

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 602**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2011 PCT/EP2011/073659**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12085132**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2011 E 11801741 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2654789**

54 Título: **Anticuerpos contra CD39 humano y uso de los mismos**

30 Prioridad:

22.12.2010 US 201061426041 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.10.2018

73 Titular/es:

**OREGA BIOTECH (50.0%)
15 Chemin du Saquin, L'Espace Européen -
Bâtiment G
69130 Ecully, FR y
INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BENSUSSAN, ARMAND;
BONNEFOY-BERARD, NATHALIE;
ELIAOU, JEAN-FRANÇOIS;
ALBERICI, GILLES y
BASTID, JEREMY**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 684 602 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

- 5 La invención se refiere a anticuerpos dirigidos contra el CD39 humano para inhibir los efectos inmunosupresores de una célula cancerosa que expresa CD39.

Antecedentes de la invención

- 10 CD39 es una proteína de membrana integral con dos dominios transmembrana y una gran región extracelular (Maliszewski et al, 1994) con actividad nucleósido trifosfato difosfohidrolasa (Wang y Guidotti, 1996). En humanos, CD39 se expresa principalmente por células T reguladoras (Treg) pero también por otros leucocitos. En cánceres infiltrados con Tregs positivos para CD39, el CD39 desempeña un papel clave porque aumenta la angiogénesis tumoral y suprime la respuesta inmunitaria antitumoral al iniciar la generación de adenosina (Stagg J et al, 2010).

- 15 Hasta la fecha, no se ha descrito la expresión de CD39 por las células tumorales. La solicitud de patente WO2009/095478 describe el uso de un anticuerpo CD39 para el tratamiento o prevención de enfermedades, como cánceres y enfermedades infecciosas, asociado con una actividad incrementada de Treg.

- 20 Sin embargo, ciertas patologías cancerosas no están asociadas con la actividad Treg. Por lo tanto, sería muy útil elaborar métodos y composiciones para inhibir los efectos inmunosupresores de células cancerosas que expresan CD39.

- 25 El documento WO2009/095478 se refiere al uso de anticuerpos anti-CD39 para tratar enfermedades asociadas con una actividad incrementada de T reguladora.

La presente descripción pretende proporcionar un método para inhibir los efectos inmunosupresores de células cancerosas que expresan CD39.

- 30 Resumen de la invención

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones y cualquier información que no se encuentre dentro de las reivindicaciones se proporciona solo a título informativo.

- 35 La presente descripción se refiere a un anticuerpo CD39 para inhibir los efectos inmunosupresores de una célula cancerosa que expresa CD39.

- 40 En particular, la descripción se refiere a un anticuerpo CD39 para el tratamiento o prevención del cáncer. Preferiblemente, dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en melanoma, cáncer hematológico, cáncer de ovario, cáncer de tiroides, cáncer de pulmón o cáncer de riñón.

- 45 La descripción también se refiere a un método para tratar el cáncer, comprendiendo dicho método la etapa de administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un antagonista de CD39, preferiblemente un anticuerpo monoclonal CD39 que inhibe el efecto inmunosupresor de células cancerosas que expresan CD39, dichas células cancerosas se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en células de cáncer hematológicas, células de melanoma, células de cáncer de ovario, células de cáncer de tiroides, células de cáncer de pulmón y células de cáncer de riñón.

- 50 Descripción detallada de la invención

Definiciones

- 55 El término "CD39" denota la proteína CD39 también denominada ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-1 (ENTPD1). CD39 es una ectoenzima que hidroliza ATP/UTP y ADP/UDP en los correspondientes nucleósidos tales como AMP.

El término "anticuerpo CD39" se refiere a un anticuerpo que se une a CD39 humano.

- 60 De acuerdo con la presente descripción, "anticuerpo" o "inmunoglobulina" tienen el mismo significado, y se usarán por igual en la presente descripción. El término "anticuerpo" tal como se usa en el presente documento se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno. Como tal, el término anticuerpo abarca no solo moléculas de anticuerpo completas, sino también fragmentos de anticuerpos así como variantes (que incluyen derivados) de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. En anticuerpos naturales, dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro y cada cadena pesada está unida a una cadena ligera mediante un enlace disulfuro. Hay dos tipos de cadena ligera, lambda (λ) y kappa (κ). Existen cinco clases

principales de cadenas pesadas (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 CH). Las regiones variables de ambas cadenas ligera (VL) y pesada (VH) determinan el sitio de unión específico para el epítipo antigénico. Los dominios de la región constante de las cadenas ligera (CL) y pesada (CH) confieren propiedades biológicas importantes tales como la asociación de la cadena del anticuerpo, la secreción, la movilidad transplacentaria, la unión del complemento y la unión a los receptores Fc (FcR). El fragmento Fv es la parte N-terminal del fragmento Fab de una inmunoglobulina y consiste en las porciones variables de una cadena ligera y una cadena pesada. La especificidad del anticuerpo reside en la complementariedad estructural entre el sitio de unión del anticuerpo y el epítipo antigénico. Los sitios de unión a anticuerpos están compuestos de residuos que provienen principalmente de las regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDR). Ocasionalmente, residuos de regiones no hipervariables o estructurales (FR) influyen en la estructura general del dominio y, por lo tanto, en el sitio de unión. Las regiones determinantes de complementariedad o CDR se refieren a secuencias de aminoácidos que juntas definen la afinidad de unión y la especificidad de la región Fv natural de un sitio de unión de inmunoglobulina nativa. 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 comprenden el conjunto de CDR de cada una de las regiones V de cadena pesada y ligera. Las regiones de marco (FR) se refieren a secuencias de aminoácidos interpuestas entre las CDR.

De acuerdo con la descripción, el término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo CD39 de cualquier especie, preferiblemente ratón, y un dominio CH y un dominio CL de un anticuerpo humano.

De acuerdo con la descripción, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que tiene una región marco variable y regiones constantes de un anticuerpo humano pero retiene las CDR de un anticuerpo CD39 de cualquier especie, preferiblemente ratón.

El término "Fab" indica un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión a antígeno, en la cual aproximadamente la mitad del lado N-terminal de la cadena H y la cadena L completa, entre fragmentos obtenidos tratando IgG con una proteasa, papaína, se unen 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 de bisagra, entre fragmentos obtenidos tratando la IgG con una proteasa, pepsina.

La descripción también abarca moléculas, preferiblemente polipéptidos, que comprenden el dominio variable del anticuerpo de la descripción, preferiblemente el Fab de dicho anticuerpo o el F(ab')₂ de dicho anticuerpo.

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

Un polipéptido Fv de cadena simple ("scFv") es un heterodímero VH::VL unido covalentemente que se expresa habitualmente a partir de una fusión génica que incluye genes que codifican VH y VL unidos mediante un enlazador que codifica un péptido. "dsFv" es un heterodímero VH::VL estabilizado por un enlace disulfuro. Los fragmentos de anticuerpos divalentes y multivalentes pueden formarse espontáneamente por asociación de scFv monovalentes, o pueden generarse mediante el acoplamiento de scFv monovalentes mediante un enlazador peptídico, tal como 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). Al usar un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se fuerzan a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión al antígeno.

Por "purificado" y "aislado" se entiende, cuando se refiere a un polipéptido (es decir, un anticuerpo de acuerdo con la descripción) o a una secuencia de nucleótidos, que la molécula indicada está presente en la ausencia sustancial de otras macromoléculas biológicas del mismo tipo. El término "purificado" como se usa en este documento significa preferiblemente que al menos un 75% en peso, más preferiblemente al menos un 85% en peso, más preferiblemente aún al menos un 95% en peso, y lo más preferiblemente al menos un 98% en peso de macromoléculas biológicas del mismo tipo está presente. 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 porciones adicionales que no afecten negativamente a las características básicas de la composición.

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

Como se usa en este documento, el término "prevención" se refiere a prevenir que la enfermedad o afección ocurra en un sujeto que aún no se ha diagnosticado que lo tiene.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" denota un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferiblemente, un sujeto de acuerdo con la descripción es un ser humano.

Como se usa en este documento, los términos "cáncer", "hiperproliferativo" y "neoplásico" se refieren a células que tienen la capacidad de crecimiento autónomo, es decir, un estado o condición anormal caracterizada por crecimiento celular que prolifera rápidamente. Los estados de enfermedad hiperproliferativa y neoplásica se pueden categorizar como patológicos, es decir, caracterizar o constituir un estado de enfermedad, o se pueden categorizar como no patológicos, es decir, una desviación de lo normal pero no asociada con un estado de enfermedad. El término pretende incluir todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos malignos transformados, independientemente de su tipo histopatológico o etapa de invasividad. Los términos "cáncer" o "neoplasias" incluyen tumores malignos de los diversos sistemas orgánicos, como afecciones pulmonares, mamarias, tiroideas, linfoides, gastrointestinales y genitourinarias, así como adenocarcinomas que incluyen tumores malignos como la mayoría de los cánceres de colon, carcinoma de células renales, cáncer de próstata y/o tumores testiculares, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer de intestino delgado y cáncer de esófago. En el contexto de la presente descripción, el término "cáncer" se refiere a melanoma, cáncer hematológico, cáncer de ovario, cáncer de tiroides, cáncer de pulmón y cáncer de riñón.

Como se usa en este documento, el término "cáncer hematológico" se refiere a cánceres de sangre y médula ósea, tales como linfoma, leucemia y mieloma múltiple. Preferiblemente, dicho cáncer hematológico es un linfoma.

La leucemia se refiere a la leucemia de células B y la leucemia de células T e incluye, pero no se limita a, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica aguda (que incluye, por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda precursora B, leucemia linfoblástica aguda precursora T y leucemia bifenotípica aguda), leucemia linfocítica crónica (p. ej., leucemia prolinfocítica de células B), leucemia monocítica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia granulocítica crónica y leucemia prolinfocítica de células T.

El linfoma incluye linfoma de células del manto, linfoma no Hodgkin y linfoma de Hodgkin.

Usos terapéuticos de los anticuerpos CD39

Por lo tanto, un primer aspecto de la descripción proporciona métodos y composiciones farmacéuticas para inhibir los efectos inmunosupresores de una célula cancerosa que expresa CD39.

