

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 969**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2011 PCT/FR2011/052949**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2012 WO12080642**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2011 E 11811089 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2651978**

54 Título: **Utilización de un anticuerpo dirigido contra una proteína membranaria**

30 Prioridad:

13.12.2010 FR 1060428

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.10.2017

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
(100.0%)
3 avenue des Tropiques ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis, FR**

72 Inventor/es:

**FOURNIER, NATHALIE y
DE ROMEUF, CHRISTOPHE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 636 969 T3

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

DESCRIPCIÓN

Utilización de un anticuerpo dirigido contra una proteína membranaria

5 La presente invención tiene por objeto la utilización de un anticuerpo dirigido contra una proteína membranaria, y en particular para el tratamiento de patologías.

10 Los anticuerpos utilizados en clínica, con el objetivo de regular una patología autoinmune o inflamatoria son, en la actualidad, principalmente los anticuerpos anti-CD20 y en particular el anti-CD20 Rituxan. El problema asociado a este tipo de tratamiento se debe al hecho de que los anti-CD20 eliminarán el conjunto de las células pre-B y linfocitos B maduros, pero también aproximadamente el 20% de los plasmocitos y una población de linfocitos B de memoria (Gonzales-Stawinski Clin Immunol 2001, 98, 175; Looney, Ann rheum dis 2002, 61, 863), pudiendo así conducir a un estado inmuno-deficiente asociado a una hipogammaglobulemia. Existe por lo tanto la necesidad de encontrar una alternativa a esta depleción B disminuyendo el número de células dendríticas plasmacitoides, células
15 claves para el inicio de la respuesta inmune patológica y, por lo tanto, atenuar la respuesta inmune del paciente y, en consecuencia, de células B auto-reactivas.

20 Las células dendríticas (en inglés "dendritic cells" o DC) son unas células del sistema inmunitario presentadoras de antígenos (CPA) que pertenecen al sistema reticuloendotelial. Bajo algunas condiciones, las células DC presentan unas prolongaciones citoplásmicas similares a las dendritas de las neuronas.

Las células dendríticas tienen dos funciones principales:

25 - la activación de la respuesta inmunitaria adaptativa, de la cual los componentes principales son los linfocitos T y los linfocitos B, dirigida contra unos antígenos "no propios".

- el mantenimiento de la tolerancia central al "propio organismo" en el timo, por el proceso que implica los linfocitos T denominado de selección negativa.

30 En el ratón se han caracterizado numerosas sub-poblaciones de células DC, pero sin que se haya identificado correspondencia en el ser humano.

35 Las DC son capaces de diferenciarse en diversos sub-grupos, según los estímulos que reciban. Existen dos grandes tipos de células DC: las células DC convencionales, las células DC plasmacitoides y las células DC inflamatorias.

Las células DC convencionales comprenden:

40 - las células DC migratorias que residen, en estado basal, en la periferia. Tras la fagocitosis de una partícula antigénica y/o la recepción de señales, migran hacia los ganglios linfoides secundarios por medio de vasos linfáticos; llegan en estado maduro a los órganos linfoides, en los que presentan el antígeno a los linfocitos T naives; se pueden citar por ejemplo unas células de Langerhans o también las células D de las mucosas;

45 - las células DC inmaduras residentes de los órganos linfoides; estas células recogen y presentan los antígenos del propio organismo o extraños dentro mismo de los órganos linfoides; se trata de la mayoría de las células DC del timo o del bazo.

50 Las células DC inflamatorias se reclutan en los tejidos tras una inflamación o una infección, pero no se presentan jamás fuera de cualquier estimulación. Se supone actualmente que las células DC inflamatorias procederían principalmente de la diferenciación de los monocitos sanguíneos.

Las células DC plasmacitoides difieren de las células DC convencionales en que son circulantes, redondas y sin dendritas en el estado basal, a pesar de que terminan por diferenciarse en DC convencionales después de la activación. Por lo tanto, son capaces de presentar el antígeno.

55 Después de la estimulación, en general por un antígeno viral, producen una gran cantidad de interferones (IFN) de clase I. Estas células están implicadas esencialmente en la respuesta anti-viral y en los desórdenes auto-inmunes.

60 Las células DC plasmacitoides (también denominadas células DC plasmacitoides) se han caracterizado fenotípicamente: expresan los marcadores CD4 y BDCA-2 y 4. Su fenotipo es por lo tanto CD4+, CD11c-, Lin-, BDCA-2+, BDCA-4+.

65 Las células DC plasmacitoides pueden ser el origen de tumores hematopoyéticos, en los que adquieren un marcador suplementario que es el CD56+. Es por ello que se habla de tumores hematopoyéticos CD4+/CD56+ (en inglés BPDCN: Blastic plasmacytoid dendritic cells neoplasm).

Los tumores hematopoyéticos CD4+/CD56+ son unos neoplasmas hematológicos raros (1% de leucemias agudas),

