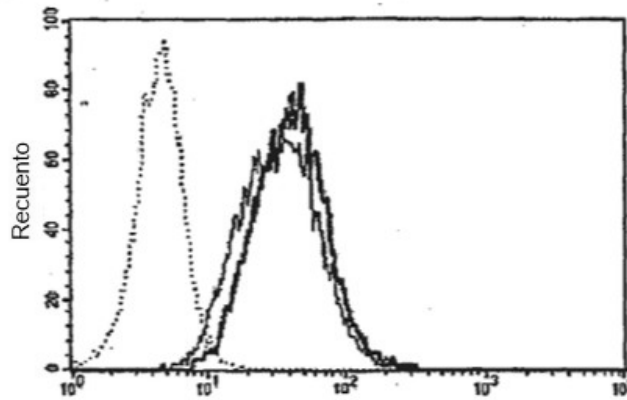


FIG. 7

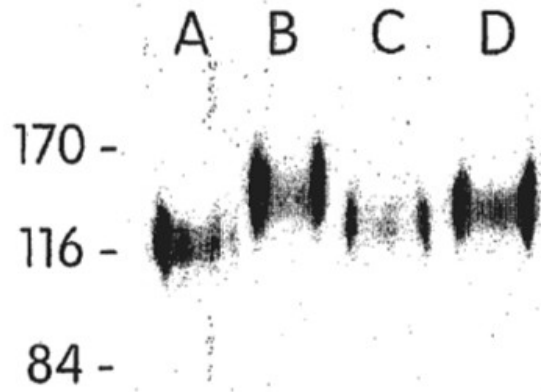


FIG. 8

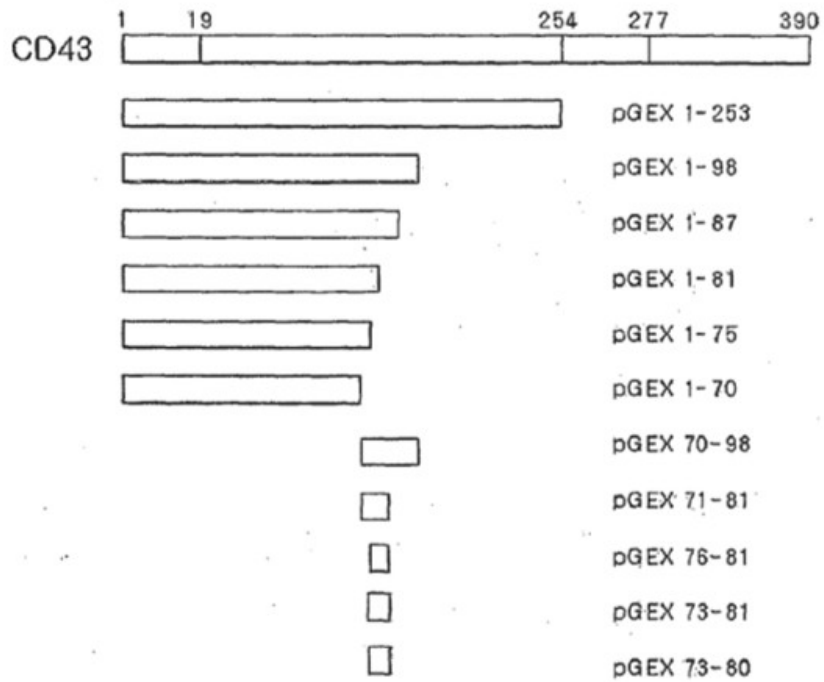


FIG. 9

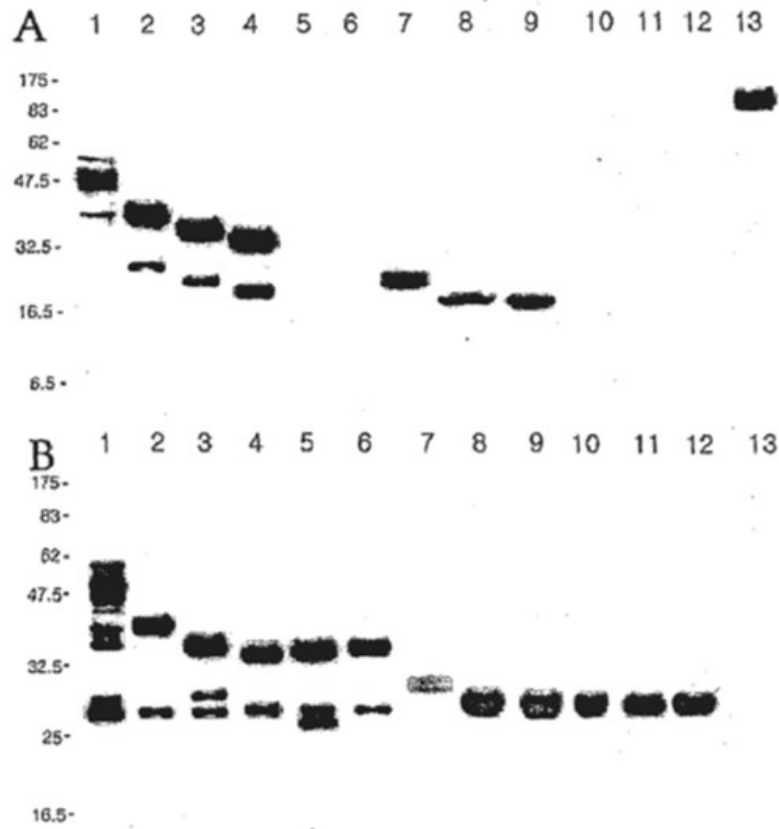


FIG. 10

