

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 912 453**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 31/663 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 33/24 (2009.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2017** **E 20186147 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2022** **EP 3744348**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA) quimiorresistente**

30 Prioridad:

06.05.2016 EP 16305531

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.05.2022

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)
101 rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ PAUL SABATIER TOULOUSE III (33.3%) y
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE TOULOUSE (33.3%)

72 Inventor/es:

SARRY, JEAN-EMMANUEL;
RECHER, CHRISTIAN;
DE TONI-COSTES, FABIENNE y
AROUA, NESRINE

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 912 453 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

Composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA) quimiorresistente

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un inhibidor del eje de señalización CD39-P2Y13-cAMP-PKA, que es un anticuerpo que presenta especificidad para CD39, para su uso en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA) quimiorresistente en un paciente que lo necesita, en el que la leucemia es resistente a citarabina (AraC).

10 **Antecedentes de la invención**

La resistencia a la quimioterapia es la principal barrera terapéutica en la leucemia mieloide aguda (LMA). La LMA es la leucemia de adultos más habitual. Se caracteriza por la expansión clonal de mieloblastos inmaduros y se inicia a partir de células madre leucémicas ("leukemic stem cells", LSC) poco habituales. A pesar de que se produce una alta tasa de remisión completa después de una quimioterapia de inducción de primera línea convencional (por ejemplo, daunorubicina, DNR, o idarubicina, IDA más citarabina, AraC), la prognosis es muy mala en la LMA. Hasta la fecha, la supervivencia global dentro de 5 años aún es de aproximadamente 30 al 40% en pacientes menores de 60 años, y menor que 20% en pacientes mayores de 60 años. Esto es el resultado de la alta frecuencia de recaídas distantes (50 y 85% antes y después de la edad de 60 años, respectivamente) provocadas por un recrecimiento tumoral iniciado por clones leucémicos quimiorresistentes ("chemoresistant leukemic clones", RLC) y que se caracteriza por una fase refractaria durante la cual ningún otro tratamiento ha demostrado ser eficaz hasta la fecha (Tallman *et al.*, 2005; Burnett *et al.*, 2011). La LMA es una de las malignidades hematológicas poco frecuentes para las cuales la terapia no ha mejorado significativamente durante los últimos 30 años, a pesar de los intensos esfuerzos de investigación. Por tanto, la comprensión de las causas de la quimiorresistencia es crucial para el desarrollo de nuevos tratamientos para erradicar las RLC para superar las recaídas de pacientes con LMA.

La biología de la resistencia terapéutica (eflujo de fármaco, enzimas de desintoxicación, inaccesibilidad del fármaco al nicho leucémico) representa un área activa de investigación en la actualidad. Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes a la quimiorresistencia de la LMA aún son poco conocidos, en especial *in vivo*. No obstante, cada vez más se reconoce que las causas de la quimiorresistencia y la recaída residen dentro de una pequeña población de células. En apoyo a esta idea, un reciente estudio clínico ha demostrado que la presencia de niveles elevados de células CD34⁺CD38^{bajo}/CD123⁺ en el diagnóstico se correlaciona con un resultado adverso en pacientes con LMA en términos de respuesta a la terapia y supervivencia global (Vergez *et al.*, 2011, *Haematologica*). En coherencia con estos datos, Ishikawa y colaboradores (2007) han observado que esta población también es la más resistente a AraC *in vivo*. Como un primer paso hacia el éxito de la erradicación terapéutica de estas RLC, ahora es necesario perfilar exhaustivamente sus características adquiridas e intrínsecas dominantes.

La CD39/ENTPD1 (ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-1) es una proteína de la membrana superficial, que participa en la vía de señalización de la adenosina. De hecho, CD39 disminuye el ATP extracelular (inductor inmunogénico) y genera adenosina inmunosupresora, que inhibe potentemente las respuestas inmunológicas del hospedante contra el cáncer. La CD39 también desempeña un papel en la inmunovigilancia y la respuesta inflamatoria. Además, aunque existen otras NTPDasas, CD39 parece ser la principal NTPDasa en los linfocitos T y las células T reguladoras (CD4 + CD25 + Foxp3 +) (Bastid *et al.*, 2013, *Oncogene*). Recientes líneas de evidencias han revelado una alta expresión y actividad de CD39 en varios tumores sólidos o de la sangre (cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de riñón, cáncer de testículos, y cáncer de ovarios), lo cual implica un papel potencial de esta enzima en el estímulo del crecimiento e infiltración tumoral (Bastid *et al.*, *Cancer Immunol. Res.*, marzo de 2015, 3(3):254-265). Además, la CD39 se detecta con frecuencia en células tumorales primarias, exosomas de cáncer, células endoteliales asociadas a tumores y blastos de LMA. La CD39 contribuye al microentorno inmunosupresor en la LMA (Dulphy *et al.*, *Br. J. Haematol.*, junio de 2014, 165(5):722-725). De hecho, ciertos nucleótidos extracelulares (ATP, UTP) pueden inhibir el alojamiento y el injerto de LMA en ratones NSG (Salvestrini *et al.*, *Blood*, 5 de enero de 2012, 119(1):217-226). Shori *et al.* indican en *Tohoku J. Exp. Med.*, 2006, 209, 217-228 que la resistencia a AraC es un importante problema en el tratamiento de pacientes con LMA. Un anticuerpo neutralizante del receptor de IGF-1 o suramina provoca una significativa inhibición en el crecimiento y un aumento en la apoptosis de células K562/AC, que es una línea celular ML humana K562 resistente a AraC.

60 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a un inhibidor del eje de señalización CD39-P2Y13-cAMP-PKA, que es un anticuerpo que presenta especificidad para CD39, para su uso en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA) quimiorresistente en un paciente que lo necesita, en el que la leucemia es resistente a citarabina (AraC).

En particular, la presente invención se define por las reivindicaciones. Las referencias a los métodos de

tratamiento en esta descripción deben interpretarse como referencias a los compuestos, a las composiciones farmacéuticas y a los medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

5 Descripción detallada de la invención

Los inventores han establecido un potente modelo preclínico para seleccionar respuestas *in vivo* a genotóxicos convencionales y para imitar la quimiorresistencia y la enfermedad residual mínima, tal como se observa en pacientes con LMA después de una quimioterapia (Farge T., Sarry J.E. *et al.*, Chemotherapy resistant human acute myeloid leukemia cells are not enriched for leukemic stem cells but require oxidative metabolism, CANCER DISCOVERY, 2017). Basándose en este modelo y en la hipótesis actual de que las células resistentes a AraC son poco frecuentes, están replicativamente latentes y están bien adaptadas a condiciones hipóxicas, los inventores también han analizado todas estas características en ratones con xenoinjertos de pacientes tratados con AraC. Primero confirmaron que la población de células CD34+CD38- aumenta después de una quimioterapia con AraC en células de LMA residuales. De modo sorprendente, los inventores han descubierto que un tratamiento con AraC mata por igual a células en circulación y quiescentes, así como LSC *in vivo*. De modo sorprendente, las células preexistentes y persistentes resistentes a citarabina muestran niveles altos de especies de oxígeno reactivas, muestran una mayor masa mitocondrial, y conservan mitocondrias polarizadas activas, lo cual es coherente con un elevado estado de fosforilación oxidativa (OXFOS) (Farge T., Sarry J.E. *et al.*, Chemotherapy resistant human acute myeloid leukemia cells are not enriched for leukemic stem cells but require oxidative metabolism, CANCER DISCOVERY, 2017). Además, observaron que la quimioterapia con AraC induce la muerte celular apoptótica *in vivo*, y han identificado una firma de 15 genes (entre 350 genes, que incluyen CD39), que se expresa de modo más diferenciado en los tres xenoinjertos de pacientes con LMA después de un tratamiento con AraC, comparado con muestras control empleando sus modelos de PDX *in vivo* acoplados a un análisis de la expresión génica. Por último, los inventores demuestran que el mecanismo de resistencia a la citarabina implica un diálogo cruzado dependiente de CD39 entre el nicho energético y las funciones mitocondriales de LMA a través del eje de señalización CD39-P2Y13-cAMP-PKA.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención se refiere a un inhibidor del eje de señalización CD39-P2Y13-cAMP-PKA para su uso en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA) quimiorresistente en un paciente que lo necesita, en el que la leucemia es resistente a citarabina, y en el que el inhibidor es un anticuerpo que tiene especificidad por CD39.

Un segundo objeto de la presente invención es un inhibidor del eje de señalización CD39-P2Y13-cAMP-PKA para su uso en la prevención de la recaída de un paciente que padece LMA que ha sido tratado con quimioterapia, en el que la quimioterapia consiste en citarabina, y en el que el inhibidor es un anticuerpo que tiene especificidad por CD39.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "leucemia mieloide aguda" o "leucemia mielógena aguda" ("LMA") se refiere a un cáncer de la línea mieloide de células sanguíneas, que se caracteriza por el rápido crecimiento de leucocitos anómalos que se acumulan en la médula ósea e interfieren con la producción de células sanguíneas normales.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "leucemia mieloide aguda quimiorresistente" se refiere a la situación clínica en un paciente que padece leucemia mieloide aguda, en la cual la proliferación de las células del cáncer no puede prevenirse ni inhibirse mediante un agente quimioterapéutico o una combinación de agentes quimioterapéuticos que se emplean habitualmente para tratar la LMA, a una dosis aceptable para el paciente. La leucemia puede ser intrínsecamente resistente antes de la quimioterapia, o la resistencia puede adquirirse durante el tratamiento de una leucemia que inicialmente era sensible a la quimioterapia.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "agente quimioterapéutico" se refiere a cualquier agente químico con utilidad terapéutica en el tratamiento del cáncer. Los agentes quimioterapéuticos, tal como se emplean en la presente, incluyen agentes químicos y biológicos. Estos agentes actúan inhibiendo una actividad celular de la cual depende la célula del cáncer para su supervivencia continuada. Las categorías de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes/alcaloides, antimetabolitos, hormonas o análogos de hormonas, y una miscelánea de fármacos antineoplásicos. La mayoría, sino todos, estos fármacos son directamente tóxicos para las células del cáncer y no requieren de una estimulación inmunológica. Los agentes quimioterapéuticos adecuados se describen, por ejemplo, en Slapak y Kufe, Principles of Cancer Therapy, capítulo 86 en Harrison's Principles of Internal Medicine, 14ª edición; Perry *et al.*, Chemotherapeutic, capítulo 17 en Abeloff, Clinical Oncology, 2ª ed., 2000, ChrchillLivingstone, Inc.; Baltzer L. y Berkery R. (eds), Oncology Pocket Guide to Chemotherapeutic, 2ª ed., St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer D. S., Knopf M. F., Durivage H. J. (eds), The Cancer Chemotherapeutic Handbook, 4ª ed., St. Louis, Mosby-Year Handbook. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico es citarabina (citosina arabinósido, Ara-C, Cytosar-U), quizartinib (AC220), sorafenib (BAY 43-9006), lestaurtinib (CEP-701), midostaurina (PKC412), carboplatino, carmustina, clorambucilo, dacarbazina, ifosfamida, lomustina, mecloretamina, procarbazona, pentostatina, (2'-desoxicoformicina), etopósido, tenipósido, topotecano, vinblastina, vincristina, paclitaxel, dexametasona, metilprednisolona, prednisona, ácido

trans-retinoico total, trióxido de arsénico, interferón-alfa, rituximab (Rituxan®), gemtuzumab ozogamicina, mesilato de imatinib, Cytosar-U), melfalano, busulfano (Myleran®), tiotepa, bleomicina, platino (cisplatino), ciclofosfamida, Cytoxan®), daunorubicina, doxorubicina, idarubicina, mitoxantrona, 5-azacitidina, cladribina, fludarabina, hidroxiurea, 6-mercaptopurina, metotrexato, 6-tioguanina, o cualquiera de sus combinaciones. En algunas realizaciones, la leucemia es resistente a una combinación de daunorubicina o idarubicina, más citarabina (AraC). Según la invención, la leucemia es resistente a citarabina (AraC).

Tal como se emplea en la presente, el término "tratamiento" o "tratar" se refiere a un tratamiento profiláctico o preventivo, así como un tratamiento curativo o modificador de la enfermedad, que incluye el tratamiento de un paciente en riesgo de contraer la enfermedad o sospechoso de haber contraído la enfermedad, así como pacientes que están enfermos o que han sido diagnosticados como que sufren una enfermedad o trastorno médico, e incluye la supresión de la recaída clínica. El tratamiento puede administrarse a un paciente que padece un trastorno médico o que, en último término, puede adquirir el trastorno, para prevenir, curar, retrasar la aparición, reducir la gravedad o mejorar uno o más síntomas de un trastorno o un trastorno recurrente, o para prolongar la supervivencia de un paciente más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento. Un "régimen terapéutico" significa el patrón de tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, el patrón de dosificación usado durante la terapia. Un régimen terapéutico puede incluir un régimen de inducción y un régimen de mantenimiento. La expresión "régimen de inducción" o "periodo de inducción" se refiere a un régimen terapéutico (o la porción de un régimen terapéutico) que se emplea para el tratamiento inicial de una enfermedad. El objetivo general de un régimen de inducción es proporcionar un alto nivel de fármaco de un paciente durante el periodo inicial de un régimen de tratamiento. Un régimen de inducción puede emplear (en parte o en su totalidad) un "régimen de carga", que puede incluir administrar una dosis mayor del fármaco que la que emplearía un médico durante un régimen de mantenimiento, administrar un fármaco con más frecuencia que la que emplearía un médico para administrar el fármaco durante un régimen de mantenimiento, o ambos. La expresión "régimen de mantenimiento" o "periodo de mantenimiento" se refiere a un régimen terapéutico (o la porción de un régimen terapéutico) que se emplea para el mantenimiento de un paciente durante el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, para mantener al paciente en remisión durante largos periodos de tiempo (meses o años). Un régimen de mantenimiento puede emplear una terapia continua (por ejemplo, administrar un fármaco a intervalos regulares, por ejemplo, cada semana, cada mes, cada año, etc.) o una terapia intermitente (por ejemplo, un tratamiento interrumpido, un tratamiento intermitente, un tratamiento durante la recaída, o un tratamiento tras alcanzar unos criterios predeterminados concretos [por ejemplo, dolor, manifestación de la enfermedad, etc.]).