- que se presentan en forma de nódulos cutáneos asociados a una linfo-adenopatía o un hinchamiento del bazo y a una citopenia frecuente. Estas manifestaciones cutáneas van seguidas muy rápidamente por una infiltración de la médula ósea. Debido a la expresión del marcador CD56+, estas patologías se clasificaron en primer lugar en los estudios complementarios que han permitido afinar la clasificación para finalmente revelar que las células dendríticas denominadas de tipo II o células DC plasmacitoides son el origen de los tumores hematopoyéticos CD4+/CD56+ [Chaperot L *et al.*, 2001, Blood. 15 de mayo de 2001;97(10):3210-7, Herling M, Jones D., 2007, Am J Clin Pathol. Mayo de 2007; 127(5):687-700].
- El tratamiento actual de estas patologías se basa en la quimioterapia, que permite una remisión completa para 2 pacientes de tres aproximadamente, pero en las que las recaídas son frecuentes y precoces (aproximadamente 9 meses). La media de supervivencia global es de 13 meses aproximadamente. Otra alternativa de tratamiento es el aloinjerto de células hematopoyéticas, que no permite sin embargo tampoco sobrevivir a largo plazo.
- En consecuencia, existe en la actualidad una necesidad real de encontrar un tratamiento a estas patologías CD4+/CD56+.
- En la técnica anterior se proponen unos medios de tratamiento de estas patologías que implican unas células que expresan unos marcadores de las células dendríticas.
- En particular, se han propuesto unas moléculas que tienen como objetivo los marcadores de diferenciación BDCA.
- Se puede citar, por ejemplo, la patente europea EP 1 301 539, que describe un polipéptido de secuencia particular que se une específicamente a la proteína BDCA-2 y una composición farmacéutica que lo comprende.
- La solicitud de patente europea EP 1 783 141 divulga una composición que permite inducir una respuesta inmunitaria en un paciente, comprendiendo dicha composición unas células dendríticas previamente tratadas con un anticuerpo anti-BDCA-2 y que expresa un antígeno (tumoral, viral, bacteriano, etc.). Esto consiste en un tratamiento por terapia celular.
- La solicitud WO 01/365487 describe unos anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína BDCA-2, y en particular los clones AC144, AD5-13A11 y AD5-4B8, así como unos fragmentos derivados. Por otro lado, esta solicitud describe la utilización de los anticuerpos monoclonales para el tratamiento de patologías tales como las infecciones virales, las enfermedades auto-inmunes y los tumores.
- La solicitud WO 2006/037247 describe la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína BDCA-2, en el ámbito del tratamiento de una enfermedad auto-inmune particular: la psoriasis.
- Nestle *et al.*, (Nestle *et al.* 2005, J. Exp. Med, vol 202, n°1, p.: 135-143) enseña que unos anticuerpos dirigidos contra la proteína BDCA-2 se pueden inyectar por vía intravenosa, con un objetivo terapéutico en el ámbito del tratamiento de la psoriasis.
- Blomberg *et al.*, (Blomberg *et al.*, 2003, Arthritis and Rheumatism, vol 48, n°9, p.: 2524-2532) enseña la utilización de anticuerpos dirigidos contra la proteína BDCA-2, utilizándose dichas vacunas para una enfermedad auto-inmune: el Lupus eritematoso. Los autores muestran que dichos anticuerpos son capaces de inhibir la producción de interferón α (IFN- α). La solicitud US 2010/1896641 describe unos anticuerpos dirigidos contra la proteína BDCA-2 en el ámbito del tratamiento de los tumores.
- El documento WO 01/38496 describe el tratamiento de neoplasmas cutáneos CD4+/CD56+ con la ayuda de anticuerpos dirigidos contra unos monocitos plasmacitoides CD56+.
- Se constata por lo tanto que la utilización de anticuerpos dirigidos contra la proteína BDCA-2 se describe ampliamente en la técnica anterior.
- Sin embargo, la técnica anterior no dice nada en cuanto al tratamiento de patologías que implican unas células CD4+/CD56+.
- BDCA-2 se describe también como marcador celular (véase por ejemplo Garnache-Ottou *et al.*, BLOOD, vol. 106, n° 11, Part 1, 2005-11, página 941A; Leonardi *et al.*, Virchows Archiv, vol 455, n°. Supl. 1, 2009-08, páginas 254-255; o Jaye *et al.*, Modern Pathology, vol. 19, n°12, páginas 1555-1562).
- Sin embargo, en la actualidad no existe ningún tratamiento específico y eficaz que permita el tratamiento o la prevención de patologías que impliquen unas células dendríticas plasmacitoides, y en particular los tumores CD4+/CD56+.
- La invención tiene por lo tanto por objeto paliar las carencias de la técnica anterior, y en particular proporcionar unos

tratamientos alternativos.

Además, la invención tiene como objetivo proporcionar un nuevo tratamiento eficaz y específico de los tumores de células CD4+/CD56+.

5 La invención tiene también por objeto unas composiciones medicamentosas para tratar y/o prevenir dichas patologías.

10 La invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su utilización en el ámbito de la prevención o del tratamiento de las patologías que implican una activación de las células dendríticas plasmacitoides.

15 La invención se basa en la constatación inesperada realizada por los inventores del efecto de anticuerpo anti-BDCA-2 sobre la progresión de tumores, en particular de tumores hematopoyéticos.

La invención se distingue de la técnica anterior por que implica una destrucción de las células DC plasmacitoides por apoptosis o por el mecanismo de ADCC.

20 La utilización de anticuerpo anti-IFN- α en el tratamiento de los pacientes que padecen patologías autoinmunes e inflamatorias induce a una neutralización de IFN- α de una manera sistemática, lo que aumenta potencialmente el riesgo de infecciones oportunistas. En efecto, esta citoquina se produce en respuesta a un agente infeccioso, en particular vírico.

25 Para responder a esta problemática, el objetivo de la invención consiste en eliminar las células DC plasmacitoides, fuente principal de IFN- α , reclutadas a nivel de las lesiones inflamatorias y responsable de la inflamación local, estando esto particularmente bien descrito en el caso de la psoriasis, por ejemplo. La ventaja de la invención se basa por lo tanto en una eliminación de IFN- α preferiblemente en el lugar de la inflamación y no de manera sistémica, esto disminuyendo por lo tanto los riesgos relacionados con la inmunodeficiencia inducida por los anti-IFN- α .

30 Una ventaja cierta y adicional reside en la ausencia de efecto sobre los leucocitos (Papot, 2002, rev med interne, 23, sup. 4), los macrófagos (Levesque MC, 1999, Arthritis Rheum, 42, 569) y los fibroblastos (Houglum, JE, 1893, 2,20) y así preservar las fuentes de IFN- α producidas por estos tipos celulares.

35 Otra ventaja consiste, a través de la eliminación de las células DC plasmacitoides, en la disminución de otras citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 también segregadas por las células DC plasmacitoides en un entorno inflamatorio y que conduce a una respuesta Th1 por ejemplo.

40 Además, al contrario que los conceptos generalmente admitidos, el objeto de la invención consiste en tomar ventaja de la hiperactivación del sistema inmunitario en el sitio de la inflamación, en particular la activación de las células efectoras, entre ellas las células NK y los macrófagos, y eso debido a la presencia de numerosas citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias para obtener al final una disminución de la inflamación. En efecto, los autores han mostrado que el anticuerpo anti-BDCA-2 citado tenía una mejor actividad citotóxica contra las pDC en presencia de moléculas, de las cuales se aumentan las cantidades en las patologías auto-inmunes e inflamatorias (IFN- γ , TNF- α , etc.).

45 La proteína BDCA-2 se expresa de manera específica en la superficie de las células DC plasmacitoides y es una proteína de tipo II que pertenece a las lectinas de tipo C.

50 En el ámbito de la presente invención, el término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina, proteína constituida de 4 cadenas que participan en la respuesta inmunitaria adquirida o a un fragmento de inmunoglobulina.

55 Las inmunoglobulinas son bien conocidas por el experto en la materia y están constituidas de un ensamblaje de dos dímeros constituidos cada uno de una cadena pesada y de una cadena ligera. El complejo multimérico está ensamblado por la unión de una cadena ligera y de una cadena pesada por un puente disulfuro entre dos cisteínas, estando las dos cadenas pesadas, por su parte, también unidas entre sí por dos puentes disulfuros.

