

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 292**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2009 PCT/EP2009/051078**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2009 WO09095478**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2009 E 09705212 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 2238170**

54 Título: **Anticuerpos contra CD39 humano y uso de los mismos para inhibir la actividad de las células T reguladoras**

30 Prioridad:

31.01.2008 EP 08300061
20.08.2008 EP 08162683

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.06.2017

73 Titular/es:

INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (100.0%)
101, RUE DE TOLBIAC
75654 PARIS CEDEX, FR

72 Inventor/es:

LEVY, YVES;
ELIAOU, JEAN-FRANÇOIS;
BENSUSSAN, ARMAND y
BONNEFOY-BERARD, NATHALIE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 618 292 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra CD39 humano y uso de los mismos para inhibir la actividad de las células T reguladoras

Campo de la invención

5 La invención se refiere a anticuerpos contra CD39 humano para inhibir la actividad de las células T reguladoras (Treg).

Antecedentes de la invención

10 Las células T reguladoras (células Treg) se clasifican actualmente en dos subconjuntos principales, según su origen y actividad supresora (Bluestone, J. A. y Abbas, A. K. Natural versus adaptive regulatory T cells. Nature Rev. Immunol. 3, 253-257 (2003)). Las células Treg naturales se originan en el timo por una interacción de alta afinidad del receptor de células T (TCR) con antígenos expresados en el estroma tímico. Se han descrito clásicamente que suprimen la proliferación de células T efectoras in vitro en una manera independiente de las citoquinas y dependiente del contacto. Las células naturales Treg expresan constitutivamente CD25, antígeno de linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA4), factor de necrosis tumoral inducida por glucocorticoides (TNF) receptor (GITR) y OX40, moléculas que caracterizan a los linfocitos activados. Sin embargo, la expresión a alto nivel del factor de transcripción FOXP3 (forkhead box p3) es el marcador más distintivo para el linaje de regulación, al menos en el sistema murino. Aunque incompletamente caracterizada hasta la fecha, la red de los mecanismos de supresión de células Treg natural incluye moléculas de superficie tales como CTLA4, el factor de crecimiento transformante unido a la membrana (TGF) y la generación pericelular de adenosina.

20 La reducción de las células Treg de origen natural en huéspedes normales da como resultado diversas enfermedades autoinmunes debido a que el sistema inmune del huésped está desactivado y va a atacar a los propios tejidos del cuerpo. En roedores, la reducción o la alteración funcional de las células T reguladoras CD25+ CD4+ se ha demostrado que causa el desarrollo espontáneo de diversas enfermedades autoinmunes específicas de órganos, incluyendo la tiroiditis, gastritis, y la diabetes tipo I. Las células T reguladoras también son críticas para la respuesta controlada frente a antígenos ambientales y se ha demostrado que previenen la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), así como la alergia.

30 Las Treg se han descrito ahora en un gran número de sistemas y han surgido como un mecanismo importante para el mantenimiento de la auto-tolerancia y la protección frente a las enfermedades autoinmunes. No solo Treg limita la autoinmunidad, sino que también atenúa la potencia de la inmunidad anti-tumoral y anti-viral. Por ejemplo, en el caso del cáncer, las células Treg pueden tener una influencia negativa, ya que podrían obstaculizar las respuestas inmunitarias antitumorales normalmente deseables y hay, de hecho, ya algunas pruebas que sugieren que los pacientes con cáncer muestran un mayor número de células Treg activas específicas para las proteínas tumorales tanto en su sangre como dentro de los propios tumores. De hecho, varios estudios recientes en humanos han mostrado porcentajes elevados de células Treg CD4+ CD25+ en una variedad de cánceres, incluyendo el cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de hígado, cáncer gástrico y linfoma. En el caso de infecciones virales, se han descrito un mayor número de células Treg en individuos que están infectados crónicamente con el virus de la hepatitis C y de la hepatitis B y en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana.

40 En consecuencia, serían útiles métodos y composiciones para la inhibición o eliminación de la actividad Treg en el tratamiento de enfermedades y trastornos caracterizados por un aumento de la actividad de Treg, por ejemplo, en el cáncer, las enfermedades infecciosas y las respuestas inmunes.

45 Un estudio reciente demuestra que CD39 podría representar una diana para el desarrollo de métodos terapéuticos útiles para tratar enfermedades asociadas a la actividad de Treg (Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enyaji K, Linden J, M Oukka, Kuchroo VK, Strom TB, Robson S C. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. J Exp Med. 2007 Jun. 11; 204 (6): 1257-1265. Epub 2007 14 de mayo). Los autores de hecho mostraron que CD39 es un marcador de superficie celular de las células Foxp3 Treg que pueden regular la supresión inmune de las células T por la producción corriente abajo de la adenosina.

50 Möller et al. (2007; Purinergic signalling 3: 359-366) describen tres anticuerpos que tienen especificidad para el CD39 de ratón. Los anticuerpos se usan como herramientas para evaluar los niveles de expresión de proteínas naturales por análisis de inmunofluorescencia y citometría de flujo. El documento US 2005 00373382 describe un método para tratar enfermedades autoinmunes que comprende la administración de un compuesto que incrementa la actividad biológica de una NTDas (que puede ser CD39). Un anticuerpo anti-CD39 se usa en transferencia Western.

Sumario de la invención

55 El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no esté contenida dentro de las reivindicaciones es proporcionada únicamente como información.

La presente aplicación se refiere a un anticuerpo CD39 para el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con un aumento de la actividad de células T reguladoras (Treg).

En particular, la aplicación se refiere a un anticuerpo CD39 para el tratamiento o la prevención de cánceres y enfermedades infecciosas.

- 5 La aplicación también se refiere a una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con un aumento de la actividad de células T reguladoras (Treg) que comprende un anticuerpo CD39.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

- 10 El término "CD39" se refiere a la proteína CD39 también denominada ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-1 (ENTPD1). CD39 es una ectoenzima que hidroliza a ATP/UTP y ADP/UDP a sus respectivos nucleósidos, tales como AMP.

La expresión "anticuerpo CD39" se refiere a un anticuerpo dirigido contra CD39 humano.

- 15 Según la presente invención, "anticuerpo" o "inmunoglobulina" tienen el mismo significado, y se utilizarán igualmente en la presente invención. El término "anticuerpo", tal como se utiliza en este documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une inmuno-específicamente a un antígeno. Como tal, el término anticuerpo abarca no sólo a moléculas de anticuerpos enteros, sino también a fragmentos de anticuerpo, así como a variantes (incluyendo derivados) de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. En los anticuerpos naturales, dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro y cada cadena pesada está unida a una cadena ligera por un enlace disulfuro. Hay dos tipos de cadena ligera, lambda (λ) y kappa (κ). Hay cinco clases principales de cadena pesada (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena contiene dominios de secuencia distintos. La cadena ligera incluye dos dominios, un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). La cadena pesada incluye cuatro dominios, un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3, denominados colectivamente como CH). Las regiones variables de ambas cadenas ligeras (VL) y pesadas (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad de la unión al antígeno. Los dominios de la región constante de las cadenas ligeras (CL) y pesadas (CH) confieren importantes propiedades biológicas tales como la asociación del anticuerpo de cadena, la secreción, la movilidad transplacentaria, la unión del complemento, y la unión a receptores Fc (FcR). El fragmento Fv es la parte N-terminal del fragmento Fab de una inmunoglobulina y consiste en las porciones variables de la cadena ligera y la cadena pesada. La especificidad del anticuerpo reside en la complementariedad estructural entre el sitio de combinación del anticuerpo y el determinante antigénico. Los sitios de combinación de los anticuerpos se componen de residuos que son principalmente de las regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDR). Ocasionalmente, los residuos de las regiones no hipervariables o marco (FR) influyen en la estructura del dominio general y, por lo tanto, el sitio de combinación. Las Regiones Determinantes de la Complementariedad o CDR se refieren a secuencias de aminoácidos que definen conjuntamente la afinidad de unión y la especificidad de la región Fv natural de un sitio de unión de inmunoglobulina natural. Las cadenas ligera y pesada de una inmunoglobulina tienen cada una tres CDR, denominadas L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectivamente. Un sitio de unión a antígeno, por lo tanto, incluye seis CDR, que comprende el conjunto de CDR de cada una de la región V de la cadena pesada y ligera. Las regiones marco (FR) se refieren a secuencias de aminoácidos interpuestas entre las CDR.

Según la presente descripción, la expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo CD39 de cualquier especie, preferiblemente de ratón, y un dominio CH y un dominio CL de un anticuerpo humano.

- 45 Según la presente descripción, la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que tiene la estructura de la región variable y regiones constantes de un anticuerpo humano, pero conserva las CDR de un anticuerpo CD39 de cualquier especie, preferiblemente de ratón.

- El término "Fab" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y la actividad de unión a antígeno, en el que aproximadamente la mitad de la parte N-terminal de la cadena H y toda la cadena L, entre los fragmentos obtenidos tratando IgG con una proteasa, papaína, están unidos a través de un enlace disulfuro.

El término "F(ab')₂" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 100.000 y actividad de unión a antígeno, que es ligeramente mayor que el Fab unido a través de un enlace disulfuro de la región bisagra, entre los fragmentos obtenidos tratando IgG con una proteasa o pepsina.

- 55 El término "Fab" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión al antígeno, que se obtiene cortando un enlace disulfuro de la región bisagra del F(ab')₂.

Un polipéptido Fv de cadena sencilla ("scFv") es un heterodímero VH::VL unido covalentemente que se expresa habitualmente a partir de una fusión de genes incluyendo genes que codifican VH y VL unidos por un enlazador que codifica el péptido. "dsFv" es un heterodímero VH::VL estabilizado por un enlace disulfuro. Fragmentos de anticuerpos divalentes y multivalentes pueden formarse ya sea espontáneamente por asociación de scFv monovalentes, o pueden ser generados mediante el acoplamiento de scFv monovalentes por un enlazador peptídico, tal como un sc(Fv)₂ divalente.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de la otra cadena creando dos sitios de unión a antígeno.