El método de la presente invención es particularmente adecuado para evitar la recaída de un paciente que padece LMA que ha sido tratado con quimioterapia, que es AraC.

Tal como se emplea en la presente, el término "recaída" se refiere al retorno del cáncer después de un periodo de mejoría en el cual no se ha podido detectar el cáncer. Por tanto, el método de la presente invención es particularmente adecuado para evitar la recaída después de un tratamiento putativamente exitoso con quimioterapia, que es AraC.

En algunos aspectos de la descripción, el inhibidor del eje de señalización CD39-P2Y13-cAMP-PKA es un inhibidor de CD39.

Tal como se emplea en la presente, el término "CD39" tiene su significado general en la técnica y se refiere a la proteína CD39, también denominada ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-1 (ENTPD1). La CD39 es una ectoenzima que hidroliza ATP/UTP y ADP/UDP para producir los respectivos nucleósidos, tales como AMP. Por consiguiente, la expresión "inhibidor de CD39" se refiere a un compuesto que inhibe la actividad o la expresión de CD39.

En algunos aspectos de la descripción, el inhibidor del eje de señalización CD39-P2Y13-cAMP-PKA es un inhibidor de P2Y13.

Tal como se emplea en la presente, el término "P2Y13" tiene su significado general en la técnica y se refiere a la proteína al purinorreceptor 13 de P2Y. El P2Y13 pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G. Esta familia posee varios subtipos de receptores con diferente selectividad farmacológica, que se solapa en algunos casos, por diversos nucleótidos de adenosina y uridina. Hasta la fecha se han clonado 8 receptores de P2Y en seres humanos: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 y P2Y14. P2Y13 es activado por ADP. Un ejemplo de una secuencia de ácido nucleico humana está accesible en GenBank con el número de registro NM 023914 o NM 028808. Un ejemplo de una secuencia de ácido nucleico humana está accesible en GenBank con el número de registro NP 795713 o NP 083084.

Según la invención, el inhibidor de CD39 es un anticuerpo que tiene especificidad por CD39.

En algunos aspectos de la descripción, el inhibidor de P2Y13 es un anticuerpo que tiene especificidad por P2Y13.

Tal como se emplea en la presente, el término "anticuerpo" se emplea, por tanto, para referirse a cualquier molécula similar a un anticuerpo que tiene una región de unión al antígeno, y este término incluye fragmentos de anticuerpos que comprenden un dominio de unión al antígeno, tales como Fab', Fab, F(ab')₂, anticuerpos de dominio único (DAB), dímero TandAbs, Fv, scFv (Fv monocatenario), dsFv, ds-scFv, Fd, anticuerpos lineales, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos, bicuerpos, tricuerpos (fusiones de scFv-Fab, biespecíficas o triespecíficas, respectivamente); sc-diacuerpo; kappa(lambda)cuerpos (fusiones de scFv-CL); BiTE (plataforma "Bispecific T-cell Engager", tándems de scFv-scFv para atraer a células T); DVD-Ig (anticuerpo de dominio variable dual, formato biespecífico); SIP (inmunoproteína pequeña, un tipo de minicuerpo); SMIP ("small modular immunopharmaceutical", producto inmunofarmacéutico modular pequeño, dímero de scFv-Fc; DART (ds-diacuerpo estabilizado mediante bicatenarización, "Dual Affinity ReTargeting"); miméticos de anticuerpos pequeños que comprenden una o más CDR, y similares. Las técnicas para preparar y usar diversas construcciones y fragmentos basados en anticuerpos son muy conocidas en la técnica (véase Kabat *et al.*, 1991).

Los diacuerpos, en particular, se describen más a fondo en los documentos EP 404.097 y WO 93/11161, mientras que los anticuerpos lineales se describen más a fondo en Zapata *et al.* (1995). Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales. Por ejemplo, pueden generarse fragmentos F(ab')₂ tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ resultante puede tratarse para reducir los puentes disulfuro para producir fragmentos Fab'. Una digestión con papaína puede conducir a la formación de fragmentos Fab. Los fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, Fv, dsFv, Fd, dAbs, TandAbs, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos y otros fragmentos también pueden sintetizarse mediante técnicas recombinantes o pueden sintetizarse de modo químico. Las técnicas para producir fragmentos de anticuerpos son muy conocidas y se describen en la técnica. Por ejemplo, cada uno de Beckman *et al.*, 2006; Holliger y Hudson, 2005; Le Gall *et al.*, 2004; Reff y Heard, 2001; Reiter *et al.*, 1996; y Young *et al.*, 1995, describen más a fondo y permiten la producción de fragmentos de anticuerpos eficaces.

Tal como se emplea en la presente, el término "especificidad" se refiere a la capacidad de un anticuerpo para unirse, de modo detectable, a un epítipo presente en un antígeno, tal como CD39 o P2Y13, al mismo tiempo que presenta una reactividad relativamente poco detectable con proteínas o estructuras que no son CD39 o P2Y13 (tales como otras proteínas presentes en células leucémicas). La especificidad puede determinarse relativamente mediante ensayos de unión o de unión competitiva usando, por ejemplo, instrumentos Biacore, tal como se describe en otro punto en la presente. La especificidad puede mostrarse en una proporción de aproximadamente 10:1, aproximadamente 20:1, aproximadamente 50:1, aproximadamente 100:1, 10.000:1 o mayor de afinidad/avidez en la unión al antígeno específico frente a la unión no específica a otras moléculas irrelevantes (en este caso, el antígeno específico es un polipéptido de CD39 o P2Y13). El término "afinidad", tal como se emplea en la presente, significa la potencia de la unión de un anticuerpo a un epítipo. La afinidad de un anticuerpo viene dada por la constante de disociación K_d, definida como $[Ab] \times [Ag]/[Ab-Ag]$, en la que [Ab-Ag] es la concentración molar del complejo de anticuerpo-antígeno, [Ab] es la concentración molar del anticuerpo no unido, y [Ag] es la concentración molar del antígeno no unido. La constante de afinidad K_a se define mediante $1/K_d$. Pueden encontrarse métodos preferidos para determinar la afinidad de los mAb en Harlow, *et al.*, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Coligan *et al.*, eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y. (1992, 1993); y Muller, Meth. Enzymol., 92:589-601 (1983).

Un método preferido y convencional muy conocido en la técnica para determinar la afinidad de los mAbs es el uso de instrumentos Biacore.

En los anticuerpos naturales, dos cadenas pesadas están unidas entre sí mediante enlaces disulfuro, y cada cadena pesada está unida a una cadena ligera mediante un enlace disulfuro. Existen dos tipos de cadenas ligeras, lambda (l) y kappa (k). 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 diferenciados. 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 las cadenas ligera (VL) y pesada (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad de unión al antígeno. Los dominios de región constante de las cadenas ligera (CL) y pesada (CH) confieren importantes propiedades biológicas, tales como la asociación de cadenas de anticuerpos, la secreción, la movilidad transplacentaria, la unión al complemento, y la unión a receptores de 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 combinación del anticuerpo y el determinante antigénico. Los sitios de combinación del anticuerpo están formados por restos que proceden principalmente de las regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad ("complementarity determining regions", CDR). A veces, los restos procedentes de regiones no hipervariables o de marco ("framework regions", FR) influyen en la estructura global del dominio y, por tanto, en el sitio de combinación. Las regiones determinantes de la complementariedad o CDR se refieren a secuencias de aminoácidos que, juntas, definen la afinidad de unión y la especificidad de una región Fv natural de un sitio de unión a inmunoglobulina nativo. 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. Por tanto, un sitio de unión al antígeno incluye seis CDR, que comprenden el conjunto de CDR procedente de cada una de una región V de cadena pesada y de cadena ligera. Las regiones de marco (FR) se refieren a las secuencias de aminoácidos interpuestas entre las CDR.

5 El término "Fab" indica un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión a un antígeno, en el que aproximadamente la mitad del extremo N-terminal de la cadena H y la cadena L entera, entre los fragmentos obtenidos tratando una IgG con una proteasa, la papaína, están unidas entre sí a través de un enlace disulfuro.

10 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 un antígeno, que es ligeramente mayor que el Fab unido a través de un enlace disulfuro de la región bisagra, entre los fragmentos obtenidos tratando una IgG con una proteasa, la pepsina.

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

20 Un polipéptido de Fv monocatenario ("single chain Fv", scFv) es un heterodímero de VH::VL unido de modo covalente que habitualmente se expresa a partir de una fusión génica que incluye genes que codifican VH y VL unidos mediante un conector que codifica un péptido. Un "dsFv" es un heterodímero de VH::VL estabilizado mediante un enlace disulfuro. Pueden formarse fragmentos de anticuerpos divalentes y multivalentes de modo espontáneo mediante la asociación de scFv monovalentes, o pueden generarse acoplando scFv monovalentes mediante un conector peptídico, tal como sc(Fv)₂ divalente.

25 El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión al antígeno, y dichos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante el uso de un conector que es demasiado corto como para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a que se apareen con los dominios complementarios de otra cadena y se crean dos sitios de unión al antígeno.

30 Pueden generarse anticuerpos monoclonales usando el método de Kohler y Milstein (Nature, 256:495, 1975). Para preparar anticuerpos monoclonales útiles en la invención, un ratón u otro animal hospedante apropiado se inmuniza a intervalos adecuados (por ejemplo, dos veces semanales, una vez a la semana, dos veces al mes o una vez al mes) con las formas antigénicas apropiadas (concretamente, CD39 o una célula que expresa CD39).
35 Después del régimen de inmunización, se aíslan los linfocitos del bazo, los nódulos linfáticos u otro órgano del animal y se condensan con una línea de células de mieloma adecuada usando un agente, tal como polietilenglicol, para formar un hibridoma. Después de la fusión, las células se colocan en un medio que permite el crecimiento de los hibridomas, pero no de los compañeros de fusión, usando métodos convencionales. Después del cultivo de los hibridomas, se analizan los sobrenadantes de las células para detectar la presencia
40 de anticuerpos con la especificidad deseada, es decir, que se unan selectivamente al antígeno. Las técnicas analíticas adecuadas incluyen ELISA, citometría de flujo, inmunoprecipitación y transferencia Western. Otras técnicas de selección son muy conocidas en la técnica. Las técnicas preferidas son las que confirman la unión de los anticuerpos a un antígeno nativamente plegado y conformacionalmente intacto, tales como ELISA no desnaturizante, citometría de flujo e inmunoprecipitación. De modo significativo, tal como se conoce en la
45 técnica, solo una pequeña porción de la molécula de un anticuerpo, el paratopo, está implicada en la unión del anticuerpo a su epítipo (véase, en general, Clark, W. R. (1986), The Experimental Foundations of Modern Immunology, Wiley & Sons, Inc., Nueva York; Roitt, I. (1991), Essential Immunology, 7ª ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford). Las regiones Fc' y Fc, por ejemplo, son efectores de la cascada del complemento, pero no están implicados en la unión al antígeno. Un anticuerpo del cual ha sido escindida enzimáticamente la región
50 pFc', o que se ha producido sin la región pFc', denominado fragmento F(ab')₂, conserva ambos sitios de unión al antígeno de un anticuerpo intacto. De modo similar, un anticuerpo del cual ha sido escindida enzimáticamente la región Fc, o que se ha producido sin la región Fc, denominado fragmento Fab, conserva uno de los sitios de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo intacta. Prosiguiendo, los fragmentos Fab consisten en una cadena ligera de anticuerpo y una porción de la cadena pesada del anticuerpo denominada Fd unidas
55 covalentemente. Los fragmentos Fd son el principal determinante de la especificidad del anticuerpo (un único fragmento Fd puede estar asociado hasta con diez cadenas ligeras diferentes sin alterar la especificidad del anticuerpo), y los fragmentos Fd conservan la capacidad de unión al epítipo en aislamiento.

60 En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Tal como se emplea en la presente, "humanizado" describe anticuerpos en los algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de las regiones CDR son reemplazados por los correspondientes aminoácidos derivados de moléculas de inmunoglobulina humanas. Los métodos de humanización incluyen, pero no se limitan a los descritos en las patentes de EE. UU. n.ºs 4.816.567, 5.225.539, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 5.859.205.

65 En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano. Los anticuerpos monoclonales totalmente humanos también pueden prepararse inmunizando ratones transgénicos para porciones grandes de

loci de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina humana. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.591.669, 5.598.369, 5.545.806, 5.545.807, 6.150.584, y las referencias citadas en estos documentos.

Estos animales han sido genéticamente modificados de modo que existe una delección funcional en la producción de anticuerpos endógenos (por ejemplo, murinos). Los animales se modifican aún más para que contengan todo o una porción del locus del gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana, de modo que la inmunización de estos animales dé como resultado la producción de anticuerpos totalmente humanos contra el antígeno de interés. Después de la inmunización de estos ratones (por ejemplo, XenoMouse (Abgenix), ratones HuMAb (Medarex/GenPharm)), pueden prepararse anticuerpos monoclonales según la tecnología del hibridoma convencional. Estos anticuerpos monoclonales tendrán secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas humanas y, por tanto, no provocarán respuestas de anticuerpos antirratón humanos (KAMA) cuando se administran a seres humanos. También existen métodos *in vitro* para producir anticuerpos humanos. Estos incluyen la tecnología de presentación de fagos (patentes de EE. UU. n.ºs 5.565.332 y 5.573.905) y la estimulación *in vitro* de células B humanas (patentes de EE. UU. n.ºs 5.229.275 y 5.567.610).

