

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 823 201**

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

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2011 E 18192072 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020 EP 3438129**

54 Título: **Composición de anticuerpos monoclonales dirigidos contra BDCA-2**

30 Prioridad:

13.12.2010 FR 1060428

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

06.05.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 823 201 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

Composición de anticuerpos monoclonales dirigidos contra BDCA-2

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

10 Los anticuerpos utilizados clínicamente, 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 alrededor del 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) que puede conducir así a un estado de inmunodeficiencia asociado con hipogammaglobulemia.

15 Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar una alternativa a esta depleción B disminuyendo el número de células dendríticas plasmocitoides, células clave para el inicio de la respuesta inmune patológica y, por lo tanto, atenuar la respuesta inmune del paciente y, en consecuencia, de las células B auto-reativas.

20 Las células dendríticas (en inglés dendritic cells o DC) son células del sistema inmunitario presentadoras de antígenos (CPA) que forman parte del sistema reticulohistiocitario. Bajo algunas condiciones, las células DC presentan prolongaciones citoplasmáticas similares a las dendritas de las neuronas.

Las células dendríticas tienen dos funciones principales:

25 - el inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa, cuyos principales actores son los linfocitos T y los linfocitos B, dirigida contra antígenos "no auto".

30 - el mantenimiento de la tolerancia central al "auto" en el timo, mediante el proceso que implican los linfocitos T denominado selección negativa.

Se han caracterizado numerosas subpoblaciones de células DC en ratones, pero no se ha identificado ninguna correspondencia en humanos.

35 Las DC son capaces de diferenciarse en varios subtipos, según los estímulos que reciban. Existen dos tipos principales de células DC: células DC convencionales, células DC plasmocitoides y 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 de la recepción de señales, migran hacia los ganglios linfoides secundarios por medio de los vasos linfáticos; llegan en estado maduro a los órganos linfoides en los que presentan el antígeno a los linfocitos T sin tratamiento previo; por ejemplo, se pueden citar las células de Langerhans o también las células D de las mucosas;

45 - las células DC inmaduras residentes en órganos linfoides; estas células recogen y presentan los antígenos no auto o extraños dentro incluso 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 después de una inflamación o de una infección, pero nunca están presentes al margen de cualquier estimulación. Se supone actualmente que las células DC inflamatorias procederían principalmente de la diferenciación de monocitos sanguíneos.

Las células DC plasmocitoides se diferencian de las células DC convencionales por que son circulantes, redondas y sin dendritas en el estado basal, aunque terminan por diferenciarse en DC convencionales tras 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 esencialmente implicadas en la respuesta antiviral y en los desórdenes autoinmunes.

60 Las células DC plasmocitoides (también denominadas células DC plasmocitoides) 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 plasmocitoides pueden ser el origen de tumores hematopoyéticos, en los que adquieren un marcador adicional que es el CD56+. Por eso, se habla de tumores hematopoyéticos CD4+/CD56+ (en inglés BPDCN: Blastic plasmacytoid dendritic cells neoplasm).

5 Los tumores hematopoyéticos CD4+/CD56+ son unos neoplasmas hematológicos raros (un 1% de las leucemias agudas), que se presentan en forma de nódulos cutáneos asociados con una linfadenopatía o una inflamación 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 primero en los linfomas de células NK. Pero la ausencia de marcadores de líneas mieloides, linfoides T o B o NK ha suscitado estudios complementarios que han permitido afinar la clasificación para finalmente revelar que las células dendríticas denominadas de tipo II o células DC plasmocitoides son el origen de los tumores hematopoyéticos CD4+/CD56+ [Chaperot L *et al.*, 2001, Blood. 2001 15 de mayo; 97 (10): 3210-7, Herling M, Jones D., 2007, Am J Clin Pathol. Mayo de 2007; 127 (5): 687-700]

10 El tratamiento actual de estas patologías se basa en la quimioterapia que permite una remisión completa de aproximadamente 2 de cada tres pacientes, pero en los que las recaídas son frecuentes y precoces (aproximadamente 9 meses). El promedio de supervivencia global es de aproximadamente 13 meses. Otra alternativa de tratamiento es el aloinjerto de células hematopoyéticas, que no permite, sin embargo, tampoco la supervivencia a largo plazo.

