

ANTICUERPOS ANTI-CD73 Y COMPOSICIONES

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA

[0001] ESTA SOLICITUD REIVINDICA LA PRIORIDAD DE LA SOLICITUD DE PATENTE PROVISIONAL DE LOS ESTADOS UNIDOS 62/896.908, PRESENTADA EL 6 DE SEPTIEMBRE, 2019, CUYA DESCRIPCIÓN SE INCORPORA POR REFERENCIA EN LA PRESENTE MEMORIA EN SU TOTALIDAD.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] LA PRESENTE SOLICITUD CONTIENE UN LISTADO DE SECUENCIAS QUE SE HA ENVIADO ELECTRÓNICAMENTE EN FORMATO ASCII Y SE INCORPORA POR EL PRESENTE DOCUMENTO POR REFERENCIA EN SU TOTALIDAD. LA COPIA ELECTRÓNICA DEL LISTADO DE SECUENCIAS, CREADA EL 1 DE SEPTIEMBRE, 2020, SE DENOMINA 022675_WO055_SL.TXT Y TIENE UN TAMAÑO DE 30.355 BYTES.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] LAS CÉLULAS TUMORALES ESTÁN RODEADAS POR UN MICROENTORNO COMPLEJO (EL MICROENTORNO TUMORAL, O TME) QUE INFLUYE EN CADA ETAPA DE LA TUMOROGÉNESIS. EN EL TME, LAS CONCENTRACIONES INCREMENTADAS DE LOS FACTORES MODULADORES INMUNES TALES COMO ADENOSINA AYUDAN A LAS CÉLULAS TUMORALES A SUPERAR LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL DEL HUÉSPED.

[0004] LA ADENOSINA SE UNE A CUATRO RECEPTORES DIFERENTES (AR) EXPRESADOS EN DIVERSAS CÉLULAS INMUNES TALES COMO CÉLULAS T CD4+ Y CD8+ Y CÉLULAS ASESINAS NATURALES (NK). ESTOS RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G PURINÉRGICOS, A1R, A2AR, A2BR, Y A3R, PRESENTAN CADA UNO PROPIEDADES Y DISTRIBUCIÓN CELULAR Y TISULAR DISTINTAS. LA UNIÓN DE ADENOSINA A LOS AR SUPRIME LAS RESPUESTAS ANTITUMORALES DE LAS CÉLULAS T Y CÉLULAS NK Y TAMBIÉN PROMUEVE EL DESARROLLO Y ACTIVACIÓN DE CÉLULAS

INMUNOSUPRESORAS TALES COMO CÉLULAS T REGULADORAS T (TREG) Y CÉLULAS SUPRESORAS DERIVADAS DE MIELOIDE (MDSC), FACILITANDO DE ESTA MANERA LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER. ADEMÁS DE LA ACCIÓN INMUNORREGULADORA DE LOS RECEPTORES DE ADENOSINA, SU SEÑALIZACIÓN TAMBIÉN PUEDE IMPACTAR DIRECTAMENTE EN LA SUPERVIVENCIA Y PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS CANCEROSAS.

[0005] LA ACUMULACIÓN DE ADENOSINA EN EL TME ESTÁ MEDIADA POR LAS ENZIMAS DE LA SUPERFICIE CELULAR CD73 Y CD39, QUE TRABAJAN EN UNA RUTA PARA CONVERTIR EL ATP EXTRACELULAR EN ADENOSINA. CD73, TAMBIÉN CONOCIDO COMO 5'-NT, ES UNA ENZIMA EXTRACELULAR QUE CONSISTE EN DOS SUBUNIDADES DE 65 KD UNIDAS POR UN CONECTOR DE HÉLICE ALFA EN UN HOMODÍMERO. SOBREEXPRESADO POR MUCHAS CÉLULAS CANCEROSAS, CD73 MEDIA LA HIDRÓLISIS DE 5'-AMP A ADENOSINA, PARTICULARMENTE EN CONDICIONES DE HIPOXIA EN EL TUMOR. LOS ESTUDIOS HAN MOSTRADO QUE UNA ALTA EXPRESIÓN DE CD73 DA LUGAR A UN PEOR PRONÓSTICO EN DIVERSOS CÁNCERES, TALES COMO CÁNCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO, CÁNCER DE PULMÓN, CÁNCER DE OVARIO, CÁNCER DE RIÑÓN, CÁNCER GÁSTRICO, Y MELANOMA. LA INHIBICIÓN DE CD73 PUEDE SER UNA ESTRATEGIA POTENTE PARA LA TERAPIA DEL CÁNCER.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0001] La presente descripción está dirigida a nuevos anticuerpos recombinantes dirigidos a CD73, así como a composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de estos anticuerpos, y al uso de los anticuerpos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer. En comparación con los tratamientos disponibles actualmente para dichos cánceres, incluyendo los tratamientos con anticuerpos, se contempla que los anticuerpos y composiciones descritos en la presente memoria pueden proporcionar una respuesta clínica superior bien solos o en combinación con otro agente terapéutico para el cáncer.

[0002] En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un anticuerpo anti-CD73 o una parte de unión a antígeno del mismo, en donde el anticuerpo se une al mismo epítipo de CD73 humano que un anticuerpo que comprende:

- a) una cadena pesada (HC) que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 9 y 41 y una cadena ligera (LC) que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 13 y 42;
- b) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 10 y 41 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 14 y 42;
- c) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 11 y 41 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 15 y 42; o
- d) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 12 y 41 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 16 y 42.

[0003] En determinadas realizaciones, la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende:

- i) regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (H-CDR)-1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 17-19, respectivamente;
- ii) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9;
- iii) un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9; o
- iv) una cadena pesada (HC) que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 9 y 41;

y la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende:

- i) regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (L-CDR)-1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 20-22, respectivamente;
- ii) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13;
- iii) un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13; o
- iv) una cadena ligera (LC) que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 13 y 42.

[0004] En determinadas realizaciones, la cadena pesada de dicho anticuerpo

comprende:

- i) regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (H-CDR)-1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 23-25, respectivamente;
- 5 ii) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10;
- iii) un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; o
- iv) una cadena pesada (HC) que comprende las secuencias de aminoácidos de
- 10 las SEQ ID NO: 10 y 41;

y la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende:

- i) regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (L-CDR)-1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 26-28, respectivamente;
- 15 ii) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14;
- iii) un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14; o
- iv) una cadena ligera (LC) que comprende las secuencias de aminoácidos de las
- 20 SEQ ID NO: 14 y 42.

[0005] En determinadas realizaciones, la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende:

- i) regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (H-CDR)-1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID
- 25 NO: 29-31, respectivamente;
- ii) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11;
- iii) un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; o
- 30 iv) una cadena pesada (HC) que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 11 y 41;

y la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende:

- i) regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (L-CDR)-1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID

NO: 32-34, respectivamente;

ii) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15;

5 iii) un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; o

iv) una cadena ligera (LC) que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 15 y 42.

[0006] En determinadas realizaciones, la cadena pesada de dicho anticuerpo comprende:

10 i) regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (H-CDR)-1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 35-37, respectivamente;

ii) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12;

15 iii) un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; o

iv) una cadena pesada (HC) que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 12 y 41;

y la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende:

20 i) regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (L-CDR)-1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 38-40, respectivamente;

ii) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16;

25 iii) un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16; o

iv) una cadena ligera (LC) que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 16 y 42.

[0007] En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un

30 anticuerpo anti-CD73 o una parte de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos de H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de las:

a) SEQ ID NO: 17-22, respectivamente;

b) SEQ ID NO: 23-28, respectivamente;

- c) SEQ ID NO: 29-34, respectivamente; o
- d) SEQ ID NO: 35-40, respectivamente.

[0008] En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo anti-CD73 o una parte de unión a antígeno del mismo, en donde dicho

5 anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada y una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera que son al menos un 90 % idénticas a las secuencias de aminoácidos de las:

- a) SEQ ID NO: 9 y 13, respectivamente;
- b) SEQ ID NO: 10 y 14, respectivamente;
- 10 c) SEQ ID NO: 11 y 15, respectivamente; o
- d) SEQ ID NO: 12 y 16, respectivamente.

[0009] En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo anti-CD73 o una parte de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada y un dominio variable

15 de cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos de las:

- a) SEQ ID NO: 9 y 13, respectivamente;
- b) SEQ ID NO: 10 y 14, respectivamente;
- c) SEQ ID NO: 11 y 15, respectivamente; o
- d) SEQ ID NO: 12 y 16, respectivamente.

20 **[0010]** En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo anti-CD73 que comprende:

- a) una cadena pesada (HC) que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 9 y 41 y una cadena ligera (LC) que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 13 y 42;
- 25 b) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 10 y 41 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 14 y 42;
- c) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 11 y 41 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ
- 30 ID NO: 15 y 42; o
- d) una HC que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 12 y 41 y una LC que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 16 y 42.

[0011] En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un

anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno del mismo que se une a un epítipo en CD73 humano que comprende:

- a) los residuos de aminoácidos R73, R109, y D168 de la SEQ ID NO: 43;
- b) el residuo de aminoácido R109 de la SEQ ID NO: 43; o
- 5 c) los residuos de aminoácidos I301, S302, y H304 de la SEQ ID NO: 43.

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno del mismo que se une a un epítipo en CD73 humano que comprende:

- a) los residuos de aminoácidos 27-31, 61-75, y 161-170 de la SEQ ID NO: 43;
- 10 b) los residuos de aminoácidos 61-70 y 161-170 de la SEQ ID NO: 43; o
- c) los residuos de aminoácidos 27-31, 266-270, y 291-305 de la SEQ ID NO: 43.

[0012] En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria tiene al menos una propiedad seleccionada de:

- 15 a) inhibe la actividad de CD73 soluble *in vitro*;
- b) inhibe la actividad de CD73 en las células Calu-6 *in vitro*;
- c) inhibe la actividad de CD73 en las células H292 *in vitro*;
- d) se une específicamente a CD73 humano y de cynomolgus expresado en las células CHO-S;
- 20 e) se une al ECD de CD73 humano con una K_D de 1 nM o menos como se mide por SPR;
- f) se une al ECD de CD73 cynomolgus con una K_D de 0,7 nM o menos como se mide por SPR;
- g) no se une al mismo epítipo de CD73 que oleclumab, CPX006, y/o 11E1;
- 25 h) se une a un epítipo en el homodímero de CD73 de una manera que da lugar a un complejo 1:1;
- i) inhibe la actividad de CD73 soluble de manera más efectiva que oleclumab *in vitro*;
- j) inhibe la actividad de CD73 en las células Calu-6, H292, y Cynom-K1 *in vitro*;
- 30 k) inhibe la actividad de CD73 en las células Calu-6, NCI-H1775, KYSE-30, y Capan-2 *in vitro*;
- l) inhibe la supervivencia y/o proliferación de las células MDA-MB-231 y MDA-MB-468 *in vitro*;
- m) inhibe la actividad de CD73 en las células T CD4⁺ y CD8⁺ y células B CD19⁺

primarias *in vitro*;

- n) restaura la proliferación de las células T CD4⁺ *in vitro*;
- o) activa las células T CD4⁺ y CD8⁺ *in vitro*;
- p) en combinación con un anticuerpo anti-PD-1, restaura la proliferación de las células T en una reacción linfocitaria mixta (MLR) de una vía en presencia de AMP;
- q) aumenta la activación de las células T en presencia de AMP en combinación con un anticuerpo anti-PD-1, en una MLR de una vía;
- r) no estimula la activación de las células B *in vitro*;
- s) no reduce los niveles de CD73 en las células H292 *in vitro* más de un 25 %;
- t) inhibe la actividad de CD73 en tumores recogidos de ratones humanizados con PBMC con injerto de células A375;
- u) inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* en ratones NOD-scid con injerto de células MDA-MB-231;
- v) inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* en ratones humanizados con PBMC con injerto de células Calu-6; e
- w) inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* en ratones humanizados con PBMC con injerto de células A375.

En realizaciones particulares, el anticuerpo o parte de unión a antígeno tiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, o las 23 de dichas propiedades.

[0013] En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria es una IgG, tal como una IgG₁. El anticuerpo puede comprender al menos una mutación en la región F_C. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser una IgG₁ y comprender una mutación en una o más de las posiciones de aminoácidos de la cadena pesada 234 y 235, que se numeran según el esquema de numeración IMGT®. En realizaciones particulares, uno o ambos de los residuos de aminoácidos en las posiciones 234 y 235 se mutan de Leu a Ala.

[0014] En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno del mismo descrito en la presente memoria y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica puede comprender además uno o más de un agente inmunoestimulador, una vacuna, un agente quimioterapéutico, un agente

antineoplásico, un agente antiangiogénico, un inhibidor de tirosina quinasa, y un inhibidor de la ruta de CD73.

5 **[0015]** En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una parte de unión a antígeno de la misma, o una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una parte de unión a antígeno de la misma, o ambas, de un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria. En determinadas realizaciones, la molécula de ácido nucleico puede comprender la secuencia de nucleótidos de una
10 cualquiera de las SEQ ID NO: 1-8.

[0016] En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico aislada descrita en la presente memoria, en donde dicho vector comprende además una secuencia de control de la expresión.

15 **[0017]** En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona una célula huésped que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una parte de unión a antígeno de la misma, y una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una parte de unión a antígeno de la misma, de un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la
20 presente memoria.

[0018] En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para producir un anticuerpo anti-CD73 o una parte de unión a antígeno del mismo, que comprende proporcionar una célula huésped descrita en la presente memoria, cultivar dicha célula huésped en condiciones adecuadas para la expresión del
25 anticuerpo o parte, y aislar el anticuerpo o parte resultante.

[0019] En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona una molécula de unión biespecífica que comprende la parte de unión a antígeno de uno o dos anticuerpos anti-CD73 distintos descritos en la presente memoria.

30 **[0020]** En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para disminuir la actividad de CD73 en un paciente que lo necesita, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno, composición farmacéutica, o molécula de unión biespecífica descrita en la presente memoria.

[0021] En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un método

para incrementar la proliferación de las células T CD4+ en un paciente que lo necesita, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno, composición farmacéutica, o molécula de unión biespecífica descrita en la presente memoria.

[0022] En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para estimular el sistema inmune en un paciente que lo necesita, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno, composición farmacéutica, o molécula de unión biespecífica descrita en la presente memoria.

[0023] En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para tratar el cáncer en un paciente, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno, composición farmacéutica, o molécula de unión biespecífica descrita en la presente memoria. En determinadas realizaciones, el cáncer se origina en un tejido seleccionado del grupo que consiste en piel, pulmón, intestino, colon, ovario, cerebro, próstata, riñón, tejidos blandos, el sistema hematopoyético, cabeza y cuello, hígado, hueso, vejiga, mama, estómago, útero, cuello uterino, y páncreas. En determinadas realizaciones, el cáncer es melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer pancreático, cáncer de ovario, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, colangiocarcinoma, cáncer de tiroides, o cáncer testicular.

[0024] En determinadas realizaciones, un tratamiento descrito en la presente memoria comprende además administrar al paciente un agente inmunoestimulador, una vacuna, un agente quimioterapéutico, un agente antineoplásico, un agente antiangiogénico, un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de la ruta de CD73, o terapia de radiación.

[0025] En algunos aspectos, la presente descripción proporciona el uso de un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno, composición farmacéutica, o molécula de unión biespecífica descrita en la presente memoria para la fabricación de un medicamento para:

- a) disminuir la actividad de CD73 en un paciente;
- b) incrementar la proliferación de las células T CD4+ en un paciente;

- c) estimular el sistema inmune en un paciente; o
- d) tratar el cáncer en un paciente.

[0026] En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno, composición farmacéutica, o molécula de

5 unión biespecífica descrita en la presente memoria para su uso en:

- a) disminuir la actividad de CD73 en un paciente;
- b) incrementar la proliferación de las células T CD4⁺ en un paciente;
- c) estimular el sistema inmune en un paciente; o
- d) tratar el cáncer en un paciente.

10 **[0027]** Otras características, objetivos, y ventajas de la invención son evidentes en la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada, aunque indica realizaciones y aspectos de la invención, se proporciona solo como ilustración, no limitación. Diversos cambios y modificaciones en el alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir

15 de la descripción detallada.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

[0028] La **FIG. 1** es un gráfico que muestra la actividad de CD73 soluble después del tratamiento con los anticuerpos anti-CD73 indicados. Los datos se normalizan respecto a los controles no tratados y se presentan como media $\pm$ SEM.

20 **[0029]** La **FIG. 2** es una pareja de gráficos que muestran la actividad de CD73 expresado en células Calu-6 (parte superior) o células H292 (parte inferior) después del tratamiento con los anticuerpos anti-CD73 indicados. Los datos se normalizan respecto a los controles no tratados y se presentan como media $\pm$ SEM.

[0030] La **FIG. 3** es un conjunto de gráficos que muestran la unión de los

25 anticuerpos anti-CD73 indicados y un análogo de anticuerpo de referencia (oleclumab) a CD73 humano y de cynomolgus expresado en las células CHO-S. Se usaron células CHO-S con transfección simulada como control negativo. El "Ab Control" es un anticuerpo de isotipo IgG₁-LALA deficiente en Fc γ R no específico de CD73. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

30 **[0031]** La **FIG. 4** es un esquema que muestra los patrones de competición y agrupaciones de epítomos identificados para los anticuerpos anti-CD73 indicados. Las líneas negras de conexión indican actividad de bloqueo cruzada. Las líneas punteadas de conexión indican anticuerpos que solo bloquean en una dirección.

Los anticuerpos se agrupan según los patrones de competición con otros anticuerpos anti-CD73.

[0032] La **FIG. 5** representa los epítomos de unión de los anticuerpos 21127 (panel A), 21163 (panel B), 21046 (panel C), análogo 11E1 (panel D), análogo oleclumab (panel E), y análogo CPX006 (panel F) mapeados en la estructura de cristal del dímero de CD73 (4H2G) en su estado abierto. Las estructuras se muestran como una representación en superficie, con el dominio N-terminal en gris claro y el dominio C-terminal en gris. La adenosina se muestra como varillas en blanco (indicado con flechas). Los epítomos lineales se muestran en gris oscuro y los residuos de contacto en negro.

[0033] Las **FIG. 6A y 6B** son una serie de perfiles de SEC-MALS de los anticuerpos 21127, 21163, 21046, y análogos 11E1, oleclumab, y CPX006 mezclados con CD73 en las relaciones mAb:CD73 1:1 (líneas negras), 0,5:1 (líneas grises oscuro), 0,1:1 (líneas grises claro), 0:1 (líneas grises punteadas) y 1:0 (líneas negras punteadas). Los tamaños calculados de los diferentes picos se muestran en la **Tabla 10**.

[0034] La **FIG. 7** es un gráfico que muestra la actividad de CD73 soluble después del tratamiento con los anticuerpos anti-CD73 indicados y un análogo de anticuerpo de referencia (oleclumab). El “Ab Control” es un anticuerpo de isotipo IgG₁-LALA deficiente en FcγR no específico de CD73. Los datos se normalizan respecto a los controles no tratados y se presentan como media ± SEM. La línea punteada vertical indica la concentración de anticuerpo que es equimolar con la del CD73 soluble recombinante.

[0035] La **FIG. 8** es un conjunto de gráficos que muestra la actividad de CD73 expresado en células Calu-6 (parte superior), células H292 (parte media), y células Cynom-K1 (parte inferior) después del tratamiento con los anticuerpos anti-CD73 indicados y un análogo de anticuerpo de referencia (oleclumab). El “Ab Control” es un anticuerpo de isotipo IgG₁-LALA deficiente en FcγR no específico de CD73. Los datos se normalizan respecto a los controles no tratados y se presentan como media ± SEM.

[0036] La **FIG. 9** es un conjunto de gráficos que muestra la actividad de CD73 expresado en células H292 después del tratamiento con los anticuerpos anti-CD73 indicados y un análogo de anticuerpo de referencia (oleclumab) durante 3 horas (parte superior), 6 horas (parte media), o 24 horas (parte inferior). Los datos se

normalizan respecto a los controles no tratados y se presentan como media $\pm$ SEM.

[0037] La **FIG. 10** es un gráfico que muestra la actividad de CD73 expresado por 20 líneas celulares de cáncer diferentes en presencia de los anticuerpos indicados como se mide por el ensayo CellTiter-Glo. El “Ab Control” es un anticuerpo de isotipo IgG₁-LALA deficiente en FcγR no específico de CD73. Cada punto de datos representa la media de tres replicados técnicos.

[0038] La **FIG. 11** es una pareja de gráficos que muestran el efecto del bloqueo de la actividad de CD73 sobre la viabilidad de las dos líneas celulares de cáncer de mama triple negativo MBA-MB-231 (panel superior) y MBA-MB-468 (panel inferior) crecidas en presencia de AMP 300 μM. El “Ab Control” es un anticuerpo de isotipo IgG₁-LALA deficiente en FcγR no específico de CD73. Todos los recuentos se normalizan respecto a las células no tratadas, y los datos se presentan como la media de tres replicados técnicos $\pm$ SEM.

[0039] La **FIG. 12** es un conjunto de gráficos que muestran la actividad de CD73 expresado por células T CD4⁺ y CD8⁺ y células B CD19⁺ primarias de donantes humanos sanos en presencia de los anticuerpos indicados como se mide por el ensayo CellTiter-Glo. La actividad se normaliza respecto a las células no tratadas (100 %). El “Ab Control” es un anticuerpo de isotipo IgG₁-LALA deficiente en FcγR no específico de CD73. Los datos se presentan como la media de tres replicados técnicos $\pm$ SEM.

[0040] La **FIG. 13** es un gráfico que muestra la proliferación de las células T CD4⁺ tratadas con lechos anti-CD3/CD28, AMP, y los anticuerpos anti-CD73 indicados y un análogo de anticuerpo de referencia (oleclumab). Los datos se normalizan respecto a los controles no tratados con AMP y se presentan como media $\pm$ SEM.

[0041] La **FIG. 14** es una pareja de gráficos que muestran la activación de las células T CD4⁺ (panel superior) y CD8⁺ (panel inferior) tratadas con lechos anti-CD3/CD28, AMP y 21127 o un análogo de anticuerpo de referencia (oleclumab). El “Ab Control” es un anticuerpo de isotipo IgG₁-LALA deficiente en FcγR no específico de CD73. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

[0042] La **FIG. 15** es un gráfico que muestra la proliferación de las células T en una reacción linfocitaria mixta (MLR) de una vía después de la incubación con anticuerpo anti-PD-1 (12819), AMP, y el anticuerpo anti-CD73 indicado o un análogo de anticuerpo de referencia (oleclumab). El “Ab Control” es un anticuerpo de isotipo IgG₁-LALA deficiente en FcγR no específico de CD73. Los datos se normalizan

respecto a los controles no tratados con AMP y se presentan como media $\pm$ SEM.

[0043] La **FIG. 16** es una pareja de gráficos que muestran la proliferación de las células T en una MLR de una vía después de la incubación con (panel inferior) o sin (panel superior) AMP y con las concentraciones indicadas de anticuerpos anti-PD-1 y/o anti-CD73. La combinación 12819 + 21127 es una mezcla 1:1 de los dos anticuerpos, y las concentraciones indicadas muestran la concentración total de la mezcla. El “Ab Control” es un anticuerpo de isotipo IgG₁-LALA deficiente en FcγR no específico de CD73. Los datos se normalizan respecto a los controles no tratados con AMP y se presentan como media $\pm$ SEM.

[0044] Las **FIG. 17A y 17B** representan la activación de las células B en PBMC de un donante sano estimuladas toda la noche con los anticuerpos indicados (10 μ g/mL) y ligando de CD40 (0,5 μ g/mL). La **FIG. 17A** es una serie de gráficos que muestran el nivel de CD69 en las células B (CD20⁺). La **FIG. 17B** es una serie de gráficos que muestran la intensidad de fluorescencia media (MFI) para la tinción de anticuerpo de los marcadores de la activación de las células B CD25, CD69 y CD83. El “IgG1-LALA Control” es un anticuerpo de isotipo IgG₁-LALA deficiente en FcγR no específico de CD73. Los datos son replicados de un donante y se presentan como media $\pm$ SEM.

[0045] La **FIG. 18** es un gráfico que muestra los niveles de CD73 expresado en células H292 después de 24 horas de tratamiento con un anticuerpo anti-CD73 indicado o el análogo de anticuerpo de referencia (oleclumab). Los datos se normalizan respecto al control no tratado y se presentan como media $\pm$ SEM.

