

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 182**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/40** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2015 PCT/US2015/061639**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2016 WO16081748**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2015 E 15816276 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3221363**

54 Título: **Anticuerpos frente a CD73 y sus usos**

30 Prioridad:

**21.11.2014 US 201462083056 P**

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

**22.02.2021**

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)  
Route 206 and Province Line Road  
Princeton, NJ 08543, US**

72 Inventor/es:

**LONBERG, NILS;  
KORMAN, ALAN J.;  
BARNHART, BRYAN C.;  
YAMNIUK, AARON P.;  
SRINIVASAN, MOHAN;  
HENNING, KARLA A.;  
LEI, MING;  
SEGA, EMANUELA;  
GOODENOUGH, ANGELA;  
JURE-KUNKEL, MARIA N.;  
CHEN, GUODONG;  
SACK, JOHN;  
HUANG, RICHARD;  
CORBETT, MARTIN J.;  
MYERS, JOSEPH E.;  
SCHWEIZER, LIANG;  
HATCHER, SANDRA V.;  
HUANG, HAICHUN y  
ZHANG, PINGPING**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 807 182 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos frente a CD73 y sus usos

5 **Antecedentes**

El grupo de Diferenciación 73 (CD73), también denominado ecto-5'-nucleotidasa (ecto-5'NT, EC 3.1.3.5), es una enzima de superficie ligada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) encontrada en la mayoría de los tejidos, pero particularmente expresada en células endoteliales y subconjuntos de células hematopoyéticas (Resta et al., *Immunol. Rev.* 1998;161:95-109 y Colgan et al., *Prinergic Signal* 2006;2:351-60). Se sabe que CD73 cataliza la desfosforilación de nucleósido monofosfatos extracelulares en nucleósidos, tales como la adenosina. La adenosina es una molécula de señalización muy estudiada que media sus efectos biológicos a través de varios receptores, incluyendo A1, A2A, A2B y A3. Se ha demostrado que la adenosina regula la proliferación y la migración de muchos cánceres y que tiene un efecto inmunosupresor a través de la regulación de linfocitos T antitumorales (Zhang et al., *Cancer Res* 2010;70:6.407-11).

Se ha publicado que CD73 se expresa sobre muchos cánceres diferentes, incluyendo cánceres de colon, pulmón, páncreas, ovario, vejiga, leucemia, glioma, glioblastoma, melanoma, tiroides, esofágico, de próstata y mama (Jin et al., *Cancer Res* 2010;70:2.245-55 y Stagg et al., *PNAS* 2010;107:1.547-52). Además, la expresión de CD73 en cáncer se ha ligado a la proliferación incrementada, la migración, la neovascularización, invasividad, metástasis y menor supervivencia del paciente. También se ha propuesto la actividad de CD73 como un marcador de pronóstico en carcinomas tiroideos papilar. Aunque que se ha demostrado que CD73 regula las interacciones célula-célula y célula-matriz sobre las células tumorales, la expresión y la actividad de CD73 también se han ligado a respuestas de linfocito T reducidas y se han implicado en la resistencia a fármaco (Spychala et al., *Pharmacol Ther.* 3000;87:161-73). Por tanto, CD73 puede regular la progresión del cáncer tanto directamente como indirectamente, lo cual resalta su potencial como diana nueva diana terapéutica. Se describe un anticuerpo monoclonal anti-CD73 humana para inhibir la formación de metástasis en cáncer de mama humano induciendo el agrupamiento y la internalización de CD73 expresada sobre la superficie de células cancerosas (Terp et al., *J. Immunol* 2013;191(8):4.165-4.173). Se describe otro anticuerpo humano anti CD73 humana obtenido de una genoteca de expresión en fago scFv para unirse e internalizarse en células de cáncer de mama, para inhibir la actividad enzimática de CD73, y para inhibir el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto (Rus et al., *Mol Cancer, Biomed Central* 2013; 12(1): 11).

Dada la necesidad en curso de estrategias mejoradas para dirigir enfermedades tales como el cáncer, son altamente deseables métodos de regulación de la progresión tumoral a través de mecanismos múltiples, así como métodos para la regulación de la actividad de CD73 y agentes terapéuticos relacionados.

35 **Sumario**

En el presente documento se proporcionan anticuerpos aislados, tales como anticuerpos monoclonales (porciones de unión a antígeno de los mismos), en particular anticuerpos monoclonales humanos, que se unen específicamente a CD73 y que tienen propiedades funcionales deseables. Estas propiedades incluyen unión de alta afinidad a CD73 humana, unión a CD73 de mono (por ejemplo, CD73 de cynomolgus), y la capacidad para inhibir la actividad enzimática de CD73. Los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden usar para inhibir el crecimiento tumoral, reducir la producción de adenosina, estimular una respuesta inmunitaria, y detectar la proteína CD73 en una muestra.

45 Los anticuerpos anti-CD73 de la invención están definidos en las reivindicaciones 1-11.

La presente invención se refiere a anticuerpos aislados que se unen al Grupo de Diferenciación 73 humano (CD73) y comprenden las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden las SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que comprenden las SEQ ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente, en los que el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada que comprende una bisagra de IgG2 y dominio CH1 de IgG2.

55 En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 de la invención se unen dentro de las regiones FTKVQQIRRAEPNVLDDA (SEQ ID NO: 96) y/o LYLPYKVLPGDEVVG (SEQ ID NO: 97) de CD73 humana, por ejemplo, en los que los tramos de epítipo o superposiciones con FTKVQQIRRAEPNVLDDA (SEQ ID NO: 96) y/o LYLPYKVLPGDEVVG (SEQ ID NO: 97) de CD73 humana.

60 En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 de la invención se unen a un epítipo sobre CD73 humana (SEQ ID NO: 1) que incluye todos o una parte de los restos de aminoácidos FTKVQQIRRAEPNVLDDA (SEQ ID NO: 96) y/o LYLPYKVLPGDEVVG (SEQ ID NO: 97). En determinadas realizaciones, el epítipo unido por los anticuerpos anti-CD73 de la invención se determina mediante, por ejemplo, HDX-MS y/o cristalografía.

65 En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 de la invención comprenden las tres CDR de la cadena pesada variables y las tres CDR de la cadena ligera variables que están en los pares de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable de los anticuerpos anti-CD73 representados por las SEQ ID NO: 4 y 12; o las SEQ ID NO:

135 y 12.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 de la divulgación comprenden regiones variables de la cadena pesada y ligera que tienen secuencias de aminoácidos que son al menos un 80 % idénticas, por ejemplo, al menos un 85 % idénticas, al menos un 90 % idénticas, al menos un 95 % idénticas, al menos un 96 % idénticas, al menos un 97 % idénticas, al menos un 98 % idénticas, o al menos un 99 % idénticas o más a las secuencias de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada de los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento, por ejemplo, que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 4, 135, 171 y una región variable de la cadena ligera de los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento, por ejemplo, que comprenden la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 12.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 de la divulgación comprenden las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que son al menos un 80 % idénticas, por ejemplo, al menos un 85 % idénticas, al menos un 90 % idénticas, al menos un 95 % idénticas, al menos un 96 % idénticas, al menos un 97 % idénticas, al menos un 98 % idénticas, o al menos un 99 % idénticas o más (por ejemplo, 100 %), a las secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO: 135 y 12; SEQ ID NO: 4 y 12; o las SEQ ID NO: 171 y 12.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 de la invención comprenden las regiones variables de la cadena pesada y ligera seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 135 y 12; SEQ ID NO: 4 y 12; o las SEQ ID NO: 171 y 12.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo de la invención comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 135 y una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 12.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 de la divulgación tienen secuencias de longitud completa de la cadena pesada y la cadena ligera al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a las secuencias de aminoácidos de cualquier anticuerpo anti-CD73 descritos en el presente documento, por ejemplo, SEQ ID NO: 100 y 102; SEQ ID NO: 133 o 189 (sin lisina C-terminal) y 102; SEQ ID NO: 189 y 102; o una cualquiera de las SEQ ID NO: 188 y 102.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo de la invención comprende una región de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 133 o 189 y una región de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 102.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 de la divulgación son los anticuerpos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o variantes de los mismos. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 de la divulgación se unen al mismo epítipo sobre CD73 que los anticuerpos que tienen las anteriores secuencias de las regiones variables de la cadena pesada y ligera (por ejemplo, anticuerpos CD73.4-2 y/o 11F11-2).

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 de la divulgación comprenden una región constante de la cadena pesada que incluye, por ejemplo, un dominio CH1 humano, un dominio bisagra humano, un dominio CH2 humano, y un dominio CH3 humano en orden desde el extremo N al C, en los que al menos 2 dominios son de un isotipo diferente (por ejemplo, isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Por ejemplo, en determinadas realizaciones, una región constante modificada comprende una bisagra de IgG2 humana y al menos uno de los dominios CH2 y CH3 no es de un isotipo IgG2. En determinadas realizaciones, CH1 es un dominio CH1 de IgG2 humana, por ejemplo, que tiene la secuencia de aminoácidos  
 ASTKGPVFLPAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
 GLYSLSSWTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV (SEQ ID NO: 124). La región constante modificada puede incluir un dominio bisagra de IgG2 humana, por ejemplo, un dominio bisagra de IgG2 humana que reduce la heterogeneidad en la unión a cisteína, por ejemplo, un dominio bisagra de IgG2 humana que tiene una sustitución de aminoácidos en C219, por ejemplo, C219S, relativa a un dominio bisagra de IgG2 humana tipo silvestre (SEQ NO 136), por ejemplo, un dominio bisagra de IgG2 humana que tiene las secuencias de aminoácidos ERKSCVECPAPPVAG (SEQ ID NO: 123). La región constante modificada puede incluir un dominio CH2 de IgG1 humana que reduce o elimina las funciones efectoras, por ejemplo, un dominio CH2 de IgG1 humana que tiene las sustituciones de aminoácidos A330S y P331S, relativas a un dominio CH2 de IgG1 humana de tipo silvestre (SEQ ID NO: 137), por ejemplo, un dominio CH2 de IgG1 humana comprende la secuencia de aminoácidos

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIKAK (SEQ ID NO: 125).

La región constante modificada puede incluir un dominio CH3 de IgG1 humana tipo silvestre, por ejemplo, que tiene la secuencia de aminoácidos

GQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD  
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:  
128).

5 En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 de la invención comprende una región de la cadena pesada modificada que comprende una bisagra de IgG2 y el dominio CH1 de IgG2, con la condición de que el anticuerpo no sea un anticuerpo IgG2, por ejemplo, el anticuerpo no comprende una región constante de la cadena pesada de IgG2 tipo silvestre.

10 En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 de la invención comprenden una cualquiera de las regiones constantes que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 130, 164, 165, 168 y 169, 268, 273, 315, 329, y 332-338.

15 En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 de la invención comprende los dominios VH y VL de 11F11 o CD73.4, y una región constante de la cadena pesada que comprende una bisagra de IgG2 y dominio CH1 de IgG2. La región constante de la cadena pesada puede ser IgG2CS-IgG1.1f (SEQ ID NO: 169) o IgG2CS-IgG1f (SEQ ID NO: 165), en la que "CS" se refiere a "C219S".

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 de la invención presentan al menos una de las siguientes propiedades:

- 20 (a) inhibición de la actividad enzimática de CD73;  
(b) unión a CD73 de cynomolgus;  
(c) internalización de CD73 mediada por anticuerpo dentro de las células, por ejemplo, células tumorales; y  
(d) unión a un epitopo conformacional que comprende los aminoácidos 65-83 y 157-172 de CD73 humana.

25 En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 de la invención se unen a CD73 humana (CD73 monomérica y/o dimerica) con un  $K_D$  de aproximadamente 10 nM a 0,1 nM o menos como se mide, por ejemplo, mediante análisis SPR BIACORE®, y se internaliza dentro de las células tumorales con un  $T_{1/2}$  de no más de 10 min medido, por ejemplo, por caza de pulso y como se describe en los Ejemplos.

30 En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 de la invención es un anticuerpo humano y presenta una o más de las siguientes propiedades:

- 35 (a) se une a CD73 humano con una  $K_D$  de 10 nM o menos determinada por Resonancia de Plasmón Superficial (SPR);  
(b) inhibe la actividad enzimática de CD73;  
(c) internaliza CD73 por internalización de CD73 mediada por anticuerpo dentro de células, por ejemplo, células tumorales; y  
(d) se une a CD73 humana con una  $CE_{50}$  de 0,1 a 10 nM o menos como se mide por FACS.

40 En el presente documento se proporcionan moléculas bioespecíficas que comprenden los anticuerpos anti-CD73 de la invención unidos a una molécula que tiene una segunda especificidad de unión, así como inmunoconjugados que comprenden los anticuerpos anti-CD73 de la invención unidos a un agente.

45 También se proporcionan las moléculas de ácidos nucleicos que codifican las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera de los anticuerpos anti-CD73 de la invención, así como los vectores de expresión que comprenden las moléculas de ácidos nucleicos, y las células transformadas con los vectores de expresión.

50 También se proporcionan las composiciones y los kits que comprenden los anticuerpos anti-CD73 de la invención. Por consiguiente, otro aspecto de la invención se refiere a composiciones que comprenden el anticuerpo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición comprende además uno o más agentes terapéuticos adicionales. En una realización, el agente terapéutico adicional es un anticuerpo antagonista de la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1), un anticuerpo antagonista del ligando 1 de muerte programada (PD-L1), un anticuerpo antagonista de la proteína 4 asociada a linfocito T citotóxica (CTLA-4), o un anticuerpo antagonista del gen-3 de activación de linfocito (LAG-3).

55 En el presente documento se proporciona un método de preparación de los anticuerpos anti-CD73 de la invención, que comprende expresar un anticuerpo anti-CD73 descrito en el presente documento en una célula y aislar el anticuerpo de la célula.

60 En el presente documento también se proporcionan métodos de uso de los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento, por ejemplo, métodos de descenso de los niveles de adenosina, por ejemplo, en o por un tumor, por ejemplo, una célula tumoral, que expresa CD73, métodos de estimulación de una respuesta de linfocito T

- específica a antígeno, métodos de estimulación de una respuesta inmunitaria en un sujeto, métodos de inhibición del crecimiento de las células tumorales en un sujeto, métodos de tratamiento del cáncer, por ejemplo, por inmunoterapia. En determinadas realizaciones, el cáncer es cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer uterino/cervical, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer de esófago, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de célula germinal, cáncer de huesos, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer de piel, neoplasias del sistema nervioso central, linfoma, leucemia, mieloma, sarcoma o cáncer relacionado con virus. El cáncer puede ser un cáncer metastásico, cáncer refractario, o cáncer recurrente.
- 10 En determinadas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento comprenden además administrar una o más sustancias terapéuticas, por ejemplo, una sustancia terapéutica que estimula el sistema inmune, por ejemplo, un antagonista de PD-1, un antagonista de CTLA-4, un antagonista de LAG-3, un antagonista de GITR, y/o un anticuerpo anti-CD39, un anticuerpo anti-A2AR, o un inhibidor químico de A2AR.
- 15 Otras características y ventajas de la presente divulgación serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de los ejemplos, que no se deberían considerar limitantes.

### Breve descripción de los dibujos

- 20 La Figura 1A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 237) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 135) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano CD73.4-1. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 5), CDR2 (SEQ ID NO: 6) y CDR3 (SEQ ID NO: 7) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J. La Figura 1B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 140) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) de la región variable de la cadena ligera (VK1) del anticuerpo monoclonal humano CD73.4-1. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 9), CDR2 (SEQ ID NO: 10) y CDR3 (SEQ ID NO: 11) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- 25 La Figura 2A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 237) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 135) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano CD73.4-2. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 5), CDR2 (SEQ ID NO: 6) y CDR3 (SEQ ID NO: 7) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- 30 La Figura 2B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 141) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 12) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano CD73.4-2. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 13), CDR2 (SEQ ID NO: 14) y CDR3 (SEQ ID NO: 15) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- 35 La Figura 3A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 139) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 11F11-1. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 5), CDR2 (SEQ ID NO: 6) y CDR3 (SEQ ID NO: 7) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- 40 La Figura 3B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 140) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 11F11-1. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 9), CDR2 (SEQ ID NO: 10) y CDR3 (SEQ ID NO: 11) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- 45 La Figura 4A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 139) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 11F11-2. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 5), CDR2 (SEQ ID NO: 6) y CDR3 (SEQ ID NO: 7) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- 50 La Figura 4B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 141) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 12) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 11F11-2. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 13), CDR2 (SEQ ID NO: 14) y CDR3 (SEQ ID NO: 15) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- 55 La Figura 5A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 142) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 16) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 4C3-1. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 17), CDR2 (SEQ ID NO: 18) y CDR3 (SEQ ID NO: 19) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- 60 La Figura 5B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 143) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 20) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 4C3-1. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 21), CDR2 (SEQ ID NO: 22) y CDR3 (SEQ ID NO: 23) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- 65 La Figura 6A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 142) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 16) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 4C3-2. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 17), CDR2 (SEQ ID NO: 18) y CDR3 (SEQ ID NO: 19) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- La Figura 6B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 144) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 24) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 4C3-2. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 25), CDR2 (SEQ ID NO: 26) y CDR3 (SEQ ID NO: 27) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.

- La Figura 7A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 142) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 16) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 4C3-3. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 17), CDR2 (SEQ ID NO: 18) y CDR3 (SEQ ID NO: 19) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- 5 La Figura 7B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 145) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 28) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 4C3-3. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 29), CDR2 (SEQ ID NO: 30) y CDR3 (SEQ ID NO: 31) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- 10 La Figura 8A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 146) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 32) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 4D4-1. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 33), CDR2 (SEQ ID NO: 34) y CDR3 (SEQ ID NO: 35) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- 15 La Figura 8B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 147) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 36) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 4D4-1. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 37), CDR2 (SEQ ID NO: 38) y CDR3 (SEQ ID NO: 39) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- 20 La Figura 9A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 148) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 40) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 10D2-1. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 41), CDR2 (SEQ ID NO: 42) y CDR3 (SEQ ID NO: 43) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- 25 La Figura 9B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 149) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 44) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 10D2-1. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 45), CDR2 (SEQ ID NO: 46) y CDR3 (SEQ ID NO: 47) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- 30 La Figura 10A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 148) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 40) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 10D2-2. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 41), CDR2 (SEQ ID NO: 42) y CDR3 (SEQ ID NO: 43) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- 35 La Figura 10B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 150) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 48) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 10D2-2. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 49), CDR2 (SEQ ID NO: 50) y CDR3 (SEQ ID NO: 51) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- 40 La Figura 11A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 151) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 52) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 11A6-1. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 53), CDR2 (SEQ ID NO: 54) y CDR3 (SEQ ID NO: 55) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- 45 La Figura 11B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 152) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 56) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 11A6-1. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 57), CDR2 (SEQ ID NO: 58) y CDR3 (SEQ ID NO: 59) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- 50 La Figura 12A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 153) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 60) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 24H2-1. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 61), CDR2 (SEQ ID NO: 62) y CDR3 (SEQ ID NO: 63) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- 55 La Figura 12B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 154) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 64) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 24H2-1. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 65), CDR2 (SEQ ID NO: 66) y CDR3 (SEQ ID NO: 67) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- 60 La Figura 13A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 155) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 68) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 5F8-1. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 69), CDR2 (SEQ ID NO: 70) y CDR3 (SEQ ID NO: 71) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- 65 La Figura 13B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 156) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 72) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 5F8-1. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 73), CDR2 (SEQ ID NO: 74) y CDR3 (SEQ ID NO: 75) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- La Figura 14A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 155) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 68) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 5F8-2. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 69), CDR2 (SEQ ID NO: 70) y CDR3 (SEQ ID NO: 71) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- La Figura 14B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 157) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 76) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 5F8-2. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 77), CDR2 (SEQ ID NO: 78) y CDR3 (SEQ ID NO: 79) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.
- La Figura 15A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 155) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 68) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 5F8-3. Se definen las

regiones CDR1 (SEQ ID NO: 69), CDR2 (SEQ ID NO: 70) y CDR3 (SEQ ID NO: 71) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.

La Figura 15B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 242) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 238) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 5F8-3. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 239), CDR2 (SEQ ID NO: 240) y CDR3 (SEQ ID NO: 241) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.

La Figura 16A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 158) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 80) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 6E11-1. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 81), CDR2 (SEQ ID NO: 82) y CDR3 (SEQ ID NO: 83) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.

La Figura 16B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 159) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 84) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 6E11-1. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 85), CDR2 (SEQ ID NO: 86) y CDR3 (SEQ ID NO: 87) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.

La Figura 17A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 160) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 88) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 7A11-1. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 89), CDR2 (SEQ ID NO: 90) y CDR3 (SEQ ID NO: 91) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.

La Figura 17B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 161) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 92) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 7A11-1. Se definen las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 93), CDR2 (SEQ ID NO: 94) y CDR3 (SEQ ID NO: 95) y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.

La Figura 18 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 189) de la cadena pesada del anticuerpo anti-CD73 CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f, y su región variable, CDR 1, 2 y 3, dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3.

La Figura 19 muestra los datos del sensorgrama SPR para la unión de humana-CD73-his 600, 200, 66,7, 22,2, 7,4, y 2,5 nM (líneas anchas) o cyno-CD73-his (líneas finas) a CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f capturado sobre una superficie de proteína A inmovilizada a 25 °C.

Las Figuras 20A1 y 20A2 muestran la unión de los anticuerpos 11F11, CD73.4 y CD73.10 con las regiones constantes de la cadena pesada indicadas a células Calu6 CD73 positivas humanas (línea celular del adenocarcinoma pulmonar humano).f

Las Figuras 20B1 y 20B2 muestran la unión de los anticuerpos 11F11, CD73.4 y CD73.10 con las regiones constantes de la cadena pesada indicadas a células DMS114 CD73 negativas humanas (línea celular del carcinoma de pulmón de célula pequeña).

Las Figuras 20C1 y 20C2 muestran la unión de los anticuerpos 11F11, CD73.4 y CD73.10 con las regiones constantes de la cadena pesada indicadas a células CHO CD73 cyno positivas.

Las Figuras 20D1 y 20D2 muestran la unión de los anticuerpos 11F11, CD73.4 y CD73.10 con las regiones constantes de la cadena pesada indicadas a células CHO-K1 CD73 positivas cyno.

La Figura 20E muestra la unión de los anticuerpos indicados a los linfocitos T de los donantes D1 y D2.

La Figura 20F muestra la unión de los anticuerpos indicados a los linfocitos T de los donantes D1 y D2.

Las Figuras 21A1 y 21A2 muestran la inhibición de la actividad enzimática de CD73 humana unida a perla por los anticuerpos anti-CD73 11F11, CD73.4 y CD73.10 con las regiones constantes de la cadena pesada indicadas. Todos los anticuerpos inhibieron la actividad enzimática de CD73 humana.

Las Figuras 21B1 y 21B2 muestran la inhibición de la actividad enzimática de CD73 cyno unida a perla por los anticuerpos anti-CD73

11F11, CD73.4 y CD73.10 con las regiones constantes de la cadena pesada indicadas. Todos los anticuerpos inhibieron la actividad enzimática de CD73 cyno.

Las Figuras 22A1 y 22A2 muestran la inhibición enzimática de CD73 en células Calu6 CD73 positivas por los anticuerpos 11F11, CD73.4 y CD73.10 con las regiones constantes de la cadena pesada indicadas. Todos los anticuerpos inhibieron la actividad enzimática de CD73 en estas células.

Las Figuras 22B1 y 22B2 muestran la inhibición enzimática de CD73 en células DMS-114 CD73 negativo por los anticuerpos 11F11, CD73.4 y CD73.10 con las regiones constantes de la cadena pesada indicadas.

La Figura 22C muestra los valores CE50 e Y<sub>máx</sub> de la inhibición de la actividad de CD73 endógena por los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de 11F11 y 11F11, como se determina en el ensayo de cAMP usando células Calu-6 y HEK/A2R. La Figura 22C también muestra los valores de CE50 e Y<sub>máx</sub> de 11F11 y fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de 11F11 en un ensayo de internalización de Calu-6. La Figura muestra que un fragmento Fab de 11F11 está inactivo en estos dos ensayos.

La Figura 22D muestra el transcurso temporal de la producción de adenosina a partir de células Calu6 con el anticuerpo 11F11 o 4C3, como se mide mediante LC/MS/MS, indicando que la inhibición enzimática de CD73 por el anticuerpo 11F11 ocurre más rápidamente que por el anticuerpo 4C3.

La Figura 23A muestra las cinéticas de la internalización de CD73 mediada por anticuerpo por los siguientes anticuerpos: anticuerpos 11F11, 4C3, 6D11, CD73.3-IgG1.If con la cadena ligera 4C3Vkl ("3-Vh-hHC-IgG1.1f/4C3Vkl"), CD73.4-IgG2CS con la cadena ligera Vk2 de 11F11 ("4-Vh-hHC-IgG2-C219S/11F11-Vk2"), CD73.10-IgG2CS ("CD73.10-Vh-hHC-IgG2-C219S"), CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f ("CD73.10-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f"), y CD73.10-IgG1.1f ("CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f") en células H2228. Los anticuerpos 11F11 (el cual es de un isotipo IgG2), CD73.4-IgG2CS, CD73.10-IgG2CS y CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f se internalizan más rápidamente y a un mayor grado que los otros anticuerpos ensayados, los cuales son de un isotipo IgG1.

La Figura 23B muestra las cinéticas de la internalización de CD73 mediada por anticuerpo de los mismos anticuerpos que los mostrados en la Figura 23A en células HCC15 (línea celular del carcinoma de células no pequeñas de pulmón), mostrando resultados similares a los obtenidos en las células H2228 (línea celular del carcinoma de células no pequeñas de pulmón).

5 La Figura 23C muestra las cinéticas de la internalización de CD73 mediada por anticuerpo de los mismos anticuerpos que los mostrados en las Figuras 23A y 23B, así como CD73.11-IgG2CS ("11-Vh-hVC-IgG2-C219S"), en células Calu6, mostrando resultados similares a los obtenidos en las células H2228 y HCC15.

10 La Figura 23D muestra las cinéticas de la internalización de CD73 mediada por anticuerpo de los mismos anticuerpos que los mostrados en la Figura 23C en células NCI-2030 (línea celular del carcinoma de células no pequeñas de pulmón), mostrando resultados similares a los obtenidos en células H2228, HCC15 y Calu6.

La Figura 23E muestra las cinéticas de la internalización de CD73 mediada por anticuerpo de los anticuerpos indicados en células Calu6, como se mide mediante citometría de flujo.

15 La Figura 23F muestra las cinéticas de la internalización de CD73 mediada por anticuerpo de los anticuerpos indicados en células NCI-H292 (línea celular del carcinoma pulmonar mucoepidermoide), como se mide mediante citometría de flujo, pero en la que los anticuerpos no se lavaron después de la primera incubación de las células con los anticuerpos.

La Figura 23G muestra el porcentaje de CD73 internalizada en células Calu6 tratadas con los anticuerpos indicados, mostrando internalización de CD73 mediada por anticuerpo de los anticuerpos indicados en células Calu6 con el paso del tiempo.

20 La Figura 23H muestra el porcentaje de CD73 internalizada en células NCI-H292 tratadas con los anticuerpos indicados con el paso del tiempo, mostrando internalización de CD73 mediada por anticuerpo de los anticuerpos indicados en células NCI-H292 con el paso del tiempo.

La Figura 23I muestra el porcentaje de CD73 internalizada en células SNU-C1 (línea celular del carcinoma de colón) tratadas con los anticuerpos indicados con el paso del tiempo, mostrando internalización de CD73 mediada por anticuerpo de los anticuerpos indicados en células SNU-C1 con el paso del tiempo.

25 La Figura 23J muestra el porcentaje de CD73 internalizada en células NCI-H1437 (línea celular del carcinoma de pulmón) de células no pequeñas tratadas con los anticuerpos indicados con el paso del tiempo, mostrando internalización de CD73 mediada por anticuerpo de los anticuerpos indicados en células NCI-H1437 con el paso del tiempo.

30 La Figura 23K muestra el porcentaje de CD73 internalizada en células Calu6 tratadas con los anticuerpos indicados con el paso del tiempo, mostrando internalización de CD73 mediada por anticuerpo de los anticuerpos indicados en células Calu6 con el paso del tiempo.

La Figura 23L muestra el porcentaje de CD73 internalizada en células NCI-H292 tratadas con los anticuerpos indicados con el paso del tiempo, mostrando internalización de CD73 mediada por anticuerpo de los anticuerpos indicados en células Calu6 con el paso del tiempo.

35 La Figura 23M muestra el nivel de CD73 sobre la superficie de células Calu6 tratadas con 5 µg/ml de los anticuerpos indicados durante 0, 5, 15 o 30 minutos.

La Figura 24A muestra secciones de tumor de xenoinjerto de animales recogidas 4 días después del tratamiento de los animales con un anticuerpo control y teñidas para la actividad enzimática de CD73. Las secciones muestran un color marrón denso, indicando actividad enzimática de CD73.

40 La Figura 24B muestra secciones de tumor de xenoinjerto de animales recogidas 1 día después del tratamiento de los animales con el anticuerpo 11F11 y teñidas para la actividad enzimática de CD73. Las secciones muestran significativamente menos color marrón en relación con las secciones de tumor control mostradas en la Figura 24A, indicando inhibición *in vivo* de la actividad enzimática de CD73 por CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f tan pronto como 1 día después del comienzo del tratamiento.

45 La Figura 24C muestra secciones de tumor de xenoinjerto de animales recogidas 2 días después del tratamiento de los animales con CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f y teñidas para la actividad enzimática de CD73. Las secciones muestran significativamente menos color marrón en relación con las secciones de tumor control mostradas en la Figura 24A y en relación con las secciones de tumor después de 1 día de tratamiento de los animales con CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f, indicando inhibición *in vivo* de la actividad enzimática de CD73 por CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f al menos 2 días después del comienzo del tratamiento.

50 La Figura 24D muestra secciones de tumor de xenoinjerto de animales recogidas 3 días después del tratamiento de los animales con CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f y teñidas para la actividad enzimática de CD73. Las secciones muestran significativamente menos color marrón en relación con las secciones de tumor control mostradas en la Figura 24A, indicando inhibición *in vivo* de la actividad enzimática de CD73 por CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f al menos 3 días después del comienzo del tratamiento.

55 La Figura 24E muestra secciones de tumor de xenoinjerto de animales recogidas 7 días después del tratamiento de los animales con CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f y teñidas para la actividad enzimática de CD73. Las secciones muestran significativamente menos color marrón en relación con las secciones de tumor control mostradas en la Figura 24A, indicando inhibición *in vivo* de la actividad enzimática de CD73 por CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f al menos 7 días después del comienzo del tratamiento.

60 La Figura 24F muestra un trascurso temporal de la actividad enzimática de CD73 humana en tumores SNUC1 en ratones xenoinjerto tratados con un anticuerpo control (no CD73) o con 1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f, mostrando que el anticuerpo anti-CD73 reduce eficazmente la actividad enzimática de CD73 en los tumores del ratón xenoinjerto.

65 La Figura 25A muestra niveles de la actividad enzimática de CD73 de ratón en las secciones de tumor control de

ratones Balb/c portadores de tumores 4T1 singeneicos y mlgG control.

La Figura 25B muestra secciones tumor (4T1 días 1-7) de ratones Balb/c portadores de tumores 4T1 singenicos subcutáneamente tratados con anticuerpo anti-CD73 de ratón TY23, mostrando que TY23 inhibe la inhibición enzimática de CD73 *in vivo*.

5 La Figura 26A muestra el nivel de bloqueo cruzado de 4C3 por los anticuerpos anti-CD73 4C3, 7A11, 6E11, 5F8, 4C3, 11F11 y 11A6 determinado mediante citometría de flujo.

La Figura 26B muestra el nivel de bloqueo cruzado de 11F11 por los anticuerpos anti-CD73 4C3, 7A11, 6E11, 5F8, 4C3, 11F11 y 11A6 determinado mediante citometría de flujo.

10 La Figura 27A muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 283) de CD73 humana y las regiones de interacción con CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f, las cuales están representadas en un gris más oscuro. A mayor interacción, más oscuro es el gris.

La Figura 27B muestra un modelo de la interacción entre una proteína CD73 humana dimérica y CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f.

La Figura 28A muestra un modelo cristalográfico de la interacción entre CD73 humana y el fragmento 11F11Fab'.

15 La Figura 28B muestra un modelo de una estructura compuesta de dos complejos de CD73 humana con 11F11.

La Figura 28C muestra un modelo de la interacción entre CD73 humana y el fragmento 11F11.

La Figura 28D muestra un modelo de la interacción entre 11F11 y CD73 humana.

La Figura 29A muestra los datos de SEC-MALS para complejos humanos de CD73 y anticuerpo. "CD73.4-hybrid" se refiere a CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f.

20 La Figura 29B muestra los datos de DLS para complejos humanos de CD73 y anticuerpo.

La Figura 30A muestra los datos del cromatograma SEC para los complejos de hCD73-his con el anticuerpo CD73.4 que contiene diferentes regiones constantes, mostrando el efecto de una bisagra de IgG2 y el dominio CH1 en el tamaño de los complejos anticuerpo/antígeno.

25 La Figura 30B muestra los datos de DLS para los complejos de hCD73-his con el anticuerpo CD73.4 que contiene diferentes regiones constantes, mostrando el efecto de una bisagra de IgG2 y el dominio CH1 en el tamaño de los complejos anticuerpo/antígeno.

La Figura 30C muestra los datos de MALS para los complejos de hCD73-his con el anticuerpo CD73.4 que contiene diferentes regiones constantes, mostrando el efecto de una bisagra de IgG2 y el dominio CH1 en el tamaño de los complejos anticuerpo/antígeno.

30 La Figura 30D muestra un modelo esquemático de los complejos hCD73-his/mAb derivados de las masas determinadas por MALS en la Figura 30C.

La Figura 30E muestra que complejos de mayor orden están afectados por la región CH1. Los histogramas muestran el % área bajo los picos 1 y 2, mostrados en la gráfica, para cada construcción.

35 La Figura 31 muestra el porcentaje de internalización de CD73 mediada por anticuerpo a 1, 4 o 21 horas después de la adición de cada uno de los anticuerpos mostrados. Las barras para cada anticuerpo se muestran en el orden de 21 horas (a la izquierda), 4 horas (en el medio) y 1 hora (derecha).

La Figura 32A muestra una superposición de los datos del cromatograma SEC para los complejos 1:1 molar de hCD73-his con 16 anticuerpos CD73.4 diferentes que contienen diferentes secuencias de región constante.

40 La Figura 32B muestra una expansión de los datos del cromatograma desde 11 - 19,5 min del cromatograma de la Figura 32A, con 4 especies de dilución distintas indicadas.

La Figura 32C muestra el porcentaje del área de la señal del cromatograma por UV para el pico 2 de la Figura 32B, trazado para los 16 complejos anticuerpo/CD73-his diferentes. Los datos están ordenados desde la izquierda a la derecha en orden de incremento del área del pico.

45 La Figura 33 muestra la unión del anticuerpo a proteínas FcγR-his capturadas por anti-his Fab. Las respuestas de la unión están trazadas en la gráfica como un porcentaje de la R<sub>máx</sub> teórica asumiendo una estequiometría de unión mAb:FcγR 1:1. Las barras para cada anticuerpo se muestran en el orden proporcionado por las leyendas de color en la parte de abajo de la diapositiva.

50 La Figura 34 muestra la unión del anticuerpo a proteínas FcγR-his capturadas por anti-his Fab. Las respuestas de la unión están trazadas en la gráfica como un porcentaje de la R<sub>máx</sub> teórica asumiendo una estequiometría de unión mAb:FcγR 1:1. Las barras para cada anticuerpo se muestran en el orden proporcionado por las leyendas de color en la parte de abajo de la diapositiva.

La Figura 35 muestra un alineamiento de las secuencias VH y VL de diversos anticuerpos anti-CD73. Las secuencias de VH y VL CDR1, CDR2 y CDR3 están en negrita.

## 55 Descripción detallada

En el presente documento se describen anticuerpos aislados, particularmente anticuerpos monoclonales, por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos, los cuales se unen específicamente a CD73 de ese modo reducen la actividad de CD73 ("anticuerpos anti-CD73 antagonistas"). En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento se derivan de secuencias particulares de la línea germinal de la cadena pesada y ligera y/o comprenden características estructurales particulares tales como regiones CDR que comprenden secuencias particulares de aminoácidos. En el presente documento se proporcionan anticuerpos aislados, métodos de producción de tales anticuerpos, inmunoconjugados y moléculas biespecíficas que comprenden tales anticuerpos, y composiciones farmacéuticas formuladas para contener los anticuerpos. En el presente documento también se proporcionan métodos de uso de los anticuerpos para reducir el crecimiento del tumor, solos o en combinación con otros agentes terapéuticos (por ejemplo, anticuerpos) y/o terapias de cáncer. Por consiguiente, los anticuerpos anti-

CD73 descritos en el presente documento se pueden usar en un tratamiento en una amplia diversidad de aplicaciones terapéuticas, incluyendo, por ejemplo, inhibición del crecimiento tumoral, inhibición de la metástasis, y aumento de una respuesta inmunitaria frente a un tumor.

## 5 Definiciones

Con el fin de que se pueda entender más fácilmente la presente divulgación, se definen previamente determinadas expresiones. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

10 La expresión "Grupo de Diferenciación 73" o "CD73" como se usa en el presente documento se refiere a una enzima (nucleotidasa) capaz de convertir los nucleósido 5' monofosfatos extracelulares a nucleósidos, concretamente adenosín monofosfato (AMP) a adenosina. CD73 normalmente se encuentra como un dímero anclado a la membrana celular a través de un enlace de glicosilfosfatidilinositol (GPI), tiene actividad ecto-enzimática y juega un papel en la transducción de la señal. La función principal de CD73 es su conversión de nucleótidos extracelulares (por ejemplo, 5'-AMP) a adenosina, una molécula altamente inmunosupresora. Por tanto, ecto-5'-nucleotidasa cataliza la desfosforilación de los ribo- y desoxirribonucleotidasa monofosfatos de purina y pirimidina al correspondiente nucleósido. Aunque CD73 tiene amplia especificidad de sustrato, prefiere ribonucleósidos de purina.

20 CD73 también es referido como ecto-5'-nucleasa (ecto-5'NT, EC 3.1.3.5). El término "CD73" incluye cualquier variante o isoforma de CD73 que se expresa de forma natural por las células. Por consiguiente, los anticuerpos descritos en el presente documento reaccionan con CD73 de especies distintas a la humana (por ejemplo CD73 cynomolgus). Como alternativa, los anticuerpos pueden ser específicos a CD73 humana y pueden presentar cualquier reactividad cruzada con otras especies. CD73 o cualquiera de sus variantes e isoformas, se pueden aislar de células o tejidos que las expresan de forma natural o se producen de manera recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica y/o las descritas en el presente documento.

30 Se han identificado dos isoformas de CD73 humana, las cuales comparten las mismas porciones N-terminal y C terminal. La isoforma 1 (N.º de acceso NP\_002517.1; SEQ ID NO: 1) representa la proteína más larga, que consiste en 574 aminoácidos y 9 exones. La isoforma 2 (N.º de acceso NP\_001191742.1; SEQ ID NO: 2) codifica una proteína más corta, que consiste en 524 aminoácidos, que carece de los aminoácidos 404-453. La Isoforma 2 carece de un alterno en el exón del marco de lectura dando como resultado una transcripción con solamente 8 exones, pero con las mismas secuencias N-terminal y C-terminal.

35 La secuencia de la proteína CD73 de cynomolgus (cyno) está proporcionada como SEQ ID NO: 3. Los términos cynomolgus y cyno ambos se refieren a la especie *Macaca fascicularis* y se usan de manera intercambiable por toda la memoria.

40 El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento puede incluir anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, la "porción de unión a antígeno") o cadenas sencillas de los mismos. Un "anticuerpo" se refiere, en una realización, a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligera (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión a antígeno de las mismas. Cada cadena pesada está comprendida por una región variable de la cadena pesada (abreviado en el presente documento como V<sub>H</sub>) y una región constante de la cadena pesada. En ciertos anticuerpos IgG, IgD e IgA de origen natural, la región constante de la cadena pesada está comprendida por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. En determinados anticuerpos de origen natural, cada cadena ligera está comprendida por una región variable de la cadena ligera (abreviada en el presente documento como V<sub>L</sub>) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está comprendida por un dominio, CL. Las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

60 La cadena pesada de un anticuerpo puede o no puede contener una lisina (K) terminal o una glicina y lisina (GK) terminal. Por tanto, cualquier secuencia de la cadena pesada y secuencia de la región constante de la cadena pesada proporcionadas en el presente documento pueden terminar en GK o G, o carecer K o GK, a pesar de lo cual están provistas del último aminoácido de la secuencia. Esto es debido a que la lisina terminal y algunas glicina y lisina se escinden durante la expresión del anticuerpo.

65 Los anticuerpos generalmente se unen específicamente a su antígeno afín con alta afinidad, reflejado por una constante de disociación (K<sub>D</sub>) de 10<sup>-7</sup> a 10<sup>-11</sup> M o menos. Cualquier K<sub>D</sub> mayor que aproximadamente 10<sup>-6</sup> M generalmente se considera que indica unión no específica. Como se usa en el presente documento, un anticuerpo que "se une específicamente" a un antígeno se refiere a un anticuerpo que se une al antígeno y a antígenos

sustancialmente idénticos con alta afinidad, lo que significa que tiene una  $K_D$  de  $10^{-7}$  M o menos, preferentemente  $10^{-8}$  M o menos, incluso más preferentemente  $5 \times 10^{-9}$  M, y lo más preferentemente entre  $10^{-8}$  M y  $10^{-10}$  M o menos, pero no se une con alta afinidad a antígenos no relacionados. Un antígeno es "sustancialmente idéntico" a un antígeno dado si presenta un alto grado de identidad de secuencia al antígeno dado, por ejemplo, si presenta al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 % o al menos un 99 % o más de identidad de secuencia a la secuencia del antígeno dado. A modo de ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a CD73 humana también puede reaccionar de manera cruzada con CD73 de ciertas especies de primate no humano (por ejemplo, mono cynomolgus), pero no puede reaccionar de manera cruzada con CD73 de otras especies, o con un antígeno distinto a CD73.

Una inmunoglobulina puede ser de cualquiera de los isotipos comúnmente conocidos, incluyendo, pero sin limitación, IgA, IgA secretora, IgG e IgM. El isotipo IgG se divide en subclases en ciertas especies: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 en seres humanos, e IgG1, IgG2a, IgG2b y IgG3 en ratones. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento son del subtipo IgG1 o IgG2. Las inmunoglobulinas, por ejemplo, IgG1 humana, existen en diversos alotipos, los cuales difieren unos de otros en como mucho unos pocos aminoácidos. "Anticuerpo" puede incluir, a modo de ejemplo, tanto anticuerpos de origen natural como de no origen natural; anticuerpos monoclonales y policlonales; anticuerpos quiméricos y humanizados; anticuerpos humanos y no humanos; anticuerpos completamente sintéticos; y anticuerpos de cadena única.

La expresión "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo, como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, CD73 humana). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados por la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD73 descrito en el presente documento, incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios  $V_L$ ,  $V_H$ , CL y CH1; (ii) un fragmento  $F(ab')_2$ , un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios  $V_H$  y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al. (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio  $V_H$ ; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada o (vii) una combinación de dos o más CDR aisladas que opcionalmente pueden estar unidas por un enlazador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv,  $V_L$  y  $V_H$ , están codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que las regiones  $V_L$  y  $V_H$  se emparejan para formar moléculas monovalentes conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véanse, por ejemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; y Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85:5.879-5.883). También se pretende que tales anticuerpos de cadena sencilla estén abarcados por la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estas y otras construcciones potenciales se describen en Chan & Carter (2010) *Nat. Rev. Immunol.* 10:301. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia y los fragmentos se seleccionan en función de su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos. Las porciones de unión a antígeno se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante, o mediante escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.

Un "anticuerpo biespecífico" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadena ligera/pesada diferentes, dando lugar a dos sitios de unión a antígeno con especificidad para antígenos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir mediante varios métodos que incluyen la fusión de hibridomas o la unión de los fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai y Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.* 148, 1.547-1.553 (1992).

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que muestra una especificidad de unión única y afinidad para un epítipo particular o una composición de anticuerpos en los que todos los anticuerpos muestran una especificidad de unión única y afinidad para un epítipo particular. Generalmente, tales anticuerpos monoclonales se derivarán de una célula única o ácido nucleico que codifica el anticuerpo, y se propagará sin introducir de manera intencionada cualquier alteración de la secuencia. Por consiguiente, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a un anticuerpo monoclonal que tiene regiones variables y opcionales constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humanas. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma, por ejemplo, obtenido fusionando un linfocito B obtenido de un animal no humano transgénico o transcromosómico (por ejemplo, un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende un transgen de la cadena pesada humana y un transgen de la cadena ligera), a una célula inmortalizada.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de los mismos (descrito más adelante), (b) anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de un recombinante, genoteca de anticuerpo humano combinatoria, y (d)

anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes comprenden regiones variables y constantes que utilizan secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana particular y son codificadas por los genes de la línea germinal, pero incluyen reordenamientos y mutaciones posteriores que ocurren, por ejemplo, durante la maduración del anticuerpo. Como es conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23(9): 1.117-1.125), la región variable contiene el dominio de unión a antígeno, el cual es codificado por diversos genes que se disponen para formar un anticuerpo específico a un antígeno extraño. Además del reordenamiento, la región variable además se puede modificar por múltiples cambios de aminoácido único (referidos como mutación somática o hipermutación) para incrementar la afinidad del anticuerpo al antígeno extraño. La región constante cambiará en respuesta adicional a un antígeno (es decir, cambio de isotipo). Por lo tanto, las secuencias de ácidos nucleicos reorganizadas y somáticamente mutadas que codifican los polipéptidos de la inmunoglobulina de la cadena ligera y la cadena pesada en respuesta a un antígeno pueden ser idénticas a las secuencias de la línea germinal original, pero en lugar de ello serán sustancialmente idénticas o similares (es decir, tienen al menos un 80 % de identidad).

Un anticuerpo "humano" (HuMAb) se refiere a un anticuerpo que tiene regiones variables en el que tanto el marco como las regiones CDR derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos descritos pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específicas a sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como de un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas. Las expresiones anticuerpos "humanos" y anticuerpos "completamente humanos" se usan como sinónimos.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo en el que algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de los dominios CDR de un anticuerpo no humano se reemplazan por los aminoácidos correspondientes derivados de las inmunoglobulinas humanas. En una realización de una forma humanizada de un anticuerpo, algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de los dominios CDR se han reemplazado por aminoácidos de las inmunoglobulinas humanas, mientras que algunos, la mayoría o todos los aminoácidos dentro de una o más regiones CDR no cambian. Pequeñas adiciones, deleciones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos son permisibles siempre que no anulen la capacidad del anticuerpo de unirse a un antígeno particular. Un anticuerpo "humanizado" conserva una especificidad antigénica similar a la del anticuerpo original.

Un "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que las regiones variables se derivan de una especie y las regiones constantes se derivan de otra especie, tal como un anticuerpo en el que las regiones variables se derivan de un anticuerpo de ratón y las regiones constantes derivan de un anticuerpo humano.

Una "región constante de la cadena pesada modificada" se refiere a una región constante de la cadena pesada que comprende los dominios constantes CH1, bisagra, CH2 y CH3, en los que uno o más de los dominios constantes son de un isotipo diferente (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). En determinadas realizaciones, la región constante modifica incluye un dominio CH1 de IgG2 humana y una bisagra de IgG2 humana fusionado con un dominio CH2 de IgG1 humana y un dominio CH3 de IgG1 humana. En determinadas realizaciones, tales regiones constantes modificadas también incluyen modificaciones de aminoácidos dentro de uno o más de los dominios en relación con la secuencia de aminoácidos tipo silvestre.

Cuando se hace referencia en el presente documento a un anticuerpo como "CD73.3" o "CD73.4" sin indicar la identidad de la región constante, a menos que se indique lo contrario, se refiere a anticuerpos que tienen las regiones variables de CD73.3 o CD73.4, respectivamente, con cualquier región constante descrita en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, e IgE) que se codifica por los genes de la región constante de la cadena pesada.

"Alotipo" se refiere a variantes de origen natural dentro de un grupo de isotipo específico, cuyas variantes difieren en unos pocos aminoácidos (véase, por ejemplo, Jefferis et al. (2009) *mAbs* 1:1). Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser de cualquier alotipo.

A menos que se especifique lo contrario en el presente documento, todos los números de aminoácidos son según el índice de la UE del sistema Kabat (Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación de NIH N.º 91-3242).

Las frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente en el presente documento con el término "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

Un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está

sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a CD73 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de CD73). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo de CD73 puede, sin embargo, tener reacción cruzada con otras proteínas CD73 de diferentes especies.

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo que "inhibe CD73" se refiere a un anticuerpo que presenta una función biológica y/o enzimática de CD73. Estas funciones incluyen, por ejemplo, la capacidad de un anticuerpo para inhibir la actividad enzimática de CD73, por ejemplo, la producción regulada por CD73 de adenosina o la reducción de la producción de cAMP.

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo que "internaliza" se refiere a un anticuerpo que cruza la membrana celular tras la unión a un antígeno de superficie celular. La internalización incluye anticuerpo mediado por receptor, por ejemplo, CD73, internalización. En algunas realizaciones, el anticuerpo "se internaliza" dentro de las células que expresa CD73 a una tasa de  $T_{1/2}$  igual a aproximadamente 10 min o inferior.

Una "función efectora" se refiere a la interacción de una región Fc de anticuerpo con un receptor o ligando de Fc, o un evento bioquímico que resulta de la misma. "Funciones efectoras" ilustrativas incluyen la unión de Clq, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), unión a receptor de Fc, funciones efectoras mediadas por FcγR tales como ADCC y fagocitosis mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCP) y regulación por disminución de un receptor superficial celular (por ejemplo, el receptor de linfocito B; BCR). Tales funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo).

Un "receptor de Fc" o "FcR" es un receptor que se une a la región Fc de una inmunoglobulina. Los FcR que se unen a anticuerpo IgG comprenden receptores de la familia FcγR, incluyendo las variantes alélicas y las formas de corte y empalme alternativo de estos receptores. La familia FcγR consiste en tres receptores activadores (FcγRI, FcγRIII, y FcγRIV en ratones; FcγRIA, FcγRIIA, y FcγRIIIA en seres humanos) y uno inhibidor (FcγRIIB). Diversas propiedades de los FcγR humanos se resumen en la Tabla 1. La mayoría de los tipos de célula efectora innata expresan conjuntamente uno o más FcγR activadores y el FcγRIIB inhibidor, mientras que los linfocitos citotóxicos naturales (NK) expresan selectivamente un receptor de Fc activadores (FcγRIII en ratones y FcγRIIIA en seres humanos) pero no el FcγRIIB inhibidor en ratones y seres humanos. La IgG1 humana se une a la mayoría de los receptores de Fc humanos y se considera equivalente a IgG2a murina con respecto a los tipos de receptores de Fc activadores a los que se unen.

**Tabla 1. Propiedades de los FcγRs humanos**

Fcγ	Variantes alélicas	Afinidad para IgG humana	Preferencia de isotipo	Distribución celular
FcγRI	no descrito	Alta ( $K_D$ aproximadamente 10 nM)	IgG1=3>4>>2	Monocitos, macrófagos, neutrófilos activados, células dendríticas?
FcγRIIA	H131	Baja a media	IgG1>3>2>4	Neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos, células dendríticas, plaquetas
	R131	Baja	IgG1>3>4>2	
FcγRIIIA	V158	Media	IgG1=3>>4>2	linfocitos NK, monocitos, macrófagos, mastocitos células, eosinófilos, células dendríticas?
	F158	Baja	IgG1=3>>4>2	
FcγRIIB	I232	Baja	IgG1=3=4>2	linfocitos B, monocitos, macrófagos, células dendríticas, mastocitos
	T232	Baja	IgG1=3=4>2	

Una "bisagra", "dominio bisagra" o "región bisagra" o región bisagra de anticuerpo" se refiere al dominio de una región constante de la cadena pesada que une el dominio CH1 al dominio CH2 e incluye las porciones superiores, medias, e inferiores de la bisagra (Roux et al. *J. Immunol.* 1998 161:4083). La bisagra proporciona niveles variantes de flexibilidad entre las regiones de unión y efectoras de un anticuerpo y también proporciona sitios para el enlace disulfuro intermolecular entre las dos regiones constantes de región pesada. Como se usa en el presente documento, una bisagra comienza en Glu216 y termina en Gly237 para los isotipos IgG (Roux et al., 1998 *J. Immunol.* 161:4.083). Las secuencias de bisagras de IgG1 tipo silvestre, IgG2, IgG3 y IgG4 se muestran en las Tablas 2 y 31.

**Tabla 2.**

**Aminoácidos de la región bisagra**

Tipo Ig	$C_{H1}^*$ C-terminal (SEQ ID NO)	Bisagra Superior (SEQ ID NO)	Bisagra Media (SEQ ID NO)	Bisagra Inferior (SEQ ID NO)
IgG1	VDKRV (284)	EPKSCDKTHT (286)	CPPCP (290)	APELLGG (298)

(continuación)

Tipo Ig	CH1* C-terminal (SEQ ID NO)	Bisagra Superior (SEQ ID NO)	Bisagra Media (SEQ ID NO)	Bisagra Inferior (SEQ ID NO)
IgG2	VDKTV (285)	ERK	CCVECPPCP (291)	APPVAG (299)
IgG3 (17-15-15-15)	VDKRV (284)	ELKTPLGDTTHT (287)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>3</sub> (292)	APELLGG (298)
IgG3 (17-15-15)	VDKRV (284)	ELKTPLGDTTHT (287)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>2</sub> (293)	APELLGG (298)
IgG3 (17-15)	VDKRV (284)	ELKTPLGDTTHT (287)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>1</sub> (294)	APELLGG (298)
IgG3 (15-15-15)	VDKRV (284)	EPKS (288)	CDTPPPCPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>2</sub> (295)	APELLGG (298)
IgG3 (15)	VDKRV (284)	EPKS (288)	CDTPPPCPRCP (296)	APELLGG (298)
IgG4	VDKRV (284)	ESKYGPP (289)	CPSCP (297)	APEFLGG (298)

\* secuencias de aminoácidos C-terminales de los dominios CH1.

El término "bisagra" incluye bisagras tipo silvestre (tales como las expuestas en las Tablas 2 y 31), así como variantes de las mismas (por ejemplo bisagras de no origen natural o bisagras modificadas). Por ejemplo, la expresión "bisagra de IgG2" incluye bisagra de IgG2 tipo silvestre, como se muestra en la Tabla 2, y las variantes que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 y/o como mucho 5, 4, 3, 2 o 1 mutaciones, por ejemplo, sustituciones, 5 delecciones o adiciones. Variantes de bisagra de IgG2 ilustrativas incluyen bisagras de IgG2 en las que 1, 2, 3 o todas las 4 cisteínas (C219, C220, C226 y C229) se cambian a otro aminoácido. En una realización específica, Una bisagra de IgG2 comprende una sustitución C219S. Una bisagra de IgG2 también puede comprender una sustitución 10 en C220 o sustituciones en tanto C219 como una C220. Una bisagra de IgG2 puede comprender una sustitución, la cual sola, o junto con una o más sustituciones en otras regiones de la cadena pesada o ligera causará que el anticuerpo tome la forma A o B (véase, por ejemplo, Allen et al. (2009) *Biochemistry* 48:3.755). En determinados aspectos descritos en el presente documento, una bisagra es una bisagra híbrida que comprende las secuencias de al menos dos isotipos. Por ejemplo, una bisagra puede comprender la bisagra superior, media o inferior de un isotipo 15 y el resto de la bisagra de uno u otro más isotipos. Por ejemplo, una bisagra puede ser una bisagra IgG2/IgG1, y puede comprender, por ejemplo, las bisagras superior y media de IgG2 y la bisagra inferior IgG1. Una bisagra puede tener función efectora o puede estar desprovista de función efectora. Por ejemplo, una bisagra inferior de IgG1 tipo silvestre proporciona función efectora.

La expresión "dominio CH1" se refiere a la región constante de la cadena pesada que une el dominio variable a la bisagra en un dominio constante de la cadena pesada. Como se usa en el presente documento, el dominio CH1 20 comienza en A118 y termina en V215. La expresión "dominio CH1" incluye dominios CH1 tipo silvestre (tales como los que tienen SEQ ID NO: 98 para IgG1 y SEQ ID NO: 124 para IgG2), así como variantes de los mismos (por ejemplo, dominios CH1 de origen natural o dominios CH1 modificados). Por ejemplo, la expresión "dominio CH1" incluye dominios CH1 tipo silvestre y variantes de los mismos que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 y/o como mucho 25 5, 4, 3, 2, o 1 mutaciones, por ejemplo, sustituciones, delecciones o adiciones. Dominios CH1 ilustrativos incluyen dominios CH1 con mutaciones que modifican una actividad biológica de un anticuerpo, tal como ADCC, CDC o semivida. En el presente documento se proporcionan modificaciones al dominio CH1 que afectan una actividad biológica de un anticuerpo. Un dominio CH1 puede comprender la sustitución C131S, dicha sustitución puede causar que un anticuerpo IgG2 o un anticuerpo que comprende al menos una porción de un anticuerpo IgG2, tal como la 30 bisagra y/o la bisagra y CH1, adopte la forma B, en lugar a la forma A del anticuerpo.

La expresión "dominio CH2" se refiere a la región constante de la cadena pesada que liga la bisagra al dominio CH3 en un dominio constante de la cadena pesada. Como se usa en el presente documento, el dominio CH2 comienza 35 en P238 y termina en K340. La expresión "dominio CH2" incluye dominios CH2 tipo silvestre (tales como los que tienen SEQ ID NO: 137 para IgG1; Tabla 35), así como las variantes de los mismos (por ejemplo, dominios CH2 de origen no natural o dominios CH2 modificados). Por ejemplo, la expresión "dominio CH2" incluye dominios CH2 tipo silvestre y variantes de los mismos que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 y/o como mucho 5, 4, 3, 2, o 1 mutaciones, por ejemplo, sustituciones, delecciones o adiciones. Dominios CH2 ilustrativos incluyen dominios CH2 con mutaciones que modifican una actividad biológica de un anticuerpo, tal como ADCC, CDC o semivida. En 40 determinadas realizaciones, un dominio CH2 comprende las sustituciones A330S/P331S que reducen la función efectora. En el presente documento se proporcionan otras modificaciones al dominio CH2 que afectan a una actividad biológica de un anticuerpo.

La expresión "dominio CH3" se refiere a la región constante de la cadena pesada que es C-terminal al dominio CH2 en un dominio constante de la cadena pesada. Como se usa en el presente documento, el dominio CH3 comienza 45 en G341 y termina en K447. La expresión "dominio CH3" incluye dominios CH3 tipo silvestre (tales como los que tienen SEQ ID NO: 138 para IgG1; Tabla 35), así como las variantes de los mismos (por ejemplo, dominios CH3 de origen no natural o dominios CH3 modificados). Por ejemplo, la expresión "dominio CH3" incluye dominios CH3 tipo silvestre y variantes de los mismos que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 y/o como mucho 5, 4, 3, 2, o 1 mutaciones,

por ejemplo, sustituciones, deleciones o adiciones. Dominios CH3 ilustrativos incluyen dominios CH3 con mutaciones que modifican una actividad biológica de un anticuerpo, tal como ADCC, CDC o semivida. En el presente documento se proporcionan modificaciones al dominio CH3 que afectan una actividad biológica de un anticuerpo.

- 5 Un "dominio CL" se refiere al dominio constante de una cadena ligera. La expresión "dominio CL" incluye dominios CL tipo silvestre y variantes de los mismos, por ejemplo, variantes que comprenden C214S.

Una "región Fc de secuencia nativa" o "Fc de secuencia nativa" comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia nativa incluyen región Fc de IgG1 humana de secuencia nativa; región Fc de IgG2 humana de secuencia nativa; región Fc de IgG3 humana de secuencia nativa; y región Fc de IgG4 humana de secuencia nativa así como variantes de las mismas de origen natural. Fc de secuencia nativa incluye diversos alotipos de Fc (véase, por ejemplo, Jefferis et al. (2009) *mAbs* 1:1).