Por "purificado" y "aislado" se quiere decir, cuando se refiere a un polipéptido (es decir, un anticuerpo de acuerdo con la invención) o a una secuencia de nucleótidos, que la molécula indicada está presente en ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. El término "purificado", tal como se usa en el presente documento, significa que preferiblemente al menos 75% en peso, más preferiblemente al menos 85% en peso, más preferiblemente todavía al menos 95% en peso, y lo más preferiblemente al menos 98% en peso, de macromoléculas biológicas del mismo tipo están presentes. Una molécula de ácido nucleico "aislada" que codifica un polipéptido particular se refiere a una molécula de ácido nucleico que está sustancialmente libre de otras moléculas de ácido nucleico que no codifican el polipéptido; sin embargo, la molécula puede incluir algunas bases o restos adicionales que no afecten perjudicialmente las características básicas de la composición.

La expresión "enfermedad asociada con un aumento de la actividad de Treg" abarca todos los trastornos que están asociados, causados o que resultan de un aumento de la actividad de Treg.

En el contexto de la invención, el término "tratar" o "tratamiento", como se usa en este documento, significa invertir, aliviar, inhibir el progreso, o prevenir el trastorno o la afección a la que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de tal trastorno o afección. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se pretende para una cantidad mínima de agente activo (por ejemplo, anticuerpos CD39), que es necesaria para impartir el beneficio terapéutico a un sujeto. Por ejemplo, una "cantidad terapéuticamente eficaz" a un mamífero es una cantidad tal que induce, aminora o, de otro modo, provoca una mejora en los síntomas patológicos, la progresión de la enfermedad o las condiciones fisiológicas asociadas o la resistencia a sucumbir a un trastorno.

Tal como se utiliza en este documento, el término "prevención" se refiere a la prevención de la enfermedad o afección en un sujeto que aún no se ha diagnosticado que la tiene.

Tal como se utiliza en este documento, el término "sujeto" se refiere a un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferiblemente, un sujeto de acuerdo con la invención es un ser humano.

Tal como se utiliza en este documento, los términos "cáncer", "hiperproliferativo" y "neoplásico" se refieren a células que tienen la capacidad de un crecimiento autónomo, es decir, un estado o condición anormal caracterizada por un crecimiento celular de rápida proliferación. Los estados de enfermedades hiperproliferativas y neoplásicas pueden ser categorizados como patológicos, es decir, que caracterizan o constituyen un estado de enfermedad, o pueden clasificarse como no patológicos, es decir, una desviación de lo normal pero no asociada a un estado de enfermedad. El término se entiende que incluye todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células malignamente transformadas, tejidos, u órganos, independientemente del tipo histopatológico o la etapa de invasividad. Los términos "cáncer" o "neoplasias" incluyen tumores malignos de los diversos sistemas de órganos, tales como el que afecta al pulmón, mama, tiroides, linfoide, gastrointestinal y del tracto genito-urinario, así como adenocarcinomas que incluyen tumores malignos tales como la mayoría de los cánceres de colon, carcinoma de células renales, cáncer de próstata y/o tumores testiculares, carcinoma de células no pequeñas del pulmón, cáncer del intestino delgado y cáncer del esófago.

Usos terapéuticos de anticuerpos CD39

Los inventores han demostrado que los anticuerpos dirigidos contra CD39, incluyendo el anticuerpo CD39 llamado BY40, son capaces de inhibir la actividad de Treg. Por lo tanto, proponen usar anticuerpos CD39 para inhibir la actividad de Treg, para el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con un aumento de la actividad de Treg.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente descripción proporciona métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con un aumento de la actividad de Treg.

La presente descripción se refiere, por tanto, a un anticuerpo CD39 para el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con un aumento de la actividad de Treg.

La presente descripción también se refiere a un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada con un aumento de la actividad de Treg que comprende la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo un anticuerpo CD39.

5 Los ejemplos de enfermedades asociadas con un aumento de la actividad de Treg incluyen, pero no se limitan, a cáncer y enfermedades infecciosas. Los ejemplos de cánceres incluyen, pero no se limitan, a cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de hígado, cáncer gástrico y linfoma. Las enfermedades infecciosas incluyen, pero no se limitan, a la infección por virus, tales como el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C, con parásitos tales como Plasmodium falciparum (el agente causante de la malaria), o con bacterias tales como Mycobacterium tuberculosis.

10 También pueden usarse anticuerpos CD39 para inhibir o para agotar las células T reguladoras durante la expansión ex vivo de los linfocitos citotóxicos específicos de tumores antes de volver a la administración a pacientes que desarrollaron cáncer: inhibición de Treg como una estrategia para la generación ex vivo de células T específicas de antígeno para terapia celular adoptiva.

15 También pueden usarse anticuerpos CD39 como adyuvantes de composiciones de vacuna. Las composiciones de vacuna son de hecho adecuadas para el tratamiento del cáncer o de enfermedades infecciosas. Sin embargo, su eficacia terapéutica puede ser limitada debido a la inducción de Treg. Por lo tanto, la administración de anticuerpos CD39 en combinación con la administración de la composición de vacuna puede ser útil para mejorar la eficacia de dichas composiciones de vacunas.

20 La presente descripción contempla el uso de cualquier anticuerpo CD39 o fragmento del mismo, incluyendo anticuerpos quiméricos CD39 (preferentemente anticuerpos quiméricos de ratón/humanos) o anticuerpos CD39 humanizados, siempre que dicho anticuerpo inhiba la actividad de Treg.

En una realización particular, dicho anticuerpo CD39 puede ser obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-3889.

25 En otra realización, dicho anticuerpo CD39 puede comprender la cadena VL del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-3889 y la cadena VH del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-3889.

30 En otra realización, dicho anticuerpo CD39 puede comprender una cadena ligera variable (VL) que comprende las CDRs de la cadena VL del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-3889 y una cadena pesada variable (VH) que comprende las CDR de la cadena VH del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-3889.

35 En otra realización de la invención, dicho anticuerpo CD39 puede comprender una primera secuencia de CDR de cadena pesada como se expone en SEQ ID NO: 2, una segunda secuencia de CDR de cadena pesada como se establece en SEQ ID NO: 3, y una tercera secuencia de CDR de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 4; y una primera secuencia de CDR de cadena ligera como se expone en SEQ ID NO: 6, una segunda secuencia de CDR de cadena ligera como se establece en SEQ ID NO: 7, y una tercera secuencia de CDR de cadena ligera como se establece en SEQ ID NO: 8. En una realización particular, el dominio variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 1 y/o el dominio variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5.

40 En una realización particular, dicho anticuerpo CD39 es un anticuerpo quimérico, preferiblemente un anticuerpo quimérico de ratón/humano.

En particular, dicho anticuerpo quimérico de ratón/humano puede comprender los dominios variables de un anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-3889.

En otra realización, dicho anticuerpo CD39 es un anticuerpo humanizado.

45 En particular, en dicho anticuerpo humanizado, el dominio variable comprende las regiones marco aceptoras humanas, y el dominio constante opcionalmente humano cuando está presente, y las CDR donantes no humanas, tales como CDR de ratón de un anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-3889.

La invención contempla el uso de fragmentos de dichos anticuerpos CD39 que incluyen, pero no se limitan, a Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ y diacuerpos; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

50 Anticuerpos CD39 pueden producirse por cualquier técnica conocida en la técnica, tales como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, ya sea sola o en combinación.

Por ejemplo, los anticuerpos CD39 se pueden generar de acuerdo con métodos conocidos por la administración del antígeno o epítipo apropiado a un animal huésped seleccionado, por ejemplo, de cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros.

Diversos adyuvantes conocidos en la técnica se pueden utilizar para mejorar la producción de anticuerpos. Aunque los anticuerpos útiles en la práctica de la invención pueden ser policlonales, se prefieren los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales contra CD39 se pueden preparar y aislar usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo.

- 5 Las técnicas para la producción y el aislamiento incluyen, pero no se limitan, a la técnica del hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975); la técnica de hibridomas de células B humanas (Cote et al., 1983); y la técnica del hibridoma de EBV (Cole et al. 1985).

10 Conociendo la secuencia de aminoácidos del anticuerpo deseado, cualquier experto en la técnica puede producir fácilmente dichos anticuerpos, por técnicas estándar para la producción de polipéptidos. Por ejemplo, pueden sintetizarse utilizando el método en fase sólida bien conocido, preferiblemente usando un aparato de síntesis de péptidos disponible en el mercado (tal como el realizado por Applied Biosystems, Foster City, Calif.) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Alternativamente, los anticuerpos CD39 se pueden sintetizar mediante técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, se pueden obtener anticuerpos como productos de expresión de ADN después de la incorporación de secuencias de ADN que codifican los anticuerpos en vectores de expresión y la introducción de dichos vectores en huéspedes eucariotas o procariotas adecuados que expresarán los anticuerpos deseados, de los que pueden ser posteriormente aislados utilizando técnicas bien conocidas.

En particular, la invención se refiere además a un método de producción de un anticuerpo de la invención, método que comprende las etapas que consisten en: (i) cultivar una célula que expresa un anticuerpo CD39 en condiciones adecuadas para permitir la expresión de dicho anticuerpo; y (ii) recuperar el anticuerpo expresado.

- 20 En otra realización particular, el método comprende las etapas de:

(i) cultivar un hibridoma que expresa un anticuerpo CD39, (por ejemplo, el hibridoma depositado como CNCM-I-3889), en condiciones adecuadas para permitir la expresión del anticuerpo; y

(ii) recuperar el anticuerpo expresado.

25 Los anticuerpos CD39 se separan adecuadamente del medio de cultivo mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

30 En una realización particular, una invención de anticuerpo CD39 quimérico humano puede ser producida por la obtención de secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios VL y VH como se ha descrito anteriormente, mediante la construcción de un vector de expresión de anticuerpo quimérico humano insertándolo en un vector de expresión para células animales que tienen genes que codifican un anticuerpo humano CH y anticuerpo humano CL, y expresando la secuencia de codificación mediante la introducción del vector de expresión en una célula animal.

35 Como dominio CH de un anticuerpo quimérico humano puede ser cualquier región que pertenezca a la inmunoglobulina humana, pero los de la clase IgG son apropiados, y cualquiera de las subclases pertenecientes a la clase IgG, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, también pueden ser usadas. También, como CL de un anticuerpo quimérico humano, puede ser cualquier región que pertenezca a Ig, y las de la clase kappa o clase lambda se pueden utilizar.

Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas de ADN y de transfección de genes recombinantes convencionales bien conocidas en la técnica (véase Morrison S L. et al (1984) y los documentos de patente de EE.UU. 5.202.238 y 5.204.244.).

40 Un anticuerpo humanizado CD39 puede producirse obteniendo secuencias de ácido nucleico que codifican dominios de CDR, como se describió anteriormente, mediante la construcción de un vector de expresión de anticuerpo humanizado insertándolo en un vector de expresión para la célula animal que tiene genes que codifican (i) una región constante de cadena pesada idéntica a la de un anticuerpo humano y (ii) una región constante de cadena ligera idéntica a la de un anticuerpo humano, y expresando los genes mediante la introducción del vector de expresión en una célula animal.

45 El vector de expresión del anticuerpo humanizado puede ser de un tipo en el que exista un gen que codifica una cadena pesada de anticuerpo y un gen que codifica una cadena ligera de anticuerpo en vectores separados o de un tipo en el que existen dos genes en el mismo vector (tipo tándem). Con respecto a la facilidad de construcción de un vector de expresión de anticuerpo humanizado, se prefiere la facilidad de introducción en las células animales, y el equilibrio entre los niveles de expresión de las cadenas H y L del anticuerpo en las células animales, el vector de expresión del anticuerpo humanizado tipo tándem (Shitara K et al. 1994). Los ejemplos de vectores de expresión de anticuerpo humanizado tipo tándem incluyen pKANTEX93 (documento WO 97/10354), pEE18 y similares.

55 Los métodos para producir anticuerpos humanizados basados en técnicas de transfección de ADN y genes recombinantes convencionales son bien conocidas en la técnica (Véase, por ejemplo, Riechmann L. et al 1988; Neuberger M S. et al., 1985). Los anticuerpos pueden humanizarse usando una variedad de técnicas conocidas en

la técnica, incluyendo, por ejemplo, de injertos de CDR (documento EP 239.400; publicación PCT WO91/09967; patentes de EE.UU. Nos. 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), de recubrimiento o de revestimiento (documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan E A (1991); Studnicka G M et al (1994); Roguska M A. et al. (1994)), y mezcla aleatoria de cadenas (patente de EE.UU. Pat. No. 5.565.332). La tecnología de ADN recombinante general para la preparación de tales anticuerpos es también conocida (véase la Solicitud de Patente Europea EP 125023 y la Solicitud de Patente Internacional WO 96/02576).

Fab puede obtenerse tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con CD39 humano con una proteasa, papaína. Asimismo, el Fab puede producirse insertando ADN que codifica el Fab del anticuerpo en un vector para el sistema de expresión procariota, o para el sistema de expresión eucariota, e introduciendo el vector en un procariota o eucariota (según sea apropiado) para expresar el Fab.

F(ab')₂ se puede obtener tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con CD39 humano con una proteasa, pepsina. Además, el F(ab')₂ puede ser producido mediante la unión del Fab que se describe a continuación a través de un enlace tioéter o un enlace disulfuro.

Fab' se puede obtener mediante el tratamiento de F(ab')₂ que reacciona específicamente con CD39 humano con un agente reductor, ditiotreitól. Además, el Fab' puede producirse insertando el ADN que codifica el fragmento Fab' del anticuerpo en un vector de expresión para procariotas, o un vector de expresión para eucariotas, e introduciendo el vector en un procariota o eucariota (según sea apropiado) para llevar a cabo su expresión.

scFv puede producirse obteniendo el ADNc que codifica los dominios VH y VL como se ha descrito anteriormente, mediante la construcción del ADN que codifica scFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procariotas o un vector de expresión para eucariotas, y después mediante la introducción del vector de expresión en un procariota o eucariota (según el caso) para expresar el scFv. Para generar un fragmento de scFv humanizado, una tecnología bien conocida, llamada injerto de CDR, puede utilizarse, que implica la selección de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un fragmento scFv donante, y el injerto de ellos en un marco fragmento scFv humano de estructura tridimensional conocida (véanse, por ejemplo, los documentos WO98/45322; WO 87/02671; patente de Estados Unidos No. 5.859.205; patente de Estados Unidos No. 5.585.089; patente de Estados Unidos No. 4.816.567; documento EP0173494).

Se contempla la modificación o modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se sabe que cuando se produce un anticuerpo humanizado simplemente injertando sólo CDR en VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano en las FR de la VH y VL de un anticuerpo humano, la actividad de unión al antígeno se reduce en comparación con la del anticuerpo original derivado de un animal no humano. Se considera que varios residuos de aminoácidos de la VH y VL del anticuerpo no humano, no sólo en CDR, sino también en FR, están asociados directa o indirectamente con la actividad de unión al antígeno. Por lo tanto, la sustitución de estos residuos de aminoácidos con diferentes residuos de aminoácidos derivados de FR de la VH y VL del anticuerpo humano reduciría la actividad de unión. Con el fin de resolver el problema, en los anticuerpos injertados con CDR humana, los intentos tienen que hacerse para identificar, entre las secuencias de aminoácidos de las FR de la VH y VL de anticuerpos humanos, un residuo de aminoácido que se asocie directamente con la unión al anticuerpo, o que interactúe con un residuo de aminoácido de la CDR, o que mantenga la estructura tridimensional del anticuerpo y que esté asociado directamente con la unión al antígeno. La actividad de unión al antígeno reducida podría aumentarse mediante la sustitución de los aminoácidos identificados con los residuos de aminoácidos del anticuerpo original derivado de un animal no humano.

Las modificaciones y los cambios se pueden hacer en la estructura de los anticuerpos de la presente invención, y en las secuencias de ADN que los codifican, y seguir obteniendo una molécula funcional que codifica un anticuerpo con características deseables.

Al hacer los cambios en las secuencias de aminoácidos, el índice hidropático de los aminoácidos puede ser considerado. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos para conferir la función biológica interactiva en una proteína se entiende generalmente en la técnica. Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, lo que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático sobre la base de su hidrofobicidad y características de carga de estos: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

Un objeto adicional de la presente descripción también se refiere a variantes conservadoras de la función de los anticuerpos de la presente invención.

"Variantes conservadoras de la función" son aquellas en las que un residuo de aminoácido dado en una proteína o enzima se ha cambiado sin alterar la conformación global y la función del polipéptido, incluyendo, pero no limitado a, la sustitución de un aminoácido con uno que tenga similares propiedades (tales como, por ejemplo, polaridad,

potencial de enlace de hidrógeno, ácido, básico, hidrófobo, aromático y similares). Los aminoácidos distintos de los indicados como conservados pueden diferir en una proteína de modo que el tanto por ciento de similitud de la proteína o la secuencia de aminoácidos entre dos proteínas de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, de 70% a 99% como se determina de acuerdo con un esquema de alineamiento tal como mediante el Método Cluster, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una "variante conservadora de la función" también incluye un polipéptido que tiene una identidad de aminoácidos de al menos 60%, determinada por los algoritmos BLAST o FASTA, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 85%, aún más preferiblemente al menos 90%, e incluso lo más preferiblemente al menos 95%, y que tiene las mismas o sustancialmente similares propiedades o funciones que la proteína nativa o de matriz con la que se compara.

5 Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando más del 80%, preferiblemente más del 85%, preferiblemente más del 90% de los aminoácidos son idénticos, o más de aproximadamente 90%, preferiblemente más del 95%, son similares (funcionalmente idénticos) a lo largo de toda la longitud de la secuencia más corta. Preferiblemente, las secuencias similares u homólogas se identifican por el alineamiento usando, por ejemplo, el programa de amontonamientos GCG (Genetics Computer Group, Manual del Programa para el Paquete GCG, Versión 7, Madison, Wis.), o cualquiera de los algoritmos de comparación de secuencias, tales como BLAST, FASTA, etc.

10 Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de actividad. Puesto que la capacidad interactiva y la naturaleza de la proteína definen la actividad funcional biológica de la proteína, ciertas sustituciones de aminoácidos se pueden hacer en una secuencia de proteína, y, por supuesto, en su secuencia de codificación de ADN, mientras que, sin embargo, se obtiene una proteína con propiedades similares. Por tanto, se contempla que diversos cambios se pueden hacer en las secuencias de los anticuerpos de la invención, o las secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos anticuerpos, sin pérdida apreciable de su actividad biológica.

15 Se sabe en la técnica que ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos que tienen un índice o valor hidropático similar y aún dar lugar a una proteína con una actividad biológica similar, es decir, aún obtener una proteína funcionalmente equivalente biológica.

20 Como se ha indicado anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se basan, por lo tanto, generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño, y similares. Sustituciones ejemplares que toman en consideración diversas de las características anteriores son bien conocidas para los expertos en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

25 Otros tipos de modificaciones de aminoácidos del anticuerpo de la invención pueden ser útiles para alterar el patrón de glicosilación original del anticuerpo.

30 Por "alteración" se entiende la delección de uno o más restos de carbohidratos que se encuentran en el anticuerpo, y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no estén presentes en el anticuerpo.

35 La glicosilación de anticuerpos está típicamente unida a N. "Unida a N" se refiere a la unión del resto carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unidos a N).

40 Otro tipo de modificación covalente implica el acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al anticuerpo. Estos procedimientos son ventajosos porque no requieren de la producción del anticuerpo en una célula huésped que tenga capacidades de glicosilación de N- u O-unidos. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el azúcar(s) puede estar unido a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de la cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de la serina, treonina, o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos como los de la fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina. Por ejemplo, se describen tales métodos en el documento WO87/05330.

45 La eliminación de cualquier resto de carbohidrato presente en el anticuerpo podría conseguirse química o enzimáticamente. La desglicosilación química requiere la exposición del anticuerpo al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento resulta en el corte de la mayoría o todos los azúcares excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando el anticuerpo intacto. La desglicosilación química se describe en Sojahr H. et al. (1987) y en Edge, AS. et al. (1981). El corte enzimático de grupos carbohidrato en anticuerpos se puede conseguir mediante el uso de una variedad de endo- y exo-glicosidasas como se describe por Thotakura, N R. et al. (1987).