[0046] La **FIG. 19** es una pareja de gráficos que muestran la actividad de CD73 en el modelo de melanoma de xenoinjerto humano A375, después del tratamiento con los anticuerpos indicados. Panel superior: los ratones humanizados con PBMC con injerto de A375 recibieron diferentes dosis de 21127 tres veces a la semana durante dos semanas. Los tumores se recogieron un día después de la última dosis y se analizaron para determinar la actividad de CD73. Panel inferior: los ratones NOD-*scid* a los que se injertó subcutáneamente A375 se trataron tres veces a la semana durante una semana con los anticuerpos indicados o combinaciones. Los tumores se recogieron en los días 3, 7, 10, 17, y 29 después del último tratamiento y se analizaron para determinar la actividad de CD73. Los datos se normalizan respecto a los controles no tratados y se presentan como media $\pm$ SEM.

[0047] La **FIG. 20** es un gráfico que muestra el crecimiento tumoral en ratones

NOD-*scid* a los que se injertó subcutáneamente la línea celular de cáncer de mama triple negativo humano MDA-MB-231. Los ratones se trataron dos veces a la semana con 10 mg/kg de anticuerpo 21127 o un análogo de anticuerpo de referencia (oleclumab). El área gris indica el periodo de tratamiento. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM.

[0048] La **FIG. 21** es una pareja de gráficos que muestran el efecto del tratamiento con el anticuerpo anti-CD73 21127 o vehículo sobre el crecimiento tumoral en ratones humanizados con PBMC a los que se injertó células tumorales Calu-6 o A375. El área gris indica el periodo de tratamiento. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM. * $P < 0,05$

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0049] La presente descripción proporciona nuevos anticuerpos anti-CD73 humano que pueden usarse para suprimir la actividad de CD73 en un paciente, tal como un paciente con cáncer. A no ser que se afirme otra cosa, tal y como se usa en la presente memoria, "CD73" se refiere a CD73 humano. Una secuencia polipeptídica de CD73 humano está disponible con el No. de Acceso UniProt P21589 (5NTD_HUMAN) (SEQ ID NO: 43), como se muestra a continuación:

	10	20	30	40	50
20	MCPRAARAPA	TLLLALGAVL	WPAAGAWELT	ILHTNDVHSR	LEQTSSESSK
	60	70	80	90	100
	CVNASRCMGG	VARLFTKVQQ	IRRAEPNVLL	LDAGDQYQGT	IWFTVYKGAE
	110	120	130	140	150
	VAHFMNALRY	DAMALGNHEF	DNGVEGLIEP	LLKEAKFPIL	SANIKAKGPL
25	160	170	180	190	200
	ASQISGLYLP	YKVLPGDEV	VGIVGYTSKE	TPFLSNPGTN	LVFEDEITAL
	210	220	230	240	250
	QPEVDKLT	NVNKIIALGH	SGFEMDKLIA	QKVRGVDVVV	GGHSNTFLYT
	260	270	280	290	300
30	GNPPSKEVPA	GKYPFIVTSD	DGRKVPVQA	YAFGKYLGYL	KIEFDERGNV
	310	320	330	340	350
	ISSHGNPILL	NSSIPEDPSI	KADINKWRIK	LDNYSTQELG	KTIVYLDGSS
	360	370	380	390	400
	QSCRFRECNM	GNLICDAMIN	NNLRHTDEMF	WNHVSMCILN	GGGIRSPIDE
35	410	420	430	440	450

```

RNNGTITWEN LAAVLPPGGT FDLVQLKGST LKKA FEHSVH RYGQSTGEFL
      460      470      480      490      500
QVGGIHHVVD LSRKPGDRVV KLDVLCTKCR VPSYDPLKMD EVYKVILPNF
      510      520      530      540      550
5  LANGGDGFQM IKDELLRHDS GDQDINVVST YISKMKVIYP AVEGRIKFST
      560      570
   GSHCHGSFSL IFLSLWAVIF VLYQ

```

[0050] El término “anticuerpo” (Ab) o “inmunoglobulina” (Ig), tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un tetrámero que comprende dos cadenas pesadas (H) (aproximadamente 50-70 kDa) y dos cadenas ligeras (L) (aproximadamente 25 kDa) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está comprendida por un dominio variable de cadena pesada (VH) y una región constante de cadena pesada (CH). Cada cadena ligera está compuesta por un dominio variable de cadena ligera (VL) y una región constante de cadena ligera (CL). Los dominios VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas “regiones determinantes de la complementariedad” (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas “regiones marco” (FR). Cada VH y VL está compuesto por tres CDR (H-CDR en la presente memoria designa una CDR de la cadena pesada; y L-CDR en la presente memoria designa una CDR de la cadena ligera) y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. La asignación de los números de los aminoácidos, y de las regiones FR y CDR, en la cadena pesada o ligera puede hacerse según las definiciones de IMGT® (numeración EU; Lefranc et al., *Dev Comp Immunol* **27**(1):55-77 (2003)); o las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 y 1991)); Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* **196**:901-917 (1987); Chothia et al., *Nature* **342**:878-883 (1989); MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* **262**:732-745 (1996); o Honegger y Plückthun, *J. Mol. Biol.* **309**(3):657-70 (2001).

[0051] El término “anticuerpo recombinante” se refiere a un anticuerpo que se expresa a partir de una célula o línea celular que comprende la(s) secuencia(s) de nucleótidos que codifican el anticuerpo, en donde dicha(s) secuencia(s) de nucleótidos no están asociadas de forma natural con la célula.

[0052] El término “proteína aislada,” “polipéptido aislado” o “anticuerpo aislado” se

refiere a una proteína, polipéptido o anticuerpo que en virtud de su origen o fuente de derivación (1) no está asociado con los componentes asociados naturalmente que le acompañan en su estado nativo, (2) carece de otras proteínas de la misma especie, (3) es expresado por una célula de una especie diferente, y/o (4) no está presente en la naturaleza. Por tanto, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente de la célula de la que se origina naturalmente estará “aislado” de sus componentes asociados naturalmente. También puede conseguirse que una proteína carezca sustancialmente de los componentes asociados naturalmente por aislamiento, usando técnicas de purificación de proteínas muy conocidas en la técnica.

[0053] El término “afinidad” se refiere a una medición de la atracción entre un antígeno y un anticuerpo. La atracción intrínseca del anticuerpo por el antígeno se expresa típicamente como la constante en equilibrio de la afinidad de la unión (K_D) de una interacción particular anticuerpo-antígeno. Se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la K_D es ≤ 1 mM, preferiblemente ≤ 100 nM. Una constante de la afinidad de la unión K_D puede medirse, p. ej., por resonancia de plasmón superficial (BIAcore™) o Interferometría en Bio-Capa, por ejemplo, usando el sistema IBIS MX96 SPR de IBIS Technologies o el sistema Octet™ de ForteBio.

[0054] El término “epítipo” tal y como se usa en la presente memoria se refiere a una parte (determinante) de un antígeno que se une específicamente a un anticuerpo o a una molécula relacionada tal como una molécula de unión biespecífica. Los determinantes epitópicos consisten generalmente en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas tales como cadenas laterales de aminoácidos o carbohidratos o azúcares y tienen generalmente características de estructura tridimensional específicas, así como características de carga específicas. Un epítipo puede ser “lineal” o “conformacional.” En un epítipo lineal, todos los puntos de interacción entre una proteína (p. ej., un antígeno) y una molécula que interacciona (tal como un anticuerpo) aparecen de manera lineal a lo largo de la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína. En un epítipo conformacional, los puntos de interacción aparecen a lo largo de residuos de aminoácidos en la proteína que están separados entre sí en la secuencia de aminoácidos primaria. Una vez se determina un epítipo deseado en un antígeno, es posible generar anticuerpos frente a ese epítipo usando técnicas muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo frente a un epítipo lineal puede

generarse, p. ej., inmunizando a un animal con un péptido que tenga los residuos de aminoácidos del epítipo lineal. Un anticuerpo frente a un epítipo conformacional puede generarse, p. ej., inmunizando a un animal con un minidominio que contenga los residuos de aminoácidos relevantes del epítipo conformacional. Un anticuerpo frente a un epítipo particular también puede generarse, p. ej., inmunizando a un animal con la molécula diana de interés (p. ej., CD73) o una parte relevante de la misma, después cribando para determinar la unión al epítipo.

[0055] Se puede determinar si un anticuerpo se une al mismo epítipo que o compite para la unión con un anticuerpo anti-CD73 de la presente descripción usando métodos conocidos en la técnica, incluyendo, sin limitación, ensayos de competición, preclasificación de epítopos, y escaneo de alanina. En algunas realizaciones, se permite que el anticuerpo anti-CD73 de la presente descripción se una a CD73 en condiciones saturantes, y después se mide la capacidad del anticuerpo de ensayo de unirse a CD73. Si el anticuerpo de ensayo es capaz de unirse a CD73 al mismo tiempo que el anticuerpo anti-CD73 de referencia, entonces el anticuerpo de ensayo se une a un epítipo diferente que el anticuerpo anti-CD73 de referencia. Sin embargo, si el anticuerpo de ensayo no es capaz de unirse a CD73 al mismo tiempo, entonces el anticuerpo de ensayo se une al mismo epítipo, a un epítipo superpuesto, o a un epítipo que está muy cerca del epítipo al que se une el anticuerpo anti-CD73 de la presente descripción. Este experimento puede realizarse usando, p. ej., ELISA, RIA, BIACORE™, SPR, Interferometría en Bio-Capa o citometría de flujo. Para ensayar si un anticuerpo anti-CD73 compite de manera cruzada con otro anticuerpo anti-CD73, se puede usar el método de competición descrito anteriormente en dos direcciones, es decir, determinando si el anticuerpo conocido bloquea al anticuerpo de ensayo y viceversa. Dichos experimentos de competición cruzada pueden realizarse, p. ej., usando un instrumento IBIS MX96 SPR o el sistema Octet™.

[0056] El término “anticuerpo humano” se refiere a un anticuerpo en el que las secuencias del dominio variable y de la región constante derivan de secuencias humanas. El término engloba anticuerpos con secuencias que derivan de genes humanos, pero que se han modificado, p. ej., para disminuir la inmunogenicidad, incrementar la afinidad, y/o incrementar la estabilidad. Además, el término engloba anticuerpos producidos recombinantemente en células no humanas, que pueden impartir una glicosilación que no es típica de las células humanas. El término

también engloba anticuerpos producidos en organismos no humanos transgénicos con genes de anticuerpos humanos (p. ej., ratas OmniRat®).

[0057] El término “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “parte de anticuerpo”), tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una o

5 más partes o fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (p. ej., CD73 humano, o una parte del mismo). Se ha mostrado que determinados fragmentos de un anticuerpo de longitud completa pueden realizar la función de unión a antígeno del anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de unión englobados en el término “parte de unión a antígeno” incluyen

10 (i) un fragmento Fab: un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂: un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un

15 fragmento dAb, que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada capaz de unirse específicamente a un antígeno. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un conector sintético que permite prepararlos como una única cadena de proteína en la que los

20 dominios VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como un Fv de cadena única (scFv)). También en la presente descripción están moléculas de unión a antígeno que comprenden un VH y/o un VL. En el caso de un VH, la molécula también puede comprender uno o más de una región CH1, bisagra, CH2, o CH3. Se pretende que dichos anticuerpos de cadena única también estén

25 englobados en el término “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo. Otras formas de anticuerpos de cadena única, tales como diacuerpos, también están englobadas. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos, en los que los dominios VH y VL se expresan en una única cadena de polipéptido, pero usando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos

30 dominios en la misma cadena, forzando de esta manera a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno.

[0058] Las partes de anticuerpo, tales como los fragmentos Fab y F(ab')₂, pueden prepararse a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales

como digestión con papaína o pepsina de anticuerpos completos. Además, los anticuerpos, partes de anticuerpo y moléculas de inmunoadhesión pueden obtenerse usando técnicas estándar de ADN recombinante, p. ej., como se describe en la presente memoria.

- 5 **[0059]** La clase (isotipo) y subclase de los anticuerpos anti-CD73 puede determinarse por cualquier método conocido en la técnica. En general, la clase y subclase de un anticuerpo puede determinarse usando anticuerpos que son específicos para una clase y subclase particular de anticuerpo. Dichos anticuerpos están disponibles comercialmente. La clase y subclase puede determinarse por
- 10 ELISA o transferencia Western, así como por otras técnicas. Alternativamente, la clase y subclase puede determinarse secuenciando toda o una parte de la región constante de las cadenas pesada y/o ligera de los anticuerpos, comparando sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos conocidas de diversas clases y subclases de inmunoglobulinas, y determinando la clase y
- 15 subclase de los anticuerpos.

[0060] A no ser que se indique otra cosa, todos los números de residuos de aminoácidos de los anticuerpos referidos en esta descripción son aquellos bajo el esquema de numeración de IMGT® (numeración EU).

Anticuerpos Anti-CD73

- 20 **[0061]** La presente descripción proporciona anticuerpos dirigidos frente a CD73, y partes de unión a antígeno de los mismos. En una realización particular, los anticuerpos descritos en la presente memoria son anticuerpos humanos generados a partir de animales transgénicos (p. ej., ratas) que son capaces de producir anticuerpos codificados por genes de anticuerpos humanos reorganizados. En
- 25 determinadas realizaciones, los anticuerpos humanos pueden contener determinadas mutaciones, p. ej., para cambiar mutaciones derivadas del cebador de nuevo a la secuencia de la línea germinal (véanse, p. ej., las secuencias variantes “corregidas por Symplex” en la **Tabla 1**).

- [0062]** En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 de la presente
- 30 descripción tienen las mutaciones “LALA” (L234A/L235A) en la región Fc. Estas mutaciones atenúan la unión de los anticuerpos a FcγR humano (receptores de Fc gamma). Dichos anticuerpos son ventajosos porque tienen un nivel bajo de funciones efectoras secundarias y no deplecionan las células T efectoras ni están

dirigidos a otras células no malignas.

[0063] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno compite o compite de manera cruzada para la unión a CD73 humano con, o se une al mismo epítipo de CD73 humano que, un anticuerpo que comprende:

- 5 a) una HC con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 9 y 41 y una LC con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 13 y 42;
- b) una HC con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 10 y 41 y una LC con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 14 y 42;
- 10 c) una HC con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 11 y 41 y una LC con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 15 y 42; o
- d) una HC con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 12 y 41 y una LC con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 16 y 42.

[0064] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno tiene una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada (H-CDR3) de la SEQ ID NO: 19, 25, 31, o 37.

[0065] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno tiene CDR1-3 de cadena pesada (H-CDR1-3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 17-19, 23-25, 29-31, o 35-37, respectivamente.

20 **[0066]** En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno tiene una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena pesada (VH) que es al menos un 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 9-12.

25 **[0067]** En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno tiene un VH que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 9-12.

30 **[0068]** En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 tiene una secuencia de aminoácidos de VH que es al menos un 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 9-12; y una secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada que es al menos un 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41.

[0069] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 comprende una secuencia de aminoácidos de VH de una cualquiera de las SEQ ID NO: 9-12 y una

secuencia de aminoácidos de región constante de cadena pesada de la SEQ ID NO: 41.

[0070] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno tiene una secuencia de aminoácidos de CD3 de cadena ligera (L-CDR3)

5 de la SEQ ID NO: 22, 28, 34, o 40.

[0071] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno tiene CDR1-3 de cadena ligera (L-CDR1-3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 20-22, 26-28, 32-34, o 38-40, respectivamente.

10 **[0072]** En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno tiene una secuencia de aminoácidos de dominio variable de cadena ligera (VL) que es al menos un 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 13-16.

15 **[0073]** En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno tiene un VL que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 13-16.

[0074] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 tiene una secuencia de aminoácidos de VL que es al menos un 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 13-16; y una secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera que es al menos un 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42.

20 **[0075]** En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 comprende una secuencia de aminoácidos de VL de una cualquiera de las SEQ ID NO: 13-16 y una secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 42.

[0076] En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 comprende una cualquiera de las cadenas pesadas descritas anteriormente y una cualquiera de las cadenas ligeras descritas anteriormente.

30 **[0077]** En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno de la presente descripción comprende las secuencias de aminoácidos de H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de las:

- a) SEQ ID NO: 17-22, respectivamente;
- b) SEQ ID NO: 23-28, respectivamente;

- c) SEQ ID NO: 29-34, respectivamente; o
- d) SEQ ID NO: 35-40, respectivamente.

[0078] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno de la presente descripción comprende un VH y un VL que son un 80 %,

5 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idénticos a las secuencias de aminoácidos de las:

- a) SEQ ID NO: 9 y 13, respectivamente;
- b) SEQ ID NO: 10 y 14, respectivamente;
- c) SEQ ID NO: 11 y 15, respectivamente; o
- 10 d) SEQ ID NO: 12 y 16, respectivamente.

[0079] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno de la presente descripción comprende un VH y un VL que comprenden las secuencias de aminoácidos de las:

- a) SEQ ID NO: 9 y 13, respectivamente;
- 15 b) SEQ ID NO: 10 y 14, respectivamente;
- c) SEQ ID NO: 11 y 15, respectivamente; o
- d) SEQ ID NO: 12 y 16, respectivamente.

[0080] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 de la presente descripción comprende:

- 20 a) una HC con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 9 y 41 y una LC con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 13 y 42;
- b) una HC con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 10 y 41 y una LC con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 14 y 42;
- c) una HC con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 11 y 41 y una
- 25 LC con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 15 y 42; o
- d) una HC con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 12 y 41 y una LC con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 16 y 42.

[0081] La presente descripción también proporciona un anticuerpo anti-CD73 o una parte de unión a antígeno del mismo que compite o compite de manera cruzada

30 para la unión con, o se une al mismo epítipo que, el anticuerpo 21028, 21046, 21127, o 21163.

[0082] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno de la presente descripción comprende las secuencias de aminoácidos de H-CDR1-3 y L-CDR1-3 del anticuerpo 21028, 21046, 21127, o 21163.

[0083] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno de la presente descripción comprende un VH y VL que son al menos un 90 % idénticos en secuencia de aminoácidos al VH y VL, respectivamente, del anticuerpo 21028, 21046, 21127, o 21163.

- 5 **[0084]** En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno de la presente descripción comprende un VH y VL que son el VH y VL, respectivamente, del anticuerpo 21028, 21046, 21127, o 21163.

- [0085]** En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 de la presente descripción es el anticuerpo 21028, 21046, 21127, o 21163, o un anticuerpo con las
10 mismas secuencias de aminoácidos que dicho anticuerpo.

- [0086]** La clase de un anticuerpo anti-CD73 obtenido por los métodos descritos en la presente memoria puede cambiarse o intercambiarse con otra clase o subclase. En algunas realizaciones de la presente descripción, una molécula de ácido nucleico que codifica VL o VH se aísla usando métodos muy conocidos en la técnica de
15 manera que no incluya secuencias de ácido nucleico que codifican CL o CH, respectivamente. Las moléculas de ácido nucleico que codifican VL o VH se unen entonces operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un CL o CH, respectivamente, de una clase diferente de molécula de inmunoglobulina. Esto puede conseguirse usando un vector o una molécula de ácido nucleico que
20 comprende una secuencia CL o CH, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD73 que era originariamente IgM puede cambiarse de clase a IgG. Además, el cambio de clase puede usarse para convertir una subclase de IgG en otra, p. ej., de IgG₁ a IgG₂. Una región constante de cadena ligera κ puede cambiarse, p. ej., a una región constante de cadena ligera λ , o viceversa. Un
25 método ejemplar para producir un anticuerpo de la presente descripción con un isotipo Ig deseado comprende las etapas de aislar una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de un anticuerpo anti-CD73 y una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera de un anticuerpo anti-CD73, obtener el dominio variable de la cadena pesada, ligar una secuencia codificadora para el
30 dominio variable de la cadena pesada con una secuencia codificadora para la región constante de una cadena pesada del isotipo deseado, expresar la cadena ligera y la cadena pesada codificadas por la secuencia ligada en una célula, y recoger el anticuerpo anti-CD73 con el isotipo deseado.

[0087] El anticuerpo anti-CD73 de la presente descripción puede ser una molécula

de IgG, IgM, IgE, IgA, o IgD, pero es típicamente del isotipo IgG, p. ej., de la subclase de IgG IgG₁, IgG_{2a} o IgG_{2b}, IgG₃ o IgG₄. En algunas realizaciones, el anticuerpo es de la subclase de isotipo IgG₁. En algunas realizaciones, el anticuerpo es de la subclase de isotipo IgG₂.

- 5 **[0088]** En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 puede comprender al menos una mutación en la región Fc. Se conocen varias mutaciones de Fc diferentes, donde estas mutaciones alteran la función efectora del anticuerpo. Por ejemplo, en muchos casos, será deseable reducir o eliminar la función efectora, p. ej., cuando las interacciones ligando/receptor son indeseables o en el caso de
- 10 conjugados anticuerpo-fármaco.
- [0089]** En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 comprende al menos una mutación en la región Fc que reduce la función efectora, p. ej., mutaciones en una o más de las posiciones 228, 233, 234 y 235, donde las posiciones de los aminoácidos se numeran según el esquema de numeración IMGT®.
- 15 **[0090]** En algunas realizaciones, p. ej., cuando el anticuerpo es de la subclase IgG₁, uno o ambos de los residuos de aminoácidos en las posiciones 234 y 235 pueden mutarse, por ejemplo, de Leu a Ala (L234A/L235A). Estas mutaciones reducen la función efectora de la región Fc de los anticuerpos IgG₁. Las posiciones de los aminoácidos se numeran según el esquema de numeración IMGT®.
- 20 **[0091]** En algunas realizaciones, p. ej., cuando el anticuerpo es de la subclase IgG₄, puede comprender la mutación S228P, donde la posición del aminoácido se numera según el esquema de numeración IMGT®. Se sabe que esta mutación reduce el intercambio de brazos Fab no deseado.
- [0092]** En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 de la invención, o una
- 25 parte de unión a antígeno del mismo, se une a un epítipo de CD73 que incluye al menos uno (p. ej., al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, o al menos cinco) de los siguientes residuos de la SEQ ID NO: 43: R73, R109, D168, I301, S302, y H304. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o parte de unión a antígeno se une a un epítipo de CD73 que comprende o consiste en los residuos
- 30 R73, R109, y D168 (tal como el anticuerpo 21127). En determinadas realizaciones, el anticuerpo o parte de unión a antígeno se une a un epítipo de CD73 que comprende o consiste en el residuo R109 (tal como el anticuerpo 21163). En determinadas realizaciones, el anticuerpo o parte de unión a antígeno se une a un epítipo de CD73 que comprende o consiste en los residuos I301, S302, y H304 (tal

como el anticuerpo 21046).

[0093] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 de la invención, o una parte de unión a antígeno del mismo, se une a un epítipo de CD73 que comprende los residuos 27-31, 61-70, 61-75, 161-170, 266-270, y/o 291-305 de la SEQ ID NO:

43. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o parte de unión a antígeno se une a un epítipo de CD73 que comprende o consiste en los residuos 27-31, 61-75, y 161-170 (tal como el anticuerpo 21127). En determinadas realizaciones, el anticuerpo o parte de unión a antígeno se une a un epítipo de CD73 que comprende o consiste en los residuos 61-70 y 161-170 (tal como el anticuerpo 21163). En determinadas realizaciones, el anticuerpo o parte de unión a antígeno se une a un epítipo de CD73 que comprende o consiste en los residuos 27-31, 266-270, y 291-305 (tal como el anticuerpo 21046).

[0094] En algunas realizaciones, el anticuerpo o parte se une a un epítipo que comprende los residuos 27-31 (o un fragmento del mismo, tal como un fragmento de 1, 2, 3, o 4 residuos), de la SEQ ID NO: 43 (tal como los anticuerpos 21127 y 21046).

En algunas realizaciones, el anticuerpo o parte se une a un epítipo que comprende los residuos 61-75 (o un fragmento del mismo, tal como un fragmento de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 residuos, p. ej., residuos 61-70) de la SEQ ID NO: 43 (tales como los anticuerpos 21127 y 21163). En algunas

realizaciones, el anticuerpo o parte se une a un epítipo que comprende los residuos 161-170 (o un fragmento del mismo, tal como un fragmento de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9 residuos) de la SEQ ID NO: 43 (tales como los anticuerpos 21127 y 21163). En algunas realizaciones, el anticuerpo o parte se une a un epítipo que comprende los residuos 266-270 (o un fragmento del mismo, tal como un fragmento de 1, 2, 3, o 4

residuos) de la SEQ ID NO: 43 (tal como el anticuerpo 21046). En algunas realizaciones, el anticuerpo o parte se une a un epítipo que comprende los residuos 291-305 (o un fragmento del mismo, tal como un fragmento de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 residuos) de la SEQ ID NO: 43 (tal como el anticuerpo 21046).