15 El término "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un lugar sobre un antígeno (por ejemplo, CD73) al que se une específicamente una inmunoglobulina o anticuerpo. Epítipos dentro de los antígenos proteicos se pueden formar tanto a partir de aminoácidos contiguos (normalmente un epítipo lineal) o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de la proteína (normalmente un epítipo conformacional). Los epítipos formados a partir de aminoácidos contiguos generalmente, pero no siempre, se conservan en la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítipos formados mediante plegamiento terciario generalmente se pierden en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo generalmente incluye al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para la determinación de qué epítipos se unen por un anticuerpo dado (es decir, mapeo de epítipos) son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ensayos de inmunotransferencia e inmunoprecipitación, en los que los péptidos que se solapan o contiguos (por ejemplo, de CD73) se ensayan para reactividad con un anticuerpo dado (por ejemplo anticuerpo anti-CD73). Los métodos para determinar la conformación espacial de un epítipo incluyen las técnicas en la materia y las descritas en el presente documento, por ejemplo, cristalografía por rayos X, resonancia magnética nuclear bidimensional y HDX-MS (véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

30 La expresión "mapeo de epítipo" se refiere al proceso de identificación de los determinantes moleculares sobre el antígeno implicado en el reconocimiento anticuerpo-antígeno.

35 La expresión "se une al mismo epítipo" en referencia a dos o más anticuerpos significa que los anticuerpos se unen al mismo segmento de los restos de aminoácidos, como se determina por un método dado. Las técnicas para determinar si los anticuerpos se unen al "mismo epítipo sobre CD73" con los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, métodos de mapeo de epítipos, tales como, análisis por rayos x de cristales de complejos de antígeno:anticuerpo, lo cual proporciona resolución atómica del epítipo, y espectrometría de masas por intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX-MS). Otros métodos que hacen un seguimiento de la unión del anticuerpo a los fragmentos de antígeno (por ejemplo, fragmentos proteolíticos) o a variaciones mutadas del antígeno donde la pérdida de unión debido a una modificación de un resto de aminoácidos dentro de la secuencia de antígeno con frecuencia se considera un indicio de un componente de epítipo (por ejemplo, mutagénesis de barrido de alanina - Cunningham & Wells (1985) *Science* 244:1.081). Además, también se pueden usar métodos combinatorios computacionales para el mapeo de epítipos. Estos métodos se basan en la capacidad del anticuerpo de interés para aislar por afinidad péptidos cortos específicos de genotecas combinatorias de genotecas de presentación de fagos.

50 Anticuerpos que "compiten con otro anticuerpo para la unión a una diana" se refiere a anticuerpos que inhiben (parcialmente o completamente) la unión del otro anticuerpo a la diana. Si dos anticuerpos compiten o no uno con otro para la unión a diana, es decir, si y hasta que punto un anticuerpo inhibe la unión del otro anticuerpo a una diana, se puede determinar usando experimentos de competición conocidos, por ejemplo, tales como los descritos en los Ejemplos. En determinadas realizaciones, un anticuerpo compite con, e inhibe la unión de otro anticuerpo a una diana en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %. El nivel de inhibición o competición puede ser diferente dependiendo de qué anticuerpo es el "anticuerpo bloqueante" (es decir, el anticuerpo frío que se incuba primero con la diana). Los ensayos de competición se pueden conducir como se describe, por ejemplo, en Ed Harlow and David Lane, *Cold Spring Harb Protoc*; 2006; doi:10.1101/pdb.prot4277 o en el Capítulo 11 of "Using Antibodies" de Ed Harlow and David Lane, "Cold Spring Harbor Laboratory Press", Cold Spring Harbor, NY, EE.UU. 1999. Los anticuerpos que compiten se unen al mismo epítipo, un epítipo solapante o a epítipos adyacentes (por ejemplo, como se evidencia por impedimento estérico).

60 Otros ensayos de unión competitiva incluyen: radioinmunoensayo (RIA) directo o indirecto en fase sólida, inmunoensayo enzimático (EIA) directo o indirecto en fase sólida, ensayo de competición de tipo sándwich (véase Stahl et al., (1983) *Methods in Enzymology* 9:242); EIA en fase sólida directa de biotina-avidina (véase, Kirkland et al., *J. Immuno.* 137:3.614 (1986)); ensayo de marcaje directo en fase sólida, ensayo de tipo sándwich de marcaje directo en fase sólida (véase Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, 1988)); RIA de marcaje directo en fase sólida usando 1-125 marcador (véase Morel et al., *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); EIA

en fase sólida directa de biotina-avidina (Cheung et al., *Virology* 176:546 (1990)); y RIA de marcaje directo. (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)).

Como se usa en el presente documento, las expresiones "unión específica", "unión selectiva", "se une selectivamente", y "se une específicamente" se refieren a la unión del anticuerpo que se une a un epítipo o un antígeno predeterminado pero no a otros antígenos. Normalmente, el anticuerpo (i) se une con una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) de aproximadamente menos de  $10^{-7}$  M, tal como aproximadamente menos de  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M o  $10^{-10}$  M o incluso inferior cuando se determina por, por ejemplo, tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento de resonancia de plasmón superficial BIACORE® 2000 que usa el antígeno predeterminado, por ejemplo, CD73 humana recombinante, como el analito y el anticuerpo como el ligando, o análisis Scatchard de unión del anticuerpo a células antígeno positivas, y (ii) se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad de unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, un anticuerpo que "se une específicamente a CD73 humana" se refiere a un anticuerpo que se une a CD73 humana soluble o unida a célula con una  $K_D$  de  $10^{-7}$  M o incluso inferior, tal como aproximadamente menos de  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M o  $10^{-10}$  M o incluso inferior. Un anticuerpo que "reacciona de manera cruzada con CD73 de cynomolgus" se refiere a un anticuerpo que se une a CD73 de cynomolgus con una  $K_D$  de  $10^{-7}$  M o inferior, tal como menos de  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M o  $10^{-10}$  M o incluso inferior. En determinadas realizaciones, los anticuerpos que no reaccionan de manera cruzada con CD73 de una especie no humana presentan básicamente unión no detectable frente a estas proteínas en ensayos de unión convencionales.

El término " $K_{asoc}$ " o " $K_a$ ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de la tasa asociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno particular, mientras que el término " $K_{dis}$ " o " $k_d$ ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de la tasa disociación de una interacción particular de anticuerpo-antígeno. El término " $K_D$ ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación en equilibrio, la cual se obtiene de la relación de  $k_d$  y  $k_a$  (es decir,  $k_d/k_a$ ) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de  $K_D$  para anticuerpos se pueden determinar usando métodos bien establecidos en la técnica. Un método preferido para determinar la  $K_D$  de un anticuerpo es usando resonancia de plasmón superficial, preferiblemente usando un sistema biosensor tal como el sistema de resonancia de plasmón superficial Biacore® o citometría de flujo y análisis de Scatchard.

El término "CE50" en el contexto de un ensayo *in vitro* o *in vivo* que usa un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, se refiere a la concentración de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo que induce una respuesta que es 50 % de la respuesta máxima, es decir, a medio camino entre la respuesta máxima y la de partida.

Una "tasa de internalización" de un anticuerpo o de un receptor, por ejemplo, CD73, mediado por un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD73, se puede representar, por ejemplo, por  $T_{1/2}$  de internalización, por ejemplo, como se muestra en los Ejemplos. Una tasa de internalización de un anticuerpo anti-CD73 se puede aumentar o incrementar en al menos un 10 %, 30 %, 50 %, 75 %, 2 veces, 3 veces, 5 veces o más, dando como resultado una reducción del  $T_{1/2}$  en al menos un 10 %, 30 %, 50 %, 75 %, 2 veces, 3 veces, 5 veces o más cambiando la región constante de la cadena pesada del anticuerpo a una región constante de la cadena pesada modificada, por ejemplo, una que contiene una bisagra de IgG2 y dominio CH1 de IgG2. Por ejemplo, en vez de tener un  $T_{1/2}$  de 10 minutos, una región constante de la cadena pesada modifica puede incrementar la tasa de internalización y de ese modo reducir el  $T_{1/2}$  a 5 minutos (es decir, un incremento de dos veces en la tasa de internalización o un descenso de dos veces en  $T_{1/2}$ ). " $T_{1/2}$ " se define como el tiempo al que se alcanza la mitad de la internalización máxima, medido a partir del momento en el que se añade el anticuerpo a las células. El nivel máximo de internalización puede ser el nivel de internalización en la meseta de una gráfica que representa la internalización trazada en la gráfica frente a las concentraciones de anticuerpo. Una región constante de la cadena pesada modificada puede incrementar el nivel de internalización de un anticuerpo en al menos un 10 %, 30 %, 50 %, 75 %, 2 veces, 3 veces, 5 veces o más. Otro modo de comparar las eficiencias de internalización de diferentes anticuerpos, tales como un anticuerpo con, y el mismo anticuerpo sin, una región constante de la cadena pesada, es comparando su nivel de internalización a una concentración de anticuerpo dada (por ejemplo, 100 nM) o a un tiempo dado (por ejemplo, 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos o 30 minutos). La comparación de los niveles de internalización también se puede realizar comparando los niveles de CE<sub>50</sub> de internalización. El nivel de internalización de un anticuerpo se puede definir en relación con la de un anticuerpo dado (referencia), por ejemplo, un anticuerpo descrito en el presente documento, por ejemplo, 11F11 o CD73.4-IgG2CS-IgG1 o CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f, y, se puede identificar como un porcentaje del valor obtenido con el anticuerpo dado (referencia). El alcance de internalización se puede aumentar en al menos un 10 %, 30 %, 50 %, 75 %, 2 veces, 3 veces, 5 veces o más, en comparación con uno cualquiera de estos métodos.

La expresión "de origen natural" como se usa en el presente documento como aplicada a un objeto se refiere al hecho de que un objeto se puede hallar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o de polinucleótido que está presente en un organismo (incluyendo a los virus) que se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionadamente por el ser humano en el laboratorio es de origen natural.

Un "polipéptido" se refiere a una cadena que comprende al menos dos restos de aminoácidos consecutivamente

unidos, con un límite no superior sobre la longitud de la cadena. Uno o más restos de aminoácidos en la proteína pueden contener una modificación tal como, pero sin limitación, glicosilación, fosforilación o un enlace disulfuro. Una "proteína" puede comprender uno o más polipéptidos.

- 5 La expresión "molécula de ácido nucleico", como se usa en el presente documento, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, y puede ser ADNc.

10 También se proporcionan "modificaciones de secuencia conservadoras" de las secuencias expuestas en las SEQ ID NO descritas en el presente documento, es decir, las modificaciones de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos que no anulan la unión del anticuerpo codificado por la secuencia de nucleótidos o que contienen la secuencia de aminoácidos, al antígeno. Tales modificaciones de secuencia conservadoras incluyen sustituciones de nucleótido y aminoácido, así como, adiciones y deleciones de nucleótido y aminoácido. Por ejemplo, las modificaciones se pueden introducir en las SEQ ID NO descritas en el presente documento por técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por la PCR. Las modificaciones de secuencia conservadoras incluyen sustituciones de aminoácidos conservadoras, en las que un resto de aminoácido se reemplaza por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por tanto, un resto de aminoácido no esencial previsto en un anticuerpo anti-CD73 está reemplazado preferentemente por otro resto de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Los métodos para identificar sustituciones conservadoras de nucleótidos y aminoácidos que no eliminan la unión a antígeno son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Brummell et al., *Biochem.* 32:1.180-1.187 (1993); Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); y Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

- 30 Como alternativa, en otra realización, las mutaciones se pueden introducir de manera aleatoria a lo largo de toda o una porción de la secuencia codificante del anticuerpo anti-CD73, tal como por mutagénesis de saturación, y los anticuerpos anti-CD73 modificados resultantes se pueden seleccionar en función de su actividad de unión mejorada.

35 Para los ácidos nucleicos, la expresión "homología sustancial" indica que dos ácidos nucleicos, o secuencias designadas de las mismas, cuando se alinean óptimamente y se comparan, son idénticas, con apropiadas inserciones o deleciones de nucleótidos, en al menos aproximadamente un 80 % de los nucleótidos, normalmente al menos aproximadamente un 90 % a 95 % y más preferentemente al menos aproximadamente un 98 % a 99,5 % de los nucleótidos. Como alternativa, la homología sustancial existe cuando los segmentos se hibridarán bajo las condiciones de hibridación selectivas, con el complemento de la hebra.

40 Para polipéptidos, la expresión "homología sustancial" indica que dos polipéptidos, o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean óptimamente y se comparan, son idénticas, con inserciones o deleciones de aminoácidos apropiadas, en al menos aproximadamente un 80 % de los aminoácidos, normalmente al menos aproximadamente un 90 % a 95 % y más preferentemente al menos aproximadamente un 98 % a 99,5 % de los aminoácidos.

50 El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias cuando las secuencias se alinean óptimamente (es decir,  $\% \text{ homología} = \frac{\text{n.º de posiciones idénticas}}{\text{n.º total de posiciones}} \times 100$ ), con alineamiento óptimo determinado tomando en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden conseguirse usando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes de más adelante.

55 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar usando el programa GAP en el paquete de programa informático GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz NWSgapdna.CMP y una ponderación de hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y una ponderación de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos también se pueden determinar usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*CABIOS*, 4:11-17 (1989)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de resto peso PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de programa informático GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250 y una ponderación por hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y una ponderación por longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

65 Las secuencias de ácidos nucleicos y proteína descritas en el presente documento además se pueden usar además

como una "secuencia problema" para realizar una búsqueda frente a bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Tales búsquedas se pueden realizar usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2,0) de Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Pueden realizarse búsquedas de nucleótidos por BLAST con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácidos nucleicos descritas en el presente documento. Las búsquedas de proteínas por BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas proteicas descritas en el presente documento. Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, se puede usar Gapped BLAST como se describe en Altschul et al, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aisla" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos celulares (por ejemplo, las otras partes del cromosoma) o proteínas, mediante técnicas convencionales, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, bandeado de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica. Véase, F. Ausubel, et al., ed. "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987).

Los ácidos nucleicos, por ejemplo, ADNc, se pueden mutar, de acuerdo con técnicas convencionales para proporcionar secuencias génicas. Para secuencias codificantes, estas mutaciones pueden afectar a la secuencia de aminoácidos como se desea. En particular, se contemplan secuencias de ADN sustancialmente homólogas a o derivadas de V nativa, D, J, constante, cambios y otras tales secuencias en el presente documento.

El término "vector", como se usa en el presente documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido" el cual se refiere a un bucle de ADN bicatenario en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales al genoma viral. Determinados vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episómicos de mamífero) se pueden integrar en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora y de este modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Tales vectores se refieren en el presente documento como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, los términos "plásmido" y "vector" se pueden usar de manera intercambiable, ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. Sin embargo, también se incluyen otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus defectuosos para la replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que tienen funciones equivalentes.

La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), como se usa en el presente documento, pretende referirse a una célula que comprende un ácido nucleico que no es de origen natural presente en la célula, y quizás una célula dentro de la cual se ha introducido una expresión recombinante. Debe entenderse que tales términos pretenden referirse no solo a la célula concreta, sino también a la descendencia de dicha célula. Debido a que pueden ocurrir determinadas mutaciones en generaciones posteriores debido a una mutación o a influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aun así se incluyen dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora", como se usa en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "antígeno" se refiere a cualquier sustancia inmunológica natural o sintética, tal como una proteína, péptido, o hapteno. Un antígeno puede ser CD73 o un fragmento de la misma.

Una "respuesta inmunitaria" se refiere una respuesta biológica dentro de un vertebrado frente a agentes extraños, dicha respuesta protege el organismo frente a estos agentes y enfermedades causadas por los mismo. Una respuesta inmunitaria está mediada por la acción de una célula del sistema inmunitario (por ejemplo, un linfocito T, linfocito B, linfocitos citolíticos naturales (NK), macrófago, eosinófilo, mastocito, célula dendrítica o neutrófilos) y macromoléculas solubles producidas por cualquiera de estas células o el hígado (que incluye anticuerpos, citoquinas, y complemento) que da como resultado el direccionamiento selectivo, unión a, daño de, destrucción de, y/o eliminación del cuerpo del vertebrado de los patógenos invasores, células o tejidos infectados por patógenos, células cancerosas u otras anormales, o, en los casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales. Una respuesta o reacción inmunitaria incluye, por ejemplo, activación o inhibición de un linfocito T, por ejemplo, un linfocito T afección o una célula Th, tal como un linfocitos T CD4+ o CD8+, o la inhibición de una célula Treg.

Un "inmunomodulador" o "inmunoregulador" se refiere a un agente, por ejemplo, un componente de una ruta de señalización, la cual puede estar implicada en la modulación, regulación, o modificación de una respuesta

inmunitaria. "Modulación", "regulación", o "modificación" de una respuesta inmunitaria se refiere a cualquier alteración en una célula del sistema inmunitario o en la actividad de tal célula (por ejemplo, un linfocito T efector). Tal modulación incluye estimulación o supresión del sistema inmunitario que se puede manifestar por un incremento o disminución en el número de diversos tipos celulares, un incremento o descenso en la actividad de estas células, o cualquier otro cambio que puede ocurrir dentro del sistema inmunitario. Se han identificado tanto los inmunomoduladores inhibidores como los estimuladores, algunos de los cuales pueden aumentar la función en un microambiente tumoral. El inmunomodulador puede estar localizado sobre la superficie de un linfocito T. Una "diana inmunomoduladora" o "diana inmunoreguladora" es un inmunomodulador que está dirigido para la unión por, y cuya actividad se altera por la unión de, una sustancia, agente, resto, compuesto o molécula. Las dianas inmunomoduladoras incluyen, por ejemplo, receptores sobre la superficie de una célula ("receptores inmunomoduladores") y ligandos del receptor ("ligandos inmunomoduladores").

Una capacidad incrementada para estimular una respuesta inmunitaria, o el sistema inmunitario, puede resultar de una actividad agonista aumentada de receptores coestimuladores de linfocito T y/o una actividad antagonista aumentada de receptores inhibidores. Una capacidad incrementada para estimular una respuesta inmunitaria, o el sistema inmunitario puede estar reflejada por un incremento de la CE50 o el nivel máximo de actividad en un ensayo que mide una respuesta inmunitaria, por ejemplo, un ensayo que mide los cambios en la liberación de citoquina o quimiocina, la actividad citolítica (determinada directamente en células diana o indirectamente detectando CD107a o granzimas) y la proliferación. La capacidad para estimular una respuesta inmune o la actividad del sistema inmunitario se puede aumentar en al menos un 10 %, 30 %, 50 %, 75 %, 2 veces, 3 veces, 5 veces o más.

"Inmunoterapia" se refiere al tratamiento de un sujeto afectado por, o está en riesgo de contraer o padecer una recurrencia de, una enfermedad mediante un método que comprende inducir, aumentar, suprimir o modificar de otro modo modificar una respuesta inmunitaria.

"Terapia inmunoestimulante" o "terapia inmunoestimuladora" se refiere a una terapia que da como resultado el incremento (inducción o aumento) de una respuesta inmunitaria en un sujeto para, por ejemplo, tratar el cáncer.

"Potenciar una respuesta inmunitaria endógena" quiere decir incrementar la efectividad o la potencia de una respuesta inmunitaria existente en un sujeto. El incremento en la efectividad y la potencia se puede alcanzar, por ejemplo, dominando mecanismos que suprimen la respuesta inmunitaria hospedadora endógena o estimulando los mecanismos que aumentan la respuesta inmunitaria hospedadora endógena.

Linfocitos "T efectores" ( $T_{eff}$ ) se refiere a linfocitos T (por ejemplo linfocitos T CD4+ y CD8+) con actividades citolíticas así como células auxiliares T (Th), que secretan citoquinas y activan y dirigen otras células inmunitarias, pero no incluyen linfocitos T reguladores (células Treg).

Como se usa en el presente documento, el término "unido" se refiere a la asociación de dos o más moléculas. El enlace puede ser covalente o no covalente. El enlace también puede ser genético (es decir, fusionado recombinantemente). Tales enlaces se pueden conseguir usando una amplia diversidad de técnicas reconocidas en la materia, tales como la conjugación química y la producción de proteína recombinante.

Como se usa en el presente documento, "administrar" se refiere a la introducción física de una composición que comprende un agente terapéutico a un sujeto, usando cualquiera de los diversos métodos y sistemas de liberación conocidos por los expertos en la técnica. Vías de administración preferidas para los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen la administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, espinal u otras vías parenterales de administración, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La expresión "administración parenteral" como se usa en el presente documento significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección e incluyen, sin limitación, inyección intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, intratecal, intralinfática, intralesional, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal e infusión, así como electroporación *in vivo*. Como alternativa, un anticuerpo descrito en el presente documento se puede administrar por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, intranasal, por vía oral, por vía vaginal, rectal, sublingualmente o tópicamente. La administración también se puede realizar, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces y/o durante uno o más períodos prolongados.

Como se usa en el presente documento, el término "respuesta linfocito T mediada" se refiere a una respuesta mediada por linfocitos T, incluyendo los linfocitos T efectores (por ejemplo, CD8+) y linfocitos T auxiliares (por ejemplo, CD4+). Las respuestas mediadas por linfocito T incluyen, por ejemplo, citotoxicidad y proliferación de linfocito T.

Como se usa en el presente documento, el término "respuestas de linfocito T citotóxico (CTL)" se refiere a una respuesta inmunitaria inducida por linfocitos T citotóxicos. Las respuestas CTL están mediadas por linfocitos T CD8+.

Como se usa en el presente documento, los términos "inhibe" o "bloquea" (por ejemplo, en referencia a la inhibición/bloqueo de la unión o actividad de CD73) se usa de manera intercambiable y abarca tanto inhibición/bloqueo parcial o completo.

5 Como se usa en el presente documento, "Cáncer" se refiere a un amplio grupo de diversas enfermedades caracterizadas por el crecimiento incontrolado de células anormales en el cuerpo. La división celular no regulada dan como resultado la formación de tumores o células malignas que invaden los tejidos vecinos y también pueden hacer metástasis a partes distantes del cuerpo a través del sistema linfático o del torrente sanguíneo.

10 Los términos "tratar", "que trata" y "tratamiento", como se usa en el presente documento, se refieren a cualquier tipo de intervención o proceso realizado en, o administración de un agente activo a, el sujeto con el objetivo de aliviar, aliviar, mejorar, inhibir o frenar o prevenir la progresión, desarrollo, gravedad o recurrencia de un síntoma, complicación, afección o indicios bioquímicos asociados con una enfermedad. La profilaxis se refiere a la administración a un sujeto que no tiene una enfermedad, para prevenir que ocurra la enfermedad o minimizar sus efectos si los hay.

Una "malignidad hematológica" incluye un linfoma, leucemia, mieloma o una malignidad linfoide, así como un cáncer del bazo y los nódulos linfáticos. Linfomas ilustrativos incluyen tanto linfomas de linfocitos B como linfomas de linfocito T. Los linfomas de linfocito B incluyen tanto linfomas de Hodgkin como la mayoría de los linfomas de no Hodgkin. Ejemplos no limitantes de los linfomas de linfocito B incluyen linfoma de linfocito B grande difuso, linfoma folicular, linfoma de tejido linfático asociado a mucosa, linfoma linfocítico de célula pequeña (superposiciones con la leucemia linfocítica crónica), linfoma de células del manto (MCL), linfoma de Burkitt, linfoma mediastínico de linfocitos B grandes, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma de linfocitos B de zona marginal nodal, linfoma esplénico de la zona marginal, linfoma intravascular de linfocito B grande, linfoma de derrame primario, granulomatosis linfomatoide. Ejemplos no limitantes de linfomas de linfocito T incluyen linfoma extranodal de linfocito T, linfoma cutáneo de linfocito T, linfoma anaplásico de células grandes, y linfoma angioinmunoblástico de linfocito T. La malignidades hematológicas también incluyen leucemia, tales como, pero sin limitación, leucemia secundaria, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, y leucemia linfoblástica aguda. Las malignidades hematológicas incluyen además mielomas, tales como, pero sin limitación, mieloma múltiple y mieloma múltiple latente. Otros cánceres hematológicos o asociados a linfocito B o linfocito T están abarcados por el término malignidad hematológica.

La expresión "dosis eficaz" o "dosificación eficaz" se define como una cantidad suficiente para conseguir o conseguir al menos parcialmente un efecto deseado. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "dosificación terapéuticamente eficaz" de un fármaco o agente terapéutico es cualquier cantidad del fármaco que, cuando se usa solo o en combinación con otro agente terapéutico, promueve la regresión de la enfermedad evidenciada por un descenso en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos libres de síntomas de la enfermedad, o una prevención del empeoramiento o discapacidad debido a la enfermedad. Una "cantidad profilácticamente eficaz" o una "dosificación profilácticamente eficaz" de un fármaco es una cantidad del fármaco que, cuando se administra solo o en combinación con otro agente terapéutico a un sujeto en riesgo de desarrollar una enfermedad o de padecer una recurrencia de la enfermedad, inhibe el desarrollo o la recurrencia de la enfermedad. La capacidad de un agente terapéutico o profiláctico para promover la regresión de la enfermedad o inhibir el desarrollo o recurrencia de la enfermedad se puede evaluar usando diversos métodos conocidos por los profesionales, tal como en sujetos humanos durante ensayos clínicos, en sistemas de modelos animales que predicen la eficacia en seres humanos, o analizando la actividad del agente en ensayos *in vitro*.

A modo de ejemplo, un agente anti-cáncer es un fármaco que frena la progresión del cáncer o promueve la regresión del cáncer en un sujeto. En realizaciones preferidas, una cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco promueve la regresión del cáncer hasta el punto de eliminar el cáncer. "Promover la regresión del cáncer" significa que la administración de una cantidad eficaz del fármaco, solo o en combinación con un agente anti-neoplásico, da como resultado una reducción en el crecimiento del tumor o el tamaño, necrosis del tumor, un descenso en la gravedad de al menos un síntoma de la enfermedad, un incremento en la frecuencia y la duración de los periodos sin síntoma de enfermedad, una prevención de deficiencia o discapacidad debido a la enfermedad, o de otra manera mejora de los síntomas de la enfermedad en el paciente. La eficacia farmacológica se refiere a la capacidad del fármaco de promover la regresión del cáncer en el paciente. La seguridad fisiológica se refiere a un nivel aceptablemente bajo de la toxicidad, u otros efectos fisiológicos adversos al nivel celular, de órgano y/u organismo (efectos adversos) resultantes de la administración del fármaco.

A modo de ejemplo para el tratamiento de tumores, una cantidad terapéuticamente eficaz o dosis del fármaco preferentemente inhibe el crecimiento celular o el crecimiento tumoral en al menos un 20 %, más preferentemente en al menos aproximadamente un 40 %, incluso más preferentemente en al menos aproximadamente un 60 %, y aún más preferentemente en al menos aproximadamente un 80 % en relación con sujetos no tratados. En las realizaciones más preferidas, una cantidad terapéuticamente eficaz o dosis del fármaco inhibe completamente el crecimiento celular o el crecimiento tumoral, es decir, preferentemente inhibe el crecimiento celular o el crecimiento al 100 %. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento tumoral se puede evaluar usando los ensayos descritos *infra*. Como alternativa, esta propiedad de una composición se puede evaluar examinando la capacidad del

compuesto para inhibir el crecimiento tumoral, tal inhibición se puede medir *in vitro* por ensayos conocidos por los profesionales. En otras realizaciones preferidas descritas en el presente documento, se puede observar la regresión tumoral y puede continuar durante un período de al menos aproximadamente 20 días, más preferentemente al menos aproximadamente 40 días, o incluso más preferentemente al menos aproximadamente 60 días.

Los términos "paciente" y "sujeto" se refieren a cualquier animal humano o no humano que recibe tratamiento profiláctico o terapéutico. Por ejemplo, los métodos y composiciones descritos en el presente documento se pueden usar para tratar un sujeto que tiene cáncer. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, oveja, perro, vaca, pollos, anfibios, reptiles, etc.

Diversos aspectos descritos en el presente documento se describen en más detalle en las siguientes subsecciones.

### I. Anticuerpos anti-CD73

En el presente documento se describen anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos completamente humanos, los cuales se caracterizan por características funcionales particulares o propiedades. Por ejemplo, los anticuerpos específicamente se unen a CD73 humana. Además, los anticuerpos pueden reaccionar de manera cruzada con CD73 de uno o más primates no humanos, tales como CD73 de cynomolgus.

Además de unirse específicamente a CD73 humana soluble y/o unida a membrana, los anticuerpos descritos en el presente documento presentan una o más de las siguientes propiedades funcionales:

- (a) inhibición de la actividad enzimática de CD73, dando como resultado una reducción de la adenosina producida;
- (b) unión a CD73 cyno;
- (c) internalización de CD73 mediada por anticuerpo en las células, por ejemplo, células tumorales; y
- (d) unión a un epitopo conformacional que comprende los aminoácidos 65-83 y 157-172 de CD73 humana.

Preferentemente, los anticuerpos anti-CD73 se unen a CD73 humana (monomérica o dimérica; isoforma 1 o 2) con alta afinidad, por ejemplo, con una  $K_D$  de  $10^{-7}$  M o menos,  $10^{-8}$  M o menos,  $10^{-9}$  M o menos,  $10^{-10}$  M o menos,  $10^{-11}$  M o menos,  $10^{-12}$  M o menos,  $10^{-12}$  M a  $10^{-7}$  M,  $10^{-11}$  M a  $10^{-7}$  M,  $10^{-10}$  M a  $10^{-7}$  M,  $10^{-9}$  M a  $10^{-7}$  M, o  $10^{-10}$  M a  $10^{-8}$  M. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 se une a CD73 humana soluble, por ejemplo, como se determina mediante análisis SPR de BIACORE®, con una  $K_D$  de  $10^{-7}$  M o menos,  $10^{-8}$  M o menos,  $10^{-9}$  M (1 nM) o menos,  $10^{-10}$  M o menos,  $10^{-12}$  M a  $10^{-7}$  M,  $10^{-11}$  M a  $10^{-7}$  M,  $10^{-10}$  M a  $10^{-7}$  M,  $10^{-9}$  M a  $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  M a  $10^{-7}$  M o  $10^{-10}$  M a  $10^{-8}$  M. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73, se une a CD73 humana unida (por ejemplo, unida a membrana celular, por ejemplo, células Calu6), por ejemplo, determinada como se describe además en el presente documento, con una  $CE_{50}$  de menor que 1 nM. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 se une a CD73 humana unida, por ejemplo, CD73 humana unida a membrana celular, por ejemplo, determinado mediante citometría de flujo y gráfico de Scatchard, con una  $K_D$  de  $10^{-7}$  M o menos,  $10^{-8}$  M o menos,  $10^{-9}$  M (1 nM) o menos,  $10^{-10}$  M o menos,  $10^{-12}$  M a  $10^{-7}$  M,  $10^{-11}$  M a  $10^{-8}$  M,  $10^{-10}$  M a  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M a  $10^{-8}$  M,  $10^{-11}$  M a  $10^{-9}$  M,  $10^{-10}$  M a  $10^{-8}$  M, o  $10^{-10}$  M a  $10^{-9}$  M. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 se une a CD73 humana soluble con una  $K_D$  de  $10^{-7}$  M o menos,  $10^{-8}$  M o menos,  $10^{-9}$  M (1 nM) o menos,  $10^{-10}$  M o menos,  $10^{-12}$  M a  $10^{-7}$  M,  $10^{-11}$  M a  $10^{-7}$  M,  $10^{-10}$  M a  $10^{-7}$  M,  $10^{-9}$  M a  $10^{-7}$  M,  $10^{-10}$  M a  $10^{-8}$  M, o  $10^{-8}$  M a  $10^{-7}$  M, y a CD73 humana unida, por ejemplo, CD73 humana unida a membrana celular, con una  $K_D$  o  $CE_{50}$  de  $10^{-7}$  M o menos,  $10^{-8}$  M o menos,  $10^{-9}$  M (1 nM) o menos,  $10^{-10}$  M o menos,  $10^{-12}$  M a  $10^{-7}$  M,  $10^{-11}$  M a  $10^{-8}$  M,  $10^{-10}$  M a  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M a  $10^{-8}$  M,  $10^{-11}$  M a  $10^{-9}$  M, o  $10^{-10}$  M a  $10^{-9}$  M.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 se une a CD73 cyno con alta afinidad, por ejemplo, se une a una célula CHO que expresa CD73 cyno con una  $CE_{50}$  de 0,1 nM to 10 nM, tal como una  $CE_{50}$  de menos de 1 nM, como se determina, por ejemplo, como se describe además en el presente documento.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento también se unen a CD73 de cynomolgus, por ejemplo, se unen a CD73 de cynomolgus unida a membrana, por ejemplo, a una célula CHO que expresa CD73 cyno con una  $CE_{50}$  de 100 nM o menos, 10 nM o menos, 1 nM o menos, 100 nM a 0,01 nM, 100 nM a 0,1 nM, 100 nM a 1 nM, o 10 nM a 0,1 nM, como se mide, por ejemplo, en los Ejemplos.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 son al menos 90 %, 95 %, 98 % o 99 % monoméricos, como se determina, por ejemplo, mediante SEC. Los anticuerpos anti-CD73 también pueden tener características biofísicas que son similares a, o están dentro del rango de, aquellas de los anticuerpos descritos en el presente documento.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 inhiben la actividad enzimática de CD73 humana y/o cyno, por ejemplo, como se determina en los ensayos unidos a perla de CD73, o como se determina en células, por ejemplo, Calu6, SKMEL24 o H292, o como se determina en un ensayo *in vivo*, por ejemplo, un modelo de tumor de xenoinjerto, por ejemplo, como se describe además en los Ejemplos. Los anticuerpos anti-CD73 pueden tener

actividades inhibitoras que son al menos similares a, o están dentro del rango de, aquellas de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD73 pueden inhibir la actividad enzimática CD73 humana (por ejemplo, CD73 unida a un sólido) (producción de adenosina) con una  $CE_{50}$  de menos de 10 nM o menos de 5 nM o en el rango de 1 a 10 nM o 5 a 10 nM. Los anticuerpos anti-CD73 pueden inhibir la actividad de CD73 humana en células, por ejemplo, células Calu6 con una  $CE_{50}$  de menos de 10 nM o menos de 1 nM o en el intervalo de 0,1 a 10 nM, 0,1 a 1 nM, o 0,1 a 0,5 nM.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 se internalizan (y median la internalización de CD73) por una célula a la cual se une como se determina, por ejemplo, en un ensayo de internalización de alto contenido o mediante FACS o citometría de flujo, como se describe además en los Ejemplos. Los anticuerpos anti-CD73 pueden tener características de internalización ( $CE_{50}$ ,  $T_{1/2}$  e  $Y_{m\acute{a}x}$ ), y el tiempo hasta la meseta que son al menos similares a, o están dentro del rango de, aquellos de los anticuerpos descritos en los Ejemplos. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 tiene un  $T_{1/2}$  de internalización que es menor que 1 hora, tal como menor que 30 minutos, menor que 15 minutos, menor que 12 minutos, menor que 10 minutos, menor que 7 minutos o incluso menor que 5 minutos en una o más líneas celulares, por ejemplo, aquellas expuestas en los Ejemplos, como se determina, por ejemplo, en un ensayo de internalización de alto contenido (descrito en el Ejemplo 6A). En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 alcanza la internalización mediada por anticuerpo anti-CD73 en 10 minutos o menos, 6 horas o menos, 5 horas o menos, 4 horas o menos, 3 horas o menos, 2 horas o menos, 1 hora o menos, por ejemplo, en el intervalo de 10 minutos a 10 horas, 10 minutos a 6 horas, 1 hora a 10 horas o 1 hora a 6 horas, como se determina, por ejemplo, usando un ensayo de internalización de alto contenido, como se describe, por ejemplo, en el Ejemplo 6A o usando citometría de flujo, como se describe, por ejemplo, en el Ejemplo 6B. El nivel máximo de internalización de CD73 mediada por anticuerpo anti-CD73 puede ser de al menos 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos 90 % o más, dependiendo del tipo de célula. Por ejemplo, la  $CE_{50}$  de la internalización de CD73 mediada por anticuerpo anti-CD73 en células Calu6, como se mide en el ensayo de internalización de alto contenido descrito en los Ejemplos, puede ser menor que 10 nM, por ejemplo, de 0,1 to 10 nM o 1 a 10 nM o 1 a 5 nM y una  $Y_{m\acute{a}x}$  de al menos 90 % o al menos 95 %.

Los anticuerpos anti-CD73, por ejemplo, los anticuerpos que tienen una bisagra de IgG2, dominio CH1 de IgG2, o bisagra de IgG2 y dominio CH1 de IgG2, puede mediar las siguientes características de internalización de CD73 como se mide en un ensayo de internalización de alto contenido, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 6A:

- $CE_{50}$  de 10 nM o menos, 5 nM o menos, 1 nM o menos, o 0,1 a 10 nM o 0,1 a 1 nM; una  $Y_{m\acute{a}x}$  (porcentaje máximo de internalización) de al menos 90 %, 95 % o 98 % en células Calu6 y una  $T_{1/2}$  de menos de 30 minutos o menos de 10 minutos en células Calu6;
- Un  $T_{1/2}$  de menos de 30 minutos o menos de 10 minutos en células humanas, por ejemplo, células Calu6, células HCC44, células H2030, células H2228, células HCC15, células SKLU1, células SKMES1 o células SW900.

Los anticuerpos anti-CD73, por ejemplo, los anticuerpos que tienen una bisagra de IgG2, dominio CH1 de IgG2, o bisagra de IgG2 y dominio CH1 de IgG2, pueden mediar las siguientes características de internalización de CD73 medidas mediante citometría de flujo, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 6B:

- Un  $T_{1/2}$  de 1 hora o menos y una  $Y_{m\acute{a}x}$  de al menos 70 % en células Calu6;
- Un  $T_{1/2}$  de 30 minutos o menos y una  $Y_{m\acute{a}x}$  de al menos 70 % en células NCI-H292;
- Un  $T_{1/2}$  de 2 horas o menos y una  $Y_{m\acute{a}x}$  de al menos 30 % en células SNUC1; y/o
- Un  $T_{1/2}$  de 30 minutos o menos y una  $Y_{m\acute{a}x}$  de al menos 60 % en células NCI-H1437.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo bin1, es decir, compite por unirse a CD73 humana con 11F11, pero no con 4C3.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 se unen a un epítipo, por ejemplo, un epítipo conformacional en la porción N-terminal de CD73 humana, por ejemplo, un epítipo localizado dentro de los aminoácidos 65-83 de CD73 humana (SEQ ID NO: 96) determinado, por ejemplo, mediante HDX-MS, como se describe además en los Ejemplos. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 se unen a los aminoácidos 157-172 de CD73 humana (SEQ ID NO: 97), o a un epítipo localizado dentro de los aminoácidos 157-172, de CD73 humana (SEQ ID NO: 97), determinado, por ejemplo, mediante HDX-MS. Como alternativa, los anticuerpos anti-CD73 se unen a un epítipo, por ejemplo, un epítipo discontinuo en la porción N-terminal de CD73 humana, como se determina, por ejemplo, mediante HDX-MS.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 se unen a los aminoácidos 65 a 83 y los aminoácidos 157-172 de CD73 humana, o a un epítipo dentro de los aminoácidos 65 a 83 y los aminoácidos 157-172, de isoforma 1 o 2 de CD73 humana, es decir, las secuencias de aminoácidos FTKVQQIRRAEPNVLALLDA (SEQ ID NO: 96) y LYLPHYKVLPGDEVVG (SEQ ID NO: 97), como se determina mediante, por ejemplo, HDX-MS. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 se unen a todos o una parte de los aminoácidos 65 a 83 y los aminoácidos 157-172 de CD73 humana, como se determina mediante, por ejemplo, HDX-MS. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 se unen a tanto CD73 humana glicosilada como no glicosilada. En determinadas

realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 se unen únicamente a CD73 glicosilada y no a CD73 no glicosilada.

Los anticuerpos anti-CD73 pueden competir por la unión a CD73 con (o inhibir la unión de) anticuerpos anti-CD73 que comprenden CDR o regiones variables descritas en el presente documento, por ejemplo, aquellas de CD73.4-1, CD73.4-2, CD73.3, 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 y/o 7A11. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 inhiben la unión de CD73.4-1, CD73.4-2, CD73.3, 11F11, 4C3, 4D4, 10D2, 11A6, 24H2, 5F8, 6E11 y/o 7A11 CD73 humanos en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %. En determinadas realizaciones, CD73.4-1, CD73.4-2, CD73.3, 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 y/o 7A11 inhiben la unión de anticuerpos anti-CD73 a CD73 humana en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 inhiben la unión de CD73.4-1, CD73.4-2, CD73.3, 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 y/o 7A11 a CD73 humana en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % y CD73.4-1, CD73.4-2, CD73.3, 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 y/o 7A11 inhiben la unión de anticuerpos anti-CD73 a CD73 humana en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % (por ejemplo, compiten en ambas direcciones). Los experimentos de competición se pueden realizar, por ejemplo, como se describe además en el presente documento, por ejemplo, en los Ejemplos.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 inhiben la actividad enzimática de CD73 y/o se internalizan en células sin requerir entrecruzamiento multivalente, como se determina, por ejemplo, por la carencia de requerimiento de unión a FcR.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, u 11 de las características enumeradas en la Tabla 3.

Tabla 3: *Características potenciales de los anticuerpos anti-CD73*

- (1) unión a CD73 humana, por ejemplo, isoforma 1 y 2 de CD73 humana monomérica y dimerica humana unida a perla, por ejemplo, con una  $K_D$  de 10 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 10 nM), por ejemplo, como se mide mediante análisis SPR de BIACORE®;
- (2) unión a CD73 humana unida a membrana, por ejemplo, con una  $CE_{50}$  de 1 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 1 nM);
- (3) unión a CD73 de cynomolgus, por ejemplo, unión a CD73 de cynomolgus unida a membrana, por ejemplo, con una  $CE_{50}$  de 10 nM o menos (por ejemplo, 0,01 nM a 10 nM);
- (4) inhibición de la actividad enzimática de CD73 humana, por ejemplo, con una  $CE_{50}$  de 10 nM o menos;
- (5) inhibición de la actividad enzimática de CD73 cyno, por ejemplo, con una  $CE_{50}$  de 10 nM o menos;
- (6) inhibición de la actividad enzimática de CD73 humana endógena (celular) en células Calu6 con una  $CE_{50}$  de 10 nM o menos;
- (7) inhibición de la actividad enzimática de CD73 humana *in vivo*;
- (8) internalización, por ejemplo, internalización de CD73 mediada (o dependiente) por anticuerpo, en células, por ejemplo, con un  $T_{1/2}$  de menos de 1 hora, 30 minutos o 10 minutos y/o una  $Y_{máx}$  de al menos 70 %, 80 % o 90 %;
- (9) unión a un epítipo conformacional en CD73 humana, por ejemplo, un epítipo discontinuo dentro de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) que incluye todos o una parte de los restos de aminoácidos FTKVQQIRRAEPNVLDDA (SEQ ID NO: 96) y/o LYLPHYKVLPGDEVVVG (SEQ ID NO: 97);
- (10) competición en una dirección o ambas direcciones para la unión a CD73 humana con CD73.4-1, CD73.4-2, CD73.3, 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 y/o 7A11; y
- (11) interacción con CD73 humana en un patrón similar a CD73.4, como se determina mediante cristalografía por rayos X.

Una actividad de anticuerpo que presenta una o más de estas propiedades funcionales (por ejemplo, actividades bioquímicas, inmunológicas, celulares, fisiológicas u otras biológicas, o similares) como se determinan según las metodologías conocidas en la técnica y se describen en el presente documento, se entenderá que se refiere a una diferencia estadísticamente significativa en la actividad particular en relación a la vista en ausencia del anticuerpo (por ejemplo, o cuando un anticuerpo control de especificidad irrelevante está presente). En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 descrito en el presente documento descendiendo un parámetro medido (por ejemplo, volumen tumoral, metástasis tumoral, niveles de adenosina, niveles de cAMP) en al menos un 10 % del parámetro medido, más preferentemente al menos un 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % y en ciertas realizaciones preferidas, en más de un 92 %, 94 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 %. Por el contrario, un anticuerpo anti-CD73 descrito en el presente documento incrementa un parámetro medido en al menos un 10 %, tal como al menos un 20 %, o, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 % (es decir, 2 veces), 3 veces, 5 veces o 10 veces.

Los ensayos convencionales para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos hacia CD73 de diversas especies son conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, ELISA, transferencias Western, y RIA. Los ensayos

adecuados se describen en detalle en los Ejemplos. Las cinéticas de unión (por ejemplo, la afinidad de unión) de los anticuerpos también se pueden evaluar mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica, tales como análisis SPR BIACORE®. Los ensayos para evaluar los efectos de los anticuerpos sobre las propiedades funcionales de CD73 (por ejemplo, la producción de adenosina, el crecimiento tumoral y la metástasis, la inhibición de los linfocitos T) se describen a más detalle *infra* y en los Ejemplos.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 no son anticuerpos nativos o no son anticuerpos de origen natural. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD73 tienen modificaciones postraduccionales que son diferentes de las de los anticuerpos que son de origen natural, tal como teniendo más, menos o un tipo diferente de modificación postraducción.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 estimulan la función de Teff (T efector) y/o reduce la función de Treg, por ejemplo, eliminando CD73 de la superficie del linfocito T y/o inhibiendo su actividad enzimática.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 comprenden al menos una bisagra de IgG2, y opcionalmente también un dominio CH1 de IgG2 o fragmento o derivado de la bisagra y/o dominio CH1 y la forma A del anticuerpo (véase, por ejemplo, Allen et al. (2009) *Biochemistry* 48:3.755). En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD3 comprenden al menos una bisagra de IgG2, y opcionalmente también un dominio CH1 de IgG2 o fragmento o derivado de la bisagra y/o dominio CH1 y el anticuerpo ha adoptado la forma B (véase, por ejemplo, Allen et al. (2009) *Biochemistry* 48:3.755). En determinadas realizaciones una composición comprende una mezcla de anticuerpos anti-CD73 con forma A y anticuerpos anti-CD73 con forma B.

En el presente documento se proporcionan anticuerpos anti-CD73 humana que (i) comprenden una región variable que se une a una región en la CD73 humana que es similar a la unida a 11F11, pero no se une a una región que es similar a la unida por 4C3 (es decir, es un anticuerpo bin1); (ii) se unen a CD73 humana monomérica y dimérica con una Kd de 10 nM o menos; (iii) inhiben la actividad enzimática (conversión de AMP a adenosina) de CD73 humana, por ejemplo, en células, por ejemplo, células Calu6, con una CE50 de menos de 10 nM; y (iv) median la internalización de CD73 dependiente de anticuerpo en células, por ejemplo, con un T1/2 de 1 hora o menos (o 30 minutos o menos, o 10 minutos o menos), una Ymáx de 50 % o más (o 60 % o más, 70 % o más, 80 % o más o 90 % o más) en células humanas, por ejemplo, células Calu6, células H2228, células HCC15 células H2030, células SNUC1. En determinadas realizaciones, los anticuerpos comprende una bisagra de IgG2 o una bisagra de IgG2 y dominio CH1 de IgG2. En el presente documento se proporcionan anticuerpos anti-CD73 humana que (i) comprenden una región variable que se une a una región en la CD73 humana que es similar a la unida a 11F11, pero no se une a una región que es similar a la unida por 4C3 (es decir, es un anticuerpo bin1); (ii) se unen a CD73 humana monomérica y dimérica con una Kd de 10 nM o menos, como se determina mediante SPR (Biacore); (iii) inhiben la actividad enzimática (conversión de AMP a adenosina) de CD73 humana, por ejemplo, en células, por ejemplo, células Calu6, con una CE50 de menos de 10 nM; y (iv) median la internalización de CD73 dependiente de anticuerpo en células, por ejemplo, con un T1/2 de 30 minutos o menos, un Ymáx de 80 % o más en células Calu6, H2228, HCC15 o H2030 humanas, determinado usando el ensayo de internalización de alto contenido descrito en el Ejemplo 6A.

En realizaciones preferidas, un anticuerpo anti-CD73 descrito en el presente documento no es significativamente tóxico. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD73 no es significativamente tóxico a un órgano de un ser humano, por ejemplo, uno o más del hígado, riñón, cerebro, pulmones y corazón, como se determina, por ejemplo, en ensayos clínicos. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 no desencadena significativamente una respuesta inmune no deseable, por ejemplo, autoinmunidad o inflamación.

## II. Anticuerpos anti-CD73 ilustrativos

La presente invención se refiere a anticuerpos anti-CD73 aislados que comprenden secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que comprenden las SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que comprenden las SEQ ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente, y los que comprenden una región constante de la cadena pesada que comprende una bisagra de IgG2 y dominio CH1 de IgG2. Además de los anticuerpos anti-CD73 de la invención, la divulgación también proporciona otros anticuerpos anti-CD73 ilustrativos.

### *Regiones variables de los anticuerpos anti-CD73*

Los anticuerpos particulares descritos en el presente documento son los anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, que tienen las secuencias de CDR y/o región variable de los anticuerpos 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11, 7A11, CD73.3-1, -2 o -3, CD73.4-1 y -2, CD73.4-2, CD73.5-1 y -2, CD73.6-1 y -2, CD73.7-1 y -2, CD73.8-1 y -2, CD73.9-1 y -2, CD73.10-1 y -2 y CD73.11, así como los anticuerpos que tienen al menos un 80 % de identidad (por ejemplo, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % de identidad) con las secuencias de su región variable o CDR. Los anticuerpos de la invención son anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, que tienen las secuencias de CDR y/o región variable de los anticuerpos 11F11-2, CD73.4-2 y CD73.5-2. La Tabla 4 expone las SEQ ID NO de las

## ES 2 807 182 T3

CDR de las regiones VH y VL de cada anticuerpo, así como la de las regiones VH y VL. Como se describe además en los Ejemplos, determinadas cadenas pesadas pueden existir con más de una cadena ligera, y las SEQ ID NO de las cadenas ligeras alternas también se proporcionan en la Tabla de a continuación.

5

Tabla 4:

	VH				VL			
	CDR1	CDR2	CDR3	VH	CDR1	CDR2	CDR3	VL
11F11-1	5	6	7	4	9	10	11	8
11F11-2	5	6	7	4	13	14	15	12
4C3-1	17	18	19	16	21	22	23	20
4C3-2	17	18	19	16	25	26	27	24
4C3-3	17	18	19	16	29	30	31	28
4D4-1	33	34	35	32	37	38	39	36
10D2-1	41	42	43	40	45	46	47	44
10D2-2	41	42	43	40	49	50	51	48
11A6-1	53	54	55	52	57	58	59	56
24H2-1	61	62	63	60	65	66	67	64
5F8-1	69	70	71	68	73	74	75	72
5F8-2	69	70	71	68	77	78	79	76
5F8-3	69	70	71	68	239	240	241	238
6E11-1	81	82	83	80	85	86	87	84
7A11-1	89	90	91	88	93	94	95	92
73,3	17	18	19	170	21	22	23	20
73.4-1	5	6	7	135	9	10	11	8
73.4-2	5	6	7	135	13	14	15	12
73.5-1	5	6	7	171	9	10	11	8
73.5-2	5	6	7	171	13	14	15	12
73.6-1	5	6	7	172	9	10	11	8
73.6-2	5	6	7	172	13	14	15	12
73.7-1	5	6	7	173	9	10	11	8
73.7-2	5	6	7	173	13	14	15	12
73.8-1	5	6	7	174	9	10	11	8
73.8-2	5	6	7	174	13	14	15	12
73.9-1	5	6	7	175	9	10	11	8
73.9-2	5	6	7	175	13	14	15	12
73.10-1	5	6	7	176	9	10	11	8
73.10-2	5	6	7	176	13	14	15	12
73.11	33	34	35	177	37	38	39	36

En el presente documento se proporcionan anticuerpos aislados, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que comprenden regiones variables de la cadena pesada y ligera, en los que la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 16, 32, 40, 52, 60, 68, 80, 88, 135, y 170-177.

10

También se proporcionan anticuerpos aislados, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que comprenden regiones variables de la cadena pesada y ligera, en los que la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 8, 12, 20, 24, 28, 36, 44, 48, 56, 64, 72, 76, 84, 92 y 238. En el presente documento se proporcionan anticuerpos aislados, o una porción de unión a antígeno de los mismos, que comprenden:

15

- (a) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 135 y 8, respectivamente;
- (b) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 135 y 12, respectivamente;
- (c) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 4 y 8, respectivamente;
- (d) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 4 y 12, respectivamente;
- (e) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 16 y 20, respectivamente;
- (f) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 16 y 24,

20

25

- respectivamente;
- (g) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 16 y 28, respectivamente;
- 5 (h) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 32 y 36, respectivamente;
- (i) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 40 y 44, respectivamente;
- (j) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 40 y 48, respectivamente;
- 10 (k) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 52 y 56, respectivamente;
- (l) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 60 y 64, respectivamente;
- 15 (m) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 68 y 72, respectivamente;
- (n) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 68 y 76, respectivamente;
- (o) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 68 y 238, respectivamente;
- 20 (p) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 80 y 84, respectivamente;
- (q) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 88 y 92, respectivamente;
- 25 (r) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 170 y 20, respectivamente;
- (s) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 170 y 24, respectivamente;
- (t) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 170 y 28, respectivamente;
- 30 (u) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 171 y 8, respectivamente;
- (v) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 171 y 12, respectivamente;
- 35 (w) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 172 y 8, respectivamente;
- (x) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 172 y 12, respectivamente;
- (y) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 173 y 8, respectivamente;
- 40 (z) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 173 y 12, respectivamente;
- (a2) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 174 y 8, respectivamente;
- 45 (b2) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 174 y 12, respectivamente;
- (c2) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 175 y 8, respectivamente;
- (d2) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 175 y 12, respectivamente;
- 50 (e2) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 176 y 8, respectivamente;
- (f2) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 176 y 12, respectivamente; o
- 55 (g2) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 177 y 36, respectivamente.

En una realización de la invención, los anticuerpos aislados comprenden

- 60 (a) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 135 y 12, respectivamente;
- (b) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 4 y 12, respectivamente; o
- (c) las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera que comprenden las SEQ ID NO: 171 y 12, respectivamente.
- 65

Los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento pueden comprender las CDRI, CDR2 y CDR3 de la

cadena pesada y ligera de los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento, por ejemplo, CD73.4-1, CD73.4-2, CD73.3, 11F11-1, 11F11-2, 11F11, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 5F8-3, 6E11 y 7A11, o combinaciones de los mismos. Los anticuerpos anti-CD73 de la invención comprenden las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y ligera del anti-CD73 CD73.4-2 u 11F11-2.

5 Dado que cada uno de estos anticuerpos se une a CD73 y que la especificidad de unión a antígeno se proporciona principalmente por las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias de CDR1, 2 y 3 de  $V_H$  y las secuencias de CDR1, 2 y 3 de  $V_L$  se pueden "mezclar y emparejar" (es decir, las CDR de diferentes anticuerpos se pueden mezclar y emparejar, aunque cada anticuerpo debe contener una CDR1, 2 y 3 de  $V_H$  y una CDR1, 2 y 3 de  $V_L$ ) para crear otras moléculas de unión a anti-CD73 descritas en el presente documento. La unión de CD73 de tales anticuerpos "mezclados y emparejados" se pueden ensayar usando los ensayos de unión anteriormente descritos en los Ejemplos (por ejemplo ELISA). Preferentemente, cuando las secuencias de CDR de  $V_H$  se mezclan y emparejan, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia  $V_H$  particular se reemplaza por una(s) secuencia(s) de CDR estructuralmente similares. Asimismo, cuando las secuencias de CDR de  $V_L$  se mezclan y emparejan, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de  $V_L$  particular se reemplaza por una(s) secuencia(s) de CDR estructuralmente similar(es). Será fácilmente evidente a los expertos en la técnica que las novedosas secuencias  $V_H$  y  $V_L$  se pueden crear sustituyendo una o más secuencias de la región de CDR de  $V_H$  y  $V_L$  con secuencias estructuralmente similares a las secuencias de CDR descritas en el presente documento para los anticuerpos monoclonales CD73.4-1, CD73.4-2, 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 y/o 7A11. Los anticuerpos "mezclados y emparejados" que tienen la afinidad de unión, la bioactividad y/o otras propiedades equivalentes o superiores a los anticuerpos específicos descritos en el presente documento se pueden seleccionar para su uso en los métodos descritos en el presente documento.

En el presente documento se proporcionan anticuerpos aislados, o una porción de unión a antígeno de los mismos, que comprenden:

- (a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 17, 33, 41, 53, 61, 69, 81, y 89;
- (b) una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, 18, 34, 42, 54, 62, 70, 82, y 90;
- (c) una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19, 35, 43, 55, 63, 71, 83, y 91;
- (d) una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9, 13, 21, 25, 29, 37, 45, 49, 57, 65, 73, 77, 85, y 93;
- (e) una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 14, 22, 26, 30, 38, 46, 50, 58, 66, 74, 78, 86, y 94; y
- (f) una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 11, 15, 23, 27, 31, 39, 47, 51, 59, 67, 75, 79, 87, y 95; en el que el anticuerpo se une específicamente a CD73 humana.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende regiones variables de la cadena pesada y ligera, en el que las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NO: 5-7; 17-19; 33-35; 41-43; 53-55; 61-63; 69-71; 81-83; o 89-91;

en el que el anticuerpo se une específicamente a CD73 humana. Los anticuerpos de la invención comprenden regiones variables de la cadena pesada y ligera, en los que las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NO: 5-7.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende regiones variables de la cadena pesada y ligera, en el que las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden:

- (a) las SEQ ID NO: 9-11; 13-15; 21-23; 25-27; 29-31; 37-39; 45-47; 49-51; 57-59; 65-67; 73-75; 77-79; 85-87; o 93-95;

en el que el anticuerpo se une específicamente a CD73 humana. Los anticuerpos de la invención comprenden regiones variables de la cadena pesada y ligera, en el que las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NO: 13-15.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende regiones variables de la cadena pesada y ligera, en el que:

- (a) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NO: 5-7, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NO: 9-11, respectivamente;
- (b) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NO: 5-7, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NO: 13-15, respectivamente;
- (c) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NO: 17-19,

respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NO: 21-23, respectivamente;

(d) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NO: 17-19, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NO: 25-27, respectivamente;

(e) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NO: 17-19, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NO: 29-31, respectivamente;

(f) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NO: 33-35, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NO: 37-39, respectivamente;

(g) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NO: 41-43, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NO: 45-47, respectivamente;

(h) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NO: 41-43, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NO: 49-51, respectivamente;

(i) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NO: 53-55, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NO: 57-59, respectivamente;

(j) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NO: 61-63, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NO: 65-67, respectivamente;

(k) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NO: 69-71, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NO: 73-75, respectivamente;

(l) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NO: 69-71, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NO: 77-79, respectivamente;

(m) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NO: 81-83, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NO: 85-87, respectivamente; o

(n) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprenden las SEQ ID NO: 89-91, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NO: 93-95, respectivamente;

en las que el anticuerpo se une específicamente a CD73 humana y opcionalmente tiene una o más de las características enumeradas en la Tabla 3, por ejemplo, la capacidad para inhibir la desfosforilación de AMP y para mediar la internalización de CD73 dependiente de receptor.

