

ANTICUERPOS ANTI-CD73 Y USOS DE ESTOS

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º
5 62/956,847, presentada el 3 de enero de 2020, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un Listado de secuencias que se ha presentado de
10 forma electrónica en formato ASCII y se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia. Dicha copia de ASCII, creada el 23 de diciembre de 2020, tiene el nombre 20443-0644WO1_SL.txt y un tamaño de 89.020 bytes.

ANTECEDENTES

15 El grupo de diferenciación 73 (CD73) es una proteína de membrana enlazada a glicosil fosfatidil inositol (GPI) que cataliza la conversión de monofosfato de adenosina extracelular (AMP) en adenosina. Funciona como un homodímero, puede suprimirse y es activo como proteína soluble en circulación. Además de su función enzimática, CD73 también es una molécula de adhesión celular y tiene una función en la regulación
20 del tráfico de leucocitos. Se sabe que los niveles de CD73 se regulan por aumento debido a lesiones tisulares o condiciones hipóxicas, y varios tumores sólidos tienen niveles elevados de CD73. La regulación por aumento de CD73 dentro del tumor contribuye al microambiente tumoral rico en adenosina, que tiene diversos efectos protumorales e inmunosupresores. Por lo tanto, existe la necesidad de agentes
25 terapéuticos que se dirijan a CD73 en el cáncer.

COMPENDIO

En un aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo que se une a CD73 humano, en donde el anticuerpo comprende un dominio pesado variable (VH) que comprende
30 la región determinante de complementariedad (CDR)1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH, en donde:

la CDR1 de VH comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSYG (SEQ ID NO:1);
la CDR2 de VH comprende la secuencia de aminoácidos IYPGSGNT (SEQ ID NO:2);
y

la CDR3 de VH comprende la secuencia de aminoácidos ARYDYLGSSYGFDY (SEQ
5 ID NO:3); y

en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que
comprende CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL, en donde:

la CDR1 de VL comprende la secuencia de aminoácidos QDVSTA (SEQ ID NO:4);

la CDR2 de VL comprende la secuencia de aminoácidos SAS (SEQ ID NO:5); y

10 la CDR3 de VL comprende la secuencia de aminoácidos QQHYNTPYT (SEQ ID NO:6).

En algunas modalidades del primer aspecto, el dominio VH comprende la secuencia
de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:22.

En algunas modalidades del primer aspecto, el anticuerpo comprende una cadena
pesada, y en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos
15 indicada en la SEQ ID NO:24.

En algunas modalidades del primer aspecto, el dominio VL comprende la secuencia
de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:23.

En algunas modalidades del primer aspecto, el anticuerpo comprende una cadena
ligera, y en donde la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos indicada
20 en la SEQ ID NO:25.

En algunas modalidades del primer aspecto, el dominio VH es al menos 80 % idéntico
a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:22 y el dominio VL es al
menos 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:23.

En algunas modalidades del primer aspecto, el dominio VH comprende la secuencia
25 de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:22, y el dominio VL comprende la secuencia
de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:23.

En algunas modalidades del primer aspecto, el anticuerpo comprende una cadena
pesada y una cadena ligera, y en donde la cadena pesada comprende la secuencia de
aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:24, y la cadena ligera comprende la secuencia
30 de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:25.

En un segundo aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo que se une a CD73

humano, en donde el anticuerpo se une a CD73 humano en un epítipo dentro de los aminoácidos 40-53 de la SEQ ID NO:70.

En un tercer aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo que se une a CD73 humano y compite por unirse a CD73 humano con un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:24 y una

cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:25. En algunas modalidades de los aspectos primero, segundo y tercero, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

En algunas modalidades de los aspectos primero, segundo y tercero, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo de cadena simple, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab', un fragmento F_{sc}, un fragmento F_v, un scFv, un sc(Fv)₂, o un diacuerpo.

En un cuarto aspecto, la descripción proporciona un ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo de cualquiera de los aspectos primero a tercero.

En un quinto aspecto, la descripción proporciona un vector de expresión o vectores de expresión que comprenden el ácido nucleico o ácidos nucleicos anteriores del cuarto aspecto.

En un sexto aspecto, la descripción proporciona una célula aislada que comprende el ácido nucleico o los ácidos nucleicos del cuarto aspecto o el vector de expresión o los vectores de expresión del quinto aspecto.

En un séptimo aspecto, la descripción proporciona una célula aislada que comprende un primer vector de expresión que comprende un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que comprende el dominio VH del anticuerpo de cualquiera de los aspectos primero a tercero enlazado operativamente a un promotor, y un segundo vector de expresión que comprende un segundo ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que comprende el dominio VL del anticuerpo de cualquiera de los aspectos primero a tercero enlazado operativamente a un promotor.

En un octavo aspecto, la descripción proporciona una célula aislada que produce el anticuerpo de cualquiera de los aspectos primero a tercero.

En un noveno aspecto, la descripción proporciona un método para preparar el anticuerpo de cualquiera de los aspectos primero a tercero, que comprende cultivar la

célula del sexto o séptimo aspecto, y aislar el anticuerpo.

En un décimo aspecto, la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de cualquiera de los aspectos primero a tercero, y un portador farmacéuticamente aceptable.

- 5 En un decimoprimer aspecto, la descripción proporciona un método para tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto humano una cantidad eficaz del anticuerpo de cualquiera de los aspectos primero a tercero.

10 En algunas modalidades del decimoprimer aspecto, el cáncer tiene una alta presencia de adenosina.

En algunas modalidades del decimoprimer aspecto, el cáncer es cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de ovario, vejiga, hígado o carcinoma de células renales.

15 En un decimosegundo aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo que se une a CD73 humano, en donde el anticuerpo comprende un dominio pesado variable (VH) que comprende la región determinante de complementariedad (CDR)1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH, en donde:

la CDR1 de VH comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSSYD (SEQ ID NO:34);

la CDR2 de VH comprende la secuencia de aminoácidos MSYDGSNK (SEQ ID NO:35)

20 o MSYEGSNK (SEQ ID NO:40); y

la CDR3 de VH comprende la secuencia de aminoácidos ATEIAAKGDY (SEQ ID NO:36); y

en donde el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL, en donde:

25 la CDR1 de VL comprende la secuencia de aminoácidos QGISNY (SEQ ID NO:37);

la CDR2 de VL comprende la secuencia de aminoácidos AAS (SEQ ID NO:38); y

la CDR3 de VL comprende la secuencia de aminoácidos QQSYSTPH (SEQ ID NO:39).

En algunas modalidades del decimosegundo aspecto,

la CDR1 de VH comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSSYD (SEQ ID NO:34);

30 la CDR2 de VH comprende la secuencia de aminoácidos MSYDGSNK (SEQ ID NO:35);

la CDR3 de VH comprende la secuencia de aminoácidos ATEIAAKGDY (SEQ ID NO:36);

la CDR1 de VL comprende la secuencia de aminoácidos QGISNY (SEQ ID NO:37);

la CDR2 de VL comprende la secuencia de aminoácidos AAS (SEQ ID NO:38); y

5 la CDR3 de VL comprende la secuencia de aminoácidos QQSYSTPH (SEQ ID NO:39).

En algunas modalidades, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:62. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada, y en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:30. En algunas modalidades, el dominio VL

10 comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:61. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena ligera, y en donde la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:31. En algunas modalidades, el dominio VH es al menos 80 % idéntico a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:62 y el dominio VL es al menos 80 % idéntica a la secuencia

15 de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:61. En algunas modalidades, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:62, y el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:61. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, y en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ

20 ID NO:30, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:31.

En algunas modalidades del decimosegundo aspecto,

la CDR1 de VH comprende la secuencia de aminoácidos GFTFSSYD (SEQ ID NO:34);

25 la CDR2 de VH comprende la secuencia de aminoácidos MSYEGSNK (SEQ ID NO:40);

la CDR3 de VH comprende la secuencia de aminoácidos ATEIAAKGDY (SEQ ID NO:36);

la CDR1 de VL comprende la secuencia de aminoácidos QGISNY (SEQ ID NO:37);

la CDR2 de VL comprende la secuencia de aminoácidos AAS (SEQ ID NO:38); y

30 la CDR3 de VL comprende la secuencia de aminoácidos QQSYSTPH (SEQ ID NO:39).

En algunas modalidades, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos

indicada en la SEQ ID NO:63. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada, y en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:33. En algunas modalidades, el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:61. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena ligera, y en donde la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:31. En algunas modalidades, el dominio VH es al menos 80 % idéntico a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:63 y el dominio VL es al menos 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:61. En algunas modalidades, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:63, y el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:61. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, y en donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:33, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:31.

En un decimotercer aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo que se une a CD73 humano, en donde el anticuerpo se une a CD73 humano en un epítipo dentro de los aminoácidos 386-399 y 470-489 de la SEQ ID NO:70.

En un decimocuarto aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo que se une a CD73 humano y compite por unirse a CD73 humano con un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:30 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:31.

En un decimoquinto aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo que se une a CD73 humano y compite por unirse a CD73 humano con un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:33 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:31.

En algunas modalidades de los aspectos decimosegundo a decimoquinto, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

En algunas modalidades de los aspectos decimosegundo a decimoquinto, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo de cadena simple, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab', un fragmento F_{sc}, un

fragmento Fv, un scFv, un sc(Fv)₂, o un diacuerpo.

En un decimosexto aspecto, la descripción proporciona un ácido nucleico o ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo de estos de cualquiera de los aspectos decimosegundo a decimoquinto.

- 5 En un decimoséptimo aspecto, la descripción proporciona un vector de expresión o vectores de expresión que comprenden el ácido nucleico o ácidos nucleicos del decimosexto aspecto enlazados operativamente a un promotor.

En un decimoctavo aspecto, la descripción proporciona una célula aislada que comprende el ácido nucleico o los ácidos nucleicos del decimosexto aspecto o el vector
10 de expresión o los vectores de expresión del decimoséptimo aspecto.

En un decimonoveno aspecto, la descripción proporciona una célula aislada que comprende un primer vector de expresión que comprende un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido que comprende el dominio VH del anticuerpo de cualquiera de los aspectos decimosegundo a decimoquinto enlazado operativamente
15 a un promotor, y un segundo vector de expresión que comprende un segundo ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido que comprende el dominio VL del anticuerpo de cualquiera de los aspectos decimosegundo a decimoquinto enlazado operativamente a un promotor.

- En un vigésimo aspecto, la descripción proporciona una célula aislada que produce el
20 anticuerpo de cualquiera de los aspectos decimosegundo a decimoquinto.

En un vigesimoprimer aspecto, la descripción proporciona un método para preparar el anticuerpo de cualquiera de los aspectos decimosegundo a decimoquinto, que comprende cultivar la célula del decimoctavo o decimonoveno aspecto, y aislar el anticuerpo.

- 25 En un vigesimosegundo aspecto, la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de cualquiera de los aspectos decimosegundo a decimoquinto, y un portador farmacéuticamente aceptable.

- En un vigesimotercer aspecto, la descripción proporciona un método para tratar un cáncer en un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto
30 humano una cantidad eficaz del anticuerpo de cualquiera de los aspectos decimosegundo a decimoquinto.

En algunas modalidades del vigesimotercer aspecto, el cáncer tiene una alta presencia de adenosina. En algunas modalidades del vigesimotercer aspecto, el cáncer es cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de ovario, vejiga, hígado o carcinoma de células renales.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **FIGURA 1A** muestra las secuencias de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada (VH) y el dominio variable de cadena ligera (VL) para los anticuerpos de CL25 humanizados CL_hu10-4, HzCL25, CL25_hu_10-6, y CL25_hu_11-4.

10 La **FIGURA 1B** muestra las secuencias de aminoácidos de VH y VL para los anticuerpos de CL25 humanizados CL25_hu_11-5, CL25_hu_11-6, CL25_hu_8-4, y CL25_hu_8-5.

La **FIGURA 1C** muestra las secuencias de aminoácidos de VH y VL para los anticuerpos de CL25 humanizados CL25_hu_8-6, CL25_hu_9-4, CL25_hu_9-5, y
15 CL25_hu_9-6.

La **FIGURA 1D** muestra una alineación del VH para anticuerpos de CL25 y CL25 humanizados. Las CDR de acuerdo con la definición de IMGT se encuentran subrayadas.

La **FIGURA 1E** muestra una alineación del VL para anticuerpos de CL25 y CL25 humanizados. Las CDR de acuerdo con la definición de IMGT se encuentran
20 subrayadas.

La **FIGURA 2A** es un gráfico que representa la unión celular (medida como la intensidad de fluorescencia media geométrica [GMFI]) para los anticuerpos indicados en las concentraciones indicadas en células MDA-MB-231.

25 La **FIGURA 2B** es un gráfico que representa la unión celular (medida como GMFI) CL25 o control de isotipo (iso ctrl) en las concentraciones indicadas en células A375.

La **FIGURA 3A** es un gráfico que representa la inhibición celular de CD73 en células A375 tratadas con los anticuerpos indicados o control de isotipo (iso ctrl) en las concentraciones indicadas.

30 La **FIGURA 3B** es un gráfico que representa la inhibición celular de CD73 en células MDA-MB-231 tratadas con los anticuerpos indicados o control de isotipo (iso ctrl) en

las concentraciones indicadas.

La **FIGURA 3C** es un gráfico que representa la inhibición celular de CD73 en células MDA-MB-231 tratadas con los anticuerpos indicados o control de isotipo (iso ctrl) en las concentraciones indicadas.

- 5 La **FIGURA 4** es un gráfico que representa la inhibición de CD73 recombinante tratado con los anticuerpos indicados o control de isotipo (iso ctrl) en las concentraciones indicadas.

- Las **FIGURAS 5A-5N** son, cada una, gráficos que representan en porcentaje de proliferación de linfocitos T CD4+ en células de donantes tratadas con el anticuerpo indicado o control de isotipo en varias concentraciones.

La **FIGURA 6** es un mapa de la estructura cristalina de CD73 humano (4H2F.pdb) con el epítipo del anticuerpo CL25 indicado en gris oscuro (con flechas).

- La **FIGURA 7** es un gráfico que representa los niveles de CD73 en la superficie después de 24 horas de incubación con el anticuerpo indicado o control de isotipo (iso ctrl), o sin tratamiento (NT), según se mide con un anticuerpo no competitivo conjugado directamente.

La **FIGURA 8** es un gráfico que representa el volumen tumoral promedio para los días indicados después de la inoculación tumoral para ratones administrados con control de isotipo (IgG control) o 1 mg/kg o 10 mg/kg de HzCL25.

- 20 La **FIGURA 9** es un gráfico que representa el porcentaje de inhibición de CD73 en tumores recolectados de ratones tratados mediante administración de control de isotipo (IgG control) o 1 mg/kg o 10 mg/kg de HzCL25.

- La **FIGURA 10A** es un gráfico que representa los niveles totales de CD73 en la superficie para suspensiones celulares individuales de células tumorales solo de ratones tratados con los anticuerpos indicados en las dosis indicadas, según lo determinado mediante la intensidad de fluorescencia media (MFI) del anticuerpo no competitivo.

- La **FIGURA 10B** es un gráfico que representa la ocupación de receptores para suspensiones celulares individuales de células tumorales solo de ratones tratados con los anticuerpos indicados en las dosis indicadas, según lo determinado mediante MFI del anticuerpo competitivo.

La **FIGURA 11A** es un gráfico que representa el volumen tumoral promedio para los días indicados después de inoculación con 10 mg/kg de control de isotipo (cx00376-001) o HzCL25. Los triángulos en el eje x indican los días de administración del fármaco.

- 5 La **FIGURA 11B** es un gráfico que representa el volumen tumoral individual hasta el día 33 para los ratones de la FIGURA 11A tratados con control de isotipo (izquierda) o HzCL25 (derecha).

La **FIGURA 12** son gráficos que representan la concentración de hCD73 soluble total y libre en sueros de ratones tratados con el anticuerpo indicado o el control de isotipo de IgG. Se detectó hCD73 soluble total con anticuerpo no competitivo (Anticuerpo X, parte inferior), y se detectó hCD73 soluble libre con anticuerpo competitivo (HzCL25, parte superior).

La **FIGURA 13A** es un gráfico que representa la unión celular (GMFI) para el anticuerpo 3-F03 en las concentraciones indicadas en células MDA-MB-231.

- 15 La **FIGURA 13B** es un gráfico que representa la unión celular (medida como GMFI) 3-F03 o control de isotipo (Iso ctrl) en las concentraciones indicadas en células A375.

La **FIGURA 14A** es un gráfico que representa la inhibición celular de CD73 en células A375 tratadas con 3-F03 o control de isotipo (Iso ctrl) en las concentraciones indicadas.

- La **FIGURA 14B** es un gráfico que representa la inhibición celular de CD73 en células MDA-MB-231 tratadas con 3-F03 o control de isotipo (Iso ctrl) en las concentraciones indicadas.

La **FIGURA 15** es un gráfico que representa la inhibición de CD73 recombinante tratado con 3-F03 o control de isotipo (Iso control) en las concentraciones indicadas.

- Las **FIGURAS 16A-16D** son, cada una, gráficos que representan en porcentaje de proliferación de linfocitos T CD4+ en células de donantes tratadas con el anticuerpo 3-F03 o control de isotipo en varias concentraciones.

La **FIGURA 17** es un mapa de la estructura cristalina de CD73 humano (4H2F.pdb) con el epítipo del anticuerpo 3-F03 indicado en gris oscuro (con flechas).

- La **FIGURA 18** es un gráfico que representa los niveles de CD73 en la superficie después de 24 horas de incubación con 3-F03 o control de isotipo (iso ctrl), o sin tratamiento (NT), según se mide con un anticuerpo no competitivo, CL43-Dy650,

conjugado directamente.

La **FIGURA 19A** es un gráfico que representa el volumen tumoral promedio para los días indicados después de inoculación con 10 mg/kg de control de isotipo (cx00376-001) o 3-F03. Los triángulos en el eje x indican los días de administración del fármaco.

- 5 La **FIGURA 19B** es un gráfico que representa el volumen tumoral individual hasta el día 33 para los ratones de la FIGURA 19 A tratados con control de isotipo (izquierda) o 3-F03 (derecha).

- La **FIGURA 20** son gráficos que representan la concentración de hCD73 soluble total y libre en sueros de ratones tratados con 3-F03 o control de isotipo de IgG. Se detectó hCD73 soluble total con anticuerpo no competitivo (Anticuerpo X, parte superior), y se
10 detectó hCD73 soluble libre con anticuerpo competitivo (3-F03, parte inferior).

La **FIGURA 21A-FIGURA 21J** muestran las secuencias de aminoácidos de VH y VL de 3-F03 y variantes de 3-F03 ilustrativas.

- La **FIGURA 22** es un gráfico que representa la unión celular (GMFI) para los anticuerpos indicados en las concentraciones indicadas en células MDA-MB-231.
15

La **FIGURA 23** es un gráfico que representa la inhibición celular de CD73 en células MDA-MB-231 tratadas con los anticuerpos indicados o control de isotipo en las concentraciones indicadas.

- La **FIGURA 24** muestra secuencias de aminoácidos ilustrativas de CH1-bisagra-CH2-CH3 de cadena pesada de IgG1 humana con una mutación N297A (SEQ ID NO:73), una CH1-bisagra-CH2-CH3 de cadena pesada de IgG1 humana con una mutación N297A con lisina en el extremo C (SEQ ID NO:75), y una región constante de cadena ligera kappa humana (SEQ ID NO:74).
20

- La **FIGURA 25A** muestra las secuencias de ADN que codifican la cadena pesada y la cadena ligera de HzCL25.
25

La **FIGURA 25B** muestra la secuencia de ADN que codifica la cadena pesada de 3-F03_411.

La **FIGURA 25C** muestra las secuencias de ADN que codifican la cadena ligera de 3-F03_411 y 3-F03_413 y la cadena pesada de 3-F03_413.

- 30 La **FIGURA 26** es un gráfico que representa la concentración de adenosina en tumores tratados con anticuerpo de control de isotipo, HzCL25, o 3-F03.

La **FIGURA 27** es un gráfico que representa la inhibición de adenosina en las concentraciones indicadas de anticuerpo HzCL25 (Ab) y AMP.

La **FIGURA 28** es un gráfico que representa la inhibición de adenosina en las concentraciones indicadas de anticuerpo 3-F03 (Ab) y AMP.

- 5 La **FIGURA 29** es un gráfico que representa la inhibición de adenosina en las concentraciones indicadas de anticuerpo HzCL25 (Ab) y AMP.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En la presente se proporcionan anticuerpos anti-CD73 y ácidos nucleicos, vectores de expresión, células y composiciones farmacéuticas relacionados. Los anticuerpos anti-CD73 descritos en la presente son útiles en el tratamiento o la prevención de trastornos tales como cáncer (por ejemplo, cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, melanoma, cáncer de ovario, vejiga, hígado o carcinoma de células renales).

15

CD73

CD73 (también conocido como «5'-nucleotidasa» y «ecto-5'-nucleotidasa») es una enzima dimérica (EC:3.1.3.5) que funciona como un homodímero unido mediante un enlace GPI a la cara externa de la membrana plasmática. CD73 puede suprimirse y es activo como proteína soluble en circulación. CD73 cataliza la conversión de AMP extracelular en adenosina. La actividad enzimática de CD73 requiere la unión del sustrato en la conformación abierta de CD73. Después de la unión del sustrato, CD73 experimenta un gran cambio conformacional de conformación abierta a cerrada para convertir AMP en adenosina (ver, por ejemplo, Knapp et ál., 2012, Structure, 20(12):2161-73). CD73 también funciona como una molécula de adhesión celular y tiene una función en la regulación del tráfico de leucocitos.