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende la unión del anticuerpo a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, o polioxialquilenos, de la manera expuesta en las patentes de EE.UU. Nos. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

- 5 También puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, a fin de aumentar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede conseguirse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativa o adicionalmente, pueden ser introducidos residuo(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo de ese modo la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o aumento de la muerte celular mediada por el complemento y/o citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) (Caron PC. et al 1992; y Shopes B. 1992)

Composiciones farmacéuticas

La presente descripción también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos CD39 para el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas con un aumento de la actividad de Treg.

- 15 Por lo tanto, los anticuerpos CD39 se pueden combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

- 20 "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra indeseable cuando se administra a un mamífero, especialmente un ser humano, según sea apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a un sólido no tóxico, semi-sólido o carga líquida, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo.

La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosis y el régimen dependen, naturalmente, de la condición a tratar, de la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el sexo del paciente, etcétera.

- 25 Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se pueden formular para una administración tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea o administración intraocular y similares.

- 30 Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estas pueden ser, en particular, soluciones salinas isotónicas, estériles (fosfato monosódico o de disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares, o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la reconstitución de soluciones inyectables.

Las dosis utilizadas para la administración pueden adaptarse en función de varios parámetros y, en particular, como una función del modo de administración utilizado, de la patología relevante o, alternativamente, de la duración deseada del tratamiento.

- 35 Para preparar composiciones farmacéuticas, una cantidad eficaz del anticuerpo puede disolverse o dispersarse en un vehículo farmacéuticamente aceptable o medio acuoso.

- 40 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

- 45 Las soluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclada de forma adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

- 50 Un anticuerpo CD39 se puede formular en una composición en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio, o hidróxidos férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

- El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede ser provocada por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser provocada por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.
- 5 Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.
- 10 También se contempla la preparación de soluciones más concentradas o altamente concentradas para la inyección directa, en las que se prevé el uso de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida entregando altas concentraciones de los agentes activos a una pequeña área de tumor.
- 15 Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad que sean terapéuticamente eficaces. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármacos y similares.
- 20 Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe estar adecuadamente tamponada si es necesario y el diluyente líquido ser primero isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas articulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos por los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermoclasia o ser inyectada en el sitio propuesto de infusión, (véase, por ejemplo, "Remington Pharmaceutical Sciences" 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Alguna variación en la dosificación ocurrirá necesariamente dependiendo de la condición del sujeto que esté siendo tratado. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis apropiada para el sujeto individual.
- 25 Se pueden formular anticuerpos CD39 dentro de una mezcla terapéutica para comprender de aproximadamente 0,0001 a 1,0 miligramos, o de aproximadamente 0,001 a 0,1 miligramos, o de aproximadamente 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis más o menos. Pueden administrarse también dosis múltiples.
- 30 Además de los compuestos formulados para la administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; cápsulas de liberación prolongada; y cualquier otra forma utilizada actualmente.
- 35 En ciertas realizaciones, el uso de liposomas y/o nanopartículas se contempla para la introducción de anticuerpos en las células huésped. La formación y el uso de liposomas y/o nanopartículas son conocidos por los expertos en la técnica.
- 40 Las nanocápsulas pueden atrapar generalmente compuestos de una manera estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debido a la sobrecarga polimérica intracelular, tales partículas ultrafinas (de tamaño alrededor de 0,1 micras) generalmente se diseñan utilizando polímeros capaces de ser degradados in vivo. Se contemplan nanopartículas biodegradables de polialquil-cianoacrilato que cumplen estos requisitos para su uso en la presente invención, y tales partículas pueden prepararse fácilmente.
- 45 Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas de bicapas concéntricas multilamelares (también denominadas vesículas multilamelares (MLV)). Las MLV suelen tener diámetros de 25 nm a 4 micras. La sonicación de las MLV da como resultado la formación de pequeñas vesículas unilaminares (SUV) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å, que contienen una solución acuosa en el núcleo. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y de la presencia de cationes divalentes.
- 50 La presente descripción también proporciona kits que comprenden al menos un anticuerpo CD39, particularmente un anticuerpo de la invención. Los kits que contienen los anticuerpos CD39 encuentran su uso en ensayos terapéuticos.
- 55 Anticuerpos y polipéptidos de la invención

5 La presente descripción proporciona anticuerpos o fragmentos aislados de los mismos que se dirigen contra CD39 humano. En particular, los inventores han depositado un anticuerpo CD39 murino (BY40) que produce un hibridoma en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia), de acuerdo con los términos de Tratado de Budapest, en el 4 de Enero del 2008. El hibridoma depositado tiene el número de depósito CNCM I-3889.

Un aspecto adicional de la invención por lo tanto se refiere a un anticuerpo CD39 murino (BY40) obtenible a partir del hibridoma disponible bajo el número de depósito CNCM I-3889.

10 En otra realización, el anticuerpo de la invención comprende una cadena ligera variable (VL) que comprende las CDR de la cadena VL del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-3889 y una cadena pesada variable (VH) que comprende las CDR de la cadena VH del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-3889.

En otra realización, el anticuerpo de la invención comprende la cadena VL del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-3889 y la cadena VH del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-3889.

15 Los inventores han clonado y caracterizado el dominio variable de las cadenas ligeras y pesadas de dicho anticuerpo BY40, y por lo tanto han determinado el dominio de las regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de dicho anticuerpo tal como se describe en la Tabla 1:

Tabla 1. Dominios VH, VL y CDR de anticuerpo BY40:

Dominios MAb BY40	
VH	TRVKK PRETV KISCK ASGYT FTHYG MNWVK QAPGK GLKWM GWINT YTGEP TYADD FKGRF AFSLE ASVST AYLQI>NNLKN EDTAT YFCAR RRYEG NYVIFY YFDYW GQGTT LTVSS AKTTP PSVYP LAPGS AAQTN SMVTL GCLVK GYFPE QVTVT WNSGS LSSGV HTFPA VLQSD LYTLS SSVTV PS (SEQ ID NO:1)
VH CDR1	GYTFT HYG (SEQ ID NO: 2)
VH CDR2	INTYT GEP (SEQ ID NO: 3)
VH CDR3	ARRRY EGNVY FYYFD YWGQG TTLTV SS (SEQ ID NO: 4)
VL	DIQMT QSPAS LSASV GETVT ITCRA SENIY SYFSW YQQKQ GKSPQ LLVYT AKTLA EGVPS RFSGS GSGTQ FSLKI NSLQP EDFGS YYCQH HYVTP YTFGG GTKLE IKRAD AAPT V SIFPP SSEQL TSGGA SVVCF LNNFY PKDIN VKWKI DGSER QNGVL NSWTD (SEQ ID NO:5)
VL CDR1	RASEN IYSYF S (SEQ ID NO: 6)
VL CDR2	TAKTL AE (SEQ ID NO: 7)
VL CDR3	QHYYV TPYTF GGGTK LEIKR (SEQ ID NO: 8)

20 Una realización de la invención se refiere a un anticuerpo CD39 que comprende una primera secuencia de CDR de cadena pesada como se establece en SEQ ID NO: 2, una segunda secuencia de CDR de cadena pesada como se establece en SEQ ID NO: 3, y una tercera secuencia de CDR de cadena pesada como se expone en SEQ ID NO: 4; y una primera secuencia de CDR de cadena ligera como se expone en SEQ ID NO: 6, una segunda secuencia de CDR de cadena ligera como se establece en SEQ ID NO: 7, y una tercera secuencia de CDR de cadena ligera como

se establece en SEQ ID NO: 8. En una realización particular, el dominio variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID NO: 1 y/o el dominio variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5.

5 Los anticuerpos de la invención se pueden producir por cualquier técnica bien conocida en la técnica. En particular, dichos anticuerpos se producen mediante técnicas como las que se describen más adelante en este documento.

En otra realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo quimérico, preferiblemente un anticuerpo quimérico de ratón/humano. En particular, dicho anticuerpo quimérico de ratón/humano puede comprender los dominios variables de un anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-3889.

Una realización de la invención se refiere al hibridoma accesible bajo el número de depósito CNCM I-3889.

10 En otra realización, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo humanizado. En particular, en dicho anticuerpo humanizado, el dominio variable comprende regiones marcos humanas aceptoras, y opcionalmente el dominio constante humano, cuando está presente, y las CDR donantes no humanas, tales como las CDR de ratón como se define anteriormente.

15 La invención proporciona además fragmentos de dichos anticuerpos, que incluyen pero no se limitan a Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂ y diacuerpos; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.

20 Un objeto adicional de la presente descripción se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo de la invención o un fragmento del mismo.

En un aspecto particular, la presente descripción se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio VH del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-3889 (BY40) o el dominio VL del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-3889 (BY40).

25 En un aspecto particular, la presente descripción se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio VH del anticuerpo BY40 o el dominio VL del anticuerpo BY40.

Tabla 2: Ácidos nucleicos de los dominios VH y VL del anticuerpo BY40:

Dominio VH:	<p>acg cga gtg aag aag cct cga gag aca gtc aag atc tcc tgc aag gct tct ggg tat acc ttc aca cac tat gga atg aac tgg gtg aag cag gct cca gga aag ggt tta aag tgg atg ggc tgg ata aac acc tac act gga gag cca aca tat gct gat gac ttc aag gga cgg ttt gcc ttc tct ttg gaa gcc tct gtc agc act gcc tat ttg cag atc aac aac ctc aaa aat gag gac acg gct aca tat ttc tgt gca aga agg aga tat gag ggt aac tac gtt ttt tac tac ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca (SEQ ID NO: 9)</p>
Dominio VL:	<p>gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gca tct gtg gga gaa act gtc acc atc aca tgt cga gca agt gaa aat att tac agt tat ttt tca tgg tat cag cag aaa cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc tat act gca aaa acc tta gca gaa ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca cag ttt tct ctg aag atc aac agc ctg cag cct gaa gat ttt ggg agt tat tac tgt caa cat cat tat gtt act ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa cgg (SEQ ID NO: 10)</p>

30 Típicamente, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, que puede incluirse en cualquier vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o un vector viral.

Los términos "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo mediante el cual una secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen ajeno) puede introducirse en una célula huésped, a fin de

transformar el anfitrión y promover la expresión (por ejemplo, la transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

Por lo tanto, un objeto adicional de la invención se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico de la invención.