En determinadas realizaciones de la invención, el anticuerpo comprende regiones variables de la cadena pesada y ligera, en el que las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NO: 5-7, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprenden las SEQ ID NO: 13-15, respectivamente;

en las que el anticuerpo se une específicamente a CD73 humana y opcionalmente tiene una o más de las características enumeradas en la Tabla 3, por ejemplo, la capacidad para inhibir la desfosforilación de AMP y para mediar la internalización de CD73 dependiente de receptor.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende regiones variables de la cadena pesada y ligera, en el que:

(a) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada consisten en las SEQ ID NO: 5-7, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera consisten en las SEQ ID NO: 9-11, respectivamente;

(b) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada consisten en las SEQ ID NO: 5-7, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera consisten en las SEQ ID NO: 13-15, respectivamente;

(c) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada consisten en las SEQ ID NO: 17-19, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera consisten en las SEQ ID NO: 21-23, respectivamente;

(d) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada consisten en las SEQ ID NO: 17-19, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera consisten en las SEQ ID NO: 25-27, respectivamente;

(e) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada consisten en las SEQ ID NO: 17-19, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera consisten en las SEQ ID NO: 29-31, respectivamente;

(f) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada consisten en las SEQ ID NO: 33-35,

respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera consisten en las SEQ ID NO: 37-39, respectivamente;

(g) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada consisten en las SEQ ID NO: 41-43, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera consisten en las SEQ ID NO: 45-47, respectivamente;

(h) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada consisten en las SEQ ID NO: 41-43, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera consisten en las SEQ ID NO: 49-51, respectivamente;

(i) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada consisten en las SEQ ID NO: 53-55, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera consisten en las SEQ ID NO: 57-59, respectivamente;

(j) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada consisten en las SEQ ID NO: 61-63, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera consisten en las SEQ ID NO: 65-67, respectivamente;

(k) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada consisten en las SEQ ID NO: 69-71, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera consisten en las SEQ ID NO: 73-75, respectivamente;

(l) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada consisten en las SEQ ID NO: 69-71, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera consisten en las SEQ ID NO: 77-79, respectivamente;

(m) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada consisten en las SEQ ID NO: 81-83, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera consisten en las SEQ ID NO: 85-87, respectivamente; o

(n) CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada consisten en las SEQ ID NO: 89-91, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera consisten en las SEQ ID NO: 93-95, respectivamente;

en las que el anticuerpo se une específicamente a CD73 humana y opcionalmente tiene una o más de las características enumeradas en la Tabla 3, por ejemplo, la capacidad para inhibir la desfosforilación de AMP y para mediar la internalización de CD73 dependiente de receptor.

En determinadas realizaciones de la invención, el anticuerpo comprende regiones variables de la cadena pesada y ligera, en el que las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada consisten en las SEQ ID NO: 5-7, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera consisten en las SEQ ID NO: 13-15, respectivamente;

en las que el anticuerpo se une específicamente a CD73 humana y opcionalmente tiene una o más de las características enumeradas en la Tabla 3, por ejemplo, la capacidad para inhibir la desfosforilación de AMP y para mediar la internalización de CD73 dependiente de receptor.

#### 40 *Dominios constantes de la cadena pesada de los anticuerpos anti-CD73*

la región constante de la cadena pesada de los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento puede ser de cualquier isotipo, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4 o combinaciones de los mismos y/o modificaciones de los mismos. Un anticuerpo anti-CD73 puede tener función efectora o puede no tener función efectora o reducida. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento comprenden una región constante de la cadena pesada modificada que proporciona propiedades aumentadas al anticuerpo. Como se muestra en los Ejemplos, los anticuerpos anti-CD73 que tienen una bisagra de IgG2 y opcionalmente un dominio CH1 de IgG2, tales como los que tienen las regiones variables del anticuerpo 11F11, se internalizan mejor y más rápido en relación a los anticuerpos que tienen la misma región variable pero con una bisagra o CH1 de no IgG2, por ejemplo, en relación a los anticuerpos que tienen una bisagra de IgG1 o una bisagra de IgG1 y CH1 de IgG1. Por ejemplo, un anticuerpo que comprende las regiones variables del anticuerpo 11F11 y que comprende una bisagra de IgG2 y opcionalmente un CH1 de IgG2 y un CH2 de IgG1 y dominios CH3 de IgG1, y si con o sin función efectora, se internaliza más eficazmente en las células tras la unión a CD73 en la membrana celular en relación al mismo anticuerpo, pero con una bisagra de IgG1 o un dominio bisagra de IgG1 y CH1 de IgG1. Como además se muestra en el presente documento, un anticuerpo de CD73 que tiene una bisagra de IgG2 y el resto del anticuerpo de un isotipo IgG1 se internaliza más eficazmente que el mismo anticuerpo en el que la bisagra es de un isotipo IgG1. Un anticuerpo que tiene, además de una bisagra de IgG2, un dominio CH1 de IgG2 internaliza incluso más eficazmente que el mismo anticuerpo en el que el dominio CH1 es un dominio CH1 de IgG1. Como además se muestra en el presente documento, los anticuerpos anti-CD73 con una bisagra de IgG2 y opcionalmente CH1 de IgG2 también forman complejos anticuerpo/antígeno mayores que los anticuerpos que tienen una bisagra de IgG1 o bisagra de IgG1 y CH1 de IgG1. La internalización incrementada parece correlacionarse con el tamaño incrementado del complejo anticuerpo/antígeno. Como se describe además en los Ejemplos, la internalización aumentada no parece estar asociada con una afinidad mayor o menor del anticuerpo. Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan anticuerpos anti-CD73 que tienen una región constante de la cadena pesada modificada que media la internalización de CD73 mediada por anticuerpo, y en los que el anticuerpo con la región constante de la cadena pesada modificada se une a CD73 con una afinidad similar a la del mismo anticuerpo, pero con una región constante

de la cadena pesada diferente.

- En determinadas realizaciones, un anticuerpo CD73 comprende una región constante de la cadena pesada modificada que comprende una bisagra del isotipo IgG2 (una "bisagra de IgG2") y un dominio CH1, CH2 y CH3. En determinadas realizaciones, una región constante de la cadena pesada comprende una bisagra de IgG2 y un dominio CH1, CH2 y CH3, en la que al menos uno de los dominios CH1, CH2 y CH3 no es del isotipo IgG2. Los anticuerpos de la invención comprenden una bisagra de IgG2 y dominio CH1 de IgG2. En determinadas realizaciones, una región constante de la cadena pesada modificada comprende una bisagra del isotipo IgG2, un CH1 del isotipo IgG2, en la que al menos uno de los dominios CH2 y CH3 no es del isotipo IgG2. La bisagra de IgG2 puede ser una bisagra de IgG2 tipo silvestre, por ejemplo, una bisagra de IgG2 humana tipo silvestre (por ejemplo, que tiene la SEQ ID NO: 136) o una variante de la misma, siempre que la bisagra de IgG2 conserve la capacidad para conferir al anticuerpo una actividad aumentada (por ejemplo, internalización incrementada por una célula; inhibición aumentada de la actividad enzimática; actividad antagonista o bloqueante mejorada; la capacidad para formar complejos grandes entrecruzados de anticuerpo/antígeno; capacidad incrementada para estimular o aumentar una respuesta; y/o efecto antiproliferativo o antitumoral incrementado) en relación al mismo anticuerpo que comprende una bisagra de no IgG2 y opcionalmente un dominio CH1 de no IgG2. En determinadas realizaciones, una variante de bisagra de IgG2 conserva rigidez o dureza similar a la de la bisagra de IgG2 tipo silvestre. La rigidez de una bisagra o un anticuerpo se puede determinar, por ejemplo, mediante modelado computarizado, microscopía electrónica, espectroscopia tal como Resonancia magnética nuclear (NMR), cristalografía por rayos X, (factores B), o ultracentrifugación analítica de la velocidad de sedimentación (AUC) para medir o comparar los radios de giro de los anticuerpos que comprende la bisagra. Una bisagra o anticuerpo puede tener rigidez similar o superior en relación con otra bisagra si un anticuerpo que comprende la bisagra tiene un valor obtenido de uno de los ensayos descritos en la frase anterior que difiere del valor del mismo anticuerpo con una bisagra diferente, por ejemplo, una bisagra de IgG1, en menos del 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % o 100 %. Un experto en la técnica será capaz de determinar a partir de los ensayos si una bisagra o un anticuerpo tiene al menos rigidez similar a la de otra bisagra o anticuerpo, respectivamente, interpretando los resultados de estos ensayos. Una variante de bisagra de IgG2 humana ilustrativa es una bisagra de IgG2 que comprende una sustitución de uno o más de los cuatro restos de cisteína (es decir, C219, C220, C226 y C229) con otro aminoácido. Una cisteína puede estar reemplazada por una serina. Una bisagra de IgG2 ilustrativa es una bisagra de IgG2 humana que comprende una mutación C219X o una mutación C220X, en la que X es cualquier aminoácido excepto serina. En una determinada realización, una bisagra de IgG2 no comprende tanto una sustitución C219X como una C220X. En determinadas realizaciones, una bisagra de IgG2 comprende C219S o C220S, pero no tanto C219S como C220S. Otras variantes de bisagra de IgG2 que se pueden usar incluyen bisagras de IgG2 humana que comprende la sustitución C220, C226 y/o C229, por ejemplo, una mutación C220S, C226S o C229S (la cual se puede combinar con una mutación C219S). Una bisagra de IgG2 también puede ser una bisagra de IgG2 en la cual una porción de la bisagra es la de otro isotipo (es decir, es una bisagra quimérica o híbrida), siempre que la rigidez de la bisagra quimérica es al menos similar a la de una bisagra de IgG2 tipo silvestre. Por ejemplo, una bisagra de IgG2 puede ser una bisagra de IgG2 en la que la bisagra inferior (como se define en la Tabla 2) es de un isotipo IgG1, y es, por ejemplo, una bisagra inferior de IgG1 tipo silvestre.
- Una bisagra "híbrida" o "quimérica" se refiere que es un isotipo específico si más de la mitad de los aminoácidos consecutivos de la bisagra son de ese isotipo. Por ejemplo, una bisagra que tiene una bisagra superior y media de IgG2 y la bisagra inferior de IgG1 se considera que es una bisagra híbrida de IgG2.

- En determinadas realizaciones, un anticuerpo de CD73 comprende una región constante de la cadena pesada que comprende una bisagra de IgG2 que comprende las siguientes bisagras:

- ERKCCVECPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 348);
- ERKSCVECPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 349);
- ERKCSVECPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 350);
- ERKXCVECPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 351);
- ERKCXVECPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 352);
- ERKCCVECPCPAPPVAGX (SEQ ID NO: 353);
- ERKSCVECPCPAPPVAGX (SEQ ID NO: 354);
- ERKCSVECPCPAPPVAGX (SEQ ID NO: 355);
- ERKXCVECPCPAPPVAGX (SEQ ID NO: 356);
- ERKCXVECPCPAPPVAGX (SEQ ID NO: 357);
- ERKCCVECPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 358);
- ERKSCVECPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 359);
- ERKCCSVECPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 360);
- ERKXCVECPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 361);
- ERKCXVECPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 362);
- ERKCCVECPCPAPELLG (SEQ ID NO: 363);
- ERKSCVECPCPAPELLG (SEQ ID NO: 364);
- ERKCCSVECPCPAPELLG (SEQ ID NO: 365);
- ERKXCVECPCPAPELLG (SEQ ID NO: 366);
- ERKCXVECPCPAPELLG (SEQ ID NO: 367);

ERKCCVECPAP (SEQ ID NO: 368);  
 ERKSCVECPAP (SEQ ID NO: 369);  
 ERKCSVECPAP (SEQ ID NO: 370);  
 ERKXCVCPAP (SEQ ID NO: 371); o  
 ERKCXVECPAP (SEQ ID NO: 372),

en las que X es cualquier aminoácido, excepto una cisteína, o cualquiera de las anteriores secuencias, en las que 1-5, 1-3, 1-2 o 1 aminoácido se inserta entre los restos de aminoácidos CVE y CPP. En determinadas realizaciones, se inserta THT o GGG.

En determinadas realizaciones, la bisagra comprende las SEQ ID NO: 348, 349, 350, 351, o 352, en las que 1, 2, 3 o todos los 4 aminoácidos P233, V234, A235 y G237 (correspondientes a los 4 aminoácidos C-terminales "PVAG" (SEQ ID NO: 373) están delecionados o sustituidos por otro aminoácido, por ejemplo, los aminoácidos del extremo C de la bisagra de IgG1 (ELLG (SEQ ID NO: 374) o ELLGG (SEQ ID NO: 375). En determinadas realizaciones, la bisagra comprende las SEQ ID NO: 348, 349, 350, 351, o 352, en las que V234, A235 y G237 están delecionados o sustituidos por otro aminoácido. En determinadas realizaciones, la bisagra comprende las SEQ ID NO: 348, 349, 350, 351, o 352, en las que A235 y G237 están delecionados o sustituidos por otro aminoácido. En determinadas realizaciones, la bisagra comprende las SEQ ID NO: 348, 349, 350, 351, o 352, en las que G237 está delecionado o sustituido por otro aminoácido. En determinadas realizaciones, la bisagra comprende las SEQ ID NO: 348, 349, 350, 351, o 352, en las que V234 y A235 están delecionados o sustituidos por otro aminoácido. La sustitución de PVAG (SEQ ID NO: 373) en una IgG2 con los correspondientes aminoácidos de una bisagra de IgG1, es decir, (ELLG (SEQ ID NO: 374) o ELLGG (SEQ ID NO: 375)) para obtener una bisagra híbrida, por ejemplo, mostrado anteriormente, proporciona una bisagra que tiene las ventajas de una bisagra de IgG2 y la función efectora de las bisagras de IgG1.

En determinadas realizaciones, una región constante de la cadena pesada modificada comprende una bisagra que consiste esencialmente en una de las secuencias anteriormente mostradas, por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NO: 348-372 y por ejemplo, no comprende restos de aminoácidos de bisagra adicional.

En determinadas realizaciones, 1 o 1-2 o 1-3 aminoácidos están insertados entre la bisagra y el dominio CH2, por ejemplo, se puede añadir una glicina adicional.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 comprende una región constante de la cadena pesada que comprende una IgG1 (no comprendida en los anticuerpos de la invención) o la región constante de IgG2, en el que la bisagra comprende una delección de 1-10 aminoácidos. Como se muestra en los Ejemplos, un anticuerpo IgG1 que carece de los restos de aminoácidos SCDKTH (S219, C220, D221, K222, T223, H224 y T225; SEQ ID NO: 376) confirió internalización de CD73 mediada por anticuerpo más eficazmente que el mismo anticuerpo que tiene una región constante de IgG1 tipo silvestre. Igualmente, en el contexto de un anticuerpo IgG2, un anticuerpo IgG2 que carece de los restos de aminoácidos CCVE (C219, C220, V222 y E224; SEQ ID NO: 377) confirió internalización de CD73 mediada por anticuerpo más eficazmente que el mismo anticuerpo que tiene una región constante de IgG1 tipo silvestre. Por consiguiente, en el presente documento se proporciona la región constante de la cadena pesada en la que la bisagra comprende una delección de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 restos de aminoácidos, seleccionados de los restos S219, C220, D221, K222, T223, H224 y T225 para un anticuerpo IgG1, y restos C219, C220, V222 y E224 para un anticuerpo IgG2.

En determinadas realizaciones, una región constante de la cadena pesada modificada comprende un dominio CH1 que es un dominio CH1 tipo silvestre del isotipo IgG1 (no comprendido en los anticuerpos de la invención) o IgG2 ("dominio CH1 de IgG1" o "dominio CH1 de IgG2", respectivamente). También se pueden usar los dominios CH1 de los isotipos IgG3 y IgG4 ("dominio CH1 de IgG3" y "dominio CH1 de IgG4", respectivamente) (no comprendido en los anticuerpos de la invención). Un dominio CH1 también puede ser una variante de un dominio CH1 tipo silvestre, por ejemplo, una variante de un dominio CH1 de IgG1 tipo silvestre, IgG2, IgG3 o IgG4. Variantes ilustrativas de los dominios CH1 incluyen A114C, T173C y/o C131, por ejemplo, C131S.

Un dominio CH1, por ejemplo, un dominio CH1 de IgG2, puede comprender la sustitución C131S, dicha sustitución confiere sobre un anticuerpo IgG2 o anticuerpo que tiene un CH1 de IgG2 y bisagra de la forma B (o conformación).

La región constante de la cadena pesada modificada según la invención comprende un dominio CH1 que es del isotipo IgG2. En determinadas realizaciones, el dominio CH1 es dominio CH1 de IgG2 tipo silvestre, por ejemplo, que tiene la secuencia de aminoácidos:

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

GLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTV (SEQ ID NO: 378). En determinadas realizaciones, el dominio CH1 es una variante de SEQ ID NO: 378 y comprende 1-10, 1-5, 1-2 o 1 sustituciones o delecciones de aminoácido en relación a la SEQ ID NO: 378. Como se describe además en los Ejemplos, se ha demostrado en el presente documento que un dominio CH1 de IgG2 o variantes del mismo confiere propiedades de internalización aumentadas o alteradas a anticuerpos anti-CD73 en relación a anticuerpos IgG1 e incluso internalización más aumentada o alterada cuando los anticuerpos también comprenden una bisagra de IgG2. En determinadas

realizaciones, las variantes de CH1 de IgG2 no comprenden sustitución o delección de aminoácidos en uno o más de los siguientes restos de aminoácidos: C131, R133, E137 y S138, dichos restos de aminoácidos se muestran en negrita y subrayados en la SEQ ID NO: 378 anteriormente mostrada. Por ejemplo, una región constante de la cadena pesada modificada puede comprender un dominio CH1 de IgG2 en el que ninguno de R133, E137 y S138 están sustituidos con otro aminoácido o se somete a delección o en el que ninguno de C131, R133, E137 y S138 están sustituidos con otro aminoácido o se someten a delección. En determinadas realizaciones, C131 está sustituido con otro aminoácido, por ejemplo, C131S, dicha sustitución desencadena que el anticuerpo adopte la conformación B. Tanto los anticuerpos de conformación A como de conformación B que tienen regiones constantes de la cadena pesada modificadas han mostrado en el presente documento que tienen actividades aumentadas en relación con el mismo anticuerpo con una región constante de IgG1.

En determinadas realizaciones, N192 y/o F193 (mostrados como restos en cursiva y subrayados en la SEQ ID NO: 378 anteriormente mostrada) están sustituidos con otro aminoácido, por ejemplo, con los correspondientes aminoácidos en IgG1, es decir, N192S y/o F193L.

En determinadas realizaciones, uno o más restos de aminoácidos de un dominio CH1 de IgG2 están sustituidos con los correspondientes restos de aminoácidos en IgG4. Por ejemplo, N192 puede ser N192S; F193 puede ser F193L; C131 puede ser C131K; y/o T214 puede ser T214R.

Un anticuerpo puede comprender una región constante de la cadena pesada modificada que comprende un dominio CH1 de IgG2 o variante del mismo y bisagra de IgG2 o variante de la misma. La bisagra y el dominio CH1 puede ser una combinación de cualquier bisagra de IgG2 y el dominio CH1 de IgG2 descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, el CH1 de IgG2 y la bisagra comprenden la siguiente secuencia de aminoácidos **ASTKGPSVFLPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSTNFG** TQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAG (SEQ ID NO: 379) o una secuencia de aminoácidos que difiere de la misma en como mucho 1-10 aminoácidos. Las variantes de aminoácidos son como se describen para la bisagra y los dominios CH1 anteriormente.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos comprenden al menos una bisagra de IgG2, y opcionalmente también un dominio CH1 de IgG2 o fragmento o derivado de la bisagra y/o dominio CH1 y el anticuerpo ha adoptado la forma (de conformación) A (véase, por ejemplo, Allen et al. (2009) *Biochemistry* 48:3.755). En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 comprenden al menos una bisagra de IgG2, y opcionalmente también un dominio CH1 de IgG2 o fragmento o derivado de la bisagra y/o dominio CH1 y el anticuerpo ha adoptado la forma B (véase, por ejemplo, Allen et al. (2009) *Biochemistry* 48:3.755).

En determinadas realizaciones, una región constante de la cadena pesada modificada comprende un dominio CH2 que es un dominio CH2 tipo silvestre del isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 ("dominio CH2 de IgG1", "dominio CH2 de IgG2", "dominio CH2 de IgG3", o "dominio CH2 de IgG4", respectivamente). Un dominio CH2 también puede ser una variante de un dominio CH2 tipo silvestre, por ejemplo, una variante de un dominio CH2 de IgG1 tipo silvestre, IgG2, IgG3 o IgG4. Variantes ilustrativas de dominios CH2 incluyen variantes que modulan una actividad biológica de la región Fc de un anticuerpo, tal como ADCC o CDC o modulan la semivida del anticuerpo o su estabilidad. En una realización, el dominio CH2 es un dominio CH2 de IgG1 con una mutación A330S y P331S, en la que el dominio CH2 tiene función efectora reducida en relación con el mismo dominio CH2 sin las mutaciones. Un dominio CH2 puede tener función efectora aumentada. Los dominios CH2 pueden comprender una o más de las siguientes mutaciones: SE (S267E), SELF (S267E/I328F), SDIE (S239D/I332E), SEFF y GASDALIE (G236A/S239D/A330L/I332E) y/o una o más de las mutaciones en los siguientes aminoácidos: E233, G237, P238, H268, P271, L328 y A330. Otras mutaciones se exponen además en el presente documento en otra parte.

En determinadas realizaciones, una región constante de la cadena pesada modificada comprende un dominio CH3 que es un dominio CH3 tipo silvestre del isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 ("dominio CH3 de IgG1", "dominio CH3 de IgG2", "dominio CH3 de IgG3", o "dominio CH3 de IgG4", respectivamente). Un dominio CH3 también puede ser una variante de un dominio CH3 tipo silvestre, por ejemplo, una variante de un dominio CH1 de IgG1 tipo silvestre, IgG2, IgG3 o IgG4. Variantes ilustrativas de dominios CH3 incluyen variantes que modulan una actividad biológica de la región Fc de un anticuerpo, tal como ADCC o CDC o modulan la semivida del anticuerpo o su estabilidad.

La región constante de la cadena pesada según la invención comprende una bisagra del isotipo IgG2 y una región CH1 del isotipo IgG2. La bisagra y CH1 de IgG2 pueden ser bisagra de IgG2 y CH1 tipo silvestre o variantes de los mismos, siempre que tengan la actividad biológica deseada. En determinadas realizaciones, una región constante de la cadena pesada modificada comprende una bisagra de IgG2 que comprende la mutación C219S, y un CH1 de IgG2, que puede ser de tipo silvestre o comprender como mucho 1-10, 1-5, 1-3, 1-2 o 1 sustitución, delección o adición de aminoácidos. La región constante de la cadena pesada modificada puede además comprender dominios CH2 y CH3 tipo silvestre o mutados. Por ejemplo, un anticuerpo de CD73 puede comprender un dominio constante de la cadena pesada que comprende un dominio CH1 de IgG2, una bisagra de IgG2, que pueden comprender C219S y un dominio CH2 y CH3 de IgG1, en el que los dominios CH2 y CH3 pueden ser no efectores, tal como comprendiendo mutaciones A330S y P331S.

Generalmente, las variantes de dominios CH1, bisagra, CH2 o CH3 puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más mutaciones, y/o como mucho 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 mutación, o 1-10 o 1-5 mutaciones, o comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la del correspondiente dominio tipo silvestre (dominio CH1, bisagra, CH2 o CH3, respectivamente), siempre que la región constante de la cadena pesada que comprende la variante específica conserve la actividad biológica necesaria.

La Tabla 5 expone las regiones constantes de la cadena pesada humana ilustrativa que comprenden un dominio CH1, bisagra, CH2 y/o CH3, en las que cada dominio es un dominio tipo silvestre o una variante del mismo que proporciona la actividad biológica deseada a la región constante de la cadena pesada. Los anticuerpos de la invención comprenden una bisagra de IgG2 y dominio CH1 de IgG2. Una celda no rellena en la Tabla 5 indica que el dominio está presente o no, y si está presente puede ser de cualquier isotipo, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Por ejemplo, un anticuerpo que comprende la región constante de la cadena pesada 1 en la Tabla 5 es un anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada que comprende al menos una bisagra de IgG2, y que también puede comprender un dominio CH1, CH2 y/o CH3, y si está presente, dicho dominio CH1, CH2 y/o CH3 es de un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Como otro ejemplo para entender la Tabla 5, un anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada 8 es un anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada que comprende un dominio de CH1 de IgG1, y bisagra de IgG2, un dominio CH2 de IgG1, y que puede o no puede comprender también un dominio CH3, el cual está presente, puede ser un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

**Tabla 5:**

MHCCR*	CH1	Bisagra	CH2	CH3
1		IgG2		
2	IgG1	IgG2		
3	IgG2	IgG2		
4		IgG2	IgG1	
5		IgG2	IgG2	
6		IgG2		IgG1
7		IgG2		IgG2
8	IgG1	IgG2	IgG1	
9	IgG1	IgG2	IgG2	
10	IgG2	IgG2	IgG1	
11	IgG2	IgG2	IgG2	
12	IgG1	IgG2		IgG1
13	IgG1	IgG2		IgG2
14	IgG2	IgG2		IgG1
15	IgG2	IgG2		IgG2
16		IgG2	IgG1	IgG1
17		IgG2	IgG1	IgG2
18		IgG2	IgG2	IgG1
19		IgG2	IgG2	IgG2
20	IgG1	IgG2	IgG1	IgG1
21	IgG1	IgG2	IgG1	IgG2
22	IgG1	IgG2	IgG2	IgG1
23	IgG1	IgG2	IgG2	IgG2
24	IgG2	IgG2	IgG1	IgG1
25	IgG2	IgG2	IgG1	IgG2
26	IgG2	IgG2	IgG2	IgG1
27	IgG2	IgG2	IgG2	IgG2

\* Una región constante de la cadena pesada

En determinadas realizaciones, un anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada mostrada en la Tabla 5 tiene una actividad biológica aumentada en relación con el mismo anticuerpo que comprende una región constante de la cadena pesada que no comprende esa región constante de la cadena pesada específica o en relación con el mismo anticuerpo que comprende una región constante de IgG1.

En determinadas realizaciones, un método para mejorar la actividad biológica de un anticuerpo anti-CD73 que comprende una bisagra de no IgG2 y/o dominio CH1 de no IgG2 comprende proporcionar un anticuerpo anti-CD73 que comprende una bisagra de no IgG2 y/o un dominio CH1 de no IgG2, y reemplazar la bisagra de no IgG2 y el dominio CH1 de no IgG2 por una bisagra de IgG2 y un dominio CH1 de IgG2, respectivamente. Un método para mejorar la actividad biológica de un anticuerpo de CD73 que no comprende una región constante de la cadena

pesada modificada, puede comprender proporcionar un anticuerpo anti-CD73 que no comprende una región constante de la cadena pesada modificada, y reemplazar su región constante de la cadena pesada por una región constante de la cadena pesada modificada.

- 5 Regiones constantes de la cadena pesada modificadas ilustrativas que se pueden unir a regiones variables anti-CD73, por ejemplo, aquellas descritas en el presente documento, se proporcionan en la Tabla 6, la cual expone la identidad de cada uno de los dominios. Los anticuerpos de la invención comprenden una bisagra de IgG2 y dominio CH1 de IgG2.

10

**Tabla 6:**

<b>* Una región constante de la cadena pesada modificada</b>	<b>CH1</b>	<b>Bisagra</b>	<b>CH2</b>	<b>CH3</b>	<b>SEQ ID NO de la RCCPM completa</b>
IgG1-IgG2-IgG1f	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:98	IgG2/IgG1 SEQ ID NO:178	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:137	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:138	SEQ ID NO: 180
IgG1-IgG2-IgG1f2	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:98	IgG2 tipo silvestre SEQ ID NO:136	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:137	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:138	SEQ ID NO: 162
IgG1-IgG2CS-IgG1f	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:98	IgG2C219S/IgG1 SEQ ID NO:179	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:137	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:138	SEQ ID NO: 181
IgG1-IgG2CS-IgG1f2	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:98	IgG2 C219S SEQ ID NO:123	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:137	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:138	SEQ ID NO: 163
IgG2-IgG1f	IgG2 tipo silvestre SEQ ID NO:124	IgG2/IgG1 SEQ ID NO:178	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:137	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:138	SEQ ID NO: 182
IgG2-IgG1f2	IgG2 tipo silvestre SEQ ID NO:124	IgG2 tipo silvestre SEQ ID NO:136	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:137	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:138	SEQ ID NO: 164
IgG2CS-IgG1f	IgG2 tipo silvestre SEQ ID NO:124	IgG2C219S/IgG1 SEQ ID NO:179	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:137	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:138	SEQ ID NO: 183
IgG2CS-IgG1f2	IgG2 tipo silvestre SEQ ID NO:124	IgG2 C219S SEQ ID NO:123	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:137	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:138	SEQ ID NO: 165
IgG1-IgG2-IgG1.1f	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:98	IgG2 tipo silvestre SEQ ID NO:136	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:125	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:138	SEQ ID NO: 166
IgG1-IgG2CS-IgG1.1f	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:98	IgG2 C219S SEQ ID NO:123	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:125	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:138	SEQ ID NO: 167
IgG2-IgG1.1f	IgG2 tipo silvestre SEQ ID NO:124	IgG2 tipo silvestre SEQ ID NO:136	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:125	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:138	SEQ ID NO: 168
IgG2CS-IgG1.1f	IgG2 tipo silvestre SEQ ID NO:124	IgG2 C219S SEQ ID NO:123	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:125	IgG1 tipo silvestre SEQ ID NO:138	SEQ ID NO: 169

En determinadas realizaciones, un anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada modificada que comprende una bisagra de IgG2 que comprende la SEQ ID NO: 123, 136, 178, 179, o 348-372 o una variante de las mismas, tal como bisagra de IgG2 que comprende una secuencia de aminoácidos que (i) difiere de la SEQ ID NO: 123, 136, 178, 179, o 348-372 en 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos, adiciones o deleciones; (ii) difiere de la SEQ ID NO: 123, 136, 178, 179, o 348-372 en 5, 4, 3, 2, 1 sustituciones de aminoácidos, adiciones o deleciones; (iii) difiere de la SEQ ID NO: 123, 136, 178, 179, o 348-372 en 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 o 3-5 sustituciones de aminoácidos, adiciones o deleciones y/o (iv) comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO:123, 136, 178, 179, o 348-372, en la que en cualquiera de (i)-(iv), una sustitución de aminoácido puede ser una sustitución de aminoácido conservadora o una sustitución de aminoácido no conservadora; y en la que la región constante de la cadena pesada modificada tiene una actividad biológica aumentada en relación con la de otra región constante de cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la cadena pesada que comprende una bisagra de no IgG2 o en relación con la misma región constante de la cadena pesada modificada que comprende una bisagra de no IgG2. Por ejemplo, la bisagra puede ser de tipo silvestre, o comprender una C219S, C220S o sustituciones C219S y C220S.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada modificada que comprende el dominio CH1 de IgG1 que comprende la SEQ ID NO: 98 (no comprendido en los anticuerpos de la invención) o un dominio CH1 de IgG2 que comprende la SEQ ID NO: 124, o una variante de la SEQ ID NO: 98 o 124, dicha variante (i) difiere de la SEQ ID NO: 98 o 124 en 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos, adiciones o deleciones; (ii) difiere de la SEQ ID NO: 98, o 124 en como mucho 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones de aminoácido, adiciones o deleciones; (iii) difiere de la SEQ ID NO: 98, o 124 en 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 o 3-5 sustituciones de aminoácido, adiciones o deleciones y/o (iv) comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica con la SEQ ID NO: 98 o 124, en la que en cualquiera de (i)-(iv), una sustitución de aminoácido puede ser una sustitución de aminoácidos conservadora o una sustitución de aminoácidos no conservadora; y en la que la región constante de la cadena pesada modificada tiene una actividad biológica aumentada en relación con la de otra región constante de cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la cadena pesada que comprende una bisagra de no IgG2 o bisagra de no IgG2y dominio CH1 o en relación con la misma región constante de la cadena pesada que comprende una bisagra de no IgG2 o bisagra de no IgG2 y dominio CH1. Un dominio CH1 de IgG2 puede comprender C131S u otras mutaciones que causan que una bisagra de IgG2 y CH1 que contienen anticuerpo adopten o bien una forma A o una B.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo descrito en el presente documento comprende una región constante de la cadena pesada que comprende un dominio CH2 de IgG1 que comprende la SEQ ID NO: 137 o 125, o una variante de SEQ ID NO: 137 o 125, dicha variante (i) difiere de la SEQ ID NO: 137 o 125 en 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos, adiciones o deleciones; (ii) difiere de la SEQ ID NO: 137, o 125 en como mucho 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones de aminoácido, adiciones o deleciones; (iii) difiere de la SEQ ID NO: 137, o 125 en 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 o 3-5 sustituciones de aminoácido, adiciones o deleciones y/o (iv) comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica con la SEQ ID NO: 137 o 125, en la que en cualquiera de (i)-(iv), una sustitución de aminoácido puede ser una sustitución de aminoácidos conservadora o una sustitución de aminoácidos no conservadora; y en la que la región constante de la cadena pesada modificada tiene una actividad biológica aumentada en relación con la de otra región constante de cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la cadena pesada que comprende una bisagra de no IgG2 o en relación con la misma región constante de la cadena pesada modificada que comprende una bisagra de no IgG2.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo descrito en el presente documento comprende una región constante de la cadena pesada que comprende un dominio CH3 de IgG1 que comprende la SEQ ID NO: 138, o una variante de SEQ ID NO: 138, dicha variante (i) difiere de la SEQ ID NO: 138 en 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácido, adiciones o deleciones; (ii) difiere de la SEQ ID NO: 138 en como mucho 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones de aminoácido, adiciones o deleciones; (iii) difiere de la SEQ ID NO: 138 en 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 o 3-5 sustituciones de aminoácido, adiciones o deleciones y/o (iv) comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 138, en la que en cualquiera de (i)-(iv), una sustitución de aminoácido puede ser una sustitución de aminoácidos conservadora o una sustitución de aminoácidos no conservadora; y en la que la región constante de la cadena pesada modificada tiene una actividad biológica aumentada en relación con la de otra región constante de cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la cadena pesada que comprende una bisagra de no IgG2 o en relación con la misma región constante de la cadena pesada modificada que comprende una bisagra de no IgG2.

Las regiones constantes de la cadena pesada modificadas también pueden comprender una combinación de los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3 anteriormente descritos.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo de CD73 comprende una región constante de la cadena pesada modificada que comprende una cualquiera de las SEQ ID NO: 162-169, 180-183, 267-282, y 300-347, o una variante de una cualquiera de las SEQ ID NO: 162-169, 180-183, 267-282, y 300-347, dicha variante (i) difiere de las SEQ ID NO: 162-169, 180-183, 267-282, y 300-347 en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones de aminoácido, adiciones o deleciones; (ii) difiere de las SEQ ID NO: 162-169, 180-183, 267-282, y 300-347 en como mucho 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones de aminoácido, adiciones o deleciones; (iii) difiere de las SEQ ID NO: 162-169, 180-183, 267-282, y 300-347 en 1-5, 1-3, 1-2, 2-5, 3-5, 1-10 o 5-10 sustituciones de aminoácido, adiciones o deleciones y/o (iv) comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 162-169, 180-183, 267-282, y 300-347, en la que en cualquiera de (i)-(iv), una sustitución de aminoácido puede ser una sustitución de aminoácidos conservadora o una sustitución de aminoácidos no conservadora; y en la que la región constante de la cadena pesada modificada tiene una actividad biológica aumentada en relación con la de otra región constante de cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la cadena pesada que comprende una bisagra de no IgG2 y dominio CH1 de no IgG2 o relativa a la misma región constante de la cadena pesada que comprende un bisagra de no IgG2 y/o un dominio CH1 de no IgG2.

Las regiones constantes de la cadena pesada modificada pueden tener (i) función efectora similar, reducida o incrementada (por ejemplo, unión a FcγR, por ejemplo, FcγRIIB) en relación con una región constante de la cadena pesada tipo silvestre y/o (ii) semivida similar, reducida o incrementada (o unión al receptor FcRn) en relación con la

región constante de la cadena pesada.

El dominio VH de un anticuerpo anti-CD73 descrito en el presente documento se puede unir a una región constante de la cadena pesada descrita en el presente documento. Por ejemplo, La Figura 18 muestra la secuencia de aminoácidos del anticuerpo CD73.4 unida a la región constante de la cadena pesada IgG2CS-IgG1.1f (SEQ ID NO:133 o 169). El presente documento también abarca anticuerpos que comprenden una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f (SEQ ID NO:133 o 189) en como mucho 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 o 1 aminoácidos (por sustitución, adición o delección) y/o que son al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idénticas a la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f (SEQ ID NO:133 o 189). Por ejemplo, el presente documento abarca anticuerpos que comprenden la cadena pesada de CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f (SEQ ID NO: 133 o 189), y en la que K o GK o PGK C-terminales están delecionados o están presentes. Otras variantes de CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f (SEQ ID NO:133 o 189) incluyen aquellas que tienen una cadena pesada que es de un alotipo diferente, y en las que, por ejemplo, los aminoácidos 356 y 358 son D y L, respectivamente. Las variantes incluyen aquellas que incluyen una cisteína adicional mutada en la bisagra de IgG2, por ejemplo, C220 (o tienen C220S en lugar de C219S), y aquellas que no tienen las mutaciones A330S y/o P331S. Las variantes de CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f (SEQ ID NO:133 o 189) preferentemente tienen al menos propiedades bioquímicas similares y/o actividades biológicas, por ejemplo, eficacia de internalización, inhibición de la actividad enzimática de CD73, afinidad a CD73 humana y unión al mismo epítipo o similar, en relación con CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f (SEQ ID NO: 133 o 189).

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73, o porciones de unión a antígeno de los mismos, comprenden una cualquiera de las regiones constantes descritas en el presente documento, por ejemplo, regiones constantes que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 126, 127, 129, 130, 162-169, 180-183, 267-282, y 300-347.

Una cadena ligera de un anti-CD73 descrito en el presente documento puede comprender una región constante de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 131, o una variante de SEQ ID NO: 131, dicha variante (i) difiere de la SEQ ID NO: 131 en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 sustituciones de aminoácidos, adiciones o delecciones; (ii) difiere de la SEQ ID NO: 131 en como mucho 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 sustituciones de aminoácidos, adiciones o delecciones; (iii) difiere de la SEQ ID NO: 131 en 1-5, 1-3, 1-2, 2-5, 3-5, 1-10, o 5-10 sustituciones de aminoácidos, adiciones o delecciones y/o (iv) comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 131, en la que en cualquiera de (i)-(iv), una sustitución de aminoácidos puede ser una sustitución de aminoácidos conservadora o una sustitución de aminoácidos no conservadora. Una mutación CL ilustrativa incluye C124S.

Las cadenas pesadas y ligeras que comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 % o 70 % idéntica a cualquiera de las cadenas pesadas y ligeras expuestas en la Tabla 35, como se detalla en el presente documento (o sus regiones variables), se pueden usar para formar anticuerpos anti-CD73 humana que tienen las características deseadas, por ejemplo, aquellas descritas además en el presente documento. Variantes ilustrativas son aquellas que comprenden una variación alotípica, por ejemplo, en el dominio constante. Las cadenas pesadas y ligeras que comprenden una secuencia de aminoácidos que difiere en al menos 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 o 1 aminoácido (por sustitución, adición o delección) de cualquiera de las cadenas pesadas y ligeras expuestas en la Tabla 35, como se describe en el presente documento (o sus regiones variables), se pueden usar para formar anticuerpos anti-CD73 humana que tienen las características deseadas, por ejemplo, aquellas descritas además en el presente documento.

En diversas realizaciones, los anticuerpos anteriormente descritos presentan una o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, diez, o todas las propiedades funcionales enumeradas en la Tabla 3.

Tales anticuerpos incluyen, por ejemplo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, o anticuerpos quiméricos.

En una realización, los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento se unen a CD73 humana tanto glicosilada (por ejemplo, glicosilación ligada a N o ligada O) como no glicosilada. Determinados anticuerpos anti-CD73 pueden unirse a CD73 glicosilada, pero no a no glicosilada o a CD73 no glicosilada pero no a glicosiladas.

En una realización, los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento se unen a un epítipo conformacional.

En una realización, los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento se unen a restos de aminoácidos dentro de la siguiente región de CD73 humana:  
FTKVQQIRRAEPNVLDDA (SEQ ID NO: 96) y correspondiente a restos de aminoácidos 65-83 de CD73 humana (SEQ ID NO: 1 o 2), como se determina mediante, por ejemplo, HDX-MS.

En una realización, los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento se unen a todos o una parte de

los siguientes restos en CD73 humana: FTKVQQIRRAEPNVLDDA (SEQ ID NO: 96), que corresponde a los restos de aminoácidos 65-83 de CD73 humana (SEQ ID NO: 1 o 2), como se determina mediante, por ejemplo, HDX-MS.

5 En una realización, el anticuerpo anti-CD73 descrito en el presente documento se une a restos de aminoácidos dentro de la siguiente región de CD73 humana: LYLPYKVLPGDEVVG (SEQ ID NO: 97), correspondiente a restos de aminoácidos 157-172 de CD73 humana (SEQ ID NO: 1 o 2), como se determina mediante, por ejemplo, HDX-MS.

10 En una realización, el anticuerpo anti-CD73 descrito en el presente documento se une a todos o una parte de los siguientes restos en CD73 humana: LYLPYKVLPGDEVVG (SEQ ID NO: 97), que corresponde a los restos de aminoácidos 157-172 de CD73 humana (SEQ ID NO: 1 o 2), como se determina mediante, por ejemplo, HDX-MS.

15 En una realización, el anticuerpo anti-CD73 descrito en el presente documento se une a restos de aminoácidos discontinuos dentro de las siguientes regiones de CD73 humana (SEQ ID NO: 1 o 2): FTKVQQIRRAEPNVLDDA (SEQ ID NO: 96) y LYLPYKVLPGDEVVG (SEQ ID NO: 97).

20 En una realización, el anticuerpo anti-CD73 descrito en el presente documento se une a los restos de aminoácidos discontinuos dentro de las siguientes regiones de CD73 humana (SEQ ID NO: 1 o 2): FTKVQQIRRAEPNVLDDA (SEQ ID NO: 96) y LYLPYKVLPGDEVVG (SEQ ID NO: 97), que corresponde a los restos de aminoácidos 65-83 y 157-172 de CD73 humana SEQ ID NO: 1 o 2), como se determina mediante, por ejemplo, HDX-MS.

25 En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 tienen interacciones con CD73 humana que corresponden a las mostradas en la Tabla 30, como se determina mediante cristalografía por rayos X. Un anticuerpo puede compartir al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99% de las interacciones con CD73 humana que se muestran en la Tabla 30.

### III. Anticuerpos que tiene secuencias de la línea germinal particulares

30 En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 comprende una región variable de la cadena pesada de un gen de inmunoglobulina de cadena pesada de línea germinal particular y/o una región variable de la cadena ligera de un gen de inmunoglobulinas de línea germinal particular.

35 Como se demuestra en el presente documento, los anticuerpos humanos específicos para CD73 se han preparado de manera que comprenden una región variable de la cadena pesada que es el producto de o se deriva de un gen VH 3-33 de línea germinal humana, gen VH 3-10, gen VH 3-15, VH 3-16, gen JH6b, gen VH 6-19, gen VH 4-34 y/o gen JH3B. Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan anticuerpos monoclonales aislados específicos para CD73 humana o porciones de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una región variable de la cadena pesada que es el producto de o se deriva de un gen de línea germinal de VH humana seleccionado del grupo que consiste en: VH 3-33, VH 3-10, VH 3-15, VH 3-16, VH 6-19 y VH 4-34.

45 Los anticuerpos humanos específicos para CD73 se han preparado de manera que comprenden una región variable de la cadena ligera que es el producto de o se deriva de un gen VK L6 de línea germinal humana, gen VK L18, gen VK L15, gen VK L20, gen VK A27, gen JK5, gen JK4, gen JK2, y gen JK1. Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan anticuerpos monoclonales aislados específicos para CD73 humana o porciones de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una región variable de la cadena ligera que es el producto de o se deriva de un gen de línea germinal VK humana seleccionado del grupo que consiste en: VK L6, VK L18, VK L15, VK L20, y VK A27.

50 Los anticuerpos preferidos descritos en el presente documento son aquellos que comprenden una cadena variable de la cadena pesada que es el producto de o se deriva de los genes VH de línea germinal humana anteriormente enumerados y también que comprenden una región variable de la cadena ligera que es el producto de o se deriva de uno de los genes VK de línea germinal humana anteriormente enumerados.

55 Como se usa en el presente documento, Un anticuerpo humano comprende regiones variables de la cadena pesada o ligera que son "el producto de" o "se deriva de" una secuencia de línea germinal particular si las regiones variables del anticuerpo se obtienen de un sistema que usa genes de inmunoglobulina de línea germinal humana. Tales sistemas incluyen inmunización de un ratón transgénico portador de genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o cribado de una genoteca de inmunoglobulina humana expresada en fago con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana se puede identificar tal como comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de las inmunoglobulinas de línea germinal humana y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana que es más cercana en secuencia (es decir, el mayor % de identidad) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana particular puede contener diferencias de aminoácido en comparación con la secuencia de línea germinal, debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas de origen natural o

introducción intencional de mutación dirigida a sitio. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado generalmente es al menos 90 % idéntico en secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal y contiene restos de aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como humano cuando se comparada con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de línea germinal murina). En determinados casos, un anticuerpo humano puede ser al menos 95 % o incluso al menos 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Normalmente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de línea germinal humana particular mostrará no más de 10 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana. En determinados casos, el anticuerpo humano puede mostrar no más de 5 o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 aminoácido de diferencia de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

#### IV. Anticuerpos homólogos

En el presente documento se abarcan anticuerpos que tienen regiones variables de la cadena pesada y ligera que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos preferidos descritos en el presente documento (los anticuerpos y secuencias de aminoácidos abarcados por la invención se definen en las reivindicaciones), y en los que los anticuerpos conservan las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-CD73, descritos en el presente documento.

Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD73 aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, puede comprender una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en el que:

(a) la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, el 98 % o el 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 16, 32, 40, 52, 60, 68, 80, 88, 135, y 170-177, o comprende 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25, o 1-50 cambios de aminoácido (i.e., sustituciones de aminoácidos, adiciones o deleciones) en relación a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 16, 32, 40, 52, 60, 68, 80, 88, 135, y 170-177, respectivamente;

(b) la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, el 98 % o el 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 8, 12, 20, 24, 28, 36, 44, 48, 56, 64, 72, 76, 84, 92, y 138, o comprende 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25, o 1-50 cambios de aminoácido (i.e., sustituciones de aminoácidos, adiciones o deleciones) en relación a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 8, 12, 20, 24, 28, 36, 44, 48, 56, 64, 72, 76, 84, 92, y 238, respectivamente;

(c) el anticuerpo especialmente se une a CD73 y

(d) el anticuerpo presenta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o todas las propiedades funcionales enumeradas en la Tabla 3.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 comprenden regiones variables de la cadena pesada y ligera con el porcentaje de identidades y/o cambios de aminoácidos y funciones discutidos anteriormente (es decir, (a)-(d)), en los que la región variable CDR3 de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19, 35, 43, 55, 63, 71, 83, y 91, y opcionalmente la CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 17, 33, 41, 53, 61, 69, 81, y 89, y opcionalmente la CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, 18, 34, 42, 54, 62, 70, 82, y 90.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 comprenden regiones variables de la cadena pesada y ligera con el porcentaje de identidades y/o cambios de aminoácidos y funciones discutidos anteriormente (es decir, (a)-(d)), en los que la región variable de la cadena ligera CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 11, 15, 23, 27, 31, 39, 47, 51, 59, 67, 75, 79, 87, 95, y 241, y opcionalmente la CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9, 13, 21, 25, 29, 37, 45, 49, 57, 65, 73, 77, 85, 93, y 239, y opcionalmente la CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 14, 22, 26, 30, 38, 46, 50, 58, 66, 74, 78, 86, 94, y 240.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 comprenden regiones variables de la cadena pesada y ligera con el porcentaje de identidades y/o cambios de aminoácidos y funciones discutidos anteriormente (es decir, (a)-(d)), en los que la región variable CDR3 de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19, 35, 43, 55, 63, 71, 83, y 91, y opcionalmente la CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 17, 33, 41, 53, 61, 69, 81, y 89, y opcionalmente la CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, 18, 34, 42, 54, 62, 70, 82, y 90, y en los que la CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 11, 15, 23, 27, 31, 39, 47, 51, 59,

67, 75, 79, 87, 95, y 241, y opcionalmente la CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9, 13, 21, 25, 29, 37, 45, 49, 57, 65, 73, 77, 85, 93, y 239, y opcionalmente la CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 14, 22, 26, 30, 38, 46, 50, 58, 66, 74, 78, 86, 94, y 240.

En diversas realizaciones, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

10 Un anticuerpo anti-CD73 aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, puede comprender una cadena pesada y una cadena ligera, en el que:

15 (a) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, el 98 % o el 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 100, 103, 107, 109, 112, 114, 116, 119, 121, 133, 184-210 o comprende 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25, o 1-50 cambios de aminoácidos (i.e., sustituciones de aminoácidos, adiciones o deleciones) en relación a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 100, 103, 107, 109, 112, 114, 116, 119, 121, 133, y 184-210, respectivamente;

20 (b) la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, el 98 % o el 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 101, 102, 104, 105, 106, 108, 110, 111, 113, 115, 117, 118, 120 y 122 o comprende 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25, o 1-50 cambios de aminoácidos (i.e., sustituciones de aminoácidos, adiciones o deleciones) en relación a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 101, 102, 104, 105, 106, 108, 110, 111, 113, 115, 117, 118, 120 y 122, respectivamente;

25 (c) el anticuerpos especialmente se une a CD73 y

(d) el anticuerpo presenta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o todas las propiedades funcionales enumeradas en la Tabla 3.

30 En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 comprenden las cadenas pesadas y ligeras con el porcentaje de identidades y/o los cambios de aminoácidos y funciones discutidos anteriormente (es decir, (a)-(d)), en los que la región variable CDR3 de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19, 35, 43, 55, 63, 71, 83, y 91, y opcionalmente la CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 17, 33, 41, 53, 61, 69, 81, y 89, y opcionalmente la CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, 18, 34, 42, 54, 62, 70, 82, y 90.

40 En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 comprenden las cadenas pesadas y ligeras con el porcentaje de identidades y/o los cambios de aminoácidos y funciones discutidos anteriormente (es decir, (a)-(d)), en los que la región variable de la cadena ligera CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 11, 15, 23, 27, 31, 39, 47, 51, 59, 67, 75, 79, 87, 95, y 241, y opcionalmente la CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9, 13, 21, 25, 29, 37, 45, 49, 57, 65, 73, 77, 85, 93, y 239, y opcionalmente la CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 14, 22, 26, 30, 38, 46, 50, 58, 66, 74, 78, 86, 94, y 240.

50 En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 comprenden las cadenas pesadas y ligeras con el porcentaje de identidades y/o los cambios de aminoácidos y funciones discutidos anteriormente (es decir, (a)-(d)), en los que la región variable CDR3 de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19, 35, 43, 55, 63, 71, 83, y 91, y opcionalmente la CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 17, 33, 41, 53, 61, 69, 81, y 89, y opcionalmente la CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, 18, 34, 42, 54, 62, 70, 82, y 90, y en los que la CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 11, 15, 23, 27, 31, 39, 47, 51, 59, 67, 75, 79, 87, 95, y 241, y opcionalmente la CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9, 13, 21, 25, 29, 37, 45, 49, 57, 65, 73, 77, 85, 93, y 239, y opcionalmente la CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 14, 22, 26, 30, 38, 46, 50, 58, 66, 74, 78, 86, 94, y 240.

65 También se proporcionan anticuerpos anti-CD73 que comprenden una VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, VLCDR1, VLCDR2 y/o VLCDR3 que difiere del correspondiente CDR de CD73.4-1, CD73.4-2, CD73.3, 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 y/o 7A11, en 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, o 1-5 cambios de aminoácidos (es decir, sustituciones de aminoácidos, adiciones o deleciones). En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 comprende 1-5 cambios de aminoácidos en cada una de 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de

las CDR en relación con las correspondientes secuencias en CD73.4-1, CD73.4-2, CD73.3, 11F11-1, 11F11-2, 11F11, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 y/o 7A11. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 comprende en total de 1-5 cambios de aminoácidos a través de todas las CDR en relación con las CDR en CD73.4-1, CD73.4-2, CD73.3, 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 y/o 7A11.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 comprende las CDR de VH y VL que consisten en aquellas de CD73.4-1 o CD73.4-2, en el que uno o más de los aminoácidos en una o más CDR son aquellas de uno de los otros anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento.

Mutaciones (por ejemplo, sustituciones, adiciones, deleciones) que se pueden realizar en las secuencias de región variable de los anticuerpos anti-CD73 se pueden determinar basándose en lo siguiente: (i) las mutaciones que se introducen en los anticuerpos, como se describe en los Ejemplos; e (ii) la comparación de los restos de aminoácidos en cada posición en los dominios variables de los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento (véase Tabla 35 y Figura 35): un aminoácido diferente en una determinada posición en anticuerpos anti-CD73 puede indicar que el resto de aminoácido en esta posición se puede cambiar a otro resto de aminoácido sin afectar significativamente a las actividades del anticuerpo; mientras que si el mismo resto de aminoácido se encuentra en la misma posición en varios o todos los anticuerpos anti-CD73, esto puede indicar que este aminoácido particular se debería conservar y no cambiar a otro resto. A continuación, se proporcionan realizaciones ilustrativas.

En determinadas realizaciones, una sustitución en la región marco se puede introducir en la posición 25 (...RLSCATSGFTF... en 11F11) de la región variable de la cadena pesada (por ejemplo, una sustitución conservadora, por ejemplo, a S o A) de los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento. Por ejemplo, si el aminoácido en esta posición es T, se puede introducir una sustitución a A o S; si el aminoácido en esta posición es A, se puede introducir una sustitución a S o T; y si el aminoácido en esta posición es S, se puede introducir una sustitución a T o A. Los anticuerpos 24H2, 4D4, 10D2, 6E11, 7A11, 11A6, y 4C3 tienen una A en esta posición, 11F11 tiene una T en esta posición, y 73.5, 73.7, y 73.9 tienen una S en esta posición.

Igualmente, en determinadas realizaciones, una sustitución de región marco se puede introducir en la posición de aminoácidos 94 (...AEDTAVYYCAR... en 11F11) de la región variable de la cadena pesada (por ejemplo, V a L o L a V). Por ejemplo, los anticuerpos 11F11, 73.3-73.10, 24H2, 4D4, 5F8, y 10D2 tienen una V en esta posición, y 6E11, 7A11, 11A6, y 4C3.

En determinadas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos se pueden realizar a la CDR2 de la región variable de la cadena pesada de los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos en la posición 52 (...WVAVILLYDGSN... en 11F11) puede estar sustituida con W o si el aminoácido en esta posición es W, entonces el aminoácido puede estar sustituido con L (los anticuerpos 11F11 y 73.4-73.7 tienen una L en esta posición, y los anticuerpos 73.8-73.10, 24H2, y 4D4 tienen un W en esta posición).

Igualmente, en determinadas realizaciones, el aminoácido en la posición 54 (...VILYDGSNKYY... en 11F11) puede estar sustituido con S o E, o si el aminoácido en esta posición es S, entonces el aminoácido puede estar sustituido con E. Los anticuerpos 11F11, 73.4, 73.5, 24H2, 10D2, y 5F8 tienen una G en esta posición, los anticuerpos 73.6-73.9, 6E11, 7A11, 4C3, y 73.3 tienen una S en esta posición, y los anticuerpos 73.10 y 4D4 tienen un E en esta posición.

Se pueden determinar otras sustituciones permisibles en la región variable basándose en el alineamiento de las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera en la Figura 35 usando un fundamento similar al anteriormente descrito.

Los anticuerpos que tienen secuencias con homología a las de CD73.3, CD73.4, CD73.5, CD73.6, CD73.7, CD73.8, CD73.9, CD73.10, CD73.11, 11F11, 4C3, 4D4, 10D2, 11A6, 24H2, 5F8, 6E11 y/o 7A11, por ejemplo, las regiones VH y VL de las SEQ ID NO: 4, 16, 32, 40, 52, 60, 68, 80, 88, 135, 170-177, y las SEQ ID NO: 8, 12, 20, 24, 28, 36, 44, 48, 56, 64, 72, 76, 84, 92, respectivamente, o las cadenas pesadas y ligeras de las SEQ ID NO: 100, 103, 107, 109, 112, 114, 116, 119, 121, 133, y 184-210, y las SEQ ID NO: 101, 102, 104, 105, 106, 108, 110, 111, 113, 115, 117, 118, 120 y 122, respectivamente, o las CDR se pueden obtener mediante mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio o mediada por PCR de moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, SEQ ID NO: 139, 142, 146, 148, 151, 153, 155, 158, 160, 237 y/o las SEQ ID NO: 140, 141, 143, 144, 145, 147, 149, 150, 152, 154, 156, 157, 159, 161 o las SEQ ID NO: 134, 243, 246, 250, 252, 255, 257, 259, 262, 264, y/o las SEQ ID NO: 244, 245, 247, 248, 249, 251, 253, 254, 256, 258, 260, 261, 263, 265, 266 seguido por ensayo del anticuerpo alterado codificado para conservar la función usando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

#### V. Anticuerpos con modificaciones conservadoras

Los anticuerpos anti-CD73 pueden comprender una región variable de la cadena pesada que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de la cadena ligera que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, en los que una o más de estas secuencias de CDR comprenden secuencias de aminoácidos especificadas

basadas en los anticuerpos preferidos descritos en el presente documento, por ejemplo, de CD73.4-1, CD73.4-2, CD73.3, 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 y/o 7A11, o modificaciones conservadoras de los mismos, y en los que los anticuerpos conservan las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento. Los anticuerpos anti-CD73 que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que comprenden las SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que comprenden las SEQ ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente.

Por consiguiente, un anticuerpo anti-CD73 aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, en el que:

(a) la CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 7, 19, 35, 43, 55, 63, 71, 83, y 91 y modificaciones conservadoras de las mismas, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 o 1-5 sustituciones conservadoras;

(a) la CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 11, 15, 23, 27, 31, 39, 47, 51, 59, 67, 75, 79, 87, y 95 y modificaciones conservadoras de las mismas, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 o 1-5 sustituciones conservadoras;

(c) el anticuerpo especialmente se une a CD73 y

(d) el anticuerpo presenta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o todas las propiedades funcionales enumeradas en la Tabla 3.

En una realización preferida, la CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 6, 18, 34, 42, 54, 62, 70, 82, y 90 y modificaciones conservadoras de las mismas, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 o 1-5 sustituciones conservadoras; y la CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 10, 14, 22, 26, 30, 38, 46, 50, 58, 66, 74, 78, 86, y 94 y modificaciones conservadoras de las mismas, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 o 1-5 sustituciones de aminoácidos conservadoras. En otra realización preferida, la CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 5, 17, 33, 41, 53, 61, 69, 81, y 89 y modificaciones conservadoras de las mismas, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 o 1-5 sustituciones conservadoras; y la CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 9, 13, 21, 25, 29, 37, 45, 49, 57, 65, 73, 77, 85, y 93 y modificaciones conservadoras de las mismas, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 o 1-5 sustituciones de aminoácidos conservadoras.

En diversas realizaciones, los anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos.

Las sustituciones de aminoácidos conservadoras también se pueden realizar en porciones de los anticuerpos distintos o además de, las CDR. Por ejemplo, las modificaciones de aminoácidos conservadoras se pueden realizar en una región de marco o en la región constante, por ejemplo, región Fc. Cualquiera de las sustituciones descritas en el presente documento puede ser una sustitución conservadora. Una región variable o una cadena pesada o ligera puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25, o 1-50 sustituciones de aminoácidos conservadoras en relación con las secuencias de anticuerpo anti-CD73 proporcionadas en el presente documento. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CD73 comprende una combinación de modificación de aminoácido conservadora o no conservadora.

