



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 982**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 5/07 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03019221 .5**
96 Fecha de presentación : **26.08.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1396501**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.03.2004**

54 Título: **Anticuerpos para la identificación y/o aislamiento de al menos una población celular que se selecciona del grupo que comprende células troncales hematopoyéticas, células troncales neuronales, células precursoras neuronales, células troncales mesenquimatosas y células precursoras mesenquimatosas.**

30 Prioridad: **04.09.2002 DE 102 42 146**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.09.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.09.2010

73 Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Buhring, Hans-Jorg;**
Lammers, Reiner;
Kuci, Selim y
Conze, Tim

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 344 982 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

Anticuerpos para la identificación y/o aislamiento de al menos una población celular que se selecciona del grupo que comprende células troncales hematopoyéticas, células troncales neuronales, células precursoras neuronales, células troncales mesenquimatosas y células precursoras mesenquimatosas.

La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal anti-CDCP1, o a un fragmento del mismo, para aislar y/o identificar al menos una población celular que se selecciona del grupo que comprende células troncales hematopoyéticas, células troncales neuronales, células precursoras neuronales, células troncales mesenquimatosas y células precursoras mesenquimatosas, caracterizado porque el anticuerpo, o el fragmento del mismo, se une a un antígeno que es el mismo al que se une un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma CUB1 (DSM ACC2569), CUB2 (DSM ACC2566), CUB3 (DSM ACC2565) o CUB4 (DSM ACC2551). La invención se refiere además a un anticuerpo monoclonal anti-CDCP1, o a un fragmento del mismo, caracterizado porque se une a la misma estructura antigénica a la que se une un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma CUB1 (DSM ACC2569), CUB2 (DSM ACC2566), CUB3 (DSM ACC2565) o CUB4 (DSM ACC2551), en donde dicho anticuerpo o fragmento es capaz de aislar y/o identificar al menos una población celular que se selecciona del grupo de células troncales hematopoyéticas, células troncales neuronales, células progenitoras neuronales, células troncales mesenquimatosas y células progenitoras mesenquimatosas.

El término "célula troncal" significa, de una manera general, cualquier célula que aún no se ha diferenciado y que posee la capacidad tanto de producir descendientes idénticos como de diferenciarse a líneas de desarrollo específico.

Las células troncales adultas tienen la función de mantener la homeostasis del número de células en el tejido correspondiente, es decir, de reemplazar las células que han muerto. Por esta razón, las células troncales se encuentran particularmente en tejidos que están sometidos a grandes agresiones. Se han encontrado células troncales adultas en una gran variedad de tejidos y órganos, tales como, por ejemplo, médula ósea, cerebro, hígado, piel, intestino, córnea, etc.

En la médula ósea, las células troncales hematopoyéticas producen nuevas células de forma continua ya que estas últimas células se requieren constantemente en la sangre debido al tiempo de vida limitado de la mayoría de las células.

El punto de partida para la formación de células sanguíneas es la célula troncal pluripotente sin diferenciar, que aún no está determinada para una función específica. Cuando las células troncales se diferencian, en primer lugar se forman células precursoras, que son incapaces de replicarse ellas mismas y sólo producen un tipo de células especializado hasta la madurez. Ni la célula troncal pluripotente ni las diferentes fases intermedias son capaces de llenar las funciones hematopoyéticas específicas de célula; son sólo las células que han madurado las que son capaces de hacer esto. Las células progenitoras que han entrado en una vía de diferenciación particular también se mantienen luego en esta vía hasta que se alcanza la maduración (compromiso).

Además de las células troncales para células hematopoyéticas, también están presentes en la médula ósea células similares a células troncales que son progenitores de tejidos no hematopoyéticos. Estos progenitores de tejidos no hematopoyéticos se denominaron originalmente, entre otros, células adherentes a plástico en cultivo celular y más recientemente se han denominado bien células troncales mesenquimatosas o células de estroma de médula ósea (MSC).

Estas células tienen interés no sólo debido a su multipotencia con respecto a la diferenciación; también tienen interés, por ejemplo, por su posible uso en terapia celular y terapia génica.

El hecho de que, en ciertas condiciones, las células troncales mesenquimatosas también se puedan diferenciar a células nerviosas significa que, entre otros, hay una necesidad de ser capaz de distinguir estas células troncales mesenquimatosas de las células progenitoras neuronales.

Estas células progenitoras neuronales (denominadas más adelante NPC) se encuentran en el sistema nervioso central. También expresan nestina y son capaces de diferenciarse a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

Las células progenitoras neuronales con positivas para CD133; este marcador de superficie celular se encontró originalmente en células troncales hematopoyéticas. Sin embargo, recientemente se ha mostrado que este marcador también se expresa en tejido nervioso y tejido de músculo esquelético. Por estas razones, este marcador no es adecuado para distinguir entre diferentes células troncales o células progenitoras por sí mismo.

Puesto que, como ya se ha mencionado, las células troncales hematopoyéticas generan continuamente nuevas células en la médula ósea, las células troncales coexisten con las células progenitoras al mismo tiempo en la médula ósea. En la médula ósea, estas células están presentes en una disposición compleja, haciendo por ello difícil identificar células raras. Las células troncales y sus descendientes directos expresan un fenotipo que es virtualmente idéntico. Por estas razones, no es posible tampoco identificar una célula troncal final simplemente en base a características visibles.