[0095] También se contempla un epítipo con cualquier combinación de los residuos anteriores, o los residuos mostrados en la Tabla 9.

[0096] En algunas realizaciones, una secuencia de aminoácidos que comprende un epítipo de CD73 como se describe en la presente memoria puede usarse como un inmunógeno (p. ej., administrado a un animal o como un antígeno para el cribado

de bibliotecas de anticuerpos) para generar o identificar anticuerpos anti-CD73 o partes de unión a antígeno de los mismos que se unen a dicho epítipo.

[0097] En algunas realizaciones (p. ej., a una concentración de 10 µg/mL), un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria
 5 inhibe la actividad de CD73 soluble al menos un 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 100 % (p. ej., al menos un 40 %). En algunas realizaciones, a una concentración de 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50, o 100 µg/mL, un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria inhibe la actividad de CD73 soluble al menos un 90 %.

[0098] En algunas realizaciones (p. ej., a una concentración de 10 µg/mL), un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria
 10 inhibe la actividad de CD73 en las células Calu-6 al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % (p. ej., al menos un 75 %).

[0099] En algunas realizaciones (p. ej., a una concentración de 10 µg/mL), un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria
 15 inhibe la actividad de CD73 en las células H292 al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % (p. ej., al menos un 80 %).

[0100] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria se une específicamente a CD73 humano,
 20 CD73 de cynomolgus, o ambos, expresados en las células CHO-S.

[0101] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria se une al dominio extracelular (ECD) de CD73 humano con una K_D de 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,09, 0,08, 0,07, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03, 0,02, o 0,01 nM o menos (p. ej., 1 nM o menos) como
 25 se mide por resonancia de plasmón superficial (SPR).

[0102] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria se une al dominio extracelular (ECD) de CD73 de cynomolgus con una K_D de 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,09, 0,08, 0,07, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03, 0,02, o 0,01 nM o menos (p. ej., 0,7 nM o menos)
 30 como se mide por resonancia de plasmón superficial (SPR).

[0103] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria no se une al mismo epítipo de CD73 que oleclumab, CPX006, 11E1, o cualquier combinación de los mismos.

[0104] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a

antígeno descrito en la presente memoria se une a un epítipo en el homodímero de CD73 de una manera que da lugar a un complejo 1:1. En determinadas realizaciones, la unión del anticuerpo/CD73 da lugar a solo un complejo 1:1. En determinadas realizaciones, la unión del anticuerpo/CD73 da lugar principalmente a un complejo 1:1. En realizaciones particulares, la unión del anticuerpo o parte de unión a antígeno a CD73 da lugar a un complejo 1:1 independientemente de la concentración de CD73.

[0105] En algunas realizaciones, p. ej., a una concentración de 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 µg/mL o menos (tal como a una concentración de 10 µg/mL o menos), un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria inhibe la actividad de CD73 soluble. En determinadas realizaciones (p. ej., a una concentración de 10 µg/mL), el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno inhibe dicha actividad de CD73 de manera más efectiva que oleclumab. En realizaciones particulares (p. ej., con el anticuerpo o parte de unión a antígeno a una de las concentraciones enumeradas anteriormente), la actividad de CD73 se inhibe al menos un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 %. Por ejemplo, el anticuerpo o parte de unión a antígeno puede inhibir la actividad de CD73 un 100 % a una concentración de 3 µg/mL.

[0106] En algunas realizaciones, p. ej., a una concentración de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, o 100 µg/mL o menos (tal como a una concentración de 3 µg/mL o menos), un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria inhibe la actividad de CD73 en las células Calu-6, H292, Cynom-K1, o cualquier combinación de las mismas. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno inhibe dicha actividad de CD73 de manera más efectiva que oleclumab. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno permanece más efectivo que oleclumab después de una incubación adicional de 3, 6, o 24 horas. En realizaciones particulares (p. ej., con el anticuerpo o parte de unión a antígeno a una de las concentraciones enumeradas anteriormente), la actividad de CD73 se inhibe al menos un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 %.

[0107] En algunas realizaciones (p. ej., a una concentración de 25 µg/mL), un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria inhibe la actividad de CD73 en cualquier línea celular o combinación de las líneas celulares mostradas en la **Tabla 11**. En determinadas realizaciones, el anticuerpo

anti-CD73 o parte de unión a antígeno inhibe la actividad de CD73 en las células Calu-6, células NCI-H1775, células KYSE-30, células Capan-2, o cualquier combinación de las mismas. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno inhibe dicha actividad de CD73 de manera más efectiva que oleclumab.

[0108] En algunas realizaciones, p. ej., a una concentración de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, o 25 µg/mL o menos (tal como a una concentración de 0,01 µg/mL o menos), un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria inhibe la supervivencia y/o proliferación de las células MDA-MB-231, células MDA-MB-468, o ambas, *in vitro*. En determinadas realizaciones (p. ej., a una concentración de 0,5 µg/mL o más), el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno inhibe dicha supervivencia/proliferación de manera más efectiva que oleclumab. En realizaciones particulares (p. ej., con el anticuerpo o parte de unión a antígeno a una de las concentraciones enumeradas anteriormente), el número de células viables disminuye al menos un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 %.

[0109] En algunas realizaciones, p. ej., a una concentración de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, o 25 µg/mL o menos (tal como a una concentración de 0,1 µg/mL o menos), un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria inhibe la actividad de CD73 en las células T CD4⁺, células T CD8⁺, células B CD19⁺ primarias, o cualquier combinación de las mismas. En realizaciones particulares (p. ej., con el anticuerpo o parte de unión a antígeno a una de las concentraciones enumeradas anteriormente), la actividad de CD73 se inhibe, p. ej., al menos un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 %.

[0110] En algunas realizaciones, p. ej., a una concentración de 0,05, 0,1, 0,5, o 1 µg/mL o menos (tal como a una concentración de 0,01 µg/mL o menos), un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria restaura la proliferación de las células T CD4⁺. En algunas realizaciones, p. ej., a una concentración de 0,1, 0,5, 1, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, o 100 µg/mL o menos (tal como a una concentración de 25 µg/mL o menos), un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria restaura la proliferación de las células T CD4⁺ hasta un 100 %. En algunas realizaciones (p. ej., a una concentración de 0,1 µg/mL o más), el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno restaura la proliferación de las células T CD4⁺ de manera más efectiva que

oleclumab. En determinadas realizaciones (p. ej., con el anticuerpo o parte de unión a antígeno a una de las concentraciones enumeradas anteriormente), la proliferación de las células T se restaura hasta al menos un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 %.

5 **[0111]** En algunas realizaciones, p. ej., a una concentración de 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 1, 5, 10, 15, o 25 µg/mL o menos (tal como a una concentración de 1 µg/mL o menos), un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria activa las células T CD4⁺ y CD8⁺. En algunas realizaciones (p. ej., a una concentración de 0,1 µg/mL o más), el anticuerpo anti-CD73 o parte de
10 unión a antígeno activa las células T CD4⁺ y CD8⁺ de manera más efectiva que oleclumab.

[0112] En algunas realizaciones, p. ej., a una concentración de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, o 10 µg/mL o menos (tal como a una concentración de 0,01 µg/mL o menos), un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la
15 presente memoria, en combinación con un anticuerpo anti-PD-1, restaura la proliferación de las células T en presencia de AMP en una reacción linfocitaria mixta (MLR) de una vía. En determinadas realizaciones (p. ej., a una concentración de 1 µg/mL o menos), el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno, en combinación con el anticuerpo anti-PD-1, restaura completamente la proliferación de
20 las células T. En determinadas realizaciones (p. ej., a una concentración de 0,1 µg/mL o más), el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno, en combinación con el anticuerpo anti-PD-1, restaura la proliferación de las células T de manera más efectiva que oleclumab. En realizaciones particulares (p. ej., con el anticuerpo o parte de unión a antígeno a una de las concentraciones enumeradas
25 anteriormente, en combinación con un anticuerpo anti-PD-1), se restaura la proliferación de las células T hasta al menos un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 %.

[0113] En algunas realizaciones, p. ej., a una concentración de 0,5, 1, 5, 10, 15, o 25 µg/mL o menos (tal como a una concentración de 1 µg/mL o menos), un
30 anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria aumenta la activación de las células T en presencia de AMP, en una MLR de una vía. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno, en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 (tal como 12819), aumenta la activación de las células T en presencia de AMP en una MLR de una vía.

[0114] En algunas realizaciones (p. ej., a una concentración de 10 µg/mL), un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria no estimula la activación de las células B *in vitro*. En algunas realizaciones (p. ej., a una concentración de 10 µg/mL), un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria estimula la activación de las células B *in vitro*. La activación de las células B puede determinarse observando marcadores tales como, por ejemplo, CD25, CD69, y/o CD83.

[0115] En algunas realizaciones (p. ej., a una concentración de 25 µg/mL), un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria no reduce los niveles de CD73 en las células H292 *in vitro*. En algunas realizaciones (p. ej., a una concentración de 25 µg/mL), un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria reduce los niveles de CD73 en las células H292 *in vitro*, p. ej., hasta no más de un 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o 90 % en comparación con un control no tratado. En algunas realizaciones (p. ej., a una concentración de 25 µg/mL), un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria solo reduce modestamente los niveles de CD73 en las células H292 *in vitro*. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, los niveles de CD73 se educen no más de, p. ej., un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, o 35 % (p. ej., 25 %).

[0116] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria inhibe la actividad de CD73 en tumores recogidos de ratones humanizados con PBMC con injerto de células A375 (p. ej., donde los ratones se dosifican con el anticuerpo o parte de unión a antígeno a 5 mg/kg, 20 mg/kg, o 50 mg/kg tres veces a la semana durante una o dos semanas). En determinadas realizaciones, la inhibición de la actividad de CD73 se mantiene durante al menos 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 50, 75, 100, 125, 150, 175, o 200 días (p. ej., al menos 28 días) después de que haya acabado el tratamiento.

[0117] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria inhibe el crecimiento tumoral en ratones NOD-*scid* con injerto de células MDA-MB-231 (p. ej., donde los ratones se dosifican con el anticuerpo o parte de unión a antígeno a 10 mg/kg dos veces a la semana durante un total de 16 tratamientos). En determinadas realizaciones, la inhibición del crecimiento tumoral se mantiene con una ganancia limitada de volumen tumoral (p. ej., menos de 10, 20, 30, 40, o 50 mm³) durante al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60,

70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, o 200 días (p. ej., al menos 60 días) después de que haya acabado el tratamiento.

[0118] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria inhibe el crecimiento tumoral en ratones humanizados con PBMC con injerto de células Calu-6 o A375 (p. ej., donde los ratones se dosifican con el anticuerpo o parte de unión a antígeno a 10 mg/kg tres veces a la semana durante un total de seis tratamientos).

[0119] La presente descripción también contempla un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno con cualquier combinación de las propiedades anteriores.

[0120] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria tiene al menos una (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, o las 23) de las siguientes propiedades:

- a) inhibe la actividad de CD73 soluble *in vitro*;
- b) inhibe la actividad de CD73 en las células Calu-6 *in vitro*;
- c) inhibe la actividad de CD73 en las células H292 *in vitro*;
- d) se une específicamente a CD73 humano y de cynomolgus expresado en las células CHO-S;
- e) se une al ECD de CD73 humano con una K_D de 1 nM o menos como se mide por SPR;
- f) se une al ECD de CD73 de cynomolgus con una K_D de 0,7 nM o menos como se mide por SPR;
- g) no se une al mismo epítipo de CD73 que oleclumab, CPX006, y/o 11E1;
- h) se une a un epítipo en el homodímero de CD73 de una manera que da lugar a un complejo 1:1;
- i) inhibe la actividad de CD73 soluble de manera más efectiva que oleclumab *in vitro*;
- j) inhibe la actividad de CD73 en las células Calu-6, H292, y Cynom-K1 *in vitro*;
- k) inhibe la actividad de CD73 en las células Calu-6, NCI-H1775, KYSE-30, y Capan-2 *in vitro*;
- l) inhibe la supervivencia y/o proliferación de las células MDA-MB-231 y MDA-MB-468 *in vitro*;
- m) inhibe la actividad de CD73 en las células T CD4⁺ y CD8⁺ y células B CD19⁺ primarias *in vitro*;

- n) restaura la proliferación de las células T CD4⁺ *in vitro*;
- o) activa las células T CD4⁺ y CD8⁺ *in vitro*;
- p) en combinación con un anticuerpo anti-PD-1, restaura la proliferación de las células T en una reacción linfocitaria mixta (MLR) de una vía en presencia de AMP;
- 5 q) aumenta la activación de las células T en presencia de AMP en combinación con un anticuerpo anti-PD-1, en una MLR de una vía;
- r) no estimula la activación de las células B *in vitro*;
- s) no reduce los niveles de CD73 en las células H292 *in vitro* más de un 25 %;
- t) inhibe la actividad de CD73 en tumores recogidos de ratones humanizados con PBMC con injerto de células A375;
- 10 u) inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* en ratones NOD-scid con injerto de células MDA-MB-231;
- v) inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* en ratones humanizados con PBMC con injerto de células Calu-6; e
- 15 w) inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* en ratones humanizados con PBMC con injerto de células A375.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno tiene todas las propiedades a)-w). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno tiene al menos las propiedades a)-k), n), y s). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno tiene al menos las propiedades a)-g), i)-k), y n). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno tiene al menos las propiedades a)-d), i)-k), n), y s).

[0121] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria puede inhibir el crecimiento tumoral y/o inducir la regresión del crecimiento tumoral *in vivo*, puede ralentizar o revertir la metástasis en un paciente con cáncer, y/o puede prolongar la supervivencia de un paciente con cáncer. También se contempla cualquier combinación de las propiedades anteriores.

[0122] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria incrementa la proliferación de las células T y/o disminuye la actividad de CD73 de manera más efectiva que los anticuerpos anti-CD73 que están actualmente en ensayos clínicos. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno tiene al menos una de las siguientes propiedades:

- a una concentración de 0,1 µg/mL, incrementa la proliferación de las células T CD4⁺ activadas cultivadas con AMP 100 µM más que un anticuerpo con las secuencias de aminoácidos de HC y LC que comprenden las:

- SEQ ID NO: 17 y 19, respectivamente, de la Publicación de Patente de EE. UU. 2016/0129108;
- SEQ ID NO: 14 y 13, respectivamente, de la Publicación de Patente de EE. UU. 2018/0009899; o
- SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente, de la Publicación de Patente de EE. UU. 2018/0030144;

10 y/o

- a una concentración de 10 µg/mL o mayor, disminuye la actividad de CD73 en las células H292 después de 24 horas de incubación más que un anticuerpo con las secuencias de aminoácidos de HC y LC que comprenden las:

- SEQ ID NO: 17 y 19, respectivamente, de la Publicación de Patente de EE. UU. 2016/0129108;
- SEQ ID NO: 14 y 13, respectivamente, de la Publicación de Patente de EE. UU. 2018/0009899; o
- SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente, de la Publicación de Patente de EE. UU. 2018/0030144.

[0123] En determinadas realizaciones, un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la presente descripción puede ser parte de una molécula de inmuno adhesina mayor, formada por la asociación covalente o no covalente del anticuerpo o parte de anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos. Los ejemplos de dichas moléculas de inmuno adhesina incluyen el uso de la región central de la estreptavidina para preparar una molécula scFv tetramérica (Kipriyanov et al., *Human Antibodies and Hybridomas* **6**:93-101 (1995)) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una etiqueta de polihistidina C-terminal para preparar moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov et al., *Mol. Immunol.* **31**:1047-1058 (1994)). Otros ejemplos incluyen cuando una o más CDR de un anticuerpo se incorporan en una molécula bien covalentemente o no covalentemente para preparar una inmuno adhesina que se une específicamente a un antígeno de interés. En dichas realizaciones, la o las CDR pueden incorporarse como parte de una cadena de polipéptido mayor, pueden unirse covalentemente a

otra cadena de polipéptido, o pueden incorporarse no covalentemente.

[0124] En algunas realizaciones, puede prepararse un anticuerpo de fusión o inmunoadhesina que comprende todo o una parte de un anticuerpo anti-CD73 de la presente descripción unido a otro polipéptido. En determinadas realizaciones, solo se unen al polipéptido los dominios variables del anticuerpo anti-CD73. En determinadas realizaciones, el dominio VH de un anticuerpo anti-CD73 se une a un primer polipéptido, mientras que el dominio VL de un anticuerpo anti-CD73 se une a un segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido de una manera tal que los dominios VH y VL pueden interaccionar entre sí para formar un sitio de unión a antígeno. En algunas realizaciones, el dominio VH está separado del dominio VL por un conector de manera que los dominios VH y VL pueden interaccionar entre sí (p. ej., anticuerpos de cadena única). El anticuerpo VH-conector-VL se une entonces al polipéptido de interés. Además, pueden crearse anticuerpos de fusión en los que dos (o más) anticuerpos de cadena única se unen entre sí. Esto es útil si se quiere crear un anticuerpo divalente o polivalente en una única cadena de polipéptido, o si se quiere crear un anticuerpo biespecífico.

[0125] Para crear un anticuerpo de cadena única (scFv), los fragmentos de ADN que codifican VH y VL se unen operativamente a otro fragmento que codifica un conector flexible, p. ej., que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4-Ser)3 (SEQ ID NO: 44), de manera que las secuencias de VH y VL pueden expresarse como una proteína de cadena única contigua, con los dominios VL y VH unidos por el conector flexible. Véanse, p. ej., Bird et al., *Science* **242**:423-426 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:5879-5883 (1988); y McCafferty et al., *Nature* **348**:552-554 (1990). El anticuerpo de cadena única puede ser monovalente, si solo se usa un único VH y VL; bivalente, si se usan dos VH y VL; o polivalente, si se usan más de dos VH y VL. Pueden generarse anticuerpos biespecíficos o polivalentes que se unen específicamente a CD73 humano y a otra molécula, por ejemplo.

[0126] En otras realizaciones, pueden prepararse otros anticuerpos modificados usando moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-CD73. Por ejemplo, pueden prepararse “cuerpos kappa” (Ill et al., *Protein Eng.* **10**:949-57 (1997)), “minicuerpos” (Martin et al., *EMBO J.* **13**:5303-9 (1994)), “diacuerpos” (Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:6444-6448 (1993)), o “Janusinas” (Traunecker et al., *EMBO J.* **10**:3655-3659 (1991) y Traunecker et al., *Int. J. Cancer*

(Supl.) 7:51-52 (1992)) usando técnicas estándar de biología molecular siguiendo las enseñanzas de la memoria descriptiva.

[0127] Un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno de la presente descripción puede derivatizarse o unirse a otra molécula (p. ej., otro péptido o proteína). En general, los anticuerpos o partes de los mismos se derivatizan de manera que la unión a CD73 no se ve afectada adversamente por la derivatización o marcaje. Por consiguiente, se pretende que los anticuerpos y partes de anticuerpos de la presente descripción incluyan tanto formas intactas como modificadas de los anticuerpos anti-CD73 humanos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, un anticuerpo o parte de anticuerpo de la presente descripción puede unirse funcionalmente (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra forma) a una o más de otras entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (p. ej., un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente de detección, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que pueda mediar la asociación del anticuerpo o parte de anticuerpo con otra molécula (tal como una región central de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina).

[0128] Un tipo de anticuerpo derivatizado se produce por el entrecruzamiento de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de tipos diferentes, p. ej., para crear anticuerpos biespecíficos). Los agentes de entrecruzamiento adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos reactivos distintos separados por un espaciador apropiado (p. ej., éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncionales (p. ej., suberato de disuccinimidilo). Dichos conectores están disponibles, p. ej., en Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

[0129] Un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno también puede derivatizarse con un grupo químico tal como polietilen glicol (PEG), un grupo metilo o etilo, o un grupo carbohidrato. Estos grupos pueden ser útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, p. ej., para incrementar la semivida en suero.

[0130] Un anticuerpo o parte de unión a antígeno según la presente descripción también puede marcarse. Tal y como se usa en la presente memoria, los términos “marcaje” o “marcado” se refieren a la incorporación de otra molécula en el anticuerpo. En algunas realizaciones, el marcaje es un marcador detectable, p. ej., la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la unión a un polipéptido de restos biotinilados puede detectarse por avidina marcada (p. ej., estreptavidina que

contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse por métodos ópticos o colorimétricos). En algunas realizaciones, el marcaje o marcador puede ser terapéutico, p. ej., un conjugado con fármaco o toxina. Diversos métodos para marcar polipéptidos y glicoproteínas son conocidos en la técnica y pueden

- 5 usarse. Los ejemplos de marcajes para polipéptidos incluyen, pero no están limitados a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (p. ej., ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), marcajes fluorescentes (p. ej., FITC, rodamina, fósforos de lantánido), marcajes enzimáticos (p. ej., peroxidasa de rábano, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, grupos biotínico, epítopos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un informador secundario (p. ej., secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, etiquetas de epítopos), agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio, toxinas tales como toxina pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. En algunas realizaciones, los marcadores se unen por brazos espaciadores de diversas
- 10 longitudes para reducir el impedimento estérico potencial.

[0131] En algunas realizaciones, un anticuerpo o parte de unión a antígeno según la presente descripción puede conjugarse a un agente citotóxico para formar un inmunoconjugado. En algunas realizaciones, un anticuerpo o parte de unión a antígeno según la presente descripción puede conjugarse a un radioisótopo.

- 25 **[0132]** En determinadas realizaciones, los anticuerpos de la presente descripción pueden estar presentes en una forma neutra (incluyendo formas zwiteriónicas) o como especies cargadas positivamente o negativamente. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden formar complejos con un contraión para formar una sal farmacéuticamente aceptable.

- 30 **[0133]** El término “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a un complejo que comprende uno o más anticuerpos y uno o más contraiones, en donde los contraiones derivan de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos farmacéuticamente aceptables.

Composiciones de Anticuerpo Anti-CD73

[0134] La presente descripción también proporciona una terapia de combinación (p. ej., una composición) que comprende uno, dos, tres, cuatro, o más de los anticuerpos anti-CD73 o partes de unión a antígeno de los mismos descritos en la presente memoria. En determinadas realizaciones, la terapia de combinación (p. ej., composición) comprende dos de los anticuerpos anti-CD73 o partes de unión a antígeno. La terapia de combinación puede tomar la forma, p. ej., de un método de tratamiento que usa dichos anticuerpos o partes de unión a antígeno o una composición farmacéutica que comprende dichos anticuerpos o partes de unión a antígeno.

[0135] En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona una composición que comprende un primer anticuerpo anti-CD73 o una parte de unión a antígeno del mismo y un segundo anticuerpo anti-CD73 o una parte de unión a antígeno del mismo, en donde el primer y segundo anticuerpo son los:

- anticuerpos 21028 y 21046, respectivamente;
- anticuerpos 21028 y 21127, respectivamente;
- anticuerpos 21028 y 21163, respectivamente;
- anticuerpos 21046 y 21127, respectivamente;
- anticuerpos 21046 y 21163, respectivamente; o
- anticuerpos 21127 y 21163, respectivamente.

[0136] En algunas realizaciones, la composición comprende anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos que se unen al mismo epítipo que, o compiten para la unión con, dicho primer y segundo anticuerpo.

[0137] En algunas realizaciones, la composición comprende un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo que comprende las secuencias de aminoácidos de H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de dicho primer anticuerpo, y un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo que comprende las secuencias de aminoácidos de H-CDR1-3 y L-CDR1-3 de dicho segundo anticuerpo.

[0138] En algunas realizaciones, la composición comprende un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo que comprende un VH y un VL con secuencias de aminoácidos que son al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idénticas a las secuencias de aminoácidos de VH y VL, respectivamente, de dicho primer anticuerpo, y un anticuerpo o una parte de

unión a antígeno del mismo que comprende un VH y un VL con secuencias de aminoácidos que son al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idénticas a las secuencias de aminoácidos de VH y VL, respectivamente, de dicho segundo anticuerpo.