15 En consecuencia, existe en la actualidad una necesidad real de encontrar un tratamiento para estas patologías CD4+/CD56+.

20 Se han propuesto en la técnica anterior unos medios para tratar estas patologías que implican células que expresan marcadores de células dendríticas.

Especialmente, se han propuesto unas moléculas que tienen como objetivo los marcadores de diferenciación de BDCA.

25 Se puede citar, por ejemplo, la patente europea EP 1 301 539 que describe un polipéptido de una secuencia particular que se une específicamente a la proteína BDCA-2 y una composición farmacéutica que la comprende.

30 La solicitud de patente europea EP 1 783 141 divulga una composición que permite inducir una respuesta inmune en un paciente, comprendiendo dicha composición unas células dendríticas previamente tratadas con un anticuerpo anti-BDCA-2 y que expresan un antígeno (tumoral, viral, bacteriano, etc.). Esto consiste en un tratamiento con terapia celular.

35 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 fragmentos derivados. Por otro lado, esta solicitud describe el uso de anticuerpos monoclonales para el tratamiento de patologías tales como infecciones virales, enfermedades autoinmunes y tumores.

40 La solicitud WO 2006/037247 describe el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína BDCA-2, en el ámbito del tratamiento de una enfermedad autoinmune particular: la psoriasis.

45 Nestlé *et al.*, (Nestlé *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 fines terapéuticos en el ámbito del tratamiento de la psoriasis.

50 Blomberg *et al.*, (Blomberg *et al.*, 2003, Arthritis and Rheumatism, vol. 48, n°9, p. 2524-2532) enseña el uso de anticuerpos dirigidos contra la proteína BDCA-2, utilizándose dichas vacunas para una enfermedad autoinmune: el lupus eritematoso. Los autores muestran que dichos anticuerpos son capaces de inhibir la producción de interferón α (IFN- α).

55 La solicitud US 2010/1896641 describe unos anticuerpos dirigidos contra la proteína BDCA-2 en el ámbito del tratamiento de tumores.

Por lo tanto, se constata que el uso de anticuerpos dirigidos contra la proteína BDCA-2 está ampliamente descrito en la técnica anterior.

60 Sin embargo, la técnica anterior no dice nada sobre el tratamiento de patologías que implican unas células CD4+/CD56+.

No obstante, en la actualidad no existe un tratamiento específico y eficaz que permita el tratamiento o la prevención de patologías que impliquen unas células dendríticas plasmocitoides, y especialmente los tumores CD4+/CD56+.

65 Por lo tanto, la invención tiene por objeto paliar la carencia del estado de la técnica y, especialmente, proporcionar tratamientos alternativos.

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

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

La invención se define mediante las reivindicaciones.

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

10 La invención se basa en la constatación inesperada hecha por los inventores del efecto de los anticuerpos anti-BDCA-2 sobre la progresión de los tumores, especialmente de los tumores hematopoyéticos.

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

15 El uso de anticuerpos anti-IFN- α en el tratamiento de pacientes que padecen patologías autoinmunes e inflamatorias induce a la neutralización de IFN- α de manera sistémica, lo que potencialmente aumenta el riesgo de infecciones oportunistas. En efecto, esta citoquina se produce en respuesta a un agente infeccioso, en particular viral.