La descripción se refiere así al uso de un antagonista de CD39 para inhibir los efectos inmunosupresores de una célula cancerosa que expresa CD39.

La descripción también se refiere a un método para inhibir los efectos inmunosupresores de una célula cancerosa que expresa CD39 que comprende la etapa de administrar a un sujeto que lo necesita un antagonista de CD39.

La descripción también se refiere a un método para tratar un sujeto que padece un cáncer, comprendiendo dicho método la etapa de administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un antagonista de CD39, preferiblemente un anticuerpo monoclonal CD39 que inhibe el efecto inmunosupresor de células cancerosas que expresan CD39, seleccionándose dichas células cancerosas preferiblemente del grupo que consiste en células cancerosas hematológicas, células de melanoma, células de cáncer de ovario, células de cáncer de tiroides, células de cáncer de pulmón y células de cáncer de riñón.

El término "células hematológicas cancerosas" se refiere a células mieloides y/o linfoides afectadas por cáncer e incluye células de linfoma, células de leucemia y células de mieloma. Preferiblemente, dicha célula cancerosa hematológica es una célula de linfoma.

Los ejemplos de cánceres a tratar incluyen, pero no se limitan a, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, melanoma, carcinoma de piel, cáncer de hígado, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de tiroides, cáncer de riñón y linfoma. Preferiblemente, los cánceres a tratar son melanoma, cáncer hematológico, cáncer de ovario, cáncer de tiroides, cáncer de pulmón y cáncer de riñón. Preferiblemente, dicho cáncer hematológico es un linfoma.

- 5 El antagonista de CD39 se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en anticuerpos y compuestos químicos, dichos anticuerpos y compuestos químicos pueden modular por disminución la expresión de CD39 en la membrana celular y/o bloquear o disminuir la actividad de CD39 ATPasa/ADPasa y/o bloquear o disminuir la inhibición o supresión mediada por células cancerosas de la respuesta inmune. Estos antagonistas de CD39 modulan significativamente la expresión de CD39 en la membrana celular y/o bloquean o disminuyen significativamente la actividad CD39 ATPasa/ADPasa y/o bloquean o disminuyen significativamente la inhibición mediada por células cancerosas o la supresión de la respuesta inmune y/o bloquean o disminuyen la inhibición o supresión mediada por células cancerosas de la respuesta de células T CD4 y/o CD8.
- 10 La expresión de la membrana celular de CD39 puede medirse de acuerdo con el protocolo descrito en los Ejemplos 1 o 5 a continuación.
- 15 La actividad CD39 ATPasa/ADPasa se puede medir de acuerdo con el protocolo descrito en los Ejemplos 3 o 7 a continuación.
- 20 La inhibición mediada por células cancerosas de la respuesta inmune se puede medir de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 2 a continuación.
- 25 La descripción también se refiere a un método para identificar un sujeto que padece un cáncer que comprende la etapa de determinar la presencia de expresión de CD39 en las células cancerosas de una muestra de dicho sujeto, con el anticuerpo CD39 de acuerdo con la descripción.
- 30 La presente descripción se refiere así al uso de cualquier anticuerpo CD39 o fragmento del mismo, que incluye anticuerpos quiméricos CD39 (preferiblemente anticuerpos quiméricos de ratón/humano) o anticuerpos CD39 humanizados, con la condición de que dicho anticuerpo inhiba los efectos inmunosupresores de una célula cancerosa que expresa CD39. Preferiblemente, el antagonista de CD39 es un anticuerpo monoclonal CD39.
- 35 Preferiblemente, dicho anticuerpo monoclonal CD39 se selecciona del grupo que consiste en BY12, BY40 y BA54g.
- 40 En una realización particular, dicho anticuerpo CD39 es BY40. Los inventores han depositado un anticuerpo CD39 murino (BY40) productor de hibridoma en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 París Cedex 15, Francia), de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest, el 4 de enero de 2008. El hibridoma depositado tiene el número de depósito CNCM-3889. Dicho anticuerpo CD39 puede obtenerse entonces a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-3889.
- 45 En otro aspecto, 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.
- 50 En otra realización, dicho anticuerpo CD39 puede comprender 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 los CDR de la cadena VH del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-3889.
- 55 En otro aspecto, la descripción también abarca moléculas, preferiblemente polipéptidos, que comprenden el dominio variable del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-3889, preferiblemente el Fab de dicho anticuerpo o el F(ab')₂ de dicho anticuerpo.
- 60 En otra realización de la invención, dicho anticuerpo CD39 puede comprender una cadena pesada en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en el ID. DE SEC. N°: 2 para CDR-H1, ID. DE SEC. N°: 3 para CDR-H2 e ID. DE SEC. N°: 4 para CDR-H3; y/o una cadena ligera en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en ID. DE SEC. N°: 6 para CDR-L1, ID. DE SEC. N°: 7 para CDR-L2 e ID. DE SEC. N°: 8 para CDR-L3.
- Los inventores han clonado y caracterizado el dominio variable de las cadenas ligera y pesada de dicho mAb BY40, y así determinaron el dominio de regiones determinantes de complementariedad (CDR) de dicho anticuerpo como se describe en la Tabla 1:

Tabla 1: dominios VH, VL y CDR de mAb BY40:

Dominios mAb BY40	
VH	TRVKK PRETV KISCK ASGYT FTHYG MNWVK QAPGK GLKWM GWINT YTGEP TYADD FKGRF AFSLE ASVST AYLQI NNLKN EDTAT YFCAR RRYEG NYVfy YFDYW GQGTT LTVSS AKTTP PSVYP LAPGS AAQTN SMVTL GCLVK GYFPE QVTVT WNSGS LSSGV HTFPA VLQSD LYTLS SSVTV PS (ID. DE SEC. Nº:1)
VH CDR1	GYTFT HYG (ID. DE SEC. Nº:2)
VH CDR2	INTYT GEP (ID. DE SEC. Nº:3)
VH CDR3	ARRRY EGNVY FYYFD YWGQG TTLTV SS (ID. DE SEC. 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 DG SER QNGVL NSWTD (ID. DE SEC. Nº:5)
VL CDR1	RASEN IYSYF S (ID. DE SEC. Nº:6)
VL CDR2	TAKTL AE (ID. DE SEC. Nº:7)
VL CDR3	QH HYV TPYTF GGGTK LEIKR (ID. DE SEC. Nº:8)

5 Un aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo CD39 que comprende una primera secuencia de CDR de cadena pesada como se expone en ID. DE SEC. Nº: 2, una segunda secuencia de CDR de cadena pesada como se expone en ID. DE SEC. Nº: 3 y una tercera secuencia de CDR de cadena pesada como se expone en ID. DE SEC. Nº: 4; y una primera secuencia de CDR de cadena ligera como se expone en ID. DE SEC. Nº: 6, una segunda secuencia de CDR de cadena ligera como se expone en ID. DE SEC. Nº: 7 y una tercera secuencia de CDR de cadena ligera como se expone en ID. DE SEC. Nº: 8. En un aspecto particular, el dominio variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos indicada en el ID. DE SEC. Nº: 1 y/o el dominio variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en el ID. DE SEC. Nº: 5.

15 Los anticuerpos de la descripción se pueden producir mediante cualquier técnica bien conocida en la técnica. En particular, dichos anticuerpos se producen mediante técnicas como se describe más adelante.

En otro aspecto, un anticuerpo de la descripción 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.

20 Un aspecto de la descripción se refiere al hibridoma accesible bajo el número de depósito de CNCM 1-3889.

En otro aspecto, un anticuerpo de la descripción es un anticuerpo humanizado. En particular, en dicho anticuerpo humanizado, el dominio variable comprende regiones marcoceptoras humanas, y opcionalmente un dominio constante humano cuando están presentes, y CDR donador no humano, tales como CDR de ratón como se define anteriormente.

La descripción 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.

30 En otro aspecto, la descripción se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en ID. DE SEC. Nº: 1, ID. DE SEC. Nº: 2, ID. DE SEC. Nº: 3, ID. DE SEC. Nº: 4, ID. DE SEC. Nº: 5; ID. DE SEC. Nº: 6; ID. DE SEC. Nº: 7 e ID. DE SEC. Nº: 8.

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

5 En un aspecto particular, la 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).

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

Tabla 2: Ácidos nucleicos de dominios VH y VL de mAb 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 (ID. DE SEC. 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 (ID. DE SEC. Nº: 10)</p>

15 En una realización particular, dicho anticuerpo CD39 es BA54g. De hecho, los inventores han depositado el hibridoma productor de anticuerpos BA54g en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 París Cedex 15, Francia), de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest, el día 23 de junio de 2009. El hibridoma depositado tiene el número de depósito CNCM 1-4171. Dicho anticuerpo CD39 puede obtenerse entonces a partir del hibridoma depositado con el número de acceso CNCM 1-4171.

20 En otro aspecto, dicho anticuerpo CD39 puede comprender la cadena VL del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-4171 y la cadena VH del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-4171.

25 En otra realización, dicho anticuerpo CD39 puede comprender una cadena ligera variable (VL) que comprende las CDR de la cadena VL del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-4171 y una cadena pesada variable (VH) que comprende los CDR de la cadena VH del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM-I-4171.

30 En otra realización de la invención, dicho anticuerpo CD39 puede comprender una cadena pesada en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en el ID. DE SEC. Nº: 12 para CDR-H1, ID. DE SEC. Nº: 13 para CDR-H2 e ID. DE SEC. Nº: 14 para CDR-H3; y/o una cadena ligera en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en ID. DE SEC. Nº: 16 para CDR-L1, ID. DE SEC. Nº: 17 para CDR-L2 e ID. DE SEC. Nº: 18 para CDR-L3.

35 Los inventores han clonado y caracterizado los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas de dicho BA54g, y así determinaron las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de dicho anticuerpo como se describe en la Tabla 3.