La frecuencia de células troncales en la médula ósea es desde 1×10^{-5} hasta 1×10^{-6} . Además, las células troncales como regla están muy diseminadas en el tejido determinado, lo que significa que son difíciles de detectar.

ES 2 344 982 T3

Como se ha mencionado anteriormente, las células troncales hematopoyéticas se dividen, en ciertas condiciones, a células progenitoras cuya diferenciación adicional ya está en algún grado determinada. Dependiendo de la naturaleza y cantidad de las citoquinas que están presentes, estas células progenitoras mieloides y linfoides pueden a su vez generar una variedad de otras células progenitoras que, sin embargo, ya no son capaces de replicarse ellas mismas. Ejemplos de citoquinas que regulan la hematopoyesis son el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), varias interleuquinas, el factor de células troncales (SCF), eritropoyetina (EPO), etc.

Para investigar el potencial hematopoyético (formación de células sanguíneas) de las células troncales, se trasplantan poblaciones relevantes de células humanas en ratones inmunodeficientes (ratones NOD/SCID). Si las células trasplantadas son células troncales, es posible detectar hematopoyesis humana además de la hematopoyesis murina. Este ensayo *in vivo* se usa para caracterizar e identificar células troncales analizando de hecho la progenie de células individuales.

Como se puede ver por lo anterior, las células troncales hematopoyéticas poseen un gran potencial terapéutico y se usan en paciente en los que el sistema inmune está dañado o destruido por completo.

Se puede usar FACS (separador celular activado por fluorescencia), por ejemplo, para purificar células troncales hematopoyéticas de la médula ósea. Esta purificación depende de la presencia, en las células troncales, de proteínas de superficie celular particulares que distinguen las células troncales hematopoyéticas y las células progenitoras de otros tipos de células y de la ausencia de otras proteínas de superficie celular, estas últimas proteínas son características de células hematopoyéticas diferenciadas. Cada una de las proteínas de superficie se une a un anticuerpo monoclonal diferente, estando conjugado cada uno estos anticuerpos a un colorante fluorescente diferente, haciendo de esta manera posible usar FACS para separar las células.

En el pasado se ha usado el marcador de superficie celular CD34, en particular, para el aislamiento de células troncales hematopoyéticas.

Además, recientemente se han usado anticuerpos dirigidos contra el antígeno CD133 para caracterizar células troncales hematopoyéticas. Miraglia *et al.*, "A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization and molecular cloning", *Blood* 90: 5013-5021, (1997) han mostrado que este antígeno es una glicoproteína de 120 kDa que posee cinco dominios transmembrana y que se expresa no sólo en células troncales hematopoyéticas y sus progenitores sino también en células troncales neuronales y endoteliales.

Los anticuerpos de CD133 se usan, además de los anticuerpos convencionales contra CD34, para seleccionar de forma positiva células troncales hematopoyéticas y células progenitoras a escala clínica. CD133 sólo se expresa en células troncales y células progenitoras CD34^{bright} (intensidad de fluorescencia alta). Las células positivas para CD34^{bright} y CD133 son en general negativas para otros marcadores de células progenitoras eritroides tales como CD36 y glicoforina A. Además de células troncales que inducen hematopoyesis humana en el modelo de ratón NOD/SCID, también se han encontrado la mayoría de las células progenitoras de granulocitos/macrófagos en las fracciones positivas para CD133 derivadas de médula ósea humana y sangre periférica.

En vista de lo anterior, es un objeto de la presente invención proporcionar un nuevo anticuerpo monoclonal que se puede usar para aislar y/o caracterizar selectivamente poblaciones celulares particulares, en particular células troncales hematopoyéticas y también células troncales y progenitoras neuronales y mesenquimatosas.

Según la invención, este objeto se alcanza por medio de un anticuerpo monoclonal, o un fragmento del mismo, con el anticuerpo, o fragmento del mismo, que se une al mismo antígeno que un anticuerpo producido por las líneas celulares de hibridoma CUB1, CUB2, CUB3 y CUB4, que se depositaron en la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen [colección alemana de microorganismos y cultivos celulares] (DSMZ), según el tratado de Budapest, con los números DSM ACC2569, DSM ACC2566 y DSM ACC2565, el 14/08/2002, y DSM ACC2551, el 12/07/2002.

El objeto subyacente de la presente invención se alcanza completamente de esta manera.

Los inventores fueron capaces de demostrar, en sus propios experimentos, que es posible usar los nuevos anticuerpos según la invención para aislar y caracterizar células troncales hematopoyéticas, células troncales y células progenitoras mesenquimatosas y células troncales y células progenitoras neuronales. Además de esto, se encontró que la selectividad de los nuevos anticuerpos era similar a la de un anticuerpo dirigido contra CD133.

La invención se refiere, en particular, a anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos, que están producidos por las líneas de células de hibridoma CUB1, CUB2, CUB3 y CUB4.

Los inventores fueron sorprendentemente capaces de aislar los anticuerpos usando el antígeno CDCP1.

CDCP1 es una proteína de membrana plasmática que posee tres potenciales dominios "CUB". Estos dominios son dominios similares a inmunoglobulina que se designan con las letras iniciales de las tres primeras moléculas que se identificaron que poseen tales dominios. Se sabe que las proteínas que poseen estos dominios se expresan preferentemente en la fase embrionaria y las fases iniciales del desarrollo.