20 Para responder a esta problemática, el objeto de la invención consiste en eliminar las células DC plasmocitoides, principal fuente de IFN- α , reclutadas a nivel de lesiones inflamatorias y responsables de la inflamación local, estando esto particularmente bien descrito en el caso de la psoriasis, por ejemplo. La ventaja de la invención reside, por lo tanto, en una eliminación de IFN- α preferiblemente en el lugar de la inflamación, y no de manera sistémica, lo que de hecho reduce los riesgos relacionados con la inmunodeficiencia inducidos por anti-IFN- α .

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

30 Otra ventaja consiste, por medio de la eliminación de las células DC plasmocitoides, en la reducción de otras citoquinas proinflamatorias tales como IL-6, también segregadas por las células DC plasmocitoides en un entorno inflamatorio y que conducen a una respuesta Th1, por ejemplo.

35 Además, contrariamente a los conceptos generalmente admitidos, el objeto de la invención consiste en aprovechar la hiperactivación del sistema inmunitario en el sitio de la inflamación, en particular la activación de las células efectoras incluyendo las células NK y los macrófagos, y esto debido a la presencia de numerosas citoquinas y quimioquinas proinflamatorias para obtener *in fine* 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 cuyos niveles se aumentan en patologías autoinmunes e inflamatorias (es decir, IFN- γ , TNF- α , etc.).

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

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

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 se ensambla mediante la unión de una cadena ligera y de una cadena pesada mediante un puente disulfuro entre dos cisteínas, estando las dos cadenas pesadas a su vez unidas entre sí también por dos puentes disulfuro.

50 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 componen un anticuerpo permite definir una estructura tridimensional característica en Y, en la que

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

60 - el extremo de los brazos de la Y corresponden al respectivo ensamblaje 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 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.

65

Los anticuerpos descritos en la invención están aislados y purificados y son diferentes de los anticuerpos naturales. Estos anticuerpos son maduros, es decir, poseen una estructura tridimensional *ad hoc* que les permite reconocer el antígeno, y poseen todas las modificaciones postraduccionales esenciales para su reconocimiento antigénico.

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

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

10 Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden obtenerse mediante técnicas bien conocidas por el experto en la materia, y especialmente mediante la técnica de fusión celular, o también mediante la técnica de clonación de las secuencias de las cadenas pesada y ligera, 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.

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

20 Por células dendríticas plasmocitoides se entiende la subpoblación 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 viral.

25 En la invención, se entiende por activación de las células dendríticas plasmocitoides los diversos mecanismos que tienen por efecto activar la proliferación, la secreción de citoquinas determinada, especialmente los interferones de clase I, y la modificación fenotípicas y morfológicas de las células plasmocitoides.

30 En una realización ventajosa, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su uso definido anteriormente, en el que dichas patologías que implican células dendríticas plasmocitoides se seleccionan entre los tumores, las enfermedades autoinmunes y las enfermedades inflamatorias.

35 De manera ventajosa, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su uso tal como se ha mencionado anteriormente, en el que los tumores son preferentemente unos tumores hematopoyéticos.

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

40 Las hemopatías malignas abarcan

- las leucemias: tumor en el que las células sanguíneas proliferan de forma anormal en la sangre,
- los linfomas: tumor en el que las células sanguíneas proliferan de forma anormal en los órganos linfoides secundarios (ganglios, bazo, etc.)
- o enfermedad de Kahler: tumor en el que las células sanguíneas proliferan de forma anormal en la médula ósea.

50 Otro modo de realización ventajosa de la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su uso como se ha definido anteriormente, en el que los tumores hematopoyéticos son unos tumores de fenotipo CD4+, CD56+.

55 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 linfomas cutáneos agranulares CD4+/CD56+, hematodermias agranulares CD4+/CD56+, leucemia/linfomas NK blásticos, 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].