El anticuerpo de la presente descripción puede ser de cualquier isotipo. La elección del isotipo generalmente vendrá guiada por las funciones efectoras deseadas, tales como la inducción de ADCC. Los ejemplos de isotipos son IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Pueden usarse cualquiera de las regiones constantes de cadena ligera humanas kappa o lambda. Si se desea, la clase de un anticuerpo monoclonal humano de la presente invención puede intercambiarse mediante métodos conocidos. Generalmente, pueden usarse técnicas de intercambio de clase para convertir una subclase de IgG en otra, por ejemplo, de IgG1 a IgG2. Así, la función efectora de los anticuerpos monoclonales humanos de la presente invención puede cambiarse mediante intercambio de isotipo, por ejemplo, a un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, o IgM para diversos usos terapéuticos. En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo de longitud completa. En algunas realizaciones, el anticuerpo de longitud completa es un anticuerpo IgG1. En algunas realizaciones, el anticuerpo de longitud completa es un anticuerpo IgG4. En algunas realizaciones, el anticuerpo IgG4 específico de OX1R es un anticuerpo IgG4 estabilizado. Los ejemplos de anticuerpos IgG4 estabilizados adecuados son anticuerpos en los que la arginina en la posición 409 en una región constante de cadena pesada de IgG4 humana, que se indica en el índice EU como en Kabat *et al.*, supra, está sustituida por lisina, treonina, metionina o leucina, preferiblemente lisina (descrito en el documento WO2006033386) y/o en los que la región bisagra comprende una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys. Otros anticuerpos IgG4 estabilizados adecuados se describen en el documento WO2008145142.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano de la presente invención es un anticuerpo de un tipo que no es IgG4, por ejemplo, IgG1, IgG2 o IgG3 que ha sido mutado de modo que la capacidad para mediar en funciones efectoras, tales como ADCC, se ha reducido o incluso eliminado. Estas mutaciones se han descrito, por ejemplo, en Dall'Acqua W.F. *et al.*, J. Immunol., 177(2):1129-1138 (2006); y Hezareh M., J. Virol., 75(24):12161-12168 (2001).

Los anticuerpos monoclonales que son inhibidores de CD39 son muy conocidos en la técnica e incluyen los descritos en la solicitud de patente internacional WO 2009095478, WO2012085132 y en las siguientes publicaciones: Bonnefoy N., Bastid J., Alberici G., Bensussan A., Eliaou J.F., CD39: A complementary target to immune checkpoints to counteract tumor-mediated immunosuppression, Oncoimmunology, 3 de febrero de 2015, 4(5):e1003015. eCollection mayo de 2015; Bastid J., Regairaz A., Bonnefoy N., Déjou C., Giustiniani J., Laheurte C., Cochaud S., Laprevotte E., Funck-Brentano E., Hemon P., Gros L., Bec N., Larroque C., Alberici G., Bensussan A., Eliaou J.F., Inhibition of CD39 enzymatic function at the surface of tumor cells alleviates their immunosuppressive activity, Cancer Immunol Res., marzo de 2015, 3(3):254-265.

En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monocatenario. Tal como se emplea en la presente, la expresión "anticuerpo de dominio único" tiene el significado general en la técnica y se refiere al dominio variable de cadena pesada único de anticuerpos del tipo que puede encontrarse en mamíferos camélido que, en la naturaleza, están exentos de cadenas ligeras. Dichos anticuerpos de dominio único también son "Nanobody®". Para una descripción general de anticuerpos de dominio (único), se remite a la técnica anterior citada anteriormente, así como al documento EP 0 368 684, Ward *et al.* (Nature, 12 de octubre de 1989, 341 (6242):544-546); Holt *et al.*, Trends Biotechnol., 2003, 21(11):484-490; y los documentos WO 06/030220, WO 06/003388. Puede considerarse que la secuencia de aminoácidos y la estructura del anticuerpo de dominio único está formada por cuatro regiones de marco o "FR" que se denominan en la técnica y en la presente como "región de marco 1" o "FR1"; "región de marco 2" o "FR2"; "región de marco 3" o "FR3"; y "región de marco 4" o "FR4", respectivamente; y dichas regiones de marco están interrumpidas por tres regiones determinantes de la complementariedad o "CDR", que se denominan en la técnica "región determinante de la complementariedad 1" o "CDR1"; "región determinante de la complementariedad 2" o "CDR2", y "región determinante de la complementariedad 3" o "CDR3", respectivamente. Por consiguiente, el anticuerpo de dominio único puede definirse como una secuencia de aminoácidos con la estructura general: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, en la que FR1 a FR4 se refieren a las regiones de marco 1 a 4, respectivamente, y en la que CDR1 a CDR3 se refieren a las regiones determinantes de la complementariedad 1 a 3.

En algunos aspectos de la descripción, el inhibidor de CD39 es un inhibidor de la expresión de CD39. En algunas realizaciones, el inhibidor de P2Y13 es un inhibidor de la expresión de P2Y13. Un "inhibidor de la expresión" se refiere a un compuesto natural o sintético que tiene un efecto biológico para inhibir la expresión de un gen. En un aspecto preferido de la descripción, dicho inhibidor de la expresión de un gen es un ARNip, un oligonucleótido antisentido o una ribozima. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido, que incluyen moléculas de ARN antisentido y moléculas de ADN antisentido, actuarían para bloquear directamente la traducción del ARNm de CD39 o P2Y13 uniéndose a él y, por tanto, evitando la traducción de proteínas o aumentando la degradación del ARNm, disminuyendo con ello el nivel de CD39 y, por tanto, la actividad, en una célula. Por ejemplo, pueden sintetizarse oligonucleótidos antisentido de al menos aproximadamente 15 bases y complementarios con regiones exclusivas de la secuencia del transcrito de ARNm que codifica CD39 o P2Y13, por ejemplo, mediante técnicas de fosfodiéster convencionales. Los métodos para usar técnicas antisentido para inhibir específicamente la expresión de genes cuya secuencia es conocida son muy conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 6.566.135; 6.566.131; 6.365.354; 6.410.323; 6.107.091; 6.046.321; y 5.981.732). Los ARN inhibidores pequeños (ARNip) también pueden actuar como inhibidores de la expresión para su uso en la presente invención. La expresión del gen de CD39 o P2Y13 puede reducirse poniendo en contacto un sujeto o una célula con un ARN bicatenario pequeño (ARNbp), o un vector o una construcción que provoque la producción de un ARN bicatenario pequeño, de modo que la expresión del gen de CD39 o P2Y13 se inhibe específicamente (es decir, ARN de interferencia o ARNi). Los oligonucleótidos antisentido, ARNip, ARNhp y las ribozimas de la invención pueden administrarse *in vivo* por sí solos o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia del ácido nucleico de oligonucleótido antisentido, ARNip, ARNhp, o ribozima a las células, y generalmente, a células que expresan CD39 o P2Y13. Generalmente, el vector transporta el ácido nucleico a las células con degradación reducida, con relación al grado de degradación que se produciría en ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la descripción incluyen, pero no se limitan a plásmidos, fágmidos, virus, otros vehículos derivados de fuentes víricas o bacterianas que han sido manipulados mediante la inserción o la incorporación de las secuencias de ácidos nucleicos de oligonucleótidos antisentido, ARNip, ARNhp o ribozimas. Los vectores víricos son un tipo preferido de vector e incluyen, pero no se limitan a secuencias de ácidos nucleicos procedentes de los siguientes virus: retrovirus, tales como el virus de la leucemia murina de Moloney, virus del sarcoma murino de Harvey, virus del tumor mamario murino, y virus del sarcoma de Rous; adenovirus, virus adenoasociados; virus de tipo SV40; virus de polio; virus de Epstein-Barr; virus de papiloma; herpesvirus; virus de vaccinia; poliovirus; y virus de ARN, tales como un retrovirus. Se pueden emplear con facilidad otros vectores no mencionados, pero conocidos en la técnica.

En algunos aspectos de la descripción, el inhibidor de P2Y13 se selecciona del grupo que consiste en derivados de PPADS (piridoxal-5'-fosfato-6-azo-fenil-2,4-disulfonato), descritos en Kim *et al.* (2005), *Biochem. Pharmacol.*, 70:266-274, tales como análogos de PPADS modificados mediante la sustitución del anillo de fenilazo, que incluyen una sustitución de halo y nitro, y análogos de 5'-alquilfosfonato. Se prefieren los derivados de 6-(3-nitrofenilazo) de piridoxal-5'-fosfato, el análogo de 2-cloro-5-nitro (MRS 2211) y el análogo de 4-cloro-3-nitro (MRS 2603). Otros ejemplos de compuestos son NF023, TNP-ATP, suramina, PPADS, DIDS (ácido 4,4'-diisotiocianatoestilben-2,2'-disulfónico), Ip5I y PPNDs. El compuesto ARC67085 es otro ejemplo de un compuesto preferido (Wang (2005), *Circ. Res.*, 96(2):189-196). Los antagonistas de P2Y13 pueden identificarse como se describe en el documento US 6.946.244.

En algunos aspectos de la descripción, el inhibidor del eje de señalización CD39-P2Y13-cAMP-PKA se selecciona del grupo que consiste en suramina, adenosina 5'-trifosfato oxidada con peryodato ("ATP oxidado"), azul brillante G ("BBG"), hexametilnamilorida ("HMA"), diinosina pentafofato ("Ip5I"), ácido piridoxal-5'-fosfato-6-azofenil-2',5'-disulfónico ("isoPPADS"), 1-[N,O-bis(5-isoquinolinsulfonil)-N-metil-L-tirosil]-4-fenilpiperazina ("KN-62"), piridoxal-5'-fosfato-6-azofenil-4'-carboxilato ("MRS 2159"), 8,8'-(carbonil-bis(imino-3,1-fenilencarbonilimino)bis(1,3,5-naftalentrifosfónico) ("NF023"), ácido 8,8'-(carbonil-bis(imino-4,1-fenilencarbonilimino-4,1-fenilencarbonilimino)bis(1,3,5-naftalentrifosfónico) ("NF279"), piridoxal-5'-fosfato-6-(2'-naftilazo-6-nitro-4',8'-disulfonato) ("PPNDs"), azul reactivo 2 ("RB-2"), 2',3'-O-(2,4,6-trinitrofenil) adenosina trifosfato ("TNP-ATP"), adenosina 3'-fosfato 5'-fosfosulfato ("A3P5PS"), 2'-desoxi-N-6-metiladenosin-3',5'-bisfosfato ("MRS 2179"), (N)-metanocarba-N-6-metil-2-cloro-2'-desoxiadenosin-3',5'-bisfosfato ("MRS 2279"), ácido piridoxal-5'-fosfato-6-azofenil-2',4'-disulfónico ("PPADS"), ácido N6-[2-(metiltio)etil]-2-(3,3,3-trifluoropropil)tio-5'-adenílico ("AR-C69931MX"), N1-(6-etoxi-1,3-benzotiazol-2-il-2-(7-etoxi-4-hidroxi-2,2-dioxo-2H-2-benzo[4,5][1,3]tiazolo[2,3-c]-[1,2,4]tiadiazin-3-il)-2-oxo-1-etansulfonamida ("C1330-7"), 2-metiloadenosin-5'-monofosfato ("2-MeSAMP"), 8-ciclopentil-1,3-dimetilxantina ("CPT"), 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina ("CPX"), 3-(3-yodo-4-aminobencil)-8-(4-oxiacetato)-fenil-1-propilxantina ("I-ABOPX"), 1,3-dietil-8-(3,4-dimetoxifeniletíl)-7-metil-3,7-dihidro-1H-purin-2,6-diona ("KW 6002"), 2-metil-6-fenil-4-feniletinil-1,4-(+)-dihidropiridin-3,5-dicarboxilato de 3-etilo y 5-bencilo ("MRS 1191"), 2,3-dietil-4,5-dipropil-6-fenilpiridin-3-tiocarboxilato-5-carboxilato ("MRS 1523"), 9-cloro-2-(2-furil)-5-fenilacetilamin-o[1,2,4]-triazolo[1,5-c]quinazolina ("MRS 1220"), N6-ciclopentil-9-metiladenina ("N-0840"), N-(2-metoxifenil)-N'-(2-(3-piridil)quinazolin-4-il)urea ("VUF 5574"), 8-(N-metilisopropil)amino-N-(5'-endohidroxi-endonorbornil)-9-metiladenina ("WRC-0571"), 8-[4-(((2-aminoetil)amino)carbonil)metil]oxi]fenil]-1,3-dipropilxantina, congénere de xantinamina ("XAC"), 8-[4-(((4-ciano)fenilcarbamoil)metil]oxi]fenil]-1,3-di-(n-propil)xantina ("MRS 1754"), 8-(3-cloroestiril)cafeína, y aloxazina.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" del inhibidor como se describió anteriormente significa una cantidad suficiente para proporcionar un efecto terapéutico. Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de los compuestos y las composiciones de la presente invención será decidido por el médico encargado dentro del alcance del criterio médico razonable. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente concreto dependerá de una diversidad de factores, que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto; el momento de la administración, la vía de administración y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o coincidentes con el polipéptido específico empleado; y factores similares conocidos en la técnica médica. Por ejemplo, dentro del conocimiento de la técnica se incluye iniciar las dosis del compuesto a unos niveles inferiores a los necesarios para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logra el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos puede variar a lo largo de un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por adulto diarios. Generalmente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación al sujeto que se va a tratar. Un medicamento generalmente contiene de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente, preferiblemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. Una cantidad eficaz del fármaco se suministra normalmente a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal diarios, en especial de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal diarios.