60 Cada una de las cadenas pesadas y de las cadenas ligeras está constituida de una región constante y de una región variable. El ensamblaje de las cadenas que compone un anticuerpo permite definir una estructura tridimensional característica en Y, en la que

- la base de la Y corresponde a la región constante Fc que está reconocida por el complemento y los receptores Fc, y

65 - el extremo de los brazos de la Y corresponden al ensamblaje respectivo de las regiones variables de la cadena

ligera y variable de la cadena pesada que son reconocidas por un antígeno específico.

Más precisamente, cada cadena ligera está constituida de una región variable (V_L) y de una región constante (C_L). Cada cadena pesada está constituida de una región variable (V_H) y de una región constante constituida de tres dominios constantes C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Los dominios C_{H2} y C_{H3} componen el dominio Fc.

Los anticuerpos descritos en la invención se aíslan y purifican, y son diferentes de los anticuerpos naturales. Estos anticuerpos son maduros, es decir que poseen una estructura tridimensional *ad hoc* que les permiten reconocer el antígeno, y poseen todas las modificaciones post-traduccionales esenciales para su reconocimiento antigénico.

En un aspecto de la invención, los anticuerpos son policlonales.

En otro aspecto, se trata de anticuerpos monoclonales, es decir que reconocen un solo determinante antigénico en BDCA-2, al contrario que los anticuerpos policlonales que corresponden a una mezcla de anticuerpos monoclonales, y por lo tanto pueden reconocer varios determinantes antigénicos en una misma proteína.

Los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden obtener mediante técnicas bien conocidas por el experto en la materia, y en particular mediante la técnica de fusión celular, o también la técnica de clonación de las secuencias de cadenas pesadas y ligeras, mediante la técnica de fago o visualización del ribosoma, por inmunización de ratones que tienen el repertorio de las inmunoglobulinas humanas y expresión en una célula *ad hoc* o un animal transgénico.

Estas técnicas son bien conocidas por el experto en la materia.

Por células dendríticas plasmacitoides, se entiende la sub-población de células dendríticas también denominada DC2, caracterizada por los marcadores HLA-DR+, CD11c-, CD123+ y CD45RA+, presentes en los órganos linfoides y también en circulación en la sangre y caracterizadas por su capacidad para segregar IFN de tipo I en presencia de una infección vírica.

En la invención, se entiende por activación, unas células dendríticas plasmacitoides, los diferentes mecanismos que tienen por efecto activar la proliferación, la secreción de citoquina determinada, en particular los interferones de clase I, y la modificación fenotípica y morfológica de las células plasmacitoides.

La invención se ilustra mediante un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su utilización definida anteriormente, en la que dichas patologías que implican unas células dendríticas plasmacitoides se seleccionan entre los tumores, las enfermedades auto-inmunes y las enfermedades inflamatorias.

La invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su utilización como se ha mencionado anteriormente, en la que los tumores son unos tumores hematopoyéticos.

En la invención, se entiende por tumores hematopoyéticos, unos tumores o enfermedades tumorales que implican unas células de la línea sanguínea, o células hematopoyéticas. Estos tumores pueden también ser denominados hemopatías malignas.

Las hemopatías malignas abarcan

- las leucemias: tumor en el que las células sanguíneas proliferan anormalmente en la sangre,

- los linfocitos: tumor de células sanguíneas que proliferen anormalmente en los órganos linfoides secundarios (ganglios, bazo, etc.),

- o la enfermedad de Kahler: tumor en el que las células sanguíneas proliferan anormalmente en la médula ósea.

La invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su utilización tal como se ha definido anteriormente, en el ámbito de la prevención o el tratamiento de las patologías que implican una activación de las células dendríticas plasmacitoides, en la que dichas patologías son unos tumores hematopoyéticos de fenotipo CD4+, CD56+.

Se entiende por tumores hematopoyéticos CD4+/CD56+, unas hemopatías malignas en las que las células cancerosas expresan conjuntamente los dos marcadores CD4 y CD56. Estas enfermedades abarcan los linfocitos cutáneos agranulares CD4+/CD56+, las hematodermias agranulares CD4+/CD56+, las leucemias/linfomas NK blásticos, los linfomas NK [Ng AP *et al.* 2006. *Haematologica* 91 (1): 143-4; Kim Y *et al.* 2005 *J. Korean Med. Sci.* 20 (2): 319-24; Chan JK, *et al.* 1997 *Blood* 89 (12): 4501-13].

La invención se ilustra también mediante un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su utilización tal como se ha definido anteriormente, en el que las enfermedades autoinmunes e inflamatorias

se seleccionan entre la enfermedad de los tejidos conjuntivos, los diferentes tipos de esclerosis, la inflamación autoinmune pulmonar, el síndrome Guillain-Barre, la tiroiditis autoinmune, la melitis, la miastenia gravis, la enfermedad del injerto contra el hospedante, la enfermedad autoinmune inflamatoria del ojo, la psoriasis, la enfermedad de Basedow (hipertiroiditis), la tiroiditis crónica de Hashimoto (hipotiroiditis), el lupus eritematoso
 5 diseminado (LED), el síndrome de Goodpasture, el pénfigo, la miaestenia, la diabetes por insulinoresistencia, la anemia hemolítica autoinmune, la púrpura trombocitopénica autoinmune, la poliartritis reumatoide, la esclerodermia, polimiositis y dermatomiositis, la anemia de Biermer, la enfermedad de Gougerot-Sjogren, la glomerulonefritis, la enfermedad de Wegener, la enfermedad de Horton, la periartitis nodular y el síndrome de Churg y Strauss, la enfermedad de Still, la policondritis atrofiante, la enfermedad de Behçet, la esclerosis múltiple, la espondilartitis, la
 10 enfermedad de Crohn, la gammapatía monoclonal, la granulomatosis de Wegener, el lupus, la enfermedad de Horton, la enfermedad de Reiter, la rectocolitis hemorrágica, al reumatismo psoriásico, la sarcoidosis, la espondilartitis anquilosante, las dermatitis bulbosas autoinmunes, la colitis colágena, la dermatitis herpetiforme, la fiebre mediterránea familiar, la glomerulonefritis con depósitos de IgA, la glomerulonefritis extra-membranosa, la hepatitis autoinmune, el síndrome miaesténico de Lambert-Eaton, la oftalmía simpática, la penfigoide bullosa, el
 15 pénfigo, la púrpura trombopénica idiopática, el síndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter, la tiroiditis autoinmune, el síndrome uveo-meningo-encefálico y la dermatitis herpetiforme.