El gen CDCP1 que codifica esta proteína (“proteína que contiene dominios CUB”) ha sido descrito por Scherl-Mostageer *et al.*, “Identification of a novel gene, CDCP1, overexpressed in human colorectal cancer”, *Oncogene* 20: 4402-4408, (2001). Este grupo de investigación mostró que esta proteína, o su ARNm, se sobreexpresan fuertemente en tipos de cánceres o tumores tales como cáncer de intestino y cáncer de pulmón. En base a su estructura tridimensional, se identificó como que era una proteína transmembrana que poseía tres dominios CUB en el dominio extracelular y los autores propusieron que estaría implicada, en particular, en adhesión celular o interacción con la matriz extracelular (véase Scherl-Mostageer *et al.*).

Sin embargo, la posibilidad de que esta proteína se pudiera expresar también, en particular, en células troncales hematopoyéticas primitivas en la médula ósea y sangre periférica y también en células troncales y células progenitoras mesenquimatosas o neuronales ni se describe ni se sugiere en esta publicación.

En lugar del anticuerpo que se menciona en cada caso, también es posible, dentro del contexto de la presente invención, usar un fragmento del anticuerpo sin que esto se mencione expresamente en cada caso. En relación a esto, se entiende que “fragmento” significa cualquier fragmento del anticuerpo que retiene la función de unión al antígeno del anticuerpo. Ejemplos de tales fragmentos son F_{ab} , $F_{(ab)2}$, F_v y otros fragmentos tales como fragmentos CDR (“región determinante de complementariedad”, región hipervariable). Dichos fragmentos muestran la especificidad de unión del anticuerpo y también se pueden preparar de forma recombinante, por ejemplo usando métodos conocidos.

Los inventores fueron capaces de demostrar que es inesperadamente posible usar los anticuerpos que están dirigidos contra la proteína de membrana plasmática CDCP1 para caracterizar y aislar de forma selectiva células troncales hematopoyéticas y células troncales y células progenitoras mesenquimatosas y neuronales.

Cuando se usaron estos nuevos anticuerpos para identificar células troncales hematopoyéticas, se encontró que los anticuerpos mostraron una selectividad que era superior a la de los anticuerpos que estaban dirigidos contra CD34 y que es similar a la del anticuerpo que está dirigido contra CD133.

Por esta razón, los nuevos anticuerpos, o fragmentos de los mismos, proporcionan alternativas ventajosas al anticuerpo de CD34 cuando se identifican o aíslan células troncales hematopoyéticas.

Tales anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando métodos convencionales (véase, Köhler y Milstein, “Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity”, *Nature* 256:495-497, (1975)). Según este método, se inmuniza un animal con un antígeno, se aíslan las células productoras de anticuerpo del animal y estas células productoras de anticuerpo se fusionan con una línea celular inmortal. Las líneas de células de hibridoma resultantes se criban para determinar si son capaces de producir un anticuerpo contra el antígeno que se usó para la inmunización.

Los anticuerpos según la invención también hacen ahora posible preparar anticuerpos adicionales que se unen al mismo antígeno. Usando los anticuerpos según la invención, es posible emplear métodos bien conocidos para aislar las estructuras antigénicas correspondientes y desarrollar anticuerpos monoclonales adicionales contra las mismas estructuras antigénicas, empleando los métodos conocidos en este caso también.

La invención se refiere además a líneas celulares de hibridoma que son capaces de producir y liberar este tipo de anticuerpo, en particular las líneas celulares de hibridoma CUB1, CUB2, CUB3 y CUB4.

Al proporcionar los anticuerpos nuevos, los inventores, por primera vez, han facilitado anticuerpos monoclonales, así como líneas de células de hibridoma que producen y liberan estos anticuerpos, lo que hace posible detectar de forma selectiva poblaciones celulares que expresan el antígeno CDCP1. Por lo tanto, los anticuerpos constituyen un medio, que es hasta ahora único y tiene muchos usos, para el médico y el investigador para detectar estos tipos de células, por una parte, y, por otra parte, para manipular estas células, donde sea apropiado, bien mediante el uso de los anticuerpos mismos o mediante el uso de reactivos que están acoplados a ellos.

La invención se refiere además a un método para aislar y/o identificar al menos una población celular que se selecciona del grupo que comprende células troncales hematopoyéticas, células troncales neuronales, células progenitoras neuronales, células troncales mesenquimatosas y células progenitoras mesenquimatosas, usando un anticuerpo o un fragmento del mismo, con el anticuerpo, o fragmento del mismo, que se une al mismo antígeno que un anticuerpo producido por las líneas celulares de hibridoma CUB1, CUB2, CUB3 y CUB4, que se depositaron en el DSMZ, según el tratado de Budapest, con los números DSM ACC2569, DSM ACC2566 y DSM ACC2565, el 14/08/2002, y DSM ACC2551, el 12/07/2002.

En otra forma de realización, el método según la invención usa un anticuerpo, o un fragmento de un anticuerpo, producido por las líneas de células de hibridoma CUB1, CUB2, CUB3 y CUB4.

La invención se refiere además a un método para aislar y/o identificar al menos una población celular, que se selecciona del grupo que comprende células troncales hematopoyéticas, células troncales neuronales, células progenitoras neuronales, células troncales mesenquimatosas y células progenitoras mesenquimatosas, usando un anticuerpo, con el método que comprende las etapas siguientes:

ES 2 344 982 T3

- (a) poner en contacto una muestra de una suspensión celular que contiene al menos una población celular con el anticuerpo monoclonal nuevo, o un fragmento del mismo, y
- (b) aislar y/o identificar las células que se unen al nuevo anticuerpo monoclonal o al fragmento del mismo.