- 5 **[0139]** En algunas realizaciones, la composición comprende un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo que comprende las secuencias de aminoácidos de VH y VL de dicho primer anticuerpo, y un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo que comprende las secuencias de aminoácidos de VH y VL de dicho segundo anticuerpo.
- 10 **[0140]** En algunas realizaciones, la composición comprende un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo que comprende las secuencias de aminoácidos de HC y LC de dicho primer anticuerpo, y un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo que comprende las secuencias de aminoácidos de HC y LC de dicho segundo anticuerpo.
- 15 **[0141]** En determinadas realizaciones, dicha composición puede comprender uno, dos, o más anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos seleccionados del grupo que consiste en:
 - a) un anticuerpo que comprende H-CDR1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 17-19, 23-25, 29-31, o 35-57,
 - 20 respectivamente;
 - b) un anticuerpo cuyo VH es al menos un 90 % idéntico en secuencia a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, 10, 11, o 12;
 - c) un anticuerpo cuyo VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, 10, 11, o 12;
 - 25 d) un anticuerpo cuya HC comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 9 y 41, 10 y 41, 11 y 41, o 12 y 41;
 - e) un anticuerpo que comprende L-CDR1-3 que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 20-22, 26-28, 32-34, o 38-40, respectivamente;
 - 30 f) un anticuerpo cuyo VL es al menos un 90 % idéntico en secuencia a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, 14, 15, o 16;
 - g) un anticuerpo cuyo VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, 14, 15, o 16;
 - h) un anticuerpo cuya LC comprende las secuencias de aminoácidos de las

SEQ ID NO: 13 y 42, 14 y 42, 15 y 42, o 16 y 42;

i) un anticuerpo cuyas H-CDR1-3 y L-CDR1-3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 17-22, 23-28, 29-34, o 35-40, respectivamente;

5 j) un anticuerpo que comprende VH y VL que comprenden secuencias de aminoácidos al menos un 90 % idénticas a las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 9 y 13, 10 y 14, 11 y 15, o 12 y 16, respectivamente;

k) un anticuerpo que comprende VH y VL que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 9 y 13, 10 y 14, 11 y 15, o 12 y 16, respectivamente; y

10

l) un anticuerpo que comprende HC y LC que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 9 y 41, y 13 y 42; 10 y 41, y 14 y 42; 11 y 41, y 15 y 42; o 12 y 41, y 16 y 42; respectivamente.

[0142] En algunas realizaciones, una composición de anticuerpo anti-CD73

15 descrita en la presente memoria puede inhibir el crecimiento tumoral y/o inducir la regresión del crecimiento tumoral *in vivo*, puede ralentizar o revertir la metástasis en un paciente con cáncer, y/o puede prolongar la supervivencia de un paciente con cáncer. También se contempla cualquier combinación de las propiedades anteriores.

20 **[0143]** La presente descripción también proporciona un método para producir una composición de anticuerpo anti-CD73 descrita en la presente memoria, que comprende proporcionar un primer anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno y un segundo anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno, y mezclar los dos anticuerpos o partes.

25 *Moléculas de Unión Biespecíficas*

[0144] La presente descripción también proporciona una molécula de unión biespecífica que tiene la especificidad de unión (p. ej., que comprende las partes de unión a antígeno, tales como las seis CDR o el VH y VL) de un anticuerpo anti-CD73 descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, la molécula de unión biespecífica tiene adicionalmente la especificidad de unión de otro anticuerpo anti-CD73 distinto (p. ej., otro anticuerpo anti-CD73 descrito en la presente memoria) o un anticuerpo que está dirigido a una proteína diferente, tal como un antígeno del cáncer u otra molécula de la superficie celular cuya actividad media una afección de

30

enfermedad tal como el cáncer. Dichas moléculas de unión biespecíficas son conocidas en la técnica, y los ejemplos de diferentes tipos de moléculas de unión biespecíficas se proporcionan en otro lugar de la presente memoria. En determinadas realizaciones, la molécula de unión biespecífica puede unirse a CD73 y PD-1, CD73 y PD-L1, o CD73 y CTLA-4.

Moléculas de Ácido Nucleico y Vectores

[0145] La presente descripción también proporciona moléculas de ácido nucleico y secuencias que codifican anticuerpos anti-CD73 o partes de unión a antígeno de los mismos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, diferentes moléculas de ácido nucleico codifican las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno. En otras realizaciones, la misma molécula de ácido nucleico codifica las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno.

[0146] Una referencia a una secuencia de nucleótidos engloba su complemento a no ser que se especifique otra cosa. Por tanto, una referencia a un ácido nucleico que tiene una secuencia particular debería entenderse que engloba su cadena complementaria, con su secuencia complementaria. El término “polinucleótido” como se hace referencia en la presente memoria significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, bien ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquiera de los dos tipos de nucleótido. El término incluye las formas mono y bicatenarias.

[0147] En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una parte de unión a antígeno de la misma, o una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una parte de unión a antígeno de la misma, o ambas, de un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno del mismo descrito en la presente memoria.

[0148] La presente descripción también proporciona secuencias de nucleótidos que son al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a una o más secuencias de nucleótidos descritas en la presente memoria, p. ej., a una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-8, o a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de

aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9-16. El término “porcentaje de identidad de secuencia” en el contexto de secuencias de ácido nucleico se refiere a los residuos en dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una máxima correspondencia. La longitud de la comparación de la identidad de secuencia puede ser sobre una cadena de al menos aproximadamente nueve nucleótidos, habitualmente al menos aproximadamente 18 nucleótidos, más habitualmente al menos aproximadamente 24 nucleótidos, típicamente al menos aproximadamente 28 nucleótidos, más típicamente al menos aproximadamente 32 nucleótidos, y preferiblemente al menos aproximadamente 36, 48 o más nucleótidos. Existen varios algoritmos diferentes conocidos en la técnica que pueden usarse para medir la identidad de secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos pueden compararse usando FASTA, Gap o Bestfit, que son programas en el Wisconsin Package Versión 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, que incluye, p. ej., los programas FASTA2 y FASTA3, proporciona alineaciones y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones de la mejor superposición entre las secuencias de búsqueda e investigadas (véase, p. ej., Pearson, *Methods Enzymol.* **183**:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* **132**:185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* **266**:227-258 (1996); y Pearson, *J. Mol. Biol.* **276**:71-84 (1998); incorporados en la presente memoria por referencia). A no ser que se especifique otra cosa, se usan los parámetros por defecto para un programa o algoritmo particular. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia entre secuencias de ácidos nucleicos puede determinarse usando FASTA con sus parámetros por defecto (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de puntuación) o usando Gap con sus parámetros por defecto como se proporciona en GCG Versión 6.1, incorporados en la presente memoria por referencia.

[0149] En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1-8. En determinadas realizaciones, la molécula de ácido nucleico comprende las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NO: 1 y 5, SEQ ID NO: 2 y 6, SEQ ID NO: 3 y 7, o SEQ ID NO: 4 y 8.

[0150] En cualquiera de las realizaciones anteriores, las moléculas de ácido nucleico pueden estar aisladas. Las moléculas de ácido nucleico referidas en la

presente memoria como “aisladas” o “purificadas” son ácidos nucleicos que (1) se han separado de los ácidos nucleicos del ADN genómico o ARN celular de su fuente de origen; y/o (2) no aparecen en la naturaleza.

[0151] En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un vector adecuado para expresar una o ambas de las cadenas de un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente memoria. El término “vector”, tal y como se usa en la presente memoria, significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. En algunas realizaciones, el vector es un plásmido, es decir, una parte circular bicatenaria de ADN en la que pueden ligarse segmentos adicionales de ADN. En algunas realizaciones, el vector es un vector viral, en donde pueden ligarse segmentos adicionales de ADN en el genoma viral. En algunas realizaciones, los vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (p. ej., vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamíferos episomales). En otras realizaciones, los vectores (p. ej., vectores de mamíferos no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped después de la introducción en la célula huésped, y de esta manera se replican junto con el genoma del huésped. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se refieren en la presente memoria como “vectores de expresión recombinantes” (o simplemente, “vectores de expresión”).

[0152] La presente descripción proporciona vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada, la cadena ligera, o tanto la cadena pesada como ligera de un anticuerpo anti-CD73 como se describe en la presente memoria o una parte de unión a antígeno del mismo. En determinadas realizaciones, un vector de la presente descripción comprende una molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria. La presente descripción proporciona además vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión, anticuerpos modificados, fragmentos de anticuerpo, y sondas de los mismos. El vector puede comprender además una secuencia de control de la expresión.

[0153] El término “secuencia de control de la expresión” tal y como se usa en la presente memoria significa secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y procesamiento de secuencias codificadoras a las que están

ligadas. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias apropiadas de inicio de la transcripción, terminación, promotoras y potenciadoras; señales de procesamiento del ARN eficientes tales como señales de corte y empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; secuencias que potencian la eficiencia de la traducción (es decir, secuencia consenso de Kozak);
 5 secuencias que potencian la estabilidad de las proteínas; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción de las proteínas. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en procariotas, dichas secuencias de control incluyen generalmente promotor, sitio de unión
 10 ribosomal, y secuencia de terminación de la transcripción; en eucariotas, generalmente, dichas secuencias de control incluyen promotores y secuencia de terminación de la transcripción. El término “secuencias de control” se pretende que incluya, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y procesamiento, y también pueden incluir componentes adicionales cuya
 15 presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de compañeros de fusión.

[0154] Una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno del mismo como se describe en la presente memoria puede aislarse de cualquier fuente que produzca
 20 dicho anticuerpo o parte. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico se aíslan de células B que expresan un anticuerpo anti-CD73 aisladas de un animal inmunizado con un antígeno de CD73 humano, o de una célula inmortalizada producida a partir de dicha célula B. Los métodos para aislar ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo son muy conocidos en la técnica. El ARNm puede aislarse y
 25 usarse para producir ADNc para su uso en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o clonación de ADNc de genes de anticuerpo. En determinadas realizaciones, una molécula de ácido nucleico como se describe en la presente memoria puede sintetizarse en lugar de aislarse.

[0155] En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico como se describe en la presente memoria comprende una secuencia de nucleótidos que
 30 codifica un dominio VH de un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno como se describe en la presente memoria unida en marco a una secuencia de nucleótidos que codifica una región constante de cadena pesada de cualquier fuente. De forma similar, una molécula de ácido nucleico como se describe en la

presente memoria puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio VL de un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno como se describe en la presente memoria unida en marco a una secuencia de nucleótidos que codifica una región constante de cadena ligera de cualquier fuente.

- 5 **[0156]** En algunas realizaciones de la presente descripción, las moléculas de ácido nucleico que codifican el VH y/o VL pueden “convertirse” en genes de anticuerpo de longitud completa. En determinadas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios VH o VL se convierten en genes de anticuerpo de longitud completa mediante la inserción en un vector de expresión
- 10 que ya codifica la región constante de cadena pesada (CH) o constante de cadena ligera (CL), respectivamente, de manera que el segmento VH está unido operativamente al o a los segmentos CH en el vector, y/o el segmento VL está unido operativamente al segmento CL en el vector. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios VH y/o VL se convierten en
- 15 genes de anticuerpo de longitud completa mediante la unión, p. ej., ligación, de una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio VH y/o VL a una molécula de ácido nucleico que codifica una región CH y/o CL usando técnicas estándar de biología molecular. Las moléculas de ácido nucleico que codifican la cadena pesada y/o ligera de longitud completa pueden expresarse entonces a partir de una
- 20 célula en la que se han introducido y el anticuerpo anti-CD73 puede aislarse.

- [0157]** Las moléculas de ácido nucleico pueden usarse para expresar recombinantemente grandes cantidades de anticuerpos anti-CD73. Las moléculas de ácido nucleico también pueden usarse para producir anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos de cadena única, inmunoadhesinas,
- 25 diacuerpos, anticuerpos mutados y derivados de anticuerpos, como se describe en la presente memoria.

- [0158]** En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico de la presente descripción se usa como una sonda o cebador de PCR para una secuencia de anticuerpo específica. Por ejemplo, el ácido nucleico puede usarse como una sonda
- 30 en métodos de diagnóstico o como un cebador de PCR para amplificar regiones de ADN que podrían usarse, *inter alia*, para aislar moléculas de ácido nucleico adicionales que codifican los dominios variables de anticuerpos anti-CD73. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico son oligonucleótidos. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos son de dominios altamente variables de

las cadenas pesada y ligera del anticuerpo de interés. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos codifican todas o parte de una o más de las CDR de los anticuerpos anti-CD73 o partes de unión a antígeno de los mismos de la presente descripción como se describe en la presente memoria.

5 **[0159]** En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico y los vectores pueden usarse para preparar anticuerpos anti-CD73 mutados. Los anticuerpos pueden mutarse en los dominios variables de las cadenas pesada y/o ligera, p. ej., para alterar una propiedad de unión del anticuerpo. Por ejemplo, puede hacerse una mutación en una o más de las CDR para incrementar o disminuir la K_D del
 10 anticuerpo anti-CD73, para incrementar o disminuir la k_{disoc} , o para alterar la especificidad de unión del anticuerpo. En algunas realizaciones, se hacen una o más mutaciones en un residuo de aminoácido que se sabe que está cambiado en comparación con la línea germinal en un anticuerpo monoclonal de la presente descripción. Las mutaciones pueden hacerse en una CDR o región marco de un
 15 dominio variable, o en una región constante. En determinadas realizaciones, las mutaciones se hacen en un dominio variable. En realizaciones particulares, se hacen una o más mutaciones en un residuo de aminoácido que se sabe que está cambiado en comparación con la línea germinal en una CDR o región marco de un dominio variable de un anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo de la
 20 presente descripción.

[0160] En algunas realizaciones, la o las regiones marco se mutan de manera que la o las regiones marco resultantes tienen la secuencia de aminoácidos del gen de la línea germinal correspondiente. Puede hacerse una mutación en una región marco o región constante, p. ej., para incrementar la semivida del anticuerpo anti-
 25 CD73. Véase, p. ej., la Publicación PCT WO 00/09560. También puede hacerse una mutación en una región marco o región constante para alterar la inmunogenicidad del anticuerpo, y/o para proporcionar un sitio para la unión covalente o no covalente a otra molécula. Según la presente descripción, un anticuerpo puede tener mutaciones en una cualquiera o más de las CDR o regiones
 30 marco del dominio variable o en la región constante.

[0161] En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 de la presente descripción o partes de unión a antígeno de los mismos se expresan insertando ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas parciales o de longitud completa, obtenidas como se ha descrito anteriormente, en vectores de expresión de manera

que los genes se unen operativamente a las secuencias de control de la expresión necesarias tales como secuencias de control de la transcripción y traducción. Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados (AAV), virus de plantas tales como el virus del mosaico de la coliflor, virus del mosaico del tabaco, cósmidos, YAC, episomas derivados de EBV, y semejantes. La secuencia codificadora del anticuerpo puede ligarse en un vector de manera que las secuencias de control de la transcripción y traducción en el vector cumplan su función pretendida de regular la transcripción y la traducción de la secuencia codificadora del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión pueden elegirse para ser compatibles con la célula huésped de expresión usada. La secuencia codificadora de la cadena ligera del anticuerpo y la secuencia codificadora de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en el mismo vector o en vectores separados, y pueden unirse operativamente a las mismas o a diferentes secuencias de control de la expresión (p. ej., promotores). En algunas realizaciones, ambas secuencias codificadoras se insertan en el mismo vector de expresión y pueden unirse operativamente a las mismas secuencias de control de la expresión (p. ej., un promotor común), a secuencias de control de la expresión idénticas separadas (p. ej., promotores), o a diferentes secuencias de control de la expresión (p. ej., promotores). Las secuencias que codifican el anticuerpo pueden insertarse en el vector de expresión por métodos estándar (p. ej., ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen del anticuerpo y vector, o ligación de extremos romos si no están presentes sitios de restricción).

[0162] Un vector conveniente es uno que codifica una secuencia de CH o CL de inmunoglobulina humana funcionalmente completa, con sitios de restricción apropiados preparados por ingeniería de manera que cualquier secuencia VH o VL pueda insertarse y expresarse fácilmente, como se ha descrito anteriormente. Los genes que codifican HC y LC en dichos vectores pueden contener secuencias de intrones que darán lugar a rendimientos de proteína de anticuerpo globales aumentados mediante la estabilización del ARNm relacionado. Las secuencias de intrones están flanqueadas por sitios donantes de corte y empalme y aceptores de corte y empalme, que determinan dónde se producirá el corte y empalme del ARN. La localización de las secuencias de intrones puede ser bien en las regiones variables o constantes de las cadenas del anticuerpo, o tanto en las regiones variables como constantes cuando se usan múltiples intrones. La poliadenilación y

la terminación de la transcripción pueden ocurrir en sitios cromosómicos nativos en 3' de las regiones codificadoras. El vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena del anticuerpo de una célula huésped. El gen de las cadenas de anticuerpo puede clonarse en el vector de manera que el péptido señal está unido en marco con el extremo amino de la cadena de inmunoglobulina. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína que no es una inmunoglobulina).

[0163] Además de los genes de cadenas del anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la presente descripción pueden portar secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de las cadenas del anticuerpo en una célula huésped. Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de las secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se va a transformar, del nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en células huésped de mamíferos incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamíferos, tales como promotores y/o potenciadores derivados de LTR retrovirales, citomegalovirus (CMV) (tal como promotor/potenciador de CMV), Virus de Simio 40 (SV40) (tal como promotor/potenciador de SV40), adenovirus, (p. ej., el promotor mayor tardío de adenovirus (AdMLP)), poliovirus y promotores fuertes de mamíferos tales como promotores nativos de inmunoglobulina y actina. Para una descripción adicional de elementos reguladores virales, y de secuencias de los mismos, véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. 5.168.062, 4.510.245 y 4.968.615. Los métodos para expresar anticuerpos en plantas, incluyendo una descripción de promotores y vectores, así como la transformación de plantas, son conocidos en la técnica. Véase, p. ej., la Patente de EE. UU. 6.517.529. Los métodos para expresar polipéptidos en células bacterianas o células fúngicas, p. ej., células de levaduras, también son muy conocidos en la técnica.

[0164] Además de los genes de las cadenas del anticuerpo y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la presente descripción pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en las células huésped (p. ej., orígenes de replicación) y genes de marcadores seleccionables. El gen del marcador seleccionable facilita la

selección de las células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, típicamente, el gen del marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Por ejemplo, los genes de marcadores seleccionables incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células huésped dhfr- con selección/amplificación con metotrexato), el gen de neo (para selección con G418), y el gen de la glutamato sintetasa.

Células Huésped y Métodos de Producción de Anticuerpos y Composiciones de Anticuerpos

[0165] La presente descripción también proporciona métodos para producir las composiciones de anticuerpos y anticuerpos y partes de unión a antígeno de los mismos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, la presente descripción se refiere a un método para producir un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno como se describe en la presente memoria, que comprende proporcionar una célula huésped recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una parte de unión a antígeno de la misma, y una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una parte de unión a antígeno de la misma, de un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria; cultivar dicha célula huésped en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo o parte de unión a antígeno; y aislar el anticuerpo o parte de unión a antígeno resultante. Los anticuerpos o partes de unión a antígeno producidos por dicha expresión en dichas células huésped recombinantes se refieren en la presente memoria como anticuerpos o partes de unión a antígeno “recombinantes”. La presente descripción también proporciona células de progenie de dichas células huésped, y anticuerpos o partes de unión a antígeno producidos por las mismas.

[0166] El término “célula huésped recombinante” (o simplemente “célula huésped”), tal y como se usa en la presente memoria, significa una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Por definición, una célula huésped recombinante no aparece en la naturaleza. La presente descripción proporciona células huésped que pueden comprender, p. ej., un vector como se describe en la presente memoria. La presente descripción también proporciona

células huésped que comprenden, p. ej., una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una parte de unión a antígeno de la misma, una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o una parte de unión a antígeno de la misma, o ambas, de un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno del mismo descrito en la presente memoria. Debe entenderse que “célula huésped recombinante” y “célula huésped” significan no solo la célula objeto particular sino también la progenie de dicha célula. Como pueden ocurrir determinadas modificaciones en las generaciones subsiguientes debido bien a mutación o influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía está incluida en el alcance del término “célula huésped” tal y como se usa en la presente memoria.

[0167] Las moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos anti-CD73 y partes de unión a antígeno de los mismos y los vectores que comprenden estas moléculas de ácido nucleico pueden usarse para la transfección de una célula huésped adecuada de mamífero, planta, bacteria o levadura. La transformación puede hacerse por cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped. Los métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son muy conocidos en la técnica e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del o de los polinucleótidos en liposomas, y microinyección directa del ADN en núcleos. Además, las moléculas de ácido nucleico pueden introducirse en células de mamíferos por vectores virales. Los métodos para transformar células son muy conocidos en la técnica. Véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461, y 4.959.455. Los métodos para transformar células de plantas son muy conocidos en la técnica, incluyendo, p. ej., transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación biolística, inyección directa, electroporación y transformación viral. Los métodos para transformar células bacterianas y de levaduras también son muy conocidos en la técnica.

[0168] Las líneas celulares de mamíferos disponibles como huéspedes para la expresión son muy conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC). Estas incluyen, *inter alia*, células de ovario de hámster chino (CHO), células NS0, células SP2, células HEK-293T, células 293 Freestyle (Invitrogen), células NIH-3T3, células

HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono verde africano (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (p. ej., Hep G2), células A549, y varias de otras líneas celulares. Las líneas celulares de preferencia particular se seleccionan determinando qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión. Otras líneas celulares que pueden usarse son líneas celulares de insectos, tales como células Sf9 o Sf21. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpo se introducen en células huésped de mamíferos, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un periodo de tiempo suficiente como para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se crecen las células huésped. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos estándar de purificación de proteínas. Las células huésped de plantas incluyen, p. ej., *Nicotiana*, *Arabidopsis*, lenteja de agua, maíz, trigo, patata, etc. Las células huésped bacterianas incluyen *E. coli* y especies de *Streptomyces*. Las células huésped de levaduras incluyen *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

[0169] Además, la expresión de anticuerpos de la presente descripción o partes de unión a antígeno de los mismos a partir de líneas celulares de producción puede aumentarse usando varias técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión del gen de la glutamina sintetasa (el sistema GS) es una estrategia común para aumentar la expresión en determinadas condiciones. El sistema GS se discute en todo o parte en conexión con las Patentes EP 0 216 846, 0 256 055, 0 323 997 y 0 338 841.

[0170] Es probable que los anticuerpos expresados por diferentes líneas celulares o en animales transgénicos tendrán diferentes patrones de glicosilación entre sí. Sin embargo, todos los anticuerpos codificados por las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en la presente memoria, o que comprenden las secuencias de aminoácidos proporcionadas en la presente memoria son parte de la presente descripción, independientemente del estado de glicosilación de los anticuerpos, y más generalmente, independientemente de la presencia o ausencia de modificaciones posteriores a la traducción.

Composiciones Farmacéuticas

[0171] Otro aspecto de la presente descripción es una composición farmacéutica

que comprende como un ingrediente activo (o como el único ingrediente activo) un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno del mismo, molécula de unión biespecífica, o composición de anticuerpo de la presente descripción. La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se pretenden para la mejoría, prevención, y/o tratamiento del cáncer, p. ej., un cáncer descrito en la presente memoria. En determinadas realizaciones, el cáncer está en un tejido tal como la piel, pulmón, intestino, colon, ovario, cerebro, próstata, riñón, tejidos blandos, el sistema hematopoyético, cabeza y cuello, hígado, hueso, vejiga, mama, estómago, útero, cuello uterino, y páncreas. En determinadas realizaciones, el cáncer es melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama (p. ej., cáncer de mama triple negativo), cáncer de vejiga, cáncer de pulmón (p. ej., cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer pancreático (p. ej., adenocarcinoma pancreático ductal), cáncer de ovario, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, colangiocarcinoma, cáncer de tiroides, o cáncer testicular.

[0172] Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción comprenderán uno o más anticuerpos anti-CD73, partes de unión a antígeno, composiciones de anticuerpo, o moléculas de unión biespecíficas de la presente descripción, p. ej., uno o dos anticuerpos anti-CD73, partes de unión a antígeno, o moléculas de unión biespecíficas. En algunas realizaciones, la composición comprende un único anticuerpo anti-CD73 de la presente descripción o una parte de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, la composición comprende dos anticuerpos anti-CD73 distintos de la presente descripción o partes de unión a antígeno de los mismos.

[0173] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede comprender al menos un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno del mismo de la presente descripción, p. ej., un anticuerpo anti-CD73 o parte, y uno o más anticuerpos adicionales dirigidos a uno o más receptores de la superficie celular relevantes, p. ej., uno o más receptores relevantes para el cáncer.

[0174] Generalmente, los anticuerpos, partes de unión a antígeno, y moléculas de unión biespecíficas de la presente descripción son adecuados para administrarse como una formulación en asociación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, p. ej., como se describe más adelante.

[0175] El término “excipiente” se usa en la presente memoria para describir cualquier ingrediente distinto del o de los compuestos de la presente descripción. La elección del o de los excipientes dependerá, en gran medida, de factores tales como al modo particular de administración, el efecto del excipiente en la solubilidad y estabilidad, y la naturaleza de la forma de dosificación. Tal y como se usa en la presente memoria, “excipiente farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, y semejantes que son fisiológicamente compatibles. Algunos ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables son agua, disolución salina, disolución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y semejantes, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio. Los ejemplos adicionales de sustancias farmacéuticamente aceptables son agentes humectantes o cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que aumentan la vida útil o efectividad del anticuerpo.