60 En otro modo de realización ventajosa, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su uso 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 pulmonar autoinmune, el síndrome de Guillain-Barré, la tiroiditis autoinmune, la melitis, la miastenia gravis, la enfermedad de injerto contra el hospedante, la enfermedad autoinmune inflamatoria del ojo, la psoriasis, la enfermedad de Basedow (hipertiroidismo), la tiroiditis crónica de Hashimoto (hipotiroidismo), el lupus eritematoso diseminado (LED), el síndrome de Goodpasture, el pénfigo, la miastenia, la diabetes por resistencia a la insulina, la anemia hemolítica autoinmune, la púrpura trombocitopénica autoinmune, la poliartritis reumatoide, la esclerodermia,

la polimiositis y la dermatomiositis, la anemia de Biermer, la enfermedad de Gougerot-Sjogren, la glomerulonefritis, la enfermedad de Wegener, la enfermedad de Horton, la periarteritis nudosa y el síndrome de Churg y Strauss, la enfermedad de Still, la policondritis atrofiante, la enfermedad de Behçet, la esclerosis múltiple, la espondilaltritis, la enfermedad de Crohn, la gammopatía monoclonal, la granulomatosis de Wegener, el lupus, la enfermedad de Horton, la enfermedad de Reiter, la rectocolitis hemorrágica, el reumatismo psoriásico, la sarcoidosis, la espondilartritis anquilosante, la dermatitis bulbosa autoinmunes, la colitis colágena, la dermatitis herpetiforme, la fiebre mediterránea familiar, la glomerulonefritis con depósitos de IgA, la glomerulonefritis extramembranosa, la hepatitis autoinmune, el síndrome miasténico de Lambert-Eaton, la oftalmia simpática, el pénfigoide bulloso, el pénfigo, la púrpura trombocitopénica idiopática, el síndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter, la tiroiditis autoinmune, el síndrome uveo-meningoencefálico y la dermatitis herpetiforme.

En otro modo de realización preferida de la invención, las patologías que implican células dendríticas plasmocitoides son enfermedades autoinmunes, preferentemente enfermedades autoinmunes caracterizadas por una secreción incrementada de IFN de tipo I.

En un modo de realización ventajosa, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su uso según la definición anterior, en el que los tumores son tumores hematopoyéticos se seleccionan entre los síndromes linfoproliferativos y mieloma (enfermedad de Waldenström, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, amiloidosis primitiva), los linfomas (linfoma folicular, linfoma difuso, linfoma de la zona marginal, enfermedad de Hodgkin), la aplasia y las leucemias, y mielodisplasias (leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, mielodisplasia, aplasia medular), los síndromes mieloproliferativos (mielofibrosis, poliglobulia primitiva, trombocitemia esencial, leucemia mieloide crónica).

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

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

Sin embargo, se generalizará en la invención las definiciones anteriores de anticuerpo humano y murino a cualquier anticuerpo que comprenda secuencias de aminoácidos de sus cadenas pesadas y de sus cadenas ligeras de humanos o de ratones. Además, un anticuerpo murino es un anticuerpo cuyas secuencias de las cadenas pesadas y de las cadenas ligeras que lo constituyen son secuencias para las que se encuentra la correspondencia en ácido nucleico en el genoma de las células B murinas. Por lo tanto, este anticuerpo está constituido de secuencias de aminoácidos murinos, sea cual sea el origen de la célula que permite su producción.

Por ejemplo, las secuencias de anticuerpos de ratón expresadas en células de macacos darán unos anticuerpos murinos.

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 la constituye comprende o consiste en una secuencia híbrida procedente de al menos dos animales distintos. Especialmente, los anticuerpos quiméricos de la invención son unos híbridos de humano/macaco o humano/ratón, lo que significa que una región de la secuencia de cadenas ligeras y de 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 posiblemente varias, inmunoglobulina humana.

Por anticuerpo humanizado, se entiende en la invención un anticuerpo derivado de un animal distinto del hombre en el que las secuencias de las cadenas pesadas y de las cadenas ligeras distintas de las CDR se han reemplazado por secuencias correspondientes de uno o más anticuerpos de origen humano. Por lo tanto, el anticuerpo está constituido mayoritariamente por secuencias humanas, pero su especificidad por el antígeno conferido por las CDR proviene de otra especie.