5

La invención se refiere además a un método para aislar y/o identificar al menos una población celular, que se selecciona del grupo que comprende células troncales hematopoyéticas, células troncales neuronales, células progenitoras neuronales, células troncales mesenquimatosas y células progenitoras mesenquimatosas, usando un anticuerpo, con el método que comprende las etapas siguientes:

10

- (a) poner en contacto una muestra de una suspensión celular que contiene al menos una población celular con el anticuerpo monoclonal nuevo, o un fragmento del mismo, y con al menos un anticuerpo adicional que se une a al menos una de las poblaciones celulares, y
- (b) aislar y/o identificar las células que se unen al anticuerpo monoclonal, o al fragmento del mismo, y al anticuerpo adicional.

15

En relación a esto, el poner en contacto una mezcla celular con el anticuerpo se puede realizar en solución como es el caso, por ejemplo, cuando se usa un citómetro de flujo (= separador celular activado por fluorescencia (FACS)).

20

Descrito de una manera general, las células se cargan, en citometría de flujo, con anticuerpos que por una parte son específicos para un marcador de superficie y por otra parte están acoplados a un colorante fluorescente. Las células que son positivas para el marcador fluorescen mientras que las células negativas permanecen oscuras. Por lo tanto es posible determinar qué proporción de una población celular es positiva para el marcador. Al mismo tiempo, un citómetro de flujo hace posible registrar el tamaño y granularidad de las células.

25

También es posible usar un método para separación magnética de células (MACS, separación magnética de células). En este método las células se marcan con bolas magnéticas, siendo posible acoplar estas bolas a los anticuerpos, por ejemplo.

30

Además, el poner en contacto también se puede llevar a cabo inmovilizando el anticuerpo monoclonal en un soporte como es el caso, por ejemplo, en la cromatografía en columna.

35

La suspensión celular puede ser cualquier solución que contenga células de médula ósea, células sanguíneas o células de tejidos.

Después de haber mezclado la suspensión celular con el anticuerpo, las células que expresan el antígeno CDCP1 se unen al anticuerpo, después de lo cual estas células se pueden, al contrario de las células que no se han unido al anticuerpo, identificar y/o aislar usando los métodos descritos.

40

En el método divulgado el último, se hace uso además de un anticuerpo adicional que también reconoce al menos una de las poblaciones celulares descritas aquí. Este anticuerpo puede, por ejemplo, ser un anticuerpo que está dirigido contra el marcador CD90, en el caso de células progenitoras neuronales, y ser un anticuerpo anti-CD34, por ejemplo, en el caso de células hematopoyéticas. Usar un anticuerpo adicional hace posible aislar/identificar subpoblaciones específicas, que por consiguiente se unen tanto al anticuerpo nuevo como a los anticuerpos adicionales, en particular anticuerpos que ya son conocidos. Este método se puede usar, por ejemplo, para caracterizar las células de forma más precisa con respecto a sus marcadores de superficie.

50

Las poblaciones celulares que se han aislado mediante los métodos se pueden usar para repoblar, por medio de trasplante, la médula ósea en pacientes inmunosuprimidos o inmunodeficientes.

La invención se refiere además al uso de los nuevos anticuerpos, o fragmentos de los mismos, para aislar y/o identificar al menos una población celular que se selecciona del grupo que comprende células troncales hematopoyéticas, células troncales neuronales, células progenitoras neuronales, células troncales mesenquimatosas y células progenitoras mesenquimatosas.

55

Se da preferencia particular al uso de los anticuerpos nuevos, o fragmentos de los mismos, en relación con el análisis de muestras de pacientes, en particular biopsias de tejidos, biopsias de médula ósea y/o muestras de sangre, y, en particular, cuando se clasifican leucemias.

60

En el caso presente, ha sido posible usar los nuevos anticuerpos para detectar expresión del antígeno correspondiente en hemoblastos de leucemia como, por ejemplo, en el caso de leucemia linfática aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia mieloide crónica (LMC).

65

La invención se refiere además al uso de la proteína CDCP-1 y/o del ácido nucleico que codifica la proteína CDCP-1 para preparar anticuerpos, o fragmentos de los mismos, para aislar y/o identificar células troncales hematopoyéticas.

ES 2 344 982 T3

La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo nuevo, o fragmentos del mismo.

Además del anticuerpo, que representa el compuesto activo en la composición, esta composición también puede comprender tampones, diluyentes o aditivos adecuados. Los tampones adecuados incluyen, por ejemplo, Tris-HCl, glicina y fosfato, mientras que los diluyentes adecuados incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas de NaCl, lactosa o manitol. Los aditivos adecuados incluyen, por ejemplo, detergentes, solventes, antioxidantes y conservantes. Se da una revisión de las sustancias que se pueden usar para composiciones de esta naturaleza, por ejemplo en: A. Kibbe, "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 3ª Ed., 2000, American Pharmaceutical Association y Pharmaceutical Press.

La invención se refiere además a un kit que comprende al menos un anticuerpo nuevo, o fragmentos del mismo.

De las figuras adjuntas y la descripción resultan ventajas adicionales.