La actividad enzimática de CD73 cumple una función en la promoción y la metástasis del cáncer (véase, por ejemplo, Stagg y Smyth, 2010, Oncogene, 29:5346-5358; Salmi y Jalkanen, 2012, OncoImmunology, 1:247-248, 2012; Stagg, 2012, OncoImmunology, 1:217-218; Zhang, 2012, OncoImmunology, 167-70). La sobreexpresión de CD73 en las células cancerosas altera las respuestas inmunitarias antitumorales adaptativas, lo

30

que potencia mejorando el crecimiento tumoral y la metástasis (véase, por ejemplo, Niemelä et ál., 2004, J. Immunol., 172:1646-1653; Sadej et ál., 2006, Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 25:1119-1123; Braganhol et ál., 2007, Biochim. Biophys. Acta., 1770:1352-1359; Zhang, 2010, Cancer Res., 70:6407-6411; Zhang, 2012, Oncolmmunology, 1:67-70).

Una secuencia de aminoácidos ilustrativa de la proteína CD73 humana madura (aminoácidos 27-549 del n.º de acceso a GenBank NP_002517) es:

WELTILHTNDVHSRLEQTSSESSKCVNASRCMGGVARLFTKVQQIRRAEPNVLLLD
AGDQYQGTIWFTVYKGAEVAHFMNALRYDAMALGNHEFDNGVEGLIEPLLKEAKFPI
10 LSANIKAKGPLASQISGLYLPYKVLPGDEVVGIVGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEIT
ALQPEVDKLKTLNVNKKIILGHSGFEMDKLIAQKVRGVDVVVGHSNTFLYTGNPPS
KEVPAGKYPPFIVTSDDGRKVPVQAYAFGKYLGYLKIEFDERGNVISSHGNPILLNSS
IPEDPSIKADINKWRIKLDNYSTQELGKTIVYLDGSSQSCRFRECNMGNLICDAMINN
NLRHTDEMFWNHVSMCILNGGGIRSPIDERNNGTITWENLA AVL PFGGTFDLVQLKG
15 STLKKA FEHSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDL SRKPGDRVVKLDVLCTKCRVPSY
DPLKMDEVYKVILPNFLANGGDGFQMIKDELLRHDSGDQDINVVSTYISKMKVIYPAV
EGRIKFS (SEQ ID NO:70).

Una secuencia de aminoácidos ilustrativa de la proteína CD73 murina madura (aminoácidos 29-551 del n.º de acceso a GenBank NP_035981) es:

WELTILHTNDVHSRLEQTSDDSTKCLNASLCVGGVARLFTKVQQIRKEEPNVFLFLDA
GDQYQGTIWFTVYKGLEVAHFMNILGYDAMALGNHEFDNGVEGLIDPLLNRNVKFPIL
SANIKARGPLAHQISGLFLPSKVL SVGGEVVGIVGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEIS
ALQPEVDKLKTLNVNKKIILGHSGFEMDKLIAQKVRGVDIVVGHSNTFLYTGNPPSK
25 EVPAGKYPPFIVTADDGRQVPVQAYAFGKYLGYLKVEFDDKGNVITSYGNPILLNSSI
PEDATIKADINQWRIKLDNYSTQELGRTIVYLDGSTQTCRFRECNMGNLICDAMINNN
LRHPDEMFWNHVSMCIVNGGGIRSPIDEKNNGTITWENLA AVL PFGGTFDLVQLKG
STLKKA FEHSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDINRKPNRVRVQLEVLCTKCRVPIYE
PLEMDKVYKVTLP SYLANGGDGFQMIKDELLKHDSGDQDISVVSEYISKMKVVYPAV
30 EGRIKFS (SEQ ID NO:71).

Una secuencia de aminoácidos ilustrativa de la proteína CD73 de cynomolgus madura es:

WELTILHTNDVHSRLEQTSSEDSSKCVNASRCMGGVARLFTKVQQIRRAEPNVLLLD
 AGDQYQGTIWFTVYKGAEVAHFMNALRYDAMALGNHEFDNGVEGLIEPLLKEAKFPI
 5 LSAKAKGPLASQISGLYLPYKVLPVGDEVVGIVGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEIT
 ALQPEVDKLKTLNVNKKIALGHSGFETDKLIAQKVRGVDDVVGGHSNTFLYTGNPPSK
 EVPAGKYPFIVTSDDGRKVPVQAYAFGKYLGYLKIEFDERGNVISSHGNPILLNSSI
 PEDPSIKADINKWRIKLDNYSTQELGKTIVYLDGSSQSCRFRECNMGNLICDAMINNN
 LRHADEMFWNHVSMCILNGGGIRSPIDERNNGTITWENLAAVLPPGGTDFDLVQLKG
 10 STLKKA FEHSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDL SRKPGDRVVKLDVLCTKCRVPSY
 DPLKMDEIYKVILPNFLANGGDGFQMIKDELLRHDSGDQDINVVSTYISKMKVIYPAV
 EGRIKFS (SEQ ID NO:72).

Anticuerpos anti-CD73

15 Esta descripción proporciona anticuerpos anti-CD73 que son útiles en el tratamiento del cáncer. Estos anticuerpos pueden unirse a CD73 humano.

En algunos casos, estos anticuerpos se unen a CD73 humano y CD73 de cynomolgus.

En algunos casos, estos anticuerpos se unen a CD73 humano y CD73 de cynomolgus y no se unen a CD73 murino. Dichos anticuerpos anti-CD73 incluyen las secuencias
 20 de un anticuerpo monoclonal anti-CD73, CL25, y una versión humanizada de este, HzCL25, cuya versión humanizada de este se une con afinidad alta a CD73 humano y de cynomolgus (por ejemplo, menos de aproximadamente 0,5 nM en las conformaciones abiertas para CD73 humano y de cynomolgus), y tiene unión indetectable a CD73 de ratón.

25 En algunos casos, estos anticuerpos se unen a CD73 humano, CD73 de cynomolgus y CD73 murino. Dichos anticuerpos anti-CD73 incluyen las secuencias de un anticuerpo monoclonal anti-CD73 humano, 3-F03, que se une con afinidad alta a la conformación abierta de cada uno de CD73 humano, de cynomolgus y murino (por ejemplo, aproximadamente 0,37 nM para CD73 humano, aproximadamente 0,734 nM
 30 para CD73 de cynomolgus, y aproximadamente 1,66 nM para CD73 murino). Dichos anticuerpos anti-CD73 tienen unión indetectable a la conformación cerrada de cada

uno de CD73 humano, de cynomolgus y murino, en presencia de un exceso de un ligando de CD73 no escindible, APCP.

Anticuerpo HzCL25

- 5 El anticuerpo HzCL25 es un anticuerpo monoclonal de IgG1/kappa humanizado con alanina en la posición de Asparagina-297 (N297, de acuerdo con la numeración de EU) de la región constante de cadena pesada para reducir la función efectora. Se une específicamente a CD73 humano y de cynomolgus con afinidad alta ($K_D \leq 0,5$ nM) y tiene una funcionalidad efectora baja.
- 10 HzCL25 se construyó a partir de una versión quimérica del anticuerpo CL25. El dominio variable de cadena pesada (VH) y el dominio variable de cadena ligera (VL) murino de CL25 se obtuvieron de un ratón inmunizado con CD73 humano recombinante (SEQ ID NO:70) que comprende una etiqueta HIS. Se determinaron las secuencias de anticuerpos de los linfocitos B y el dominio variable de cadena pesada (VH) (SEQ ID
- 15 NO: 26) y el dominio variable de la cadena ligera (VL) murino (SEQ ID NO: 27) se expresaron como quimeras con Fc de IgG1 humana (región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:73 y región constante de cadena ligera kappa que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:74). La Tabla 1, a continuación, muestra las secuencias de aminoácidos
- 20 de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de CL25 de acuerdo con la numeración IMGT, Chothia, AbM, Kabat y Contact. La Tabla 1, a continuación, también muestra las secuencias de aminoácidos de VH y VL maduras de CL25.

Tabla 1. CDR, VH y VL de CL25

	IMGT	Chothia	AbM	Kabat	Contact
CDR 1 de VH	GYTFTSYG (SEQ ID NO:1)	GYTFTSY (SEQ ID NO:7)	GYTFTSYGL S (SEQ ID NO:12)	SYGLS (SEQ ID NO:14)	TSYGLS (SEQ ID NO:16)
CDR	IYPGSGNT	YPGSGN	EIYPGSGNT	EIYPGSGNT	WIGEIYPG

2 de VH	(SEQ ID NO:2)	(SEQ ID NO:8)	Y (SEQ ID NO:13)	YYNEKFKG (SEQ ID NO:15)	SGNTY (SEQ ID NO:28)
CDR 3 de VH	ARYDYLGSS YGFDY (SEQ ID NO:3)	YDYLGSSY GFDY (SEQ ID NO:9)	YDYLGSSY GFDY (SEQ ID NO:9)	YDYLGSSY GFDY (SEQ ID NO:9)	ARYDYLGSS SYGFD (SEQ ID NO:18)
CDR 1 de VL	QDVSTA (SEQ ID NO:4)	KASQDVSTA VA (SEQ ID NO:10)	KASQDVSTA VA (SEQ ID NO:10)	KASQDVSTA VA (SEQ ID NO:10)	STAVAWY (SEQ ID NO:19)
CDR 2 de VL	SAS (SEQ ID NO:5)	SASYRYN (SEQ ID NO:29)	SASYRYN (SEQ ID NO:29)	SASYRYN (SEQ ID NO:29)	LLIYSASYR Y (SEQ ID NO:20)
CDR 3 de VL	QQHYNTPY T (SEQ ID NO:6)	QQHYNTPY T (SEQ ID NO:6)	QQHYNTPY T (SEQ ID NO:6)	QQHYNTPY T (SEQ ID NO:6)	QQHYNTP Y (SEQ ID NO:21)
VH	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCRASGYTFTSYGLSWVKQRTGQGLEWIG EIYPGSGNTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARY DYLGSYGFYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO:26)				
VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYS ASYRYNGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYNTPYTFG GGTKLEIK (SEQ ID NO:27)				

Para construir HzCL25, se alinearon las secuencias de VH y VL de CL25 con una base de datos de genes de VH y VK humanos. Las CDR (Tabla 1) del anticuerpo CL25 murino se injertaron en genes de VH y VK humanos.

5 La Tabla 2, a continuación, muestra las secuencias de aminoácidos de CDR de

HzCL25 de acuerdo con la numeración IMGT, Chothia, AbM, Kabat y Contact. La Tabla 2, a continuación, también muestra las secuencias de aminoácidos de VH, VL, cadena pesada y cadena ligera maduras de HzCL25.

5 **Tabla 2. Secuencias de aminoácidos de CDR, VH, VL, cadena pesada y cadena ligera de HzCL25**

	IMGT	Chothia	AbM	Kabat	Contact
CDR 1 de VH	GYTFTSYG (SEQ ID NO:1)	GYTFTSY (SEQ ID NO:7)	GYTFTSYGL S (SEQ ID NO:12)	SYGLS (SEQ ID NO:14)	TSYGLS (SEQ ID NO:16)
CDR 2 de VH	IYPGSGNT (SEQ ID NO:2)	YPGSGN (SEQ ID NO:8)	EIYPGSGNT Y (SEQ ID NO:13)	EIYPGSGNT YYNEKFKG (SEQ ID NO:15)	WMGEIYP GSGNTY (SEQ ID NO:17)
CDR 3 de VH	ARYDYLGS YGFYD (SEQ ID NO:3)	YDYLGS YGFYD (SEQ ID NO:9)	YDYLGS YGFYD (SEQ ID NO:9)	YDYLGS YGFYD (SEQ ID NO:9)	ARYDYLGS SYGFD (SEQ ID NO:18)
CDR 1 de VL	QDVSTA (SEQ ID NO:4)	KASQDVSTA VA (SEQ ID NO:10)	KASQDVSTA VA (SEQ ID NO:10)	KASQDVSTA VA (SEQ ID NO:10)	STAVAWY (SEQ ID NO:19)
CDR 2 de VL	SAS (SEQ ID NO:5)	SASYRYS (SEQ ID NO:11)	SASYRYS (SEQ ID NO:11)	SASYRYS (SEQ ID NO:11)	LLIYSASYR Y (SEQ ID NO:20)
CDR 3 de VL	QQHYNTPY T (SEQ ID NO:6)	QQHYNTPY T (SEQ ID NO:10)	QQHYNTPY T (SEQ ID NO:10)	QQHYNTPY T (SEQ ID NO:10)	QQHYNTPY Y (SEQ ID NO:19)

	NO:6)	NO:6)	NO:6)	NO:6)	NO:21)
VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFTSYGLSWVRQMPGKGLEWM GEIYPGSGNTYYNEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYPYCAR YDYLGSSYGFDYWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO:22)				
VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYS ASYRYSQVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYNTPYTFGG GTKLEIK (SEQ ID NO:23)				
Cadena pesada	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFTSYGLSWVRQMPGKGLEWM GEIYPGSGNTYYNEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYPYCAR YDYLGSSYGFDYWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSDDL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNHYTQKSL SLSPG (SEQ ID NO:24)				
Cadenaliger	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYS ASYRYSQVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYNTPYTFGG GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:25)				

Los anticuerpos anti-CD73 pueden abarcar CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH, y CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL de HzCL25 o CL25. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH de HzCL25 (véase la Tabla 2). En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VL que comprende CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL de HzCL25 (véase la Tabla 2). En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH de HzCL25 (véase la

Tabla 2), y un VL que comprende CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL de HzCL25 (véase la Tabla 2). En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH de CL25 (véase la Tabla 1). En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VL que comprende CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL de CL25 (véase la Tabla 1). En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH de CL25 (véase la Tabla 1), y un VL que comprende CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL de CL25 (véase la Tabla 1). En algunos casos, los anticuerpos anti-CD73 pueden tener, por ejemplo, 1, 2 o 3 sustituciones dentro de una o más (es decir, 1, 2, 3, 4, 5 o 6) de las seis CDR de HzCL25 o CL25. En algunos casos, los anticuerpos (i) inhiben el CD73 celular (por ejemplo, al menos 10 %; al menos 20 %; al menos 30 %; al menos 40 %; al menos 50 %; al menos 60 %; al menos 70 %; al menos 80 %; al menos 90 %; al menos 95 %; al menos 97 %; al menos 99 %, o 100 % de reducción de la actividad de CD73 celular en comparación con un control de isotipo, según se determina, por ejemplo, mediante el ensayo que se describe en el Ejemplo 3); y/o (ii) inhiben el CD73 soluble (por ejemplo, al menos 10 %; al menos 20 %; al menos 30 %; al menos 40 %; al menos 50 %; al menos 60 %; al menos 70 %; al menos 80 %; al menos 90 %; al menos 95 %; al menos 97 %; al menos 99 %, o 100 % de reducción en la actividad de CD73 soluble en comparación con un control de isotipo, según se determina, por ejemplo, mediante el ensayo que se describe en el Ejemplo 4); y/o (iii) se unen a CD73 humano o de mono cynomolgus en la conformación abierta con afinidad alta (por ejemplo, $K_D \leq 0,5$ nM), pero no se unen significativamente a CD73 en la conformación abierta de ratones (por ejemplo, según se determina mediante el ensayo de unión que se describe en el Ejemplo 6); y/o (iv) se unen a CD73 humano o de mono cynomolgus en la conformación cerrada con afinidad alta (por ejemplo, $K_D \leq 0,5$ nM), pero no se unen significativamente a CD73 en la conformación cerrada de ratones; y/o (v) se unen a un epítipo dentro de los aminoácidos 40-53 de la SEQ ID NO:70 (es decir, dentro de TKVQQIRRAEPNVL (SEQ ID NO:76)) (por ejemplo, según se determina mediante el ensayo de unión que se describe en el Ejemplo 6); y/o (vi) reducen la supresión mediada por AMP de la proliferación de linfocitos T (por ejemplo, al menos 10 %; al menos 20 %; al menos 30 %; al menos

40 %; al menos 50 %; al menos 60 %; al menos 70 %; al menos 80 %; al menos 90 %; al menos 95 %; al menos 97 %; al menos 99 %, o 100 % de reducción en la proliferación de linfocitos T en comparación con un control de isotipo, según se determina, por ejemplo, mediante el ensayo que se describe en el Ejemplo 5); y/o (vii) disminuyen los niveles de CD73 en la superficie celular (por ejemplo, en células cancerosas, por ejemplo, células cancerosas de melanoma, por ejemplo, en al menos 10 %; al menos 20 %; al menos 30 %; al menos 40 %; al menos 50 %; al menos 60 %; al menos 70 %; al menos 80 %; al menos 90 %; al menos 95 %; al menos 97 %; al menos 99 %, o 100 % en comparación con un control de isotipo, según se determina, por ejemplo, mediante el ensayo que se describe en el Ejemplo 8); y/o (viii) reducen el crecimiento tumoral (por ejemplo, tumores de melanoma, por ejemplo, en al menos 10 %; al menos 20 %; al menos 30 %; al menos 40 %; al menos 50 %; al menos 60 %; al menos 70 %; al menos 80 %; al menos 90 %; al menos 95 %; al menos 97 %; al menos 99 %, o 100 % en comparación con un control de isotipo, según se determina, por ejemplo, mediante el ensayo que se describe en el Ejemplo 9); y/o (ix) reducen el CD73 libre en la superficie en las células (por ejemplo, en células cancerosas, por ejemplo, células cancerosas de melanoma, por ejemplo, en al menos 10 %; al menos 20 %; al menos 30 %; al menos 40 %; al menos 50 %; al menos 60 %; al menos 70 %; al menos 80 %; al menos 90 %; al menos 95 %; al menos 97 %; al menos 99 %, o 100 % en comparación con un control de isotipo, según se determina, por ejemplo, mediante el ensayo que se describe en el Ejemplo 11).

Los anticuerpos anti-CD73 pueden comprender CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH de H₂CL25 o CL25 de acuerdo con la definición de IMGT, o una definición de CDR alternativa tal como, de modo no taxativo, la definición de Kabat, la definición de Chothia, la definición de CDR de AbM, o la definición de Contact. Estos anticuerpos anti-CD73 pueden incluir cero, una, dos o tres sustituciones en CDR1 de VH y/o CDR2 de VH y/o CDR3 de VH de H₂CL25 o CL25. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden, además, CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL de H₂CL25 o CL25 de acuerdo con la definición de IMGT, o una definición de CDR alternativa tal como, de modo no taxativo, la definición de Kabat, la definición de Chothia, la definición de CDR de AbM, o la definición de Contact. Estos anticuerpos anti-CD73 pueden incluir

cero, una, dos o tres sustituciones en CDR1 de VL y/o CDR2 de VL y/o CDR3 de VL de HzCL25 o CL25. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH indicadas en las SEQ ID NO: 1, 2, y 3, respectivamente, y un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL indicadas en las SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH indicadas en las SEQ ID NO: 7, 8, y 9, respectivamente, y un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL indicadas en las SEQ ID NO: 10, 11 y 6, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH indicadas en las SEQ ID NO: 12, 13, y 9, respectivamente, y un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL indicadas en las SEQ ID NO: 10, 11 y 6, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH indicadas en las SEQ ID NO: 14, 15, y 9, respectivamente, y un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL indicadas en las SEQ ID NO: 10, 11 y 6, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH indicadas en las SEQ ID NO: 16, 17, y 18, respectivamente, y un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL indicadas en las SEQ ID NO: 19, 20 y 21, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH indicadas en las SEQ ID NO: 7, 8, y 9, respectivamente, y un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL indicadas en las SEQ ID NO: 10, 29 y 6, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH indicadas en las SEQ ID NO: 12, 13, y 9, respectivamente, y un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL indicadas en las SEQ ID NO: 10, 29 y 6, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH indicadas en las SEQ ID NO: 14, 15, y 9, respectivamente, y un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL indicadas en las SEQ ID NO: 10, 29 y 6, respectivamente. En algunos casos, el

anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH indicadas en las SEQ ID NO: 16, 28, y 18, respectivamente, y un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL indicadas en las SEQ ID NO: 19, 20 y 21, respectivamente. En algunos casos, estos anticuerpos (i) inhiben el

5 CD73 celular (por ejemplo, al menos 10 %; al menos 20 %; al menos 30 %; al menos 40 %; al menos 50 %; al menos 60 %; al menos 70 %; al menos 80 %; al menos 90 %; al menos 95 %; al menos 97 %; al menos 99 %, o 100 % de reducción de la actividad de CD73 celular en comparación con un control de isotipo, según se determina, por ejemplo, mediante el ensayo que se describe en el Ejemplo 3); y/o (ii) inhiben el CD73

10 soluble (por ejemplo, al menos 10 %; al menos 20 %; al menos 30 %; al menos 40 %; al menos 50 %; al menos 60 %; al menos 70 %; al menos 80 %; al menos 90 %; al menos 95 %; al menos 97 %; al menos 99 %, o 100 % de reducción en la actividad de CD73 soluble en comparación con un control de isotipo, según se determina, por ejemplo, mediante el ensayo que se describe en el Ejemplo 4); y/o (iii) se unen a CD73

15 humano o de mono cynomolgus en la conformación abierta con afinidad alta (por ejemplo, $K_D \leq 0,5$ nM), pero no se unen significativamente a CD73 en la conformación abierta de ratones (por ejemplo, según se determina mediante el ensayo de unión que se describe en el Ejemplo 6); y/o (iv) se unen a CD73 humano o de mono cynomolgus en la conformación cerrada con afinidad alta (por ejemplo, $K_D \leq 0,5$ nM), pero no se

20 unen significativamente a CD73 en la conformación cerrada de ratones; y/o (v) se unen a un epítipo dentro de los aminoácidos 40-53 de la SEQ ID NO:70 (es decir, dentro de TKVQQIRRAEPNVL (SEQ ID NO:76)) (por ejemplo, según se determina mediante el ensayo de unión que se describe en el Ejemplo 6); y/o (vi) reducen la supresión mediada por AMP de la proliferación de linfocitos T (por ejemplo, al menos 10 %; al

25 menos 20 %; al menos 30 %; al menos 40 %; al menos 50 %; al menos 60 %; al menos 70 %; al menos 80 %; al menos 90 %; al menos 95 %; al menos 97 %; al menos 99 %, o 100 % de reducción en la proliferación de linfocitos T en comparación con un control de isotipo, según se determina, por ejemplo, mediante el ensayo que se describe en el Ejemplo 5); y/o (vii) disminuyen los niveles de CD73 en la superficie celular (por

30 ejemplo, en células cancerosas, por ejemplo, células cancerosas de melanoma, por ejemplo, en al menos 10 %; al menos 20 %; al menos 30 %; al menos 40 %; al menos

50 %; al menos 60 %; al menos 70 %; al menos 80 %; al menos 90 %; al menos 95 %; al menos 97 %; al menos 99 %, o 100 % en comparación con un control de isotipo, según se determina, por ejemplo, mediante el ensayo que se describe en el Ejemplo 8); y/o (viii) reducen el crecimiento tumoral (por ejemplo, tumores de melanoma, por ejemplo, en al menos 10 %; al menos 20 %; al menos 30 %; al menos 40 %; al menos 50 %; al menos 60 %; al menos 70 %; al menos 80 %; al menos 90 %; al menos 95 %; al menos 97 %; al menos 99 %, o 100 % en comparación con un control de isotipo, según se determina, por ejemplo, mediante el ensayo que se describe en el Ejemplo 9); y/o (ix) reducen el CD73 libre en la superficie en las células (por ejemplo, en células cancerosas, por ejemplo, células cancerosas de melanoma, por ejemplo, en al menos 10 %; al menos 20 %; al menos 30 %; al menos 40 %; al menos 50 %; al menos 60 %; al menos 70 %; al menos 80 %; al menos 90 %; al menos 95 %; al menos 97 %; al menos 99 %, o 100 % en comparación con un control de isotipo, según se determina, por ejemplo, mediante el ensayo que se describe en el Ejemplo 11).