En también otro modo de realización ventajosa, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su uso tal como se ha mencionado anteriormente, los tumores son tumores sólidos seleccionados entre cáncer de pulmón, riñón, hígado, páncreas, melanoma y ovario.

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

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

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

10 La invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o policlonal dirigido contra la proteína BDCA-2 para su uso anteriormente mencionado, en el que dicho anticuerpo presenta una tasa de fucosilación inferior al 60% de las formas glicosiladas.

15 Los anticuerpos según la invención presentan una pequeña cantidad de fucosa en las cadenas glicánicas portadas por dichos anticuerpos. Esta cantidad de fucosa, o tasa de fucosa, se define 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.

20 Otro objeto de la invención es un anticuerpo, en el que dicho anticuerpo se acopla a una molécula bioactiva seleccionada entre los radioisótopos, los metales no radiactivos, las toxinas, los ácidos nucleicos, los agentes citotóxicos o también las enzimas.

25 La invención se refiere además a un anticuerpo monoclonal tal como se ha definido anteriormente, en el que dicho anticuerpo se acopla a una molécula bioactiva seleccionada entre los radioisótopos, los metales no radiactivos, las toxinas (seleccionadas entre la ricina, la abrina, la toxina difteria), los ácidos nucleicos seleccionados entre los ARN antisentido, 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.

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

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

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

40 También se pueden utilizar los agentes citotóxicos seleccionados entre los antifolatos (metotrexato, pemetrexed, raltitrexed), las anti-purinas (cladribina, fludarabina, azatioprina, azatioprina, mercaptopurina, 5-fluorouracilo capecitabina, citarabina, gemcitabina), los inhibidores de topoisomerasa 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 e hidroclicloruro, epirubicina, idarrubicina, bleomicina), los taxanos, los inhibidores específicos de tirosinacinasas (imatinib, erlotinib). El conjunto de estas moléculas o compuestos que se pueden injertar sobre los anticuerpos según la invención son bien conocidos por el experto en la materia y le resulta fácil determinar la molécula a utilizar.

Leyenda de las figuras

50 La figura 1 representa un histograma que muestra la depleción de las células DC plasmocitoides BDCA-2+ en PBMC humanas de donantes sanos en presencia del anticuerpo policlonal de conejo anti-BDCA-2+. El % de células positivas se obtiene por un doble marcado ILT7/CD123.

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

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

La columna negra representa el porcentaje de secreción de IFN- α por PBMC totales, la columna blanca representa el porcentaje de secreción de IFN- α por PBMC totales de depleción en células DC plasmocitoides y la columna rayada representa el porcentaje de secreción de IFN- α por células DC plasmocitoides solas.

65 La figura 3 representa un histograma que muestra la actividad ADCC del anticuerpo policlonal anti-BDCA-2 (barras negras) en células Jurkat-BDCA-2. Los resultados se expresan como el porcentaje de lisis de la célula Jurkat-BDCA-

2 en función de la cantidad de anticuerpo añadida, expresado como 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 de control (barras blancas).

5 El eje de las Y representa el porcentaje de lisis.

EJEMPLOS

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

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

15 Se transfecta el vector pcDNA que contiene BDCA-2 por nucleofección o Fugene HD la línea celular U937 o THP-1.

Después de 48h tras la transfección, la expresión de BDCA-2 por las células transfectadas se monitoriza mediante citometría de flujo, usando un anticuerpo anti-BDCA-2 y un anticuerpo acoplado a un fluoróforo.

20 Las células BDCA-2 + se clasificarán mediante selección positiva con la ayuda de perlas magnéticas acopladas al anticuerpo anti-BDCA-2 (kit myltenyi).

La clasificación se repite hasta que se obtiene el 100% de células positivas que expresan BDCA-2.