Tabla 3: dominios VH, VL y CDR de mAb BA54g:

Dominios mAb BA54g	
VH	DVQLV ESGGG LVQPG GSRKL SCAAS GFTFS SFGMH WVRQA PEKGL EWWAY ISSGS SIIYY ADTVK GRFTI SRDNP KNTLF LQMTS LGSED TAMYY CARWS TTVVA TDYWG QGTTL TVS (ID. DE SEC. Nº: 11)
VH CDR1	GGSRK LSCAA SGFTF SSFGM H (ID. DE SEC. Nº:12)
VH CDR2	YISSG SSIY YADTV KG (ID. DE SEC. Nº: 13)
VH CDR3	WSTTV VATDY WGQGT TLTVS (ID. DE SEC. Nº:14)
VL	NIVMT QSPKS MSMSV GERVT LTCKA SENVV TYVSW YQQKP EQSPK LLIYG ASNRY TGVPD RFTGS GSATD FTLTI SSVQA EDLAD YHCGQ GYSYP YTFGG GTKLE IKR (ID. DE SEC. Nº: 15)
VL CDR1	KASEN VVTYV S (ID. DE SEC. Nº:16)
VL CDR2	GASNR YT (ID. DE SEC. Nº:17)
VL CDR3	CGQGY SYPYT FGGGT KLEIK R (ID. DE SEC. Nº:18)

5 Un aspecto de la descripción se refiere a un anticuerpo CD39 que comprende una primera secuencia de CDR de cadena pesada como se expone en ID. DE SEC. Nº: 12, una segunda secuencia de CDR de cadena pesada como se expone en ID. DE SEC. Nº: 13, y una tercera pesada secuencia de cadena CDR como se expone en ID. DE SEC. Nº: 14; y una primera secuencia de CDR de cadena ligera como se expone en ID. DE SEC. Nº: 16, una segunda secuencia de CDR de cadena ligera como se expone en ID. DE SEC. Nº: 17 y una tercera secuencia de CDR de cadena ligera como se expone en ID. DE SEC. Nº: 18. En una realización particular, el dominio variable de cadena pesada de dicho anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos como se expone en el ID. DE SEC. Nº: 11 y/o el dominio variable de cadena ligera de dicho anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en el ID. DE SEC. Nº: 15.

10 Dichos anticuerpos se pueden producir mediante cualquier técnica bien conocida en la técnica. En particular, dichos anticuerpos se producen mediante técnicas como se describen más adelante.

15 De acuerdo con un aspecto, el anticuerpo de la descripción es un anticuerpo murino.

20 En otro aspecto, el anticuerpo de la descripción 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 1-4171.

25 En otro aspecto, el anticuerpo de la descripción es un anticuerpo humanizado. En particular, en dicho anticuerpo humanizado, el dominio variable comprende regiones marco aceptoras humanas, y opcionalmente un dominio constante humano cuando está presente, y CDR donadora no humana de un anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM I-4171.

30 La descripción proporciona además fragmentos de dichos anticuerpos que incluyen, pero sin limitación, 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 descripción se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en ID. DE SEC. Nº: 11, ID. DE SEC. Nº: 12, ID. DE SEC. Nº: 13, ID. DE SEC. Nº: 14, ID. DE SEC. Nº: 15; ID. DE SEC. Nº: 16; ID. DE SEC. Nº: 17 e ID. DE SEC. Nº: 18.

35 En un aspecto particular, la descripción se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio VH de mAb BA54g o el dominio VL de mAb BA54g, como se detalla en la Tabla 4.

En un aspecto particular, la descripción se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio VH del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM 1-4171 (SEC ID N°: 19) o el dominio VL del anticuerpo obtenible a partir del hibridoma depositado como CNCM 1-4171 (ID. DE SEC. N°: 20).

5 Tabla 4: Ácidos nucleicos de los dominios VH y VL de mAb BA54g:

Dominio VH:	GATGT GCAGC TGGTG GAGTC TGGGG GAGGC TTAGT GCAGC CTGGA GGGTC CCGGA AACTC TCCTG TGCAG CCTCT GGATT CACTT TCAGT AGCTT TGGAA TGCAC TGGGT TCGTC AGGCT CCAGA GAAGG GGCTG GAGTG GGTCG CATA CATTAG TAGTG GCAGT AGTAT TATCT ACTAT GCAGA CACAG TGAAG GGCCG ATTCA CCATC TCCAG AGACA ATCCC AAGAA CACCC TGTTT CTGCA AATGA CCAGT CTAGG GTCTG AGGAC ACGGC CATGT ATTAC TGTGC AAGAT GGAGT ACTAC GGTAG TAGCT ACAGA CTACT GGGGC CAAGG CACCA CTCTC ACAGT CTCC (ID. DE SEC. N°: 19)
Dominio VL:	AACAT TGTA TGACC CAATC TCCCA AATCC ATGTC CATGT CAGTA GGAGA GAGGG TCACC TTGAC CTGCA AGGCC AGTGA GAATG TGGTT ACTTA TGTTT CCTGG TATCA ACAGA AACCA GAGCA GTCTC CTAAA CTGCT GATAT ACGGG GCATC CAACC GGTAC ACTGG GGTCC CCGAT CGCTT CACAG GCAGT GGATC TGCAA CAGAT TTCAC TCTGA CCATC AGCAG TGTGC AGGCT GAAGA CCTTG CAGAT TATCA CTGTG GACAG GGTTA CAGCT ATCCG TACAC GTTCG GAGGG GGGAC CAAGC TGGAA ATAAA ACGG (ID. DE SEC. N°: 20)

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.

10 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 extraño) puede introducirse en una célula hospedadora para transformar el huésped y promover la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) de la secuencia introducida.

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

20 Dichos 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 un promotor y potenciador temprano de SV40 (Mizukami T. et al. 1987), promotor LTR y potenciador del virus de la leucemia de ratón Moloney (Kuwana Y et al. 1987), promotor (Mason JO et al., 1985) y potenciador (Gillies SD et al., 1983) de la cadena H de inmunoglobulina y similares.

25 Se puede usar cualquier vector de expresión para célula animal, siempre que se pueda insertar y expresar 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.

Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos replicantes que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integradores, tales como, por ejemplo, pUC, pcDNA, pBR y similares.

Otros ejemplos de vectores víricos incluyen adenovirus, retrovirus, virus del herpes y vectores AAV. Tales virus recombinantes pueden producirse mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como transfección de células de empaquetadoras o mediante transfección transitoria con plásmidos auxiliares o virus. Los ejemplos típicos de células empaquetadoras de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenv+, células 293, etc. Pueden encontrarse protocolos detallados para producir tales virus recombinantes defectivos en la replicación, por ejemplo, en WO 95/14785, WO 96/22378, US 5.882.877, US 6,013,516, US 4,861,719, US 5,278,056 y WO 94/19478.

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

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

Los ácidos nucleicos de la descripción se pueden usar para producir un anticuerpo de la descripción en un sistema de expresión adecuado. El término "sistema de expresión" significa una célula huésped y un vector compatible en condiciones adecuadas, por ejemplo, para la expresión de una proteína codificada por ADN extraño transportado por el vector e introducido en la célula huésped.

Los sistemas de expresión comunes incluyen células huésped de *E. coli* y vectores plasmídicos, células huésped de insectos y vectores de Baculovirus, y células y vectores huésped de mamíferos. Otros ejemplos de células huésped incluyen, sin limitación, células procariontas (tales como bacterias) y células eucariotas (tales como células de levadura, células de mamífero, células de insecto, células vegetales, etc.). Los ejemplos específicos incluyen levaduras de *E. coli*, *Kluyveromyces* o *Saccharomyces*, líneas celulares de mamíferos (por ejemplo, células Vero, células CHO, células 3T3, células COS, etc.) así como cultivos celulares primarios o establecidos de mamíferos (por ejemplo, producidos a partir de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). Los ejemplos también incluyen células SP2/0-Ag14 de ratón (ATCC CRL1581), células P3X63-Ag8.653 de ratón (ATCC CRL1580), células CHO en las que un gen de dihidrofolato reductasa (en lo sucesivo denominado "gen DHFR") es defectuoso (Urlaub G et al., 1980), células YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 de rata (ATCC CRL1662, en lo sucesivo denominada "célula 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 descripción, 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) cultivando in vitro o ex vivo la célula huésped recombinante obtenida y (iii), opcionalmente, seleccionando las células que expresan y/o secretan dicho anticuerpo. Tales células huésped recombinantes pueden usarse para la producción de anticuerpos de la divulgación.

Los anticuerpos CD39 pueden producirse mediante cualquier técnica conocida en la técnica, tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, sola o en combinación.

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

Se pueden usar diversos adyuvantes conocidos en la técnica para potenciar la producción de anticuerpos. Aunque los anticuerpos útiles en la práctica de la descripción pueden ser policlonales, se prefieren los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales contra CD39 pueden prepararse y aislarse usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo.

Las técnicas para producción y aislamiento incluyen, pero sin limitación, la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (1975); la técnica del hibridoma de células B humanas (Cote et al., 1983); y la técnica de hibridoma EBV (Cole et al., 1985).

Conociendo la secuencia de aminoácidos del anticuerpo deseado, un experto en la materia puede producir fácilmente dichos anticuerpos, mediante técnicas estándar para la producción de polipéptidos. Por ejemplo, pueden sintetizarse usando un método bien conocido de fase sólida, preferiblemente usando un aparato de síntesis de péptidos disponible comercialmente (tal como el fabricado por Applied Biosystems, Foster City, California) 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, los anticuerpos pueden obtenerse 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 aislarse posteriormente utilizando técnicas bien conocidas.

5 En particular, la descripción se refiere además a un método para producir un anticuerpo de la descripción, cuyo método comprende los pasos 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.

En otro aspecto particular, el método comprende los pasos de:

10 (i) cultivar un hibridoma que expresa un anticuerpo CD39, (por ejemplo, el hibridoma depositado como CNCM-I-3889 o CNCM-I-4171), en condiciones adecuadas para permitir la expresión de anticuerpo; y
(ii) recuperar el anticuerpo expresado.

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

20 En un aspecto particular, se puede producir un anticuerpo humano CD39 quimérico obteniendo secuencias nucleicas que codifican los dominios VL y VH como se describió previamente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo quimérico humano insertándolo en un vector de expresión para célula animal que tiene genes que codifican el CH de anticuerpo humano y el CL de anticuerpo humano, y que expresa la secuencia codificante introduciendo el vector de expresión en una célula animal.