En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 22, 26 y 82-84. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de HzCL25 (véase la Tabla 1, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 1-3, respectivamente), en donde el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO:22, 26, y 82-84. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:24. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una cadena pesada que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de HzCL25 (véase la Tabla 1, por ejemplo, de

acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 1-3, respectivamente), en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la

5 secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:24. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO:23, 27, 80, y 81. En determinadas

10 modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL de HzCL25 (véase la Tabla 1, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 4-6, respectivamente), en donde el VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10)

15 sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO:23, 27, 80, y 81. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos

20 indicada en la SEQ ID NO:25. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una cadena ligera que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL de HzCL25 (véase la Tabla 1, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 4-6, respectivamente), en donde la cadena ligera comprende una secuencia de

25 aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:25. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden: (i) una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o

30 eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO:22, 26, y 82-84; y (ii) una secuencia de aminoácidos

que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO:23, 27, 80, y 81. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden: (i) un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de HzCL25 (véase la Tabla 1, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 1-3, respectivamente), en donde el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO:22, 26, y 82-84; y (ii) un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL de HzCL25 (véase la Tabla 1, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 4-6, respectivamente), en donde el VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO:23, 27, 80, y 81. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden: (i) una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:24; y (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:25. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden: (i) una cadena pesada que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de HzCL25 (véase la Tabla 1, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 1-3, respectivamente), en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:24; y (ii) una cadena ligera que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL de HzCL25 (véase la Tabla

1, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 4-6, respectivamente), en donde la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:25.

En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VH indicado en cualquiera de las SEQ ID NO: 22, 26, y 82-84. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de HzCL25 (véase la Tabla 1, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 1-3, respectivamente), en donde el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VH indicado en cualquiera de las SEQ ID NO: 22, 26, y 82-84. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VL indicado en cualquiera de las SEQ ID NO: 23, 27, 80, y 81. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL de HzCL25 (véase la Tabla 1, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 4-6, respectivamente), en donde el VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VL indicado en cualquiera de las SEQ ID NO: 23, 27, 80, y 81.

al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VL indicado en cualquiera de las SEQ ID NO: 23, 27, 80, y 81. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VH indicado en cualquiera de las SEQ ID NO: 22, 26, y 82-84, y una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VL indicado en cualquiera de las SEQ ID NO: 23, 27, 80, y 81. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden: (i) un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de HzCL25 (véase la Tabla 1, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 1-3, respectivamente), en donde el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VH indicado en cualquiera de las SEQ ID NO: 22, 26, y 82-84, y (ii) un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL de HzCL25 (véase la Tabla 1, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 4-6, respectivamente), en donde el VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VL indicado en cualquiera de las SEQ ID NO: 23, 27, 80, y 81.

En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una secuencia

de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VH de HzCL25 (es decir, la

5 secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:22). En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de HzCL25 (véase la Tabla 1, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 1-3, respectivamente), en donde el VH comprende una secuencia

10 de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VH de HzCL25 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:22). En determinadas

15 modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden un VH que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:22. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al

20 menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con la cadena pesada de HzCL25 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:24). En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una cadena pesada que comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de HzCL25 (véase la Tabla 1, por ejemplo, de

25 acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 1-3, respectivamente), en donde el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al

30 menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VH de HzCL25 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:22), en donde la cadena pesada

comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con la

5 cadena pesada de HzCL25 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:24). En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:24. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al

10 menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VL de HzCL25 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:23). En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden un VL que comprende la CDR1

15 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL de HzCL25 (véase la Tabla 1, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 4-6, respectivamente), en donde el VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al

20 menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VL de HzCL25 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:23). En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden un VL que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:23. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con la cadena ligera de HzCL25 (es decir, la secuencia de aminoácidos

25 indicada en la SEQ ID NO:25). En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una cadena ligera que comprende un VL que comprende la CDR1 de VL,

30

CDR2 de VL, y CDR3 de VL de HzCL25 (véase la Tabla 1, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 4-6, respectivamente), en donde el VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VL de HzCL25 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:23), en donde la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con la cadena ligera de HzCL25 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:25). En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:25. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden: (i) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VH de HzCL25 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:22); y (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VL de HzCL25 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:23). En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden: (i) un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de HzCL25 (véase la Tabla 1, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 1-3, respectivamente), en donde el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VL de HzCL25 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:23).

al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VH de HzCL25 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:22) y (ii) un VL que

5 comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL de HzCL25 (véase la Tabla 1, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 4-6, respectivamente), en donde el VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al

10 menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VL de HzCL25 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:23). En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden: un VH que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:22, y (ii) un VL

15 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:23. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden: (i) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos

20 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con la cadena pesada de HzCL25 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:24); y (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al

25 menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con la cadena ligera de HzCL25 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:25). En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden: (i) una cadena pesada que comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de HzCL25 (véase la Tabla 1, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir,

30 las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 1-3, respectivamente), en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al

menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con la cadena pesada de HzCL25 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:24) y (ii) una cadena ligera que comprende un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL de HzCL25 (véase la Tabla 1, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 4-6, respectivamente), en donde la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con la cadena ligera de HzCL25 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:25). En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden: (i) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:24, y (ii) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:25.

El epítipo de unión a CD73 de HzCL25 está dentro de la secuencia de aminoácidos TKVQQIRRAEPNVL (SEQ ID NO:76) (es decir, los aminoácidos 40-53 de la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:70). Esta descripción presenta anticuerpos que se unen a CD73 dentro de la secuencia TKVQQIRRAEPNVL (SEQ ID NO:76). Esta descripción presenta anticuerpos que se unen al mismo epítipo que HzCL25. Esta descripción también presenta anticuerpos que inhiben de forma competitiva la unión de HzCL25 a CD73 humano.

En algunas modalidades, el VH de HzCL25 se enlaza a una región constante de cadena pesada que comprende un dominio CH1 y una región bisagra. En algunas modalidades, el VH de HzCL25 se enlaza a una región constante de cadena pesada que comprende un dominio CH3. En algunas modalidades, el dominio CH3 carece del residuo de aminoácidos de lisina (K) en el extremo C. En algunas modalidades, el dominio CH3 contiene el residuo de aminoácidos de lisina (K) en el extremo C. En determinadas modalidades, el VH de HzCL25 se enlaza a una región constante de

cadena pesada que comprende un dominio CH1, una región bisagra, un dominio CH2, y un dominio CH3 de IgG1 humana. En algunas modalidades, el dominio CH3 de IgG1 humana carece del residuo de aminoácidos de lisina (K) en el extremo C. En algunas modalidades, el dominio CH3 de IgG1 humana contiene el residuo de aminoácidos de lisina (K) en el extremo C. En determinadas modalidades, dicho anticuerpo contiene una o más mutaciones adicionales en la región constante de cadena pesada que aumentan la estabilidad del anticuerpo. En determinadas modalidades, la región constante de cadena pesada incluye sustituciones que modifican las propiedades del anticuerpo (por ejemplo, disminuyen la unión al receptor Fc, aumentan o disminuyen la glicosilación del anticuerpo, disminuyen la unión a C1q). En determinadas modalidades, la región constante de cadena pesada incluye una alanina en la posición de Asparagina-297 (N297, de acuerdo con la numeración de EU) de la región constante de cadena pesada para reducir la función efectora.

En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo de IgG. En una modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1. En una modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo IgG4. En otra modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo IgG2. En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-CD73 comprende una región constante de cadena pesada que carece de uno o más residuos de aminoácidos de lisina (K) con respecto a una región constante de cadena pesada de tipo salvaje. Por ejemplo, en determinadas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que carece del residuo de aminoácido de lisina (K) en el extremo C del dominio CH3 de la región constante de cadena pesada. En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-CD73 comprende una región constante de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:73. En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-CD73 comprende una región constante de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:75. En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-CD73 comprende una región constante de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:74. En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-CD73 comprende una región constante de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:73 y una región constante de cadena ligera que tiene la secuencia de

aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:74. En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-CD73 comprende una región constante de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:75 y una región constante de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:74.

5

Anticuerpo 3-F03

El anticuerpo 3-F03 es un anticuerpo monoclonal IgG1 humano/kappa con alanina en la posición de Asparagina-297 (N297, de acuerdo con la numeración de EU) de la región constante de cadena pesada para reducir la función efectora. 3-F03 se une específicamente a CD73 humano, de cynomolgus, y murino con afinidad alta ($K_D \leq 2$ nM) y tiene una funcionalidad efectora baja.

El 3-F03 se modificó genéticamente a partir de secuencias obtenidas mediante múltiples rondas de selección de una biblioteca de donantes individuales. Los casetes de scFv de este grupo se recombinaron luego en una biblioteca de vectores de presentación en levaduras, que se sometió a selección de FAC con CD73 murino (SEQ ID NO:71). Las secuencias de aminoácidos del casete de scFv de 3-F03 en levaduras se indican en las SEQ ID NO:77 y 65, respectivamente:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYD
GSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQG
20 TLVTVSS (SEQ ID NO:77); y
AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ ID
NO:65).

Para construir el anticuerpo 3-F03, los VH y VL de 3-F03 en levaduras se modificaron de la siguiente manera y se clonaron en un andamiaje de IgG1 humana/kappa. Para el VH, se eliminó el glutamato del extremo N (E) del VH de 3-F03 en levaduras (SEQ ID NO:77) y se sustituyó la treonina (T) en la posición H77 de Kabat de la SEQ ID NO:77 (es decir, la posición 78 de la SEQ ID NO:77) con una alanina (A). Para el VL, se eliminó la alanina del extremo N (A) de SEQ ID NO:65. El anticuerpo 3-F03 humano de longitud completa resultante contiene el VH y el VL indicados en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:60 y 61, respectivamente. El anticuerpo 3-F03 humano

30

de longitud completa resultante se denomina en la presente «3-F03». La Tabla 3, a continuación, muestra las secuencias de aminoácidos de CDR de 3-F03 de acuerdo con la numeración IMGT, Chothia, AbM, Kabat y Contact. La Tabla 3, a continuación, también muestra las secuencias de aminoácidos de VH, VL, cadena pesada y cadena ligera maduras de 3-F03.

Tabla 3. secuencias de aminoácidos de CDR, VH y VL de 3-F03

	IMGT	Chothia	AbM	Kabat	Contact
CDR 1 de VH	GFTFSSYD (SEQ ID NO:34)	GFTFSSY (SEQ ID NO:41)	GFTFSSYD MH (SEQ ID NO:46)	SYDMH (SEQ ID NO:49)	SSYDMH (SEQ ID NO:53)
CDR 2 de VH	MSYDGSNK (SEQ ID NO:35)	SYDGSN (SEQ ID NO:42)	VMSYDGSN KY (SEQ ID NO:47)	VMSYDGSN KYYADSVK G (SEQ ID NO:50)	WVAVMSY DGSNKY (SEQ ID NO:54)
CDR 3 de VH	ATEIAAKGD Y (SEQ ID NO:36)	EIAAKGDY (SEQ ID NO:52)	EIAAKGDY (SEQ ID NO:52)	EIAAKGDY (SEQ ID NO:52)	ATEIAAKG D (SEQ ID NO:56)
CDR 1 de VL	QGISNY (SEQ ID NO:37)	RASQGISNY LA (SEQ ID NO:44)	RASQGISNY LA (SEQ ID NO:44)	RASQGISNY LA (SEQ ID NO:44)	SNYLAWY (SEQ ID NO:57)
CDR 2 de VL	AAS (SEQ ID NO:38)	AASTLQS (SEQ ID NO:45)	AASTLQS (SEQ ID NO:45)	AASTLQS (SEQ ID NO:45)	LLIYAAS TLQ (SEQ ID NO:58)
CDR 3 de VL	QQSYSTPH (SEQ ID NO:39)	QQSYSTPH (SEQ ID NO:39)	QQSYSTPH (SEQ ID NO:39)	QQSYSTPH (SEQ ID NO:39)	QQSYSTP (SEQ ID NO:59)
VH	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVA VMSYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALY LQMNSLRAEDTAVYYCATE IAAKGDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:60)				

	IMGT	Chothia	AbM	Kabat	Contact
VL	IQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTR LEIK (SEQ ID NO:61)				
HC	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVA VMSYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALY LQMNSLRAEDTAVYYCATE IAAKGDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:66)				
LC	IQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTR LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC (SEQ ID NO:31)				

En la presente también se describen variantes de 3-F03. 3-F03_411 es idéntico a 3-F03, excepto que la cadena pesada de 3-F03_411 (i) contiene un glutamato (E) en el extremo N que no está presente en 3-F03 y (ii) no incluye la lisina en el extremo C presente en 3-F03. La Tabla 4, a continuación, muestra las secuencias de aminoácidos de VH, VL, cadena pesada y cadena ligera maduras de 3-F03_411. 3-F03_413 es idéntico a 3-F03_411, excepto que contiene un glutamato (E) en la posición H53 del VH según Kabat (posición 54 de la SEQ ID NO:60) en lugar de un ácido aspártico (D). La Tabla 5, a continuación, muestra las secuencias de aminoácidos de CDR de 3-F03_413 de acuerdo con la numeración IMGT, Chothia, AbM, Kabat y Contact. La Tabla 5, a continuación, también muestra las secuencias de aminoácidos de VH, VL,

cadena pesada y cadena ligera maduras de 3-F03_413. Se describen variantes adicionales en los Ejemplos a continuación (véase la **FIGURA 21A-FIGURA 21J**).

Tabla 4. Secuencias de aminoácidos de HC y LC de 3-F03_411

	SECUENCIA
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWV AVMSYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCAT EIAAKGDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:62)
VL	IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTR LEIK (SEQ ID NO:61)
Cadena pesada	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWV AVMSYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCAT EIAAKGDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:30)
Cadena ligera	IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTR LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC (SEQ ID NO:31)

5

Tabla 5. Secuencias de aminoácidos de CDR, VH, VL, HC, LC de 3-F03_413

	IMGT	Chothia	AbM	Kabat	Contact
CDR	GFTFSSYD	GFTFSSY	GFTFSSYD	SYDMH	SSYDMH

	IMGT	Chothia	AbM	Kabat	Contact
1 de VH	(SEQ ID NO:34)	(SEQ ID NO:41)	MH (SEQ ID NO:46)	(SEQ ID NO:49)	(SEQ ID NO:53)
VH CDR 2	MSYEGSNK (SEQ ID NO:40)	SYEGSN (SEQ ID NO:43)	VMSYEGSN KY (SEQ ID NO:48)	VMSYEGSN KYYADSVK G (SEQ ID NO:51)	WVAVMSY EGSNKY (SEQ ID NO:55)
CDR 3 de VH	ATEIAAKGD Y (SEQ ID NO:36)	EIAAKGDY (SEQ ID NO:52)	EIAAKGDY (SEQ ID NO:52)	EIAAKGDY (SEQ ID NO:52)	ATEIAAKG D (SEQ ID NO:56)
CDR 1 de VL	QGISNY (SEQ ID NO:37)	RASQGISNY LA (SEQ ID NO:44)	RASQGISNY LA (SEQ ID NO:44)	RASQGISNY LA (SEQ ID NO:44)	SNYLAWY (SEQ ID NO:57)
CDR 2 de VL	AAS (SEQ ID NO:38)	AASTLQS (SEQ ID NO:45)	AASTLQS (SEQ ID NO:45)	AASTLQS (SEQ ID NO:45)	LLIYAAS T (SEQ ID NO:58)
CDR 3 de VL	QQSYSTPH (SEQ ID NO:39)	QQSYSTPH (SEQ ID NO:39)	QQSYSTPH (SEQ ID NO:39)	QQSYSTPH (SEQ ID NO:39)	QQSYSTP (SEQ ID NO:59)
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWV AVMSYEGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCAT EIAAKGDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:63)				
VL	IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTR LEIK (SEQ ID NO:61)				
HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWV AVMSYEGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCAT EIAAKGDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVKDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD				

	IMGT	Chothia	AbM	Kabat	Contact
	TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:33)				
LC	IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTR LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC (SEQ ID NO:31)				

Los anticuerpos anti-CD73 pueden abarcar CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH, y CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL de 3-F03 o 3-F03_413. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH de 3-F03 (véase la Tabla 3). En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VL que comprende CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL de 3-F03 (véase la Tabla 3). En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH de 3-F03 (véase la Tabla 3), y un VL que comprende CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL de 3-F03 (véase la Tabla 3). En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH de 3-F03_413 (véase la Tabla 5). En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VL que comprende CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL de 3-F03_413 (véase la Tabla 5). En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH de 3-F03_413 (véase la Tabla 5), y un VL que comprende CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL de 3-F03_413 (véase la Tabla 5). En algunos casos, los anticuerpos anti-CD73 pueden tener, por ejemplo, 1, 2 o 3 sustituciones dentro de una o más (es decir, 1, 2, 3, 4, 5 o 6) de las seis CDR de 3-F03 o 3-F03_413. En algunos casos, estos anticuerpos (i) inhiben el CD73 celular (por ejemplo, al menos

10 %; al menos 20 %; al menos 30 %; al menos 40 %; al menos 50 %; al menos 60 %; al menos 70 %; al menos 80 %; al menos 90 %; al menos 95 %; al menos 97 %; al menos 99 %, o 100 % de reducción de la actividad de CD73 celular en comparación con un control de isotipo, según se determina, por ejemplo, mediante el ensayo que se describe en el Ejemplo 15); y/o (ii) inhiben el CD73 soluble (por ejemplo, al menos 10 %; al menos 20 %; al menos 30 %; al menos 40 %; al menos 50 %; al menos 60 %; al menos 70 %; al menos 80 %; al menos 90 %; al menos 95 %; al menos 97 %; al menos 99 %, o 100 % de reducción en la actividad de CD73 soluble en comparación con un control de isotipo, según se determina, por ejemplo, mediante el ensayo que se describe en el Ejemplo 16); y/o (iii) se unen a CD73 humano, de mono cynomolgus o murino en la conformación abierta con afinidad alta (por ejemplo, $K_D \leq 2$ nM) (por ejemplo, según se determina mediante el ensayo de unión que se describe en el Ejemplo 18); y/o (iv) no se unen a CD73 humano, de mono cynomolgus o murino en la conformación cerrada; y/o (v) se unen a un epítipo dentro de los aminoácidos 386-399 de la SEQ ID NO:70 (es decir, dentro de AAVLPFGGTFDLVQ (SEQ ID NO:78), los aminoácidos 470-489 de la SEQ ID NO:70 (es decir, dentro de ILPNFLANGGDGFQMIKDEL (SEQ ID NO:79)) (por ejemplo, según se determina mediante el ensayo de unión que se describe en el Ejemplo 6); y/o (vi) reducen la supresión mediada por AMP de la proliferación de linfocitos T (por ejemplo, al menos 10 %; al menos 20 %; al menos 30 %; al menos 40 %; al menos 50 %; al menos 60 %; al menos 70 %; al menos 80 %; al menos 90 %; al menos 95 %; al menos 97 %; al menos 99 %, o 100 % de reducción en la proliferación de linfocitos T en comparación con un control de isotipo, según se determina, por ejemplo, mediante el ensayo que se describe en el Ejemplo 17); y/o (vii) disminuyen los niveles de CD73 en la superficie celular (por ejemplo, en células cancerosas, por ejemplo, células cancerosas de melanoma, por ejemplo, en al menos 10 %; al menos 20 %; al menos 30 %; al menos 40 %; al menos 50 %; al menos 60 %; al menos 70 %; al menos 80 %; al menos 90 %; al menos 95 %; al menos 97 %; al menos 99 %, o 100 % en comparación con un control de isotipo, según se determina, por ejemplo, mediante el ensayo que se describe en el Ejemplo 20); y/o (viii) reducen el crecimiento tumoral (por ejemplo, tumores de melanoma, por ejemplo, en al menos 10 %; al menos 20 %; al menos 30 %;

al menos 40 %; al menos 50 %; al menos 60 %; al menos 70 %; al menos 80 %; al menos 90 %; al menos 95 %; al menos 97 %; al menos 99 %, o 100 % en comparación con un control de isotipo, según se determina, por ejemplo, mediante el ensayo que se describe en el Ejemplo 21).