Las formas de realización se representan en las figuras adjuntas y se explican en más detalle en la descripción, en la que:

La figura 1a muestra la reactividad de los anticuerpos según la invención con células de tipo salvaje;

La figura 1b muestra la reactividad de los anticuerpos según la invención con transfectantes;

La figura 2a muestra la coexpresión de CD34 y CDCP1 en poblaciones de células de médula ósea (células marcadas con CD34-FITC y CDCP1-PE (CUB 1));

La figura 2b muestra células de médula ósea en un gráfico de CD34 contra CD38 y la selección en la población de células troncales (poblaciones de células de médula ósea marcadas con CD38-FITC, CDCP1-PE, CD34-PerCP y CD133-APC);

La figura 2c muestra la coexpresión de CDCP1 y CD133 en células troncales de médula ósea CD34⁺/CD38⁻;

La figura 3 muestra la expresión de CDCP1 en células troncales mesenquimatosas;

La figura 4a muestra la expresión de CDCP1 en células troncales neuronales; y

La figura 4b muestra la coexpresión de CDCP1 y CD90 en células troncales neuronales.

Ejemplo

Preparación de los transfectantes

Empezando con el vector de clonación pBluescript II SK(+), en el que se había clonado la región codificante de CDCP1 humana (obtenido de Boehringer Ingelheim/Viena), la secuencia codificante se subclonó en un vector pRK (PharMingen, San Diego, EE. UU.) y, al mismo tiempo, se unió en extremo C-terminal un epítipo myc de cinco veces (13 aminoácidos de la proteína c-myc). Se cotransfectó el ADN de pRK-CDCP1-myc5 junto con un plásmido de resistencia a puromicina (pSVpacΔp: de la Luna *et al.*, "Efficient transformation of mammalian cells with constructs containing a puromycin-resistance marker", *Gene*, 62(1): 121-126, 1988) en células de ratón NIH-3T3 usando el método del CaCl₂.

Después de haber clonado células individuales resistentes a puromicina, se detectó la expresión de la proteína CDCP1-myc5 en las células transfectadas mediante inmunotransferencia usando un antisuero anti-myc. Posteriormente se seleccionó el clon NIH-3T3/huCDCP1.

Inmunización

Se inmunizaron dos ratones Balb/c cuatro veces por vía intraperitoneal con aprox. 5-10 x 10⁶ células NIH-3T3/huCDCP1 usando un protocolo estándar. De tres a cuatro días después de la última inmunización, se retiró el bazo y las células del bazo se fusionaron con células de melanoma SP2/0 usando un protocolo estándar. Se probaron los sobrenadantes de cultivo de células de hibridoma en crecimiento, resistentes a HAT mediante análisis por FACS tanto en los transfectantes como en las líneas celulares de tipo salvaje (NIH-3T3).

Se juzgó que los sobrenadantes que reaccionaron selectivamente con los transfectantes pero no con la línea celular de tipo salvaje NIH-3T3 eran específicos para CDCP1. Se clonaron las células de hibridoma correspondientes (dilución limitante) y se seleccionaron clones positivos. Se obtuvieron cuatro clones (CUB1, CUB2, CUB3 y CUB4) que reaccionaban selectivamente con las células NIH-3T3/huCDCP1 (isotipos: uno IgG2b [CUB1] y tres IgG2a [CUB2-4]).

ES 2 344 982 T3

Los histogramas en la figura 1a muestran que los cuatro anticuerpos no reaccionaron con las células de tipo salvaje. La figura 1b muestra histogramas en los que se representa claramente la reactividad de los cuatro anticuerpos CUB1, CUB2, CUB3 y CUB4 con los transfectantes mediante el segundo pico oscuro que está presente en cada caso.

5

Investigación de la reactividad de los anticuerpos en células de sangre periférica

En primer lugar se probó la reactividad de los anticuerpos en células de sangre periférica. Los resultados de estas investigaciones se muestran en la tabla 1 a continuación.

10

Se encontró que los linfocitos T CD3⁺, linfocitos B CD20⁺, células NK CD56⁺, monocitos CD14⁺, granulocitos neutrofilicos, granulocitos eosinofílicos Siglec-8⁺, eritrocitos CD235a⁺ y plaquetas CD61⁺ eran negativos para CDCP1.

15

TABLA 1

Reactividad del anticuerpo específico de CDCP1 CUB1 en células de sangre periférica

20

Tipo celular	Reactividad
Linfocitos T (CD3 ⁺)	-
Linfocitos B (CD20 ⁺)	-
Células NK (CD56 ⁺)	-
Monocitos (CD14 ⁺)	-
Granulocitos neutrofilicos (CD15 ⁺)	-
Granulocitos eosinofílicos (Siglec-8 ⁺)	-
Granulocitos basofílicos (CD203c ⁺)	-
Eritrocitos (CD235a ⁺)	-
Plaquetas (CD61 ⁺)	-

35

Los resultados de la reactividad de los anticuerpos en varias líneas celulares, que se enumeran horizontalmente, se muestran en la tabla 2 posteriormente. Los cuatro anticuerpos probados, es decir CUB1 a CUB4, se enumeran verticalmente.

40

Descripción de las líneas celulares

45

K-562: eritroleucemia; WERI-RB-1: retinoblastoma; BV-173: leucemia de células pro-B; HEL: eritroleucemia; HL-60: leucemia promielocítica; KU-812: leucemia basofílica; HepG2: carcinoma hepatocelular; MOLT-4: leucemia de linfocitos T).