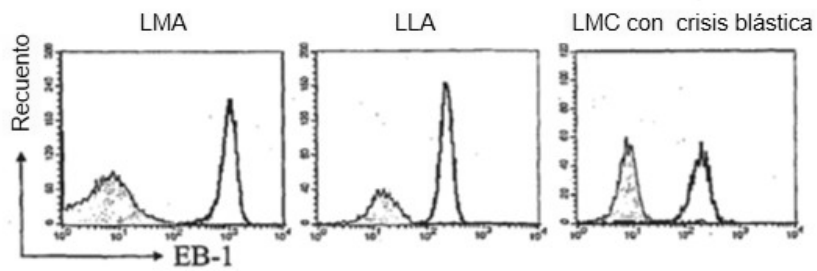


FIG. 11

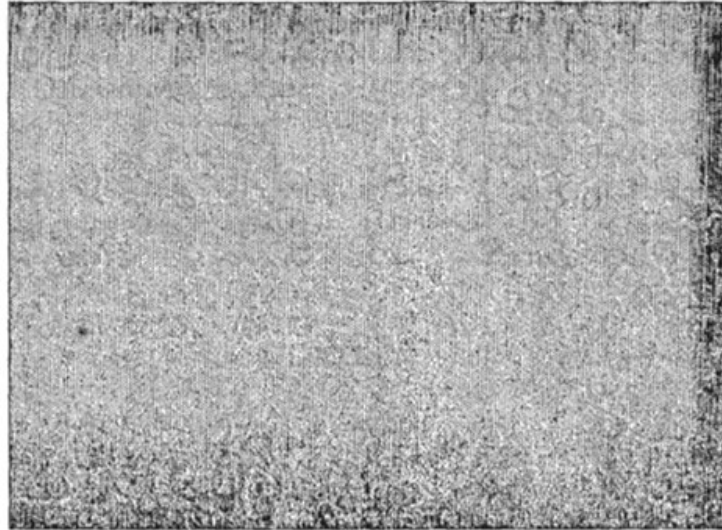


FIG. 12

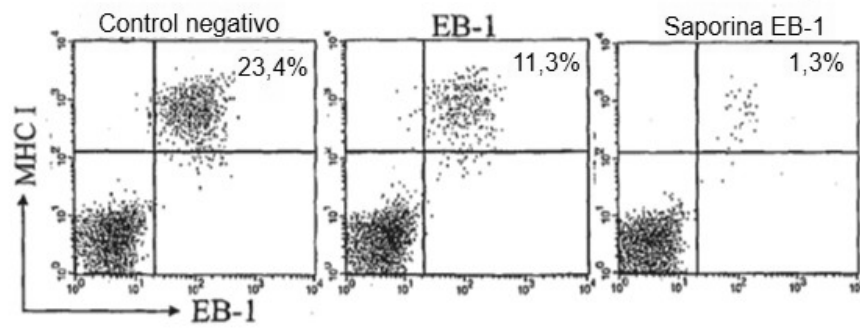


FIG. 13

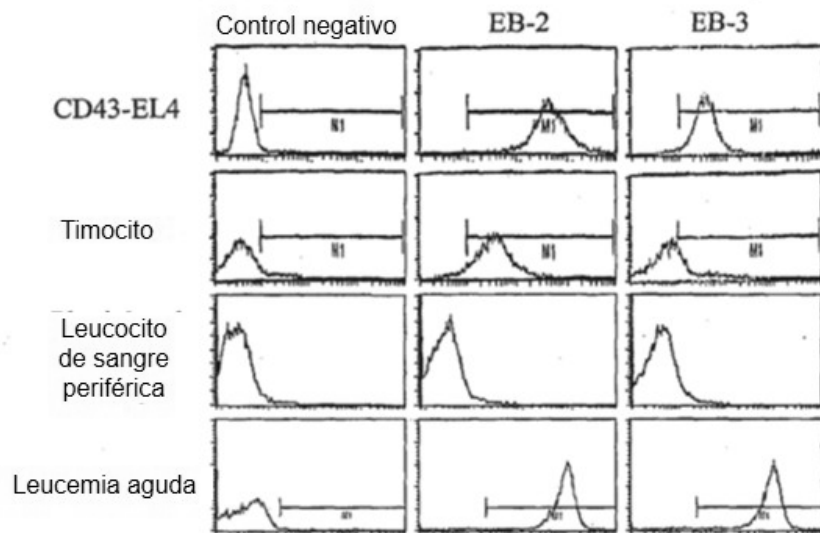


FIG. 14