En otra ilustración de la invención, las patologías que implican unas células dendríticas plasmacitoides son unas enfermedades autoinmunes, preferentemente unas enfermedades autoinmunes caracterizadas por una secreción incrementada de IFN de tipo I.
 20

En un modo de realización ventajoso, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su utilización según la definición anterior, en la que los tumores hematopoyéticos son:

- 25 - los síndromes linfoproliferativos y mieloma seleccionados entre: la enfermedad de Waldenström, la leucemia linfocítica crónica, el mieloma múltiple, la amilosis primitiva,
- los linfomas seleccionados entre: linfoma folicular, linfoma difuso, linfoma de la zona marginal, enfermedad de Hodgkin,
 30
- la aplasia y las leucemias y mielodisplasias seleccionadas entre: leucemia aguda linfoblástica, leucemia aguda mieloide, mielodisplasia, aplasia medular,
- los síndromes mieloproliferativos seleccionados entre: mielofibrosis, poliglobulia primitiva, trombocitemia esencial,
 35 leucemia mieloide crónica.

En un modo de realización aún más ventajoso, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su utilización según la definición anterior, en el que dicho anticuerpo se selecciona entre los anticuerpos siguientes: un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano.
 40

Es bien conocido por el experto en la materia que los anticuerpos murinos son unos anticuerpos producidos por unas células de ratones, y los anticuerpos humanos son producidos por unas células humanas.

45 Sin embargo, se generalizarán en la invención las definiciones anteriores de anticuerpo humano y murino a cualquier anticuerpo que comprende unas secuencias de aminoácidos de sus cadenas pesadas y de sus cadenas ligeras del ser humano o de ratones. Asimismo, un anticuerpo murino es un anticuerpo cuyas secuencias de cadenas pesadas y de cadenas ligeras que lo constituyen son unas secuencias de las cuales se encuentra la correspondencia en ácido nucleico en el genoma de las células B murinas. Este anticuerpo está por lo tanto constituido de secuencias de
 50 aminoácidos murinos, sea cual sea el origen de la célula que permite su producción.

Por ejemplo, las secuencias de anticuerpos de ratones expresadas en unas células de macaco darán unos anticuerpos murinos.

55 La definición anterior se aplica *mutatis mutandis* a los anticuerpos humanos.

Por anticuerpo quimérico, se entiende en la invención un anticuerpo aislado, en el que la secuencia de cada cadena ligera y/o de cada cadena pesada que lo constituye comprende o consiste en una secuencia híbrida procedente de al menos dos animales distintos. En particular, los anticuerpos quiméricos de la invención son unos híbridos ser humano/macaco o ser humano/ratón, lo que significa que una región de la secuencia de las cadenas ligeras y de las cadenas pesadas procede de la secuencia de una inmunoglobulina de macaco o de ratón, y que el resto de la secuencia de dichas cadenas pesadas y de dichas cadenas ligeras procede de la secuencia de una, o eventualmente varias, inmunoglobulina humana.
 60

65 Por anticuerpo humanizado, se entiende en la invención un anticuerpo procedente de un animal diferente del ser humano, en el que las secuencias de las cadenas pesadas y de las cadenas ligeras diferentes de los CDR se han

sustituido por unas secuencias correspondientes de uno o varios anticuerpos de origen humano. El anticuerpo está por lo tanto mayoritariamente constituido de secuencias humanas, pero su especificidad para el antígeno conferida por los CDR procede de otra especie.

5 La invención está también ilustrada por un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su utilización como se ha mencionado anteriormente, los tumores son unos tumores sólidos seleccionados entre el cáncer del pulmón, riñón, hígado, páncreas, melanoma y ovario.

10 En otro modo de realización también ventajoso, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su utilización como se ha mencionado anteriormente, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico y preferentemente un anticuerpo quimérico seleccionado entre un anticuerpo quimérico murino/humano o un anticuerpo quimérico humano/macaco.

15 En también otro modo de realización ventajoso, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 dirigido para su utilización como se ha mencionado anteriormente, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

20 En también otro modo de realización ventajoso, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 dirigido para su utilización como se ha mencionado anteriormente, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humano.

25 En también otro modo de realización ventajoso, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 dirigido para su utilización como se ha mencionado anteriormente, en el que dicho anticuerpo presenta un porcentaje de fucosilación inferior al 60% de las formas glicosiladas.

30 Los anticuerpos según la invención presentan una baja cantidad de fucosa sobre las cadenas glicánicas portadas por dichos anticuerpos. Esta cantidad de fucosa, o porcentaje de fucosa, está definida como la proporción media de fucosa portada por todos los anticuerpos, con respecto a la cantidad máxima de fucosa que pueden portar las cadenas glicánicas.

Otro aspecto de la invención se refiere a fragmentos de un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su utilización tal como se ha definido anteriormente.

35 La expresión "fragmento de anticuerpo" define una porción de anticuerpo, preferentemente un sitio de unión al antígeno o una región variable del anticuerpo. Ejemplos de fragmentos incluyen Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂, diabody, triabody o tetrabody, y unos anticuerpos multispecíficos compuestos de diferentes fragmentos.

40 En aún otro modo de realización ventajoso, la invención se refiere así a fragmentos de un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su utilización como se ha mencionado anteriormente, en el que dicho fragmento se selecciona entre Fab, F(ab')₂, Fd, scFv, dímero de ScFv, diabody, triabody o tetrabody.

El conjunto de estos fragmentos de anticuerpos son bien conocidos por el experto en la materia.

45 Como ejemplos, se dan a continuación algunas definiciones.

50 El término "Fab" designa un fragmento de anticuerpo de masa molecular de aproximadamente 50.000 Daltons y que posee una actividad de unión al antígeno. Comprende aproximadamente la mitad del lado N-terminal de la cadena pesada y la cadena ligera entera unida por un puente disulfuro. El Fab se puede obtener en particular por tratamiento de las IgG por una proteasa, la papaína.

El término "F(ab')₂" designa un fragmento de aproximadamente 100.000 Daltons y una actividad de unión al antígeno, la asociación por un puente disulfuro de dos Fab descritos anteriormente. Se puede obtener mediante el tratamiento de IgG por una proteasa, la pepsina.

55 Un "scFv" (single chain Fv) es un polipéptido VH:VI sintetizado utilizando los genes que codifican los dominios VL y VH y una secuencia que codifica un péptido destinado a unir estos dominios. Un scFv según la invención incluye los CDR mantenidos en una conformación apropiada, por ejemplo utilizando unas técnicas de recombinación genética.