50

TABLA 2

Reactividad de los anticuerpos específicos de CDCP1 CUB1, CUB2, CUB3 y CUB4 en varias líneas celulares

55

	CD34- Tf*	CD133- Tf*	K-562	WERI- RB-1	BV- 173	HEL	HL-60	KU- 812	Hep- G2	MOLT- 4
CUB1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
CUB2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
CUB3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
CUB4	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

60

*Tf = transfectante

65

Se encontró que todas las líneas celulares probadas eran negativas para CDCP1 aparte de K-562. Scherl-Mostageer y col. ya han mostrado que K-562, una línea celular eritroleucémica, expresa el ARNm de CDCP1.

ES 2 344 982 T3

Se llevaron a cabo investigaciones adicionales en la expresión correlacionada de CDCP1 y los otros marcadores de células troncales CD34 y CD133 en varios subconjuntos de hemoblastos de leucemia. Los resultados obtenidos en estas investigaciones se resumen en la tabla 3 posteriormente. Los patrones de expresión se obtuvieron por medio de marcajes estándar de inmunofluorescencia, usando los anticuerpos, y después llevando a cabo análisis por FACS.

El análisis mostró que CDCP1 es un marcador independiente en relación a los otros marcadores de células troncales ya que su expresión no se correlaciona necesariamente con la de los otros marcadores. La coexpresión frecuente de los tres marcadores de células troncales se puede ver, en particular, en el caso de leucemias mieloides (LMA y LMC)

TABLA 3

Expresión de CDCP1 en hemoblastos de leucemia

	LLA (LLA-B, LLA-pro-B, LLA-Pre-B, LLA-C)	LMA (M1-M5)	LMC (crisis hemoblástica)
CD34 ⁺ CD133 ⁺ CDCP1 ⁺	2/20	4/11	4/10
CD34 ⁺ CD133 ⁺ CDCP1 ⁻	5/20	2/11	0/10
CD34 ⁺ CD133 ⁻ CDCP1 ⁺	1/20	1/11	2/10
CD34 ⁺ CD133 ⁻ CDCP1 ⁻	7/20	0/11	2/10
CD34 ⁻ CD133 ⁺ CDCP1 ⁺	0/20	2/11	0/10
CD34 ⁻ CD133 ⁺ CDCP1 ⁻	0/20	0/11	0/10
CD34 ⁻ CD133 ⁻ CDCP1 ⁺	1/20	0/11	1/10
CD34 ⁻ CD133 ⁻ CDCP1 ⁻	4/20	2/11	1/10

En la tabla, LLA significa leucemia linfática aguda mientras que LMA significa leucemia mieloides aguda y LMC significa leucemia mieloides crónica (las designaciones adicionales son designaciones de clasificación y caracterización que se usan normalmente para las leucemias agudas).

Por consiguiente, los anticuerpos nuevos se pueden usar, por ejemplo, en diagnósticos de rutina en relación con leucemias.

Investigación de la reactividad de los anticuerpos en células de médula ósea

Posteriormente se investigó la reactividad de los anticuerpos con poblaciones de células de médula ósea. Resultó que CDCP1 se expresa exclusivamente en células troncales CD34⁺ y no en otras poblaciones (véase la figura 2a). La fracción CDCP1⁺ separada por FACS consistía casi completamente en hemoblastos inmaduros y colonias inmaduras: CFU-GM (unidad formadora de colonias de macrófago granulocito), BFU-E (unidad formadora de brotes eritroides), CFU-GEMM (unidad formadora de colonias granulocito-eritroide-macrófago-megacariocito).

Las figuras 2b y 2c muestran los resultados de un análisis de cuatro colores de células de médula ósea.

Para llevar a cabo el análisis de cuatro colores las células se marcaron con los siguientes conjugados de anticuerpo: CUB1-PE (ficoeritrina), CD133-APC (aloficocianina), CD38-FITC (isotiocianato de fluoresceína) y CD34-PerCP (proteína peridina clorofila A).

En el gráfico en la figura 2b, se representa CD34 contra CD38. Las células troncales se encuentran en la fracción rara CD34⁺/CD38⁻ (Terstappen y Huang "Analysis of bone marrow stem cell", Blood Cells 20(1): 45-61, 1994). En el gráfico en la figura 2b, esta población se muestra en la "región R2".

En el gráfico en la figura 2c, se represente CDCP1 contra CD133. Este gráfico representa las células que se han visto en la región "R2" en el gráfico de la figura 2b. La figura 2c muestra que esencialmente todas las células troncales CD34⁺/CD38⁻ coexpresan CDCP1 y CD133.

ES 2 344 982 T3

En otros experimentos, los inventores fueron capaces de demostrar que, 6 semanas después de haber trasplantado células positivas para CDCP1 en ratones NOD/SCID, se habían formado células CD45+ humanas en la médula ósea de los ratones. (CD45+ es un marcador para células hematopoyéticas). Por consiguiente esto demuestra que las células que se aíslan usando los anticuerpos nuevos son capaces de llevar a cabo hematopoyesis.

5

Investigación de la reactividad de los anticuerpos en células troncales neuronales y mesenquimatosas

En otros experimentos, se investigó la reactividad de los anticuerpos hacia células troncales neuronales y mesenquimatosas.

10

Para este fin se usaron células progenitoras neuronales fetales (en lo siguiente NPC) y células troncales mesenquimatosas comercialmente disponibles, obtenidas de Cell-Systems, St. Katharinen, Alemania.

15

En la figura 3, el segundo pico oscuro en el histograma muestra que el anticuerpo CUB2 reacciona con células troncales mesenquimatosas. El histograma en la figura 4a muestra la reactividad con NPC, en este caso con el anticuerpo CUB2 marcado con PE (ficoeritrina).