25 Como dominio CH de un anticuerpo quimérico humano, puede ser cualquier región que pertenece a la inmunoglobulina humana, pero son adecuadas las de clase IgG y también puede usarse cualquiera de las subclases pertenecientes a la clase IgG, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Además, como CL de un anticuerpo quimérico humano, puede ser cualquier región que pertenece a Ig, y pueden usarse las de clase kappa o clase lambda.

30 Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas de ADN recombinante convencional y las técnicas de transfección génica que son bien conocidos en la técnica (véase Morrison SL. Et al. (1984) y documentos de patente US 5.202.238 y US 5.204, 244).

35 Se puede producir un anticuerpo humanizado CD39 obteniendo secuencias de ácido nucleico que codifican dominios CDR, como se describió previamente, construyendo un vector de expresión de anticuerpo humanizado insertándolo en un vector de expresión para una célula animal que tiene genes que codifican (i) una región constante de cadena pesada idéntica al de un anticuerpo humano y (ii) una región constante de cadena ligera idéntica a la de un anticuerpo humano, y que expresa los genes introduciendo el vector de expresión en una célula animal.

40 El vector de expresión de anticuerpo humanizado puede ser de un tipo en el que existe 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 ambos genes existen en el mismo vector (tipo tándem). Con respecto a la facilidad de construcción de un vector de expresión de anticuerpo humanizado, la facilidad de introducción en células animales y el equilibrio entre los niveles de expresión de las cadenas de anticuerpo H y L en células animales, se prefiere el vector de expresión de anticuerpo humanizado del tipo tándem (Shitara K et al. al. 1994). Los ejemplos de vector de expresión de anticuerpo humanizado de tipo tándem incluyen pKANTEX93 (documento WO 97/10354), pEE18 y similares.

45 Los métodos para producir anticuerpos humanizados basados en técnicas convencionales de ADN recombinante y transfección génica son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Riechmann L. et al., 1988, Neuberger MS. et al., 1985). Los anticuerpos se pueden humanizar usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (documentos EP 239.400, publicación PCT WO91/09967, patentes de Estados Unidos N° 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), recubrimiento o repavimentación (documento EP 592.106; EP 519.596; Padlan EA (1991); Studnicka GM et al. (1994); Roguska MA. Et al. (1994)), y cambio de cadena al azar (Patente de Estados Unidos N° 5.565.332). La tecnología de ADN recombinante general para la preparación de tales anticuerpos también es conocida (véase la Solicitud de Patente Europea EP 125023 y la Solicitud de Patente Internacional WO 96/02576).

50 El Fab puede obtenerse tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con CD39 humano con la proteasa papaína. Además, el Fab puede producirse insertando ADN que codifica Fab del anticuerpo en un vector para el sistema de expresión procariótico, o para el sistema de expresión eucariótico, e introduciendo el vector en una célula procariota o eucariota (según corresponda) para expresar el Fab.

55 Se puede obtener F(ab')₂ tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con CD39 humano con la proteasa pepsina. Además, el F(ab')₂ puede producirse uniendo el Fab' descrito a continuación a través de un enlace tioéter o un enlace disulfuro.

65

Se puede obtener Fab' tratando F(ab')₂ que reacciona específicamente con CD39 humano con un agente reductor, ditiotreitól. Además, el Fab' puede producirse insertando ADN que codifica el fragmento Fab' del anticuerpo en un vector de expresión para procariota, o un vector de expresión para eucariota, e introduciendo el vector en una célula procariota o eucariota (según corresponda) para llevar a cabo su expresión.

Se puede producir scFv obteniendo ADNc que codifica los dominios VH y VL como se describió previamente, construyendo un ADN que codifica scFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procariota, o un vector de expresión para eucariota, y luego introduciendo el vector de expresión en una célula procariota o eucariota (según corresponda) para expresar el scFv. Para generar un fragmento scFv humanizado, se puede usar una tecnología bien conocida llamada injerto de CDR, que implica seleccionar las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un fragmento scFv donador, e injertarlas en un marco de fragmento scFv humano de estructura tridimensional conocida (véase, por ejemplo, WO98/45322, WO 87/02671, US5,859,205, US5,585,089, US4,816,567; EP0173494).

Se contemplan modificaciones de la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en este documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Se sabe que cuando un anticuerpo humanizado se produce simplemente injertando solo una 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 VH y VL del anticuerpo no humano, no solo en la CDR sino también en la FR, están directa o indirectamente asociados con la actividad de unión a antígeno. Por lo tanto, la sustitución de estos residuos de aminoácidos con diferentes residuos de aminoácidos derivados de las FR de VH y VL del anticuerpo humano reduciría la actividad de unión. Para resolver el problema, en anticuerpos injertados con una CDR humana, se deben intentar identificar, entre las secuencias de aminoácidos de la FR de la VH y VL de anticuerpos humanos, un residuo de aminoácido que está directamente asociado con la unión al anticuerpo, o que interactúa con una porción de aminoácido de CDR, o que mantiene la estructura tridimensional del anticuerpo y que está directamente asociado con la unión al antígeno. La actividad de unión al antígeno reducida podría aumentarse reemplazando los aminoácidos identificados con residuos de aminoácidos del anticuerpo original derivado de un animal no humano.

Se pueden hacer modificaciones y cambios en la estructura de los anticuerpos de la presente descripción, y en las secuencias de ADN que los codifican, y aún obtener una molécula funcional que codifica un anticuerpo con características deseables.

Al realizar los cambios en las secuencias amino, se puede considerar el índice hidropático de aminoácidos. Se entiende generalmente en la técnica la importancia del índice hidropático de aminoácidos para conferir función biológica interactiva a una proteína. Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, 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 en función de su hidrofobicidad y sus características de carga: 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 divulgación también abarca las variantes conservadoras de función de los anticuerpos de la presente descripción.

Las "variantes conservadoras de la función" son aquellas en las que se ha cambiado un residuo de aminoácido dado en una proteína o enzima sin alterar la conformación y función generales del polipéptido, que incluyen, pero no se limitan a, la sustitución de un aminoácido con uno que tiene propiedades similares (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 manera que el porcentaje de proteína o la similitud de secuencia de aminoácidos entre dos proteínas de función similar puede variar y puede ser, por ejemplo, del 70% al 99% según se determina según un esquema de alineación tal como mediante el método "Cluster" o de grupo, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una "variante conservadora de función" también incluye un polipéptido que tiene al menos un 60% de identidad de aminoácidos como se determina mediante los algoritmos BLAST o FASTA, preferiblemente al menos un 75%, más preferiblemente al menos un 85%, aún preferiblemente al menos un 90% e incluso más preferiblemente al menos un 95%, y que tiene las mismas o sustancialmente similares propiedades o funciones que la proteína nativa o parental con la que se compara.

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 el 90%, preferiblemente más del 95%, son similares (funcionalmente idénticos) en toda la longitud de la secuencia más corta. Preferiblemente, las secuencias similares u homólogas se identifican por alineación usando, por ejemplo, el programa de apilamiento GCG (Genetics Computer Group, manual del programa para el

Paquete GCG, Versión 7, Madison, Wisconsin) o cualquiera de los algoritmos de comparación de secuencias tales como BLAST, FASTA, etc.

5 Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden estar sustituidos por otros aminoácidos en una estructura de proteína sin pérdida apreciable de actividad. Dado que la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína definen la actividad biológica funcional de la proteína, pueden realizarse ciertas sustituciones de aminoácidos en una secuencia de proteína y, por supuesto, en su secuencia de codificación de ADN, obteniendo al mismo tiempo una proteína con propiedades similares. De este modo, se contempla que pueden realizarse diversos cambios en las secuencias de anticuerpos de la descripción, o las correspondientes secuencias de ADN que codifican dichos anticuerpos, sin pérdida apreciable de su actividad biológica.

10 Se sabe en la técnica que ciertos aminoácidos pueden estar sustituidos por otros aminoácidos que tienen un índice hidropático o puntuación similar y aún así dar como resultado una proteína con actividad biológica similar, es decir, obtener aún una proteína biológica funcionalmente equivalente.

15 Como se resumió anteriormente, las sustituciones de aminoácidos generalmente se basan en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral de aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y similares. Las sustituciones ejemplares que tienen en cuenta varias de las características anteriores son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

20 Otro tipo de modificación de aminoácido del anticuerpo de la descripción puede ser útil para alterar el patrón de glicosilación original del anticuerpo.

25 Por "alterar" se entiende eliminar una o más porciones de carbohidrato encontrados en el anticuerpo, y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

30 La glicosilación de anticuerpos típicamente está ligada a N. "N-ligado" se refiere a la unión de la porción de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la porción de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se lleva a cabo convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glicosilación ligados a N).

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

40 La eliminación de cualquier porción de carbohidrato presente en el anticuerpo se puede realizar química o enzimáticamente. La desglicosilación química requiere la exposición del anticuerpo al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayoría o todos los azúcares, excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras deja el anticuerpo intacto. La desglicosilación química está descrita por Sojahr H. et al. (1987) y por Edge, AS. et al. (1981). La división enzimática de porciones de carbohidratos en anticuerpos se puede lograr mediante el uso de una diversidad de endo y exoglucosidasas como se describe por Thotakura, NR. et al. (1987).

45 Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende unir el anticuerpo a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera expuesta en las patentes de los Estados Unidos números 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

50 También puede ser deseable modificar el anticuerpo de la descripción con respecto a la función efectora, por ejemplo para mejorar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede lograr introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativa o adicionalmente, se pueden introducir residuos 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 una mayor destrucción de células mediada por complemento y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Caron PC et al., 1992 y Shopes B. 1992).

65

Composiciones farmacéuticas

La descripción también se refiere a una composición farmacéutica que comprende antagonistas de CD39 para inhibir los efectos inmunosupresores de una célula cancerosa que expresa CD39.

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

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

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

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

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de inyectarse. Estos pueden ser en particular soluciones salinas isotónicas, estériles (monosódico o fosfato disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas, que después de la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permite la constitución de soluciones inyectables.

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

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

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; 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 facilidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, como bacterias y hongos.