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

25 Se mide el efecto del anticuerpo anti-BDCA-2 según la invención en ratones o en humanos según su naturaleza.

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

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

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

40 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 la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) (Roche Diagnostics – Cytotoxicity Detection Kit LDH ref 11644793001).

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

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

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

55 Las células asesinas (PBMC, células NK o células T transfectadas con CD16 humano) se purifican previamente mediante 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 células dianas transfectadas BDCA-2 o células DC plasmocitoides de pacientes leucémicos (CD4+/CD56+) o que padecen una enfermedad inflamatoria y/o autoinmune, en una relación E/T de 15/1, en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpos anti-BDCA-2.

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

En el caso de un nivel de LDH intracelular bajo, 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 la lisis específica se expresan en porcentaje de lisis en función de la concentración de anticuerpos. Los valores de EC_{50} (cantidad de anticuerpo que induce el 50% de la lisis máxima) así como los valores de E_{max} (porcentaje de lisis máximo) se calculan con la ayuda del programa PRISM.

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

Se amplifica el ADN complementario de BDCA-2 mediante 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 Fugene HD de la línea celular Jurkat. 48 horas después de la transfección, la expresión de BDCA-2 por las células transfectadas se monitoriza mediante citometría de flujo, utilizando un anticuerpo anti-BDCA-2 acoplado a un fluoróforo. Las células BDCA-2+ se aislarán con la ayuda de clasificaciones sucesivas realizadas por citometría de flujo con un clasificador (Altra, Becton Dickson) usando un anticuerpo anti BDCA-2 (Myltenyi). La clasificación se repite hasta que se obtiene el 100% de células positivas que expresan BDCA-2.

15 **Ejemplo 4: Citotoxicidad.**

Depleción de células DC plasmocitoides en PBMC

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

Los resultados se muestran en la figura 1.

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

Disminución del porcentaje de $IFN\alpha$ asociado con la depleción de células DC plasmocitoides

Los PBMC se aíslan a partir de sangre periférica en un gradiente de Ficoll. La técnica consiste en depletar las células DC plasmocitoides de las PBMC con la ayuda del kit Myltenyi anti-células DC plasmocitoides. Después de la activación por CpG durante 16h a 37°C, se mide la tasa de $IFN-\alpha$ mediante citometría de flujo, y esto en comparación con las PBMC de control que contienen células DC plasmocitoides.

Los resultados se muestran en la figura 2.

Los resultados indican una disminución en la secreción de $IFN-\alpha$ después de la depleción de las células DC plasmocitoides de aproximadamente el 85%, lo que permite concluir que la depleción de las células DC plasmocitoides por un anti-BDCA-2 puede conducir a una disminución en la secreción de $IFN-\alpha$. En este experimento, las células DC plasmocitoides solas se utilizan como células positivas para la secreción de $IFN-\alpha$.

45 ADCC

Las células asesinas (células NK) se purifican previamente mediante 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 células dianas 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 un anticuerpo policlonal de conejo irrelevante. Después de 16 horas de incubación, la actividad citotóxica inducida por los anticuerpos anti-BDCA-2 se mide por colorimetría analizando en los sobrenadantes una enzima intracelular denominada lactato deshidrogenasa (LDH) liberada por las células diana lisadas (Roche Diagnostics - Citotoxicity Detection Kit LDH).