[0176] Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción y los métodos para su preparación serán evidentes fácilmente para los expertos en la técnica.

Dichas composiciones y métodos para su preparación pueden encontrarse, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19^a Edición (Mack Publishing Company, 1995). Las composiciones farmacéuticas se fabrican preferiblemente en condiciones GMP (buenas prácticas de fabricación).

[0177] Una composición farmacéutica de la presente descripción puede prepararse, envasarse, o venderse a granel, como una única dosis unitaria, o como una pluralidad de únicas dosis unitarias. Tal y como se usa en la presente memoria, una “dosis unitaria” es una cantidad discreta de la composición farmacéutica que comprende una cantidad predeterminada del ingrediente activo. La cantidad del ingrediente activo es generalmente igual a la dosificación del ingrediente activo que se administraría a un sujeto o una fracción conveniente de dicha dosificación tal como, por ejemplo, la mitad o un tercio de dicha dosificación.

[0178] Las formulaciones de una composición farmacéutica adecuadas para la administración parenteral comprenden típicamente el ingrediente activo combinado con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril o disolución

salina isotónica estéril. Dichas formulaciones pueden prepararse, envasarse, o venderse en una forma adecuada para administración en bolo o para administración continua. Las formulaciones inyectables pueden prepararse, envasarse, o venderse en forma de dosificación unitaria, tal como en ampollas o en contenedores de múltiples dosis que contienen un conservante. Las formulaciones para administración parenteral incluyen, pero no están limitadas a, suspensiones, disoluciones, emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, pastas, y semejantes. Dichas formulaciones pueden comprender además uno o más ingredientes adicionales incluyendo, pero no limitado a, agentes de suspensión, estabilización, o dispersión. En algunas realizaciones de una formulación para administración parenteral, el ingrediente activo se proporciona en forma seca (es decir, polvo o granular) para la reconstitución con un vehículo adecuado (p. ej., agua estéril sin pirógenos) antes de la administración parenteral de la composición reconstituida. Las formulaciones parenterales también incluyen disoluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, carbohidratos y agentes tamponadores (preferiblemente a un pH de 3 a 9), pero, para algunas aplicaciones, pueden formularse más adecuadamente como una disolución no acuosa estéril o como una forma seca para usarse conjuntamente con un vehículo adecuado tal como agua estéril sin pirógenos. Las formas para administración parenteral ejemplares incluyen disoluciones o suspensiones en disoluciones acuosas estériles, por ejemplo, disoluciones acuosas de propilen glicol o dextrosa. Dichas formas de dosificación pueden tamponarse adecuadamente, si se desea. Otras formulaciones que se pueden administrar por la ruta parenteral que son útiles incluyen aquellas que comprenden el ingrediente activo en forma microcristalina, o en una preparación liposomal. Las formulaciones para administración parenteral pueden formularse para una liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones con liberación modificada incluyen liberación retrasada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada.

[0179] En algunas realizaciones, las disoluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el anticuerpo anti-CD73, parte de unión a antígeno del mismo, molécula de unión biespecífica, o composición de anticuerpo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto

activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son secado en vacío y liofilización que rinden un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una disolución estéril filtrada previamente del mismo. La fluidez apropiada de una disolución puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato o gelatina, y/o usando recubrimientos con liberación modificada (p. ej., recubrimientos de liberación lenta).

[0180] Los anticuerpos de la presente descripción también pueden administrarse intranasalmente o por inhalación, típicamente en la forma de un polvo seco (bien solo, como una mezcla, o como una partícula de componentes mezclados, por ejemplo, mezclados con un excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado) de un inhalador de polvo seco; como una pulverización en aerosol de un contenedor presurizado, bomba, pulverizador, atomizador (preferiblemente un atomizador que usa electrohidrodinámica para producir una rociada fina), o nebulizador, con o sin el uso de un propelente adecuado; o como gotas nasales.

[0181] Los anticuerpos y partes de anticuerpo de la presente descripción también pueden formularse para una administración por la ruta oral. La administración oral puede implicar tragar, de manera que el compuesto entra en el tracto gastrointestinal, y/o la administración bucal, lingual, o sublingual por la que el compuesto entra en la corriente sanguínea directamente desde la boca. Las formulaciones adecuadas para la administración oral incluyen sistemas sólidos, semisólidos y líquidos tales como comprimidos; cápsulas blandas o duras que contienen multi o nano particulados, líquidos, o polvos; pastillas para chupar (incluyendo llenas de líquido); chicles; geles; formas de dosificación de dispersión rápida; películas; óvulos; pulverizaciones; parches bucales/mucoadhesivos. Las formulaciones líquidas incluyen suspensiones, disoluciones, jarabes y elixires. Dichas formulaciones pueden emplearse como rellenos en cápsulas blandas o duras (hechas, por ejemplo, de gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa) y comprenden típicamente un vehículo, por ejemplo, agua, etanol, polietilen glicol, propilen glicol,

metilcelulosa, o un aceite adecuado, y uno o más agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión. Las formulaciones líquidas también pueden prepararse por la reconstitución de un sólido, por ejemplo, de un sobre.

Usos terapéuticos de anticuerpos y composiciones de la presente descripción

5 **[0182]** En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 y partes de unión a antígeno de los mismos, composiciones anti-CD73, y moléculas de unión biespecíficas de la presente descripción se usan para disminuir la actividad de CD73 en un mamífero (p. ej., un ser humano) que lo necesita. Por ejemplo, un médico puede reforzar la actividad antitumoral en un paciente administrando un anticuerpo
10 anti-CD73 de la presente descripción, solo o en combinación con otros agentes terapéuticos (secuencialmente o concurrentemente). El anticuerpo anti-CD73 disminuye la actividad de CD73, inhibiendo una ruta que suprime la respuesta antitumoral del paciente.

[0183] En determinadas realizaciones, los anticuerpos o partes de unión a
15 antígeno de los mismos, composiciones, o moléculas de unión biespecíficas son para su uso en el tratamiento de un cáncer positivo para CD73. El cáncer puede estar en uno o más tejidos tales como la piel, pulmón, intestino, colon, ovario, cerebro, próstata, riñón, tejidos blandos, el sistema hematopoyético, cabeza y cuello, hígado, hueso, vejiga, mama, estómago, útero, cuello uterino, y páncreas.

20 **[0184]** En algunas realizaciones, los cánceres tratados con los anticuerpos anti-CD73, partes de unión a antígeno, moléculas de unión biespecíficas, y/o composiciones de anticuerpo de la presente descripción pueden incluir, p. ej., melanoma (p. ej., melanoma avanzado o metastásico), cáncer de células basales de la piel, glioblastoma, glioma, gliosarcoma, astrocitoma, meningioma, neuroblastoma,
25 cáncer adrenocortical, cáncer de células escamosas de la cabeza y el cuello, cáncer oral, cáncer de las glándulas salivares, cáncer nasofaríngeo, cáncer de mama, cáncer de tiroides, cáncer de pulmón (p. ej., cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, y cáncer de pulmón de células escamosas), cáncer esofágico, cáncer de la unión gastroesofágica, cáncer gástrico,
30 cáncer gastrointestinal, cáncer peritoneal primario, cáncer de hígado, carcinoma hepatocelular, cáncer del tracto biliar, colangiocarcinoma, cáncer de colon, carcinoma colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de las trompas de falopio, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario superior, cáncer urotelial, carcinoma de células

- renales, cáncer de riñón, cáncer genitourinario, cáncer del cuello uterino, cáncer de próstata, cáncer testicular, fibrosarcoma, liposarcoma, rabdomiosarcoma, osteosarcoma, histiocitoma, cáncer pancreático, cáncer endometrial, cáncer del apéndice, cáncer de células de Merkel avanzado, mieloma múltiple, sarcoma,
- 5 coriocarcinoma, eritroleucemia, leucemia linfoblástica aguda, leucemia monocítica aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia de mastocitos, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, linfoma de células B grandes difuso, linfoma folicular, linfoma
- 10 monocítico, leucemia/linfoma de células T asociado a HTLV, mesotelioma, y tumores sólidos. El cáncer puede estar, p. ej., en un estadio temprano, intermedio, tardío, localmente avanzado, o metastásico, y puede ser recidivante o refractario a otros agentes terapéuticos (p. ej., otros agentes terapéuticos anti-CD73) o puede que no haya ninguna terapia estándar disponible.
- 15 **[0185]** En algunas realizaciones, los cánceres tratados con los anticuerpos anti-CD73, partes de unión a antígeno, composiciones, y/o moléculas de unión biespecíficas de la presente descripción pueden incluir, p. ej., melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama (p. ej., cáncer de mama triple negativo), cáncer de vejiga, cáncer de pulmón (p. ej., cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer
- 20 pancreático (p. ej., adenocarcinoma pancreático ductal), cáncer de ovario, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, colangiocarcinoma, cáncer de tiroides, y cáncer testicular.
- [0186]** “Tratar”, “tratando” y “tratamiento” se refieren a un método para aliviar o suprimir un trastorno biológico y/o al menos uno de sus síntomas concomitantes.
- 25 Tal y como se usa en la presente memoria, “aliviar” una enfermedad, trastorno o afección significa reducir la gravedad y/o frecuencia de aparición de los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección. Además, las referencias en la presente memoria a “tratamiento” incluyen referencias a tratamiento curativo, paliativo y profiláctico.
- 30 **[0187]** “Cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del agente terapéutico que se está administrando que aliviará en algún grado uno o más de los síntomas del trastorno que se está tratando. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente terapéutico anticanceroso puede, por ejemplo, dar lugar a un crecimiento tumoral retrasado, encogimiento tumoral, supervivencia incrementada,

eliminación de las células cancerosas, progresión de la enfermedad ralentizada o disminuida, reversión de la metástasis, u otros puntos finales clínicos deseados por los profesionales sanitarios.

[0188] Los anticuerpos anti-CD73 o partes de unión a antígeno de los mismos,

composiciones de anticuerpo, o moléculas de unión biespecíficas descritos en la presente memoria pueden administrarse solos o en combinación con uno o más de otros fármacos o anticuerpos (o como cualquier combinación de los mismos). Las composiciones farmacéuticas, métodos y usos descritos en la presente memoria también engloban, por tanto, realizaciones de combinaciones (coadministración) con otros agentes activos, como se detalla más adelante.

[0189] Tal y como se usa en la presente memoria, los términos “coadministración,” “coadministrado” y “en combinación con,” en referencia a los anticuerpos anti-CD73 y partes de unión a antígeno de los mismos, composiciones de anticuerpo, y moléculas de unión biespecíficas de la presente descripción con uno o más de otros agentes terapéuticos, se pretende que signifique, y se refiere a e incluye lo siguiente:

a) la administración simultánea de dicha combinación de anticuerpo / parte de unión a antígeno / composición de anticuerpo / molécula de unión biespecífica de la presente descripción y agente(s) terapéutico(s) a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan conjuntamente en una única forma de dosificación que libera dichos componentes a sustancialmente el mismo tiempo en dicho paciente,

b) la administración sustancialmente simultánea de dicha combinación de anticuerpo / parte de unión a antígeno / composición de anticuerpo / molécula de unión biespecífica de la presente descripción y agente(s) terapéutico(s) a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan de manera separada entre sí en formas de dosificación separadas que se toman sustancialmente al mismo tiempo por dicho paciente, después de lo cual dichos componentes se liberan a sustancialmente el mismo tiempo en dicho paciente,

c) la administración secuencial de dicha combinación de anticuerpo / parte de unión a antígeno / composición de anticuerpo / molécula de unión biespecífica de la presente descripción y agente(s) terapéutico(s) a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan de manera separada entre sí en formas de dosificación separadas que se toman en momentos consecutivos por

dicho paciente con un intervalo de tiempo significativo entre cada administración, después de lo cual dichos componentes se liberan a sustancialmente tiempos diferentes en dicho paciente; y

- d) la administración secuencial de dicha combinación de anticuerpo / parte de unión a antígeno / composición de anticuerpo / molécula de unión biespecífica de la presente descripción y agente(s) terapéutico(s) a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan conjuntamente en una única forma de dosificación que libera dichos componentes de una manera controlada después de lo cual se liberan de manera concurrente, consecutiva, y/o superpuesta al mismo y/o diferentes tiempos en dicho paciente, donde cada parte puede administrarse bien por la misma ruta o una diferente.

[0190] Los anticuerpos anti-CD73 o partes de unión a antígeno de los mismos, composiciones de anticuerpo, o moléculas de unión biespecíficas de la presente descripción pueden administrarse sin tratamientos terapéuticos adicionales, es decir, como una terapia sola (monoterapia). Alternativamente, el tratamiento con los anticuerpos anti-CD73 o partes de unión a antígeno de los mismos, composiciones de anticuerpo, o moléculas de unión biespecíficas de la presente descripción pueden incluir al menos un tratamiento terapéutico adicional (terapia de combinación), p. ej., un agente inmunoestimulador, un agente anticanceroso (p. ej., un agente quimioterapéutico, un agente antineoplásico, un agente antiangiogénico, o un inhibidor de tirosina quinasa), o una vacuna (p. ej., una vacuna tumoral).

[0191] En algunas realizaciones, el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, composición de anticuerpo, o molécula de unión biespecífica puede coadministrarse o formularse con otra medicación/fármaco para el tratamiento del cáncer. El tratamiento terapéutico adicional puede comprender, p. ej., un agente inmunoestimulador, una vacuna, un agente quimioterapéutico, un agente antineoplásico, un agente antiangiogénico, un inhibidor de tirosina quinasa, y/o terapia de radiación. En algunas realizaciones, el tratamiento terapéutico adicional puede comprender un anticuerpo anticanceroso diferente.

[0192] Los artículos farmacéuticos que comprenden un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno del mismo, composición de anticuerpo, o molécula de unión biespecífica descrito en la presente memoria y al menos otro agente (p. ej., un quimioterapéutico, antineoplásico, o antiangiogénico) pueden usarse como un tratamiento de combinación para la administración simultánea, separada o sucesiva

en la terapia del cáncer. El otro agente puede ser cualquier agente adecuado para el tratamiento del cáncer particular en cuestión, por ejemplo, un agente seleccionado del grupo que consiste en agentes alquilantes, p. ej., derivados de platino tales como cisplatino, carboplatino y/o oxaliplatino; alcaloides de plantas, p. ej., paclitaxel, docetaxel y/o irinotecán; antibióticos antitumorales, p. ej., doxorubicina (adriamicina), daunorrubicina, epirubicina, idarrubicina mitoxantrona, dactinomicina, bleomicina, actinomicina, luteomicina, y/o mitomicina; inhibidores de topoisomerasa tales como topotecán; antimetabolitos, p. ej., fluorouracilo y/u otras fluoropirimidinas; FOLFOX; osimertinib; ciclofosfamida; antraciclina; dacarbazina; gemcitabina; o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno del mismo, composición de anticuerpo, o molécula de unión biespecífica descrito en la presente memoria reestablece la capacidad de respuesta al otro agente.

[0193] Un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno del mismo, composición de anticuerpo, o molécula de unión biespecífica de la presente descripción también puede usarse en combinación con otras terapias anticancerosas tales como vacunas, citoquinas, inhibidores de enzimas, compuestos inmunoestimuladores, y terapias de células T. En el caso de una vacuna, puede ser, p. ej., una vacuna de proteínas, péptidos o ADN que contiene uno o más antígenos que son relevantes para el cáncer que se está tratando, o una vacuna que comprende células dendríticas junto con un antígeno. Las citoquinas adecuadas incluyen, por ejemplo, IL-2, IFN-gamma y GM-CSF. Un ejemplo de un tipo de inhibidor de enzimas que tiene actividad anticancerosa es un inhibidor de indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO), por ejemplo, 1-metil-D-triptófano (1-D-MT). La terapia de células T adoptiva se refiere a diversas técnicas de inmunoterapia que implican expandir o modificar por ingeniería las células T propias del paciente para que reconozcan y ataquen sus tumores.

[0194] También se contempla que un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno del mismo, composición de anticuerpo, o molécula de unión biespecífica de la presente descripción pueda usarse en terapia adyuvante en conexión con los inhibidores de tirosina quinasa. Estos son moléculas de bajo peso molecular sintéticas, principalmente derivadas de quinazolina, que interaccionan con el dominio tirosina quinasa intracelular de receptores e inhiben la fosforilación del receptor inducida por el ligando, p. ej., compitiendo para el sitio de unión del Mg-

ATP intracelular.

[0195] En algunas realizaciones, el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo, composición de anticuerpo, o molécula de unión biespecífica puede usarse en combinación con una medicación/fármaco que media la activación del sistema inmune, incluyendo, pero no limitado a, un agente que modula la expresión o actividad de A2AR, A1AR, A2BR, A3AR, ADA, ALP, BTLA, B7-H3, B7-H4, CTLA-4, CD27, CD28, CD39, CD40, CD47, CD55, CD122, CD137, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, CTLA-3, CEACAM (p. ej., CEACAM-1 y/o CEACAM-5), GAL9, GITR, HVEM, LAG-3, LY108, LAIR1, ICOS, IDO, KIR, NKG2A, PAP, PD-1/PD-L1/PD-L2, OX40, TIGIT, TIM-3, TGFR-beta, TNFR2, VISTA, LILRB2, CMTM6 y/o 2B4. En algunas realizaciones, el agente modula la expresión de CD39, NKG2A, LAG-3, TIM-3, o TNFR2. En determinadas realizaciones, el agente es un inhibidor que es una molécula pequeña. En determinadas realizaciones, el agente es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a una de las moléculas anteriores. En realizaciones particulares, el agente es un anticuerpo anti-PD-L1 (p. ej., durvalumab o atezolizumab), un anticuerpo anti-PD-1, o un anticuerpo anti-CTLA-4. También se contempla que un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno del mismo, composición de anticuerpo, o molécula de unión biespecífica de la presente descripción pueda usarse en combinación con una citoquina (p. ej., IL-1, IL-2, IL-12, IL-15 o IL-21), un inhibidor de EGFR, un inhibidor de VEGF, etc.

[0196] En determinadas realizaciones, los anticuerpos y partes de unión a antígeno, composiciones de anticuerpo, o moléculas de unión biespecíficas de la presente descripción pueden administrarse en combinación con otro inhibidor de la ruta adenosinérgica, que puede estar dirigido, p. ej., a CD73, CD39, o CD38, o a un receptor de adenosina seleccionado de A1R, A2AR, A2BR, y/o A3R. Dichos inhibidores incluyen, sin limitación, inhibidores de A1R (p. ej., DPCPX, SCH58261, y FSPTP), inhibidores de A2AR (p. ej., PBF-509, CPI-444, AZD4635, ZM241385, AB928, istradefilina, SYN-115, ANR94, PSB1115, PSB603, y NIR178), inhibidores de A2B (p. ej., miR-128b, ATL801, aminofilina, MRS1754, IPDX, y PBF-1129), e inhibidores de A3R (p. ej., MRS1191, MRS1220, MRS1523, y CF-102). Otros ejemplos de dichos inhibidores incluyen otros anticuerpos anti-CD73, así como anticuerpos anti-CD39 y anti-CD38. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno del mismo, anticuerpo biespecífico, o composición de anticuerpo de la presente descripción puede administrarse en

combinación con A001421, APCP, oleclumab, CPX-006/CPI-006, CPX-016, NZV-930, BMS-986179, IPH53, PT199, durvalumab, atezolizumab, daratumumab, o isatuximab.

[0197] La presente descripción también contempla el uso de secuencias (p. ej., las seis CDR o secuencias de VH y VL) de un anticuerpo anti-CD73 o parte de unión a antígeno descrito en la presente memoria en la preparación de un receptor de antígeno quimérico, que puede ser para su uso en la tecnología CAR-T.

[0198] Se entiende que los anticuerpos y partes de unión a antígeno de los mismos, composiciones de anticuerpo, y moléculas de unión biespecíficas de la presente descripción pueden usarse en un método de tratamiento como se describe en la presente memoria, pueden ser para su uso en un tratamiento como se describe en la presente memoria, y/o pueden ser para su uso en la fabricación de un medicamento para un tratamiento como se describe en la presente memoria. La presente descripción también proporciona kits y artículos de fabricación que comprenden los anticuerpos y partes de unión a antígeno de los mismos, composiciones de anticuerpo, y moléculas de unión biespecíficas descritos en la presente memoria.

Dosis y Ruta de Administración

[0199] Los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos, composiciones de anticuerpo, o moléculas de unión biespecíficas de la presente descripción pueden administrarse en una cantidad efectiva para el tratamiento de la afección en cuestión, es decir, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios para conseguir un resultado deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede variar según factores tales como la afección particular que se está tratando, la edad, sexo y peso del paciente, y de si los anticuerpos se están administrando como un tratamiento único o en combinación con uno o más tratamientos anticancerosos adicionales.

[0200] Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada. Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas durante el tiempo o la dosis puede reducirse o incrementarse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la

uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los pacientes/sujetos que se van a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitarias de la presente descripción está dictada generalmente por y depende directamente de (a) las características únicas del agente terapéutico y del efecto terapéutico o profiláctico particular que se quiere conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formación de compuestos tales como un compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

[0201] Por tanto, el experto en la técnica apreciará, sobre la base de la descripción proporcionada en la presente memoria, que la dosis y régimen de dosificación se ajustan según los métodos muy conocidos en las técnicas terapéuticas. Esto es, la dosis máxima tolerable puede establecerse fácilmente, y también puede determinarse la cantidad efectiva que proporciona un beneficio terapéutico detectable a un paciente, como también los requerimientos temporales para administrar cada agente para proporcionar un beneficio terapéutico detectable al paciente. Por consiguiente, aunque en la presente memoria se ejemplifican determinadas dosis y regímenes de administración, estos ejemplos de ninguna manera limitan la dosis ni el régimen de administración que pueden proporcionarse a un paciente en la práctica de la presente descripción.

[0202] Debe indicarse que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y gravedad de la afección que se va a aliviar, y pueden incluir dosis únicas o múltiples. Debe entenderse además que, para cualquier sujeto particular, deben ajustarse los regímenes de dosificación específicos con el tiempo según la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que está administrando o supervisando la administración de las composiciones, y que los rangos de dosificación mostrados en la presente memoria son solo ejemplares y no se pretende que limiten el alcance o la práctica de la composición realizada. Además, el régimen de dosificación con las composiciones de la presente descripción puede basarse en una variedad de factores, incluyendo el tipo de enfermedad, la edad, peso, sexo, afección médica del paciente, la gravedad de la afección, la ruta de administración, y el anticuerpo particular empleado. Por tanto, el régimen de dosificación puede variar ampliamente,

pero puede determinarse rutinariamente usando métodos estándar. Por ejemplo, las dosis pueden ajustarse sobre la base de parámetros farmacocinéticos o farmacodinámicos, que pueden incluir efectos clínicos tales como efectos tóxicos y/o valores de laboratorio. Por tanto, la presente descripción engloba la escalada de dosis intrapaciente como determina el experto en la técnica. La determinación de las dosificaciones y regímenes apropiados es muy conocida en la técnica relevante y se entendería como englobada por el experto en la técnica una vez proporcionadas las enseñanzas descritas en la presente memoria.

[0203] Una cantidad efectiva para la terapia tumoral puede medirse por su capacidad de estabilizar la progresión de la enfermedad y/o mejorar los síntomas en un paciente, y preferiblemente revertir la progresión de la enfermedad, p. ej., reduciendo el tamaño tumoral. La capacidad de un anticuerpo, parte de unión a antígeno, composición de anticuerpo, o molécula de unión biespecífica de la presente descripción para inhibir el cáncer puede evaluarse por ensayos *in vitro*, p. ej., como se describe en los ejemplos, así como en modelos animales adecuados que son predictivos de la eficacia en tumores humanos. Los regímenes de dosificación adecuados se seleccionarán con el fin de proporcionar una respuesta terapéutica óptima en cada situación particular, por ejemplo, administrados como un único bolo o como una infusión continua, y con el ajuste posible de la dosificación como indiquen las exigencias de cada caso.