Las soluciones de los compuestos activos como sales de base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua adecuadamente mezclada 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 normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Un antagonista de CD39 se puede formular en una composición en 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 pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o 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, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede ser provocada por diversos 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 conseguirse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

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 por congelación y secado al vacío que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

También se contempla la preparación de soluciones altamente concentradas o más concentradas para inyección directa, donde se prevé el uso de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida, administrando altas concentraciones de los agentes activos a un área tumoral pequeña.

Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. 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.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe tamponarse adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido primero se vuelve isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En relación con esto, los expertos en la técnica conocerán medios acuosos estériles que se pueden emplear a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, una dosis podría disolverse en 1 ml de solución de NaCl isotónica y agregarse a 1000 ml de fluido de hipodermoclasia o inyectarse en el sitio de infusión propuesto (ver, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038). y 1570-1580). Alguna variación en la dosificación necesariamente ocurrirá dependiendo de la condición del sujeto que se está tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

Los anticuerpos CD39 se pueden formular dentro de una mezcla terapéutica para comprender aproximadamente de 0,0001 a 1,0 miligramos, o aproximadamente de 0,001 a 0,1 miligramos, o aproximadamente de 0,1 a 1,0 o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis aproximadamente. También se pueden administrar dosis múltiples.

Además de los compuestos formulados para administración parenteral, tales como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; cápsulas de liberación; y cualquier otra forma actualmente utilizada.

En ciertos aspectos, se contempla el uso de liposomas y/o nanopartículas para la introducción de anticuerpos en células huésped. La formación y el uso de liposomas y/o nanopartículas son conocidos por los expertos en la técnica.

Las nanocápsulas generalmente pueden atrapar compuestos de una manera estable y reproducible. Para evitar los efectos secundarios debidos a la sobrecarga polimérica intracelular, dichas partículas ultrafinas (con un tamaño de aproximadamente 0,1 μm) se diseñan generalmente usando polímeros capaces de degradarse in vivo. Las nanopartículas de polialquil-cianoacrilato biodegradables que cumplen estos requisitos se contemplan para su uso en la presente descripción, y dichas partículas pueden fabricarse fácilmente.

Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas de dos capas concéntricas multilamelares (también denominadas vesículas multilaminares (MLV)). Las MLV generalmente tienen diámetros de 25 nm a 4 μm . La sonicación de las MLV da como resultado la formación de vesículas unilamelares pequeñas (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 la presencia de cationes divalentes.

Los anticuerpos de la descripción pueden producirse y/o modificarse mediante cualquier técnica conocida en la técnica, como se describió anteriormente.

Figuras:

Figura 1: Expresión de CD39 por células de melanoma. Las líneas celulares de melanoma (HN11, SK-MEL-5 y SK-MEL-28) y las células de melanoma de un tumor primario (MCM) se tiñeron con anticuerpo CD39 (BA54g o clon A1, Ebioscience) y la expresión de CD39 se analizó mediante citometría de flujo. Se indica el porcentaje de células tumorales positivas para CD39 dentro de la población. MCM, SK-MEL-5 y SK-MEL-28 expresan CD39 en su superficie celular.

Figura 2: Actividad inmunosupresora de las células de melanoma. 1×10^5 células CD8 activadas (A) o células CD4 (B) activadas de sangre de donantes sanos se incubaron solas o en presencia de una línea celular de melanoma (SK-MEL-5) en proporciones 1:1 o 2:1 (SK-MEL-5:células T). El mAb anti-CD3 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, clon UCHT1) se inmovilizó

previamente en placas de cultivo celular (activación de células T). Se añadió anti-CD28 mAb (1 µg/ml, clon CD28.2) al comienzo del cultivo. Después de 4 días de cultivo, se realizó la incorporación de timidina (18 h) para medir la proliferación de las células T CD8 y CD4. Cada condición se realizó por triplicado.

5 Figura 3: El anticuerpo CD39 (BA54g) inhibe la actividad de CD39 ATPasa de células de melanoma. Se cultivaron 1×10^5 células de melanoma (SK-MEL-5) en medio RPMI completo solo o en presencia de mAb BA54g durante 16 h. Después, 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 el mismo tampón complementado con 100 µM de ATP durante 15 minutos. La concentración de fosfato en los sobrenadantes se midió después de la adición de verde malaquita/alcohol polivinílico/solución de mobilato de amonio durante 20 min mediante un espectrofotómetro a 620 nm y se comparó con una curva patrón. El experimento se realizó por triplicado.

15 Figura 4: el anticuerpo CD39 (BY40) restaura las respuestas de las células T contra las células de melanoma. Se cultivaron 5×10^4 PBMC marcadas con CFSE en presencia de 5×10^3 SK-MEL-5 (NT) irradiados (100 Gy). Se añadieron POM-1 (100 o 250 µM), BY40 o anticuerpo isotipo de control D6212 (5 µg/ml) al comienzo del cultivo y después de 2 días de cultivo. Después de 5 días de cultivo, se analizó la proliferación de células T CD4 (A) y CD8 (B) marcadas con CFSE mediante citometría de flujo. El experimento se realizó por duplicado y los resultados son representativos de 2 experimentos independientes.

20 Figura 5: Expresión de CD39 por células de linfoma. Las líneas celulares de linfoma (BL41, linfoma de burkitt, B104, linfoma de células B, Ramos, linfoma de Burkitt) se tiñeron con el anticuerpo CD39 (clon A1; Ebioscience) y la expresión de CD39 se analizó mediante citometría de flujo. Los resultados son representativos de cuatro experimentos. BL41, B104 y Ramos expresan CD39 en su superficie celular.

25 Figura 6: Actividad de ATPasa de células de linfoma. (A) Se cultivaron 5×10^4 células de linfoma que expresan CD39 (Ramos, BL41) o no (BJAB) en tampón libre de fosfato suplementado con 100 µM de ATP durante 15 minutos. La concentración de fosfato en los sobrenadantes se midió después de la adición de verde Malaquita/alcohol polivinílico/solución de mobilato de amonio durante 10 min usando un espectrofotómetro a 620 nm. El experimento se realizó por triplicado. (B) Se cultivaron 5×10^4 células de linfoma que expresan CD39 (BL41 y B104) en medio RPMI completo durante 30 minutos con ATP 10 µM. La concentración de ATP extracelular "no hidrolizado" se determinó usando el sistema de ensayo de detección de ATP por luminiscencia, ATPlite (Perkin Elmer). Los resultados son la media de 2 experimentos independientes.

35 Figura 7: los anticuerpos CD39 inhiben la actividad CD39 ATPasa de las células de linfoma. Se cultivaron 1×10^5 células de linfoma (Ramos) en medio RPMI completo solo o en presencia de mAb BA54g, BY12 o BY40, en las concentraciones indicadas, durante 16 h. Después, 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 el mismo tampón complementado con 100 µM de ATP durante 15 minutos. La concentración de fosfato en los sobrenadantes se midió después de la adición de verde Malaquita/alcohol polivinílico/solución de mobilato de amonio durante 20 min mediante un espectrofotómetro a 620 nm y se comparó con una curva patrón. Los resultados son la media de dos experimentos independientes.

45 Figura 8: Expresión y actividad de CD39 en células de cáncer de ovario. (A) Se tiñeron células de cáncer de ovario (OAW42) con anticuerpo CD39 (clon A1, Ebiosciences) y se analizó la expresión de CD39 mediante citometría de flujo. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes. (B) Se cultivaron 5×10^4 células OAW42 en medio RPMI completo durante 30 minutos con ATP 10 µM. La concentración de ATP extracelular "no hidrolizado" se determinó usando el sistema de ensayo de detección de ATP por luminiscencia, ATPlite (Perkin Elmer). El experimento se realizó por triplicado.

50 Figura 9: Expresión de CD39 en un panel de tejidos normales y cancerosos. Se utilizó un microarray (MC5002) de US Biomax, Inc. de cáncer de múltiples órganos y tejido normal para analizar las expresiones de CD39. MC5002 contenía 500 núcleos con 18 de los tipos de cáncer más comunes (20-25 casos/tipo) y controles normales (5 casos/tipo). Los tejidos se fijaron con formalina, se incrustaron en parafina. Las secciones de matriz se montaron en el portaobjetos de vidrio Fisher SuperFrost con carga positiva que es adecuado para la detección de antígenos. Se evaluaron dos anticuerpos CD39 para la idoneidad de IHC y se seleccionaron los anticuerpos CD39 de Abcam (clon 22A9). La tinción con IHC se realizó entonces usando este anticuerpo CD39 a 1,52 µg/ml (clon 22A9, Abcam). Se realizó una puntuación manual de la intensidad de la tinción. La intensidad (Fuerza, 0-3) de la tinción de CD39 se calificó como negativa (0), posible positiva (0,5), débil (1), moderada (2) o fuerte (3). Se muestran los resultados para los tejidos normales o cancerosos de los ganglios linfáticos (A), tiroides (B), pulmón (C) o del riñón (D). Cada punto representa una muestra.

Ejemplos

Ejemplo 1: expresión de CD39 por células de melanoma

5 Protocolo: Líneas de melanoma (HN11, SK-MEL-5 y SK-MEL-28) y células de melanoma de un tumor primario (MCM) se tiñeron con anticuerpo CD39 (BA54g o clon A1 de Ebioscience) y la expresión de CD39 se analizó mediante citometría de flujo. El porcentaje de células tumorales positivas CD39 dentro de la población se evaluó a continuación.

10 Resultados: CD39 se expresa por células tumorales de melanoma. CD39 es una ectonucleotidasa que convierte el ATP extracelular generado en sitios de activación inmune, que conduce a la generación de adenosina, un inhibidor de la proliferación celular. Se ha informado que CD39 se expresa en la superficie celular de Treg humanos, así como en otros leucocitos (Stagg J, Oncogene 2010) pero no en la superficie de las células tumorales. Aquí se utilizó el anticuerpo CD39 BA54g, así como uno comercial (clon A1 de Ebioscience) para examinar la expresión de CD39 humana en la superficie celular de células de melanoma humano. Como se muestra en la figura 1, las células de melanoma de un tumor primario humano (MCM) y de las líneas celulares SK-MEL-5 y SK-MEL-28 muestran expresión membranosa de CD39, mientras que otra línea celular (HN11) es negativa para CD39. Por lo tanto, las células tumorales de melanoma pueden expresar CD39 en su superficie celular.