Generalmente, el inhibidor de la presente invención se combina con excipientes farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, con matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones farmacéuticas. "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refieren entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción contraria cuando se administran a un mamífero, en especial a un ser humano, según sea apropiado. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga sólida, semisólida o líquida, diluyente, material encapsulante o formulación auxiliar de cualquier tipo no tóxicos. Generalmente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estas pueden ser, en particular, disoluciones salinas estériles isotónicas (fosfato de monosodio o disodio, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares, o mezclas de dichas sales), o composiciones secas, en especial liofilizadas, que, tras la adición de agua esterilizada o disolución salina fisiológica, dependiendo del caso, permiten la constitución de disoluciones inyectables. Las formas farmacéuticas adecuadas para un uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación improvisada de dispersiones o disoluciones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que pueda administrarse con facilidad mediante una jeringa. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y conservación, y debe preservarse de la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando el inhibidor en la cantidad necesaria en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de una esterilización mediante filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados a un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios extraídos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son las técnicas de secado al vacío y liofilización, que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una disolución previamente esterilizada mediante filtración de este.

La invención se ilustrará más a fondo mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

Figuras

Figura 1. Identificación de nuevas dianas (por ejemplo, CD39/ENTPD1 y P2Y13) de la respuesta de resistencia a citarabina (AraC) temprana en células de LMA y análisis de su expresión génica en tejidos humanos, células hematopoyéticas normales y células de pacientes con LMA. (A) Análisis transcriptómico de células de LMA residuales humanas purificadas a partir de ratones con xenoinjertos tratados con AraC, comparado con ratones con xenoinjertos tratados con PBS/control (de Toni *et al.*, en preparación). (B) Expresión de los genes de ENTPD1 y P2Y13 en diversos tejidos humanos (de Dezso, BMC Biol., 2008). (C) Perfiles de expresión de ARNm de ENTPD1 y P2Y13 en un sistema mieloide normal humano y en LMA humanas de la base de datos HemaExplorer. (D) Coexpresión de los genes de ENTPD1 y P2Y13 en dos estudios transcriptómicos independientes de pacientes con LMA (MILE y METZLER).

Figura 2. Validación del aumento en CD39 después de citarabina (AraC) en 9 xenoinjertos derivados de pacientes, 45 pacientes con LMA y 2 xenoinjertos derivados de líneas celulares. (A) El número total de células de LMA humanas que expresan CD45, CD33 y CD44 en 9 xenoinjertos derivados de pacientes (PDX) se analizó y se cuantificó usando citometría de flujo en ratones con xenoinjertos tratados con AraC, comparado con ratones con xenoinjertos tratados con PBS en médula ósea y bazo. (B) Se realizó un análisis citométrico de flujo del

porcentaje de población de células inmaduras CD34⁺CD38⁻ en células de LMA CD45⁺CD33⁺ residuales viables humanas procedentes de ratones con xenoinjertos tratados con AraC, comparado con ratones con xenoinjertos tratados con PBS en médula ósea. (C) Se evaluó el porcentaje de células CD39⁺ en la población en masa y la población de células inmaduras CD34⁺CD38⁻ de células de LMA CD45⁺CD33⁺ residuales viables humanas procedentes de ratones con xenoinjertos tratados con AraC, comparado con ratones con xenoinjertos tratados con PBS en médula ósea mediante citometría de flujo. (D-E-F) De modo similar, se muestran análisis citométricos de flujo de 45 pacientes con LMA en sangre periférica en D35 (después de la quimioterapia) y en el diagnóstico para evaluar el porcentaje de blastos (D), de células inmaduras CD34⁺CD38⁻ (E), y de células residuales CD39⁺ en los blastos totales (masa) y la población CD34⁺CD38⁻ (F). (G-H) Análisis de citometría de flujo de 1 línea celular resistente (MOLM14) y 1 línea celular sensible (U937) derivadas de xenoinjertos (CLDX) para evaluar la carga total de células tumorales de células de LMA viables humanas en CLDX tratados con AraC y PBS (G), es el porcentaje de células CD39⁺ (H).

Figura 3. Estudio *in vitro* de la expresión de la proteína CD39 en células de LMA MOLM14 después de un tratamiento con citarabina (AraC) en normoxia (21%) e hipoxia (1%). (A) Análisis de la transferencia Western de la expresión de HIF-1alfa, VDAC, CD39, P2Y13, pATF2 y HSP90 (como control de carga) en células MOLM14 después de normoxia (21% de O₂) o hipoxia (1% de O₂) durante 24 h, 48 h o 72 h. Cada carril contiene 30 µg de proteína. (B-C-D) Las células MOLM14 se trataron con AraC (2 µM, CI50 en normoxia) durante 48 h en normoxia (21% de O₂) o hipoxia (1% de O₂). Se realizaron análisis citométricos de flujo para evaluar la viabilidad celular (B), expresión de CD39⁺ (C-D). Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes. Se evaluó la actividad ATPasa de CD39 en células MOLM14 después de un tratamiento con Ara-C y se determinó la concentración de ATP extracelular no hidrolizado usando el ensayo ATPlite (PerkinElmer) (E).

Figura 4. Efecto potenciador *in vitro* de ARL67156 (inhibidor de CD39) con citarabina (AraC) en la línea celular MOLM14. (A-B) Células MOLM14 se trataron o no se trataron con Ara-C 2 µM, ARL 100 µmol/l o 250 µmol/l de otro inhibidor de CD39, POM-1, durante 48 h. Se evaluó la viabilidad celular usando un ensayo de citometría de flujo basado en AnnexinV/7AAD. (C) La línea celular de LMA U937 se trató o no se trató con Ara-C 0,5 µM o ARL 100 µmol/l. Se analizó el porcentaje de células viables usando un ensayo de citometría de flujo basado en AnnexinV/7AAD.

Ejemplo

La resistencia a la quimioterapia es la principal barrera terapéutica en la leucemia mieloide aguda (LMA). La LMA es la leucemia de adultos más habitual. Se caracteriza por la expansión clonal de mieloblastos inmaduros y se inicia a partir de células madre leucémicas ("leukemic stem cells", LSC) poco habituales. A pesar de que se produce una alta tasa de remisión completa después de una quimioterapia de inducción de primera línea convencional (por ejemplo, daunorubicina, DNR, o idarubicina, IDA más citarabina, AraC), la prognosis es muy mala en la LMA. Hasta la fecha, la supervivencia global dentro de 5 años aún es de aproximadamente 30 al 40% en pacientes menores de 60 años, y menor que 20% en pacientes mayores de 60 años. Esto es el resultado de la alta frecuencia de recaídas distantes (50 y 85% antes y después de la edad de 60 años, respectivamente) provocadas por un recrescimiento tumoral iniciado por clones leucémicos quimiorresistentes ("chemoresistant leukemic clones", RLC) y que se caracteriza por una fase refractaria durante la cual ningún otro tratamiento ha demostrado ser eficaz hasta la fecha (Tallman *et al.*, 2005; Burnett *et al.*, 2011). La LMA es una de las malignidades hematológicas poco frecuentes para las cuales la terapia no ha mejorado significativamente durante los últimos 30 años, a pesar de los intensos esfuerzos de investigación. Por tanto, la comprensión de las causas de la quimiorresistencia es crucial para el desarrollo de nuevos tratamientos para erradicar las RLC para superar las recaídas de pacientes con LMA.

La biología de la resistencia terapéutica (eflujo de fármaco, enzimas de desintoxicación, inaccesibilidad del fármaco al nicho leucémico) representa un área activa de investigación en la actualidad. Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes a la quimiorresistencia de la LMA aún son poco conocidos, en especial *in vivo*. No obstante, cada vez más se reconoce que las causas de la quimiorresistencia y la recaída residen dentro de una pequeña población de células. En apoyo a esta idea, un reciente estudio clínico del equipo de los inventores ha demostrado que la presencia de niveles elevados de células CD34⁺CD38^{bajo/-}CD123⁺ en el diagnóstico se correlaciona con un resultado adverso en pacientes con LMA en términos de respuesta a la terapia y supervivencia global (Vergez *et al.*, 2011). En coherencia con estos datos, Ishikawa y colaboradores (2007) han observado que esta población también es la más resistente a AraC *in vivo*. Como un primer paso hacia el éxito de la erradicación terapéutica de estas RLC, ahora es necesario perfilar exhaustivamente sus características adquiridas e intrínsecas dominantes.

Hasta fechas recientes, se han utilizado muchos modelos de ratón de LMA para caracterizar la naturaleza y el origen de las LSC (en parte por el grupo de los inventores: Sánchez *et al.*, 2009; Sarry *et al.*, 2011), pero se ha empleado con menos frecuencia para estudiar su quimiorresistencia y enfermedad residual mínima *in vivo*, una estrategia que es crucial para mejorar el resultado terapéutico de pacientes con LMA. Por tanto, los inventores ensayaron y establecieron una dosis y un régimen de uso apropiados de la AraC como citotóxico de línea de

base en ratones NSG de los inventores con xenoinjerto de células de LMA primarias procedentes de pacientes observados en el diagnóstico o en la recaída de la enfermedad. Los inventores tienen acceso a una enorme fuente de muestras primarias a través del Biobanco del Departamento Clínico de Hematología del Hospital Oncopole en Toulouse (HIMIP, INSERM-U1037, aproximadamente 150 pacientes nuevos diagnosticados/año) y en colaboración con los doctores Gwen Danet-Desnoyers y Martin Carroll (Universidad de Pensilvania, Filadelfia, EE. UU.). Después, se analizaron células de LMA humanas que sobrevivieron a un tratamiento con AraC a lo largo del tiempo. De manera muy destacada, los inventores han demostrado una citorreducción significativa del injerto periférico y de la carga total de células tumorales en todos los pacientes ensayados con AraC y una duración variable (2-7 semanas) de la respuesta entre pacientes, como se observa en la clínica, lo cual demuestra que se ha establecido un poderoso modelo preclínico para seleccionar las respuestas *in vivo* a genotóxicos convencionales y para imitar la quimiorresistencia y la enfermedad residual mínima, tal como se observa en pacientes con LMA después de una quimioterapia (Farge T., Sarry J.E. *et al.*, Chemotherapy resistant human acute myeloid leukemia cells are not enriched for leukemic stem cells but require oxidative metabolism, CANCER DISCOVERY, 2017).

Basándose en este modelo y en la hipótesis actual de que las células resistentes a AraC son poco frecuentes, están replicativamente latentes y están bien adaptadas a condiciones hipóxicas (Ishikawa *et al.*, 2007; Raaijmakers, 2011; Wilson y Hay, 2011), los inventores también han analizado todas estas características en ratones con xenoinjertos de pacientes tratados con AraC. Primero confirmaron que la población de células CD34⁺CD38⁻ aumenta después de una quimioterapia con AraC en células de LMA residuales. De modo sorprendente, los inventores han descubierto que un tratamiento con AraC mata por igual a células en circulación y quiescentes, así como LSC *in vivo*. Además, se observó que una quimioterapia con AraC induce una muerte celular apoptótica dependiente de ROS/MMP *in vivo*, y que las células de LMA resistentes a AraC muestran características metabólicas y firmas génicas coherentes con un elevado estado de fosforilación oxidativa (OXFOS). Por último, identificaron una firma de 15 genes (entre 350 genes, que incluyen CD39/ENTPD1 y P2Y13) que se expresa de modo más diferenciado en los tres xenoinjertos derivados de pacientes con LMA después de un tratamiento con AraC, comparado con muestras control empleando sus modelos de PDX *in vivo* acoplados a un análisis de la expresión génica (figura 1a).

La CD39 es un nuevo jugador y diana del mecanismo de resistencia a AraC en la leucemia mieloide aguda *in vivo*. La CD39/ENTPD1 (ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-1) es una proteína de la membrana superficial, que participa en la vía de señalización de la adenosina. De hecho, CD39 disminuye el ATP extracelular (inductor inmunogénico) y genera adenosina inmunosupresora, que inhibe potentemente las respuestas inmunológicas del hospedante contra el cáncer. La CD39 también desempeña un papel en la inmunovigilancia y la respuesta inflamatoria. Además, aunque existen otras NTPDasas, CD39 parece ser la principal NTPDasa en los linfocitos T y las células T reguladoras (CD4 + CD25 + Foxp3 +) (Bastid *et al.*, 2013).

Recientes líneas de evidencias han revelado una alta expresión y actividad de CD39 en varios tumores sólidos o de la sangre (cáncer de cabeza y cuello, cáncer de tiroides, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de riñón, cáncer de testículos, y cáncer de ovarios), lo cual implica un papel potencial de esta enzima en el estímulo del crecimiento e infiltración tumoral (Bastid *et al.*, 2015). Además, la CD39 se detecta con frecuencia en células tumorales primarias, exosomas de cáncer, células endoteliales asociadas a tumores y blastos de LMA. La CD39 contribuye al microentorno inmunosupresor en la LMA (Dulphy *et al.*, 2014). De hecho, ciertos nucleótidos extracelulares (ATP, UTP) pueden inhibir el alojamiento y el injerto de LMA en ratones NSG (Salvestrini *et al.*, 2012). Por otra parte, la segunda diana P2Y13 pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G (un receptor de ADP purinérgico) que disminuye la ADP extracelular. El P2Y13 se sobreexpresa en monocitos humanos, células T y células dendríticas derivadas de monocitos de la sangre o médula ósea, lo cual sugiere que puede desempeñar un papel en la hematopoyesis y el sistema inmunológico. El P2Y13 desempeña un papel en la sobreexpresión del metabolismo de HDL-c (Goffinet *et al.*, 2014) y también desempeña un papel importante en el equilibrio de la diferenciación terminal de osteoblastos y adipocitos en progenitores de médula ósea (Biver *et al.*, 2013).