[0204] Los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos, composiciones de anticuerpo, o moléculas de unión biespecíficas de la presente descripción pueden administrarse por cualquier método para administrar péptidos, proteínas o anticuerpos aceptado en la técnica, y son típicamente adecuados para la administración parenteral. Tal y como se usa en la presente memoria, “administración parenteral” incluye cualquier ruta de administración caracterizada por la rotura física de un tejido de un sujeto y la administración a través de la abertura en el tejido, por tanto, da lugar generalmente a la administración directa en la corriente sanguínea, en el músculo, o en un órgano interno. La administración parenteral incluye, por tanto, pero no está limitada a, la administración por inyección, por aplicación a través de una incisión quirúrgica, por la aplicación a través de una herida no quirúrgica que penetra en un tejido, y semejantes. En particular, se contempla que la administración parenteral incluya, pero no está limitada a, inyección subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intraesternal, intracisternal,

intravenosa, intraarterial, intratecal, intrauretral, intracraneal, intratumoral, e intrasinovial o infusiones. Las realizaciones particulares incluyen las rutas intravenosa y subcutánea.

Usos y Composiciones de Diagnóstico

- 5 **[0205]** Los anticuerpos y partes de unión a antígeno de la presente descripción también son útiles en procesos de diagnóstico (p. ej., *in vitro*, *ex vivo*). Por ejemplo, los anticuerpos y partes de unión a antígeno pueden usarse para detectar y/o medir el nivel de CD73 en una muestra de un paciente (p. ej., una muestra de tejido, o una muestra de fluido corporal tal como un exudado inflamatorio, sangre, suero, fluido
- 10 intestinal, saliva, u orina). Los métodos adecuados de detección y medición incluyen métodos inmunológicos tales como citometría de flujo, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos quimioluminiscentes, radioinmunoensayos, e inmunohistología. La presente descripción engloba además kits (p. ej., kits de diagnóstico) que comprenden los anticuerpos y partes de unión a
- 15 antígeno descritos en la presente memoria.

Artículos de Fabricación y Kits

- [0206]** La presente descripción también proporciona artículos de fabricación, p. ej., kits, que comprenden uno o más contenedores (p. ej., contenedores de uso único o de múltiples usos) que contienen una composición farmacéutica de un anticuerpo
- 20 anti-CD73 o parte de unión a antígeno del mismo, composición, o molécula de unión biespecífica descrito en la presente memoria, opcionalmente una molécula biológicamente activa adicional (p. ej., otro agente terapéutico), e instrucciones para su uso. El anticuerpo o parte de unión a antígeno, composición, o molécula de unión biespecífica, y molécula biológicamente activa adicional opcional, pueden
- 25 envasarse separadamente en un envase adecuado tal como un vial o ampolla hecha de un vidrio o plástico no reactivo. En determinadas realizaciones, el vial o ampolla alberga una preparación madre concentrada (p. ej., 2x, 5x, 10x o más) del anticuerpo o parte de unión a antígeno, composición, o molécula de unión biespecífica y opcionalmente la molécula biológicamente activa. En determinadas
- 30 realizaciones, los artículos de fabricación tales como kits incluyen un dispositivo médico para administrar el anticuerpo o parte de unión a antígeno, composición, o molécula de unión biespecífica y/o molécula biológicamente activa (p. ej., una

jeringa y una aguja); y/o un diluyente apropiado (p. ej., agua estéril y disolución salina normal). La presente descripción también incluye métodos para fabricar dichos artículos.

[0207] A no ser que se defina otra cosa en la presente memoria, los términos

5 científicos y técnicos usados en conexión con la presente descripción tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica. Los métodos y materiales ejemplares se describen a continuación, aunque también pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente descripción. En el caso de conflicto,

10 prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones.

[0208] Generalmente, la nomenclatura usada en conexión con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética, química analítica, química orgánica sintética, química médica y farmacéutica, y química de proteínas y de ácidos nucleicos e hibridación descritas en la presente

15 memoria son las conocidas y usadas comúnmente en la técnica. Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan según las especificaciones del fabricante, como se consigue comúnmente en la técnica o como se describe en la presente memoria.

[0209] Además, a no ser que se requiera por el contexto, los términos en singular

20 deben incluir las pluralidades y los términos en plural deben incluir el singular. A lo largo de esta memoria descriptiva y realizaciones, las palabras “tienen” y “comprenden,” o variaciones tales como “tiene,” “que tiene,” “comprende,” o “que comprende,” se entenderá que implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicado, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o

25 grupo de números enteros.

[0210] Todas las publicaciones y otras referencias mencionadas en la presente memoria se incorporan por referencia en su totalidad. Aunque en la presente memoria se citan varios documentos, esta cita no constituye una admisión de que cualquiera de estos documentos forma parte del conocimiento general común en la

30 técnica.

[0211] Con el fin de que la presente descripción pueda entenderse mejor, se muestran los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son solo para propósitos de ilustración y no deben considerarse como limitantes del alcance de la presente descripción de ninguna manera.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Clonación de anticuerpos anti-CD73 de células B de rataMateriales y Métodos

5 **[0212]** Los anticuerpos frente a CD73 humano se aislaron de un repertorio de anticuerpos derivado de ratas OmniRat® (Osborn et al., *J Immunol.* **190**(4):1481-90 (2013)), una cepa de ratas transgénicas de Ligand Pharmaceuticals Inc. que produce anticuerpos con idiotipos completamente humanos. La clonación de genes de anticuerpo derivados de ratas a partir de células B secretoras de anticuerpos
 10 (ASC) separadas como células individuales se realizó mediante la tecnología de descubrimiento de anticuerpos Symplex™ (Meijer et al., *J Mol Biol* **358**(3):764-72 (2006)).

[0213] Las construcciones del repertorio de anticuerpos que codifican inmunoglobulinas completamente humanas en formato IgG₁-LALA (véase más
 15 adelante) se transfectaron en células HEK293. Los sobrenadantes de las células se cribaron para determinar la unión a CD73 expresado en la superficie de células CHO usando citometría de flujo en un formato de alto rendimiento. Los clones reactivos frente a CD73 se analizaron por secuenciación de ADN y se extrajeron las secuencias de ADN que codificaban anticuerpo. Los clones de anticuerpo
 20 seleccionados se expresaron y se ensayaron funcionalmente como se describe más adelante.

[0214] Las mutaciones con cambio de sentido en el extremo amino de las cadenas pesada y ligera que se introdujeron por el uso de cebadores degenerados en la clonación Symplex™ de los fragmentos de ADNc que codifican anticuerpo se
 25 corrigieron de nuevo a la secuencia de la línea germinal. La **Tabla 1** muestra las secuencias de nucleótidos del dominio variable de cadena pesada y ligera de los anticuerpos corregidos a la línea germinal designados 21028, 21046, 21127 y 21163. El proceso de corrección implica la corrección de la secuencia amino terminal a la línea germinal, así como la optimización en el uso de codones. Las
 30 dianas para concordar con las secuencias de la línea germinal humana se identificaron por búsquedas de homología blast para las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera.

[0215] Las secuencias de proteínas de los dominios variables, las regiones

constantes y las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de los anticuerpos 21028, 21046, 21127 y 21163 se muestran en la **Tabla 2**, **Tabla 3** y **Tabla 4**, respectivamente.

Resultados

- 5 **[0216]** La **Tabla 1** muestra las secuencias de nucleótidos que codifican los dominios variables de los anticuerpos 21028, 21046, 21127 y 21163.

Tabla 1: Secuencias de nucleótidos de los dominios variables de los anticuerpos 21028, 21046, 21127 y 21163

	Secuencia (5' a 3')
21028 VH SEQ ID NO: 1	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCAGG CAGAAGCCTGAGACTGTCTTGTGCTGCCTCTGGCTTTTCCTTCGAC GATTACGCTATGCACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGCAAGGGCCTG GAGTGGGTGTCTGGCATCAGCTGGCACTCCGATAACATCGGCTAC GCTGATTCCGTGAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCA AGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCTGAGGATAC CGCCTTTTACTATTGCGCCAAGGATGGCCCAAGATATAGGGGCTCC TATTACTACTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACAGTCT CGAGT
21046 VH SEQ ID NO: 2	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCTGG CAGATCTCTGAGACTGTCTTGCCTGGCTTCTGGTTTTACTTTTGATG ACTATGCCATGCACTGGGTGCGGCAGGCTCCAGGCAAGGGCCTGG AGTGGGTGTCTGGCATCAGCTGGAATCCGGCTCTATCGGCTACG CTGACAGCGTGAAAGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAA GAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCTGAGGATAC CGCTTTTCTATTACTGCGCTCAGGGCGGCTATGCTATCCTGACCGCC CTGGAGTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTCTCGAGT
21127 VH SEQ ID NO: 3	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGCGGCCTGGTGCAACCAGG CAGAAGCCTGAGACTGTCTTGTGCTGCCTCCGGTTTTACTTTTCGAT GACTTCGCTATGCATTGGGTGCGGCAGGCCCCCTGGCAAGGGCCTG GAGTGGGTGTCTGGCATCTCTTGGAATAGCGGCAACATCGGCTAC GCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC AAGAACTCCCTGTATCTCCAAATGAACTCCCTGAGAGCTGAGGATA CCGCTCTGTACTATTGCGCCAAGGATAAGTCCGGCTCTCCTTACTA TTACTACGGCATGGACGTGTGGGGCCAGGGCACAAATGGTGACCGT CTCGAGT
21163 VH SEQ ID NO: 4	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCAGG CGGCTCCCTGAGACTGTCTTGTGCTGCCTCCGGCTTTAGCTTCTCC ACCTATTGGATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCAGGCAAGGGCCTG GAGTGGGTGGCCAATATCAAGCAGGATGGCTCCGAGAAGTACTAT GTGGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCC AAGAACTCCCTGTATCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGATA CCGCCGTGTACTATTGTGCCAGGGATATCAGCTCCTCTTGTTTTA CTATTACGGCATGGACGTGTGGGGCCAGGGCACAAACCGTGACCGT CTCGAGT
21028 VL SEQ ID NO: 5	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCTACACTGTCCGCCAGCGTG GGCGATAGGGTGACCATCACATGCCGGGCCTCTCAGTCCATCAGC AACTGGCTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAG CTGCTGATCTATAAGGCTTCCAGCCTGGAGAGCGGCGTGCCATCTA GATTCTCTGGCTCCGGCAGCGGCACCGAGTTTACCCTGACAATCTC TTCCCTGCAGCCAGACGATTTTCGCTACATACTATTGTCAGCAGTAC AATTCTTATTCCCCCATCACCTTTGGCCAGGGCACACGCCTGGAGA TCAAG
21046 VL SEQ ID NO: 6	GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTTCCAGCCTGTCCGCCTCCGTG GGCGATAGGGTGACCATCACATGCCGGGCCTCTCAGGGCATCTCC AACTACCTGGCTTGGTTCCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAG AGCCTGATCTATGCCGCTTCTAGCCTGCAAAGCGGCGTGCCATCTA AGTTCTCTGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTTACCCTGACAATCAG CTCTCTGCAGCCAGAGGATTTTCGCCACATACTATTGTCAGCAGTAC AATTCTTATCCCCTGACATTCGGCGGTGGAATAAGGTGGAGATCA AG

21127 VL SEQ ID NO: 7	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCCTCCGTGTCCGCCTCCGTG GGCGATAGAGTGACCATCACATGCAGGGCTACACAGGGAATCTCT AGGCGGCTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAA GCTGCTGATCTATGCCGCTTCTAGCCTGCAATCTGGCGTGCCATCC AGGTTCTCTGGATCCGGAAGCGGAACCGACTTTACCCTGACAATCA GCTCTCTGCAGCCAGAGGATTTGCGCCACATACTATTGTCAGCAGGC TAACTCCTTCCCCCTGACTTTGCGCGGTGGAACAAAAGTGGAGATC AAG
21163 VL SEQ ID NO: 8	GACATCCAGCTGACACAGAGCCCATCTTTCCTGTCCGCCTCCGTGG GCGATAGGGTGACCATCACATGCCGGGCCTCTCAGGGCATCTCCA GCTACCTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCAAGC TGCTGATCTACGCTGCTTCTACCCTGCAGTCCGGAGTGCCTAGCAG GTTCTCTGGCTCCGGCAGCGGCACAGAGTTTACCCTGACAATCTCT AGCCTGCAACCAGAGGACTTCGCCACCTACTATTGTCAGCAGCTGA ACTCCTATCCCCCTACATTCGGCGGTGGAACCAAAGTCGAAATCAA G

[0217] La **Tabla 2** muestra las secuencias de aminoácidos deducidas de los anticuerpos 21028, 21046, 21127 y 21163. Las CDR están en grita/subrayadas.

Tabla 2: Secuencias de aminoácidos de los dominios variables de 21028, 21046, 21127 y 21163

5

	Secuencia (N-terminal a C-terminal)
21028 VH SEQ ID NO: 9	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAAS <u>GFSFDDY</u> AMHWVRQAPGKGLE WVSG <u>ISWHS</u> <u>SDNIG</u> YADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAFY Y <u>CAKDGP</u> <u>RYRGS</u> <u>YYYFDY</u> WGQGLTVTVSS
21046 VH SEQ ID NO: 10	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCVAS <u>GFTFDDY</u> AMHWVRQAPGKGLE WVSG <u>ISWNSGS</u> <u>IGY</u> ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAFY Y <u>CAQGGY</u> <u>AILTALEY</u> WGQGLTVTVSS
21127 VH SEQ ID NO: 11	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAAS <u>GFTFDDF</u> AMHWVRQAPGKGLE WVSG <u>ISWNSGNIG</u> YADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALY Y <u>CAKDKSG</u> <u>SPYYYGMDVW</u> WGQGTMTVTVSS
21163 VH SEQ ID NO: 12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFSFSTY</u> WMNWVRQAPGKGLE WVAN <u>IKQDGSEK</u> YYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YY <u>CARDISSW</u> <u>FYYYGMDVW</u> WGQGTTVTVSS
21028 VL SEQ ID NO: 13	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS <u>QGISN</u> WLAWYQQKPGKAPKLLI Y <u>KASS</u> LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYY <u>CQQYNSYSP</u> <u>ITFG</u> QGTRLEIK
21046 VL SEQ ID NO: 14	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS <u>QGISN</u> YLAWFQQKPGKAPKSLIY <u>AASSLQ</u> SGVPSKFSFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY <u>CQQYNSYPLT</u> <u>EGG</u> GTKVEIK
21127 VL SEQ ID NO: 15	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRAT <u>QGISRR</u> YLAWYQQKPGKAPKLLI Y <u>AASSLQ</u> SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY <u>CQQANSFPL</u> <u>TFG</u> GGTKVEIK
21163 VL SEQ ID NO: 16	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRAS <u>QGISS</u> YLAWYQQKPGKAPKLLIY <u>AASTLQ</u> SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYY <u>CQQLNSYPPT</u> <u>EGG</u> GTKVEIK

[0218] La **Tabla 3** muestra las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de cadena pesada y ligera (CH y CL, respectivamente). “IgG₁ LALA” se

refiere a la presencia de mutaciones “LALA” en la cadena pesada (L234A/L235A, numerado según el esquema de numeración de Kabat) que se sabe que reducen la función efectora de la región Fc de los anticuerpos IgG₁ (Hezareh et al., *J Virol.* **75(24)**:12161-68 (2001); Hessel et al., *Nature* **449(7158)**:101-04 (2007)).

5

Tabla 3: Secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de los anticuerpos 21028, 21046, 21127 y 21163

Fragmento	Secuencia (N-terminal a C-terminal)
IgG ₁ -LALA CH añadido al VH SEQ ID NO: 41	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
Kappa CL añadido al VL SEQ ID NO: 42	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

[0219] La **Tabla 4** muestra las secuencias de aminoácidos de las CDR de cadena pesada y ligera de los anticuerpos 21028, 21046, 21127, y 21163, en donde las CDR se definen según el sistema IMGT.

Tabla 4: Secuencias de aminoácidos de las CDR de los anticuerpos 21028, 21046, 21127 y 21163

Nombre	Secuencia (N-terminal a C-terminal)					
	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
21028	GFSFDDYA SID 17	ISWHSJNI SID 18	CAKDGPRYRGSYYYFDYW SID 19	QSIWNW SID 20	KAS SID 21	CQQYNSYSPITF SID 22
21046	GFTFDDYA SID 23	ISWNSGSI SID 24	CAQGGYAILTALEYW SID 25	QGISNY SID 26	AAS SID 27	CQQYNSYPLTF SID 28
21127	GFTFDDFA SID 29	ISWNSGNI SID 30	CAKDKSGSPYYYGMDVW SID 31	QGISRR SID 32	AAS SID 33	CQQANSFPLTF SID 34
21163	GFSFSTYW SID 35	IKQDGSEK SID 36	CARDISSWFYYYGMDVW SID 37	QGISSY SID 38	AAS SID 39	CQQLNSYPPTF SID 40

15 SID: SEQ ID NO:

[0220] La **Tabla 5** muestra la información de la SEQ ID NO para los anticuerpos 21028, 21046, 21127 y 21163. A no ser que se afirme otra cosa, las secuencias son secuencias de aminoácidos.

Tabla 5: SEQ ID NO para los anticuerpos 21028, 21046, 21127 y 21163

Nombre	VH nt	VL nt	VH aa	VL aa	H- CDR1	H- CDR2	H- CDR3	L- CDR1	L- CDR2	L- CDR3
21028	1	5	9	13	17	18	19	20	21	22
21046	2	6	10	14	23	24	25	26	27	28
21127	3	7	11	15	29	30	31	32	33	34
21163	4	8	12	16	35	36	37	38	39	40

nt: nucleótido

aa: aminoácido

5 Ejemplo 2. Cribado de anticuerpos anti-CD73 en el ensayo de la actividad de CD73 soluble

- [0221] Se evaluó un panel de anticuerpos anti-CD73 para determinar su capacidad de inhibir la actividad enzimática de CD73 recombinante soluble. Los anticuerpos anti-CD73 se incubaron a una concentración de 10 µg/mL con CD73 recombinante (SinoBiological Incorporated), AMP, y ATP durante 30 minutos a 37 °C. Se investigó la actividad de CD73 midiendo la inhibición por AMP de la detección de ATP usando CellTiter-Glo® 2.0 (Promega Corporation) como se describe en Sachsenmeier et al., *Journal of Biomolecular Screening* **17(7)**:993-998 (2012).
- 10 [0222] La inhibición de la actividad enzimática de CD73 después del tratamiento con los anticuerpos anti-CD73 se observa en la **FIG. 1**. Es evidente que la actividad de CD73 después del tratamiento con los diferentes anticuerpos anti-CD73 varió fuertemente, mostrando que algunos anticuerpos no tenían funcionalidad en este ensayo, mientras que otros anticuerpos inhibieron fuertemente la actividad de CD73.

20

Ejemplo 3. Cribado de anticuerpos anti-CD73 en un ensayo de la actividad de CD73 basado en células

- [0223] Se evaluó un panel de anticuerpos anti-CD73 para determinar su capacidad de inhibir la actividad de CD73 expresado en líneas celulares de cáncer. Los anticuerpos anti-CD73 se incubaron a una concentración de 10 µg/mL con líneas celulares que expresaban CD73 durante 30 minutos a 37 °C seguido de la adición del sustrato de CD73, AMP, y una incubación adicional durante 3 horas a 37 °C. Se investigó la actividad de CD73 añadiendo ATP a los sobrenadantes y midiendo la inhibición por AMP de la detección de ATP usando CellTiter-Glo® 2.0

25

(Promega Corporation) como se describe en Sachsenmeier *et al.*, *supra*.

[0224] La actividad de CD73 expresado en dos líneas celulares de cáncer diferentes después del tratamiento con los anticuerpos anti-CD73 se muestra en la **FIG. 2**. Es evidente que la actividad de CD73 después del tratamiento con los diferentes anticuerpos anti-CD73 varió fuertemente; algunos anticuerpos no tenían funcionalidad en este ensayo, mientras que otros anticuerpos inhibieron fuertemente la actividad de CD73. Notablemente, los mismos diez anticuerpos mostraron la mayor actividad en ambas líneas celulares.

Ejemplo 4. Clonación de análogos de anticuerpo de referencia anti-CD73

Materiales y Métodos

[0225] Las secuencias de aminoácidos que codifican los dominios variables de cadena pesada y ligera de los análogos de anticuerpo en la **Tabla 6** se obtuvieron a partir de patentes o solicitudes de patentes enumeradas. Las secuencias de las proteínas se tradujeron de manera inversa en secuencias de ADN con el uso de codones humanos. Las secuencias de ADN correspondientes se sintetizaron a partir de genes y se clonaron en vectores de expresión que contenían las regiones constantes de cadena pesada o ligera humana, dando lugar a la expresión de cadenas de anticuerpo de longitud completa. El isotipo del anticuerpo humano seleccionado para la expresión se enumera en la columna de formato de anticuerpo junto con las mutaciones adicionales introducidas en la región Fc cuando es aplicable. Las células CHO se transfectaron con los plásmidos de expresión resultantes usando un sistema estándar de expresión de proteínas. Los sobrenadantes de anticuerpo correspondientes se purificaron usando purificación estándar por cromatografía en columna de proteína A.

Table 6: Listado de análogos de anticuerpos sintetizados de genes y el formato de anticuerpo correspondiente

Anticuerpo	Formato del anticuerpo	Fuente
MEDI9447 (oleclumab, MedImmune)	IgG ₁ -TM (función efectora atenuada triple mutante L234F, L235E y P331S)	Publicación de Patente de EE. UU. 2016/0129108 A1 (SEQ ID NO: 17 y 19)
CPX006 (Corvus)	IgG ₁ -N297Q (no glicosilado)	Publicación de Patente de EE. UU. 2018/0009899 A1 (SEQ ID NO: 14 y 13)

11E1 (Innate Pharma)	IgG ₁ -LALA	Publicación de Patente de EE. UU. 2018/0030144 A1 (SEQ ID NO: 3 y 4)
----------------------	------------------------	---

Ejemplo 5. Unión directa de los anticuerpos anti-CD73 a las células CHO-S transfectadas con la proteína CD73 humana o de cynomolgus

[0226] Se evaluó la unión de los anticuerpos anti-CD73 21028, 21046, 21127, y 21163 a la proteína CD73 humana o de cynomolgus expresada en las células CHO-S y se comparó con la de un análogo oleclumab.

[0227] Los anticuerpos anti-CD73 se incubaron con la línea celular CHO-S de hámster que expresa transitoriamente CD73 humano o de cynomolgus durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces y posteriormente se incubaron durante 20 minutos adicionales con anticuerpo secundario anti-IgG humana conjugado con AF647 (H+L). Después de la etapa de lavado, la unión del anticuerpo se detectó usando el citómetro de flujo de alto rendimiento iQue Screener PLUS (Sartorius) midiendo la media geométrica de la señal de AF647 en cada pocillo. Cada concentración se ensayó en triplicado y se generó una curva de titulación de 12 puntos para cada anticuerpo.

[0228] Las curvas de unión de los anticuerpos frente a CD73 humano o de cynomolgus expresado en células se muestran en la **FIG. 3**. Los anticuerpos ensayados se unen a la proteína CD73 humana y de cynomolgus presentada en células con una potencia y eficacia diferentes. En particular, mAb 21127 se une a CD73 humano y de cynomolgus con la mayor potencia de los anticuerpos ensayados.

Ejemplo 6. Medición de las afinidades del anticuerpo y fragmentos Fab para el dominio extracelular (ECD) de CD73 humano y de cynomolgus

[0229] Este ejemplo demuestra la unión de fragmentos Fab y anticuerpos anti-CD73 a los dominios extracelulares (ECD) de CD73 recombinante humano y de cynomolgus como se mide por resonancia de plasmón superficial (SPR).