20 Ejemplo 2: actividad de células de melanoma positivas para CD39 hacia las células T efectoras

Protocolo: se incubaron 1×10^5 células CD8 (A) activadas o células CD4 (B) activadas de sangre de donantes sanos solas o en presencia de una línea celular de melanoma (SK-MEL-5) a una relación 1:1 o 2:1 (SK-MEL-5:células T). El mAb anti-CD3 (1 $\mu\text{g/ml}$, clon UCHT1) se inmovilizó previamente en placas de cultivo celular (activación de células T). Se añadió mAb anti-CD28 (1 $\mu\text{g/ml}$, clon CD28.2) al comienzo del cultivo. Después de 4 días de cultivo, se realizó la incorporación de timidina (18 h) para medir la proliferación de las células T CD8 y CD4. Cada condición se hizo por triplicado.

30 Resultados: Las células de melanoma positivas para CD39 son supresivas frente a células T efectoras de CD4 y CD8. Como CD39 participa en la generación de adenosina que es un potente inmunosupresor, se especuló que las células de melanoma positivas para CD39 inhibirían la proliferación de células T activadas por CD4 y CD8. Como se muestra en la figura 2, las células SK-MEL-5 de hecho inhiben la proliferación de células T efectoras CD4 y CD8 de una manera dependiente de la dosis. Por lo tanto, las células de melanoma positivas para CD39 ejercen una potente actividad inmunosupresora que podría afectar la respuesta antitumoral in vivo.

35 Ejemplo 3: Inhibición de la actividad enzimática melanoma-CD39 por BA54g

Protocolo: se cultivaron 1×10^5 células de melanoma (SK-MEL-5) en medio RPMI completo solas o en presencia de mAb BA54g durante 16 h. Después, las células se lavaron tres veces en tampón libre de fosfato (glucosa 10 mM, Hepes 20 mM, KCl 5 mM, NaCl 120 mM, CaCl₂ 2 mM) y se resuspendieron en el mismo tampón complementado con 100 μM de ATP durante 15 minutos. La concentración de fosfato en los sobrenadantes se midió después de la adición de verde Malaquita/alcohol polivinílico/solución de mobilato de amonio durante 20 min mediante un espectrofotómetro a 620 nm y se comparó con una curva patrón. El experimento se realizó por triplicado.

45 Resultados: Inhibición de la actividad enzimática de melanoma-CD39 por el anticuerpo monoclonal CD39 (mAb) BA54g. Con el fin de aliviar la inmunosupresión mediada por adenosina por células de melanoma, se cultivaron células SK-MEL-5 positivas para CD39 en presencia de mAb CD54 BA54g y se midió la actividad enzimática de CD39. Como se muestra en la figura 3, BA54g inhibe la actividad enzimática de CD39 de una manera dependiente de la dosis, sugiriendo que los mAb CD39 podrían ser herramientas útiles para anular la generación de adenosina por células de melanoma y restaurar una respuesta antitumoral eficaz.

Ejemplo 4: Inhibición de la supresión mediada por células de melanoma por BY40

55 Protocolo: se cultivaron 5×10^4 PBMC marcadas con CFSE en presencia de 5×10^3 SK-MEL-5 (NT) irradiados (100 Gy). Se añadieron POM-1 (100 o 250 μM), BY40 o anticuerpo isotipo de control D6212 (5 $\mu\text{g/ml}$) al comienzo del cultivo y después de 2 días de cultivo. Después de 5 días de cultivo, se analizó la proliferación de células T CD4 (A) y CD8 (B) marcadas con CFSE mediante citometría de flujo. El experimento se realizó por duplicado y los resultados son representativos de 2 experimentos independientes.

60 Resultados: el anticuerpo CD39 (BY40) restaura las respuestas de las células T contra las células de melanoma. Las células de melanoma positivas para CD39 son supresivas frente a las células T CD4 y CD8. Como los anticuerpos bloqueadores de CD39 inhiben la actividad enzimática de CD39 (figura 3), analizamos si la inhibición de CD39 en la superficie celular de las células de melanoma restaura la proliferación de células T. Para este fin, co-cultivamos linfocitos T y células de melanoma irradiadas en presencia de CD39 mAb BY40 o un inhibidor sintético de CD39, POM-1 (metatungstato de sodio). Como se muestra en la figura 4, BY40 y POM-1 aumentaron la proliferación de

65

células T CD4 y CD8. Por lo tanto, la inhibición de las células T efectoras por las células de melanoma que expresan CD39 puede ser anulada por los mAb que bloquean CD39.

Ejemplo 5: expresión de CD39 por células tumorales de linfoma

Protocolo: Líneas de linfoma (BL41, linfoma de Burkitt, B104, linfoma de células B, Ramos, linfoma de Burkitt) se tiñeron con el anticuerpo CD39 (clon A1; Ebioscience) y la expresión de CD39 se analizó mediante citometría de flujo. Los resultados son representativos de cuatro experimentos.

Resultados: CD39 se expresa por células tumorales de linfoma. Con el fin de evaluar si las células de linfoma también podrían expresar CD39, medimos la expresión de CD39 en la superficie celular de diversas líneas celulares tumorales de linfoma mediante citometría de flujo usando el anticuerpo CD39 A1 (Ebioscience). Como se muestra en la figura 5, las líneas celulares de linfoma de Burkitt BL41 y Ramos, así como la línea celular de linfoma de células B B104, todas expresan CD39 en su superficie celular. Por lo tanto, las células de linfoma pueden expresar CD39 que podría participar para suprimir la respuesta del sistema inmune.

Ejemplo 6: Actividad de ATPasa de células de linfoma

Protocolo: (A) Se cultivaron 5×10^4 células de linfoma que expresan CD39 (Ramos, BL41) o no (BJAB) en tampón libre de fosfato suplementado con 100 μM de ATP durante 15 minutos. La concentración de fosfato en los sobrenadantes se midió después de la adición de verde Malaquita/alcohol polivinílico/solución de mobilato de amonio durante 10 min usando un espectrofotómetro a 620 nm. El experimento se realizó por triplicado. (B) Se cultivaron 5×10^4 células de linfoma que expresan CD39 (BL41 y B104) en medio RPMI completo durante 30 minutos con ATP 10 μM . La concentración de ATP extracelular "no hidrolizado" se determinó usando el sistema de ensayo de detección de ATP por luminiscencia ATPlite (Perkin Elmer).

Resultados: Las células de linfoma positivas para CD39, pero no las células de linfoma negativas para CD39, ejercen una actividad ATPasa. Con el fin de evaluar la actividad enzimática de CD39 en la superficie de líneas celulares Ramos, BL41 y B104, medimos su capacidad para metabolizar ATP, ya sea midiendo la concentración de fosfato en el sobrenadante celular o midiendo el ATP restante. Como se muestra en la figura 6, las líneas celulares CD39 positivas (Ramos, BL41 y B104), pero no la negativa (BJAB), tenían la capacidad de hidrolizar ATP. Por lo tanto, las células de linfoma positivas para CD39 ejercen una actividad ATPasa y pueden suprimir las respuestas antitumorales.

Ejemplo 7: Inhibición de la actividad enzimática de linfoma-CD39 por BA54g, BY12 y BY40

Protocolo: se cultivaron 1×10^5 células de linfoma (Ramos) en medio RPMI completo solo o en presencia de mAbs BA54g, BY12 o BY40, en las concentraciones indicadas, durante 16 h. Después, 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 el mismo tampón complementado con 100 μM de ATP durante 15 minutos. La concentración de fosfato en los sobrenadantes se midió después de la adición de verde Malaquita/alcohol polivinílico/solución de mobilato de amonio durante 20 min mediante un espectrofotómetro a 620 nm y se comparó con una curva patrón. Los resultados son la media de dos experimentos independientes.

Resultados: Inhibición de la actividad enzimática de linfoma-CD39 por mAb CD39 BA54g, BY12 y BY40. Con el fin de probar si los mAb CD39 podrían ser útiles para inhibir la inmunosupresión mediada por CD39 por células de linfoma, cultivamos la línea celular Ramos positiva para CD39 con dosis crecientes de 3 mAbs de CD39. Como se muestra en la figura 7, los tres anticuerpos BA54g, BY12 y BY40 inhibieron la actividad de CD39 de una manera dependiente de la dosis. En conjunto, estos resultados demuestran que CD39 se expresa y es activo en la superficie de algunas células cancerosas (por ejemplo, melanoma y linfoma). La actividad de CD39 participa en la generación de adenosina que conduce a la respuesta disminuida del sistema inmune con una inhibición de la respuesta antitumoral. En conclusión, mostramos aquí que los mAb CD39 BA54g, BY12 y BY40 son capaces de disminuir la actividad enzimática de CD39 y, por lo tanto, son herramientas prometedoras para bloquear la inmunosupresión mediada por CD39 tumoral.

Ejemplo 8: expresión y actividad de CD39 en células de cáncer de ovario.

Protocolo: (A) Se tiñeron células de cáncer de ovario (OAW42) con anticuerpo CD39 (clon A1, Ebiosciences) y se analizó la expresión de CD39 mediante citometría de flujo. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes. (B) Se cultivaron 5×10^4 células OAW42 en medio RPMI completo durante 30 minutos con ATP 10 μM . La concentración de ATP extracelular "no hidrolizado" se determinó usando el sistema de ensayo de detección de ATP por luminiscencia ATPlite (Perkin Elmer). El experimento se realizó por triplicado.

Resultados: las células de cáncer de ovario expresan CD39 funcional. Con el fin de evaluar si las células de cáncer de ovario también podrían expresar CD39, medimos la expresión de CD39 en la superficie celular de la línea celular de cáncer de ovario OAW42 mediante citometría de flujo usando el mAb A1 de CD39 (Ebiosciences). Como se

5 muestra en la figura 8, las células OAW42 expresaban CD39 en su superficie celular. Además, medimos su capacidad para hidrolizar ATP midiendo el ATP restante en el sobrenadante celular después del cultivo de células con ATP. Como se muestra en la figura 8, las células OAW42 degradaron aproximadamente el 60% de ATP después de 30 minutos de cultivo. Por lo tanto, las células de cáncer de ovario expresan una enzima CD39 funcional y podrían participar para suprimir las respuestas antitumorales a través de la degradación de ATP y la generación de adenosina.