- 5 Tales vectores pueden comprender elementos reguladores, tales como un promotor, potenciador, terminador y similares, para causar o dirigir la expresión de dicho anticuerpo tras la administración a un sujeto. Los ejemplos de promotores y potenciadores usados en el vector de expresión para células animales incluyen el promotor temprano y el potenciador de SV40 (Mizukami T. et al. 1987), el promotor LTR y el potenciador del virus de la leucemia Moloney de ratón (Kuwana Y et al. 1987), el promotor (Mason JO et al. 1985) y el potenciador (Gillies SD et al. 1983) de la
10 cadena H de inmunoglobulina y similares.

Se puede utilizar cualquier vector de expresión para células animales, siempre que puede ser insertado y expresado un gen que codifique la región C del anticuerpo humano. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107 (Miyaji H et al. 1990), pAGE103 (Mizukami T et al. 1987), pHSG274 (Brady G et al. 1984), pKCR (O'Hare K et al. 1981), pSG1 beta d2 4- (Miyaji H et al. 1990) y similares.

- 15 Otros ejemplos de plásmidos incluyen los plásmidos de replicación que comprenden un origen de replicación, o plásmidos de integración, tales como, por ejemplo, pUC, pcDNA, pBR, y similares.

Otros ejemplos de vectores virales incluyen los vectores adenovirales, retrovirales, el virus del herpes y AAV. Tales virus recombinantes pueden producirse mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como mediante la transfección de células de empaquetamiento o mediante la transfección transitoria con plásmidos auxiliares o virus.

- 20 Ejemplos típicos de células de empaquetamiento de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv +, células 293, etc. Los protocolos detallados para producir tales virus recombinantes defectuosos en la replicación se pueden encontrar por ejemplo en los documentos WO 95/14785, WO 96/22378, la patente de EE.UU. No. 5.882.877, patente de EE.UU. No. 6.013.516, patente de EE.UU. No. 4.861.719, patente de EE.UU. No 5.278.056 y el documento WO 94/19478.

- 25 Un objeto adicional de la presente invención se refiere a una célula que ha sido transfectada, infectada o transformada por un ácido nucleico y/o un vector de acuerdo con la invención.

El término "transformación" significa la introducción de un gen "exterior" (es decir, exógeno o extracelular) secuencia de ADN o ARN a una célula huésped, de modo que la célula huésped expresará el gen o la secuencia introducida para producir una sustancia deseada, típicamente una proteína o enzima codificada por el gen o la
30 secuencia introducida. Una célula huésped que recibe y expresa el ADN o ARN introducido se ha "transformado".

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden usar para producir un anticuerpo de la invención en un sistema de expresión adecuado. La expresión "sistema de expresión" se refiere a una célula huésped y a un vector compatible en condiciones adecuadas, por ejemplo, para la expresión de una proteína codificada por el ADN ajeno transportado por el vector e introducido en la célula huésped.

- 35 Los sistemas de expresión comunes incluyen células huésped de E. coli y vectores de plásmidos, células huésped de insectos y vectores de baculovirus, y células huésped de mamíferos y vectores. Otros ejemplos de células huésped incluyen, sin limitación, células procariontes (tales como bacterias) y células eucariotas (tales como células de levadura, células de mamífero, células de insecto, células de plantas, etc.). Los ejemplos específicos incluyen E. coli, Kluyveromyces o levaduras Saccharomyces, líneas celulares de mamífero (por ejemplo, células Vero, células
40 CHO, células 3T3, células COS, etc.) así como cultivos de células de mamíferos primarios o establecidos (por ejemplo, producidos a partir de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). Ejemplos también incluyen células SP2/0-Ag14 de ratón (ATCC CRL1581), células de ratón P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL1580), células CHO en las que un gen de dihidrofolato reductasa (en lo sucesivo denominado en este documento "gen DHFR") es defectuoso (Urlaub G et al; 1980), células YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 de rata
45 (ATCC CRL1662, denominadas en lo sucesivo en este documento "células YB2/0"), y similares.

- La presente descripción también se refiere a un método para producir una célula huésped recombinante que expresa un anticuerpo de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho método las etapas de: (i) introducir in vitro o ex vivo un ácido nucleico recombinante o un vector como se describe anteriormente en una célula huésped competente, (ii) cultivar in vitro o ex vivo la célula huésped recombinante obtenida y (iii), opcionalmente, seleccionar
50 las células que expresan y/o secretan dicho anticuerpo. Tales células huésped recombinantes se pueden utilizar para la producción de los anticuerpos de la invención.

Los anticuerpos de la invención pueden ser producidos y/o modificados por cualquier técnica conocida en la técnica, como se ha descrito anteriormente.

Figuras

Fig. 1: Expresión de CD39 en células T CD4⁺CD25^{bajo} y CD4⁺CD25^{alto} a partir de controles de HIV⁻ y pacientes HIV⁺. Linfocitos de sangre periférica de controles de HIV⁻ (□) y pacientes HIV⁺ (●) fueron teñidos con anticuerpos de BY40 anti-CD39, anti-CD4 y anti-CD25 y los porcentajes de células CD39⁺ dentro de poblaciones CD4⁺CD25^{bajo} y CD4⁺CD25^{alto} (A), así como la intensidad media de fluorescencia (MFI) para la expresión de CD39 en ambas subpoblaciones (B) se determinaron por citometría de flujo. Superposiciones representativas que comparan los niveles de expresión de CD39 en células T CD4⁺CD25^{bajo} (izquierda) y CD4⁺CD25^{alto} (derecha) de HIV⁻ (histogramas vacíos) y donantes de HIV⁺ (histogramas rellenos) están representadas en C. Se indican en A y B, los valores de p evaluados por las pruebas no paramétricas de Wilcoxon y Man-Witney.

Fig. 2: Efecto del anticuerpo de CD39, BY40, sobre la actividad inmunosupresora de células T reguladoras CD4⁺CD25^{alto}. A. Células T CD8 marcadas con CFSE de pacientes con HIV⁺ se incubaron en presencia de anticuerpo CD3 inmovilizado (5 µg/ml) y anticuerpo CD39 (histograma superior) o en presencia de células T reguladoras CD4⁺CD25^{alto} autólogas (relación 4:1 CD8:Treg) (histograma medio) o en presencia de células Treg CD4⁺CD25^{alto} autólogas pre-incubadas con anticuerpo CD39 (histograma inferior). Después de 72 h, los porcentajes de células divididas (CFSE bajo) se determinaron por citometría de flujo. B. Los porcentajes de inhibición de la proliferación de células T CD8 en presencia de células CD4⁺CD25^{alto} autólogas (panel superior) se calculan como (% de células T CD8⁺ CFSE^{bajo} en presencia de células CD4⁺CD25^{alto} autólogas) x 100/(% de células T CD8⁺ CFSE^{bajo} en ausencia de células CD4⁺CD25^{alto}). Los porcentajes de restauración de la proliferación de células T CD8 en presencia de anticuerpos anti-CD39 (panel inferior) se calculan como 100 - (% de células T CD8⁺ CFSE^{bajo} en presencia de células CD4⁺CD25^{alto} autólogas pre-tratadas con CD39) x 100/(% de CFSE^{bajo} en presencia de células CD4⁺CD25^{alto} autólogas). Se indican los valores de p evaluados por pruebas no paramétricas de Wilcoxon y Man-Witney.

Fig. 3: Efecto del anticuerpo de CD39, BA54g, sobre la actividad inmunosupresora de células T reguladoras CD4⁺CD25^{alto}. A. Células T CD8 marcadas con CFSE de pacientes con HIV⁺ fueron incubadas en presencia del anticuerpo inmovilizado CD3 (5 µg/ml) y anticuerpo BA54g (histograma superior) o en presencia de Tregs CD4⁺CD25^{alto} autólogas (relación 4 : 1 de CD8:Tregs) (histograma medio) o en presencia de Treg CD4⁺CD25^{alto} autólogas pre-incubadas con anticuerpo BA54g (histograma inferior). Después de 72 h, los porcentajes de células divididas (CFSE bajo) se determinaron por citometría de flujo.

Fig. 4: Modulación de la expresión de CD39 por varios anticuerpos anti-CD39. Células YT2C2 NK (1 × 10⁶ células/ml) se cultivaron en una placa de 96 pocillos en presencia de BY12, BY40, BA54g, A1 (Biolegend), BU61 (Santa Cruz Biotech) o AC2 (Immunotech) (10 µg/ml) durante 2 h a 37°C. Las células fueron lavadas y se incubaron durante 20 min a 4°C con el mismo anticuerpo (10 µg/ml) que se había usado para el cultivo. La fijación de anticuerpos se reveló con el anticuerpo de cabra acoplado a APC anti-ratón y se midió por citometría de flujo. El porcentaje de inhibición de la fijación del anticuerpo se calculó según la siguiente fórmula: 100 - (MFI de las células tratadas con anticuerpo/MFI de las células tratadas con el isotipo control) * 100.

Ejemplo:

Expresión de CD39 en células T CD4⁺CD25^{bajo} y CD4⁺CD25^{alto} a partir de controles de HIV⁻ y pacientes con HIV⁺: Se ha publicado recientemente que las células T reguladoras CD4⁺CD25^{alto} de ratón y humanas expresan CD39 constitutivamente, una ectonucleotidasa que convierte el ATP extracelular generado en sitios de activación inmune, lo que lleva a la generación de adenosina, un inhibidor de la proliferación celular. En esta invención se utilizó el anticuerpo anti-CD39 BY40 para examinar la expresión de CD39 en poblaciones de linfocitos de sangre periférica (PBL) CD4⁺CD25^{alto} y CD4⁺CD25^{bajo} y a partir de ambos controles de HIV⁻ y pacientes con HIV⁺. Los resultados de la figura 1 indican que el porcentaje de células CD39⁺ en la subpoblación CD4⁺CD25^{alto} es significativamente mayor (p <0,01) que el porcentaje de células CD39⁺ en la subpoblación CD4⁺CD25^{bajo} en PBL de tanto personas con HIV⁻ como con HIV⁺ (fig. 1A). Las medias son un 16% frente al 46% (HIV⁻) y el 17% frente al 42% (HIV⁺). No se observaron diferencias estadísticas entre el porcentaje de células CD39⁺ cuando se comparó cada uno del mismo CD4⁺, la población entre los grupos de HIV⁻ y HIV⁺.