- 5 Los anticuerpos anti-CD73 pueden comprender CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH de 3-F03 o 3-F03_413 de acuerdo con la definición de IMGT, o una definición de CDR alternativa tal como, de modo no taxativo, la definición de Kabat, la definición de Chothia, la definición de CDR de AbM, o la definición de Contact. Estos anticuerpos anti-CD73 pueden incluir cero, una, dos o tres sustituciones en CDR1 de VH y/o CDR2
- 10 de VH y/o CDR3 de VH de 3-F03 o 3-F03_413. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden, además, CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL de 3-F03 o 3-F03_413 de acuerdo con la definición de IMGT, o una definición de CDR alternativa tal como, de modo no taxativo, la definición de Kabat, la definición de Chothia, la definición de CDR de AbM, o la definición de Contact. Estos anticuerpos
- 15 anti-CD73 pueden incluir cero, una, dos o tres sustituciones en CDR1 de VL y/o CDR2 de VL y/o CDR3 de VL de 3-F03 o 3-F03_413. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH indicadas en las SEQ ID NO: 34, 35, y 36, respectivamente, y un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL indicadas en las SEQ ID NO: 37, 38 y 39,
- 20 respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH indicadas en las SEQ ID NO: 41, 42, y 52, respectivamente, y un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL indicadas en las SEQ ID NO: 44, 45 y 39, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende la CDR1 de VH,
- 25 CDR2 de VH y CDR3 de VH indicadas en las SEQ ID NO: 46, 47, y 52, respectivamente, y un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL indicadas en las SEQ ID NO: 44, 45 y 39, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH indicadas en las SEQ ID NO: 49, 50, y 52, respectivamente, y un VL
- 30 que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL indicadas en las SEQ ID NO: 44, 45 y 39, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73

comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH indicadas en las SEQ ID NO: 53, 54, y 56, respectivamente, y un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL indicadas en las SEQ ID NO: 57, 58 y 59, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH indicadas en las SEQ ID NO: 34, 40, y 36, respectivamente, y un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL indicadas en las SEQ ID NO: 37, 38 y 39, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH indicadas en las SEQ ID NO: 41, 43, y 52, respectivamente, y un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL indicadas en las SEQ ID NO: 44, 45 y 39, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH indicadas en las SEQ ID NO: 46, 48, y 52, respectivamente, y un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL indicadas en las SEQ ID NO: 44, 45 y 39, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH indicadas en las SEQ ID NO: 49, 51, y 52, respectivamente, y un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL indicadas en las SEQ ID NO: 44, 45 y 39, respectivamente. En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH indicadas en las SEQ ID NO: 53, 55, y 56, respectivamente, y un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL indicadas en las SEQ ID NO: 57, 58 y 59, respectivamente. En algunos casos, estos anticuerpos (i) inhiben el CD73 celular (por ejemplo, al menos 10 %; al menos 20 %; al menos 30 %; al menos 40 %; al menos 50 %; al menos 60 %; al menos 70 %; al menos 80 %; al menos 90 %; al menos 95 %; al menos 97 %; al menos 99 %, o 100 % de reducción de la actividad de CD73 celular en comparación con un control de isotipo, según se determina, por ejemplo, mediante el ensayo que se describe en el Ejemplo 15); y/o (ii) inhiben el CD73 soluble (por ejemplo, al menos 10 %; al menos 20 %; al menos 30 %; al menos 40 %; al menos 50 %; al menos 60 %; al menos 70 %; al menos 80 %; al menos 90 %; al menos 95 %; al menos 97 %; al menos 99 %, o 100 % de reducción en la actividad de CD73 soluble en comparación con un control

de isotipo, según se determina, por ejemplo, mediante el ensayo que se describe en el Ejemplo 16); y/o (iii) se unen a CD73 humano, de mono cynomolgus o murino en la conformación abierta con afinidad alta (por ejemplo, $K_D \leq 2$ nM) (por ejemplo, según se determina mediante el ensayo de unión que se describe en el Ejemplo 18); y/o (iv) no se unen a CD73 humano, de mono cynomolgus o murino en la conformación cerrada; y/o (v) se unen a un epítipo dentro de los aminoácidos 386-399 de la SEQ ID NO:70 (es decir, dentro de AAVLPFGGTFDLVQ (SEQ ID NO:78), los aminoácidos 470-489 de la SEQ ID NO:70 (es decir, dentro de ILPNFLANGGDGFQMIKDEL (SEQ ID NO:79)) (por ejemplo, según se determina mediante el ensayo de unión que se describe en el Ejemplo 6); y/o (vi) reducen la supresión mediada por AMP de la proliferación de linfocitos T (por ejemplo, al menos 10 %; al menos 20 %; al menos 30 %; al menos 40 %; al menos 50 %; al menos 60 %; al menos 70 %; al menos 80 %; al menos 90 %; al menos 95 %; al menos 97 %; al menos 99 %, o 100 % de reducción en la proliferación de linfocitos T en comparación con un control de isotipo, según se determina, por ejemplo, mediante el ensayo que se describe en el Ejemplo 17); y/o (vii) disminuyen los niveles de CD73 en la superficie celular (por ejemplo, en células cancerosas, por ejemplo, células cancerosas de melanoma, por ejemplo, en al menos 10 %; al menos 20 %; al menos 30 %; al menos 40 %; al menos 50 %; al menos 60 %; al menos 70 %; al menos 80 %; al menos 90 %; al menos 95 %; al menos 97 %; al menos 99 %, o 100 % en comparación con un control de isotipo, según se determina, por ejemplo, mediante el ensayo que se describe en el Ejemplo 20); y/o (viii) reducen el crecimiento tumoral (por ejemplo, tumores de melanoma, por ejemplo, en al menos 10 %; al menos 20 %; al menos 30 %; al menos 40 %; al menos 50 %; al menos 60 %; al menos 70 %; al menos 80 %; al menos 90 %; al menos 95 %; al menos 97 %; al menos 99 %, o 100 % en comparación con un control de isotipo, según se determina, por ejemplo, mediante el ensayo que se describe en el Ejemplo 21).

En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO:32, 60, 62, 63, 67-69, 77, y 85-88. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden un VH

que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de 3-F03 o una variante de este (por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413) (véase, por ejemplo, la Tabla 3 y Tabla 5, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 34-36, respectivamente, o las SEQ ID NO:34, 40 y 36, respectivamente), en donde el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77, y 85-88. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en las SEQ ID NO: 30, 33, y 66. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una cadena pesada que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de 3-F03 o una variante de este (por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413) (véase, por ejemplo, la Tabla 3 y Tabla 5, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 34-36, respectivamente, o las SEQ ID NO:34, 40 y 36, respectivamente), en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en las SEQ ID NO: 30, 33, y 66. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 61, 64, y 65. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL de 3-F03 o una variante de este (por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413) (véase, por ejemplo, la Tabla 3 y Tabla 5, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 37-39, respectivamente), en donde el VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones con respecto a la

secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 61, 64, y 65. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 31. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una cadena ligera que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL de 3-F03 o una variante de este (por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413) (véase, por ejemplo, la Tabla 3 y Tabla 5, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 37-39, respectivamente), en donde la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 31. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden: (i) una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77, y 85-88; y (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 61, 64, y 65. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden: (i) un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de 3-F03 o una variante de este (por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413) (véanse, por ejemplo, la Tabla 3 y la Tabla 5, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 34-36, respectivamente o las SEQ ID NO: 34, 40 y 36, respectivamente), en donde el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77, y 85-88; y (ii) un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL de 3-F03 o una variante de este (por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413) (véanse, por ejemplo, la Tabla 3 y la Tabla

5, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 37-39, respectivamente), en donde el VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 61, 64, y 65. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden: (i) una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en las SEQ ID NO: 30, 33 y 66; y (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 31. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden: (i) una cadena pesada que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de 3-F03 o una variante de este (por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413) (véanse, por ejemplo, la Tabla 3 y la Tabla 5, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 34-36, respectivamente o las SEQ ID NO: 34, 40 y 36, respectivamente), en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en las SEQ ID NO: 30, 33, y 66; y (ii) una cadena ligera que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL de 3-F03 o una variante de este (por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413) (véanse, por ejemplo, la Tabla 3 y la Tabla 5, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 37-39, respectivamente), en donde la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 31.

En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos

87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VH indicado en cualquiera de las SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77, y 85-88. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de 3-F03 o una variante de este (por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413) (véanse, por ejemplo, la Tabla 3 y la Tabla 5, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO:34-36, respectivamente, o las SEQ ID NO:34, 40, y 36, respectivamente), en donde el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VH indicado en cualquiera de las SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77, y 85-88. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VL indicado en cualquiera de las SEQ ID NO: 61, 64, y 65. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL de 3-F03 o una variante de este (por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413) (véanse, por ejemplo, la Tabla 3 y la Tabla 5, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO:37-39, respectivamente), en donde el VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VL indicado en cualquiera de las SEQ ID NO: 61, 64, y 65. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %

al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VH indicado en cualquiera de las SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77, y 85-88, y una

5 secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VL indicado en cualquiera de las SEQ ID NO: 61, 64, y 65. En determinadas modalidades, los

10 anticuerpos anti-CD73 comprenden: (i) un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de 3-F03 o una variante de este (por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413) (véanse, por ejemplo, la Tabla 3 y la Tabla 5, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 34-36, respectivamente, o las SEQ ID NO: 34, 40 y 36, respectivamente),

15 en donde el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VH indicado en cualquiera de las SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69,

20 77, y 85-88, y (ii) un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL de 3-F03 o una variante de este (por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413) (véanse, por ejemplo, la Tabla 3 y la Tabla 5, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 37-39, respectivamente), en donde el VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene

25 al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VL indicado en cualquiera de las SEQ ID NO: 61, 64, y 65. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una secuencia

30 de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VL indicado en cualquiera de las SEQ ID NO: 61, 64, y 65.

al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VH de 3-F03_411 o 3-F03_413 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:62 o 63, respectivamente). En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73

5 comprenden un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de 3-F03_411 (véase la Tabla 3, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 34-36, respectivamente), en donde el VH comprende una secuencia de aminoácidos que

10 tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VH de 3-F03_411 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:62). En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de

15 VH, y CDR3 de VH de 3-F03_413 (véase la Tabla 5, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 34, 40 y 36, respectivamente), en donde el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al

20 menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VH de 3-F03_411 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:63). En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden un VH que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:62. En algunas modalidades, los anticuerpos

25 anti-CD73 comprenden un VH que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:63. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al

30 menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con la cadena pesada de 3-F03_411 o 3-F03_F13 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada

en la SEQ ID NO:30 o 33, respectivamente). En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una cadena pesada que comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de 3-F03_411 (véase la Tabla 3, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 34-36, respectivamente), en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con la cadena pesada de 3-F03_411 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:30). En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una cadena pesada que comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de 3-F03_413 (véase la Tabla 5, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 34, 40 y 36, respectivamente), en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con la cadena pesada de 3-F03_413 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:33). En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:30. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:33. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VL de 3-F03_411 o 3-F03_413 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:61). En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden un VL que

comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL de 3-F03_411 o 3-F03_413 (véase la Tabla 3, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 37-39, respectivamente), en donde el VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VL de 3-F03_411 o 3-F03_413 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:61). En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden un VL que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:61. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con la cadena ligera de 3-F03_411 o 3-F03_413 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:31). En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una cadena ligera que comprende un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL de 3-F03_411 o 3-F03_413 (véase la Tabla 5, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 37-39, respectivamente), en donde la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con la cadena ligera de 3-F03_411 o 3-F03_413 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:31). En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:31. En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al

menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VH de 3-F03_411 o 3-F03_413 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:62 o 63, respectivamente), y una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VL de 3-F03_411 o 3-F03_413 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:61). En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden: (i) un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de 3-F03_411 (véase la Tabla 3, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 34-36, respectivamente), en donde el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VH de 3-F03 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:62) y (ii) un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL de 3-F03_411 (véase la Tabla 3, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 37-39, respectivamente), en donde el VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VL de 3-F03 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:61). En determinadas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden: (i) un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de 3-F03_413 (véase la Tabla 5, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 34, 40 y 36, respectivamente), en donde el VH comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %,

al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VH de 3-F03_413 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:63) y (ii) un VL que comprende

5 la CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL de 3-F03_413 (véase la Tabla 5, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 37-39, respectivamente), en donde el VL comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al

10 menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con el VL de 3-F03_413 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:61). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD73 comprende: (i) un VH que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:62; y (ii) un VL

15 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:61. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD73 comprende: (i) un VH que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:63; y (ii) un VL que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:61. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al

20 menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con la cadena pesada de 3-F03_411 o 3-F03_413 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:30 o 33), y una secuencia de

25 aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con la cadena ligera de 3-F03_411 o 3-F03_413 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:31). En

30 algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden: (i) una cadena pesada que comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH

de 3-F03_411 (véase la Tabla 3, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 34-36, respectivamente), en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con la cadena pesada de 3-F03_411 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:30) y (ii) una cadena ligera que comprende un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL de 3-F03_411 (véase la Tabla 3, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 37-39, respectivamente), en donde la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con la cadena ligera de 3-F03 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:31). En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CD73 comprenden: (i) una cadena pesada que comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de 3-F03_413 (véase la Tabla 5, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 34, 40 y 36, respectivamente), en donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con la cadena pesada de 3-F03 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:33) y (ii) una cadena ligera que comprende un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL de 3-F03_413 (véase la Tabla 5, por ejemplo, de acuerdo con la definición de IMGT, es decir, las secuencias de aminoácidos indicadas en las SEQ ID NO: 37-39, respectivamente), en donde la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al

menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o 100 % de identidad con la cadena ligera de 3-F03_413 (es decir, la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:31). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD73 comprende: (i) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:30; y (ii) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:31. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CD73 comprende: (i) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:33; y (ii) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:31.

El epítipo de unión a CD73 de 3-F03 (y variantes de este, por ejemplo, 3-F03_411 y 3-F03_413) contiene AAVLPFGGTFDLVQ (SEQ ID NO:78) (es decir, los aminoácidos 386-399 de la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:70) e ILPNFLANGGDGFQMIKDEL (SEQ ID NO:79) (es decir, los aminoácidos 470-489 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:70). Esta descripción presenta anticuerpos que se unen a CD73, un epítipo dentro de AAVLPFGGTFDLVQ (SEQ ID NO:78) e ILPNFLANGGDGFQMIKDEL (SEQ ID NO:79). Esta descripción presenta anticuerpos que se unen al mismo epítipo que 3-F03 (o una variante de este, por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413). Esta descripción también presenta anticuerpos que inhiben de forma competitiva la unión de 3-F03 (o una variante de este, por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413) a CD73 humano.

En algunas modalidades, el VH de 3-F03 (o una variante de este, por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413) se enlaza a una región constante de cadena pesada que comprende un dominio CH1 y una región bisagra. En algunas modalidades, el VH de 3-F03 (o una variante de este, por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413) se enlaza a una región constante de cadena pesada que comprende un dominio CH3. En algunas modalidades, el dominio CH3 carece del residuo de aminoácidos de lisina (K) en el extremo C. En algunas modalidades, el dominio CH3 contiene el residuo de aminoácidos de lisina (K) en el extremo C. En determinadas modalidades, el VH de 3-F03 (o una variante de este, por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413) se enlaza a una

- región constante de cadena pesada que comprende un dominio CH1, una región bisagra, un dominio CH2, y un dominio CH3 de IgG1 humana. En algunas modalidades, el dominio CH3 de IgG1 humana carece del residuo de aminoácidos de lisina (K) en el extremo C. En algunas modalidades, el dominio CH3 de IgG1 humana
- 5 contiene el residuo de aminoácidos de lisina (K) en el extremo C. En determinadas modalidades, dicho anticuerpo contiene una o más mutaciones adicionales en la región constante de cadena pesada que aumentan la estabilidad del anticuerpo. En determinadas modalidades, la región constante de cadena pesada incluye sustituciones que modifican las propiedades del anticuerpo (por ejemplo, disminuyen
- 10 la unión al receptor Fc, aumentan o disminuyen la glicosilación del anticuerpo, disminuyen la unión a C1q). En determinadas modalidades, la región constante de cadena pesada incluye una alanina (A) en la posición de Asparagina-297 (N297, de acuerdo con la numeración de EU) de la región constante de cadena pesada para reducir la función efectora.
- 15 En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo de IgG. En una modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1. En una modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo IgG4. En otra modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo IgG2. En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-CD73 comprende una región constante de cadena pesada que carece de uno o más residuos de aminoácidos de lisina (K) con
- 20 respecto a una región constante de cadena pesada de tipo salvaje. Por ejemplo, en determinadas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que carece del residuo de aminoácido de lisina (K) en el extremo C del dominio CH3 de la región constante de cadena pesada. En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-CD73 comprende una región constante de cadena pesada que tiene la
- 25 secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:73. En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-CD73 comprende una región constante de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:75. En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-CD73 comprende una región constante de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:74.
- 30 En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-CD73 comprende una región constante de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la

SEQ ID NO:73 y una región constante de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:74. En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-CD73 comprende una región constante de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:75 y una región constante de

5 cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:74.

Fragmentos de anticuerpos

En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de los anticuerpos (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Facb, y Fv) pueden

10 prepararse mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos. Por ejemplo, pueden obtenerse fragmentos de anticuerpos mediante el tratamiento del anticuerpo completo con una enzima tal como papaína, la pepsina o la plasmina. La digestión de papaína de los anticuerpos completos produce fragmentos F(ab)₂ o Fab; la digestión de pepsina de los anticuerpos completos proporciona F(ab')₂ o Fab'; y la digestión de

15 plasmina de los anticuerpos completos proporciona fragmentos Facb.

De manera alternativa, los fragmentos de anticuerpos pueden producirse de manera recombinante. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican los fragmentos de anticuerpos de interés pueden construirse, introducirse en un vector de expresión y expresarse en células hospedadoras adecuadas. Véase, por ejemplo, Co, M.S. et ál.,

20 J. Immunol., 152:2968-2976 (1994); Better, M. y Horwitz, A.H., Methods in Enzymology, 178:476-496 (1989); Plueckthun, A. y Skerra, A., Methods in Enzymology, 178:476-496 (1989); Lamoyi, E., Methods in Enzymology, 121:652-663 (1989); Rousseaux, J. et ál., Methods in Enzymology, (1989) 121:663-669 (1989); y Bird, R.E. et ál., TIBTECH, 9:132-137 (1991)). Los fragmentos de anticuerpos pueden

25 expresarse en *E. coli* y ser secretados por esta, lo que permite la producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de las bibliotecas de fagos de anticuerpos. De manera alternativa, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab)₂ (Carter et ál., Bio/Technology, 10:163-

30 167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente de cultivo de células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos Fab

y $F(ab')_2$ con semivida *in vivo* aumentada que comprende residuos de epítipo de unión al receptor de salvamento se describen en la patente estadounidense n.º 5,869,046.

Minicuerpos

- 5 En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 es un minicuerpo. Los minicuerpos de los anticuerpos anti-CD73 incluyen diacuerpos, (scFv) de cadena simple y $(Fv)_2$ de cadena simple ($sc(Fv)_2$).

Un «diacuerpo» es un minicuerpo bivalente construido mediante fusión génica (véase, por ejemplo, Holliger, P. et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90:6444-6448 (1993);
 10 EP 404,097; WO 93/11161). Los diacuerpos son dímeros compuestos por dos cadenas de polipéptidos. El dominio VL y VH de cada cadena de polipéptidos del diacuerpo están unidos por enlazadores. La cantidad de residuos de aminoácidos que constituyen un enlazador puede ser de entre 2 a 12 residuos (por ejemplo, 3-10 residuos o cinco o alrededor de cinco residuos). Los enlazadores de los polipéptidos
 15 en un diacuerpo son típicamente demasiado cortos para permitir que VL y VH se unan entre sí. Por lo tanto, VL y VH codificadas en la misma cadena de polipéptidos no pueden formar un fragmento de región variable de cadena simple, en cambio, forman un dímero con un fragmento de región variable de cadena simple diferente. Como resultado, un diacuerpo tiene dos sitios de unión al antígeno.