Los dímeros de ScFv corresponden a dos moléculas de scFv unidas entre sí por una unión peptídica.

60 Los ScFv pueden también servir de módulos de base para el desarrollo de estructuras multiméricas (dimérica: "diabody", trimérica: "triabody", tetramérica: "tetrabody"). Así, el diabody es un dímero de scFv. La secuencia de fijación es más corta, y por lo tanto no permitirá la auto-asociación entre las cadenas pesadas y ligeras en un scFv solitario. Este dímero de fragmento tiene la propiedad suplementaria de mantener la doble valencia que el anticuerpo parental posee.

65

Asimismo, en la invención, se entiende por "triabody" la asociación trivalente de scFv, pudiendo dicho triabody fijar 3 antígenos idénticos o diferentes.

5 En la invención, un "tetrabody" corresponde a la asociación tetravalente de scFv, pudiendo dicho tetrabody fijar 4 antígenos idénticos o diferentes.

10 Otros objetos de la invención es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo está acoplado a una molécula bioactiva seleccionada entre los radioisótopos, los metales no radioactivos, las toxinas, los ácidos nucleicos, los agentes citotóxicos o también las enzimas.

15 La invención se refiere así a un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo monoclonal tales como se han definido anteriormente, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo está acoplado a una molécula bioactiva seleccionada entre los radioisótopos, los metales no radioactivos, las toxinas (seleccionadas entre la ricina, la abrina, la toxina diftérica), los ácidos nucleicos seleccionados entre los ARNs anti-sentido, los agentes citotóxicos seleccionados entre la mitomicina C, el metotrexato, la adriamicina, las enzimas tales como las RNasas, la biotina, la avidina o la estreptavidina.

20 Tales anticuerpos acoplados a una molécula bioactiva son capaces de dirigir específicamente un radioisótopo, una enzima, un metal pesado, o también una toxina, injertado a dicho anticuerpo a una célula diana determinada, en este caso las células DC plasmacitoides.

Se pueden citar como isótopos ventajosos los radioisótopos siguientes At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, no siendo esta lista limitativa.

25 Las toxinas que se pueden injertar a los anticuerpos según la invención se seleccionan entre la ricina, la toxina tetánica, la abrina, la toxina diftérica.

30 También se pueden utilizar los agentes citotóxicos seleccionados entre los antifolatos (metotrexato, pemetrexed, raltitrexed), las anti-purinas (cladribina, fludarabina, azatioprina, azatioprina, mercaptopurina, 5-fluorouracil capecitabina, citarabina, gemcitabina), los inhibidores de topoisomerasas I y II, los agentes alquilantes (clormetina, ciclofosfamida, ifosfamida, carmustina, fotemustina) y emparentados (mitomicina C, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino), los agentes intercalantes, las antraciclinas (daunorrubicina, doxorubicina y clorhidrato, epirubicina, idarrubicina, bleomicina), los taxanos, los inhibidores específicos de tirosina-quinasa (imatinib, Erlotinib). El conjunto de estas moléculas o compuestos que se puede injertar sobre los anticuerpos según la invención son bien conocidos por el experto en la materia, y le es fácil determinar la molécula a utilizar.

40 En un aspecto ventajoso, la invención se refiere también a un anticuerpo monoclonal o policlonal tal como se ha definido anteriormente o un fragmento de anticuerpo monoclonal tal como se ha definido anteriormente, en el que dicho fragmento de anticuerpo está acoplado a una molécula bioactiva seleccionada entre:

- los radioisótopos,
- los metales no radioactivos,
- 45 - las toxinas seleccionadas entre la ricina, la abrina, la toxina diftérica,
- los ácidos nucleicos seleccionados entre los ARNs anti-sentido,
- los agentes citotóxicos seleccionados entre:
- 50 - los antifolatos seleccionados entre metotrexato, pemetrexed, raltitrexed,
- las anti-purinas seleccionadas entre cladribina, fludarabina, azatioprina, azatioprina, mercaptopurina, 5-fluorouracil capecitabina, citarabina, gemcitabina,
- 55 - los inhibidores de topoisomerasas I y II,
- los agentes alquilantes seleccionados entre: clormetina, ciclofosfamida, ifosfamida, carmustina, fotemustina y los agentes alquilantes emparentados seleccionados entre: mitomicina C, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino,
- 60 - los agentes intercalantes,
- las antraciclinas seleccionadas entre: daunorrubicina, doxorubicina y clorhidrato, epirubicina, idarrubicina, bleomicina,
- 65 - los taxanos,

- los inhibidores específicos de tirosina-quinasa seleccionados entre: imatinib, Erlotinib,

- las enzimas tales como las RNAs,

- la biotina, la avidina o la estreptavidina.

La invención se refiere también a un producto de combinación que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo antes mencionado, en asociación con un agente anticanceroso, para una utilización simultánea, separada o espaciada en el tiempo, en terapia tumoral.

La invención se refiere así a un producto de combinación que comprende un anticuerpo tal como se ha definido anteriormente o un fragmento de anticuerpo monoclonal o policlonal tal como se ha definido anteriormente, y un agente anticanceroso para una utilización simultánea, separada o espaciada en el tiempo en terapia tumoral, en el tratamiento de los tumores hematopoyéticos de fenotipo CD4+, CD56+.

Los anticancerosos que pueden ser utilizados en la invención se seleccionan en particular entre

- los anti-metabólicos tales como los antifólicos (metotrexato, raltitrexed, y pemetrexed), los antipúricos (mercaptopurina, tioguanina, pentostatina, cladribina y fludarabina), los antipirimídicos (5 fluoro-uracilo, tegafur-uracilo, capecitabina y citarabina), y otros anti-metabólicos (hidroxicarbamida o hidroxiurea y gemcitabina),

- los alquilantes tales como las mostazas con nitrógeno (clorambucil, melfelan, clormetina o metacloroetamina, estramustina, ifosfamida y ciclofosfamida), las nitroso-ureas (fotemustina, lomustina, carmustina y estreptoizocina), los organoplatinos (carboplatino, cisplatino y oxaliplatino), las etileniminas (tiotepa y altretamina), los triazenos (procarbazina, temozolomida y dacarbazina) y otros alquilantes (busulfán, mitomicina C y pipobromán)

- los agentes intercalantes tales como los derivados de la camptotecina (irinotecán y topotecán), las antraciclinas (epirrubina, daunorrubicina, doxorubicina, pirarrubicina e idarrubicina) y otros agentes intercalantes (mitoxantrona, amsacrina, eliptinio, actinomomicina d o dactinomomicina, etopósido y bleomicina), y

- las moléculas que tienen una acción sobre el huso mitótico tales como vinca-alcaloides o veneno del huso (vinorelbina, vindesina, vincristina y vinblastina), los taxoides o estabilizantes del huso (paclitaxel y docetaxel), los inhibidores de tirosina quinasa (dasatinib, erlotinib, imatinib, sorafenib y sunitinib).