Como puede observarse en la figura 1b, el análisis de la expresión de CD39/ENTPD1 y P2Y13 en varios tejidos en seres humanos muestra un perfil de distribución en tejidos similares y una sobreexpresión concordante en la médula ósea y linfocitos. Además, CD39 y P2Y13 se coexpresan en células hematopoyéticas, como se ha analizado en la base de datos pública Hemaexplorer (figura 1c). A este respecto, sorprendentemente están sobreexpresados en monocitos normales y en células de pacientes con LMA (figura 1c). Por último, los inventores han demostrado coexpresión entre CD39 y P2Y13 en células de pacientes con LMA a partir de dos cohortes de pacientes independientes con datos de expresión de genes (estudios de MILE y METZLER; figura 1d). Esto sugiere que los pacientes con LMA pueden estratificarse en dos grupos, "alto y bajo", basándose en su expresión de los genes de CD39/P2Y13. Tomados conjuntamente, los datos preliminares de los inventores y las observaciones de la bibliografía, los inventores han intentado enfocarse en los niveles de expresión de CD39 en respuesta a un tratamiento con citarabina y explorar el eje de señalización que implica a CD39-P2Y13 en la quimiorresistencia de LMA.

Validación del aumento en la expresión de CD39 en 9 modelos de xenoinjertos derivados de pacientes (PDX)

tratados con citarabina, y en 45 pacientes con LMA en D35 comparado con el diagnóstico. Primero se examinó el efecto de AraC sobre la expresión de CD39 en células de LMA viables residuales procedentes del modelo de NSG con xenoinjerto de células de LMA primarias procedentes de 9 pacientes (figura 2a). En coherencia con lo que ya se ha demostrado, se produjo una significativa citorreducción de la carga total de células tumorales en médula ósea y bazo *in vivo* asociada con un aumento en la población de CD34⁺CD38⁻ después de un tratamiento con AraC en el modelo de PDX de los inventores (figura 2a). Además, se produce un aumento en el porcentaje de células CD39 no solo en masa, sino también en la población inmadura de CD34⁺CD38⁻ procedente de ratones tratados con AraC, comparado con ratones control (figura 2a). Según el modelo preclínico de los inventores, el análisis de 45 pacientes con LMA en el diagnóstico (DX) y después de una significativa reducción del tumor o remisión completa (D35) también mostró un aumento en la población de CD34⁺CD38⁻ y en células CD39 en la masa residual y en poblaciones inmaduras en el día 35 después del tratamiento con AraC (figura 2b). Después, se analizó la expresión de CD39 en dos xenoinjertos derivados de una línea de células de LMA, que confirmó los resultados previos en pacientes y PDX. De hecho, la expresión de CD39 aumenta en la línea de células sensibles (U937) después de un tratamiento con AraC, comparado con el modelo de CLDX tratado con vehículo, en coherencia con una significativa citorreducción de la carga total de células tumorales en la médula ósea y el bazo (figuras 2g-h).

Por otra parte, se observó cualquier reducción significativa en el tumor en el xenoinjerto derivado de la línea de células resistentes (MOLM14), asociada con una alta expresión de CD39 en los ratones vehículo, que parece ser comparable con el nivel de expresión de CD39 en la línea de células sensibles (U937) después de un tratamiento con AraC.

Aumento *in vitro* de la expresión de CD39 en la línea celular de LMA MOLM-14 después de un tratamiento con citarabina en normoxia e hipoxia. Después, se estableció un modelo de una línea de células de LMA para estudiar más a fondo este mecanismo. Usando la línea celular de LMA MOLM14 y condiciones hipóxicas (1% frente a 21% de O₂), se analizó la expresión de CD39 y la actividad hidrolizante de ATP (figura 3). Primero se observó la inducción de marcadores hipóxicos, tales como HIF1a y VDAC, así como CD39 de una manera dependiente del tiempo (figura 3a), que puede sugerir una conexión de CD39 con la función mitocondrial bajo hipoxia. Después, se confirmó que el tratamiento con AraC aumenta el porcentaje y la expresión de CD39 en células MOLM14 viables residuales en condiciones normóxicas e hipóxicas (figura 3b-d). De manera similar al aumento en la expresión de CD39 en células MOLM14, se observó una disminución significativa del ATP remanente después de AraC en condiciones normóxicas e hipóxicas, lo cual sugiere un aumento proporcional de la actividad hidrolizante de ATP de CD39 en células MOLM14 residuales de AraC (figura 3e). Nota de atención: la hipoxia no aumenta la actividad y la expresión superficial de CD39 (figura 3c-e) en condición basal (por ejemplo, en ausencia de AraC), mientras que aumenta la expresión de proteína de CD39 total (transferencia Western, figura 3a).

Efecto potenciador *in vitro* de un inhibidor de CD39 con citarabina en la línea celular MOLM14. Para explorar el efecto de CD39 sobre la quimiorresistencia a AraC en líneas de células de LMA *in vitro*, primero se ensayó la consecuencia de la inhibición de CD39 usando el inhibidor de ecto-ATPasa ARL67156 (no es parte de la invención reivindicada).

Aunque el inhibidor ARL67156 no indujo por sí solo la muerte celular (por ejemplo, en ausencia de AraC), se observó un efecto potenciador de ARL67156 con AraC en la línea celular Molm-14 (figura 4a). Por otra parte, otro inhibidor de CD39, POM-1 (no es parte de la invención reivindicada), no indujo un efecto potenciador en combinación con un tratamiento con AraC, sino que parece tener un efecto protector, lo cual sugiere la activación de un mecanismo compensatorio (figura 4b). Además, el tratamiento de la línea de células U937 con el inhibidor ARL67156 no potencia el efecto de AraC en la inducción de la muerte celular (figura 4c). Una alta activación de ADP y/o P2YR13 puede estar implicada en este mecanismo compensatorio y protector.

Referencias bibliográficas

A lo largo de esta solicitud, diversas referencias describen la técnica actual a la cual pertenece esta invención.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor del eje de señalización CD39-P2Y13-cAMP-PKA para su uso en el tratamiento de la leucemia
mieloide aguda (LMA) quimiorresistente en un paciente que lo necesita, en el que la leucemia es resistente a
5 citarabina, y en el que el inhibidor es un anticuerpo que tiene especificidad por CD39.

2. Un inhibidor del eje de señalización CD39-P2Y13-cAMP-PKA para su uso en la prevención de la recaída de un
paciente que padece LMA que ha sido tratado con quimioterapia, en el que la quimioterapia consiste en
10 citarabina, y en el que el inhibidor es un anticuerpo que tiene especificidad por CD39.

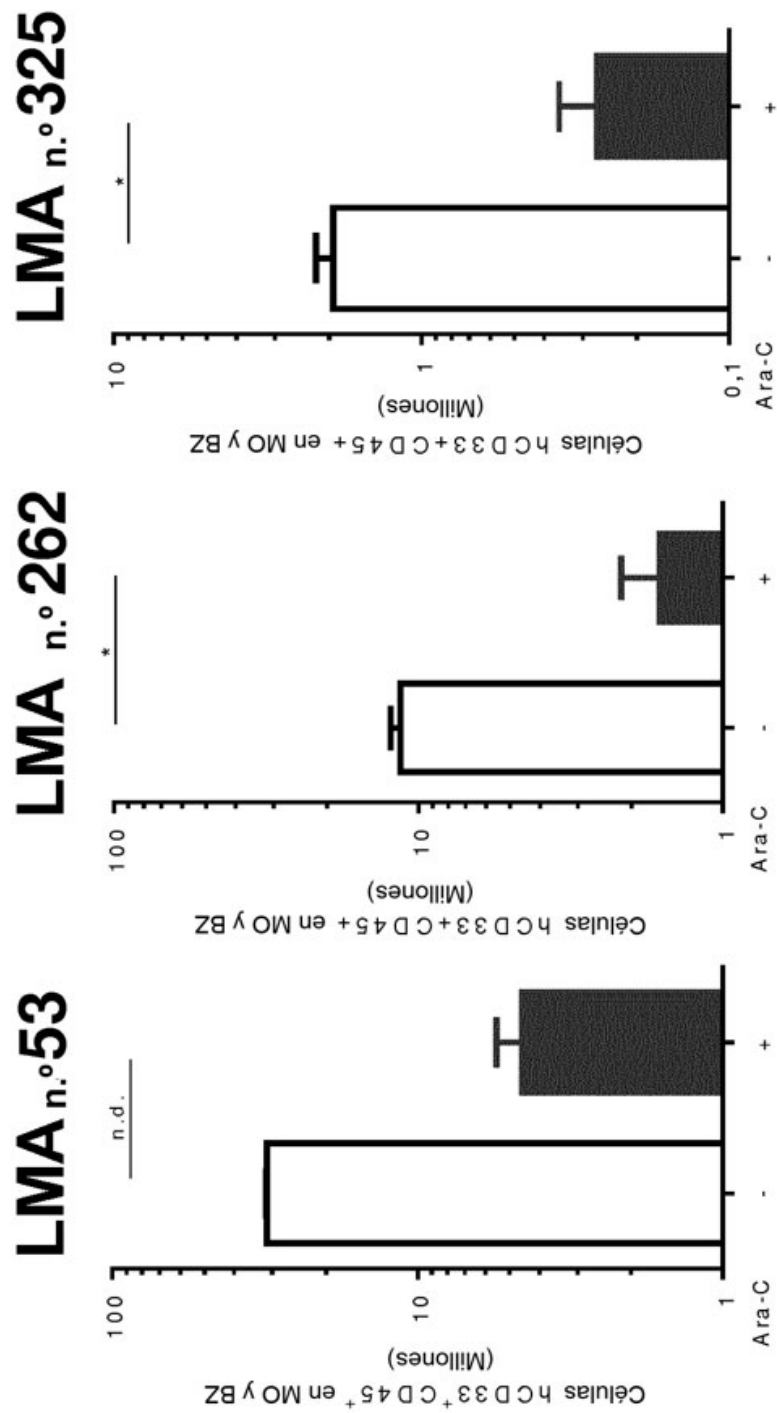


Figura 1A (1/2)

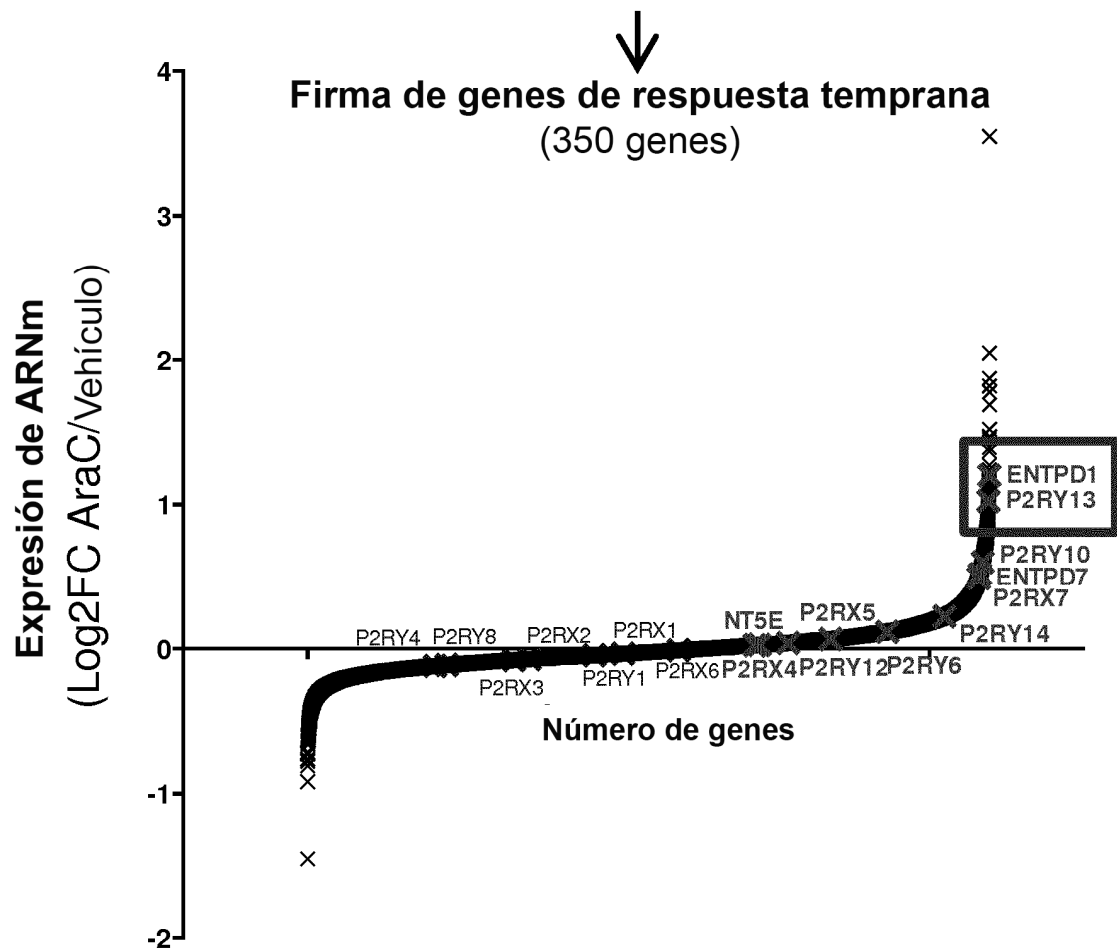


Figura 1A (2/2)