- 20 Un scFv es un anticuerpo de polipéptidos de cadena simple que se obtiene mediante el enlace de VH y VL con un enlazador (véase, por ejemplo, Huston et ál., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85:5879-5883 (1988); y Plickthun, «The Pharmacology of Monoclonal Antibodies» Vol.113, Ed Resenbarg y Moore, Springer Verlag, Nueva York, págs. 269-315, (1994)). El orden de VH y VL que se han de enlazar no se encuentra
 25 particularmente limitado, y pueden disponerse en cualquier orden. Los ejemplos de disposiciones incluyen: [VH] enlazador [VL]; o [VL] enlazador [VH]. El dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera en un scFv pueden derivar de cualquier anticuerpo anti-CD73 descrito en la presente.

Un $sc(Fv)_2$ es un minicuerpo en el que dos VH y dos VL se encuentran enlazados por
 30 un enlazador para formar una cadena simple (Hudson, et ál., J. Immunol. Methods, (1999) 231: 177-189 (1999)). Puede prepararse un $sc(Fv)_2$, por ejemplo, mediante la

conexión de los scFv con un enlazador. Los sc(Fv)₂ de la presente invención incluyen anticuerpos en los que, preferentemente, se disponen dos VH y dos VL en el siguiente orden: VH, VL, VH y VL ([VH] enlazador [VL] enlazador [VH] enlazador [VL]), comenzando en el extremo N de un polipéptido de cadena simple; sin embargo, el
 5 orden de las dos VH y las dos VL no se limita a la disposición anterior, y se pueden disponerse en cualquier orden.

Anticuerpos biespecíficos

En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo biespecífico. Los
 10 anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. Algunos anticuerpos biespecíficos ilustrativos pueden unirse a dos epítopos diferentes de la proteína CD73. Otros de dichos anticuerpos pueden combinar un sitio de unión a CD73 con un sitio de unión con otra proteína. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa
 15 o formas de peso molecular bajo de estos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂, anticuerpos biespecíficos sc(Fv)₂, anticuerpos biespecíficos de diacuerpos). La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein et ál., Nature,
 20 305:537-539 (1983)). En un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en una célula hospedadora
 25 adecuada. Esto proporciona mayor flexibilidad a la hora de ajustar las proporciones de los tres fragmentos de polipéptidos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptidos en un único vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en proporciones iguales produce rendimientos altos.
 30 De acuerdo con otro enfoque descrito en la patente estadounidense n.º 5,731,168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede diseñarse para maximizar el

- porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio CH3. En este método, se reemplazan una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean «cavidades» compensatorias de tamaño idéntico o similar a las una o más cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo mediante el reemplazo de las cadenas laterales grandes de aminoácidos por unas más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como los homodímeros.
- Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o «heteroconjugados». Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Los anticuerpos heteroconjugados pueden producirse mediante el uso de cualquier método de reticulación conveniente.
- La tecnología del «diacuerpo» proporciona un mecanismo alternativo para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un VH conectado a un VL mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. En consecuencia, los dominios VH y VL de un fragmento se fuerzan para acoplarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, mediante lo cual se forman dos sitios de unión al antígeno.

Anticuerpos multivalentes

- En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo multivalente. Un anticuerpo multivalente puede ser internalizado (y/o catabolizado) más rápidamente que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al cual se une el anticuerpo. Los anticuerpos que se describen en la presente pueden ser anticuerpos multivalentes con tres o más sitios de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente mediante la expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas de polipéptidos del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más

sitios de unión al antígeno. Un ejemplo dominio de dimerización comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. Un anticuerpo multivalente puede comprender (o consistir en) de tres a alrededor de ocho (por ejemplo, cuatro) sitios de unión al antígeno. El anticuerpo multivalente comprende opcionalmente al menos una cadena

5 de polipéptidos (por ejemplo, al menos dos cadenas de polipéptidos), donde las una o más cadenas de polipéptidos comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, las una o más cadenas de polipéptidos pueden comprender $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, en donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena de polipéptidos de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido

10 o espaciador peptídico y n es 0 o 1.

Anticuerpos conjugados

En algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo conjugado. Los anticuerpos descritos en la presente pueden ser anticuerpos conjugados que se unen

15 a diversas moléculas, incluidas sustancias macromoleculares tales como polímeros (por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polietilenimina (PEI) modificada con PEG (PEI-PEG), ácido poliglutámico (PGA) (copolímeros de N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (HPMA)), ácido hialurónico, materiales radioactivos (por ejemplo, ^{90}Y , ^{131}I), sustancias fluorescentes, sustancias luminiscentes, haptenos, enzimas, quelatos de metales,

20 fármacos, y toxinas (por ejemplo, calicheamicinas, exotoxina de *Pseudomonas A*, ricina (por ejemplo, cadena A de ricina desglicosilada)).

En una modalidad, con el fin de mejorar las acciones citotóxicas de los anticuerpos anti-CD73 y, en consecuencia, su eficacia terapéutica, los anticuerpos se conjugan con sustancias altamente tóxicas, que incluyen radioisótopos y agentes citotóxicos.

25 Estos conjugados pueden suministrar una carga tóxica de manera selectiva al sitio diana (es decir, células que expresen el antígeno reconocido por el anticuerpo), mientras que las células que no son reconocidas por el anticuerpo permanecen intactas. Con el fin de minimizar la toxicidad, en general, los conjugados se modifican con base en moléculas con una semivida sérica corta (por lo tanto, el uso de

30 secuencias murinas y los isotipos IgG3 o IgG4).

En determinadas modalidades, se modifica un anticuerpo anti-CD73 con un resto que

mejora la estabilización y/o la retención en la circulación, por ejemplo, en la sangre, el suero u otros tejidos, por ejemplo, al menos 1,5, 2, 5, 10 o 50 veces. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD73 puede estar asociado (por ejemplo, conjugado) con un polímero, por ejemplo, un polímero sustancialmente no antigénico, por ejemplo, un óxido de polialquileno o un óxido de polietileno. Los polímeros adecuados varían sustancialmente según el peso. Es posible usar polímeros con pesos promedio en número molecular en el intervalo de alrededor de 200 a alrededor de 35.000 Daltons (o de alrededor de 1000 a alrededor de 15.000 y de alrededor de 2000 a alrededor de 12.500). Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD73 puede conjugarse con un polímero soluble en agua, por ejemplo, un polímero de polivinilo hidrofílico, por ejemplo, alcohol polivinílico o polivinilpirrolidona. Los ejemplos de dichos polímeros incluyen homopolímeros de óxido de polialquileno, tales como polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicoles, polioles polioxietilenados, copolímeros de estos y copolímeros en bloque de estos, siempre que se mantenga la solubilidad en agua de los copolímeros en bloque. Otros polímeros útiles incluyen polioxialquilenos tales como polioxietileno, polioxipropileno y copolímeros en bloque de polioxietileno y polioxipropileno; polimetacrilatos; carbómeros; y polisacáridos ramificados o no ramificados.

Los anticuerpos conjugados descritos anteriormente pueden prepararse mediante la realización de modificaciones químicas a los anticuerpos, respectivamente, o las formas de menor peso molecular de estos que se describen en la presente. Los métodos para modificar los anticuerpos son conocidos en la técnica (por ejemplo, US 5057313 y US 5156840).

Métodos para la producción de anticuerpos

Los anticuerpos pueden producirse en células bacterianas o eucariotas. Algunos anticuerpos, por ejemplo, los Fab, pueden producirse en células bacterianas, por ejemplo, células de *E. coli*. Los anticuerpos también pueden producirse en células eucariotas tales como líneas celulares transformadas (por ejemplo, CHO, 293E, COS). Además, los anticuerpos (por ejemplo, scFv) pueden expresarse en una célula de levadura tal como *Pichia* (véase, por ejemplo, Powers et ál., *J Immunol Methods*. 251:123-35 (2001)), *Hanseula*, o *Saccharomyces*. Con el fin de producir el anticuerpo

de interés, se construye un polinucleótido que codifica el anticuerpo, se introduce en un vector de expresión y se expresa en células hospedadoras adecuadas. Para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospedadoras, seleccionar los transformantes, cultivar las células hospedadoras y recuperar el anticuerpo se usan técnicas de biología molecular estándar.

Si el anticuerpo se ha de expresar en células bacterianas (por ejemplo, *E. coli*), el vector de expresión debería tener características que permitan la amplificación del vector en las células bacterianas. Además, cuando se usa *E. coli* tal como JM109, DH5 α , HB101 o XL1-Blue como hospedadora, el vector debe tener un promotor, por ejemplo, un promotor de lacZ (Ward et ál., 341:544-546 (1989)), un promotor de araB (Better et ál., Science, 240:1041-1043 (1988)) o un promotor de T7 que pueda permitir una expresión eficiente en *E. coli*. Algunos ejemplos de dichos vectores incluyen, por ejemplo, vectores de serie M13, vectores de serie pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script, pGEX-5X-1 (Pharmacia), «sistema QIAexpress» (QIAGEN), pEGFP y pET (cuando se utiliza este vector de expresión, el hospedador es, preferentemente, BL21 con expresión de ARN polimerasa en T7). El vector de expresión puede contener una secuencia de señal para la secreción del anticuerpo. Para la producción en el periplasma de *E. coli*, se puede utilizar la secuencia de señal de pelB (Lei et ál., J. Bacteriol., 169:4379 (1987)) como secuencia de señal para la secreción del anticuerpo. Para la expresión bacteriana, se pueden usar métodos con cloruro de calcio o métodos de electroporación para introducir el vector de expresión en la célula bacteriana.

Si el anticuerpo se ha de expresar en células animales tales como células CHO, COS y NIH3T3, el vector de expresión incluye un promotor necesario para la expresión en estas células, por ejemplo, un promotor del SV40 (Mulligan et ál., Nature, 277:108 (1979)), promotor de MMLV-LTR, promotor de EF1 α (Mizushima et ál., Nucleic Acids Res., 18:5322 (1990)) o promotor del CMV. Además de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la inmunoglobulina o un dominio de esta, los vectores de expresión recombinantes pueden contener secuencias adicionales, tales como secuencias que regulen la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células hospedadoras en las cuales se

ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 4,399,216, 4,634,665 y 5,179,017). Por ejemplo, típicamente, el gen marcador seleccionable confiere resistencia a los fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en la cual se ha introducido el vector. Los
5 ejemplos de vectores con marcadores seleccionables incluyen pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV y pOP13.

En una modalidad, los anticuerpos se producen en células de mamíferos. Las células hospedadoras de mamífero ilustrativas para la expresión de un anticuerpo incluyen células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluidas las células dhfr- CHO,
10 descritas en Urlaub y Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, utilizadas con un marcador seleccionable de DHFR, por ejemplo, tal como se describe en Kaufman y Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células 293 de riñón embrionario humano (por ejemplo, 293, 293E, 293T), células COS, células NIH3T3, líneas celulares linfocíticas, por ejemplo, células de mieloma NS0 y células SP2, y una célula de un
15 animal transgénico, por ejemplo, un mamífero transgénico. Por ejemplo, la célula es una célula epitelial mamaria.

En un sistema ilustrativo para la expresión de anticuerpos, un vector de expresión recombinante que codifica la cadena pesada del anticuerpo y la cadena ligera del anticuerpo, de un anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, CL25, HzCL25, 3-F03, 3-
20 F03_411, o 3-F03_413) se introduce en células dhfr- CHO mediante transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de la cadena pesada y ligera del anticuerpo están, cada uno, enlazados operativamente a elementos reguladores potenciadores/promotores (por ejemplo, derivados de SV40, CMV, adenovirus y otros similares, tales como un elemento
25 regulador potenciador de CMV/promotor de AdMLP o un elemento regulador potenciador de SV40/promotor de AdMLP) para controlar niveles elevados de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que se han transfectado con el vector mediante el uso de selección/amplificación con metotrexato. Las células hospedadoras
30 transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo, y el anticuerpo se extrae del medio de cultivo.

Los anticuerpos también pueden ser producidos por un animal transgénico. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5,849,992 describe un método para expresar un anticuerpo en la glándula mamaria de un mamífero transgénico. Se construye un transgén que incluye un promotor específico de la leche y ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo de interés y una secuencia de señal para la secreción. La leche producida por las hembras de esos mamíferos transgénicos incluye el anticuerpo de interés secretado en ella. El anticuerpo puede purificarse a partir de la leche o, en algunas aplicaciones, usarse directamente. También se proporcionan animales que comprenden uno o más de los ácidos nucleicos que se describen en la presente.

- 5
- 10 Los anticuerpos de la presente descripción pueden aislarse del interior o el exterior (tal como el medio) de la célula hospedadora y purificarse como anticuerpos sustancialmente puros y homogéneos. Los métodos de aislamiento y purificación que se usan comúnmente para la purificación de anticuerpos pueden usarse para el aislamiento y la purificación de anticuerpos y no se limitan a ningún método particular.
- 15 Los anticuerpos pueden aislarse y purificarse mediante selección y combinación adecuadas, por ejemplo, cromatografía en columna, filtración, ultrafiltración, precipitación por sales, precipitación por solvente, extracción con solvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, enfoque isoelectrico, diálisis y recristalización. La cromatografía incluye, por ejemplo, cromatografía por
- 20 afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrofóbica, filtración en gel, cromatografía de fase inversa y cromatografía de adsorción (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et ál., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). La cromatografía puede llevarse a cabo mediante el uso de cromatografía de fase líquida, tal como HPLC y FPLC. Las
- 25 columnas que se utilizan para cromatografía por afinidad incluyen la columna de proteína A y la columna de proteína G. Los ejemplos de columnas que usan la columna de proteína A incluyen Hyper D, POROS y Sepharose FF (GE Healthcare Biosciences). La presente descripción también incluye anticuerpos muy purificados mediante estos métodos de purificación.

30

Polinucleótidos, vectores de expresión y células

La descripción también proporciona polinucleótidos y vectores que codifican un anticuerpo anti-CD73, o una parte de este (por ejemplo, VH, VL, HC o LC), que se describe en la presente. Los polinucleótidos de la descripción pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN. En algunos casos, el polinucleótido es ADN. En algunos
5 casos, el polinucleótido es ADN complementario (ADNc). En algunos casos, el polinucleótido es ARN.

En algunos casos, el polinucleótido codifica un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de cualquier anticuerpo descrito en la presente (véanse, por ejemplo, las Tablas 1, 2, 3 y 5). En algunos casos, el polinucleótido codifica un VL
10 que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL de cualquier anticuerpo descrito en la presente (véanse, por ejemplo, las Tablas 1, 2, 3 y 5). En algunos casos, el polinucleótido codifica una cadena pesada que comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de cualquier anticuerpo descrito en la presente (véanse, por ejemplo, las Tablas 1, 2, 3 y 5). En algunos casos, el
15 polinucleótido codifica una cadena ligera que comprende un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL de cualquier anticuerpo descrito en la presente (véanse, por ejemplo, las Tablas 1, 2, 3 y 5). En algunos casos, el polinucleótido está enlazado operativamente a un promotor.

En algunos casos, el polinucleótido comprende: (i) una primera secuencia de ácido
20 nucleico que codifica un primer polipéptido, en donde el primer polipéptido comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de cualquier anticuerpo descrito en la presente (véanse, por ejemplo, las Tablas 1, 2, 3 y 5); y (ii) una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido, en donde el segundo polipéptido comprende un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2
25 de VL, y CDR3 de VL de cualquier anticuerpo descrito en la presente (véanse, por ejemplo, las Tablas 1, 2, 3 y 5). En algunos casos, el polinucleótido comprende: (i) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido, en donde el primer polipéptido comprende una cadena pesada que comprende un VH que comprende la CDR1 de VH, CDR2 de VH, y CDR3 de VH de cualquier anticuerpo
30 descrito en la presente (véanse, por ejemplo, las Tablas 1, 2, 3 y 5); y (ii) una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido, en donde el segundo

polipéptido comprende una cadena ligera que comprende un VL que comprende la CDR1 de VL, CDR2 de VL, y CDR3 de VL de cualquier anticuerpo descrito en la presente (véanse, por ejemplo, las Tablas 1, 2, 3 y 5). En algunos casos, el primer ácido nucleico está enlazado operativamente a un primer promotor y el segundo ácido nucleico está enlazado operativamente a un segundo promotor.

En algunos casos, el polinucleótido codifica el VH de CL25 o una variante de este (por ejemplo, una versión humanizada de este, por ejemplo, HzCL25). En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO:22, 26, y 82-84. En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 22, 26 y 82-84. En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO:22, 26, y 82-84. En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:22. En algunos casos, el polinucleótido está enlazado operativamente a un promotor.

En algunos casos, el polinucleótido codifica el VL de CL25 o una variante de este (por ejemplo, una versión humanizada de este, por ejemplo, HzCL25). En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO:23, 27, 80, y 81. En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO:23, 27, 80, y 81. En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO:23, 27, 80, y 81. En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido

que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:23. En algunos casos, el polinucleótido está enlazado operativamente a un promotor.

En algunos casos, el polinucleótido comprende: (i) un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido, en donde el primer polipéptido comprende el VH de

5 CL25 o una variante de este (por ejemplo, una versión humanizada de este, por ejemplo, HzCL25); y (ii) un segundo ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido, en donde el segundo polipéptido comprende el VL de CL25 o una variante de este (por ejemplo, una versión humanizada de este, por ejemplo, HzCL25). En

10 algunos casos, el polinucleótido comprende: (i) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido, en donde el primer polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO:22, 26, y 82-84, y (ii) una

15 segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido, en donde el segundo polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO:23, 27, 80, y 81. En algunos casos, el polinucleótido comprende: (i) una primera

20 secuencia de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido, en donde el primer polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO:22, 26, y 82-84; y (ii) una segunda secuencia de ácido nucleico que

25 codifica un segundo polipéptido, en donde el segundo polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO:23, 27, 80, y 81.

En algunos casos, el primer ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO:22, 26, y 82-84 y el segundo ácido nucleico

30 codifica la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO:23, 27, 80, y 81. En algunos casos, el primer ácido nucleico codifica la secuencia de

aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:22, y el segundo ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:23. En algunos casos, el primer ácido nucleico está enlazado operativamente a un primer promotor y el segundo ácido nucleico está enlazado operativamente a un segundo promotor.

- 5 En algunos casos, el polinucleótido codifica la cadena pesada de CL25 o una variante de este (por ejemplo, una versión humanizada de este, por ejemplo, HzCL25). En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:24. En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:24. En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:24. En algunos casos, el polinucleótido comprende la secuencia indicada en la SEQ ID NO:89. En algunos casos, el polinucleótido está enlazado operativamente a un promotor.

- En algunos casos, el polinucleótido codifica la cadena ligera de CL25 o una variante de este (por ejemplo, una versión humanizada de este, por ejemplo, HzCL25). En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:25. En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:25. En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:25. En algunos casos, el polinucleótido comprende la secuencia indicada en la SEQ ID NO:90. En algunos casos, el polinucleótido está enlazado operativamente a un promotor.

En algunos casos, el polinucleótido codifica la cadena pesada de CL25 o una variante

de este (por ejemplo, una versión humanizada de este, por ejemplo, HzCL25) y la cadena ligera de CL25 o una variante de este (por ejemplo, una versión humanizada de este, por ejemplo, HzCL25) . En algunos casos, el polinucleótido comprende: (i) un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido, en donde el primer polipéptido

5 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:24, y (ii) un segundo ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido, en donde el segundo polipéptido comprende una

10 secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:25. En algunos casos, el polinucleótido comprende: (i) un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido, en donde el primer polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con

15 respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:24; y (ii) un segundo ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido, en donde el segundo polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:25. En algunos

20 casos, el polinucleótido comprende: (i) un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido, en donde el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:24, y (ii) un segundo ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido, en donde el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:25. En algunos casos, el polinucleótido comprende: (i) un

25 primer ácido nucleico que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:89, y (ii) un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:90. En algunos casos, el primer ácido nucleico está enlazado operativamente a un primer promotor y el segundo ácido nucleico está enlazado operativamente a un segundo promotor.

30 En algunos casos, el polinucleótido codifica el VH de 3-F03 o una variante de este (por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413). En algunos casos, el polinucleótido codifica un

polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77, y 85-88. En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido

5 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77, y 85-88. En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las

10 SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77, y 85-88. En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:62. En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:63. En algunos casos, el polinucleótido está enlazado operativamente a un promotor.

15 En algunos casos, el polinucleótido codifica el VL de 3-F03 o una variante de este (por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413). En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO:61, 64, y

20 65. En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 61, 64, y 65. En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende la secuencia

25 de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 61, 64, y 65. En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:61. En algunos casos, el polinucleótido está enlazado operativamente a un promotor.

En algunos casos, el polinucleótido comprende: (i) un primer ácido nucleico que

30 codifica un primer polipéptido, en donde el primer polipéptido comprende el VH de 3-F03 o una variante de este (por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413); y (ii) un segundo

ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido, en donde el segundo polipéptido comprende el VL de 3-F03 o una variante de este (por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413). En algunos casos, el polinucleótido comprende: (i) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido, en donde el primer polipéptido

5 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77, y 85-88, y (ii) una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido, en donde el segundo polipéptido comprende una secuencia de

10 aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 61, 64, y 65. En algunos casos, el polinucleótido comprende: (i) una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido, en donde el primer polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos

15 que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77, y 85-88; y (ii) una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido, en donde el segundo polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más

20 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 61, 64, y 65. En algunos casos, el primer ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77, y 85-88, y el segundo ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos

25 indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 61, 64, y 65. En algunos casos, el primer ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:62, y el segundo ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:61. En algunos casos, el primer ácido nucleico codifica la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:63, y el segundo ácido nucleico codifica la

30 secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:61. En algunos casos, el primer ácido nucleico está enlazado operativamente a un primer promotor y el segundo ácido

nucleico está enlazado operativamente a un segundo promotor.

