

**MOLÉCULAS DE UNIÓN ESPECÍFICAS PARA CD73 Y USOS DE LAS
MISMAS**

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- [0001]** CD73 o ecto-5'-nucleotidasa (5'-NT) se expresa
5 ubicuamente en una serie de tejidos. Esta proteína está
anclada a la membrana celular a través de un enlace de
glucosilfosfatidilinositol (GPI), tiene actividad de ecto-
enzima y desempeña un papel en la transducción de señales.
La función principal de CD73 es la conversión de los
10 nucleótidos extracelulares (por ejemplo, 5'-AMP), para los
que las células son normalmente impermeables, en sus
correspondientes nucleósidos (por ejemplo, adenosina), que
pueden entrar fácilmente en la mayoría de las células. Se
ha demostrado que la producción de adenosina por CD73
15 mediante la desfosforilación del AMP regula el acoplamiento
del receptor de adenosina en muchos tejidos, lo que indica
que la adenosina tiene función en la citoprotección, el
crecimiento celular, la angiogénesis y la inmunosupresión y
también desempeña un papel en la tumorigénesis.
- 20 **[0002]** Se ha comunicado la expresión de CD73 en células
tumORAles en varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer
colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de vejiga,
leucemia, linfoma, glioma, glioblastoma, melanoma, cáncer
de ovario, cáncer de tiroides, cáncer esofágico, cáncer de
25 próstata y cáncer de mama. También se ha relacionado la
expresión elevada de CD73 con la invasividad tumoral, la
metástasis y un tiempo de supervivencia del paciente
reducido. CD73 genera un ambiente inmunosuprimido,
caracterizado por niveles de adenosina elevados, que
30 promueven el desarrollo celular y la progresión del cáncer.
De manera destacable, la expresión de CD73 se ha asociado

con un fenotipo prometastásico en el melanoma y el cáncer de mama.

[0003] Los inhibidores de puntos de control inmunitarios tienen un gran potencial como agentes terapéuticos para el
5 cáncer. Sin embargo, los beneficios clínicos de la inhibición de puntos de control inmunitarios han sido escasos. Una explicación potencial es que los tumores usan mecanismos inmunosupresores no solapantes para facilitar la evasión inmunitaria. Por consiguiente, se necesitan
10 urgentemente composiciones y métodos mejorados para reducir la inmunosupresión mediada por tumores.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0004] La presente invención proporciona moléculas de unión aisladas o fragmentos de unión a antígeno de las
15 mismas que se unen específicamente a CD73. En algunos aspectos, dichas moléculas de unión a CD73 son, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En realizaciones particulares, los anticuerpos anti-CD73 de la invención (por ejemplo, MEDI9447) son
20 útiles para reducir la inmunosupresión mediada por tumores. Por consiguiente, la presente invención también proporciona combinaciones terapéuticas que contienen anticuerpos anti-CD73 (por ejemplo, MEDI9447) y otros agentes que se dirigen a aspectos adicionales del ciclo inmunitario del cáncer (es
25 decir, anticuerpos anti-PD-1 o anti-PD-L1; anticuerpos anti-CTLA4, antagonistas de A2aR, inhibidores de STAT-3) y métodos para usar dichas combinaciones útiles para reducir la inmunosupresión mediada por tumores.

[0005] En un aspecto, la invención proporciona una
30 molécula de unión aislada o un fragmento de unión a antígeno de la misma que se une específicamente a un

epítopo de CD73, donde la molécula de unión se une específicamente al mismo epítopo de CD73 que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que tiene la región variable de cadena pesada (V_H) y la región variable de cadena ligera (V_L) de un anticuerpo seleccionado entre
5 CD730002, CD730003, CD730004, CD730008, CD730010, CD730011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047 o CD730058.

[0006] En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión aislada o un fragmento de unión a
10 antígeno de la misma que se une específicamente a CD73 y que inhibe de manera competitiva la unión a CD73 mediante un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende la V_H y la V_L de CD730002, CD730003, CD730004, CD730008, CD730010, CD730011, CD730021, CD730042, CD730046,
15 CD730047 o CD730058.

[0007] En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión aislada o un fragmento de unión a antígeno de la misma que se une específicamente a CD73 que comprende una V_L de anticuerpo, donde la V_L tiene la
20 secuencia de aminoácidos:

[FW₁]SGSLSNIGRNX₁VN[FW₂] LX₂NX₃RX₄X₅[FW₃] ATWDDSX₆X₇GWX₈[FW₄]

donde [FW₁], [FW₂], [FW₃] y [FW₄] representan regiones marco de V_L , y donde X₁ representa los restos de aminoácido prolina (P), ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D); X₂
25 representa los restos de aminoácido asparagina (N) o ácido aspártico (D);

X₃ representa los restos de aminoácido glutamina (Q) o leucina (L);

X₄ representa los restos de aminoácido leucina (L) o
30 prolina (P);

X₅ representa los restos de aminoácido glicina (G) o serina (S);

X₆ representa los restos de aminoácido leucina (L) o histidina (H);

- 5 X₇ representa los restos de aminoácido lisina (K), prolina (P), isoleucina (I) o asparagina (N); y,
X₈ representa los restos de aminoácido leucina (L) o treonina (T).

En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el
10 presente documento, la molécula de unión aislada o el fragmento de unión a antígeno de la misma de acuerdo con la reivindicación 6, donde la FW₁ comprende la SEQ ID NO: 25 o 26, la FW₂ comprende la SEQ ID NO: 27 o 28, la FW₃ comprende la SEQ ID NO: 29, y la FW₄ comprende la SEQ ID
15 NO: 30.

[0008] En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión aislada o un fragmento de unión a antígeno de la misma que se une específicamente a CD73 que comprende una VH de anticuerpo, donde la V_H tiene la
20 secuencia de aminoácidos:

[FW₅]SYAX₉S [FW₆]X₁₀IX₁₁GSX₁₂GX₁₃TYADSVKG [FW₇]LGYX₁₄X₁₅X₁₆DX₁₇
[FW₈]

donde [FW₅], [FW₆], [FW₇] y [FW₈] representan regiones marco de VH, y donde

- 25 X₉ representa los restos de aminoácido metionina (M) o tirosina (Y);

X₁₀ representa los restos de aminoácido leucina (L) o alanina (A);

- 30 X₁₁ representa los restos de aminoácido triptófano (W) o serina (S);

X₁₂ representa los restos de aminoácido triptófano (W) o glicina (G);

X₁₃ representa los restos de aminoácido serina (S) o arginina (R);

5 X₁₄ representa los restos de aminoácido glicina (G) o serina (S);

X₁₅ representa los restos de aminoácido arginina (R) o treonina (T);

10 X₁₆ representa los restos de aminoácido valina (V) o isoleucina (I); y,

X₁₇ representa los restos de aminoácido tirosina (Y), lisina (K), metionina (M), leucina (L) o ácido glutámico (E).

[0009] En otro aspecto, la invención proporciona una
15 molécula de unión aislada o un fragmento de unión a antígeno de la misma que se une específicamente a CD73 que comprende una V_L de anticuerpo y una V_H de anticuerpo, donde la V_L comprende la secuencia de aminoácidos:

[FW₁]SGSLSNIGRNX₁VN[FW₂]LX₂NX₃RX₄X₅[FW₃]ATWDDSX₆X₇GWX₈[FW₄]

20 donde [FW₁], [FW₂], [FW₃] y [FW₄] representan regiones marco de V_L, y donde

X₁ representa los restos de aminoácido prolina (P), ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D);

25 X₂ representa los restos de aminoácido asparagina (N) o ácido aspártico (D);

X₃ representa los restos de aminoácido glutamina (Q) o leucina (L);

X₄ representa los restos de aminoácido leucina (L) o prolina (P);

30 X₅ representa los restos de aminoácido glicina (G) o serina (S);

X₆ representa los restos de aminoácido leucina (L) o histidina (H);

X₇ representa los restos de aminoácido lisina (K), prolina (P), isoleucina (I) o asparagina (N); y,

5 X₈ representa los restos de aminoácido leucina (L) o treonina (T);

y donde la V_H comprende la secuencia de aminoácidos:

[FW₅]SYAX₉S [FW₆]X₁₀IX₁₁GSX₁₂GX₁₃TYYADSVKG [FW₇]LGYX₁₄X₁₅X₁₆DX₁₇
[FW₈]

10 donde [FW₅], [FW₆], [FW₇] y [FW₈] representan regiones marco de V_H, y donde

X₉ representa los restos de aminoácido metionina (M) o tirosina (Y);

15 X₁₀ representa los restos de aminoácido leucina (L) o alanina (A);

X₁₁ representa los restos de aminoácido triptófano (W) o serina (S);

X₁₂ representa los restos de aminoácido triptófano (W) o glicina (G);

20 X₁₃ representa los restos de aminoácido serina (S) o arginina (R);

X₁₄ representa los restos de aminoácido glicina (G) o serina (S);

25 X₁₅ representa los restos de aminoácido arginina (R) o treonina (T);

X₁₆ representa los restos de aminoácido valina (V) o isoleucina (I); y,

X₁₇ representa los restos de aminoácido tirosina (Y), lisina (K), metionina (M), leucina (L) o ácido glutámico

30 (E).

[00010] En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión aislada o un fragmento de unión a antígeno de la misma que se une específicamente a CD73 que tiene una V_L de anticuerpo, donde la V_L tiene una secuencia de aminoácidos de región determinante de la complementariedad-2 de V_L (VL-CDR2) idéntica a, o idéntica a excepción de cuatro, tres, dos o una sustitución de aminoácidos a la SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51 ou SEQ ID NO: 52.

10 **[00011]** En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión aislada o un fragmento de unión a antígeno de la misma que se une específicamente a CD73 que tiene una V_L de anticuerpo, donde la V_L tiene una secuencia de aminoácidos de región determinante de la complementariedad-3 (VL-CDR3) idéntica a, o idéntica a excepción de cuatro, tres, dos o una sustitución de aminoácidos a: la SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, ou SEQ ID NO: 56.

[00012] En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión aislada o un fragmento de unión a antígeno de la misma que se une específicamente a CD73 que tiene una V_H de anticuerpo, donde la V_H tiene una secuencia de aminoácidos de región determinante de la complementariedad-1 (VH-CDR1) idéntica a, o idéntica a excepción de cuatro, tres, dos o una sustitución de aminoácidos a la SEQ ID NO: 35 o la SEQ ID NO: 36.

[00013] En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión aislada o un fragmento de unión a antígeno de la misma que se une específicamente a CD73 que tiene una V_H de anticuerpo, donde la V_H tiene una secuencia de aminoácidos de región determinante de la

complementariedad-2 (VH-CDR2) idéntica a, o idéntica a excepción de cuatro, tres, dos o una sustitución de aminoácidos a: la SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, ou SEQ ID NO: 40.

- 5 **[00014]** En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión aislada o un fragmento de unión a antígeno de la misma que se une específicamente a CD73 que tiene una V_H de anticuerpo, donde la V_H tiene una secuencia de aminoácidos de región determinante de la
- 10 complementariedad-3 (VH-CDR3) idéntica a, o idéntica a excepción de cuatro, tres, dos o una sustitución de aminoácidos a la SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, ou SEQ ID NO: 45.

- 15 **[00015]** En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión aislada o un fragmento de unión a antígeno de la misma que se une específicamente a CD73 que tiene una V_L de anticuerpo, donde la V_L tiene secuencias de aminoácidos de VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3 idénticas a, o idénticas a excepción de cuatro, tres, dos o una sustitución
- 20 de aminoácidos en una o más de las VL-CDR respecto de: SEQ ID NOS: 46, 49 y 53; SEQ ID NOS: 47, 49, y 53; SEQ ID NOS: 47, 49, y 54; SEQ ID NOS: 46, 50, y 54; SEQ ID NOS: 46, 51, y 55; SEQ ID NOS: 48, 52, y 54; SEQ ID NOS: 46, 49, y 56; SEQ ID NOS: 47, 49, y 56; SEQ ID NOS: 46, 50, y 56; SEQ ID
- 25 NOS: 46, 51, y 56; ou SEQ ID NOS: 48, 52, y 56, respectivamente.

- 30 **[00016]** En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión aislada o un fragmento de unión a antígeno de la misma que se une específicamente a CD73 que tiene una V_H de anticuerpo, donde la V_H tiene secuencias de aminoácidos de VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 idénticas a, o

idénticas a excepción de cuatro, tres, dos o una sustitución de aminoácidos en una o más de las VH-CDR respecto de: SEQ ID NOs: 35, 37 y 41; SEQ ID NOs: 36, 37, y 42; SEQ ID NOs: 36, 38, y 43; SEQ ID NOs: 36, 39, y 44; SEQ ID NOs: 36, 40, y 44; SEQ ID NOs: 35, 37, y 45; SEQ ID NOs: 36, 37, y 45; SEQ ID NOs: 36, 38, y 45; SEQ ID NOs: 36, 39, y 45; ou SEQ ID NOs: 36, 40, y 45 respectivamente.

[00017] En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a CD73 que tiene una V_L y una V_H que tienen secuencias de aminoácidos de VL-CDR1, VL-CDR2, VL-CDR3, VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 idénticas o idénticas a excepción de cuatro, tres, dos o una sustitución de aminoácidos en una o más CDR respecto de: SEQ ID NOs: 46, 49, 53, 35, 37, y 41; SEQ ID NOs: 47, 49, 53, 35, 37, y 41; SEQ ID NOs: 47, 49, 54, 36, 37, y 42; SEQ ID NOs: 46, 50, 54, 36, 38, y 43; SEQ ID NOs: 46, 51, 55, 36, 39, y 44; SEQ ID NOs: 48, 52, 54, 36, 40, y 44; SEQ ID NOs: 46, 49, 56, 35, 37, y 41; SEQ ID NOs: 46, 49, 53, 35, 37, y 45; SEQ ID NOs: 47, 49, 56, 36, 37, y 45; SEQ ID NOs: 46, 50, 56, 36, 38, y 45; SEQ ID NOs: 46, 51, 56, 36, 39, y 45; SEQ ID NOs: 48, 52, 56, 36, 40, y 45; ou SEQ ID NOs: 46, 49, 56, 35, 37, y 45.

[00018] En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión aislada o un fragmento de unión a antígeno de la misma que se une específicamente a CD73 que tiene una V_L de anticuerpo y una V_H de anticuerpo, donde la V_L tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos de aproximadamente un 90 % a aproximadamente un 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada entre la SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ

ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, y SEQ ID NO: 70.

[00019] En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión aislada o un fragmento de unión a antígeno de la misma que se une específicamente a CD73 que tiene una V_L de anticuerpo y una V_H de anticuerpo, donde la V_H tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos de aproximadamente un 90 % a aproximadamente un 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada entre la SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83 y SEQ ID NO: 84.

[00020] En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a CD73, donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno tiene una V_L que tiene una secuencia al menos de aproximadamente un 90 % a aproximadamente un 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada entre SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, y SEQ ID NO: 70, y donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno tiene una V_H que tiene una secuencia al menos de aproximadamente un 90 % a aproximadamente un 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada entre SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO:

77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83 y SEQ ID NO: 84.

[00021] En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una V_L que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 57 y una V_H que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 71.

[00022] En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una V_L que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 68 y una V_H que consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 82.

[00023] En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una V_L que consiste en la SEQ ID NO: 57 y una V_H que consiste en la SEQ ID NO: 71.

[00024] En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que tiene una V_L que consiste en la SEQ ID NO: 68 y una V_H que consiste en la SEQ ID NO: 82.

[00025] En otro aspecto, la invención proporciona una composición que contiene un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención y un vehículo.

[00026] En otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico que tiene una secuencia que codifica el anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención.

[00027] En otro aspecto, la invención proporciona una composición que incluye un ácido nucleico de acuerdo con la invención.

[00028] En otro aspecto, la invención proporciona un vector que contiene un ácido nucleico de acuerdo con la invención.

5 **[00029]** En otro aspecto, la invención proporciona una célula hospedadora que comprende una secuencia de ácido nucleico, una composición o el vector de acuerdo con la invención.

10 **[00030]** En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención que implica cultivar una célula que contiene una secuencia de ácido nucleico, una composición o el vector de acuerdo con la invención; y aislar el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo.

15 **[00031]** En otro aspecto, la invención proporciona un reactivo para diagnóstico que contiene un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención, que se encuentra marcado.

20 **[00032]** En otro aspecto, la invención proporciona un kit que contiene un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, una composición o el reactivo diagnóstico de acuerdo con la invención.

25 **[00033]** En otro aspecto, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa CD73 que implica poner en contacto la célula con un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención.

30 **[00034]** En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesite, que implica administrar al sujeto una cantidad

terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la invención.

[00035] En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar el cáncer en un sujeto, que implica
5 administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un primer agente, que es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la invención, en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de un
segundo agente, que es un agente anticanceroso distinto del
10 primer agente.

[00036] En otro aspecto, la invención proporciona un método de tratamiento que implica la administración de un anticuerpo anti-CD73 o un fragmento de unión a antígeno del mismo a un sujeto identificado como portador de un tumor
15 que tiene expresión aumentada de CD73 en relación a una referencia.

[00037] En otro aspecto, la invención proporciona un método de tratamiento que implica administrar un anticuerpo anti-CD73 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y un
20 anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4 o un fragmento de unión a antígeno de los mismos, a un sujeto identificado como portador de un tumor que tiene expresión aumentada de CD73 en comparación con una referencia.

[00038] En otro aspecto, la invención proporciona un método de tratamiento que implica administrar MEDI9447 o hIgG1 Phn0203, o un fragmento de unión a antígeno de los
25 mismos, y pembrolizumab (Keytruda®) o nivolumab (Opdiva®), o un fragmento de unión a antígeno de los mismos, a un sujeto identificado como portador de un tumor que tiene
30 expresión aumentada de CD73 en comparación con una referencia.

[00039] En otro aspecto, la invención proporciona un método de tratamiento que implica administrar MEDI9447 o hIgG1 Phen0203, o un fragmento de unión a antígeno de los mismos, y MEDI4736, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, a un sujeto identificado como portador de un tumor que tiene expresión aumentada de CD73 en comparación con una referencia.

[00040] En otro aspecto, la invención proporciona un método de tratamiento que implica administrar MEDI9447 o hIgG1 Phen0203, o un fragmento de unión a antígeno de los mismos, y tremelimumab, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, a un sujeto identificado como portador de un tumor que tiene expresión aumentada de CD73 en comparación con una referencia.

[00041] En otro aspecto, la invención proporciona un método para identificar a un sujeto que tiene un cáncer sensible a la terapia anti-CD73, implicando el método detectar un nivel aumentado de expresión o actividad de CD73 en una célula tumoral o una célula sanguínea del sujeto, en relación con una referencia, identificando de este modo que dicho cáncer es sensible a la terapia anti-CD73.

[00042] En otro aspecto, la invención proporciona un método para identificar a un sujeto que tiene un cáncer sensible a la terapia anti-CD73 en combinación con una o más de una terapia anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4, implicando el método detectar un nivel aumentado de expresión o actividad de CD73 en una célula tumoral o una célula sanguínea del sujeto, en relación con una referencia, identificando de este modo que dicho cáncer es

sensible a la terapia anti-CD73 en combinación con una o más de una terapia anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4.

[00043] En otro aspecto, la invención proporciona un método para identificar a un sujeto que tiene un cáncer
5 sensible a la terapia anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4, implicando el método detectar un nivel reducido de expresión o actividad de CD73 en una célula tumoral o una célula sanguínea del sujeto, en relación con una referencia, identificando de este modo que dicho cáncer es
10 sensible a la terapia anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4.

[00044] En otro aspecto, la invención proporciona un método para inhibir el crecimiento tumoral en un sujeto, implicando el método administrar a un sujeto que lo
necesite un anticuerpo anti-CD73 o un fragmento de unión a
15 antígeno del mismo y uno o más de un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-CTLA4 o un fragmento de unión a antígeno de los mismos.

[00045] En otro aspecto, la invención proporciona un método para aumentar una respuesta inmunitaria antitumoral
20 en un sujeto, implicando el método administrar a un sujeto que lo necesite un anticuerpo anti-CD73 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y uno o más de un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo anti-PD-L1, un anticuerpo anti-CTLA4 o un fragmento de unión a antígeno de los mismos al
25 sujeto.

[00046] En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar un tumor en un sujeto, implicando el
método administrar a un sujeto que lo necesite un
anticuerpo anti-CD73 o un fragmento de unión a antígeno del
30 mismo y uno o más de un anticuerpo anti-PD-1, un anticuerpo

anti-PD-L1, un anticuerpo anti-CTLA4 o un fragmento de unión a antígeno de los mismos.

[00047] En otro aspecto, la invención proporciona una formulación farmacéutica que contiene una cantidad eficaz
5 de un anticuerpo anti-CD73 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[00048] En otro aspecto, la invención proporciona una formulación farmacéutica que contiene una cantidad eficaz
10 de MEDI9447 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y pembrolizumab (Keytruda®) o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[00049] En otro aspecto, la invención proporciona una formulación farmacéutica que contiene una cantidad eficaz
15 de MEDI9447 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y nivolumab (Opdiva®) o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[00050] En otro aspecto, la invención proporciona una formulación farmacéutica que contiene una cantidad eficaz
20 de Pen0203 hIgG1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y pembrolizumab (Keytruda®) o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[00051] En otro aspecto, la invención proporciona una formulación farmacéutica que contiene una cantidad eficaz
25 de Pen0203 hIgG1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y nivolumab (Opdiva®) o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[00052] En otro aspecto, la invención proporciona una formulación farmacéutica que contiene una cantidad eficaz
30 de un anticuerpo anti-CD73 o un fragmento de unión a

antígeno del mismo y un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[00053] En otro aspecto, la invención proporciona una formulación farmacéutica que contiene una cantidad eficaz
5 de MEDI9447 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[00054] En otro aspecto, la invención proporciona una formulación farmacéutica que contiene una cantidad eficaz
10 de hIgG1 Phen0203 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[00055] En otro aspecto, la invención proporciona una formulación farmacéutica que contiene una cantidad eficaz
15 de un anticuerpo anti-CD73 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo anti-CTLA4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[00056] En otro aspecto, la invención proporciona una formulación farmacéutica que contiene una cantidad eficaz
20 de MEDI9447 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y tremelimumab o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[00057] En otro aspecto, la invención proporciona una formulación farmacéutica que contiene una cantidad eficaz
de MEDI9447 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y ipilimumab o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[00058] En otro aspecto, la invención proporciona una formulación farmacéutica que contiene una cantidad eficaz
25 de hIgG1 Phen0203 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y tremelimumab o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[00059] En otro aspecto, la invención proporciona una formulación farmacéutica que contiene una cantidad eficaz
30

de hIgG1 Phn0203 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y ipilimumab o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

5 **[00060]** En otro aspecto, la invención proporciona un kit para aumentar la actividad antitumoral, comprendiendo el kit un anticuerpo anti-CD73 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

10 **[00061]** En otro aspecto, la invención proporciona un kit para aumentar la actividad antitumoral, comprendiendo el kit un anticuerpo anti-CD73 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

15 **[00062]** En otro aspecto, la invención proporciona un kit para aumentar la actividad antitumoral, comprendiendo el kit un anticuerpo anti-CD73 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo anti-CTLA4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

20 **[00063]** En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, la VL y la VH de CD730002 es o incluye las SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente y la VL y VH de CD730010 son o incluyen las SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente.

25 **[00064]** En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, la molécula de unión aislada o el fragmento de unión a antígeno de la misma incluye un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

30 **[00065]** En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, la molécula de unión se somete a maduración de afinidad.

5 **[00066]** En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, la FW5 es o incluye la SEQ ID NO: 31, la FW6 es o incluye la SEQ ID NO: 32, la FW7 es o incluye la SEQ ID NO: 33 y la FW8 es o incluye la SEQ ID NO: 34.

10 **[00067]** En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, la FW1 es o incluye la SEQ ID NO: 25 o 26, la FW2 es o incluye la SEQ ID NO: 27 o 28, la FW3 es o incluye la SEQ ID NO: 29, la FW4 es o incluye la SEQ ID NO: 30, la FW5 es o incluye la SEQ ID NO: 31, la FW6 es o incluye la SEQ ID NO: 32, la FW7 es o incluye la SEQ ID NO: 33 y la FW8 es o incluye la SEQ ID NO: 34.

15 **[00068]** En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, la VL incluye una secuencia de aminoácidos de región determinante de la complementariedad-1 de VL (VL-CDR1) idéntica a o idéntica a excepción de cuatro, tres, dos o una sustitución de aminoácidos respecto de: SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 48.

20 **[00069]** En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una VL que tiene la SEQ ID NO: 57 y una VH que tiene la SEQ ID NO: 71.

25 **[00070]** En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno del mismo tiene una VL que tiene la SEQ ID NO: 68 y una VH que tiene la SEQ ID NO: 82.

30 **[00071]** En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno del mismo incluye una

región constante de cadena pesada o un fragmento de la misma.

[00072] En varias realizaciones, la región constante de cadena pesada o el fragmento de la misma es una región constante de IgG que incluye, por ejemplo, una región constante de IgG1, una región constante de IgG2, una región constante de IgG3 o una región constante de IgG4.

[00073] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno del mismo incluye una región constante de cadena ligera seleccionada entre una región constante kappa humana y una región constante lambda humana.

[00074] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, la región constante de IgG tiene una o más sustituciones de aminoácidos en relación a una región constante de IgG de tipo silvestre, donde la IgG modificada tiene una semivida aumentada en comparación con la semivida de una IgG que tiene la región constante de IgG de tipo silvestre.

[00075] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, la región constante de IgG tiene una o más sustituciones de aminoácidos de restos de aminoácidos en las posiciones 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-436, donde la numeración es según el índice EU tal como se expone en Kabat.

[00076] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, al menos una sustitución de aminoácido de la región constante de IgG se selecciona entre:

- (a) sustitución del aminoácido en la posición 252 con tirosina (Y), fenilalanina (F), triptófano (W) o treonina (T);
- (b) sustitución del aminoácido en la posición 254 con treonina (T);
- (c) sustitución del aminoácido en la posición 256 con serina (S), arginina (R), glutamina (Q), ácido glutámico (E), ácido aspártico (D) o treonina (T);
- (d) sustitución del aminoácido en la posición 257 con leucina (L);
- (e) sustitución del aminoácido en la posición 309 con prolina (P);
- (f) sustitución del aminoácido en la posición 311 con serina (S);
- (g) sustitución del aminoácido en la posición 428 con treonina (T), leucina (L), fenilalanina (F) o serina (S);
- (h) sustitución del aminoácido en la posición 433 con arginina (R), serina (S), isoleucina (I), prolina (P) o glutamina (Q);
- (i) sustitución del aminoácido en la posición 434 con triptófano (W), metionina (M), serina (S), histidina (H), fenilalanina (F) o tirosina; y,
- (j) una combinación de dos o más de dichas sustituciones, donde la numeración es de acuerdo el índice EU tal como se expone en Kabat.

[00077] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, la región constante de IgG humana tiene sustituciones de aminoácidos en relación con una región constante de IgG humana de tipo silvestre en las posiciones 252, 254 y 256, donde

(a) el aminoácido en la posición 252 se sustituye con tirosina (Y),

(b) el aminoácido en la posición 254 se sustituye con treonina (T), y

- 5 (c) el aminoácido en la posición 256 se sustituye con ácido glutámico (Y),
donde la numeración es de acuerdo el índice EU tal como se expone en Kabat.

[00078] En varias realizaciones de cualquier aspecto
10 indicado en el presente documento, el aminoácido en la posición 434 se sustituye con un aminoácido seleccionado entre triptófano (W), metionina (M), tirosina (Y) y serina (S), y donde la numeración es de acuerdo con el índice EU tal como se expone en Kabat.

15 **[00079]** En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el aminoácido en la posición 428 se sustituye con un aminoácido seleccionado entre treonina (T), leucina (L), fenilalanina (F) y serina (S), y donde la numeración es de acuerdo con el índice EU
20 tal como se expone en Kabat.

[00080] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el aminoácido en la posición 257 se sustituye con leucina (L) y el aminoácido en la posición de Kabat 434 se sustituye con tirosina (Y),
25 y donde la numeración es de acuerdo con el índice EU tal como se expone en Kabat.

[00081] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el aminoácido en la posición 428 se sustituye con leucina (L) y el aminoácido
30 en la posición de Kabat 434 se sustituye con serina (S).

[00082] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, la región constante de IgG humana tiene sustituciones de aminoácidos en relación con una región constante de IgG humana de tipo silvestre en las posiciones 252, 254 y 256, donde la numeración es de acuerdo con el índice EU tal como se expone en Kabat y donde

- (a) el aminoácido en la posición 252 se sustituye con tirosina (Y),
- (b) el aminoácido en la posición 254 se sustituye con treonina (T), y
- (c) el aminoácido en la posición 256 se sustituye con ácido glutámico (Y).

[00083] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo multiespecífico o un fragmento de unión a antígeno de los mismos.

[00084] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el fragmento de unión a antígeno es un Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv o sc(Fv)₂.

[00085] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno del mismo se conjuga a al menos un agente heterólogo, incluyendo, por ejemplo, un agente anticanceroso.

[00086] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, una composición de

acuerdo con la invención contiene además un agente anticanceroso.

[00087] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno del mismo no induce citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC).

[00088] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno del mismo es un agonista de CD73.

[00089] En varias realizaciones, el anticuerpo aislado o el fragmento de unión a antígeno del mismo es un antagonista de CD73 en células seleccionadas entre MB-MDA-231, 4T1, MK1 o una combinación de dos o más de las células citadas.

[00090] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el CD73 es CD73 humano.

[00091] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, la unión del anticuerpo o del fragmento de unión a antígeno a CD73 puede reducir la proliferación celular.

[00092] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno para CD73 puede unirse a CD73 humano, a CD73 de mono cinomolgo y a CD73 de ratón.

[00093] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el cáncer se selecciona entre cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, leucemia, linfoma, glioma, glioblastoma, melanoma,

cáncer de ovario, cáncer de tiroides, cáncer esofágico, cáncer de próstata y cáncer de mama.

[00094] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el cáncer tiene un fenotipo prometastásico, incluyendo melanoma o cáncer de mama.

[00095] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el sujeto es humano.

[00096] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, la combinación del primer agente y el segundo agente tiene una actividad antitumoral superior que puede ser aditiva o sinérgica.

[00097] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el segundo agente es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[00098] En varias realizaciones, el segundo agente se une a PD-1 (proteína 1 de muerte programada), PD-L1 (ligando 1 de la proteína 1 de muerte programada), PD-L2 (ligando 2 de la proteína 1 de muerte programada o CTLA-4 (proteína 4 de antígeno de linfocitos T citotóxicos).

[00099] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el segundo agente es un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, incluyendo, por ejemplo, ipilimumab, tremelimumab (ticilimumab, CP-675,206) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

[00100] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el segundo agente es un anticuerpo anti-PD-1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, incluyendo, por ejemplo, pembrolizumab (Keytruda®, lambrolizumab, MK-3475), nivolumab (Opdiva®, BMS-936558,

MDX-1106, ONO-4538), AMP-224, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

[00101] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el segundo agente es un anticuerpo anti-PD-L1 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, incluyendo, por ejemplo, MEDI4736, BMS-936559, MPDL3280A o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

[00102] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el anticuerpo anti-CD73 es MEDI9447, hIgG1 Phen0203 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

[00103] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el sujeto se está sometiendo, se ha sometido o se someterá a una terapia anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4.

[00104] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, la terapia anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4 implica administrar un anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, respectivamente.

[00105] En varias realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es pembrolizumab (Keytruda®, lambrolizumab, MK-3475), nivolumab (Opdiva®, BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538), AMP-224 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

[00106] En varias realizaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 es MEDI4736, BMS-936559, MPDL3280A o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

[00107] En varias realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 es ipilimumab, tremelimumab (ticilimumab, CP-675,206) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

[00108] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el tumor es un cáncer de colon, melanoma, cáncer de mama, linfoma, carcinoma de pulmón no microcítico, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin y linfoma de Burkitt, cáncer de ovario, cáncer de mama, cánceres de cabeza y cuello o cáncer pancreático.

[00109] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, la expresión o actividad de CD73 se detecta en una muestra tumoral, una muestra de sangre o una muestra de linfa.

[00110] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, la expresión de CD73 se detecta en una célula tumoral o célula de sangre periférica, incluyendo los subconjuntos celulares linfoides o mieloides (es decir, uno o más de un linfocito B, linfocito CD4+, FoxP3+ o célula supresora derivada de mieloide (MDSC)).

[00111] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, la expresión de CD73 se detecta mediante citometría de flujo, inmunohistoquímica (IHC) o actividad enzimática de CD73 o niveles de CD73 soluble en las muestras.

[00112] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el anticuerpo anti-CD73 o el fragmento de unión a antígeno del mismo y el anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4 o el fragmento de unión a antígeno de los mismos se administran de manera concurrente.

[00113] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el método induce o aumenta una respuesta inmunitaria específica del tumor.

[00114] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el método reduce los efectos inmunosupresores de una vía de AMP/CD73/adenosina.

[00115] En varias realizaciones de cualquier aspecto
5 indicado en el presente documento, el tumor es un tumor que sobreexpresa CD73.

[00116] En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de unión aislada o un fragmento de unión a antígeno de la misma que se une específicamente a CD73 que tiene una
10 VL de anticuerpo y una VH de anticuerpo que se une específicamente a un epítipo de una proteína CD73 que tiene uno o más aminoácidos correspondientes a Val144, Lys180, y Asn185.

[00117] En varias realizaciones de cualquier aspecto
15 indicado en el presente documento, la molécula de unión aislada o de unión a antígeno contiene además uno o más aminoácidos correspondientes a Tyr135, Lys136, y Asn187.

[00118] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, la molécula de unión
20 aislada o el fragmento de unión a antígeno de la misma contiene los aminoácidos correspondientes a Tyr135, Lys136, y Asn187.

[00119] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, la molécula de unión
25 aislada o el fragmento de unión a antígeno de la misma contiene los aminoácidos correspondientes a Tyr135, Lys136, Asn187, Tyr135, Lys136, y Asn187.

[00120] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, la molécula de unión
30 aislada o el fragmento de unión a antígeno de la misma se une a un epítipo dentro de una o más de las siguientes

regiones de una proteína CD73: Tyr132-Val144 y/ou Lys180-Asn187.

5 **[00121]** En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, la molécula de unión aislada o el fragmento de unión a antígeno de la misma contiene o se encuentra dentro de las secuencias de aminoácidos en Tyr132-Val144 y/ou Lys180-Asn187.

10 **[00122]** En otro aspecto, la invención proporciona un epítipo conformacional sobre la superficie de una proteína CD73 que tiene uno o más de los aminoácidos correspondientes a Val144, Lys180 y Asn185, donde una proteína CD73 que contiene el epítipo puede unirse específicamente a al anticuerpo monoclonal MEDI9447 o a un fragmento de unión a antígeno, variante, análogo o derivado del mismo.

15 **[00123]** En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el epítipo conformacional contiene además uno o más aminoácidos correspondientes a Tyr135, Lys136, y Asn18.

20 **[00124]** En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el epítipo conformacional contiene los aminoácidos correspondientes a Tyr135, Lys136, y Asn187.

25 **[00125]** En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el epítipo conformacional contiene los aminoácidos correspondientes a Tyr135, Lys136, Asn187, Tyr135, Lys136, y Asn187.

30 **[00126]** En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el epítipo conformacional se encuentra dentro de una o más de las siguientes regiones de una proteína CD73: Tyr132-Val144 y/o Lys180-Asn187.

[00127] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, el epítipo conformacional contiene o se encuentra dentro de las secuencias de aminoácidos en Tyr132-Val144 y/ou Lys180-Asn187.

5 **[00128]** En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, MEDI9447 se une a la proteína CD73 en un estado inactivo o catalíticamente activo o un estado abierto o cerrado.

[00129] En varias realizaciones de cualquier aspecto
10 indicado en el presente documento, la proteína CD73 es CD73 humana.

[00130] En varias realizaciones de cualquier aspecto indicado en el presente documento, la molécula de unión aislada o el fragmento de unión a antígeno de la misma, en
15 donde la VL y la VH son las VL y VH de MEDI9447.

[00131] Las composiciones y artículos definidos por la invención se aislaron o de otro modo produjeron en relación con los ejemplos proporcionados a continuación. Otras características y ventajas de la invención serán evidentes
20 a partir de la descripción detallada, y de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS/FIGURAS

[00132] La figura 1A muestra la secuencia de nucleótidos y la traducción en aminoácidos del dominio VH de MEDI9447
25 con las CDR mostradas basándose en la convención de numeración de Kabat.

[00133] La figura 1B muestra la secuencia de nucleótidos y la traducción en aminoácidos del dominio VL de MEDI9447 con las CDR mostradas basándose en la convención de
30 numeración de Kabat.

[00134] La figura 1C muestra un alineamiento de la VH de MEDI9447 con las secuencias de VH y JH más próximas de línea germinal. Se resaltan las CDR basadas en la convención de numeración de Kabat y los restos diferentes de las secuencias de línea germinal se encuentran recuadrados.

[00135] La figura 1D muestra un alineamiento de la VL de MEDI9447 con las secuencias de VL y JL más próximas de línea germinal. Se resaltan las CDR basadas en la convención de numeración de Kabat y los restos diferentes de las secuencias de línea germinal se encuentran recuadrados.

[00136] La figura 2 proporciona dos gráficas que muestran la internalización mediada por anticuerpo de un reactivo FabZAP citotóxico en células MDA-MB-231 y células 4T1, donde los anticuerpos son MEDI9447 y el anticuerpo de control R347.

[00137] La figura 3A es una gráfica que muestra la inhibición de 5' ectonucleotidasa por el anticuerpo anti-CD73, MEDI9447.

[00138] La figura 3B es una gráfica que muestra la inhibición de la hidrólisis de AMP por el anticuerpo anti-CD73, CD370010.

[00139] La figura 4 es una gráfica que muestra que MEDI9447 inhibió el crecimiento tumoral en un modelo de tumor singénico CT26. Se implantaron células tumorales murinas CT26 por vía subcutánea en el costado derecho de ratones Balb/C hembra. Se dejó que los tumores crecieran durante 3 días y se trataron con MEDI9447 o un control de isotipo dos veces a la semana durante dos semanas. En el

día 16, se recogieron los tumores para su análisis por citometría de flujo.

[00140] La Figura 5 es una gráfica que muestra que MEDI9447 inhibía células supresoras derivadas de mieloide (MDSC) infiltrantes en tumores. Los ratones portadores de tumores CT26 tratados con MEDI9447 fueron sacrificados y se recogieron los tumores en el día 16 del estudio. Los tumores se desasociaron en células individuales, se tiñeron para CD45 y marcadores de MDSC y se analizaron por citometría de flujo.

[00141] La figura 6 incluye seis diagramas de tela de araña que muestran el efecto de mIgG1 MEDI9447, anti-PD-1 o la combinación sobre el volumen tumoral. Los anticuerpos de control incluyen rIgG2a, que es un anticuerpo de rata monoclonal de control IgG2a de rata específico para la β -galactosidasa (β -Gal) de *E. coli* y la IgG1 murina de control de Isotipo. Se representaron los volúmenes tumorales de cada grupo para los animales individuales hasta el día 40 del estudio. Ningún ratón del grupo de control se encontró libre de tumores al final del periodo de 40 días del estudio. El tratamiento con anti-CD73 solo dio como resultado un 10 % de animales libres de tumores al final del estudio. El tratamiento con anti-PD1 solo también dio como resultado un 10 % de animales libres de tumores al final del estudio. De manera destacable, la combinación de tratamiento anti-CD73 y anti-PD dio como resultado un 60 % de ratones libres de tumores. Ninguno de los ratones del grupo de control se encontró libre de tumores al final del estudio.

[00142] La figura 7 es una gráfica que muestra el efecto de mIgG1 MEDI9447, de anti-PD1 o de la combinación sobre la supervivencia.

5 **[00143]** La figura 8 es una gráfica que muestra que la combinación de MEDI9447 y anti-PD-1 mejoró significativamente la inhibición del crecimiento tumoral ($p < 0.05$) cuando se comparó con cualquiera de los dos agentes individualmente en tumores de carcinoma colorrectal. Se inyectaron a los ratones por vía subcutánea
10 células singénicas de carcinoma colorrectal MC38-OVA y se trataron dos veces a la semana con 10 mg por kg de MEDI9447 o 10 mg por kg de anticuerpo anti-PD-1 solo o una combinación de ambos anticuerpos. El volumen tumoral se midió dos veces a la semana.

15 **[00144]** La figura 9 es un gráfico que muestra que anti-PD-1 inducía un microentorno tumoral rico en CD73 según se medía por la expresión de CD73 en células tumorales aisladas de ratones portadores de tumores. Se inyectaron a los ratones (n=4) por vía subcutánea células singénicas
20 colorrectales CT26 y se trataron dos veces a la semana con 10 mg por kg de anti-PD-1 o un anticuerpo de control de isotipo irrelevante. Un día después del primer tratamiento, los tumores se aislaron, las células se disociaron y se analizó el fenotipo de superficie por citometría de flujo.

25 **[00145]** La figura 10 es un gráfico que muestra que anti-PD-1 inducía un microentorno tumoral rico en CD73 según se medía por la expresión de CD73 en células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) aisladas de ratones portadores de tumores. Se inyectaron a los ratones (n=4) por vía
30 subcutánea células singénicas colorrectales CT26 y se trataron dos veces a la semana con 10 mg por kg de anti-PD-

1 o un anticuerpo de control de isotipo irrelevante. Un día después del primer tratamiento, se aislaron los tumores, se aislaron las células tumorales, se recogieron las células sanguíneas periféricas enteras y se analizó la expresión de CD73 en la superficie por citometría de flujo.

5 **[00146]** La figura 11 es un gráfico que muestra que anti-PD-1 inducía un microentorno tumoral rico en CD73 según se medía por la expresión de CD73 en linfocitos CD4⁺, FoxP3⁺ aislados de ratones portadores de tumores. Se inyectaron a los ratones (n=4) por vía subcutánea células singénicas colorrectales CT26 y se trataron dos veces a la semana con 10 mg por kg de anti-PD-1 o un anticuerpo de control de isotipo irrelevante. Tres días después del primer tratamiento, se aislaron los tumores, se recogieron las células sanguíneas periféricas enteras y se analizó la expresión de CD73 en la superficie por citometría de flujo.

15 **[00147]** La figura 12 es una gráfica que muestra que la combinación de MEDI9447 y anti-PD-L1 mejoró significativamente la inhibición del crecimiento tumoral (p<0.05) cuando se comparó con cualquiera de los dos agentes individualmente en tumores de melanoma. Se inyectaron a los ratones por vía subcutánea células singénicas de melanoma B16F10 y se trataron dos veces a la semana con 10 mg por kg de MEDI9447 o 10 mg por kg de anticuerpo anti-PD-L1 solo o una combinación de ambos anticuerpos. El volumen tumoral se midió dos veces a la semana.

25 **[00148]** La figura 13 es una gráfica que muestra que la combinación de MEDI9447 y anti-PD-L1 mejoró significativamente la inhibición del crecimiento tumoral (p<0.01) cuando se comparó con cualquiera de los dos

agentes individualmente en tumores de linfoma. Se
inyectaron a los ratones por vía subcutánea células
singénicas de linfoma EG7-OVA y se trataron dos veces a la
semana con 10 mg por kg de MEDI9447 o 10 mg por kg de
5 anticuerpo anti-PD-L1 solo o una combinación de ambos
anticuerpos. El volumen tumoral se midió dos veces a la
semana.

[00149] La figura 14 es un gráfico que muestra que anti-
PD-L1 inducía un microentorno tumoral rico en CD73 según se
10 medía por la expresión en la superficie de CD73 en
linfocitos B de ganglio linfático de drenaje. Se inyectaron
a los ratones (n=4) por vía subcutánea células singénicas
colorrectales CT26 y se trataron dos veces a la semana con
10 mg por kg de anti-PD-L1 o un anticuerpo de control de
15 isotipo irrelevante. Un día después del primer tratamiento,
se aislaron las células de los ganglios linfáticos de
drenaje y se analizó el fenotipo de superficie por
citometría de flujo.

[00150] La figura 15 es un gráfico que muestra que anti-
PD-L1 inducía un microentorno tumoral rico en CD73 según se
20 medía por la expresión en la superficie de CD73 en
linfocitos CD4⁺, FoxP3⁺ que infiltraban los tumores. Se
inyectaron a los ratones (n=4) por vía subcutánea células
singénicas colorrectales CT26 y se trataron dos veces a la
25 semana con 10 mg por kg de anti-PD-L1 o un anticuerpo de
control de isotipo irrelevante. Tres días después del
primer tratamiento, los tumores se aislaron, las células se
disociaron y se analizó el fenotipo de superficie por
citometría de flujo.

30 **[00151]** La figura 16 A y B son gráficos que muestran que
MEDI9447 solo o en combinación con anti-PD-L1 reducía la

expresión de CD73 en células linfoides que infiltraban los tumores. Se trataron ratones portadores de tumores singénicos CT26 colorrectales dos veces por semana (Día 12 y D16) con 30 mg/kg de MEDI9447 o 30 mg/kg de anti-PD-L1 individualmente o una combinación de MEDI9447 y anti-PD-L1. El Día 17, se recogieron los tumores y se analizó la expresión de CD73 en la superficie por citometría de flujo. Expresión de CD73 en infiltrados tumorales de (A) Treg CD4+ FoxP3+ y (B) células T CD8+.

10 **[00152]** La figura 17 A y B son gráficos que muestran que MEDI9447 solo o en combinación con anti-PD-L1 reducía la actividad de CD73 en (A) células tumorales y (B) células sanguíneas periféricas enteras. Se trataron ratones portadores de tumores singénicos CT26 colorrectales dos veces por semana (Día 12 y D16) con 30 mg/kg de MEDI9447 o 30 mg/kg de anti-PD-L1 individualmente o una combinación de MEDI9447 y anti-PD-L1. El Día 17 se recogieron los tumores y células sanguíneas periféricas enteras y se analizó la expresión de CD73 en la superficie en relación con la actividad enzimática usando Cell-Titre Glo.

20 **[00153]** La figura 18 es una serie de gráficos que representan perfiles de citocinas de células mononucleares de sangre periférica tratadas con MEDI9447 y anticuerpos o proteínas de expresión específicas para CTLA4, OX40, PD-1 y PD-L1. Se incubaron células mononucleares de sangre periférica humana primarias durante 72 h en una reacción de cultivo mixto de leucocitos con MEDI9447 y/o anticuerpos o proteínas de fusión específicas para las dianas indicadas. Se cuantificaron las citocinas (IFN- γ , IL-1 β , TNF- α) en los sobrenadantes por duplicado mediante un ELISA. Los datos representan las combinaciones de dosis óptimas de

anticuerpo anti-CD73 con los 4 agentes asociados diferentes. La combinación anti-PD-1 y anti-CD73 mostraba una sinergia significativa ($p < 0.05$) determinada por el método de respuesta de superficie de Bliss (Zhao et al.).

- 5 El perfil de citocinas indica que se veían afectados tanto el linaje mieloide como el linaje linfoide. Se han ensayado más de 50 parejas de donantes.

[00154] Las figuras 19A y 19B representan los resultados del análisis MS de intercambio de hidrógeno-deuterio (HDX-MS) de CD73 en complejos con MEDI9447. La figura 19A
10 representa el mapa térmico del intercambio de hidrógeno-deuterio de las regiones de CD73 (desde el extremo N al extremo C) que experimentan una menor captación de deuterio cuando se unen a MEDI9447. El intercambio relativo entre
15 CD73 unido a anticuerpo y no unido se representa como una función del tiempo de exposición, mostrándose el intercambio reducido en rojo, el intercambio aumentado en azul y la ausencia de intercambio en blanco. Las regiones N-terminales en las posiciones 132-143 y 182-187
20 presentaban el máximo grado de intercambio diferencial. La figura 8B muestra una estructura cristalina del monómero de CD73 que representa la localización de la interfase de unión identificada por HDX (cian) dentro del dominio N-terminal (amarillo). La región enlazadora de CD73 y el
25 dominio C-terminal se representan en naranja y azul, respectivamente.

[00155] Las figuras 20A-20E representan los resultados del análisis MS de intercambio de hidrógeno-deuterio (HDX-MS) que indican las regiones de CD73 y MEDI9447 que
30 experimentan intercambio de hidrógeno diferencial en estados libre frente a unido. La figura 20A representa

diagramas que representan la captación relativa de deuterio (cambio de masa en daltons) en función del tiempo de exposición al deuterio dentro de péptidos que incluyen la región 132-143. La figura 20B representa diagramas que

5 representan la captación relativa de deuterio (cambio de masa en daltons) en función del tiempo de exposición al deuterio dentro de péptidos que incluyen la región 182-187. En las figuras 20A y 20B, la captación para CD73 solo se muestra con cuadrados y la captación para CD73 unido al Fab

10 MEDI9447 se muestra en rojo. La secuencia del péptido, la posición y la masa se indican en el diagrama de cajas. Para limitar la región que contiene la secuencia que presenta un cambio en el intercambio de hidrógeno y que sería predecible que formara el epítipo, se comparó el cambio de

15 masa relativa en péptidos solapantes. Por ejemplo, el péptido que abarcaba las posiciones 173-186 presentaba un intercambio diferencial, mientras que no había diferencia en el péptido que abarcaba las posiciones 173-181. De esta manera, se dedujo que los restos cadena arriba de 182 no se

20 marcan de manera diferencial. La figura 20C representa una gráfica de diferencia DynamX para la cadena pesada del Fab MEDI9447. La figura 20D representa una gráfica de diferencia DynamX para la cadena ligera del Fab MEDI9447. En el caso de las figuras 20C y 20D, cada punto de datos

25 indica la diferencia en la captación de deuterio entre el complejo CD73+Fab (valores positivos en el eje y) y el Fab solo (valores negativos en el eje y). La barra vertical representa la suma de las diferencias de captación a través de los puntos de tiempo de exposición. Están indicadas las

30 CDR que mostraban menor captación relativa cuando el Fab estaba unido a CD73. La figura 9E representa la gráfica de

diferencia DynamX de CD73 solo (valores negativos en el eje y) frente a CD73 unido al Fab (valores positivos en el eje y). Están indicadas las regiones E1 (aa 132-143) y E2 (aa 182-187). El eje horizontal corresponde a los péptidos analizados desde el extremo N al extremo C (de izquierda a derecha). Sobre la gráfica está superpuesta una línea de trazos que muestra el límite del intervalo de confianza del 98 % de 1.6 dalton, para los cambios estadísticamente significativos.