Materiales y Métodos

[0230] El análisis de la cinética de unión de los mAb y fragmentos Fab anti-CD73 se realizó por Resonancia de Plasmón Superficial (SPR), usando un Microspotter de

Flujo Continuo (CFM, Wasatch Microfluidics, Salt Lake City, EE. UU.) combinado con un instrumento IBIS MX96 SPR (IBIS Technologies, Países Bajos). Se sintetizaron los ADNc de CD73 que codifican los dominios extracelulares de CD73 humano y de cynomolgus y cada uno se clonó en un vector que contenía un

5 promotor de CMV y bien una secuencia C-terminal de 6x histidina (SEQ ID NO: 45) para ECD de CD73 etiquetado con His, o una secuencia de Fc de IgG1 humana (AA P101-K330), dando lugar a la fusión de Fc de IgG1 en C terminal respecto al ECD de CD73 clonado. Las construcciones etiquetadas con His y de fusión de Fc se expresaron transitoriamente usando un sistema de expresión ExpiCHO™ y se

10 purificaron bien por cromatografía estándar de Ni-NTA o procedimientos estándar de MabSelect™ SuRe™, respectivamente. Los fragmentos Fab anti-CD73 se generaron por la digestión de anticuerpos IgG1 de longitud completa con la enzima GingiskHAN, usando un kit proporcionado por Genovis (Suecia). Las afinidades de los fragmentos Fab se midieron capturando los antígenos etiquetados con Fc en un

15 G-a-hu-IgG Fc SensEye® durante 15 minutos usando el CFM. Después de la deposición, el SensEye® se posicionó en el biosensor IBIS MX96 y los antígenos inmovilizados se fijaron con el kit SensEye FixIt. Los análisis cinéticos se realizaron inyectando fragmentos Fab monoméricos a concentraciones crecientes de 0,8 nM a 300 nM. Después de cada ciclo de inyección de fragmentos Fab, la superficie se

20 regeneró con glicina 10 mM pH 3, glicerol al 10 %. La asociación de Fab se realizó durante 15 minutos y la disociación del antígeno se realizó durante 15 minutos. Las afinidades de los anticuerpos monoclonales (mAb) de longitud completa se midieron capturando los mAb en un G-a-hu-IgG Fc SensEye® (Ssens BV, Países Bajos) durante 15 minutos usando un Microspotter de Flujo Continuo (CFM, Wasatch

25 Microfluidics, Salt Lake City, EE. UU.). Después de la deposición, el SensEye se incorporó en el IBIS MX96 y los mAb depositados se fijaron con el kit SensEye FixIt (Ssens BV, Países Bajos). El análisis cinético se realizó aplicando una serie de titulación cinética inyectando concentraciones crecientes de antígenos etiquetados con His de 0,16 nM a 10 nM como diluciones de 2 veces. La superficie se regeneró

30 antes del siguiente ciclo de inyecciones de antígenos de cynomolgus con H₃PO₄ 100 mM, pH 3. La asociación de los mAb se realizó durante 15 minutos y la disociación de los antígenos se realizó durante 45 minutos. Las respuestas de unión registradas se ajustaron a un modelo de unión simple 1:1 de Langmuir con el software Scrubber 2.0 para el cálculo de las constantes de la tasa de asociación

(k_{asoc} o k_a), tasa de disociación (k_{off} o k_d) y afinidad (K_D). Los parámetros de la cinética de unión se midieron como un promedio de seis puntos de medición independientes.

Resultados

5 **[0231]** Las afinidades de unión y los parámetros cinéticos de los fragmentos Fab anti-CD73 y los anticuerpos de longitud completa se muestran en la **Tabla 7** y **Tabla 8**, respectivamente. Los anticuerpos de longitud completa se unieron a CD73 humano con altas afinidades en el rango subnanomolar. Todos los anticuerpos reconocieron CD73 humano y de cynomolgus con cinéticas de unión comparables a
10 los anticuerpos de referencia (análogos de 11E1, oleclumab, y CPX006). Todos los anticuerpos se caracterizaron por constantes de tasa de disociación muy lenta, contribuyendo a las altas afinidades medidas. Las afinidades de unión monovalentes de los fragmentos Fab fueron 20 a 245 veces más débiles que las de
15 los anticuerpos de longitud completa correspondientes. Las tasas de disociación (k_d) se vieron afectadas fuertemente por el cambio de formato, presentando los fragmentos Fab una disociación mucho más rápida de CD73 que los anticuerpos intactos.

[0232] Las diferencias en las cinéticas de unión de los anticuerpos intactos y de los fragmentos Fab sugieren que los anticuerpos se unen a un homodímero de
20 CD73 y que la alta afinidad medida para los anticuerpos de longitud completa se debe a efectos de avidéz. Se sabe que CD73 existe como un homodímero no covalente (Knapp et al., *Structure* **20(12)**: 2161-2173 (2012)), y que se ha encontrado previamente que la unión de los análogos 11E1 y oleclumab depende de la unión bivalente al homodímero de CD73 con diferencias similares en las cinéticas
25 de unión entre los anticuerpos de longitud completa y los fragmentos Fab como se describe aquí (Perrot, *Cell Reports* **27(8)**:2411-2425 (2019)).

[0233] El análisis por SPR de los anticuerpos y los fragmentos Fab anti-CD73 mostró que los anticuerpos anti-CD73 dependen de la unión bivalente al CD73 dimérico, y que las afinidades de la unión de los anticuerpos de longitud completa
30 ejemplificados en la presente memoria eran comparables a las de los mAb de referencia cuando se unen a un homodímero de CD73.

Tabla 7: Cinéticas de unión de los fragmentos Fab anti-CD73 a ECD de CD73 humano (Hs) y de cynomolgus (Cy) como se mide por SPR

Fragmento Fab	ECD de CD73	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
21127	Hs	2,9E+05	1,6E-02	54,6
	Cy	3,1E+05	1,7E-02	55,3
21163	Hs	2,0E+05	1,5E-02	78,3
	Cy	2,0E+05	1,6E-02	77,6
21046	Hs	6,1E+05	5,0E-04	0,8
	Cy	6,2E+05	5,2E-04	0,8
Análogo 11E1	Hs	2,9E+05	2,8E-03	9,8
	Cy	3,2E+05	2,8E-03	8,7
Análogo oleclumab	Hs	5,6E+05	3,4E-05	0,06
	Cy	5,8E+05	4,3E-05	0,07
Análogo CPX006	Hs	6,6E+03	5,3E-04	80,3
	Cy	6,7E+03	4,8E-04	71,6

Tabla 8: Cinéticas de unión de los anticuerpos anti-CD73 a ECD de CD73 humano (Hs) y de cynomolgus (Cy) como se mide por SPR

mAb	ECD de CD73	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
21127	Hs	3,2E+05	7,0E-05	0,22
	Cy	3,8E+05	9,0E-05	0,24
21163	Hs	6,5E+04	5,5E-05	0,91
	Cy	1,0E+05	6,2E-05	0,66
21046	Hs	1,9E+05	8,3E-06	0,04
	Cy	2,1E+05	1,1E-05	0,05
Análogo 11E1	Hs	5,7E+04	5,6E-06	0,10
	Cy	8,4E+04	1,3E-05	0,14
Análogo oleclumab	Hs	1,1E+05	2,5E-06	0,02
	Cy	1,4E+05	6,6E-06	0,06
Análogo CPX006	Hs	1,7E+05	2,4E-06	0,02
	Cy	2,8E+04	1,4E-05	0,33

Ejemplo 7. Agrupación de los epítomos de los anticuerpos anti-CD73

[0234] Este ejemplo describe el agrupamiento de los anticuerpos anti-CD73 en agrupaciones de epítomos sobre la base de patrones de competición pareados. Los anticuerpos que pertenecen a diferentes agrupaciones de epítomos reconocen diferentes epítomos en el ECD de CD73.

Materiales y Métodos

[0235] La investigación de competición de anticuerpos pareados se realizó por SPR usado un instrumento IBIS-MX96 (IBIS, Países Bajos). Los anticuerpos anti-

CD73 se diluyeron hasta 3 $\mu\text{g/mL}$ en PBS y se depositaron en un G-a-hu-IgG Fc SensEye® capturando durante 15 minutos usando un Microspotter de Flujo Continuo, seguido del bloqueo de los sitios de unión residuales por Herceptina (trastuzumab) y el entrecruzamiento químico con el kit SensEye FixIt (IBIS, Países Bajos). Después de la preparación del sensor, el análisis de la competición de los anticuerpos se realizó usando un ensayo en sándwich clásico. El antígeno CD73-His ECD se diluyó en tampón de operación de PBS, Tween 20 al 0,05 %, y Herceptina 200 nM, después se inyectó a una concentración 10 nM y se capturó por la matriz conjugada de anticuerpos anti-CD73. A continuación, se realizaron inyecciones individuales de cada uno de los anticuerpos frente a CD73 diluidos hasta 100 nM en tampón de operación para establecer los patrones de competición de los anticuerpos. Los datos se analizaron por Epitope Binning 2.0 (Wasatch, EE. UU.).

Resultados

[0236] El patrón de competición de 16 anticuerpos anti-CD73 se presenta en la **FIG. 4**. Los anticuerpos anti-CD73 ensayados se agruparon en cuatro agrupaciones de epítomos principales superpuestas: 1, 2, 3, y 4. La agrupación 1 incluyó los análogos oleclumab y 11E1, que se bloqueaban de manera cruzada entre sí. Se ha mostrado que el anticuerpo oleclumab y 11E1 se unen a epítomos superpuestos en la parte superior del dominio N-terminal y de manera opuesta al sitio catalítico de CD73 (Geoghegan et al., *MABS* **8(3)**:454-467 (2016), y Perrot et al., *Cell Reports* **27**:2411-2425 (2019)). Todos los anticuerpos en la agrupación 1 bloqueaban de manera cruzada los anticuerpos agrupados en la agrupación 2. La agrupación 2 incluyó a los anticuerpos 21385, 21127, y 21163, que presentaban patrones de competición comparables, lo que sugiere que los anticuerpos se unen a epítomos similares. Los anticuerpos en la agrupación 2 bloqueaban de manera cruzada todos los anticuerpos ensayados excepto los anticuerpos en la agrupación 4. Los anticuerpos de la agrupación 4 podrían dividirse en dos subagrupaciones; agrupación 4a y 4b que compiten con uno o más anticuerpos de la agrupación 3. El anticuerpo 21046 (agrupación 4a) y el análogo CPX006 (agrupación 4b) compitieron con diferentes anticuerpos en la agrupación 3, lo que muestra que los dos anticuerpos tienen epítomos de unión relacionados de cerca, pero no idénticos.

[0237] En conclusión, los anticuerpos 21127 y 21163 (agrupación 2) se unen a epítopo(s) único(s) de CD73 que tienen algo de superposición con el o los epítopos de los análogos 11E1 y oleclumab (agrupación 1). El o los epítopos de los anticuerpos 21127 y 21163 son distintos de los del análogo CPX006 (agrupación 4).

- 5 El anticuerpo 21046 (agrupación 4a) se une a un epítopo que es similar al epítopo del análogo CPX006 (agrupación 4b), pero diferente de los epítopos de los anticuerpos 21127 y 21163 (agrupación 2) y los análogos 11E1 y oleclumab (agrupación 1).

Ejemplo 8. Mapeo de epítopos de los anticuerpos anti-CD73 por mutagénesis de CD73

[0238] Este ejemplo ilustra cómo los epítopos de unión de los anticuerpos 21127, 21163, y 21046 pueden dividirse en epítopos lineales y residuos de contacto individuales midiendo la afinidad de unión y las cinéticas frente a 94 mutantes de CD73 diferentes.

Materiales y Métodos

[0239] Las secuencias de las proteínas de CD73 humano y de rata (*Rattus norvegicus*) se descargaron de UniProt (No. de Acceso P21589 y P21588, respectivamente). Las secuencias de las proteínas de longitud completa de CD73 de mono cynomolgus (*Macaca fascicularis*) y pollo (*Gallus gallus*) se descargaron de NCBI (XP_005552488.1, y XP_004940453.1, respectivamente). Se usaron las estructuras de CD73 disponibles públicamente PDB 4H2F (abierta), 4H2G (abierta), y 4H2I (cerrada) para mapear los residuos de aminoácidos expuestos en la superficie. Las posiciones de los residuos expuestos en la superficie que eran diferentes entre CD73 humano y de rata se mutaron a alanina. Para mapear los epítopos lineales de los anticuerpos, se generaron proteínas quiméricas CD73 en las que 10 aminoácidos en la secuencia de ECD de CD73 humano se intercambiaron secuencialmente a la secuencia de pollo en segmentos que se superponían en 5 aminoácidos.

[0240] El ADNc que codifica el dominio extracelular de CD73 humano se sintetizó y se clonó en un vector que contenía el promotor de CMV y la secuencia de Fc de Ig humana (residuos P101-K330), dando lugar a la fusión en C-terminal de Fc de Ig al

ECD de CD73 clonado. Se generaron construcciones de fusión con Fc de CD73 humano de tipo salvaje (wt) y mutado por técnicas estándar de síntesis génica y las proteínas se expresaron transitoriamente en cultivos de 2 mL usando un sistema de expresión ExpiCHO™.

- 5 **[0241]** Después de que se recogieran las construcciones de fusión de CD73 humano Fc, los sobrenadantes se ensayaron para determinar la unión a los Fab anti-CD73 por Resonancia de Plasmón Superficial (SPR). Los sobrenadantes de los cultivos que contenían proteínas de fusión de CD73 se inmovilizaron en un G-a-hu-IgG Fc SensEye® (Ssens BV, Países Bajos) durante 15 minutos usando un
- 10 Microspotter de Flujo Continuo (CFM, Wasatch Microfluidics, Salt Lake City, EE. UU.). Después de la deposición, el SensEye® se posicionó en un biosensor IBIS MX96 y las proteínas capturadas se fijaron en la superficie usando el kit FixIT (Ssens BV, Países Bajos). El análisis cinético se realizó aplicando series de titulación cinética donde los fragmentos Fab monoméricos de los anticuerpos de la
- 15 invención se inyectaron en concentraciones crecientes de 0,8 nM hasta 500 nM. Después de cada ciclo de inyección de fragmentos Fab, la superficie se regeneró con glicina 10 mM pH 3, glicerol al 10 %. La asociación de Fab se realizó durante 15 minutos y la disociación del antígeno se realizó durante 15 minutos. Las respuestas de unión registradas se ajustaron a un modelo de unión simple 1:1 de
- 20 Langmuir con el software Scrubber 2 para el cálculo de las constantes de la tasa de asociación (k_{asoc} o k_a), tasa de disociación (k_{disoc} o k_d) y afinidad (K_D).

Resultados

- [0242]** Los epítomos de CD73 reconocidos por los anticuerpos 21127, 21163 y 21046, y los análogos 11E1, oleclumab, y CPX006 se mapearon usando
- 25 construcciones de receptores quiméricos, en las que segmentos de 10 aminoácidos de la secuencia de CD73 humano se reemplazaron por la secuencia de pollo; o por escaneo de alanina, donde los aminoácidos expuestos en la superficie que eran diferentes entre CD73 humano y de rata se mutaron a alanina. Las afinidades de unión de los anticuerpos para CD73 de tipo salvaje y los mutantes se midieron por
- 30 SPR, y se usó un punto de corte de una reducción de al menos 5 veces en la afinidad en comparación con wt o desviación del modelo de unión 1:1 para encontrar las construcciones con una pérdida significativa de unión a los anticuerpos anti-CD73 (**Tabla 9**).

Tabla 9: Resumen de las especificidades de unión de los anticuerpos 21127, 21163, y 21046, y los análogos 11E1, oleclumab, y CPX006

Anticuerpo	Epítomos Lineales	Residuos de Contacto
21127	27-31, 61-75, 161-170	R73, R109, D168
21163	61-70, 161-170	R109
21046	27-31, 266-270, 291-305	I301, S302, H304
Análogo 11E1	126-135, 156-170	E129, K133, E134
Análogo oleclumab	161-170, 206-215	V170, K206, N211
Análogo CPX006	206-210, 231-235, 266-270, 296-305	R297, I301

[0243] Los epítomos lineales y los residuos de contacto identificados se mapearon en la estructura de cristal del homodímero de CD73 en su estado abierto (**FIG. 5**).

Se encontró que los epítomos reconocidos por los anticuerpos 21127, 21163, y 21046, y los análogos 11E1, oleclumab, y CPX006 estaban todos en el dominio N-terminal de CD73 (**FIG. 5**). Se encontró que los epítomos de los anticuerpos 21127 y 21163 y los análogos 11E1 y oleclumab estaban localizados en una superficie perpendicular a la interfaz de dimerización del homodímero de CD73 y en el lado opuesto respecto al centro catalítico (**FIG. 5**, paneles A, B, D, y E). Se encontró que los epítomos de los cuatro anticuerpos eran distintos por la unión a diferentes residuos de contacto y epítomos lineales. Los anticuerpos que se unen a la superficie en la parte superior de CD73 pueden bloquear la actividad enzimática bloqueando la enzima en una conformación abierta, inactiva, evitando la transición al estado abierto activo (Perrot et al., *Cell Reports* **27**:2411-2425 (2019)).

[0244] Se encontró que los epítomos del anticuerpo 21046 y del análogo CPX006 estaban en la parte frontal del dominio N-terminal, justo por encima del centro catalítico de CD73 (**FIG. 5**, paneles C y F). Los dos anticuerpos se diferenciaban en términos de los epítomos lineales y de los residuos de contacto reconocidos.

[0245] En resumen, el mapeo de los epítomos a una resolución de único aminoácido mostró que los anticuerpos anti-CD73 ejemplificados tenía cada uno distintos epítomos de unión. Los anticuerpos 21127 y 21163 se unen a epítomos similares en la parte superior del dominio N-terminal de CD73; estos epítomos son

distintos de los epítomos de los análogos 11E1, oleclumab y CPX006. El anticuerpo 21046 y el análogo CPX006 se unen a epítomos superpuestos, pero distintos, en la parte frontal del dominio N-terminal de CD73.

Ejemplo 9. Estequiometría de los complejos anticuerpo/CD73 formados en disolución

[0246] Este ejemplo describe el tamaño de los complejos anticuerpo/ECD de CD73 formados en disolución como se mide por SEC-MALS.

Materiales y Métodos

[0247] Se analizaron los anticuerpos anti-CD73 y CD73 etiquetado con His en diferentes relaciones, así como individualmente para analizar el tamaño de los complejos formados entre el homodímero de CD73 y los anticuerpos anti-CD73. Se prepararon muestras mezclando 900 pmoles de CD73-His con 900, 450, 90 o 0 pmoles de anticuerpo diluido en PBS, pH 7,4. Las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente seguido de la separación usando un UHPLC UltiMate 3000 (Thermo Scientific) y una columna SEC X-Bridge (Waters) a una velocidad de flujo de 1,2 mL/min. El tampón de operación de las muestras fue Citrato 0,01 M, L-Arginina·HCl 250 mM, pH 6,0. Después de la separación por HPLC, todas las muestras se analizaron usando un detector MiniDAWN TREOS MALS (Wyatt) y detector de índice de refracción Optilab T-rEX (Wyatt). Se generaron gráficos de datos usando GraphPad Prism.

Resultados

[0248] La unión bivalente de los anticuerpos al homodímero de CD73 puede bloquear la enzima en una conformación inactiva (Geoghegan et al., *MABS* **8(3)**:454-467 (2016) y Perrot et al., *Cell Reports* **27**:2411-2425 (2019)). El mecanismo de bloqueo puede ser a través del entrecruzamiento de los homodímeros de CD73 o mediante la unión de un único dímero de CD73 en el estado inactivo. Para caracterizar la estequiometría de los complejos anticuerpo/CD73 formados en disolución, se determinaron los tamaños de los complejos de proteína por SEC-MALS. El tamaño de un complejo 1:1 anticuerpo/homodímero de CD73 está en el rango de 270-280 kDa, como se calcula

a partir de los pesos moleculares individuales de anticuerpo y homodímero de CD73 (aproximadamente 150 y 125 kDa, respectivamente). Las **FIG. 6A y 6B** y la **Tabla 10** muestran los perfiles de SEC-MALS y los tamaños de los complejos formados para los anticuerpos 21127, 21163, y 21046 y los análogos 11E1, oleclumab, y CPX006 que se unen al homodímero de CD73 a diversas relaciones moleculares. Las operaciones individuales de CD73 y cada uno de los anticuerpos muestran un pico monodisperso que concuerda con los tamaños esperados para las proteínas, y confirman la ausencia de agregados (**FIG. 6A y 6B**, líneas punteadas). El perfil de SEC-MALS del anticuerpo 21127 uniéndose a CD73 muestra un pico principal (pico 2) con un tamaño promedio de 276 kDa, correspondiente al tamaño del complejo predicho 1:1 21127:homodímero de CD73, y un pico más pequeño (pico 1) correspondiente bien al exceso 21127 o de dímeros de CD73. El anticuerpo 21163, y los análogos 11E1 y CPX006, formaron principalmente complejos 1:1, pero tendieron a formar complejos de un orden mayor a la mayor relación anticuerpo:CD73 (1:1). Los complejos de orden mayor polidispersos fueron más pronunciados para los análogos CPX006 y 11E1. El anticuerpo 21046 y el análogo oleclumab formaron complejos grandes, lo que indica que estos anticuerpos entrecruzan principalmente dímeros de CD73 separados, lo que también se ha mostrado para oleclumab (MEDI9447) (Geoghegan et al, *MABS* **8(3)**:454-467 (2016)).

Tabla 10: Masas moleculares (PM, kDa) de los complejos formados cuando se mezclan CD73 y anticuerpos anti-CD73 a diversas relaciones como se mide por SEC-MALS

Proteína	Relación mAb:CD73 (n:n)	Pico 1 (PM, kDa)	Pico 2 (PM, kDa)	Pico 3 (PM, kDa)	Pico 4 (PM, kDa)
CD73	0:1	124	-	-	-
anticuerpo	1:0	151	-	-	-
21127	1:1	144	269	-	-
	0,5:1	140	277	-	-
	0,1:1	128	282	-	-
21163	1:1	197	280	606	-
	0,5:1	143	278	464	-
	0,1:1	129	279	-	-

21046	1:1	194	382	552	863
	0,5:1	97	199	521	794
	0,1:1	137	969	480	815
Análogo 11E1	1:1	116	270	511	802
	0,5:1	127	277	566	3.372
	0,1:1	123	265	704	11.848
Análogo Oleclumab	1:1	116	389	682	1.039
	0,5:1	127	870	559	1.007
	0,1:1	123	194	432	821
Análogo CPX006	1:1	124	148	246	363
	0,5:1	118	143	245	349
	0,1:1	120	121	236	339

[0249] Los picos en la **Tabla 10** corresponden a los picos 1-4 observados en los cromatogramas en las **FIG. 6A y 6B** como se cuenta de derecha a izquierda. El pico 1 corresponde bien a homodímero de CD73 no unido/en exceso (~125 kDa) o anticuerpo no unido/en exceso (~150 kDa). Los picos 2-4 corresponden a

5 complejos mAb:CD73 de diversos tamaños y estequiometría, donde un tamaño de complejo de ~275 kDa representa una estequiometría 1:1.

[0250] Como se muestra en la **Tabla 10** y en las **FIG. 6A y 6B**, el anticuerpo 21127 se une a un epítipo en el homodímero de CD73 de una manera que da lugar a un complejo 1:1, independiente de la concentración de CD73. El anticuerpo 21163

10 y los análogos 11E1 y CPX006 se unen principalmente al dímero de CD73 como un complejo 1:1, pero también muestran una tendencia a formar complejos de orden mayor en diversos grados. El anticuerpo 21046 y el análogo oleclumab se unen al homodímero de CD73 solamente como complejos oligoméricos, lo que indica entrecruzamiento de múltiples dímeros de CD73.

15 **Ejemplo 10. Funcionalidad de los anticuerpos anti-CD73 en un ensayo de la actividad de CD73 soluble**

[0251] Se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-CD73 21028, 21046, 21127, y 21163 para inhibir la actividad enzimática de CD73 recombinante soluble con más detalle y se comparó con un análogo oleclumab en un ensayo de la actividad de

20 CD73 soluble. Los anticuerpos anti-CD73 se incubaron con CD73 recombinante, AMP y ATP durante 2 horas a 37 °C. Se investigó la actividad de CD73 midiendo la inhibición por AMP de la detección de ATP usando CellTiter-Glo® 2.0 (Promega

Corporation) como se describe en Sachsenmeier et al., *supra*.

[0252] La inhibición de la actividad enzimática de CD73 después del tratamiento con las concentraciones indicadas de los anticuerpos anti-CD73 o del análogo oleclumab se muestra en la **FIG. 7**. Es evidente que la función inhibidora de los anticuerpos anti-CD73 depende de la concentración y que todos los anticuerpos anti-CD73 inhiben la actividad de CD73, si bien con una potencia y eficacia diferentes. Además, el análogo oleclumab inhibe la actividad enzimática de CD73 de una manera menos efectiva a concentraciones mayores de anticuerpo. Se han publicado resultados similares para oleclumab (previamente MEDI9447) por MedImmune (Geoghegan et al., *MABS* **8(3)**:454-467 (2016)). Los anticuerpos 21028 y 21046 también inhiben la actividad enzimática de CD73 ligeramente menos a concentraciones mayores en comparación con las concentraciones intermedias. Por el contrario, los anticuerpos 21127 y 21163 muestran una máxima inhibición de la actividad enzimática de CD73 a todas las concentraciones por encima de aproximadamente 3 µg/mL.

Ejemplo 11. Funcionalidad de los anticuerpos anti-CD73 en ensayos de la actividad de CD73 basados en células

[0253] Se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-CD73 21028, 21046, 21127, y 21163 para inhibir la actividad de CD73 expresado en células con más detalle y se comparó con un análogo oleclumab. Los anticuerpos anti-CD73 se incubaron con líneas celulares humanas que expresaban CD73 (Calu-6 y H292) o una línea celular de cynomolgus que expresaba CD73 (Cynom-K1) durante 30 minutos a 37 °C seguido de la adición del sustrato de CD73, AMP, y una incubación adicional durante 3 horas a 37 °C. Se investigó la actividad de CD73 añadiendo ATP a los sobrenadantes y midiendo la inhibición por AMP de la detección de ATP usando CellTiter-Glo® 2.0 (Promega Corporation) como se describe en Sachsenmeier et al., *supra*.