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

Por lo tanto, estos resultados indican que dirigiendo el antígeno BDCA-2 expresado en la superficie de una célula, es posible lisar esta célula usando efectores tales como las células NK. El anticuerpo anti-BDCA-2 puede soportar otras actividades citotóxicas como la fagocitosis dependiente de otras células efectoras como macrófagos o neutrófilos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína BDCA-2, presentando dichos anticuerpos un porcentaje de fucosilación inferior al 60% de las formas glicosiladas, e implicando dichos anticuerpos una destrucción de células DC plasmocitoides por el mecanismo de ADCC.
- 10 2. Composición de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína BDCA-2 según la reivindicación 1, en la que dichos anticuerpos se seleccionan entre los siguientes anticuerpos: anticuerpos murinos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos.
- 15 3. Composición de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína BDCA-2 según la reivindicación 2, en la que dichos anticuerpos son unos anticuerpos quiméricos y preferentemente unos anticuerpos quiméricos seleccionados entre anticuerpos quiméricos murino/humano o anticuerpos quiméricos humanos/macacos.
- 20 4. Composición de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína BDCA-2 según la reivindicación 2, en la que dichos anticuerpos son unos anticuerpos humanizados.
- 25 5. Composición de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína BDCA-2 según la reivindicación 2, en la que dichos anticuerpos son unos anticuerpos humanos.
- 30 6. Composición de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína BDCA-2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dichos anticuerpos están acoplados a una molécula bioactiva seleccionada entre:
- 35 - los radioisótopos,
 - los metales no radiactivos,
 - las toxinas, seleccionadas entre la ricina, la abrina, la toxina diftérica,
 - 40 - los ácidos nucleicos seleccionados entre ARN antisentido,
 - los agentes citotóxicos seleccionados entre:
 - 45 ◦ los antifolatos, seleccionados entre metotrexato, pemetrexed, raltitrexed,
 - las antipurinas, seleccionadas entre cladribina, fludarabina, azatioprina, azatioprina, mercaptopurina, 5-fluorouracilo capecitabina, citarabina, gemcitabina,
 - los inhibidores de las 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,
 - 50 ◦ los agentes intercalantes,
 - las antraciclinas seleccionadas entre daunorrubicina, doxorrubicina y clorhidrato, epirubicina, idarrubicina, bleomicina,
 - los taxanos,
 - los inhibidores específicos de la tirosina quinasa seleccionados entre imatinib, Erlotinib,
 - 55 - las enzimas tales como las RNasas,
 - la biotina, la avidina o la estreptavidina.
7. Composición de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína BDCA-2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso como medicamento.