10 **[00156]** Las figuras 21A-21H representan datos del chip sensor que muestran que el epítipo de MEDI9447 reside dentro del dominio N-terminal de CD73. La figura 21A es un gráfico que representa los datos del chip sensor para la proteína CD73 de tipo silvestre. Se inmovilizó proteína

15 CD73 de tipo silvestre en un chip sensor HTG y se midió la unión de diluciones de MEDI9447 (de 5 nM a 0,3 nM) por resonancia de plasmón superficial (SPR). La figura 21B es un gráfico que representa los datos del chip sensor para la proteína CD73 con intercambio en el dominio N-terminal. Se

20 inmovilizó proteína CD73 con intercambio en el dominio N-terminal en un chip sensor HTG y se midió la unión de diluciones de MEDI9447 (de 5 nM a 0,3 nM) por SPR. MEDI9447 no se unía a CD73 cuando en el dominio N-terminal se había producido intercambio. La figura 21C es un gráfico que

25 representa los datos del chip sensor para la proteína CD73 con intercambio en los dominios N-terminal y C-terminal. Se inmovilizó proteína CD73 con intercambio en los dominios N-terminal y C-terminal en un chip sensor HTG y se midió la unión de diluciones de MEDI9447 (de 5 nM a 0,3 nM) por SPR.

30 MEDI9447 no se unía a CD73 cuando en los dominios N-terminal y C-terminal se había producido intercambio. La

figura 21D es un gráfico que representa los datos del chip sensor para la proteína CD73 con intercambio en la región enlazadora. Se inmovilizó proteína CD73 con intercambio en la región enlazadora en un chip sensor HTG y se midió la unión de diluciones de MEDI9447 (de 5 nM a 0,3 nM) por SPR. El intercambio únicamente en la región enlazadora no afectaba a la unión. La figura 21E es un gráfico que representa los datos del chip sensor para la proteína CD73 con intercambio en el dominio C-terminal. Se inmovilizó proteína CD73 con intercambio en el dominio C-terminal en un chip sensor HTG y se midió la unión de diluciones de MEDI9447 (de 5 nM a 0,3 nM) por SPR. El intercambio únicamente en el dominio C-terminal no afectaba a la unión. La figura 21F es un gráfico que representa los datos del chip sensor para la proteína CD73 con intercambio en la interfase E1 (aa 132-143). Se inmovilizó proteína CD73 con intercambio en la interfase E1 (aa 132-143) en un chip sensor HTG y se midió la unión de diluciones de MEDI9447 (de 5 nM a 0,3 nM) por SPR. La figura 21G es un gráfico que representa los datos del chip sensor para la proteína CD73 con intercambio en la interfase E2 (aa 182-187). Se inmovilizó proteína CD73 con intercambio en la interfase E2 (aa 182-187) en un chip sensor HTG y se midió la unión de diluciones de MEDI9447 (de 5 nM a 0,3 nM) por SPR. La figura 21H es un gráfico que representa los datos del chip sensor para la proteína CD73 con intercambio en la interfase E1 (aa 132-143) y en la interfase E2 (aa 182-187). Se inmovilizó proteína CD73 con intercambio en la interfase E1 (aa 132-143) y en la interfase E2 (aa 182-187) en un chip sensor HTG y se midió la unión de diluciones de MEDI9447 (de 5 nM a 0,3 nM) por SPR. En el caso de las

figuras 21F-21H, el intercambio en la interfase HDX E1 (aa 132-143) (figura 21F) tuvo un impacto pequeño sobre la unión, al contrario de lo que ocurría con el intercambio en la interfase HDX E2 (aa 182-187) sola (figura 21G) o en combinación con E1 (figura 21H). En el caso de las figuras 21A-21H, los sensogramas y los ajustes superpuestos se muestran en colores correspondientes. En la tabla 16 se proporcionan las mediciones cinéticas para cada análisis de unión.

10 **[00157]** La figura 22 representa el alineamiento de secuencias de la proteína CD73 humana y de pollo. Solo se muestran las secuencias de la proteína madura. En la secuencia de pollo están destacados los restos no conservados. Están anotadas las regiones intercambiadas entre pollo y ser humano para generar las variantes knock-out (por ejemplo, DS1a, DS1b, etc.).

15 **[00158]** Las figuras 23 representan la unión de MEDI9447 a variantes de CD73. La figura 23 es una tabla de datos que muestran la unión de MEDI9447 a variantes de CD73. Los valores de K_D para las variantes destacadas en azul han cambiado más de 2 veces con respecto a la construcción parental WT o KO. *Mediciones cinéticas derivadas de ajuste de ligando heterogéneo 2:1. **La numeración corresponde a la secuencia de pollo (129 = 133, 140 = 144, y 181 = 185 en ser humano).

20 **[00159]** Las figuras 24A-24F representan que el epítipo de MEDI9447 está situado en el ápice del dominio N-terminal. La figura 13A muestra que una evaluación de la unión de MEDI9447 a un panel de variantes de CD73 (véanse las figuras 22 y 23) reveló seis posiciones que constituyen un sitio de interacción. Dos de los tres restos que producen

25

30

más impacto (bloques destacados) están localizados fuera de las regiones de interfase HDX (destacadas en azul). Tres restos menos importantes (bloques de color rosa) están localizados dentro de la interfase HDX. La figura 24B es una tabla que muestra que la inserción de N185 y V144 (K180 está conservado) en una construcción de CD73 que contiene la secuencia del dominio N- y C-terminal de pollo restauraba la unión a menos de 20 veces la K_D para CD73 de tipo silvestre (diluciones de MEDI9447 desde 5 nM a 0,3 nM; compárese con la Figura 10B). La figura 24C representa un cierre de los restos del epítipo localizados dentro del dominio N-terminal de CD73. Los restos más importantes para la unión se muestran destacados y las posiciones con menos impacto (Y135, K136 y N187) están en color rosa. La interfase HDX está subrayada en azul. La figura 24D presenta una representación de superficie que muestra que el epítipo forma una superficie de unión casi contigua. La figura 24E representa una estructura cristalina de la conformación abierta de CD73 que muestra la posición del epítipo en la superficie apical, lateral del dominio N-terminal. La figura 24F muestra que la localización del epítipo está alejada del sitio de unión al sustrato (adenosina representada con esferas) y el sitio de coordinación con el ion de cinc (esfera gris) (cadenas laterales en cian). En todas las estructuras cristalinas, el dominio N-terminal de CD73, la región enlazadora y el dominio C-terminal están representados en amarillo, naranja y azul, respectivamente.

[00160] Las figuras 25A-25C muestran que MEDI9447 es un inhibidor no competitivo de la hidrólisis de AMP por CD73. La figura 25A es un gráfico que representa la cinética de

la fosfohidrólisis de AMP por CD73 medida en presencia de MEDI9447 o un mAb de control de isotipo correspondiente. La figura 25B es un gráfico que muestra que MEDI9447 actúa como inhibidor no competitivo, ya que inhibe la hidrólisis de manera equivalente independientemente de la concentración de sustrato. Por el contrario, APCP, un inhibidor competitivo conocido de CD73, aumenta K_m pero no aumentaba la V_{max} . La figura 25C es un gráfico que representa la respuesta a la dosis de IgG MEDI9447, Fab MEDI9447 o IgG de control sobre la inhibición de la hidrólisis de AMP por CD73. La IgG MEDI9447 alcanzó la inhibición máxima a una estequiometría molar 1:1 con dímero de CD73 (flecha). A altas concentraciones, en las que la IgG MEDI9447 está en exceso (>10 nM), se observó una pérdida de inhibición o "efecto gancho". El Fab MEDI9447 y la IgG de control no inhibían CD73. Todos los experimentos se realizaron usando el ensayo CellTiterGlo como se describe en el presente documento (RLU, unidades relativas de luz).

20 **[00161]** Las figuras 26A-26C muestran que la unión del Mab anti-CD73 (clon 0069) depende de los restos del dominio N- y C-terminal de CD73. La figura 26A es un gráfico que muestra los datos del chip sensor para CD73 marcado con histidina. CD73 marcado con histidina se inmovilizó en un biosensor HIS2 y se midió la unión por el mAb A mediante interferometría de biocapa (BLI). La unión del mAb A a CD7 WT (sensograma azul), CD73 knockout de intercambio del dominio N-terminal (KO_1-291, sensograma verde) y CD7 knockout de intercambio del dominio C-terminal (KO_311-523, sensograma cian) muestran que la unión del mAb se ve afectada por restos tanto del dominio N-terminal como del

dominio C-terminal. Figura 26B Estructura cristalina de CD73 abierto y cerrado que muestra la posición de mAb A que se une al punto caliente destacado (aa 114-134 y 153-170), que está situado cerca de la interfase del dominio N- y C-terminal (dominio N-terminal en amarillo, enlazador en naranja y dominio C-terminal en azul). El mapeo se basó en los datos de unión de las figuras 26A y 26C. La figura 26C muestra sensogramas de unión de mAb A a diferentes variantes knockout de intercambio de dominio de CD73. El intercambio de subregiones DS2c (aa 114-134) o DS3a (aa 153-170) hacía desaparecer la unión. Todo el análisis de unión se realizó en un instrumento Octet QK384 como se describe en el presente documento.

[00162] Las figuras 27A-27C muestran que MEDI9447 inhibía la transición de CD73 a la estructura conformacionalmente activa. La figura 27A es un gráfico que muestra los datos del biosensor para CD73 de tipo silvestre. Se inmovilizó CD73 de tipo silvestre en un biosensor HIS2 y se midió la unión de MEDI9447 (sensograma azul) y mAb A anti-CD73 (sensograma de color marrón) por BLI en un Octet QK384. Cuando CD73 se preincubó con Zn^{2+} y APCP, MEDI9447 conservaba la unión (sensograma negro), pero se perdía la unión del mAb A (sensograma naranja). La figura 27B es un gráfico que muestra que aunque la preincubación de Zn^{2+} y APCP con CD73 producía una pérdida de unión del mAb A (sensograma naranja), la preincubación con MEDI9447 antes de la adición de Zn^{2+} y APCP restauraba la unión (sensograma morado). La unión de mAb A a CD73 solo y a CD73 preincubado con MEDI9447 (pero sin Zn^{2+} y APCP) se muestran en los sensogramas azul y marrón, respectivamente. La figura 27C muestra un modelo propuesto que representa cómo

MEDI9447 impide que CD73 adopte la conformación completamente cerrada, activa, inducida por Zn^{2+} y APCP. MEDI9947 puede restringir la transición a un estado intermedio con menor afinidad por mAb A.

- 5 **[00163]** Las figuras 28A y 28B muestran la unión de
MEDI9447 o mAb A a CD73 en diferentes condiciones, medida
por BLI como se describe en el presente documento, a menos
que se indique lo contrario más adelante. La figura 28A es
un gráfico que representa la unión del mAb A anti-CD73 a
10 CD73 de tipo silvestre marcado con histidina inmovilizado
en un biosensor HIS2. Después de un punto de referencia de
100 seg, se incubó CD73 capturado con Zn^{2+} , APCP y/o EDTA
durante 900 seg, y después el biosensor se incubó en mAb A
30 nM durante 600 seg para medir la unión. El mAb A se unió
15 a CD73 (sensograma azul) pero no a CD73 preincubado con
 Zn^{2+} y APCP (sensograma morado). El mAb A mantenía la unión
a CD73 preincubado con APCP y EDTA (sensograma verde) o
 Zn^{2+} , APCP y EDTA (sensograma dorado). El efecto quelante
de EDTA muestra que se necesitaba el catión divalente para
20 la pérdida de unión de mAb A cuando CD73 se incubaba con
 Zn^{2+} y APCP. La figura 28B es un gráfico que muestra que el
Fab MEDI9447 o la IgG de control no rescataban la unión del
mAb A a CD73 preincubado con Zn^{2+} y APCP. El ensayo se
realizó como en la figura 27B. Se preincubaron Fab MEDI9447
25 o IgG de control del isotipo correspondiente con CD73 antes
de la adición de Zn^{2+} y APCP. El mAb A inmovilizado en el
biosensor se unía a CD73 solo (sensograma azul), CD73
preincubado con Fab MEDI9447 (sensograma azul claro) o IgG
de control (sensograma negro), pero no a CD73 incubado con
30 Zn^{2+} y APCP (sensograma de color marrón), o Fab (sensograma

dorado) o IgG de control (sensograma morado) preincubado con CD73 antes de la adición de Zn^{2+} y APCP.

[00164] Las figuras 29A y 29B muestran que la unión del mAb B anti-CD73 depende de los restos de las subregiones DS2b (aa 92-134) o DS2c (aa 114-134). La figura 29A es una tabla que muestra los datos SEC-MALS correspondientes a las figuras 30A-30C. Para cada mezcla de CD73 y MEDI9447 o mAb B, se muestran el tiempo de retención por SEC correspondiente, el peso molecular (Mw) y la polidispersidad de los complejos formados. La figura 29B representa la determinación del punto caliente de unión del mAb B en CD73. La unión del mAb B a variantes de CD73 inmovilizadas en biosensores HIS2 se midió por BLI como se describe para el mAb A (clon 0069) en las figuras 26A-26C de acuerdo con los métodos del presente documento. Los sensogramas de unión mostraron que el intercambio de la subregión DS2b (aa 92-134) o DS2c (aa 114-134) hacía desaparecer la unión por el mAb B.

[00165] Las figuras 30A-30C muestran que MEDI9447 forma puentes interdiméricos entre las moléculas de CD73 solubles. CD73 se incubó con cantidades variables de MEDI9447 o mAb B anti-CD73 y se analizó por SEC-MALS. Se muestran cromatogramas de SEC UV con el tiempo de retención de la proteína en el eje x y la masa molar determinada por MALS en el eje y. La figura 30A es un cromatograma que muestra que a una relación molar 1:1 (trazado verde), MEDI9447 formaba complejos con CD73 de ~1.7 (^) y ~6.6 (+) megadaltons. Se formaron complejos de tamaño comparable a relaciones menores de MEDI9447:CD73 (0.5:1 en azul, 0.1:1 en magenta). MEDI9447 y CD73 solos se representan por los trazados UV negro y rojo, respectivamente. La figura 30B es

una vista completa de la estructura cristalina del dímero de CD73 que muestra el punto caliente de unión del mAb B (morado) y el epítipo de MEDI9447 (magenta y rosa). El mAb B se une a un sitio próximo el surco central entre los dímeros en la conformación abierta. La Figura 30C es un cromatograma que muestra que cuando CD73 se une a mAb B, se formaba un solo complejo predominante de ~270-290 kD (pico a ~7,2 min). Los trazados UV mostrados representan 1:1 mAb B:CD73 (rojo), 0.5:1 (azul), y 0.1:1 (verde). El mAb A y CD73 solos están en magenta y negro, respectivamente.

[00166] Las Figuras 31A-31D representan que el CD73 unido a la superficie se inhibía por los formatos de IgG y Fab de MEDI9447. La Figura 31A es un gráfico que representa la inhibición de la hidrólisis de AMP de CD73 inmovilizado por IgG MEDI9447, Fab MEDI9447 o anticuerpos de control. CD73 se inmovilizó a través de un marcador de histidina C-terminal en una placa de microtitulación recubierta con níquel y la inhibición de la hidrólisis de AMP por IgG MEDI9477, Fab MEDI9447 o anticuerpos de control se midió usando el ensayo de Verde Malaquita como se describe en el presente documento. La IgG MEDI9447, pero no la IgG de control, inhibía la hidrólisis de AMP por CD73 de una manera dependiente de la dosis. El Fab MEDI9447, también inhibía la actividad de CD73, pero en una medida mucho menor. La Figura 31B representa complejos que comprenden el Fab MEDI9447 (verde) unido al anticuerpo anti-Fd(xFd, rojo). Cuando el Fab MEDI9447 (verde) se unía a un brazo de un anticuerpo anti-Fd (xFd, rojo) y el otro brazo se unía a un Fab policlonal no específico (pFab, naranja) la inhibición aumentaba hasta que era comparable con IgG MEDI9447 (Fab+xFd+pFab vs. IgG MEDI9447 e IgG

MEDI9947+xFd+pFab) (véase la Figura 31A). La Figura 31C es un gráfico que representa la inhibición de la hidrólisis de AMP de CD73 anclado por GPI mediante IgG MEDI9447, Fab MEDI9447 o anticuerpos de control. Se midió la actividad 5 enzimática de CD73 expresado de forma endógena en células MDA-MB-231 por el ensayo CellTiterGlo. De forma similar al CD73 recombinante inmovilizado, la IgG MEDI9447 inhibe la hidrólisis de AMP en un mayor grado que el Fab, pero el aumento del tamaño eficaz del Fab MEDI9447 al formar un 10 complejo con un anticuerpo anti-Fd aumenta la inhibición. La Figura 31D es un gráfico que representa la inhibición de la hidrólisis de AMP de CD73 soluble (sCD73) mediante IgG MEDI9447, Fab MEDI9447 o anticuerpos de control. Para ensayar si el xFd+MEDI9447 puede inhibir el CD73 soluble, 15 se midió la hidrólisis de AMP usando el ensayo de Verde de Malaquita. El Fab MEDI9447 solo o unido a un solo brazo de xFd no inhibía la actividad de CD73 soluble. Por el contrario, la unión del Fab MEDI9947 a los dos brazos de xFd (MEDI9447 Fab + xFd) confería bivalencia que daba como 20 resultado la inhibición de CD73.

[00167] La Figura 32 es un gráfico que muestra que la IgG y Fab MEDI94447 inhibían la hidrólisis de AMP por CD73. La actividad de CD73 se midió en presencia de concentraciones 25 crecientes de anticuerpo usando el ensayo de Verde de Malaquita, como se describe en el presente documento. La IgG MEDI9447 inhibía la actividad hidrolítica de CD73 de una manera dependiente de la dosis y sin efecto gancho, o se observaba una pérdida de inhibición. El Fab MEDI9447 también inhibía la función de CD73, pero en un menor nivel 30 de inhibición máxima. El experimento se realizó dos veces

con resultados comparables. Se muestran los datos de un solo experimento.

[00168] La Figura 33 representa un modelo que muestra que la inhibición de la actividad hidrolítica de CD73 por
5 MEDI9447 se realiza a través de un mecanismo doble. La IgG MEDI9447 (verde) inhibe el CD73 soluble al formar puentes interdiméricos que impiden la transición conformacional al estado cerrado. La IgG o Fab unido de forma monovalente no inhibe el CD73 soluble. Cuando CD73 está unido a la
10 superficie, la inhibición se puede producir a través de la formación de puentes de dímeros de CD73 adyacentes, o bloqueo estérico de IgG unida de forma monovalente o complejos Fab/xFd (rojo).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[00169] La presente invención proporciona moléculas de unión aisladas o fragmentos de unión a antígeno de las mismas que se unen específicamente a CD73. En algunos aspectos, dichas moléculas son anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente
20 a CD73. También se proporcionan polinucleótidos relacionados, vectores, composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos anti-CD73 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. También se proporcionan métodos de fabricación así como métodos para usar los anticuerpos
25 anti-CD73 y fragmentos de unión a antígeno desvelados en el presente documento, por ejemplo, métodos de diagnóstico y métodos para tratar cánceres en un sujeto (como terapia directa, terapia coadyuvante o en terapia de combinación). La invención también proporciona conjugados de anticuerpo-
30 fármaco derivados de las moléculas de unión a CD73 desveladas en el presente documento. Por consiguiente, la

presente invención también proporciona combinaciones terapéuticas que contienen anticuerpos anti-CD73 (por ejemplo, MEDI9447) y uno o más agentes que se dirigen a aspectos adicionales del ciclo inmunitario del cáncer tales como anticuerpos anti-PD-1, anticuerpos anti-PD-L1 (por ejemplo, MEDI4736), anticuerpos anti-CTLA4; y métodos para usar dichas combinaciones para reducir la inmunosupresión mediada por tumores.

[00170] Para que la presente divulgación pueda entenderse más fácilmente, en primer lugar se definen determinados términos. Las definiciones adicionales se exponen a lo largo de la descripción detallada.

I. Definiciones

[00171] Antes de describir la presente invención en detalle, se debe sobreentender que esta invención no se limita a composiciones o pasos de procesos específicos, ya que estos pueden variar. Tal como se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/o", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. El término "un/uno" (o "una"), así como las expresiones "uno o más" y "al menos uno" se pueden utilizar indistintamente en el presente documento.

[00172] Además, "y/o" cuando se usa en esta memoria debe tomarse como la descripción específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por tanto, el término "y/o" tal como se usa en un frase tal como "A y/o B" en el presente documento pretende incluir "A y B", "A o B", "A" (solo), y "B" (solo). De modo similar, el término "y/o", según se utiliza en una frase tal como "A, B y/o C", pretende incluir cada uno de los

siguientes aspectos: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

[00173] A menos que se defina de otro modo, todos los términos científicos y técnicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que interpreta comúnmente un experto en la materia a la que se refiere esta divulgación. Por ejemplo, el Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2ª ed., 2002, CRC Press; el Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3ª ed., 1999, Academic Press; y el Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, revisado, 2000, Oxford University Press, proporcionan a un experto un diccionario general de muchos de los términos utilizados en esta divulgación.

[00174] Las unidades, los prefijos y los símbolos se indican con su forma aceptada por el Sistema Internacional de Unidades (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxilo. Los encabezados proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos, que pueden obtenerse como referencia a la memoria descriptiva como un todo. Por consiguiente, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen más detalladamente por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

[00175] Se entiende que siempre que se describan aspectos en el presente documento con el lenguaje "que comprende", también se proporcionan aspectos por lo demás análogos en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

[00176] En la presente, se hace referencia a los aminoácidos ya sea mediante sus símbolos de tres letras conocidos habitualmente o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. De modo similar, se hace referencia a los nucleótidos mediante sus códigos de una única letra aceptados habitualmente.

[00177] La expresión "polipéptido CD73" como se usa en el presente documento se refiere a la proteína CD73 (Cluster of Differentiation 73), también denominada 5'-nucleotidasa (5'-NT) o ecto-5'-nucleotidasa en la bibliografía, que se codifica por el gen *NT5E*. Véase, por ejemplo, Misumi et al. Eur. J. Biochem. 191(3): 563-9 (1990). Las secuencias respectivas de las formas humana y murina de CD73 están disponibles en la base de datos Uniprot con los números de registro P21589 y Q61503, respectivamente. En la definición de cualquiera de los epítopos del anticuerpo contra CD73, la numeración de aminoácidos usada representa el resto de aminoácido de la proteína CD73 madura que no contiene los restos de la secuencia señal. Por consiguiente, un aminoácido de unión del anticuerpo Val144, Lys180 y Asn185, por ejemplo, se refiere a las posiciones de aminoácido después de la escisión de la secuencia señal, es decir, el aminoácido en la proteína madura.

[00178] A continuación se proporciona un polipéptido CD73 ejemplar:

>sp|P21589|5NTD_HUMAN 5'-nucleotidasa OS= Homo sapiens
GN=NT5E PE=1 SV=1

MCPRAARAPATLLLALGAVLWPAAGAWELTILHTNDVHSRLSEQTSEDSSKCVNASRCMG

30 G

VARLFTKVQQIRRAEPNVLLLDAGDQYQGTIWFTVYKGAEVAHF MNALRYDAMALGNHE
F
DNGVEGLIEPLLKEAKFPILSANIKAKGPLASQISGLYLPYKVLPVGDEVVGIVGYTSK
E
5 TPFLSNPGTNLVFEDEITALQPEVDKLKTLNVNKIIALGHSGFEMDKLIAQKVRGVDVV
V
GGHSNTFLYTGNPPSKEVPAGKYPFIVTSDDGRKVPVQAYAFGKYLGYLKIEFDERGN
V
ISSHGNPILLNSSIPEDPSIKADINKWRIKLDNYSTQELGKTIVYLDGSSQSCRFRECN
10 M
GNLICDAMINNNLRHTDEMFWNHVSMCILNGGGIRSPIDERNNGTITWENLAAVL PFGG
T
FDLVQLKGSTLKKAFEHSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVDLSRKPGDRVVKLDVLC TKC
R
15 VPSYDPLKMDEVYKVILPNFLANGGDGFQMIKDELLRHDSGDQDINVVSTYISKMKVIY
P
AVEGRIKFSTGSHCHGSFSLIFLSLWAVIFVLYQ

[00179] Se han identificado formas soluble y unida a la membrana de CD73. Véase Klemens et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 172(3): 1371-7 (1990). Además, se han
20 identificado varias isoenzimas diferentes. Véase Rosi et al. Life Sci. 62(25): 2257-66 (1998). La proteína CD73 de longitud completa comprende 574 aminoácidos. La proteína CD73 madura se produce después de retirar la secuencia
25 señal (posiciones 1 a 26) y la región C-terminal del propéptido (posiciones 550-574). Además, se retiran los aminoácidos 404 a 453 en la isoforma 2 de CD73 después del corte y empalme alternativo. También se conocen variantes naturales, por ejemplo, la variante C358Y, la variante
30 T376A y la variante M379T. Véase Misumi et al., Eur. J. Biochem. 191:563-569 (1990); Otsuki et al. DNA Res. 12:117-

126 (2005); Mungall et al. Nature 425:805-811 (2003);
Hansen et al. Gene 167:307-312 (1995); Klemens et al.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 172:1371-1377 (1990); Knapp
et al. Structure 20:2161-2173 (2012); o St. Hilaire et al.
5 N. Engl. J. Med. 364:432-442 (2011), todos los cuales se
incorporan en el presente documento por referencia en su
totalidad.

[00180] Las enfermedades típicas que conducen a un cambio
en el nivel de CD73 del paciente en fluidos de tejidos,
10 especialmente en suero son: traumatismo de tejidos;
lesiones de reperfusión debidas a un infarto de miocardio o
ictus, trasplantes de órganos u otras operaciones
quirúrgicas; cáncer o metástasis de cáncer; o estados
inflamatorios debidos a los traumatismos o lesiones de
15 reperfusión mencionados anteriormente o a afecciones
crónicas que incluyen estados alérgicos, enfermedades
autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias. Como
ejemplos de dichas afecciones crónicas pueden mencionarse
artritis, estados alérgicos tales como asma, afecciones
20 inflamatorias tales como enfermedades inflamatorias del
intestino o una afección inflamatoria de la piel,
psoriasis, enfermedad de Parkinson, enfermedad de
Alzheimer, enfermedades autoinmunitarias, diabetes de tipo
I o tipo II, aterosclerosis, esclerosis múltiple,
25 enfermedad de Crohn o reacciones de rechazo debidas a
trasplantes de órganos. Particularmente, las enfermedades
inflamatorias síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
(SIRS), lesión pulmonar aguda (ALI), fallo multiorgánico
(MOF), lesión de isquemia-reperfusión (IRI) y reacciones
30 adversas a fármacos (ADRS) conducen a alteraciones de la
proteína CD73 en fluidos de tejidos. Por consiguiente, las

moléculas de unión a CD73 desveladas pueden usarse, por ejemplo, para tratar o diagnosticar cánceres (por ejemplo, cáncer de colon, melanoma, cáncer de mama, linfoma, carcinoma de pulmón no microcítico, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin y linfoma de Burkitt, cáncer de ovario, cáncer de mama, cánceres de cabeza y cuello o cáncer pancreático). Además, la medición de los niveles de CD73 en una muestra de un paciente (por ejemplo un fluido de tejido) usando las moléculas de unión a CD73 desveladas en el presente documento puede usarse para supervisar el desarrollo de las enfermedades descritas anteriormente, para evaluar la eficacia de las terapias, para elegir a pacientes para el tratamiento con una terapia particular o para tomar decisiones médicas, por ejemplo, comenzar, finalizar, interrumpir o modificar un cierto tratamiento.

[00181] Los términos "inhibir", "bloquear", "reducir" y "suprimir" y variantes gramaticales de los mismos se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a cualquier disminución significativa desde el punto de vista estadístico de la actividad biológica, incluido el bloqueo total de la actividad. Por ejemplo, "inhibición" puede referirse a una disminución de aproximadamente el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o el 100 % de la actividad biológica. Por consiguiente, cuando se aplican los términos "inhibición" o "supresión" para describir, por ejemplo, un efecto sobre la actividad enzimática de CD73, el término se refiere a la capacidad de un anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo de reducir de una forma estadísticamente significativa la actividad 5' nucleotidasa de CD73 (que cataboliza la hidrólisis de adenosina monofosfato, AMP, a adenosina), con respecto a la

actividad 5' nucleotidasa mediada por CD73 en una célula no tratada (de control). La célula que expresa CD73 puede ser una célula o línea celular que se produce de manera natural (por ejemplo, una célula cancerosa) o puede producirse de manera recombinante introduciendo un ácido nucleico que codifica para CD73 en una célula hospedadora. En algunos aspectos, un anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo puede reducir de una manera estadísticamente significativa la actividad 5' nucleotidasa de una forma soluble de CD73 en un fluido biológico. En un aspecto, la molécula de unión anti-CD73, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe la actividad 5' nucleotidasa mediada por CD73 en al menos un 10 %, al menos un 15 %, o al menos un 20 %, al menos un 25 % o al menos un 30 %, al menos un 35 %, o al menos un 40 %, al menos un 45 %, o al menos un 50 %, al menos un 55 %, o al menos un 60 %, al menos un 65 %, o al menos un 70 %, al menos un 75 %, o al menos un 80 %, al menos un 85 %, o al menos un 90 %, al menos un 95 %, o aproximadamente un 100 %, como se determina, por ejemplo, por los métodos descritos en los ejemplos mostrados más adelante y/o métodos conocidos en la técnica.

[00182] La expresión "suprime la actividad de CD73", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de la molécula de unión anti-CD73, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, de reducir de una manera estadísticamente significativa la actividad 5' nucleotidasa dependiente de CD73 en una célula que expresa CD73 o una muestra que contiene CD73. En algunos aspectos, la supresión de la actividad de CD73 puede ser una reducción de al menos un 10 %, o al menos un

15 %, o al menos un 20 %, o al menos un 25 %, o al menos un 30 %, o al menos un 35 %, o al menos un 40 %, o al menos un 45 %, o al menos un 50 %, o al menos un 55 %, o al menos un 60 %, o al menos un 65 %, o al menos un 70 %, o al menos un 5 75 %, o al menos un 80 %, o al menos un 85 %, o al menos un 90 %, o al menos un 95 % o aproximadamente un 100 % cuando las células o una muestra se ponen en contacto con una molécula de unión anti-CD73, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente 10 divulgación, con respecto a la actividad de CD73 medida en ausencia de la molécula de unión anti-CD73, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (condiciones de control).

[00183] Los términos "anticuerpo" o "inmunoglobulina", 15 utilizados indistintamente en el presente documento, incluyen anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión al antígeno o cadenas individuales de estos.

[00184] Un anticuerpo típico comprende al menos dos 20 cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (que se abrevia en el presente documento como VH o V_H) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada 25 cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (que se abrevia en el presente documento como VL o V_L) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones de VH y VL pueden subdividirse además en regiones 30 de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que

están más conservadas, denominadas regiones marco (FW).
Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FW, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, FW4. Las
5 regiones variables de las cadenas ligera y pesada contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a factores o tejidos
hospedadores, incluidas varias células del sistema
10 inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema del complemento clásico. Los anticuerpos ejemplares de la presente divulgación incluyen anticuerpos anti-CD73 (originales y de línea germinal), clones optimizados por afinidad, anticuerpos optimizados
15 que carecen de ADCC, anticuerpos conjugados (por ejemplo, ADC), y otros anticuerpos optimizados (por ejemplo, anticuerpos con la semivida optimizada en suero que incluyen, por ejemplo, mutaciones YTE, véase Dall'Acqua et al., J. Biol. Chem. 281: 23514-24 (2006) y la patente de
20 Estados Unidos n.º 7,083,784, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad).

[00185] El término "germinalizar" significa que los aminoácidos en posiciones específicas en un anticuerpo se mutan para que sean los aminoácidos que estaban en la línea
25 germinal.

[00186] El término "anticuerpo" significa una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una diana, tal como una proteína, un polipéptido, un péptido, un hidrato de carbono, un polinucleótido, un lípido, o
30 combinaciones de los anteriores a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región

variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpo (tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv), mutantes de Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos multiespecíficos, tales como anticuerpos biespecíficos generados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden una porción de determinación antigénica de un anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno en tanto que los anticuerpos muestren la actividad biológica deseada.

[00187] Un anticuerpo puede ser de cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos) de estas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), basándose en la identidad de sus dominios constantes de la cadena pesada denominados α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales diferentes y bien conocidas. Los anticuerpos pueden estar desnudos o conjugados con otras moléculas tales como toxinas, radioisótopos, etc. para formar ADC.

[00188] Un anticuerpo de "bloqueo" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une, tal como CD73. En un determinado aspecto, los anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno. De forma deseable, la

actividad biológica se reduce en al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o incluso un 100 %.

[00189] Las expresiones "anticuerpo de CD73", "anticuerpo que se une a CD73" o "anti-CD73" se refieren a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que es capaz de unirse a CD73 con una afinidad suficiente de tal manera que la molécula sea útil como agente terapéutico o reactivo de diagnóstico para dirigirse a CD73. El grado de unión de un anticuerpo anti-CD73 a una proteína distinta de CD73 no relacionada es menor de aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo a CD73 tal como se mide, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA), o BIACORE™ (usando CD73 recombinante como analito y anticuerpo como ligando, o viceversa), u otros ensayos de unión conocidos en la técnica. En determinados aspectos, un anticuerpo que se une a CD73 tiene una constante de disociación (K_D) de ≤ 1 μ M, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, ≤ 0.1 nM, ≤ 10 pM, ≤ 1 pM o ≤ 0.1 pM. La expresión "anti-CD73" también incluye en sentido amplio moléculas que comprenden, por ejemplo, las CDR de los anticuerpos desvelados en el presente documento incorporadas en un esqueleto. De esta manera, la frase "molécula de unión aislada o fragmento de unión a antígeno de la misma que se une específicamente a CD73" haría referencia no solo a los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, sino que también haría referencia a una molécula que comprende, por ejemplo, uno o más

armazones (tal como un dominio de fibronectina III de la fibronectina o tenascina-3) que incorpora las CDR de los anticuerpos desvelados en el presente documento. Véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos N.º 20150098955, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

[00190] En una realización, un anticuerpo anti-CD73 se refiere a un anticuerpo en formato IgG1-TM de tal forma que el dominio Fc de IgG1 comprende las mutaciones L234, L235E y P331, se une a CD73 soluble y presentado en la superficie celular e inhibe la actividad enzimática de CD73. Las Figuras 1A-1D proporcionan las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los dominios VH y VL de MEDI9447.

[00191] Por "polipéptido CTLA4" se entiende un polipéptido que tiene al menos un 85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el n.º de registro del GenBank AAL07473.1 o un fragmento del mismo que tiene una actividad inhibidora de células T. La secuencia de AAL07473.1 se proporciona a continuación:

20 Secuencia del polipéptido CTLA4 [Homo sapiens]
gi|15778586|gb|AAL07473.1|AF414120_1
MACLGFRHKAQLNLATRTWPCTLLFLLFIPVFCKAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCE
YASPGKATEVR
VTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYIC
25 KVELMYPPPPY
LGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLKMLKKRSPLTTG
VYVKMPPEPE
CEKQFQPYFIPIN

[00192] Por "molécula de ácido nucleico de CTLA4" se entiende un polinucleótido que codifica un polipéptido CTLA4. Se proporciona una secuencia de molécula de ácido

nucleico CTLA4 ejemplar en el GenBank con el n.º de registro AAL07473.

[00193] Por "anticuerpo anti-CTLA4" se entiende un anticuerpo que se une selectivamente a un polipéptido CTLA4. Se describen anticuerpos anti-CTLA4 ejemplares, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n.º 6,682,736; 7,109,003; 7,123,281; 7,411,057; 7,824,679; 8,143,379; 7,807,797; y 8,491,895 (Tremelimumab es 11.2.1 en las mismas), que se incorporan al presente documento por referencia. Tremelimumab es un anticuerpo anti-CTLA4 ejemplar. Se proporcionan secuencias de tremelimumab en una lista de secuencias que se proporciona en el presente documento a continuación (SEQ ID NO: 130-137).

[00194] Por "polipéptido PD-1" se entiende un polipéptido o fragmento del mismo que tiene al menos aproximadamente un 85 % de identidad de aminoácidos con el n.º de registro del NCBI NP_005009 y que tiene actividad de unión a PD-L1 y/o PD-L2. La secuencia de NP_005009 se proporciona a continuación.

20 Secuencia del polipéptido PD-1

N.º de registro de NCBI NP_005009

mqipqapwpv vwavlqlgwr pgwfldspdr pwnpptfspa llvvtegdna
tftcsfsnts

esfvlnwurm spsnqtdkla afpedrsqpg qdcrrfrvtql pnggrdfhmsv
25 vrarrndsgt

ylcgaislap kaqikeslra elrvterrae vptahpspsp rpagqfqtlv
vgvvvgllgs

lvllvwvlav icsraargti garrtgqplk edpsavpvfs vdygeldfw
rektpeppvp

30 cvpeqteyat ivfpsgmgts sparrgsadg prsaqplrpe dghcswpl

[00195] Por "molécula de ácido nucleico PD-1" se entiende un polinucleótido que codifica un polipéptido PD-1. Se proporciona una secuencia de molécula de ácido nucleico PD-1 ejemplar en el n.º de registro de NCBI NM_005018.

- 5 **[00196]** Por "anticuerpo anti-PD-1" se entiende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une selectivamente a un polipéptido PD-1. Los anticuerpos anti-PD-1 ejemplares incluyen, por ejemplo, pembrolizumab (KEYTRUDA®, lambrolizumab, MK-3475), nivolumab (OPDIVA®, BMS-
10 936558, MDX-1106, ONO-4538) o AMP-224.

- [00197]** Por "polipéptido PD-L1" se entiende un polipéptido o fragmento del mismo que tiene al menos aproximadamente un 85 %, 95 % o 100 % de identidad de aminoácidos con el n.º de registro de NCBI NP_001254635 y que tiene actividad de unión
15 a PD-1 y CD80. A continuación se proporciona la secuencia de NP_001254635.

Secuencia del polipéptido PD-L1

N.º de registro de NCBI NP_001254635

mrifavfifm tywhllnapy nkinqrilvv dpvtsehelt cqaegypkae
20 viwtssdhqv
lsgkttttns kreeklnvt stlrntttn eifyctfrrl dpeenhtael
vipelplahp
pnerthlvil gaillclgva ltfifrlrkg rmmdvkkcgi qdtnskkqsd
thleet

- 25 **[00198]** Por "molécula de ácido nucleico PD-L1" se entiende un polinucleótido que codifica un polipéptido PD-L1. Se proporciona una secuencia de molécula de ácido nucleico PD-L1 ejemplar en el n.º de registro de NCBI NM_001267706.

- 30 **[00199]** Por "anticuerpo anti-PD-L1" se entiende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se

une selectivamente a un polipéptido PD-L1. Se describen anticuerpos anti-PD-L1 ejemplares, por ejemplo, en los documentos US20130034559 / US8779108 y US20140356353, que se incorporan en el presente documento por referencia.

5 MEDI4736 es un anticuerpo PD-L1 ejemplar. Se proporcionan secuencias de MEDI4736 en un listado de secuencias que se presenta en el presente documento más adelante (SEQ ID NO: 138-145).

[00200] La expresión "fragmento de unión al antígeno" se
10 refiere a una molécula que comprende una parte de un anticuerpo intacto y se refiere, en particular, a las regiones variables determinantes antigénicas de un anticuerpo intacto. Se conoce en la técnica que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse
15 mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de
20 fragmentos de anticuerpo.

[00201] Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de anticuerpos homogénea que participa en el reconocimiento y la unión sumamente específicos de un único determinante antigénico o epítipo. Esto se distingue de los
25 anticuerpos policlonales que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos.

[00202] El término "anticuerpo monoclonal" engloba anticuerpos monoclonales tanto intactos como de longitud
30 completa así como también fragmentos de anticuerpos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), mutantes monocatenarios

- (scFv), proteínas de fusión que comprenden una porción de un anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprende un sitio de reconocimiento del antígeno. Además, "anticuerpo monoclonal" se refiere a
- 5 tales anticuerpos producidos de varias maneras incluyendo, sin carácter limitante, mediante hibridoma, selección en fago, expresión recombinante y animales transgénicos (por ejemplo, expresión de un anticuerpo humano en un ratón transgénico).
- 10 **[00203]** El término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo derivado de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, murina), que se ha manipulado para que contenga secuencias no humanas mínimas (por ejemplo, murinas). Normalmente, los anticuerpos humanizados son
- 15 inmunoglobulinas humanas en las que se reemplazan restos de la región determinante de la complementariedad (CDR) por restos de la CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo o hámster) que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas (Jones *et al.*, 1986, *Nature*, 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature*, 332:323-327; Verhoeven *et al.*, 1988, *Science*, 239:1534-1536). En algunos
- 20 casos, los restos de la región marco (FW) de una inmunoglobulina humana se reemplazan por los restos correspondientes de un anticuerpo de una especie no humana que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas.
- 25 **[00204]** Los anticuerpos humanizados puede modificarse adicionalmente mediante la sustitución de restos adicionales en la región marco de Fv y/o en los restos no humanos reemplazados para refinar y optimizar la
- 30 especificidad, afinidad y/o capacidad de los anticuerpos. En general, los anticuerpos humanizados comprenderán

sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos o tres, dominios variables que contienen todas o sustancialmente todas las regiones CDR que corresponden a la inmunoglobulina no humana mientras que todas o sustancialmente todas las regiones FR serán las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una parte de una región constante o dominio (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Los ejemplos de métodos utilizados para generar anticuerpos humanizados se describen en las patentes de EE. UU. Nos. 5,225,539 o 5,639,641.

[00205] Una "región variable" de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea solas o combinadas. Las regiones variables de las cadena pesada y ligera consisten cada en cuatro regiones FW conectadas mediante tres regiones CDR. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas y muy próximas mediante las regiones FW y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio unión al antígeno de los anticuerpos. Existen al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un enfoque basado en variabilidad de secuencia entre especies (es decir, Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5^a ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani et al. (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948)). Además, a veces se utilizan combinaciones de estas dos estrategias en la técnica para determinar CDR.

[00206] Generalmente, se utiliza el sistema de numeración de Kabat cuando se hace referencia a un resto en el dominio variable (aproximadamente, los restos 1-107 de la cadena ligera y los restos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

[00207] Las expresiones "numeración de posición de aminoácido como en Kabat", "la posición de Kabat", y variantes gramaticales de las mismas se refieren al sistema de numeración usado para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de una FW o CDR del dominio variable o una inserción en esta. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir una inserción de un único aminoácido (resto 52a según Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo, los restos 82a, 82b y 82c, etc. según Kabat) después del resto 82 de la FW de la cadena pesada.

TABLA 1

Bucle	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B (Numeración de Kabat)	H26-H32..34
H1	H31-H35	H26-H35 (Numeración de Chothia)	H26-H32
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[00208] La numeración de Kabat de los restos puede determinarse para un anticuerpo concreto mediante alineación en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia con numeración de Kabat "convencional". Chothia se refiere en su lugar a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). El final del bucle CDR-H1 de Chothia cuando se numera utilizando la convención de numeración de Kabat varía entre H32 y H34 dependiendo de la longitud del bucle (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat sitúa las inserciones en H35A y H35B; si no está presente ni 35A ni 35B, el bucle termina en 32; si únicamente está presente 35A, el bucle termina en 33; si están presentes tanto 35A como 35B, el bucle termina en 34). Las regiones hipervariables de AbM representan un término intermedio entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se utilizan mediante software de modelización de anticuerpos AbM de Oxford Molecular.

[00209] MGT (ImMunoGeneTics) también proporciona un sistema de numeración para las regiones variables de inmunoglobulina, incluyendo las CDR. Véase, por ejemplo,

Lefranc, M.P. *et al.*, Dev. Comp. Immunol. 27: 55-77(2003), que se incorpora en el presente documento a modo de referencia. El sistema de numeración de IMGT se basó en una alineación de más de 5,000 secuencias, datos estructurales y caracterización de bucles hipervariables y permite una fácil comparación de las regiones variables y CDR para todas las especies. Según el esquema de numeración de IMGT la CDR1-VH está en las posiciones 26 a 35, la CDR2-VH está en las posiciones 51 a 57, la CDR3-VH está en las posiciones 93 a 102, la CDR1-VL está en las posiciones 27 a 32, la CDR2-VL está en las posiciones 50 a 52 y la CDR3-VL está en las posiciones 89 a 97.

[00210] El índice EU o sistema de numeración EU está basado en la numeración secuencial de la primera IgG humana secuenciada(el anticuerpo EU). Como la referencia más común para esta convención es el manual de secuencia de Kabat (Kabat *et al.*, 1991), el índice EU algunas veces se usa de forma errónea como sinónimo del índice de Kabat. El índice EU no proporciona inserciones y deleciones y, por lo tanto, en algunos casos las comparaciones de posiciones de IgG entre subclases y especies de IgG pueden ser dudosas, particularmente en las regiones bisagra. Sin embargo, la convención ha sido suficiente para permitir una comparación directa entre regiones Fc en numerosos estudios de estructura y función de Fc. Por consiguiente, el esquema de numeración usado para sustituciones e inserciones en regiones Fc en esta memoria descriptiva es el índice EU como en Kabat. Por el contrario, el esquema de numeración usado para las regiones variables (VH y VL) en esta memoria descriptiva es la numeración de Kabat normal.

- [00211]** Tal como se utiliza a lo largo de la memoria descriptiva las secuencias de las CDR de la VH descritas corresponden a las ubicaciones de la numeración de Kabat clásica, concretamente CDR1-VH está en las posiciones 31-35, CDR2-VH está en las posiciones 50-65 y CDR3-VH está en las posiciones 95-102. La CDR1-VL, la CDR2-VL y la CDR3-VL también corresponden a las ubicaciones de la numeración de Kabat clásica, concretamente las posiciones 24-34, 50-56 y 89-97, respectivamente.
- [00212]** Tal como se usa en el presente documento, la región Fc incluye los polipéptidos que comprenden la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de región constante. Por lo tanto, Fc se refiere a los dos últimos dominios de la región constante de inmunoglobulina de IgA, IgD e IgG y uno de los tres últimos dominios de la región constante de inmunoglobulina de IgE e IgM y la región bisagra flexible N-terminal con respecto a estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, Fc comprende los dominios de inmunoglobulina Cgamma2 y Cgamma3 (Cy2 y Cy3) y la región bisagra entre Cgamma1 (Cy1) y Cgamma2 (Cy2).
- [00213]** Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de la IgG humana se define normalmente de modo que comprenda de los restos C226 o P230 a su extremo carboxilo, donde la numeración es según el índice EU tal como se expone en Kabat et al. (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Fc puede referirse a esta región aisladamente, o a esta región en el contexto de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión de

Fc. Se han observado polimorfismos en varias posiciones diferentes de Fc, incluyendo, pero sin limitación, las posiciones 270, 272, 312, 315, 356 y 358 tal como se numeran según el índice EU, y por lo tanto pueden existir ligeras diferencias entre la secuencia presentada y las secuencias de la técnica anterior.

[00214] El término "anticuerpo humano" significa un anticuerpo producido por un ser humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un anticuerpo producido por un ser humano preparada usando cualquier técnica conocida en la técnica (por ejemplo, expresión recombinante en células en cultivos, o la expresión en animales transgénicos). Por tanto, el término anticuerpo humano también engloba un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un anticuerpo producido originariamente por un ser humano (o una variante modificada por ingeniería o derivado del mismo) pero expresado en un sistema no humano (por ejemplo, producido mediante síntesis química; expresado de manera recombinante en células microbianas, de mamífero o de insecto; o expresado en un sujeto animal). Por consiguiente, un anticuerpo obtenido a partir de un sujeto humano o a partir de células humanas (por ejemplo, hibridoma o línea celular que expresa un anticuerpo recombinante o fragmento del mismo) y expresado posteriormente en un animal, por ejemplo, ratones, se considera un anticuerpo humano. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos intactos o completos, fragmentos de estos y/o anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de la cadena pesada y/o ligera humana tal

como, por ejemplo, un anticuerpo que comprende polipéptidos de la cadena pesada humana y cadena ligera murina.