- En algunos casos, el polinucleótido codifica la cadena pesada de 3-F03 o una variante de este (por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413). En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 30, 33, y 66. En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 30, 33, y 66. En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 30, 33, y 66. En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:30. En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:33. En algunos casos, el polinucleótido comprende la secuencia indicada en la SEQ ID NO:91. En algunos casos, el polinucleótido comprende la secuencia indicada en la SEQ ID NO:93. En algunos casos, el polinucleótido está enlazado operativamente a un promotor.
- En algunos casos, el polinucleótido codifica la cadena ligera de 3-F03 o una variante de este (por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413). En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:31. En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 31. En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 31. En algunos casos, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:31. En algunos

casos, el polinucleótido comprende la secuencia indicada en la SEQ ID NO:92. En algunos casos, el polinucleótido está enlazado operativamente a un promotor.

En algunos casos, el polinucleótido codifica la cadena pesada de 3-F03 o una variante de este (por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413) y la cadena ligera de 3-F03 o una variante de este (por ejemplo, 3-F03_411 o 3-F03_413) . En algunos casos, el polinucleótido comprende: (i) un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido, en donde el primer polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 30, 33, y 66, y (ii) un segundo ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido, en donde el segundo polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 31. En algunos casos, el polinucleótido comprende: (i) un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido, en donde el primer polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 30, 33, y 66; y (ii) un segundo ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido, en donde el segundo polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 31. En algunos casos, el polinucleótido comprende: (i) un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido, en donde el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 30, 33 y 66, y (ii) un segundo ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido, en donde el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO: 31. En algunos casos, el polinucleótido comprende: (i) un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido, en donde el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:30, y (ii) un segundo ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido, en donde el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos

indicada en la SEQ ID NO:31. En algunos casos, el polinucleótido comprende: (i) un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido, en donde el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:33, y (ii) un segundo ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido, en donde el segundo polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:31. En algunos casos, el polinucleótido comprende: (i) un primer ácido nucleico que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:91, y (ii) un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:92. En algunos casos, el polinucleótido comprende: (i) un primer ácido nucleico que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:93, y (ii) un segundo ácido nucleico que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:92. En algunos casos, el primer ácido nucleico está enlazado operativamente a un primer promotor y el segundo ácido nucleico está enlazado operativamente a un segundo promotor.

En algunas modalidades, un polinucleótido descrito en la presente se encuentra aislado.

En la presente también se proporcionan vectores de expresión que codifican los anticuerpos anti-CD73 o partes de estos (por ejemplo, VH, VL, HC, y/o LC) que se describen en la presente. En la presente también se proporcionan vectores de expresión que comprenden uno o más polinucleótidos descritos en la presente. En la técnica se conocen diversos tipos de vectores de expresión y se describen en la presente (por ejemplo, véase la sección «Métodos para la producción de anticuerpos» anterior).

En la presente se proporcionan células que comprenden los anticuerpos anti-CD73 descritos en la presente. En la presente también se proporcionan células que comprenden uno o más polinucleótidos descritos en la presente. En la presente también se proporcionan células que comprenden uno o más vectores de expresión descritos en la presente. En la técnica se conocen diversos tipos de células y se describen en la presente (por ejemplo, véase la sección «Métodos para la producción de anticuerpos» anterior).

Anticuerpos anti-CD73 con glicosilación modificada

Las diferentes glicoformas pueden afectar en gran medida las propiedades de un agente terapéutico, lo que incluye la farmacocinética, farmacodinámica, interacción con el receptor y direccionamiento específico al tejido (Graddis et ál., 2002, Curr Pharm Biotechnol. 3: 285-297). En particular, para los anticuerpos, la estructura de los oligosacáridos puede afectar las propiedades pertinentes para la resistencia de proteasas, la semivida sérica del anticuerpo mediada por el receptor de FcRn, la fagocitosis y la retroalimentación del anticuerpo, además de las funciones efectoras del anticuerpo (por ejemplo, la unión al complejo C1 del complemento, que induce la CDC y la unión a los receptores FcγR, que son responsables de la modulación de la vía de ADCC) (Nose y Wigzell, 1983; Leatherbarrow y Dwek, 1983; Leatherbarrow et ál., 1985; Walker et ál., 1989; Carter et ál., 1992, PNAS, 89: 4285-4289).

Por consiguiente, otro medio para modular la función efectora de los anticuerpos incluye alterar la glicosilación de la región constante del anticuerpo. La glicosilación alterada incluye, por ejemplo, una disminución o un aumento en la cantidad de residuos glicosilados, un cambio en el patrón o la ubicación de los residuos glicosilados, así como un cambio en una o más estructuras de los azúcares. Los oligosacáridos que se encuentran en las IgG humanas afectan su grado de función efectora (Raju, T.S. BioProcess International abril 2003. 44-53); la microheterogeneidad de los oligosacáridos de IgG humanos puede afectar las funciones biológicas tales como la CDC y la ADCC, la unión a diversos receptores Fc y la unión a la proteína C1q (Wright A. & Morrison SL. TIBTECH 1997, 15 26-32; Shields et ál. J Biol Chem. 2001 276(9):6591-604; Shields et ál. J Biol Chem. 2002; 277(30):26733-40; Shinkawa et ál. J Biol Chem. 2003 278(5):3466-73; Umana et ál. Nat Biotechnol. febrero 1999; 17(2): 176-80). Por ejemplo, la capacidad de IgG de unirse a C1q y activar la cascada del complemento puede depender de la presencia, ausencia o modificación del resto de carbohidratos ubicado entre los dos dominios CH2 (que, normalmente, está anclado en Asn297) (Ward y Ghetie, Therapeutic Immunology 2:77-94 (1995). Por lo tanto, en algunos casos, el anticuerpo anti-CD73 contiene una sustitución Asn297Ala con respecto a una región constante de tipo salvaje.

Los sitios de glicosilación en un polipéptido que contiene Fc, por ejemplo, un anticuerpo tal como un anticuerpo IgG, pueden identificarse mediante técnicas estándar. La identificación del sitio de glicosilación puede ser experimental o basarse en el análisis de secuencias o datos de modelado. Se han descrito motivos de consenso, es decir, la secuencia de aminoácidos reconocida por diversas glicosil transferasas. Por ejemplo, el motivo de consenso para un motivo de glicosilación enlazado a N es, con frecuencia, NXT o NXS, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. También se han descrito varios algoritmos para ubicar un posible motivo de glicosilación. Por consiguiente, para identificar los posibles sitios de glicosilación dentro de un anticuerpo o fragmento que contiene Fc, se analiza la secuencia del anticuerpo, por ejemplo, mediante el uso de las bases de datos disponibles al público, tales como el sitio web proporcionado por el Center for Biological Sequence Analysis (véanse los servicios NetNGlyc para predecir los sitios de glicosilación enlazados a N y los servicios NetOGlyc para predecir los sitios de glicosilación enlazados a O).

Los estudios in vivo han confirmado la reducción de la función efectora de los anticuerpos aglicosilados. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD8 aglicosilado es incapaz de eliminar las células que contienen CD8 en ratones (Isaacs, 1992 J. Immunol. 148: 3062) y un anticuerpo anti-CD3 aglicosilado no induce el síndrome de liberación de citocinas en ratones o seres humanos (Boyd, 1995 supra; Friend, 1999 Transplantation 68:1632). Las formas aglicosiladas del anticuerpo anti-CD73 también tienen una función efectora reducida.

Es importante destacar que, aunque la remoción de los glicanos en el dominio CH2 parece producir un efecto significativo sobre la función efectora, otras propiedades funcionales y físicas del anticuerpo permanecen inalteradas. Específicamente, se ha demostrado que la remoción de los glicanos presentó poco o ningún efecto sobre la semivida sérica y la unión al antígeno (Nose, 1983 supra; Tao, 1989 supra; Dorai, 1991 supra; Hand, 1992 supra; Hobbs, 1992 Mol. Immunol. 29:949).

Los anticuerpos anti-CD73 de la presente invención pueden modificarse o alterarse para provocar un aumento o disminución de una o más funciones efectoras (en comparación con un segundo anticuerpo específico de CD73). Los métodos

adicionales para alterar los sitios de glicosilación de los anticuerpos se describen, por ejemplo, en US 6,350,861 y US 5,714,350, WO 05/18572 y WO 05/03175; estos métodos pueden usarse para producir los anticuerpos anti-CD73 de la presente invención con una glicosilación alterada, reducida o nula.

5

Indicaciones

Los anticuerpos anti-CD73 de la presente descripción pueden modular la actividad de CD73. Por consiguiente, los compuestos, las sales o los estereoisómeros que se describen en la presente pueden utilizarse en métodos para inhibir CD73 al poner en
10 contacto CD73 con cualquiera de los anticuerpos o composiciones que se describen en la presente. En algunas modalidades, los anticuerpos pueden utilizarse en métodos para inhibir la actividad de CD73, en un individuo/paciente que necesita la inhibición, mediante la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo descrito en la presente. En algunas modalidades, modular es inhibir. En algunas modalidades, el
15 contacto es in vivo. En algunas modalidades, el contacto es ex vivo o in vitro.

Otro aspecto de la presente descripción hace referencia a métodos para el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con CD73 en un individuo (por ejemplo, paciente) mediante la administración al individuo que necesite dicho tratamiento de una cantidad o dosis terapéuticamente eficaz de uno o más anticuerpos de la presente
20 descripción o una composición farmacéutica de estos. Una enfermedad o trastorno asociado con CD73 puede incluir cualquier enfermedad, trastorno o afección vinculada de forma directa o indirecta con la expresión o actividad de CD73, incluso la sobreexpresión y/o niveles de actividad anómalos.

Otro aspecto de la presente descripción hace referencia a métodos para el tratamiento
25 de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) en un individuo (por ejemplo, paciente) mediante la administración al individuo que necesita dicho tratamiento de una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más anticuerpos de la presente descripción, o una composición farmacéutica de estos, en donde la enfermedad o trastorno tiene una alta presencia de adenosina. En la técnica se conocen métodos
30 para determinar que una enfermedad o trastorno tiene una alta presencia de adenosina. Por ejemplo, el análisis de la expresión génica del tejido tumoral puede

realizarse mediante el uso de un panel definido de genes que responden a la adenosina.

Los compuestos de la presente descripción son útiles para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la actividad de CD73, que incluyen, por ejemplo, 5 cáncer, enfermedades inflamatorias, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, trastornos inmunomoduladores, enfermedades del sistema nervioso central y diabetes.

En función de los roles persuasivos de CD73, en múltiples mecanismos inmunosupresores, el desarrollo de inhibidores puede estimular el sistema inmunitario 10 para suprimir la evolución de tumores. Los anticuerpos anti-CD73 pueden usarse, solos o en combinación con otras terapias, para el tratamiento del cáncer de vejiga, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), metástasis pulmonar), melanoma (por ejemplo, melanoma metastásico), cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de 15 esófago, cáncer de próstata, cáncer de piel, cáncer de tiroides, cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular), cáncer de útero, cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, carcinoma de cabeza y cuello de células escamosas), y carcinoma de células renales. En algunas modalidades, el cáncer de próstata es carcinoma de próstata metastásico resistente a la castración (mCRPC). En algunas modalidades, el cáncer 20 colorrectal es carcinoma colorrectal (CRC).

En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico), melanoma, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas, cáncer de próstata, 25 cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de vejiga, cáncer de piel, cáncer de útero, cáncer renal, cáncer gástrico o sarcoma. En algunas modalidades, el sarcoma es un tumor de Askin, sarcoma botrioide, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, hemangioendotelioma maligno, schwannoma maligno, osteosarcoma, sarcoma alveolar de partes blandas, angiosarcoma, cistosarcoma filoides, dermatofibrosarcoma protuberans, tumor desmoide, tumor desmoplásico de 30 células redondas pequeñas, sarcoma epiteliode, condrosarcoma esquelético, osteosarcoma esquelético, fibrosarcoma, tumor estromal gastrointestinal (GIST),

hemangiopericitoma, hemangiosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiosarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, linfosarcoma, tumor maligno de la vaina del nervio periférico (MPNST), neurofibrosarcoma, rabdomiosarcoma, sarcoma sinovial o sarcoma pleomórfico indiferenciado.

5 En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello), cáncer colorrectal, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC)), melanoma, cáncer de ovario, vejiga, hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular) o carcinoma de células renales.

10 En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es mesotelioma o adenocarcinoma. En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es mesotelioma. En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es adenocarcinoma.

Las MDSC (células supresoras derivadas de mieloides) son un grupo heterogéneo de células inmunitarias del linaje mieloide (una familia de células originadas a partir de las células madre de la médula ósea). Las MDSC se expanden fuertemente en situaciones patológicas tales como infecciones crónicas y cáncer, como resultado de una hematopoyesis alterada. Las MDSC se distinguen de otros tipos de células mieloides en que poseen actividades inmunosupresoras fuertes en vez de propiedades inmunoestimuladoras. De forma similar a las células mieloides, las MDSC interactúan con otros tipos de células inmunitarias, que incluyen linfocitos T, células dendríticas, macrófagos y linfocitos citolíticos naturales para la regulación de sus funciones. En algunas modalidades, los compuestos, etc. que se describen en la presente pueden utilizarse en métodos relacionados con tejido canceroso (por ejemplo, tumores) con una infiltración elevada de MDSC, incluso tumores sólidos con un nivel basal elevado de macrófagos y/o infiltración de MDSC.

25 En algunas modalidades, los anticuerpos de la descripción pueden utilizarse en el tratamiento de la inflamación pulmonar, que incluye fibrosis pulmonar inducida por bleomicina y lesión relacionada con la deficiencia de adenosina desaminasa.

En algunas modalidades, los anticuerpos de la descripción pueden utilizarse como tratamiento para enfermedades inflamatorias tales como reacciones alérgicas (por ejemplo, reacciones alérgicas dependientes de CD73) y otras reacciones inmunitarias

dependientes de CD73. Otras enfermedades inflamatorias que pueden tratarse mediante los anticuerpos de la descripción incluyen trastornos respiratorios, sepsis, lesión por reperfusión y trombosis.

En algunas modalidades, los anticuerpos de la descripción pueden utilizarse como un
5 tratamiento para enfermedades cardiovasculares, tales como enfermedad arterial coronaria (infarto de miocardio, angina de pecho, insuficiencia cardíaca), enfermedad cerebrovascular (apoplejía, ataque isquémico transitorio), arteriopatía periférica, y aneurisma y aterosclerosis aórtica. La aterosclerosis es un factor etiológico subyacente en muchos tipos de enfermedades cardiovasculares. La aterosclerosis comienza en la
10 adolescencia con vetas de grasa, que evolucionan a placas en la edad adulta y finalmente eventos trombóticos que provocan la oclusión de los vasos sanguíneos, lo que conduce a una morbilidad y mortalidad clínicamente significativas.

En algunas modalidades, los anticuerpos de la descripción pueden utilizarse como un tratamiento para trastornos de la actividad motora; deficiencia provocada por la
15 degeneración del sistema dopaminérgico estriatonigral; y enfermedad de Parkinson; algunos de los síntomas que motivan la depresión.

En algunas modalidades, los compuestos de la descripción pueden utilizarse como un tratamiento para la diabetes y trastornos relacionados, tales como resistencia a la insulina. La diabetes afecta la producción de adenosina y la expresión de los
20 receptores de adenosina A2B (A2BR) que estimulan la producción de IL-6 y CRP, la resistencia a la insulina y la asociación entre los polimorfismos de nucleótido simple del gen A2BR (ADORA2B SNP) y marcadores inflamatorios. La mayor señalización de A2BR en la diabetes puede aumentar parcialmente la resistencia a la insulina al elevar los mediadores proinflamatorios. Los anticuerpos anti-CD73 selectivos pueden ser
25 útiles para tratar la resistencia a la insulina.

Los términos «individuo», «paciente» o «sujeto», utilizados de forma indiferente, hacen referencia a cualquier animal, incluso mamíferos, preferentemente ratones, ratas, otros roedores, conejos, perros, gatos, cerdos, ganado, ovejas, caballos o primates y, más preferentemente, seres humanos (es decir, un sujeto humano).

30 La expresión «cantidad terapéuticamente eficaz» hace referencia a la cantidad de anticuerpo activo o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o

medicinal buscada en un tejido, sistema, animal, individuo o ser humano por un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro médico.

Tal como se usan en la presente, los términos «tratar» o «tratamiento» hacen referencia a uno o más de (1) inhibir la enfermedad; por ejemplo, inhibir una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que padece o presenta la patología o sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno (es decir, detener el desarrollo adicional de la patología y/o sintomatología); y (2) mejorar la enfermedad; por ejemplo, mejorar una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que padece o presenta la patología o sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno (es decir, revertir la patología y/o sintomatología) tal como reducir la gravedad de la enfermedad.

En algunas modalidades, los anticuerpos de la invención son útiles para la prevención o la reducción del riesgo de desarrollar cualquiera de las enfermedades mencionadas en la presente, por ejemplo, prevenir o reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad, una afección o un trastorno en un individuo que presente predisposición a la enfermedad, la afección o el trastorno, pero todavía no padezca ni presente la patología o sintomatología de la enfermedad.

Composiciones farmacéuticas

Es posible formular un anticuerpo anti-CD73 descrito en la presente como una composición farmacéutica para administración a un sujeto, por ejemplo, para tratar un trastorno descrito en la presente. Típicamente, una composición farmacéutica incluye un portador farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en la presente, un «portador farmacéuticamente aceptable» incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles. La composición puede incluir una sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una sal de adición de ácido o una sal de adición de base (véase, por ejemplo, Berge, S.M., et ál. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19).

La formulación farmacéutica es una técnica consolidada y se describe de manera adicional, por ejemplo, en Gennaro (ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20.^a ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel

et ál., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7.^a Ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727); y Kibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 3.^a ed. (2000) (ISBN: 091733096X).

- 5 Las composiciones farmacéuticas pueden encontrarse en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida puede depender de la aplicación terapéutica y el modo de
- 10 administración previstos. Típicamente, las composiciones de los agentes que se describen en la presente se encuentran en forma de soluciones inyectables o infundibles.

- La composición puede formularse como una solución, una microemulsión, una dispersión, un liposoma u otra estructura ordenada adecuada para el almacenamiento
- 15 estable en una concentración alta. Es posible preparar soluciones inyectables estériles mediante la incorporación de un agente que se describe en la presente en la cantidad necesaria en un solvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido por esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de un
- 20 agente que se describe en la presente en un vehículo estéril que contenga un medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios a partir de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son el secado al vacío y la liofilización que producen un polvo de un agente que se describe en la
- 25 presente más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución filtrada previamente en condiciones estériles. La fluidez adecuada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, al mantener el tamaño de partícula necesario en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede
- 30 lograrse mediante la inclusión en la composición de un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-CD73 puede prepararse con un portador que protegerá al compuesto contra la liberación rápida, por ejemplo, una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Es posible usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de esas formulaciones se encuentran patentados o son de conocimiento general. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York (1978).

Administración

El anticuerpo anti-CD73 puede administrarse a un sujeto, por ejemplo, un sujeto que lo necesita, por ejemplo, un sujeto humano, a través de diversos métodos. Para muchas aplicaciones, la vía de administración es una de las siguientes: inyección o infusión intravenosa (IV), inyección subcutánea (SC), inyección intraperitoneal (IP) o intramuscular. También es posible usar la administración intraarticular. Se pueden usar otros modos de administración parenteral. Algunos ejemplos de dichos modos incluyen: inyección intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbitaria, intracardiaca, intradérmica, transtraqueal, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal. En algunos casos, la administración puede ser oral.

La vía y/o el modo de administración del anticuerpo también pueden adaptarse para el caso individual, por ejemplo, mediante el monitoreo del sujeto, por ejemplo, mediante el uso de imagenología tomográfica, por ejemplo, para visualizar un tumor.

El anticuerpo puede administrarse como una dosis fija o en una dosis de mg/kg de peso del paciente. La dosis también puede elegirse para reducir o evitar la producción de anticuerpos contra el anticuerpo anti-CD73. Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada, por ejemplo, una respuesta terapéutica o un efecto terapéutico combinatorio. En general, las dosis del anticuerpo anti-CD73 (y opcionalmente un segundo agente) pueden usarse con el fin de proporcionar a un sujeto el agente en cantidades biodisponibles.

Las formas de dosificación unitaria o «dosis fija» o «dosis constante», tal como se usan en la presente, hacen referencia a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico necesario, y opcionalmente, en asociación con el otro agente. Pueden proporcionarse dosificaciones únicas o múltiples. De manera alternativa o adicional, el anticuerpo puede administrarse a través de una infusión continua.

Los siguientes son ejemplos de la práctica de la invención. No deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención de forma alguna.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor la invención reivindicada y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención. En la medida en que se mencionan materiales específicos, es meramente con fines ilustrativos y no se pretende limitar la invención. Un experto en la técnica puede desarrollar medios o reactivos equivalentes sin el ejercicio de la capacidad inventiva y sin apartarse del alcance de la invención.