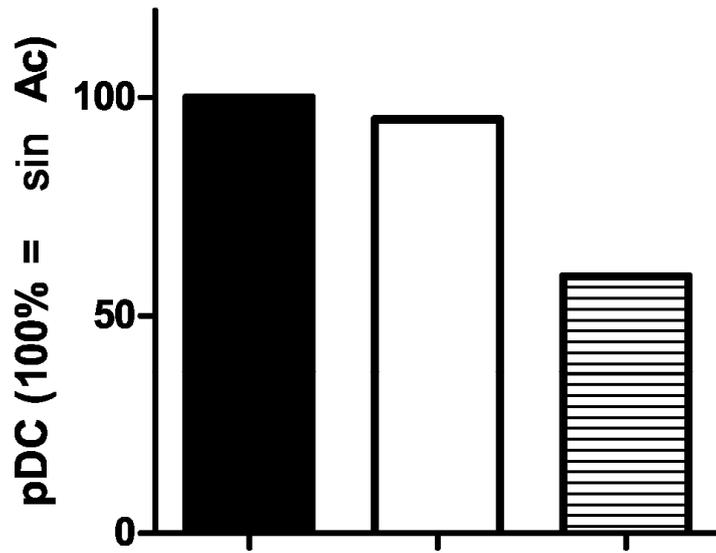


Figura 1

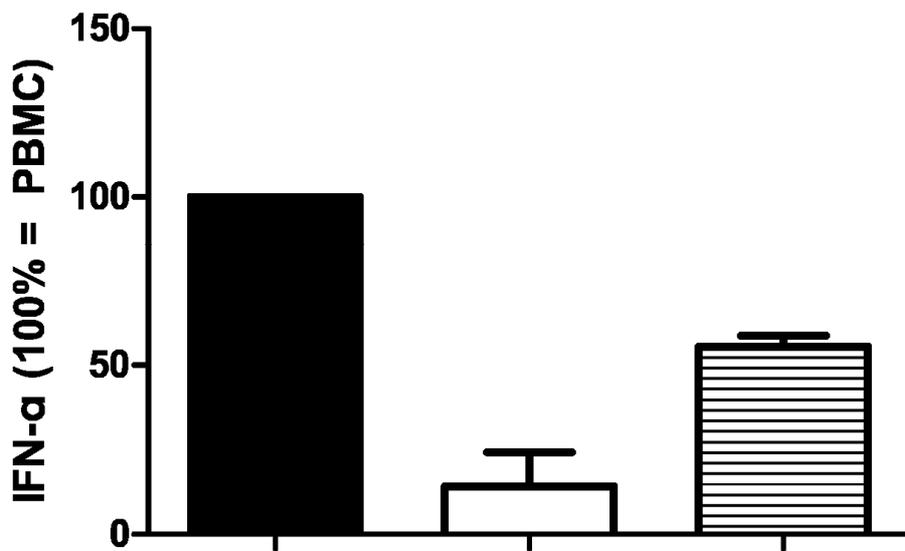


Figura 2

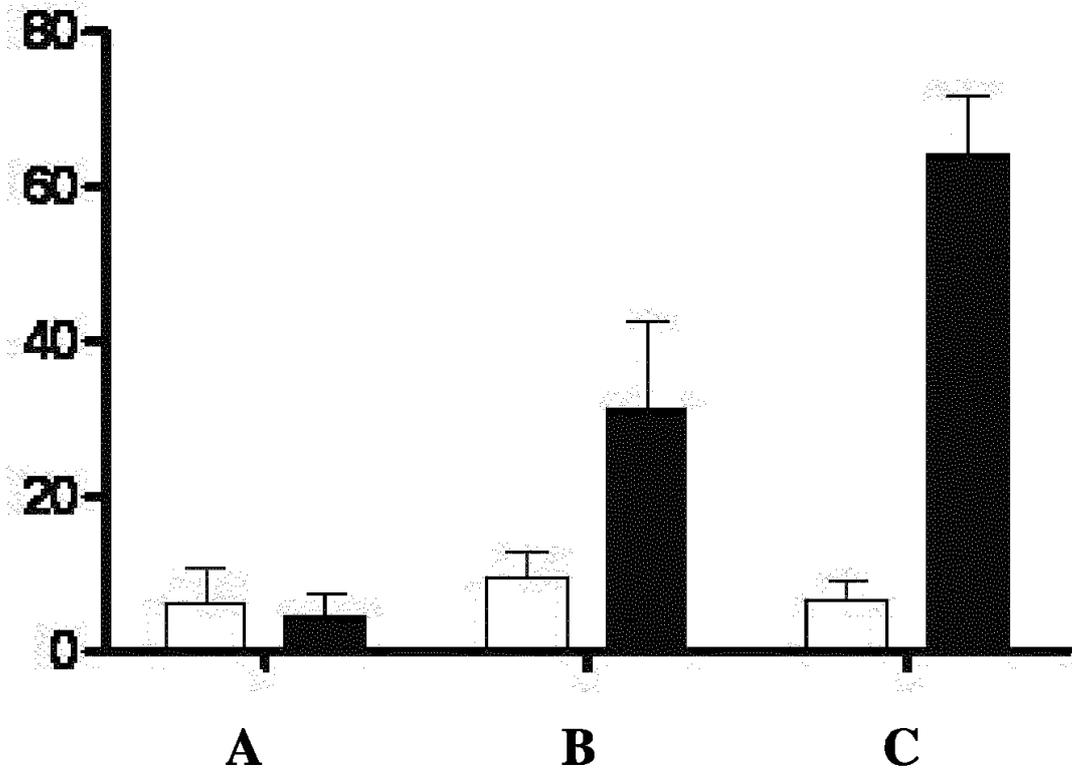


Figura 3