- [00215]** El término "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos en donde la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina procede de dos o más especies animales. Normalmente, la región variable de ambas cadenas ligeras y pesadas corresponde a la región variable de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, y/o afinidad, y/o capacidad deseadas mientras que las regiones constantes son homólogas a las secuencias en anticuerpos derivados de otra especie (habitualmente ser humano) para evitar provocar una respuesta inmunitaria en esa especie.
- [00216]** El término "epítopo" tal como se usa en el presente documento se refiere a un determinante antigénico proteico que puede unirse a un anticuerpo contra CD73 o molécula de unión a CD73 dada a conocer en el presente documento. Los epítopos están constituidos normalmente por agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como cadenas laterales de azúcares o aminoácidos y normalmente tienen unas características estructurales tridimensionales específicas, así como también unas características de carga específicas. La parte de un anticuerpo o molécula de unión que reconoce el epítopo se denomina un parátopo. Los epítopos de antígenos proteicos se dividen en dos categorías, epítopos conformacionales y epítopos lineales, basándose en su estructura e interacción con el parátopo. Un epítopo conformacional se compone de secciones discontinuas de la secuencia de aminoácidos del antígeno. Estos epítopos

interaccionan con el parátipo basándose en las características superficiales 3-D y la forma o estructura terciaria del antígeno. En cambio, los epítopos lineales interaccionan con el parátipo basándose en su estructura primaria. Un epítipo lineal se forma mediante una secuencia de aminoácidos continua del antígeno.

[00217] El término "sitio de unión de anticuerpo" se refiere a una región en el antígeno (por ejemplo, CD73) que comprende un sitio continuo o discontinuo (es decir, un epítipo) al que se une específicamente un anticuerpo complementario. Por tanto, el sitio de unión de anticuerpo puede contener zonas adicionales en el antígeno que están más allá del epítipo y que pueden determinar propiedades tales como afinidad de unión y/o estabilidad, o afectar a propiedades tales como dimerización o actividad enzimática del antígeno. Por consiguiente, aunque dos anticuerpos se unan al mismo epítipo dentro de un antígeno, si las moléculas de anticuerpo establecen distintos contactos intermoleculares con aminoácidos fuera del epítipo, se considera que tales anticuerpos se unen a distintos sitios de unión de anticuerpo.

[00218] Generalmente, la "afinidad de unión" se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se utiliza en el presente documento, la "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y puede representarse

generalmente mediante la constante de disociación (K_D). Puede medirse la afinidad mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluidos los descritos en el presente documento. Los anticuerpos con una baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos con una alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos más tiempo. En la técnica se conocen varios métodos para medir la afinidad de unión, y cualquiera de los cuales puede utilizarse para los fines de la presente divulgación.

[00219] La "potencia" se expresa normalmente como un valor de CI_{50} , en nM a menos que se establezca de otro modo. CI_{50} es la mediana de la concentración inhibidora de una molécula de unión a antígeno. En los ensayos funcionales, la CI_{50} es la concentración que reduce una respuesta biológica al 50 % de su máximo. En estudios de unión de ligando, la CI_{50} es la concentración que reduce la unión a receptor al 50 % del nivel de unión específico máximo. Puede calcularse la CI_{50} mediante cualquiera de varios medios conocidos en la técnica. La mejora de potencia puede determinarse midiendo, por ejemplo, frente a un anticuerpo parental (por ejemplo, el anticuerpo parental previo a la línea germinal o el anticuerpo parental previo a la optimización y afinidad).

[00220] Las veces de mejora en la potencia para los anticuerpos o polipéptidos de la presente divulgación en comparación con un anticuerpo parental puede ser de al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 10 veces,

al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 60 veces, al menos aproximadamente 70 veces, al menos aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 90 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 110 veces, al menos aproximadamente 120 veces, al menos aproximadamente 130 veces, al menos aproximadamente 140 veces, al menos aproximadamente 150 veces, al menos aproximadamente 160 veces, al menos aproximadamente 170 veces, o al menos aproximadamente 180 veces o más.

[00221] La "citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la cual las inmunoglobulinas secretadas unidas a los receptores de Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que porta el antígeno y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos IgG con elevada afinidad específicos dirigidos a la superficie de células diana "arman" las células citotóxicas y se requieren de manera esencial para tal destrucción. La lisis de la célula diana es extracelular, requiere contacto directo entre las células y en ella no participa el complemento. Se contempla que, además de anticuerpos, otras proteínas que comprenden regiones Fc, específicamente proteínas de fusión con Fc, que tienen la capacidad para unirse específicamente a una célula diana que porta el antígeno podrán efectuar la

citotoxicidad mediada por células. Por simplicidad, la citotoxicidad mediada por células resultado de la actividad de una proteína de fusión con Fc también se denomina en el presente documento actividad ADCC.

5 **[00222]** Un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está "aislado" es un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está en una forma no unida en la naturaleza. Los polipéptidos, anticuerpos, polinucleótidos, vectores,
10 células o composiciones aislados incluyen los que se han purificado en un grado que no están ya en una forma en la que se encuentran en la naturaleza. En algunos aspectos, un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está aislado es sustancialmente puro.

15 **[00223]** El término "sujeto" se refiere a cualquier animal (por ejemplo, un mamífero), incluyendo, sin limitación, seres humanos, primates no humanos, roedores y similares, que vaya a ser el receptor de un tratamiento particular. Normalmente, Los términos "sujeto" y "paciente" se usan
20 indistintamente en el presente documento en referencia a un sujeto humano.

[00224] El término "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma como para permitir que la actividad biológica del principio activo (por ejemplo,
25 una molécula de unión anti-CD73 dada a conocer en el presente documento) sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que son inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administrará la composición. Dicha composición puede ser estéril.

30 **[00225]** Una "cantidad eficaz" de una molécula de unión anti-CD73 tal como se da a conocer en el presente documento

es una cantidad suficiente para llevar a cabo un fin establecido específicamente. Puede determinarse una "cantidad eficaz" empíricamente y de manera rutinaria, en relación con el fin establecido.

5 **[00226]** El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una molécula de unión anti-CD73 dada a conocer en el presente documento u otro fármaco eficaz para "tratar" una enfermedad o un trastorno en un sujeto o mamífero.

10 **[00227]** El término "marcador" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o una composición detectable que está fusionado (por ejemplo, genéticamente fusionado) o conjugado (por ejemplo, químicamente conjugado) directa o indirectamente con una molécula de unión anti-CD73
15 dada a conocer en el presente documento de modo que se genera una molécula de unión anti-CD73 "marcada". El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisotópicos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración
20 química de un compuesto o una composición de sustrato que es detectable.

25 **[00228]** Los términos tales como "grupo derivatizable" y "grupo funcional derivatizable" se usan indistintamente y se refieren a un grupo funcional que puede reaccionar para permitir la formación de un enlace covalente entre una
30 molécula de unión anti-CD73 dada a conocer en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo contra CD73) y otra sustancia. En algunos aspectos, tal sustancia es un agente terapéutico (por ejemplo, una citotoxina), un marcador detectable, un polímero (por ejemplo, PEG), etc. Los grupos derivatizables a modo de ejemplo incluyen tiol, hidroxilo,

amino, carboxilo y amida, así como formas modificadas del mismo, tal como formas activadas o protegidas.

[00229] Términos tales como "que trata" o "tratamiento" o "tratar" o "que alivia" o "aliviar" se refieren tanto a (1) medidas terapéuticas que curan, ralentizan, disminuyen los síntomas de y/o detienen la progresión de un trastorno o estado patológico diagnosticado y (2) medidas profilácticas o preventivas que previenen y/o retrasan el desarrollo de un trastorno o estado patológico seleccionado como diana. Por tanto, los que necesitan el tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno; los propensos a tener el trastorno; y aquéllos en los que va a prevenirse el trastorno. En determinados aspectos, un sujeto se "trata" satisfactoriamente para cáncer según los métodos de la presente divulgación si el paciente muestra, por ejemplo, remisión total, parcial o transitoria de un determinado tipo de cáncer.

[00230] Los términos "cáncer", "tumor", "canceroso" y "maligno" se refieren a o describen el estado fisiológico en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cánceres incluyen pero no se limitan a, carcinoma incluyendo adenocarcinomas, linfomas, blastomas, melanomas, sarcomas y leucemias. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer gastrointestinal, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, cáncer de páncreas, glioblastoma, glioma, cáncer cervicouterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado tal como carcinoma hepático y hepatoma, cáncer de vejiga, cáncer de mama (incluyendo cáncer de mama mediado de manera hormonal, véase, por ejemplo, Innes

et al. (2006) Br. J. Cancer 94:1057-1065), cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, mieloma (tal como mieloma múltiple), carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón tal como carcinoma de células renales y tumores de Wilms, carcinoma de células basales, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, cáncer testicular, cáncer de esófago, diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello y cánceres de orígenes mucinosos, tales como, cáncer de ovario mucinoso, colangiocarcinoma (hígado) y carcinoma papilar renal. En algunos aspectos, el término cáncer tal como se usa en el presente documento se refiere específicamente a cáncer que expresa CD73. En algunos aspectos específicos, el término cáncer se refiere a cánceres que expresan bajos niveles de CD73. En algunos aspectos, el término cáncer, como se usa en el presente documento, se refiere específicamente a un cáncer que expresa CD73 (por ejemplo, cáncer de colon, cáncer de mama, linfoma, carcinoma de células no pequeñas).

[00231] "Polinucleótido" o "ácido nucleico", tal como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero por ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en el presente documento, incluyendo ARN y ADN.

[00232] El término "vector" se refiere a un constructo, que es capaz de suministrar, y en algunos aspectos, expresar, uno o más genes o secuencias de interés en una célula hospedadora. Los ejemplos de vectores incluyen, sin carácter limitante, vectores virales, vectores de expresión de ARN o ADN desnudo, plásmidos, vectores de cósmido o fago, vectores de expresión de ARN o ADN asociados con agentes de condensación catiónicos, vectores de expresión de ARN o ADN encapsulados en liposomas, y ciertas células eucariotas, tales como células productoras.

[00233] Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede estar interrumpido por elementos distintos a aminoácidos. Los términos también engloban un polímero de aminoácidos que se ha modificado de manera natural o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje. También están incluidos en la definición, por ejemplo, los polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluidos, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como también otras modificaciones conocidas en la técnica. Se entiende que, dado que los polipéptidos de la presente divulgación se basan en anticuerpos, en determinados aspectos, los polipéptidos pueden aparecer como cadenas sencillas o cadenas asociadas.

[00234] Un polipéptido o una proteína "recombinante" se refiere a un polipéptido o una proteína producido por

tecnología de ADN recombinante. Polipéptidos y proteínas producidos de forma recombinante, expresados en células hospedadoras modificadas por ingeniería, se consideran aislados, ya que son polipéptidos nativos o recombinantes que han sido separados, fraccionados o parcial o sustancialmente purificados por cualquier técnica adecuada. Los polipéptidos dados a conocer en el presente documento pueden producirse de manera recombinante usando métodos conocidos en la técnica. Como alternativa, las proteínas y los péptidos dados a conocer en el presente documento pueden sintetizarse químicamente.

[00235] La expresión "sustitución de aminoácidos" se refiere al reemplazo de un resto de aminoácido presente en una secuencia parental por otro resto de aminoácido. Puede sustituirse un aminoácido en una secuencia parental, por ejemplo, mediante síntesis química de péptidos o a través de métodos recombinantes conocidos en la técnica. Por consiguiente, las referencias a una "sustitución en la posición X" o "sustitución en la posición X" se refieren a la sustitución de un aminoácido presente en la posición X por un resto de aminoácido alternativo. En algunos aspectos, pueden describirse los patrones de sustitución según el esquema AXY, en donde A es el código de una sola letra correspondiente al aminoácido presente de manera natural en la posición X, e Y es el resto de aminoácido de sustitución. En otros aspectos, pueden describirse los patrones de sustitución según el esquema XY, en donde Y es el código de una sola letra correspondiente al resto de aminoácido que sustituye al aminoácido presente de manera natural en la posición X.

[00236] Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la que el resto de aminoácido se reemplaza por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica, se han definido familias de restos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares, incluyendo cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina e histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico y ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina y cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano), cadenas laterales β -ramificadas (por ejemplo, treonina, valina e isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano e histidina). Por tanto, si un aminoácido en un polipéptido se reemplaza por otro aminoácido de la misma familia de cadenas laterales, se considera que la sustitución es conservativa. En otro aspecto, una hilera de aminoácidos puede reemplazarse de manera conservativa por una hilera estructuralmente similar que difiere en el orden y/o la composición de miembros de la familia de cadenas laterales.

[00237] Las sustituciones no conservativas incluyen aquellas en las que (i) un resto que tiene una cadena lateral electropositiva (por ejemplo, Arg, His o Lys) se sustituye por, o mediante, un resto electronegativo (por ejemplo, Glu o Asp), (ii) un resto hidrófilo (por ejemplo, Ser o Thr) se sustituye por, o mediante, un resto hidrófobo (por ejemplo, Ala, Leu, Ile, Phe o Val), (iii) una cisteína o prolina se sustituye por, o mediante, cualquier otro resto, o (iv) un resto que tiene una cadena lateral voluminosa hidrófoba o

aromática (por ejemplo, Val, His, Ile o Trp) se sustituye por, o mediante, una que tiene una cadena lateral más pequeña (por ejemplo, Ala, Ser) o sin cadena lateral (por ejemplo, Gly).

- 5 **[00238]** Otras sustituciones pueden identificarse fácilmente por expertos habituales en la técnica. Por ejemplo, para el aminoácido alanina, puede tomarse una sustitución de una cualquiera de D-alanina, glicina, beta-alanina, L-cisteína y D-cisteína. Para lisina, un reemplazo
- 10 puede ser una cualquiera de D-lisina, arginina, D-arginina, homo-arginina, metionina, D-metionina, ornitina o D-ornitina. Generalmente, sustituciones en regiones funcionalmente importantes que puede esperarse que induzcan cambios en las propiedades de polipéptidos aislados son
- 15 aquellas en las que (i) un resto polar, por ejemplo, serina o treonina, se sustituye por (o mediante) un resto hidrófobo, por ejemplo, leucina, isoleucina, fenilalanina o alanina; (ii) un resto de cisteína se sustituye por (o mediante) cualquier otro resto; (iii) un resto que tiene una cadena
- 20 lateral electropositiva, por ejemplo, lisina, arginina o histidina, se sustituye por (o mediante) un resto que tiene una cadena lateral electronegativa, por ejemplo, ácido glutámico o ácido aspártico; o (iv) un resto que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, se
- 25 sustituye por (o mediante) una que no tiene tal cadena lateral, por ejemplo, glicina. La probabilidad de que una de las sustituciones no conservativas anteriores pueda alterar las propiedades funcionales de la proteína también se correlaciona con la posición de la sustitución con respecto
- 30 a regiones funcionalmente importantes de la proteína: por

consiguiente, algunas sustituciones no conservativas pueden tener poco o ningún efecto sobre las propiedades biológicas.

[00239] El término "inserción de aminoácido" se refiere a introducir un nuevo resto de aminoácido entre dos restos de aminoácido presentes en la secuencia parental. Puede insertarse un aminoácido en una secuencia parental, por ejemplo, mediante síntesis química de péptidos o a través de métodos recombinantes conocidos en la técnica. Por consiguiente tal como se usa en el presente documento, las expresiones "inserción entre las posiciones X e Y" o "inserción entre las posiciones de Kabat X e Y", en donde X e Y corresponden a las posiciones de aminoácido (por ejemplo, una inserción de aminoácido cisteína entre las posiciones 239 y 240), se refiere a la inserción de un aminoácido entre las posiciones X e Y, y también a la inserción en una secuencia de ácido nucleico de un codón que codifica para un aminoácido entre los codones que codifican para los aminoácidos en las posiciones X e Y. Pueden describirse los patrones de inserción según el esquema AXins, en donde A es el código de una sola letra correspondiente al aminoácido que se inserta, y X es la posición que precede a la inserción.

[00240] El término "porcentaje de identidad de secuencia" entre dos secuencias de polipéptido o polinucleótido se refiere al número de posiciones coincidentes idénticas compartidas por las secuencias a lo largo de una ventana de comparación, teniendo en cuenta adiciones o deleciones (es decir, huecos) que deben introducirse para la alineación óptima de las dos secuencias. Una posición coincidente es cualquier posición donde se presenta un nucleótido o aminoácido idéntico tanto en la secuencia diana como de referencia. Los huecos presentados en la secuencia diana no

se cuentan puesto que los huecos no son nucleótidos o aminoácidos. Asimismo, los huecos presentados en la secuencia de referencia no se cuentan puesto que se cuentan los nucleótidos o aminoácidos de la secuencia diana, no los
5 nucleótidos o aminoácidos de la secuencia de referencia.

[00241] El porcentaje de identidad de secuencia se calcula determinando el número de posiciones en las que el resto de aminoácido o base de ácido nucleico idéntico aparece en ambas secuencias para producir el número de posiciones
10 coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje
15 de identidad de secuencia entre dos secuencias puede lograrse usando software fácilmente disponible tanto para uso en línea como para descarga. Están disponibles programas de software adecuados de diversas fuentes, y para la alineación de secuencias tanto de proteína como de nucleótidos. Un programa
20 adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia es bl2seq, parte del paquete BLAST de programa disponible a partir del sitio web de BLAST del Centro Nacional para Información Biotecnológica del gobierno de los EE.UU. (blast.ncbi.nlm.nih.gov). Bl2seq realiza una
25 comparación entre dos secuencias usando el algoritmo o bien BLASTN o bien BLASTP. BLASTN se usa para comparar secuencias de ácido nucleico, mientras que BLASTP se usa para comparar secuencias de aminoácidos. Otros programas adecuados son, por ejemplo, Needle, Stretcher, Water o Matcher, parte del
30 paquete EMBOSS de programas bioinformáticos y también

disponibles del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) en www.ebi.ac.uk/Tools/psa.

[00242] Diferentes regiones dentro de una única secuencia diana de polinucleótido o polipéptido que se alinea con una secuencia de referencia de polinucleótido o polipéptido pueden tener cada una su propio porcentaje de identidad de secuencia. Se indica que el valor de porcentaje de identidad de secuencia se redondea a la décima más próxima. Por ejemplo, 80.11, 80.12, 80.13 y 80.14 se redondean a la baja a 80.1, mientras que 80.15, 80.16, 80.17, 80.18 y 80.19 se redondean al alza a 80.2. También se indica que el valor de longitud siempre será un número entero.

[00243] En determinados aspectos, el porcentaje de identidad "X" de una primera secuencia de aminoácidos con una segunda secuencia de aminoácidos se calcula como $100 \times (Y/Z)$, donde Y es el número de restos de aminoácido puntuados como coincidencias idénticas en la alineación de la primera y la segunda secuencias (tal como se alinean mediante inspección visual o un programa de alineación de secuencias particular) y Z es el número total de restos en la segunda secuencia. Si la longitud de una primera secuencia es mayor que la de la segunda secuencia, la identidad porcentual de la primera secuencia respecto a la segunda secuencia será mayor que la identidad porcentual de la segunda secuencia respecto a la primera secuencia.

[00244] Un experto en la materia apreciará que la generación de una alineación de secuencias para el cálculo de un porcentaje de identidad de secuencia no se limita a comparaciones binarias secuencia-secuencia dirigidas exclusivamente por datos de secuencia primaria. Las alineaciones de secuencias pueden derivarse de alineaciones

de secuencias múltiples. Un programa adecuado para generar alineaciones de secuencias múltiples es ClustalW2, disponible de www.clustal.org. Otro programa adecuado es MUSCLE, disponible de www.drive5.com/muscle/. ClustalW2 y MUSCLE están disponibles como alternativa, por ejemplo, del EBI.

[00245] Se apreciará también que pueden generarse alineaciones de secuencias mediante la integración de datos de secuencia con datos de fuentes heterogéneas tales como datos estructurales (por ejemplo, estructuras cristalográficas de proteínas), datos funcionales (por ejemplo, ubicación de mutaciones) o datos filogenéticos. Un programa adecuado que integra datos heterogéneos para generar una alineación de secuencias múltiples es T-Coffee, disponible en www.tcoffee.org, y disponible como alternativa, por ejemplo, del EBI. Se apreciará también que la alineación final usada para calcular el porcentaje de identidad de secuencia puede calcularse o bien automática o bien manualmente.

[00246] La expresión "secuencia consenso", como se usa en el presente documento con respecto a las regiones variables de cadena ligera (VL) y cadena pesada (VH), se refiere a una secuencia de VL o VH compuesta o genérica definida basándose en la información sobre qué restos de aminoácidos dentro de la cadena VL o VH son susceptibles de modificación sin detrimento de la unión al antígeno. De esta manera, en una "secuencia consenso" para una cadena VL o VH, ciertas posiciones de aminoácidos están ocupadas por uno o múltiples restos de aminoácido posibles en esa posición. Por ejemplo, si en una posición particular existe una arginina (R) o una serina (S) entonces esa posición particular dentro de la

secuencia consenso puede ser arginina o serina (R o S). Las secuencias consenso para la cadena VH y VL pueden definirse, por ejemplo, por maduración de afinidad *in vitro* (por ejemplo, aleatorizando cada posición de aminoácido en una
5 cierta CDR usando cebadores de codificación degenerados), por mutagénesis de barrido (por ejemplo, mutagénesis de barrido de alanina) de restos de aminoácido dentro de las CDR de anticuerpo, o cualquiera de otros métodos conocidos en la técnica, seguido de evaluación de la unión de los
10 mutantes al antígeno para determinar si la posición de aminoácido mutada afecta a la unión del antígeno. En algunos aspectos, se introducen mutaciones en las regiones CDR. En otros aspectos, se introducen mutaciones en regiones marco. En algunos otros aspectos, se introducen mutaciones en
15 regiones marco y CDR.

II. Moléculas de unión a CD73

[00247] La presente divulgación proporciona moléculas de unión a CD73, por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a CD73,
20 por ejemplo, CD73 humano. Las secuencias de aminoácidos (aa) y nucleótidos (nt) de longitud completa para CD73 se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, UniProt Acc. n.º P21589 para CD73 humana, o UniProt Acc. N.º Q61503 para CD73 de ratón). En algunos aspectos, las moléculas de unión anti-
25 CD73 son anticuerpos humanos (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3, un anticuerpo del clon 2C5, MEDI9447). En determinados aspectos, las moléculas de unión a CD73 son anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

[00248] En algunos aspectos, las moléculas de unión a CD73,
30 por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de los mismos, comprenden un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un

Fd, un Fv de cadena sencilla o scFv, un Fv con enlaces disulfuro, un dominio V-NAR, un IgNar, un intracuerpo, una IgG CH2, un minicuerpo, un F(ab')₃, un tetracuerpo, un triacuerpo, un diacuerpo, un anticuerpo de un solo dominio, DVD-Ig, Fcab, mAb², un (scFv)₂ o un scFv-Fc. En algunos aspectos, el anticuerpo es del tipo IgG, por ejemplo del tipo IgG1.

[00249] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, MEDI9447, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región constante de cadena pesada o fragmento del mismo. En algunos aspectos específicos, la región constante de cadena pesada es una región constante de IgG. La región constante de IgG puede comprender una región constante de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en una región constante kappa y una región constante lambda.

[00250] En determinados aspectos, los anticuerpos anti-CD73 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos desvelados en el presente documento están modificados en comparación con un anticuerpo parental, por ejemplo, el anticuerpo CD730010 o el anticuerpo CD730002. En algunos aspectos, el anticuerpo parental es CD730010. En otros aspectos, el anticuerpo parental es CD730002. En otros aspectos, el anticuerpo parental es CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068 o CD730069. Las modificaciones pueden incluir mutaciones en las regiones CDR y/o en las regiones FW en comparación con el anticuerpo parental, por ejemplo, CD730010 o CD730002.

[00251] La frase "anticuerpo CD730002" se refiere a una IgG1 que comprende dos dominios VL que comprenden la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 y dos dominios de VH que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

5 **[00252]** La frase "anticuerpo CD730004" se refiere a una IgG1 que comprende dos dominios de VL que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:104 y dos dominios de VH que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:103.

10 **[00253]** La frase "anticuerpo CD730008" se refiere a una IgG1 que comprende dos dominios de VL que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:106 y dos dominios de VH que comprenden la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 107.

15 **[00254]** La frase "anticuerpo CD730010" se refiere a una IgG1 que comprende dos dominios de VL que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3 y dos dominios de VH que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

20 **[00255]** La frase "anticuerpo CD730011" se refiere a una IgG1 que comprende dos dominios de VL que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5 y dos dominios de VH que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

[00256] La frase "anticuerpo CD730021 " se refiere a una IgG1 que comprende dos dominios de VL que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 y dos dominios de VH que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

25 **[00257]** La frase "anticuerpo CD730042 " se refiere a una IgG1 que comprende dos dominios de VL que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y dos dominios de VH que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

30 **[00258]** La frase "anticuerpo CD730046 " se refiere a una IgG1 que comprende dos dominios de VL que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11 y dos dominios de

VH que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12.

[00259] La frase "anticuerpo CD730047 " se refiere a una IgG1 que comprende dos dominios de VL que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13 y dos dominios de VH que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14.

[00260] La frase "anticuerpo CD730068" se refiere a una IgG1 que comprende dos dominios de VL que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:108 y dos dominios de VH que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:107.

[00261] La frase "anticuerpo CD730069 " se refiere a una IgG1 que comprende dos dominios de VL que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:110 y dos dominios de VH que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:109.

(i) Anticuerpos anti-CD73 derivados de CD730010

[00262] En determinados aspectos, un anticuerpo anti-CD73 de la presente divulgación comprende modificaciones a CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo CD730010, incluyendo, pero sin limitación:

- 1) una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia consenso SGSLSNIGRN_{X1}VN, en donde X₁ representa los restos de aminoácido prolina (P), ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D); y/o,
- 2) una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia consenso LX₂NX₃RX₄X₅, en donde X₂ representa los restos de aminoácido asparagina (N) o ácido aspártico (D), X₃ representa los restos de aminoácido glutamina (Q) o leucina (L), X₄ representa los restos de aminoácido leucina (L) o

prolina (P), y X₅ representa los restos de aminoácido glicina (G) o serina (S); y/o,

- 3) una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia consenso ATWDDSX₆X₇GWX₈, en donde X₆ representa los restos de aminoácido leucina (L) o histidina (H), X₇ representa los restos de aminoácido lisina (K), prolina (P), isoleucina (I) o asparagina (N), y X₈ representa los restos de aminoácido leucina (L) o treonina (T).

[00263] En determinados aspectos, un anticuerpo anti-CD73 de la presente divulgación comprende modificaciones en CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo CD730010, incluyendo, pero sin limitación:

- 1) una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia consenso SYAX₉S, en donde X₉ representa los restos de aminoácido metionina (M) o tirosina (Y); y/o,
- 2) una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia consenso X₁₀IX₁₁GSX₁₂GX₁₃TYYADSVKG, en donde X₁₀ representa los restos de aminoácido leucina (L) o alanina (A), X₁₁ representa los restos de aminoácido triptófano (W) o serina (S), X₁₂ representa los restos de aminoácido triptófano (W) o glicina (G) y X₁₃ representa los restos de aminoácido serina (S) o arginina (R); y/o,
- 3) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia consenso LGYX₁₄X₁₅X₁₆DX₁₇, en donde X₁₄ representa los restos de aminoácido glicina (G) o serina (S), X₁₅ representa los restos de aminoácido arginina (R) o treonina (T), X₁₆ representa los restos de aminoácido valina (V) o isoleucina (I), y X₁₇ representa los restos de aminoácido tirosina (Y), lisina (K), metionina (M), leucina (L) o ácido glutámico (E).

[00264] En otro aspecto, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región de VL que comprende la secuencia de aminoácidos consenso:
[FW₁]SGSLSNIGRNX₁VN[FW₂] LX₂NX₃RX₄X₅[FW₃] ATWDDSX₆X₇GWX₈[FW₄]
5 en donde [FW₁], [FW₂], [FW₃] y [FW₄] representan los restos de aminoácido de la región 1 marco de VL (SEQ ID NO: 25 o 26), la región 2 marco de VL (SEQ ID NO: 27 o 28), la región 3 marco de VL (SEQ ID NO: 29) y la región 4 marco de VL (SEQ ID NO: 30), respectivamente, y en donde
10 X₁ representa los restos de aminoácido prolina (P), ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D);
X₂ representa los restos de aminoácido asparagina (N) o ácido aspártico (D);
X₃ representa los restos de aminoácido glutamina (Q) o
15 leucina (L);
X₄ representa los restos de aminoácido leucina (L) o prolina (P);
X₅ representa los restos de aminoácido glicina (G) o serina (S);
20 X₆ representa los restos de aminoácido leucina (L) o histidina (H);
X₇ representa los restos de aminoácido lisina (K), prolina (P), isoleucina (I) o asparagina (N); y,
X₈ representa los restos de aminoácido leucina (L) o
25 treonina (T).

[00265] En un aspecto, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región de VH que comprende la secuencia de aminoácidos consenso:
[FW₅]SYAX₉S [FW₆]X₁₀IX₁₁GSX₁₂GX₁₃TYYADSVKG [FW₇]LGYX₁₄X₁₅X₁₆DX₁₇
30 [FW₈]

- en donde [FW₅], [FW₆], [FW₇] y [FW₈] representan los restos de aminoácido de la región 1 marco de VH (SEQ ID NO: 31), la región 2 marco de VH (SEQ ID NO: 32), la región 3 marco de VH (SEQ ID NO: 33) y la región 4 marco de VH (SEQ ID NO: 34), respectivamente, y en donde
- 5 X₉ representa los restos de aminoácido metionina (M) o tirosina (Y);
- X₁₀ representa los restos de aminoácido leucina (L) o alanina (A);
- 10 X₁₁ representa los restos de aminoácido triptófano (W) o serina (S);
- X₁₂ representa los restos de aminoácido triptófano (W) o glicina (G);
- X₁₃ representa los restos de aminoácido serina (S) o
- 15 arginina (R);
- X₁₄ representa los restos de aminoácido glicina (G) o serina (S);
- X₁₅ representa los restos de aminoácido arginina (R) o treonina (T);
- 20 X₁₆ representa los restos de aminoácido valina (V) o isoleucina (I)
- X₁₇ representa los restos de aminoácido tirosina (Y), lisina (K), metionina (M), leucina (L) o ácido glutámico (E).
- 25 **[00266]** En un aspecto, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región de VL que comprende la secuencia de aminoácidos consenso:
- [FW₁]SGSLSNIGRNX₁VN[FW₂] LX₂NX₃RX₄X₅[FW₃] ATWDDSX₆X₇GWX₈[FW₄]
- en donde [FW₁], [FW₂], [FW₃] y [FW₄] representan los restos
- 30 de aminoácido de la región 1 marco de VL (SEQ ID NO: 25 o 26), la región 2 marco de VL (SEQ ID NO: 27 o 28), la

región 3 marco de VL (SEQ ID NO: 29) y la región 4 marco de VL (SEQ ID NO: 30), respectivamente, y en donde

X₁ representa los restos de aminoácido prolina (P), ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D);

5 X₂ representa los restos de aminoácido asparagina (N) o ácido aspártico (D);

X₃ representa los restos de aminoácido glutamina (Q) o leucina (L);

X₄ representa los restos de aminoácido leucina (L) o
10 prolina (P);

X₅ representa los restos de aminoácido glicina (G) o serina (S);

X₆ representa los restos de aminoácido leucina (L) o histidina (H);

15 X₇ representa los restos de aminoácido lisina (K), prolina (P), isoleucina (I) o asparagina (N); y,

X₈ representa los restos de aminoácido leucina (L) o treonina (T);

y en donde el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a
20 antígeno del mismo comprende además una región de VH que comprende la secuencia de aminoácidos consenso:

[FW₅]SYAX₉S [FW₆]X₁₀IX₁₁GSX₁₂GX₁₃TYADSVKG [FW₇]LGYX₁₄X₁₅X₁₆DX₁₇
[FW₈]

en donde [FW₅], [FW₆], [FW₇] y [FW₈] representan los restos
25 de aminoácido de la región 1 marco de VH (SEQ ID NO: 31), la región 2 marco de VH (SEQ ID NO: 32), la región 3 marco de VH (SEQ ID NO: 33) y la región 4 marco de VH (SEQ ID NO: 34), respectivamente, y en donde

X₉ representa los restos de aminoácido metionina (M) o
30 tirosina (Y);

X₁₀ representa los restos de aminoácido leucina (L) o alanina (A);

X₁₁ representa los restos de aminoácido triptófano (W) o serina (S);

5 X₁₂ representa los restos de aminoácido triptófano (W) o glicina (G);

X₁₃ representa los restos de aminoácido serina (S) o arginina (R);

10 X₁₄ representa los restos de aminoácido glicina (G) o serina (S);

X₁₅ representa los restos de aminoácido arginina (R) o treonina (T);

X₁₆ representa los restos de aminoácido valina (V) o isoleucina (I)

15 X₁₇ representa los restos de aminoácido tirosina (Y), lisina (K), metionina (M), leucina (L) o ácido glutámico (E).

[00267] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR1 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 46, 47 y 48. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID
20
25 NO: 46, 47 y 48.

[00268] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR2 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 49, 50, 51 y 52. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR2 que comprende una
30

secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 49, 50, 51 y 52.

5 **[00269]** En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR3 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 53, 54, 55 y 56. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR3 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID
10 NO: 53, 54, 55 y 56.

[00270] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR1 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 35 y 36. En algunos aspectos,
15 el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 35 y 36.

[00271] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o
20 fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR2 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 37, 38, 39 y 40. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR2 que comprende una
25 secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 37, 38, 39 y 40.

[00272] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR3 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo
30 que consiste en las SEQ ID NO: 41, 42, 43, 44 y 45. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de

unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR3 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 41, 42, 43, 44 y 45.

[00273] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o
5 fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR1 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 46, 47 y 48, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a
10 antígeno comprende una VL-CDR1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 46, 47 y 48, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido.

[00274] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o
15 fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR2 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 49, 50, 51 y 52, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de
20 unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR2 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 49, 50, 51 y 52, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido.

[00275] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o
25 fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR3 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 53, 54, 55 y 56, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de
30 unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR3 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste

en las SEQ ID NO: 53, 54, 55 y 56, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido.

[00276] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-
5 CDR1 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 35 y 36, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR1 que comprende una
10 secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 35 y 36, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido.

[00277] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-
15 CDR2 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 37, 38, 39 y 40, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR2 que
20 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 37, 38, 39 y 40, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido.

[00278] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-
25 CDR3 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 41, 42, 43, 44 y 45, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR3 que
30 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste

en las SEQ ID NO: 41, 42, 43, 44 y 45, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido.

[00279] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR1 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 46, 47 y 48; una VL-CDR2 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 49, 50, 51 y 52; y una VL-CDR3 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 53, 54, 55 y 56. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 46, 47 y 48; una VL-CDR2 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 49, 50, 51 y 52; y una VL-CDR3 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 53, 54, 55 y 56.

[00280] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR1 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 35 y 36; una VH-CDR2 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 37, 38, 39 y 40; y una VH-CDR3 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 41, 42, 43, 44 y 45. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 35 y 36; una VH-CDR2 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 37, 38, 39 y 40; una

VH-CDR3 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 41, 42, 43, 44 y 45.

[00281] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR1 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 46, 47 Y 48 excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; una VL-CDR2 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 49, 50, 51 y 52 excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; y una VL-CDR3 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 53, 54, 55 y 56 excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido.

[00282] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 46, 47 y 48 excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; una VL-CDR2 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 49, 50, 51 y 52 excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; y una VL-CDR3 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 53, 54, 55 y 56 excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido.

[00283] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR1 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 35 y 36 excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; una VH-CDR2 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 37, 38, 39 y 40 excepto por una, dos, tres

o cuatro sustituciones de aminoácido; y una VH-CDR3 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 41, 42, 43, 44 y 45 excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido.

5 **[00284]** En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 35 y 36 excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; una VH-CDR2 que
10 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 37, 38, 39 y 40 excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; una VH-CDR3 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 41, 42, 43, 44 y 45 excepto por una, dos,
15 tres o cuatro sustituciones de aminoácido.

[00285] En determinados aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende modificaciones en CDR1, y/o CDR2, y/o CDR3 de la cadena pesada y/o ligera, y comprende además modificaciones en FW1
20 y/o FW2 y/o FW3 y/o FW4 de la cadena pesada y/o ligera.

[00286] En algunos aspectos, FW₁ comprende la SEQ ID NO: 25 o 26, FW₂ comprende la SEQ ID NO: 27 o 28, FW₃ comprende la SEQ ID NO: 29, FW₄ comprende la SEQ ID NO: 30, FW₅ comprende la SEQ ID NO: 31, FW₆ comprende la SEQ ID NO: 32, FW₇ comprende la SEQ ID NO: 33 y FW₈ comprende la SEQ ID NO: 34.
25

[00287] En algunos aspectos, FW₁ comprende la SEQ ID NO: 25 o 26, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; FW₂ comprende la SEQ ID NO: 27 o 28, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; FW₃
30 comprende la SEQ ID NO: 29, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; FW₄ comprende la SEQ ID

NO: 30, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; FW₅ comprende la SEQ ID NO: 31, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; FW₆ comprende la SEQ ID NO: 32, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; FW₇ comprende la SEQ ID NO: 33, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; y FW₈ comprende la SEQ ID NO: 34.

[00288] En determinados aspectos, el anticuerpo anti-CD733 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL y una VH que comprenden secuencias de aminoácidos de VL-CDR1, VL-CRD2, VL-CDR3, VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 idénticas o idénticas excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido en una o más CDR, donde dichas VL-CDR1, VL-CRD2, VL-CDR3, VH-CDR1, VH-CDR2, y VH-CDR3 son:

SEQ ID NOS: 46, 49, 53, 35, 37, y 41; ou,
SEQ ID NOS: 47, 49, 53, 35, 37 y 41; ou,
SEQ ID NOS: 47, 49, 54, 36, 37 y 42; ou,
SEQ ID NOS: 46, 50, 54, 36, 38 y 43; ou,
SEQ ID NOS: 46, 51, 55, 36, 39 y 44; ou,
SEQ ID NOS: 48, 52, 54, 36, 40 y 44; ou,
SEQ ID NOS: 46, 49, 56, 35, 37 y 41; ou,
SEQ ID NOS: 46, 49, 53, 35, 37 y 45; ou,
SEQ ID NOS: 47, 49, 56, 36, 37 y 45; ou,
SEQ ID NOS: 46, 50, 56, 36, 38 y 45; ou,
SEQ ID NOS: 46, 51, 56, 36, 39 y 45; ou,
SEQ ID NOS: 48, 52, 56, 36, 40 y 45; ou
SEQ ID NOS: 46, 49, 56, 35, 37 y 45, respectivamente.

[00289] En determinados aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL de anticuerpo y una VH de anticuerpo, donde la VL comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 80

- %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, y SEQ ID NO: 70.
- 5
- 10 **[00290]** En otros aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL de anticuerpo y una VH de anticuerpo, donde la VH comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83 y SEQ ID NO: 84.
- 15
- 20
- 25 **[00291]** En otros aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL que comprende una secuencia de al menos aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada
- 30

del grupo que consiste en SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, y SEQ ID NO: 70, y
5 comprende además una VH que comprende una secuencia de al menos aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o
10 aproximadamente un 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ
15 ID NO: 82, SEQ ID NO: 83 y SEQ ID NO: 84.

[00292] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 68 y una VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 82. En algunos aspectos, el
20 anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 68 y una VH que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 82.

[00293] El "anticuerpo del clon 10.3" (también denominado
25 "73combo3" o "MEDI9447") es una IgG1 que comprende dos cadenas ligeras derivadas de CD730010(VL) de SEQ ID NO: 68 (que comprende tres CDR, CDR1, CDR2 y CDR3, con las secuencias de SEQ ID NO: 46, 51 y 56, respectivamente), y dos cadenas pesadas derivadas de CD730010(VH) de SEQ ID NO:
30 82 (que comprende tres CDR, CDR1, CDR2 y CDR3, con las secuencias de SEQ ID NO: 36, 39 y 45, respectivamente).

[00294] En determinados aspectos, un anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo desvelado en el presente documento se une a CD73 con sustancialmente la misma mejor afinidad que un anticuerpo 10.3 que comprende la cadena pesada 10.3 VH de SEQ ID NO: 82 y la cadena ligera 10.3 VL de SEQ ID NO: 68.

(ii) Anticuerpos anti-CD73 derivados de CD730002

[00295] En determinados aspectos, el anticuerpo anti-CD73 de la presente divulgación comprende modificaciones en las CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo CD730002, incluyendo pero sin limitación:

- 1) una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia SGDKVGDKYAS; y/o,
- 2) una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia consenso EDX₁₈KX₁₉X₂₀S, en donde X₁₈ representa los restos de aminoácido serina (S) o treonina (T), X₁₉ representa los restos de aminoácido arginina (R) o tirosina (Y) y X₂₀ representa los restos de aminoácido histidina (H), prolina (P) o leucina (L); y/o,
- 3) una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia QAWDTSFWV.

[00296] En determinados aspectos, el anticuerpo anti-CD73 de la presente divulgación comprende modificaciones en las CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de la cadena pesada de CD730002, incluyendo, pero sin limitación:

- 1) una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia SX₂₁A X₂₂S, en donde X₂₁ representa los restos de aminoácido tirosina (Y) o valina (V) y X₂₂ representa los restos de aminoácido metionina (M) o arginina (R); y/o,
- 2) una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia AISGSGGSX₂₃YY X₂₄DSVKX₂₅, en donde X₂₃ representa los restos

de aminoácido treonina (T) o prolina (P); X_{24} representa los restos de aminoácido alanina (A) o G (glicina); y X_{25} representa los restos de aminoácido glicina (G) o arginina (R); y/o,

- 5 3) una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuenciaDKGYWYM.

[00297] En un aspecto, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región de VL que comprende la secuencia de aminoácidos consenso:

- 10 [FW₉]SGDKVGDKYAS[FW₁₀]EDX₁₈KX₁₉X₂₀S[FW₁₁]QAWDTSEFWV[FW₁₂]
en donde [FW₉], [FW₁₀], [FW₁₁] y [FW₁₂] representan los restos de aminoácido de la región 1 marco de VL (SEQ ID NO: 90 o 91), la región 2 marco de VL (SEQ ID NO: 92), la región 3 marco de VL (SEQ ID NO: 93, 94 o 122) y la región
15 4 marco de VL (SEQ ID NO: 30), respectivamente; y en donde X_{18} representa los restos de aminoácido prolina (P) o leucina (L); X_{19} representa los restos de aminoácido arginina (R) o tirosina (Y); y X_{20} representa los restos de aminoácido histidina (H), prolina (P) o leucina (L).

- 20 **[00298]** En un aspecto, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región de VH que comprende la secuencia de aminoácidos consenso:

[FW₁₃] SX₂₁A X₂₂S[FW₁₄]AISGSGGSX₂₃YY
X₂₄DSVKX₂₅[FW₁₅]DKGYWYM[FW₁₆]

- 25 en donde [FW₁₃], [FW₁₄], [FW₁₅] y [FW₁₆] representan los restos de aminoácido de la región 1 marco de VH (SEQ ID NO: 31), la región 2 marco de VH (SEQ ID NO: 32), la región 3 marco de VH (SEQ ID NO: 33) y la región 4 marco de VH (SEQ ID NO: 89), respectivamente; y en donde X_{21} representa los restos de
30 aminoácido tirosina (Y) o valina (V); X_{22} representa los restos de aminoácido metionina (M) o arginina (R); X_{23}

representa los restos de aminoácido treonina (T) o prolina (P); X_{24} representa los restos de aminoácido alanina (A) o G (glicina); y X_{25} representa los restos de aminoácido glicina (G) o arginina (R).

- 5 **[00299]** En un aspecto, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una región de VL que comprende la secuencia de aminoácidos consenso:

[FW₉]SGDKVGDKYAS[FW₁₀]EDX₁₈KX₁₉X₂₀S[FW₁₁]QAWDTSEFWV[FW₁₂]

- 10 en donde [FW₉], [FW₁₀], [FW₁₁] y [FW₁₂] representan los restos de aminoácido de la región 1 marco de VL (SEQ ID NO: 90 o 91), la región 2 marco de VL (SEQ ID NO: 92), la región 3 marco de VL (SEQ ID NO: 93, 94 o 122) y la región 4 marco de VL (SEQ ID NO: 30), respectivamente; y en donde X_{18} representa los restos de aminoácido prolina (P) o leucina (L); X_{19} representa los restos de aminoácido arginina (R) o tirosina (Y); y X_{20} representa los restos de aminoácido histidina (H), prolina (P) o leucina (L), y en donde el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende además una región de VH que
20 comprende la secuencia de aminoácidos consenso:

[FW₁₃] SX₂₁A X₂₂S[FW₁₄]AISGSGGSX₂₃YY

X₂₄DSVKX₂₅[FW₁₅]DKGYWYWM[FW₁₆]

- 25 en donde [FW₁₃], [FW₁₄], [FW₁₅] y [FW₁₆] representan los restos de aminoácido de la región 1 marco de VH (SEQ ID NO: 31), la región 2 marco de VH (SEQ ID NO: 32), la región 3 marco de VH (SEQ ID NO: 33) y la región 4 marco de VH (SEQ ID NO: 89), respectivamente; y en donde X_{21} representa los restos de aminoácido tirosina (Y) o valina (V); X_{22} representa los restos de aminoácido metionina (M) o arginina (R); X_{23} representa los restos de aminoácido treonina (T) o prolina (P); X_{24} representa los restos de
30

aminoácido alanina (A) o G (glicina); y X₂₅ representa los restos de aminoácido glicina (G) o arginina (R).

5 **[00300]** En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR1 que consiste en una secuencia que consiste en la SEQ ID NO: 97. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR1 que comprende una secuencia que consiste en la SEQ ID NO: 97.

10 **[00301]** En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR2 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 98, 99, 127, 128 y 129. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de
15 unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR2 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 98, 99, 127, 128 y 129.

20 **[00302]** En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR3 que consiste en una secuencia que consiste en la SEQ ID NO: 100. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR3 que comprende una secuencia que consiste en la SEQ ID NO: 100.

25 **[00303]** En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR1 que consiste en una secuencia de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 35, 123 y 124. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o
30 fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-

CDR1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 35, 123 y 124.

[00304] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-
5 CDR2 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 37, 95, 125 y 126. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR2 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID
10 NO: 37, 95, 125 y 126.

[00305] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-
CDR3 que consiste en una secuencia que consiste en la SEQ ID
NO: 96. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o
15 fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR3 que comprende una secuencia que consiste en la SEQ ID NO: 96.

[00306] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-
20 CDR1 que consiste en una secuencia que consiste en la SEQ ID NO: 97, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR1 que comprende una secuencia que consiste en la SEQ ID
25 NO: 97, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido.

[00307] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-
CDR2 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo
30 que consiste en las SEQ ID NO: 98, 99, 127, 128 y 129, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de

aminoácido. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR2 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 98, 99, 127, 128 y 129, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido.

[00308] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR3 que consiste en una secuencia que consiste en la SEQ ID NO: 100, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR3 que comprende una secuencia que consiste en la SEQ ID NO: 100, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido.

[00309] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR1 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 35, 123 y 124, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 35, 123 y 124, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido.

[00310] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR2 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 37, 95, 125 y 126, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR2 que

comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 37, 95, 125 y 126, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido.

[00311] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o
5 fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-
CDR3 que consiste en una secuencia que consiste en la SEQ ID
NO: 96, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de
aminoácido. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o
10 fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-
CDR3 que comprende una secuencia que consiste en la SEQ ID
NO: 96, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de
aminoácido.

[00312] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o
fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-
15 CDR1 que consiste en una secuencia que consiste en la SEQ ID
NO: 97; a VL-CDR2 que consiste en una secuencia seleccionada
del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 98, 99, 127, 128 y
129; y una VL-CDR3 que consiste en una secuencia que consiste
en la SEQ ID NO: 100. En algunos aspectos, el anticuerpo
20 anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende
una VL-CDR1 que comprende una secuencia que consiste en la
SEQ ID NO: 97; a VL-CDR2 que comprende una secuencia
seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 98,
99, 127, 128 y 129; y una VL-CDR3 que comprende una secuencia
25 que consiste en la SEQ ID NO: 100.

[00313] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o
fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-
CDR1 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo
que consiste en las SEQ ID NO: 35, 123 y 124; una VH-CDR2
30 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que
consiste en las SEQ ID NO: 37, 95, 125 y 126; y una VH-CDR3

que consiste en una secuencia que consiste en la SEQ ID NO: 96. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 35, 123 y 124; una VH-CDR2 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 37, 95, 125 y 126; una VH-CDR3 que comprende una secuencia que consiste en la SEQ ID NO: 96.

[00314] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR1 que consiste en una secuencia que consiste en la SEQ ID NO: 97, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; una VL-CDR2 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 98, 99, 127, 128 y 129, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; y una VL-CDR3 que consiste en una secuencia que consiste en la SEQ ID NO: 100, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido.

[00315] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR1 que comprende una secuencia que consiste en la SEQ ID NO: 97, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; una VL-CDR2 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 98, 99, 127, 128 y 129, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; y una VL-CDR3 que comprende una secuencia que consiste en la SEQ ID NO: 100, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido.

[00316] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR1 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo

que consiste en las SEQ ID NO: 35, 123 y 124, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; una VH-CDR2 que consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 37, 95, 125 y 126, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; y una VH-CDR3 que consiste en una secuencia que consiste en la SEQ ID NO: 96, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido.