#### **VI. Anticuerpos que se unen al mismo epítipo en CD73 o compiten por la unión a CD73 con los anticuerpos descritos en el presente documento**

También se proporcionan anticuerpos que compiten por la unión a CD73 con los particulares anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento (por ejemplo, anticuerpos CD73.4, CD73.3, 11F11, 4C3, 4D4, 10D2, 11A6, 24H2, 5F8, 6E11 y 7A11). Tales anticuerpos competidores se pueden identificar basándose en su capacidad para inhibir de manera competitiva la unión a CD73 de uno o más anticuerpos monoclonales 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 7A11 y/o CD73.3 o CD73.4 (con cualquier región constante y cadenas ligeras descritas en el presente documento para estos anticuerpos) en ensayos de unión a CD73 convencionales. Por ejemplo, se pueden usar ensayos ELISA convencionales o ensayos ELISA competitivos en los que una proteína CD73 humana recombinante se inmoviliza sobre la placa, se añaden diversas concentraciones del primer anticuerpo no marcado, la placa se lava, se añade el segundo anticuerpo marcado, se lava, y se mide la cantidad de marcador unido. Si la concentración creciente del anticuerpo (primero) no marcado (también referido como el "anticuerpo bloqueante") inhibe la unión del anticuerpo (segundo) marcado, se dice que el primer anticuerpo inhibe la unión del segundo anticuerpo a la diana en la placa, o se dice que compiten con la unión

del segundo anticuerpo. Además, o como alternativa, se puede usar el análisis SPR de BIACORE® para valorar la capacidad de los anticuerpos para competir. La capacidad de un anticuerpo de ensayo para inhibir la unión de un anticuerpo anti-CD73 descrito en el presente documento a CD73 demuestra que el anticuerpo de ensayo puede competir con el anticuerpo para la unión a CD73.

5 En el presente documento también se proporciona anticuerpos anti-CD73 que inhiben la unión de anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento a CD73 sobre células, por ejemplo, células tumorales, en al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 10 97 %, 98 %, 99 % o 100 % y/o dicha unión a CD73 sobre las células, por ejemplo, células tumorales, se inhibe en al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, por ejemplo, como se mide mediante ELISA o FACS, tal como usando el ensayo descrito en el párrafo anterior.

15 Los anticuerpos que compiten por la unión con los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento se pueden identificar usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden inmunizar ratones con CD73 humana como se describe en el presente documento, hibridomas producidos, y los anticuerpos monoclonales resultantes seleccionados en función de su capacidad para competir con un anticuerpo descrito en el presente documento por la unión a CD73. Los ratones también se pueden inmunizar con un fragmento más pequeño de CD73 que contiene el epítipo al que se une el anticuerpo. El epítipo o región que comprende el epítipo se puede 20 identificar mediante, por ejemplo, cribado en función de su unión a una serie de péptidos de solapamientos que abarcan CD73. Como alternativa, el método de Jespers et al., *Biotechnology* 12:899, 1994 se puede usar para guiar la selección de anticuerpos que tienen el mismo epítipo y, por lo tanto, propiedades similares al anti-CD73 descrito en el presente documento. Usando la presentación en fago, primero, la cadena pesada del anticuerpo anti-CD73 se empareja con un repertorio de cadenas ligeras (preferentemente humanas) para seleccionar un anticuerpo de unión 25 a CD73, y a continuación la nueva cadena ligera se empareja con un repertorio de cadenas pesadas (preferentemente humanas) para seleccionar un anticuerpo de unión a CD73 (preferentemente humano) que tiene el mismo epítipo o región de epítipo que un anticuerpo anti-CD73 descrito en el presente documento. Se pueden obtener variantes alternativas de un anticuerpo descrito en el presente documento mediante mutagénesis de ADNc que codifica las cadenas pesadas y ligera del anticuerpo.

30 Las técnicas para determinar los anticuerpos que se unen al "mismo epítipo sobre CD73" con los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, métodos de mapeo de epítopos, tales como análisis por rayos x de cristales de antígeno: complejos de anticuerpo, que proporciona resolución atómica del epítipo. Otros métodos hacen un seguimiento de la unión del anticuerpo a fragmentos de antígeno o variaciones mutadas del 35 antígeno en los que la pérdida de unión debida a una modificación de un resto de aminoácido dentro de la secuencia de antígeno se considera con frecuencia un indicio de un componente epítipo. Además, también se pueden usar métodos combinatorios computacionales para el mapeo de epítopos. Los métodos también pueden depender de un anticuerpo de interés para aislar por afinidad péptidos cortos específicos (o bien en forma tridimensional nativa o en forma desnaturalizada) de las genotecas de péptido de expresión en fago. Por tanto, los péptidos se consideran 40 guías para la definición del epítipo correspondiente al anticuerpo usado para cribado de la genoteca de péptidos. Para el mapeo de epítopos, también se han desarrollado algoritmos computacionales que ha demostrado que mapean epítopos conformacionales discontinuos.

45 La mutagénesis por barrido de alanina, como se describe por Cunningham and Wells (1989) *Science* 244: 1.081-1.085, o alguna otra forma de mutagénesis puntual de los restos de aminoácidos en CD73 también se pueden usar para determinar el epítipo funcional para un anticuerpo anti-CD73. Los estudios de mutagénesis, sin embargo, también pueden revelar restos de aminoácidos que son cruciales para la estructura tridimensional general de CD73 pero que no están implicados directamente en los contactos de anticuerpo-antígeno y, por tanto, pueden ser necesario otros métodos para confirmar un epítipo funcional determinado usando este método.

50 El epítipo o región de epítipo (una región de epítipo" es una región que comprende el epítipo o el solapamiento con el epítipo) unido a un anticuerpo específico también se puede determinar valorando la unión del anticuerpo a los péptidos que comprenden fragmentos de CD73, por ejemplo, fragmentos no desnaturalizados o desnaturalizados. Una serie de péptidos de solapamiento que abarcan la secuencia de CD73 (por ejemplo, CD73 humana) se pueden 55 sintetizar y seleccionar en función de su unión, p. ej., en un ELISA directo, un ELISA competitivo (donde se evalúa la capacidad del péptido para evitar la unión de un anticuerpo con CD73 unido a un pocillo de una placa de microtitulación) o en un chip. Tales métodos de cribado de péptidos pueden no tener capacidad para detectar algunos epítopos funcionales discontinuos, es decir, epítopos funcionales que implican restos de aminoácidos que no son contiguos a lo largo de la secuencia primaria de la cadena polipeptídica de CD73.

60 Un epítipo también se puede identificar mediante huella proteica basada en MS, tal como espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX-MS) y oxidación fotoquímica rápida de proteínas (FPOP). HDX-MS se puede conducir, por ejemplo, como se describe además en los Ejemplos y en Wei et al. (2014) *Drug Discovery Today* 19:95. FPOP se puede conducir como se describe, por ejemplo, en Hambley and Gross (2005) *J. American Soc. Mass Spectrometry* 16:2.057.

El epítipo unido por anticuerpos anti-CD73 también se puede determinar mediante métodos estructurales, tales como determinación de la estructura cristalina por rayos X (por ejemplo., documento WO2005/044853), modelado molecular y espectroscopia por resonancia magnética nuclear (NMR), incluyendo determinación por NMR de las tasas de intercambio de H-D de hidrógenos de amida lábiles en CD73 cuando están libres y cuando están unidos en un complejo con un anticuerpo de interés (Zinn-Justin et al. (1992) *Biochemistry* 31: 11335-11347; Zinn-Justin et al. (1993) *Biochemistry* 32: 6.884-6.891).

Con respecto a la cristalografía por rayos X, se puede conseguir cristalización usando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Giege et al. (1994) *Acta Crystallogr.* D50:339-350; McPherson (1990) *Eur. J. Biochem.* 189:1-23), incluyendo microlote (por ejemplo, Chayen (1997) *Structure* 5:1269-1274), difusión de vapor de gota colgante (p. ej., McPherson (1976) *J. Biol. Chem.* 251:6300-6303), siembra y diálisis. Es deseable usar una preparación de proteínas que tenga una concentración de al menos aproximadamente 1 mg/ml y preferentemente de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. La cristalización puede lograrse mejor en una solución precipitante que contiene polietilenglicol 1000-20.000 (PEG; peso molecular medio que varía de aproximadamente 1000 a aproximadamente 20.000 Da), preferentemente de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 7.000 Da, más preferentemente aproximadamente 6.000 Da, oscilando las concentraciones de aproximadamente 10 % a aproximadamente 30 % (p/v). También puede ser deseable incluir un agente estabilizador de proteínas, por ejemplo, glicerol a una concentración que oscila de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 20 %. Una sal adecuada, tal como cloruro de sodio, cloruro de litio o citrato de sodio también puede ser deseable en la solución de precipitación, preferentemente en una concentración que oscila de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 1000 mM. El precipitado se tampona preferentemente a un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 5,0, preferentemente de aproximadamente 4,0. Tampones específicos útiles en la solución de precipitado pueden variar y son bien conocidos en la técnica ("Scopes, Protein Purification: Principles and Practice", tercera ed., (1994) Springer-Verlag, Nueva York). Ejemplos de tampones útiles incluyen, pero sin limitación, HEPES, Tris, MES y acetato. Los cristales pueden crecer a una amplia gama de temperaturas, incluyendo 2 °C, 4 °C, 8 °C y 26 °C.

Anticuerpo: los cristales de antígeno se pueden estudiar usando técnicas de difracción de rayos X bien conocidas y pueden refinarse usando programa informático tal como X-PLOR (Universidad de Yale, 1992, distribuido por Molecular Simulations, Inc.; véase, por ejemplo, Blundell y Johnson (1985) *Meth. Enzymol.* 114 y 115, H. W. Wyckoff et al., eds., Academic Press; publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos N.º 2004/0014194) y BUSTER (Bricogne (1993) *Acta Cryst.* D49:37-60; Bricogne (1997) *Meth. Enzymol.* 276A: 361-423, Carter y Sweet, eds.; Roversi et al. (2000) *Acta Cryst.* D56:1313-1323).

Los anticuerpos anti-CD73 pueden unirse al mismo epítipo que cualquiera de los anticuerpos anti-CD73 que tienen las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento, como se determina mediante una técnica de mapeo de epítopos, tal como una técnica descritas en el presente documento. Los anticuerpos anti-CD73 también pueden tener interacciones similares con CD73 humana, por ejemplo, pueden tener al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más de las interacciones mostradas en la Tabla 30, como se determina mediante cristalografía por rayos X.

## VII. Anticuerpos diseñados y modificados por ingeniería genética

### Regiones VH y VL

También se proporcionan anticuerpos diseñados y modificados por ingeniería genética que se preparan usando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias  $V_H$  y/o  $V_L$  descritas en el presente documento como material de partida para diseñar y modificar por ingeniería genética el anticuerpo, dicho anticuerpo modificado puede tener propiedades alteradas del anticuerpo de partida. Un anticuerpo se puede diseñar por ingeniería genética modificando uno o más restos en una o ambas regiones variables (es decir,  $V_H$  y/o  $V_L$ ), por ejemplo, en una o más regiones CDR y/o en una o más regiones marco. Además, o como alternativa, se puede diseñar por ingeniería genética un anticuerpo modificando los restos en la(s) región(es) constante(s), por ejemplo, para alterar la(s) función(es) efectora(s) del anticuerpo.

Un tipo de ingeniería genética en la región variable que se puede realizar es la inserción de CDR. Los anticuerpos interaccionan con antígenos diana de manera predominante a través de los restos de aminoácidos que están localizados en las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadena pesada y ligera. Por este motivo, las secuencias de aminoácidos en las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Dado que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de los anticuerpos de referencia específicos construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo de referencia específico insertados en las secuencias marco de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véase, por ejemplo, Riechmann, L. et al. (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad.* Véase. EE.UU. 86:10029-10033; el documento de patente de los Estados Unidos N.º 5.225.539 de Winter, y el documento de Patente de los Estados Unidos N.º 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al.)

Por consiguiente, otra realización descrita en el presente documento concierne a un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 17, 33, 41, 53, 61, 69, 81, y 89, SEQ ID NO: 6, 18, 34, 42, 54, 62, 70, 82, y 90 y las SEQ ID NO: 7, 19, 35, 43, 55, 63, 71, 83, y 91, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9, 13, 21, 25, 29, 37, 45, 49, 57, 65, 73, 77, 85, y 93, SEQ ID NO: 10, 14, 22, 26, 30, 38, 46, 50, 58, 66, 74, 78, 86, y 94, y las SEQ ID NO: 11, 15, 23, 27, 31, 39, 47, 51, 59, 67, 75, 79, 87, y 95, respectivamente. Por tanto, tales anticuerpos contienen las secuencias de CDR de  $V_H$  y  $V_L$  de los anticuerpos monoclonales CD73.4-1, CD73.4-2, 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 y 7A11, incluso puede contener diferentes secuencias marco de estos anticuerpos.

Tales secuencias marco se pueden obtener a partir de bases de datos públicas de ADN o de referencias publicadas que incluyen secuencias génicas de anticuerpos de la línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal para los genes de la región variable de la cadena pesada y ligera humana se pueden encontrar en la base de datos de secuencias de la línea germinal humana "VBase" (disponible en internet en [www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase)), así como en Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación de NIH N.º 91-3242; Tomlinson, I. M., et al (1992) "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; y Cox, J. P. L. et al. (1994) "A Directory of Human Germline VH Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836.

Las secuencias marco preferidas para su uso en los anticuerpos descritos en el presente documento son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias marco usadas por los anticuerpos descritos en el presente documento. Las secuencias de CDR1, 2 y 3 de  $V_H$ , y las secuencias de CDR1, 2 y 3 de  $V_L$ , se pueden insertar sobre regiones marco que tienen la secuencia idéntica que la encontrada en el gen de inmunoglobulina de la línea germinal de la cual deriva la secuencia marco, o las secuencias de CDR se pueden insertar sobre las regiones marco que contienen hasta 20, preferentemente conservadoras, sustituciones de aminoácidos en comparación con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, se ha descubierto que en determinados casos es beneficioso mutar restos en las regiones marco para conservar o aumentar la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo (véase, por ejemplo, el documento de Patente de los Estados Unidos N.º 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al.).

Los anticuerpos diseñados por ingeniería genética descritos en el presente documento incluyen aquellos en los que se han hecho modificaciones en los restos de la región marco en  $V_H$  y/o  $V_L$ , por ejemplo para mejorar las propiedades del anticuerpo. Generalmente, tales modificaciones en la región marco se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, una estrategia es "retromutar" uno o más restos de la región marco a la correspondiente secuencia de la línea germinal. Más específicamente, un anticuerpo que se ha sometido a una mutación somática puede contener restos de la región marco que difieren de la secuencia de la línea germinal de la que deriva el anticuerpo. Tales restos se pueden identificar mediante la comparación de las secuencias marco del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de la que proviene el anticuerpo. Para restablecer las secuencias de la región marco a su configuración de la línea germinal, las mutaciones somáticas se pueden "retromutar" a la secuencia de la línea germinal mediante, por ejemplo, mutagénesis de sitio dirigido o mutagénesis mediada por PCR. También se pretende que se abarquen tales anticuerpos "retromutados". Otro tipo de modificación en la región marco implica mutar uno o más restos en la región marco o incluso en una o más regiones CDR, para eliminar los epítomos de linfocitos T para reducir de ese modo la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Esta estrategia también es referida como "desinmunización" y se describe con más detalle en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20030153043 por Carr et al.

Otro tipo de modificación de la región variable es mutar los restos de aminoácidos en las regiones CDR para mejorar una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo de interés. La mutagénesis dirigida a sitio o la mutagénesis mediada por PCR se pueden realizar para introducir la(s) mutación(es), y el efecto sobre la unión a anticuerpo y otra propiedad de interés, se puede evaluar en ensayos *in vitro* o *in vivo* como se describe en el presente documento y se proporciona en los Ejemplos. Preferentemente se introducen modificaciones conservadoras (como se ha discutido anteriormente). Las mutaciones pueden ser adiciones de aminoácidos, deleciones, o preferentemente adiciones. Además, generalmente se alteran no más de uno, dos, tres, cuatro o cinco restos en una región CDR.

Por consiguiente, también se proporcionan anticuerpos monoclonales anti-CD73 aislados, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende: (a) una región CDR1 de  $V_H$  que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 17, 33, 41, 53, 61, 69, 81, y 89, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos, deleciones o adiciones en comparación con las SEQ ID NO: 5, 17, 33, 41, 53, 61, 69, 81, y 89; (b) una región CDR2 de  $V_H$  que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, 18, 34, 42, 54, 62, 70, 82, y 90, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos, deleciones o adiciones en comparación con las SEQ ID NO: 6, 18,

34, 42, 54, 62, 70, 82, y 90; (c) una región CDR3 de  $V_H$  que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19, 35, 43, 55, 63, 71, 83, y 91, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos, deleciones o adiciones en comparación con las SEQ ID NO: 7, 19, 35, 43, 55, 63, 71, 83, y 91; (d) una región CDR1 de  $V_L$  que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9, 13, 21, 25, 29, 37, 45, 49, 57, 65, 73, 77, 85, y 93, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos, deleciones o adiciones en comparación con las SEQ ID NO: 9, 13, 21, 25, 29, 37, 45, 49, 57, 65, 73, 77, 85, y 93; (e) una región CDR2 de  $V_L$  que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 14, 22, 26, 30, 38, 46, 50, 58, 66, 74, 78, 86, y 94, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos, deleciones o adiciones en comparación con las SEQ ID NO: 10, 14, 22, 26, 30, 38, 46, 50, 58, 66, 74, 78, 86, y 94; y (f) una región CDR3 de  $V_L$  que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 11, 15, 23, 27, 31, 39, 47, 51, 59, 67, 75, 79, 87, y 95, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos, deleciones o adiciones en comparación con las SEQ ID NO: 11, 15, 23, 27, 31, 39, 47, 51, 59, 67, 75, 79, 87, y 95.

Los restos de metionina en las CDR de los anticuerpos se pueden oxidar, dando como resultado la degradación química potencial y la reducción consecuyente en la potencia del anticuerpo. Por consiguiente, también se proporcionan anticuerpos anti-CD73 que tienen uno o más restos de metionina en las CDR de la cadena pesada y/o ligera reemplazados por restos de aminoácidos que no se someten a la degradación oxidativa.

Igualmente, los sitios de desaminación se pueden eliminar de los anticuerpos anti-CD73, particularmente en las CDR.

Los sitios de glicosilación potencial en el dominio de unión a antígeno se eliminan preferentemente para evitar la glicosilación que puede interferir con la unión de antígeno. Véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.714.350.

#### *Unión a antígeno dirigido*

En diversas realizaciones, el anticuerpo de la presente divulgación se modifica para bloquear selectivamente la unión a antígeno en tejidos y ambientes en donde la unión a antígeno sería perjudicial, pero permiten la unión a antígeno en donde sería beneficiosa. En una realización, una "máscara" de péptido bloqueante se genera que se une específicamente a la superficie de unión a antígeno del anticuerpo e interfiere con la unión a antígeno, dicha máscara se une a cada uno de los brazos del anticuerpo por un enlazador escindible de peptidasa. Véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N.º 8.518.404 de CytomoX. Tales construcciones son útiles para el tratamiento de los cánceres en los que los niveles de proteasa se incrementan mucho en el ambiente del tumor en comparación con tejidos no tumorales. La escisión selectiva del enlazador escindible en el ambiente de tumor permite la disociación del péptido de enmascaramiento/bloqueo, permitiendo la unión a antígeno selectivamente en el tumor, en lugar de en los tejidos periféricos en los que la unión a antígeno podría causar efectos secundarios indeseados.

Como alternativa, en una realización relacionada, se desarrolla un compuesto de unión bivalente ("ligando de enmascaramiento") que comprende dos dominios de unión a antígeno que une ambas superficies de unión a antígeno del anticuerpo (bivalente) e interfiere con la unión a antígeno, en el que las máscaras de los dominios de unión se unen una a otra (pero no al anticuerpo) por un enlazador escindible, por ejemplo, escindible por una peptidasa. Véase, por ejemplo, Publicación de solicitud de patente Internacional N.º WO 2010/077643 de Tegopharm Corp. Los ligandos de enmascaramiento pueden comprender, o ser derivados de, el antígeno al cual el anticuerpo se pretende unir, o se puede generar independientemente. Tales ligandos de enmascaramiento son útiles para el tratamiento de los cánceres en los que los niveles de proteasa se incrementan mucho en el ambiente del tumor en comparación con tejidos no tumorales. La escisión selectiva del enlazador escindible en el ambiente del tumor permite la disociación de los dos dominios de unión uno del otro, reduciendo la capacidad para las superficies de unión a antígeno del anticuerpo. La disociación resultante del ligando de enmascaramiento del anticuerpo posibilita la unión a antígeno selectivamente en el tumor, en lugar de en los tejidos periféricos en los que la unión a antígeno podría causar efectos secundarios indeseados.

#### *Fcs y Fcs modificado*

Además de la actividad de un anticuerpo terapéutico que surge de la unión del dominio de unión a antígeno al antígeno (por ejemplo, bloqueo de un ligando afín o proteína receptora en el caso de anticuerpos antagonistas, o señalización inducida en el caso de anticuerpos agonistas), la porción Fc del anticuerpo interacciona con el sistema inmunitario generalmente de manera compleja para suscitar cualquier número de efectos biológicos. Las funciones efectoras, tales como la región Fc de una inmunoglobulina es responsable de muchas importantes funciones del anticuerpo, tales como la citotoxicidad celular dependiente de antígeno (ADCC), la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y la fagocitosis mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCP), dando como resultado la muerte de células diana, aunque mediante diferentes mecanismos.

Los anticuerpos anti-CD73 pueden comprender los dominios variables de los anticuerpos descritos en el presente documento con los dominios constantes que comprenden las regiones Fc, seleccionados basándose en las actividades biológicas (si las hay) del anticuerpo para el uso previsto. Salfeld (2007) *Nat. Biotechnol.* 25:1369. Las IgG humanas, por ejemplo, se pueden clasificar en cuatro subclases, IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4 y cada una de estas comprende una región Fc que tiene un perfil único para la unión a uno o más de los receptores Fcγ (receptores activadores FcγRI (CD64), FcγRIIA, FcγRIIC (CD32); FcγRIIIA y FcγRIIIB (CD16) y receptor inhibidor FcγRIIB), y para el primer componente del complemento (C1q). IgG1 y IgG3 humanas se unen a todos los receptores de Fcγ; IgG2 se une a FcγRIIA<sub>H131</sub>, y con afinidad inferior a FcγRIIA<sub>R131</sub> FcγRIIIA<sub>V158</sub>; IgG4 se une a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, y FcγRIIIA<sub>V158</sub>; y el receptor inhibidor FcγRIIB tiene una afinidad inferior para IgG1, IgG2 y IgG3 que todos los otros receptores de Fcγ. Bruhns et al. (2009) *Blood* 113:3716. Los estudios ha demostrado que FcγRI no se une a IgG2, y FcγRIIIB no se une a IgG2 o IgG4. *Id.* En general, con respecto a la actividad ADCC, IgG1 >>IgG3 >>IgG4 >>IgG2 humana. En consecuencia, por ejemplo, un dominio constante de IgG1, en lugar de IgG2 o IgG4, se podría elegir para su uso en un fármaco en el que se desea ADCC; IgG3 se podría elegir si la activación de células NK que expresan FcγRIIIA, monocitos de macrófagos; e IgG4 se podrían elegir si el anticuerpo es para ser usado para insensibilizar pacientes de alergia. IgG4 también se podría seleccionar si se desea que el anticuerpo carezca de toda la función efectora.

Por consiguiente, las regiones variables de anti-CD73 descritas en el presente documento se pueden unir (por ejemplo, unidas o fusionadas covalentemente) a un Fc, por ejemplo, un Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, que puede ser de cualquier alotipo o isoalotipo, por ejemplo, para IgG1: G1m, G1m1(a), G1m2(x), G1m3(f), G1m17(z); para IgG2: G2m, G2m23(n); para IgG3: G3m, G3m21(g1), G3m28(g5), G3m11(b0), G3m5(b1), G3m13(b3), G3m14(b4), G3m10(b5), G3m15(s), G3m16(t), G3m6(c3), G3m24(c5), G3m26(u), G3m27(v); . Véase, por ejemplo, Jefferis et al. (2009) *mAbs* 1:1). La selección de alotipo puede estar influenciada por los asuntos de inmunogenicidad potencial, por ejemplo, para minimizar la formación de anticuerpos anti-fármaco.

Las regiones variables descritas en el presente documento se pueden unir a un Fc que comprende una o más modificaciones, generalmente, para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tal como la semivida en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo descrito en el presente documento se puede modificar químicamente (por ejemplo, se pueden unir uno o más grupos químicos al anticuerpo) o se puede modificar para alterar su glicosilación, para alterar una o más propiedades del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe con más detalle a continuación. La numeración de los restos en la región Fc es la del índice de la UE de Kabat. Se proporcionan las variantes de secuencia descritas en el presente documento en referencia al número de resto seguido por el aminoácido que está sustituido en lugar del aminoácido de origen natural, opcionalmente precedido por el resto de origen natural en esa posición. Cuando aminoácidos múltiples pueden estar presentes en una posición dada, por ejemplo, si las secuencias difieren entre los isotipos de origen natural, o si las mutaciones múltiples pueden estar sustituidas en la posición, se separan por barras inclinadas (por ejemplo, "X/Y/Z").

Por ejemplo, se pueden hacer modificaciones en la región Fc para generar una variante Fc con (a) citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo incrementada o disminuida (ADCC), (b) citotoxicidad mediada por complemento incrementada o disminuida (CDC), (c) afinidad incrementada o disminuida para C1q y/o (d) afinidad incrementada o disminuida para un receptor de Fc en relación con Fc parental. Tales variantes de la región Fc generalmente comprenderán al menos una modificación de aminoácidos en la región Fc. La combinación de las modificaciones de aminoácidos se cree que es particularmente deseable. Por ejemplo, la región Fc variante puede incluir una, tres, cuatro, cinco, etc sustituciones en la misma, por ejemplo, de las posiciones de la región Fc específica identificadas en el presente documento. Variantes de la secuencia de Fc ilustrativas se describen en el presente documento, y también se proporcionan en los documentos de patente de Estados Unidos n.º 5.624.821; 6.277.375; 6.737.056; 6.194.551; 7.317.091; 8.101.720; las publicaciones de Patente PCT WO 00/42072; WO 01/58957; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455; WO 04/099249; WO 04/063351; WO 05/070963; WO 05/040217, WO 05/092925 y WO 06/020114.

#### *Reducción de la función efectora*

La actividad de ADCC se puede reducir modificando la región Fc. En determinadas realizaciones, se pueden eliminar los sitios que afectan la unión a receptores de Fc, preferentemente los sitios distintos de los sitios de unión a receptor salvaje. En otras realizaciones, se puede modificar una región Fc para eliminar un sitio ADCC. Los sitios ADCC son conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Sarmay et al. (1992) *Molec. Immunol.* 29 (5): 633-9 con respecto a los sitios ADCC en IgG1. En una realización, la variante G236R y L328R de la IgG1 humana elimina eficazmente la unión a FcγR. Horton et al. (2011) *J. Immunol.* 186:4223 y Chu et al. (2008) *Mol. Immunol.* 45:3926. En otras realizaciones, la Fc que tiene la unión reducida a FcγRs comprendía las sustituciones de aminoácidos L234A, L235E y G237A. Gross et al. (2001) *Immunity* 15:289. Además, los anticuerpos de no unión a FcγR se pueden preparar convirtiendo el dominio de unión a FcγR de IgG1 (en las posiciones 233, 234, 235, 236, 327, 330, y 331) en la secuencia de IgG2 o IgG4. El documento US 2013/0317203.

La actividad de CDC también se puede reducir modificando la región Fc. Mutaciones en las posiciones D270 de IgG1, K322, P329 y P331, específicamente mutaciones de alanina D270A, K322A, P329A y P331A, reducen

significativamente la capacidad del correspondiente anticuerpo para unirse a C1q y para activar el complemento. Idusogie et al. (2000) *J. Immunol.* 164:4178; el documento WO 99/51642. Se ha demostrado que la mutación de la posición 331 de IgG1 (por ejemplo, P331S) que reduce la unión a complemento. Tao et al. (1993) *J. Exp. Med.* 178:661 y Canfield & Morrison (1991) *J. Exp. Med.* 173:1483. En otro ejemplo, uno o más restos de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 231 a 239 se alteran para reducir de ese modo la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. el documento WO 94/29351.

En algunas realizaciones, la Fc con fijación de complemento reducida tiene las sustituciones de aminoácidos A330S y P331S. Gross et al. (2001) *Immunity* 15:289.

Para su usos cuando hay que evitar la función efectora por completo, por ejemplo, cuando la unión a antígeno sola es suficiente para generar el beneficio terapéutico deseado, y la función efectora solamente conduce a (o incrementa el riesgo de) efectos secundarios indeseados, los anticuerpos IgG4 se pueden usar, o los anticuerpos o fragmentos que carecen de la región Fc o una porción sustancial de los mismos se pueden concebir, o la Fc se puede mutar para eliminar la glicosilación totalmente (por ejemplo N297A). Como alternativa, se ha generado una construcción híbrida de IgG2 humana (dominio CH1 y región bisagra) y IgG4 humana (dominios CH2 y CH3) que está desprovista de la función efectora, que carece de la capacidad de unir los FcγRs (tipo IgG2) y es incapaz de activar el complemento (tipo IgG4). Rother et al. (2007) *Nat. Biotechnol.* 25:1256. Véase también Mueller et al. (1997) *Mol. Immunol.* 34:441; Labrijn et al. (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20:479 (discutiendo las modificaciones de Fc para reducir la función efectora generalmente).

En otras realizaciones, se altera la región Fc reemplazando al menos un resto de aminoácido por un resto de aminoácido diferente para reducir las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los restos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 se pueden reemplazar por un resto de aminoácidos diferente de manera que el anticuerpo tiene afinidad disminuida para un ligando efector para conservar la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo parenteral. El ligando efector para el que se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc (restos 234, 235, 236, 237, 297) o el componente C1 del complemento (restos 297, 318, 320, 322). Los documentos de patente de Estados Unidos n.º 5.624.821 y 5.648.260, ambas por Winter et al.

el documento WO 88/007089 propuso modificaciones en la región Fc de IgG para disminuir la unión a FcγRI para disminuir ADCC (234A; 235E; 236A; G237A) o bloquear la unión al componente complemento C1q para eliminar CDC (E318A o V/K320A y K322A/Q). Véase también Duncan & Winter (1988) *Nature* 332:563; Chappel et al. (1991) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 88:9036; y Sondermann et al. (2000) *Nature* 406:267 (discutiendo los efectos de estas mutaciones sobre la unión de FcγRIII).

Las modificaciones de Fc que reducen la función efectora también incluyen sustituciones, inserciones, y deleciones en las posiciones 234, 235, 236, 237, 267, 269, 325, y 328, tal como 234G, 235G, 236R, 237K, 267R, 269R, 325L y 328R. Una variante de Fc puede comprender 236R/328R. Otras modificaciones para reducir FcγR y las interacciones complemento incluyen las sustituciones 297A, 234A, 235A, 237A, 318A, 228P, 236E, 268Q, 309L, 330S, 331S, 220S, 226S, 229S, 238S, 233P, y 234V. Estas y otras modificaciones se revisan en Strohl (2009) *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691. Las funciones efectoras (tanto ADCC como la activación de complemento) se pueden reducir, mientras que se mantiene la unión de FcR neonatal (mantiene la semivida), mutando los restos de IgG en una o más posiciones 233 - 236 y 327 - 331, tal como E233P, L234V, L235A, opcionalmente G236Δ, A327G, A330S y P331S en IgG1; E233P, F234V, L235A, opcionalmente G236Δ en IgG4; y A330S y P331S en IgG2. Véase Armour et al. (1999) *Eur. J. Immunol.* 29:2613; el documento WO 99/58572. Otras mutaciones que reducen la función efectora incluyen L234A y L235A en IgG1 (Alegre et al., (1994) *Transplantation* 57:1537); V234A y G237A en IgG2 (Cole et al. (1997) *J. Immunol.* 159:3613; véase también el documento de patente de Estados Unidos N.º 5.834.597); y S228P y L235E para IgG4 (Reddy et al. (2000) *J. Immunol.* 164:1.925). Otra combinación de mutaciones para reducir en una IgG1 humana incluye L234F, L235E y P331S. Oganessian et al. (2008) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 64:700. Véase generalmente Labrijn et al. (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20:479. Las mutaciones adicionales encontradas para disminuir la función efectora en el contexto de una proteína de fusión Fc (IgG1) (abatacept) son C226S, C229S y P238S (enumeración de resto EU). Davis et al. (2007) *J. Immunol.* 34:2204.

Otras variantes de Fc que tienen ADCC y/o CDC reducidas se describen en Glaesner et al. (2010) *Diabetes Metab. Res. Rev.* 26:287 (F234A y L235A para disminuir ADCC y ADCP en un IgG4); Hutchins et al. (1995) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 92:11980 (F234A, G237A y E318A en un IgG4); An et al. (2009) *MAbs* 1:572 y la Publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2007/0148167 (H268Q, V309L, A330S y P331S en una IgG2); McEarchern et al. (2007) *Blood* 109:1.185 (C226S, C229S, E233P, L234V, L235A en un IgG1); Vafa et al. (2014) *Methods* 65:114 (V234V, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S, P331S en una IgG2).

En determinadas realizaciones, se elige una Fc que tiene esencialmente no función efectora, es decir, tiene unión reducida a FcγRs y fijación a complemento reducida. Una Fc ilustrativa, por ejemplo, Fc de IgG1, que no es efectora comprende las siguientes mutaciones: L234A, L235E, G237A, A330S y P331S. Gross et al. (2001) *Immunity* 15:289. Cadenas pesadas ilustrativas que comprende estas mutaciones se exponen en el Listado de Secuencias, como se

detalla en la Tabla 35. Estas cinco sustituciones se pueden combinar con N297A para eliminar también la glicosilación.

#### Aumentar la función efectora

5 Como alternativa, la actividad de ADCC se puede incrementar modificando la región Fc. Con respecto a la actividad ADCC, IgG1  $\cong$  IgG3 >> IgG4  $\cong$  IgG2 huma, por tanto, un dominio constante de IgG1, en lugar de IgG2 o IgG4, se podría elegir para su uso en un fármaco en el que se desea ADCC. Como alternativa, la región Fc se puede modificar para incrementar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y/o para incrementar la afinidad para un receptor de Fc $\gamma$  modificando uno o más aminoácidos de las siguientes posiciones: 234, 235, 236, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 262, 263, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 313, 315, 320, 322, 324, 325, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 433, 434, 435, 436, 437, 438 o 439. Véase el documento WO 2012/142515; véase también el documento WO 00/42072. Sustituciones ilustrativas incluyen 236A, 239D, 239E, 268D, 267E, 268E, 268F, 324T, 332D y 332E. Variantes ilustrativas incluyen 239D/332E, 236A/332E, 236A/239D/332E, 268F/324T, 267E/268F, 267E/324T, y 267E/268F/324T. Por ejemplo, se ha demostrado que las IgG1Fc humanas que comprenden la variante G236A, la cual opcionalmente se puede combinar con I332E, incrementa la relación de afinidad de unión a Fc $\gamma$ IIA / Fc $\gamma$ IIB aproximadamente 15 veces. Richards et al. (2008) *Mol. Cancer Therap.* 7:2517; Moore y co. (2010) *mAbs* 2:181. Otras modificaciones para aumentar las interacciones de Fc $\gamma$ R y complemento incluyen pero no se limitan a sustituciones 298A, 333A, 334A, 326A, 247I, 339D, 339Q, 280H, 290S, 298D, 298V, 243L, 292P, 300L, 396L, 305I, y 396L. Estas y otras modificaciones se revisan en Strohl (2009) *Current Opinion in Biotechnology* 20:685-691. Específicamente, tanto ADCC como CDC se pueden aumentar por cambios en la posición E333 de IgG1, por ejemplo, E333A. Shields et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591. El uso de mutaciones P247I y A339D para aumentar la función efectora en una IgG1 se describe en el documento WO 2006/020114, y D280H, K290S  $\pm$  S298D/V se describe en el documento WO 2004/074455. Se ha demostrado que las variantes K326A/W y E333A/S incrementan la función efectora en IgG1 humana y E333S en IgG2. Idusogie et al. (2001) *J. Immunol.* 166:2571.

30 Específicamente, los sitios de unión en IgG1 humana para Fc $\gamma$ R1, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII y FcRn se han mapeado, y se han descrito variantes con unión mejorada. Shields et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604. Se demostró que las mutaciones específicas 256, 290, 298, 333, 334 y 339 mejoran la unión a Fc $\gamma$ RIII, incluyendo los mutantes de combinación T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A (que tiene unión a Fc $\gamma$ RIIIa aumentada y actividad ADCC). Se han identificado otras variantes de IgG1 con unión a Fc $\gamma$ RIIIa fuertemente aumentada, incluyendo variantes con mutaciones S239D/I332E y S239D/I332E/A330L que muestran el mayor incremento en afinidad para Fc $\gamma$ RIIIa, una disminución en la unión a Fc $\gamma$ RIIb, y fuerte actividad citotóxica en monos cynomolgus. Lazar et al. (2006) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 103:4005; Awan et al. (2010) *Blood* 115:1204; Desjarlais & Lazar (2011) *Exp. Cell Res.* 317:1278. La introducción de las mutaciones triples en anticuerpos tales como alemtuzumab (específico a CD52), trastuzumab (específico a HER2/neu), ituximab (específico a CD20), y cetuximab (específico a EGFR) se tradujo en actividad ADCC muy aumentada *in vitro*, y la variante S239D/I332E mostró una capacidad aumentada para eliminar los linfocitos B en monos. Lazar et al. (2006) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 103:4005. Además, se han identificado mutantes de IgG1 que contienen mutaciones L235V, F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L que presentan unión a Fc $\gamma$ RIIIa y actividad ADCC concomitantemente aumentada en ratones transgénicos que expresan Fc $\gamma$ RIIIa humana en modelos de malignidades de linfocito B y cáncer de mama. Stavenhagen et al. (2007) *Cancer Res.* 67:8882; el documento de patente de Estados Unidos n.º 8.652.466; Nordstrom et al. (2011) *Breast Cancer Res.* 13:R123.

50 Isotipos de IgG diferentes también pueden presentar actividad CDC diferencial (IgG3 > IgG1 >> IgG2  $\cong$  IgG4). Dangl et al. (1988) *EMBO J.* 7:1989. Para sus usos en los que se desea CDC aumentada, también es posible introducir mutaciones que incrementan la unión a C1q. La capacidad de reclutar complemento (CDC) se puede aumentar mediante mutaciones a K326 y/o E333 en una IgG2, tal como K326W (que reduce la actividad ADCC) y E333S, para incrementar la unión a C1q, el primer componente de la cascada complemento. Idusogie et al. (2001) *J. Immunol.* 166:2571. La introducción de S267E / H268F / S324T (sola o en cualquier combinación) en IgG1 humana aumenta la unión a C1q. Moore y co. (2010) *mAbs* 2:181. La región Fc del anticuerpo isotipo híbrido IgG1/IgG3 "113F" de Natsume et al. (2008) *Cancer Res.* 68:3863 (figura 1 en el presente documento) también confiere CDC aumentada. Véase también Michaelsen et al. (2009) *Scand. J. Immunol.* 70:553 y Redpath et al. (1998) *Immunology* 93:595.

60 Las mutaciones adicionales que pueden incrementar o disminuir la función efectora se describen en Dall'Acqua et al. (2006) *J. Immunol.* 177:1129. Véase también Carter (2006) *Nat. Rev. Immunol.* 6:343; Presta (2008) *Curr. Op. Immunol.* 20:460.

65 También se pueden usar variantes de Fc que aumentan la afinidad para el receptor inhibitor Fc $\gamma$ RIIb, por ejemplo, para aumentar la actividad inductor de apoptosis o adyuvante. Li & Ravetch (2011) *Science* 333:1030; Li & Ravetch (2012) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 109:10966; la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2014/0010812. Tales variantes pueden proporcionar un anticuerpo con actividades inmunomoduladoras relacionadas con células Fc $\gamma$ RIIb+, incluyendo por ejemplo linfocitos B y monocitos. En una realización, las variantes

- de Fc proporcionan afinidad aumentada a FcγRIIb en relación con uno o más receptores activadores. Las modificaciones para alterar la unión a FcγRIIb incluyen una o más modificaciones en una posición seleccionada del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328, y 332, según el índice EU. Las sustituciones ilustrativas para aumentar la afinidad de FcγRIIb incluyen pero no se limitan a 234D, 234E, 234F, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y y 332E. Sustituciones ilustrativas incluyen 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W, y 328Y. Otras variantes de Fc para aumentar la unión a FcγRIIb incluyen 235Y/267E, 236D/267E, 239D/268D, 239D/267E, 267E/268D, 267E/268E, y 267E/328F. Específicamente, las variantes S267E, G236D, S239D, L328F y I332E, incluyendo la variante doble S267E + L328F, de IgG1 humana son de particular valor en aumentar específicamente la afinidad para el receptor FcγRIIb inhibitor. Chu et al. (2008) *Mol. Immunol.* 45:3926; la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2006/024298; documento WO 2012/087928. La especificidad aumentada para FcγRIIb (como se distingue de FcγRIIa<sup>R131</sup>) se puede obtener añadiendo la sustitución P238D. Mimoto et al. (2013) *Protein. Eng. Des. & Selection* 26:589; el documento WO 2012/115241.
- 15 En determinadas realizaciones, el anticuerpo se modifica para incrementar su semivida biológica. Son posibles diversas estrategias. Por ejemplo, esto se puede realizar para incrementar la afinidad de unión de la región de Fc para FcRn. En una realización, se altera el anticuerpo en la región CH1 o CL para contener un receptor de rescate de unión al epítipo tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en los documentos de patente de Estados Unidos n.º 5.869.046 y 6.121.022 por Presta et al. Otras variantes de Fc ilustrativas que incrementan la unión a FcRn y/o mejoran las propiedades farmacocinéticas incluyen las sustituciones en las posiciones 259, 308, y 434, incluyendo por ejemplo 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434H, 434F, 434Y y 434M. Otras variantes que incrementan la unión de Fc a FcRn incluyen: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton et al., 2004, *J. Biol. Chem.* 279(8): 6213-6216, Hinton et al. 2006 *Journal of Immunology* 176:346-356), 256A, 272A, 305A, 307A, 311A, 312A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields et al, *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(9):6591-6604), 252F, 252Y, 252W, 254T, 256Q, 256E, 256D, 433R, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H (Dall'Acqua et al. *Journal of Immunology*, 2002, 169:5171-5180, Dall'Acqua et al., 2006, *Journal of Biological Chemistry* 281:23514-23524), Véase el documento de Patente de Estados Unidos n.º, 8.367.805,
- 20 La modificación de determinados restos conservados en Fc de IgG (I253/H310/Q311/H433/N434), tales como la variante N434A (Yeung et al. (2009) *J. Immunol.* 182:7663), se ha propuesto como un modo de incrementar la afinidad de FcRn, incrementando así la semivida del anticuerpo en circulación. el documento WO 98/023289. Se ha demostrado que la variante de Fc de combinación que comprende M428L y N434S incrementa la unión a FcRn e incrementa la semivida en suero hasta cinco veces. Zalevsky et al. (2010) *Nat. Biotechnol.* 28:157. La variante de Fc de combinación que comprende las modificaciones T307A, E380A y N434A también se prolonga la semivida de los anticuerpos IgG1. Petkova et al. (2006) *Int. Immunol.* 18:1759. Además, también se ha demostrado que las variantes de Fc de combinación que comprenden las variantes M252Y/M428L, M428L/N434H, M428L/N434F, M428L/N434Y, M428L/N434A, M428L/N434M, y M428L/N434S prolongan la semivida. el documento WO 2009/086320.
- 30 Además, una variante de Fc de combinación que comprende M252Y, S254T y T256E, incrementa la semivida casi 4 veces. Dall'Acqua et al. (2006) *J. Biol. Chem.* 281:23514. Se ha usado una modificación de IgG1 relacionada que proporciona afinidad de FcRn incrementada pero dependencia de pH reducida (M252Y / S254T / T256E / H433K / N434F) para crear una construcción de IgG1 ("MST-HN Abdeg") para usarse como un competidor para evitar la unión de otros anticuerpos a FcRn, dando como resultado aclaramiento incrementado de ese otro anticuerpo, o bien IgG endógena (por ejemplo, en un ajuste autoinmune) u otro anticuerpo exógeno (terapéutico). Vaccaro et al. (2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1283; el documento WO 2006/130834.
- 35 Se describen otras modificaciones para incrementar la unión de FcRn en Yeung et al. (2010) *J. Immunol.* 182:7663-7671; 6.277.375; 6.821.505; documento WO 97/34631; documento WO 2002/060919,
- 50 En determinadas realizaciones, los isotipos de IgG híbridos se pueden usar para incrementar la unión de FcRn, e incrementar potencialmente la semivida. Por ejemplo, se puede construir una variante híbrida IgG1/IgG3 sustituyendo posiciones de IgG1 en la región CH2 y/o CH3 con aminoácidos de IgG3 en las posiciones donde los dos isotipos difieren. Por tanto se puede construir un anticuerpo IgG variante híbrido que comprende una o más sustituciones, por ejemplo, 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R y 436F. En otras realizaciones descritas en el presente documento, se puede construir una variante híbrida IgG1/IgG2 sustituyendo posiciones de IgG2 en la región CH2 y/o CH3 con aminoácidos de IgG1 en posiciones donde los dos isotipos difieren. Por tanto se puede construir un anticuerpo IgG variante híbrido que comprende una o más sustituciones, por ejemplo, uno o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 233E, 234L, 235L, -236G (referente a una inserción de una glicina en la posición 236) y 327A. Véase el documento de Patente de Estados Unidos n.º 8.629.113. Se ha generado un híbrido de las secuencias IgG1/IgG2/IgG4 que incrementan supuestamente la semivida en suero y mejora la expresión. El documento de patente de Estados Unidos n.º 7.867.491 (número de secuencia 18 en el presente documento).
- 60 La semivida en suero de los anticuerpos de la presente invención también se puede incrementar por pegilación. Se puede someter a pegilación un anticuerpo para, por ejemplo, incrementar la semivida biológica (por ejemplo, en el suero) del anticuerpo. Para someter a pegilación un anticuerpo, el anticuerpo o fragmento del mismo, generalmente
- 65

se hacer reaccionar con un reactivo de polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o un derivado de aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se unen al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Preferentemente, la pegilación se lleva a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero reactivo análogo soluble en agua). Como se usa en el presente documento, el término "polietilenglicol" pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tales como mono alcoxi (C1-C10) alcoxi o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En determinadas realizaciones, el anticuerpo a someter a pegilación es un anticuerpo aglicosilado. Los métodos de pegilación de proteínas son conocidos en la técnica y se pueden aplicar a los anticuerpos descritos en el presente documento. Véase, por ejemplo, el documento EP 0154316 de Nishimura et al, y el documento EP 0401384 de Ishikawa et al.

Como alternativa, bajo algunas circunstancias puede ser deseable incrementar la semivida de un anticuerpo de la presente invención, en lugar de incrementarlo. Modificaciones tales como I253A (Hornick et al. (2000) *J. Nucl. Med.* 41:355) y H435A/R I253A o H310A (Kim et al. (2000) *Eur. J. Immunol.* 29:2819) en Fc de IgG1 humana puede disminuir la unión a FcRn, disminuyendo así la semivida (incrementando el aclaramiento) para su uso en situaciones en las que se prefiere el rápido aclaramiento, tales como un realización de imagen médica. Véase también Kenanova et al. (2005) *Cancer Res.* 65:622. Otros medios para aumentar el aclaramiento incluyen el formateo de los dominios de unión a antígeno de la presente invención como fragmentos de anticuerpo que carecen de la capacidad de unión a FcRn, tal como fragmentos Fab. Tal modificación puede reducir la circulación de la semivida de un anticuerpo de un par de semanas a un asunto de horas. A continuación, se puede usar la pegilación selectiva de los fragmentos de anticuerpo para afinar (incrementar) la semivida de los fragmentos de anticuerpo si es necesario. Chapman et al. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:780. Los fragmentos de anticuerpo también se pueden fusionar a albúmina humana de suero, por ejemplo, en una construcción de proteína de fusión, para incrementar la semivida. Yeh et al. (1992) *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 89:1904. Como alternativa, se puede construir un anticuerpo biespecífico con un primer dominio de unión a antígeno de la presente invención y un segundo dominio de unión a antígeno que se une a albúmina humana de suero (HSA). Véase la Publicación de solicitud de patente Internacional WO 2009/127691 y las referencias de patente citadas en el mismo. Como alternativa, se pueden añadir secuencias polipeptídicas especializadas a fragmentos de anticuerpo para incrementar la semivida, por ejemplo, secuencias polipeptídicas "XTEN". Schellenberger et al. (2009) *Nat. Biotechnol.* 27:1186; La publicación de solicitud de patente Internacional WO 2010/091122. *Variantes de Fc adicionales*

Cuando se usa un dominio constante de IgG4, es preferible normalmente incluir la sustitución S228P, la cual imita la secuencia bisagra en IgG1 y de ese modo estabiliza las moléculas de IgG4, por ejemplo, reduciendo el intercambio Fab-brazo entre el anticuerpo terapéutico e IgG4 endógena en el paciente a tratar. Labrijn et al. (2009) *Nat. Biotechnol.* 27:767; Reddy et al. (2000) *J. Immunol.* 164:1925.

Se puede eliminar un sitio de escisión de proteasa potencial en la bisagra de las construcciones de IgG1 por las modificaciones D221G y K222S, incrementando la estabilidad del anticuerpo. el documento WO 2014/043344.

Las afinidades y las propiedades de unión de una variante de Fc para su ligando (receptores de Fc) se pueden determinar mediante diversos métodos de ensayo *in vitro* (ensayos basados en bioquímicos o inmunológicos) conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, métodos de equilibrio (por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), o radioinmunoensayo (RIA)), o cinéticas (por ejemplo, análisis SPR BIACORE®), y otros métodos tales como ensayos de unión indirecta, ensayos de inhibición competitiva, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), electroforesis y cromatografía en gel (por ejemplo, filtración en gel). Estos y otros métodos pueden utilizar un marcador o uno o más de los componentes a examinar y/o emplear varios métodos de detección que incluyen, pero sin limitación, marcadores cromogénicos, fluorescentes, luminiscentes, o isotópicos. Puede encontrarse una descripción detallada de las afinidades y cinéticas de unión en Paul, W. E., ed., "Fundamental Immunology", 4.<sup>a</sup> edición, Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), que se centra en las interacciones de anticuerpo-inmunógeno.

En otras realizaciones más, la glicosilación de un anticuerpo se modifica para incrementar o disminuir la función efectora. Por ejemplo, se puede producir un anticuerpo aglicosilado que carezca de toda la función efectora mutando el resto de asparagina conservado en la posición 297 (por ejemplo, N297A). por tanto, suprimiendo la unión de complemento y FcγRI. Bolt et al. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23:403. Véase también Tao & Morrison (1989) *J. Immunol.* 143:2595 (usando N297Q en IgG1 para eliminar la glicosilación en la posición 297).

Aunque los anticuerpos aglicosilados generalmente carecen de función efectora, se pueden introducir mutaciones para restaurar esa función. Los anticuerpos aglicosilados, por ejemplo, aquellos resultantes de mutaciones N297A/C/D/or H o producidos en los sistemas (por ejemplo, *E. coli*) que no glicosilan las proteínas, además se pueden mutar para restaurar la unión de FcγR, por ejemplo, S298G y/o T299A/G/o H (WO 2009/079242), o E382V y M428I (Jung et al. (2010) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 107:604).

Además, se puede producir un anticuerpo con ADCC mejorada alterando la glicosilación. Por ejemplo, se ha demostrado que la eliminación de la fucosa de los oligosacáridos unidos a Asn297 de la cadena pesada aumentada la ADCC, basándose en la unión mejorada a FcγRIIIa. Shields et al. (2002) *JBC* 277:26.733; Niwa et al. (2005) *J.*

*Immunol. Methods* 306: 151; Cardarelli et al. (2009) *Clin. Cancer Res.* 15:3376 (MDX-1401); Cardarelli et al. (2010) *Cancer Immunol. Immunotherap.* 59:257 (MDX-1342). Tales anticuerpos de baja fucosa se pueden producir, por ejemplo, en células de ovario de hámster chino (CHO) nuligénico que carecen de fucosiltransferasa (*FUT8*) (Yamane-Ohnuki et al. (2004) *Biotechnol. Bioeng.* 87:614), o en otras células que generan estos anticuerpos afucosilados. Véase, por ejemplo, Zhang et al. (2011) *mAbs* 3:289 y Li et al. (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:210 (describiendo ambos la producción de anticuerpo en *Pichia pastoris* glicodiseñada por ingeniería genética); Mossner et al. (2010) *Blood* 115:4393; Shields et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733; Shinkawa et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278:3466; documento EP 1176195B1. ADCC también se puede aumentar como se describe en la publicación PCT WO 03/035835, que describe el uso de una línea celular CHO variante, Lec13, con capacidad reducida para unir fucosa a los carbohidratos unidos a Asn(297), también dando como resultado la hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase también Shields, R.L. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). Como alternativa, los análogos de fucosa se pueden añadir a medio de cultivo durante la producción de anticuerpo para inhibir la incorporación de fucosa en el carbohidrato sobre el anticuerpo. el documento WO 2009/135181.

Incrementar las estructuras GlcNac bisectantes en oligosacáridos unidos a anticuerpo también aumenta la ADCC. El documento de publicación PCT WO 99/54342 concedida a Umana et al. describe líneas celulares diseñadas por ingeniería genética para expresar glucosiltransferasas modificadoras de glucoproteínas (por ejemplo beta(1,4)-N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), de manera que dichos anticuerpos expresados en las líneas celulares diseñadas por ingeniería genética presentan estructuras GlcNac bisectadas aumentadas que dan como resultado una actividad de ADCC aumentada de los anticuerpos (véase también Umana et al., 1999 *Nat. Biotech.* 17:176-180).

Se han desarrollado variantes de glicosilación adicionales que están desprovistas de restos de galactosa, ácido siálico, fucosa y xilosa (denominados glicomformas GNGN), que presentan ADCC y ADCP aumentadas pero CDC disminuida, así como otras que están desprovistas de ácido siálico, fucosa y xilosa (denominadas glicofomas G1/G2), que presentan ADCC, ADCP y CDC aumentadas. la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2013/0149300. Los anticuerpos que tienen estos patrones de glicosilación opcionalmente se producen en plantas de *N. benthamiana* genéticamente modificadas en las que se han desactivado los genes de la xiloxil y fucosil tranfesasa endógenas.

El glicodiseño por ingeniería genética también se puede usar para modificar las propiedades antiinflamatorias de una construcción de IgG cambiando el contenido de  $\alpha$ 2,6 sialilo de las cadenas de carbohidrato unidas a Asn297 de las regiones Fc, en la que una proporción de formas  $\alpha$ 2,6 sialidadas da como resultado efectos antiinflamatorios aumentados. Véase Nimmerjahn et al. (2008) *Ann. Rev. Immunol.* 26:513. Por el contrario, la reducción en la producción de anticuerpos que tienen carbohidratos  $\alpha$ 2,6 sialidados puede ser útil en casos en los que no se quieren las propiedades antiinflamatorias. Los métodos de modificación del contenido de  $\alpha$ 2,6 sialilación de anticuerpos, por ejemplo, mediante purificación selectiva de formas  $\alpha$ 2,6 sialidadas o mediante modificación enzimática, se proporcionan en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2008/0206246. En otras realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la región Fc se puede modificar para imitar el efecto de  $\alpha$ 2,6 sialilación, por ejemplo, mediante inclusión de una modificación F241A. el documento WO 2013/095966.

#### VIII. Propiedades físicas del anticuerpo

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden contener uno o más sitios de glicosilación en la región variable de la cadena ligera o la pesada. Tales sitios de glicosilación pueden dar como resultado la inmunogenicidad incrementada del anticuerpo o una alteración de pK del anticuerpo debido a la unión a antígeno alterada Marshall et al. (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala and Morrison (2004) *J. Immunol* 172:5489-94; Wallick et al (1988) *J. Exp. Med.* 168:1.099-109; Spiro (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh et al 1985) *Nature* 316:452-7; Mimura et al. (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). Se ha sabido que la glicosilación ocurre en motivos que contienen una secuencia N-X-S/T. En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-CD73 que no contenga glicosilación de la región variable. Esto se puede conseguir o bien seleccionando anticuerpos que no contienen el motivo de glicosilación en la región variable o mutando los restos en la región de glicosilación.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento no contienen sitios de isomerismo de asparagina. La desaminación de la asparagina puede ocurrir en secuencias N-G o D-G y pueden dar como resultado la creación de un resto de ácido isoaspártico que puede introducir un pliegue en la cadena polipeptídica y puede disminuir su estabilidad (efecto de ácido isoaspártico). Por ejemplo, si la secuencia de aminoácidos Asp-Gly está presente en las secuencias de CDR de la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo, la secuencia se sustituye con una secuencia de aminoácidos que no se somete a isomerización. En una realización descrita en el presente documento, el anticuerpo comprende la secuencia de CDR2 de la región variable de la cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 6, pero en el que Asp o Gly en la secuencia de Asp-Gly (VILYDGSNKYYPPDSVKG; SEQ ID NO: 6 están reemplazados por la secuencia de aminoácidos que no se somete a isomerización, por ejemplo, una secuencia Asp-Ser o una Ser-Gly.

Cada anticuerpo tendrá un punto isoeléctrico único (pI), que generalmente cae en el intervalo de pH entre 6 y 9,5. El pI de un anticuerpo IgG1 generalmente cae dentro del intervalo de pH de 7-9,5 y el pI para un anticuerpo IgG4 generalmente cae en el intervalo de pH 6-8. Se especula que los anticuerpos con un pI fuera del intervalo normal

puede tener algún desdoblamiento e inestabilidad bajo condiciones *in vivo*. Por tanto, se prefiere tener un anticuerpo anti-CD73 que contenga un valor de  $pI$  que caiga en el intervalo normal. Esto se puede conseguir o bien seleccionando anticuerpos con un  $pI$  en el intervalo normal o mutando restos de superficie cargados.

- 5 Cada anticuerpo tendrá una temperatura de fusión característica, con una temperatura de fusión mayor indicando mayor estabilidad general *in vivo* (Krishnamurthy R and Manning M C (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). Generalmente, se prefiere que la  $T_{M1}$  (la temperatura de desplegamiento inicial) sea mayor que 60 °C, preferentemente mayor que 65 °C, incluso preferentemente mayor que 70 °C. El punto de fusión de un anticuerpo se puede medir usando calorimetría de barrido diferencial (Chen et al (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando et al (1999) *Immunol Lett* 68:47-52) o dicroísmo circular (Murray et al (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9). En una  
10 realización preferida, se seleccionan anticuerpos que no se degraden rápidamente. La degradación de un anticuerpo se puede medir usando electroforesis capilar (CE) y MALDI-MS (Alexander A J and Hughes D E (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).
- 15 En otra realización preferida, se seleccionan anticuerpos que tienen efectos de agregación mínima, lo cual puede conducir al desencadenamiento de una respuesta inmunitaria indeseada y/o propiedades farmacocinéticas alteradas o desfavorables. Generalmente, los anticuerpos son aceptables con una agregación del 25 % o menos, preferentemente 20 % o menos, incluso más preferentemente 15 % o menos, incluso más preferentemente 10 % o menos e incluso más preferentemente 5 % o menos. La agregación se puede medir mediante varias técnicas, incluyendo la columna de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y la dispersión de luz.  
20

#### IX. Métodos de diseño por ingeniería genética de anticuerpos

- 25 Como se ha tratado anteriormente, los anticuerpos anti-CD73 que tienen las secuencias  $V_H$  y  $V_L$  descritas en el presente documento se pueden usar para crear nuevos anticuerpos anti-CD73 modificando las secuencias  $V_H$  y/o  $V_L$ , o la(s) región(es) constante(s) unidas a las mismas. Por tanto, en otro aspecto descrito en el presente documento, las características estructurales de un anticuerpo anti-CD73 descrito en el presente documento, por ejemplo, CD73.4, 11F11, 4C3, 4D4, 10D2, 11A6, 24H2, 5F8, 6E11 y/o 7A11, se usan para crear anticuerpos anti-  
30 CD73 estructuralmente relacionados para conservar al menos una propiedad funcional de los anticuerpos descritos en el presente documento, tal como la unión a CD73 humana y CD73 de cynomolgus. Por ejemplo, una o más regiones CDR de 11F11, 4C3, 4D4, 10D2, 11A6, 24H2, 5F8, 6E11 y/o 7A11, o mutaciones de las mismas, se pueden combinar recombinantemente con regiones marco conocidas y/o otras CDR para crear anticuerpos anti-CD73 adicionales, recombinantemente diseñados por ingeniería genética, descritos en el presente documento, tal como se ha tratado anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen aquellas descritas en la sección anterior. El material de partida para el método de diseño por ingeniería genética es una o más secuencias de  $V_H$  y/o  $V_L$  proporcionadas en el presente documento, o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo diseñado por ingeniería genética, no es necesario realmente preparar (es decir, expresar como una proteína) un anticuerpo que tiene una o más secuencias de la  $V_H$  y/o  $V_L$  proporcionadas en el presente documento, o una o más regiones CDR de las mismas. En cambio, la información contenida en la(s) secuencia(s) se usa como el material de partida para crear una(s) secuencia(s) de "segunda generación" de la(s) secuencia(s) original(es) y, a continuación, se prepara(n) la(s) secuencia(s) de "segunda generación" y se expresa(n) como una proteína.  
40

Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan métodos para preparar anticuerpo anti-CD73 que comprende:  
45

- (a) proporcionar: (i) una secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 5, 17, 33, 41, 53, 61, 69, 81, y 89, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, 18, 34, 42, 54, 62, 70, 82, y 90, y/o secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 7, 19, 35, 43, 55, 63, 71, 83, y 91; y (ii) una secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9, 13, 21, 25, 29, 37, 45, 49, 57, 65, 73, 77, 85, y 93, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 14, 22, 26, 30, 38, 46, 50, 58, 66, 74, 78, 86, y 94, y/o secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 11, 15, 23, 27, 31, 39, 47, 51, 59, 67, 75, 79, 87, y 95;  
50  
55 (b) alterar al menos un resto de aminoácidos en la secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena pesada y/o la secuencia de anticuerpo de la región variable de la cadena ligera para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterada; y  
(c) expresar la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.  
60

Las técnicas de biología molecular convencionales se pueden usar para preparar y expresar la secuencia de anticuerpo alterada.