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos monoclonales anti-CD73 humana

Para generar anticuerpos monoclonales anti-CD73 humana, se inmunizaron ratones con proteína CD73 humana recombinante (SEQ ID NO:70) que comprende una etiqueta HIS en el extremo C y se aislaron linfocitos B del bazo y los ganglios linfáticos de ratón. Se determinaron las secuencias de anticuerpos de los linfocitos B mediante el uso de secuenciación de linfocitos B en pares de VH/VL 10x Genomics. Los pares de VH/VL murinos se expresaron como quimeras de Fc hulgG1 (SEQ ID NO: 73 y 74) y se evaluaron para determinar su unión y funcionalidad. Mediante este proceso se produjo un anticuerpo denominado CL25. La Tabla 1 anterior muestra las secuencias de aminoácidos de CDR de CL25 de acuerdo con la numeración IMGT, Chothia, AbM, Kabat y Contact, y VH, VL, cadena pesada y cadena ligera maduros.

Se humanizó el anticuerpo quimérico CL25 (que comprende el VH murino de la SEQ

ID NO:26 y el VL murino de la SEQ ID NO:27) para minimizar la inmunogenicidad de los marcos de anticuerpo, mientras se mantiene la actividad específica. La humanización se llevó a cabo mediante la alineación de VH y VL con una base de datos de genes de VH y VK humanos. Las CDR (**Tabla 1**) del anticuerpo CL25 murino se injertaron en diversos genes principales de VH y VK humanos. Las secuencias de VH y VL de los anticuerpos de CL25 humanizados ilustrativos se representan en la **FIGURA 1A-FIGURA 1C**. Las alineaciones de VH y VL de CL25 y los anticuerpos CL25 humanizados ilustrativos se representan en la **FIGURA 1D** y la **FIGURA 1E**, respectivamente. También se evaluaron diversas mutaciones de marco presentes en el CL25 murino junto con las CDR murinas (**FIGURA 1A-FIGURA 1E**). La versión humanizada de CL25 con un VH de la SEQ ID NO:22 y un VL de la SEQ ID NO:23, denominada en la presente «HzCL25», se seleccionó para estudios adicionales. La Tabla 2 anterior muestra las secuencias de aminoácidos de CDR de HzCL25 de acuerdo con la numeración IMGT, Chothia, AbM, Kabat y Contact, y VH, VL, cadena pesada y cadena ligera maduros.

Ejemplo 2: Unión de anticuerpos monoclonales anti-CD73 humana a CD73 en la superficie celular

Para evaluar la unión de clones de CL25 humanizados y no humanizados a CD73 en la superficie celular, se lavaron células MDA-MB-231 o A375 y se agregaron a placas de 96 pocillos a 5×10^4 células/pocillo. Las células se tiñeron con la concentración indicada de anticuerpos durante 30 minutos en hielo (**FIGURA 2A** y **FIGURA 2B**). A continuación, las células se lavaron y se tiñeron mediante el uso de secundario de cabra anti-ratón conjugado con ficoeritrina (PE) durante 30 minutos en hielo. A continuación, las células se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo. Se representó gráficamente la intensidad de fluorescencia media geométrica (GMFI) de la tinción de CD73 (**FIGURA 2A** y **FIGURA 2B**). Tanto CL25 como HzCL25 mostraron una unión de alta potencia a células con altos niveles de CD73 en la superficie (células MDA-MB-231) y niveles moderados de CD73 en la superficie (tal como se evaluó en células A375).

Ejemplo 3: Inhibición de CD73 celular mediada por anticuerpos monoclonales anti-CD73 humana

Para medir la capacidad del anticuerpo anti-CD73 para inhibir la actividad de CD73 en las células, se lavaron células A375 y MDA-MB-231 con medio RPMI libre de suero (ThermoFisher) y se colocaron en placas de 96 pocillos en una concentración de 8×10^4 células/pocillo para A375 o 1×10^4 células/pocillo para MDA-MB-231. Las células se incubaron con la concentración indicada de anticuerpos o APCP a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 30 minutos (**FIGURA 3A**, **FIGURA 3B**, y **FIGURA 3C**). A continuación, se agregó monofosfato de adenosina (AMP) hasta una concentración final de 100 µM y las células se incubaron 3 horas más a 37°C, 5 % de CO₂. Las placas se centrifugaron durante 1-2 minutos a 300 g, y se transfirieron 25 µL de sobrenadante a placas nuevas de 96 pocillos. Se usó un ensayo AMP-Glo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega). La unidad de luminiscencia relativa (RLU) se correlaciona directamente con la concentración de AMP en este ensayo. Los resultados se representan en la **FIGURA 3A**, la **FIGURA 3B**, y la **FIGURA 3C**.

Tanto CL25 como HzCL25 tuvieron una buena potencia en la inhibición de CD73 celular en ambos tipos de células evaluadas (**FIGURA 3A**, **FIGURA 3B**, y **FIGURA 3C**). HzCL25 tuvo una capacidad similar a CL25 para inhibir CD73 celular (**FIGURA 3A**, **FIGURA 3B**, y **FIGURA 3C**).

Ejemplo 4: Inhibición de CD73 soluble mediada por anticuerpos monoclonales anti-CD73 humana

Para medir la capacidad del anticuerpo anti-CD73 para inhibir la actividad de CD73 de la proteína recombinante, se agregó CD73 recombinante humana (rhuCD73) (SEQ ID NO:70) a placas de 96 pocillos en una concentración final de 0,008 µg/mL con la concentración indicada de anticuerpos (**FIGURA 4**) o adenosina 5'-[α,β-metileno]difosfato (APCP) y se incubó a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 30 minutos. Después de la incubación de 30 minutos, se agregó AMP en una concentración final de 100 µM, y las reacciones se incubaron durante 3 horas más a 37 °C, 5 % de CO₂. Se transfirieron 25 µL de sobrenadante a placas nuevas de 96 pocillos. Se usó el ensayo AMP-Glo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La RLU se

correlaciona directamente con la concentración de AMP en este ensayo. Los resultados se representan en la **FIGURA 4**. Tanto CL25 como HzCL25 mostraron una alta potencia y ningún efecto de gancho (**FIGURA 4**). HzCL25 tuvo una capacidad similar a CL25 para inhibir CD73 celular (**FIGURA 4**).

5

Ejemplo 5: Inversión mediada por anticuerpos monoclonales anti-CD73 humana de la supresión de la proliferación de linfocitos T mediada por AMP

Para medir la capacidad de los anticuerpos de CD73 para invertir la supresión de la proliferación de linfocitos T mediada por AMP, se purificaron linfocitos T CD4⁺ humanos primarios a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante el uso de un kit de aislamiento de linfocitos T CD4⁺ humanos (Miltenyi Biotec). Se marcaron los linfocitos T CD4⁺ con 1 μ M de carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) (BD Biosciences) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células marcadas con CFSE se resuspendieron en RPMI que contenía suero bovino fetal al 10 % y 60 IU/ml de IL-2 humana recombinante. Se agregaron aproximadamente 50.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Se agregaron perlas de CD3/CD28 activadoras de linfocitos T humanos Dynabeads a la suspensión de células en una relación de perla:célula de 1:1 y se incubaron durante 1 hora a 37 grados C. Se agregaron diluciones en serie de los anticuerpos en los pocillos indicados y se incubaron durante 30 minutos a 37 grados C. Finalmente, se agregó AMP en una concentración final de 1000 μ M y todo el cultivo se incubó durante 5 días a 37 grados C en la incubadora. Después de 5 días, se determinó la proliferación de linfocitos T CD4⁺ mediante análisis de citometría de flujo basado en CFSE mediante el uso de un analizador LSRFORTESSA X-20 (BD Biosciences).

El anticuerpo anti-CD73 invirtió la supresión de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ mediada por AMP de una manera dependiente de la concentración en múltiples donantes humanos diferentes (**FIGURAS 5A-5N**).

Ejemplo 6: Afinidad de unión

La actividad enzimática de CD73 requiere la unión del sustrato en la conformación abierta. Después de la unión del sustrato, CD73 tiene que pasar por un gran cambio

conformacional de conformación abierta a cerrada para convertir AMP en adenosina. La unión de anticuerpos que inhibe o modula este cambio conformacional disminuirá potencialmente la tasa de conversión de AMP en adenosina.

Para evaluar la afinidad de unión de HzCL25, se realizó resonancia de plasmones superficiales (SPR) mediante el uso de un instrumento Biacore 8K (GE Healthcare) a 25 °C. El amortiguador de ejecución de SPR (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y tensioactivo P20 al 0,05 % v/v, pH 7,4) se preparó a partir de amortiguador HBS-EP 10X (GE Healthcare). Se inmovilizaron anticuerpos anti-Fc humanos (GE Healthcare) mediante acoplamiento de amina en las dieciséis celdas de flujo de un chip sensor CM5 de la serie S (GE Healthcare). Los niveles de inmovilización fueron ~9000 RU para todas las celdas de flujo. El nivel de captura deseado de anticuerpo anti-CD73 se logró haciendo mediante el flujo de la concentración apropiada de anticuerpo anti-CD73 a través de la celda de flujo activa de cada canal. Puede usarse el análogo de ADP no escindible APCP (adenosina-5'-(α , β -metileno) difosfato) con la presencia de Zn^{2+} para cambiar el equilibrio conformacional de CD73 de abierto a cerrado. Por lo tanto, la CD73 recombinante se incubó con amortiguador de ejecución SPR en presencia de 100 μ M de APCP y 10 μ M de $ZnCl_2$ (amortiguador de ejecución SPR cerrado) para estudiar la unión del anticuerpo anti-CD73 a la CD73 en la conformación cerrada. Para lograr esto, se utilizó la función de inyección de ABA en Biacore 8K. Para la conformación abierta, la secuencia de inyección de ABA comenzó con una inyección de 60 segundos de amortiguador de ejecución. A continuación, se inyectaron series de concentración de dilución en serie de 3 veces CD73 preparadas a partir de la solución madre de CD73 (BPS Bioscience) y amortiguador de ejecución durante 180 segundos, seguido inmediatamente por amortiguador de ejecución durante 240 segundos. Para la conformación cerrada, el amortiguador de ejecución SPR normal se reemplazó con el amortiguador de ejecución SPR cerrado. La superficie se regeneró con 30 segundos de inyección de $MgCl_2$ 3 M. La cinética de unión y los parámetros de afinidad se obtuvieron a partir de un ajuste global de los datos al modelo de unión 1 a 1. Las afinidades de unión y la asociación cinética y las constantes de velocidad de disociación para CD73 humana, de cynomolgus y de ratón

en conformaciones abiertas o cerradas se muestran en la **Tabla 6** a continuación. Los resultados de la Tabla 6 garantizan que los datos farmacocinéticos de cynomolgus reflejarán los datos farmacocinéticos humanos.

- 5 **Tabla 6:** Afinidades de unión y asociación cinética y constantes de velocidad de disociación para CD73 humana (SEQ ID NO:70), de cynomolgus (SEQ ID NO:72) y de ratón (SEQ ID NO:71) en conformaciones abiertas o cerradas para los anticuerpos (Ab) indicados.

Ab	CD73	Abierto			Cerrado		
		k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
CL25	Human o	> 1E+06	3,94E-04	< 3,94E-10	9,03E+05	3,44E-04	3,81E-10
	Cynomolgus	> 1E+06	6,58E-04	< 6,58E-10	9,36E+05	4,95E-04	5,29E-10
	Murino	Sin unión			Sin unión		
HzCL25	Human o	>1E+06	4,49E-04	<4,49E-10	No se realizó		
	Cynomolgus	>1E+06	4,68E-04	<4,68E-10	No se realizó		
	Murino	Sin unión			No se realizó		
CL25_hu_8-4	Human o	7,70E+05	1,76E-03	2,29E-09	No se realizó		
CL25_hu_8-5	Human o	>1E+06	9,49E-04	7,18E-10	No se realizó		
CL25_hu_8-6	Human o	7,15E+05	1,11E-03	1,55E-09	No se realizó		
CL25_hu_9-4	Human o	3,82E+05	2,64E-03	6,90E-09	No se realizó		
CL25_	Human	5,65E+0	1,14E-03	2,02E-09	No se realizó		

hu_9-5	o	5			
CL25_ hu_9-6	Human o	4,24E+0 5	9,53E-04	2,25E-09	No se realizó
CL25_ hu_10-4	Human o	8,87E+0 5	1,07E-03	1,20E-09	No se realizó
CL25_ hu_10-6	Human o	5,24E+0 5	9,20E-04	1,75E-09	No se realizó
CL25_ hu_11-4	Human o	6,24E+0 5	1,55E-03	2,48E-09	No se realizó
CL25_ hu_11-5	Human o	7,99E+0 5	1,17E-03	1,46E-09	No se realizó
CL25_ hu_11-6	Human o	5,50E+0 5	1,01E-03	1,84E-09	No se realizó

Ejemplo 7: Mapeo de epítomos

Para mapear el epítipo de CL25, se realizó espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno-deuterio (HDX). Se incubó CD73 en óxido de deuterio solo o en complejo con Fab de CL25. El intercambio de deuterio se llevó a cabo a 20 °C durante 0 segundos, 60 segundos, 600 segundos o 3600 segundos. La reacción de intercambio se inactivó con un pH bajo y las proteínas se digirieron con pepsina/proteasa VIII. Se monitorearon los niveles de deuterio en los péptidos identificados a partir del cambio de masa en LC-MS. Se graficaron las curvas de acumulación de deuterio durante el tiempo de intercambio para todos los péptidos en función del tiempo. Los péptidos con una reducción significativa en la absorción de deuterio al unirse a Fab se asignaron como los epítomos para cada anticuerpo. El epítipo determinado mediante HDX-MS

para CL25 se mapea en la estructura cristalina de CD73 humano (4H2F.pdb) (**FIGURA 6**) y es TKVQQIRRAEPNVL (SEQ ID NO:76) (es decir, los aminoácidos 40-53 de SEQ ID NO:70).

5 **Ejemplo 8: Niveles de CD73 en la superficie celular**

Para medir la cantidad de CD73 en la superficie celular después de tratamiento con anticuerpos, se resuspendieron células MDA-MB-231 en el medio (RPMI-1640 con FBS al 10 %) y se sembraron en placas de 96 pocillos a 1×10^5 células/pocillo. Se agregaron los anticuerpos indicados en una concentración final de 10 $\mu\text{g/mL}$ y las

10 placas se incubaron a 37 °C, 5 % de CO_2 durante 24 horas. Las células se recuperaron mediante el uso de Versene y se transfirieron a placas nuevas de 96 pocillos. Las células se lavaron y se tiñeron durante 30 minutos en hielo con 10 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo no competitivo conjugado directamente con Dy650. Las células se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo. La densidad del receptor de CD73 en la

15 superficie celular se determinó mediante la capacidad de unión de anticuerpos (ABC) mediante el uso de perlas Quantum Simply Cellular. El tratamiento de las células con CL25 durante 24 horas redujo los niveles de CD73 en la superficie celular (**FIGURA 7**).

20 **Ejemplo 9: Efecto del anticuerpo anti-CD73 sobre el crecimiento tumoral**

Se evaluó la eficacia *in vivo* del anticuerpo CL25. Se suspendió HzCL25 en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) 1x (Life Technologies) para la dosificación intraperitoneal de ratones hu-CD34 NSG (laboratorios Jackson). En este estudio, se incluyó IgG1 humana inhabilitada con 1xPBS y Fc suspendida en 1xPBS como control.

25 Los ratones con sistemas inmunitarios humanizados se adquirieron en Jackson Labs (Bar Harbor, Maine). Brevemente, los ratones NSG/NOD SCID hembra de 3 semanas recibieron una única dosis de irradiación tóxica para los precursores de células inmunitarias, y luego, fueron «rescatados» mediante la inyección de células CD34^+ seleccionadas de la sangre del cordón umbilical humano. Después de 12 semanas

30 (para permitir la recuperación y el injerto de las células inmunitarias humanas), los ratones fueron recibidos en el vivero certificado por AALAS en el Instituto de

Investigación Incyte. Los ratones comprendían receptores de tres donantes inmunitarios humanos distintos para representar mejor las variaciones individuales en la respuesta inmunitaria.

El flanco izquierdo de los ratones se afeitó el día antes de la inoculación con 5×10^6 células de la línea de melanoma humano A375 (ATCC, Manassas Virginia) suspendidas en matrigel (Corning Life Sciences, Tewksbury, Mass). El día 11, las dimensiones se midieron del tumor con calibradores Vernier y el volumen se estimó mediante la fórmula Volumen = $[L \text{ (dimensión larga)} \times W^2 \text{ (dimensión corta)}]/2$. Los ratones se asignaron aleatoriamente en 3 grupos de 5 o 6 ratones de volumen promedio aproximado ($\sim 200 \text{ mm}^3$) y representación de donantes. Los tumores se midieron cada 2-4 días durante la duración del estudio.

Se diluyó HzCL25 en PBS hasta concentraciones de 1 y 0,1 mg/ml, y se diluyó un control de isotipo correspondiente (cx00376-001) hasta 1 mg/ml fresco en la mañana de la administración. Cada seis días, a partir del día 11, se administró anticuerpo a los ratones mediante inyección intraperitoneal a 10 ml/kg, logrando dosis eficaces de 1 y 10 mg/kg de peso corporal. Se proporcionó un total de tres dosis.

Cuarenta y ocho horas después de las dosis tercera y final, los ratones fueron sacrificados por asfixia con CO_2 . Los tumores se escindieron, se colocaron en medios que contenían proteasas, se colocaron en hielo y luego se rompieron en suspensiones de células individuales mediante el uso del disruptor de tejido GentleMacs (Miltenyi, Auburn CA). Las células permanecieron en hielo mientras se procesaban para la citometría de flujo y el ensayo enzimático.

Los ratones a los que se administró HzCL25 mostraron inhibición del crecimiento tumoral en ambas dosis; la dosis baja ($p = ,026$, prueba t de dos colas) ralentizó de forma significativa el crecimiento un 56 % (**FIGURA 8**).

Ejemplo 10: Ensayo de actividad enzimática ex vivo

Para evaluar la actividad enzimática de CD73 en ratones portadores de tumores a los que se administró HzCL25, se clasificó la suspensión de células individuales de los homogeneizados tumorales del experimento de la **FIGURA 8** para detectar las células vivas mediante el uso de microperlas de remoción de células muertas (Miltenyi Biotec).

Después de la selección de células, se sembraron en placas 10.000 células vivas por pocillo con 100 μ M de AMP. Como control positivo, se usaron células tratadas con 250 μ M de APCP. Después del tratamiento, se utilizó el kit AMP-glo (Promega; Cat. # V5011) para detectar la actividad enzimática de CD73 según las pautas del fabricante.

- 5 Se usó luminiscencia como una medida para la detección del nivel de AMP y las lecturas de cada animal se normalizaron a las lecturas de los cultivos tratados con APCP, donde se consideró que los cultivos tratados con APCP demostraban una inhibición máxima de la actividad de CD73 (**FIGURA 9**). Tal como se muestra en la **FIGURA 9**, HzCL25 demostró una inhibición dependiente de la dosis de la actividad
- 10 enzimática de CD73 sobre las células tumorales.

Ejemplo 11: CD73 libre en la superficie de tumores tratados con anti-CD73

- Para evaluar la cobertura del receptor después del tratamiento, se tiñeron las suspensiones de células individuales de homogeneizados tumorales del experimento
- 15 de la **FIGURA 8** con anticuerpos conjugados con fluorocromo contra tinte de viabilidad (Biolegend, Cat. # 423110), CD45 humano (Biolegend, Cat. # 304036), CD45 de ratón (BD Biosciences, Cat. # 563410), CD90.2 de ratón (BD Biosciences, Cat. # 565257), y anticuerpo competitivo (anticuerpo CL25 conjugado con AF488) o no competitivo (Anticuerpo X conjugado con PE). Las células se procesaron y se analizaron mediante
- 20 el uso del analizador de citometría de flujo BD FACSymphony y el paquete de software FlowJo, respectivamente. El análisis se realizó mediante la selección de la población de células vivas, seguido por exclusión de células de ratón y células inmunitarias humanas, centrándose en la población de células tumorales. Los niveles totales de CD73 en las células tumorales se detectaron mediante el uso de un anticuerpo CD73
- 25 no competitivo marcado con fluoróforo. De manera dependiente de la dosis, HzCL25 disminuyó los niveles totales de CD73 en las células tumorales (**FIGURA 10A**). De las células que expresan CD73 según se mide en la **FIGURA 10A**, se midió el CD73 libre en la superficie mediante el uso de un anticuerpo competitivo marcado con fluoróforo (CL25) (**FIGURA 10B**). El tratamiento con HzCL25 demostró una disminución
- 30 dependiente de la dosis en CD73 libre en la superficie (**FIGURA 10B**). Además, esta reducción en los niveles de CD73 libre en la superficie para ambas dosis fue

significativamente menor en comparación con los tumores tratados con IgG (**FIGURA 10B**).