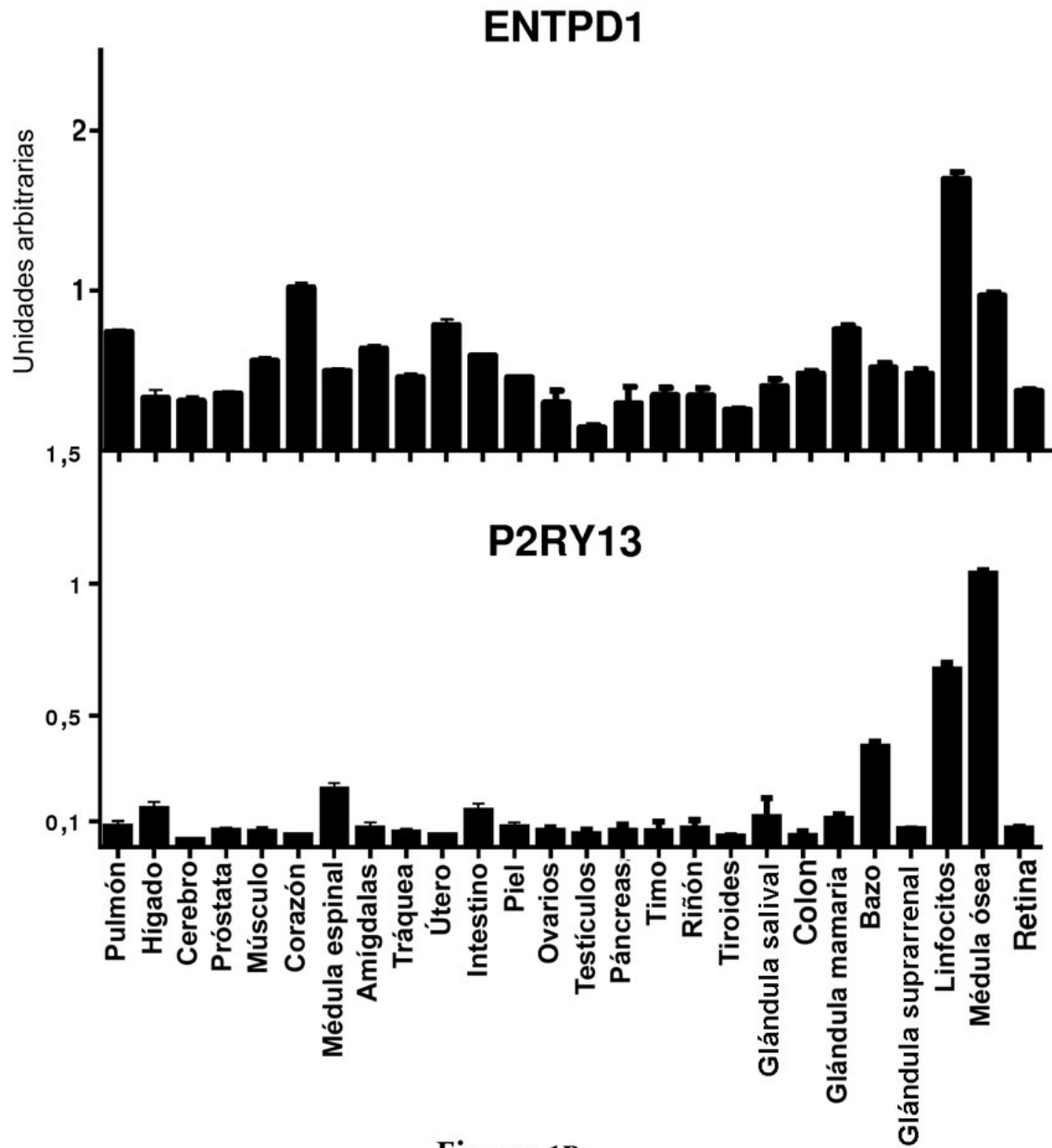


Figura 1B

ENTPD1

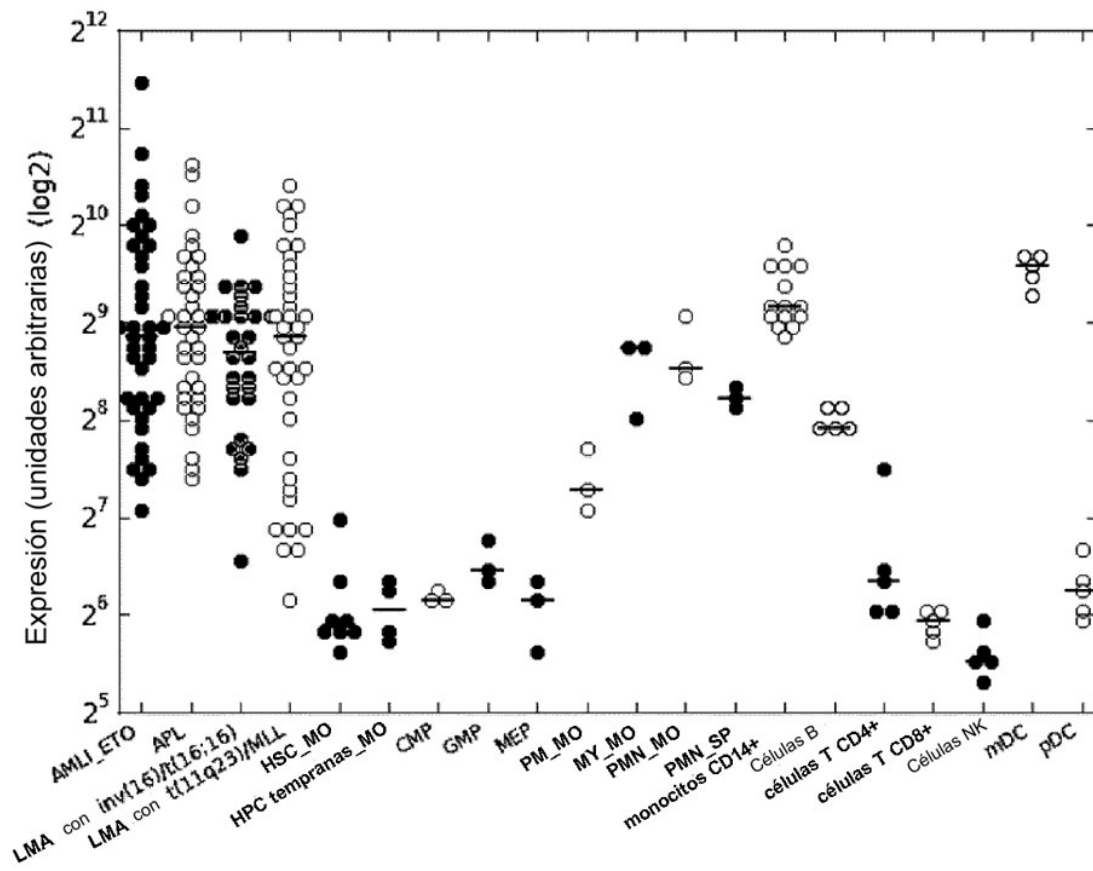


Figura 1C (1/2)

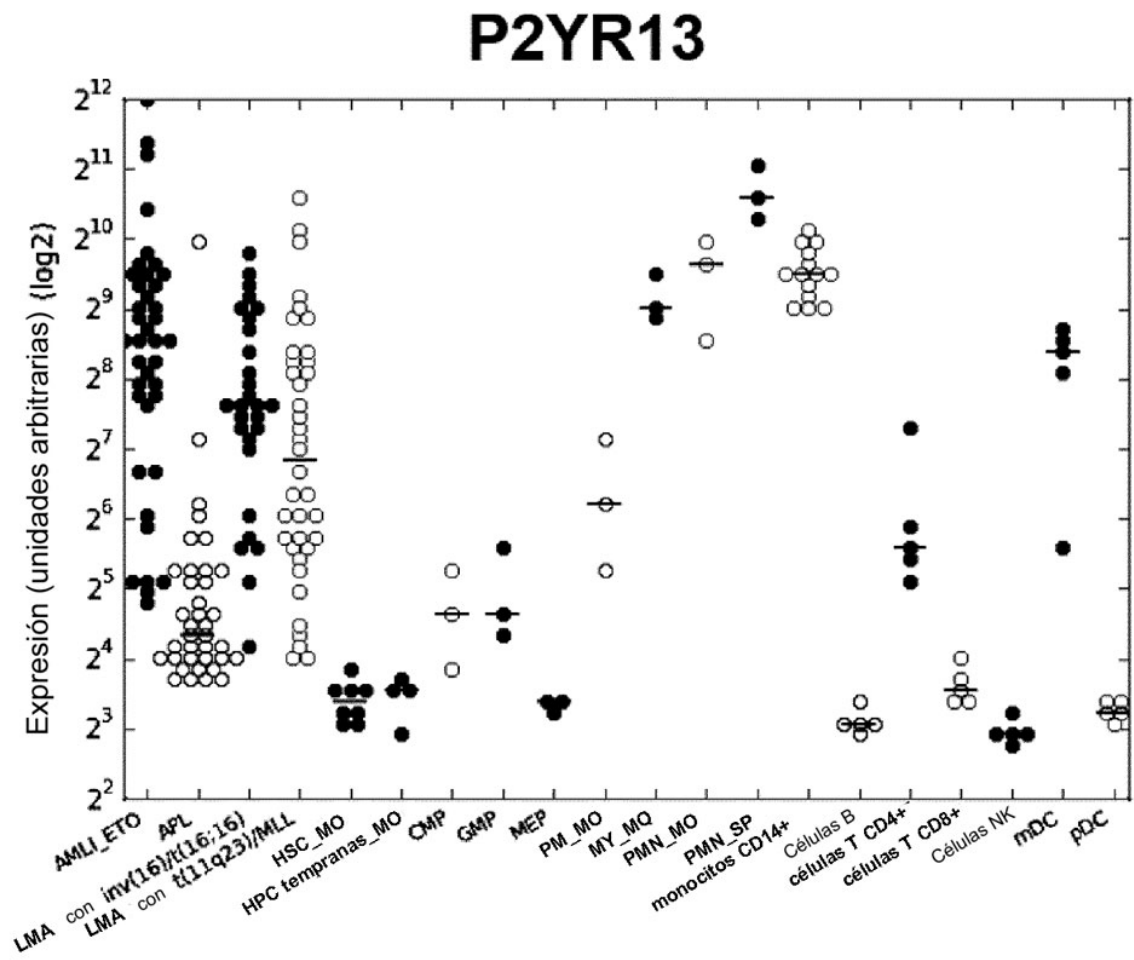


Figura 1C (2/2)