A continuación, se analizó el nivel de expresión de CD39 en células CD4⁺, tanto de individuo con HIV⁻ como con HIV⁺ (Figs. 1B y 1C). Los inventores observaron que la expresión de CD39 en las células CD4⁺CD25^{bajo} y CD4⁺CD25^{alto} de pacientes con HIV⁺ es significativamente mayor en comparación con el nivel de expresión de CD39 en las células de los controles HIV⁻ (medias 84 frente a 45 y 136 frente a 93, respectivamente).

Estos resultados indican un mayor porcentaje positivo de CD4⁺CD25^{alto} teñidas para CD39 en comparación con la población CD4⁺CD25^{bajo} y que las células T reguladoras CD4⁺CD25^{alto} y CD4⁺CD25^{bajo} de pacientes con HIV⁺ expresaban un mayor nivel de CD39.

El bloqueo de CD39 en células T reguladoras CD4⁺CD25^{alto} revierte su efecto inmunosupresor hacia las células T efectoras CD8 autólogas: Habiendo demostrado que las células T reguladoras CD4⁺CD25^{alto} de pacientes con HIV⁺ expresaban un alto nivel de CD39, se examinó el posible papel de CD39 en la inhibición mediada por células T reguladoras HIV⁺ de la proliferación de células T CD8.

Como era de esperar se observó en experimentos de co-cultivos que células T reguladoras CD4⁺CD25^{alto} autólogas sin tratar inhiben eficazmente la proliferación de células T CD8⁺, un efecto que no se observaba cuando las células T reguladoras CD4⁺CD25^{alto} previamente se incubaban en presencia del anticuerpo CD39 BY40 (Fig. 2A, histograma inferior). El anticuerpo CD39 no tiene efecto directo sobre la proliferación de células T CD8⁺ (Fig. 2A, histograma superior). La capacidad del anticuerpo BY40 para revertir el efecto inmunosupresor de células T reguladoras CD4⁺CD25^{alto} no se limita a células T reguladoras CD4⁺CD25^{alto} de pacientes con HIV⁺. Un efecto similar se ha observado en experimentos de co-cultivo realizados con células T de individuos HIV⁻. Sin embargo, el anticuerpo BY40 era más eficiente para inhibir la actividad inmunosupresora de células T reguladoras CD4⁺CD25^{alto} y restablecer la proliferación de las células CD8 T autólogas de pacientes HIV⁺ (FIG. 2B).

Estos resultados indican que la activación de la molécula de CD39 en células T reguladoras CD4⁺CD25^{alto} con anticuerpo BY40 puede revertir su actividad inmunosupresora y restaurar la proliferación de las células T CD8 autólogas inducida por el anticuerpo CD3.

El efecto observado con el anticuerpo BY40 se ha extendido a otro anti-CD39, el anticuerpo BA54g (Fig. 3).

Desregulación de la molécula CD39 inducida por los anticuerpos de CD39. Como un posible mecanismo de acción para los anticuerpos BY40 y BA54g, se midió su capacidad para des-modular la expresión de CD39 en la superficie celular. Como se muestra en la figura 4, se demostró que la incubación de las células YT2C2 durante 2 h en presencia del anticuerpo BA54g o BY40 daba lugar a una potente inhibición de la expresión de CD39 (> 70% de inhibición). No se han observado importantes modulaciones de la expresión de CD39 con el anticuerpo BU61, mientras que los anticuerpos BY12, A1 y AC2 indujeron una des-modulación intermedia de la expresión en la superficie celular CD39.

El pre-tratamiento de células T reguladoras CD4⁺CD25^{alto} con el anticuerpo BY40 revierte parcialmente su efecto inmunosupresor hacia la generación de células T CD4 efectoras citotóxicas específicas de tumor. A continuación se midió la capacidad del anticuerpo BY40 se mantener la generación de células T específicas de tumor con funciones efectoras. Como se demuestra en la Tabla 3, el co-cultivo de PBL con células T reguladoras CD4⁺CD25^{alto} y la línea celular de melanoma HM11 llevaron a la generación de bajo nivel de células T CD4 efectoras citotóxicas según lo revelado por la adquisición de la expresión de CD107, un marcador específico de la desgranulación. Los experimentos preliminares mostraron que el tratamiento previo de las células Tregs CD4⁺CD25^{alto} con el anticuerpo BY40 ligeramente aumentaba el porcentaje de células T efectoras CD4⁺CD107⁺ (Tabla 3), lo que sugiere que el anticuerpo BY40 revierte parcialmente la actividad inmunosupresora de las Treg y permite la generación de células T citotóxicas.

Tabla 3: Efecto del anticuerpo CD39, BY40, en la generación de células CD4 T citotóxicas específicas de tumor.

	% de expresión de CD107a	aumento de la actividad de CTL en %
CD4 ⁺ CD25 ^{alto} + IgG1	4,21%	
CD4 ⁺ CD25 ^{alto} + BY40	6,56%	56%

2 × 10⁵ células mononucleares de sangre periférica y 1 × 10⁵ células tumorales irradiadas con HM11 (60 Gray) suplementadas con 5 × 10⁴ células CD4⁺CD25^{alto} (Treg) purificadas, que se habían incubado previamente durante 1 h, ya sea con control de IgG1 o anticuerpo BY40 (10 µg/ml) se co-cultivaron durante 6 días. Cada 48 h, 0,5 µg de control de IgG1 o anticuerpo BY40 fueron añadidos al cultivo. A continuación, los linfocitos se recogieron y se incubaron en una placa de 96 pocillos con células HM11 (relación 1/1) en presencia de cualquiera de IgG1 control o anticuerpo BY40 (10 µg/ml). El porcentaje de células CD4 T citotóxicas efectoras específicas de tumor se determinó mediante el marcaje con un anticuerpo anti-CD107a-PC5 en presencia de monensina (2 µM de concentración final). Después de 4 h a 37°C y 5% de CO₂, las células se lavaron y se tiñeron con anticuerpo anti-CD4-FITC. La doble expresión de CD4 y CD107a se midió por citometría de flujo. El porcentaje de restauración de la expresión de CD107a se midió de acuerdo con la siguiente fórmula: (% de células CD4⁺ CD107a⁺ después del tratamiento con BY40) - (% de células CD4⁺CD107a⁺ después del tratamiento con IgG1 control)/% de células CD4⁺CD107a⁺ después del tratamiento con IgG1 control) * 100.

El anticuerpo BA54g inhibe la actividad de ATPasa de PBMC humanas. El CD39 se ha descrito anteriormente como un componente integral de la maquinaria de supresión de células T reguladoras, actuando, al menos en parte, a través de la modulación de los niveles pericelulares de la adenosina. Se analizó en esta invención el efecto del anticuerpo BA54g CD39 sobre la actividad de la ATPasa espontánea de PBMC humanas. Se observó que la actividad de la ATPasa espontánea de PBMC humano tras 24 h de cultivo en presencia de BA54g se reducía en 29% en comparación con PBMC cultivadas en presencia de IgG1 control (Tabla 4). El efecto de otros anticuerpos CD39 y, en particular, BY40 está actualmente bajo investigación.

Tabla 4: Efecto del anticuerpo CD39, BA54g, sobre la actividad de ATPasa humana de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

	OD 620 nm	% de inhibición
IgG1 control	0,215	
BA54g	0,151	29%

5 Se cultivaron 4×10^5 PBMC en medio RPMI completo en presencia del anticuerpo BA54g o control de IgG1 (10 µg/ml). Después de 24 h, las células se lavaron tres veces en tampón libre de fosfato (glucosa 10 mM, Hepes 20 mM, KCl 5 mM, NaCl 120 mM, CaCl_2 2 mM) y se resuspendieron en 400 µl de tampón de incubación suplementado con ATP 2 mM. Después de 10 min a 37°C las células fueron centrifugadas, la concentración de fosfato en los sobrenadantes se midió mediante un espectrofotómetro (620 nm) después de la adición de solución de verde de malaquita/alcohol de polivinilo/molibato de amonio durante 20 min.

Referencias

- Bluestone, J. A. & Abbas, A. K. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nature Rev. Immunol.* 3, 253-257 (2003).
- 10 Brady G, Jantzen H M, Bernard H U, Brown R, Schutz G, Hashimoto-Gotoh T. New cosmid vectors developed for eukaryotic DNA cloning. *Gene.* 1984 Feb; 27(2):223-32.
- Caron P C, Laird W, Co M S, Avdalovic N M, Queen C, Scheinberg D A. Engineered humanized dimeric forms of IgG are more effective antibodies. *J Exp Med.* 1992 Oct. 1; 176(4):1191-5.
- 15 Chardes T, Villard S, Ferrieres G, Piechaczyk M, Cerutti M, Devauchelle G. Pau B. Efficient amplification and direct sequencing of mouse variable regions from any immunoglobulin gene family. *FEBS Lett.* 1999 Jun. 11; 452(3):386-94.
- Cole et al. "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, Inc., 1985, pp. 77-96.
- Connolly D C, Bao R, Nikitin A Y, Stephens K C, Poole T W, Hua X, Harris S S, Vanderhyden B C, Hamilton T C. Female mice chimeric for expression of the simian virus 40 TAg under control of the MISIR promoter develop epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* 2003 Mar. 15; 63(6):1389-97.
- 20 Cote R J, Morrissey D M, Houghton A N, Beattie E J Jr, Oettgen H F, Old U. "Generation of human monoclonal antibodies reactive with cellular antigens". *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983 April; 80(7):2026-30.
- Deaglio S, Dwyer K M, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen J F, Enyaji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo V K, Strom T B, Robson S C. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 2007 Jun. 11; 204(6):1257-65. Epub 2007 May 14.
- 25 Edge A S, Faltynek C R, Hof L, Reichert L E Jr, Weber P. Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid. *Anal Biochem.* 1981 Nov. 15; 118(1):131-7.
- Gazzano-Santoro H, Ralph P, Ryskamp T C, Chen A B, Mukku V R. A non-radioactive complement-dependent cytotoxicity assay for anti-CD20 monoclonal antibody. *J Immunol Methods.* 1997 Mar. 28; 202(2):163-71.
- 30 Gillies S D, Morrison S L, Oi V T, Tonegawa S. A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell.* 1983 Jul. 33(3):717-28.
- Köhler G., M. C. (1975) *Nature* 256, 495-497.
- Kuwana Y, Asakura Y, Utsunomiya N, Nakanishi M, Arata Y, Itoh S, Nagase F, Kurosawa Y. Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987 Dec. 31; 149(3):960-8.
- 35 Mason J O, Williams G T, Neuberger M S. Transcription cell type specificity is conferred by an immunoglobulin VII gene promoter that includes a functional consensus sequence. *Cell.* 1985 Jun; 41(2):479-87.
- Miyaji H, Mizukami T, Hosoi S, Sato S, Fujiyoshi N, Itoh S. Expression of human beta-interferon in Namalwa KJM-1 which was adapted to serum-free medium. *Cytotechnology.* 1990 Mar; 3(2):133-40.
- 40 Mizukami T, Itoh S. A new SV40-based vector developed for cDNA expression in animal cells. *J Biochem (Tokyo).* 1987 May; 101(5):1307-10.
- Morrison S L, Johnson M J, Herzenberg L A, Oi V T. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984 Nov; 81(21):6851-5.