[00317] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 35, 123 y 124, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; una VH-CDR2 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 37, 95, 125 y 126, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; una VH-CDR3 que comprende una secuencia que consiste en la SEQ ID NO: 96, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido.

[00318] En determinados aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende modificaciones en CDR1, y/o CDR2, y/o CDR3 de la cadena pesada y/o ligera, y comprende además modificaciones en FW1 y/o FW2 y/o FW3 y/o FW4 de la cadena pesada y/o ligera.

[00319] En algunos aspectos, FW₉ comprende la SEQ ID NO: 90 o 91, FW₁₀ comprende la SEQ ID NO: 92, FW₁₁ comprende la SEQ ID NO: 93, 94 o 122, FW₁₂ comprende la SEQ ID NO: 30, FW₁₃ comprende la SEQ ID NO: 31, FW₁₄ comprende la SEQ ID NO: 32, FW₁₅ comprende la SEQ ID NO: 33 y FW₁₆ comprende la SEQ ID NO: 89.

- [00320]** En algunos aspectos, FW₉ comprende la SEQ ID NO: 90 o 91, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido, FW₁₀ comprende la SEQ ID NO: 92, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido, FW₁₁ comprende la SEQ ID NO: 93, 94 o 122, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido, FW₁₂ comprende la SEQ ID NO: 30, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido, FW₁₃ comprende la SEQ ID NO: 31, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido, FW₁₄ comprende la SEQ ID NO: 32, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido, FW₁₅ comprende la SEQ ID NO: 33, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido y FW₁₆ comprende la SEQ ID NO: 89.
- [00321]** En determinados aspectos, el anticuerpo anti-CD733 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL y una VH que comprenden las secuencias de aminoácido VL-CDR1, VL-CRD2, VL-CDR3, VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 idénticas o idénticas excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido en una o más CDR, en donde dichas VL-CDR1, VL-CRD2, VL-CDR3, VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 son:
- SEQ ID NOS: 97, 98, 100, 35, 37, y 96; ou,
SEQ ID NOS: 97, 99, 100, 35, 95 y 96; ou,
SEQ ID NOS: 97, 98, 100, 35, 37, y 96; ou,
SEQ ID NOS: 97, 99, 100, 123, 37, y 96; ou,
SEQ ID NOS: 97, 99, 100, 124, 37, y 96; ou,
SEQ ID NOS: 97, 99, 100, 35, 125, y 96; ou,
SEQ ID NOS: 97, 99, 100, 35, 126, y 96; ou,
SEQ ID NOS: 97, 99, 100, 35, 95, y 96; ou,
SEQ ID NOS: 97, 127, 100, 35, 95, y 96; ou,
SEQ ID NOS: 97, 128, 100, 35, 95, y 96; ou,

SEQ ID NOs: 97, 129, 100, 35, 95, y 96; ou,

SEQ ID NOs: 97, 99, 100, 35, 95, y 96; respectivamente.

[00322] En determinados aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL de anticuerpo y una VH de anticuerpo, donde la VL comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 86, 88, 112, 118, 119, 120, y 121.

[00323] En otros aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL de anticuerpo y una VH de anticuerpo, donde la VH comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 85, 87, 111, 113, 114, 115, 116, y 117.

[00324] En otros aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL que comprende una secuencia de al menos aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % idéntica

a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 86, 88, 112, 118, 119, 120, y 121; y comprende además una VH que comprende una secuencia de al menos aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 85, 87, 111, 113, 114, 115, 116, y 117.

[00325] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 88; y una VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 87. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL que consiste en la SEQ ID NO: 87, y una VH que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 87.

[00326] El "anticuerpo del clon 2C5" es una IgG1 que comprende dos cadenas ligeras derivadas de CD730002 (VL) de SEQ ID NO: 88 (que comprende tres CDR, CDR1, CDR2 y CDR3, con las secuencias de SEQ ID NO: 97, 99 y 100, respectivamente) y cadenas pesadas derivadas de CD7300002 (VH) de SEQ ID NO: 87 (que comprende tres CDR, CDR1, CDR2 y CDR3, con las secuencias de SEQ ID NO: 35, 95 y 96, respectivamente).

[00327] En determinados aspectos, un anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo desvelado en el presente documento se une a CD73 con sustancialmente la misma afinidad o una afinidad mejor que un anticuerpo 2C5 que

comprende la cadena pesada VH de 2C5 de SEQ ID NO: 87 y la cadena ligera VL de 2C5 de SEQ ID NO: 88.

(iii) Anticuerpos anti-CD73 con anticuerpos parentales distintos de CD730002 o CD730010

5 **[00328]** En otros aspectos, el anticuerpo parental de un anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno desvelado en el presente documento es CD730004 (es decir, un anticuerpo anti-CD73 que comprende una VL de SEQ ID NO: 104 y una VH de SEQ ID NO: 103), CD730008 (es decir, un anticuerpo anti-CD73 que comprende una VL de SEQ ID NO: 106 y una VH de SEQ ID NO: 107), CD7300011 (es decir, un anticuerpo anti-CD73 que comprende una VL de SEQ ID NO: 5 y una VH de SEQ ID NO: 6), CD730021 (es decir, un anticuerpo anti-CD73 que comprende una VL de SEQ ID NO: 7 y una VH de SEQ ID NO: 8),
10 CD730042 (es decir, un anticuerpo anti-CD73 que comprende una VL de SEQ ID NO: 9 y una VH de SEQ ID NO: 10), CD730046 (es decir, un anticuerpo anti-CD73 que comprende una VL de SEQ ID NO: 11 y una VH de SEQ ID NO: 12), CD730047 (es decir, un anticuerpo anti-CD73 que comprende una VL de SEQ ID NO: 13 y una VH de SEQ ID NO: 14), CD730068 (es decir, un anticuerpo anti-CD73 que comprende una VL de SEQ ID NO: 108 y una VH de SEQ ID NO: 107), o CD730069 (es decir, un anticuerpo anti-CD73 que comprende una VL de SEQ ID NO: 110 y una VH de SEQ ID NO: 109). Las modificaciones en los
15 anticuerpos parentales pueden incluir mutaciones en las regiones CDR y/o en las regiones FW en comparación con el anticuerpo parental, por ejemplo CD730004.

20 **[00329]** En determinados aspectos, el anticuerpo anti-CD73 comprende modificaciones en CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de la
25 cadena ligera de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068 o CD730069.

[00330] En determinados aspectos, el anticuerpo anti-CD73 comprende modificaciones en CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de la cadena pesada de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069.

5 **[00331]** En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR1 de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a
10 antígeno del mismo comprende una VL-CDR2 de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR3 de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021,
15 CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069.

[00332] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR1 de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069. En algunos
20 aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR2 de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR3 de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021,
25 CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069.

[00333] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR1 de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042,
30 CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069 excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido. En algunos

aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR2 de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069, excepto por una, dos, tres o cuatro
5 sustituciones de aminoácido. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR3 de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069, excepto por una, dos, tres o cuatro
10 sustituciones de aminoácido.

[00334] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR1 de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069, excepto por una,
15 dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR2 de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069, excepto por una, dos, tres o cuatro
20 sustituciones de aminoácido. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR3 de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069, excepto por una, dos, tres o cuatro
25 sustituciones de aminoácido.

[00335] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR1 de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069; una VL-CDR2 de
30 CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069; y una VL-CDR3 de CD730004,

CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069.

[00336] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR1 de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069; una VH-CDR2 de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069; y una VH-CDR3 de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069.

[00337] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL-CDR1 de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; una VL-CDR2 de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; y una VL-CDR3 de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido.

[00338] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VH-CDR1 de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; una VH-CDR2 de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido; y una VH-CDR3 de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042,

CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069, excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido.

[00339] En determinados aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende modificaciones en la CDR1, y/o CDR2, y/o CDR3 de la cadena pesada y/o ligera de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069, y además comprende modificaciones en FW1, y/o FW2, y/o FW3, y/o FW4 de la cadena pesada y/o ligera de CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069.

[00340] En determinados aspectos, el anticuerpo anti-CD733 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL y una VH que comprenden las secuencias de aminoácido VL-CDR1, VL-CRD2, VL-CDR3, VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 idénticas o idénticas excepto por una, dos, tres o cuatro sustituciones de aminoácido en una o más CDR, en donde dichas VL-CDR1, VL-CRD2, VL-CDR3, VH-CDR1, VH-CDR2 y VH-CDR3 son CD730004, CD730008, CD7300011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069.

[00341] En determinados aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL de anticuerpo y una VH de anticuerpo, donde la VL comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %, aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %, aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste en CD730004, CD730008, CD7300011,

CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou
CD730069.

[00342] En otros aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o
fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL de
anticuerpo y una VH de anticuerpo, donde la VH comprende una
5 secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 80 %,
aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %,
aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %,
aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %,
10 aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % idéntica
a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada
del grupo que consiste en CD730004, CD730008, CD730011,
CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou
CD730069.

[00343] En otros aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o
fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una VL de
anticuerpo y una VH de anticuerpo, donde la VH comprende una
secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente un 80 %,
aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %,
20 aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %,
aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %,
aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % idéntica
a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada
del grupo que consiste en CD730004, CD730008, CD730011,
25 CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou
CD730069, y comprende además una VH que comprende una
secuencia de al menos aproximadamente un 80 %,
aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %,
aproximadamente un 95 %, aproximadamente un 96 %,
30 aproximadamente un 97 %, aproximadamente un 98 %,
aproximadamente un 99 % o aproximadamente un 100 % idéntica

a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste en CD730004, CD730008, CD730011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069.

- 5 **[00344]** En determinados aspectos, un anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo desvelado en el presente documento se une a CD73 con sustancialmente la misma afinidad o una afinidad mejor que un CD730004, CD730008, CD730011, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069 anticuerpo.

(iv) Anticuerpos anti-CD73 mixtos y emparejados

- [00345]** Las secuencias VH y VL de las moléculas de unión anti-CD73 desveladas en el presente documento (por ejemplo, CD730002, CD730004, CD730008, CD730010, CD730011, CD730021, 15 CD730042, CD730046, CD730047, CD730068, ou CD730069) o VH y VL de variantes de dichas secuencias (por ejemplo, clon 10 GL9, clon 10 P32E, clon 10 C1, clon 10 C2, clon 10 D3, clon 10 G10, clon 10 HPT, clon 10 GRVE, clon 10 combo1, clon 10 combo2, clon 10 combo3, clon 10 combo5 o clon combo6) pueden 20 "mezclarse y emparejarse" para crear otras moléculas de unión anti-CD73.

- [00346]** En determinados aspectos, las secuencias de VH del anticuerpo 10.3 y el anticuerpo 2C5 están mezcladas y emparejadas. En otro aspecto, las secuencias de VL del anticuerpo 10.03 y el anticuerpo 2C5 pueden mezclarse y emparejarse. Adicionalmente o como alternativa, las secuencias de VL y/o VH de las variantes del clon 10 (CD730010) desveladas en el presente documento pueden mezclarse y emparejarse. Adicionalmente o como alternativa, 25 las secuencias de VL y/o VH de las variantes del clon 2 (CD730002) desveladas en el presente documento pueden 30

mezclarse y emparejarse. Adicionalmente o como alternativa, las secuencias VL y/o VH de las variantes del clon 10 (CD730010) y el clon 2 (CD730002) desveladas en el presente documento pueden mezclarse y emparejarse.

5 **[00347]** En algunos aspectos, la mezcla y el emparejamiento de VL y/o VH puede tener lugar entre secuencias derivadas de anticuerpos agrupados en la misma clase de epítipo (véase el Ejemplo 2). Como se usa en el presente documento, la expresión "clase de epítipo" se refiere al agrupamiento de
10 anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen al mismo epítipo o a un epítipo solapante, o compiten entre sí por la unión con el mismo epítipo o epítipo solapante. Por ejemplo, las secuencias de CD730003, CD730010, CD730021, CD730042, CD730046 y CD730047, siendo
15 todos ellos anticuerpos que pertenecen a la "clase de epítipo B" pueden mezclarse y emparejarse. En otros aspectos, la mezcla y emparejamiento de la VL y/o VH puede tener lugar entre secuencias derivadas de anticuerpos anti-CD73 agrupados en diferentes clases de epítipo. Por consiguiente,
20 secuencias procedentes de anticuerpos que pertenecen a la "clase de epítipo B" pueden mezclarse y emparejarse con secuencias de anticuerpos anti-CD73 de la "clase de epítipo A" (CD730002, CD730004, CD730008 y CD730011) o la "clase de epítipo C" (CD730068 y CD730069).

25 **(v) Anticuerpos anti-CD73 mutantes**

[00348] En determinados aspectos, un anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, MEDI9447, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o fragmentos de unión a antígeno del mismo desvelado en el presente documento, comprende
30 mutaciones que mejoran la unión a FcRn humano y mejoran la semivida del anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a

antígeno del mismo. En algunos aspectos, dichas mutaciones son una mutación de metionina (M) a tirosina (Y) en posición 252, una mutación de serina (S) a treonina (T) en la posición 254 y una mutación de treonina (T) a ácido glutámico(E) en la posición 256, numerado de acuerdo con el índice EU como en Kabat (Kabat, *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Public Health Service, National Institutes of Health, Washington, D.C.), introducidas en el dominio constante de una IgG1. Véase la patente de Estados Unidos n.º 7,658,921, que se incorpora por referencia en el presente documento. Este tipo de IgG mutante, denominada "mutante YTE" según se ha demostrado presenta una semivida aproximadamente cuatro veces mayor en comparación con las versiones de tipo silvestre del mismo anticuerpo (Dall'Acqua *et al.*, J. Biol. Chem. 281: 23514-24 (2006)). En algunos aspectos, un anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un dominio constante de IgG comprende una o más sustituciones de aminoácidos de los restos de aminoácido en las posiciones 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-436, numeradas de acuerdo con el índice EU como en Kabat, donde dichas mutaciones aumentan la semivida en suero del anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

[00349] En algunos aspectos, un mutante YTE comprende además una sustitución en la posición 434 del dominio constante de IgG, numerado de acuerdo con el índice EU como en Kabat, con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en triptófano (W), metionina (M), tirosina (Y) y serina (S). En otros aspectos, un mutante YTE comprende además una sustitución en la posición 434 del dominio constante de IgG, numerado de acuerdo con el índice EU como

en Kabat, con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en triptófano (W), metionina (M), tirosina (Y) y serina (S), y sustitución en la posición 428 del dominio constante de IgG, numerado de acuerdo con el índice EU como en Kabat, con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en treonina (T), leucina (L), fenilalanina (F) y serina (S).

[00350] En otro aspecto adicional, un mutante YTE comprende además una sustitución en posición 434 del dominio constante de IgG, numerado de acuerdo con el índice EU como en Kabat, con tirosina (Y) y una sustitución en la posición 257 del dominio constante de IgG, numerado de acuerdo con el índice EU como en Kabat, con leucina (L). En algunos aspectos, un mutante YTE comprende además una sustitución en la posición 434 del dominio constante de IgG, numerado de acuerdo con el índice EU como en Kabat, con serina (S), y una sustitución en posición 428 del dominio constante de IgG, numerado de acuerdo con el índice EU como en Kabat, con leucina (L).

[00351] En un aspecto específico, el anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo MEDI9447, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o fragmento de unión a antígeno del mismo desvelado en el presente documento comprende un dominio constante de IgG1 que comprende una mutación de metionina (M) a tirosina (Y) en la posición 252, una mutación de serina (S) a treonina (T) en la posición 254, y una mutación de treonina (T) a ácido glutámico (E) en la posición 256 del dominio constante de IgG1, numerado de acuerdo con el índice EU como en Kabat.

[00352] En determinados aspectos, el anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, MEDI9447, un anticuerpo del clon 10.3 o un

anticuerpo del clon 2C5) o fragmento de unión a antígeno del mismo desvelado en el presente documento comprende al menos una sustitución de aminoácido de dominio constante de IgG seleccionada del grupo que consiste en:

- 5 (a) sustitución del aminoácido en posición 252 con tirosina (Y), fenilalanina (F), triptófano (W) o treonina (T);
- (b) sustitución del aminoácido en posición 254 con treonina (T);
- (c) sustitución del aminoácido en posición 256 con serina
- 10 (S), arginina (R), glutamina (Q), ácido glutámico (E), ácido aspártico (D) o treonina (T);
- (d) sustitución del aminoácido en posición 257 con leucina (L);
- (e) sustitución del aminoácido en posición 309 con prolina
- 15 (P);
- (f) sustitución del aminoácido en posición 311 con serina (S);
- (g) sustitución del aminoácido en posición 428 con treonina (T), leucina (L), fenilalanina (F) o serina (S);
- 20 (h) sustitución del aminoácido en posición 433 con arginina (R), serina (S), isoleucina (I), prolina (P) o glutamina (Q);
- (i) sustitución del aminoácido en posición 434 con triptófano (W), metionina (M), serina (S), histidina (H),
- 25 fenilalanina (F) o tirosina; y,
- (j) una combinación de dos o más de dichas sustituciones, donde las posiciones están numeradas de acuerdo con el índice EU como en Kabat, y donde la IgG modificada tiene una mayor semivida en suero en comparación con la semivida
- 30 en suero de una IgG que tiene el dominio constante de IgG de tipo silvestre.

[00353] En algunos aspectos, la secuencia de aminoácidos de VH y/o VL de un anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, MEDI9447, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o fragmento de unión a antígeno del mismo desvelado en el presente documento puede ser un 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % similar a las secuencias de VH y VL indicadas anteriormente, y comprende 1, 2, 3, 4, 5 o más sustituciones conservativas. Un anticuerpo CD73 que tiene regiones de VH y VL que tienen alta similitud de secuencia o identidad de secuencia (es decir, del 80 % o mayor) con las regiones VH de SEQ ID NOs: 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 87, 111, 113, 114, 115, 116, ou 117, y/o regiones VL de SEQ ID NOs: 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 86, 88, 112, 118, 119, 120, ou 121 respectivamente, puede obtenerse por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican SEQ ID NOs: 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, ou 121, seguido del ensayo del anticuerpo alterado codificado para determinar la función conservada usando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

[00354] En algunos aspectos, el dominio Fc de un anticuerpo anti-CD73 desvelado en el presente documento o el dominio Fc de una proteína de fusión que comprende un fragmento de unión a CD73 de un anticuerpo desvelado en el presente documento tiene unión reducida a un receptor de Fc para reducir la citotoxicidad, por ejemplo, mediante ADCC. En algunos aspectos, el dominio Fc del anticuerpo o la proteína de fusión de Fc tiene mayor unión a un receptor de Fc para

aumentar la citotoxicidad, por ejemplo, mediante ADCC. En algunos aspectos, el dominio Fc del anticuerpo o la proteína de fusión de Fc comprende un resto de aminoácido reductor de ADCC natural en una o más posiciones seleccionadas del grupo

5 que consiste en 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 251, 252, 254, 255, 256, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 279, 280, 284, 292, 296, 297, 298, 299, 305, 313, 316, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 339, 341, 343, 370, 373, 378, 392, 416, 419, 421, 440, y 443

10 numerado por el índice EU como se indica en Kabat. En la técnica se conocen numerosas mutaciones específicas capaces de reducir la actividad ADCC de un anticuerpo e incluyen, por ejemplo, 234F, 235E, 235F, 235Q (o 235Y), 239A, 332Q, 331S y combinaciones de las mismas. Por ejemplo, véase las

15 mutaciones descritas en las patentes de Estados Unidos n.º 5,624,821, 5,648,260, 7,597,889, 8,961,967, 7,371,826, 7,785,791, 7,790,858, en la publicación de patente n.º 20140378663, 20130071390, 20110212087, 20150118227, 20060194290, 20060194291, 20080274105, 20080274506,

20 US20130089541 y US20130108623, que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. Los anticuerpos con función efectora ADCC reducida también incluyen los que tienen una sustitución de uno o más de los restos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329

25 (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6,737,056). Dichos mutantes de Fc también incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más posiciones de aminoácido 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el mutante Fc con sustitución de los restos 265 y 297 por alanina (véase, por

30 ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 7,332,581). Opcionalmente, pueden incorporarse mutaciones que reducen

tanto ADCC como CDC. En algunos aspectos, pueden usarse anticuerpos anti-CD73 desvelados en el presente documento o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden mutaciones que reducen o anulan la ADCC y/o CDC para generar conjugados de anticuerpo y fármaco(ADC).

[00355] En un aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-CD73, en donde el anticuerpo es una IgG1, IgG2 o IgG3 y comprende al menos una modificación en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235 y 331 numerado por el índice EU como se indica en Kabat. En otro aspecto específico, la región Fc es una región Fc de IgG1, IgG2 o IgG3 y los aminoácidos no naturales se seleccionan del grupo que consiste en 234F, 235E, 235F, 235Q (o 235Y), 239A, 332Q, 331S, 332Q según se numera por el índice EU tal como se expone en Kabat.

[00356] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-CD73, en donde el anticuerpo es una IgG4 y comprende al menos una modificación en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 228 y 235 según se numera por el índice EU tal como se expone en Kabat. En otro aspecto específico más, la región Fc es una región Fc de IgG4 y los aminoácidos que no están presentes de manera natural se seleccionan a partir del grupo constituido por 228P, 235E y 235Y según se numera por el índice EU tal como se expone en Kabat. En aspectos específicos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-CD73, en donde el anticuerpo es una IgG1, IgG2 o IgG3 y comprende modificaciones en las posiciones (i) 234F, 235E y 331S; (ii) 234F, 235F y 331S; (iii) 234F, 235Q y 322Q. En otro aspecto específico, la presente divulgación

proporciona un anticuerpo anti-CD73, en donde el anticuerpo es una IgG4 y comprende modificaciones 228P y 235E.

III. Moléculas de unión a CD73 que compiten por el epítopo

5 **[00357]** En otro aspecto, la presente divulgación proporciona moléculas de unión a CD73 que se une al mismo epítopo que los diversos anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento, por ejemplo, moléculas que se unen al mismo epítopo que MEDI9447, un anticuerpo del clon 10.3 o el
10 mismo epítopo que un anticuerpo del clon 2C5.

[00358] Dichos anticuerpos pueden identificarse basándose en su capacidad de competir de forma cruzada (por ejemplo, de inhibir competitivamente la unión de, de una manera estadísticamente significativa) con los anticuerpos anti-
15 CD73 desvelados en el presente documento, tales como en anticuerpo CD730010, el anticuerpo CD730002, el anticuerpo CD730004 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, en ensayos de unión a CD73 convencionales (por ejemplo, ensayos de citometría de flujo, resonancia de plasmón superficial o
20 ensayos en solución).

[00359] Por consiguiente, en un aspecto, la presente divulgación proporciona anticuerpos anti-CD73 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos, que compiten por la unión a CD73 con
25 otro anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo, tal como el anticuerpo CD730010, el anticuerpo CD730002, el anticuerpo CD730004, variantes de los mismos (por ejemplo, MEDI9447, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5), o fragmentos de unión a antígeno
30 de los mismos. La capacidad de un anticuerpo de ensayo para inhibir la unión de, por ejemplo, el anticuerpo CD730010 (o

un anticuerpo del clon 10.3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo), o el anticuerpo CD730002 (o anticuerpo del clon 2C5 o un fragmento de unión a antígeno del mismo) demuestra que el anticuerpo de ensayo puede competir con ese anticuerpo por la unión a CD73; dicho anticuerpo, de acuerdo con una teoría no limitante, puede unirse al mismo epítipo o a un epítipo relacionado (por ejemplo, un epítipo estructuralmente similar o espacialmente próximo) presente en CD73 como el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo con el que compete. En un aspecto, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo en CD73 que, por ejemplo, el anticuerpo CD730010 (o un anticuerpo del clon 10.3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo) o el anticuerpo CD730002 (o anticuerpo del clon 2C5 o un fragmento de unión a antígeno del mismo), es un anticuerpo monoclonal humano.

[00360] Como se describe en el presente documento, el epítipo de MEDI9447, un anticuerpo monoclonal que inhibe directamente la actividad enzimática de CD73 se identificó para esclarecer el mecanismo de acción de MEDI9447. El epítipo reside dentro de la superficie apical del dominio N-terminal de CD73, una región distal de los restos del sitio de unión al sustrato y activo. Los estudios estructurales y mecánicos revelaron que MEDI9447 antagoniza CD73 a través de un mecanismo dual que impide que CD73 adopte una conformación catalíticamente activa. Estos resultados proporcionan el primer informe de un epítipo mapeado de forma exacta que puede fijarse como diana para la inhibición selectiva, potente y no competitiva de CD73 como medio de modular la señalización de adenosina en el micro entorno tumoral.

[00361] Usando espectrometría de masas (MS) de intercambio de hidrógeno-deuterio (HDX) y estrategias de mutagénesis, se definió el epítipo de MEDI9447 y se examinó los posibles efectos de la unión del anticuerpo a la estructura global de CD73. El anticuerpo se une a un sitio en el dominio N terminal de CD73 que permite la inhibición no competitiva de la hidrólisis de AMP. En diversos aspectos, el epítipo comprende uno o más restos de aminoácido de CD73 que corresponden a V144, K180 y N185. En diversos aspectos, el epítipo además comprende uno o más restos de aminoácido de CD73 que corresponden a Y135, K136 y N187. Debe destacarse que el epítipo está situado de tal manera que la unión del anticuerpo impide la conversión de CD73 desde el conformero abierto al sitio catalíticamente activo, conformero cerrado. Además, los estudios de los presentes inventores muestran que MEDI9447 puede inhibir el CD73 tanto anclado como soluble a través de un mecanismo doble de inhibición que está mediado por la valencia de la interacción del anticuerpo con CD73.

IV. Características funcionales de anticuerpos anti-CD73

[00362] La afinidad o avidez de un anticuerpo por un antígeno puede determinarse de forma experimental usando cualquier método adecuado bien conocido en la técnica, por ejemplo, citometría de flujo, ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA), o cinética (por ejemplo, análisis BIACORE™). Se pueden emplear fácilmente formatos de ensayos de unión directa así como también de ensayos de unión competitiva. (Véase, por ejemplo, Berzofsky *et al.*, "Antibody-Antigen Interactions," In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: Nueva York, N.Y. (1984); Kuby, Immunology, W. H. Freeman and Company: Nueva York, N.Y. (1992); y los métodos descritos en

el presente documento. La afinidad medida de una interacción concreta anticuerpo-antígeno puede variar si se mide en condiciones diferentes (por ejemplo, concentración salina, pH o temperatura). Por tanto, se realizan mediciones de
5 afinidad y otros parámetros de unión a antígeno (por ejemplo, D o K_d , K_{on} , K_{off}) con disoluciones normalizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón normalizado, tal como se conoce en la técnica y tal como el tampón descrito en el presente documento.

10 **[00363]** También se sabe en la técnica que las afinidades medidas usando análisis de resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, BIACORE™) pueden variar dependiendo de cuál de los reactivos se une al chip. A este respecto, la afinidad puede medirse usando un formato en el que el anticuerpo de
15 dirección (por ejemplo un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) se inmoviliza en el chip (denominado formato de "IgG abajo") o usando un formato en el que la proteína diana (por ejemplo, CD73) se inmoviliza sobre el chip (denominado, por ejemplo, un formato "CD73 abajo").

20 **[00364]** En un aspecto de la presente divulgación, el anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, MEDI9447, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a CD73 y/o a fragmentos antigénicos del mismo con una constante de
25 disociación de k_d (k_{off}/k_{on}) menor de 10^{-6} M, o menor de 10^{-7} M, o menor de 10^{-8} M, o menor de 10^{-9} M, o menor de 10^{-10} M, o menor de 10^{-11} M, o menor de 10^{-12} M, o menor de 10^{-13} M.

[00365] En otro aspecto, el anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, MEDI9447, un anticuerpo del clon 10.3 o un
30 anticuerpo del clon 2C5) o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une a CD73 y/o fragmentos antigénicos del mismo

con una K_{off} menor de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, o menor de $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. En otros aspectos, un anticuerpo anti-CD73 o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une a CD73 y a fragmentos antigénicos del mismo con una K_{off} menor de 10^{-3} s^{-1} , menor de $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, menor de 10^{-4} s^{-1} , menor de $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, menor de 10^{-5} s^{-1} , menor de $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, menor de 10^{-6} s^{-1} , menor de $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, menor de $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$, menor de 10^{-8} s^{-1} , menor de $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, menor de 10^{-9} s^{-1} , menor de $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$, o menor de 10^{-10} s^{-1} .

[00366] En otro aspecto, el anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une a CD73 y/o a fragmentos antigénicos del mismo con una constante de velocidad de asociación o k_{on} de al menos $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, al menos $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, al menos $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, al menos $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, al menos $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, al menos $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o al menos $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, o al menos $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

[00367] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une a CD73 en la superficie de células MB-MDA-231 con una K_{D} de al menos aproximadamente 60 pM, al menos aproximadamente 70 pM, al menos aproximadamente 80 pM, al menos aproximadamente 90 pM, al menos aproximadamente 100 pM, al menos aproximadamente 110 pM, al menos aproximadamente 120 pM, al menos aproximadamente 130 pM, al menos aproximadamente 140 pM, al menos aproximadamente 150 pM, al menos aproximadamente 160 pM o al menos aproximadamente 170 pM, medido por citometría de flujo. En un aspecto específico, el anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo del clon 10.3 y se une a CD73 en la superficie de células MB-MDA-231 con una K_{D} de aproximadamente 150 pM, medido por citometría de flujo. En

otro aspecto específico, el anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo del clon 2C5 y se une a CD73 en la superficie de células MB-MDA-231 con una K_D de aproximadamente 80 pM, medido por citometría de flujo.

- 5 **[00368]** En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, MEDI9447, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une a CD73 en la superficie de células 3T1 murinas con una K_D de al menos aproximadamente 40 pM, al
10 menos aproximadamente 50 pM, al menos aproximadamente 60 pM, al menos aproximadamente 70 pM, al menos aproximadamente 80 pM, al menos aproximadamente 90 pM, al menos aproximadamente 100 pM, al menos aproximadamente 120 pM o al menos aproximadamente 130 pM, medido por citometría de flujo. En
15 un aspecto específico, el anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo del clon 10.3 y se une a CD73 en la superficie de células 3T1 murinas con una K_D de aproximadamente 110 pM medido por citometría de flujo. En otro aspecto específico, el anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo del clon 2C5 y se
20 une a CD73 en la superficie de células 3T1 murinas con una K_D de aproximadamente 55 pM medido por citometría de flujo.

- [00369]** En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, MEDI9447, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o un fragmento de unión a antígeno
25 del mismo se une a CD73 en la superficie de células MK-1 de mono cinomolgo con una K_D de al menos aproximadamente 40 pM, al menos aproximadamente 50 pM, al menos aproximadamente 60 pM, al menos aproximadamente 70 pM, al menos aproximadamente 80 pM, al menos aproximadamente 90 pM o al menos
30 aproximadamente 100 pM, medido por citometría de flujo. En un aspecto específico, el anticuerpo anti-CD73 es un

anticuerpo del clon 10.3 y se une a CD73 en la superficie de células MK-1 de mono cinomolgo con una K_D de aproximadamente 80 pM, medido por citometría de flujo. En otro aspecto específico, el anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo del
5 clon 2C5 y se une a CD73 en la superficie de células MK-1 de mono cinomolgo con una K_D de aproximadamente 60 pM medido por citometría de flujo.

[00370] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, MEDI9447, un anticuerpo del clon 10.3 o un
10 anticuerpo del clon 2C5) o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une a CD73 humano con una K_D de al menos aproximadamente 3 pM, al menos aproximadamente 4 pM, al menos aproximadamente 5 pM, al menos aproximadamente 6 pM, al menos aproximadamente 7 pM, al menos aproximadamente 8 pM, al menos
15 aproximadamente 9 pM o al menos aproximadamente 10 pM, medido por resonancia de plasmón superficial (PROTEO®). En un aspecto específico, el anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo del clon 10.3 y se une a CD73 humano con una K_D de aproximadamente 4 pM medido por resonancia de plasmón superficial (PROTEO®).
20 En otro aspecto específico, el anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo del clon 2C5 y se une a CD73 humano con una K_D de aproximadamente 9 pM medido por resonancia de plasmón superficial (PROTEO®).

[00371] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, MEDI9447, un anticuerpo del clon 10.3 o un
25 anticuerpo del clon 2C5) o un fragmento de unión a antígeno del mismo desvelado en el presente documento se une a CD73 murino con una K_D de al menos aproximadamente 1 pM, al menos aproximadamente 2 pM, al menos aproximadamente 3 pM, al menos aproximadamente 4 pM, al menos aproximadamente 5 pM, al menos
30 aproximadamente 6 pM, al menos aproximadamente 7 pM, al menos

aproximadamente 8 pM, al menos aproximadamente 9 pM, al menos aproximadamente 10 pM, al menos aproximadamente 11 pM, al menos aproximadamente 12 pM, al menos aproximadamente 13 pM, al menos aproximadamente 14 pM, al menos aproximadamente 15 pM, al menos aproximadamente 16 pM, al menos aproximadamente 17 pM, al menos aproximadamente 18 pM, al menos aproximadamente 19 pM, al menos aproximadamente 20 pM, al menos aproximadamente 21 pM, al menos aproximadamente 22 pM, al menos aproximadamente 23 pM, al menos aproximadamente 24 pM o al menos aproximadamente 25 pM, medido por resonancia de plasmón superficial (PROTEO®). En un aspecto específico, el anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo del clon 10.3 y se une a CD73 murino con una K_D de aproximadamente 1 pM medido por resonancia de plasmón superficial (PROTEO®). En otro aspecto específico, el anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo del clon 2C5 y se une a CD73 murino con una K_D de aproximadamente 22 pM medido por resonancia de plasmón superficial (PROTEO®).

[00372] En algunos aspectos, un anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, MEDI9447, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une a CD73 de mono cinomolgo con una K_D de al menos aproximadamente 3 pM, al menos aproximadamente 4 pM, al menos aproximadamente 5 pM, al menos aproximadamente 6 pM, al menos aproximadamente 7 pM, al menos aproximadamente 8 pM, al menos aproximadamente 9 pM o al menos aproximadamente 10 pM, medido por resonancia de plasmón superficial (PROTEO®). En un aspecto específico, el anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo del clon 10.3 y se une a CD73 de mono cinomolgo con una K_D de aproximadamente 7 pM medido por SPR (Proteo). En otro aspecto específico, el

anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo del clon 2C5 y se une a CD73 de mono cinomolgo con una K_D de aproximadamente 9 pM medido por resonancia de plasmón superficial (PROTEO®).

[00373] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, MEDI9447, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une a CD73 humano con una K_D de al menos aproximadamente 40 pM, al menos aproximadamente 50 pM, al menos aproximadamente 60 pM, al menos aproximadamente 70 pM, al menos aproximadamente 80 pM, al menos aproximadamente 90 pM, al menos aproximadamente 100 pM o al menos aproximadamente 110 pM, medido por unión en solución. En un aspecto específico, el anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo del clon 10.3 y se une a CD73 humano con una K_D de aproximadamente 80 pM medido por unión en solución. En otro aspecto específico, el anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo del clon 2C5 y se une a CD73 humano con una K_D de aproximadamente 80 pM medido por unión en solución.

[00374] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une a CD73 murino con una K_D de al menos aproximadamente 100 pM, al menos aproximadamente 200 pM, al menos aproximadamente 300 pM, al menos aproximadamente 400 pM, al menos aproximadamente 500 pM, al menos aproximadamente 600 pM, al menos aproximadamente 700 pM, al menos aproximadamente 800 pM, al menos aproximadamente 900 pM, al menos aproximadamente 1000 pM, al menos aproximadamente 1100 pM, al menos aproximadamente 1200 pM, al menos aproximadamente 1300 pM, al menos aproximadamente 1400 pM, al menos aproximadamente 1500 pM, al menos aproximadamente 1600 pM, al menos

aproximadamente o al menos aproximadamente 1700 pM, medido por unión en solución. En un aspecto específico, el anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo del clon 10.3 y se une a CD73 murino con una K_D de aproximadamente 130 pM medido por unión en solución. En otro aspecto específico, el anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo del clon 2C5 y se une a CD73 murino con una K_D de aproximadamente 1500 pM medido por unión en solución.

[00375] En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une a CD73 de mono cinomolgo con una K_D de al menos aproximadamente 60 pM, al menos aproximadamente 70 pM, al menos aproximadamente 80 pM, al menos aproximadamente 90 pM, al menos aproximadamente 100 pM, al menos aproximadamente 110 pM o al menos aproximadamente 120 pM, medido por unión en solución. En un aspecto específico, el anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo del clon 10.3 y se une a CD73 de mono cinomolgo con una K_D de aproximadamente 90 pM medido por unión en solución. En otro aspecto específico, el anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo del clon 2C5 y se une a CD73 de mono cinomolgo con una K_D de aproximadamente 100 pM medido por unión en solución. En un aspecto particular, MEDI9447 se une a CD73 con una K_D de aproximadamente 1×10^{-12} , 5×10^{-12} , 10×10^{-12} , 100×10^{-12} o 150×10^{-12} .

[00376] En algunos aspectos, una molécula de unión a CD73 desvelada en el presente documento, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, MEDI9447, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede acelerar la supresión de la división de células T mediada por AMP. En otros aspectos,

una molécula de unión a CD73 desvelada en el presente documento, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, MEDI9447, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede rescatar la supresión de T_{eff} inducida por ATP mediante T_{reg} .

[00377] En algunos aspectos, una molécula de unión a CD73 desvelada en el presente documento, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) puede inhibir significativamente el crecimiento tumoral singénico. En un aspecto, el tumor es un tumor pulmonar de células no pequeñas, de ovario, de mama, de cabeza y cuello, pancreático, tumor de cáncer colorrectal, melanoma, linfoma. En un aspecto, el tumor es un tumor CRC singénico de ratón CT26, un tumor de melanoma B16F10, un tumor de linfoma EG7-OVA o un tumor LL2 (pulmón de Lewis). En algunos aspectos, una molécula de unión a CD73 por ejemplo un anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo desvelado en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) puede inhibir significativamente el crecimiento tumoral, donde el tumor no responde a la terapia con anticuerpos anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o anti-PD-L2 y/o anti-CTLA-4. En algunos aspectos, una molécula de unión a CD73 desvelada en el presente documento, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) puede inhibir significativamente el crecimiento tumoral cuando se administra a una concentración de aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg,

aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg,
aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg,
aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg o
aproximadamente 10 mg/kg.PD1.

- 5 **[00378]** En algunos aspectos, una molécula de unión a CD73
desvelada en el presente documento, por ejemplo, un
anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del
mismo (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un
anticuerpo del clon 2C5) puede internalizarse después de
10 unirse a las células. En algunos aspectos, la molécula de
unión a CD73 es un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC).

V. Preparación de anticuerpos anti-CD73 y fragmentos de unión a antígeno

- [00379]** Los anticuerpos monoclonales anti-CD73 (por
15 ejemplo, MEDI9447, un anticuerpo del clon 10.3 o un
anticuerpo del clon 2C5) y los fragmentos de unión a antígeno
de los mismos pueden prepararse usando métodos de hibridoma,
tales como los descritos por Kohler and Milstein (1975)
Nature 256:495. Utilizando el método con hibridomas, se
20 inmuniza un ratón, hámster, u otro animal hospedador
apropiado, tal como se describe anteriormente para provocar
la producción por parte de los linfocitos de anticuerpos que
se unirán de manera específica a un antígeno de inmunización.
También pueden inmunizarse linfocitos *in vitro*. Después de
25 la inmunización, se aíslan los linfocitos y se fusionan con
una línea celular de mieloma adecuada utilizando, por
ejemplo, polietilenglicol, para formar células de tipo
hibridoma que se pueden seleccionar a continuación
separándolas de los linfocitos no fusionados y de las células
30 de mieloma. Los hibridomas que producen anticuerpos
monoclonales dirigidos específicamente contra un antígeno

elegido tal como se determina mediante inmunoprecipitación, inmunotransferencia, o mediante un ensayo de unión in vitro (por ejemplo radioinmunoensayo (RIA); ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)) pueden propagarse entonces o bien en cultivo in vitro usando métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986) o *in vivo* como tumores con ascitis en un animal. A continuación, los anticuerpos monoclonales se pueden purificar a partir del medio de cultivo o líquido ascítico tal como se ha descrito anteriormente para los anticuerpos policlonales.

[00380] Como alternativa, los anticuerpos monoclonales anti-CD73 (por ejemplo, MEDI9447, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos también pueden fabricarse usando métodos de ADN recombinante como se describe, por ejemplo en la patente de Estados Unidos n.º 4,816,567. Los polinucleótidos que codifican para un anticuerpo monoclonal se aíslan de linfocitos B maduros o célula de tipo hibridoma, por ejemplo, mediante RT-PCR utilizando cebadores de oligonucleótidos que amplifican de manera específica los genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, y se determina su secuencia utilizando procedimientos habituales. Los polinucleótidos aislados que codifican para las cadenas pesadas y ligeras se clonan entonces en vectores de expresión adecuados, que cuando se transfectan en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen por lo demás proteína inmunoglobulina, se generan anticuerpos monoclonales por las células hospedadoras. Además, los

anticuerpos monoclonales anti-CD73 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de las especies deseadas pueden aislarse de bibliotecas de presentación en fagos que expresan CDR de las especies deseadas como se describe (McCafferty *et al.*, 1990, Nature, 348:552-554; Clarkson *et al.*, 1991, Nature, 352:624-628; and Marks *et al.*, 1991, J. Mol. Biol., 222:581-597).

[00381] El polinucleótido o polinucleótidos que codifican un anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o fragmento de unión a antígeno del mismo pueden modificarse adicionalmente de varias maneras diferentes usando la tecnología de ADN recombinante para generar anticuerpos alternativos. En algunos aspectos, los dominios constantes de las cadenas ligera y pesada de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón puede sustituirse (1) por esas regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un anticuerpo quimérico o (2) por un polipéptido que no es la inmunoglobulina para generar un anticuerpo de fusión. En algunos aspectos, las regiones constantes se truncan o se retiran para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal. Puede usarse mutagénesis dirigida al sitio o de alta densidad de la región variable para optimizar la especificidad, afinidad, etc. de un anticuerpo monoclonal.

[00382] En determinados aspectos, el anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Se pueden preparar directamente anticuerpos humanos utilizando diversas técnicas conocidas en la técnica. Pueden

generarse linfocitos B humanos inmortalizados inmunizados *in vitro* o aislados de un individuo inmunizado que produce un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (véase, por ejemplo, Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boemer *et al.*, 1991, J. Immunol. 147 (1):86-95; y patente estadounidense n.º 5,750,373).

[00383] Además, el anticuerpo humano anti-CD73 (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o fragmento de unión a antígeno del mismo puede seleccionarse de una biblioteca de fagos, donde esa biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos, como se describe, por ejemplo, en Vaughan *et al.*, 1996, Nat. Biotech., 14:309-314, Sheets *et al.*, 1998, Proc. Nat'l. Acad. Sci., 95:6157-6162, Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381, and Marks *et al.*, 1991, J. Mol. Biol., 222:581). También se describen técnicas para la generación y uso de bibliotecas en fagos de anticuerpos en las patentes de Estados Unidos n.º 5,969,108, 6,172,197, 5,885,793, 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915; 6,593,081; 6,300,064; 6,653,068; 6,706,484; y 7,264,963; y Rothe *et al.*, 2007, J. Mol. Bio., doi:10.1016/j.jmb.2007.12.018 (cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad).

[00384] Se conocen en la técnica estrategias de maduración por afinidad y estrategias de intercambio de cadenas (Marks *et al.*, 1992, Bio/Technology 10:779-783, incorporado por referencia en su totalidad) y pueden emplearse para generar anticuerpos humanos de alta afinidad o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

[00385] En algunos aspectos, el anticuerpo monoclonal anti-CD73 (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un

anticuerpo del clon 2C5) puede ser un anticuerpo humanizado. También puede usarse métodos para modificar por ingeniería, humanizar o revestir anticuerpos no humanos o humanos y se conocen bien en la técnica. Un anticuerpo humanizado, con la
5 superficie modificada o manipulado de manera similar puede tener uno o más restos de aminoácido de una fuente que es no humana, por ejemplo, sin carácter limitante, ratón, rata, conejo, primate no humano u otro mamífero. Estos restos de aminoácido no humanos son reemplazados por restos que se
10 denominan a menudo restos "importados", que se toman normalmente de un dominio "importado" variable, constante o diferente de una secuencia humana conocida. Tales secuencias importadas se pueden utilizar para reducir la inmunogenicidad o reducir, potenciar o modificar la unión,
15 afinidad, velocidad de asociación, velocidad de disociación, avidéz, especificidad, semivida, o cualquier otra característica adecuada, tal como se conoce en la técnica. En general, los restos de CDR participan directamente y de la manera más importante influenciando la unión a CD73. Por
20 consiguiente, parte o todas las secuencia de CDR no humanas o humanas se mantienen mientras que las secuencias no humanas de las regiones variable y constante pueden ser reemplazadas por aminoácidos humanos o de otro tipo.

[00386] De manera opcional, los anticuerpos también pueden
25 estar humanizados, modificados en su superficie, manipulados o ser anticuerpos humanos modificados que conservan una afinidad elevada por el antígeno de CD73 y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar este objetivo, se pueden preparar de manera opcional anticuerpos anti-CD73
30 humanizados (o humanos) o manipulados y anticuerpos con la superficie modificada, mediante un proceso de análisis de

las secuencias progenitoras y varios productos manipulados y humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias progenitoras, manipuladas y humanizadas. Los expertos en la técnica pueden consultar los modelos de la inmunoglobulina tridimensionales y están familiarizados con ellos. Se puede disponer de programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de las secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite analizar el papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno, tal como CD73. De esta manera, se pueden seleccionar y combinar restos de la región marco (FW) a partir de las secuencias consenso e importada de modo que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como una mayor afinidad por el antígeno o los antígenos diana.

[00387] La humanización, modificación de la superficie o manipulación de los anticuerpos anti-CD73 (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o los fragmentos de unión a antígeno del mismo se puede llevar a cabo utilizando cualquier método conocido incluidos, sin carácter limitante, los descritos en Jones *et al.*, Nature 321:522 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323 (1988); Verhoeven *et al.*, Science 239:1534 (1988)), Sims *et al.*, J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol. 151:2623 (1993), patentes de Estados Unidos n.º 5,639,641, 5,723,323; 5,976,862; 5,824,514; 5,817,483; 5,814,476; 5,763,192;

5,723,323; 5,766,886; 5,714,352; 5,9,55,358; 6,204,023;
6,180,370; 6,331,431; 5,693,762; 5,530,101; 5,585,089;
5,225,539; 4,816,567; 5,969,108; 7,635,666; 7,723,270;
7,557,189; 7,538,195; y 7,342,110; solicitudes
5 internacionales n.º PCT/US98/16280; PCT/US91/05939;
PCT/US94/01234; PCT/GB92/01755; publicación de solicitud de
patente internacional n.º WO90/14443; WO90/14424;
WO90/14430; y publicación de patente europea n.º EP 229246;
cada una de las cuales se incorpora completamente en el
10 presente documento por referencia, incluyendo las
referencias citadas en las mismas.

[00388] Los anticuerpos humanizados anti-CD73 y fragmentos
de unión a antígeno de los mismos también pueden fabricarse
en ratones transgénicos que contienen loci de
15 inmunoglobulina humana que son capaces, después de la
inmunización, de producir el repertorio completo de
anticuerpos humanos en ausencia de producción de
inmunoglobulina endógena. Esta estrategia se describe en las
patentes de Estados Unidos n.º 5,545,807; 5,545,806;
20 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; y 5,661,016.

[00389] En determinados aspectos se proporciona un
fragmento de anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, un fragmento
de un anticuerpos del clon 10.3 o de un anticuerpo del clon
2C5). Se conocen diversas técnicas para la producción de
25 fragmentos de un anticuerpo. Tradicionalmente, estos
fragmentos se obtienen por digestión proteolítica de
anticuerpos intactos (por ejemplo Morimoto *et al.*, 1993,
Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117;
Brennan *et al.*, 1985, Science, 229:81). En determinados
30 aspectos, se producen fragmentos de anticuerpos anti-CD73 de
forma recombinante. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y

scFv pueden expresarse todos en *E. coli* u otras células hospedadoras y secretarse a partir de estas, lo que evita por tanto la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. También pueden aislarse tales fragmentos de anticuerpo anti-CD73 de las bibliotecas en fago de anticuerpos comentados anteriormente. Los fragmentos de anticuerpo anti-CD73 también pueden ser anticuerpos lineales tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5,641,870. Para el experto en la materia serán evidentes otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, síntesis química.

[00390] De acuerdo con la presente divulgación, pueden adaptarse técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios específicos para CD73 (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4,946,778). Además, pueden adaptarse métodos para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (véase, por ejemplo, Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989)) para permitir la identificación rápida y eficaz de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada por CD73, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos. Pueden producirse fragmentos de anticuerpo mediante técnicas en la técnica incluyendo, sin carácter limitante: (a) un fragmento F(ab')₂ producido mediante digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (b) un fragmento Fab generado reduciendo los puentes disulfuro de un fragmento F(ab')₂, (c) un fragmento Fab generado mediante el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor, y (d) fragmentos Fv.

[00391] Un anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o un fragmento de unión a antígeno del mismo desvelado en el

presente documento puede modificarse para aumentar su semivida en suero. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítipo de unión a receptor de reciclaje en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo mediante
5 mutación de la región apropiada en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo o incorporando el epítipo en una etiqueta peptídica que se fusiona entonces al anticuerpo o fragmento de anticuerpo en cualquier extremo o en la parte central (por ejemplo, mediante síntesis de ADN o péptidos), o
10 mediante mutación YTE. Otros métodos para aumentar la semivida sérica de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, por ejemplo, conjugación con una molécula heteróloga tal como PEG se conocen en la técnica.