- Preferentemente, el anticuerpo codificado por la(s) secuencia(s) de anticuerpo alterada(s) es una que conserva una, alguna o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento, que incluye aquellas enumeradas en la Tabla 3.  
65

El anticuerpo alterado puede presentar una o más, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, diez, o todas las propiedades funcionales usando los ensayos funcionales descritos en el presente documento. Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados se pueden valorar usando ensayos convencionales disponibles en la técnica y/o descritos en el presente documento, tal como aquellos expuestos en los Ejemplos (por ejemplo, ELISAs, FACS).

En determinadas realizaciones de los métodos de diseño por ingeniería genética de anticuerpos descritos en el presente documento, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente o selectivamente a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante del anticuerpo anti-CD73 y los anticuerpos anti-CD73 modificados resultantes se pueden seleccionar en función de su actividad de unión y/o otras propiedades funcionales como se describen en el presente documento. En la técnica se han descrito métodos multifuncionales. Por ejemplo, el documento de publicación PCT WO 02/092780 de Short describe métodos para creación y cribado de mutaciones de anticuerpo usando mutagénesis de saturación, ensamblaje de ligamiento sintético, o una combinación de los mismo. Como alternativa, el documento de publicación PCT WO 03/074679 de Lazar et al. describe métodos de uso de métodos de cribado por ordenador para optimizar propiedades fisicoquímicas de anticuerpos.

#### X. Moléculas de ácido nucleico

Otro aspecto descrito en el presente documento pertenece a moléculas de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos descritos en el presente documento. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aisla" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos celulares (por ejemplo, otro ADN cromosómico, por ejemplo, el ADN cromosómico que se une al ADN aislado en la naturaleza) o proteínas, mediante técnicas convencionales, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, bandeado de CsCl, cromatografía en columna, enzimas de restricción, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica. Véase, F. Ausubel, et al., ed. (1987) "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico descrito en el presente documento puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede o no puede contener secuencias intrónicas. En una determinada realización, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento se pueden obtener usando técnicas de biología molecular convencionales. Para los anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que portan genes de inmunoglobulina humana como se describen adicionalmente más adelante), Los ADNc que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo producido por el hibridoma se pueden obtener mediante amplificación por PCR convencional o técnicas de clonación de ADNc. Para anticuerpos obtenidos de una genoteca de inmunoglobulina (por ejemplo, usando técnicas de expresión en fago), se puede recuperar el ácido nucleico que codifica el anticuerpo de la genoteca.

Las moléculas de ácidos nucleicos preferidas descritas en el presente documento son aquellas que codifican las secuencias de VH y VL de los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento, por ejemplo, anticuerpos monoclonales CD73.4 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11, 7A11, CD73.3 y/o CD73.4. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias de VH de CD73.4 (CD73.4-1 y CD73.4-2) 11F11 (11F11-1 y 11F11-2), 4C3 (4C3-1, 4C3-2 y 4C3-3), 4D4, 10D2 (10D2-1 y 10D2-2), 11A6, 24H2, 5F8 (5F8-1 y 5F8-2), 6E11, 7A11, CD73.3 y CD73.4 se exponen en las SEQ ID NO: 4, 16, 32, 40, 52, 60, 68, 80, 88, 135, y 170, respectivamente. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias de VL de 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 7A11, CD73.3 y/o CD73.4 se exponen en las SEQ ID NO: 8, 12, 20, 24, 28, 36, 44, 48, 56, 64, 72, 76, 84, y 92, respectivamente.

Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos VH y VL, estos fragmentos de ADN se pueden manipular además mediante técnicas de ADN recombinante convencionales, por ejemplo, para convertir genes de la región variable en genes de la cadena del anticuerpo de longitud completa, en genes del fragmento Fab o en un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN codificante de VL o VH se une operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. La expresión "unido operativamente", como se usa en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN se juntan de manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el marco de lectura.

El ADN aislado que codifica la región de VH se puede convertir en un gen de la cadena pesada de longitud completa uniendo operativamente el ADN codificante de VH a otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de la cadena pesada (bisagra, CH1, CH2 y/o CH3). Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, El documento de publicación NIH N.º 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación por PCR convencional. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, por ejemplo, una región de IgG1. Para un gen de la cadena pesada de

fragmento Fab, El ADN codificante de VH se puede unir operativamente a otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante de CH1 de la cadena pesada.

5 El ADN aislado que codifica la región VL se puede convertir en un gen de la cadena ligera de longitud completa (así como un gen de la cadena ligera de Fab) uniendo operativamente el ADN codificante de VL a otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena ligera son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, El documento de publicación NIH N.º 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante  
10 amplificación por PCR convencional. La región constante de la cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

15 Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN codificantes de VH y VL se unen operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>, de manera que las secuencias VH y VL puedan expresarse como una proteína monocatenaria contigua, con las regiones VL y VH juntas por el enlazador flexible (véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85:5.879-5.883); McCafferty et al., (1990) *Nature* 348:552-554).

20 En el presente documento también se describe moléculas de ácidos nucleicos que codifican secuencias VH y VL o las cadenas pesadas y ligeras de longitud completa que son homólogas a aquellas de los anticuerpos descritos en el presente documento, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11, 7A11, CD73.3 y/o CD73.4. Las moléculas de ácidos nucleicos ilustrativas codifican las secuencias VH y VL que son al menos 70 %, por ejemplo, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o al menos un 99 % idénticas, a las moléculas de ácidos nucleicos que codifican las secuencias VH y VL o las cadenas pesadas y ligeras de longitud completa de los anticuerpos monoclonales 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 7A11, CD73.3 y/o CD73.4, por ejemplo, las secuencias expuestas en la Tabla 35. Por ejemplo, en el presente documento se proporcionan anticuerpos anti-CD73 que comprenden una cadena VH y una cadena VL que se codifican por secuencias de nucleótidos que son al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticas a SEQ ID NO: 139 y SEQ ID NO: 140 o 141; SEQ ID NO: 237 y SEQ ID NO: 140 o 141; SEQ ID NO: 142 y SEQ ID NO: 143, 144 o 145; SEQ ID NO: 146 y SEQ ID NO: 147; SEQ ID NO: 148 y SEQ ID NO: 149 o 150; SEQ ID NO: 151 y SEQ ID NO: 152; SEQ ID NO: 153 y SEQ ID NO: 154; SEQ ID NO: 155 y SEQ ID NO: 156 o 157 o 242; SEQ ID NO: 158 y SEQ ID NO: 159; SEQ ID NO: 160 y SEQ ID NO: 161. En el presente documento también se proporcionan anticuerpos anti-CD73 que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera que se codifican por secuencias nucleótidas que son al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con las SEQ ID NO: 134, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 243, 266 (cadena pesada) y SEQ ID NO: 244 o 245 (cadena ligera); SEQ ID NO: 211, 212, 213 o 246 y SEQ ID NO: 247, 248 o 249; SEQ ID NO: 235, 236 o 250 y 251; SEQ ID NO: 252 y SEQ ID NO: 253 o 254; SEQ ID NO: 255 y SEQ ID NO: 256; SEQ ID NO: 257 y SEQ ID NO: 258; SEQ ID NO: 259 y SEQ ID NO: 260 o 261; SEQ ID NO: 262 y SEQ ID NO: 263; SEQ ID NO: 264 y SEQ ID NO: 265. En el presente documento también se proporcionan moléculas de ácidos nucleicos con mutaciones silenciosas (es decir, cambios de bases que no alteran la secuencia de aminoácidos resultante tras la traducción de la molécula de ácido nucleico), por ejemplo, para optimización de codones.

#### 45 XI. Generación de anticuerpo

Se pueden producir diversos anticuerpos de la presente invención usando diversas técnicas conocidas, tales como la técnica de hibridación de célula somática convencional descrita por Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Aunque se prefieren procedimientos de hibridación de célula somática, en principio, también se pueden emplear  
50 otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B, técnica de expresión in fago usando genotecas de genes de anticuerpo humano.

El sistema animal preferido para preparar los hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridoma en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Se conocen en la técnica protocolos de inmunización y técnicas  
55 para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión. También se conocen compañeros de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión.

Los anticuerpos quiméricos o humanizados descritos en el presente documento se pueden preparar basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se ha descrito anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de la cadena pesada y ligera se puede obtener del hibridoma murino de interés y se puede diseñar por ingeniería genética para contener secuencias de inmunoglobulina no murina (por ejemplo, humana) usando técnicas de biología molecular convencionales. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas se pueden unir a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567 de Cabilly et al.). Para crear un anticuerpo humano, las regiones CDR murinas se pueden insertar en una región marco humana usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.225.539 de Winter, y

el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al.).

En una realización, los anticuerpos descritos en el presente documento son anticuerpos monoclonales humanos. Tales anticuerpos monoclonales humanos dirigidos frente a CD73 se pueden generar usando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones referidos en el presente documento como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y colectivamente se refieren en el presente documento como "ratones Ig humanos".

El HuMAb mouse® (Medarex, Inc.) contiene miniloci de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de la cadena pesada ( $\mu$  y  $\gamma$ ) y ligera k desorganizadas, junto con mutaciones dirigidas que activan los loci de la cadena  $\mu$  y k endógena (véase, por ejemplo, Lonberg, et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones presentan expresión de ratones IgM o k, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de la cadena pesada y ligera humanos introducidos se someten a intercambio de clase y mutación somática para generar monoclonal humano de IgGk de alta afinidad (Lonberg, N. et al. (1994), *supra*; revisado en Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, y Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). La preparación y el uso de ratones HuMAb, y las modificaciones genómicas portadas por tales ratones, se describe además en Taylor, L. et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaille et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi et al. (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaille et al. (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, J. et al. (1994) *International Immunology* 6: 579-591; y Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851. Véase, además, El documento de patente de Estados Unidos n.º 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todos de Lonberg y Kay; El documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.545.807 de Surani et al.; Los documentos de publicación PCT n.º WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todos de Lonberg y Kay; y el documento de publicación PCT N.º WO 01/14424 de Korman et al.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento se cultivan usando un ratón que porta secuencias de inmunoglobulina humana sobre transgenes y transcromosomas, tales como un ratón que porta un transgen de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana. Tales ratones, referidos en el presente documento como "ratones KM", se describen en detalle en el documento de publicación PCT WO 02/43478 de Ishida et al.

Más aún, los sistemas animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se pueden usar para cultivar los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento. Por ejemplo, se puede usar un sistema transgénico alternativo referido como el Xenorotón (Abgenix Inc.); tales ratones se describen en, por ejemplo, el documento de patente de Estados Unidos n.º 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 de Kucherlapati et al.

Además, los sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se pueden usar para cultivar los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento. Por ejemplo, se pueden usar ratones que portan tanto un transcromosoma de la cadena pesada humano y un transcromosoma de la cadena ligera humano, referido como "ratones TC"; tales ratones se describen en Tomizuka et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Además, se han descrito en la técnica vacas que portan transcromosomas de la cadena pesada y ligera humanos (Kuroiwa et al. (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894) y se pueden usar para cultivar los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento.

Los sistemas de ratón adicionales descritos en la técnica para cultivar anticuerpos humanos, por ejemplo, anticuerpos anti-CD73 humanos, incluyen (i) el ratón VelocImmune® (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), en el que las regiones variables endógenas de la cadena pesada y ligera de ratón se han reemplazado, mediante recombinación homóloga, por regiones variables humanas de la cadena pesada y ligera, uniendo operativamente las regiones endógenas constantes de ratón, de manera que los ratones quiméricos (V humano/ C de ratón) se cultivan en los ratones, y a continuación se convierten posteriormente en anticuerpos completamente humanos usando las técnicas de ADN recombinantes convencionales; y (iii) el ratón MeMo® (Merus Biopharmaceuticals, Inc.), en el que el ratón contiene regiones variables desorganizadas de la cadena pesada y ligera pero una región variable de la cadena ligera común humana reorganizada. Tales ratones, y su uso para cultivar los anticuerpos, se describen en, por ejemplo, WO 2009/15777, US 2010/0069614, WO 2011/072204, WO 2011/097603, WO 2011/163311, WO 2011/163314, WO 2012/148873, US 2012/0070861 y US 2012/0073004.

Los anticuerpos monoclonales humanos descritos en el presente documento se pueden preparar usando métodos de expresión en fago para el cribado de genotecas de genes de inmunoglobulina humana. Tales métodos de expresión en fago para aislar los anticuerpos humanos están establecidos en la técnica. Véase, por ejemplo: el documento de patente de Estados Unidos n.º 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 de Ladner et al.; los documentos de patente de Estados Unidos n.º 5.427.908 y 5.580.717 de Dower et al.; los documentos de patente de Estados Unidos n.º 5.969.108 y 6.172.197 de McCafferty et al.; y los documentos de patente de Estados Unidos n.º 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 de Griffiths et al.

Los anticuerpos monoclonales humanos descritos en el presente documento también se pueden preparar usando ratones SCID en los que las células inmunitarias humanas se han reconstituido de manera que se puede generar una respuesta de anticuerpo humano tras la inmunización. Tales ratones se describen en, por ejemplo, los documentos de patente de Estados Unidos n.º 5.476.996 y 5.698.767 de Wilson et al.

### *Inmunizaciones*

Para generar anticuerpos a CD73 humanas completas, se pueden inmunizar ratones transgénicos o transcromosómicos que contienen genes de inmunoglobulina humana (por ejemplo, HCo12, HCo7 o KM) se pueden inmunizar con una preparación purificada o enriquecida del antígeno CD73 y/o células que expresan CD73, como se describe para otros antígenos, por ejemplo, por Lonberg, et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 y el documento WO 98/24884. Como alternativa, los ratones se pueden inmunizar con ADN que codifica CD73 humana. Preferentemente, los ratones serán de 6-16 semanas de vida tras la primer infusión. Por ejemplo, se puede usar una preparación purificada o enriquecida (5-50 µg) del antígeno CD73 recombinante para inmunizar los ratones HuMab intraperitonealmente. En el suceso de que las inmunizaciones que usan una preparación purificada o enriquecida del antígeno CD73 no da como resultado anticuerpos, los ratones también se pueden inmunizar con células que expresen CD73, por ejemplo, una línea celular, para promover respuestas inmunitarias. Líneas celulares ilustrativas incluyen CHO estables que sobreexpresan CD73 y líneas celulares Raji.

Las experiencia acumulativa con diversos antígenos ha demostrado que la respuesta de los ratones transgénicos HuAmb es la mejor cuando inicialmente se inmunizan intraperitonealmente (IP) o subcutáneamente (SC) con antígeno en adyuvante de Ribí, seguido de inmunizaciones IP/SC cada dos semanas (hasta un total de 10) con antígeno en adyuvante Ribí. Se puede hacer un seguimiento de la respuesta inmunitaria durante el transcurso del protocolo de inmunización con muestras de plasma que se obtienen por sangrados retroorbitales. El plasma se puede someter a cribado por ELISA y FACS (como se describe más adelante), y se pueden usar para las fusiones ratones con suficiente titulación de inmunoglobulina humana anti-CD73. Los ratones se pueden estimular intravenosamente con antígeno 3 días antes de sacrificio y la extirpación del bazo y los nódulos linfáticos. Se espera que pueda ser necesario realizar 2-3 fusiones para cada inmunización. Entre 6 y 24 ratones generalmente se inmunizan para cada antígeno. Normalmente, HCo7, HCo12 y KM. Además, tanto el transgen HCo7 como HCo12 se pueden criar juntos en un único ratón teniendo dos transgenes humanos diferentes de cadena pesada (HCo7/HCo12).

### *Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales a CD73*

Para generar los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos descritos en el presente documento, se pueden aislar esplenocitos y/o células del nodo linfático de ratones inmunizados y fusionar a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes se pueden seleccionar en función de la producción de anticuerpos específicos a antígeno. Por ejemplo, se pueden fusionar suspensiones de célula única de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados a células de mieloma de ratón no secretadoras de Sp2/0 (ATCC, CRL 1581) con PEG al 50 %. Las células se colocan a aproximadamente  $2 \times 10^5$  en placa de microtitulación de fondo plano, seguido de dos semanas de incubación en medio selectivo que contiene 10 % de suero de clon fetal, 18 % de medios condicionados "653", 5 % de origen (IGEN), L-glutamina 4 mM, piruvato sódico 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina, 50 mg/ml de gentamicina y IX HAT (Sigma). Después de aproximadamente dos semanas, las células se pueden cultivar en medio en el que HAT está reemplazado por HT. Los pocillos individuales a continuación se pueden someter a cribado mediante ELISA para anticuerpos IgM e IgG monoclonales humanos. Una vez que se da el crecimiento de hibridoma extenso, se pueden observar el medio normalmente después de 10-14 días. Los hibridomas secretadores de anticuerpo se pueden reemplazar, someter a cribado de nuevo, y si aún es positivo para IgG, los anticuerpos monoclonales se pueden subclonar al menos dos veces mediante dilución limitante. A continuación, se pueden cultivar los subclones estables *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo de tejido para la caracterización.

Para purificar los anticuerpos monoclonales, se pueden cultivar hibridomas seleccionados en dos matraces giratorios de dos litros para la purificación de anticuerpo monoclonal. Los sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de la cromatografía por afinidad con proteína A-sefarosa (Pharmacia, Piscataway, N.J.). El IgG eluido se puede controlar mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución para asegurar la pureza. La solución tampón se puede intercambiar en PBS y la concentración se puede determinar por DO280 usando 1,43 de coeficiente de extinción. Los anticuerpos monoclonales se pueden poner en alícuotas a -80 °C.

## **XII. Producción de anticuerpo**

### *Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales a CD73*

Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir en un transfectoma de célula hospedadora usando, por

ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinantes y métodos de transfección génica como es bien conocido en la técnica (Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202).

5 Por ejemplo, para expresar anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, ADN que codifican cadenas ligeras y pesadas parciales o de longitud completa, se pueden obtener mediante técnicas de biología molecular convencionales (por ejemplo, amplificación por PCR o clonación de ADNc usando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés) y los ADN se pueden insertar en vectores de expresión de manera que los genes se unen operativamente a secuencias de control transcripcional y de traducción. En este contexto, la expresión "unido operativamente" pretende significar que un gen de anticuerpo se liga en un vector de manera que las secuencias de control transcripcional y de traducción dentro del vector cumplen con su función prevista de regular la transcripción y traducción del gen del gen. EL vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan para que sean compatibles con la célula huésped de expresión empleada. El gen de la cadena ligera de anticuerpo y el gen de la cadena pesada de anticuerpo se pueden insertar en el vector separado o ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se pueden insertar en el(los) vector(es) de expresión mediante métodos convencionales (por ejemplo, ligamiento de sitios de restricción complementarios en el fragmento génico y el vector, o ligamiento de extremos romos si no hay sitios de restricción). Las regiones variables de la cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden usar para crear los genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en los vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de la cadena pesada y la cadena ligera del isotipo deseado de manera que el segmento  $V_H$  se une operativamente al(a los) segmento(s)  $C_H$  dentro del vector y el segmento  $V_L$  se une operativamente al segmento  $C_L$  dentro del vector. Además, o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilita la secreción de la cadena anticuerpo de una célula hospedadora. El gen de la cadena de anticuerpo se puede clonar en el vector de tal manera que el péptido señal se une al marco de lectura al extremo amino del gen de la cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de la cadena del anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes pueden portar secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena de anticuerpo en una célula hospedadora. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o la traducción de los genes de la cadena del anticuerpo. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, pueden depender de tales factores como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en células hospedadoras de mamífero incluyen elementos víricos que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero, tales promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), Virus de Simio 40 (SV40), (por ejemplo, el promotor tardío principal (AdMLP)) y polioma. Como alternativa, se pueden usar secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de ubiquitina o promotor de  $\beta$ -globina. Más aún, los elementos reguladores compuestos de secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor SR $\alpha$ , los cuales contienen secuencias del promotor temprano SV40 y la repetición terminal larga del virus de leucemia de linfocitos T tipo 1 (Takebe, Y. et al. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

Además de los genes de la cadena de anticuerpo y de las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores de selección. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células hospedadoras en las que se ha introducido el vector (véase, por ejemplo, los documento de patente de Estados Unidos n.º 4.399.216, 4.634.665, 5.179.017, todos de Axel et al.). Por ejemplo, el gen marcador seleccionable confiere generalmente resistencia a fármacos, tal como G418, higromicina o metotrexato, a una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células hospedadoras dhfr con selección/amplificación en metotrexato) y el gen neo (para selección de G418).

Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, se someten a transfección el(los) vector(es) de expresión que codifican las cadenas pesadas y ligeras en una célula hospedadora mediante técnicas convencionales. Se pretende que las diversas formas del término "transfección" abarquen una gran variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procarionta o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos descritos en el presente documento en células hospedadoras procariontas o eucariotas, la expresión de los anticuerpos en células eucariotas, y los más preferentemente células hospedadoras de mamífero, es la más preferido debido a que tales células eucariotas, y en particular las células mamíferas, son más probables que se ensamblen que las células procariontas y secreten un anticuerpo apropiadamente plegado e inmunológicamente activo. Se ha publicado que la expresión procarionta de los genes de anticuerpo es ineficaz para la producción de altas producciones de anticuerpo activo (Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13). Los anticuerpos de la presente invención también se pueden producir en cepas glicomodificadas por ingeniería genética de la levadura *Pichia pastoris*. Li et al. (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:210.

Las células mamíferas preferidas para la expresión de los anticuerpos recombinantes descritos en el presente documento incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) (incluyendo células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, usadas con un marcador de selección de DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En particular, para su uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión del gen GS descrito en el documento WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338.841. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpo en células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferentemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células hospedadoras. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo utilizando métodos de purificación de proteínas convencionales.

Los extremos N y C de las cadenas polipeptídicas de anticuerpo de la presente invención pueden diferir de la secuencia esperada debido a las modificaciones postraduccionales observadas. Por ejemplo, los restos de lisina C-terminales con frecuencia están ausentes en las cadenas pesadas de anticuerpo. Dick et al. (2008) *Biotechnol. Bioeng.* 100:1132. Los restos de glutamina N-terminales, y restos de glutamato a un alcance menor, con frecuencia se convierten en restos de piroglutamato en tanto las cadenas pesadas como ligeras de los anticuerpos terapéuticos. Dick et al. (2007) *Biotechnol. Bioeng.* 97:544; Liu et al. (2011) *JBC* 28611211; Liu et al. (2011) *J. Biol. Chem.* 286:11211.

### XIII. Ensayos

Los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden ensayar para la unión a CD73 por, por ejemplo, ELISA convencional. En resumen, se recubren placas de microtitulación con CD73 purificada a 1-2 µg/ml en PBS y, a continuación, se bloquean con albúmina de suero bovino al 5 % en PBS. Se añaden diluciones del anticuerpo (por ejemplo, diluciones de plasma de ratones inmunizados con CD73) a cada pocillo y se incuban durante 1-2 horas a 37 °C. Las placas se lavan con PBS/Tween y, a continuación, se incuban con reactivo secundario (por ejemplo, para anticuerpos humanos, un reactivo policlonal específico a Fc anti-IgG humana de cabra) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 hora a 37 °C. Después de lavar, las placas se cultivaron con sustrato ABTS (Moss Inc, product: ABTS-1000) y se analizaron mediante un espectrofotómetro a DO 415-495. A continuación, además se investigan sueros de ratones inmunizados mediante citometría de flujo para la unión a una línea celular humana que expresa CD73 humana, pero no a una línea celular control que no expresa CD73. En resumen, la unión de anticuerpos anti-CD73 se valora mediante células CHO que expresan CD73 con el anticuerpo anti-CD73 a dilución 1:20. Las células se lavan y se detecta la unión con anticuerpo anti IgG humana marcado con PE. Los análisis de citometría de flujo se realizan usando citometría de flujo FACScan (Becton Dickinson, San José, CA). Preferentemente, los ratones que desarrollan las mayores titulaciones se usarán para las fusiones.

Se puede usar un ensayo ELISA como se ha descrito anteriormente para cribado de los anticuerpos y, por tanto, los hibridomas que producen anticuerpos que muestran reactividad positiva con el inmunogen de CD73. los hibridomas que producen anticuerpos que se unen, preferentemente con alta afinidad, a CD73 pueden entonces subclonarse y caracterizarse más. Un clon de cada hibridoma, el cual conserva la reactividad de las células parentales (mediante ELISA), entonces se pueden elegir para producir un banco celular, y para la purificación de anticuerpo.

Para purificar anticuerpos anti-CD73, se pueden cultivar hibridomas seleccionados en dos matraces giratorios de dos litros para la purificación de anticuerpo monoclonal. Los sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de la cromatografía por afinidad con proteína A-sefarosa (Pharmacia, Piscataway, NJ). El IgG eluido se puede controlar mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución para asegurar la pureza. La solución tampón se puede intercambiar en PBS y la concentración se puede determinar por DO<sub>280</sub> usando 1,43 de coeficiente de extinción. Los anticuerpos monoclonales se pueden poner en alícuotas a -80 °C.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-CD73 seleccionados se unen a epítopos únicos, cada anticuerpo se puede someter a biotinylation usando reactivos comercialmente disponibles (Pierce, Rockford, IL). El mAb biotinilado se puede detectar con una sonda marcada por estreptavidina. Los estudios de competición que usan anticuerpos monoclonales no marcados y anticuerpos monoclonales biotinilados se pueden realizar usando placas de ELISA recubiertas con CD73 como se ha descrito anteriormente.

Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, se pueden realizar ELISA de isotipo usando reactivos específicos para los anticuerpos de un isotipo particular. Por ejemplo, para determinar el isotipo de un anticuerpo monoclonal humano, se pueden recubrir pocillos de placas de microtitulación con 1 µg/ml de anti-inmunoglobulina humana durante una noche a 4 °C. Después de bloquear con BSA al 1 %, las placas se hacen reaccionar con 1 µg/ml o menos de anticuerpos monoclonales de ensayo o controles de isotipo purificado, a temperatura ambiente durante una o dos horas. A continuación, los pocillos se hacen reaccionar con sondas conjugadas a fosfatasa alcalina específicas a IgG1 humana o IgM humana. Las placas se desarrollan y se analizan como se ha descrito anteriormente.

Para ensayar la unión de los anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan CD73, se puede usar citometría de flujo, como se describe en los Ejemplos. En resumen, las líneas celulares que expresan CD73 unida a membrana (cultivo bajo condiciones de crecimiento convencionales) se mezclan con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en PBS que contenía BSA al 0,1 % a 4 °C durante 1 hora. Después del lavado, las células se hacen reaccionar con anticuerpo anti-IgG marcado con Fluoresceína bajo las mismas condiciones que la tinción de anticuerpo primaria. Las muestras se pueden analizar por instrumento FACScan usando propiedades de dispersión de luz y lateral a puerto sobre célula únicas y se determina la unión de los anticuerpos marcados. Se puede usar un ensayo alternativo que usa microscopia de fluorescencia (además o en lugar de) el ensayo de citometría de flujo. Las células se pueden teñir exactamente como se ha descrito anteriormente y examinar mediante microscopia de fluorescencia. El método permite la visualización de las células individuales, pero puede tener sensibilidad disminuida dependiendo de la densidad del antígeno.

Los anticuerpos anti-CD73 además se pueden ensayar para la reactividad con el antígeno CD73 mediante transferencia Western. En resumen, los extractos de la células que expresa CD73 se pueden preparar y someter a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio. Tras la electroforesis, los antígenos separados se transferirán a membranas de nitrocelulosa, bloqueadas con suero de ratón al 20 %, y sondadas con los anticuerpos monoclonales a ensayar. La unión a IgG se puede detectar usando la fosfatasa alcalina anti-IgG y desarrollar con tabletas de sustrato BCIP/NBT. Co., St. Louis, MO).

Los métodos para analizar la afinidad de unión, la reactividad cruzada, y las cinéticas de unión de diversos anticuerpos anti-CD73 incluyen ensayos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo, análisis por resonancia de plasmón superficial BIACORE® (SPR) usando un instrumento de SPR BIACORE® 2000 (Biacore AB, Upsala, Suecia).

#### 25 **XIV. Inmunoconjugados y derivados de anticuerpo**

Los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden usar para fines diagnósticos, incluyendo el ensayo de muestras y la realización de imágenes *in vivo*, y con estos fines el anticuerpo (o el fragmento de unión del mismo) se puede conjugar a un agente detectable apropiado, para formar un inmunoconjugado. Para fines diagnósticos, los agentes apropiados son marcadores detectables que incluyen radioisótopos, para la imagen completa, y radioisótopos, enzimas, marcadores fluorescentes y otras etiquetas de anticuerpo adecuadas para el ensayo de muestra.

Los marcadores detectables pueden ser de los diversos tipos usados actualmente en el campo del diagnóstico *in vitro*, incluyendo marcadores particulados que incluyen metal tal como oro coloidal, isótopos tales como I<sup>125</sup> o Tc<sup>99</sup> presentados por ejemplo con un agente quelante peptídico del tipo N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>S o N<sub>4</sub>, cromóforos incluyendo marcadores fluorescentes, biotina, marcadores luminiscentes, marcadores fosforescentes y similares, así como marcadores enzimáticos que convierten un sustrato dado en un marcador detectable, y etiquetas de polinucleótidos que se revelan después de la amplificación tal como por reacción en cadena de la polimerasa. Entonces, un anticuerpo biotilado será detectable por unión a avidina o estreptavidina. Marcadores enzimáticos adecuados incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y similares. Por ejemplo, el marcador puede ser la enzima fosfatasa alcalina, detectada midiendo la presencia o la formación de quimioluminiscencia después de la conversión de sustratos de 1,2 dioxetano tal como adamantil methoxi fosforiloxi fenil dioxetano (AMPPD), 3-(4-(metoxispiro{1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)tricyclo{3.3.1.1 3,7}decan}-4-il) fenil fosfato de disodio (CSPD), así como CDP y CDP-star® u otros sustratos luminiscentes bien conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, los quelatos de lantanidas adecuadas tales como Terbio(III) y Europio(III). El significado de la detección se determina por el marcador elegido. La apariencia del marcador o sus productos de reacción se pueden conseguir a simple vista, en el caso en el que el marcador es particulado y se acumula a niveles apropiados, o usando instrumentos tales como un espectrofotómetro, un luminómetro, un fluorímetro, y similares, todo de acuerdo con la práctica convencional.

Preferentemente, los métodos de conjugación dan como resultado enlaces que son sustancialmente (o casi) no inmunogénicos, por ejemplo, enlaces péptidos (es decir, amida), de sulfuro, (estéricamente impedido), disulfuros, hidrazona, y éter. Estos enlaces son casi no inmunogénicos y muestran estabilidad razonable dentro del suero (véase, Senter, P.D., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13 (2009) 235-244; documento WO 2009/059278; WO 95/17886).

Dependiendo de la naturaleza bioquímica del resto y el anticuerpo, se pueden emplear diferentes estrategias de conjugación. En el caso en el que el resto es polipéptido de origen natural o recombinante de entre 50 a 500 aminoácidos, existen procedimientos convencionales en los libros de texto que describen la química para la síntesis de los conjugados proteicos, los cuales pueden ser fácilmente seguidos por los expertos (véase, por ejemplo, Hackenberger, C. P. R., and Schwarzer, D., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47 (2008) 10030-10074). En una realización se usa la reacción de un resto maleinimido con un resto de cisteína dentro del anticuerpo o el resto. Esto es una química de acoplamiento especialmente adecuada en el caso de que se use, por ejemplo, un fragmento Fab o Fab' de un anticuerpo. Alternativamente en una realización se realiza el acoplamiento al extremo C-terminal del anticuerpo o el resto. La modificación C-terminal de una proteína, por ejemplo, de un fragmentos Fab se puede realizar tal como se describe (Sunbul, M. and Yin, J., *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 3361-3371).

En general la reacción específica a sitio y el acoplamiento covalente se basa en la transformación de un aminoácido natural en un aminoácido con una reactividad que es ortogonal a la reactividad de los otros grupos funcionales presentes. Por ejemplo, una cisteína específica dentro de un contexto de secuencia raro se puede convertir enzimáticamente en un aldehído (véase Frese, M. A., and Dierks, T., *ChemBioChem*. 10 (2009) 425-427). También es posible obtener una modificación de aminoácidos deseada utilizando la reactividad enzimática específica de determinadas enzimas con un aminoácido natural en un contexto de secuencia dado (véase, por ejemplo, Taki, M. et al., *Prot. Eng. Des. Sel.* 17 (2004) 119-126; Gautier, A. et al. *Chem. Biol.* 15 (2008) 128-136. La formación catalizada por proteasa de enlaces C-N se describe en Bordusa, F., *Highlights in Bioorganic Chemistry* (2004) 389-403.

La reacción específica a sitio y el acoplamiento covalente también se puede conseguir mediante la reacción selectiva de los aminoácidos terminales con reactivos modificantes apropiados. La reactividad de una cisteína N-terminal con benzonitrilos (véase, Ren, H. et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009) 9658-9662) se puede usar para conseguir un acoplamiento covalente específico a sitio. El ligamiento químico nativo también puede depender de los restos de cisteína C-terminal ((Taylor, E. Vogel; Imperiali, B, *Nucleic Acids and Molecular Biology* (2009), 22 (*Protein Engineering*), 65-96). El documento EP 1 074 563 describe un método de conjugación que se basa en la reacción más rápida de una cisteína dentro de un tramo de aminoácidos negativamente cargados que una cisteína localizada en un tramo de aminoácidos positivamente cargados.

El resto también puede ser un péptido sintético o un mimético peptídico. En el caso de que un polipéptido se sintetice químicamente, se pueden incorporar aminoácidos con reactividad química ortogonal durante tal síntesis (véase, de Graaf, A. J. et al., *Bioconjug. Chem.* 20 (2009) 1281-1295). Puesto que se puede introducir una gran diversidad de grupos funcionales ortogonales en un péptido sintético, la conjugación de tal péptido a un enlazador es química convencional.

Para obtener un polipéptido monomarcado el conjugado con estequiometría 1:1 se puede separar mediante cromatografía de otra conjugación de productos secundarios. Este procedimiento se puede facilitar usando un miembro del par de unión marcado por colorante y un enlazador cargado. Usando este tipo de miembro del par de unión marcado y altamente negativamente cargado, los polipéptidos mono conjugados se separan fácilmente de polipéptidos no marcados y polipéptidos que portan más de un enlazador, puesto que la diferencia en carga y el peso molecular se pueden usar por separación. El colorante fluorescente puede ser útil para purificar el complejo de componentes no unidos, como un enlazador monovalente marcado.

En una realización el reto unido a un anticuerpo anti-CD73 se selecciona del grupo que consiste en un resto de unión, un resto de marcación, y un resto biológicamente activo.

Los anticuerpos descritos en el presente documento también se pueden conjugar a un agente terapéutico para formar un inmunocombinado tal como un combinado anticuerpo-fármaco (ADC). Agentes terapéuticos adecuados incluyen antimetabolitos, agentes alquilantes, aglutinantes de la ranura menor del ADN, intercaladores de ADN, reticulantes de ADN, inhibidores de la histona desacetilasa, inhibidores de exportación nuclear, inhibidores de proteosoma, inhibidores de topoisomerasa I o II, inhibidores de la proteína de choque térmico, inhibidores de tirosina quinasa, antibióticos, y agentes anti-mitóticos. En ADC, el anticuerpo y el agente terapéutico preferentemente se conjugan por un enlazador escindible tal como un enlazador de peptidilo, disulfuro o hidrazona. Más preferentemente, el enlazador es un enlazador de peptidilo tal como Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO: 219), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser, o Glu. Los ADC se pueden preparar como se describe en el documento de patente de Estados n.º 7.087.600; 6.989.452; y 7.129.261; Los documentos de publicación PCT WO 02/096910; WO 07/038658; WO 07/051081; WO 07/059404; WO 08/083312; y WO 08/103693; Los documentos de publicación de patente de Estados Unidos 20060024317; 20060004081; y 20060247295.

Otros usos para los anticuerpos anti-CD73, por ejemplo, como monoterapia, se proporcionan en otra parte en el presente documento, por ejemplo, en la sección que pertenece a los tratamientos de combinación.

Más específicamente, en un ADC, el anticuerpo se conjuga a un fármaco, funcionando el anticuerpo como un agente dirigido para dirigir el ADC a una célula diana que expresa su antígeno, tal como una célula cancerosa. Preferentemente, el antígeno es un antígeno asociado a tumor, es decir, uno que únicamente se expresa o sobreexpresa por la célula cancerosa. Una vez allí, el fármaco se libera, o bien dentro de la célula diana o en su vecindad, para actuar como un agente terapéutico. Para la revisión sobre el mecanismo de acción y el uso de ADC en terapia para el cáncer, véase Schrama et al., *Nature Rev. Drug Disc.* 2006, 5, 147.

Para el tratamiento del cáncer, el fármaco preferentemente es un fármaco citotóxico que causa muerte de la célula cancerosa dirigida. Los fármacos citotóxicos que se pueden usar en ADC incluyen los siguientes tipos de compuestos y sus análogos y derivados:

(a) enediinas tales como caliqueamicina (véase, por ejemplo, Lee et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 3464 y 3466) y uncialmacina (véase, por ejemplo, Davies et al, WO 2007/038868 A2 (2007) y Chowdari et al., US 8.709.431 B2 (2012));

(b) tubulinas (véase, por ejemplo, Domling et al., US 7.778.814 B2 (2010); Cheng et al., US 8.394.922 B2 (2013); y Cong et al., US 2014/0227295 A1;

(c) CC-1065 y duocarmicina (véase, por ejemplo, Boger, US 6.5458.530 B1 (2003); Sufi et al., US 8.461.117 B2 (2013); y Zhang et al., US 2012/0301490 A1 (2012));

(d) epotilonas (véase, por ejemplo, Vite et al., US 2007/0275904 A1 (2007) y US RE42930 E (2011));

(e) auristatinas (véase, por ejemplo, Senter et al., US 6.844.869 B2 (2005) y Doronina et al., US 7.498.298 B2 (2009));

(f) dímeros de pirrolbezodiazepina (PBD) (véase, por ejemplo, Howard et al., US 2013/0059800 A1(2013); US 2013/0028919 A1 (2013); y WO 2013/041606 A1 (2013)); y

(g) maitansinoides tales como DM1 y DM4 (véase, por ejemplo, Chari et al., US 5.208.020 (1993) y Amphlett et al., US 7.374.762 B2 (2008)).

### **XV. Moléculas específicas**

Los anticuerpos descritos en el presente documento se puede usar para formar moléculas biespecíficas. Un anticuerpo anti-CD73, o porciones de unión a antígeno del mismo, se puede derivatizar o unir a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se une a al menos dos sitios de unión diferentes o moléculas diana. El anticuerpo descrito en el presente documento de hecho se deriva o está unido a más de una otra molécula funcional para generar moléculas multiespecíficas que se unen a más de dos sitios de unión diferentes y/o moléculas diana; tales moléculas multiespecíficas también se pretende que se abarquen por la expresión "molécula biespecífica" como se usa en el presente documento. Para crear una molécula biespecífica descrita en el presente documento, un anticuerpo descrito en el presente documento puede estar funcionalmente unido (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más moléculas de unión diferentes, tal como otro anticuerpo, fragmentos de anticuerpo, péptido o mimético de unión, de manera que resulta una molécula biespecífica.

Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión para CD73 y una segunda especificidad de unión para un segundo epítipo diana. En una realización descrita en el presente documento en la que la molécula biespecífica es multiespecífica, la molécula además puede incluir una tercera especificidad de unión.

En una realización, las moléculas biespecíficas descritas en el presente documento comprenden como una especificidad de unión al menos un anticuerpo, o un fragmento anticuerpo del mismo, incluyendo, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, o un Fv de cadena sencilla. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera y cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o una construcción de cadena sencilla como se describe en Ladner et al, documento de patente de Estados Unidos N.º 4.946.778.

La unión de las moléculas biespecíficas a sus dianas específicas se pueden confirmar usando métodos reconocidos por la técnica, tales como ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), análisis FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición del crecimiento), o ensayo de transferencia Western. Cada uno de estos ensayos generalmente detectan la presencia de complejos proteína-anticuerpo de particular interés empleando un reactivo marcado (por ejemplo, anticuerpo) específico para el complejo de interés.

### **XVI. Composiciones**

Además se proporcionan composiciones, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contienen uno o una combinación de anticuerpos anti-CD73, o porción(es) de unión a antígeno de los mismos, como se describe en el presente documento, formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden incluir uno o una combinación de (por ejemplo, dos o más diferentes) anticuerpos o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas descritas en el presente documento. Por ejemplo, una composición farmacéutica descrita en el presente documento puede comprender una combinación de anticuerpos (inmunconjugados o biespecíficos) que se unen a diferentes epítopos en el antígeno diana o que tienen actividades complementarias. Las composiciones de la invención comprenden el anticuerpo de la invención y un vehículo aceptable.

En determinadas realizaciones, una composición comprende un anticuerpo anti-CD73 a una concentración de al menos 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, 1-300 mg/ml, o 100-300 mg/ml.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-CD73 descrito en el presente documento combinado con al menos otro agente anti-cáncer y/o

estimulante de linfocito T (por ejemplo, activador). Ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden usar en la terapia de combinación se describen en mayor detalle a continuación en la sección sobre usos de los anticuerpos descritos en el presente documento.

5 En algunas realizaciones, las composiciones terapéuticas descritas en el presente documento pueden incluir otros compuestos, fármacos, y/o agentes usados para el tratamiento de cáncer. Se pueden incluir tales compuestos, fármacos, y/o agentes, por ejemplo, fármacos quimioterapéuticos, fármacos de molécula pequeña o anticuerpos que estimulan la respuesta inmune a un cáncer dado. En algunos casos, las composiciones terapéuticas pueden incluir, por ejemplo, uno o más de los agentes enumerados en la sección o terapias de combinación.

10 Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo, inmunoconjugado o molécula biespecífica, se puede recubrir con un material para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y de otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

15 Los compuestos farmacéuticos descritos en el presente documento pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto parental y que no produce ningún efecto toxicológico indeseado (véase, por ejemplo, Berge, S.M., et al. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácidos incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, hidroyódico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos, tales como ácidos alifáticos monocarboxílicos y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, y similares. Las sales de adición de bases incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

20 Una composición farmacéutica descrita en el presente documento también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metal, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

25 Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

30 Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como agentes conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse mediante procedimientos de esterilización, *supra*, y mediante la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol de ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede llevar a cabo mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

35 Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones estériles inyectables o dispersiones. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en el caso de que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

40 Normalmente, las composiciones terapéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para la alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario

en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

5 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes  
10 requeridos de los 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 el secado en frío (liofilización) que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir una solución del mismo previamente esterilizada por filtración.

15 La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material vehículo para producir una sola forma de dosificación variará dependiendo del sujeto a tratar, y el modo particular de administración. La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material portador para producir una sola forma farmacéutica, en general, será la cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. Generalmente, de un cien por ciento, esta cantidad oscilará desde aproximadamente el 0,01 por ciento a aproximadamente el noventa por ciento del principio  
20 activo, preferentemente desde aproximadamente el 0,1 por ciento a aproximadamente el 70 por ciento, más preferentemente desde aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento de principio activo junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una  
25 respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar proporcionalmente la dosis según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma de dosificación unitaria usada en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones  
30 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 vehículo farmacéutico requerido. La memoria descriptiva para las formas de unidad de dosificación descritas en el presente documento está dictada por y dependiente directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se va a lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la composición de tal compuesto activo para el  
35 tratamiento de sensibilidad en individuos.

Para la administración del anticuerpo, la dosificación oscila desde aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más normalmente 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo las dosificaciones pueden ser 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de  
40 peso corporal o en el intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ilustrativo implica la administración una vez al día, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses.

En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión se administran  
45 simultáneamente, en ese caso, la dosis de cada anticuerpo administrado cae dentro de los rangos indicados. El anticuerpo normalmente se administra en ocasiones múltiples. Los intervalos entre dosis individuales pueden ser, por ejemplo, semanalmente, mensualmente, cada tres meses o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles sanguíneos de anticuerpo para el antígeno diana en el paciente. En algunos métodos, la dosis se ajusta para conseguir una concentración de anticuerpo en plasma de  
50 aproximadamente 1-1.000 µg/ml y en algunos métodos aproximadamente 25-300 µg/ml.

Un anticuerpo se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia pueden variar dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la mayor semivida, seguido de anticuerpos  
55 humanizados, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un periodo de tiempo largo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la  
60 enfermedad se reduzca o termine, y hasta que el paciente muestre una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Después de eso, al paciente se le puede administrar un régimen profiláctico.

Los niveles reales de dosificación de los principios activos en las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden variar para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para conseguir la  
65 respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particular, sin que sean tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de varios factores farmacocinéticos que

incluyen la actividad de las composiciones particulares descritas en el presente documento empleadas, o el éster, la sal o la amida del mismo, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados junto con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la afección, estado de salud general e historial médico previo del paciente a tratar, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Una "dosificación terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo anti-CD73 descrito en el presente documento preferiblemente da como resultado gravedad de síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos libres de síntomas de la enfermedad, o una prevención del empeoramiento o discapacidad debido a la enfermedad. En el contexto del cáncer, una dosis terapéuticamente eficaz preferiblemente previene además el deterioro de los síntomas físicos asociados con el cáncer. Síntomas del cáncer son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, características molares inusuales, un cambio en la apariencia de un mol, incluyendo asimetría, borde, color y/o diámetro, un área de piel recientemente pigmentada, un mol anormal, área oscurecida bajo la uña, bultos en mama, cambios de pezón, quiste en mama, dolor de mama, muerte, pérdida de peso, debilidad, fatiga excesiva, dificultad en la alimentación, pérdida de apetito, tos crónica, empeoramiento de la falta de aire, tos con sangre, sangre en orina, sangre en heces, náuseas, vómitos, metástasis de hígado, metástasis de pulmón, metástasis de hueso, plenitud abdominal, meteorismo, fluido en cavidad peritoneal, sangrado vaginal, estreñimiento, distensión abdominal, perforación de colon, peritonitis aguda (infección, fiebre, dolor), dolor, vómitos de sangre, fuerte sudoración, fiebre, tensión arterial alta, anemia, diarrea, ictericia, mareos, escalofríos, espasmos musculares, metástasis de colon, metástasis de pulmón, metástasis de vejiga, metástasis de hígado, metástasis de hueso, metástasis de riñón, y metástasis pancreática, dificultad al tragar, y similares.

Una dosis terapéuticamente eficaz puede evitar o retrasar la aparición del cáncer, tal como se puede desear cuando los signos tempranos y preliminares de la enfermedad están presentes. Los ensayos en laboratorio utilizados en el diagnóstico del cáncer incluyen compuestos químicos (incluyendo la medición de los niveles de CD73), hematología, serología y radiología. Por consiguiente, se puede usar un ensayo clínico y bioquímico que hace un seguimiento de lo anterior para determinar si un tratamiento particular es una dosis terapéuticamente eficaz para el tratamiento del cáncer. Un experto en la técnica sería capaz de determinar tales cantidades en función de factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y la composición particular de la vía de administración seleccionada.

Una composición descrita en el presente documento se puede administrar a través de una o más vías de administración utilizando uno o más de diversos métodos conocidos en la técnica. Como apreciarán lo expertos en la técnica, la vía y/o el modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Vías de administración preferidas para los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen la administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías parenterales de administración, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La expresión "administración parenteral" como se usa en el presente documento significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección e incluyen, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal e infusión.

Como alternativa, un anticuerpo descrito en el presente documento se puede administrar por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, intranasal, por vía oral, por vía vaginal, rectal, sublingualmente o tópicamente.

Los compuestos activos se pueden preparar con vehículos que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Biodegradable, se pueden usar polímeros biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliolefinas y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o se conocen generalmente por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, se puede administrar una composición terapéutica descrita en el presente documento con un dispositivo de inyección hipodérmica sin agujas, tal como los dispositivos desvelados en los documentos de Patentes de Estados Unidos N.º 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Ejemplos de implantes bien conocidos y módulos para su uso con anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento incluyen: documento de patente de Estados Unidos n.º 4.487.603, que desvela una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicamento a una tasa controlada; documento de patente de Estados Unidos n.º 4.486.194, que desvela un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; documento de patente de Estados Unidos n.º 4.447.233, que desvela una bomba de infusión de medicamento para suministrar medicamento a una tasa de infusión precisa; documento de patente de Estados Unidos n.º 4.447.224, que desvela un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármaco; documento de patente de Estados Unidos n.º 4.439.196, que desvela un sistema de administración osmótica de

fármaco que tiene compartimentos multicámara; y el documento de patente de Estados Unidos n.º 4.475.196, que desvela un sistema de administración osmótica de fármaco. Muchos otros de estos implantes, sistemas de administración y módulos son conocidos por los expertos en la materia.

- 5 En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento se pueden formular para asegurar la distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHM) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos descritos en el presente documento crucen la BBB (si se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, véase, por ejemplo, los documento de Patentes de Estados Unidos 4.522.811; 5.374.548; 10 y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más grupos que se transportan de manera selectiva en células u órganos específicos, mejorando de este modo la administración dirigida de fármaco (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Los restos dirigidos ilustrativos incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos 5.416.016 para Low et al.); manósidos (Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; 15 M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); receptor de proteína A del tensoactivo (Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); véase también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

## 20 XVII. Usos y métodos

Los anticuerpos, las composiciones de anticuerpo y los métodos descritos en el presente documento tienen numerosas aplicaciones *in vitro* e *in vivo*, por ejemplo, inhibición del crecimiento tumoral, inhibición de la metástasis tumoral, aumento de la respuesta inmunitaria por, por ejemplo, reducción de la señalización de adenosina, o 25 detección de CD73. En una realización preferida, los anticuerpos descritos en el presente documento son anticuerpos humanos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento se pueden administrar a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para inhibir la proliferación de células tumorales. Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan métodos de modificación del crecimiento tumoral en un sujeto que comprende la administración al sujeto de un anticuerpo, o 30 porción de unión a antígeno del mismo, descritos en el presente documento de manera que se reduce el crecimiento tumoral en el sujeto.

En una realización particular, los métodos son particularmente adecuados para el tratamiento del cáncer *in vivo*. Para conseguir la inhibición específica a antígeno del crecimiento tumoral, los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento se pueden administrar juntos con un antígeno de interés o el antígeno puede estar ya presente 35 en el sujeto a tratar (por ejemplo, un sujeto portador de tumor). Cuando los anticuerpos para CD73 se administran junto con otro agente, los dos se pueden administrar por separado o simultáneamente.

También se abarcan los métodos para detectar la presencia de antígeno CD73 humano en una muestra, o medir la cantidad de antígeno CD73 humano, que comprenden poner en contacto la muestra y una muestra de control, con 40 un anticuerpo monoclonal humano, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a CD73 humana, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o la porción del mismo y CD73 humana. Entonces, se detecta la formación de un complejo, en el que una formación de complejo diferente entre la muestra en comparación con la muestra control es indicativa de la presencia de antígeno CD73 humano en la muestra. Además, los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento se pueden usar para 45 purificar CD73 humana por purificación por inmutofinidad.

Además se abarcan métodos de estimulación de respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta a linfocito T específica a antígeno) en un sujeto que comprende administrar un anticuerpo anti-CD73 descrito en el presente documento al sujeto de manera que se estimula una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta de linfocito T 50 específica a antígeno) en el sujeto. En una realización preferida, el sujeto es un sujeto portador de tumor y se estimula una respuesta inmunitaria contra el tumor. Un tumor puede ser un tumor sólido o un tumor líquido, por ejemplo, una malignidad hematológica. En determinadas realizaciones, un tumor es un tumor inmunogénico. En determinadas realizaciones, un tumor es no inmunogénico.

55 Estos y otros métodos descritos en el presente documento se tratan en más detalle más adelante.

## Cáncer

La inhibición de CD73 por anticuerpos anti-CD73 puede reducir el crecimiento tumoral y la metástasis en un 60 paciente. La inhibición de CD73 por anticuerpos anti-CD73 puede también aumentar la respuesta inmune a células cancerosas en el paciente. En el presente documento se proporcionan métodos de tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer, comprendiendo la administración al sujeto de un anticuerpo anti-CD73 descrito en el presente documento, de manera que el sujeto se trata, por ejemplo, de manera que el crecimiento de los tumores cancerosos se inhiben o reducen y/o los tumores revierten. Un anticuerpo anti-CD73 se puede usar para inhibir el crecimiento de 65 tumores cancerosos. Como alternativa, un anticuerpo anti-CD73 se puede usar junto con otro agente, por ejemplo, otros agentes inmunogénicos, tratamientos del cáncer convencionales, u otros anticuerpos, como se describe a

continuación.

Por consiguiente, en el presente documento se proporcionan métodos de tratamiento del cáncer, por ejemplo, inhibiendo el crecimiento de las células tumorales, en un sujeto, comprendiendo la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD73 descrito en el presente documento o porción de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD73 humano (tal como cualquiera de los anticuerpos humanos anti-CD73 humana descritos en el presente documento). Además, o como alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-CD73 humanizado, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD73 quimérico o humanizado que comprende un anticuerpo anti-CD73 descrito en el presente documento, o una porción de unión a antígeno del mismo.

Los cánceres cuyo crecimiento puede inhibirse usando los anticuerpos de la invención incluyen cánceres sensibles a la inmunoterapia. Ejemplos no limitantes de cánceres para el tratamiento incluyen carcinoma de célula escamosa, cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de no célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña escamosa (CPNM), no NSCLC, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células claras), cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón (por ejemplo, carcinoma celular renal (RCC)), cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma de próstata refractario a hormonas), cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma (glioblastoma multiforme), cáncer de cuello uterino, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello (o carcinoma), cáncer gástrico, tumor de células germinales, sarcoma pediátrico, asenino natural senonasal, melanoma (por ejemplo, melanoma maligno metastásico, tal como melanoma maligno cutáneo o intraocular), cáncer de huesos, cáncer de piel, cáncer de útero, cáncer de la región anal, cáncer de testículo, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de la uretra, cáncer del pene, tumores sólidos de la infancia, cáncer del útero, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de linfocitos T, cánceres inducidos por el medio ambiente incluyendo aquellos inducidos por amianto, cánceres relacionados con virus (por ejemplo, tumor relacionado con el virus del papiloma humano (HPV), y malignidades derivadas de ambos de los dos linajes de célula sanguínea principales, es decir, línea celular mielóide (la cual produce granulocitos, eritrocitos, trombocitos, macrófagos y mastocitos) o línea celular mielóide (que produce linfocitos B, T, NK y células plasmáticas), tales como todos los tipos de leucemias, linfomas, y mielomas, por ejemplo, leucemias agudas, crónicas, linfocíticas y/o mielógena, tales como leucemia aguda (ALL), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (CLL), y leucemia mielógena crónica (CML), AML no diferenciada (M0), leucemia mieloblástica (M1), leucemia mieloblástica (M2; con maduración celular), leucemia promielocítica (M3 o variante de M3 [M3V]), leucemia mielomonocítica (M4 o variante de M4 con eosinofilia [M4E]), leucemia monocítica (M5), eritroleucemia (M6), leucemia megacarioblástica (M7), sarcoma granulocítico aislado y cloroma; linfomas, tal como linfoma de Hodgkin (HL), linfoma no Hodgkin (NHL), linfomas de linfocitos B, linfomas de linfocitos T, linfoma linfoplasmocitoide, linfoma de linfocito B monocitoide, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT), linfoma de célula grande anaplásico (por ejemplo, Ki 1+), linfoma/leucemia de linfocitos T adulto, linfoma de células del manto, linfoma de linfocitos T angio inmunoblásticos, linfoma angiocéntrico, linfoma intestinal de linfocitos T, linfoma mediastinal de linfocitos B primario, linfoma linfoblástico de precursores T, linfoblástico T; y linfoma/leucemia (T-Lbly/TALL), linfoma periférico de linfocitos T, linfoma linfoblástico, trastorno linfoproliferativo después del trasplante, linfoma histiocítico verdadero, linfoma primario del sistema nervioso central, linfoma de derrame primario, linfoma linfoblástico (LBL), tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, leucemia linfoblástica aguda, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma de Burkitt, linfoma folicular, linfoma histiocítico difuso (DHL), linfoma inmunoblástico de células grandes, linfoma linfoblástico B precursores, linfoma cutáneo de linfocitos T (CTLC) (también denominado fungoides o síndrome de Sezary), y linfoma linfoplasmocitoide (LPL) con macroglobulinemia de Waldenstrom; mielomas, tal como mieloma IgG, mieloma de cadena ligera, mieloma no secretor, mieloma latente (también denominado mieloma), plasmocitoma solitario, y mielomas múltiples, leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma de células pilosas; tumores hematopoyéticos de linaje mielóide, tumores de origen mesenquimatoso, incluyendo fibrosarcoma y rhabdomiocarcinoma; seminoma, teratocarcinoma, tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo astrocitoma, schwannomas; tumores de origen mesenquimatoso, incluyen fibrosarcoma, rhabdomiocarcinoma y osteosarcoma; y otros tumores, incluyendo melanoma, xeroderma pigmentoso, queratoacantoma, seminoma, cáncer folicular de tiroides y teratocarcinoma, tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, por ejemplo, tumores de linfocitos T y linfocitos B, incluyendo pero sin limitación trastornos de linfocitos T tales como leucemia prolinfocítica T (T-PLL), incluyendo la célula pequeña y el tipo de célula cerebriforme; leucemia de linfocitos granulares grandes (LGL) preferiblemente del tipo de linfocitos T; linfoma hepatosplénico a/d T-NHL; linfoma de linfocitos T periférico/posttímico (subtipos pleomórficos e inmunoblásticos); linfoma angiocéntrico (nasal) de linfocitos T; cáncer de cabeza o cuello, cáncer renal, cáncer rectal, cáncer de la glándula tiroides; linfoma mielóide agudo, así como cualquier combinación de dichos cánceres. Los métodos descritos en el presente documento también se pueden usar para el tratamiento de cánceres metastásicos, cánceres refractarios (por ejemplo, cánceres refractarios para inmunoterapia previa, por ejemplo, con un anticuerpo bloqueante CTLA-4 or PD-1 o PD-L1), y cánceres recurrentes.

Los métodos se pueden usar para el tratamiento de tumores o cánceres que son CD73 positivos, o que expresan altos niveles de CD73. Un método puede comprender determinar primero el nivel de CD73 en tumores o células tumorales, y tratar con un anticuerpo anti-CD73, por ejemplo, como se describe en el presente documento, si los tumores o células expresan CD73, por ejemplo, altos niveles de CD73.