Ejemplo 9: expresión de CD39 en un panel de tejidos normales y cancerosos.

10 Protocolo: se usó un microarray de tejido de múltiples órganos con cáncer y tejido normal (MC5002) de US Biomax, Inc. para analizar las expresiones de CD39. MC5002 contenía 500 núcleos con 18 de los tipos de cáncer más comunes (20 -25 casos/tipo) y controles normales (5 casos/tipo). Los tejidos se fijaron con formalina, se incrustaron en parafina. Las secciones de matriz se montaron en el portaobjetos de vidrio Fisher SuperFrost con carga positiva que es adecuado para la detección de antígenos. La tinción con IHC se realizó usando anticuerpo CD39 a 1,52
15 µg/ml (clon 22A9, Abcam). Se realizó una puntuación manual de la intensidad de la tinción. La intensidad (Fuerza, 0-3) de la tinción de CD39 se calificó como negativa (0), posible positiva (0,5), débil (1), moderada (2) o fuerte (3). Se muestran los resultados para los tejidos normales o cancerosos de los ganglios linfáticos (A), tiroides (B), pulmón (C) o del riñón (D). Cada punto representa una muestra.

20 Resultados: CD39 se expresa mediante células tumorales en diversos cánceres humanos. Para evaluar la expresión de CD39 en un panel grande de cáncer, analizamos la expresión de CD39 en cáncer y tejido normal en Microarray. Como se muestra en la Figura 9, la tinción de CD39 se calificó como moderada a fuerte en muchos tejidos cancerosos incluyendo células de linfoma o carcinoma de pulmón, tiroides o riñón. Para estos tejidos, la tinción de CD39 es más alta en las muestras de cáncer en comparación con la de los tejidos normales.

25

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> OREGA BIOTECH

30 <120> ANTICUERPOS CONTRA EL CD39 HUMANO Y USO DE LOS MISMOS

<130>

35 <160> 20

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

40 <211> 187

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

ES 2 684 602 T3

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

5 <210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

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

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

15 <400> 3
1 Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro
5

ES 2 684 602 T3

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

5

<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

10

<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
 35 40 45
 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

15

20

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

ES 2 684 602 T3

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

5
 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

10
 <210> 8
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15
 <400> 8
 Gln His His Tyr Val Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 1 5 10 15
 Glu Ile Lys Arg
 20

20
 <210> 9
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

25
 <400> 9
 acgcgagtga agaagcctcg agagacagtc aagatctcct gcaaggcttc tgggtataacc 60
 ttcacacact atggaatgaa ctgggtgaag caggctccag gaaagggttt aaagtggatg 120
 ggctggataa acacctacac tggagagcca acatatgctg atgacttcaa gggacggttt 180
 gcctttctctt tggaagcctc tgtcagcact gcctatattgc agatcaacaa cctcaaaaat 240
 gaggacacgg ctacatattt ctgtgcaaga aggagatatg agggtaacta cgttttttac 300
 tactttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 345

30
 <210> 10
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 10
 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60
 atcacatgtc gagcaagtga aaatatttac agttatTTTT catgggatca gcagaaacag 120
 ggaaaatctc ctcagctcct ggtctatact gcaaaaacct tagcagaagg tgtgccatca 180
 aggttcagtg gcagtgatc aggcacacag ttttctctga agatcaacag cctgcagcct 240
 gaagatTTTg ggagttatta ctgtcaacat cattatgTTa ctccgtacac gttcggaggg 300
 gggaccaagc tggaaataaa acgg 324

35
 <210> 11
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

40

ES 2 684 602 T3

<400> 11

Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Thr Ser Leu Gly Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Ser Thr Thr Val Val Ala Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser
115

5

<210> 12

<211> 21

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 12

Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
1 5 10 15

Ser Phe Gly Met His
20

15

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

20 <213> Mus musculus

<400> 13

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Ile Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys
1 5 10 15

Gly

25

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 684 602 T3

<400> 14

Trp Ser Thr Thr Val Val Ala Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Val Ser
 20

5 <210> 15
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 15

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

15 <210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <400> 16

Lys Ala Ser Glu Asn Val Val Thr Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 17
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 17

Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

30 <210> 18
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

35

ES 2 684 602 T3

<400> 18

Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 1 5 10 15

Leu Glu Ile Lys Arg
 20

<210> 19

5 <211> 354

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 19

```

gatgtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccgaaactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct      120
ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatac attagtagtg gcagtagtat tatctactat      180
gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atccaagaa caccctgttc      240
ctgcaaatga ccagtctagg gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aagatggagt      300
actacggtag tagctacaga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctcc          354
  
```

10

<210> 20

<211> 324

<212> ADN

15 <213> Mus musculus

<400> 20

```

aacattgtaa tgacccaatc tcccaaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc      60
ttgacctgca aggccagtga gaatgtgggtt acttatgttt cctgggatca acagaaacca      120
gagcagtctc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggtacactgg ggtccccgat      180
cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcactctga ccatcagcag tgtgcaggct      240
gaagaccttg cagattatca ctgtggacag ggttacagct atccgtacac gttcggaggg      300
gggaccaagc tggaaataaa acgg          324
  
```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo antagonista de CD39 para su uso para tratar el cáncer inhibiendo los efectos inmunosupresores de una célula cancerosa que expresa CD39, en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de ovario, cáncer de tiroides, cáncer de pulmón y cáncer de riñón.
2. El anticuerpo antagonista de CD39 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha célula cancerosa se selecciona de cáncer de ovario, cáncer de tiroides, cáncer de pulmón y cáncer de riñón.
- 10 3. El anticuerpo antagonista CD39 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho antagonista es un anticuerpo capaz de modular negativamente la expresión de CD39 en la membrana celular y/o bloquear o disminuir la actividad CD39 ATPasa/ADPasa y/o bloquear o disminuir la inhibición o supresión mediada por células cancerosas de la respuesta inmunitaria antitumoral.
- 15 4. El anticuerpo antagonista de CD39 para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho antagonista es un anticuerpo monoclonal CD39.
- 20 5. El anticuerpo antagonista CD39 para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho anticuerpo 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.
- 25 6. El anticuerpo antagonista de CD39 para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho anticuerpo comprende:
- una cadena pesada en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en ID. DE SEC. N°: 2 para CDR-H1, ID. DE SEC. N°: 3 para CDR-H2 e ID. DE SEC. N°: 4 para CDR-H3 ; y/o
- 30 -una cadena ligera en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en ID. DE SEC. N°: 6 para CDR-L1, ID. DE SEC. N°: 7 para CDR-L2 e ID. DE SEC. N°: 8 para CDR-L3 .
- 35 7. El anticuerpo antagonista CD39 para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho anticuerpo 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-4171 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-4171.
- 40 8. El anticuerpo antagonista de CD39 para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho anticuerpo comprende:
- una cadena pesada en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en ID. DE SEC. N°: 12 para CDR-H1, ID. DE SEC. N°: 13 para CDR-H2 e ID. DE SEC. N°: 14 para CDR-H3 ; y/o
- 45 -una cadena ligera en la que el dominio variable comprende al menos una CDR que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en ID. DE SEC. N°: 16 para CDR-L1, ID. DE SEC. N°: 17 para CDR-L2 e ID. DE SEC. N°: 18 para CDR-L3 .
- 50 9. El anticuerpo antagonista de CD39 para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en:
- 55 -el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma depositada en la CNCM el 4 de enero de 2008 con el número de acceso 1-3889; y
- el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma depositada en la CNCM el 23 de junio de 2009 con el número de acceso CNCM 1-4171.