[00392] También están dentro del alcance de la presente
15 divulgación anticuerpos anti-CD73 heteroconjugados (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos unidos covalentemente. Se ha propuesto que
20 dichos anticuerpos que dirigen células inmunitarias hacia células indeseadas (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4,676,980). Se contempla que los anticuerpos anti-CD73 heteroconjugados (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) y fragmentos de unión a
25 antígeno de los mismos pueden prepararse *in vitro* usando métodos conocidos en la química sintética de proteínas, incluyendo los que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace
30 tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen el iminotiolato y el metil-4-mercaptobutirimidato.

[00393] En determinados aspectos, las moléculas de unión a CD73 desveladas en el presente documento, por ejemplo, anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden combinarse con otros agentes terapéuticos (por ejemplo, en una terapia de combinación) o pueden fusionarse (por ejemplo fusionarse genéticamente, para formar una proteína de fusión) o conjugarse (por ejemplo, conjugarse de forma química o enzimática) con al menos un resto heterólogo. De esta manera, las moléculas de unión a CD73 desveladas en el presente documento pueden fusionarse o conjugarse con otros agentes terapéuticos o toxinas para formar inmunoconjugados y/o proteínas de fusión. La presente divulgación también proporciona conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) que comprenden al menos una de las moléculas de unión a CD73 desveladas en el presente documento que se han obtenido o unido (por ejemplo, de forma química o recombinante) con otra molécula (por ejemplo, un péptido, un fármaco de molécula pequeña, una molécula detectable, etc.). En general, los anticuerpos anti-CD73 o partes de los mismos se derivatizan de manera que su unión a CD73 no se ve afectada adversamente por la derivatización o el marcaje. Por consiguiente, los anticuerpos anti-CD73 y partes de anticuerpo de la presente divulgación pretenden incluir formas tanto intactas como modificadas de las moléculas de unión anti-CD73 descritas en el presente documento. Por ejemplo, una molécula de unión anti-CD73 dada a conocer en el presente documento o parte de unión a CD73 de la misma puede ligarse funcionalmente (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente, o de otro modo) a una o más de otras entidades moleculares, tales como un

agente citotóxico, un agente farmacéutico, un agente de detección, y/o una proteína o un péptido que puede mediar en la asociación de la molécula de unión anti-CD73 con otra molécula (tal como una región central de estreptavidina o una cola de polihistidina).

[00394] Un tipo de molécula derivatizada puede producirse por reticulación de dos o más entidades moleculares, por ejemplo, una molécula de unión anti-CD73 desvelada en el presente documento y un agente terapéutico (por ejemplo, una citotoxina tal como tubulisina o MEDI 1508). Los agentes de reticulación adecuados incluyen los que son heterobifuncionales, es decir, que tienen dos grupos reactivos de manera distinta separados por un espaciador apropiado (por ejemplo, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida); o homobifuncionales (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo). Tales agentes de reticulación están disponibles, por ejemplo, de Pierce Chemical Company, Rockford, II. Los agentes de acoplamiento adicionales incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-ácido (tal como bis(p-acidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolileno), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno).

[00395] Otro tipo de molécula derivatizada puede producirse incorporando un marcador detectable. Los agentes

de detección útiles incluyen compuestos fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamino-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina, fósforos de lantánidos y similares), enzimas
5 que son útiles para detección (por ejemplo, peroxidasa del rábano, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares), epítomos reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos
10 secundarios, dominios de unión a metal, etiquetas epitópicas, etc.). En algunos aspectos, pueden unirse marcadores detectables mediante al menos un brazo espaciador. Los brazos espaciadores pueden ser de diversas longitudes para reducir un posible impedimento estérico.

15 **[00396]** Las moléculas de unión anti-CD73 desveladas en el presente documento también pueden marcarse con un aminoácido radiomarcado. El radiomarcador puede usarse tanto para fines de diagnóstico como terapéuticos. Por ejemplo, el radiomarcador puede usarse para detectar células que
20 expresan CD73 mediante rayos X u otras técnicas de diagnóstico tales como tomografía de emisión de positrones (PET).

[00397] Además, el radiomarcador puede usarse terapéuticamente como una toxina para células que expresan
25 CD73, tales como las que provocan una respuesta inmunitaria no deseada. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes radioisótopos o radionúclidos: ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I y ^{131}I . En algunos aspectos, la molécula de unión anti-CD73 puede
30 marcarse con un ion paramagnético, radiactivo o fluorogénico que puede detectarse mediante formación de imágenes. En

algunos aspectos, el ion paramagnético es cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III),
5 disprosio (III), holmio (III) o erbio (III). En otros aspectos, el ion radiactivo es yodo-123, tecnecio-99, indio-111, renio-188, renio-186, cobre-67, yodo-131, itrio-90, yodo-125, astato-211 y galio-67. En otros aspectos, la molécula de unión anti-CD73 se marca con un agente de
10 formación de imágenes con rayos X tal como lantano (III), oro (III), plomo (II) y bismuto (III). Una molécula de unión anti-CD73 también puede derivatizarse con un grupo químico, por ejemplo un polímero tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo, un grupo etilo o un grupo de hidrato de
15 carbono. Estos grupos son útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, por ejemplo, para aumentar la semivida sérica o para aumentar la unión tisular.

[00398] El término "agente citotóxico" tal como se usa en el presente documento se define ampliamente y se refiere a
20 un sustancia que inhibe o previene la función de células y/o provoca la destrucción de células (muerte celular), y/o ejerce efectos antineoplásicos/antiproliferativos. Por ejemplo, el agente citotóxico puede prevenir directa o indirectamente el desarrollo, la maduración o diseminación
25 de células tumorales neoplásicas. El término incluye también tales agentes que provocan un efecto citostático sólo y no un mero efecto citotóxico. El término incluye agentes quimioterápicos como los especificados a continuación, así como otros antagonistas de CD73, agentes antiangiogénicos,
30 inhibidores de tirosina quinasas, inhibidores de proteína quinasa A, miembros de la familia de citocinas, isótopos

radiactivos y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal.

[00399] El término "agente quimioterápico" es un subconjunto del término "agente citotóxico" que comprende
5 compuestos químicos naturales o sintéticos. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes, por ejemplo, mostazas de nitrógeno, compuestos de etilenimina, alquilsulfonatos y otros compuestos con una acción alquilante tales como nitrosoureas, cisplatino y dacarbazina;
10 antimetabolitos, por ejemplo, ácido fólico, antagonistas de purina o pirimidina; inhibidores mitóticos, por ejemplo, alcaloides de la Vinca y derivados de podofilotoxina; antibióticos citotóxicos y derivados de camptotecina. Otros agentes quimioterápicos son amifostina (ETHYOL®),
15 cisplatino, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, mecloretamina (mostaza de nitrógeno), estreptoizocina, ciclofosfamida, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), doxorubicina (ADRIAMYCIN®), doxorubicina lipo (DOXIL®), gemcitabina (GEMZAR®), daunorubicina, daunorubicina lipo (DAUNOXOME®),
20 procarbazina, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo (5-FU), vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (TAXOL®), docetaxel (TAXOTERE®), aldesleucina, asparaginasa, busulfano, carboplatino, cladribina, camptotecina, CPT-11, 10-hidroxi-
25 7-etil-camptotecina (SN38), gefitinib (IRESSA®), dacarbazina, floxuridina, fludarabina, hidroxiaurea, ifosfamida, idarubicina, mesna, interferón alfa, interferón beta, irinotecán, mitoxantrona, topotecán, leuprolida, megestrol, melfalán, mercaptopurina, plicamicina, mitotano,
30 pegaspargasa, pentostatina, pipobroman, plicamicina, estreptoizocina, tamoxifeno, tenipósido, testolactona,

tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, inhibidores de clorambucilo aromatasa, y combinaciones de los mismos.

[00400] Para los fines de la presente divulgación, debe apreciarse que los anticuerpos anti-CD73 modificados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden comprender cualquier tipo de región variable que proporciona la disociación del anticuerpo o polipéptido con CD73. En este sentido, la región variable puede comprender o derivarse de cualquier tipo de mamífero en el que se pueda inducir la aparición de una respuesta humoral y la generación de inmunoglobulinas contra el antígeno asociado a tumor deseado. Por lo tanto, la región variable de los anticuerpos anti-CD73 modificados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden ser, por ejemplo, de origen humano, murino, de primate no humano (por ejemplo, monos cinomolgos, macacos, etc.) de origen lupino. En algunos aspectos, tanto la región variable como la región constante de los anticuerpos anti-CD73 modificados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos son humanas. En otros aspectos, las regiones variables de anticuerpos compatibles (normalmente obtenidos a partir de una fuente no humana) se pueden manipular o personalizar de manera específica para mejorar las propiedades de unión o reducir la inmunogenicidad de la molécula. En este sentido, las regiones variables pueden humanizarse o alterarse de otra manera mediante la inclusión de secuencias de aminoácido importadas.

[00401] En determinados aspectos, los dominios variables de las cadenas tanto pesada como ligera de un anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o fragmento de unión a antígeno del

mismo están alterados por al menos el reemplazo parcial de una o más CDR y, si es necesario, mediante el reemplazo parcial de una región marco y cambio de secuencia. Aunque las CDR se pueden obtener a partir de la misma clase o incluso subclase del anticuerpo a partir del cual se obtienen las regiones marco, se contempla que las CDR se obtengan de un anticuerpo de una clase diferente y, en determinados aspectos, de un anticuerpo de una especie diferente. No es necesario reemplazar todas las CDR con las CDR completas de la región variable donante para transferir la capacidad de unión al antígeno de un dominio variable a otro. En su lugar, tan solo es necesario transferir aquellos restos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión al antígeno. Con las explicaciones expuestas en las patentes de Estados Unidos N.º 5,585,089, 5,693,761 y 5,693,762, estará totalmente dentro de las competencias de los expertos en la técnica, ya sea llevando a cabo la experimentación habitual o mediante ensayos de prueba y error, obtener un anticuerpo funcional con una inmunogenicidad reducida.

20 **[00402]** A pesar de las alteraciones en la región variable, los expertos en la materia apreciarán que los anticuerpos anti-CD73 modificados (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 modificado o un anticuerpo del clon 2C5 modificado) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos comprenderán anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa o fragmentos inmunorreactivos de los mismos) en los que al menos una fracción de uno o más de los dominios de región constante se ha delecionado o alterado de otra manera para proporcionar características bioquímicas deseadas tales como una mayor localización del tumor o una semivida en suero reducida en comparación con un anticuerpo de aproximadamente

la misma inmunogenicidad que comprende una región constante nativa o no alterada. En algunos aspectos, la región constante de los anticuerpos modificados comprenderá una región constante humana. Las modificaciones de la región constante compatibles con estas moléculas anti-CD73 desveladas en el presente documento comprenden adiciones, deleciones o sustituciones de uno o más aminoácidos en un o más dominios. Es decir, los anticuerpos modificados desvelados en el presente documento pueden comprender alteraciones o modificaciones en uno o más de los tres dominios constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o el dominio constante de la cadena ligera (CL). En algunos aspectos, se contemplan regiones constantes modificadas donde uno o más dominios se han deleccionado parcial o completamente. En algunos aspectos, los anticuerpos modificados comprenderán variantes o constructos con dominios eliminados donde el dominio CH2 en su totalidad se ha eliminado (constructos Δ CH2). En algunos aspectos, el dominio de la región constante que se ha omitido se reemplazará por un espaciador corto de aminoácidos (por ejemplo, 10 restos) que proporciona parte de la flexibilidad molecular que normalmente confiere la región constante ausente.

[00403] Aparte de su configuración, en la técnica se sabe que la región constante media varias funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 del complemento a los anticuerpos activa el sistema del complemento. La activación del complemento es importante en la opsonización y la lisis de los patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta amoratoria y también puede participar en la hipersensibilidad autoinmunitaria.

Además, los anticuerpos se unen a las células mediante la región Fc, donde un sitio para el receptor de Fc en la región Fc del anticuerpo se une a un receptor de Fc (FcR) en una célula. Existen varios receptores Fc que son específicos para diferentes clases de anticuerpos, incluidas las IgG (receptores gamma), IgE (receptores eta), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores Fc de la superficie celular desencadena varias respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen la absorción y la destrucción de las partículas recubiertas de anticuerpos, la lisis de células diana recubiertas por anticuerpos por parte de los linfocitos citolíticos (que se denomina citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de la producción de inmunoglobulinas.

[00404] En determinados aspectos, el anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o un fragmento de unión a antígeno del mismo proporciona funciones efectoras alteradas que, a su vez, afectan al perfil biológico del anticuerpo administrado o fragmento de unión a antígeno del mismo. Por ejemplo, la eliminación o inactivación (mediante mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de la región constante puede reducir la unión al receptor de Fc del anticuerpo modificado circulante aumentando de este modo la localización tumoral. En otros casos puede ser que las modificaciones a la región constante -----moderar la unión al complemento y, por lo tanto, reducen la semivida sérica y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Sin embargo, se pueden utilizar otras modificaciones de la región constante

para eliminar las uniones de disulfuro o los restos de oligosacáridos que permiten una mejor ubicación debido a una mayor especificidad por antígeno o flexible al anticuerpo. De manera similar, las modificaciones de la región constante de acuerdo con esta divulgación se pueden realizar fácilmente utilizando técnicas bioquímicas o de manipulación molecular bien conocidas, totalmente comprendidas dentro del ámbito del experto.

[00405] En determinados aspectos, una molécula de unión a CD73 desvelada en el presente documento que es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o fragmento de unión a antígeno del mismo no tiene una o más funciones efectoras. Por ejemplo, en algunos aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no presenta actividad por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o no presenta actividad por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En determinados aspectos, el anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo no se une a un receptor de Fc y/o factores del complemento. En determinados aspectos, en anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no tiene función efectora.

[00406] Se observará que en determinados aspectos, los anticuerpos modificados anti-CD73 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden modificarse por ingeniería genética para fusionar el dominio CH3 directamente con la región de bisagra de los anticuerpos modificados respectivos o fragmentos de los mismos. En otras construcciones puede ser deseable proporcionar un espaciador de péptido entre la región de bisagra y los dominios CH2 y/o CH3 modificados. Por ejemplo, pueden expresarse constructos compatibles en

donde el dominio CH2 se ha delecionado y el dominio CH3 restante (modificado o sin modificar) se une a la región bisagra con un espaciador de 5-20 aminoácidos. Puede añadirse un espaciador de este tipo, por ejemplo, para garantizar que los elementos reguladores del dominio constante sigan estando libres y accesibles o que la región bisagra siga siendo flexible. Sin embargo, debe indicarse que los espaciadores de aminoácidos pueden, en algunos casos, demostrar ser inmunogénicos y provocar una respuesta inmunitaria no deseada contra el constructo. Por consiguiente, en determinados aspectos, cualquier espaciador añadido al constructo será relativamente no inmunogénico, o incluso se omitirá totalmente, de modo que se mantengan las cualidades bioquímicas deseadas de los anticuerpos modificados.

[00407] Además de la delección de los dominios de región constante enteros, se apreciará que los anticuerpos anti-CD73 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente divulgación pueden proporcionarse mediante la delección parcial o sustitución de unos pocos o incluso de un solo aminoácido. Por ejemplo, la mutación de un solo aminoácido en zonas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión a Fc y aumentar de ese modo la localización tumoral. De forma similar, puede ser deseable simplemente delecionar la parte de uno o más dominios de región constante que controlan la función efectora (por ejemplo, unión al complemento C1q) a modular. Tales delecciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, la semivida en suero) a la vez que dejan otras

funciones deseables asociadas con el dominio de la región constante correspondiente intactas. Además, tal como se aludió anteriormente, las regiones constantes del anticuerpo anti-CD73 y fragmentos de unión a antígeno del mismo pueden modificarse a través de la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos que potencia el perfil del constructo resultante. A este respecto, es posible perturbar la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (por ejemplo, unión a Fc) mientras que se mantiene sustancialmente la configuración y el perfil inmunogénico del anticuerpo modificado o fragmento de unión a antígeno del mismo. Determinados aspectos pueden comprender la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para potenciar características deseables tales como disminuir o aumentar la función efectora o proporcionar más unión a citotoxinas o hidratos de carbono. En tales aspectos, puede resultar deseable insertar o replicar secuencias específicas obtenidas a partir de dominios de la región constante seleccionados.

20 **[00408]** La presente divulgación también proporciona variantes equivalentes que son sustancialmente homólogos a los anticuerpos anti-CD73 quiméricos, humanizados y humanos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, indicados en el presente documento. Estos pueden contener, por ejemplo, mutaciones de sustitución conservativa, es decir, la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares. Por ejemplo, una sustitución conservadora se refiere a la sustitución de un aminoácido por otro de la misma clase general tal como, por ejemplo, un aminoácido ácido por otro aminoácido ácido, un aminoácido básico por otro aminoácido básico o un aminoácido neutro por otro

aminoácido neutro. En la técnica se sabe lo que se pretende decir con una sustitución de aminoácidos conservadora.

[00409] Un anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo puede modificarse adicionalmente de manera que contenga restos químicos adicionales que normalmente no forman parte de la proteína. Estos restos modificados pueden mejorar la solubilidad, la semivida biológica o la absorción de la proteína. Los restos también pueden reducir o eliminar cualquier efecto secundario deseable de las proteínas y similares. Se puede encontrar una revisión de estos restos en Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000).

VI. Polinucleótidos que codifican moléculas de unión a CD73

[00410] En determinados aspectos, la presente divulgación incluye polinucleótidos que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido que se une específicamente a CD73 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Por ejemplo, la presente divulgación proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o codifica un fragmento de unión a antígeno de dicho anticuerpo. Los polinucleótidos de la presente divulgación pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN. El ADN incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético; y puede ser bicatenario o monocatenario, y si es monocatenario puede ser la hebra codificante o la hebra no codificante (antisentido).

[00411] En determinados aspectos, los polinucleótidos están aislados. En determinados aspectos, los polinucleótidos son sustancialmente puros. En determinados

aspectos, los polinucleótidos comprenden la secuencia codificadora para el polipéptido maduro condensada en el mismo marco de lectura a un polinucleótido que ayuda, por ejemplo, a la expresión y secreción de un polipéptido de una célula hospedadora (p.ej., una secuencia conductora que funciona como una secuencia secretora para controlar el transporte de un polipéptido a partir de la célula). El polipéptido que tiene una secuencia líder es una preproteína y puede tener la secuencia líder escindida por la célula hospedadora para formar la forma madura del polipéptido. Los polinucleótidos también pueden codificar una proproteína de unión a CD73 que es la proteína madura mas restos de aminoácidos 5' adicionales.

[00412] En determinados aspectos los polinucleótidos comprenden la secuencia codificante del polipéptido de unión a CD73 maduro, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o un fragmento de unión a antígeno del mismo fusionado en la misma fase de lectura a una secuencia marcadora que permite, por ejemplo, la purificación del polipéptido codificado. Por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hexahistidina suministrada por un vector pQE-9 para hacer posible la purificación del polipéptido maduro fusionado al marcador en el caso de un hospedador bacteriano o la secuencia marcadora puede ser una etiqueta de hemaglutinina (HA) obtenida a partir de la proteína hemaglutinina gripal cuando se utiliza un hospedador mamífero (por ejemplo, células COS-7).

[00413] La presente divulgación también proporciona variantes de los polinucleótidos descritos que codifican, por ejemplo, fragmentos de unión a CD73. Análogos y derivados

de las moléculas de unión a CD73 desveladas en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5).

- [00414]** Las variantes de polinucleótido pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, regiones no codificantes o ambas cosas. En algunos aspectos, las variantes de polinucleótido contienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o deleciones silenciosas, pero no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. En algunos aspectos, se producen variantes de nucleótidos mediante sustituciones silenciosas debidas a la degeneración del código genético. Pueden producirse variantes de polinucleótido por una variedad de motivos, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones para un hospedador particular (cambiar codones en el ARNm humano a los preferidos por un hospedador bacteriano tal como *E. coli*). También se proporcionan vectores y células que comprenden los polinucleótidos descritos en el presente documento.
- [00415]** En algunos aspectos, puede construirse una secuencia de ADN que codifica una molécula de unión a CD73, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o un fragmento de unión a antígeno del mismo por síntesis química usando un sintetizador de nucleótidos. Tales oligonucleótidos pueden diseñarse basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y seleccionando aquellos codones que están favorecidos en la célula hospedadora en la que se producirá el polipéptido recombinante de interés. Pueden aplicarse métodos convencionales para sintetizar una secuencia de

polinucleótido aislada que codifica para un polipéptido de interés aislado. Por ejemplo, puede usarse una secuencia de aminoácidos completa para construir un gen retrotraducido. Además, puede sintetizarse un oligómero de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido aislado particular. Por ejemplo, pueden sintetizarse varios oligonucleótidos pequeños que codifican para partes del polipéptido deseado y luego ligarse. Los oligonucleótidos individuales contienen normalmente proyecciones en 5' o 3' para un ensamblaje complementario.

[00416] Una vez ensamblado (mediante síntesis, mutagénesis dirigida al sitio u otro método), las secuencias de polinucleótido que codifican para un polipéptido de interés aislado particular se insertará en un vector de expresión y operativamente unido a una secuencia de control de la expresión apropiada para la expresión de la proteína en un hospedador deseado. El ensamblaje apropiado se puede confirmar, mediante secuenciación de nucleótidos, mapeo de restricción y expresión de un polipéptido biológicamente activo en un hospedador adecuado. Tal como se conoce bien en la técnica, con el fin de obtener altos niveles de expresión de un gen transfectado en un hospedador, el gen debe estar operativamente unido a secuencias de control de la transcripción y la traducción que son funcionales en el hospedador de expresión elegido.

[00417] En determinados aspectos, se usan vectores de expresión recombinante para amplificar y expresar ADN que codifica anticuerpos anti-CD73 (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Vectores de expresión recombinantes son construcciones de ADN replicables que

5 tienen fragmentos de ADN sintéticos o derivados de ADNc que codifican una cadena polipeptídica de un anticuerpo anti-CD73 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, operativamente enlazado a cualesquiera elementos reguladores de la transcripción o traducción adecuados, derivados de genes de mamíferos, microbianos, virales o de insectos.

[00418] Una unidad transcripcional comprende por lo general un ensamblaje de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen una función reguladora en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores transcripcionales, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe para obtener ARNm y se traduce para obtener una proteína, y (3) secuencias de iniciación y terminación de la transcripción y la traducción apropiadas, tal como se describe en detalle a continuación. Tales elementos reguladores pueden incluir una secuencia operadora para controlar la transcripción. De manera adicional, se puede incorporar la capacidad de replicarse en un hospedador, que normalmente confiere un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes. Las regiones de ADN están operativamente unidas cuando están relacionadas funcionalmente entre sí. Por ejemplo, el ADN para un péptido señal (secuencia señal secretora) está operativamente unido al ADN para un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor está operativamente unido a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si está situado de modo que se permita la traducción. Los elementos estructurales destinados para su

uso en sistemas de expresión en levaduras incluyen una secuencia líder que permite la secreción extracelular de proteína traducida por una célula hospedadora. Como alternativa, cuando se expresa proteína recombinante sin una
5 secuencia líder o de transporte, puede incluir un resto de metionina N-terminal. Este resto puede opcionalmente escindirse posteriormente de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

[00419] La elección de la secuencia de control de la
10 expresión y el vector de expresión dependerá de la elección de la célula hospedadora. Puede emplearse una amplia variedad de combinaciones de hospedador/vector de expresión. Los vectores de expresión útiles para hospedadores eucariotas, incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de
15 control de la expresión de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Los vectores de expresión útiles para hospedadores bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tales como plásmidos de *E. coli*, incluyendo PCR 1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos de
20 gama de hospedadores más amplia, tales como M13 y fagos filamentosos de ADN monocatenario.

[00420] Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de una molécula de unión a CD73, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, un anticuerpo del clon
25 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o fragmento de unión a antígeno del mismo incluyen procariotas, levaduras, células de insecto o eucariotas superiores bajo el control de promotores apropiados. Las procariotas incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo *E. coli* o
30 bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen líneas celulares establecidas de origen mamífero tal como se

describe a continuación. También podrían emplearse sistemas de traducción sin células. Se describen vectores de clonación y expresión apropiados para uso con hospedadores celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y de mamífero por Pouwels *et al.* (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985), cuya divulgación relevante se incorpora en el presente documento por referencia. Puede encontrarse información adicional en relación con los métodos de producción de proteínas, incluyendo la producción de anticuerpos, por ejemplo, en la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2008/0187954, patentes de Estados Unidos 6,413,746, 6,660,501 y 7,932,087, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

[00421] También pueden emplearse ventajosamente diversos sistemas de cultivo de células de mamífero o insecto para expresar moléculas de unión a CD73 recombinantes, por ejemplo, anticuerpos anti-CD73 (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Puede realizarse la expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero porque tales proteínas se pliegan generalmente de manera correcta, se modifican apropiadamente y son completamente funcionales.

[00422] Los ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamíferos adecuadas incluyen HEK-293 y HEK-293T, las líneas COS-7 de células de riñón de mono, descritas por Gluzman (Cell 23:175, 1981), y otras líneas celulares que incluyen, por ejemplo, células L, C127, 3T3, de ovario de hámster chino (CHO), HeLa y líneas celulares BHK. Los vectores de expresión de mamífero pueden comprender elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuados ligados al gen que va a expresarse, y otras

secuencias no transcritas flanqueantes en 5' o 3', y secuencias no traducidas en 5' o 3', tales como sitios de unión al ribosoma necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios de corte y empalme donadores y aceptores, y secuencias de terminación de la transcripción. Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insecto se revisan por Luckow & Summers, BioTechnology 6:47 (1988).

[00423] Las moléculas de unión a CD73, por ejemplo, anticuerpos anti-CD73 (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos producidos por un hospedador transformado pueden purificarse de acuerdo con cualquier método adecuado. Tales métodos estándar incluyen la cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y cromatografía en columna por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Pueden unirse etiquetas de afinidad tales como hexahistidina, dominio de unión a maltosa, secuencia de revestimiento gripal y glutatión-S-transferasa, a la proteína para permitir una fácil purificación mediante el paso por una columna de afinidad adecuada. También pueden caracterizarse físicamente proteínas aisladas usando tales técnicas como proteólisis, resonancia magnética nuclear o cristalografía de rayos X.

[00424] Por ejemplo, pueden concentrarse en primer lugar sobrenadantes de sistemas que secretan proteína recombinante en medios de cultivo usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon® o Millipore Pellicon®. Tras la

etapa de concentración, se puede aplicar el concentrado a una matriz de purificación adecuada. Como alternativa, se puede emplear también una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o un sustrato que tiene grupos dietilaminoetilo (DEAE) laterales. Las matrices pueden ser de acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos empleados comúnmente en la purificación de proteínas. Como alternativa, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Finalmente, pueden emplearse una o más etapas de cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) empleando medios de RP-HPLC hidrófobos, por ejemplo, gel de sílice que tiene grupos metilo u otros grupos alifáticos colgantes, para purificar adicionalmente una molécula de unión a CD73 (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5). También pueden emplearse algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

[00425] Una proteína de unión a CD73, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o fragmento de unión a antígeno del mismo producido en cultivo bacteriano puede aislarse, por ejemplo, mediante la extracción inicial de sedimentos celulares, seguido de una o más etapas de concentración, precipitación con sales, cromatografía de intercambio iónico acuoso o cromatografía de exclusión por tamaño. Puede emplearse cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para las etapas de purificación finales. Se puede alterar la integridad física de las células

microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante mediante cualquier método conveniente, incluidos ciclos de congelación-descongelación, sonicación, alteración mecánica de la integridad física o el uso de
5 agentes de lisado celular.

[00426] Métodos conocidos en la técnica para purificar anticuerpos y otras proteínas también incluyen, por ejemplo, los descritos en las publicaciones de patente de Estados Unidos n.º 2008/0312425, 2008/0177048 y 2009/0187005, cada
10 una de las cuales se incorpora con ello como referencia en su totalidad en esta memoria.

[00427] En determinados aspectos, la molécula de unión a CD73 es un polipéptido que no es un anticuerpo. En la técnica se conocen varios métodos para identificar y producir
15 polipéptidos que no son anticuerpos que se unen con una afinidad elevada a una proteína diana. Véase, por ejemplo, Skerra, Curr. Opin. Biotechnol., 18:295-304 (2007), Hosse *et al.*, Protein Science, 15:14-27 (2006), Gill et al., Curr. Opin. Biotechnol., 17:653-658 (2006), Nygren, FEBS J.,
20 275:2668-76 (2008), y Skerra, FEBS J., 275:2677-83 (2008), cada uno de los cuales se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad. En determinados aspectos, puede usarse la tecnología de presentación en fagos para identificar/producir un polipéptido de unión a CD73. En
25 determinados aspectos, el polipéptido comprende un esqueleto proteico de un tipo seleccionado del grupo que consiste en proteína A, una lipocalina, un dominio de fibronectina (por ejemplo, un dominio de fibronectina tal como un dominio de Tenascin-3 Fn III), un dominio de repetición consenso de
30 anquirina y tiorredoxina.

VI. Métodos de tratamiento usando anticuerpos anti-CD73 terapéuticos

[00428] La presente divulgación proporciona métodos dirigidos al uso de moléculas de anticuerpo anti-CD73, por ejemplo, anticuerpos, incluyendo fragmentos de unión a antígeno, variantes y derivados de los mismos (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5), para tratar a pacientes que tienen una enfermedad asociada con la expresión de CD73 o células que expresan CD73, por ejemplo cáncer. En algunos aspectos específicos, dicho cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer renal, cáncer de estómago, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de colon y linfoma.

[00429] Por "célula que expresa CD73" se entiende una célula que expresa CD73. CD73 puede estar unido a la membrana a través de un anclaje de glicosil fosfatidilinositol y también puede estar presente como una proteína soluble. Los métodos para detectar la expresión de CD73 en las células y en otras muestras adecuadas son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, inmunohistoquímica, citometría de flujo, transferencia de Western, ELISA y similares.

[00430] Aunque el siguiente análisis se refiere a métodos de diagnóstico y tratamiento de diversas enfermedades y trastornos con una molécula de unión a CD73 de la presente divulgación(por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5), los métodos descritos en el presente documento también son aplicables a cualquier otro anticuerpo anti-CD73, y los fragmentos de unión a antígeno, variantes y derivados (por ejemplo, proteínas de fusión o

conjugados) de estos anticuerpos anti-CD73 que conservan las propiedades deseadas de los anticuerpos anti-CD73 desvelados en el presente documento, por ejemplo, al ser capaces de unirse específicamente a CD73 y neutralizar su actividad 5'-nucleotidasa. En algunos aspectos, las moléculas de unión a CD73 son anticuerpos humanos o humanizados que no median la ADCC humana, o son anticuerpos anti-CD73 que se han modificado por ingeniería genética de tal forma que no median la ADCC.

- 10 **[00431]** En algunos aspectos, la molécula de unión a CD73 es *un* anticuerpo CD730010 o fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo del clon 10.3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo CD730002 o fragmento de unión a antígeno del mismo, un anticuerpo del clon 2C5 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo CD73004 o fragmento de unión a antígeno del mismo. En otros aspectos, la molécula de unión a CD73 es un anticuerpo mutante del clon 10.3. En algunos aspectos, la molécula de unión a CD73 es un anticuerpo monoclonal del clon 10.3. En algunos aspectos, la molécula de unión a CD73 es un anticuerpo monoclonal del clon 10.3 modificado por ingeniería genética para prolongar su semivida en suero. En otros aspectos, la molécula de unión a CD73 es un anticuerpo mutante YTE del clon 10.3. En otros aspectos, la molécula de unión a CD73 es un anticuerpo mutante del clon 2C5. En algunos aspectos, la molécula de unión a CD73 es un anticuerpo monoclonal del clon 2C5. En algunos aspectos, la molécula de unión a CD73 es un anticuerpo monoclonal del clon 2C5 modificado por ingeniería genética para prolongar su semivida en suero. En otros aspectos, la molécula de unión a CD73 es un anticuerpo mutante YTE del clon 2C5.

[00432] En un aspecto, el tratamiento incluye la aplicación o administración de una molécula de unión anti-CD73, por ejemplo, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la presente divulgación a un sujeto o paciente, o la aplicación o administración de la molécula de unión anti-CD73 a un tejido o línea celular aislada de un sujeto o paciente, donde el sujeto o paciente tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad o una predisposición a una enfermedad. En otro aspecto, tratamiento también pretende incluir la aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión anti-CD73, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo de la presente divulgación a un sujeto o paciente, o la aplicación o administración de una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión anti-CD73 a una línea celular o un tejido aislado de un sujeto o paciente, que tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad o una predisposición a una enfermedad.

[00433] Las moléculas de unión anti-CD73, por ejemplo, anticuerpos (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de las mismas de la presente divulgación son útiles para el tratamiento de diversos cánceres. En un aspecto, la presente divulgación proporciona moléculas de unión anti-CD73, por ejemplo, anticuerpos (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de las mismas para uso como un medicamento, en particular para uso en el tratamiento o profilaxis de cáncer

(por ejemplo, cáncer de colon, melanoma, cáncer de mama, linfoma o carcinoma de pulmón de células no pequeñas, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin y linfoma de Burkitt, cáncer de ovario, cáncer de mama, cánceres de cabeza y cuello y

5 cáncer pancreático. . En algún aspecto, el cáncer presenta un fenotipo prometastásico. En algunos aspectos, el cáncer que presenta un fenotipo prometastásico es melanoma o cáncer de mama. En algunos aspectos, el cáncer es un cáncer metastásico. En algunos aspectos, las moléculas de unión

10 anti-CD73 desveladas en el presente documento pueden desencadenar una actividad antitumoral adaptativa y/o inhibir la metástasis. En algunos aspectos particulares, las moléculas de unión anti-CD73 desveladas en el presente documento pueden inhibir la metástasis en el cáncer de mama.

15 **[00434]** De acuerdo con los métodos de la presente divulgación, se usa al menos una molécula de unión anti-CD73, por ejemplo, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo como se

20 define en otras partes del presente documento para promover una respuesta terapéutica positiva con respecto al cáncer. El término "respuesta terapéutica positiva" con respecto al tratamiento del cáncer se refiere a una mejora en la enfermedad en asociación con la actividad de estas moléculas

25 de unión anti-CD73, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos, y/o una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad. De esta manera, por ejemplo, una mejora en la enfermedad puede caracterizarse como una respuesta completa. Por "respuesta

30 completa" se entiende una ausencia de enfermedad clínicamente detectable con normalización de cualquier

resultado de prueba previamente. Como alternativa, una mejora en la enfermedad puede clasificarse como que es una respuesta parcial. Una "respuesta terapéutica positiva" engloba una reducción o inhibición de la progresión y/o duración del cáncer, la reducción o mejora de la severidad de cáncer, y/o la mejora de uno o más síntomas del mismo que resultan de la administración de una molécula de unión anti-CD73 desvelada en el presente documento.

[00435] En aspectos específicos, tales términos se refieren a uno, dos o tres o más resultados tras la administración de moléculas de unión anti-CD73 desveladas en el presente documento: (1) una estabilización, reducción o eliminación de la población de células cancerosas; (2) una estabilización o reducción del crecimiento del cáncer; (3) un deterioro en la formación de cáncer; (4) la erradicación, eliminación o control de cáncer primario, regional y/o metastásico; (5) una reducción de la mortalidad; (6) un aumento de la supervivencia, duración o tasa sin enfermedad, sin recaídas, sin progresión y/o global; (7) un aumento en la tasa de respuesta, la duración de la respuesta o el número de pacientes que responden o están en remisión; (8) una reducción en la tasa de hospitalización, (9) una reducción en la duración de la hospitalización, (10) el tamaño del cáncer se mantiene y no aumenta o aumenta menos de un 10 %, preferentemente menos de un 5 %, preferentemente menos de un 4 %, preferentemente menos de un 2 %, y (12) un aumento en el número de pacientes en remisión.

[00436] Puede evaluarse la respuesta clínica usando técnicas de examen tales como exploración de obtención de imágenes de resonancia magnética (IRM), obtención de imágenes radiográficos con rayos X, exploración tomográfica

computarizada (TC), citometría de flujo o análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), histología, patología macroscópica y bioquímica sanguínea, incluyendo sin carácter limitante cambios detectables mediante ELISA, RIA, cromatografía, y similares. Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto que se somete a terapia con la molécula de unión anti-CD73, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, puede experimentar el efecto beneficioso de una mejora en los síntomas asociados con la enfermedad.

[00437] Las moléculas de unión anti-CD73, por ejemplo, anticuerpos (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, variantes, o derivados de los mismos desvelados en el presente documento pueden usarse en combinación con cualquier terapia conocida para cáncer, incluyendo cualquier agente o combinación de agentes que se sabe que son útiles, o que se han usado o están en uso actualmente, para el tratamiento de cánceres, por ejemplo, cáncer de colon, melanoma, cáncer de mama, linfoma, carcinoma de pulmón no microcítico, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin y linfoma de Burkitt, cáncer de ovario, cáncer de mama, cánceres de cabeza y cuello y cáncer pancreático). El segundo agente o combinación de agentes de la formulación de combinación farmacéutica o régimen de dosificación tiene preferiblemente actividades complementarias a las del anticuerpo o polipéptido de la presente divulgación de manera que no se afecten de manera adversa entre sí.

[00438] Los agentes anticancerosos incluyen fármacos usados para tratar tumores malignos, tales como crecimientos

cancerosos. La terapia farmacológica puede usarse sola, o en combinación con otros tratamientos tales como cirugía o radioterapia. Pueden usarse varias clases de fármacos en el tratamiento del cáncer, dependiendo de la naturaleza del órgano implicado. Por ejemplo, los cánceres de mama se estimulan comúnmente mediante estrógenos, y pueden tratarse con fármacos que inactivan las hormonas sexuales. De manera similar, el cáncer de próstata puede tratarse con fármacos que inactivan los andrógenos, las hormonas sexuales masculinas. Los agentes anticancerosos para su uso en determinados métodos de la presente divulgación incluyen, entre otros, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos que se unen a IGF-1R, anticuerpos que se unen a EGFR, anticuerpos que se unen a Her2 o anticuerpos que se unen a cMET), moléculas pequeñas que se dirigen hacia IGF1R, moléculas pequeñas que se dirigen hacia EGFR, moléculas pequeñas que se dirigen hacia Her2, antimetabolitos, agentes alquilantes, inhibidores de topoisomerasa, agentes que se dirigen hacia microtúbulos, inhibidores de quinasas, inhibidores de la síntesis de proteínas, agentes inmunoterápicos, terapias hormonales, glucocorticoides, inhibidores de aromatasa, inhibidores de mTOR, agentes quimioterápicos, inhibidores de proteína quinasa B, inhibidores de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), inhibidores de quinasa dependientes de ciclina (CDK), RLR9, CD289, inhibidores enzimáticos, anti-TRAIL, inhibidores de MEK, etc.

[00439] En aspectos específicos, las moléculas de unión a CD73 desveladas en el presente documento, por ejemplo, anticuerpos (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden administrarse en combinación con

anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se dirigen, por ejemplo, a PD-1 (proteína 1 de muerte programada), sus dos ligandos PD-L1 (ligando 1 de muerte programada) y/o PD-L2, o CTLA-4 (proteína de antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos). Véase, por ejemplo, Stagg et al. PNAS 107:1547-1552 (2010); Jin et al. Cancer Res. 70(6): (2010); Allard et al. Clin. Cancer Res. 19:5626 (2013) que se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CTLA-4 es ipilimumab o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En otros aspectos, en anticuerpo anti-CTLA-4 es tremelimumab (ticilimumab, CP-675,206) o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-PD-1 es pembrolizumab (KEYTRUDA®, anteriormente lambrolizumab, también conocido como MK-3475) o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-PD-1 es nivolumab (BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538, OPDIVA®) o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-PD-L1 es BMS-936559 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En otros aspectos, el anticuerpo anti-PD-L1 es MPDL3280A. En otros aspectos, el anticuerpo anti-PD-1 es AMP-224 (proteína de fusión Fc anti-PD-1) o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En diversos aspectos, el anticuerpo anti-PD-L1 es MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

[00440] En algunos aspectos, las moléculas de unión a CD73 desveladas en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) pueden administrarse en combinación con un anti-PD-1 o anticuerpo anti-PD-1. En diversas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 se administra a una concentración de aproximadamente 1

mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg, 5 aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 11 mg/kg, aproximadamente 12 mg/kg, aproximadamente 13 mg/kg, aproximadamente 14 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 16 mg/kg, aproximadamente 17 mg/kg, aproximadamente 18 mg/kg, aproximadamente 19 mg/kg o 10 aproximadamente 20 mg/kg. En algunos aspectos, las moléculas de unión a CD73 desveladas en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) pueden administrarse en combinación con un anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4, donde el 15 anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4 se administra a una concentración de aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, 20 aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 11 mg/kg, aproximadamente 12 mg/kg, aproximadamente 13 mg/kg, aproximadamente 14 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 16 mg/kg, aproximadamente 17 mg/kg, 25 aproximadamente 18 mg/kg, aproximadamente 19 mg/kg o aproximadamente 20 mg/kg. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 y el anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4 se administran a una relación de aproximadamente 1:1, 1:2, 1:3 o 1:4. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 y el 30 anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4 se administran a una relación de aproximadamente 1:2. En un aspecto

específico, la concentración de anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) es de aproximadamente 10 mg/kg, y la concentración del anticuerpo anti-PD-1 es de aproximadamente 20 mg/kg. En algunos aspectos, las moléculas de unión a CD73 desveladas en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) pueden administrarse en combinación con un anticuerpo anti-PD-1. En algunos aspectos, la administración de un tratamiento de combinación que comprende una molécula de unión a CD73 desvelada en el presente documento (por ejemplo, MEDI9447, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) en combinación con un anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4, puede aumentar la supervivencia en aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 90 % o aproximadamente un 100 % en comparación con sujetos no tratados o sujetos tratados con una monoterapia (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4 sin un anticuerpo anti-CD73). En algunos aspectos, la administración de un tratamiento de combinación que comprende una molécula de unión a CD73 desvelada en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) en combinación con un anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4, puede aumentar la supervivencia aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 6 veces, aproximadamente 7 veces, aproximadamente 8 veces,

aproximadamente 9 veces o aproximadamente 10 veces en comparación con sujetos no tratados o sujetos tratados con una monoterapia (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4 sin un anticuerpo anti-CD73).

5 **[00441]** Cuando las terapias combinadas comprenden la administración de una molécula de unión anti-CD73 en combinación con la administración de otro agente terapéutico (por ejemplo, un anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4), los métodos desvelados en el presente documento
10 incluyen la coadministración, usando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden. En algunos aspectos, los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo
15 del clon 2C5) se administran en combinación con otros fármacos, donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo y el agente o agentes terapéuticos pueden administrarse secuencialmente, en cualquier orden, o simultáneamente (es decir, de forma
20 concurrente o dentro del mismo marco de tiempo).

[00442] La terapia de combinación puede proporcionar "sinergia" y resultar "sinérgica", es decir, el efecto logrado cuando se usan juntos los principios activos es mayor que la suma de los efectos que resultan del uso de los
25 compuestos por separado. Puede lograrse un efecto sinérgico cuando los principios activos: (1) se coformulan y se administran o suministran simultáneamente en una formulación de dosificación unitaria combinada; (2) se suministran mediante alternación o en paralelo como formulaciones
30 independientes; o (3) mediante algún otro régimen. Cuando se administran en terapia de alternancia, puede lograrse un

efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o suministran secuencialmente, por ejemplo, mediante diferentes inyecciones en jeringas independientes. En general, durante la terapia de alternancia, una dosificación eficaz de cada principio activo se administra secuencialmente, es decir, en serie, mientras que en terapia de combinación, se administran dosificaciones eficaces de dos o más principios activos juntos.

[00443] En otros aspectos, las moléculas de unión a CD73 desveladas en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) pueden administrarse en combinación con inhibidores de la tirosina quinasa. En algunos otros aspectos específicos, las moléculas de unión a CD73 desveladas en el presente documento pueden administrarse en combinación con inhibidores de la actividad tirosina quinasa asociada con EGFR y/o HER2/neu, por ejemplo, lapatinib. En algunos aspectos, las moléculas de unión a CD73 desveladas en el presente documento pueden administrarse en combinación con agentes antimitóticos. En algunos aspectos específicos, las moléculas de unión a CD73 desveladas en el presente documento pueden administrarse en combinación con agentes que estabilizan el ensamblaje de microtúbulos del haz mitótico, por ejemplo, paclitaxel o docetaxel. Un aspecto adicional es el uso de moléculas de unión anti-CD73 por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de las mismas (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5), para la supervisión de diagnóstico de los niveles de proteínas en el tejido como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. Por ejemplo, puede

facilitarse la detección mediante el acoplamiento del anticuerpo a una sustancia detectable.

[00444] Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa del rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina-fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los ejemplos de material radiactivo adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , o ^3H .

VIII. Combinaciones terapéuticas de anticuerpo anti-CD73 y coterapia

[00445] La presente divulgación proporciona métodos dirigidos al uso de combinaciones terapéuticas que comprenden moléculas de unión anti-CD73, por ejemplo, anticuerpos, incluyendo fragmentos de unión a antígeno, variantes y derivados de los mismos (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5), para tratar a pacientes que tienen cáncer (incluyendo cáncer de colon, melanoma, cáncer de mama, linfoma, cáncer de pulmón no microcítico, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de Burkitt, cáncer de ovarios, cáncer de mama, cánceres de cabeza y cuello y cáncer pancreático).

[00446] Aunque el siguiente análisis se refiere a combinaciones terapéuticas que se caracterizan por una molécula de unión a CD73 de la presente divulgación (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5), los métodos descritos en el presente documento también son aplicables a cualquier otro anticuerpo anti-CD73, y los fragmentos de unión a antígeno, variantes y derivados (por ejemplo, proteínas de fusión o conjugados) de estos anticuerpos anti-CD73 que conservan las propiedades deseadas de los anticuerpos anti-CD73 desvelados en el presente documento, por ejemplo, que son capaces de unirse específicamente a CD73 y neutralizar su actividad 5' nucleotidasa. En algunos aspectos, las moléculas de unión a CD73 son anticuerpos humanos o humanizados que no median la ADCC humana, o son anticuerpos anti-CD73 que se han modificado por ingeniería genética de tal forma que no median la ADCC.

[00447] El tratamiento de un paciente con un tumor sólido usando una combinación de la invención, tal como un anticuerpo anti-CD73, o fragmento de unión a antígeno del mismo, en combinación con un anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4, o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede dar como resultado un efecto aditivo o sinérgico. Como se usa en el presente documento, el término "sinérgico" se refiere a una combinación de terapias (por ejemplo una combinación de un anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo MEDI9447) y un anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4, que es más eficaz que los efectos aditivos de las terapias individuales.

[00448] Un efecto sinérgico de una combinación de terapias (por ejemplo, una combinación de un anticuerpo anti-

CD73 (por ejemplo, MEDI9447) y un anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4 permite el uso de menores dosificaciones de uno o más de los agentes terapéuticos y/o la administración menos frecuente de dichos agentes terapéuticos a un paciente con un tumor sólido. La capacidad para utilizar dosificaciones menores de agentes terapéuticos y/o para administrar dichas terapias con menor frecuencia reduce la toxicidad asociada con la administración de dichas terapias a un sujeto sin reducir la eficacia de dichas terapias en el tratamiento de un tumor sólido. Además, un efecto sinérgico puede dar como resultado una eficacia mejorada de los agentes terapéuticos en el manejo, tratamiento o mejora de un tumor sólido. El efecto sinérgico de una combinación de agentes terapéuticos puede evitar o reducir los efectos secundarios adversos o no deseados asociados con el uso de cualquiera de las dos terapias individuales.

[00449] En la coterapia, una combinación de un anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, MEDI9447) o fragmento de unión a antígeno del mismo y anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden incluirse opcionalmente en la misma composición farmacéutica o pueden incluirse en una composición farmacéutica separada. En este último caso, la composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, MEDI9447) o fragmento de unión a antígeno del mismo es adecuada para la administración, antes, simultáneamente o después de la administración de la composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4, o fragmento de unión a antígeno del mismo. En ciertos casos, el anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, MEDI9447) o fragmento

de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4 se administra en tiempos coincidentes en una composición separada.

[00450] Un anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, MEDI9447) o
5 fragmento de unión a antígeno del mismo y un anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 o anti-CTLA4, o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede administrarse únicamente una vez o pocas veces mientras siga proporcionando efectos
beneficiosos al paciente. En aspectos adicionales, se
10 administran al paciente dosis de seguimiento adicionales. Las dosis de seguimiento pueden administrarse a varios intervalos de tiempo, dependiendo de la edad, peso, evaluación clínica, carga tumoral y/u otros factores del paciente, incluyendo el criterio del médico tratante.

[00451] Los métodos proporcionados en el presente
15 documento pueden reducir o retrasar el crecimiento tumoral. En algunos aspectos, la reducción o el retraso pueden ser estadísticamente significativos. Puede medirse una reducción en el crecimiento tumoral mediante comparación con el
20 crecimiento inicial del tumor del paciente, frente a un crecimiento tumoral esperado, contra un crecimiento tumoral esperado basándose en una gran población de pacientes o frente al crecimiento tumoral de una población de control. En otras realizaciones, los métodos de la invención aumentan
25 la supervivencia.