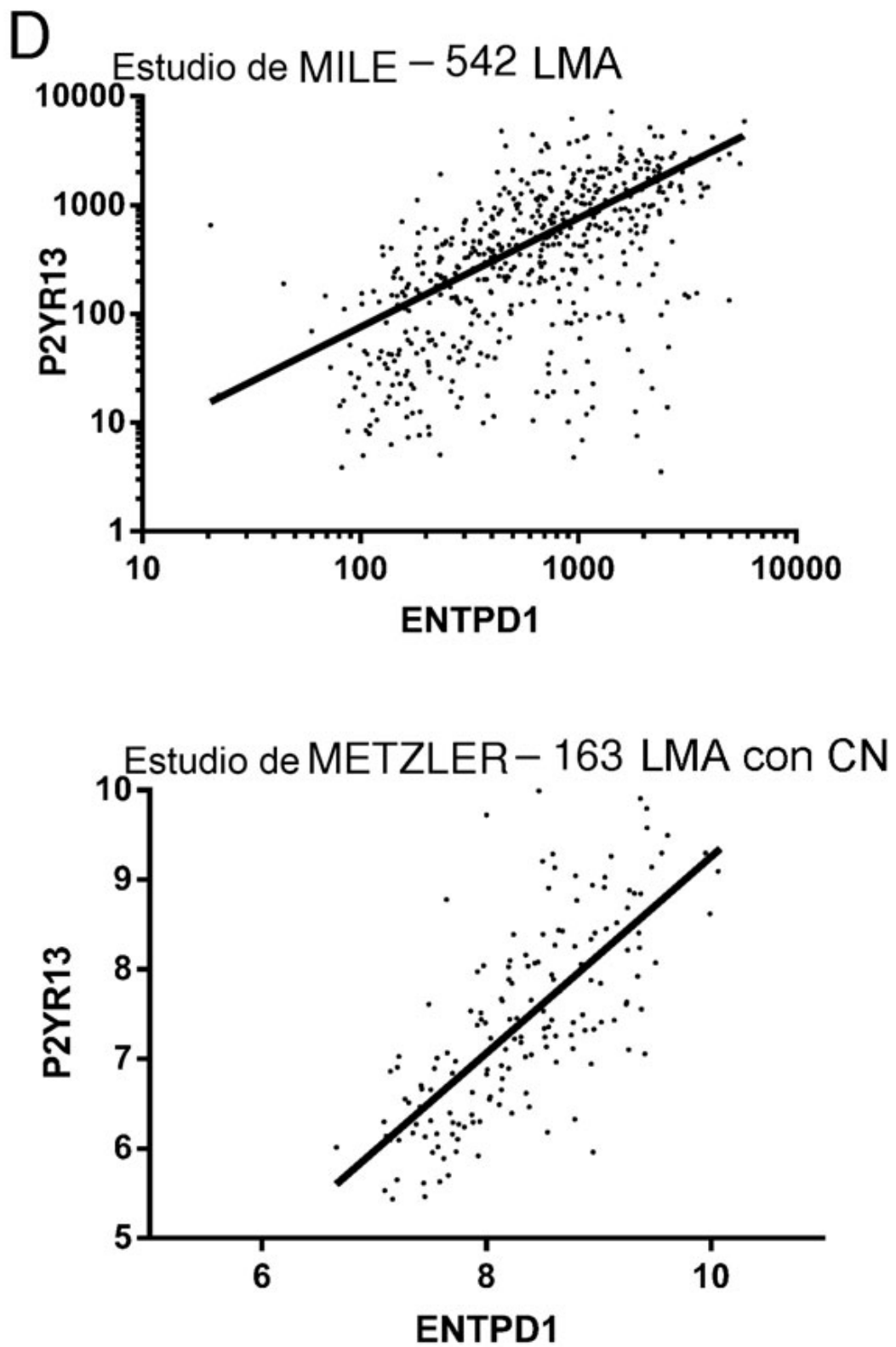


Figura 1D

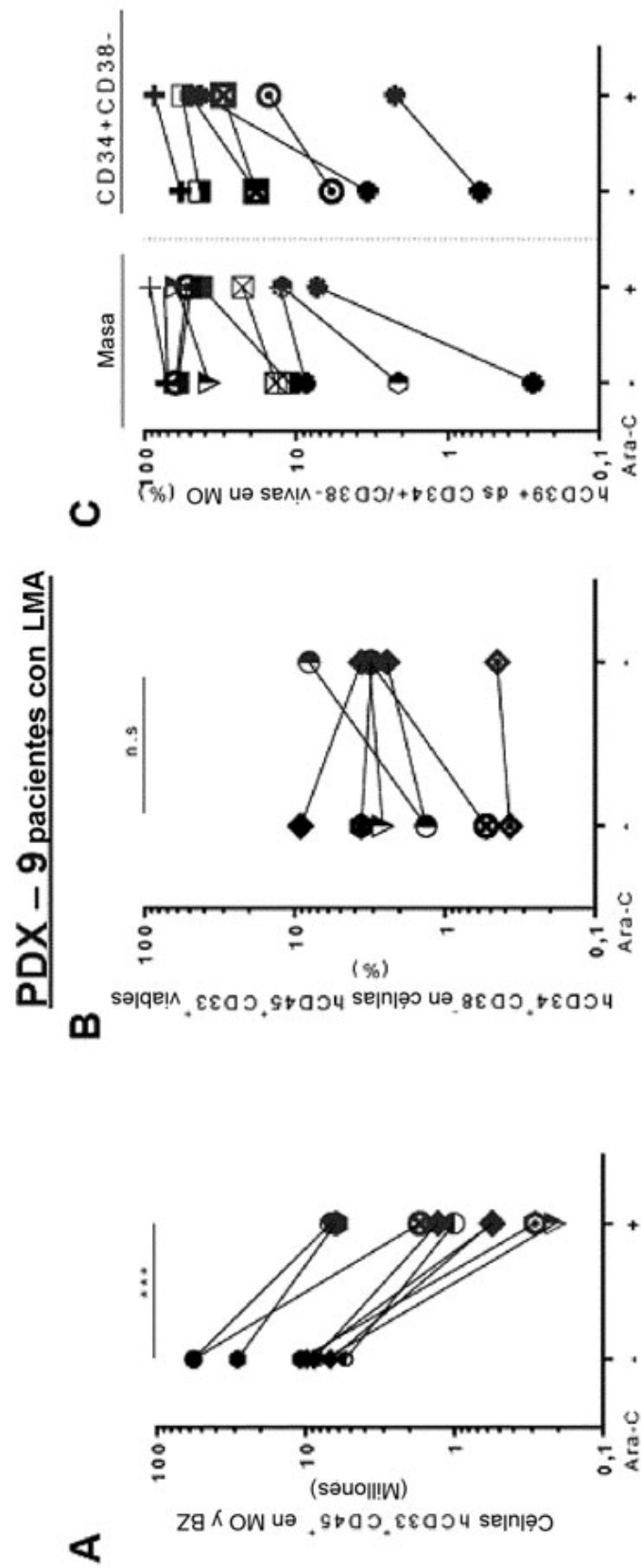


Figura 2 (1/3)

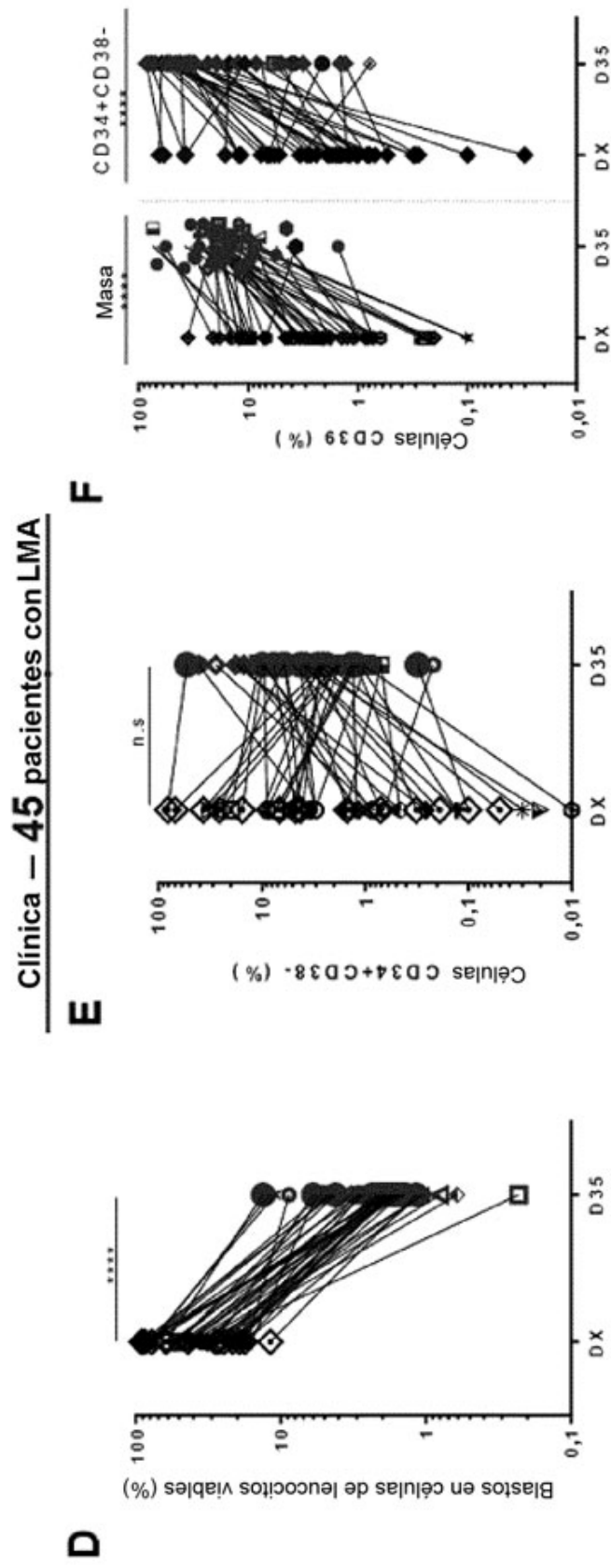


Figura 2 (2/3)

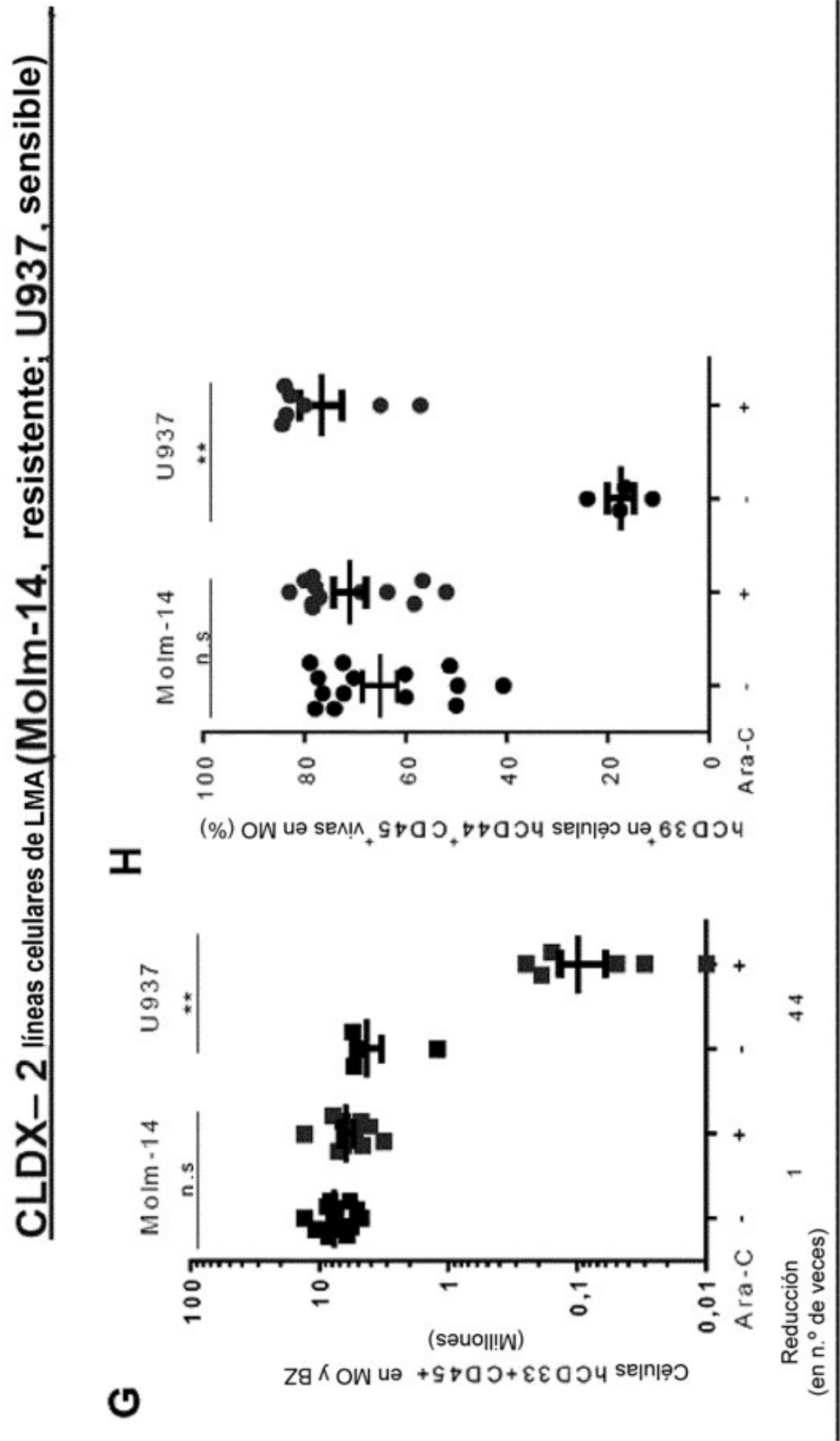
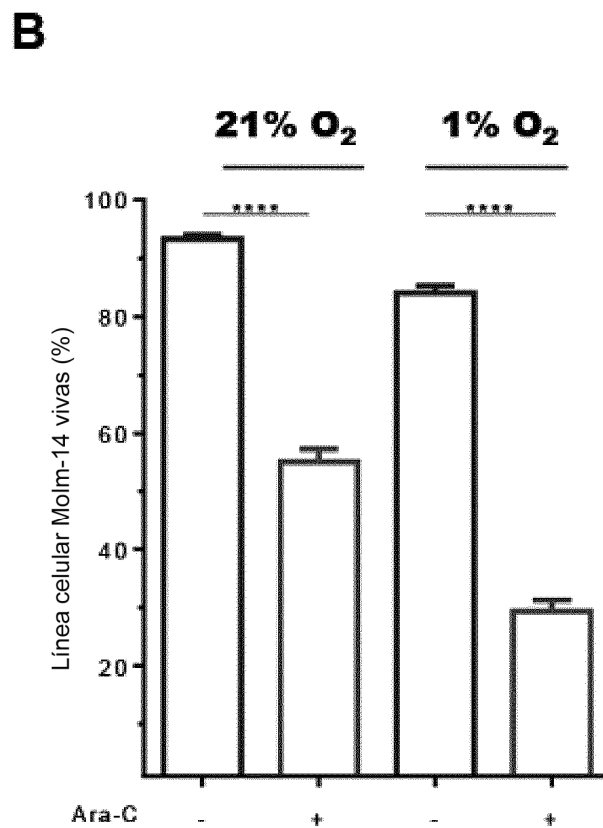
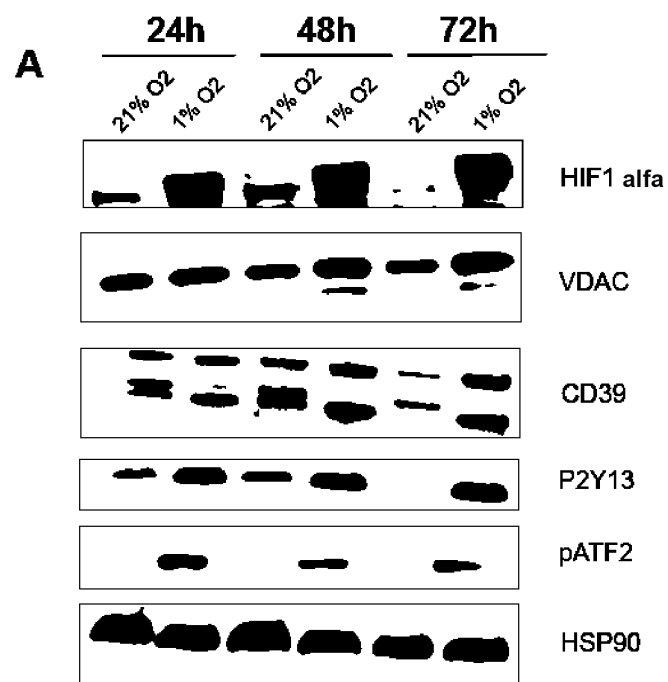
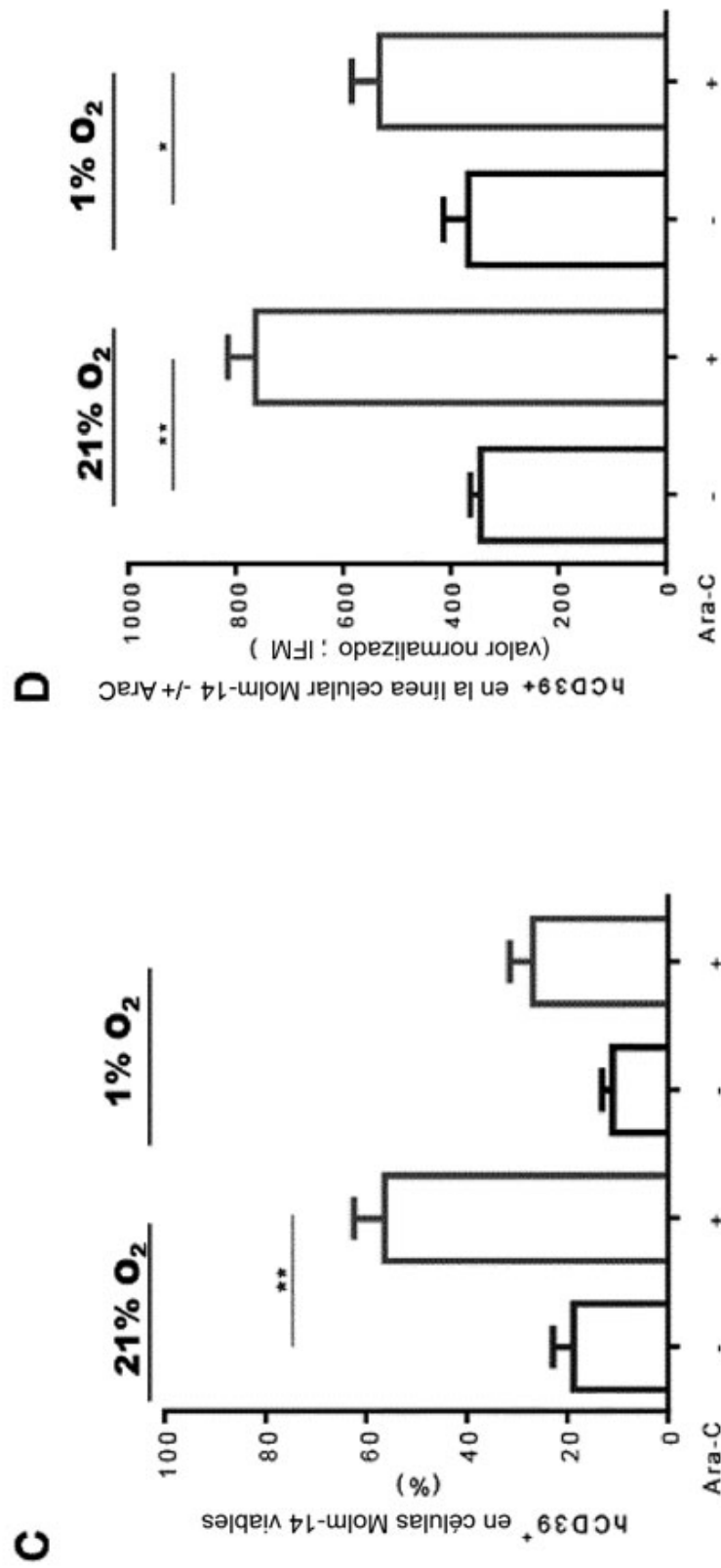