- Neuberger M S, Williams G T, Fox R O. Recombinant antibodies possessing novel effector functions. *Nature*. 1984 Dec. 13-19; 312(5995):604-8.
- 5 O'Hare K, Benoist C, Breathnach R. Transformation of mouse fibroblasts to methotrexate resistance by a recombinant plasmid expressing a prokaryotic dihydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981 Mar; 78(3):1527-31.
- Padlan E A. A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. *Mol Immunol*. 1991 Apr-May; 28(4-5):489-98.
- Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G Reshaping human antibodies for therapy. *Nature*. 1988 Mar. 24; 332(6162):323-7.
- 10 Roguska M A, Pedersen J T, Keddy C A, Henry A H, Searle S J, Lambert J M, Goldmacher V S, Blattler W A, Rees A R, Guild B C. Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994 Feb. 1; 91(3):969-73.
- Shitara K, Nakamura K, Tokutake-Tanaka Y, Fukushima M, Hanai N. A new vector for the high level expression of chimeric antibodies in myeloma cells. *J Immunol Methods*. 1994 Jan. 3; 167(1-2):271-8.
- 15 Shopes B. A genetically engineered human IgG mutant with enhanced cytolytic activity. *J Immunol*. 1992 May 1; 148(9):2918-22.
- Strohal R, Kroemer G, Wick G, Kofler R. Complete variable region sequence of a nonfunctionally rearranged kappa light chain transcribed in the nonsecretor P3-X63-Ag8.653 myeloma cell line. *Nucleic Acids Res*. 1987 Mar. 25; 15(6):2771.
- 20 Studnicka G M, Soares S, Better M, Williams R E, Nadell R, Horwitz A H. Human-engineered monoclonal antibodies retain full specific binding activity by preserving non-CDR complementarity-modulating residues. *Protein Eng*. 1994 June; 7(6):805-14.
- Thotakura N R, Bahl O P. Enzymatic deglycosylation of glycoproteins. *Methods Enzymol*. 1987; 138:350-9.
- 25 Urlaub G, Chasin L A. Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980 July; 77(7):4216-20.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Inserm
- 5 <120> Anticuerpos contra CD39 humano y uso de los mismos para inhibir la actividad de las células T reguladoras
- <130> BI007566 Bensussan / MC
- <160> 10
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 187
- 15 <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Arg | Val | Lys | Lys | Pro | Arg | Glu | Thr | Val | Lys | Ile | Ser | Cys | Lys | Ala |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | His | Tyr | Gly | Met | Asn | Trp | Val | Lys | Gln | Ala |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Lys | Trp | Met | Gly | Trp | Ile | Asn | Thr | Tyr | Thr | Gly |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Glu | Pro | Thr | Tyr | Ala | Asp | Asp | Phe | Lys | Gly | Arg | Phe | Ala | Phe | Ser | Leu |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Glu | Ala | Ser | Val | Ser | Thr | Ala | Tyr | Leu | Gln | Ile | Asn | Asn | Leu | Lys | Asn |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Glu | Asp | Thr | Ala | Thr | Tyr | Phe | Cys | Ala | Arg | Arg | Arg | Tyr | Glu | Gly | Asn |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tyr | Val | Phe | Tyr | Tyr | Phe | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Leu | Thr |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | | 110 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Val | Ser | Ser | Ala | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Ser | Val | Tyr | Pro | Leu | Ala | Pro |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gly | Ser | Ala | Ala | Gln | Thr | Asn | Ser | Met | Val | Thr | Leu | Gly | Cys | Leu | Val |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lys | Gly | Tyr | Phe | Pro | Glu | Gln | Val | Thr | Val | Thr | Trp | Asn | Ser | Gly | Ser |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Leu | Ser | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Asp | Leu |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tyr | Thr | Leu | Ser | Ser | Ser | Val | Thr | Val | Pro | Ser | | | | | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | | | |
- <210> 2
- <211> 8
- 20

ES 2 618 292 T3

<212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 2
 Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr Gly
 5 1 5

<210> 3
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 3
 Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro
 1 5

<210> 4
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4
 Ala Arg Arg Arg Tyr Glu Gly Asn Tyr Val Phe Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 20 25

<210> 5
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 5
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
 20 25 30

Phe Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 30 35 40 45

ES 2 618 292 T3

Tyr Thr Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Val Thr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
 100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
 115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
 130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
 145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp
 165

<210> 6
 <211> 11
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 6
 Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Phe Ser
 1 5 10

10 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15 <400> 7
 Thr Ala Lys Thr Leu Ala Glu
 1 5

20 <210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8
 Gln His His Tyr Val Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 1 5 10 15

25 Glu Ile Lys Arg
 20

<210> 9
 <211> 345
 <212> DNA
 30 <213> Artificial

<220>

ES 2 618 292 T3

<223> cDNA

<400> 9

```

acgcgagtga agaagcctcg agagacagtc aagatctcct gcaaggettc tgggtataacc    60
ttcacacact atggaatgaa ctgggtgaag caggtccag gaaagggttt aaagtggatg    120
ggctggataa acacctacac tggagagcca acatatgctg atgacttcaa gggacggttt    180
gccttctctt tgaagcctc tgtcagcact gcctatctgc agatcaacaa cctcaaaaat    240
gaggacacgg ctacatattt ctgtgcaaga aggagatatg agggtaacta cgttttttac    300
tactttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca                    345

```

5

<210> 10

<211> 324

<212> DNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> cDNA

<400> 10

```

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc    60
atcacatgtc gagcaagtga aaatatttac agttatcttt catggtatca gcagaaacag    120
ggaaaatctc ctcagctcct ggtctatact gcaaaaacct tagcagaagg tgtgccatca    180
aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tttctctga agatcaacag cctgcagcct    240
gaagatcttg ggagttatta ctgtcaacat cattatgcta ctccgtacac gttcggaggg    300
gggaccaagc tggaaataaa acgg                    324

```

15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-CD39 que comprende:
- una cadena ligera variable (VL) que comprende las CDR de la cadena VL obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-3889; y
 - 5 - una cadena pesada variable (VH) que comprende las CDR de la cadena VH obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-3889, en donde dicho anticuerpo inhibe la actividad de las células T reguladoras (Treg).
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo comprende:
- 10 - una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 1; y
 - una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta como SEQ ID NO: 5.
3. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂, un diacuerpo, y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos.
- 15 4. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.
5. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 6. Un anticuerpo anti-CD39 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para uso para tratar o prevenir una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cánceres y enfermedades infecciosas.
7. El anticuerpo anti-CD39 para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de hígado, cáncer gástrico, linfoma, cáncer de tiroides, cáncer gastrointestinal, cáncer genito-urinario, y adenocarcinomas, tales como cánceres de colon, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, tumores testiculares, carcinoma de células no pequeñas del pulmón, cáncer del intestino delgado y cáncer de esófago.
- 25 8. El anticuerpo anti-CD39 para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en infecciones por virus, parásitos o bacterias.
9. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en infección por VIH, VBH, VCH, Plasmodium falciparum o Mycobacterium tuberculosis.
- 30