IX. Anticuerpos anti-PD-L1

[00452] Los anticuerpos que se unen específicamente e
inhiben la actividad PD-L1 (por ejemplo, la unión a PD-1 y/o
CD80) son útiles para el tratamiento de tumores. B7-H1,
30 también conocido como PD-L1, es una proteína transmembrana de tipo I de aproximadamente 53 kDa de tamaño. En los seres

humanos, B7-H1 se expresa en varios tipos de células inmunitarias incluyendo células T activadas y anérgicas/sometidas a delección clonal, en células B vírgenes y activadas, así como en células dendríticas mieloides (DC),
5 monocitos y mastocitos. También se expresa en células no inmunitarias incluyendo islotes del páncreas, células de Kupffer del hígado, endotelio vascular y epitelio seleccionado, por ejemplo, epitelio de las vías respiratorias y epitelio de los túbulos renales, donde su
10 expresión se potencia durante los episodios inflamatorios. También se encuentra expresión de B7-H1 a mayores niveles en varios tumores que incluyen, pero sin limitación, cáncer de mama, colon, colorrectal, de pulmón, renal, incluyendo carcinoma de células renales, gástrico, de vejiga, cáncer de
15 pulmón no microcítico (NSCLC), cáncer hepatocelular (HCC) y cáncer pancreático, así como melanoma.

[00453] Se sabe que B7-H1 se une a dos ligandos alternativos, el primero de estos, PD-1, es un receptor transmembrana de tipo I de 50-55 kDa que se identificó
20 originalmente en una línea de células T que experimentaba apoptosis inducida por activación. PD-1 se expresa en células T activadas, células B y monocitos, así como en otras células del sistema inmunitario y se une tanto a B7-H1 (PD-L1) como a la B7-DC relacionada (PD-L2). El segundo es el miembro B7-
25 1 de la familia B7, que se expresa en células T activadas, células B, monocitos y células presentadoras de antígeno.

[00454] La señalización a través del eje PD-1/B7-H1 se cree que tiene funciones no redundantes importantes dentro del sistema inmunitario, al regular negativamente las
30 respuestas de la células T. La expresión de B7-H1 en células tumorales se cree que ayuda a los tumores a evadir la

detección y eliminación por el sistema inmunitario. B7-H1 funciona a este respecto a través de varios mecanismos alternativos que incluyen impulsar la delección clonal y la anergia de linfocitos T infiltrantes en tumores, estimular la secreción de citocinas represoras del sistema inmunitario en el microentorno del tumor, estimular la función de las células T reguladoras represivas y protegen a las células tumorales que expresan B7-H1 de la lisis por células T citotóxicas específicas de células tumorales.

10 **[00455]** MEDI4736 es un anticuerpo anti-PD-L1 ejemplar que es selectivo para B7-H1 y bloquea la unión de B7-H1 a PD-1 y a los receptores de CD80. MEDI4736 puede aliviar la supresión mediada por B7-H1 de la activación de células T humanas in vitro e inhibe el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto mediante un mecanismo dependiente de las células T. Otros agentes que podrían usarse incluyen agentes que inhiben PD-L1 y/o PD-1 (AB u otros).

15 **[00456]** La información referente a MEDI4736 (o fragmentos del mismo) para uso de los métodos proporcionados en el presente documento puede encontrarse en los documentos US20130034559 / US 8779108 y US20140356353, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. El dominio de fragmento cristalizante (Fc) de MEDI4736 contiene una triple mutación en el dominio constante de la cadena pesada de IgG1 que reduce la unión al componente de complemento C1q y a los receptores de Fcγ responsables de mediar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC).

25 **[00457]** MEDI4736 y los fragmentos de unión a antígeno del mismo para su uso en los métodos proporcionados en el presente documento comprende una cadena pesada y una cadena

ligera o una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera. En un aspecto específico, MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en los métodos proporcionados en el presente documento

5 comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 130 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 131. En un aspecto específico, MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo para

10 su uso en los métodos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde la región variable de cadena ligera comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 definidas por Kabat de las SEQ ID NO: 132-134, y en donde la

15 región variable de cadena ligera comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 definidas por Kabat de las SEQ ID NO: 135-137. Los expertos habituales en la materia serán capaces de identificar fácilmente las CDR definidas por Chothia, definidas por Abm u otras conocidas para los expertos

20 habituales en la materia. En un aspecto específico, MEDI4736 o un fragmento de unión a antígeno del mismo para uso en los métodos proporcionados en el presente documento comprende las secuencias de CDR de cadena pesada variable y cadena ligera variable del anticuerpo 2.14H9OPT como se desvela en

25 los documentos US20130034559 / US 8779108 y US20140356353, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

X. Anticuerpo anti-CTLA4

[00458] Por consiguiente, en una realización las

30 combinaciones terapéuticas de la invención comprenden un anticuerpo bloqueante de CTLA4 (por ejemplo, tremelimumab)

y/o anticuerpos que reducen las interacciones PD1/PD-L1. Dos vías moduladoras de células T que están recibiendo una atención significativa hasta ahora señalizan a través del antígeno 4 de linfocito T citotóxico (CTLA4, CD152) y del
5 ligando 1 de muerte programada (PD-L1, también conocido como B7H-1 o CD274).

[00459] CTLA4 se expresa en células T activadas y sirve como co-inhibidor para mantener controlada las respuestas de células T después de la activación de células T mediada por
10 CD28. Se cree que CTLA4 regula la amplitud de la activación temprana de las células T no expuestas previamente y de memoria después del acoplamiento del TCR y que forma parte de una vía inhibitoria central que afecta tanto a la inmunidad como a la autoinmunidad antitumoral. CTLA4 se
15 expresa principalmente en células T y la expresión de sus ligandos, CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2), está en gran medida restringida a células presentadoras de antígenos, células T y otras células mediadoras inmunitarias. Se ha comunicado que los anticuerpos antagonistas anti-CTLA4 que bloquean la
20 vía de señalización de CTLA4 potencian la activación de células T. Uno de dichos anticuerpos, ipilimumab, fue aprobado por la FDA en 2011 para el tratamiento del melanoma metastásico. Otro anticuerpo anti-CTLA4, tremelimumab, se probó en ensayos de fase III para el tratamiento del melanoma
25 avanzado, pero no aumentó significativamente la supervivencia general de los pacientes en comparación con el tratamiento de referencia (temozolimida o dacarbazina) en ese momento.

[00460] La información referente a tremelimumab (o
30 fragmentos de unión a antígeno del mismo) para su uso en los métodos proporcionados en el presente documento puede

encontrarse en el documento US 6,682,736 (donde se cita como 11.2.1), cuya divulgación se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad). Tremelimumab (también conocido como CP-675,206, CP-675, CP-675206 y ticilimumab) es un anticuerpo monoclonal IgG2 humano que es altamente selectivo para CTLA4 y bloquea la unión de CTLA4 a CD80 (B7.1) y a CD86 (B7.2). Se ha demostrado que da como resultado una activación inmunitaria in vitro y algunos pacientes tratados con tremelimumab han mostrado regresión tumoral.

[00461] El Tremelimumab para su uso en los métodos proporcionados en el presente documento comprende una cadena pesada y una cadena ligera o una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera. En un aspecto específico, tremelimumab o un fragmento de unión a antígeno del mismo para uso en los métodos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada. En un aspecto específico, tremelimumab o un fragmento de unión a antígeno del mismo para uso en los métodos proporcionados en el presente documento comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera identificadas en el presente documento. Los expertos habituales en la materia serán capaces de identificar fácilmente las CDR definidas por Chothia, definidas por Abm u otras conocidas para los expertos habituales en la materia. En un aspecto específico, tremelimumab o un fragmento de unión a antígeno del mismo para su uso en los métodos proporcionados en el presente documento comprende las secuencias de CDR de cadena pesada variable y de cadena ligera variable del anticuerpo 11.2.1 tal como se divulga en el documento US 6,682,736, que

se incorpora al presente documento por referencia en su integridad.

XI. VII. Composiciones farmacéuticas y métodos de administración

- 5 **[00462]** Los métodos para preparar y administrar moléculas de unión anti-CD73, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) a un sujeto que lo necesita son bien conocidos o
- 10 se determinan fácilmente por los expertos en la materia. La vía de administración de la molécula de unión anti-CD73, por ejemplo, un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado de la misma puede ser, por ejemplo, oral, parenteral, por inhalación o tópica. El término parenteral
- 15 tal como se usa en el presente documento incluye, por ejemplo, administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Sin embargo, en otros métodos compatibles con las enseñanzas del presente documento, pueden suministrarse
- 20 moléculas de unión anti-CD73, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la presente divulgación directamente en el sitio de la población celular adversa, aumentando de ese modo la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.
- 25 **[00463]** Como se analiza en el presente documento, las moléculas de unión anti-CD73, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos de la presente divulgación (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) pueden
- 30 administrarse en una cantidad farmacéuticamente eficaz para

el tratamiento *in vivo* de enfermedades mediadas por células que expresan CD73 tales como ciertos tipos de cánceres.

[00464] Los métodos para preparar y administrar combinaciones terapéuticas que comprenden moléculas de unión anti-CD73, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) en combinación con un anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 y/o anti-CTLA4, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos a un sujeto que lo necesita son bien conocidos o se pueden determinar fácilmente por los expertos en la materia. La vía de administración de la combinación puede ser, por ejemplo, oral, parenteral, por inhalación o tópica. El término "parenteral", tal como se utiliza en el presente documento, incluye, por ejemplo, la administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Sin embargo, en otros métodos compatibles con las enseñanzas del presente documento, una combinación de la presente divulgación puede administrarse directamente en el sitio de la población celular adversa, aumentando de esta manera la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico. Como se analiza en el presente documento, una combinación de un anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, MEDI9447) y un anticuerpo anti-PD-1, anti-PD-L1 y/o anti-CTLA4 puede administrarse en una cantidad farmacéuticamente eficaz para el tratamiento *in vivo* de enfermedades mediadas por células que expresan CD73 tales como ciertos tipos de cánceres.

[00465] Las composiciones farmacéuticas usadas en esta divulgación pueden comprender vehículos farmacéuticamente aceptables, incluyendo, por ejemplo, agua, intercambiadores

iónicos, proteínas, sustancias tamponantes y sales. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión. Se describen formulaciones adecuadas para su uso en los métodos terapéuticos divulgados en el presente documento, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16^a ed. (1980).

[00466] En cualquier caso, pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando una combinación terapéutica de la invención o un compuesto activo (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5, por sí mismo o en combinación con otros agentes activos) en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado seguido por esterilización por filtración. Además, las preparaciones pueden envasarse y venderse en forma de un kit. Tales artículos de fabricación pueden tener marcadores o prospectos que indican que las composiciones asociadas son útiles para tratar a un sujeto que padece, o que está predispuesto a una enfermedad o un trastorno.

[00467] Las formulaciones parenterales pueden ser una única dosis en bolo, una infusión o una dosis en bolo de carga seguida por una dosis de mantenimiento. Estas composiciones pueden administrarse a intervalos específicos fijos o variables, por ejemplo, una vez al día, o "según se necesite".

[00468] La composición pueden administrarse como una única dosis, múltiples dosis o a lo largo de un periodo de tiempo establecido en una infusión. Los regímenes de dosificación también pueden ajustarse para proporcionar la respuesta

deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica).

[00469] Las dosis terapéuticamente eficaces de las composiciones de la presente divulgación, para el tratamiento de enfermedades mediadas por células que expresan CD73, tales como ciertos tipos de cánceres incluyendo, por ejemplo, cáncer de colon, melanoma, cáncer de mama, linfoma, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin y linfoma de Burkitt, cáncer de ovario, cáncer de mama, cánceres de cabeza y cuello y cáncer pancreático, varían dependiendo de muchos factores diferentes, incluyendo medios de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, de si el paciente es un ser humano o un animal, de otras medicaciones administradas y de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Habitualmente, el paciente es un ser humano, pero también pueden tratarse mamíferos no humanos incluyendo mamíferos transgénicos. Se pueden titular las dosificaciones de tratamiento utilizando métodos habituales conocidos por los expertos en la técnica para optimizar la seguridad y eficacia.

[00470] La cantidad de dicha al menos una molécula de unión anti-CD73, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión, variante o derivado del mismo (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o combinación terapéutica de la invención a administrar se determina fácilmente por un experto habitual en la materia sin experimentación indebida dada la divulgación de la presente divulgación. Los factores que influyen en el modo de administración y la cantidad respectiva de dicha al menos una molécula de unión anti-CD73, por ejemplo, anticuerpo,

fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, o combinación terapéutica de la invención, incluye, pero sin limitación, la gravedad de la enfermedad, la historia de la enfermedad y la edad, altura, peso, salud y estado físico del individuo que se somete a la terapia. De manera similar, la cantidad de molécula de unión anti-CD73, por ejemplo, anticuerpo, o fragmento, variante o derivado del mismo, o combinación terapéutica de la invención, a administrar, dependerá del modo de administración y de si el sujeto se va a someter a una sola dosis o a múltiples dosis de este agente.

[00471] La presente divulgación también proporciona medios para el uso de una molécula de unión anti-CD73, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5), o combinación terapéutica de la invención, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tipo de cáncer, incluyendo, por ejemplo, cáncer de colon, melanoma, cáncer de mama, linfoma, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin y linfoma de Burkitt, cáncer de ovarios, cáncer de mama, cánceres de cabeza y cuello y cáncer pancreático.

[00472] La divulgación también proporciona medios para el uso de una molécula de unión anti-CD73, por ejemplo, anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) en la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto para tratar un tipo de cáncer. En determinados aspectos, el medicamento se usa en un sujeto que se ha pretratado con al menos otra terapia.

[00473] Por "pretratado" o "pretratamiento" se entiende que el sujeto ha recibido una o más terapias distintas (por ejemplo, se ha tratado con al menos otra terapia anticancerosa) antes de recibir el medicamento que comprende la molécula de unión anti-CD73, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5). No es necesario que el sujeto respondiese al pretratamiento con la terapia o terapias previas. Por lo tanto, el sujeto que recibe el medicamento que comprende la molécula de unión anti-CD73, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, variante o derivado del mismo podría haber respondido, o podría no haber respondido al pretratamiento con la terapia previa, o a una o más de las terapias previas en caso de que el pretratamiento comprendiera múltiples terapias.

[00474] La presente divulgación también proporciona la coadministración de una molécula de unión anti-CD73, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) y al menos otra terapia. El anticuerpo anti-CD73 y dicha al menos otra terapia pueden coadministrarse conjuntamente en una sola composición o pueden coadministrarse conjuntamente al mismo tiempo o en momentos solapantes en composiciones independientes. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-CD73 puede coadministrarse, por ejemplo, con un anticuerpo que se dirige a PD-1 (proteína 1 de muerte programada. La presente divulgación también proporciona medios para el uso de una molécula de unión anti-CD73, por ejemplo, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del

5 mismo(por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) en la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto para tratar un cáncer, donde la molécula de unión anti-CD73 se administra antes de que el sujeto se haya tratado con al menos otra terapia.

VIII. Diagnóstico

[00475] La presente divulgación proporciona además métodos de diagnóstico útiles durante el diagnóstico de enfermedades mediadas por células que expresan CD73, tales como ciertos tipos de cáncer, que implican medir el nivel de expresión de proteína CD73 en un tejido u otras células o fluido corporal de un individuo y comparar el nivel de expresión medido con un nivel de expresión convencional de CD73 en un tejido o fluido corporal normal, con lo que un aumento en el nivel de expresión en comparación con el nivel convencional es indicativo de un trastorno.

[00476] Los anticuerpos anti-CD73 desvelados en el presente documento y fragmentos de unión a antígeno, variantes y derivados de los mismos (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) pueden usarse para ensayar niveles de proteínas CD73 en una muestra biológica usando métodos inmunohistológicos clásicos conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo, véase Jalkanen, *et al.*, *J. Cell. Biol.* **101**:976-985 (1985); Jalkanen *et al.*, *J. Cell Biol.* 105:3087-3096 (1987)). Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión de la proteína CD73 incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas(ELISA), inmunoprecipitación o transferencia de Western. Se describen ensayos adecuados en más detalle en otra parte en el presente documento.

[00477] Por "ensayar el nivel de expresión del polipéptido CD73" se entiende medir o estimar cualitativa o cuantitativamente el nivel de polipéptido CD73 en una primera muestra biológica directamente (por ejemplo, determinando o
5 estimando el nivel de proteína absoluta) o relativamente (por ejemplo, comparando con el nivel de polipéptido asociado con la enfermedad en una segunda muestra biológica). El nivel de expresión del polipéptido CD73 en la primera muestra biológica puede medirse o estimarse y compararse con un nivel
10 de polipéptido CD73 convencional, tomándose el nivel convencional de una segunda muestra biológica obtenida de un individuo que no tiene el trastorno o determinándose promediando los niveles de una población de individuos que no tienen el trastorno. Tal como se apreciará en la técnica,
15 una vez que se conoce el nivel de polipéptido CD73 "convencional", puede usarse repetidamente como patrón para la comparación.

[00478] Por "muestra biológica" se entiende cualquier muestra biológica obtenida de un individuo, línea celular,
20 cultivo tisular u otra fuente de células que pueden expresar CD73. Se conocen bien en la técnica métodos para obtener biopsias de tejido y fluidos corporales de mamíferos.

IX. Kits que comprenden moléculas de unión a CD73

[00479] La presente divulgación también proporciona kits
25 que comprenden al menos una de las moléculas de unión a CD73 descritas en el presente documento, *por ejemplo*, anticuerpos anti-CD73 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, variantes o derivados de las moléculas desveladas en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3
30 o un anticuerpo del clon 2C5), que pueden usarse para realizar los métodos descritos en el presente documento. En

determinados aspectos, un kit comprende al menos un anticuerpo anti-CD73 purificado o un fragmento de unión a antígeno del mismo en uno o más recipientes. En algunos aspectos, los kits contienen todos los componentes necesarios y/o suficientes para realizar un ensayo de detección, incluyendo todos los controles, instrucciones para realizar los ensayos, y cualquier software necesario para el análisis y la presentación de los resultados. Un experto en la materia reconocerá fácilmente que la molécula de unión a CD73 desvelada, *por ejemplo*, un anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente divulgación (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) puede incorporarse fácilmente en uno de los formatos de kit establecidos que son bien conocidos en la técnica.

X. Inmunoensayos

[00480] Las moléculas de unión anti-CD73 desveladas en el presente documento, por ejemplo, anticuerpos anti-CD73 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, variantes o derivados de las moléculas desveladas en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5), pueden ensayarse con respecto a la unión inmuno-específica por cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que pueden usarse incluyen pero no se limitan a sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que usan técnicas tales como inmunotransferencias de tipo Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina de difusión en gel, ensayos de

5 inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunorradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A, por nombrar unos cuantos. Tales ensayos son de rutina y se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds, (1994) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., NY) Vol. 1, que se incorpora como referencia en el presente documento en su totalidad).

[00481] Las moléculas de unión a CD73, por ejemplo, anticuerpos anti-CD73 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y sus variantes o derivados (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5), pueden emplearse histológicamente, como en inmunofluorescencia, microscopía inmunoeléctronica o ensayos no inmunológicos, para la detección in situ de CD73 o variantes conservadas o fragmentos peptídicos de los mismos. Puede lograrse la detección *in situ* retirando una muestra histológica de un paciente, y aplicando a la misma una molécula de unión a CD73 marcada, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD73 o fragmento de unión a antígeno del mismo, variante o derivado del mismo, aplicada preferiblemente recubriendo la molécula de unión a CD73 marcada (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento) sobre una muestra biológica. Mediante el uso de un procedimiento de este tipo, es posible determinar no solo la presencia de CD73, o variantes conservadas o fragmentos peptídicos, sino también su distribución en el tejido examinado. Utilizando la presente divulgación, los expertos en la técnica comprenderán fácilmente que se puede modificar un método cualquiera de una amplia variedad de métodos histológicos (tales como los

procedimientos de tinción) con el fin de conseguir tal detección *in situ*.

[00482] La actividad de unión de un lote dado de moléculas de unión a CD73, por ejemplo, anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o fragmento de unión a antígeno del mismo, variante o derivado del mismo puede determinarse de acuerdo con métodos bien conocidos. Los expertos en la técnica podrán determinar condiciones operativas y de ensayo óptimas para cada determinación mediante el empleo de experimentación de rutina.

[00483] Los métodos y reactivos adecuados para la determinación de las características de unión de una molécula de unión a CD73 aislada, por ejemplo, anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, un anticuerpo del clon 10.3 o un anticuerpo del clon 2C5) o fragmento de unión a antígeno del mismo, variante o un derivado alterado/mutante del mismo, se conocen en la técnica y/o están disponibles en el mercado. Están disponibles en el mercado equipos y software diseñados para tales análisis cinéticos (por ejemplo, BIAcore, software BIAevaluation, GE Healthcare; software KinExa, Sapidyne Instruments).

[00484] La práctica de la presente divulgación empleará, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de los conocimientos de la técnica. Tales técnicas se explican detalladamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, por ejemplo, Sambrook *et al.*, ed. (1989) Molecular Cloning A Laboratory Manual (2^a ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*,

ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volúmenes I y II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis et al. *Patente de Estados Unidos N.º*
5 4,683,195; Hames and Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning*;
10 the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu et al., eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And*
15 *Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, Volúmenes I-IV; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); and in Ausubel et al. (1989) *Current Protocols in Molecular*
20 *Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

[00485] Los principios generales de modificación por ingeniería de anticuerpos se exponen en Borrebaeck, ed. (1995) *Antibody Engineering* (2^a ed.; Oxford Univ. Press).
Press). Los principios generales de modificación por
25 ingeniería de proteínas se exponen en Rickwood et al., eds. (1995) *Protein Engineering, A Practical Approach* (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.). Press, Oxford, Eng.).
Los principios generales de anticuerpos y unión de anticuerpo-hapteno se exponen en: Nisonoff (1984) *Molecular*
30 *Immunology* (2^a ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); y Steward (1984) *Antibodies, Their Structure and Function*

(Chapman and Hall, New York, N.Y.). Adicionalmente, se siguen generalmente métodos convencionales en inmunología conocidos en la técnica y no descritos específicamente como en Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Nueva York; Stites et al., eds. (1994) Basic and Clinical Immunology (8^a ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) y Mishell y Shiigi (eds) (1980) Selected Methods in Cellular Immunology (W.H. Freeman and Co., NY).

[00486] Los trabajos de referencia habituales que exponen los principios generales de inmunología incluyen Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Klein (1982) J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (John Wiley & Sons, NY); Kennett et al., eds. (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, ed. Burden et al., (Elsevier, Amsterdam); Goldsby et al., eds. (2000) Kuby Immunology (4th ed.; H. Freeman & Co.); Roitt et al. (2001) Immunology (6th ed.; London: Mosby); Abbas et al. (2005) Cellular and Molecular Immunology (5th ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann and Dubel (2001) Antibody Engineering (Springer Verlag); Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall 2003); Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach y Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press).

[00487] Todas las referencias citadas anteriormente, así como todas las referencias citadas en el presente documento, se incorporan por referencia a la presente en su totalidad.

[00488] Los siguientes ejemplos se presentan a modo de ilustración y no a modo de limitación.

EJEMPLOS

[00489] Pueden definirse adicionalmente aspectos de la presente divulgación mediante referencia a los siguientes ejemplos no limitativos, que describen la preparación en detalle de determinados anticuerpos de la presente divulgación y métodos para usar los anticuerpos de la presente divulgación. Resultará evidente para los expertos en la técnica que pueden ponerse en práctica muchas modificaciones, tanto de materiales como de métodos, sin apartarse del alcance de la presente divulgación.

[00490] CD73 (Cluster of Differentiation 73), también conocido como ecto-5'-nucleotidasa (NT5E), es un receptor transmembrana que se encuentra en células tumorales así como en células estromáticas normales tales como células endoteliales y ciertos leucocitos. CD73 cataliza la escisión de adenosina monofosfato en adenosina y fosfato inorgánico. La unión de la parte extracelular de receptores de adenosina emite señales a través del AMP cíclico para inhibir la activación de receptores de células T (revisado por Linden and Cekic, 2012). Se cree que CD73 interviene en la mediación de la función inhibidora de los linfocitos B y T reguladores (Saze et al, 2013), así como en el mantenimiento de la integridad endotelial (revisado por Jalkanen and Salmi, 2008).

[00491] Además de su papel en la biología normal, CD73 y la adenosina afectan a la biología de los tumores. La presencia de adenosina extracelular dentro del microentorno tumoral, según se ha descrito, es un "halo" inmunosupresor (Antonioli et al, 2013). De forma coherente con este papel

de la adenosina, se ha demostrado que los ratones knockout que carecen de receptores de adenosina rechazan los tumores más fácilmente que los ratones normales (Ohta et al, 2006). Se cree que la fuente primaria de adenosina extracelular dentro de los tumores es CD73 (Augusto et al, 2013). De forma coherente con esta hipótesis así como con estudios realizados con ratones deficientes en A2A, los ratones knockout que carecen de CD73 tienen mayor inmunidad antitumoral (Stagg et al, 2011) y muestran una menor carcinogénesis (Stagg et al, 2012) cuando se comparan con los ratones normales. Específicamente, se cree que la adenosina extracelular media los efectos inmunosupresores tanto de las células T reguladoras como de las células supresoras derivadas de mieloide (MDSC), entre otras (revisado por Antonioli et al, 2013). Considerado junto con otros estudios que muestran que la inhibición molecular de CD73 con moléculas pequeñas o anticuerpos puede inhibir la formación de tumores, el crecimiento y la metástasis (revisado por Young et al, 2014), se propone la hipótesis de que los tumores usan CD73 para generar adenosina y, de esta manera, suprimir la inmunidad antitumoral. Por consiguiente, es probable que los anticuerpos anti-CD73 que se unen selectivamente e inhiben la actividad ectonucleotidasa de CD73 sean útiles para potenciar una respuesta inmunitaria antitumoral.

EJEMPLO 1: Aislamiento e identificación de anticuerpos anti-CD73

[00492] Se exploraron bibliotecas de presentación de fagos scFv humanas con el dominio extracelular de CD73 (ECD) biotinilado para aislar anticuerpos que se unen a CD73 humano, de mono cinomolgo y murino. El anticuerpo principal, CD730010, se demostró que se unía específicamente a células

que expresaban CD73 humanas, murinas y de mono cinomolgo (por citometría de flujo), y que inhibían la actividad de ECD de CD73 soluble recombinante así como el CD73 nativo presentado en las células. Se inició maduración por afinidad de CD730010 para aumentar la afinidad de unión de CD730010 por CD73 humano.

[00493] Antes de la optimización de afinidad, se intentaron revertir los máximos restos marco posibles de CD730010 a las secuencias de línea general humana más próximas (basándose en el repertorio IMGT) sin afectar a la afinidad. Esto se hizo para minimizar el potencial de inmunogenicidad del fármaco de anticuerpo final en seres humanos. Todos los restos marco del dominio de VL y todos excepto uno de los restos marco del dominio VH pudieron revertirse para corresponder a la secuencia amino de las líneas germinales humanas IGLV1-44, IGLJ3, IGHV3-23 y IGHJ2. La lisina en posición 94 (numeración de Kabat; Kabat, 1991) del dominio de VH de CD730010 no pudo revertirse sin pérdida de afinidad.

[00494] La afinidad y la potencia del anticuerpo CD730010 revertido a la línea germinal se optimizó generando bibliotecas de variantes de CDR y ensayando las variantes con respecto a la unión mejorada a CD73. Se combinaron varias mutaciones con la mejor mejora en afinidad para generar el fármaco candidato MEDI9447. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducidas de MEDI9447 se muestran en las Figuras 1A-1D.

[00495] Se aislaron anticuerpos scFv específicos para CD73 a partir de la biblioteca de presentación en fagos de scFv humano en una serie de ciclos de selección alternos repetidos sobre el dominio extracelular (ECD) de CD73 humano y murino

biotinilado producido localmente a partir de células de mamífero esencialmente como se ha descrito anteriormente en Lloyd et al., PEDS 22:159-68 (2009). Los genes de ScFv de las vueltas 2 y 3 de los resultados de selección se convirtieron de forma discontinua en vectores de expresión bacterianos scFv-Fc o Fab. Los sobrenadantes de cultivo bacterianos que llevaban scFv-Fc o Fab solubles se exploraron para determinar su unión a CD73 ECD de CD73 humano, murino y de mono cinomolgo por ELISA o fluorescencia homogénea de resolución en el tiempo (HTRF). Se seleccionaron los aciertos máximos que mostraban reactividad cruzada, se sometieron a secuenciación de ADN y se convirtieron en formato de anticuerpo mutante triple de inmunoglobulina G1 entera ("IgG-TM", secuencia de Fc de IgG1 que incorpora mutaciones L234F, L235E y P331S). Los anticuerpos IgG1 TM se expresaron en células de mamífero, se purificaron por cromatografía de afinidad y se clasificaron basándose en sus características en unión y ensayos funcionales.

EJEMPLO 2: Clasificación de epítomos de anticuerpos anti-CD73

[00496] La capacidad de los anticuerpos anti-CD73 de competir entre sí por la unión a ECD de CD73 humano se evaluó en un instrumento Octet esencialmente como se describe (Abdiche YN et al., Anal Biochem 386: 172-80 (2009). La proteína ECD de CD73 y el primer anticuerpo anti-CD73 se preincubaron y se añadieron a un segundo anticuerpo anti-CD73 biotinilado capturado en un sensor de Estreptavidina. Si el primer anticuerpo anti-CD73 bloqueaba la unión de ECD de CD73 al segundo anticuerpo anti-CD73, los dos anticuerpos se ponían en la misma clase de epítomos o en clases de epítomos solapantes. Si los dos anticuerpos podían unirse

simultáneamente a ECD de CD73, se ponían en clases de epítomos no solapantes. El ensayo por parejas de los anticuerpos anti-CD73 demostró que pertenecen a 3 clases de epítomos no solapantes (Tabla 2).

5 **[00497] Tabla 2: Clases de epítomos de anticuerpos anti-CD73**

	Clase de epítomos	Anticuerpos
10	A	CD730002, CD730004, CD730008, CD730011
	B	CD730003, CD730010, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047
	C	CD730068, CD730069

EJEMPLO 3: Unión de anticuerpos anti-CD73 a CD73

15 **[00498]** La afinidad de unión y la especificidad de los anticuerpos anti-CD73 se determinó por Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) y citometría de flujo.

[00499] Se usó un instrumento ProteOn XPR36 para caracterizar la unión de MEDI9447 a ECD de CD73 humano, murino y de mono cinomolgo. MEDI9447 se capturó por afinidad usando un anticuerpo Fc anti-humano. ECD de CD73 estaba en la fase móvil. La asociación y disociación de CD73 a MEDI9447 pudo describirse de forma precisa con el modelo Langmuir 1:1. Los resultados mostrados en la Tabla 3 demuestran que la afinidad de MEDI9447 por ECD de CD73 de las tres especies es comparable y está en el intervalo picomolar bajo.

[00500] Tabla 3: Afinidad de MEDI9447 por ECD de CD73 determinada por Resonancia de Plasmón Superficial

Analito	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
ECD de CD73 humano	2.57×10^6	1.06×10^{-5}	4.1×10^{-12}
ECD de CD73 murino	2.41×10^6	2.32×10^{-6}	0.9×10^{-12}
ECD de CD73 cinomolgo	2.71×10^6	1.76×10^{-5}	6.5×10^{-12}

k_a Constante de velocidad de asociación; k_d Constante de velocidad de disociación; K_D Constante de disociación

[00501] La unión de MEDI9447 a CD73 nativo expresado en líneas celulares de humano, murinas y de mono cinomolgo se caracterizó por citometría de flujo. Las células se incubaron con diversas concentraciones de MEDI9447 y se supervisó la unión del anticuerpo con anticuerpo RFc anti-humano marcado con fluoróforo. La intensidad media de fluorescencia en función de la concentración de MEDI9447 se ajustó de forma no lineal usando un modelo de isoterma de unión de un sitio para calcular la constante de disociación de equilibrio. El análisis por citometría de flujo confirma la unión de MEDI9447 a CD73 humano, murino y cinomolgo con afinidades comparables (Tabla 4), aunque los valores de K_D son 13 - 126 veces mayores que los determinados por SPR, probablemente debido a las diferencias conformacionales entre CD73 nativo y recombinante.

[00502] Tabla 4: Afinidad de MEDI9447 por CD73 nativo determinada por citometría de flujo

Analito	K_D (M)
Células MDA-MB-231 (humanas)	154×10^{-12}

Analito	K _D (M)
Células 4T1 (murinas)	113 x 10 ⁻¹²
Células MK-1 (cinomolgo)	84 x 10 ⁻¹²

5 **[00503]** Para determinar la especificidad de MEDI9447 por
CD73 humano mediante citometría de flujo, se desarrollaron
líneas celulares. Las células MDA-MB-231, que son células de
cáncer de mama humano derivado de efusión pleural, se
transfectaron con ARN de horquilla corto de CD73 humano
10 (shRNA) para anular la expresión de CD73 en la superficie
celular. Se transfectaron células Jurkat, una línea de
células T derivadas de células de linfoma de Burkitt, con un
plásmido que expresaba ARNm de CD73 humano para inactivar la
expresión de CD73 en la superficie celular. Las células
15 Jurkat expresan poco CD73 endógeno.

[00504] La especificidad de MEDI9447 por CD73 humano se
determinó mediante la relación de unión de MEDI9447 a una
línea celular de alta expresión de CD73 (MDA-MB-231) con
respecto a una línea celular de baja expresión (MDA-MB-231,
20 CD73-shRNA). La especificidad de MEDI9447 por CD73 humano
también se determinó mediante la relación de la línea celular
de alta expresión de CD73 (Jurkat -CD73 knock-in) con
respecto a la línea celular de menor expresión Jurkat.

[00505] La especificidad de MEDI9447 por CD73 murino
25 (mCD73) se determinó por citometría de flujo comparando la
línea celular de ratón 4T1 (alta expresión de mCD73) con la
línea celular inactivada (4T1 mCD73 -shRNA). Además, se
comparó la especificidad de MEDI9447 por células Jurkat con
CD73 murino knock-in con células Jurkat de tipo silvestre
30 (sin CD73 murino).

[00506] Tabla 5: Especificidad de MEDI9447 por CD73 humano y de ratón

Especificidad de MEDI9447	Relación de líneas celulares	Relación media de intensidad de fluorescencia (MFIR)
humano	MDA-MB-231 / MDA-MB-231 (CD73-shRNA)	3.5
humano	Jurkat (CD73 knock-in) / Jurkat	7.9
Ratón	4T1 / 4T1 (mCD73 -shRNA)	3.9
Ratón	Jurkat (mCD73 knock-in) / Jurkat	57.1

EJEMPLO 4: Internalización de CD73 por el anticuerpo anti-CD73 MEDI9447

[00507] La internalización mediada por anticuerpo o shedding (corte y liberación) de CD73 se evaluó por citometría de flujo. Se incubaron células MDA-MB-231 en presencia de MEDI9447 100 nM o anticuerpo R347 como control negativo en medio de crecimiento a 37 °C durante 0 - 4 horas. Las células se lavaron y se resuspendieron en PBS enfriado con hielo. La presencia de CD73 en la superficie celular se detectó añadiendo anticuerpo de detección marcado con DyLight488 10 nM. Las células se incubaron durante 15 minutos, se lavaron y se analizaron por citometría de flujo. El anticuerpo de detección se une a un epítipo de CD73 que es diferente del epítipo de MEDI9447 y los dos anticuerpos se unen simultáneamente a CD73 sin interferencia. La expresión en la superficie celular de CD73 se redujo al 73 %

de su valor original después de 4 horas de incubación con MEDI9447, lo que sugiere que el 27 % de CD73 se había internalizado o eliminado después de la unión a MEDI9447 (Tabla 3.5-1).

- 5 **[00508] Tabla 6: Porcentaje de CD73 que queda en la superficie celular de células MDA-MB-231 después de la incubación con anticuerpo de ensayo**

	Tiempo [h]	R347	MEDI9447
	0	100%	100%
10	0.25	107%	90%
	0.5	104%	90%
	1	102%	87%
	2	104%	80%
15	4	102%	73%

- 20 **[00509]** La internalización de MEDI9447 en las líneas celulares MDA-MB-231 (carcinoma mamario humano) y 4T1 (carcinoma mamario murino) se evaluó usando un kit de internalización de anticuerpo humano que se vende en el mercado como el ensayo FabZAP (Advanced Targeting Systems, San Diego CA). Se preincubaron diluciones en serie de MEDI9447 o anticuerpo de control negativo R347 con reactivo FabZAP 40 nM (fragmento Fab de un anticuerpo IgG policlonal anti-humano conjugado con la proteína citotóxica saporina) y después se añadieron a las líneas celulares. Después de 3 días en cultivo, se midió la proliferación celular usando un ensayo de viabilidad celular luminiscente vendido en el mercado como ensayo CellTiter-Glo (Promega, Madison WI). Este ensayo se usó para calcular los valores de CE₅₀ y la toxicidad máxima. El reactivo FabZAP no se puede internalizar en las células por sí mismo. Se une a un anticuerpo de ensayo
- 25
- 30

(por ejemplo, MEDI9447) y solo es citotóxico tras la internalización del anticuerpo de ensayo. MEDI9447 produjo la internalización de FabZAP e inhibió la proliferación celular de una manera dependiente de la dosis.

5 **[00510] Tabla 7: Internalización mediada por anticuerpo del reactivo FabZAP citotóxico en células MDA-MB-231 y células 4T1**

10		MDA-MB-231		4T1	
		CE ₅₀ [pM]	toxicidad máxima	CE ₅₀ [pM]	toxicidad máxima
	MEDI9447	3.5	97%	18.5	97%

15 **[00511]** La proliferación celular de las células MDA-MB-231 y las células 4T1 tratadas con diluciones seriadas de anticuerpo de ensayo y reactivo FabZAP se midió por el ensayo CellTiter-Glo (Figura 2). La señal del anticuerpo R347 de control negativo en el ensayo CellTiter-Glo se restó de la señal de MEDI9447 y se calcularon el valor de CEC50 y la toxicidad máxima ajustando la curva de dosis-respuesta mediante el uso de un análisis de regresión no lineal.

20 **EJEMPLO 5: Inhibición de la actividad 5'Ectonucleotidasa por el anticuerpo anti-CD73 MEDI9447**

25 **[00512]** En este estudio, se determinó la actividad funcional de MEDI9447 en un ensayo *in vitro* que medía la hidrólisis catalizada por CD73 del AMP usando una línea celular de carcinoma de células no pequeñas humano, NCI-H322. La formulación de MEDI9447 se preparó diluyendo su solución madre en medio RPMI sin suero hasta una concentración final de 1 µM. La formulación de R347 se preparó diluyendo su solución madre en RPMI hasta una
30 concentración final de 1 µM.

[00513] Se centrifugaron células NCI-H322 durante 5 minutos a 1500 rpm. El sobrenadante se retiró y se reemplazó por medio RPMI sin suero. La suspensión celular se contó usando el contador de células ViCell (Beckman, Coulter). Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos a una densidad celular de 10,000 células por 100 µl por pocillo. Se añadieron 50 µl de AMP concentrado 4X (200 µM). Las placas después se incubaron a 37°C, 5 % de CO₂ durante 24 horas. Las placas se centrifugaron y se transfirieron 50 µl del sobrenadante de cultivo pocillo a pocillo a placas de fondo redondo opacas de 96 pocillos. Después se añadió ATP 2X. Se añadió CellTiterGlo® (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La inhibición enzimática celular de la 5' ectonucleotidasa se midió en un lector multilabel, la Perkin-Elmer Envision Workstation. Las muestras se analizaron usando el Software Prism.

[00514] MEDI9447 inhibía específicamente la desfosforilación de la adenosina monofosfato (AMP) en un sistema humano *in vitro*. En un ensayo basado en células de CD73 expresado en la superficie, la conversión de adenosina monofosfato en adenosina se redujo de una manera dependiente de la dosis por MEDI9447, pero no por un anticuerpo de control de isotipo irrelevante (Figura 3). Los resultados representados en la Figura 3 se obtuvieron usando células NSCLC que expresaban CD73 que se cultivaron en placas no tratadas con cultivo de tejidos de 96 pocillos (Falcon 3788) a 10,000 células por pocillo en 100 µl de medio RPMI sin aditivos. Se añadieron anticuerpos por duplicado junto con AMP (concentración final 200 µM) y las placas se incubaron a 37°C, 5 % de CO₂ durante 24 horas. Después, las placas se centrifugaron durante 3 minutos a 1500 rpm. Los sobrenadantes

se recogieron en una nueva placa de 96 pocillos (Costar #3605) y se añadió ATP a una concentración final de 100 μ M. Se añadió reactivo CellTiter-Glo® (Promega) 1:1 y se determinó la actividad AMP fosforilasa de la enzima CD73 celular midiendo los niveles de ATP usando el lector de placas de luminiscencia Envision (Perkin Elmer). Como control negativo se usó tampón que contenía únicamente ATP y AMP. El ensayo se repitió y los resultados mostrados en la Figura 3 son representativos de dos experimentos similares usando otras líneas de células cancerosas humanas.

[00515] Estos resultados indican que MEDI9447 inhibía la producción de adenosina por células cancerosas. Se cree que la adenosina media los efectos inmunosupresores de los tumores dentro del microentorno de los tumores.

15 **EJEMPLO 6: Reducción en células supresoras derivadas de mieloide infiltrantes de tumores por MEDI9447**

[00516] Se establecieron células CT26, que proceden de un cáncer de colon murino, por inyección subcutánea (SC) de 5×10^5 células suspendidas en 0.1 ml de PBS en los costados derechos de ratones hembra de 4 a 6 semanas de edad. Los ratones se trataron con MEDI9447 o con un anticuerpo de control.

[00517] En este estudio se usaron 10 ratones por grupo. Los animales se asignaron aleatoriamente a grupos. Los animales del Grupo 1 se dejaron sin tratar y a los animales del Grupo 2 se les administró un control de isotipo. MEDI9447 se administró al Grupo 3. Los artículos de ensayo se administraron por vía intraperitoneal dos veces por semana empezando el día 3. El día 16, se sometieron a necropsia 5 animales de cada grupo y se aislaron los tumores.

[00518] La denominación de los grupos y los niveles de dosificación se presentan en la Tabla 8.

[00519] Tabla 8: Denominación de grupo y niveles de dosificación

5	Grupo	Número de animales (hembra)	Tratamiento	Días de dosificación	Nivel de la dosis (mg/kg) a	ROA
	1	5	no tratado	N/A	N/A	N/A
10	2	5	isotipo	2X por semana	20 mg/kg	IP
	3	5	MEDI9447	2X por semana	10 mg/kg	IP

N/A = no aplicable; ROA = vía de administración.

15

Los tumores se midieron los días 1, 7, 9, 12, 14 y 16 mediante un calibre y los volúmenes de los tumores se calcularon como se indica a continuación:

20 (1) $(\text{longitud del volumen tumoral (mm)} \times (\text{anchura del volumen tumoral})^2 (\text{mm})) / 2$

Los efectos anticancerosos de MEDI9447 se expresaron como porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral, que se calculó como se indica a continuación:

25 (2) $(\text{Volumen tumoral medio para MEDI9447} / \text{Volumen tumoral medio para R347-TM}) \times 100$

[00520] Los tumores se aislaron para citometría de flujo. Los tumores se diseccionaron a partir de ratones que llevaban el tumor CT26 el día 16 del de estudio. Los tumores se cortaron en pequeñas piezas y se digirieron con colagenasa. Después de una incubación de 30 minutos, la muestra digerida se pasó a través de un filtro de 70 micrómetros. Las células

disociadas se sedimentaron a 1000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se resuspendieron en tampón de clasificación de células activado por fluorescencia (FACS). Las células se contaron en Vi-Cell usando la configuración por defecto. Se cultivaron 1 x 10⁶ células por pocillo. Las células se tiñeron con anti-CD45 (para detectar todos los leucocitos), anti-GR1 (para detectar MDSC) y anti-Ly6g (Gran MDSC). Los datos se adquirieron en el citómetro de flujo LSRII. Los valores de p significativos, si existen, obtenidos a partir de los análisis de MDSC se presentan en la Figura 4 adyacentes al lado de los parámetros estadísticos descriptivos (es decir, media y desviación típica).

[00521] MEDI9447 inhibía el crecimiento tumoral en el modelo de tumor de Balb/C singénico CT26 murino (Figura 4).

[00522] MEDI9447 reducía la proporción de MDSC infiltrantes en tumores en el modelo de tumor Balb/C singénico CT26 murino (Figura 5).

[00523] MEDI9447 inhibía el crecimiento de tumores singénicos murinos CT26. Además, las células supresoras derivadas de mieloide se habían reducido en los tumores de carcinoma de colon CT26 singénico después del tratamiento con MEDI9447. Las MDSC intratumorales tienen un efecto inmunosupresor sobre el microentorno tumoral, lo cual permite un mayor crecimiento tumoral. La reducción observada en las MDSC intratumorales después del tratamiento con MEDI9447 demuestra un mecanismo mediante el cual el tratamiento con MEDI9447 reduce la supresión inmune del tumor.

EJEMPLO 7: Una combinación de mIgG1 MEDI9447 y un anticuerpo anti-PD-1 reducía el crecimiento tumoral y aumentaba la supervivencia.

[00524] Se establecieron tumores singénicos por inyección subcutánea (SC) de 0.1 ml de 5×10^6 células CT26/ml suspendidas en HBSS en los costados derechos de animales de 8 a 10 semanas de edad. Los tumores se midieron mediante calibres y los volúmenes de los tumores (TV) se calcularon usando la siguiente fórmula:

[00525] (1) $TV = (L \times W^2) / 2$

[00526] donde L es la longitud del tumor en milímetros y W es la anchura del tumor en milímetros

10 [00527] Los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos basándose en el peso corporal. No hubo sustituciones de animales. En este estudio se usaron 60 ratones Balb/c hembra.

15 [00528] Los animales se asignaron aleatoriamente en 6 grupos. A los animales se les administró MEDI9447(mIgG1). Los artículos de ensayo se administraron por inyección intraperitoneal (IP) dos veces por semana empezando el día 3. La denominación de los grupos y los niveles de dosificación se presentan en la Tabla 9.

20 **Tabla 9: Denominación de grupo y niveles de dosificación**

25	Grupo	Número de animales (hembra)	Tratamiento	Programa de dosificación (2x por semana)	Nivel de la dosis (mg/kg) a	ROA
	1	10	No tratado	NA	NA	NA
	2	10	Isotipo mIgG1	4 dosis	10	ip
30	3	10	Isotipo rIgG2a	4 dosis	10	ip

Tabla 9: Denominación de grupo y niveles de dosificación

Grupo	Número de animales (hembra)	Tratamiento	Programa de dosificación (2x por semana)	Nivel de la dosis (mg/kg) a	ROA
4	10	mIgG1 MEDI9447	4 dosis	10	ip
6	10	Anti-PD1	4 dosis	0.5	ip
7	10	PD1 + MEDI9447	4 dosis	0.5 + 10	ip

F = hembra; IV = intravenoso; M = macho; ROA = vía de administración.

^a Volumen de la dosis: 10 ml/kg.

(a) Resultados del estudio de inhibición tumoral in vivo

[00529] Se implantaron carcinomas de colon murinos CT26 en ratones Balb/C singénicos y se trataron con anti-CD73 (mIgG1 MEDI9447), anti-PD1 o la combinación. El tratamiento de combinación inhibió significativamente el crecimiento tumoral cuando se comparó con anti-CD73 solo ($p = 0.015$, ANOVA) (Figura 6). Se representaron los volúmenes tumorales de cada grupo de animales para los animales individuales hasta el día 40 del estudio. Ningún ratón del grupo de control se encontró libre de tumores al final del periodo de 40 días del estudio. El tratamiento con anti-CD73 solo dio como resultado un 10 % de animales libres de tumores al final del estudio. El tratamiento con anti-PD1 solo también dio como resultado un 10 % de animales libres de tumores al final del estudio. De manera destacable, la combinación de

tratamiento anti-CD73 y anti-PD dio como resultado un 60 % de ratones libres de tumores. Ninguno de los ratones del grupo de control se encontró libre de tumores al final del estudio. Se midieron los tumores CT26 en ratones tratados con anti-CD73 (mIgG1 MEDI9447), anti-PD1 o la combinación de anti-CD73 y anti-PD1. Los ratones se midieron hasta el día 40 del estudio, y se sacrificaron humanamente una vez que los tumores alcanzaron 2000 mm³. La combinación del tratamiento con anti-CD73 y anti-PD1 conjuntamente dio como resultado un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia en comparación con el tratamiento con anti-CD73 o anti-PD1 solo (valor de $p = 0.005$ y $p = 0.038$, respectivamente, Ensayo Log Rank) (Figura 7). La mediana de supervivencia aumentó desde 25 y 33 días (anti-CD73 y anti-PD1, respectivamente) en comparación con lo "no definido" en el día 40 para la combinación (Tabla 10).