Figura 1

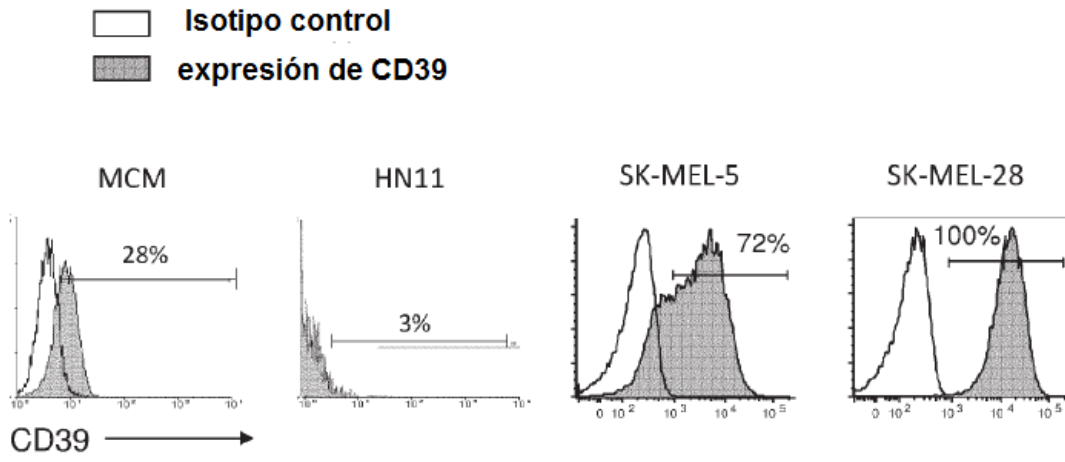


Figura 2

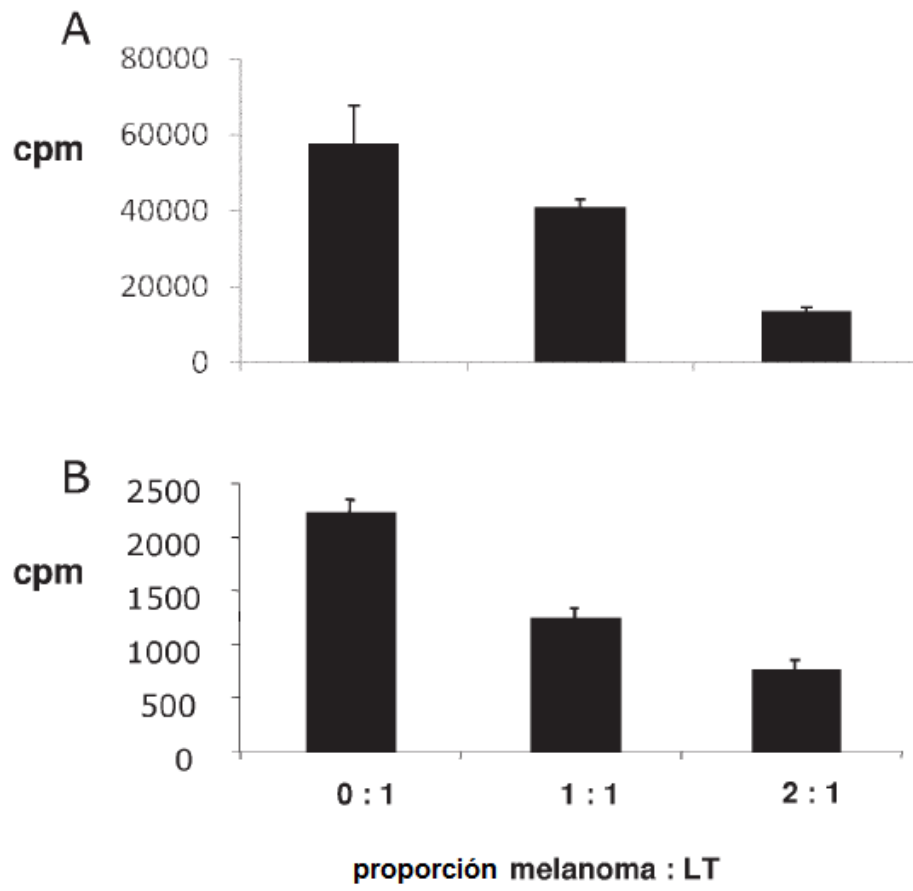


Figura 3

actividad ATPasa de CD39 (%)

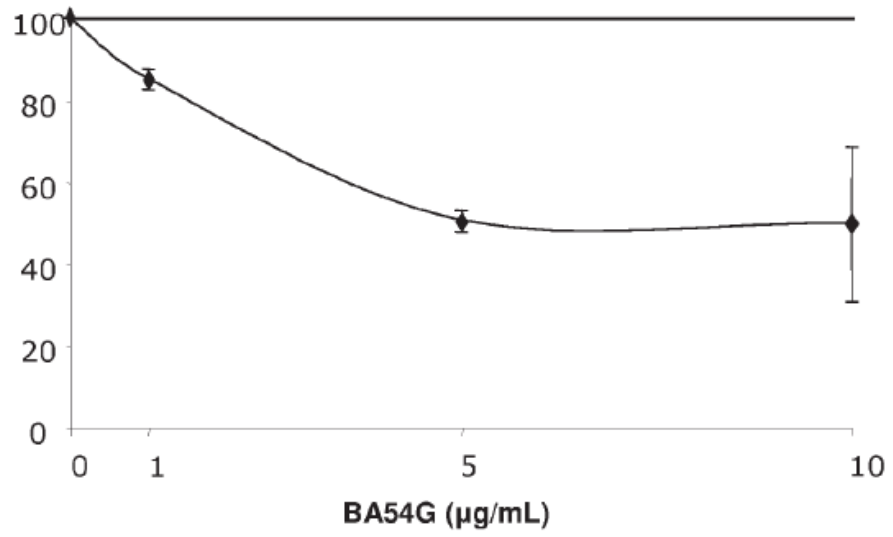


Figura 4

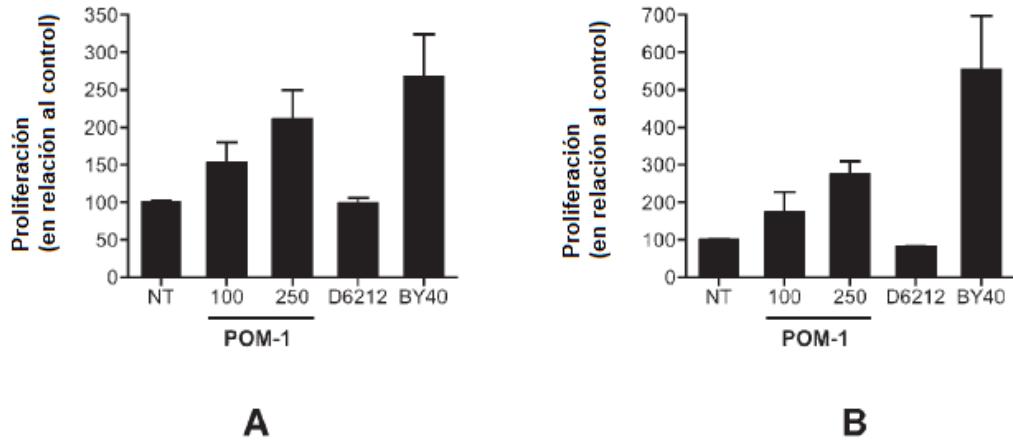


Figura 5

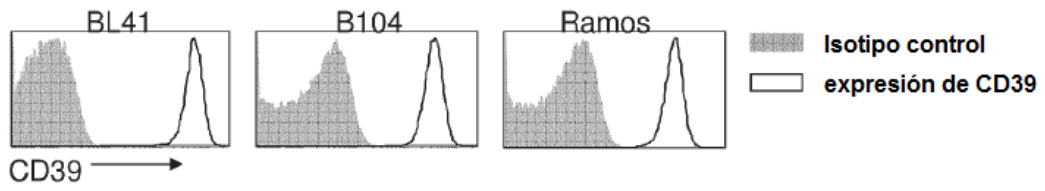


Figura 6

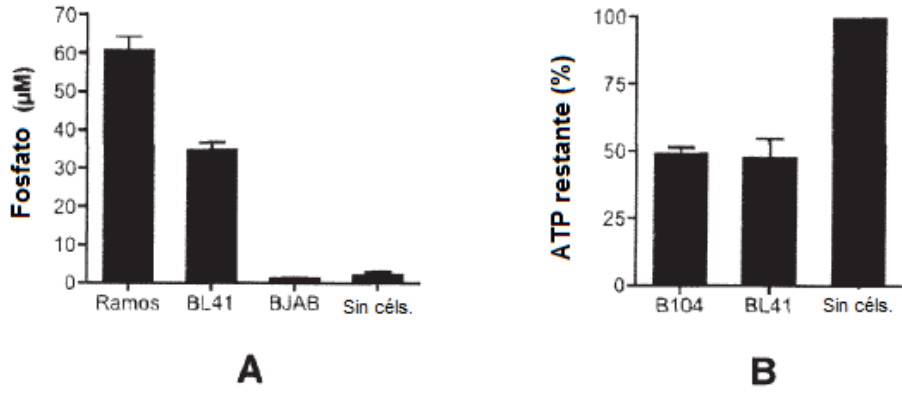


Figura 7

actividad ATPasa de CD39 (%)

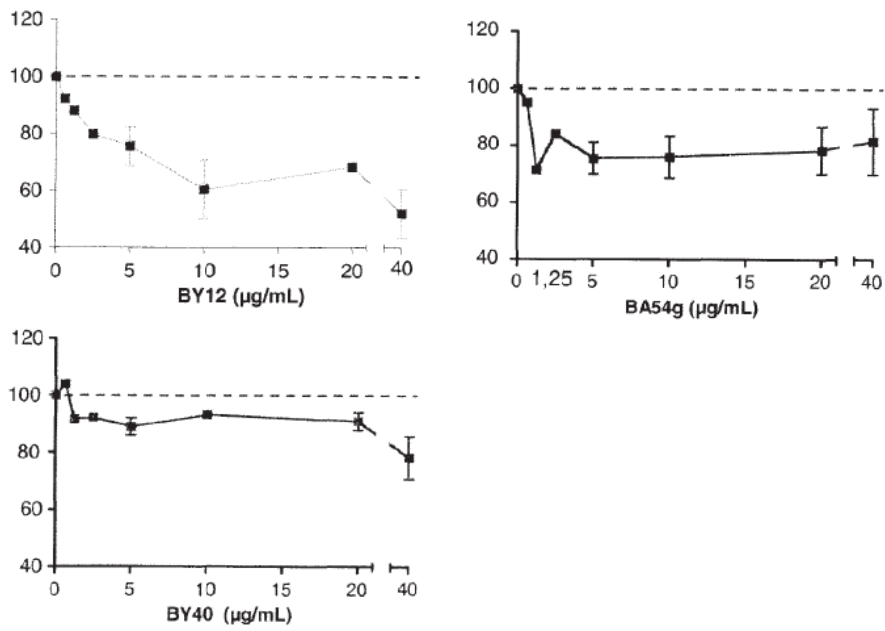


Figura 8

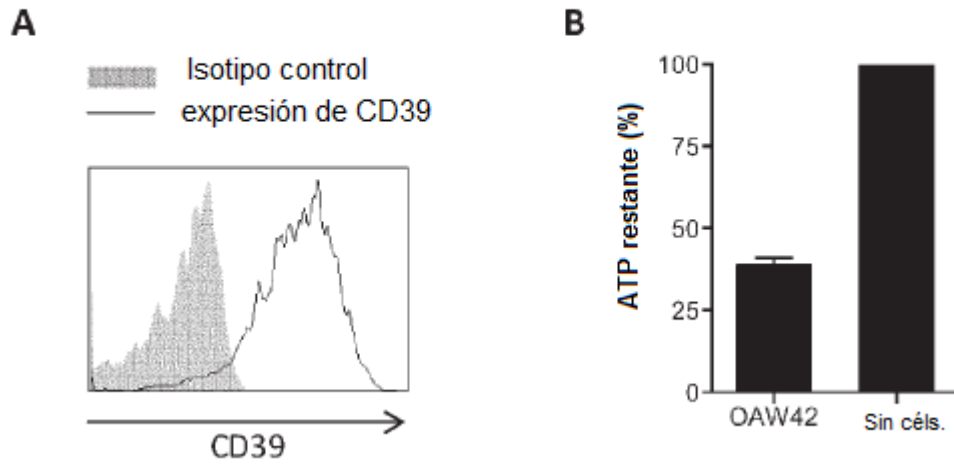


Figura 9