Las moléculas antes mencionadas se dan a título indicativo, pero no limitan el alcance de la invención. Los compuestos antes mencionados corresponden a la denominación común internacional (DCI) y el experto en la materia puede muy fácilmente encontrar las marcas comerciales correspondientes en los diferentes proveedores.

La invención se refiere a un producto de combinación como se ha mencionado anteriormente para una utilización en el tratamiento de los tumores hematopoyéticos.

La invención se refiere a un producto de combinación como se ha mencionado anteriormente para una utilización en el tratamiento de los tumores de fenotipo CD4+, CD56+.

Leyenda de las figuras

La figura 1 representa un histograma que muestra la depleción de las células DC plasmacitoides BDCA-2+ en PBMC humanos de donante sano en presencia del anticuerpo policlonal de conejo anti-BDCA-2+. El % de células positivas se obtiene mediante un doble marcado ILT7/BDCA-2.

La columna negra representa el porcentaje de células DC plasmacitoides sin tratamiento con el anticuerpo (control negativo 1), la columna blanca representa el porcentaje de células DC plasmacitoides tratadas con un anticuerpo control (que no está dirigido contra BDCA-2; control negativo 2) y la columna con rayas representa el porcentaje de células DC plasmacitoides tratadas con el anticuerpo anti BDCA-2.

La figura 2 representa un histograma que muestra la determinación de IFN- α después de la depleción de las células DC plasmacitoides con un anticuerpo policlonal de conejo anti-BDCA-2+ y de la activación por CpG.

La columna negra representa el porcentaje de secreción de IFN- α por los PBMC totales, la columna blanca representa el porcentaje de secreción de IFN- α por los PBMC totales de depleción en células DC plasmacitoides y la columna con rayas representa el porcentaje de secreción de IFN- α por las células DC plasmacitoides solas.

La figura 3 representa un histograma que muestra la actividad ADCC del anticuerpo policlonal anti-BDCA-2 (barras negras) sobre las células Jurkat-BDCA-2. Los resultados se expresan en porcentaje de lisis de la célula Jurkat-BDCA-2 en función de la cantidad de anticuerpos añadida, expresado en factor de dilución de la solución inicial de

anticuerpo (A: 0, B: 1/250 y C: 1/25. Media +/- desviación estándar. En control, el porcentaje de lisis se mide con la ayuda de un anticuerpo control (barras blancas).

El eje de las Y representa el porcentaje de lisis.

5

Ejemplos

Ejemplo 1: preparación de líneas celulares que expresan la proteína BDCA-2.

10 Se amplifica el ADN complementario de BDCA-2 por PCR y se clona en el vector de expresión pcDNA3.1(-) en los sitios de restricción HindIII/BamHI.

El vector pcDNA que contiene BDCA-2 se transfecta por nucleofección o Fugeno HD la línea celular U937 o THP-1.

15 cuarenta y ocho horas después de la transfección, se sigue la expresión de BDCA-2 por las células transfectadas por citometría en flujo, utilizando un anticuerpo anti-BDCA-2 y un anticuerpo acoplado a un fluoróforo.

Las células BDCA-2+ se clasificarán por selección positiva con la ayuda de bolas magnéticas acopladas con el anticuerpo anti-BDCA-2 (kit myltenyi).

20

Se repite la clasificación hasta la obtención del 100% de células positivas que expresan BDCA-2.

Ejemplo 2: Medición del efecto del anticuerpo anti-BDCA-2 según la invención.

25 El efecto del anticuerpo anti-BDCA-2 según la invención se mide en el ratón o en el ser humano según su naturaleza.

Un medio para medir la actividad del anticuerpo es medir la lisis celular dependiente de los anticuerpos (ADCC) en presencia de células asesinas (Natural Killer (NK) o líneas T transfectadas con unos receptores Fc).

30

Medición de ADCC para un anticuerpo murino o que presenta un fragmento Fc de origen murino

Las células asesinas (células efectoras de ratones o de las líneas T transfectadas con FcR murinos) se incuban con unas células dianas transfectadas BDCA-2 (ejemplo 1) o células dendríticas plasmacitoides de pacientes leucémicos (CD4+/CD56+) o que padecen enfermedad inflamatoria y/o autoinmune, en una relación E/T de 15/1, en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpos anti-BDCA-2.

35

Después de 4 o 16 horas de incubación, se mide la actividad citotóxica inducida por los anticuerpos anti-BDCA-2 por colorimetría determinando en los sobrenadantes la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) (Roche Diagnostics - Cytotoxicity Detection Kit LDH ref 11644793001).

40

En el caso de un índice bajo de LDH intra-celular, las células son marcadas con un agente fluorescente y la lisis se estima midiendo la cantidad de fluorescencia liberada en el sobrenadante.

45 Los resultados de lisis específica se expresan en porcentaje de lisis en función de la concentración de anticuerpos. Los valores de EC_{50} (cantidad de anticuerpos que induce el 50% de la lisis máxima) así como los valores de E_{max} (porcentaje de lisis máxima) se calculan con la ayuda del programa PRISM.

Medición de ADCC para un anticuerpo que posee un fragmento Fc de origen humano

50

Las células asesinas (PBMC, células NK, o células T transfectadas con CD16 humana) son previamente purificadas por la técnica de depleción negativa desarrollada por la compañía Miltenyi (Miltenyi Biotec - NK cell isolation kit human ref 130-092-657), a partir de sangre periférica de donantes sanos. La técnica ADCC consiste en incubar las células NK con unas células dianas transfectadas BDCA-2 o unas células DC plasmacitoides de pacientes leucémicos (CD4+/CD56+) o que padecen enfermedad inflamatoria y/o autoinmune, a una relación E/T de 15/1, en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpos anti-BDCA-2.

55

Después de 4 o 16 horas de incubación, se mide la actividad citotóxica inducida por los anticuerpos anti-BDCA-2 por colorimetría analizando en los sobrenadantes una enzima intracelular denominada lactato deshidrogenasa (LDH) liberada por las células dianas lisadas (Roche Diagnostics - Cytotoxicity Detection Kit LDH ref 11644793001).