[00530] Tabla 10: Resultado en el día 40 del estudio

Tratamiento	Ratones sin tumor (%)	Supervivencia (%)
no tratado	0	0
Isotipo mIgG1	0	0
Isotipo rIgG2a	0	0
Anti-CD73	10	10
Anti-PD1	10	20
Anti-CD73 + Anti-PD1	60	70

[00531] En resumen, el anticuerpo anti-CD73, mIgG1 MEDI9447, mostraba una mayor actividad antitumoral cuando se combinaba con un anticuerpo anti-PD-1 en un modelo de carcinoma de colon CT26 singénico murino. Además, la combinación de tratamiento anti-CD73 y anti-PD dio como

resultado un 60 % de ratones sin tumores. La combinación del tratamiento con anti-CD73 y anti-PD1 conjuntamente también dio como resultado un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia en comparación con el tratamiento con
5 anti-CD73 o anti-PD1 solos.

[00532] EJEMPLO 8: Anti-PD-1 inducía un microentorno tumoral rico en CD73 según se mide por la expresión de CD73 en células tumorales (Figura 9), células supresoras derivadas de mieloide (MDSC) y linfocitos CD4+, FoxP3+
10 infiltrantes en tumores (Figura 15).

[00533] Se establecieron tumores singénicos por inyección subcutánea (SC) de células de melanoma B16F10 singénicas o células de linfoma EG7-OVA singénicas. Los ratones se trataron dos veces por semana con MEDI9447 (10 mg/kg),
15 anticuerpo anti-PD-L1 (10 mg/kg) o una combinación de MEDI9447 (10 mg/kg) y anticuerpo anti-PD-L1 (10 mg/kg). El volumen tumoral se midió dos veces a la semana. La administración de MEDI9447 y anti-PD-L1 en combinación aumentaba significativamente la inhibición del crecimiento
20 tumoral en los tumores de melanoma (Figura 12) y tumores de linfoma (Figura 13).

[00534] Para comprender el efecto de anti-PD-L1 sobre el microentorno tumoral, se estudió la expresión de CD73 sobre los linfocitos. Se inyectaron a los ratones (n=4) por vía
25 subcutánea células singénicas colorrectales CT26 y se trataron dos veces a la semana con 10 mg por kg de anti-PD-L1 o un anticuerpo de control de isotipo irrelevante. Un día después del primer tratamiento, se aislaron las células de los ganglios linfáticos de drenaje y se analizó el fenotipo
30 de superficie por citometría de flujo. Tres días después del primer tratamiento, los tumores se aislaron, las células se

disociaron y se analizó el fenotipo de superficie por citometría de flujo. Anti-PD-L1 inducía un microentorno tumoral rico en CD73 según se mide por la expresión superficial de CD73 en linfocitos B de cambios linfáticos drenantes (Figura 14) y en linfocitos CD4+, FoxP3+ infiltrantes de tumores (Figura 15).

[00535] Se trataron ratones portadores de tumores singénicos CT26 colorrectales dos veces por semana con MEDI9447 (30 mg/kg) o anti-PD-L1 (30 mg/kg) o una combinación de MEDI9447 (30 mg/kg) y anti-PD-L1 (30 mg/kg). El día 16, se recogieron los tumores y las células sanguíneas periféricas enteras y se analizaron con respecto a la expresión de CD73 en la superficie por citometría de flujo y actividad enzimática. MEDI9447 solo o en combinación con anti-PD-L1 reducía la expresión de CD73 en células sanguíneas periféricas enteras (Figura 16), los linfocitos CD4+, FoxP3+ infiltrantes de tumores (Figura 17) y los linfocitos CD8+ infiltrantes de tumores (Figura 18). MEDI9447 solo o en combinación con anti-PD-L1 también reducía la expresión de CD73 en células tumorales (Figura 19).

[00536] MEDI9447 y anticuerpos o proteínas de fusión específicas por CTLA4, OX40, PD-1 y PD-L1 se incubaron durante 72 horas con células mononucleares de sangre periférica humanas primarias en una reacción mixta de leucocitos. Las citocinas indicadas en los sobrenadantes por duplicado se cuantificaron por ELISA. Los datos representan las combinaciones de dosis óptimas de anticuerpo anti-CD73 con los 4 agentes asociados diferentes. La combinación anti-PD-1 y anti-CD73 mostraba una sinergia significativa ($p < 0.05$) (Figura 20) determinada por el método de respuesta de superficie de Bliss (Zhao et al.). El perfil de citocinas

indica que se veían afectados tanto el linaje mieloide como el linaje linfoide. Se han ensayado más de 50 parejas de donantes.

[00537] En resumen, los anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1 creaban un microentorno tumoral rico en CD73 detectable en la periferia y reversible por tratamiento con anticuerpo anti-CD73, mIgG1 MEDI9447. Específicamente, los niveles de expresión en la superficie celular de CD73 y la actividad enzimática aumentaron espectacularmente en los tumores CT26 murinos cuando los ratones portadores de estos tumores se trataron con un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1. Además, los niveles de expresión y actividad se redujeron por tratamiento con el anticuerpo anti-CD73 MEDI9447 solo o en combinación con el anticuerpo anti-PD-L1. Estos cambios se observaron tanto en los tumores como en las células sanguíneas periféricas enteras circulantes. De esta manera, la expresión y actividad de CD73 puede servir como marcador farmacodinámico tanto del tratamiento con anti-PDL1 como con el tratamiento con anti-CD73 o como un biomarcador predictivo para la segmentación de pacientes tratados con anti-PD-1 o anti-PD-L1 cuyos tumores han "escapado" por falta de regulación de la expresión y actividad de CD73. Es importante destacar que el anticuerpo anti-CD73, MEDI9447, en combinación con anti-PD1 o anti-PD-L1, MEDI 4736, mostró una mayor actividad antitumoral.

[00538] Considerados conjuntamente, estos resultados confirman, por diversas medidas, que los anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1 inducen un microentorno tumoral "rico en CD73" y proporcionan un fuerte fundamento para combinar MEDI9447 con terapias que se dirigen al eje PD-1/PD-L1.

Ejemplo 9: anticuerpo anti-CD730010 y variantes de anticuerpo

[00539] Tabla 11: Afinidad de anticuerpo anti-CD730010 parental y variantes de anticuerpo con aminoácidos de la línea germinal.

variante de anticuerpo	aminoácido en posición de VL					aminoácido en posición de VH	CE50 [nM]
	1	2	11	37	39	94	
CD730010	L	P	V	K	V	R	69
CD730010 GL9	Q	S	A	Q	L	R	64
CD730010 GL10	L	P	V	K	V	K	205
CD730010 GL18	Q	S	A	Q	L	K	132

[00540] En el caso de CD730002, los genes de la línea germinal más próximos eran IGHV3-23 y IGHJ3 para el dominio de VH, e IGLV3-1 e IGLJ3 para el dominio de VL. Se identificaron cuatro restos que no eran de la línea germinal fuera de las regiones CDR: R94 en VH, y T20, R57, L81 y F87 en VL (numeración de Kabat) (Tabla 11). Se retromutaron nucleótidos en el vector de expresión IgG1 CD730002-TM por técnicas convencionales de biología molecular, de forma que los vectores de expresión resultantes codificaran aminoácidos de la línea germinal en esas posiciones (K94 en VH, y S20, G57, M81 y Y87 en VL). Las variantes de proteína IgG1 CD730002-TM se expresaron, purificaron y ensayaron con respecto a la unión a CD73 humano y murino recombinante por citometría de flujo. Los 4 aminoácidos que no eran de la línea germinal en VL pudieron cambiarse por sus restos de la

línea germinal sin perjudicar a la unión. Sin embargo, R94 en VH es importante para la unión y su cambio por K perjudica a la unión. Se usó la variante CD730002 SGMV (V no de la línea germinal, VL completamente de la línea germinal) como
5 plantilla para generar variantes de anticuerpo de afinidad optimizada.

**EJEMPLO 10: Optimización de afinidad de anticuerpos anti-
CD73 CD730010GL9**

[00541] Se optimizó IgG1 CD730010GL9-TM mediante la
10 exploración de bibliotecas de Fab que comprendían secuencias de CDR variantes con mutaciones de un solo aminoácido. Cada una de las 61 posiciones en las seis CDR se aleatorizó de forma individual a 19 aminoácidos (todos aminoácidos naturales excepto cisteína), generando una biblioteca con
15 una diversidad teórica de 1159 clones únicos (19 aminoácidos por posición por 61 posiciones). Se produjeron fragmentos Fab bacterianos a partir de 4224 clones de la biblioteca y se exploraron con respecto a la unión a la proteína CD73 humana y murina por ELISA de captura (Ensayo 2). Se
20 seleccionaron 180 clones con una señal de unión aumentada en comparación con IgG1 CD730010 GL9-TM parental y las mutaciones en el dominio de VH o VL se identificaron por secuenciación del ADN. La concentración de Fab en los sobrenadantes bacterianos se normalizó y la unión de los
25 sobrenadantes normalizados a la proteína CD73 humana y murina se evaluó por ELISA directo (Ensayo 1). La Tabla 12 indica sustituciones de un solo aminoácido beneficiosas seleccionadas y su efecto sobre la unión a la proteína CD73 recombinante.

30 **[00542] Tabla 12: Variantes de un solo aminoácido de CD730010 GL9 con afinidad mejorada.**

	CDR	Cambio de aminoácidos	Señal ELISA, mejora en veces con respecto al anticuerpo parental	
			huCD73	muCD73
5	L1	P32E	27.7	6.7
	L1	P32D	11.7	6.5
	H3	Y102K	9.9	7.4
	L2	N51D	8.9	4.5
	H2	G54N	8.9	7.1
10	H2	S52W	8.9	4.4
	H3	Y102M	7.9	6.3
	H3	Y102L	7.3	5.8
	L2	S56G	7.1	5.6
	L2	N51A	6.7	2.5
15	H3	Y102A	6.6	5.0
	L1	P32G	6.1	5.8
	L1	P32A	6.0	5.5
	L2	Q53L	6.0	3.8
	L2	Q53Y	5.8	2.3
20	L2	P55L	5.7	4.3
	H2	S56R	5.6	4.9
	L2	N51Q	4.2	2.3
	H2	G54W	4.2	3.7
	H2	A50L	4.2	3.0
25	L2	Q53F	4.1	2.7
	H1	M34Y	3.9	2.9
	L2	P55I	3.7	3.2
	H3	Y102Q	3.6	3.0
	L2	Q53W	3.1	2.7
30	L2	Q53H	2.4	1.9

L2	L50F	2.2	1.4
H1	S35H	1.8	1.1
H1	M34I	1.5	1.1

5 **[00543]** Para mejorar adicionalmente la afinidad del anticuerpo anti-CD73, se combinaron varios cambios de un solo aminoácido con unión mejorada en comparación con CD730010 GL9 parental para crear una biblioteca de Fab combinatoria (Ensayo 4). Se produjeron fragmentos Fab de
10 4224 clones de la biblioteca combinatoria en E.coli y se exploraron con respecto a la unión a la proteína CD73 humana y murina por ELISA de captura. Los 20 clones superiores de cada ensayo de exploración se seleccionaron para una caracterización adicional. La concentración de Fab en los
15 sobrenadantes se normalizó y se ensayaron diluciones seriadas de sobrenadantes normalizados con respecto a la unión a CD73 humano y murino por ELISA de captura y ELISA directo. Los clones C1, C2, D3 y G10 mostraron una fuerte unión a CD73 humana y murina y se seleccionaron para la
20 caracterización adicional.

[00544] La unión al antígeno de CD730010 GL9 también se optimizó usando selecciones de fagos basadas en afinidad. Se crearon grandes bibliotecas de scFv derivadas de la secuencia principal de CD730010 GL9 por mutagénesis dirigida a
25 oligonucleótido de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3) de la cadena variable (VH) o la CDR3 de la cadena ligera variable (VL) usando técnicas convencionales de biología molecular como se describe (Finch et al., JMB 411, 791-807 (2011)). Las bibliotecas se
30 sometieron a panning (inmunopurificación) en una serie de ciclos de selección alternos repetidos con proteína de

dominio extracelular CD73 humana y murina biotinilada. Se retroconvirtieron genes de ScFv de la vuelta 3 del resultado de selección en un vector de expresión de IgG bacteriano. Se exploraron sobrenadantes de cultivo bacteriano que contenían IgG soluble con respecto a su unión a CD73 humano y murino. Las variantes de IgG con una unión significativamente mejorada a CD73 en comparación con CD730010 GL9 parental se sometieron a secuenciación del ADN. Se seleccionaron dos variantes, GRVE y HPT, para una caracterización adicional.

[00545] Para generar mejoras de afinidad adicionales, se combinaron mutaciones beneficiosas identificadas a partir de la biblioteca de Fab combinatoria y a partir de la selección de fagos basada en afinidad creando variantes 73combo1 a 73combo6.

EJEMPLO 11: Optimización de afinidad de anticuerpos anti-CD73 CD730002SGMY

[00546] Se optimizó IgG1 CD730002SGMY-TM mediante la exploración de bibliotecas de Fab que comprendían secuencias de CDR variantes con mutaciones de un solo aminoácido como se describe para CD730010GL9. Se identificaron cinco mutaciones de aminoácidos en el dominio de VH y cuatro mutaciones de aminoácidos en el dominio de VL que dieron como resultado una mayor señal de unión a CD73 recombinante. La Tabla 13 indica sustituciones de un solo aminoácido beneficiosas y su efecto sobre la unión a CD73 recombinante.

[00547] **Tabla 13: Variantes de un solo aminoácido de CD730002SGMY con afinidad mejorada.**

CDR	Cambio de aminoácidos	Señal FACS, mejora en veces con respecto al anticuerpo parental
		Células MDA-MB-231
H1	Y32V	1.2

5

H1	M34R	1.1
H2	T57P	1.5
H2	A60G	1.3
H2	G65R	1.3
L2	T52S	1.5
L2	R54Y	1.2
L2	P55L	1.9
L2	P55H	1.5

10

[00548] Para mejorar adicionalmente la afinidad del anticuerpo anti-CD73 CD730002SGMY, se prepararon variantes de IgG que llevaban un cambio de aminoácido beneficioso en el dominio de VH y un cambio de aminoácido beneficioso en el dominio de VL. Se prepararon variantes de anticuerpo por transfección transitoria de células 293F y se exploraron con respecto a la unión a células MDA-MB-231 por citometría de flujo. El clon 2C5 tenía un valor de CE50 3 veces menor que CD730002SGMY parental.

15

EJEMPLO 12: Afinidad de anticuerpos anti-CD73 optimizados

20

[00549] La afinidad de anticuerpos anti-CD73 optimizados (en formato IgG1-TM) por CD73 humano, murino y cinomolgo se determinó por citometría de flujo y resonancia de plasmón superficial (SPR) (Tabla 14). Los anticuerpos optimizados tenían afinidad pM por CD73 celular y recombinante de las tres especies.

25

[00550] Tabla 14: Afinidad de anticuerpos anti-CD73 por CD73 humano, murino y cinomolgo

30

	KD [pM]	
	citometría de flujo	SPR (Proteon)

5		MB- MDA- 231 (humano)	4T1 (murino)	MK- 1 (cyno)	CD73 humano	CD73 murino	CD73 cyno
	CD730010	8000	6100	ND	3580	2470	1920
	CD730010GL9	8949	16365	164 60	1640	ND	ND
10	P32E	178	145	110	63	35	27
	C1	179	95	160	29	6	12
	C2	158	67	105	23		
	G10	354	259	258	9		
15	HPT	739	5812	113 8	548		
	GRVE	125	88	101	29		
	73combo1 (C1+GRVE+HPT)	157	150	90	7	2	8
20	73combo2 (C2+GRVE+HPT)	166	64	74	5		
	73combo3 (D3+GR VE+HPT)	154	113	84	4	1	7
	73combo5 (G10+GRVE+HPT)	169	205	78	7		
25	73combo6 (GRVE+ HPT)	166	82	107	15		
	CD730002	52	50	52	7	40	15
	CD730002 2C5	84	55	63	9	22	9

EJEMPLO 13: Internalización de anticuerpos anti-CD73

30

[00551] Se evaluó internalización de anticuerpos anti-CD73 en líneas celulares MDA-MB-231 y 4T1 usando el ensayo FabZAP

(Advanced Targeting Systems, San Diego CA). Se incubaron líneas celulares en presencia de anticuerpos anti-CD73 y reactivo FabZAP. Después de 3 días, se midió la proliferación celular para calcular los valores de CE50 y la toxicidad máxima (Tabla 15). Los datos de FACS muestran que la tasa de internalización de los anticuerpos de afinidad optimizada es baja.

[00552] Tabla 15: Internalización de anticuerpos anti-CD73

	MDA-MB-231		4T1	
	CE50 [pM]	toxicidad máx	CE50 [pM]	toxicidad máx
CD730010	158.3	84%	ND	ND
L1-P32E	15.7	95%	123.8	92%
73combo1	3.8	97%	33.1	97%
73combo3	3.5	97%	18.5	97%
CD730002	7.1	95%	205.6	83%
CD730002 2C5	9.1	98%	172.6	82%
Phen0203	92.5	91%	ND	ND

[00553] En otro experimento, se evaluó la internalización de anticuerpos en líneas celulares analizando el efecto citotóxico de conjugados de anticuerpo anti-CD73/saporina en líneas celulares positivas para CD73 (Tabla 15). Se conjugaron directamente anticuerpos anti-CD73 con toxina saporina usando las químicas S-HyNic y 4FB (Solulink, San Diego CA) y se determinó la concentración de conjugado de anticuerpo/saporina necesaria para inhibir el crecimiento celular en un 50 %.

[00554] TABLA 15: Caracterización de anticuerpos anti-CD73.

	Anticuerpo	1/CE ₅₀ (nM)				
		Unión			Inhibición enzimática	Internalización
		Ser humano	Ratón	Cyno	rCD73	MDA-MB-231
5						
	CD730002	1.0E-001	2.4E-002	2.0E-001	2.10E-02	1.20E+01
10						
	CD730003	1.8E-004	2.3E-004	4.8E-005	2.00E-03	7.00E-03
	CD730004	2.3E-005	2.3E-004	2.0E-006	0.00E+00	6.00E-02
	CD730008	1.1E-003	5.8E-004	1.1E-003	0.00E+00	1.10E-01
15						
	CD730010	3.4E-003	2.4E-003	3.3E-003	6.20E-03	3.30E-01
	CD730011	2.1E-003	1.5E-003	2.7E-003	0.00E+00	6.80E-04
20						
	CD730021	8.5E-004	5.7E-004	1.2E-003	1.10E-03	9.50E-03
	CD730042	1.7E-003	0.0E+000	1.4E-003	0.00E+00	3.20E-03
	CD730046	4.1E-003	5.2E-003	1.0E-002	0.00E+00	8.10E-02
25						
	CD730047	0.0E+000	0.0E+000	0.0E+000	1.00E-03	2.70E-02
	CD730068	ND	ND	ND	0.00E+00	0.00E+00
30						
	CD730069	ND	ND	ND	3.80E-02	1.30E-03

EJEMPLO 14: El anticuerpo anti-CD73 humano, hIgG1 Phen0203, inhibía la supresión mediada por AMP de la proliferación de células T CD4+CD25- in vitro, de una manera dependiente de la concentración.

- 5 **[00555]** Se realizó un estudio para determinar la capacidad de un anticuerpo anti-CD73 (Phen0203) para aliviar la supresión de células T mediada por AMP in vitro. En este estudio in vitro, se examinó la capacidad de un anticuerpo anti-CD73 humano (hIgG1 Phen0203) para inhibir la catálisis de adenosina monofosfato en adenosina y fosfato orgánico por CD73 y el posterior impacto sobre la función de las células T. hIgG1 Phen0203 tiene propiedades funcionales similares a MEDI9447, incluyendo la capacidad de inhibir la actividad enzimática celular y bioquímica de CD73 in vitro).
- 10
- 15 **[00556]** El anticuerpo hIgG1 Phen0203 es un mAb IgG1 humano sin modificación por ingeniería genética en la región constante de la cadena pesada. De forma similar a MEDI9447, también se une selectivamente e inhibe la producción de adenosina inmunosupresora por la actividad ectonucleotidasa de CD73 humano. Sin embargo, Phen0203 carece de reactividad cruzada contra CD73 de ratón.
- 20
- 25 **[00557]** En un ensayo de supresión de células T mediada por AMP, se aislaron células T humanas primarias CD4⁺ que se habían separado de células CD25⁺ a partir del contenido de capas leucocitarias y se usaron como células efectoras; cada capa se procesó por separado. En resumen, el contenido de una capa leucocitaria se diluyó en PBS, después se estratificó sobre Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Chalfont St Giles, Reino Unido) y se centrifugó a 400×g durante 40 minutos con los frenos apagados. Después, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de la
- 30

interfase y se lavaron con PBS por centrifugación a 200×g durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y las células se suspendieron en PBS. Se determinaron las células viables, después se sedimentaron a 350×g durante 5 minutos y se suspendieron en tampón Robosep (Stem Cell, Grenoble, Francia) a una concentración de 5×10^7 por ml. Se aislaron células T CD4⁺ a partir de PBMC por selección negativa usando el kit de enriquecimiento de células T CD4⁺ humanas EasySep (Stem Cell, Grenoble, Francia) y el RoboSep (Stem Cell, Grenoble, Francia). Las células T CD4⁺ purificadas se sedimentaron y resuspendieron a 1.5×10^7 por ml en tampón Robosep. Se añadieron Dynabeads CD25 (un componente del kit de células T CD4⁺CD25⁺ de Dynabeads Regulatory; Life Technologies, Paisley, Reino Unido) a 200 µl por 1.5×10^7 células y se incubaron durante 25 minutos a 4°C con mezcla continua. Después, las células se pusieron en un imán DynaMag-15 (Life Technologies, Paisley, Reino Unido) durante 1 minuto y el sobrenadante que contenía las células efectoras CD4⁺CD25⁻ se transfirió a un nuevo tubo.

20 **[00558]** Las células efectoras aisladas se marcaron con sonda CFSE (3 µM) usando el kit de proliferación celular CellTrace CFSE (Life Technologies, Paisley, Reino Unido) a una densidad celular de 1×10^6 células por ml en PBS que contenía BSA al 0.1 % con un periodo de incubación de 15 minutos a 37°C. Las células se lavaron dos veces con medio X-Vivo 15 caliente y se suspendieron a 5×10^5 células por ml en el mismo medio. Las células efectoras marcadas se activaron durante 1 hora a 37°C añadiendo 25 µl de microperlas recubiertas con anti-CD3 y anti-CD28 (Dynabeads human T-activator CD3/CD28; Life Technologies, Paisley, Reino Unido) por 1×10^6 células y 60 UI/ml de rhIL-2.

Posteriormente, se añadieron células CD4⁺CD25⁻ activadas (aproximadamente 50,000 en 100 µl) a pocillos de placas de 96 pocillos de fondo redondo. Se realizaron diluciones seriadas de los siguientes reactivos en medio X-Vivo 15 (Lonza, Slough, Reino Unido): artículo de ensayo hIgG1 Phen0203 y anticuerpo de control R347,

[00559] A las células de la placa se les añadieron 50 µl de reactivos diluidos seguidos de 50 µl de X-Vivo 15 (Lonza, Slough, Reino Unido) que contenía una concentración 400 µM u 800 µM de AMP (Sigma-Aldrich, Gillingham, Reino Unido). También se incluyeron los siguientes pocillos de control: células CD4⁺CD25⁻ marcadas con CFSE activadas sin AMP (control activado); células CD4⁺CD25⁻ marcadas con CFSE con AMP pero sin artículos de ensayo/control (control no tratado); y células CD4⁺CD25⁻ marcadas con CFSE no activadas (control de reposo) sin AMP. Las células en el ensayo se sedimentaron suavemente por centrifugación a 100×g durante 2 minutos y se pusieron en una incubadora de cultivo de tejidos humidificado a 37°C con CO₂ al 5 % durante 72 horas.

[00560] Después de 72 horas de incubación, las células se sedimentaron por centrifugación a 380 g durante 4 minutos, se lavaron una vez con 100 µl de tampón FACS (eBioscience, Hatfield, Reino Unido) y finalmente se suspendieron en 100 µl de PBS que contenía un 3.7 % de formaldehído para el análisis por citometría de flujo en un BD FACSCanto II (BD Biosciences, Oxford, Reino Unido). Se usaron células CFSE⁺ CD4⁺CD25⁻ en reposo sin pocillo de AMP para identificar las células que habían experimentado división celular (células divididas).

[00561] Se observó que CD73 se expresaba en una subserie de células T CD4⁺. En presencia de AMP extracelular, las

células T CD73⁺ tienen el potencial de permitir rutas paracrinas/autocrinas que implican el metabolismo de AMP para dar adenosina por CD73, seguido por la activación de los receptores de adenosina y la posterior regulación de la función de las células T. Esta ruta de CD73/adenosina se modeló *in vitro* usando células T humanas primarias CD4⁺CD25⁻ purificadas activadas por señalización de TCR y rhIL-2. La proliferación de células T se suprimió en presencia de una concentración 100 o 200 μ M de AMP extracelular.

10 **[00562]** hIgG1 Phen0203, un anticuerpo anti-CD73 humano, era capaz de inhibir la supresión mediada por AMP de la proliferación de células T CD4⁺CD25⁻ *in vitro*, de una manera dependiente de la concentración. Los datos proporcionan un fundamento científico para una estrategia de anticuerpo anti-CD73 que se dirige a los efectos inmunosupresores de la ruta de AMP/CD73/adenosina.

EJEMPLO 15: Mapeo de epítipo y parátipo de MEDI9447

[00563] Para identificar la interfase de unión de MEDI9447 y CD73, se realizó un análisis MS con intercambio de hidrógeno-deuterio (HDX-MS) con Fab MEDI9447 y CD73 soluble recombinante (sCD73) solos o en complejo (Figuras 19A, 19B y 20A-20E). En los últimos años, la MS con intercambio de hidrógeno-deuterio (HDX-MS) ha resultado ser una herramienta poderosa para mapear sitios de interacción proteína-proteína y caracterizar la estructura y la dinámica conformacional de las proteínas. Aprovechando el marcaje diferencial de regiones de proteínas de una manera mediada por accesibilidad del disolvente, se han mapeado satisfactoriamente epítopos de anticuerpos usando HDX-MS. La comparación de la cinética del intercambio de hidrógeno entre CD73 libre y complejo reveló dos regiones localizadas dentro del dominio N-

terminal de sCD73 (aminoácidos (aa) 132-143 y 182-187) que presenta una menor captación de deuterio cuando está unido a Fab (Figuras 19A, 20A y 20B). La región 132-143 (HDX_E1) mostró un cambio significativo en la captación solo en los puntos de tiempo de exposición más cortos. A los tiempos de exposición más largos no hubo diferencia en el intercambio. Sin limitarse por una teoría particular, esto indica que el sitio solo está parcialmente protegido del disolvente. Por el contrario, el grado de captación diferencial del deuterio en la región 182-187 (HDX_E2) aumentaba con el tiempo de exposición. Sin limitarse por una teoría particular, esto es coherente con una interacción proteína-proteína de alta afinidad que reduce la accesibilidad del disolvente (Figura 19A). El análisis del Fab mostró que la región determinante de complementariedad (CDR) 1 y 3 de la cadena pesada, y la CDR1 y CDR2 de la cadena ligera presentaban la mayor reducción en el intercambio cuando estaban formando un complejo con CD73, lo que indica que estas regiones son los constituyentes principales del parátipo (Figuras 20C y 20D). Aunque los aa 132-143 (HDX_E1) y 182-187 (HDX_E2) de CD73 son discontinuos en el espacio de secuencia, están adyacentes cuando se mapean en la estructura plegada de CD73 (Figura 19B). Se observaron diferencias en el intercambio de hidrógeno en otras regiones dentro de CD73. Sin embargo, la mayor parte de los cambios de masa, incluyendo los de péptidos que contiene restos de unión al sustrato y del sitio activo conocidos, no fueron estadísticamente significativos (Figuras 19A y 20E).

[00564] Como HDX afecta a los cambios dependientes de contexto en la exposición al disolvente del esqueleto polipeptídico, se requiere validación para distinguir entre

las diferencias en el intercambio de hidrógeno debidas al enmascaramiento del esqueleto dentro de la interfase de epítipo-parátipo frente a las alteraciones conformacionales inducidas indirecta o alostéricamente por la unión del anticuerpo. Para determinar si HDX_E1 y HDX_E2 constituían el epítipo de MEDI9447, se evaluó la unión del anticuerpo a mutantes de CD73 quiméricos con intercambio de dominio (Figuras 21A-21H y Tabla 16).

[00565] Tabla 16: Unión de MEDI9447 a variantes de CD73

Construcción de CD73	Posición de intercambio/mutación de KO	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)
CD73 humano de tipo silvestre	TS huCD73	4.20E-12	4.63E+06	1.94E-05
KO_Nterm+Cterm	KO_1-291+311-523	Sin unión		
KO_Nterm	KO_1-291	Sin unión		
KO_Enlazador	KO_292-310	4.14E-12	5.57E+06	2.31E-05
KO_Cterm	KO_311-523	1.70E-12	4.75E+06	8.10E-06
HDX_E1	KO_132-143	9.90E-12	2.15E+06	2.12E-05
HDX_E2	KO_182-187*	2.83E-09	5.73E+06	1.62E-02
HDX_E1+E2	KO_132-143+182-187*	4.43E-09	4.76E+06	2.11E-02
V144K	V144K	8.14E-11	1.13E+06	9.18E-05
K180A	K180A	4.35E-11	3.45E+06	1.54E-04
N185G	N185G*	2.69E-11	9.11E+06	2.45E-04
V144K+K180A	V144K+K180A	2.68E-09	1.58E+06	4.25E-03
V144K+N185G	V144K+N185G	Sin unión		
K180A+N185G	K180A+N185G	Sin unión		

***Valores cinéticos derivados de un ajuste 2:1.**

[00566] El intercambio de dominio es una técnica por la que un homólogo de la proteína diana (es decir, human CD73) que no se une al anticuerpo de interés se usa para generar quimeras que revelan los restos que componen el epítipo. En lugar de introducir deleciones, el intercambio de secuencias entre homólogos minimiza la probabilidad de romper globalmente la estructura de la proteína o prevenir la expresión de la proteína. CD73 de *Gallus gallus* (pollo) comparte ~65 % de identidad de secuencia con CD73 humano maduro (Figura 22). Cuando se eliminaron el dominio N-terminal (KO_1-291) de CD73 humano o los dominios tanto N-

como C-terminal (KO_1-291+311-523) por reemplazo por la secuencia de pollo correspondiente, se perdió la unión de las quimeras sometidas a intercambio a MEDI9447 (Figuras 21A-21H y Tabla 16). La eliminación solo del dominio C-terminal (aa 311-523) o de la región enlazadora de hélice alfa (aa 292-310) no afectó a la unión en comparación con la proteína de tipo silvestre (WT) (Figuras 21A, 21D, 21E y Tabla 16). Estos resultados son coherentes con una localización del epítipo dentro del dominio N-terminal de CD73. A continuación, se eliminó cada región de interfase de HDX por separado y en combinación. La unión de MEDI9447 a KO_HDX_E1 fue comparable a CD73 WT, aunque había una reducción minoritaria en la tasa de asociación k_a (Figura 21F y Tabla 16). Por el contrario, la afinidad de unión por KO_HDX_E2 era significativamente más débil que la de CD73 WT, dirigida por una disociación más rápida (Figura 21F y Tabla 16). La eliminación de ambas regiones (KO_HDX_E1+E2) dio como resultado solo una pequeña reducción en la unión en comparación con la región E2 sola (Figura 21G y Tabla 16). Estos hallazgos indican que aunque la región 182-187, y en una menor medida 132-143, contienen restos importantes para la unión de anticuerpos, otros restos fuera de la interfase identificada de HDX componen el epítipo.

[00567] Para definir completamente el epítipo de MEDI9447, se generó un panel de quimeras sometidas a intercambio de secuencia reemplazando tramos de ~70 aa del dominio N-terminal de CD73 humano con la secuencia de pollo correspondiente (Figuras 22, 23A y 23B). La eliminación de la región 2 (DS2) o 3 (DS3) solas reducía la unión y el intercambio de las dos regiones conjuntamente (DS2_3) y anulaba la unión (Figuras 23A y 23B). La eliminación de la

región 4 (DS4) o una parte de la región 1 (DS1a) (el intercambio de la región completa impedía la expresión) no afectaba a la unión (Figuras 23A y 23B). El análisis de la unión con quimeras que contenían regiones intercambiadas de ~20-30 aa revelaba que la subregión DS2d (aa 135-152) y DS3b (aa 171-188) contienen restos que afectan a la unión de MEDI9447 (Figuras 23A y 23B). Cuando una parte de las subregiones 2d (DS2dmod) se intercambió con la región 3b (DS2dmod_3b), se perdió la unión (Figuras 23A y 23B). Es importante indicar que estas dos subregiones incluyen la interfase identificada por el estudio de HDX (Figura 22). La observación de que el intercambio de las dos regiones de HDX conjuntamente no anulaba la unión indica que los restos adicionales que median la unión están localizados dentro de las subregiones 2d y 3b, pero no dentro de los sitios identificados de HDX. Para localizar estos restos de epítipo adicionales, se evaluó la unión del anticuerpo a un panel de quimeras de CD73 que contenían mutaciones puntuales únicas, o una combinación de mutaciones puntuales e intercambio de regiones. También se realizó mutagénesis de alanina en restos dentro y espacialmente próximos a la interfase de HDX que están conservados entre CD73 de pollo y humano (Figuras 22, 23A y 23B). Estos análisis revelaron que V144, K180 y N185 son los restos de epítipo primarios, siendo N185 el más importante (Figuras 23A, 23B y 24). La combinación de una mutación N185G con K180A o V144K anulaba la unión mientras que la mutación K180 y V144 juntas daban como resultado una reducción en la unión (Figuras 23A y 23B). Además de K180, se observó que otros tres restos conservados, Y135, K136 y N187 efectuaban la unión, pero en una menor medida (Figuras 23A, 23B y 24A). El impacto de estos tres últimos restos se

reveló mutándolos a alanina en el contexto de un fondo KO con intercambio de dominios; como las mutaciones puntuales exclusivas tuvieron un impacto mínimo o nulo sobre la afinidad (Figuras 23A y 23B). Para validar V144, K180 y N185 como constituyentes importantes del epítipo, se reemplazó CD73 de pollo con V144 y N185 (K180 está conservado). La presencia de estos tres restos confería unión por MEDI9947 a una afinidad sub-nanomolar ($K_D = 79$ pM) (Figuras 23A, 23B y 24B). Sin limitarse por una teoría particular, esto indica que la unión de MEDI9447 a CD73 está mediada principalmente por estas tres posiciones de aminoácidos. Es importante destacar que, aunque el análisis de HDX identificó la localización general de la interfase de unión, dos de los tres restos de epítipo importantes no estaban contenidos dentro de péptidos que presentaban cambios en el intercambio de hidrógeno (Figuras 20A y 20B).

[00568] La superposición del epítipo identificado sobre la estructura de CD73 muestra que el sitio de unión está identificado en la superficie lateral apical de la conformación abierta de CD73 (Figuras 24C-24E). N185 está situado cerca del ápice del dominio N-terminal en una región de bucle que se extiende hacia el exterior desde la hélice G, que contiene K180 (Figura 24C). Localizados en la cadena β 6 y adyacentes a K180, están Y135 y K136. V144 está posicionado dentro de la cadena β 7, en estrecho contacto con N187 (Figura 24C). Colectivamente, las cadenas laterales de estos restos forman una superficie de unión casi contigua (Figura 24D). Cuando se visualiza en la estructura abierta del monómero de CD73, es evidente que el epítipo está tanto en la cara opuesta como espacialmente distante del sitio de unión al sustrato (Figura 24F). Además, el sitio de unión no

incluye ningún resto del sitio activo, incluyendo los que coordinan la interacción con el cofactor Zn^{2+} c(Figura 24F). Sin limitarse por una teoría particular, se predijo que MEDI9447 no compite por la unión al AMP sino que en su lugar
5 inhibe la actividad enzimática de CD73 a través de un mecanismo alostérico potencial, basándose en la posición del epítipo.

EJEMPLO 14: MEDI9447 inhibía la actividad enzimática de CD73

- 10 **[00569]** Para caracterizar el modo de inhibición de MEDI9447, primero se examinó la cinética de la hidrólisis de AMP por sCD73 en presencia de MEDI9447 o el inhibidor no hidrolizable de CD73, APCP. MEDI9447 no inhibía competitivamente sCD73, como se demostraba por la reducción
15 de $V_{\text{máx}}$ (4.59 ± 0.26 vs 1.21 ± 0.03), independientemente de la concentración del sustrato (Figura 25A). Por el contrario, APCP aumentaba la constante de Michaelis K_m (75.85 ± 3.36 vs 26.03 ± 3.87), pero no reducía $V_{\text{máx}}$ (3.35 ± 0.04 vs 3.50 ± 0.11), lo cual está de acuerdo con los descubrimientos previos de
20 que APCP es un inhibidor competitivo de CD73 (Figura 25B). Estos resultados muestran que MEDI9447 bloqueaba la capacidad de sCD73 de hidrolizar AMP. Además, indican que MEDI9447 no bloquea la unión del sustrato a AMP, lo cual es coherente con la posición del epítipo.
- 25 **[00570]** A continuación, se ensayó la inhibición de sCD73 en función de la concentración creciente de MEDI9447 en un formato de IgG o Fab. La IgG MEDI9447 inhibía la actividad de sCD73 de una manera dosis-respuesta, consiguiéndose la inhibición máxima a una relación molar de ~1:1 entre la IgG
30 y el dímero de sCD73 (Figura 25C). Sin embargo, cuando la IgG estaba en exceso estequiométrico con respecto a sCD73,

se observó una pérdida de inhibición (Figura 25C). Este denominado "efecto gancho" se ha observado en otros inmunoensayos y puede ser el resultado de la unión de anticuerpo monovalente dirigida por brazos de Fab en la misma molécula de IgG que compite por sitios de unión limitante en el antígeno diana. Coherente con esta observación, el formato de Fab de MEDI9447 no inhibía la actividad de sCD73 (Figura 25C). Conjuntamente, estos resultados indican que la interacción bivalente de MEDI9447 es necesaria para inhibir la función de sCD73.

EJEMPLO 15: MEDI9447 prevenía la transición conformacional de CD73 al estado cerrado

[00571] Los estudios estructurales previos de CD73 revelaron que la actividad enzimática de CD73 requiere transición entre una conformación "abierta" y "cerrada". En el estado abierto, la enzima es inactiva, mientras que en el estado cerrado se forma el sitio activo, permitiendo la hidrólisis del sustrato. La determinación de la estructura cristalina de CD73 humano mostró que la transición entre los conformeros abiertos y cerrados requiere el plegamiento y la rotación extensiva de la región enlazadora de alfa-hélice para permitir que el dominio N-terminal se reposicione contra el dominio C-terminal para formar el sitio activo. Se propuso la hipótesis de que el encaje de cada brazo de Fab de MEDI9447 sobre dos dominios N-terminales de CD73 podía formar un puente que restringe la transición de CD73 desde el estado abierto inactivo al estado cerrado catalíticamente activo. Para ensayar si MEDI9447 inhibe la transición conformacional de CD73, se utilizó un anticuerpo, mAb A, que se creó como indicador de la conformación de CD73. El mapeo de la interfase de unión del mAb A mostró que interacciona tanto

con el dominio N-terminal como con el dominio C-terminal de CD73 (Figuras 26A-26C). Considerando la localización de la región de unión, se postuló que el epítipo estaría presente en el confórmero abierto de CD73, pero alterado en el

5 confórmero cerrado (Figura 26B). Para ensayar esto, se midió la unión del mAb A a sCD73 abierto, sin sustrato, y a sCD73 cerrado (Figuras 27A-27C). Para inducir la conformación cerrada, sCD73 se preincubó con Zn^{2+} y APCP; este cofactor y sustrato no hidrolizable se usaron previamente para generar

10 la estructura cristalina del confórmero cerrado de CD73 humano. El análisis de unión mostró que el mAb A se une a sCD73 abierto, pero la unión se anula cuando CD73 se preincuba con Zn^{2+} y APCP (Figura 27A). Sin limitarse por una teoría particular, este descubrimiento es coherente con que

15 el epítipo de mAb A esté presente únicamente en la estructura abierta de CD73. Por el contrario, la unión de MEDI9447 no era sensible al estado de CD73, lo que indica que puede unirse a CD73 sin sustrato o unido (Figura 27A). La pérdida de unión por mAb A era dependiente tanto de Zn^{2+} como de APCP

20 (Figura 28A). Habiendo establecido que la unión del mAb A afecta al estado conformacional de CD73, a continuación se ensayó el efecto de MEDI9447 sobre la transición estructural inducida por Zn^{2+} /APCP de CD73. mAb A se unía a sCD73 que se había preincubado con MEDI9447, indicando que los dos

25 anticuerpos se unen a epítopos distintos (Figura 27B). Es importante destacar que, cuando el complejo sCD73-MEDI9447 se incubaba posteriormente con Zn^{2+} y APCP, se mantenía la unión por mAb A (Figura 27B). Por el contrario, una IgG de control y un formato Fab de MEDI9447 no restauraba la unión

30 del mAb A cuando se precomplejaba con sCD73 antes de la adición de Zn^{2+} y APCP (Figura 28B). Estos resultados

confirman la hipótesis de que la unión de MEDI9447 bivalente impide la transición de sCD73 desde el estado abierto a la conformación cerrada hidrolíticamente activa. La observación de que la unión del mAb A solo se mantiene parcialmente cuando MEDI9447 está unido indica que Zn^{2+} y APCP pueden inducir que CD73 adopte un intermedio catalíticamente inactivo que se une con menor afinidad al anticuerpo indicador (Figura 27C).

EJEMPLO 16: sCD73 y MEDI9447 formaban complejos con puentes interdiméricos

[00572] La actividad inhibidora observada de MEDI9447 podría producirse a través de un dominio N-terminal, formación de puentes interdiméricos de una sola molécula de CD73 o a través de formación de puentes intradiméricos de moléculas de CD73 distintas. Para distinguir entre estos escenarios, se caracterizó el tamaño de los complejos formados en solución. Basándose en la masa medida de MEDI9447 y CD73 no unidos (145 y 125 kilodaltons (kD), respectivamente), el tamaño previsto de un complejo 1:1 con puentes interdiméricos de anticuerpo con CD73 sería de ~270 kD (Figura 29A). Cuando MEDI9447 y sCD73 se unieron a una relación molar 1:1, se formaron dos complejos. La especie predominante tenía una masa molar media ponderal (Mw) de ~1.74 megadaltons y la especie menos abundante tenía un Mw de ~0.66 kD (Figura 30A). El Mw del complejo más grande es coherente con un oligómero que contiene siete dímeros de CD73 y seis IgG ($7 \times 125 \text{ kD} + 6 \times 150 \text{ kD} = 1.745 \text{ megadaltons}$). Cuando MEDI9447 es limitante (0.5:1, 0.1:1), se forman complejos de Mw comparable, pero la diferencia relativa en abundancia de cada especie está menos pronunciada (Figura 30A). Los complejos con MEDI9447 se compararon con los

formados con un anticuerpo anti-CD73 diferente, mAb B. El análisis de unión de mAb B a un panel de quimeras de CD73 con dominios intercambiados mostró que se une a una región dentro del dominio N-terminal de CD73 que, al contrario de
5 MEDI9447, está próxima al surco formado entre los monómeros de CD73 (Figuras 29B y 19B). Se postuló que la unión a esta superficie situada internamente puede impedir que los brazos de Fab del mAb B se unan a través de los dímeros de CD73. De hecho, el SEC-MALS mostró que el mAb B forma complejos de
10 ~270-295 kD, un Mw próximo al predicho para una interacción 1:1 (Figura 30C). Colectivamente, los descubrimientos indican que MEDI9447 forma puentes interdiméricos entre múltiples dímeros de sCD73 y que la generación de estos oligómeros se confiere por el epítipo.

15 **EJEMPLO 17: MEDI9447 inhibía el CD73 anclado a través de interacción monovalente**

[00573] Aunque CD73 se desprende de la superficie celular *in vivo* y conserva la actividad enzimática en su forma soluble, la mayor parte del CD73 nativo existe en formato
20 anclado por GPI. A la luz de esto y del hecho de que los estudios anteriores se realizaron con una forma soluble de CD73, fue necesario caracterizar la actividad de MEDI9447 con CD73 en un estado inmovilizado. La captura de CD73 recombinante a través de un marcador de seis histidinas C-
25 terminal en placas de microtitulación recubiertas con níquel permitió ensayar la actividad enzimática de CD73 inmovilizado que está orientado espacialmente de una manera que se parece a la del CD73 anclado por GPI en la superficie celular. De forma similar a los resultados previos de los
30 presentes inventores, la IgG MEDI9447 inhibía la hidrólisis de AMP de una manera dependiente de la dosis (Figura 31A).

Sin embargo, cuando el anticuerpo estaba en exceso molar con respecto al dímero de CD73, no se observó pérdida de inhibición o efecto gancho (Figuras 31A y 32). Inesperadamente, el Fab MEDI9447 también inhibía la actividad de CD73, pero con una inhibición máxima menor en comparación con la IgG MEDI9447 (Figuras 31A y 32). Estos resultados indican que, a diferencia del CD73 soluble, el CD73 anclado puede inhibirse mediante interacción de anticuerpo monovalente. La diferencia en inhibición entre la IgG y el Fab sugería que el tamaño de la molécula de anticuerpo puede dictar potencia. Para investigar esto, se preincubó Fab MEDI9447 con un anticuerpo anti-Fd (xFd) en condiciones tales que un brazo de Fab del anticuerpo xFd se une a un Fab MEDI9447 y el otro brazo se une a un Fab policlonal no específico (pFab) (Figura 31B). La formación de este complejo aumentaba eficazmente el tamaño del Fab MEDI9447 mientras que mantenía monovalencia para CD73. Este xFd-Fab unido inhibía la actividad de CD73 en un grado equivalente a IgG MEDI9447 (Figura 31A). Para validar esta observación, la inhibición por anticuerpo de CD73 expresado de forma endógena se midió en la línea celular de cáncer de mama epitelial humano MBA-MD-231. De forma similar a CD73 recombinante inmovilizado, CD73 anclado por GPI se inhibía de forma robusta por la IgG MEDI9447, de forma modesta por el Fab MEDI9447 y la preunión de Fab al anticuerpo xFd aumentaba la inhibición máxima a un nivel equivalente al de IgG (Figura 31C). Por último, se ensayó la inhibición de sCD73 por el Fab MEDI9447 unido a uno o a los dos brazos del anticuerpo xFd. A diferencia de CD73 unido a la superficie, sCD73 no se inhibía por el Fab MEDI9447 unido a un solo brazo de xFd (Figura 31D). Sin embargo, al conferirse divalencia

por la unión del Fab MEDI9447 a los dos brazos de xFd se produjo una inhibición de sCD73 comparable con la de IgG MEDI9447 (Figuras 31B y 31D). Estos descubrimientos muestran que el CD73 anclado a la superficie puede inhibirse por la unión de anticuerpos monovalentes y que la potencia está mediada por el tamaño del anticuerpo. Esto está totalmente en contraste con sCD73, que solo se inhibe por MEDI9447 a través de interacción bivalente.

EJEMPLO 18: MEDI9447 inhibe el cambio conformacional de CD73 y la hidrólisis de AMP por un mecanismo de acción dual no competitivo

[00574] Como se describe en el presente documento, se determinó el epítipo y mecanismo de acción de un anticuerpo monoclonal terapéutico que inhibe la actividad enzimática de CD73. Los resultados de este estudio revelaron un sitio de unión dentro del dominio N-terminal de CD73 que permitía la inhibición a través de dos mecanismos distintos. Es importante destacar que esta característica confiere a MEDI9447 la capacidad de bloquear tanto el CD73 soluble como el CD73 anclado a la superficie celular de una manera no competitiva.

[00575] Usando HDX-MS, se identificó la interfase de unión entre CD73 y el Fab MEDI9447. Debido a los péptidos relativamente grandes derivados de la digestión con pepsina, el sitio de interacción identificado por el análisis de intercambio era relativamente amplio, abarcando un total de dieciocho aminoácidos a través de dos péptidos discontinuos. Los experimentos de mutagénesis y de intercambio de dominio mostraron que solo una subserie de estos restos influían en la unión del anticuerpo y dos de los tres aminoácidos con más impacto (V144 y K180) estaban contenidos dentro de

péptidos que no presentaban un intercambio de hidrógeno diferencial. Una explicación de esta discrepancia es que, aunque las cadenas laterales de V144 y K180 pueden estar ocluidas debido al contacto con restos de CDR de anticuerpos, los átomos de hidrógeno de amida del esqueleto polipeptídico asociado que experimentan intercambio con deuterio pueden estar relativamente expuestos al disolvente. Los resultados de HDX-MS también mostraron que la región compuesta de los aa 132-143 solo presentaba un cambio significativo en la cinética de intercambio a los puntos de tiempo de exposición más cortos. Sin limitarse por una teoría particular, esto indicaba que la unión a esta región es relativamente débil. De hecho, los dos restos que se observó que afectaban a la unión dentro de esta región (Y135 y K136) solo tenían un efecto minoritario sobre la afinidad de MEDI9947 (Figuras 23A y 23B). Por el contrario, la región con el intercambio diferencial más significativo, aa 182-187, contenía el resto más importante para la unión (N185). Al estar ausente una estructura co-cristalina, no puede excluirse formalmente la posibilidad de que algunos restos que estaban descontados como elementos de interacción con MEDI9447 formaran de hecho contactos con el parátipo. Sin embargo, el análisis de unión del mutante extensivo indica que estos restos potenciales contribuirían de forma mínima a la termodinámica de la unión. Como CDR3 de la cadena pesada es importante para la formación de sitios de contacto de antígeno, esta CDR presentaba el mayor grado de intercambio diferencial. Los resultados de HDX también indicaron que la cadena ligera es importante para la unión del antígeno, particularmente CDR1 y 2 (Figuras 20C y 20D). Colectivamente, estos resultados destacan tanto la utilidad de HDX-MS en el mapeo de epítomos como la

importancia de la validación de la interfase de unión predicha por una técnica ortogonal tal como mutagénesis.