5 Un anticuerpo anti-CD73 se puede administrar como monoterapia, o como la única terapia inmunoestimulante. Los anticuerpos para CD73, por ejemplo, los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento, también se puede combinar con un agente inmunogénico, tal como células cancerosas, antígenos tumorales purificados (incluyendo proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de carbohidratos), células y células transfectadas con genes que codifican citoquinas inmunoestimulantes (He et al. (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Los ejemplos no limitativos de vacunas tumorales que se pueden usar incluyen péptidos de antígenos de melanoma, tales como péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o tirosinasa, o células tumorales transfectadas para expresar la citoquina GM-CSF (discutido más a continuación).

15 En seres humanos, se ha demostrado que algunos tumores son inmunogénicos tales como melanomas. Al bajar el umbral de activación de los linfocitos T por la inhibición de CD73, se pueden activar las respuestas tumorales en el hospedador, permitiendo el tratamiento de tumores no inmunogénicos o aquellos que tienen inmunogenicidad limitada.

20 Un anticuerpo anti-CD73, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD73 descrito en el presente documento, se puede combinar con un protocolo de vacunación. Se han ideado muchas estrategias experimentales para la vacunación contra tumores (véase Rosenberg, S., 2000, "Development of Cancer Vaccines", ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; véase también Restifo, N. y Sznol, M., "Cancer Vaccines", C. 61, pág. 3023-3043 en DeVita et al., 1997, "Cancer: Principles and Practice of Oncology", Quinta Edición). En una de estas estrategias, se prepara una vacuna usando células tumorales autólogas o alogénicas. Se ha demostrado que estas vacunas celulares son más eficaces cuando las células tumorales se someten a transducción para expresar GM-CSF. Se ha demostrado que GM-CSF es un potente activador de la presentación de antígeno para la vacunación de tumores (Dranoff et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 3539-43).

El estudio de la expresión génica y los patrones de expresión génica a gran escala en diversos tumores ha conducido a la definición de los denominados antígenos específicos de tumores (Rosenberg, S A (1999) *Immunity* 10: 281-7). En muchos casos, estos antígenos específicos de tumor son antígenos de diferenciación expresados en los tumores y en la célula de la que se originó el tumor, por ejemplo, antígenos de melanocitos gp100, antígenos MAGE y Trp-2. Más importante aún, se puede demostrar que muchos de estos antígenos son las dianas de linfocitos T específicos a tumor encontrados en el hospedador. La inhibición de CD73 se puede usar junto con una colección de proteínas recombinantes y/o péptidos expresados en un tumor para generar una respuesta inmunitaria a estas proteínas. Estas proteínas son normalmente vistas por el sistema inmunitario como antígenos propios y por lo tanto, son tolerantes a ellos. El antígeno tumoral puede incluir la proteína telomerasa, que se requiere para la síntesis de telómeros de cromosomas y que se expresa en más del 85 % de los cánceres humanos y en solo un número limitado de tejidos somáticos (Kim, N et al. 1994) *Science* 266: 2011-2013). El antígeno tumoral también puede ser "neoantígeno" expresado en células cancerosas debido a mutaciones somáticas que alteran la secuencia de proteína o crean proteínas de fusión entre dos secuencias no relacionadas (es decir, bcr-abl en el cromosoma Filadelfia), o idiotipo de tumores de linfocitos B.

Otras vacunas de tumores pueden incluir las proteínas de virus implicados en cánceres humanos tales como virus del papiloma humano (HPV), Virus de la hepatitis (VHB y VHC) y Virus del sarcoma de herpes de Kaposi (KHSV). Otra forma de antígeno específico a tumor que se puede usar junto con la inhibición de CD73 es proteínas de choque térmico (HSP) purificadas aisladas del tejido tumoral. Estas proteínas de choque térmico contienen fragmentos de proteínas de las células tumorales y estas HSP son altamente eficientes en la administración a las células presentadoras de antígeno para provocar la inmunidad tumoral (Suot, R y Srivastava, (1995) *Science* 269:1585-1588; Tamura et al. (1997) *Science* 278:117-120).

55 Las células dendríticas (DC) son potentes células presentadoras de antígeno que pueden usarse para preparar respuestas específicas de antígeno. Las DC pueden producirse ex vivo y cargarse con diversos antígenos de proteínas y péptidos, así como con extractos de células tumorales (Nestle, F. et al. (1998) *Nature Medicine* 4: 328-332). Las DC también pueden ser sometidas a transducción por medios genéticos para expresar también estos antígenos tumorales. Las DC también se han fusionado directamente a células tumorales con el fin de inmunización (Kugler, A. et al. (2000) *Nature Medicine* 6:332-336). Como método de vacunación, La inmunización con DC puede combinarse eficazmente con la inhibición de CD73 para activar respuestas antitumorales más potentes.

65 La inhibición de CD73 también se puede combinar con tratamientos del cáncer convencionales (por ejemplo, cirugía, radiación y quimioterapia). La inhibición de CD73 se puede combinar eficazmente con regímenes quimioterapéuticos. En estos casos, puede ser posible reducir la dosis de reactivo quimioterapéutico administrado (Mokyr, et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301 -5304). Un ejemplo de tal combinación es un anticuerpo anti-CD73

junto con la descarbazina para el tratamiento del melanoma. Otro ejemplo de tal combinación es un anticuerpo anti-CD73 junto con interleuquina-2 (IL-2) para el tratamiento del melanoma. El fundamento científico detrás del uso combinado de inhibición de CD73 y quimioterapia es que la muerte celular, que es una consecuencia de la acción citotóxica de la mayoría de los compuestos quimioterapéuticos, debería dar lugar a niveles incrementados de antígeno tumoral en la ruta de presentación del antígeno. Otras terapias combinadas que pueden dar como resultado una sinergia con la inhibición de CD73 a través de la muerte celular son la radiación, cirugía y privación de hormonas. Cada uno de estos protocolos crea una fuente de antígeno tumoral en el hospedador. Los inhibidores de angiogénesis también se pueden combinar con la inhibición de CD73. La inhibición de la angiogénesis conduce a la muerte de células tumorales que pueden alimentar el antígeno tumoral en las rutas de presentación del antígeno hospedador.

Otro ejemplo más de tal combinación es un anticuerpo anti-CD73 junto con un anti-CD39, anti-A2AR o inhibidor químico, o anticuerpo antiA2BR o inhibidor químico. El fundamento científico tras el uso combinado de la inhibición de CD73 y la inhibición de CD39, A2AR o A2BR es que estas proteínas también están ligadas a la función biológica de CD73 y la señalización. Específicamente, CD39 cataliza la conversión de ATP o ADP a AMP, proporcionando así el sustrato (AMP) para la actividad enzimática de CD73 (es decir, la conversión de AMP en adenosina). Además, la adenosina es un ligando para cuatro receptores conocidos, incluyendo AIR, A2AR, A2BR y A3. Se ha demostrado que A2AR y A2BR regulan la proliferación de célula tumoral, el crecimiento, la migración y la metástasis, así como la activación de linfocito T en el ambiente tumoral a través de señalización de cAMP.

Los anticuerpos anti-CD73, descritos en el presente documento pueden usarse junto con anticuerpos biespecíficos que dirigen las células efectoras que expresan el receptor Fc $\alpha$  o Fc $\gamma$  a las células tumorales (véase, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos N.º 5.922.845 y 5.837.243). Se pueden usar anticuerpos biespecíficos para dirigir dos antígenos separados. Por ejemplo, se han usado anticuerpos biespecíficos receptor anti-Fc/antígeno anti-tumoral (por ejemplo, Her-2/neu) para dirigir macrófagos a sitios de tumor. Este direccionamiento puede activar más eficazmente las respuestas tumorales específicas. Como alternativa, el antígeno se puede administrar directamente a las DC mediante el uso de anticuerpos biespecíficos que se unen al antígeno tumoral y un marcador de superficie celular específico a células dendríticas.

Los tumores evaden la vigilancia inmunitaria del hospedador por una gran diversidad de mecanismos. Muchos de estos mecanismos pueden ser superados por la inactivación de proteínas que son expresadas por los tumores y que son inmunosupresoras. Estos incluyen entre otros TGF- $\beta$  (Kehrl et al. (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200), y ligando Fas (Hahne et al. (1996) *Science* 274: 1363-1365). Los anticuerpos para cada una de estas entidades se pueden usar junto con anticuerpos anti-CD73 para contrarrestar los efectos del agente inmunosupresor y favorecer las respuestas inmunitarias tumorales por parte del hospedador.

Otros anticuerpos que activan la capacidad de respuesta inmunitaria del hospedador junto con anticuerpos anti-CD73. Estos incluyen moléculas en la superficie de las células dendríticas que activan la función DC y la presentación del antígeno. Los anticuerpos anti-CD40 son capaces de sustituir eficazmente la actividad del auxiliar del linfocito T (Ridge et al. (1998) *Nature* 393: 474-478) y se pueden usar junto con anticuerpos anti-CD73. Los anticuerpos activadores para moléculas coestimuladoras del linfocito T tal como OX-40 (Weinberg et al. (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero, I. et al. (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997) e ICOS (Hutloff, A. et al. (1999) *Nature* 397: 262-266) también pueden proporcionar niveles incrementados de la activación de linfocitos T. Los inhibidores de PD1, PD-L1 o CTLA-4 (e.g., documento de patente de Estados Unidos.N 5.811.097), también se pueden usar junto con un anticuerpo anti-CD73.

Otros métodos descritos en el presente documento se usan para tratar pacientes que han estado expuestos a toxinas o patógenos particulares. Por consiguiente, otro aspecto descrito en el presente documento proporciona un método de tratamiento de enfermedad infecciosa en un sujeto que comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-CD73, o porción de unión a antígeno del mismo, de manera que el sujeto sea tratado por la enfermedad infecciosa. Además, o como alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o humanizado.

En todos los métodos anteriores, la inhibición de CD73 puede combinarse con otras formas de inmunoterapia tales como tratamiento con citoquina (por ejemplo, interferones, GM-CSF, G-CSF, IL-2) o terapia de anticuerpos biespecíficos, que proporciona una presentación de antígenos tumorales aumentada (véase, por ejemplo, Holliger (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak (1994) *Structure* 2:1121-1123).

#### Terapias de combinación

Además de las terapias de combinación anteriormente proporcionadas, los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento se pueden usar en terapia de combinación, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer, como se describe a continuación.

En el presente documento además se proporciona métodos de terapia de combinación en los que un anticuerpo anti-CD73 se administra conjuntamente con un o más agentes adicionales, por ejemplo, anticuerpos, que son eficaces en

respuestas inmunitaria estimulantes para de ese modo aumentar más, estimular o regular al alza las respuestas inmunitarias en un sujeto.

5 Generalmente, un anticuerpo anti-CD73 descrito en el presente documento se puede combinar con (i) un agonista de un receptor coestimulante y/o (ii) un antagonista de una señal inhibidora en los linfocitos T, ambos dan como resultado amplificación de respuestas de linfocitos T específicos a antígeno (reguladores del ciclo regular inmune). La mayoría de las moléculas coestimulantes y de inhibición conjunta son miembros de la superfamilia de la inmunoglobulina (IgsF), y anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento se pueden administrar con un agente que dirige un miembro de la familia IgsF para incrementar una respuesta inmunitaria. Una familia importante de ligandos unidos a membrana que se unen a receptores coestimuladores o coinhibidores es la familia B7, que incluye B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) y B7-H6. Otra familia de ligandos unidos a membrana que se unen a receptores coestimuladores o coinhibidores es la familia TNF de moléculas que se unen a miembros de la familia de receptores TNF relacionados, que incluye CD40 y CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137, GITR, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, 10 TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT $\beta$ R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1, linfotóxina  $\alpha$ /TNF $\beta$ , TNFR2, TNF $\alpha$ , LT $\beta$ R, linfotóxina  $\alpha$  1 $\beta$ 2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY, NGFR (véase, por ejemplo, Tansey (2009) *Drug Discovery Today* 00:1). La activación del linfocito T también se regula por citoquinas solubles. Por tanto, los anticuerpos anti-CD73 se pueden usar junto con (i) antagonistas (o agentes inhibidores o bloqueantes) de proteínas de la familia IgsF o la familia B7 o la familia del TNF que inhibe la activación de linfocitos T o antagonistas de citoquinas que inhiben la activación de linfocitos T (por ejemplo, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF; ("citoquinas inmunosupresoras") y/o (ii) agonistas de receptores estimuladores de la familia IgsF, familia B7 o la familia TNF o de citoquinas que estimulan la activación de los linfocitos T, para estimular una respuesta inmunitaria, por ejemplo, para tratar enfermedades proliferativas, tal como cáncer.

25 Por ejemplo, las respuestas de los linfocitos T se pueden estimular mediante una combinación de anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento, por ejemplo, CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f, y uno o más de los siguientes agentes:

30 (1) Un antagonista (agente inhibidor o bloqueante) de una proteína que inhibe la activación de linfocitos T (por ejemplo, inhibidores de los puntos de regulación inmune), tal como CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2 y LAG-3, como se ha descrito anteriormente, y cualquiera de las siguientes proteínas: TIM-3, Galectina 9, CEACAM-1, BTLA, CD69, Galectina-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, CD73, PD1H, LAIR1, TIM-1, TIM-4, CD39.

35 (2) Un agonista de una proteína que estimula la activación de los linfocitos T, tal como B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, GITR, GITRL, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, CD70, CD27, CD40, DR3 y CD28H.

40 Agentes ilustrativos que modulan una de las anteriores proteínas y se pueden combinar con anticuerpos anti-CD73 antagonistas, por ejemplo, aquellos descritos en el presente documento, para el tratamiento del cáncer, incluyen: Yervoy™ (ipilimumab) o Tremelimumab (para CTLA-4), galiximab (para B7.1), BMS-936558 (para PD-1), CT-011 (para PD-1), MK-3475 (para PD-1), AMP224 (para B7DC), BMS-936559 (para B7-H1), MPDL3280A (para B7-H1), MEDI-570 (para ICOS), AMG557 (para B7H2), MGA271 (para B7H3), IMP321 (para LAG-3), BMS-663513 (para CD137), PF-05082566 (para CD137), CDX-1127 (para CD27), anti-OX40 (Providence Health Services), huMAbOX40L (para OX40L), Atacicept (para TACI), CP-870893 (para CD40), Lucatumumab (para CD40), Dacetuzumab (para CD40), Muromonab-CD3 (para CD3), Ipilimumab (para CTLA-4).

50 Otras moléculas que pueden combinarse con anticuerpos anti-CD73 antagonistas para el tratamiento del cáncer incluyen antagonistas de receptores inhibidores en células NK o agonistas de receptores activadores en células NK. Por ejemplo, los anticuerpos antagonistas anti-CD73 se pueden combinar con antagonistas de KIR (por ejemplo, lirilumab).

55 La activación de los linfocitos T también se puede regular por citoquinas solubles, y los anticuerpos anti-CD73 se pueden administrar a un sujeto, por ejemplo, que tiene un cáncer, con antagonistas de citoquinas que inhiben la activación de linfocitos T o agonistas de citoquinas que estimulan la activación de linfocitos T.

60 En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CD73 se pueden usar junto con (i) antagonistas (o agentes inhibidores o bloqueantes) de proteínas de la familia IgsF o la familia B7 o la familia del TNF que inhibe la activación de linfocitos T o antagonistas de citoquinas que inhiben la activación de linfocitos T (por ejemplo, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF; ("citoquinas inmunosupresoras") y/o (ii) agonistas de receptores estimuladores de la familia IgsF, familia B7 o la familia TNF o de citoquinas que estimulan la activación de los linfocitos T, para estimular una respuesta inmunitaria, por ejemplo, para tratar enfermedades proliferativas, tal como cáncer.

65 Aún otros agentes para terapias de combinación incluyen agentes que inhiben o reducen macrófagos o monocitos, incluyendo, pero sin limitación, antagonistas de CSF-1R tales como anticuerpos antagonista de CSF-1R incluyendo RG7155 (WO11/70024, WO11/107553, WO11/131407, WO13/87699, WO13/119716, WO13/132044) o FPA-008 (WO11/140249; WO13169264; WO14/036357).

Los anticuerpos anti-CD73 también se pueden administrar con agentes que inhiben la señalización de TGF- $\beta$ .

5 Agentes adicionales que se pueden combinar con anticuerpo anti-CD73 incluyen agentes que aumentan la presentación de antígeno tumoral, por ejemplo, vacunas de células dendríticas, vacunas celulares secretoras de GM-CSF, Oligonucleótidos CpG, e imiquimod, o terapias que aumentan la inmunogenicidad de las células tumorales (por ejemplo, antraciclina).

10 Otras terapias más que se pueden combinar con un anticuerpo anti-CD73 incluyen terapias que eliminan o bloquean la células Treg, por ejemplo, un agente que se une específicamente a CD25.

Otra terapia que se puede combinar con un anticuerpo anti-CD73 es una terapia que inhibe una enzima metabólica tal como indolamina dioxigenasa (IDO), dioxigenasa, arginasa, o sintasa de óxido nítrico.

15 Otra clase de agentes que se pueden usar con un anticuerpo anti-CD73 incluye agentes que inhiben la formación de adenosina o inhiben el receptor A2A de adenosina.

20 Otras terapias que se pueden combinar con anticuerpo anti-CD73 para tratar el cáncer incluyen terapias que invierten/previene la anergia o el agotamiento de linfocitos T y terapias que desencadenan una activación inmunitaria innata y/o inflamación en un sitio tumoral.

25 Un anticuerpo anti-CD73 se puede combinar con más de un agente inmunooncológico, y puede ser, por ejemplo, combinado con una estrategia combinatoria que dirige elementos múltiples de la ruta inmunitaria, tal como uno o más de lo siguiente: una terapia que aumenta la presentación de antígenos tumorales (por ejemplo, vacuna de células dendríticas, vacunas celulares secretoras de GM-CSF, Oligonucleótidos CpG, imiquimod); una terapia que inhibe la regulación inmunitaria negativa, por ejemplo, inhibiendo la ruta de CTLA-4 y/o PD1/PD-L1/PD-L2 y/o disminuyendo o bloqueando Treg u otras células supresoras inmunitarias; una terapia que estimula la regulación inmunitaria positiva, por ejemplo, con agonistas que estimulan la ruta de CD-137, OX-40 y/o GITR y/o estimulan la función efectora de linfocitos T; una terapia que incrementa sistémicamente la frecuencia de linfocitos T antitumorales; una terapia que disminuye o inhibe Treg, tales como Treg en el tumor, por ejemplo, usando un antagonista de CD25 (por ejemplo, daclizumab) o por agotamiento de perla anti-CD25; una terapia que afecta a la función de las células mieloides supresoras en el tumor; una terapia que aumenta la inmunogenicidad de las células tumorales (por ejemplo, antraciclina); transferencia de linfocitos T adoptivos o células NK incluyendo células modificadas genéticamente, por ejemplo, células modificadas por receptores de antígeno quiméricos (Terapia de CAR-T); una terapia que inhibe una enzima metabólica tal como indoleamina dioxigenasa (IDO), dioxigenasa, arginasa, o sintasa de óxido nítrico; una terapia que invierte/evita la anergia o agotamiento de los linfocitos T; una terapia que desencadena la activación inmunitaria innata y/o la inflamación en un sitio tumoral; administración de citoquinas estimuladoras inmunitarias; o bloqueo de citoquinas inmunosupresoras.

40 Generalmente, los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento se pueden usar junto con uno o más agentes agonistas que se ligan a receptores coestimulantes positivos, agentes de bloqueo que atenúan la señalización a través de receptores inhibidores, antagonistas, y uno o más agentes que incrementan de manera sistémica la frecuencia de células T antitumorales, agentes que superan distintas rutas supresoras inmunitarias dentro del microentorno tumoral (por ejemplo, bloquear la unión de receptor inhibidor (por ejemplo, interacciones PD-L1/PD-1), disminuir o inhibir Tregs (por ejemplo, usando un anticuerpo monoclonal anti-CD25 (por ejemplo, daclizumab) o mediante agotamiento de perlas anti-CD25 ex vivo), inhibir enzimas metabólicas tales como IDO, o revertir/evitar la anergia o el agotamiento de células T) y agentes que disparan la activación inmunitaria innata y/o inflamación en sitios tumorales. Una internalización incrementada de receptores inhibidores puede traducirse en un nivel inferior de un inhibidor potencial (asumiendo que no se da señalización).

50 En determinadas realizaciones, se administra un anticuerpo anti-CD73 a un sujeto junto con un inhibidor de BRAF si el sujeto es positivo para mutación BRAF V600.

55 Se proporcionan en el presente documento métodos para estimular una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende administrar al sujeto una molécula anti-CD73 antagonista, por ejemplo, un anticuerpo, y uno o más anticuerpos inmunoestimuladores adicionales, tal como un antagonista anti-PD-1, por ejemplo, anticuerpo antagonista, un antagonista anti-PD-L1, por ejemplo, anticuerpo antagonista, un antagonista anti-CTLA-4 antagonista, por ejemplo, anticuerpo antagonista y/o un antagonista anti-LAG3, por ejemplo, un anticuerpo antagonista, de tal manera que se estimula una respuesta inmunitaria en el sujeto, por ejemplo, para inhibir el crecimiento tumoral o para estimular una respuesta antiviral. En una realización, al sujeto se administra un anticuerpo anti-CD73 antagonista y un anticuerpo anti-PD-1 antagonista. En una realización, al sujeto se administra un anticuerpo anti-CD73 antagonista y un anticuerpo anti-PD-L1 antagonista. En una realización, al sujeto se administra un anticuerpo anti-CD73 antagonista y un anticuerpo anti-CTLA-4 antagonista. En una realización, el anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo humano, tal como un anticuerpo descrito en el presente documento. Como alternativa, el anticuerpo anti-CD73 puede ser, por ejemplo, un anticuerpo quimérico o humanizado (por ejemplo, de un mAb anti-CD73 de ratón), tal como aquellos además descritos en el presente documento. En una realización, el al menos un anticuerpo

inmunoestimulante adicional (por ejemplo, un anticuerpo un anti-PD-1 antagonista, un anti-PD-L1 antagonista, un anti-CTLA-4 antagonista y/o anti-LAG3 antagonista) es un anticuerpo humano. Como alternativa, el al menos un anticuerpo inmunoestimulante adicional puede ser, por ejemplo, un anticuerpo quimérico o humanizado (por ejemplo, preparado de un anticuerpo de ratón anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-CTLA-4 y/o anti-LAG3).

5 En el presente documento se proporcionan métodos para tratar una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, cáncer), que comprende administrar un anticuerpo anti-CD73 antagonista y un anticuerpo PD-1 antagonista a un sujeto. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 se administra a una dosis subterapéutica, el anticuerpo anti-PD-1 se administra a una dosis subterapéutica, o ambos se administran a una dosis subterapéutica.

10 En el presente documento también se proporcionan métodos para alterar una suceso adverso asociado con el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente inmunoestimulador, que comprende administrar un anticuerpo anti-CD73 y una dosis subterapéutica de anticuerpo anti-PD-1 a un sujeto. En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo monoclonal de secuencia humana y el anticuerpo anti-CD73 es anticuerpo monoclonal de secuencia humana, tal como un anticuerpo que comprende las CDR o regiones variables de 11F11, 4C3, 4D4, 10D2, 11A6, 24H2, 5F8, 6E11, 7A11, CD73.3, CD73.4, CD73.5, CD73.6, CD73.7, CD73.8, CD73.9, CD73.10 o CD73.11 descritos en el presente documento u otro anticuerpo anti-CD73 descrito en el presente documento.

20 Los antagonistas PD-1 adecuados para su uso en los métodos descritos en el presente documento, incluyen, sin limitación, ligandos, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y anticuerpos biespecíficos), y agentes multivalentes. En una realización, el antagonista de PD-1 es una proteína de fusión, por ejemplo, una proteína de fusión Fc, tal como AMP-244. En una realización, el antagonista de PD-1 es un anticuerpo anti-PD-1 o anti-PD-L1.

25 Un anticuerpo anti-PD-1 ilustrativo es nivolumab (BMS-936558) o un anticuerpo que comprende las CDR o regiones variables de uno de los anticuerpos 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 7D3, 5F4 y 4A11 descritos en el documento WO 2006/121168. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-PDI es MK-3475 (Lambrolizumab) descrito en el documento WO2012/145493; AMP-514 descrito en el documento WO 2012/145493; y CT-011 (Pidilizumab; previamente CT-AcTibody o BAT; véase, por ejemplo, Rosenblatt et al., (2011) *J. Immunotherapy* 34:409). Anticuerpos PD-1 conocidos adicionales y otros inhibidores de PD-1 incluyen aquellos descritos en los documentos WO 2009/014708, WO 03/099196, WO 2009/114335, WO 2011/066389, WO 2011/161699, WO 2012/145493, El documento de patente de Estados Unidos n.º 7.635.757 y 8.217.149 y la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2009/0317368. También se pueden usar cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 descritos en el documento WO2013/173223. Un anticuerpo anti-PD-1 que compite por la unión con, y/o se une al mismo epítipo en PD-1 que, uno de estos anticuerpos también se puede usar junto con los tratamientos.

35 En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 se une a PD-1 humana con una  $K_D$  de  $5 \times 10^{-8}$  M o menos, se une a PD-1 humana con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o menos, se une a PD-1 humana con una  $K_D$  de  $5 \times 10^{-9}$  M o menos, o se une a PD-1 humana con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M y  $1 \times 10^{-10}$  M o menos.

40 En el presente documento se proporcionan métodos para tratar una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, cáncer), que comprende administrar un anticuerpo anti-CD73 antagonista y un anticuerpo PD-L1 antagonista a un sujeto. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 se administra a una dosis subterapéutica, el anticuerpo anti-PD-L1 se administra a una dosis subterapéutica, o ambos se administran a una dosis subterapéutica. En el presente documento se proporcionan métodos para alterar un suceso adverso asociado con el tratamiento de una enfermedad proliferativa con un agente inmunoestimulador, que comprende administrar un anticuerpo anti-CD73 y una dosis subterapéutica de anticuerpo anti-PD-L1 a un sujeto. En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal de secuencia humana y el anticuerpo anti-CD73 es anticuerpo monoclonal de secuencia humana, tal como un anticuerpo que comprende las CDR o regiones variables de 11F11, 4C3, 4D4, 10D2, 11A6, 24H2, 5F8, 6E11, 7A11, CD73.3, CD73.4, CD73.5, CD73.6, CD73.7, CD73.8, CD73.9, CD73.10 o CD73.11 descritos en el presente documento u otro anticuerpo anti-CD73 descrito en el presente documento.

55 En una realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es BMS-936559 (referido como 12A4 en el documento WO 2007/005874 y el documento de patente de Estados Unidos No. 7.943.743), o un anticuerpo que comprende las CDR o regiones variables de 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 y 13G4, el cual se describe en el documento de publicación PCT WO 07/005874 y el documento de patente de Estados Unidos n.º 7.943.743. En determinada realización un anticuerpo anti-PD-L1 es MEDI4736 (también conocido como Anti-B7-H1) o MPDL3280A (también conocido como RG7446). También se puede usar cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 descritos en los documentos WO2013/173223, WO2011/066389, WO2012/145493, patentes de Estados Unidos n.º 7.635.757 y 8.217.149, y publicación de Estados Unidos n.º 2009/145493. También se pueden usar los anticuerpos anti-PD-L1 que compiten con y/o se unen al mismo epítipo que el de cualquiera de estos anticuerpos junto con los tratamientos.

65 En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 se une a PD-L1 humana con una  $K_D$  de  $5 \times 10^{-8}$  M o menos, se une a PD-L1 humana con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o menos, se une a PD-L1 humana con una  $K_D$  de  $5 \times 10^{-9}$  M o menos, o se une a PD-L1 humana con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M y  $1 \times 10^{-10}$  M o menos.

En el presente documento se proporcionan métodos para tratar una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, cáncer), que comprenden un anticuerpo anti-CD73 descrito en el presente documento y un anticuerpo antagonista de CTLA-4 a un sujeto. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 se administra a una dosis subterapéutica, el anticuerpo anti-CTLA-4 se administra a una dosis subterapéutica, o ambos se administran a una  
 5 dosis subterapéutica. En el presente documento se proporcionan métodos para alterar un suceso adverso asociado con el tratamiento de una enfermedad proliferativa con un agente inmunoestimulador, que comprende administrar un anticuerpo anti-CD73 y una dosis subterapéutica de anticuerpo anti-CTLA-4 a un sujeto. En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 es un anticuerpo seleccionado del grupo de: Yervoy™ (ipilimumab o anticuerpo 10D1, descrito en el documento de  
 10 publicación PCT WO 01/14424), emelimumab (anteriormente ticilimumab, CP-675.206), anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en cualquiera de las siguientes publicaciones: WO 98/42752; WO 00/37504; patente de Estados Unidos n.º 6.207.156; Hurwitz et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(17):10067-10071; Camacho et al. (2004) *J. Clin. Oncology* 22(145): Abstract No. 2505 (anticuerpo CP-675206); y Mokyr et al. (1998) *Cancer Res.* 58:5301-5304. También se pueden usar cualquiera de los anticuerpos anti-CTLA-4 descritos en el documento WO2013/173223.

15 En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 se une a CTLA-4 humana con una  $K_D$  de  $5 \times 10^{-8}$  M o menos, se une a CTLA-4 humana con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o menos, se une a CTLA-4 humana con una  $K_D$  de  $5 \times 10^{-9}$  M o menos, o se une a CTLA-4 humana con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M y  $1 \times 10^{-10}$  M o menos.

20 En el presente documento se proporcionan métodos para tratar una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, cáncer), que comprende administrar un anticuerpo anti-CD73 y un anticuerpo LAG-3 a un sujeto. En realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-CD73 se administra a una dosis subterapéutica, el anticuerpo anti-LAG-3 se administra a una dosis subterapéutica, o ambos se administran a una dosis subterapéutica. En el presente documento se proporcionan métodos para alterar un suceso adverso asociado con el tratamiento de una  
 25 enfermedad hiperproliferativa con un agente inmunoestimulador, que comprende administrar un anticuerpo anti-CD73 y una dosis subterapéutica de anticuerpo anti-LAG-3 a un sujeto. En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 es un anticuerpo monoclonal de secuencia humana y el anticuerpo anti-CD73 es anticuerpo monoclonal de secuencia humana, tal como un anticuerpo que comprende las CDR o regiones variables de 11F11, 4C3, 4D4, 10D2, 11A6, 24H2, 5F8, 6E11, 7A11, CD73.3, CD73.4, CD73.5, CD73.6, CD73.7, CD73.8, CD73.9, CD73.10 o CD73.11 u otro anticuerpo anti-CD73 antagonista  
 30 descrito en el presente documento. Ejemplos de anticuerpos anti-LAG3 incluyen anticuerpos que comprenden las CDR o regiones variables de los anticuerpos 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 o 17E5, que se describen en la publicación de patente de Estados Unidos n.º US2011/0150892 y WO2014/008218. En una realización, un anticuerpo anti-LAG-3 es BMS-986016. Otros anticuerpos anti-LAG-3 reconocidos en la técnica que se pueden usar incluyen IMP731 descrito en el documento US 2011/007023. También se puede usar IMP-321. También se pueden  
 35 usar los anticuerpos anti-LAG-3 que compiten con y/o se unen al mismo epítipo que el de cualquiera de estos anticuerpos junto con los tratamientos.

40 En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-LAG-3 se une a LAG-3 humana con una  $K_D$  de  $5 \times 10^{-8}$  M o menos, se une a LAG-3 humana con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o menos, se une a LAG-3 humana con una  $K_D$  de  $5 \times 10^{-9}$  M o menos, o se une a LAG-3 humana con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-8}$  M y  $1 \times 10^{-10}$  M o menos.

45 En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CD73 se administra junto con un anticuerpo anti-agonista de G1TR, por ejemplo, un anticuerpo que tiene las secuencias de CDR de 6C8, por ejemplo, un anticuerpo humanizado que tiene las CDR de 6C8, como se describe, por ejemplo, en el documento WO2006/105021; un anticuerpo que comprende las CDR del anticuerpo anti-G1TR descrito en el documento WO2011/028683; un anticuerpo que comprende las CDR del anticuerpo anti-G1TR descrito en el documento JP2008278814; o un anticuerpo que comprende las CDR del anticuerpo anti-G1TR descrito en el documento WO2015187835.

50 La administración de anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento y antagonistas, por ejemplo, anticuerpos antagonista, a uno o más segundos antígenos diana tales como LAG-3 y/o CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 puede aumentar la respuesta inmunitaria a células cancerosas en el paciente. Los cánceres cuyo crecimiento se puede inhibir usando los anticuerpos descritos en la presente divulgación incluyen cánceres sensibles a la inmunoterapia. Ejemplos representativos de cánceres para el tratamiento con la terapia de combinación de la  
 55 presente divulgación incluyen aquellos cánceres especialmente anteriormente enumerados en la discusión de la monoterapia con los anticuerpos anti-CD73.

60 En determinadas realizaciones, la combinación de anticuerpos terapéuticos tratados en el presente documento se puede administrar al mismo tiempo como una composición sencilla en un vehículo farmacéuticamente aceptable, o al mismo tiempo como composiciones separadas con cada anticuerpo en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la combinación de los anticuerpos terapéuticos se puede administrar secuencialmente. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CTLA-4 y un anticuerpo anti-CD73 se pueden administrar secuencialmente, tal como administrando el anticuerpo anti-CTLA-4 primero y el anticuerpo anti-CD73 segundo, o administrándose el anticuerpo anti-CD73 primero y el anticuerpo anti-CTLA-4 segundo. Además, o como alternativa, un anticuerpo anti-  
 65 PD-1 y un anticuerpo anti-CD73 se pueden administrar secuencialmente, tal como administrando el anticuerpo anti-PD-1 primero y el anticuerpo anti-CD73 segundo, o administrándose el anticuerpo anti-CD73 primero y el anticuerpo

anti-PD-1 segundo. Además, o como alternativa, un anticuerpo anti-PD-L1 y un anticuerpo anti-CD73 se pueden administrar secuencialmente, tal como administrando el anticuerpo anti-PD-L1 primero y el anticuerpo anti-CD73 segundo, o administrándose el anticuerpo anti-CD73 primero y el anticuerpo anti-PD-L1 segundo. Además, o como alternativa, un anticuerpo anti-LAG-3 y un anticuerpo anti-CD73 se pueden administrar

5 secuencialmente, tal como administrando el anticuerpo anti-LAG-3 primero y el anticuerpo anti-CD73 segundo, o administrándose el anticuerpo anti-CD73 primero y el anticuerpo anti-LAG-3 segundo.

Además, si se administra secuencialmente más de una dosis de la terapia combinada, el orden de la administración secuencial se puede revertir o mantener en el mismo orden en cada momento de administración, las

10 administraciones secuenciales pueden combinarse con administraciones concurrentes, o cualquier combinación de las mismas. Por ejemplo, la primera administración de una combinación anticuerpo anti-CTLA-4 y anticuerpo anti-CD73 puede ser concurrente, la segunda administración puede ser secuencial con el anticuerpo anti-CTLA-4 primero y el anticuerpo anti-CD73 segundo, y la tercera administración puede ser secuencial con el anticuerpo anti-CD73 primero y el anticuerpo anti-CTLA-4 segundo, etc. Además, o como alternativa, la primera administración de una combinación anticuerpo anti-PD-1 y anticuerpo anti-CD73 puede ser concurrente, la segunda administración puede ser secuencial con el anticuerpo anti-PD-1 primero y el anticuerpo anti-CD73 segundo, y la tercera administración puede ser secuencial con el anticuerpo anti-CD73 primero y el anticuerpo anti-PD-1 segundo, etc. Además, o como alternativa, la primera administración de una combinación anticuerpo anti-PD-L1 y anticuerpo anti-CD73 puede ser concurrente, la segunda administración puede ser secuencial con el anticuerpo anti-PD-L1 primero y el anticuerpo anti-CD73 segundo, y la tercera administración puede ser secuencial con el anticuerpo anti-CD73 primero y el anticuerpo anti-PD-L1 segundo, etc. Además, o como alternativa, la primera administración de una combinación anticuerpo anti-LAG-3 y anticuerpo anti-CD73 puede ser concurrente, la segunda administración puede ser secuencial con el anticuerpo anti-LAG-3 primero y el anticuerpo anti-CD73 segundo, y la tercera administración puede ser secuencial con el anticuerpo anti-CD73 primero y el anticuerpo anti-LAG-3 segundo, etc. Otro esquema de dosificación representativo puede implicar una primera administración que es secuencial con anticuerpo anti-CD73 primero y anti-CTLA-4 (y/o anticuerpo anti-PD-1 y/o anticuerpo anti-PD-L1 y/o anticuerpo anti-LAG-3) segundo, y posteriormente las administraciones pueden ser concurrentes.

En una realización, un sujeto que tiene una enfermedad que puede beneficiarse de la estimulación del sistema inmunitario, por ejemplo, cáncer o una enfermedad infecciosa, se trata mediante la administración al sujeto de un agente inmunooncológico y un anticuerpo anti-CD73, en la que el agente inmunooncológico es un agonista de CD137 (4-1BB), tal como un anticuerpo de CD137 agonista. Los anticuerpos de CD137 adecuados incluyen, por ejemplo, urelumab o PF-05082566 (WO12/32433).

En una realización, un sujeto que tiene una enfermedad que puede beneficiarse de la estimulación del sistema inmunitario, por ejemplo, cáncer o una enfermedad infecciosa, se trata mediante la administración al sujeto de un agente inmunooncológico y un anticuerpo anti-CD73, en la que el agente inmunooncológico es un agonista de OX40, tal como un anticuerpo de OX40 agonista. Los anticuerpos de OX40 adecuados incluyen, por ejemplo, MEDI-6383, MEDI-6469 o MOXR0916 (RG7888; WO06/029879).

En una realización, un sujeto que tiene una enfermedad que puede beneficiarse de la estimulación del sistema inmunitario, por ejemplo, cáncer o una enfermedad infecciosa, se trata mediante la administración al sujeto de un agente inmunooncológico y un anticuerpo anti-CD73, en la que el agente inmunooncológico es un agonista de CD40, tal como un anticuerpo de CD40 agonista. En determinadas realizaciones, el agente inmunooncológico es un antagonista de CD40, tal como un anticuerpo anti-CD40 antagonista. Los anticuerpos de CD40 adecuados incluyen, por ejemplo, lucatumumab (HCD122), dacetuzumab (SGN-40), CP-870.893 o Chi Lob 7/4.

En una realización, un sujeto que tiene una enfermedad que puede beneficiarse de la estimulación del sistema inmunitario, por ejemplo, cáncer o una enfermedad infecciosa, se trata mediante la administración al sujeto de un agente inmunooncológico y un anticuerpo anti-CD73, en la que el agente inmunooncológico es un agonista de CD27, tal como un anticuerpo de CD27 agonista. Los anticuerpos de CD27 adecuados incluyen, por ejemplo, varlilumab (CDX-1127).

En una realización, un sujeto que tiene una enfermedad que puede beneficiarse de la estimulación del sistema inmunitario, por ejemplo, cáncer o una enfermedad infecciosa, se trata mediante la administración al sujeto de un agente inmunooncológico y un anticuerpo anti-CD73, en el agente inmunooncológico es MGA271 (a B7H3) (WO11/109400).

En una realización, un sujeto que tiene una enfermedad que puede beneficiarse de la estimulación del sistema inmunitario, por ejemplo, cáncer o una enfermedad infecciosa, se trata mediante la administración al sujeto de un agente inmunooncológico y un anticuerpo anti-CD73, en la que el agente inmunooncológico es un antagonista de KIR, tales como lirilumab.

En una realización, un sujeto que tiene una enfermedad que puede beneficiarse de la estimulación del sistema inmunitario, por ejemplo, cáncer o una enfermedad infecciosa, se trata mediante la administración al sujeto de un agente inmunooncológico y un anticuerpo anti-CD73, en la que el agente inmunooncológico es un antagonista de

IDO. Los antagonistas de IDO adecuados incluyen, por ejemplo, INCB-024360 (WO2006/122150, WO07/75598, WO08/36653, WO08/36642), indoximod, NLG-919 (WO09/73620, WO09/1156652, WO11/56652, WO12/142237) o F001287.

5 En una realización, un sujeto que tiene una enfermedad que puede beneficiarse de la estimulación del sistema inmunitario, por ejemplo, cáncer o una enfermedad infecciosa, se trata mediante la administración al sujeto de un agente inmunooncológico y un anticuerpo anti-CD73, en la que el agente inmunooncológico es un agonista del receptor tipo Toll, por ejemplo, un agonista de TLR2/4 (por ejemplo, Bacillus Calmette-Guerin); un agonista de TLR7 (por ejemplo, Hiltonol o Imiquimod); un agonista de TLR7/8 (por ejemplo, Resiquimod); o un agonista de TLR9 (por ejemplo, CpG7909).

10 En una realización, un sujeto que tiene una enfermedad que puede beneficiarse de la estimulación del sistema inmunitario, por ejemplo, cáncer o una enfermedad infecciosa, se trata mediante la administración al sujeto de un agente inmunooncológico y un anticuerpo anti-CD73, en la que, el agente inmunooncológico es un inhibidor de TGF- $\beta$ , por ejemplo, GC1008, LY2157299, TEW7197, o IMC-TR1.

15 En un aspecto, un anticuerpo anti-CD73 se administrar secuencialmente antes de la administración de un segundo agente, por ejemplo, un agente inmunooncológico. En un aspecto, un anticuerpo anti-CD73 se administra al mismo tiempo con el segundo agente, por ejemplo, un agente inmunológico-oncológico. En un aspecto más, un anticuerpo anti-CD73 se administrar secuencialmente después de la administración del segundo agente. La administración de los dos agentes puede comenzar en momentos que están, por ejemplo, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 3 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 3 días, 5 días, 7 días, o una o más semanas separados, o la administración del segundo agente puede comenzar, por ejemplo, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos, 3 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 3 días, 5 días, 7 días, o una o más semanas después de que se haya administrado el primer agente.

20 En ciertos aspectos, un anticuerpo anti-CD73 y un segundo agente, por ejemplo, un agente inmunooncológico, se administran simultáneamente, por ejemplo, se infusionan simultáneamente, por ejemplo, durante un periodo de 30 o 60 minutos, a un paciente. Un anticuerpo anti-CD73 se puede formular conjuntamente con un segundo agente, por ejemplo, un agente inmunooncológico.

25 Opcionalmente, un anti-CD73 como agente inmunoterapéutico solo, o la combinación de un anticuerpo anti-CD73 y uno o más anticuerpos inmunoterapéuticos adicionales (por ejemplo, bloqueo de anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o PD-L1 y/o anti-LAG-3) se puede combinar además con un agente inmunogénico, tal como células cancerosas, antígenos tumorales purificados (incluyendo proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de carbohidratos), células y células transfectadas con genes que codifican citoquinas inmunoestimulantes (He et al. (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Los ejemplos no limitativos de vacunas tumorales que se pueden usar incluyen péptidos de antígenos de melanoma, tales como péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o tirosinasa, o células tumorales transfectadas para expresar la citoquina GM-CSF (discutido más a continuación). Una inhibición de CD73 combinada y uno o más anticuerpos adicionales (por ejemplo, bloqueo de CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 ay/o LAG-3) se pueden combinar además con tratamientos de cáncer convencionales. Por ejemplo, Una inhibición de CD73 combinada y uno o más anticuerpos adicionales (por ejemplo, bloqueo de CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 ay/o LAG-3) se pueden combinar eficazmente con regímenes quimioterapéuticos. En estos casos, Es posible reducir la dosis de otro reactivo quimioterapéutico administrado con la combinación de la presente divulgación (Mokyr et al. (1998) *Cancer Research* 58: 5301-5304). Un ejemplo de tal combinación es una combinación de anticuerpo antagonista anti-CD73 con o sin un anticuerpo adicional, tal como anticuerpos anti-CTLA-4 y/o anticuerpos anti-PD-1 y/o anticuerpos anti-PD-L1 y/o anticuerpos anti-LAG-3) además junto con decarbazina para el tratamiento de melanoma. Otro ejemplo es una combinación de anticuerpo anti-CD73 con o sin anticuerpos anti-CTLA-4, y/o anticuerpos a anti-PD-1 y/o anticuerpos anti-PD-L1 y/o anticuerpos LAG-3 además junto con interleucina-2 (IL-2) para el tratamiento de melanoma. El fundamento científico tras el uso combinado de la inhibición de CD73 y bloqueo de CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 y/o LAG-3 con quimioterapia es que la muerte celular, que es una consecuencia de la acción citotóxica de la mayoría de los compuestos quimioterapéuticos, debería dar lugar a niveles incrementados de antígeno tumoral en la ruta de presentación del antígeno. Otras terapias de combinación que pueden dar como resultado sinergia con una inhibición de CD73 combinada con o sin un bloqueo de CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 y/o LAG-3 a través de la muerte celular incluyen la radiación, cirugía, o privación hormonal. Cada uno de estos protocolos crea una fuente de antígeno tumoral en el hospedador. Los inhibidores de angiogénesis también se puede combinar con una inhibición de CD73 combinada y bloqueo de CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 y/o LAG-3. La inhibición de la angiogénesis conduce a la muerte de las células tumorales, que puede ser una fuente de antígeno tumoral alimentada en las rutas de presentación del antígeno del hospedador.

30 Un anticuerpo antagonista anti-CD73 como agente inmunoterapéutico solo, o una combinación de antagonística de CD73 y anticuerpos de bloqueo de CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 y/o LAG-3 se pueden usar junto con anticuerpos biespecíficos que dirigen las células efectoras que expresan el receptor Fc $\alpha$  o Fc $\gamma$  diana a las células tumorales (véase, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos N.º 5.922.845 y 5.837.243). Se pueden usar anticuerpos biespecíficos para dirigir dos antígenos separados. El brazo de linfocito T de estas respuestas se aumentaría por el uso de una inhibición de CD73 y bloqueo de CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 y/o LAG-3 combinados.

En otro ejemplo, un anticuerpo antagonista anti-CD73 como agente inmunoterapéutico solo o una combinación de un anticuerpo anti-CD73 y agente inmunoestimulante adicional, por ejemplo, anticuerpo anti-CTLA-4 y/o anticuerpo anti-PD-1 y/o anticuerpo anti-PD-L1 y/o agente LAG-3, por ejemplo, anticuerpo, se puede usar junto con un anticuerpo antineoplásico, tal como RITUXAN® (rituximab), Herceptin® (trastuzumab), Bexxar® (tositumomab), Zevalin® (ibritumomab), Campath® (alemtuzumab), Lymphocide® (epruzumab), Avastin® (bevacizumab), y Tarceva® (erlotinib), y similares. A modo de ejemplo y sin el deseo de quedar vinculados a teoría alguna, el tratamiento con un anticuerpo anticancerígeno o un anticuerpo anticancerígeno conjugado con una toxina puede conducir a la muerte de células cancerosas (por ejemplo, células tumorales), lo que potenciaría una respuesta inmunitaria mediada por el agente inmunoestimulante, por ejemplo, CD73, CTLA-4, PD-1, PD-L1 o LAG-3, por ejemplo, anticuerpo. En una realización a modo de ejemplo, un tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, un tumor canceroso) puede incluir un agente anticáncer, por ejemplo, anticuerpo, junto con anti-CD73 y opcionalmente un agente inmunoestimulante adicional, por ejemplo, agente anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o anti-LAG-3, por ejemplo, anticuerpo, concurrente o secuencialmente, o cualquier combinación de los mismos, que puede potenciar una respuesta inmunitaria antitumoral por el hospedador.

Los tumores evaden la vigilancia inmunitaria del hospedador por una gran diversidad de mecanismos. Muchos de estos mecanismos pueden ser superados por la inactivación de proteínas, que se expresan por los tumores y que son inmunosupresoras. Estas incluyen, entre otros, TGF- $\beta$  (Kehrl et al. (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) *Immunology Today* 13: 198-200), y ligando Fas (Hahne et al. (1996) *Science* 274: 1363-1365). Además se pueden combinar anticuerpos para cada una de estas entidades con un anticuerpo anti-CD73 con o sin un agente inmunoestimulante adicional, por ejemplo, un agente anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o anti-LAG-3, tal como anticuerpo, para contrarrestar los efectos de los agentes inmunosupresores y favorecer las respuestas inmunes antitumorales por parte del hospedador.

Otros agentes, por ejemplo, anticuerpos, que se pueden usar para activar la capacidad de respuesta inmunitaria del hospedador además se puede usar junto con un anticuerpo anti-CD73 con o sin un agente inmunoestimulante adicional, tal como, anticuerpo anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o anti-LAG-3. Estos incluyen moléculas en la superficie de las células dendríticas que activan la función DC y la presentación del antígeno. Los anticuerpos anti-CD40 (Ridge et al., *supra*) se pueden usar junto con un anticuerpo anti-CD73 y opcionalmente un agente inmunoestimulante adicional, por ejemplo, un agente anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o anti-LAG-3, por ejemplo, anticuerpo. Otros anticuerpos activadores para moléculas coestimuladoras de linfocitos T Weinberg et al., *supra*, Melero et al. *supra*, Huttoff et al., *supra*, también pueden proporcionar niveles incrementados de activación de linfocitos T.

Como se ha tratado anteriormente, el trasplante de médula ósea se utiliza actualmente para tratar diversos tumores de origen hematopoyético. La inmunoterapia anti-CD73 sola o combinada con bloqueo de CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 y/o LAG-3 se puede usar para incrementar la eficacia de los linfocitos T específicos a tumor donantes.

También varios protocolos de tratamiento experimental implican la activación *ex vivo* y expansión de linfocitos T específicos a antígeno y transferencia adoptiva de estas células en receptores para linfocitos T específicos a antígeno contra tumor (Greenberg, & Riddell, *supra*). Estos métodos también se pueden usar para activar las respuestas de los linfocitos T a agentes infecciosos tales como CMV. La activación *ex vivo* en la presencia de anti-CD73 con o sin una terapia inmunoestimulante adicional, por ejemplo, se puede esperar que los anticuerpos anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o anti-LAG-3 incrementen la frecuencia y la actividad de los linfocitos T transferidos de manera adoptiva.

En el presente documento se proporcionan métodos para alterar un suceso adverso asociado con el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa (por ejemplo, cáncer) con un agente inmunoestimulador, que comprende administrar un anticuerpo anti-CD73 con o sin y una dosis subterapéutica de agente anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o anti-LAG-3, por ejemplo, anticuerpo, a un sujeto. Por ejemplo, los métodos descritos en el presente documento para un método de reducción de la incidencia de colitis inducida por anticuerpo terapéutico inmunoestimulador o diarrea mediante la administración de un esteroide no absorbible al paciente. Como se usa en el presente documento, un "esteroide no absorbible" es un glucocorticoide que presenta un extenso metabolismo de primer paso de manera que, después del metabolismo en el hígado, la biodisponibilidad del esteroide es baja, es decir, menos de aproximadamente 20 %. En una realización descrita en el presente documento, el esteroide no absorbible es budesonida. La budesonida es un glucocorticoide de acción local, que se metaboliza ampliamente, principalmente por el hígado, después de la administración oral. ENTOCORT EC® (Astra-Zeneca) es una formulación oral de budesonida dependiente del tiempo y del pH desarrollada para optimizar la administración de fármacos al íleon y por todo el colon. ENTOCORT® EC está aprobado en los Estados Unidos para tratamiento de la enfermedad de Crohn leve a moderada que afecta al íleon y/o al colon ascendente. La dosis oral habitual de ENTOCORT EC® para el tratamiento de la enfermedad de Crohn es de 6 a 9 mg/día. ENTOCORT EC® se libera en los intestinos antes de ser absorbido y retenido en la mucosa intestinal. Una vez que pasa a través del tejido diana de la mucosa intestinal, ENTOCORT EC® se metaboliza ampliamente por el sistema del citocromo P450 en el hígado a metabolitos con una actividad glucocorticoide insignificante. Por lo tanto, La biodisponibilidad es baja (alrededor del 10 %). La baja biodisponibilidad de budesonida da como resultado una proporción terapéutica

mejorada en comparación con otros glucocorticoides con un metabolismo de primer paso menos extenso. Budesonida da como resultado menos efectos adversos, incluyendo menos supresión hipotalámica-pituitaria, que los corticosteroides de acción sistémica. Sin embargo, la administración crónica de ENTOCORT EC® puede producir efectos glucocorticoides sistémicos tales como hipercorticismismo y supresión suprarrenal. Véase PDR 58ª ed. 2004; 608-610.

En otras realizaciones adicionales, la inhibición de CD73 con o sin bloque de CTLA-4 y/o PD-1 y/o PD-L1 y/o LAG-3 (es decir, anticuerpos terapéuticos inmunoestimuladores anti-CD73 y opcionalmente anticuerpos anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o anti-LAG-3) junto con un esteroide no absorbible además se puede combinar con un salicilato. Los salicilatos incluyen agentes 5-ASA tales como, por ejemplo: sulfasalazina (AZULFIDINE®, Pharmacia & UpJohn); olsalazina (DIPENTUM®, Pharmacia & UpJohn); balsalazida (COLAZAL®, Salix Pharmaceuticals, Inc.); y mesalamina (ASACOL®, Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA®, Shire US; CANASA®, Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA®, Solvay).

De acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, un salicilato administrado junto con anti-CD73 con o sin anticuerpos anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o LAG-3 y un esteroide no absorbible puede incluir cualquier solapamiento o administración secuencial del salicilato y el esteroide no absorbible con el fin de disminuir la incidencia de colitis inducida por anticuerpos inmunoestimuladores. Por tanto, por ejemplo, los métodos para reducir la incidencia de colitis inducida por los anticuerpos inmunoestimuladores descritos en el presente documento abarcan la administración de un salicilato y uno no absorbible al mismo tiempo o secuencialmente (por ejemplo, un salicilato se administra 6 horas después de un esteroide no absorbible), o cualquier combinación de lo mismo. Además, un salicilato y un esteroide no absorbible se pueden administrar mediante la misma vía (por ejemplo, ambos se administran oralmente) o mediante vías diferentes (por ejemplo, un salicilato se administra oralmente y un esteroide no absorbible se administra por el recto), las cuales pueden diferir de la(s) ruta(s) usada(s) para administrar los anticuerpos anti-CD73 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 y/o anti-PD-L1 y/o anti-LAG-3.

Los anticuerpos anti-CD73 y la combinación de terapias de anticuerpo descritas en el presente documento también se pueden usar junto con otras terapias bien conocidas que se seleccionan para su particular utilidad contra la enfermedad a tratar (por ejemplo, cáncer). Las combinaciones de los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento se pueden usar secuencialmente con agente(s) farmacéuticamente aceptable(s) conocido(s).

Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD73 y las terapias con anticuerpo de combinación descritos en el presente documento se pueden usar junto con (por ejemplo, simultáneamente o por separado) un tratamiento adicional, tal como irradiación, quimioterapia (por ejemplo, usando camptotecina (CPT-11), 5-fluorouracilo (5-FU), cisplatino, doxorubicina, irinotecán, paclitaxel, gemcitabina, cisplatino, paclitaxel, carboplatin-paclitaxel (Taxol), doxorubicina, 5-fu o camptotecina + apo21/TRAIL (un combo 6X)), uno o más inhibidores de proteasoma (por ejemplo, bortezomib o MG132), uno o más inhibidores de Bcl-2 (por ejemplo, BH3I-2' (inhibidor de bcl-x1), inhibidor de indoleamina dioxigenasa-1 (IDO1) (por ejemplo., INCB24360), AT-101 (derivado de R-(-)-gossipol), ABT-263 (molécula pequeña), GX-15-070 (obatoclax) o MCL-1 (antagonistas de la proteína 1 de diferenciación celular de leucemia mieloide), antagonistas de iAP (inhibidor de la proteína de apoptosis) (por ejemplo, smac7, smac4, mimético smac de molécula pequeña, péptidos smac sintéticos (véase Fulda et al., *Nat Med* 2002;8:808-15), ISIS23722 (LY2181308) o AEG-35156 (GEM-640)), HDAC (inhibidores de la histona desacetilasa), anticuerpos anti-CD20 (por ejemplo, rituximab), inhibidores de la angiogénesis (por ejemplo, bevacizumab), agentes anti-angiogénicos dirigidos a VEGF y VEGFR (por ejemplo, Avastina), triterpenoides sintéticos (véase Hyer et al., *Cancer Research* 2005;65:4799-808), c-FLIP (proteína inhibidora de FLICE celular) moduladores (por ejemplo, ligandos naturales y sintéticos de PPAR $\gamma$  (receptor  $\gamma$  activado por proliferado de peroxisoma), 5809354 o 5569100), inhibidores de quinasa (por ejemplo., Sorafenib), Trastuzumab, Cetuximab, Temeirolimus, inhibidores de mTOR tales como rapamicina y temsirolimus, Bortezomib, inhibidores de JAK2, inhibidores de HSP90, inhibidores de PI3K-AKT, Lenalidomida, inhibidores de GSK3 $\beta$ , inhibidores de IAP y/o fármacos genotóxicos.

Los anticuerpos anti-CD73 y las terapias con anticuerpo de combinación descritas en el presente documento se pueden usar además junto con uno o más agentes citotóxicos antiproliferativos. Las clases de compuestos que pueden usarse como agentes citotóxicos antiproliferativos incluyen, pero sin limitación, las siguientes:

agentes alquilantes (incluyendo, sin limitación, mostazas nitrogenadas, derivados de etilenimina, alquil sulfonatos, nitrosoureas y triazenos): mostaza de uracilo, clorometina, ciclofosfamida (CYTOXAN™) fosfamida, Melfalán, Clorambucilo, Pipobromano, Trietilenomelamina, Trietilenotiofosforamina, Busulfán, Carmustina, Lomustina, Estreptoizocina, dacarbazina y temozolomida.

Antimetabolitos (incluyendo, sin limitación, antagonistas de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de adenosina desaminasa): Metotrexato, 5-fluorouracilo, Floxuridina, Citarabina, 6-mercaptapurina, 6-tioguanina, Fosfato de fludarabina, pentostatina y gemcitabina.

Agentes antiproliferativos adecuados para la combinación con anticuerpos anti-CD73 antagonistas, sin limitación, taxanos, paclitaxel (paclitaxel es comercialmente disponible como TAXOL™), docetaxel, discodermolida (DDM), dictioestatina (DCT), pelorusida A, epotilonas, epotilona A, epotilona B, epotilona C, epotilona D, epotilona E, epotilona F, furanoepotilona D, desoxiepotilona B1, [17]-deshidrodesoxiepotilona B, [18]-deshidrodesoxiepotilona B,

C12,13-ciclopropil-epotilona A, epotilona A puenteada C6-C8, trans-9,10-deshidroepotilona D, cis-9,10-deshidroepotilona D, 16-desmetilepotilona B, epotilona B10, discoderomolida, patupilona (EPO-906), KOS-862, KOS-1584, ZK-EPO, ABJ-789, XAA296A (discodermolida), TZT-1027 (soblidotina), ILX-651 (tasidotina clorhidrato), halicondrina B, mesilato de eribulina (E-7389), hemiasterlina (HTI-286), E-7974, criptoficinas, LY-355703, inmuoconjugados de maitansinoide (DM-1), MKC-1, ABT-751, T1-38067, T-900607, SB-715992 (ispinesib), SB-743921, MK-0731, STA-5312, eleuterobina, 17beta-acetoxi-2-etoxi-6-oxo-B-homo-estra-1,3,5(10)-trien-3-ol, ciclostreptina, isolaulimalida, laulimalida, 4-epi-7-deshidroxi-14,16-didemetil-(+)-discodermolidas y criptotilona 1, además de otros agentes estabilizadores de la microtubulina conocidos en la técnica.

En los casos en que es deseable hacer que las células proliferativas de forma aberrante permanezcan quiescentes junto con o antes del tratamiento con los anticuerpos anti-CD73 descritos en el presente documento, las hormonas y esteroides (incluyendo análogos sintéticos), tales como 17a-etinilestradiol, Dietilestilbestrol, Testosterona, Prednisona, Fluoximasterona, Propionato de dromostanolona, Testolactona, Megestrolacetato, Metilprednisolona, metil-testosterona, Prednisolona, Triamcinolona, Clorotrianiseno, Hidroxiprogesterona, Aminoglutetimida, Estramustina, medroxiprogesteronaacetato, leuprolida, flutamida, Toremifeno, ZOLADEX™, también se pueden administrar al paciente. Cuando se emplean los métodos o composiciones descritas en el presente documento, también se pueden administrar otros agentes usados en la modulación del crecimiento o metástasis tumoral en un instalaciones clínicas, tales como antimiméticos, como se desee.