60

En el caso de un índice bajo LDH intra-celular, las células se marcan con un agente fluorescente y la lisis se estima midiendo la cantidad de fluorescencia liberada en el sobrenadante.

Los resultados de lisis específica son expresados en porcentaje de lisis en función de la concentración de anticuerpos. Los valores de EC_{50} (cantidad de anticuerpos que induce el 50% de la lisis máxima) así como los valores de E_{max} (porcentaje de lisis máxima) se calculan con la ayuda del programa PRISM.

5 Ejemplo 3: preparación de líneas celulares que expresan la proteína BDCA-2.

10 El ADN complementario de BDCA-2 se amplifica por PCR y se clona en el vector de expresión pcDNA3.1(-) en los sitios de restricción HindIII/BamHI. El vector pcDNA que contiene BDCA-2 se transfecta por nucleofección o Fugeno HD la línea celular Jurkat. 48 horas después de la transfección, se sigue la expresión de BDCA-2 por las células transfectadas por citometría en flujo, utilizando un anticuerpo anti-BDCA-2 acoplado a un fluoróforo. Las células BDCA-2+ se aislarán con la ayuda de clasificación sucesivas realizadas por citometría en flujo con un clasificador (Altra, Becton Dickson) utilizando un anticuerpo anti BDCA-2 (Myltenyi). Se repite la clasificación hasta la obtención del 100% de células positivas que expresan BDCA-2.

15 Ejemplo 4: Citotoxicidad.

Depleción de células DC plasmacitoides en PBMC

20 Los PBMC se aíslan a partir de la sangre periférica sobre un gradiente de Ficoll. La técnica consiste en incubar los PBMC en presencia de un anticuerpo policlonal de conejo anti BDCA-2 o de anticuerpo policlonal de conejo irrelevante. Después de 16 horas de incubación, se mide la depleción de las células DC plasmacitoides inducida por los anticuerpos anti BDCA-2 por citometría en flujo en base al doble marcado ILT7/CD123.

25 Los resultados se muestran en la figura 1.

Estos resultados muestran una disminución del número de células DC plasmacitoides de aproximadamente el 40% en presencia de anticuerpos anti-BDCA-2 en comparación con el anticuerpo control. Este resultado permite concluir que un anticuerpo anti-BDCA-2, en presencia de células efectoras, puede inducir a una depleción de las células DC plasmacitoides.

30 Disminución del porcentaje de IFN α asociado a la depleción de las células DC plasmacitoides

35 Los PBMC se aíslan a partir de la sangre periférica sobre un gradiente de Ficoll. La técnica consiste en realizar una depleción de las células DC plasmacitoides de los PBMC con la ayuda del kit Myltenyi anti-células DC plasmacitoides. Después de la activación por CpG durante 16h a 37°C, el porcentaje de IFN- α se mide por citometría en flujo en comparación con los PBMC control que contienen unas células DC plasmacitoides.

Los resultados se muestran en la figura 2.

40 Los resultados indican una disminución de la secreción de IFN- α después de la depleción de las células DC plasmacitoides de aproximadamente el 85%, permitiendo esto concluir que la depleción de las células DC plasmacitoides por un anti-BDCA-2 puede conducir a una disminución de la secreción de IFN- α . En este experimento, las células DC plasmacitoides solas se utilizan como células positivas para la secreción de IFN- α .

45 ADCC

50 Las células asesinas (células NK) se purifican previamente por la técnica de depleción negativa desarrollada por la compañía Miltenyi (Miltenyi Biotec - NK cell isolation kit human ref 130-092-657), a partir de sangre periférica de donantes sanos. La técnica ADCC consiste en incubar las células NK con unas células diana de la línea Jurkat transfectadas con el receptor BDCA-2, en presencia de diferentes concentraciones de un anticuerpo policlonal de conejo anti-BDCA-2 o de anticuerpo policlonal de conejo irrelevante. Después de 16 horas de incubación, se mide la actividad citotóxica inducida por los anticuerpos anti-BDCA-2 por colorimetría determinando en los sobrenadantes, una enzima intracelular denominada lactato deshidrogenasa (LDH) liberada por las células dianas lisadas (Roche Diagnostics - Cytotoxicity Detection Kit LDH).

55 Los resultados se presentan en la figura 3 y muestran una actividad citotóxica del anticuerpo policlonal de conejo anti-BDCA-2 sobre las células Jurkat-BDCA-2, de manera dosis dependiente que puede alcanzar más del 60% de lisis de la célula diana.

60 Estos resultados indican por lo tanto que enfocando el antígeno BDCA-2 expresado en la superficie de una célula, es posible lisar esta célula utilizando unos efectores tales como las células NK. El anticuerpo anti-BDCA-2 puede soportar otras actividades citotóxicas tales como la fagocitosis dependiente de otras células efectoras como los macrófagos o los neutrófilos.

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su utilización en el ámbito de la prevención o del tratamiento de las patologías que implican una activación de las células dendríticas plasmacitoides, en el que dichas patologías son unos tumores hematopoyéticos de fenotipo CD4+, CD56+.
- 10 2. Anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su utilización según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo se selecciona entre los anticuerpos siguientes: un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano.
- 15 3. Anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su utilización según la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico y preferentemente un anticuerpo quimérico seleccionado entre un anticuerpo quimérico murino/humano o un anticuerpo quimérico humano/macaco.
- 20 4. Anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su utilización según la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
5. anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su utilización según la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humano.
- 25 6. Anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo presenta un porcentaje de fucosilación inferior al 60% de las formas glicosiladas.
- 30 7. Fragmento de un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho fragmento se selecciona entre Fab, F(ab)'2, Fd, scFV, dímero de ScFv, diabody, triabody o tetrabody, en particular para su utilización en el ámbito del tratamiento de las patologías tales como se han definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 35 8. Anticuerpo monoclonal o policlonal tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o fragmento de anticuerpos monoclonal tal como se define en la reivindicación 7, en el que dicho anticuerpo o dicho fragmento de anticuerpo está acoplado a una molécula bioactiva seleccionada entre:
- los radioisótopos,
 - los metales no radioactivos,
 - las toxinas seleccionadas entre la ricina, la abrina, la toxina diftérica,
 - los ácidos nucleicos seleccionados entre los ARNs anti-sentido,
 - los agentes citotóxicos seleccionados entre:
 - los antifolatos seleccionados entre metotrexato, pemetrexed, raltitrexed,
 - las anti-purinas seleccionadas entre cladribina, fludarabina, azatioprina, azatioprina, mercaptopurina, 5-fluorouracil capecitabina, citarabina, gemcitabina,
 - los inhibidores de topoisomerasas I y II,
 - los agentes alquilantes seleccionados entre: clormetina, ciclofosfamida, ifosfamida, carmustina, fotemustina y los agentes alquilantes emparentados seleccionados entre: mitomicina C, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino,
 - los agentes intercalantes,
 - las antraciclinas seleccionadas entre: daunorrubicina, doxorubicina y clorhidrato, epirubicina, idarrubicina, bleomicina,
 - los taxanos,
 - los inhibidores específicos de tirosina-quinasa seleccionados entre: imatinib, Erlotinib,
 - las enzimas tales como las RNsas,
 - la biotina, la avidina o la estreptavidina.
- 65