[00576] La localización del epítipo en una posición dentro del dominio N-terminal que está distante de la unión al sustrato de CD73 y los restos del sitio activo es coherente con los resultados que muestran que MEDI9447 tiene un modo de inhibición no competitivo. Basándose en la huella del epítipo solo, se podría proponer la hipótesis de que el anticuerpo actúa como un inhibidor alostérico clásico, induciendo un cambio conformacional de largo intervalo en CD73 que distorsiona los restos del sitio activo de una manera que impide la actividad hidrolítica. Sin embargo, los datos de HDX-MS no revelaban alteraciones significativas en la estructura de CD73 en regiones fuera de la interfase de unión que soportarían esta forma de alosteria. Como alternativa, el epítipo podría sugerir que la unión de MEDI9447 restringe el movimiento de bucles, cadenas β o hélices α dentro del dominio N-terminal que se necesita para la actividad catalítica. Contrario a esto, se notificaron diferencias de pequeñas a nulas en la estructura secundaria o terciaria dentro del dominio N-terminal entre las estructuras abierta y cerrada de CD73. Los cambios conformacionales interdominio locales que se producen se restringen al dominio enlazador y C-terminal.

[00577] Como alternativa a la inducción de un cambio estructural, se consideró que la localización del epítipo estaría bien situada para permitir la formación de puentes o la reticulación por el anticuerpo de dímeros de CD73 que restringirían un cambio necesario en la conformación. Este concepto de la formación de puentes se confirma por datos que muestran que se requería IgG para inhibir una forma

soluble de CD73 y que MEDI9447 forma complejos que contienen múltiples dímeros de CD73. Este último resultado estaba en contraste con el mAb B, que no formaba puentes interdiméricos, destacando la importancia del epítipo de
5 MEDI9447 para conferir esta actividad de reticulación. Racionalmente, si dos dominios N-terminales de CD73 se unen por dominios de Fab de la misma IgG, esto podría restringir físicamente el movimiento del dominio N-terminal y la región enlazadora que es necesaria para que la enzima adopte su
10 estructura activa cerrada. Mediante el uso del mAb A, que actúa como sonda conformacional del estado de CD73, se demostró que la unión de MEDI9447 impide que CD73 adopte el confórmero completamente cerrado, como se induce por Zn^{2+} y APCP. El nivel intermedio de unión por el indicador mAb A
15 cuando MEDI9447 estaba precomplejado con CD73 indica que aún se induce cierto grado de transición conformacional por Zn^{2+} y APCP. La unión del mAb A disminuida puede reflejar que este epítipo está parcialmente distorsionado en su estado intermedio, pero aún es suficiente para producir unión. Dado
20 el alto grado de flexibilidad de la región de bisagra, no es sorprendente que incluso cuando MEDI9447 está uniendo dímeros de CD73, aún haya alguna alteración estructural de CD73 debido a la unión al sustrato. Sin limitarse por una teoría particular, es difícil prever que la IgG unida
25 atrapara CD73 en una conformación completamente rígida.

[00578] Un resultado sorprendente de este trabajo es que además de la formación de puentes a través de interacción bivalente, MEDI9447 también puede inhibir CD73 cuando está
unido a la superficie a través de un mecanismo de unión
30 monovalente. Aunque inicialmente es sorprendente, un segundo mecanismo de bloqueo mediado por impedimento estérico de la

actividad de CD73 anclado es coherente con las observaciones descritas en el presente documento. La formación de CD73 anclado por GPI catalíticamente activo requiere que el dominio N-terminal rote hacia abajo, a una posición próxima a la superficie celular. El dímero de CD73 nativo es de ~130 kDa. En comparación el tamaño de una IgG o Fab (~150 kD y ~50 kD, respectivamente), es razonable que el anticuerpo unido al dominio N-terminal pudiera bloquear estéricamente la rotación completa de CD73 para adoptar la conformación cerrada. Este mecanismo se confirma por dos observaciones. En primer lugar, el hecho de que Fab presenta una menor inhibición máxima en comparación con la IgG coincide con un efecto estérico dependiente del tamaño. Es poco probable que la disparidad entre el Fab y la IgG se deba a diferencias en la unión ya que la afinidad del Fab sigue siendo sub-nanomolar ($K_D = 327$ pM, datos no mostrados). Además, la elevada conferida al aumentar el tamaño efectivo del Fab mediante conjugación con un anticuerpo xFd también confirma fuertemente un mecanismo estérico dependiente del tamaño y no de la valencia o avidéz. La segunda observación que confirma este modo de inhibición es que no se observó un efecto gancho o pérdida de inhibición por la IgG MEDI9447 cuando CD73 estaba unido a la superficie. Supuestamente, esto se debe a que el anticuerpo puede bloquear la hidrólisis de AMP por CD73 anclado a través de una interacción bi o monovalente (Figura 33). Por el contrario, se observa un efecto gancho cuando CD73 es soluble debido a la ausencia de una fase sólida requerida para el IgG o la Fab unida de forma monovalente para bloquear estéricamente la rotación del dominio N-terminal.

[00579] De esta manera, se propone un modelo por el que MEDI9447 antagoniza la función de CD73 soluble y anclado por GPI a través de un mecanismo doble de inhibición que está asociado integralmente con su epítipo (Figura 33). Aunque los estudios descritos en el presente documento muestran que MEDI9447 puede bloquear CD73 tanto soluble como unido, *in vivo* se desconoce si el CD73 anclado por GPI se inhibiría a través de uno o los dos mecanismos. Supuestamente, la densidad, orientación y distancia interdimérica de CD73 en la superficie celular dictaría el modo dominante de inhibición. Dado que la mayoría de las células cancerosas sobreexpresan CD73, que aumentaría la probabilidad de que los dímeros estuvieran próximos, es de esperar que MEDI9447 encajara en interacciones tanto bi como monovalentes. En tejido normal no tumoral, en el que la expresión de CD73 estaría a una densidad de superficie relativamente menor, MEDI9447 podría inhibir la hidrólisis de AMP principalmente a través del modo de bloqueo estérico.

[00580] Desde una perspectiva mecánica, el bloqueo de CD73 es una estrategia de inmunooncología distinta de la de dianas comparables tales como PD-1 y CTLA-4, para las que ya hay fármacos aprobados. Desde un punto de vista terapéutico, la actividad de MEDI9447 es ventajosa. Inhibe de forma competitiva CD73 y, por lo tanto, no tiene que competir con la unión de nucleótidos endógenos mediante bloqueo del sitio activo. Esto evita la posible reactividad cruzada hacia otras proteínas de unión de nucleótidos/laterales con sitios activos conservados estructuralmente. Además, MEDI9447 puede inhibir el CD73 tanto soluble como unido a la membrana a través de un encaje mono o bivalente. Sería de esperar que estas dos características contribuyeran a la eficacia *in*

vivo. Este mAb terapéutico tiene potencial inmunomodulador para el tratamiento de cánceres tanto solo como en combinación con agentes quimioterapéuticos existentes que se dirigen a rutas inmunomoduladoras complementarias.

- 5 Los resultados descritos anteriormente se realizaron usando los siguientes materiales y métodos.

Ensayo 1: ELISA directo

- [00581]** Se recubrieron placas ELISA de 384 pocillos con aproximadamente 1.5 ng/pocillo de proteína CD73
10 recombinante, bloqueados con 1 % de BSA/0.1 % de Tween20/PBS y se incubaron con muestras de anticuerpo durante 90 minutos a temperatura ambiente. Esto se siguió de incubación con conjugado de cabra-anti-Iglambda-peroxidasa de rábano
15 actividad HRP se detectó con sustrato tetra metil bencidina (TMB) y la reacción se detuvo con HCl 1 M. Las placas se leyeron a 450 nm.

Ensayo 2: ELISA de captura

- [00582]** Se recubrieron placas ELISA de 384 pocillos con
20 aproximadamente 3 ng/pocillo de anticuerpo Fd de oveja-anti-humano (para la exploración de anticuerpos en formato Fab), bloqueados con 1 % de BSA/0.1 % de Tween20/PBS y se incubaron con muestras durante 90 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadió proteína CD73 biotinilada durante 1 h a
25 temperatura ambiente. Esto se siguió de incubación con conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 30 min a temperatura ambiente. La actividad HRP se detectó con sustrato tetra metil bencidina (TMB) y la
30 reacción se detuvo con HCl 1 M. Las placas se leyeron a 450 nm.

[00583] Se usaron aproximadamente 50 ng/pocillo de CD73 recombinante biotinilado para explorar clones con mutaciones de un solo aminoácido. Para la selección de clones a partir de la biblioteca combinatoria, se usaron 10 ng/pocillo de
5 CD73 recombinante biotinilado.

Ensayo 3: Ensayo de unión de citometría de flujo

[00584] Todos los experimentos de citometría de flujo se realizaron a 4 °C y los reactivos se prepararon en tampón PBS/1 % de FBS. Se incubaron 10,000 con anticuerpo de ensayo
10 en un volumen de 50 ul durante 4 horas. Las células se lavaron dos veces y se incubaron en 50 ul de conjugado de cabra anti-IgGFc humana-AlexaFluor647 durante 15 minutos. Las células se lavaron, se resuspendieron en tampón suplementado con Dapi y se analizaron en un citómetro de
15 flujo. Las células muertas, identificadas por alta tinción Dapi, se excluyeron del análisis. Para la determinación de los valores de KD, una gráfica de la mediana de intensidad de fluorescencia en función de la concentración de anticuerpo de ensayo se ajustó de forma no lineal usando un modelo de
20 isoterma de un sitio de unión.

Ensayo 4: Generación de la biblioteca de anticuerpos con cambios de un solo aminoácido

[00585] Se realizó mutagénesis dirigida de los codones de CDR de CD730010 o CD730002 usando el QuikChange Lightning
25 Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) y cebadores. Cada codón se mutagenizó con un cebador que reemplazaba el codón de tipo silvestre con el codón NNS. Se clonaron genes VH y VL mutagenizados en un vector Fab para la expresión bacteriana. Se transformó la cepa de E.coli BL21(DE3) con la
30 biblioteca de anticuerpos, se repicaron colonias individuales y se cultivaron en Magic Media (Invitrogen)

durante 24 horas a temperatura ambiente para producir fragmentos Fab bacterianos. Se preparó sobrenadante bacteriano y se usó para explorar la biblioteca de anticuerpos en ensayos de unión ELISA.

5 **Ensayo 5: Generación de la biblioteca de anticuerpos con cambios de aminoácidos combinatorios**

[00586] Se clonaron los genes VH y VL de CD730010GL9 en un vector para la expresión de Fab bacteriana. Se realizó mutagénesis dirigida de los codones de CDR de CD730010GL9
10 usando el QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) o cebadores de PCR solapantes y degenerados. Los cebadores degenerados se diseñaron para codificar cambios de aminoácidos seleccionados así como el aminoácido parental en la misma posición. Se transformó la
15 cepa de E.coli BL21(DE3) con la biblioteca de Fab, se cultivaron colonias individuales en Magic Media (Invitrogen) durante 24 horas a temperatura ambiente para producir fragmentos Fab bacterianos. Se usaron sobrenadantes bacterianos para explorar la biblioteca de anticuerpos en
20 ensayos de unión ELISA.

Ensayo 6: Ensayo FabZAP

[00587] Se cultivaron 1,000 células/pocillo en placas de 96 pocillos en RPMI/10 % de FBS. Se mezclaron diluciones seriadas de anticuerpos anti-CD73 empezando a 5 nM con
25 reactivo FabZAP (Advanced Targeting Systems, San Diego CA) y se añadieron a las células. Después de 3 días de incubación a 37 °C, se midió la proliferación celular usando el ensayo CellTiter-Glo (Promega, Madison WI).

[00588] Los siguientes ensayos (Ensayos 7-11) se
30 realizaron usando los siguientes reactivos de anticuerpo y CD73.

[00589] Se construyó un plásmido de vector de expresión de mamífero que codificada CD73 humano maduro recombinante (posiciones de aminoácidos 1-526) (MedImmune). Para conseguir la expresión de una forma secretada soluble de CD73, se retiró el péptido señal de anclaje de GPI y se reemplazó con un marcador de 6x-histidina C-terminal. La numeración de la secuencia de CD73 está basada en la proteína madura sin el péptido señal (*NT5E* humano, secuencia de referencia NCBI NP_002517.1). Se generaron plásmidos que codificaban los mutantes "knock-out" (KO) con intercambios de dominio quiméricos de humano/pollo recombinantes usando gBlocks de ADN sintético (IDT, Inc.) que codificaban la secuencia de ADN de CD73 de pollo con codones optimizados (*NT5E* de pollo, secuencia de referencia NCBI XP_004940453.1). Basándose en el alineamiento con la secuencia de proteína CD73 humana, el aminoácido que codifica la posición 1 de posiciones que contienen un dominio N-terminal de pollo corresponde a la posición 20 de CD73 de pollo inmadura que contiene el péptido señal predicho. Se obtuvieron construcciones de ADN KO de longitud completa por PCR de extensión solapante individual de gBlocks y amplicones de PCR de CD73 humano. Todas las construcciones contenían un marcador de 6x histidina C-terminal. Se realizaron mutaciones puntuales individuales y múltiples en construcciones humanas y quiméricas por mutagénesis dirigida usando un kit de mutagénesis dirigida Quick Change Lightning Multi (Stratagene). Todas las construcciones de CD73 se expresaron en células HEK293 en suspensión. CD73 humano de tipo silvestre marcado con histidina (que carecía de la secuencia señal de anclaje de GPI) se purificó usando una columna de afinidad de níquel HisTrap (GE Healthcare Life

Sciences) por el grupo MedImmune Protein Sciences. Se confirmó que la proteína era un dímero en solución, con una masa molar de ~125 kDa (véanse las Figuras 18A y 18B). Todas las construcciones de CD73 mutante se expresaron por transfección transitoria de células HEK293 en suspensión usando 293Fectin (Life Technologies). Las células se cultivaron y transfectaron en medio 293Freestyle sin suero (Life Technologies) en bloques de pocillos profundos de 24 pocillos. Se recogieron los sobrenadantes de las células en bruto seis días después de la transfección y se filtraron a través de un filtro de 0.45 µm para retirar el desecho celular antes del uso. Las concentraciones de sobrenadante de variantes de CD73 se determinaron midiendo la unión de las proteínas marcadas con histidina a biosensores HIS2 (FortéBio/Pall Life Sciences) en un instrumento de interferometría de biocapa (BLI) Octet QK384 (FortéBio/Pall Life Sciences). Las concentraciones se calcularon usando el software de análisis de datos Octet comparando la señal de unión con una curva patrón generada a partir de diluciones de CD73 humana marcada con 6x-histidina recombinante purificada de concentración conocida. MEDI9447 (formatos de IgG1 humano e IgG1 de ratón), mAb A (IgG1 humana), y mAb B (IgG1 humana) y el Fab MEDI9447 (IgG1 humana) se expresaron y purificaron por los grupos MedImmune Protein Sciences y Expression. Las IgG se expresaron en células de mamífero y se purificaron por cromatografía de Proteína A y de exclusión molecular. Para generar Fab de MEDI9447, se dirigieron 10 mg de IgG durante 5 h a 37 °C con papaína inmovilizada (Thermo Scientific/Life Technologies) y el Fab se purificó usando una columna HiTrap Q (GE Healthcare Life Sciences).

Ensayo 7: Análisis de HDX-MS

[00590] Se prepararon muestras de CD73 humano recombinante y Fab MEDI9447 a una concentración de 2 mg/ml. El complejo CD73 + Fab se formó por preincubación a una relación de concentración de 1:1. Los experimentos de HDX entero se realizaron usando la Tecnología Waters HDX (Waters Corporation) equipada con un robot de automatización Leap. En resumen, se diluyeron 1.25 µl de muestras de proteína veinte veces con H₂O o tampón D₂O (fosfato 10 mM, pH 7.0) a 20 °C. Después de diferentes tiempos de incubación (0 segundos para experimentos no deuterados o 0.5, 1, 5, 10, 30, 60 y 120 minutos para experimentos deuterados), las muestras marcadas se inactivaron añadiendo un volumen igual de una solución enfriada con hielo de guanidina HCl 4.0 M (Pierce Biotechnology), clorhidrato de Tris(2-carboxietil)fosfina 500 mM (TCEP) (Pierce Biotechnology), pH 2.4. Inmediatamente después, las muestras se digirieron usando un cartucho Poroszyme Immobilized Pepsin (Applied Biosystems) a 20 °C. Los fragmentos peptídicos se recogieron y se desalinizaron usando una pre-columna ACQUITY BEH C18 VanGuard (2.1x5 mm, Waters) y se eluyeron en una columna ACQUITY BEH C18 (1.7 µm, 1.0 x 100 mm, Waters) a 0 °C. Los péptidos separados en la columna se analizaron por un espectrómetro de masas SYNAPT G2 (Waters). Para el análisis de los datos, los péptidos se identificaron usando el software ProteinLynx Global Server (Waters) y los niveles de incorporación de deuterio para cada péptido péptico de cada tiempo de marcado se calcularon usando DynamX (Waters). Para cada proteína, se realizaron cuatro experimentos no deuterados y tres experimentos HDX completos. Los valores de diferencia significativa (±1.6 daltons) se calcularon usando la incertidumbre experimental y un intervalo de confianza

del 98 % como se ha descrito previamente, con la excepción de que se usó una varianza reunida de desviaciones típicas en lugar de la media de desviaciones típicas individuales. Las captaciones fraccionales relativas entre el complejo CD73 + Fab y CD73 se generaron por el software DynamX (Waters) y se exportaron a PyMOL (Shrödinger, Inc.) para la creación de modelos estructurales. Todas las figuras estructurales de CD73 humano se generaron usando PyMol y las estructuras cristalinas indicadas de las conformaciones abierta y cerrada de CD73 (números de referencia PDB 4H2F y 4H2I, respectivamente).

Ensayo 8: Análisis de unión de SPR y BLI

[00591] La unión de MEDI9447 a proteínas CD73 de tipo silvestre y mutante se midió por resonancia de plasmón superficial (SPR) usando un instrumento ProteOn (BioRad). Se diluyeron muestras de proteína sobrenadante de células brutas CD73 a 3 µg/ml en PBS, 0.005 % de Tween-20, pH 7.4 (BioRad) y se inmovilizaron a ~400 RU en un chip sensor de HTG tris-NTA (BioRad) pre-activado con NiSO₄ 10 mM, MES 10 mM, pH 6.0 (BioRad). Como control de canal de referencia, se incluyó una muestra sobrenadante de células brutas diluida de forma equivalente procedente de células no transfectadas. Los sensogramas se registraron haciendo fluir diluciones a la mitad de MEDI9447 preparado en PBS, 0.005 % de Tween-20, pH 7.4, que variaba de 5 nM a 0.31 nM. En algunos casos, para variantes de CD73 que se unían débilmente a MEDI9447, las diluciones de anticuerpo variaban de 20 nM a 1.25 nM. La unión de anticuerpo se midió a un caudal de 100 µl/min con una fase de asociación de 3 min y una fase de disociación de 20 min. La superficie del chip sensor se regeneró entre cada ensayo por una inyección de 800 s de EDTA 300 mM, pH 8.5

(BioRad) a un caudal de 30 μ l/min. La cinética de unión se analizó usando el software de análisis de datos ProteOn. Se realizó un doble referenciado y, a menos que se indique otra cosa, se utilizó un modelo de unión Langmuir 1:1 para ajustar los datos. Algunas variantes de CD73 que contienen mutaciones dentro de la región de aminoácidos 171-188 apenas se ajustan a un modelo 1:1 (es decir, valores $\text{Chi}^2 > 10\%$ de $R_{\text{máx}}$). Cuando se indica, estas variantes se ajustaron con un modelo de antígeno heterogéneo (2:1). Debido a la alta afinidad de MEDI9447 (~ 4 pM) y a las limitaciones de sensibilidad de ProteOn, solo se consideraron significativos cambios de > 2 veces en las cinéticas medidas en comparación con la unión de MEDI9447 a las variantes de CD73. Debido al formato de ensayo (antígeno inmovilizado) y el estado dimérico de CD73, los valores de K_D pueden exagerarse debido a los efectos de avididad. Sin embargo, no se prevé que esto impacte al rango de unión de MEDI9447 a las diferentes variantes de CD73.

[00592] El mapeo de las manchas calientes de unión de anticuerpos anti-CD73 mAb A y mAb B se realizó por BLI usando un instrumento Octet QK384. Todas las proteínas se prepararon en tampón 1x Kinetics (FortéBio/Pall Life Sciences). Se diluyeron variantes de CD73 marcadas con histidina en el extremo C-terminal procedentes de sobrenadantes de células en bruto a 6 μ g/ml y se inmovilizaron en biosensores HIS2 a un umbral de respuesta de unión de 0.8 nm. Después de una etapa basal de 300 seg, los sensores se sumergieron en anticuerpo 30 nM. Los tiempos de asociación y disociación fueron de 600 seg. Se incluyó un control de referencia de sobrenadante de células no transfectadas para la resta de la unión de fondo durante el análisis de los datos. Los datos

se procesaron y los gráficos se prepararon usando el software FortéBio Data Analysis.

Ensayo 9: Ensayos de actividad enzimática de CD73

[00593] La hidrólisis catalizada por CD73 de AMP en adenosina y fosfato inorgánico se analizó cuantificando el fosfato inorgánico (ensayo Verde de Malaquita; R&D Systems) o midiendo la oxidación dependiente de ATP de luciferina que se inhibe por AMP (ensayo CellTiterGlo; Promega). Se generaron gráficos de datos y mediciones cinéticas de enzima (regresión no lineal de Michaelis-Menten) usando el software Prism (Graphpad). Los experimentos se realizaron por duplicado o por triplicado.

[00594] Para las mediciones de CD73 recombinante soluble usando el ensayo CellTiterGlo, se incubaron CD73 recombinante 400 pM y diversas concentraciones de anticuerpos anti-CD73 en tampón de ensayo (Tris 25 mM pH 7.5, MgCl₂ 5 mM, 0.005 % de Tween-20) durante 1 hora a 37 °C antes de añadir un volumen igual de AMP 200 µM/ATP 600 µM (en tampón de ensayo). Después de 1 hora de incubación a 37 °C, la concentración de AMP en la muestra se determinó usando el ensayo CellTiterGlo siguiendo las instrucciones del fabricante.

[00595] Para las mediciones de CD73 recombinante soluble usando el ensayo de Verde de Malaquita, se incubaron CD73 recombinante 1 nM y anticuerpo 1 nM o adenosina 5'-(α,β -metilen)difosfato 40 µM (APCP; Sigma-Aldrich) en tampón de ensayo (Tris 25 mM pH 7.5, MgCl₂ 5 mM, 0.005 % de Tween-20) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió un volumen igual de AMP 400 µM (para anticuerpos anti-CD73) o AMP 3 mM (para APCP) en tampón de ensayo y las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. La concentración

de fosfato inorgánico se determinó usando el ensayo de Verde de Malaquita siguiendo las instrucciones del fabricante.

[00596] Para las mediciones de CD73 recombinante inmovilizado, se inmovilizaron 50 µl de CD73 a 100 ng/ml en
5 tampón de ensayo (Tris 25 mM pH 7.5, MgCl₂ 5 mM, 0.005 % de Tween-20) suplementado con 100 µg/ml de BSA en placas recubiertas con níquel (Life Technologies). El CD73 no unido se retiró por lavado y se añadieron 50 µl de anticuerpo anti-CD73 (en tampón de ensayo). Después de incubar durante 1
10 hora a temperatura ambiente, las placas se lavaron de nuevo, se añadieron 100 µl de AMP 500 µM (en tampón de ensayo) y las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. La concentración de fosfato inorgánico se determinó usando el ensayo de Verde de Malaquita siguiendo
15 las instrucciones del fabricante. En algunos experimentos con CD73 inmovilizado y soluble, se preincubó anticuerpo anti-CD73 (IgG y Fab) durante al menos 2 horas con un exceso molar de 10 veces de fragmento Fab humano policlonal (Bethyl Laboratories) y un exceso molar de 100 veces de IgG (fd) de
20 oveja-anti-humana (Meridian Life Sciences) antes de la adición a CD73.

[00597] Para la medición de la actividad de CD73 endógeno en células cultivadas, se cultivaron 20,000 células MDA-MB-231 por pocillo en RPMI/10 % de FBS (Life Technologies) en
25 una placa de 96 pocillos. Después de una incubación de una noche, los pocillos se lavaron 3 veces con RPMI sin suero y se añadieron 50 µl de anticuerpos (en RPMI sin suero). Después de incubar durante 30 minutos a 37 °C, se añadieron 25 µl de AMP 1.2 mM (en RPMI sin suero) por pocillo. Las
30 placas se incubaron durante 3 horas a 37 °C. Se mezclaron 25 µl de sobrenadante celular y 25 µl de ATP 100 mM y la

concentración de AMP en la muestra se determinó usando el ensayo CellTiterGlo siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ensayo 10: Ensayo indicador de mAb A de transición conformacional de CD73

5 **[00598]** Se realizó la unión de MEDI9447 y mAb A a CD73 humano recombinante purificado en un instrumento Octet QK384. Para comparar la unión de mAb A y MEDI9447, se diluyó CD73 a 6 µg/ml en PBS, pH 7.4 (Life Technologies) más
10 albúmina de suero bovino al 0.5 % (PBSB; Sigma-Aldrich) y se cargó en biosensores HIS2 hasta un umbral de señal de unión de 1.0 nm. Después, los biosensores se transfirieron a PBSB solo o PBSB con ZnCl₂ 10 µM (Sigma-Aldrich), APCP y/o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM (Life Technologies) y
15 se incubaron durante 15 min. A continuación, los biosensores se transfirieron a PBSB que contenía MEDI9447 o mAb A diluido a 30 nM en PBSB y se midió la asociación de anticuerpo durante 10 min.

[00599] Para ensayar el efecto de MEDI9447 sobre la
20 transición conformacional de CD73 en presencia de ZnCl₂ y APCP, se inmovilizó mAb A diluido a 10 µg/ml en PBS, pH 7.4 en un biosensor Fc AHC anti-humano (FortéBio/Pall Life Sciences). Después de la etapa de inmovilización de 400 s, los biosensores se bloquearon durante 10 min en IgG humana
25 policlonal no específica (Jackson ImmunoResearch Laboratories) a 50 µg/ml en PBS, pH 7.4. Después de una etapa basal de 4 min, se midió la unión de mAb A incubando los biosensores durante 600 seg en pocillos que contenían CD73 diluido a 250 nM (basándose en el peso molecular del dímero)
30 en PBS solo, o PBS que contenía ZnCl₂ 10 µM y/o APCP 0.5 mM. Para las muestras que contenían MEDI9447 unido a CD73, se

preincubó una versión de IgG1 de ratón de MEDI9447 (usada para evitar la unión al biosensor Fc anti-humano) diluida a 250 nM en PBS con el CD73 durante 15 min a temperatura ambiente antes de la incubación con ZnCl₂ y APCP. El Fab
5 MEDI9447 y una IgG1 de control de isotipo correspondiente de ratón (generada en MedImmune) se ensayaron a 500 nM. La velocidad de agitación para todas las etapas de ensayo fue de 1000 rpm. El análisis de unión y los gráficos de datos se generaron usando el software FortéBio Data Analysis.

10 **Ensayo 11: Análisis SEC-MALS**

[00600] Para los experimentos que analizan complejos formados con CD73 y MEDI9447 o mAb B, se incubaron 900 pmoles de CD73 con 900, 450, 90 o 0 pmoles de anticuerpo, diluido en PBS, pH 7.4. También se preparó una muestra separada de
15 900 pmoles de anticuerpo solo. Las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente y después se separaron 100 µl de cada muestra en un HP 1100 HPLC (Agilent) usando una columna TSKgel G3000WxL de 5 µm, de 7.88 mm x 30 cm (Tosoh Bioscience, LLC) a un caudal de 1 ml/min durante 20
20 min. El tampón de procesamiento de muestra fue NaPi 0.1 M, NaSO₄ 0.1 M, pH 6.8. Después de la separación por HPLC, todas las muestras se analizaron usando un detector Dawn Heleos II MALS y un detector de índice de refracción Optilab T-rEx (Wyatt). Los datos se analizaron usando el software Astra
25 (Wyatt).

[00601]

[00602] La descripción anterior de los aspectos específicos revelará así en detalle la naturaleza general de la invención que terceros pueden, aplicando el conocimiento
30 dentro de las capacidades de la técnica, modificar y/o adaptar fácilmente para diversas aplicaciones tales aspectos

específicos, sin excesiva experimentación, sin apartarse del concepto general de la presente invención. Por tanto, se pretende que tales adaptaciones y modificaciones estén dentro del significado y rango de equivalentes de los
5 aspectos dados a conocer, basándose en las enseñanzas y orientaciones presentadas en el presente documento. Ha de entenderse que la fraseología o terminología en el presente documento es con fines de descripción y no de limitación, de manera que la terminología o fraseología de la presente
10 memoria descriptiva ha de interpretarse por el experto en la materia a la luz de las enseñanzas y orientaciones.

15

20

25

30

LISTA DE SECUENCIAS

>SEQ ID NO:1 CD730002 VL

QSVLTQPPSVSVSPGQTATITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRPSRIPE
RFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYFCQAWDTSFWVFGGGTKLTVL

5 >SEQ ID NO:2 CD730002 VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWGQGMVTVS
S

>SEQ ID NO:3 CD730010 VL

10 LPVLTQPPSVSGTPGQRTVITCSGSLSNIGRNPVNWYKQVPGTAPKLLIYLNQRP SGV
PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYCATWDDSLNGWLFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:4 CD730010 VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDYWGRGTLTVSS

15 >SEQ ID NO:5 CD730011 VL

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASKYVQWYQQRPGSSPMAVIYKDNQRSSGV
PDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKPEDEADYCYQSYDASNYYVFGTGTKVTVL

>SEQ ID NO:6 CD730011 VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
20 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGHGLYFDLWGQGTTVTVSS

>SEQ ID NO:7 CD730021 VL

QSVLTQPPSASGTPGQRTVITCSGSRPNIGGNTVNWYQQLPGAAPKLLIYSNSQRPSGV
PDRFSGSKYGTASLAISGLQSDDEADYCGTWDDSLNGPVFGRGTKLTVL

>SEQ ID NO:8 CD730021 VH

25 QVQLQESGPGLVRPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWAWVRQSPGKGLEWIGNIYYRGST
YYNPSLKSRTMSVDM SKHQFSLKLSSLNAADTAVYYCASLYSGTYVFDYWGRGTLTV
SS

>SEQ ID NO:9 CD730042 VL

QSVLTQPASVSGSPGQSITISCAGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEGSKRPSG
30 VSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYCYSSYTTR-STRVFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:10 CD730042 VH

GVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSIKY
YADSVKGRFTISRDDSKNALYLQMNSLRRAEDTAVYYCSTLSGSYGYFDYWGRGTLTVTS
S

>SEQ ID NO:11 CD730046 VL

5 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVSWYQHLPGTAPQLLIYTNHRPSGV
PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLSGYVFGTGTKVTVL

>SEQ ID NO:12 CD730046 VH

QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSIKY
YADSVKGRFTISRDN SKNSLFLQMNSLRDDDTATYYCARGHLLRIGDIFYYSLDVWGQG
10 TLVTVSS

>SEQ ID NO:13 CD730047 VL

QSVLTQPPSASGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQRLPGAAPQLLIYNNDQRPSGI
PDRFSGSKSGTSGSLVISGLQSEDEADYYCAAWDDSLSGNVFGTGTKVTVL

>SEQ ID NO:14 CD730047 VH

15 EVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSIKY
YADSVKGRFAISRDN AKNTLYLQMNSLRREDTAMYYCASGLTG VAGALGVWGRGTLTV
SS

>SEQ ID NO:15 CD730058 VL

QSVLTQPPSVSVSPGQTATITCSGDRLRNEFVSWYQQRPGQSPVVVIYQDIYRPSGIPD
20 RFSGSKSGNTATLTISGPQTVDEADYYCQAWDSNTVVFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:16 CD730058 VH

QLQLQESGSGLVKPSQTLSLICAVSGGSITSGNAWNWIRQSPGAGLEWIGYIFSNGAT
YYNPSLESRVTTISADTSKNQFSLT LTSVTAADTAVYYCARGDFWTGKG VFDPWGQGTLV
TVSS

25 >SEQ ID NO:17 10.3AA_HC

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGRTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRRAEDTAVYYCARLGYGRVDEWGRGTLTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEG
30 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPS

REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:18 10.3Nt_HC

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
5 CTCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCTATAGCTGGGTCCGCCAGG
CTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGAACATAC
TACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCT
GTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAT
TAGGGTATGGGCGGGTGGACGAGTGGGGCAGGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCG
10 TCGACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG
CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTcT
GGAActCAGGCGCtCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGAC
CTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGC
15 CCAAATCTTGTGACAAACTCACACATgcCCAcCGTGCCAGCACCTGAATTGAGGGG
GGAcCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCaaGgACACCCTCATGATCTCCCGGAC
CCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA
ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG
TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA
20 TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCTCCATCGAGAAAA
CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTcTACACCCTGCCCCCATCC
CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGAC
25 AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA
CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

>SEQ ID NO:19 10.3AA_LC

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLSGV
PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVLGQPKAAPS
30 VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYA
ASSYLSTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

>SEQ ID NO:20 10.3Nt-LC
CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCAT
CTCTTGTTCTGGAAGCCTCTCCAACATCGGAAGGAATCCTGTAACTGGTATCAGCAGC
TCCCAGGGACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATCTTGATAATCTACGGCTAAGTGGGGTC
5 CCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGAACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCT
CCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAACATGGGATGACAGCCACCCCGGGT
GGACGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCGGCGCCCTCG
GTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTG
TCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCC
10 CCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCG
GCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTG
CCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA
>SEQ ID NO:21 10.3AA_VH
EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGRTY
15 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLG YGRVDEWGRGTLTVSS
>SEQ ID NO:22 10.3Nt_VH
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACT
CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCTATAGCTGGGTCCGCCAGG
CTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGAACATAC
20 TACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCT
GTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAT
TAGGGTATGGGCGGGTGGACGAGTGGGGCAGGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT
>SEQ ID NO:23 10.3AA_VL
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLR LSGV
25 PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL
>SEQ ID NO:24 10.3Nt-VL
CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCAT
CTCTTGTTCTGGAAGCCTCTCCAACATCGGAAGGAATCCTGTAACTGGTATCAGCAGC
TCCCAGGGACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATCTTGATAATCTACGGCTAAGTGGGGTC
30 CCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGAACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCT

CCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAACATGGGATGACAGCCACCCCGGGT
GGACGTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

>SEQ ID NO: 25 FW1-VL parental de CD7300010

LPVLTQPPSVSGTPGQRTISC

5 >SEQ ID NO:26 CD7300010 GL FW1-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRTISC

>SEQ ID NO: 27 FW2-VL parental de CD7300010

WYKQVPGTAPKLLIY

>SEQ ID NO:28 CD7300010 GL FW2-VL

10 WYQQLPGTAPKLLIY

>SEQ ID NO: 29 FW3-VL parental/LG de CD7300010

GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC

>SEQ ID NO: 30 FW4-VL parental/LG de CD7300010 (también
CD370002 y 2C5)

15 FGGGTKLTVL

>SEQ ID NO: 31 FW1-VH parental/LG de CD7300010 (también
CD370002 y 2C5)

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS

>SEQ ID NO: 32 FW2-VH parental/LG de CD7300010 (también
20 CD370002 y 2C5)

WVRQAPGKGLEWVS

>SEQ ID NO: 33 FW3-VH parental/LG de CD7300010 (también
CD370002 y 2C5)

RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

25 >SEQ ID NO: 34 FW4-VH parental/LG de CD7300010

WGRGTLVTVSS

>SEQ ID NO: 35 CDR1-VH de CD7300010 (también CD370002 y 2C5)
SYAMS

>SEQ ID NO:36 CD7300010 CDR1-VH

30 SYAYS

>SEQ ID NO: 37 CDR2-VH (también CD370002)

AISGSGGSTYYADSVKG
>SEQ ID NO:38 CDR2-VH
LIWGSWGSTYYADSVKG
>SEQ ID NO:39 CDR2-VH
5 AISGSGGRTTYADSVKG
>SEQ ID NO:40 CDR2-VH
AISGSWGRTYYADSVKG
>SEQ ID NO:41 CDR3-VH
LGYSTIDY
10 >SEQ ID NO:42 CDR3-VH
LGYSTIDK
>SEQ ID NO:43 CDR3-VH
LGYSTIDM
>SEQ ID NO:44 CDR3-VH
15 LGYSTIDL
>SEQ ID NO:45 CDR3-VH
LGYGRVDE
>SEQ ID NO:46 CDR1-VL
SGSLSNIGRNPVN
20 >SEQ ID NO:47 CDR1-VL
SGSLSNIGRNEVN
>SEQ ID NO:48 CDR1-VL
SGSLSNIGRNDVN
>SEQ ID NO:49 CDR2-VL
25 LNNQRPS
>SEQ ID NO:50 CDR2-VL
LDNLRLG
>SEQ ID NO:51 CDR2-VL
LDNLRLS
30 >SEQ ID NO:52 CDR2-VL
LNNQRLG

>SEQ ID NO:53 CDR3-VL
ATWDDSLNGWL
>SEQ ID NO:54 CDR3-VL
ATWDDSLKGWL
5 >SEQ ID NO:55 CDR3-VL
ATWDDSLIGWL
>SEQ ID NO:56 CDR3-VL
ATWDDSHPGWT
>SEQ ID NO:57 CD730010-VL
10 LPVLTQPPSVSGTPGQRVITISCSGSLSNIGRNPVNWYQVPGTAPKLLIYLNQRPSTGV
PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNGWLFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:58 CD730010GL9-VL
15 QSVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLNQRPSTGV
PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNGWLFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:59 P32E-VL
20 QSVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSLSNIGRNEVNWYQQLPGTAPKLLIYLNQRPSTGV
PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNGWLFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:60 C1-VL
25 QSVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSLSNIGRNEVNWYQQLPGTAPKLLIYLNQRPSTGV
PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLKGWLFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:61 C2-VL
30 QSVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLLGGV
PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLKGWLFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:62 D3-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLSGV
5 PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYCATWDDSLIGWLFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:63 G10-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNDVNWYQQLPGTAPKLLIYLNQRLGGV
10 PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYCATWDDSLKGWLFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:64 HPT-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLNQRPSPGV
15 PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:65 GRVE-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLNQRPSPGV
20 PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYCATWDDSLNGWLFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO: 66 73combo1 (C1+GRVE+HPT)-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNEVNWYQQLPGTAPKLLIYLNQRPSPGV
25 PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO: 67 73combo2 (C2+GRVE+HPT)-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLLGGV
30 PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO: 68 73combo3 (D3+GRVE+HPT)-VL [10.3]
QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLSGV
5 PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO: 69 73combo5 (G10+GRVE+HPT)-VL
QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNDVNWYQQLPGTAPKLLIYLNQRLGGV
10 PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO: 70 73combo6 (GRVE+HPT)-VL
QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLNQRPSPGV
15 PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:71 CD730010-VH
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
20 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDYWGRGTLVTVSS

>SEQ ID NO:72 CD730010GL9-VH
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDYWGRGTLVTVSS
25

>SEQ ID NO:73 P32E-VH
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDYWGRGTLVTVSS

30
>SEQ ID NO:74 C1-VH

EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDKWGRGTLVTVSS

>SEQ ID NO:75 C2-VH

5 EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSLIWGSWGSTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDMWGRGTLVTVSS

>SEQ ID NO:76 D3-VH

EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGRTY
10 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDLWGRGTLVTVSS

>SEQ ID NO:77 G10-VH

EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSWGRTY
15 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDLWGRGTLVTVSS

>SEQ ID NO:78 HPT-VH

EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDYWGRGTLVTVSS

20 >SEQ ID NO:79 GRVE-VH

EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLG YGRVDEWGRGTLVTVSS

>SEQ ID NO: 80 73combo1 (C1+GRVE+HPT)-VH

25 EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLG YGRVDEWGRGTLVTVSS

>SEQ ID NO: 81 73combo2 (C2+GRVE+HPT)-VH

EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSLIWGSWGSTY
30 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLG YGRVDEWGRGTLVTVSS

- >SEQ ID NO: 82 73combo3 (D3+GRVE+HPT) -VH [10.3]
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGRTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGRVDEWGRGTLTVSS
- 5
- >SEQ ID NO: 83 73combo5 (G10+GRVE+HPT) -VH
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSWGRTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGRVDEWGRGTLTVSS
- 10
- >SEQ ID NO: 84 73combo6 (GRVE+HPT) -VH
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGRVDEWGRGTLTVSS
- >SEQ ID NO:85 CD730002VH
15 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYYWYMDVWGQGTMTVTS
S
- >SEQ ID NO:86 CD730002VL
QSVLTQPPSVSVSPGQTATITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRPSRIPE
20 RFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYFCQAWDTSFWVFGGGTKLTVL
- >SEQ ID NO:87 2C5VH
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKRRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYYWYMDVWGQGTMTVTS
S
- 25
- >SEQ ID NO:88 2C5VL
QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRLSGIPE
RFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFWVFGGGTKLTVL
- >SEQ ID NO: 89 FW4-VH parental/2C5 de CD730002
WGQGTMTVTVSS
- 30
- >SEQ ID NO: 90 FW1-VL parental de CD730002
QSVLTQPPSVSVSPGQTATITC

>SEQ ID NO: 91 FW1-VL de 2C5 de CD730002
QSVLTQPPSVSVSPGQTASITC

>SEQ ID NO: 92 FW2-VL parental/2C5 de CD730002
WYQQKPGQSPVLVIY

5 >SEQ ID NO: 93 FW3-VL parental de CD730002
RIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYFC

>SEQ ID NO:94 CD730002/2C5 FW3-VL
GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC

>SEQ ID NO:95 CD730002/2C5 CDR2-VH

10 AISGSGGSTYYADSVKR

>SEQ ID NO: 96 CDR3-VH parental/2C5 de CD730002
DKGYYWYMDV

>SEQ ID NO: 97 CDR1-VL parental/2C5 de CD730002

15 SGDKVGDKYAS

>SEQ ID NO: 98 CDR2-VL parental de CD730002
EDTKRPS

>SEQ ID NO:99 CD730002 2C5 CDR2-VL
EDTKRLS

20 >SEQ ID NO: 100 CDR3-VL parental/2C5 de CD730002
QAWDTSFWV

>SEQ ID NO: 101 Phen0203-VH
EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFRFSDFAMHWVRQAPGKGLEWVAGISYDGGNKY
YADSVKGRFTISRDNSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDHGYSGYGHLDYWGRGTLV

25 TVSS

>SEQ ID NO: 102 Phen0203-VL
QSVVTQPPSASGTPGQRTVISCSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGV
PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGRVFGTGKLTVL

>SEQ ID NO:103 CD730004-VH

30

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRPNYYGASGSYYKQGGDHW
GQGTMTVTVSS

>SEQ ID NO:104 CD730004-VL

5 NFMLTQPHSVSESPGQTVTISCTRSSGSIASKYVQWYQKRP GSSPTTVIYEDTQRPSGV
PDRFSGSIDISSNSASLTISGLRTEDEADYYCQSYDSTNWWVFGGGTKVTVL

>SEQ ID NO:105 CD730008-VH

EVQLLETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNYGNLDHWGKGT LVTVSS

10 >SEQ ID NO:106 CD730008-VL

QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGD KYASWYQQKPGQSPVLVIYQDRKRPSGIPE
RFSGSNSGNTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDSSHVWVFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:107 CD730068-VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYIMGWVRQAPGKGLEWVSSISSSGGATI

15 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDMAVYYCAKDHLGGHGM DVWGQGT TTVTVS
S

>SEQ ID NO:108 CD730068-VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDISNYLAWFQQKPGKAPKSLIFAASSLESGVP
SKFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDSATYYCQQYNSYPLTFGGG TKVEIK

20 >SEQ ID NO:109 CD730069-VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSEYQMGWVRQAPGKGLEWVSYIRSSGGQTI
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRTYSSGWHIDYWGQGT LVTV
SS

25 >SEQ ID NO:110 CD730069-VL

DIQMTQSPDLSASVGDRV TITCRASQSI SRYLNWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFSLTIS SLQLEDFATYYCQQSYRTPLTFGGG TKVEIQ

>SEQ ID NO: 111 SGMV-VH Clon 2

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY

30 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWGQGTMTVTVS
S

>SEQ ID NO: 112 SGMV-VL Clon 2
QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRPSGIPE
RFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFWVFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:113 CDRH1 Y32V-VH
5 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSVAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWGQGTMTVTS
S

>SEQ ID NO:114 CDRH1 M34R-VH
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYARSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
10 YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWGQGTMTVTS
S

>SEQ ID NO:115 CDRH2 T57P-VH
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSPY
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWGQGTMTVTS
15 S

>SEQ ID NO:116 CDRH2 A60G -VH
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YGDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWGQGTMTVTS
S

>SEQ ID NO:117 CDRH2 G65R-VH
20 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTY
YADSVKRRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWGQGTMTVTS
S

>SEQ ID NO:118 CDRL2 T52S-VL
25 QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPE
RFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFWVFGGGTKLTVLL

>SEQ ID NO:119 CDRL2 R54Y-VL
QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKYPSGIPE
RFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFWVFGGGTKLTVLVL

>SEQ ID NO:120 CDRL2 P55H-VL
30

QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSVLVIYEDTKRHSGIPER
FSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFVWFVGGGTKLTVLV

>SEQ ID NO:121 CDRL2 P55L-VL

QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRLSGIPE
5 RFSGSNRGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFVWFVGGGTKLTVLV

>SEQ ID NO:122 2SGMY FW3-VL

GIPERFSGSNRGNTATLTISGTQAMDEADYYC

>SEQ ID NO:123 CDRH1 Y32V CDR1-VH

10 SVAMS

>SEQ ID NO:124 CDRH1 M34R CDR1-VH

SYARS

>SEQ ID NO:125 CDRH2 T57P CDR2-VH

AISGSGGSPYYADSVKG

15 >SEQ ID NO:126 CDRH2 A60G CDR2-VH

AISGSGGSTYYGDSVKG

>SEQ ID NO:127 CDRL2 T52S CDR2-VL

EDSKRPS

>SEQ ID NO:128 CDRL2 R54H CDR2-VL

20 EDTKYPS

>SEQ ID NO:129 CDRL2 P55H CDR2-VL

EDTKRLS

>SEQ ID NO: 130 VL de Tremelimumab del documento U.S.
6,682,736

25 PSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSTPFTFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKV

>SEQ ID NO: 131 VH de Tremelimumab del documento U.S.

30 6,682,736

GVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYYADSVKGRF
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLYYYYYGMDVWGQGT TVTVSSAS
TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH

>SEQ ID NO: 132 CDR1 de VH de Tremelimumab del documento U.S.

5 6,682,736

GFTFSSYGMH

>SEQ ID NO: 133 CDR2 de VH de Tremelimumab del documento U.S.

6,682,736

VIWYDGSNKYYADSV

10 >SEQ ID NO: 134 CDR3 de VH de Tremelimumab del documento U.S.

6,682,736

DPRGATLYYYYYGMDV

>SEQ ID NO: 135 CDR1 de VL de Tremelimumab del documento U.S.

6,682,736

15 RASQSINSYLD

>SEQ ID NO: 136 CDR2 de VL de Tremelimumab del documento U.S.

6,682,736

AASSLQS

>SEQ ID NO: 137 CDR3 de VL de Tremelimumab del documento U.S.

20 6,682,736

QQYYSTPFT

>SEQ ID NO:138

US 20130034559_77 Secuencia 77 del documento US 20130034559

Organismo: Homo sapiens

25 EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQVRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGI

PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIK

>SEQ ID NO:139

US 20130034559_72 Secuencia 72 del documento US 20130034559

Organismo: Homo sapiens

30

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKY
YVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGLVT
VSS

>SEQ ID NO:140 - VH CDR1

5 US 20130034559_73 Secuencia 73 del documento US 20130034559
Organismo: Homo sapiens

RYWMS

>SEQ ID NO:141 - VH CDR2

US 20130034559_74 Secuencia 74 del documento US 20130034559
10 Organismo: Homo sapiens

NIKQDGSEKYYVDSVKG

>SEQ ID NO:142 - VH CDR3

US 20130034559_75 Secuencia 75 del documento US 20130034559
Organismo: Homo sapiens

15 EGGWFGELAFDY

>SEQ ID NO:143 - VL CDR1

US 20130034559_78 Secuencia 78 del documento US 20130034559
Organismo: Homo sapiens

RASQRVSSSYLA

20 >SEQ ID NO:144 - VL CDR2

US 20130034559_79 Secuencia 79 del documento US 20130034559
Organismo: Homo sapiens

DASSRAT

>SEQ ID NO:145 - VL CDR3

25 US 20130034559_80 Secuencia 80 del documento US 20130034559
Organismo: Homo sapiens

QQYGSLPWT

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor
método conocido por la solicitante para llevar a la práctica
30 la citada invención, es el que resulta claro de la presente
descripción de la invención.