20

Para llevar a cabo el análisis de coexpresión, las células se marcaron con los siguientes conjugados de anticuerpo: CUB1 + algG2bPE (ficoeritrina) y CD90-APC (aloficocianina). Se sabe que CD90 se expresa en NPC (véase, por ejemplo Vogel *et al.*, "Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells", *Haematologica* 88: 126-133, (2003)).

25

En el gráfico en la figura 4b, se representa CDCP1 contra CD90. Se puede ver que la mayoría de las células NPC expresaban CDCP1 (además de CD90 como el "marcador de confirmación").

30

En resumen, por lo tanto, estos datos muestran que CDCP1 es un marcador nuevo para células troncales hematopoyéticas y para células troncales/células progenitoras mesenquimatosas o neuronales. Es posible usar el anticuerpo según la invención que está dirigido contra este marcador para seleccionar células troncales que expresan CDCP1 de una manera sencilla y después, por ejemplo, trasplantarlas para el propósito de repoblación. El anticuerpo según la invención es por consiguiente de gran importancia para seleccionar células troncales hematopoyéticas o mesenquimatosas y/o neuronales. Además, constituye una alternativa destacada a los marcadores CD133 y CD34 que se usan normalmente para la selección de células troncales.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un anticuerpo monoclonal anti-CDCP1, o un fragmento del mismo, capaz de aislar y/o identificar al menos una población celular que se selecciona del grupo de células troncales hematopoyéticas, células troncales neuronales, células progenitoras neuronales, células troncales mesenquimatosas y células progenitoras mesenquimatosas, **caracterizado** porque el anticuerpo, o el fragmento del mismo, se une a un antígeno que es el mismo que se une a un anticuerpo producido por la línea de células de hibridoma CUB1 (DSM ACC2569), CUB2 (DSM ACC2566), CUB3 (DSM ACC2565) o CUB4 (DSM ACC2551).

10 2. Un anticuerpo monoclonal anti-CDCP1, o un fragmento del mismo, **caracterizado** porque se une a la misma estructura antigénica a la que se une un anticuerpo producido por la línea de células de hibridoma CUB1 (DSM ACC2569), CUB2 (DSM ACC2566), CUB3 (DSM ACC2565) o CUB4 (DSM ACC2551), en donde dicho anticuerpo o fragmento es capaz de aislar y/o identificar al menos una población celular que se selecciona del grupo de células troncales hematopoyéticas, células troncales neuronales, células progenitoras neuronales, células troncales mesenquimatosas y células progenitoras mesenquimatosas.

15 3. El anticuerpo monoclonal o fragmento de la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque el anticuerpo está producido por la línea de células de hibridoma CUB1 (DSM ACC2569).

20 4. El anticuerpo monoclonal o fragmento de la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque el anticuerpo está producido por la línea de células de hibridoma CUB2 (DSM ACC2566).

25 5. El anticuerpo monoclonal o fragmento de la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque el anticuerpo está producido por la línea de células de hibridoma CUB3 (DSM ACC2565).

30 6. El anticuerpo monoclonal o fragmento de la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque el anticuerpo está producido por la línea de células de hibridoma CUB4 (DSM ACC2551).

35 7. Una línea de células de hibridoma, **caracterizada** porque produce el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

40 8. Un método para aislar y/o identificar al menos una población celular, que se selecciona del grupo de células troncales hematopoyéticas, células troncales neuronales, células progenitoras neuronales, células troncales mesenquimatosas y células progenitoras mesenquimatosas, usando al menos un anticuerpo, que comprende las siguientes etapas:

- (a) poner en contacto una muestra de una suspensión celular, que contiene al menos una población celular, con un anticuerpo monoclonal o fragmento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y
- (b) aislar y/o identificar las células que se unen a dicho anticuerpo monoclonal o fragmento.

45 9. El método de la reivindicación 8 que comprende además en la etapa (a):
poner en contacto dicha muestra de una suspensión celular con al menos un anticuerpo adicional que se une al menos a una de las poblaciones celulares.

50 10. El método de la reivindicación 8 ó 9 para el análisis *in vitro* de muestras de pacientes, en particular de biopsias de tejidos, biopsias de médula ósea y/o muestras de sangre.

11. El método de la reivindicación 8 ó 9 para la clasificación diagnóstica *in vitro* de leucemias.

55 12. Una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo monoclonal o fragmento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

60 13. Un kit, que comprende al menos un anticuerpo monoclonal o fragmento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