Ejemplo 12: Estudios de farmacocinética y farmacodinamia in vivo del anticuerpo anti-CD73

Para evaluar la eficacia de HzCL25 *in vivo*, ratones hembra con reconstitución de CD34⁺ humanas (de 21 semanas; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) se inocularon por vía subcutánea con 5×10^6 células de melanoma humano A375 (ATCC# CRL-1619). El tratamiento de los ratones portadores de tumores comenzó 7 días después de la inoculación cuando el tumor alcanzó aproximadamente 330 mm³. A los ratones NSG humanizados injertados en A375 se les administró por vía intraperitoneal HzCL25 a 10 mg/kg cada 5 días. Los animales del estudio recibieron un total 6 dosis de anticuerpo, con la dosis final el día 32. Se extrajeron los tumores de ratones con tumores superiores al 10 % de su peso corporal los días 26 y 29, y de todos los animales restantes el día 33. Se extrajo suero de todos los animales el día 26, nuevamente de los ratones con tumores superiores al 10 % de su peso corporal el día 29, y de todos los animales restantes el día 33. Durante 26 días (momento en el que el grupo de control de IgG había alcanzado su criterio de valoración de eficacia promedio), HzCL25 proporcionó una modesta, pero insignificante, inhibición del crecimiento tumoral del 14 % (**FIGURA 11A**). Sin embargo, la dosificación prolongada durante 32 días mostró diferencias marcadas en las tasas de crecimiento tumoral y la supervivencia entre los animales tratados con HzCL25 y los ratones restantes que recibieron el control de IgG (**FIGURA 11B**).

Se inició un estudio farmacodinámico (PD) separado el día 22 con HzCL25 a 10 mg/kg cada 3 días para un total de 2 dosis de anticuerpo. Los tumores de los animales de PD se extrajeron el día 27, 48 horas después de la segunda dosis de anticuerpo. Para medir el CD73 humano soluble (hCD73) en sueros de ratón después del tratamiento con anticuerpos, se recubrieron placas MSD con un anticuerpo de IgG de captura no competitivo a 1 µg/mL y se incubaron a 4 °C durante la noche. Las placas se lavaron y se agregaron muestras de suero de ratón diluido 1:5. Se generó una curva estándar mediante el uso de CD73 humano recombinante (rhuCD73). Las placas se incubaron

durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación a 600 rpm. Las placas se lavaron y se añadieron a las placas anticuerpos competitivos (HzCL25) o no competitivos (Anticuerpo X) directamente conjugados a la etiqueta sulfo a 1 µg/mL y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación a 600 rpm. Las

5 placas se lavaron, y se agregó 150 µL de amortiguador de lectura, y se analizaron mediante el uso de un lector de placas MSD. Se calcularon los niveles de hCD73 soluble de sueros de ratón a partir de la curva estándar. Aunque el tratamiento con HzCL25 estabilizó ligeramente el CD73 humano soluble en ratones, el nivel de CD73 humano soluble estaba todavía muy por debajo del nivel de anticuerpo en los ratones

10 (FIGURA 12).

Ejemplo 13: Generación del anticuerpo monoclonal anti-CD73 humana 3-F03

Para generar anticuerpos monoclonales anti-CD73 humana adicionales, se realizaron múltiples rondas de selección de una biblioteca de donantes individuales. La biblioteca

15 de aproximadamente 1,5E12 de partículas de fago se enriqueció durante tres rondas de cribado mediante el uso de CD73 humano biotinilado 200 nM (SEQ ID NO:70). Los casetes de scFv de este grupo se recombinaron luego en un vector de presentación en levaduras y se creó una biblioteca de aproximadamente 5,4E7. Esta biblioteca se seleccionó mediante FACS para tres rondas mediante el uso de CD73 murino

20 biotinilado 100 nM (SEQ ID NO:71). Se obtuvieron secuencias únicas a partir de la salida de clasificación final mediante secuenciación de Sanger de colonias de levadura. Se identificó la secuencia de scFv de 3-F03 de levadura a partir de este grupo, y contenía un VH de la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:77 y un VL de la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID NO:65.

25 Para construir un anticuerpo 3-F03 humano de longitud completa, las secuencias de scFv de 3-F03 de levadura se modificaron antes de la clonación en un andamiaje de IgG1 humano que comprende la región constante de IgG1 humana indicada en la SEQ ID NO:73 y la región constante de cadena ligera kappa humana indicada en la SEQ ID NO:74. Para el VH, se eliminó el glutamato del extremo N (E) de la SEQ ID NO:77, y

30 se sustituyó la treonina (T) en la posición H77 de Kabat de la SEQ ID NO:77 (es decir, la posición 78 de la SEQ ID NO:77) con una alanina (A). Para el VL, se eliminó la

alanina del extremo N (A) de SEQ ID NO:65. El anticuerpo 3-F03 humano de longitud completa resultante contiene el VH y el VL indicados en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:60 y 61, respectivamente. El anticuerpo 3-F03 humano de longitud completa resultante contiene la cadena pesada y la cadena ligera indicadas en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 66 y 31, respectivamente. Este anticuerpo se denomina en la presente «3-F03». La Tabla 3 anterior muestra las secuencias de aminoácidos de CDR de 3-F03 de acuerdo con la numeración IMGT, Chothia, AbM, Kabat y Contact, y de VH, VL, cadena pesada y cadena ligera maduros.

10 **Ejemplo 14: Unión de 3-F03 a CD73 en la superficie celular**

La unión de 3-F03 a CD73 en la superficie celular se realizó tal como se describe en el Ejemplo 2, anteriormente. 3-F03 muestra una gran potencia de unión a células con niveles altos de CD73 en la superficie (MDA-MB-231), y niveles moderados de CD73 (células A375) (**FIGURA 13A** y la **FIGURA 13B**).

15

Ejemplo 15: Inhibición de CD73 celular mediada por 3-F03

Se evaluó la capacidad de 3-F03 para inhibir la actividad de CD73 en las células tal como se describe en el Ejemplo 3, anteriormente. Los resultados se muestran en la **FIGURA 14A** y la **FIGURA 14B**.

20 El clon 3-F03 mostró una inhibición máxima de CD73 celular en ambos tipos de células evaluadas en comparación con el inhibidor de molécula pequeña de CD73, APCP (**FIGURA 14A** y **FIGURA 14B**).

Ejemplo 16: Inhibición de CD73 soluble mediada por 3-F03

25 Se evaluó la capacidad de 3-F03 para inhibir la actividad CD73 de la proteína recombinante tal como se describe en el Ejemplo 4 anteriormente, excepto que se usaron 0,025 ug/mL de rhuCD73. Los resultados se representan en la **FIGURA 15**. El anticuerpo 3-F03 tuvo buena potencia (**FIGURA 15**). El anticuerpo 3-F03 no mostró ningún efecto de gancho.

30

Ejemplo 17: Inversión mediada por anticuerpos monoclonales anti-CD73

humana de la supresión de la proliferación de linfocitos T mediada por AMP

Se evaluó la capacidad de 3-F03 para invertir la supresión de la proliferación de linfocitos T mediada por AMP tal como se describe en el Ejemplo 5 anteriormente. 3-F03 invirtió la supresión de la proliferación de linfocitos T CD4+ mediada por AMP de manera dependiente de la concentración en múltiples donantes humanos diferentes (FIGURAS 16A-16D).

Ejemplo 18: Afinidad de unión del anticuerpo anti-CD73

Se evaluó la afinidad de unión de 3-F03 tal como se describe en el Ejemplo 6, anteriormente. Las afinidades de unión y la asociación cinética y las constantes de velocidad de disociación para CD73 humana, de cynomolgus y de ratón en conformaciones abiertas o cerradas se muestran en la **Tabla 7** a continuación.

Tabla 7: Afinidades de unión y la asociación cinética y las constantes de velocidad de disociación para CD73 humana, de cynomolgus y de ratón en conformaciones abiertas o cerradas.

Nombre de la muestra	CD73	Abierto			Cerrado		
		k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
3-F03	Humano	2,15E+05	7,96E-05	3,70E-10	Sin unión		
	Cynomolgus	3,01E+05	2,21E-04	7,34E-10	Sin unión		
	Murino	2,17E+05	3,60E-04	1,66E-09	Sin unión		

Ejemplo 19: Mapeo de epítomos de 3-F03

Se mapeó el epítopo de 3-F03 tal como se describe en el Ejemplo 7, anteriormente.

Los epítomos determinados mediante HDX-MS para 3-F03 se mapean en la estructura cristalina de CD73 humano (4H2F.pdb) (**FIGURA 17**) y son AAVLPFGGTFDLVQ (SEQ ID NO:78) (es decir, los aminoácidos 386-399 de la SEQ ID NO:70) e ILPNFLANGGDGFQMIKDEL (SEQ ID NO:79) (es decir, los aminoácidos 470-489 de la SEQ ID NO:70).

Ejemplo 20: Efecto de 3-F03 sobre los niveles de CD73 en la superficie celular

Se evaluó la cantidad de CD73 en la superficie celular después del tratamiento con 3-F03 tal como se describe en el Ejemplo 8, anteriormente. 3-F03 disminuyó drásticamente el nivel de CD73 detectable en la superficie celular en comparación con un anticuerpo de control de isotipo o células no tratadas (**FIGURA 18**).

Ejemplo 21: Estudios *in vivo*

Se evaluó la eficacia *in vivo* de 3-F03 tal como se describe en el Ejemplo 12, anteriormente. Durante 26 días, momento en el que el grupo de control de IgG había alcanzado su criterio de valoración de eficacia promedio, 3-F03 proporcionó una modesta, pero estadísticamente insignificante, inhibición del crecimiento tumoral del 8 % (**FIGURA 19A**). Sin embargo, la dosificación prolongada durante 32 días mostró diferencias marcadas en las tasas de crecimiento tumoral y la supervivencia entre los animales tratados con 3-F03 y los ratones restantes que recibieron el control de IgG (**FIGURA 19B**).

También se evaluaron las propiedades PD de 3-F03 tal como se describe en el Ejemplo 12, anteriormente. El tratamiento con 3-F03 no estabilizó el CD73 humano soluble en ratones, ya que no hubo un aumento detectable en el CD73 humano soluble total o libre tras el tratamiento con 3-F03 (**FIGURA 20**).

Ejemplo 22: Variantes de 3-F03

Se usaron secuencias de la cadena ligera de 3-F03 (LC, SEQ ID NO:66) y la cadena pesada (HC, SEQ ID NO:31) para construir un modelo de homología. Las **FIGURA 21A-FIGURA 21J** proporcionan las secuencias de aminoácidos del VH y el VL de las variantes ilustrativas de 3-F03. Los anticuerpos que comprenden estas secuencias de

VH y VL contenían la región constante de cadena pesada indicada en la SEQ ID NO:73 y la región constante de cadena ligera indicada en la SEQ ID NO:74. La **Tabla 8** proporciona la afinidad de unión y la cinética de las variantes ilustrativas de 3-F03. Ninguna de las mutaciones evaluadas afectó dramáticamente la unión a CD73 mediante Biacore. Todas las mutaciones evaluadas tenían afinidades diez veces superiores al anticuerpo 3-F03, con la mayoría dentro del doble de 3-F03.

Tabla 8: Afinidad de unión mediante Biacore y cinética de las variantes de 3-F03. - = ausente.

Nombre de la muestra	Mutación realizada (numeración kabat)				k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
	VH1 (E o -)	VH53 (D, E, o S)	VH77 (A o T)	VL1 (A, D, o -)			
3-F03_396	E	D	T	A	1,39E+05	1,78E-04	1,28E-09
3-F03_408	E	D	T	-	1,40E+05	1,86E-04	1,33E-09
3-F03_402	-	D	T	A	1,32E+05	1,84E-04	1,39E-09
3-F03_384	E	D	T	D	1,40E+05	1,98E-04	1,41E-09
3-F03_399	E	D	A	A	1,38E+05	1,97E-04	1,43E-09
3-F03_411	E	D	A	-	1,39E+05	2,04E-04	1,47E-09
3-F03_414	-	D	T	-	1,31E+05	1,98E-04	1,51E-09
3-F03_390	-	D	T	D	1,29E+05	2,12E-04	1,64E-09
3-F03_398	E	E	T	A	9,26E+04	1,59E-04	1,71E-

Nombre de la muestra	Mutación realizada (numeración kabat)				k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
	VH1 (E o -)	VH53 (D, E, o S)	VH77 (A o T)	VL1 (A, D, o -)			
							09
3-F03_387	E	D	A	D	1,37E+05	2,38E-04	1,74E-09
3-F03_386	E	E	T	D	9,23E+04	1,64E-04	1,78E-09
3-F03_401	E	E	A	A	9,15E+04	1,67E-04	1,82E-09
3-F03_413	E	E	A	-	9,13E+04	1,71E-04	1,88E-09
3-F03_405	-	D	A	A	1,26E+05	2,39E-04	1,90E-09
3-F03_410	E	E	T	-	9,01E+04	1,76E-04	1,95E-09
3-F03_389	E	E	A	D	9,17E+04	1,89E-04	2,06E-09
3-F03_393	-	D	A	D	1,14E+05	2,39E-04	2,09E-09
3-F03_417	-	D	A	-	1,34E+05	2,84E-04	2,12E-09
3-F03_392	-	E	T	D	8,08E+04	1,80E-04	2,23E-09
3-F03_404	-	E	T	A	8,35E+04	1,89E-04	2,26E-09
3-F03_419	-	E	A	-	8,28E+04	2,00E-04	2,41E-09

Nombre de la muestra	Mutación realizada (numeración kabat)				k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
	VH1 (E o -)	VH53 (D, E, o S)	VH77 (A o T)	VL1 (A, D, o -)			
3-F03_416	-	E	T	-	9,01E+04	2,21E-04	2,45E-09
3-F03_407	-	E	A	A	8,74E+04	2,35E-04	2,69E-09
3-F03_395	-	E	A	D	7,12E+04	2,10E-04	2,94E-09
3-F03_388	E	S	A	D	1,15E+05	8,68E-04	7,56E-09
3-F03_397	E	S	T	A	6,07E+04	4,89E-04	8,04E-09
3-F03_385	E	S	T	D	6,33E+04	5,38E-04	8,50E-09
3-F03_400	E	S	A	A	6,15E+04	5,29E-04	8,60E-09
3-F03_409	E	S	T	-	6,02E+04	5,46E-04	9,06E-09
3-F03_403	-	S	T	A	5,79E+04	5,41E-04	9,34E-09
3-F03_415	-	S	T	-	5,99E+04	6,06E-04	1,01E-08
3-F03_391	-	S	T	D	5,69E+04	5,84E-04	1,03E-08
3-F03_406	-	S	A	A	7,41E+04	7,65E-04	1,03E-08
3-F03_412	E	S	A	-	5,27E+04	6,38E-04	1,21E-

Nombre de la muestra	Mutación realizada (numeración kabat)				k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
	VH1 (E o -)	VH53 (D, E, o S)	VH77 (A o T)	VL1 (A, D, o -)			
							08
3-F03_394	-	S	A	D	4,84E+04	6,30E-04	1,30E-08
3-F03_418	-	S	A	-	5,55E+04	7,99E-04	1,44E-08

Para evaluar la unión de las variantes de 3-F03 modificadas genéticamente a CD73 en la superficie celular, se lavaron células MDA-MB-231, y se agregaron a placas de 96 pocillos a 5×10^4 células/pocillo. Las células se tiñeron con la concentración indicada de anticuerpos durante 1 hora en hielo. Luego, las células se lavaron y se tiñeron con secundario de cabra anti-ratón conjugado con PE durante 30 minutos en hielo. Luego, las células se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo. Se representa gráficamente el GMFI de la tinción de CD73 (**FIGURA 22**). Cada una de las variantes de 3-F03 tenía un perfil de unión similar, excepto para 3-F03_417, que mostraba un $Y_{m\acute{a}x}$ ligeramente superior (**FIGURA 22**). Estos datos confirman los estudios de Biacore (**Tabla 8**): estas mutaciones no alteraron drásticamente la unión de CD73 humano para estos clones de variantes.

Para evaluar la capacidad de las variantes de 3-F03 para inhibir la actividad de CD73 en las células, se lavaron células MDA-MB-231 con medio RPMI libre de suero y se colocaron en placas de 96 pocillos a 1×10^4 células/pocillo. Las células se incubaron con la concentración indicada de anticuerpos o APCP a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 30 minutos. A continuación, se agregó AMP hasta una concentración final de 100 μ M y las células se incubaron 3 horas más a 37 °C, 5 % de CO₂. Las placas se centrifugaron durante 1-2 minutos a 300 g, y se transfirieron 25 μ L de sobrenadante a placas nuevas de 96 pocillos. Se usó el ensayo AMP-Glo de acuerdo con las instrucciones del

fabricante. RLU está directamente correlacionada con la concentración de AMP en este ensayo. 3-F03 mostró una inhibición máxima entre las variantes de 3-F03 (**FIGURA 23**). Las variantes 3-F03_417, 3-F03_411 y 3-F03_413 mostraron una potencia ligeramente menor en comparación con 3-F03 (**FIGURA 23**). La variante 3-F03_412 no inhibió el CD73 unido a la membrana en las células MDA-MB-231 (**FIGURA 23**).

Ejemplo 23: Niveles de adenosina tumoral de tumores tratados con anticuerpos anti-CD73

Se evaluó la capacidad de HzCL25 y 3-F03 para modular la adenosina intratumoral in vivo. Se inocularon ratones hembra con reconstitución con CD34+ humanas (de 29 semanas; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) por vía subcutánea con 3×10^6 células MDA-MB-231 (ATCC# HTB-26), se suspendieron en matrigel (Corning Life Sciences) en su flanco izquierdo, con tres ratones por grupo de tratamiento. El tratamiento de los ratones portadores de tumores comenzó 10 días después de la inoculación, cuando el volumen tumoral alcanzó aproximadamente 240 mm^3 . HzCL25, 3-F03 o un control de isotipo de IgG se diluyeron hasta 1 mg/ml en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y se administraron a los ratones mediante inyección intraperitoneal en una dosis de 10 mg/kg el día 12, y nuevamente, 5 después, el día 17. El día 18, los ratones se sacrificaron, se escindieron los tumores, se colocaron en criotubos y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido.

Para determinar la concentración de adenosina en los tumores, se cortaron muestras de tejido congeladas y se sometieron a imagenología de espectrometría de masas (MSI) cuantitativa MALDI por triplicado con resolución espacial de $80 \mu\text{m}$. En función de los conjuntos de datos de MSI obtenidos de los cortes de tejido y una serie de diluciones de los estándares detectados en los cortes de control, se obtuvo la cuantificación de adenosina en cortes de tejido seleccionados con un software de múltiples imágenes. Se realizó una correlación entre la curva de calibración y la señal obtenida para determinar la concentración de analitos en cada región de interés. Las regiones que contenían tumores de interés se identificaron mediante tinción con H&E de cortes en serie.

Tal como se demuestra en la **FIGURA 26**, el tratamiento con HzCL25 o 3-F03 dio como resultado una disminución de 35 % y 42 % en las concentraciones de adenosina intratumoral, respectivamente.

5 **Ejemplo 24: Inhibición enzimática de CD73 mediante anticuerpos anti-CD73**

Se investigó el mecanismo molecular de inhibición de 3-F03 y HzCL25 mediante el uso de un ensayo enzimático donde se usó el CD73 recombinante de longitud completa, y se midió la producción de adenosina mediante LCMS. Los datos se analizaron mediante el uso de un modelo de inhibición mixto y los hallazgos para 3-F03 y HzCL25 se resumen en la Tabla 9.

Brevemente, se midieron las potencias de inhibición de los agentes en un ensayo enzimático mediante el uso de adenosina $^{13}\text{C}_{10}$, $^{15}\text{N}_5$ 5'-solución salina de monofosfato de sodio (650676, Sigma) como sustrato y producto de detección, adenosina mediante LC-MS. Los agentes anticuerpos se diluyeron en serie en amortiguador y se transfirió un volumen de 5 μL a una placa de 96 pocillos. Se agregó 20 μL de CD73 recombinante 0,5 pM en amortiguador de ensayo (Tris 25 mM, MgCl_2 5 mM, Brij35 al 0,005 % pH 7,5) a la placa, y se preincubó durante 2 horas a 25 °C. El ensayo se inició mediante la adición de 25 μL de solución que contenía AMP en varias concentraciones. Las reacciones se ejecutaron durante 0,5 h a 25 °C, y luego, se inactivaron con 50 μL de metanol.

Los resultados indicaron que HzCL25 es un inhibidor no competitivo, con un valor de K_i de $0,3 \pm 0,2$ nM, y un valor de α cercano a la unidad (**FIGURA 27**). 3-F03 es un inhibidor mixto con K_i de $1,5 \pm 0,7$ nM y α de 19 ± 12 , lo que indica que 3-F03 tiene una afinidad mayor con respecto a la enzima libre que el sustrato enzimático, y presenta una naturaleza competitiva (**FIGURA 28**).

Además, HzCL25 presentó un efecto de «gancho», donde se observó una pérdida de inhibición para concentraciones altas del agente (**FIGURA 29**). Esto indica que la estequiometría de las interacciones moleculares de HzCL25 y CD73 cambia a medida que cambia su relación de concentración, lo que cambia la población de moléculas de las especies inhibidas a las especies no inhibidas.

Tabla 9. Resumen de los parámetros cinéticos para HzCL25 y 3-F03.

Agente	Mecanismo de acción	K_i (nM)	α	K_m (uM)
3-F03 IgG	Inhibición mixta	$1,5 \pm 0,7$	19 ± 12	$1,4 \pm 0,5$
HzCL25 IgG	Inhibición no competitiva	$0,3 \pm 0,2$	$2,1 \pm 1,7$	$0,9 \pm 0,3$

OTRAS MODALIDADES

Si bien la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de esta, se pretende que la descripción que antecede ilustre y no limite el alcance de la invención, que se define mediante el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones se encuentran dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.