9. Producto de combinación que comprende un anticuerpo tal como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o fragmento de anticuerpo monoclonal o policlonal tal como se define en la reivindicación 7, y un agente canceroso para una utilización simultánea, separada o espaciada en el tiempo en terapia tumoral, en el tratamiento de tumores hematopoyéticos de fenotipo CD4+, CD56+.

5

2

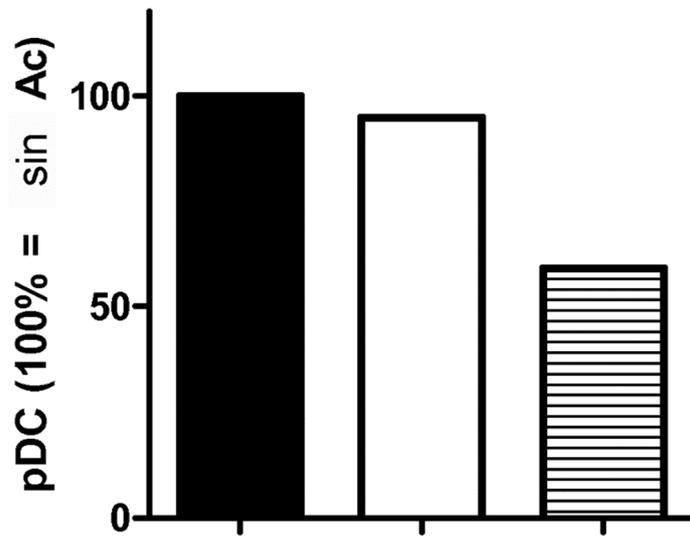


Figura 1

21

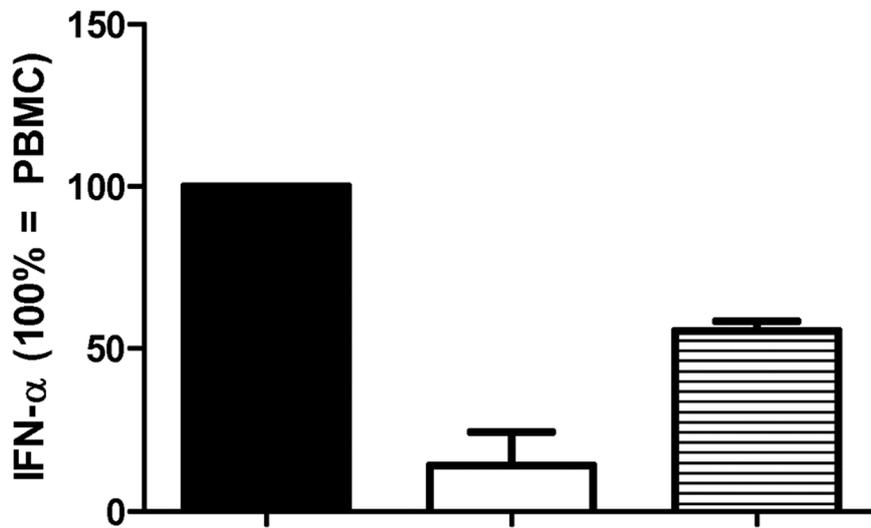


Figura 2

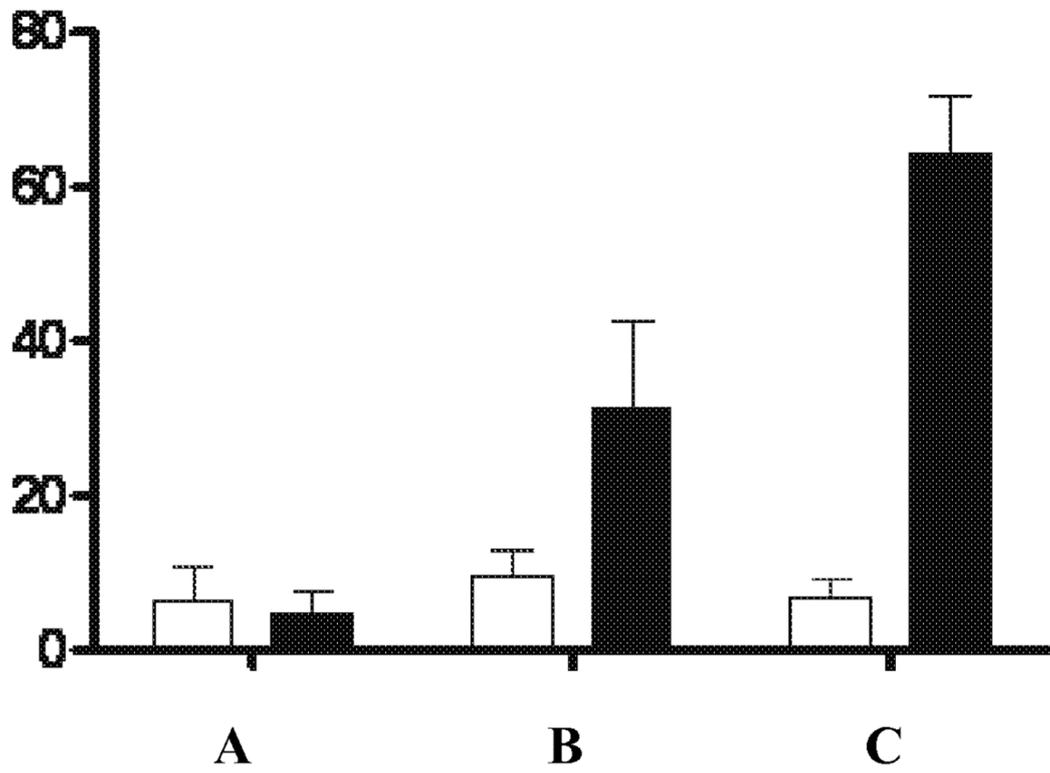


Figura 3