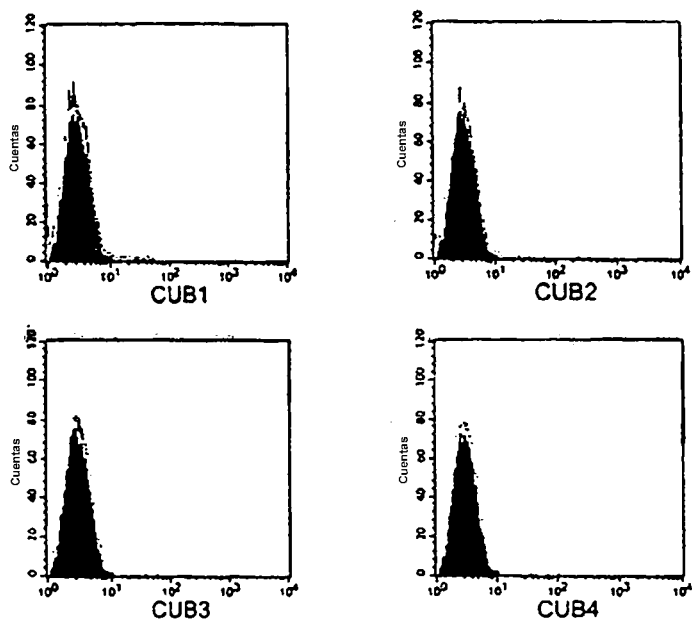


Fig. 1a

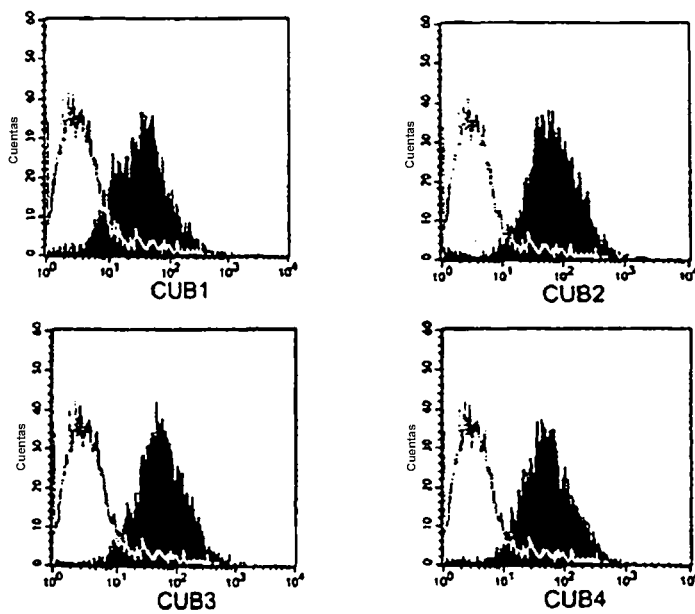


Fig. 1b

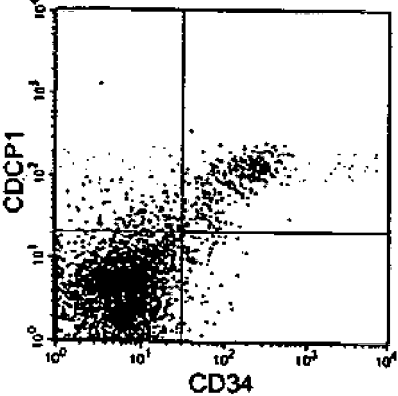


Fig. 2a

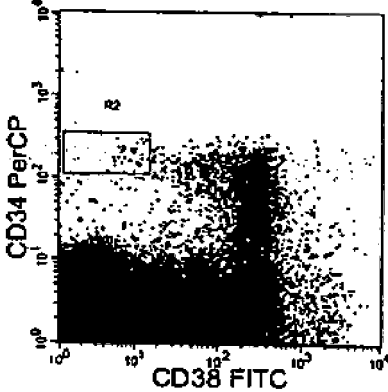


Fig. 2b

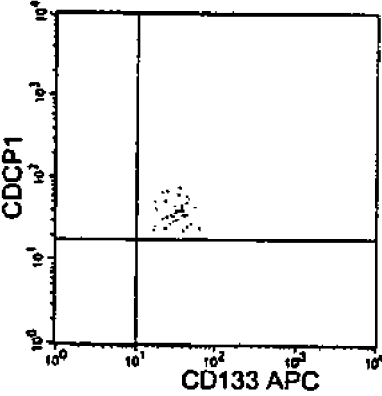


Fig. 2c

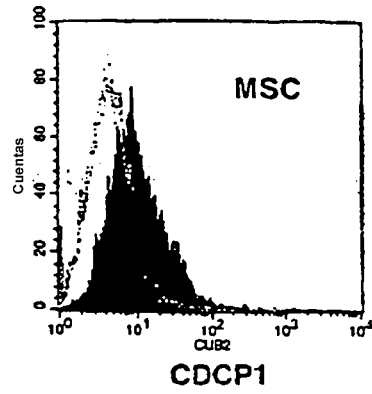


Fig. 3

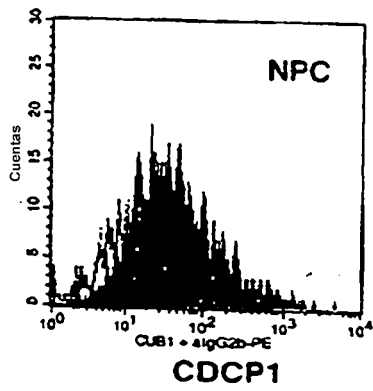


Fig. 4a

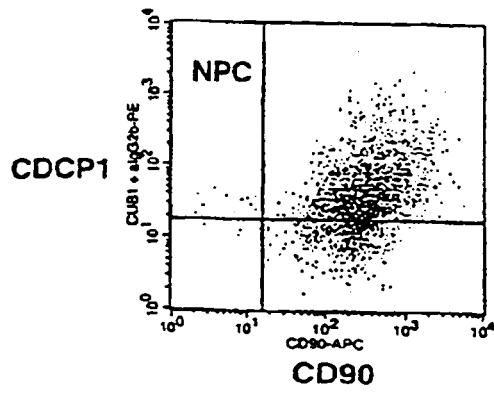


Fig. 4b