Los métodos para la administración segura y eficaz de la mayoría de los agentes quimioterapéuticos son conocidos por los expertos en la técnica. Además, su administración se describe en la bibliografía convencional. Por ejemplo, la administración de muchos de los agentes quimioterapéuticos se describe en "Physicians' Desk Reference" (PDR), por ejemplo, 1996 edición (Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, EE.UU.).

El o los agente(s) quimioterapéutico(s) y/o la radioterapia se puede(n) administrar de acuerdo con protocolos terapéuticos bien conocidos en la técnica. Será evidente para los expertos en la técnica que la administración del o los agente(s) quimioterapéutico(s) y/o la radioterapia se puede variar dependiendo de la enfermedad a tratar y los efectos conocidos del o los agente(s) quimioterapéutico(s) y/o la radioterapia sobre dicha enfermedad. También, de acuerdo con los conocimientos del experto, los protocolos terapéuticos (p. ej., cantidades de dosis y tiempos de administración) se pueden modificar a la luz de los efectos observados de los agentes terapéuticos administrados sobre el paciente, y a la luz de las respuestas observadas de la enfermedad a los agentes terapéuticos administrados.

La presente divulgación se ilustra además mediante los siguientes ejemplos

### Ejemplos

#### Ejemplo 1: Generación de anticuerpos anti-CD73 humanos

Se generaron anticuerpos humanos monoclonales anti-CD73 humana en cepas Hco7, Hco27, Hco20, Hco12, Hco17, y Hc2 de ratones transgénicos HuMAb® ("HuMAb" es una Marca Comercial de Medarex, Inc., Princeton, New Jersey) y ratones KM (la cepa KM Mouse® contiene el transcromosoma SC20 como se describe en la publicación PCT WO 02/43478). Se generaron ratones HC2/KCo27 HuMAb y ratones KM como se describe en los documentos de Patente de Estados Unidos N.º 5.770.429 y 5.545.806.

Se inmunizaron ratones, incluyendo diversos genotipos de ratones transgénicos (tales como, KM, Hco7, Hco27, Hco20, Hco12, Hco17 y Hc2) con diferentes estrategias de inmunización (diferente antígeno, diferente dosis, duración, vías de administración (almuhadilla plantar (fp), intraperitoneal (ip) y subcutánea (sc) y adyuvante (CFA/IFA, Ribí y anticuerpo), etc). Se realizaron fusiones de los ratones y se investigaron, y los anticuerpos se identificaron a partir de estas fusiones. La caracterización adicional condujo al aislamiento de anticuerpos de particular interés, incluyendo los anticuerpos denominados 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4-1, 10D2-1, 10D2-2, 11A6-1, 24H2-1, 5F8-1, 5F8-2, 6E11-1, y 7A11-1. La Tabla 7 (a continuación) proporciona el isotipo y el alotipo de IgG de las cadenas pesadas, así como el tipo de cadena ligera, para cada anticuerpo. Los anticuerpos que difieren únicamente en la cadena ligera están representados por un dígito diferente después del guión. Por ejemplo, 11F11-1 tiene la misma cadena pesada que 11F11-2, pero 11F11-1 tiene la cadena ligera VK1, mientras que 11F11-2 tiene la cadena ligera VK2. A menos que se especifique lo contrario, los anticuerpos recombinantes basados en regiones VH de los anticuerpos en la tabla están realizados con la cadena ligera predominante.

Tabla 7:

Clon	Isotipo	Cadena ligera predominante	Otras cadenas ligeras expresadas
11F11	IgG2	VK2	VK1
4C3	IgG1za	VK1	VK2, VK3
4D4	IgG2	VK1	

60

(continuación)

Clon	Isotipo	Cadena ligera predominante	Otras cadenas ligeras expresadas
10D2	IgG4	VK2	VK1
11A6	IgG1za	VK1	
24H2	IgG4	VK1	
5F8	IgG1za	VK1	VK2
6E11	IgG1za	VK1	
7A11	IgGlza	VK1	

Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la secuencia de longitud completa de las cadenas pesadas y ligeras, los dominios VH y VL y las CDR de cada anticuerpo se proporcionan en el listado de secuencias y en la Tabla 35. Las secuencias de aminoácidos de VH y VL también se proporcionan en las Figuras 1A a 17B y un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de VH y VL de diversos anticuerpos se proporciona en la Figura 35 (las secuencias de CDR están en negrita).

### Ejemplo 2: Sustituciones de aminoácidos en regiones variables y variaciones de isotipo

La región marco de la región VH del anticuerpo 11F11 se mutó introduciendo uno o más de la mutación en los siguientes restos de aminoácidos (se muestran los aminoácidos circundantes y el aminoácido mutado está subrayado): T25 (mutación en región marco; ... RLSCATSGFTF...), L52 (mutación CDR2; ...WVAVILYDGSN...), G54 (mutación CDR2; ...VILYDGSNKYY...) y V94 (mutación de región marco; ...AEDTAVYYCAR...). Los nombres de las construcciones y las sustituciones en cada uno de ellos se exponen en la Tabla 8:

Tabla 8.

Nombre de Ab	Ab origen	Sustitución	
CD73.3	4C3	V94A	
CD73.4	11F11	T25A	
CD73.5		T25S	
CD73.6		T25A, G54S	
CD73.7		T25S, G54S	
CD73.8		T25A, L52W, G54S	
CD73.9		T25S, L52W, G54S	
CD73.10		T25A, L52W, G54E	
CD73.11*		4D4	A25, W52, E54
* CD73.11 es 4D4 y contenía estos restos de aminoácidos como aislados. En la tabla se enumera con fines comparativos.			

La región constante de los anticuerpos 11F11 y 4D4 también se modificaron, cambiándola a una región constante de IgG2 (CH1, bisagra, CH2 y CH3) con una sustitución C219S ("IgG2CS"; SEQ ID NO: 267), una región constante de IgG1 no efectora con las sustituciones L234A, L235E, G237A, A330S y P331S ("IgG1. 1f"; SEQ ID NO:268) o una región constante híbrida IgG1/IgG2 no efectora CH1 y bisagra de IgG2 (con C219S) y CH2 y CH3 de IgG1 (con A330S/P331S) ("IgG2CS-IgG1.1f" o "IgG2C219S-IgG1.1f"; SEQ ID NO:169). Las construcciones que se produjeron se enumeran en la Tabla 9.

Tabla 9.

Nombre de Ab	Ab origen	sustitución de VH	región constante	Nombre del Ab
CD73.4	11F11	T25A	IgG2CS	CD73.4-IgG2CS
CD73.4		T25A	IgG2CS-IgG1.1f	CD73.4-IgG2CS IgG1.1f
CD73.6		T25A, G54S	IgG2CS-IgG1.1f	CD73.6-IgG2CS IgG1.1f
CD73.8		T25A, L52W, G54S	IgG2CS-IgG1.1f	CD73.8-IgG2CS IgG1.1f
CD73.10		T25A, L52W, G54E	IgG2CS-IgG1.1f	CD73.10-IgG2CS IgG1.1f
CD73.10		T25A, L52W, G54E	IgG1.1f	CD73.10-IgG1.1f
CD73.10		T25A, L52W, G54E	IgG2CS	CD73.10-IgG2CS
CD73.11	4D4	A25, W52, E54	IgG2CS	CD73.11-IgG2CS

La secuencia de aminoácidos de CD73.4-IgG2CS IgG1.1f se muestra en la Figura 18 (SEQ ID NO: 189).

Los anticuerpos CD73.3-CD73.11 se produjeron como sigue. Se usó la cadena ligera VK2 (SEQ ID NO: 102) para los anticuerpos que derivaban de 11F11 (CD73.4, CD73.6, CD73.8 y CD73.10). Las cadenas pesadas y ligeras se expresaron en células HEK293-6E y los medidos de cultivo se recogieron 5 días después de la transfección.

La unión de las construcciones a FcγR humanos se midió por SPR hCD64 y los datos de la unión de hCD32a-H131

para moléculas de IgG1.1 y IgG2 eran coherentes con los valores esperados para las diferentes Fc. IgG1.1f es la Fc más inerte. IgG2 y IgG2-C219S mostró unión típica a FcR para IgG2. Como cabía esperar, los datos para IgG2-C219S-G1.1f sugieren unión significativamente más débil que IgG1 o IgG2 tipo silvestre, pero unión incrementada en comparación con IgG1.1f. IgG2-C219S-G1.1f tenía unión débil de hCD32a-H131 ( $K_D$  de 2.3  $\mu$ M) y la afinidad de unión a otros receptores Fc $\gamma$ R eran menor que 5  $\mu$ M. La afinidad de unión de IgG2-C219S-G1.1f a Fc $\gamma$ R cyno era mayor que 5  $\mu$ M. EL análisis por SPR de la unión de IgG2-C219S-G1.1f a FcRn humano mostró unión dependiente de pH (fuerte a pH 6 y unión débil con disociación rápida a pH 7,4).

Se encontró que las preparaciones recombinantes con frecuencia carecen de Lys C-terminal de la cadena pesada. Por ejemplo, el 97 % de las cadenas pesadas del anticuerpo CD73.4.IgG2-C219S-G1.1f carecían de la lisina C-terminal. Determinadas preparaciones tenían pyro-Q en la Q (glutamina) N-terminal de la cadena pesada. Por ejemplo, el 94 % de la glutamina N-terminal de la cadena pesada del anticuerpo CD73.4.IgG2-C219S-G1.1f era pyro-Q.

### 15 Ejemplo 3: Características de unión de los anticuerpos anti-CD73

#### A. Resonancia de plasmón superficial (SPR)

Se estudiaron las cinéticas de unión a CD73 y la afinidad mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) usando un instrumento Biacore T100 (GE Healthcare) a 25 °C.

Un formato experimental ensayó la unión del dominio N-terminal de hCD73 (que consistía en los restos 26-336 de la CD73 humana; denominado N-hCD73) a anticuerpos que se capturaron sobre superficies de proteína A inmovilizadas. Para estos experimentos, la proteína A (Pierce) se inmovilizó a una densidad de 3.000 - 4.000 RU sobre células de flujo 1-4 de un chip sensor CM5 (GE Healthcare) usando el compuesto químico convencional etil(dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/ N-hdroxisuccinimida (NHS), con bloqueo de etanoamina, en un tampón de ejecución de HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tween 20 al 0,005 % v/v. Los experimentos cinéticos se realizaron primero capturando anticuerpos (5-10ug/ml) sobre las superficies de la proteína A usando un tiempo de contacto de 30 s a 10ul/min, con unión de N-hCD73-his 600, 200, 66,7, 22,2, 7,4, y 2,5 nM, usando 180 s de tiempo de asociación y 360 s de tiempo de disociación a una tasa de flujo de 30 ul/min. El tampón de ejecución para los experimentos cinéticos era de fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 130 mM, Tween 20 al 0,05 %, pH 7,1. Las superficies se regeneraron después de cada ciclo usando dos pulsos de 30 s de glicina 10 mM pH 1,5 a una tasa de flujo de 30  $\mu$ l/min. Los datos del sensograma eran doblemente referenciados y a continuación se fijaron a un modelo 1:1 Langmuir usando el programa informático v2.0.4 de Biacore T100, para determinar la constante de la tasa de asociación ( $k_a$ ), la constante de la tasa de disociación ( $k_d$ ), y la constante de disociación en equilibrio ( $KD$ ).

Los resultados se muestran en la Tabla 10. La tabla compila los datos de los diferentes experimentos. Para los anticuerpos para los cuales se muestran dos o más conjuntos de números, cada conjunto corresponde a datos obtenidos en un experimento separado.

Tabla 10.

Cinéticas de unión de mAb de CD73 a N-hCD73-his (hCD73(26-336)His) a 25 °C				
mAb	Fc	$k_a$ (1/MS)	$k_d$ (1/s)	KD (nM)
11F11	IgG2	2,6E+05	4,2E-04	1,6
		2,9 E+05	1,6:E-04	0,56
4C3	IgG1	2,2E+04	2,4E-03	110
		2,4 E+04	2,2:E-03	92
4D4	IgG2	8,2E+04	7,7E-04	9,4
		7,9 E+04	4,9:E-04	6,2
10D2	IgG4	6,1E+05	9,5E-04	1,6
11A6	IgG1	5,5E+04	7,6E-03	140
1H9	IgG1	3,3E+05	9,3E-04	2,8
24H2	IgG4	2,3E+05	3,2E-03	14
5F8	IgG1	1,5E+05	6,0E-03	41
6E11	IgG1	5,7E+04	1,4E-03	25
7A11	IgG1	8,8E+05	3,8E-04	0,43
CD73.4	IgG1.1f	4,2E+05	3,9:E-04	0,92
CD73.4	IgG2-C219S	2,9 E+05	1,6:E-04	0,55
		2,8 E+05	3,3:E-04	1,2
		2,9 E+05	3,7:E-04	1,3
		3,5 E+05	4,4:E-04	1,2
CD73.4	IgG2-C219S-IgG1.1f	3,1 E+05	3,5:E-04	1,1

(continuación)

Cinéticas de unión de mAb de CD73 a N-hCD73-his (hCD73(26-336)His) a 25 °C				
mAb	Fc	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
		3,3 E+05	1,4:E-04	0,43
		3,1 E+05	1,3:E-04	0,42
		3,2 E+05	1,5:E-04	0,47
		3,1 E+05	4,1:E-04	1,4
		2,7 E+05	3,8:E-04	1,4
		3,0 E+05	4,1:E-04	1,4
		3,1 E+05	4,2:E-04	1,3
		3,2 E+05	4,3:E-04	1,3
		2,9 E+05	4,0:E-04	1,4
CD73.10	IgG1.1f	2,7 E+05	1,3:E-03	4,7
CD73.10	IgG2-C219S	2,2 E+05	1,4:E-03	6,2
		2,2 E+05	1,8:E-03	8,3
CD73.10	IgG2-C219S-IgG1.1f	2,4 E+05	1,4:E-03	5,7
		2,3 E+05	1,60E-03	6,8
CD73.3	IgG1.1f	1,6 E+04	3,6:E-03	220
CD73.11	IgG2-C219S	8,0 E+04	2,8:E-04	3,5
		7,9 E+04	5,1:E-04	6,5
CD73.6	IgG1.1f	3,7 E+05	2,5:E-04	0,68
CD73.6	IgG2-C219S-IgG1.1f	3,0 E+05	2,2:E-04	0,72

La  $K_D$  en la tabla es la  $K_D$  monovalente, es decir, La  $K_D$  de la unión de los anticuerpos a la porción N-terminal de CD73 humana, la cual es monovalente.

5 La mutación G54S se tolera y parece que incrementa ligeramente la afinidad, con la eliminación del sitio de isomerización DG previsto. La mutación L52W parece causar una disminución en la afinidad de aproximadamente 10 veces. Las variantes 4D4 tienen secuencias de CDR3 únicas y diferentes cinéticas (asociación más lenta en comparación con moléculas 11F11).

10 La  $K_D$  media de 10 experimentos para CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f es  $1,1 \pm 0,4$  nM. La mutación T25A relativa a 11F11 no afecta la afinidad.

Los resultados muestran que todos los anticuerpos anti-CD73 se unen a CD73 humana con buena afinidad y tienen una tasa de disociación lenta.

15 Los resultados de los estudios de unión indican que la actividad de unión se mantuvo después de la introducción de mutaciones en 11F11, 4C3 o 4D4, o cambio de isotipo, aunque algunos anticuerpos tenían afinidad reducida en relación al anticuerpo original (es decir, 11F11, 4C3 o 4D4). En particular, CD73.10 (T25A,L52W,G54E) tiene una tasa de disociación más rápida que CD73.4 (T25A) o CD73.11 (4D4). La comparación con todas las moléculas de  
20 IgG2 indica que 11F11 y CD73.4 (11F11-T25A) tienen la afinidad de CD73 monovalente más alta ( $KD = 1,1$  nM  $\pm$  0,4 nM). CD73.10 (11F11-T25A, L52W, G54E) tienen afinidad de CD73 aproximadamente 10 veces menor que 11F11 o CD73.4. Esto sugiere que las mutaciones de L52W o G54E o ambas reducen la afinidad de CD73 cuando  
25 junto con otras secuencias de 11F11. 4D4 y CD73.11 tienen afinidad comparable con CD73.10 ( $KD$  aproximadamente 5 nM), pero diferentes cinéticas. Se cree que el epítipo 4C3 incluye regiones de dominios N y C-terminales de CD73, por lo tanto, la  $KD$  medida para un dominio N-terminal aislado es débil ( $KD = 100-200$  nM).

También se investigó la unión de CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f a CD73 cyno. Se comparó la especificidad de CD73.4-IgG2- C219S-IgG1.1f para la unión a CD73 de mono cynomolgus con la de la unión a CD73 humana por  
30 resonancia de plasmón superficial (SPR) usando un instrumento Biacore T100 (GE Healthcare) a 25 °C. El dominio extracelular de longitud completa de o bien CD73 humana (que consistía en los restos 27-547 de CD73 humana unidos a una etiqueta His, denominado hCD73-his) o CD73 de cynomolgus (que consistía en los restos 27-547 de CD73 de cynomolgus unidos a una etiqueta His, denominado cy-CD73-his) se ensayaron para la unión a anticuerpos que se capturaron sobre superficies de proteína A inmovilizadas. Para estos experimentos, la proteína A (Pierce) se inmovilizó a una densidad de 3.000 - 4.000 RU sobre células de flujo 1-4 de un chip sensor CM5 (GE Healthcare)  
35 usando el compuesto químico convencional etil(dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/ N-hdroxisuccinimida (NHS), con bloqueo de etanoamina, en un tampón de ejecución de HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tween 20 al 0,005 % v/v. Los experimentos se realizaron primero capturando anticuerpos (5-10ug/ml) sobre las superficies de la proteína A usando un tiempo de contacto de 30 s a 10 ul/min, con unión a N-hCD73-his 600, 200, 66,7, 22,2, 7,4, y 2,5 nM o cyno-CD73-his, usando 180 s de tiempo de asociación y 360 s de tiempo de disociación a una tasa de flujo de 30 ul/min. El tampón de ejecución de estos experimentos era fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio  
40 130 mM, Tween 20 al 0,05 %, pH 7,1. Las superficies se regeneraron después de cada ciclo usando dos pulsos de

30 s de glicina 10 mM pH 1,5 a una tasa de flujo de 30 µl/min.

Los resultados, los cuales se muestran en la Figura 19, indican que CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f se une con afinidad similar y cinéticas a CD73 cyno y humana. CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f se une a dímero de CD73 humano y cyno de longitud completa con una KD de menos de 1 nM. Se observó reactividad cruzada no significativa de CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f a CD73 de ratón o rata.

Las cinéticas y la afinidad de un fragmento Fab aislado del anticuerpo 11F11 también se evaluó por SPR. En estos experimentos, el dominio Fab de un anticuerpo anti-6xHis se inmovilizó sobre un chip sensor CM5 usando EDC/NHS a una densidad de -3.000 RU. Se capturó hCD73 de longitud completa a densidad de 10 RU en Fc2 (1 ug/ml hCD73-his), la densidad de 40 RU en Fc3 (5ug/ml de hCD73-his) y 160 RU de densidad en Fc4 (20ug/ml hCD73-his), usando un tiempo de contacto de 30 s a 10 ul/min. A continuación, el fragmento Fab de 11F11 (purificado del anticuerpo 11F11 reducido en L-cisteína escindido con pepsina) se ensayó para unión a 400, 135, 44.4, 14.8, 4.9, 1.7, 0.55 nM, usando tiempo de asociación de 180 s, tiempo de disociación de 600 s a 30 ul/min, en un tampón de ejecución de fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 130 mM, Tween 20 al 0,05 %, pH 7,1. Las superficies se regeneraron después de cada ciclo usando dos pulsos de 15 s de glicina 10 mM pH 2,0 a una tasa de flujo de 30 µl/min. Los datos del sensograma eran doblemente referenciados y a continuación se ajustaron a un modelo 1:1 Langmuir usando el programa informático v2.0.4 de evaluación Biacore T100, para determinar la constante de la tasa de asociación (ka), la constante de la tasa de disociación (kd), y la constante de disociación en equilibrio (K<sub>D</sub>). Los resultados se muestran en la Tabla 11 de a continuación.

**Tabla 11.**

Cinéticas de unión de 11F11-Fab a superficie de hCD73-his a 25 °C			
Densidad de superficie de hCD73-his (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K <sub>D</sub> (nM)
10	1,2E+06	8,7E-04	0,73
40	1,2E+06	8,7E-04	0,73
160	1,1E+06	8,5E-04	0,77

Por tanto, los resultados muestran que el fragmentos Fab de 11F11 tiene alta afinidad para hCD73 ((K<sub>D</sub> de aproximadamente 0,74 nM).

**B. Unión de anticuerpos de CD73 a células CD73 positivas**

Las curvas de unión de titulación se produjeron con anticuerpos de CD73 en Calu6 (expresores endógenos de CD73; línea celular de adenocarcinoma pulmonar humano), DMS114 (CD73 negativa; línea celular de cáncer de pulmón de célula pequeña humana), CHO-cynoCD73 (cynoCD73-transfectadas) y CHO-K1 (cynoCD73 negativa), células que usan anti-IgG humana de cabra Alexa Fluor® 647 (H+L) como un anticuerpo secundario, Invitrogen Cat N.ºA-21445, usando el siguiente método: se pusieron en placa 100.000 células en 100ul de PBS+2 % FBS por pocillo y se bloquearon durante 20 min. Usando una placa de 96 pocillos profundos de fondo en U, volúmenes de anticuerpo y PBS+2 % FBS se combinaron como se dicta en la Tabla 12 de a continuación.

**Tabla 12.**

Clon	[Reserva] (mg/ml)	[Cepa] (mg/ml)	Vol Ab (ul)	Vol TM (ul)
11F11	3,70	0,020	2,92	537,1
CD73.10-IgG1.1f	1,3	0,020	8,31	531,7
CD73.10-IgG2	1	0,020	10,80	529,2
CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f	1	0,020	1-/80	529,2
CD73.4-IgG2	2,3	0,020	4,70	535,3
CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f	2	0,020	5,40	534,6
CD73.4-IgG1.1f	2,3	0,020	4,70	535,3

Se realizó una dilución serial 1:8 diluyendo un sexto del volumen (90 ul) en 450 µl de PBS+2 % FBS. La placa celular se centrifugó durante 5 minutos a 1.500 rpm. Se añadió 100 ul de anticuerpo diluido por pocillo de la placa. Se añadió 100 ul de PBS+2 % FBS a todos los otros pocillos. Las placas se tiñeron en hielo durante 45 min, se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 min y se lavaron dos veces en 200 ul de PBS + 2 % FBS por pocillo. Los pocillos que han recibido anticuerpo no conjugado, más un pocillo no teñido por línea celular, se resuspendieron en 100 ul de APC anticuerpo anti-secundario humano (20 ug/ml). 100 ul de PBS+2 % FBS se añadieron a todos los otros pocillos, y se tiñeron en hielo durante 45 min. Las placas se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 min y se lavaron en 200 ul de PBS+2 % FBS por pocillo. Las placas se lavaron de nuevo, se resuspendieron en 200 ul de FBS al 2 % en PBS por pocillo y las muestras se trataron.

Los resultados, los cuales se muestran en las Figuras 20A1, 20A2, 20B1, 20B2, 20C1, 20C2, 20D1, 20D2, y la Tabla 13, indican que todos los anticuerpos de CD73 se unen a células que se expresan de manera natural CD73 (células Calu6) y células CHO transfectadas para expresar cyno CD73, pero que los anticuerpos no se unen a células que no expresan CD73 (DMS114 y CHO-K1). La CE50 de unión obtenida para cada anticuerpo se muestran en la Tabla 13.

5

**Tabla 13.**

Anticuerpo	CE50 nM Calu6	CE50 nM CHO-cynoCD73
11F11	0,78	0,58
CD73.10-IgG1.1f	0,64	0,67
CD73.10-IgG2	0,85	1,24
CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f	0,85	1,27
CD73.4-IgG2	0,49	0,34
CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f	0,53	0,51
CD73.4-IgG1.1f	0,43	0,45

La CE50 de unión de CD73.4-IgG2-IgG1.1f a líneas celulares tumorales humanas era de 0,5 nM (intervalo de 0,3 a 0,67 nM). La CE50 de unión CD73.4-IgG2-IgG1.1f a células CHO transfectadas con CD73 cyno era de 0,3 nM (intervalo de 0,1 a 0,5 nM).

10

También se determinó la unión de anticuerpo CD73.4 a linfocitos B y T humanos. Se obtuvo sangre de dos donantes, D316 y D329, de Immunscreens, BMS. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron con medios de gradiente de separación celular de linfocito H. Se incubaron PBMC con anticuerpos CD73.4-IgG2 marcados con FITC serialmente diluidos, CD73.4-IgG2-IgG1.1f, o CD73.4-IgG1.1f, y se identificaron linfocitos B y linfocitos T con anticuerpos marcados con fluorocromo para CD3 y CD20. Las células de ambos donantes se agrupó para las muestras control no teñidas y FMO (Fluorescencia menor uno). Los resultados, los cuales se muestran en las Figuras 20E y F y la Tabla 14, indican que los anticuerpos se unen específicamente a linfocitos B y T humanos.

15

20

**Tabla 14:** CI50 de unión de anticuerpos de CD73 a linfocitos B y T

	IC50 (nM) linfocitos B	IC50 (nM) linfocitos T
D316 mAb-CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f	0,1648	0,1829
D316 mAb-CD73.4-IgG2	0,1588	0,1799
D316 mAb-CD73.4-IgG1.1f	0,0994	0,1263
D329 mAb-CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f	0,1454	0,2406
D329 mAb-CD73.4-IgG2	0,07766	0,1348
D329 mAb-CD73.4-IgG1.1f	0,1356	0,2248

#### **Ejemplo 4: Características biofísicas de unión de los anticuerpos anti-CD73**

##### **A. Cromatografía de exclusión por tamaño acoplada a un detector de dispersión de luz multiángulo en línea (SEC-MALS)**

25

El estado oligomérico de mAb de CD73 se examinaron por cromatografía de exclusión por tamaño acoplada a un detector de dispersión de luz multiángulo en línea (SEC-MALS). Se realizaron separaciones isocráticas sobre una columna Shodex PROTEIN KW-803 conectada a una Prominence Shimadzu UFLC en tampón que contiene K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 200 mM, NaCl 150 mM, pH 6,8, que contiene Na azida al 0,02 % (0,1 µm filtrada) que corre a 0,5 ml/min. Las muestras se inyectaron en la columna usando un automuestreador SIL-20AC Prominence Shimadzu y los datos se obtuvieron de tres detectores en línea conectados en serie: un espectrofotómetro por UV/vis de matriz de diodos Prominence SPD-20AD seguido por un detector de dispersión de la luz multiángulo Wyatt miniDAWN™ TREOS a continuación un detector de índice refractivo Wyatt Optilab T-REX. Los datos (mostrados en la Tabla 15 de a continuación) se recogieron y se analizaron usando el programa informático de Astra (Wyatt) and Labsolutions (Shimadzu). Los resultados se muestran en la Tabla 15.

30

35

##### **B. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

40

La estabilidad térmica de mAb de CD73 se determinó usando un instrumento de DSC capilar MicroCal (GE Healthcare). Los anticuerpos se analizaron a una concentración de 0,5-0,75 mg/ml en PBS pH 7,1. Para estabilizar las condiciones de partida del instrumento de DSC y obtener un historial térmico consistente, se registraron múltiples barridos del tampón solo en tanto en la célula muestra como en la de referencia antes del análisis de la muestra. Los barridos de la muestra contenían mAb en la célula muestra y PBS pH 7,1 en la célula de referencia. Todos los barridos se llevaron a cabo desde 10-110 °C a una tasa de barrido de 60/h usando un periodo de termostato preciclo de 5 minutos. Los datos (como se muestran en la Tabla 15 de a continuación) se analizaron usando el programa informático de análisis DSC MicroCal Origin Cap. Los barridos en blanco de tampón-tampón apropiados se restaron

45

a los datos muestra-tampón, y los valores de la temperatura del punto medio de la transición ( $T_m$ ) se determinaron ajustando los datos a un modelo de no 2 estados. Los resultados se muestran en la Tabla 15.  $T_{m1}$ ,  $T_{m2}$  y  $T_{m3}$  son las  $T_m$  para diferentes dominios en los anticuerpos.

Tabla 15. SEC-MALS y DSC

mAb	Fc	SEC% HMW	SEC% Monomero	SEC%LMW	Masa MALS (pico principal/monomero)	DSC Tactivación (oC)	DSC Tm1 (oC)	DSC Tm2 (oC)	DSC Tm3 (oC)
7A11		0,5	98,5	0,5	146,3	56,0	64,8	70,2	82,8
6E11		2,1	97,6	0,1	145,2	55,0	62,3	72,0	83,3
11F11		0,8	99,2	0,0	143,3	64,0	73,3	78,0	
5F8		2,3	97,7	0,0	143,8	59,0	68,7	82,7	
4C3		0,9	94,4	4,5	142,7	60,0	66,9	71,2	82,7
11A6		4,8	94,0	0,0	143,2	61,0	66,0	71,4	82,1
10D2		1,1	98,8	0,0	141,4	61,0	67,7	77,1	
24H2		0,0	100,0	0,0	142,4	62,0	71,7	76,9	79,8
4D4		3,2	96,8	0,0	144,2	62,0	71,7	77,0	79,9
CD73.4	IgG1.1f		98,2	1,8	140,4	59	65,5	81,2	
CD73.4	IgG2-C219S					60	72,9	77,5	
CD73.4	IgG2-C219S-IgG1.1f	0,4	99,6		141,5	59	68,4	78,3	
CD73.10	IgG1.1f	0,4	99,6		135,9	55	64,2	78,2	
CD73.10	IgG2-C219S		100		152	61	73,2	77,0	
CD73.10	IgG2-C219S-IgG1.1f		100		139,5	61	70,4	76,5	84,1
CD73.3	IgG1.1f	0,6	99,4		146,1	56	64,8	75,0	83,4
CD73.11	IgG2-C219S					61	73,4	77,9	
CD73.6	IgG1.1f	0,2	99,7	0,0	142,0	58	64,2	79,7	
CD73.6	IgG2-C219S-IgG1.1f	0,3	99,7	0,1	142,3	60	70,1	77,4	84,6

Los resultados muestran que todos los anticuerpos son mayormente monoméricos y son estables.

### Ejemplo 5: Inhibición de la actividad enzimática por anticuerpos anti-CD73

#### 5 A. Inhibición de la actividad enzimática de CD73 unida a perla

Para valorar la inhibición de la actividad enzimática de CD73 unida a perla por anticuerpos anti-CD73, se usaron los siguientes materiales y métodos:

#### 10 Materiales

tampón TM: Tris 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM en agua

Tampón fosfato de sodio 0,5 mM, pH8,0

15 Tampón de lavado (10 ml de fosfato de sodio 0,5 mM, pH 8,0; 10 ml de NaCl 5M; 34 ml de agua; 10 ul de Tween-20)

sal de adenosina 5'-monofosfato disodio, Sigma Cat N.º 01930-%G, 300 mM en tampón TM

Hidrato de sal de adenosina 5'-trifosfato disodio, Sigma Cat N.º A6419-1G, 100 mM en tampón TM rhCD73, 0,781 mg/ml de CD73 cyno, Sino Biological Inc Cat N.º 90192-C08H

perlas de etiqueta his magnéticas, Invitrogen Cat N.º 10103D

20 ensayo de viabilidad celular por luminiscencia CellTiter-Glo®, Promega Cat N.º G7572 mAbO, un anticuerpo no relacionado que no se une a CD73

#### Métodos

25 Se condujo una dilución serial 1:6 de los anticuerpos anti-CD73 enumerados en la Tabla 16 (concentración máxima 10 ug/ml) combinando volúmenes como los dictados en la Tabla 16 y diluyendo 3 veces (transfiriendo 225 ul en 450 ul de tampón TM). Todos los anticuerpos con bisagra de IgG2 contenían la mutación C219S.

**Tabla 16.**

Clon	[Reserva] (mg/ml)	[Estim] (mg/ml)	Vol Ab (ul)	Vol TM (ul)
mAbO	5,38	0,010	1,25	673,7
F3713.11F11.F3.A4	3,70	0,010	1,82	673,2
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f	1,3	0,010	5,19	669,8
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2	1	0,010	6,75	668,3
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	1	0,010	6,75	668,3
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2	2,3	0,010	2,93	672,1
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	2	0,010	3,38	671,6
mAb-CD73.4-Vh-IgG1.1f	2,3	0,010	2,93	672,1

30 Las perlas magnéticas (2 ul de perlas por muestra) se lavaron en 1 ml de tampón de fosfato de sodio en un tubo de microcentrifuga. Las perlas se sedimentaron con el imán y se resuspendieron en 400 ul de tampón TM. Para cada especie de CD73: En un tubo separado, se combinó CD73 (75 ng por muestra) con TM para aumentar el volumen hasta 400 ul. Se preparó un tercer tupo para perlas en blanco (no CD73). La suspensión de perla se combinó con solución de rhCD73 y se mezcló sobre un agitador durante 5 min a temperatura ambiente. Las perlas se sedimentaron con un imán y las perlas se lavaron en 1 ml de tampón de lavado. Las perlas se sedimentaron con un imán y se resuspendieron en tampón TM (40 ul por muestra). Las perlas se transfirieron a placas de 96 pocillos de PCR (40 ul por pocillo). Se añadieron 200 ul de HuMab de CD73 serialmente diluido a placas y se mezclaron bien. Las placas se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Se prepararon 700 ul de cada uno de ATP 400 uM (8X) y AMP 1,2 mM (8X). 650 ul de cada uno se combinaron para producir una mezcla reserva 4X AMP/ATP. Las perlas se sedimentaron y se lavaron dos veces con 200 ul de tampón TM por pocillo. Las perlas se sedimentaron de nuevo y se resuspendieron en 30 ul de tampón TM. Los 30 ul de perlas se transfirieron a placas en blanco de 96 pocillos. Se añadieron 10 ul de la 4x solución de reserva de AMP/ATP (concentración final AMP 150uM/ATP 50uM) y se mezclaron. Se añadieron 40 ul en pocillos control (concentración final AMP 150uM y/o ATP 50uM). Las placas se incubaron durante 15 min a 37 °C.

45 Los resultados se muestran en las Figuras 21A1, 21A2, 21B1, y 21B2, y la Tabla 17.

**Tabla 17:**

mAb	Fc	CE50 (nM)
11F11	IgG2	3,98
4C3	IgG1	3,63
4D4	IgG2	5,31
10D2	IgG1	6,94

(continuación)

mAb	Fc	CE50 (nM)
11A6	IgG1	3,12
24H2	IgG1	4,18
5F8	IgG1	5,76
6E11	IgG1	3,71
7A11	IgG1	2,86
CD73.4	IgG1.1f	3,25
CD73.4	IgG2-C219S	2,72
CD73.4	IgG2-C219S-IgG1.1f	2,97
CD73.10	IgG1.1f	4,69
CD73.10	IgG2-C219S	7,54
CD73.10	IgG2-C219S-IgG1.1f	4,84

Los resultados de la inhibición enzimática de CD73 cyno se exponen en la Tabla 18.

**Tabla 18:**

mAb	Fc	CE50 (nM)
CD73.4	IgG1.1f	7,123
CD73.4	IgG2-C219S	3,658
CD73.4	IgG2-C219S-IgG1.1f	4,572
CD73.10	IgG1.1f	10,2
CD73.10	IgG2-C219S	8,783
CD73.10	IgG2-C219S-IgG1.1f	9,935

5

Los resultados muestran que los anticuerpos inhiben dependientemente de la dosis la actividad enzimática de CD73 humana. CD73.4.IgG2-C219S-IgG1.1f tiene una CE50 de 2,97 (intervalo de 2,9 a 3,1 nM) en el ensayo de inhibición de enzima CD73 humana recombinante. CD73.4.IgG2-C219S-IgG1.1f tiene una CE50 de 3,7 (intervalo de 1,6 a 12,6 nM) en el ensayo de inhibición de enzima CD73 humana recombinante. Por tanto, todos los anticuerpos para CD73 ensayados inhiben la actividad enzimática de CD73 humana y cyno unida a perla.

10

#### B. Inhibición de la actividad enzimática de CD73 en células Calu6

La muestra describe la valoración de células Calu6 (CD73 positivas) y células DMS-114 (CD73 negativas) para la desfosforilación de CD73 de AMP después del tratamiento con anticuerpos anti-CD73.

15

#### Materiales:

anticuerpos de CD73; véase la tabla de a continuación

20

Anticuerpo control MabO, 5,38 mg/ml

tampón TM: Tris 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM en agua

sal de adenosina 5'-monofosfato disodio, Sigma Cat N.º 01930-5G, 300 mM en tampón TM

Hidrato de sal de adenosina 5'-trifosfato disodio, Sigma Cat N.º A6419-1G, 100 mM en tampón TM rhCD73, 0,781 mg/ml

25

ensayo de viabilidad celular por luminiscencia CellTiter-Glo®, Promega Cat N.º G7572

#### Métodos:

Los anticuerpos se diluyeron serialmente combinando volúmenes de anticuerpos purificados y PBS como se dicta en la Tabla 19 de a continuación en una placa de 96 pocillos de fondo en U. Se realizaron diluciones seriales 1:6 con los anticuerpos (concentración máxima 25 ug/ml, 300 ul) y diluciones 5 veces, transfiriendo 60 ul en 240 ul de PBS, . Todos los anticuerpos con bisagra de IgG2 contenían la mutación C219S.

30

**Tabla 19.**

Clon	Conc (mg/ml)	Vol Ab (ul)	Vol PBS (ul)
mAbO	5,38	1,39	298,6
F3713.11F11.F3.A4	3,70	2,03	298,0
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f	1,3	5,77	294,2
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2	1	7,50	292,5
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	1	7,50	292,5
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2	2,3	3,26	296,7

35

(continuación)

Clon	Conc (mg/ml)	Vol Ab (ul)	Vol PBS (ul)
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	2	3,75	296,3
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f	2,3	3,26	296,7

5 Las células se recogieron con Versene y se recontaron. La placas se sembraron, se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 min y se resuspendieron en 100 ul de anticuerpo serialmente diluido. Todos los otros pocillos se resuspendieron en 100 ul de PBS. La incubación era a 37 °C durante 20 min. Se preparó 15 ml de una reserva 180 uM de AMP en tampón TM.

10 Las placas se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 min y se lavaron una vez con 200 ul de PBS/pocillo. Las placas se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron en 100 ul de AMP. Todos los otros pocillos se resuspendieron en 100 ul de tampón TM. Las células se incubaron con AMP durante 60 min a 37 °C. Se preparó 7,5 ml de una reserva 60 uM de ATP en tampón TM. Las placas se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 min y 50 ul del sobrenadante se transfirió a una placa de 96 pocillos en blanco. Se añadió 50 ul de ATP. Se añadió rhCD73 a determinados pocillos a 75 ng por pocillo como un control positivo. Los pocillos que no recibieron rhCD73 se rellenaron hasta 100 ul con tampón TM. La concentración final era de 90 uM de AMP: 30 uM de ATP. La incubación era de 37 °C durante 15 min. Para el ensayo CellTiterGlo (el cual detecta ATP), se añadió 100 ul por pocillo y se hizo la lectura de la placa.

15 Los resultados, los cuales se muestran en las Figuras 22A1, 22A2, 22B1, 22B2, y la Tabla 20, indican que los anticuerpos anti-CD73 inhiben la desfosforilación de AMP (o reducen el procesamiento de AMP) en las células Calu6 CD73 positivas humanas, pero no afectan a las células DMS114 CD73 negativas. La CE50 para el bloque de CD73 celular endógena en la línea de célula tumoral humana Calu6 del anticuerpo CD73.4-IgG2S-IgG1.1f es de 0,39 nM (intervalo de 0,31 a 0,48 nM). Estos experimentos se repitieron en células NCI-H292 (línea celular de carcinoma mucoepidermoide) y SK-MEL-24 (línea celular de melanoma humano) y los resultados son similares (Tabla 20).

**Tabla 20:**

Anticuerpo	CE50 unión Calu6 <sup>1</sup> (nM)	CE50 inhibición enz. <sup>2</sup> (nM)	CE50 inhibición Calu6 <sup>3</sup> (nM)	CE50 inhibición SKMEL24 <sup>3</sup> (nM)	CE50 inhibición H292 <sup>3</sup> (nM)
11F11	0,78	3,980	0,70	3,15	0,81
4C3	2,00	3,63	3,43	13,29	4,48
4D4	0,82	5,31			
11A6	1,93	3,12	2,21		
5F8	11,65	5,76	8,10	110,19	13,46
7A11	0,35	2,86	0,95	3,72	1,31
24H2		4,18			
10D2		6,94			
6E11	0,63	3,71	1,54	3,43	1,34
CD73.4-IgG2CS	0,49	2,72	0,34		
CD73.4-IgG1.1f	0,43	3,25	0,37		
CD73.4-IgG2S-IgG1.1f	0,53	2,97	0,39		
CD73.10-IgG2S-IgG1.1f	0,85	4,84	0,77		
CD73.10-IgG1.1f	0,64	4,69	0,77		
CD73.10-IgG2S	0,85	7,54	0,84		

<sup>1</sup> Valoración de la unión sobre células Calu6 con expresión de CD73 endógena. Los anticuerpos se ensayaron en 2-6 experimentos independientes, y se indica el valor promedio.

<sup>2</sup> Datos de la Sección A de este Ejemplo. Los anticuerpos se ensayaron en 1-5 experimentos independientes, y se indica el valor promedio.

<sup>3</sup> Inhibición de la actividad de CD73 celular en la línea celular indicada. Los anticuerpos se ensayaron en 2-4 experimentos independientes, y se indica el valor medio.

25 C. Inhibición de la actividad enzimática de CD73 en un ensayo de cAMP de línea celular dual ensayo de cAMP de fluorescencia homogénea resuelta en tiempo (HTRF)

Los anticuerpos de CD73 se diluyeron en serie con tampón PBS que contenía BSA al 0,2 % y se colocó en placa 5

5  $\mu$ l/pocillo en proxiplaca de fondo blanco de 384 pocillos (PerkinElmer, Waltham, MA). Las células Calu-6 se recogieron y resuspendieron en PBS que contenía BSA al 0,2 %, a continuación, se añadieron 5  $\mu$ l de células (300 células/pocillo) a la placa. Las células se incubaron con anticuerpos durante 10 min a 37 °C CO<sub>2</sub> al 5 % y humedad al 95 %, seguido por la adición de 5  $\mu$ l/pocillo de AMP 80 mM. Las células además se incubaron con AMP durante 10 minutos a 37 °C. Durante este tiempo, las células HEK293/A2AR se recogieron y se diluyeron a 0,4 millones/ml en PBS que contenía BSA al 0,2 %. Se añadieron dentro de la placa de ensayo a 5  $\mu$ l/pocillo y se continuaron incubando a 37 °C durante 1 h. Se realizaron ensayos de HTRF usando el kit de detección de cAMP HiRange de fluorescencia homogénea resuelta en tiempo homogénea (HTRF) (Cisbio, Bedford, MA) añadiendo 10  $\mu$ l/pocillo de d2 cAMP conjugado y 10  $\mu$ l/pocillo de criptato de europio conjugado con anticuerpo anti-cAMP en tampón de lisis según con las instrucciones del fabricante. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos y las señales de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) (665 y 615 nm) se leyeron usando un lector de placa Envision (PerkinElmer, Waltham, MA). La señal de FRET se calculó como la proporción de señal de los canales de 665 nm (aceptor) y 615 nm (donante) y se multiplicó por 10.000. Se midieron CI<sub>50</sub> e Y<sub>máx</sub>. Se determinó Y<sub>máx</sub> comparando con 100 nM de dosis de 11F11 como máximo interno. Se determinaron todos los cálculos como un porcentaje de inhibición en comparación con este control, los cuales hacían el 100 %.

20 Los resultados, los cuales se muestran en la Tabla 21, indican que los mAb anti-CD73 demostraron diferentes eficacias y potencias en este ensayo de cAMP usando un sistema de cultivo conjunto de línea celular. Todos los anticuerpos mostraron alguna reducción en la producción de adenosina, y el alcance de la inhibición era similar para la mayoría de los anticuerpos seleccionados. La mayor inhibición se vio para 11F11, 11A6, 4C3 y 5F8.

**Tabla 21:**

Sustancia	IC50 (nM)	Y <sub>máx</sub>
APCP	1,29	97
11A6	4,87	84
5F8	13,17	80
4C3	9,02	80
11F11	0,75	76
7A11	0,95	45

25 Los ensayos de inhibición enzimática también se condujeron con Fab y F(ab')<sub>2</sub> de 11F11. Los resultados, los cuales se muestran en la Figura 22C, indicaron que la inhibición enzimática ocurrió con el fragmento F(ab')<sub>2</sub>, pero no con el fragmento Fab. Por tanto, no se requiere la región Fc para la inhibición enzimática de 11F11, pero se requiere bivalencia.

30 La inhibición enzimática en las células Calu6 también se determinó para los anticuerpos CD73.4 que comprendían regiones constantes de la cadena pesada, los cuales se muestran en la Tabla 26, usando el ensayo de cAMP anteriormente descrito. Los resultados, en términos de CE50 y el nivel de inhibición frente a lo anterior ("S:B") se proporcionan en las últimas columnas de la Tabla 28. Los resultados indican que todos los anticuerpos CD73.4 inhiben la actividad enzimática de CD73 en las células Calu6.

35 D. Trascuro de tiempo temporal la inhibición de la actividad enzimática de CD73

40 La inhibición de la actividad enzimática también se evaluó en un trascurso temporal evaluando la generación de adenosina por LC/MS/MS. Se incubaron células Calu6 con 11F11 o 4C3 durante 30 minutos, 2 horas o 4 horas, seguido de la adición de 50  $\mu$ M de AMP y la evaluación de la producción de adenosina mediante LC/MS/MS usando métodos convencionales.

Condiciones de espectrometría de masas (Xevo TQ-S):

45 Instrumento: Xevo TQ-S (con Waters 2777C)

Tune = CD73_adenosna_MRM_tune2.ipr	
Ionización: (+) ESI	Temperatura de desolvatación (°C): 500
capilaridad (kV): 0,9	Gas de desolvatación (L/Hr): 1000
Cono (V): véase a continuación	Gas de cono (L/Hr): 150
Salida de la fuente V): 50	Nebulizador (Bar): 7,0
Resolución de LM 1: 2,81	Resolución de HM 1: 15,00
Resolución de LM 2: 2,93	Resolución de HM 2: 15,00
Energía iónica 1: 0,4	Energía iónica 2: 0,9
Flujo de gas de colisión (ml/min): 0,15	Colisión: véase a continuación
La muestra se desechó durante los primeros 0,5 min	

(continuación)

Tune = CD73_adenosna_MRM_tune2.ipr	
Waters Xevo TQ-S	Número de serie: WAA021

Los resultados, los cuales se muestran en la Figura 22D, indican que el tiempo de incubación hace una diferencia en el momento de 30 min y que la inhibición por 11F11 ocurre más rápidamente que por 4C3. Aunque ambos anticuerpos alcanzaron la misma inhibición en momentos más tardíos, el anticuerpo 11F11 inhibe más rápidamente la actividad enzimática de CD73.

### Ejemplo 6: Internalización de CD73 mediada por anticuerpo

La internalización de CD73 mediada por anticuerpo anti-CD73 se midió de dos maneras diferentes.

#### A. Ensayo de internalización de alto contenido (ensayo de tiempo fijado de 2 horas)

Los anticuerpos anti-CD73 se usaron para ensayar la internalización de CD73 dependiente de anti-CD73 en células Calu6 valorando la expresión celular después de 2 horas de incubación de anticuerpo. Se colocaron las células (2.000 células/pocillo) en 20 µl de medio completo (Gibco RPMI Media 1640 con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor) en placa 384 BD Falcon y se cultivaron durante una noche a 37 °C CO<sub>2</sub> al 5 % y humedad al 95 %. Los anticuerpos anti-CD73 se diluyeron serialmente con tampón PBS que contenía BSA al 0,2 % y se añadieron a 5 µl/pocillo en la placa celular. Las células se incubaron con anticuerpos durante 2 horas a 37 °C CO<sub>2</sub> al 5 % y humedad al 95 %, seguido de lavado una vez con tampón PBS. A continuación, se añadió formaldehído (4 % final en PBS) en placa celular a 20 µl/pocillo, y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después, se aspiró todo el líquido y las células se recogieron una vez con 30 µl de PBS. El anticuerpo de detección (2,5 µg/pocillo de anticuerpo anti-CD73 CD73.10.IgG2C219S) se añadió a 15 µg/pocillo en la placa celular fijada. Las células se incubaron a 4 °C durante una noche. Al día siguiente, la placa se lavó dos veces con tampón PBS, seguido de la adición de anticuerpo secundario que contenía anti humano de cabra Alexa-488 y DAPI, se tiñó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 3 lavados en tampón PBS, se realizó imagen de la placa en Arrayscan Vti (Cellomics, Pittsburgh, PA). Se midieron Cl<sub>50</sub> e Y<sub>máx</sub>. Se determinó Y<sub>máx</sub> comparando con 100 nM de dosis de 11F11 como máximo interno. Se determinaron todos los cálculos como un porcentaje de internalización en comparación con este control, los cuales hacían el 100 %.

Los resultados se proporcionan en la tabla 22.

**Tabla 22:**

mAb	región constante	Clase Epitopo	CE50 (nM)	Y <sub>máx</sub>
11F11	IgG2	1	0,58	98
4C3	IgG1	2	ND	NA
4D4	IgG2	1	0,38	104
10D2	IgG1	1	ND	29
11A6	IgG1	1	ND	NA
24H2	IgG1	1	8,2	51
5F8	IgG1	2	ND	NA
6E11	IgG1	1	ND	NA
7A11	IgG1	1	2,59	50
CD73.4	IgG2-C219S-IgG1.1f	1	1,2	97
CD73.10	IgG1.1f	1	6,18	64
CD73.10	IgG2-C219S	1	0,67	99
CD73.10	IgG2-C219S-IgG1.1f	1	0,87	99
ND = No detectado NA=no aplicable				

Por tanto, los resultados indican que la CE50 de la internalización de CD73 mediada por CD73.4.IgG2-C219S-IgG1.1f en la línea celular de expresión de CD73 humana Calu6 era de 1,2 nM, y que el nivel máximo de internalización en la línea celular era de 97,5 %.

Los ensayos de internalización también se condujeron con Fab y F(ab')<sub>2</sub> de 11F11. Los resultados, los cuales se muestran en la Figura 22C, indicaron que la internalización ocurría con el fragmento F(ab')<sub>2</sub>, pero no con el fragmento Fab. Por tanto, no se requiere la región Fc para la internalización de 11F11.

Los estudios de internalización cinética se realizaron para valorar la tasa de internalización. Se colocaron las células

(2.000 células/pocillo) en 20 µl de medio completo (Gibco RPMI Media 1640 con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor) en placa 384 BD Falcon y se cultivaron durante una noche a 37 °C CO<sub>2</sub> al 5 % y humedad al 95 %. Se diluyeron anticuerpos de CD73 con tampón PBS que contenía BSA al 0,2 % a 10 µg/ml y se añadió 5 µl/pocillo en la placa celular. Las células se incubaron con anticuerpos durante 0-2 horas de trascurso temporal a 37 °C, seguido de lavado una vez con tampón PBS. Las células posteriormente se fijaron con formaldehído (4 % final en PBS) a temperatura ambiente durante 10 minutos, y a continuación se lavaron una vez con 30 µl de PBS. El anticuerpo de detección (2,5 µg/pocillo de anticuerpos anti-CD73 CD73.10.IgG2C219S) se diluyeron con tampón PBS que contenía BSA al 0,2 %, y añadió 15 µl/pocillo en la placa celular fijada. La placa se incubó a 4 °C durante una noche. Al día siguiente, después de 3 lavados en tampón PBS, se añadieron anticuerpo secundario anti humano de cabra Alexa488 con DAPI. Las células se tiñeron durante 60 minutos a temperatura ambiente, después de 3 lavados, se adquirieron imágenes usando Arrayscan Vti (Cellomics, Pittsburgh, PA). Los resultados se proporcionan en las Figuras 23A-23D y las Tablas 23 y 24. Los valores en la Tabla 24 derivan de los datos mostrados en las Figuras 23A-D.

15

**Tabla 23:**

Línea celular	Tipo de célula	11F11(IgG2) T <sub>1/2</sub> (min)	6E11 1T <sub>1/2</sub> (min)	CD73.10.IgG1.1f T <sub>1/2</sub> (min)
Calu6	Adenocarcinoma de pulmón humano	3,9	60,9	14,4
HCC44	Carcinoma de pulmón de célula no pequeña	3,3	27,9	23,5
H2030	Carcinoma de pulmón de célula no pequeña	3,3	40,3	18,3
H647	Carcinoma de pulmón de célula no pequeña	45,7	N/A	N/A
H2228	Carcinoma de pulmón de célula no pequeña	10,9	36,5	35,7
HCC15	Carcinoma de pulmón de célula no pequeña	2,2	84,4	37,9
SKLU1	Adenocarcinoma de pulmón	6,8	18,0	17,2
SKMES1	Melanoma	2,2	62,8	32,3
SW900	Carcinoma de pulmón de células escamosas	10,3	94,9	43,4

**Tabla 24:** T<sub>1/2</sub> y % de internalización de anticuerpos de CD73 en 4 líneas celulares humanas

	células H228		células HCC15		células Calu6		células H2030	
	T <sub>1/2</sub> min	% Internalización						
CD73.11-IgG2CS	-	-	-	-	4,1	89	4,6	85
CD73.10-IgG2CS	9,7	93	2,6	91	3,0	91	3,3	85
CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f	9,4	92	3,0	91	3,1	91	4,3	87
CD73.4-IgG2CS	13,8	94	3,1	94	6,5	88	3,7	89
CD73.10-IgG1.1f	35,7	33	37,9	71	14,4	63	18,3	67
CD73.3-IgG1.1f	16,5	-47	>240	38	111,4	79	>120	27
11F11	10,9	96	2,2	94	3,9	87	3,3	90
4C3	7,6	-48	141,5	28	0,6	-6	>120	-34
6E11	36,5	13	84,4	64	107,4	68	40,32	51

Los resultados indican que los anticuerpos clase 1(11F11 y sus derivados CD73.4 y CD73.10) mostraron unos buenos valores de internalización  $CE_{50}$  y máximo (97,5 %), aunque algunos anticuerpos se internalizaron más que otros. 11F11 era el más activo e internalizado en minutos, alcanzando una meseta en los 30 minutos, mientras que 6E11 (también un anticuerpo clase 1, IgG1) se internalizó más lentamente, alcanzando una meseta a aproximadamente 1 h (Figuras 23A-D). Los anticuerpos clase 2 (5F8 y 4C3) no se internalizaron significativamente. Además, la presencia de bisagra de IgG2 y el dominio CH1 aumentaron la velocidad y el alcance de internalización. La tendencia se observó en diversas líneas celulares (Figuras 23A-D y Tabla 24).

**B. Internalización medida por citometría de flujo**

La internalización de CD73 mediada por anticuerpo anti-CD73 también se ensayó mediante citometría de flujo. Las células indicadas se incubaron con 10  $\mu\text{g/ml}$  del anticuerpo indicado durante 30 minutos en hielo, se lavaron varias veces, y se transfirieron a 37 °C durante el tiempo indicado. Las células se recogieron en el mismo momento después del tiempo de incubación indicado. Las células se tiñeron con anticuerpo primario de nuevo (el mismo anticuerpo usado para la incubación inicial) seguido de anticuerpo secundario anti humano. A continuación, se valoró la expresión de CD73 en las células mediante citometría de flujo.

Los resultados, los cuales se muestran en las Figuras 23E y la Tabla 25, son coherentes con los obtenidos en los ensayos de internalización anteriormente descritos, e indican que, todos los anticuerpos con bisagra de IgG2 y CH1 indujeron rápida y completa internalización. Los niveles de CD73 permanecieron bajos después de 22 horas después del lavado, indicando que la internalización es duradera.

Se obtuvieron resultados similares, mostrados en la Figura 23F y la Tabla 25, en la línea celular NCI-H292, en la que el anticuerpo se mantuvo en cultivo durante el tiempo de incubación (no lavado). De nuevo, estos datos indican internalización rápida y significativa y mantenimiento de la regulación por disminución de CD73 endógena.

Los ensayos de internalización también se condujeron con las células humanas SNU-C1 (línea celular de cáncer de colon) y NCI-H1437 (línea celular de carcinoma de pulmón de célula no pequeña. Los resultados, los cuales se muestran en las Figuras 23I y J y la Tabla 25, también indican rápida internalización con un nivel máximo alcanzado en 5 horas y un nivel máximo de internalización de aproximadamente el 50 % para CD73.4.IgG2-C219S-IgG1.1f en SNU-C1 y el 60 % para las células NCI-H1437. Las Figuras 23G y H muestran cinéticas similares de internalización de CD73.4.IgG2-C219S-IgG1.1f en células Calu6 y NCI-H292. Para las gráficas, las cuales muestran el % de CD73 internalizada, este número se obtuvo como sigue:

$$\% \text{ CD73 internalizada} = 100 - \left( \frac{IFM_{t=x} - IFM_{original}}{IFM_{t=0} - IFM_{original}} \times 100 \right)$$

en la que para cada anticuerpo,  $IFM_{t=x}$  es la IFM a un momento dado y  $IFM_{t=0}$  es la fluorescencia máxima a  $t=0$  y  $IFM_{original}$  es la IFM del anticuerpo secundario solamente.

**Tabla 25:** CE<sub>50</sub> de la internalización de CD73 mediada por anticuerpo en varias líneas celulares

	Calu6		NCI-H292		SNU-C1		SNU-C1 (no lavar)		NCI-H1437		NCI-H1437 (no lavar)	
	Ymáx (%)	T <sub>1/2</sub> (h)	Ymáx (%)	T <sub>1/2</sub> (h)	Ymáx (%)	T <sub>1/2</sub> (h)	Ymáx (%)	T <sub>1/2</sub> (h)	Ymáx (%)	T <sub>1/2</sub> (h)	Ymáx (%)	T <sub>1/2</sub> (h)
mAb-CD73.4-IgG2-IgG1.1f	76,8	0,5661	77,64	0,2633	48,96	0,4954	38,39	1,025	63,12	0,3164	62,78	0,3418
mAb-CD73.4-IgG2	75,59	0,6003	78,42	0,2766	-	-	-	-	-	-	-	-
mAb-CD73.4-IgG1.1f	44,99	1,737	51,49	0,2087	30,58	0,9915	33,16	2,33	49,76	0,4915	49,95	0,5384

Los ensayos de internalización se condujeron en células Calu6 y H292 para discriminar además el papel del isotipo sobre la internalización. Los ensayos de internalización se condujeron como se ha descrito anteriormente (protocolo sin la etapa de lavado de los anticuerpos), y los anticuerpos de isotipos híbridos variantes mostrados en la Tabla 26 se mantuvieron en el cultivo a 10 µg/ml durante el tiempo de incubación. Para los experimentos de citometría de flujo, el método del Ejemplo 6B se adaptó a análisis de alto rendimiento en placas de 96 pocillos (en lugar de placas de 48 pocillos) y con 50.000 células por pocillo.