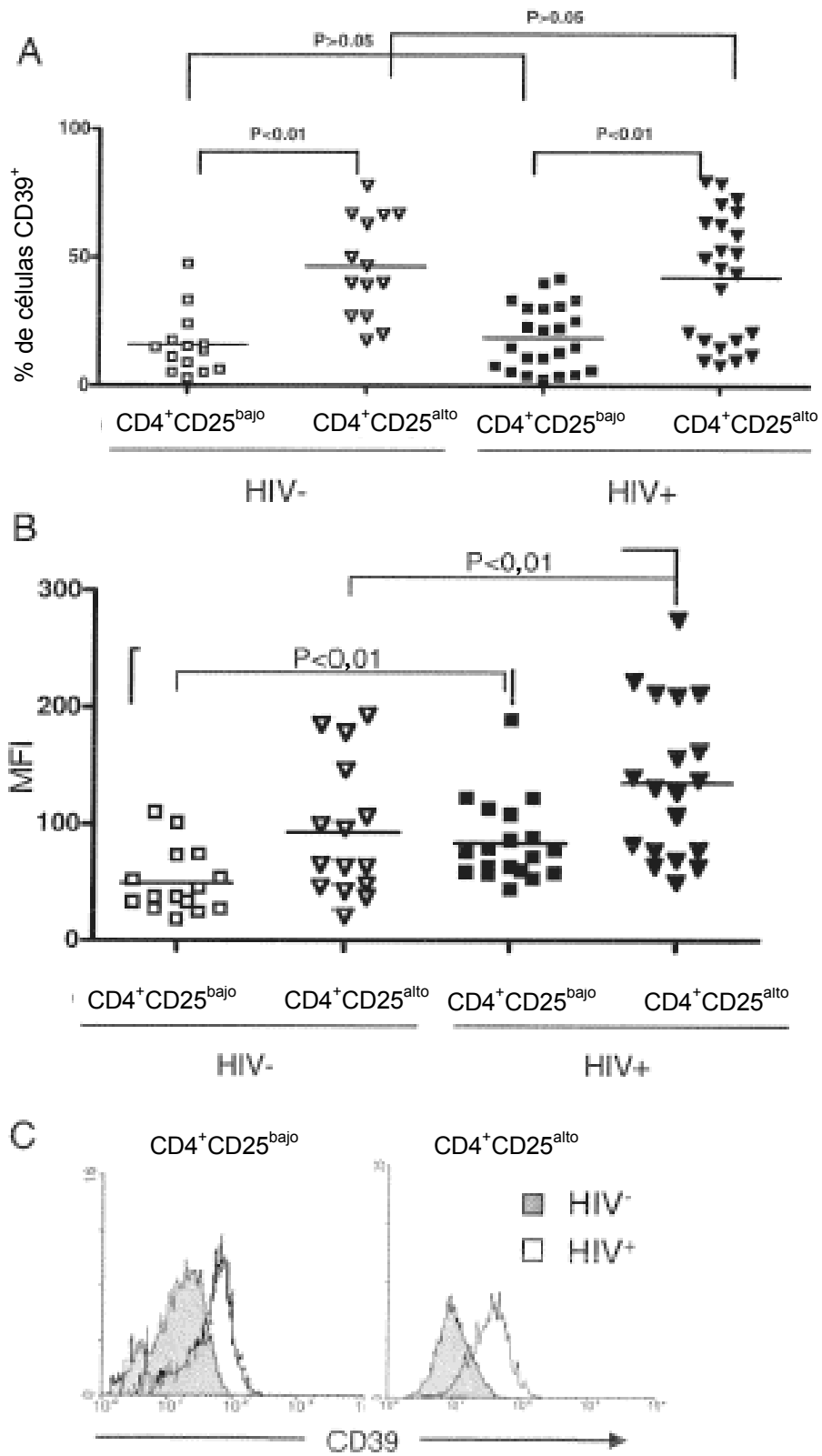


Figura 1

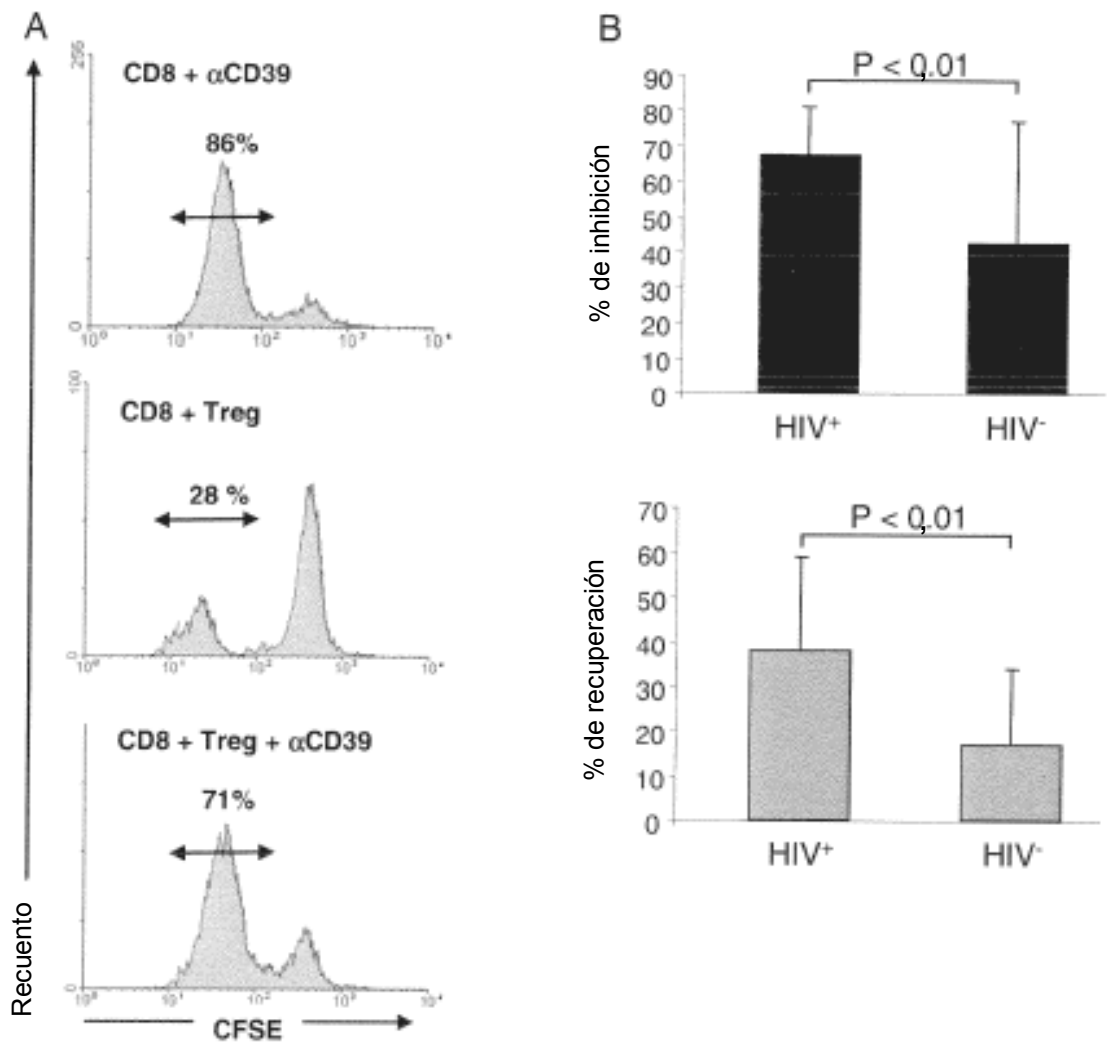


Figura 2

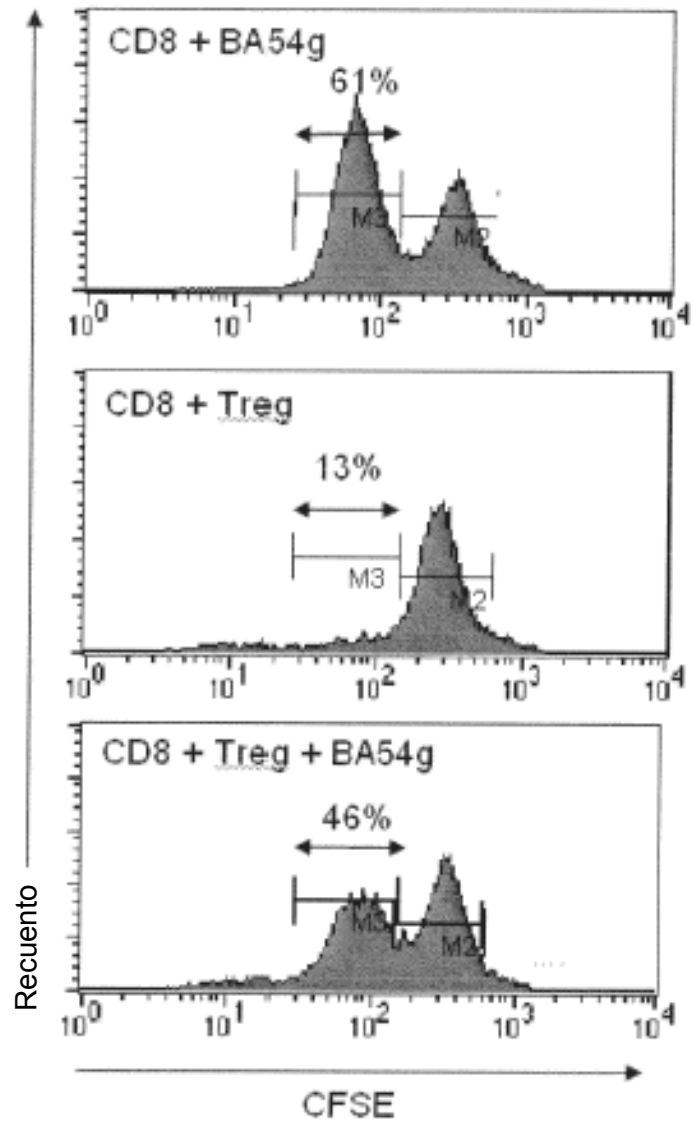
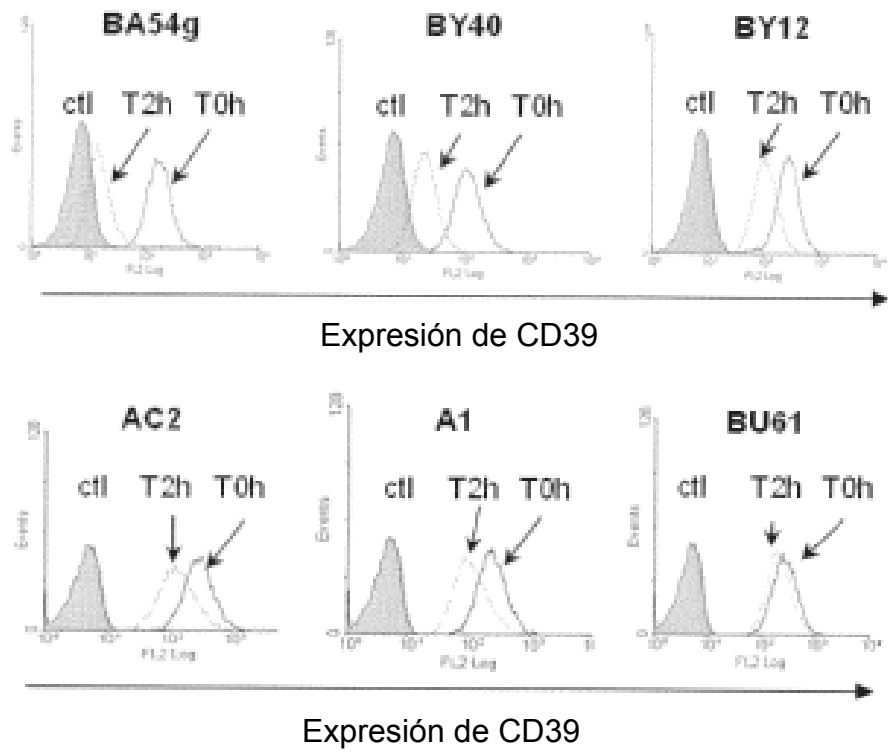


Figura 3



mAb	% inh. MFI
BA54g	77
BY40	73
BY12	49
AC2	48
A1	50
BU61	20

Figura 4