[0254] La inhibición de la actividad de CD73 después del tratamiento con los diferentes anticuerpos anti-CD73 se muestra en la **FIG. 8**. Es evidente que la función inhibidora de los anticuerpos anti-CD73 depende de la concentración y que todos los anticuerpos inhiben la actividad tanto de CD73 humano como de cynomolgus, si bien con potencia y eficacia diferentes. Los anticuerpos 21127 y

21163 muestran la mayor eficacia en las dos líneas celulares humanas Calu-6 y H292, pero los cuatro anticuerpos ensayados son claramente superiores al análogo oleclumab en las tres líneas celulares.

Ejemplo 12. Funcionalidad de los anticuerpos anti-CD73 en un ensayo de la actividad de CD73 basado en células a largo plazo

[0255] Se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-CD73 21028, 21046, 21127, y 21163 para inhibir la actividad de CD73 expresado en líneas celulares con más detalle y se comparó con un análogo oleclumab en un ensayo basado en células a largo plazo. Los anticuerpos anti-CD73 se incubaron con la línea celular humana que expresaba CD73 H292 durante 30 minutos a 37 °C seguido de la adición del sustrato de CD73, AMP, y una incubación adicional durante 3, 6 o 24 horas a 37 °C. Se investigó la actividad de CD73 añadiendo ATP a los sobrenadantes y midiendo la inhibición por AMP de la detección de ATP usando CellTiter-Glo® 2.0 (Promega Corporation) como se describe en Sachsenmeier et al., *supra*.

[0256] La inhibición de actividad de CD73 después del tratamiento con los diferentes anticuerpos anti-CD73 se muestra en la **FIG. 9**. Es evidente que la función inhibidora de los anticuerpos anti-CD73 depende de la concentración y que todos los anticuerpos inhiben la actividad de CD73, si bien con potencia y eficacia diferentes. Notablemente, la incubación de las células con los anticuerpos durante hasta 24 horas diferencia más a los anticuerpos 21127 y 21163 del análogo oleclumab (y de los otros dos anticuerpos anti-CD73 ensayados).

Ejemplo 13. Eficacia de los anticuerpos anti-CD73 en líneas celulares de cáncer

[0257] Se evaluaron los anticuerpos anti-CD73 21127, 21046, 21163 para determinar la capacidad de inhibir la actividad de CD73 expresado en un gran panel de líneas celulares del cáncer que representan un espectro amplio de niveles de expresión y actividad de CD73. El panel de células abarca varias indicaciones de cáncer en múltiples tejidos de origen, como se describe en la **Tabla 11**.

Materiales y Métodos

[0258] Los anticuerpos anti-CD73 se incubaron a una concentración de 25 µg/mL

con líneas celulares que expresaban CD73 durante 30 minutos a 37 °C seguido de la adición del sustrato de CD73, AMP, y una incubación adicional durante 3 horas a 37 °C. Se valoró la actividad celular de CD73 añadiendo ATP a los sobrenadantes y midiendo la inhibición por AMP de la detección de ATP usando CellTiter-Glo® 2.0

- 5 (Promega Corporation) como se describe en Sachsenmeier et al., supra. La actividad de CD73 se detecta mediante luminiscencia.

Resultados

- [0259] El efecto de los anticuerpos anti-CD73 sobre la actividad de CD73 expresado en 20 líneas celulares de cáncer diferentes se muestra en la **FIG. 10**. Es
- 10 evidente que la actividad de CD73 varió después del tratamiento con los diferentes anticuerpos anti-CD73. Algunos anticuerpos (21046 y el análogo oleclumab) presentaron algo de capacidad de inhibir CD73 a niveles menores de actividad celular de CD73, pero no inhibieron la enzima a los niveles de actividad mayores, mientras otros anticuerpos (21127 y 21163) inhibieron fuertemente la actividad de
- 15 CD73 incluso a los niveles de actividad mayores observados, p. ej., en las líneas celulares Calu-6, NCI-H1775, KYSE-30 y Capan-2.

Tabla 11: Lista de líneas celulares y tejidos de origen

Línea celular	Indicación, Subtipo de enfermedad (cuando sea aplicable)
A375	Cáncer de Piel, Carcinoma
A549	Cáncer de Pulmón de Células no Pequeñas, Adenocarcinoma
ASPC-1	Cáncer de Páncreas, Adenocarcinoma Exocrino
BFTC-905	Cáncer de Vejiga, Carcinoma de Células Transicionales
BT-474	Cáncer de Mama, Carcinoma
Calu-3	Cáncer de Pulmón de Células no Pequeñas, Adenocarcinoma
Calu-6	Cáncer de Pulmón de Células no Pequeñas
Capan-2	Cáncer de Páncreas, Adenocarcinoma Exocrino
Detroit 562	Cáncer de Cabeza y Cuello, Carcinoma de Células Escamosas, Faringe
DU145	Cáncer de Próstata, Adenocarcinoma
H292	Cáncer de Pulmón de Células no Pequeñas, Carcinoma Mucoepidermoide
H441	Cáncer de Pulmón, Adenocarcinoma Papilar
HCT-116	Cáncer Colorrectal, Adenocarcinoma
KYSE-30	Cáncer Esofágico, Carcinoma de Células Escamosas
MCF-7	Cáncer de Mama, Carcinoma
MDA-MB-468	Cáncer de Mama, Carcinoma
NCI-H1975	Cáncer de Pulmón de Células no Pequeñas, Adenocarcinoma

SKBR-3	Cáncer de Mama, Carcinoma
T47D	Cáncer de Mama, Carcinoma Ductal

Ejemplo 14. Ensayo *in vitro* de la actividad de los anticuerpos anti-CD73 en un ensayo de viabilidad basado en células

[0260] Este ejemplo describe la caracterización funcional *in vitro* del anticuerpo 21127 en un ensayo de viabilidad usando dos líneas celulares de cáncer crecidas en presencia de AMP 300 μ M.

Materiales y Métodos

[0261] Se evaluaron los anticuerpos *in vitro* para determinar su capacidad de inhibir directamente la viabilidad (supervivencia y/o proliferación) de líneas celulares de cáncer de mama triple negativo MDA-MB-231 y MDA-MB-468. Las células se sembraron a 1.000 células/pocillo en una placa de 384 pocillos en los medios RPMI 1640 Glutamax (MDA-MB-231) o DMEM (MDA-MB-468) suplementados con FBS al 2 % y P/S al 1 %, y se incubaron durante cuatro días en un incubador humidificado a 37 °C con anticuerpos titulados desde 25 μ g/mL en presencia de AMP (monofosfato de adenosina, Sigma-Aldrich) a 300 μ M. La viabilidad celular se cuantificó usando el reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche) según las instrucciones del fabricante.

Resultados

[0262] Es evidente que 21127 y el análogo oleclumab se diferencian con respecto al resultado funcional (**FIG. 11**). El anticuerpo 21127 presentó un efecto pronunciado en ambas líneas celulares, con MBA-MB-231 reduciéndose hasta aproximadamente el 60 % de células viables y MBA-MB-468 hasta el 0 % de células viables en comparación con las células no tratadas (es decir, ausencia de células viables mensurables sobre el fondo de medio). El análogo oleclumab no presentó un efecto significativo sobre la viabilidad de la línea celular MBA-MB-231, mientras la MBA-MB-468 se vio afectada en algún grado con los números de células viables reducidos hasta aprox. el 70-80 % en comparación con las células no tratadas.

[0263] Un efecto similar puede esperarse en líneas celulares de cáncer derivadas de otros tejidos.

Ejemplo 15. Inhibición de CD73 expresado en células T CD4⁺ y CD8⁺ y células B CD19⁺ primarias de donantes humanos sanos por los anticuerpos anti-CD73

[0264] Se evaluaron los anticuerpos anti-CD73 se evaluaron para determinar la capacidad de inhibir la actividad de CD73 expresado en células T CD4⁺ y CD8⁺ y células B CD19⁺ primarias de donantes humanos sanos.

Materiales y Métodos

[0265] Se aislaron células T CD4⁺ y CD8⁺ y células B CD19⁺ primarias de PBMC de la capa leuco-plaquetaria (células mononucleares de sangre periférica) usando lechos magnéticos (MACS) con la especificidad relevante según las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Se incubó una titulación de una dilución de cuatro veces de los anticuerpos anti-CD73 a una concentración de 50 a 0,003 µg/mL con células primarias aisladas durante 30 minutos a 37 °C, seguido de la adición del sustrato de CD73, AMP, y una incubación adicional durante 20 horas (células B CD19⁺) o 40 horas (células T CD4⁺ y CD8⁺) a 37 °C. La actividad de CD73 se valoró añadiendo ATP a los sobrenadantes y midiendo la inhibición por AMP de la detección de ATP usando CellTiter-Glo® 2.0 (Promega Corporation) como se describe en Sachsenmeier et al., *supra*.

Resultados

[0266] La actividad de CD73 expresado en células T CD4⁺ y CD8⁺ y células B CD19⁺ primarias después del tratamiento con los anticuerpos anti-CD73 se muestra en la **FIG. 12**. Es evidente que la actividad de CD73 después del tratamiento con el anticuerpo 21127 y el análogo oleclumab difiere fuertemente. Concentraciones mayores del anticuerpo 21127 demostraron una inhibición casi completa de la actividad de CD73 en todos los tipos de células primarias, mientras que el análogo oleclumab mostró una inhibición muy limitada de la actividad de CD73 en las células B CD19⁺ y células T CD8⁺ y solo una inhibición parcial en las células T CD4⁺. La capacidad del análogo oleclumab para inhibir la actividad de CD73 se correlaciona con el nivel de expresión de CD73, ya que las células T CD4⁺ de sangre periférica de donantes sanos tienen de promedio una expresión limitada de CD73, mientras que las células B CD19⁺ expresan de promedio altos niveles de CD73 y las células T CD8⁺ expresan de promedio niveles intermedios (Allard et al., *Immunol Rev*

276(1):121-144 (2017)).

Ejemplo 16. Funcionalidad de los anticuerpos anti-CD73 en un ensayo de proliferación de células T

[0267] Se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-CD73 21028, 21046, 21127, y 21163 para inhibir la actividad de CD73 expresado en células T CD4⁺ y se comparó con un análogo oleclumab en un ensayo *in vitro*. Las células T CD4⁺ se aislaron de un donante sano y se activaron con lechos anti-CD3/CD28 (Thermo Fisher Scientific), AMP y anticuerpos anti-CD73 durante 48 horas, seguido de la adición de 3H-timidina (PerkinElmer Corporation) durante 24 horas adicionales. La proliferación de las células T se midió como la incorporación de 3H-timidina y se normalizó respecto a los controles no tratados con AMP.

[0268] La proliferación de las células T después del tratamiento con los diferentes anticuerpos anti-CD73 se muestra en la **FIG. 13**. Es evidente que la función estimuladora de los anticuerpos anti-CD73 sobre la proliferación de las células T depende de la concentración y que todos los anticuerpos estimulan la proliferación de las células T, si bien con potencia y eficacia diferentes. Todos los anticuerpos excepto el análogo oleclumab restauran completamente la proliferación de las células T, con el anticuerpo 21127 haciéndolo con la mayor potencia.

Ejemplo 17. Funcionalidad de los anticuerpos anti-CD73 en un ensayo de la activación de las células T

[0269] Se evaluó la capacidad de un anticuerpo anti-CD73 para inhibir la actividad de CD73 expresado en células T CD4⁺ y CD8⁺ y se comparó con un análogo oleclumab en un ensayo *in vitro*.

[0270] Las células T CD4⁺ y CD8⁺ se aislaron de donantes sanos y se activaron con lechos anti-CD3/CD28 (Thermo Fisher Scientific), AMP y anticuerpos anti-CD73 durante 72 horas, seguido de la recogida del sobrenadante. La activación de las células T se midió como niveles de IFN- γ en el sobrenadante usando ELISA (Thermo Fisher Scientific).

[0271] La activación de las células T después del tratamiento con los diferentes anticuerpos anti-CD73 se muestra en la **FIG. 14**. Es evidente que la función estimuladora del anticuerpo 21127 sobre la activación de las células T depende de

la concentración y que 21127 da lugar a mayores niveles de IFN- γ que el análogo oleclumab.

Ejemplo 18. Funcionalidad de los anticuerpos anti-CD73 en un ensayo MLR de una vía

5 **[0272]** Se evaluó la capacidad de un anticuerpo anti-CD73 para inhibir la actividad de CD73 en una reacción linfocitaria mixta (MLR) de una vía y se comparó con un análogo oleclumab en un ensayo *in vitro*.

10 **[0273]** Se cocultivaron células dendríticas (DC) y células T CD4⁺ aisladas de dos donantes sanos diferentes para inducir una reacción específica de aloantígeno dando lugar a la producción de citoquinas y a la activación y/o proliferación de las células T. Las DC se diferenciaron a partir de monocitos CD14⁺ por 7 días de cultivo con 20 ng/mL de factor estimulante de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y 20 ng/mL de interleuquina-4 (IL-4), y se mezclaron en una relación 1:10 con células T CD4⁺ aisladas de células mononucleares de sangre

15 periférica (PBMC) de material de donantes sanos. La MLR de una vía se incubó con 25 μ g/mL de anticuerpo anti-PD-1 (12819; véase la Publicación de Patente PCT WO 2017/055547), AMP 50 μ M y la concentración indicada de anticuerpo anti-CD73 durante 48 horas, seguido de la adición de 3H-timidina (PerkinElmer Corporation) durante 24 horas adicionales. La proliferación se midió como la incorporación de

20 3H-timidina y se normalizó respecto a los controles no tratados con AMP.

25 **[0274]** La proliferación de las células T después del tratamiento con los diferentes anticuerpos anti-CD73 se muestra en la **FIG. 15**. Es evidente que la función estimuladora de los anticuerpos anti-CD73 sobre la proliferación depende de la concentración y que tanto el anticuerpo 21127 como el análogo oleclumab estimularon la proliferación de las células T. Sin embargo, solo el anticuerpo 21127 restauró completamente la proliferación.

Ejemplo 19. Combinación de anticuerpos anti-CD73 y anti-PD-1 en un ensayo MLR de una vía

30 **[0275]** Este ejemplo examina la capacidad de una combinación de un anticuerpo anti-PD-1 (12819) y un anticuerpo anti-CD73 (21127) para aumentar la activación de las células T en una reacción linfocitaria mixta (MLR) de una vía.

[0276] Se cocultivaron células dendríticas (DC) y células T CD4⁺ aisladas de dos donantes sanos diferentes para inducir una reacción específica de aloantígeno dando lugar a la producción de citoquinas y a la activación y/o proliferación de las células T. Las DC se diferenciaron a partir de monocitos CD14⁺ por 7 días de cultivo con 20 ng/mL de factor estimulante de las colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y 20 ng/mL de interleuquina-4 (IL-4), y se mezclaron en una relación 1:10 con células T CD4⁺ aisladas de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de material de donantes sanos. La MLR de una vía se incubó con o sin AMP 50 µM y con anticuerpo anti-CD73 21127 y/o anticuerpo anti-PD-1 (12819; véase la Publicación de Patente PCT WO 2017/055547) durante 72 horas, seguido de la recogida del sobrenadante. La combinación de anticuerpo anti-CD73 21127 y anticuerpo anti-PD-1 12819 se añadió en una relación 1:1 de los dos anticuerpos. La activación de las células T se midió cuantificando los niveles de IFN-γ en el sobrenadante usando ELISA (Thermo Fisher Scientific), y se normalizó respecto a los controles no tratados con AMP.

[0277] La activación de las células T en la MLR de una vía, como se mide por los niveles de IFN-γ después del tratamiento con el anticuerpo 12819 y/o 21127, se muestra en la **FIG. 16**. Es evidente que el anticuerpo anti-PD-1 12819 activó fuertemente la MLR de una vía sin AMP y tanto con, como sin, la incubación simultánea con el anticuerpo 21127 (panel superior). La activación de la MLR de una vía con el anticuerpo anti-PD-1 es considerablemente menor cuando se añade AMP a la MLR de una vía (panel inferior). Sin embargo, la combinación del anticuerpo anti-PD-1 y el anticuerpo anti-CD73 21127 restauró al menos parcialmente la activación fuerte de las células T, resaltando el beneficio de la combinación anticuerpo anti-PD-1/anticuerpo anti-CD73.

Ejemplo 20. Funcionalidad de los anticuerpos anti-CD73 en un ensayo de activación de células B

[0278] Se evaluó la capacidad de los anticuerpos 21046 y 21127 para estimular la activación de las células B en un ensayo *in vitro* de activación de células B. Las PBMC de un donante sano se estimularon toda la noche con 21046, 21127, o el análogo oleclumab (10 µg/mL), así como el ligando CD40 (0,5 µg/mL). El análisis por citometría de flujo se realizó con selección de células B (CD20⁺) y la activación

de las células B se evaluó como regulación al alza de los marcadores de la activación de las células B CD25, CD69, y CD83.

[0279] Como se muestra en las **FIG. 17A y 17B**, el anticuerpo 21046 estimula una fuerte regulación al alza de los marcadores de la activación de las células B CD25, CD69 y CD83, mientras que el anticuerpo 21127 y el análogo oleclumab tienen un efecto limitado en la activación de las células B.

Ejemplo 21. Disminución inducida por los anticuerpos anti-CD73 de los niveles de CD73 en las células H292

[0280] Se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-CD73 21127, 21028, 21046, y 21163 para modular los niveles de CD73 en una línea celular y se comparó con el análogo oleclumab. Los anticuerpos anti-CD73 se incubaron con la línea celular humana H292 durante 24 horas a 37 °C a 25 µg/mL seguido de la lisis celular y la evaluación de los niveles de CD73 usando una técnica Simple Western (ProteinSimple).

[0281] La **FIG. 18** muestra los niveles de CD73 después del tratamiento con el anticuerpo 21127, 21028, 21046, o 21163 o el análogo oleclumab. La incubación con el anticuerpo anti-CD73 21046 o el análogo oleclumab dio lugar a alguna regulación a la baja de CD73, mientras que los otros anticuerpos anti-CD73 tuvieron un efecto modesto, si alguno, en los niveles de CD73.

Ejemplo 22. Funcionalidad de un anticuerpo anti-CD73 en modelos de xenoinjerto de tumor humano

[0282] Este ejemplo demuestra la capacidad del anticuerpo anti-CD73 21127 para inhibir la actividad enzimática de CD73 expresado en células aisladas de xenoinjertos de tumor humano.

Materiales y Métodos

[0283] La línea celular de melanoma humano A375 se inoculó subcutáneamente en los flancos de ratones hembra NOG o NOD-*scid* de 6-8 semanas de edad. En un ejemplo (**FIG. 19**, panel superior), se inyectaron intraperitonealmente PBMC humanas un día después de la inoculación de las células tumorales. Los tumores se midieron tres veces a la semana con un calibrador en dos dimensiones, y el

volumen tumoral en mm³ se calculó según la fórmula: (anchura)² x longitud x 0,5.

Los ratones se trataron tres veces a la semana por inyección intraperitoneal de

tampón de vehículo o (1) anticuerpo 21127, (2) un análogo oleclumab, o (3)

anticuerpo 21127 combinado con anticuerpo anti-CD73 de ratón TY/23 (BioXcell). A

5 diferencia del análogo oleclumab, el anticuerpo 21127 no reacciona de manera cruzada con CD73 de ratón. Por tanto, para comparar la inhibición de la actividad de CD73 en la masa tumoral, que también contiene células murinas que expresan CD73 (células endoteliales y estromales), el anticuerpo 21127 se combinó con el anticuerpo anti-CD73 de ratón TY/23. Los anticuerpos se dosificaron a 5 mg/kg, 10 20 mg/kg o 50 mg/kg. A diferentes puntos de tiempo después del abandono del tratamiento, los tumores se recogieron y se disociaron usando un kit de disociación tumoral y el Disociador gentleMACS Octo (Miltenyi). La suspensión celular resultante se incubó con el sustrato de CD73 AMP, durante 3 horas a 37 °C. Se investigó la actividad de CD73 añadiendo ATP a los sobrenadantes y midiendo la 15 inhibición por AMP de la detección de ATP por CellTiter-Glo® 2.0 (Promega Corporation) como se describe en Sachsenmeier et al., *supra*.

Resultados

[0284] El anticuerpo 21127 demostró una inhibición dependiente de la dosis de la actividad de CD73 en tumores recogidos de ratones humanizados con PBMC con 20 injerto de la línea celular de melanoma humano A375 después de una dosificación repetida durante dos semanas (**FIG. 19**, panel superior). También se encontró que el efecto sobre la actividad enzimática de CD73 duraba durante un periodo de tiempo prolongado después del abandono del tratamiento.

[0285] Como se muestra en la **FIG. 19**, panel inferior, el análogo oleclumab inhibió 25 la actividad de CD73 durante 16 días después del tratamiento y la actividad enzimática se recuperó totalmente en el día 28 después del tratamiento. Por el contrario, el anticuerpo 21127 solo o en combinación con TY/23 mostró una inhibición sostenida de la actividad de CD73 durante 28 días después del abandono del tratamiento.

30 **Ejemplo 23. Eficacia *in vivo* de un anticuerpo anti-CD73 en un modelo de tumor de xenoinjerto humano sin células inmunes**

[0286] Este ejemplo demuestra la capacidad de los anticuerpos anti-CD73 para inhibir el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama triple negativo humano.

[0287] Las células de cáncer de mama triple negativo humano MDA-MB-231 se inocularon subcutáneamente en los flancos de ratones hembra NOD-*scid* de 6-8 semanas de edad. Los tumores se midieron tres veces a la semana con un calibrador en dos dimensiones, y el volumen tumoral en mm³ se calculó según la fórmula: (anchura)² x longitud x 0,5. Los ratones se trataron dos veces a la semana con un total de 16 tratamientos por inyección intraperitoneal de tampón de vehículo, anticuerpo 21127, o un análogo oleclumab, seguido de un periodo de observación. Los anticuerpos se dosificaron a 10 mg/kg. Se aplicó un ensayo ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples de Bonferroni para comparar los volúmenes tumorales en cada punto de tiempo entre los grupos de tratamiento. Se realizaron análisis estadísticos usando GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, Inc.).

[0288] El anticuerpo 21127 y el análogo oleclumab mostraron un efecto inhibitor tumoral pronunciado durante el tratamiento (**FIG. 20**). Después del abandono del tratamiento, se observó un recremento de los tumores tratados con el análogo oleclumab. Por el contrario, los ratones tratados con el anticuerpo 21127 controlaron de manera efectiva el crecimiento tumoral durante el tratamiento con una ganancia limitada en el tamaño tumoral durante 60 días después del tratamiento.

Ejemplo 24. Eficacia *in vivo* de un anticuerpo anti-CD73 en modelos de tumor de xenoinjerto humano en ratones reconstituidos con PBMC humanas

[0289] Este ejemplo demuestra la eficacia *in vivo* del anticuerpo anti-CD73 21127 en ratones humanizados con PBMC con injerto de las células de carcinoma de pulmón humano o células de melanoma humano.

[0290] Las células de la línea celular de carcinoma de pulmón humano Calu-6 o línea celular de melanoma humano A375 se injertaron subcutáneamente en ratones NOG un día antes de la inyección intraperitoneal de PBMC humanas. El tratamiento se inició en el día de la inyección de las PBMC, y los ratones se trataron tres veces a la semana durante un total de seis tratamientos por la inyección intraperitoneal de tampón de vehículo o anticuerpo anti-CD73 21127 a 10 mg/kg (n=10/grupo). Los

tumores se midieron tres veces a la semana con un calibrador en dos dimensiones, y el volumen tumoral en mm³ se calculó según la fórmula: (anchura)² x longitud x 0,5. Se aplicó un ensayo ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples de Bonferroni para comparar los volúmenes tumorales en cada punto de tiempo entre los grupos de tratamiento. Se realizaron análisis estadísticos usando GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, Inc.).

[0291] Como se muestra en la **FIG. 21**, el tratamiento con el anticuerpo 21127 dio lugar a un retraso significativo del crecimiento tumoral ($P < 0,05$ frente al control de vehículo) en dos modelos de xenoinjerto de tumor humano (Calu-6 y A375) en ratones reconstituidos con PBMC humanas. Cada gráfico en la **FIG. 21** representa un donante de PBMC humanas.