Figura 2 (3/3)



Figuras 3A y 3B



Figuras 3C y 3D

E

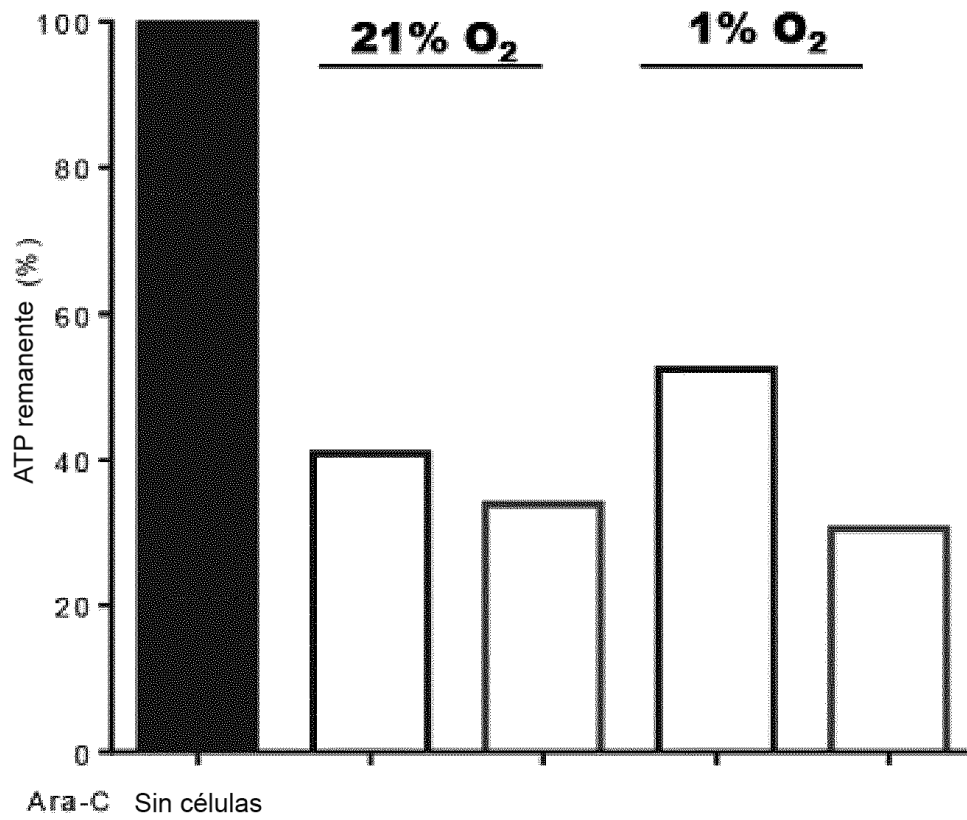
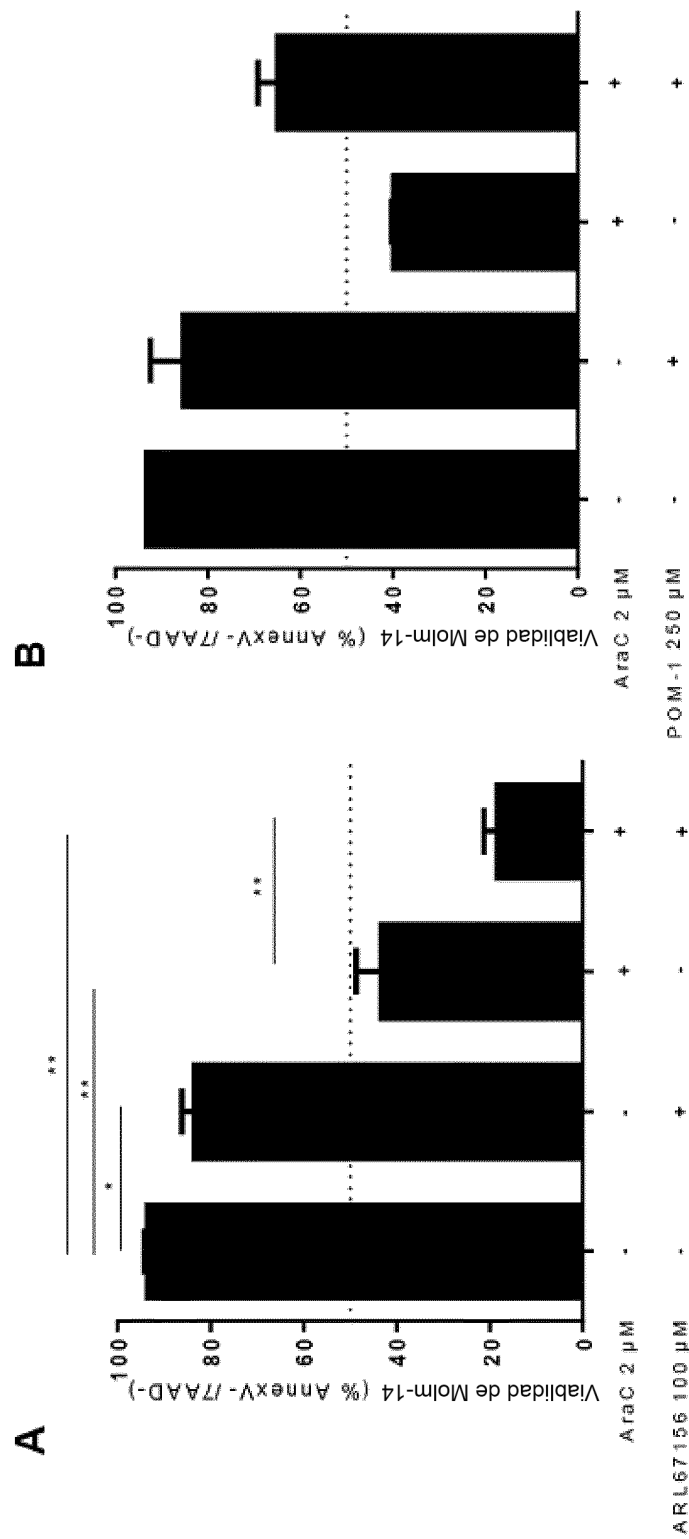


Figura 3E



Figuras 4A y 4B

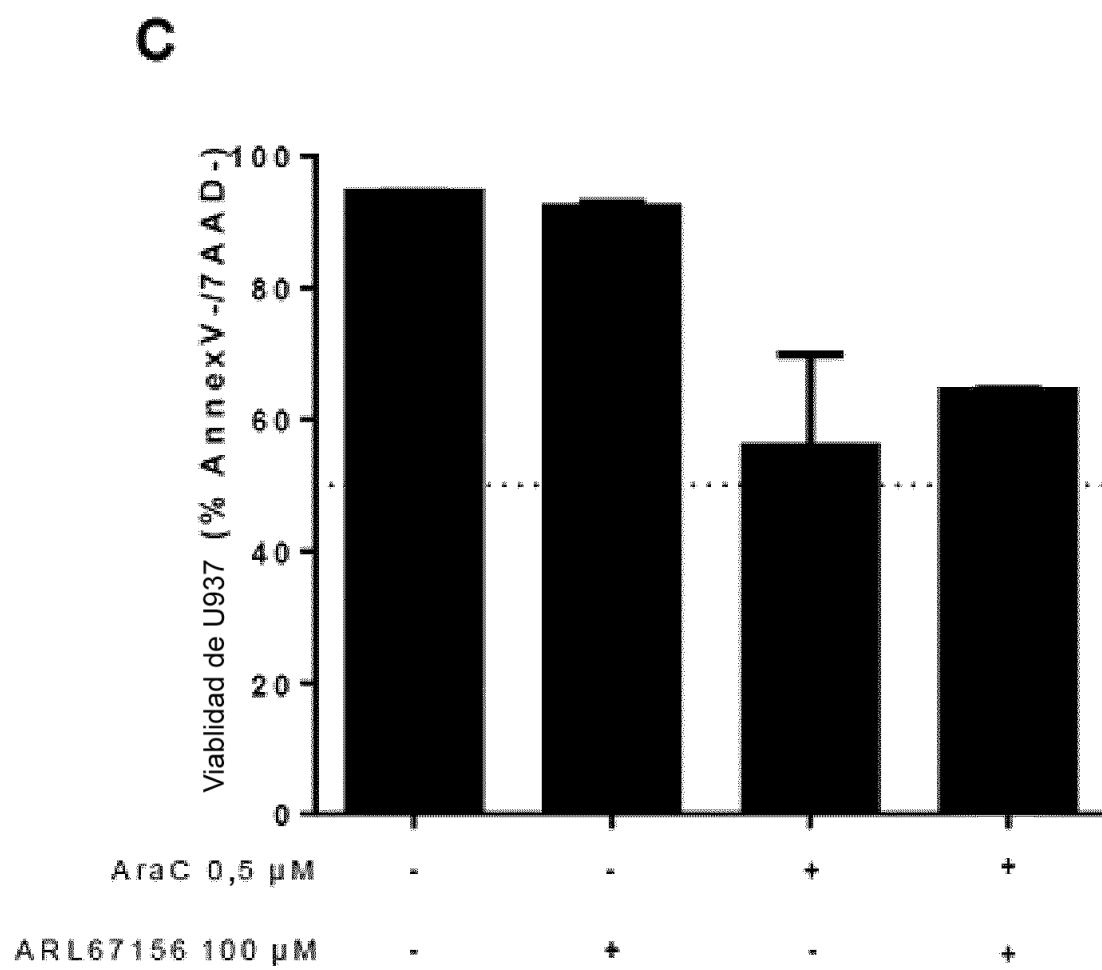


Figura 4C