**Tabla 26:** Regiones constantes ensayadas con las regiones variables de CD73.4:

<b>Construcciones</b>	<b>SEQ ID NO de la región constante</b>	<b>Descripción</b>
IgG1f	267	IgG1f tipo silvestre
IgG1.1f	272	IgG1.1f inerte convencional
IgG2.3	268	forma A de IgG2(C219S)
IgG2.5	271	forma B de IgG2 (C131S)
IgG2.3G1-KH	270	CH1, bisagra superior y bisagra inferior/CH2 superior de IgG2.3, todo lo demás IgG1f
IgG2.5G1-KH	279	CH1, bisagra superior y bisagra inferior/CH2 superior de IgG2.5, todo lo demás IgG1f
IgG2.3G1-AY	269	CH1 y bisagra superior de IgG2.3, todo lo demás IgG1f
IgG2.5G1-AY	278	CH1 y bisagra superior de IgG2.5, todo lo demás IgG1f
IgG 1-G2.3G1-KH	282	CH1 de IgG1, bisagra superior y bisagra inferior/CH2 superior de IgG2.3, todo lo demás IgG1f
IgG1-G2.3G1-AY	281	CH1 de IgG1, bisagra superior de IgG2.3, todo lo demás IgG1f
IgG2.3G1.1f-KH	273	CH1, bisagra superior y bisagra inferior/CH2 superior de IgG2.3, todo lo demás IgG1.1f
IgG2.5G1.1f-KH	277	CH1, bisagra superior y bisagra inferior/CH2 superior de IgG2.5, todo lo demás IgG1.1f
IgG1-deltaTHT	274	IgG1 con secuencia THT eliminada de la bisagra
IgG2.3-plusTHT	275	IgG2.3 con secuencia THT (de IgG1) añadida en la bisagra
IgG2.5-plusTHT	280	IgG2.5 con secuencia THT (de IgG1) añadida en la bisagra
IgG2.3-plusGGG	276	IgG2.3 con secuencia GGG flexible añadida en la bisagra

10 La unión de FcγR se muestra que es como se espera para cada construcción, es decir, la unión de FcγR está conducida por la región bisagra inferior/CH2.

Los resultados se muestran en las Figuras 23K, L, M y en la Tabla 27 y 28. Los datos mostrados en la Tabla 27 se generaron usando el mismo protocolo descrito en el Ejemplo 6B. Los datos mostrados en la Tabla 28 se generaron usando el mismo protocolo descrito en el Ejemplo 6A.

15

**Tabla 27:** Y<sub>máx</sub> y T<sub>1/2</sub> de internalización de CD73 mediada por anticuerpo en células Calu6 y NCI-292

	Calu6		NCI-H292	
	Y <sub>máx</sub> (%)	T <sub>1/2</sub> (h)	Y <sub>máx</sub> (%)	T <sub>1/2</sub> (h)
mAb-CD73.4-IgG1f/IC-11F11-Vk2	55,72	0,8452	73,05	0,5014
mAb-CD73.4-IgG2.3G1-AY-pTT5-SP	85,07	0,3326	90,25	0,272
mAb-CD73.4-IgG2.3G1-KH	81,62	0,3962	91,61	0,2801
mAb-CD73.4-G1-G2.3-G1-AY	72,7	0,4229	84,51	0,3083
mAb-CD73.4-IgG2-deltaTHT	69,27	0,5652	83,63	0,3441
mAb-CD73.4-G1-G2.3-G1-KH	65,67	0,5674	83,29	0,343
mAb-CD73.4-IgG2.3-pluSTHT	81,19	0,3551	91,41	0,2935
mAb-CD73.4-IgG2.3-plusGGG	81,72	0,3355	91,6	0,2712
mAb-CD73.4-IgG2.5	78,98	0,3485	89,56	0,3057
mAb-CD73.4-IgG2.5G1.1f-KH	79,63	0,3527	90,86	0,2993
mAb-CD73.4-IgG2.5G1-AY	81,91	0,2901	91,3	0,2452
mAb-CD73.4-IgG2.5G1-KH	76	0,2837	90,75	0,256
mAb-CD73.4-IgG2.5plusTHT/IC	80,15	0,2869	89,6	0,2565
mAb-CD73.4-IgG2-C219S/IC	82,35	0,3725	88,91	0,2866
mAb-CD73.4-IgG2-C219S/IC	82,54	0,3639	87,66	0,2845
mAb-CD73.4-IgG1.1f+K/IC	57,07	1,519	70,4	0,4969
mAb-CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f	80,98	0,3508	90,35	0,2764

**Tabla 28:** Internalización y características de inhibición enzimática de CD73.4 con diversas regiones constantes en células Calu6

N.º	CD73_mAb_Clones	Internalización		Inhibición de CD73	
		Máx	Velocidad	CE50 (nM)	S:B
1	CD73.4-IG1f/IC-11F11-Vk2	+	+	2,01	2
2	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3G1-AY-pTT5-SPS	++++	++++	2,37	56
3	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3G1-KH	++++	+++	1,70	52
4	CD73.4-Vh-hHC-G1-G2.3-G1-AY	++	++	0,38	6
5	CD73.4-Vh-hHC-G1-G2.3-G1-KH	++	++	0,63	3
6	CD73.4-Vh-hHC-IgG1-deltaTHT	++	+++	0,31	6
7	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3-plusTHT	++++	++++	1,54	33
8	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3-plusGGG	++++	++++	1,26	26
9	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5	++++	++++	2,17	51
10	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5G1.1f-KH	++	++++	0,87	45
11	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5G1-AY	+++	++++	0,43	52
12	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5G1-KH	+++	++++	0,44	42
13	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5plusTHT/IC	++++	++++	0,90	44
14	CD73.4-Vh-hHC-IgG2-C219S/IC	++++	++++	1,56	28
15	CD73.4-Vh-hHC-IgG2-C219S/IC	++++	++++	1,78	41
16	CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f+K/IC	+	+	0,70	2
17	CD73.4-Vh-hHC-IgG2C219S-IgG1.1f	++++	++++	1,28	12

Las Figuras 23K, L y M y las Tablas 27 y 28 indican que los anticuerpos que tienen una bisagra y el dominio CH1 del isotipo IgG2 son los más eficaces en conducir la internalización de CD73, mientras que los anticuerpos que tienen una bisagra de IgG1 y dominio CH1 corresponden a las curvas inferiores en la figura, es decir, alcance inferior de la internalización. Además, los anticuerpos con solamente la bisagra de IgG2 tienen una internalización incrementada en comparación con una bisagra de IgG1 humana. Por tanto, los anticuerpos que tienen una bisagra y el dominio CH1 del isotipo IgG2 tienen características de internalización superiores en relación con los anticuerpos con un isotipo IgG1.

Por tanto, El anticuerpo anti-CD73 mAb-CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f indujo rápida internalización dependiente sobre la célula ensayada. El T1/2 para la internalización osciló de minutos a por debajo de una hora. La mayoría de las líneas celulares ensayadas tenían un T1/2 por debajo de 10 minutos. Se indujo una internalización casi completa para algunas líneas celulares y todas las ensayadas tenían al menos una reducción del 50 % en la expresión de CD73 superficial que generalmente alcanzaba niveles máximos en 5 horas, menos en algunos casos.

Los datos de SEC-MALS y DLS demostraron que complejos más grandes se forma entre hCD73-his y los mAb que contenían una bisagra de IgG2 y región CH1 (IgG2-C219S o IgG2-C219S-IgG1.1f), en comparación con aquellos que contenían bisagra de IgG1 y región CH1 (IgG1.1f).

#### **Ejemplo: 7: Inhibición enzimática de CD73 en tumores en modelos animales de xenoinjerto**

Se trataron ratones portadores de tumores de Calu6 humana subcutáneos con CD73.10-IgG1.1, CD73.10-IgG2CS, o CD73.10-IgG2CS-IgG1.1 después de 7 días de crecimiento. Los anticuerpos se dosificaron a 10 mg/kg IP. Los tumores se recogieron en los días 1, 2, 3 y 7 después de la administración de anticuerpo, incrustados en OCT y congelados rápidamente en isopentano helado. Los tumores incrustados en OCT se cortaron en secciones de 5-6  $\mu\text{m}$  y se dejaron secar durante una noche a TA. Las secciones tumorales se fijaron durante 2,5 min con una mezcla 1:1 de formalina tamponado con fosfato al 10 % fría y acetona a continuación se preincubaron durante 1 h a TA en tampón Tris-maleato 50 mM, pH 7,4 que contenía  $\text{CaCl}_2$  2 mM y sacarosa 0,25 M. Después de 1 hora se separó el tampón de preincubación y se reemplazó por el mismo tampón suplementado con  $\text{MnCl}_2$  5 mM,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  2 mM, 2,5 % de Dextrano T200, levamisol 2,5 mM, y AMP 1 mM. La reacción enzimática se llevó a cabo durante 1 h a 37 °C. Después de un enjuague con agua DI, las secciones se incubaron durante exactamente 1 min con 1 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{S}$  seguido de un enjuague rápido en agua DI. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron con un medio de montaje basado en xilano. Un color marrón indica la presencia de CD73 activa, mientras que la carencia de color marrón indica que la actividad enzimática de CD73 estaba inhibida por el anticuerpo.

Los resultados indican que CD73.10-IgG1.1, CD73.10-IgG2CS, y CD73.10-IgG2CS-IgG1.1 inhiben la actividad enzimática de CD73 *in vivo*. Las secciones teñidas representativas de los tumores de ratones tratados con el anticuerpo CD73.10-IgG2CS-IgG1.1 se muestran en las Figuras 24A-E. Las secciones teñidas de los tumores de ratones tratados con los otros dos anticuerpos eran similares. El alcance de la inhibición de CD73 se correlacionó con los niveles en suero del anticuerpo. El nivel ligeramente mayor de la actividad de CD73 observada en el Día 3

ejemplo se correlacionó con un nivel en suero inferior del anticuerpo que el Día 7 ejemplo.

Un experimento similar al descrito anteriormente se condujo sobre ratones portadores de tumores de xenoinjerto derivados de adenocarcinoma de colon de SNUC1 humano subcutáneos y se trataron con el anticuerpo anti-CD73 CD73.4IgG2CS-IgG1.1f. Los ratones con tumores SNUC1 se trataron con CD73.4IgG2CS-IgG1.1f a 1, 3 y 10 mg/kg IP el día 0. Los tumores se recogieron a 24 h, 48 h, 72 h, 96 h y 168 h después de la dosificación. El ensayo de inhibición enzimática de CD73 se realizó como se ha descrito anteriormente. La cuantificación de tinción en marrón se realizó con el programa informático mage Pro Premie Media Cybernetics).

Los resultados, los cuales se presentan en la gráfica en la Figura 24F, muestran que la actividad de CD73 se reduce significativamente en animales dosificados con el anticuerpo anti-CD73 cuando se compara con ratones tratados con anticuerpo control, indicando la inhibición enzimática de CD73 fuerte por el anticuerpo a las tres concentraciones. Por tanto, el anticuerpo anti-CD73 CD73.4CS-IgG1.1f inhibe eficazmente la actividad enzimática de CD73 *in vivo*. Las cinéticas de la inhibición de CD73 por los anticuerpos anti-CD73 también se determinaron en el modelo tumoral sinérgico 4T1. Se inyectaron TY/23 (anticuerpos de rata anti-CD73 de ratón) o control de IgG de rata (10 mg/kg) el día 7 después de la inyección de célula tumoral 4T1. Tumor, bazo, sangre completa y suero se recogieron los días 1, 2, 3, 6 y 7 después del tratamiento con anticuerpo. La inhibición de la actividad de CD73 se midió como se ha descrito anteriormente en secciones del día indicado. Las secciones tumorales representativas se muestran en las Figuras 25A y B. Los datos indican que TY/23 inhibe la actividad de CD73 *in vivo*.

**Ejemplo 8: Preclasificación (binning) de epítipo y bloqueo cruzado basado citometría de flujo**

Los estudios de preclasificación de epítipo se realizaron por Interferometría de biocapa (BLI) usando un instrumento Octet RED (Pall Fortebio) a 25 °C. Para estos estudios, 20-30 ug/ml de hCD73-his se capturaron sobre los sensores anti-penta-his usando 90-180 s de fase de carga. La competición de anticuerpo se evaluó permitiendo que un anticuerpo dado (mAb1) se una a las superficies hCD73-his durante 180 s, seguido por la exposición inmediata a una segunda solución de anticuerpo (mAb2) durante 180 s. La señal de unión para mAb2 después de preunión de mAb1 se comparó a la del mAb2 en la ausencia de competición, para determinar si mAb1 y mAb2 compiten por la unión a las superficies de hCD73-his. Estos experimentos se realizaron para numerosos pares de mAb en ambos órdenes (mAb1 luego mAb2 y mAb2 luego mAb1) para establecer los perfiles de competición y clases (bin) de epítipo (como se resume en la Tabla 29 de a continuación).

Como se muestra en la Tabla 29, el análisis de preclasificación de epítipo reveló 2 clases de epítipo.

**Tabla 29.**

Anticuerpo	Clase 1	Clase 2
7A11	X	
6E11	X	
11F11	X	
5F8		X
4C3		X
11A6		X

Los anticuerpos también se sometieron a bloqueo cruzado basado por citometría de flujo. El experimento se condujo como sigue usando un conjunto de anticuerpo fluorescentemente marcado y un segundo conjunto de anticuerpo no marcado: se sembraron 100.000 células NCI-H292 por pocillo. La placa se centrifugó y las células se resuspendieron en 100 ul de FBS al 2 % en PBS por pocillo. Las células se bloquearon en hielo durante 20 min. El anticuerpo no marcado, como se indica, en FBS al 2 % en PBS se añadió a cada pocillo. La placa se centrifugó y las células se resuspendieron en 100 ul por pocillo de anticuerpo diluido, marcado (10ug/ml), es decir, 4C3 u 11F11, conjugado con FITC. 6 pocillos de células se incubaron sin anticuerpo, y se resuspendieron en 100 ul de FBS al 2 % en PBS solamente (para controles). A continuación, se incubaron en hielo durante 30 min. Las células se lavaron dos veces con FBS al 2 % en PBS y las muestras se resuspendieron en 140 ul de FBS al 2% y se analizaron en un citómetro de flujo FacsCalibur Becton Dickinson).

Los resultados del bloqueo cruzado basado en citometría de flujo, los cuales se muestran en las Figuras 26A y B, confirman los datos de preclasificación de epítipo por SPR expuestos anteriormente. Por ejemplo, 7A11 compite con 11F11, pero 4C3 no.

**Ejemplo 9: Mapeo de epítipo por HDX**

Este ejemplo describe el uso de HDX-MS para la identificación del epítipo sobre CD73 humana a dicho CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f.

El método de espectrometría de masas por intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX-MS) investiga la conformación

de la proteína y las dinámicas conformacionales en la solución haciendo un seguimiento de la tasa y el alcance del intercambio de deuterio de los átomos de hidrógenos de amida de la estructura principal de la proteína (excepto prolina). El nivel de intercambio de HDX depende de la accesibilidad de disolvente proteico y los enlaces de hidrógeno, y el incremento de masa de la proteína tras HDX se puede medir con precisión mediante MS. Cuando esta técnica se junta con la digestión enzimática, se puede resolver las características estructurales al nivel de péptido, posibilitando la diferenciación de superficie expuesta de aquellas plegadas dentro. En experimentos de mapeo de epítomos, los experimentos de marcación con deuterio y posterior enfriamiento se realizaron en paralelo para el antígeno y el complejo antígeno/mAb, seguido de digestión con pepsina en línea, separación de péptido, y análisis MS.

Antes del mapeo de epítomo de CD73.4-IgG2-CS-IgG1.1f en CD73 por HDX-MS, se realizaron experimentos no deuterizados para generar un listado de péptidos pépticos comunes para CD73 dimérica de ECD de longitud completa humana recombinante (12  $\mu$ M) y complejo proteico de CD73 humana recombinante y mAb de CD73 (relación molar 1:1, 12  $\mu$ M para mAb de CD73), consiguiendo una cobertura de secuencia del 88 % para CD73 de ECD de longitud completa. En el experimento de HDX-MS, 5  $\mu$ l de CD73 (SEQ ID NO: 99) o CD73 con mAb CD73.4-IgG2-CS-IgG1.1f se diluyeron en 55  $\mu$ l de tampón de D<sub>2</sub>O (tampón de fosfato 10 mM, D<sub>2</sub>O, pD 7,0) para comenzar las reacciones de marcación a temperatura ambiente. La proteína CD73 usada era hCD73 dimérica de longitud completa glicosilada que tenía SEQ ID NO: 99, también mostrada a continuación). Las reacciones se llevaron a cabo durante diferentes periodos de tiempo: 20 s, 1 min, 10 min y 240 min. Al final de cada periodo de reacción de marcación, la reacción se enfrió añadiendo tampón de enfriamiento (tampón fosfato 100 mM con GdnCl 4 M y TCEP 0,4 M, pH 2,5, 1:1, v/v) y 50  $\mu$ l de muestra enfriada se inyectó en el sistema de HDX-MS de Waters para el análisis. Se hizo un seguimiento de los niveles de absorción de deuterio de los péptidos pépticos comunes en ausencia/presencia de mAb de CD73.

La proteína CD73 usada tenía la secuencia de aminoácidos que tenía la SEQ ID NO: 99.

Las mediciones de HDX-MS sobre mAb de CD73 en CD73 indican que el mAb CD73.4-IgG2-CS-IgG1.1f reconoce un epítomo discontinuo de dos regiones peptídicas en la región N-terminal de CD73:

región peptídica 1 (65-83): FTKVQQIRRAEPNVLDDA (SEQ ID NO: 96)

región peptídica 2 (157-172): LYLPHYKLVPGDEVVG (SEQ ID NO: 97)

Una vista tridimensional de la interacción (Figura 27B) muestra que estas dos regiones son geoméricamente cercanas. Un mapa detallado de la interacción se muestra en la Figura 27A.

#### **Ejemplo 10: Estructura cristalina de 11F11 que se une a CD73**

Este ejemplo describe la estructura cristalina de un Fab' de 11F11 unido a CD73(26-336)His.

CD73(26-336)His se purificó de células HEK-293 E temporalmente transfectadas usando protocolos convencionales, y se usaron tal cual, o se sometieron a desglucosilación por tratamiento PNGase F, y se concentraron a 1,2 mg/ml. El Fab' del anticuerpo 11F11 se preparó por digestión por Pepsina de 11F11 usando protocolos convencionales, y se concentró a 1,1 mg/ml.

El complejo se formó incubando volúmenes iguales de hCD73(26-336)His desglucosiladas y el Fab' de 11F11 durante una noche a 4 °C, se purificó usando columna GE Superdex 200 26/60, y se concentró a 9,5 mg/ml usando un concentrador rotatorio MWCO 10 K.

Los cristales se cultivaron en gotas posada, los experimentos de difusión al vapor y la gota era de 0,25  $\mu$ l de proteína mezclada con 0,25  $\mu$ l de solución reservorio. Se establecieron por encima de 7.100 experimentos de cristalización. El cristal inicial era pequeño aproximadamente 10  $\mu$ m. Los cristales optimizados eran de 200 - 300  $\mu$ m en tamaño. La optimización de cristalización incluía cribado: de tipo de aditivos, detergentes, precipitantes, pH, temperatura y tampón. Las condiciones que permitieron la formación de cristal era como sigue: la solución reservorio consistía en polipropilenglicol P400 al 34 %, Na/K PO<sub>4</sub> 0,1 M pH 6,5 y CYMAL-7 15  $\mu$ M; los experimentos de cristalización se establecieron a temperatura ambiente y, a continuación, se colocaron en placa a 4 °C para incubar; y la incubación a 4 °C durante 7 días. La formación de cristal se observó únicamente con la proteína CD73 glicosilada.

Los cristales se recogieron directamente de la gota de cristalización y se colocaron directamente en el líquido de N<sub>2</sub>. Por encima de 100 cristales se seleccionaron en función de la difracción interna.

Los datos se recogieron usando un haz pequeño, atenuación muy pequeña, y colección de datos helicoidales sobre SER-CAT beamline 22ID con el detector de CCD de alta velocidad Rayonix MX-33HS. Los conjuntos de datos se recogieron a 4,1 Å, 3,8 Å, 3,5 Å, y finalmente a 3,05 Å. Los datos, procesados y a escala que usan HKL2000 habitual (Otwinowski Z., Minor W., *Methods in Enzymology* 276, 307-326 (1997)), eran 96 % completos a resolución 3,04 Å.

Una búsqueda BLAST (Altschul et al. (1990) "Basic local alignment search tool". *J. Mol. Biol.* 215:403-410) se usó

para encontrar el modelo más cercano para el dominio N-terminal de CD73 y los dominios Fc y Fv en el Banco de Datos de Proteína RCSB para usarse en una búsqueda de reemplazo molecular: el modelo de CD73 era de PDB Entry 4H1S (Heuts et al. *ChemBiochem*. 2012 Nov 5;13(16):2384-91).

- 5 Estos se usaron como modelo de partida en la búsqueda PHASER (McCoy et al. *J. Appl. Cryst.* (2007). 40, 658-674) de reemplazo molecular. La búsqueda de CD73 encontró 5 moléculas en la unidad asimétrica. Manteniendo la CD73 fijada, una búsqueda con el modelo de búsqueda de la cadena pesada encontró 2 moléculas en la unidad asimétrica. Manteniendo las CD73 y las cadenas pesadas fijadas, una tercera búsqueda PHASER con la cadena ligera encontró 2 moléculas en la unidad asimétrica. Un modelo compuesto de cinco complejos completos se realizó a partir de soluciones parciales superponiendo las cinco CD73 y emparejando las cadenas ligeras y pesadas. Esto se usó como el modelo de partida para un refinado por BUSTER ((Bricogne et al. (2011) BUSTER versión 2.11.6. Cambridge, Reino Unido: Global Phasing Ltd).

- 15 El modelo se ha reajustado y los aminoácidos cambiado para reflejar las secuencias de 11F11. El modelo se sometió a construcción de modelo manual exhaustivo y refinado. Se realizaron un total de cinco ciclos de refinado por BUSTER para completar el refinado. El factor R final es de 20,59 % (R-libre=24,58 %) para los 27.484 átomos de proteína y 24 moléculas de disolvente.

- 20 Las representaciones de la estructura cristal del complejo se exponen en las Figuras 28A-D.

Las estructuras de cristal muestran que todos menos una de las interacciones son de restos en las regiones CDR, y que la mayoría de las interacciones son del dominio VH con dos interacciones adicionales del dominio VL (Figura 28A). Los restos que interactúan de CD73 y Fab' de 11F11 humanos se muestran en la Tabla 30.

25

**Tabla 30.**

Resto de CD73	Interacción	Cadena pesada 11F11		Cadena ligera 11F11	
		Resto	Distancia (Å)	Resto	Distancia (Å)
Phe-65	VDW			Ser-30	4,0
				Ser-31	3,5
				Trp-32	3,8
Gln-69	VDW			Trp-32	3,9
Arg-73	VDW			Ser-53	3,8
Asn-106	VDW	Tyr-100	3,6		
Ala-107				Trp-32	3,7
Arg-109	H-Enlace	Pro-100A	2,8	Tyr-91	3,0
	VDW	Tyr-100	3,4	Trp-32	3,5
				Asn-92	3,5
Tyr-100	H-Enlace	Tyr-100	3,0		
Lys-136	VDW	Trp-99	3,3		
		Tyr-100	3,6		
Phe-137	VDW	Trp-99	3,6		
		Tyr-100	3,3		
Pro-138	VDW	Trp-99	3,4		
Lys-162	Enlace Sal	Asp-53	2,8		
	VDW	Tyr-52A	3,2		
		Trp-99	3,8		
Leu-164	VDW	Tyr-52A	3,6		
Pro-165	VDW	Asn-31	3,2		
		Tyr-52A	3,6		

(continuación)

Resto de CD73	Interacción	Cadena pesada 11F11		Cadena ligera 11F11	
		Resto	Distancia (Å)	Resto	Distancia (Å)
		Ser-97	3,5		
Gly-167	H-Enlace	Asn-31	2,7		
	VDW	Tyr-32	3,7		
Asp-168	H-Enlace	Thr-28	2,9		
	VDW	Asn-31	3,3		
		Phe-27	3,4		
Glu-169	H-Enlace	Asn-31	2,9		
Val-170	VDW	Asn-31	3,5		
Ser-319	H-Enlace			Ser-67	2,7
				Gly-68	3,0
	VDW			Ser-30	3,8
				Ser-67	3,8
Ile-320	VDW			Ser-30	4,0

Un modelo basado en la estructura compuesta de dos complejos CD73(NDT)/11F11 superpuestos sobre dímero de CD73 (PDB Entry 4H1S) sugiere que 11F11 se une a la superficie sobre CD73 lejos de la interfaz del dímero, sugiriendo que Fab no interferirá con la formación de dímero.

5

Una comparación de mapeo por HDX-MS y los resultados de rayos X sobre el complejo CD73/11F11 muestran que son de acuerdo básico con lo que muestra un epitopo similar sobre CD73 (65-83 y 157-172). Sin embargo, la estructura por rayos X muestra interacciones adicionales (menos de 6Å) en la región de Met-105 a Asp-111 (incluyendo enlaces H a Arg-109 y Tyr-110), Lys-135 a Pro-139, y Asp-317 a Ile-320 (incluyendo enlaces H a Ser-319).

10

#### Ejemplo 11: Impacto de diferentes bisagra/Fc sobre el tamaño de los complejos anticuerpo/CD73

Como se muestra en los Ejemplos anteriores, los anticuerpos anti-CD73 con una bisagra de IgG2 y CH1 son mejores inhibidores de la actividad enzimática de CD73 sobre las células y se internalizaron mejor que los mismos anticuerpos con una bisagra de IgG1. Basándose en estas observaciones, y el hecho de que la bisagra de IgG2 es más rígida que una bisagra de IgG1, se tuvo la hipótesis de que se forman mayores complejos entre un antígeno y anticuerpos que tienen una bisagra de IgG2 en relación a anticuerpos que tienen una bisagra de IgG1. El siguiente experimento se condujo para analizar esta hipótesis.

15

20

La estructura y el estado oligomérico de los complejos CD73/anticuerpo en solución se examinaron por SEC-MALS y DLS. Para estos estudios, los anticuerpos que contenían una región constante de IgG1 o IgG2, se mezclaron a diferentes relaciones molares con proteínas recombinantes que comprendían el dominio extracelular de longitud completa de CD73 humana que contenía etiqueta de polihistidina C-terminal (restos de aminoácidos 26-546 de CD73 humana, denominado "hCD73-his") o un fragmento que correspondía al dominio N-terminal de CD73 humana (restos de aminoácidos 26-336, denominado "N-hCD73-his").

25

El estado oligomérico de los complejos CD73/anticuerpo se examinó por cromatografía de exclusión por tamaño acoplada a un detector de dispersión de la luz multiángulo en línea (SEC-MALS). Se realizaron separaciones isocráticas sobre una columna Shodex PROTEIN KW-803 conectada a una Prominence Shimadzu UFLC en tampón que contiene K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 200 mM, NaCl 150 mM, pH 6,8, que contiene Na azida al 0,02 % (0,1 µm filtrada) que corre a 0,5 ml/min. Las muestras se inyectaron en la columna usando un automuestreador SIL-20AC Prominence Shimadzu y los datos se obtuvieron de tres detectores en línea conectados en serie: un espectrofotómetro por UV/vis de matriz de diodos Prominence SPD-20AD seguido por un detector de dispersión de la luz multiángulo Wyatt miniDAWN™ TREOS a continuación un detector de índice refractario Wyatt Optilab T-REX. Los datos se recogieron y analizaron

30

35

usando el programa informático Astra (Wyatt) y Labsolutions (Shimadzu).

Se realizaron estudios de dispersión de la luz dinámica (DLS) en un lector de placa Wyatt DynaPro en placas de 384 pocillos a 25 °C. Los parámetros experimentales eran 20 adquisiciones de 5 s cada una para medición, y las mediciones se registraron por cuadruplicado, con la desviación media y estándar informada. Las funciones de autocorrelación de intensidad se ajustaron usando el algoritmo de "Regularización" en el programa informático Dynamics (Wyatt Technologies).

Un sumario de SEC-MALS y DLS se proporciona en las Figura 29A y B. Los análisis de los anticuerpos solos, muestra tiempos de retención (aproximadamente 16-17 min), masas (140-150 kDa) y radios hidrodinámicos (5,0-5,4 nm) para cada anticuerpo que son típicos para el anticuerpo monoclonal monomérico. Los datos para la proteína hCD73-his es coherente con la proteína que adopta la estructura dimerica esperada en solución; en particular, la masa determinada a partir de los datos SEC-MALS (120 kDa) es coherente con la esperada para un dímero CD73-his (117 kDa) e incoherente con la que se esperaría para un monómero hCD73-his (58,5 kDa). Los datos para N-hCD73 son coherentes con la proteína N-dominio recombinante que es monomérica en solución (masa medida por SEC-MALS = 38 kDa, en comparación con la masa monomérica esperada = 35,0 kDa), lo cual se espera debido a que la región del dominio extracelular de CD73 de longitud completa que es responsable para la dimerización de la proteína está contenido en el dominio C-terminal sin contribución de los restos N-terminales.

Se encontró que las mezclas equimolares de un anticuerpo dado con N-hCD73-his eluyen como una especie sencilla en la SEC con tiempo de retención más corto que el anticuerpo o N-hCD73-his solo, así como mayores radios hidrodinámicos (Rh) por DLS, lo cual es coherente con la formación de complejos. Los datos de MALS indican masas para estos complejos de aproximadamente 210 kDa. Esto es coherente con una molécula N-hCD73-his unida a cada uno de los dos dominios Fab de un anticuerpo dado para formar un complejo anticuerpo:N-hCD73-his 1:2.

Los datos de SEC-MALS para mezclas de anticuerpos anti-CD73 con dímero hCD73-his muestra que las mezclas eluyen antes que el hCD73-his o el anticuerpo solo, sugiriendo que se forman los complejos. Comparando los datos para mAb que contienen la misma región variable pero diferentes dominios constantes, muestra que los tiempos de elución para los complejos de hCD73-his con mAb que contiene dominios constantes de IgG2 (IgG2-C219S, IgG2-C219S-IgG1.1f) son más tempranos que aquellos para complejos de hCD73-his con mAb que contienen un dominio constante de IgG1.1f. Además, las masas determinadas por MALS para complejos de hCD73-his con mAb que contienen un dominio constante de IgG2 son mayores que aquellas para complejos de hCD73-his con mAb que contienen un dominio constante de IgG1. Los datos de DLS muestran además que los radios hidrodinámicos de complejos de hCD73-his con mAb que contienen un dominio constante de IgG2 son mayores que aquellos para complejos de hCD73-his con mAb que contienen un dominio constante de IgG1. Por ejemplo, los datos de SEC-MALS y DLS para CD73.4 con tres regiones constantes diferentes (IgG2-C219S, IgG2-C219S-IgG1.1f, o IgG1.1f) se muestran en la Figura 30. En este caso se puede ver que el complejo de hCD73-his con CD73.4 que contiene el dominio constante de IgG2 tiene tiempos de retención más cortos (Figura 30A), radios hidrodinámicos mayores (Figura 30B) y mayores masas determinadas por MALS (Figura 30C), en comparación con los complejos de hCD73-his con CD73.4-IgG1.1f. Basándose en las masas por MALS, un modelo esquemático para la estructura y la estequiometría de los complejos entre hCD73-his y los anticuerpos se muestra en la Figura 30D, en el que los complejos que contienen CD73.4-IgG1.1f predominantemente forman complejos de dímero mAb/CD73 más pequeños 2:2 (pico 1 = -550 kDa) o 4:4 (pico 2 = -1.300 kDa), mientras que CD73.4-IgG2-C219S o CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f forman complejos muchos mayores (>3.000 kDa) con hCD73-his, por lo cual no se puede modelar con seguridad estructura y estequiometría precisas.

Los anticuerpos CD73.4 que tienen las regiones constantes de la cadena pesada expuestos en la Tabla 26 también se ensayaron para el tamaño de la formación de complejo. Como se muestra en la Figura 30D, los resultados indican que se forman complejos de mayor orden con anticuerpos que tienen un dominio CH1 de IgG2 en relación con aquellos que tienen un dominio CH1 de IgG1.

Colectivamente los datos de SEC-MALS y DLS demuestran que los complejos más grandes se forman entre hCD73-his y los mAb que contienen una bisagra de IgG2 y región CH1 (IgG2-C219S o IgG2-C219S-IgG1.1f), en comparación con aquellos que contienen bisagra de IgG1 y región CH1 (IgG1.1f). Además, los anticuerpos que tienen un dominio CH1 de IgG2 forman mayores complejos que aquellos que tienen un dominio CH1 de IgG1.

#### **Ejemplo 12: Relevancia de determinados restos de aminoácidos en CH1 y bisagra de IgG2 en mejora de la internalización de CD73 mediada por anticuerpos**

Los anticuerpos anti-CD73 (CD73.4) con las regiones constantes de la cadena pesada mostrados en la Tabla 31 se prepararon y se ensayaron como se ha descrito anteriormente en ensayos de internalización de CD73 mediada por anticuerpo.

**Tabla 31:** Regiones constantes de la cadena pesada que se fusionaron a regiones variables de anti-CD73

<u>Descripción</u>	<u>Construcciones</u>	<u>SEQ ID NO de la región constante</u>
dominio CH1 de IgG2, con lo demás de IgG1. También, mutante Cys>Ser para reducir la heterogeneidad de disulfuro potencial:	G2-G1-G1-G1	300
	G2.5-G1-G1-G1	301
dominio CH1 de IgG1 con todo lo demás de IgG2.3:	G1-G2.3-G2-G2	302
Regiones CH1 intercambio (swap) en IgG1 con aquellas de IgG2, separadas o juntas	G1-KRGE <del>G</del> SSNLF	303
	G1-KRGE <del>G</del> GS	304
	G1-SNLF	305
	IgG1-ITNDRTPR	306
	G1-SNLFPR	307
Regiones CH1 intercambio (swap) en IgG2 con aquellas de IgG1, separadas o juntas:	G2-RKEGSGNSFL	308
	G2-RKEGSG	309
	G2-NSFL	310
	IgG2-TIDNTRRP	311
	G2-NSFLRP	312
IgG1 con restos de dominio CH2 de IgG2:	G1-G1-G2-G1-AY	313
	G1-G1-G2-G1-KH	314
IgG2 con restos de dominio CH2 de IgG1:	G2-G2.3-G1-G2-KH	315
	G2.5-G2.3-G1-G2-KH	316
	G2-G2.3-G1-G2-AY	317
	G2.5-G2.3-G1-G2-AY	318
Regiones de bisagra intercambio entre IgG1 y IgG2:	G1-G2.3-G1-G1-KH	319
	G2-G1-G2-G2-AY	320
	G2.5-G1-G2-G2-AY	321
	G1-G2-G1-G1-AY	322
	G2-G1-G2-G2-KH	323
	G2.5-G1-G2-G2-KH	324
Truncamientos de bisagra	IgG1 - deltaBisagra	325
	IgG2 - deltaBisagra	326
	IgG2.5 - deltaBisagra	327
	IgG1 - deltaG237	328
	IgG2 - plusG237	329
Otra	IgG2.4	330
	IgG2.3/4	331

Los resultados, los cuales se muestran en la Figura 31, proporcionan la siguiente información en el contexto de internalización de CD73:

5

- el dominio CH2 no parece tener un impacto como se muestra por

10

- a) se observó muy poca diferencia en la capacidad de internalización entre los anticuerpos que comprenden una región constante de la cadena pesada modificada con formato "AY" (que tiene la bisagra de IgG2 ERKCCVECP~~P~~CPAPPVAG (SEQ ID NO: 8) en relación con aquellas con formato "KH" (ERKCCVECP~~P~~CPAPELLGG (SEQ ID NO: 22) (Conjunto 5, 6 y 7);

- b) los intercambios de CH2 son comparables a G1 o G2 tipo silvestre (Conjuntos 5 y 6); y

15

- c) el resto 237 no tiene impacto sobre la internalización: ni la adición de un resto "G" a una bisagra de IgG2 ni la delección del "G" C-terminal en una bisagra de IgG1 afectó a la internalización (Conjunto 9).

Esto sugiere que el dominio CH2 no afecta la internalización (es decir, el dominio CH2 puede ser de IgG1 o IgG2);

- Intercambio de las regiones CH1 indicadas en el Conjunto 3 (KRGESSNLF; KRGECS; SNLF; ITNDRTPR y SNLFPR) en IgG1 con aquellas de IgG2 proporciona poco beneficio, es decir, la internalización permanece similar a la de IgG1; véase Conjunto 3);
- Intercambio de las regiones CH1 indicadas en el Conjunto 4 (RKEGSGNSFL; RKEGSG; NSFL; TIDNTRRP and NSFLRP) en IgG2 con aquellas de IgG1 tiene impacto variable: cambiar NSFL no tiene impacto, mientras que las 2 regiones (RKEGSG & RP) están implicadas (véase Conjunto 4). Basándose en los resultados de los Conjuntos 3 y 4, parece que existe una interacción entre la región CH1 y la bisagra, siendo las regiones RKEGSG y RP más importantes que la región NSFL;
- La región bisagra afecta a la internalización, es decir, la bisagra de IgG2 proporciona mejor internalización en relación con la bisagra de IgG1 (véase los conjuntos 7 y 8). Además, IgG1 con una delección (G1-delta-bisagra) mejora la internalización sobre IgG1.IgG2 con una delección (G2-delta-bisagra) proporciona un nivel similar de internalización en relación con el de una bisagra de IgG2. Esto sugiere que la región bisagra afecta a la internalización, dicho efecto es aumentado por un CH1 de IgG2 (G2-G1-G2-G2-AY es comparable a G1-G2-G1-G1-AY);
- IgG2.4 (C220S) tiene internalización similar o reducida en comparación con IgG2.3 (C219S). IgG2.3/4 (C219S/C220S) tiene internalización muy reducida en comparación con IgG2.3 o IgG2.4 solo (véase Conjunto 10). Esto sugiere que la internalización de un anticuerpo con una bisagra de IgG2 y C219S es aproximadamente la misma que la de una bisagra de IgG2 con C220S, ambas son mucho mejores que la de una bisagra de IgG2 con tanto C219S como C220S;
- IgG2.5 (mutación C131S) tiene internalización reducida en comparación con las construcciones con C131 (véase Conjuntos 1, 6 y 7).

Por tanto, estos resultados indican que el dominio CH1 y la bisagra son ambas relevantes en la internalización de CD73 mediada por anticuerpo, y que un anticuerpo que tiene las secuencias de IgG2 de estos dominios se internaliza con mejor eficacia en relación con un anticuerpo que tiene estas regiones de IgG1.

### **Ejemplo 13: Anticuerpos que tienen una bisagra de IgG2 y/o dominio CH1 forman complejos de alto peso molecular**

Anticuerpos CD73.4 que tienen regiones constantes de la cadena pesada expuestas en la Tabla 26 también se ensayaron para la formación de complejos de alto peso molecular por experimentos SEC-MALS y DLS, como se ha descrito en el Ejemplo 11.

Tres de los 16 anticuerpos en este estudio se ensayaron previamente: CD73.4-IgG1.1f, CD73.4-IgG2-C219S (denominado también CD73.4-IgG2.3), y CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f (también denominado CD73.4-IgG2.3G1.1f-KH). Los datos de SEC-MALS y DLS de los anticuerpos solos mostraron tiempos de retención, masas, y radios hidrodinámicos para cada anticuerpo que son típicos para un anticuerpo monoclonal monomérico. Complejos equimolares de cada anticuerpo (5,5  $\mu$ M) con hCD73-his (5,5 $\mu$ M) mostraron tiempos de retención más lentos para todos los complejos en comparación con el anticuerpo o hCD73-solo indicando la formación de complejos. Un solapamiento de los datos del cromatograma SEC para cada uno de los 16 complejos se muestra en las Figuras 32A. Los datos del cromatograma se pueden dividir en 4 picos distintos, los cuales se muestran en la Figura 32B. El pico 1 contiene las especies más grandes, con masas determinadas por MALS que sugieren complejos con masa equivalente de mayor que complejos hCD73-his:mAb 4:4. El pico 2 contiene especies con masas determinadas por MALS que sugieren complejos de aproximadamente complejos hCD73-his:mAb 2:2. El pico 3 es una especie menor con baja señal y masas determinadas por MALS que sugieren complejos hCD73-his:mAb de aproximadamente 1:1. El pico 4 corresponde a la elución de los mAb solos con masas determinadas por MALS coherentes con sin anticuerpo. Para cuantificar las cantidades relativas de cada especie, los picos 4 de cada cromatograma se integraron como pico 1 (12,9 min) pico 2 (12,9 min - 15,1 min) pico 3 (15,1 -16,7 min) pico 4 (16,7 - 19,3 min). La integración también incluía un intervalo integrado adicional denominado pico 5 (>19,3 min) para tener en cuenta cualquier especie de peso molecular, el cual se encontró insignificante (<3,5 % para todos los complejos). El porcentaje para cada especie de esta integración se resume en la Tabla 32. Todos los complejos contenían un porcentaje pequeño similar de pico 3 (aproximadamente 6-9 %), pero cantidades variables de los otros picos. Lo más notable es que todos los complejos entre hCD73-his y los anticuerpos que contenían el dominio CH1 de hIgG1 tenían un porcentaje significativamente mayor de complejos menores (pico 2), mientras que aquellos que contenían el dominio CH1 de hIgG2 tenían un porcentaje mayor de complejos mayores (pico 1) (Tabla 32 y Figura 32C). Esto sugiere un importante papel para no solamente la región de bisagra sino también el dominio CH1 en formación de complejo de orden mayor.

**Tabla 32:** Tiempos de retención de anticuerpos CD73.4 con regiones constantes de la cadena pesada modificadas

Complejos	% UV				
	Pico1	Pico2	Pico3	Pico4	Pico5
	<12,9 min	12,9-15,1 min	15,1-16,7 min	16,7-19,3 min	>19,3 min
CD73.4-IgG2.3 + hCD73-his	37,0	23,8	7,7	28,6	2,9
CD73.4-IgG2.3G1.1f-KH + hCD73-his	36,0	23,8	7,9	29,3	30.
CD73.4-IgG1.f + hCD73-his	28,4	36,2	7,4	25,6	2,3
CD73.4-IgG1f + hCD73-his	26,0	36,5	7,5	27,8	2,2
CD73.4-IgG2.3G1-AY + hCD73-his	30,2	24,3	8,1	34,4	3,0
CD73.4-IgG2.3G1-KH + hCD73-his	34,9	23,4	7,9	30,7	3,0
CD73.4-IgG1-G2.3G1-AY + hCD73-his	14,6	29,2	6,4	48,3	1,6
CD73.4-IgG1-G2.3G1-KH + hCD73-his	23,8	32,6	7,0	34,5	2,1
CD73.4-IgG1-deltaTHT + hCD73-his	28,3	35,4	7,0	26,9	2,4
CD73.4-IgG2.3-plusTHT + hCD73-his	30,6	24,3	8,3	33,7	3,2
CD73.4-IgG2.3-plusGGG + hCD73-his	30,0	23,9	8,2	34,9	2,9
CD73.4-IgG2.5 + hCD73-his	31,7	24,4	8,4	32,5	3,1
CD73.4-IgG2.5G1.1f-KH + hCD73-his	30,7	24,3	8,9	32,7	3,4
CD73.4-IgG2.5G1-AY + hCD73-his	26,3	24,8	8,1	38,3	2,6
CD73.4-IgG2.5G1-KH + hCD73-his	21,4	24,1	7,0	45,6	1,9
CD73.4-IgG2.5-plusTHT + hCD73-his	32,6	23,5	8,3	32,6	3,0

**Ejemplo 14: Unión del receptor de Fc para anticuerpos con dominios constantes diseñados por ingeniería genética**

5 Este ejemplo demuestra que los anticuerpos que tienen regiones constantes de la cadena pesada modificadas que comprenden el CH1 y bisagra de IgG2 se unen a FcγRs cuando contienen los dominios CH2 y CH3 de IgG1.

10 Además de la unión a antígeno por los dominios variables, los anticuerpos se pueden acoplar a receptores gamma de Fc (FcγRs) a través de la interacción con los dominios constantes. Estas interacciones median las funciones efectoras tales como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y la fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP). La actividad de la función efectora es alta para el isotipo IgG1, pero muy baja o ausente para IgG2 e IgG4 debido a que estos isotipos tienen afinidad menor para FcγRs. Además, la función efectora de IgG1 se puede modificar a través de mutación de restos de aminoácidos en las regiones constantes para alterar la afinidad a FcγR y la selectividad.

15 La unión de los anticuerpos a receptores gamma de Fc (FcγRs o FcγRs) se estudió usando tecnologías de biosensor incluyendo resonancia de plasmón superficial (SPR) Biacore e Interferometría de biocapa Fortebio (BLI). Los estudios de SPR se realizaron en un instrumento Biacore T100 (GE Healthcare) a 25 °C. El fragmento Fab de un anticuerpo anti-6xHis murino se inmovilizó sobre un chip sensor CM5 usando EDC/NHS a una densidad de -3.000 RU. Se capturaron diversos FcγRs his-etiquetados (7 ug/ml) por la etiqueta his C-terminal usando un tiempo de contacto de 30 s a 10 ul/min, y la unión de anticuerpo 1,0 μM se evaluó en un tampón de ejecución de NaPO4 10 mM, NaCl 130 mM, 0,05 % de p20 (PBS-T) pH 7,1. Los FcγRs usados para estos experimentos incluían CD64 (FcγRI), CD32aH131 (FcγRIIa-H131), CD32a-R131 (FcγRIIa-R131), CD32b (FcγRIIb), CD16a-V158 (FcγRIIIa-V158), CD16b-NA1 (FcγRIIIb-NA1), y CD16B-NA2 (FcγRIIIb-NA2). Se realizaron experimentos BLI en un instrumento de RED Fortebio Octet (Pall, Fortebio) a 25 °C en NaPO4 10 mM, NaCl 130 mM, 0,05 % de p20 (PBS-T) pH 7,1. Los anticuerpos se capturaron fuera de los sobrenadantes de expresión no diluidos en sensores recubiertos por proteína A, seguido de la unión de 1 μM hCD32a-H131, hCD32a-R131, hCD32b, hCD16a-V158, o 0.1 μM analitos hCD64.

20 En primer lugar, se produjeron anticuerpos que contenían los dominios Fc de IgG1 modificados que incluyen las sustituciones S267E (SE) y S267E/I328F (SELF), así como diversas combinaciones de las mutaciones P238D, P271G, H268D, A330R, G237D, E233D, referidas como V4, V7, V8, V9 y V12. Se estudió la unión de estos anticuerpos por Biacore SPR con comparación a anticuerpos IgG1f, IgG2.3 (IgG2-C219S) e IgG4.1 (IgG4-S228P), así como un anticuerpo IgG1.1f que se ha diseñado por ingeniería genética para reducir la unión a todos los FcγRs. Los resultados, los cuales se muestran en la Figura 33, demuestran las propiedades unión a FcγR esperadas para IgG1f, IgG2.3 e IgG4.1 y los anticuerpos IgG1 mutantes, incluyendo unión de CD32a-H131, CD32a-R131 y CD32b incrementada para SE y SELF, así como selectividad incrementada de los mutantes V4, V7, V8, V9 y V12 para CD32b sobre CD32a-H131 y CD32a-R131, Figura 33.

40 El próximo conjunto de construcciones se usó para diseñar por ingeniería genética la función efectora en el isotipo IgG2 función efectora negativo. Para este estudio, las mutaciones anteriormente descritas se introdujeron en el contexto de una región constante IgG2.3, o un híbrido IgG2.3/IgG1f denominado IgG2.3G1-AY (Table 33). Los anticuerpos se expresaron a pequeña escala como sobrenadantes, y se ensayaron para la unión a FcγRs usando

tecnología de biosensor de interferometría de biocapa Fortebio Octet. Puesto que los anticuerpos estaban presentes a baja concentración en los sobrenadantes, el experimento se realizó capturando los anticuerpos fuera de los sobrenadantes usando los sensores de recubrimiento de proteína A, seguido por la unión de analitos FcgR en solución. IgG1f control purificado y sobrenadante que incluye anticuerpos IgG1 tipo silvestre, SE, P238D, V4 y V12 también se incluyeron para la comparación, y cada uno de estos anticuerpos controles demostraron propiedades de unión a FcgR esperadas (Figura 34). El anticuerpo IgG2.3 también demostró el perfil de unión esperado, con unión apreciable a solamente CD32a-H131. Sin embargo, todas las mutaciones S267E, L328F, P238D, P271G, H268D, A330R, G237D y E233D en IgG2.3 fallaron para recapitular la afinidad de FcgR de los correspondientes mAb IgG1 diseñados por ingeniería genética (Figura 34). Por el contrario, la construcción IgG2.3G1-AY era capaz de conservar completamente las propiedades de unión a FcgR de IgG1 tipo silvestre, mientras retiene la regiones CH1 y bisagras de IgG2.3. Además, todos los mutantes IgG2.3G1-AY que contienen S267E, L328F, P238D, P271G, H268D, A330R, G237D y E233D demostraron que las propiedades de unión a FcgR comparables a los mAb versión IgG1 que contienen las mismas mutaciones (Figura 34). Esto demuestra el éxito del diseño por ingeniería genética de los anticuerpos con regiones CH1 y bisagra de IgG2 combinadas con la función efectora del IgG1 tipo silvestre o mutante.

**Tabla 33:** Construcciones IgG2 diseñadas por ingeniería genética

Conjunto	ID	Construcción	SEQ ID NO
1	IgG2.3	hHC-IgG2-C219S	268
	IgG2.3-V13	hHC-IgG2-C219S - P238D	332
	IgG2.3-V14	hHC-IgG2-C219S - P238D,P271G	333
	IgG2.3-V15	hHC-IgG2-C219S - P238D,H268D,P271G	334
	IgG2.3-V16	hHC-IgG2-C219S - P238D,P271G,A330R	335
	IgG2.3-V17	hHC-IgG2-C219S - P238D,H268D,P271G,A330R	336
	IgG2.3-V18	hHC-IgG2-C219S - S267E	337
	IgG2.3-V19	hHC-IgG2-C219S - S267E,L328F	338
2	IgG2.3G1	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f	269
	IgG2.3G1-AY-V20	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f - P238D	339
	IgG2.3G1-AY-V21	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f - P238D,P271G	340
	IgG2.3G1-AY-V22	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f - P238D,H268D,P271G	341
	IgG2.3G1-AY-V23	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f - P238D,P271G,A330R	342
	IgG2.3G1-AY-V24	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f - P238D,H268D,P271G,A330R	343
	IgG2.3G1-AY-V25	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f - G237D,P238D,H268D,P271G,A330R	344
	IgG2.3G1-AY-V26	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f - E233D,G237D,P238D,H268D,P271G,A330R	345
	IgG2.3G1-AY-V27	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f - S267E	346
	IgG2.3G1-AY-V28	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f - S267E,L328F	347

Además se exploró la estrategia del diseño por ingeniería genética produciendo otros anticuerpos formateados con IgG2.3G1-AY, IgG2.3G1-AY-S267E (IgG2.3G1-AY-V27), así como variantes de forma B de IgG2(IgG2.5G1-AY y IgG2.5G1-AY-V27), y otros anticuerpos híbridos que contienen combinaciones diferentes de dominios constantes de IgG1 y IgG2, y ensayando la unión de estos anticuerpos a FcgRs his-etiquetados capturados por anti-his Fab usando la tecnología de SPR Biacore. De acuerdo con los datos de sobrenadante de Octet, los datos de SPR mostraron que los anticuerpos IgG2.3G1-AY y IgG2.3G1-AY-V27 tenían propiedades de unión a FcgR comparables a IgG1f y IgG1f-S267E, respectivamente, a pesar de contener las regiones CH1 y bisagra de un anticuerpo IgG2 de forma A (IgG2.3) (Tabla 34). Los datos también se obtuvieron usando anticuerpos IgG2.5G1-AY y IgG2.5G1-AY-V27, demostrando el éxito del diseño por ingeniería genética de anticuerpos IgG2 forma B (que contienen la mutación C131S denominado IgG2.5) que tienen funciones efectoras tipo IgG1f o IgG1f modificado. Los datos de otros varios anticuerpos con regiones constantes IgG2.3G1-AY, IgG2.3G1-AY-V27, IgG2.5G1-AY, o IgG2.5G1-AY-V27 pero diferentes regiones variables mostraron que la estrategia de diseño por ingeniería genética es muy aplicable a otros anticuerpos independientes de los dominios variables (Tabla 34). Otras construcciones que demuestran las propiedades de unión a FcgR tipo IgG1f incluyen IgG1-G2.3G1-AY, y IgG1deltaTHT, mientras que varias de las construcciones de región constante modificada eran incapaces de conservar las propiedades de unión a FcgR tipo IgG1f, incluyendo las construcciones IgG2.3G1-KH, IgG2.5G1-KH, IgG2.3plusTHT, IgG2.5plusTHT y IgG2.3plusGGG (Table 34).

**Tabla 34:** Valores de % R<sub>máx</sub> para la unión de anticuerpo 1  $\mu$ M a proteínas FcgR-his capturadas por anti-his Fab

mAb	hCD64	hCD32a-H131	hCD32a-R131	hCD32b	hCD16a-V158	hCD16B-NA2
mAb8-IgG1f	80 %	82 %	51 %	27 %	51 %	21 %
mAb9-IgG1f	70 %	33 %	19 %	4 %	28 %	10 %
CD73.4-IgG1f	65 %	46 %	26 %	6 %	43 %	17 %
CD73.4-IgG1.1f	2 %	0 %	2 %	1 %	0 %	0 %
mAb11-IgG2.3	2 %	44 %	17 %	5 %	1 %	0 %
CD73.4-IgG2.3	3 %	48 %	11 %	1 %	1 %	0 %
mAb6-IgG2.3	3 %	66 %	14 %	3 %	1 %	0 %
mAb4-IgG2.3	1 %	39 %	6 %	1 %	1 %	0 %
mAb5-IgG2.3	6 %	100 %	30 %	4 %	3 %	0 %
mAb12-IgG2.3	2 %	39 %	7 %	1 %	1 %	0 %
mAb13-IgG2.3	2 %	40 %	7 %	1 %	1 %	0 %
mAb11-IgG2.5	0 %	40 %	13 %	3 %	0 %	-1 %
mAb7-IgG2.5	4 %	72 %	19 %	2 %	2 %	0 %
mAb8-IgG2.5	3 %	59 %	14 %	3 %	2 %	0 %
mAb10-IgG2.5	1 %	29 %	5 %	1 %	1 %	0 %
CD73.4-IgG2.5	3 %	40 %	7 %	1 %	1 %	0 %
mAb6-IgG2.5	3 %	75 %	17 %	4 %	2 %	0 %
mAb4-IgG2.5	2 %	46 %	8 %	1 %	1 %	0 %
mAb5-IgG2.5	6 %	89 %	26 %	5 %	4 %	1 %
mAb12-IgG2.5	1 %	36 %	6 %	1 %	1 %	0 %
mAb13-IgG2.5	-2 %	39 %	4 %	-2 %	0 %	-2 %
mAb8-IgG2.3G1-AY	77 %	61 %	38 %	10 %	38 %	13 %
mAb10-IgG2.3G1-AY	67 %	23 %	14 %	4 %	24 %	8 %
CD73.4-IgG2.3G1-AY	65 %	38 %	20 %	5 %	38 %	14 %
mAb7-IgG2.5G1-AY	80 %	73 %	45 %	12 %	47 %	19 %
mAb8-IgG2.5G1-AY	77 %	70 %	45 %	17 %	48 %	22 %
CD73.4-IgG2.5G1-AY	65 %	43 %	24 %	7 %	40 %	16 %
CD73.4-IgG2.3G1-KH	2 %	15 %	2 %	0 %	2 %	0 %
CD73.4-IgG2.5G1-KH	2 %	17 %	2 %	0 %	3 %	0 %
CD73.4-IgG2.3G1.1f-KH	1 %	10 %	1 %	0 %	1 %	0 %
CD73.4-IgG2.5G1.1f-KH	1 %	6 %	1 %	0 %	1 %	0 %
mAb7-IgG2.3G1-AY-V27	84 %	68 %	92 %	76 %	26 %	7 %
mAb8-IgG2.3G1-AY-V27	78 %	67 %	80 %	67 %	24 %	7 %
mAb10-IgG2.3G1-AY-V27	69 %	24 %	57 %	40 %	12 %	3 %
mAb7-IgG2.5G1-AY-V27	81 %	74 %	89 %	84 %	32 %	9 %
mAb8-IgG2.5G1-AY-V27	77 %	76 %	79 %	77 %	33 %	10 %

(continuación)

mAb	hCD64	hCD32a-H131	hCD32a-R131	hCD32b	hCD16a-V158	hCD16B-NA2
CD73.4-IgG1-G2.3G1-AY	66 %	50 %	31 %	10 %	48 %	23 %
CD73.4-IgG1-G2.3G1-KH	2 %	18 %	2 %	0 %	4 %	1 %
CD73.4-IgG1deltaTHT	65 %	43 %	23 %	6 %	42 %	17 %
CD73.4-IgG2.3plusTHT	3 %	42 %	8 %	1 %	1 %	0 %
CD73.4-IgG2.5plusTHT	2 %	34 %	7 %	1 %	1 %	0 %
CD73.4-IgG2.3plusGGG	3 %	43 %	8 %	1 %	1 %	0 %

Tomándolos conjuntamente estos datos demuestran que la secuencia en IgG1 inmediatamente C-terminal al motivo conservado CPPCPAP (SEQ ID NO: 380) en la región bisagra confiere función efectora mediada por FcγR, mientras que CH1 y las porciones superiores de la bisagra del anticuerpo se pueden reemplazar con secuencias de IgG2 o IgG2 modificadas, para combinar potencialmente las funciones efectoras de IgG1 y IgG1 modificada con las propiedades superiores de internalización o señalización de anticuerpos que contienen regiones CH1 y bisagra de IgG2.

**Equivalentes**

Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar, usando simplemente experimentos de rutina, muchos equivalentes de las realizaciones específicas descritas en el presente documento.

**COMPENDIO DE LISTADO DE SECUENCIAS**

**Tabla 35.**

SEQ ID	Descripción	Secuencia
1	Isoforma 1 de CD73 humana	MCPRAARAPA TLLLALGAVL WPAAGAWELT ILHITNDVIISR LEQTSSESSK CVNASRCMGG VARLFTKVQQ IRRAEPNVLL LDAGDQYQGT IWFTVYKGAE VAHFMNALRY DAMALGNHEFDNGVEGLIEP IJLKEAKFPIL SANIKAKGPL ASQISGLYLP YKVLPVGDEV VGIVGYTSKE TPFLSNPGTN LVFEDEITAL QPEVDKIKTL NVNKIIALGH SGFEMDKLIA QKVRGVDVVV GGHSNTHLYT GNPPSKEVPA GKYPFIVTSD DGRKVPVQA YAFGKYLGYL KIEFDERGNV ISSHGNPILL NSSIPEDPSI KADINKWRIK LDNYSTQELG KTIVYLDGSS QSCRFRECNM GNLICDAMIN NNLRHTDEMF WNHVSMCIIN GGGIRSPIDE RNNGITWEN LAAVLPFGGT FDLVQLKGST LKKAIEHSVH RYGQSTGEFL QVGGIHVVYD LSRKPGDRVV KLDVLC TKRVPSYDPLKMD EVYKVLPNF LANGDGFQM IKDELLRHDS GDQDINVVST YISKMKVIYP AVEGRIKIST GSHCHGSI SL IFLSLWAVIF VLYQ

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
2	Isoforma 2 de CD73 humana	<p>                     MCPRAARAPA TLLLALGAVL WPAAGAWELT                      ILHTNDVHSR LEQTSSESSK                      CVNASRCMGGVARLFTKVQQ IRRRAEPNVLL                      LDAGDQYQGT IWFTVYKGAE VAHFMNALRY                      DAMALGNHEFDNGVEGLIEP LLKEAKFPIL                      SANIKAKGPL ASQISGLYLP YKVLPGDEV                      VGIVGYTSKETPFLSNPGTN LVFEDEITAL                      QPEVDKCLKTL NVNKIIALGH SGFEMDKLIA                      QKVRGVDVVVGGHSNTFLYT GNPPSKEVPA                      GKYPFIVTSD DGRKVPVVQA YAFGKYLGYL                      KIEFDERGNVISSIHGNPILL NSSIPEDPSI                      KADINKWRIK LDNYSTQELG KTIVYLDGSS                      QSCRFRECNMGNLICDAMIN NNLRHTDEMF                      WNHVSMCILN GGGIRSPIDE RNNGIHVVYD                      LSRKPGDRVVKLDVLC TKCR VPSYDPLKMD                      EVYK VILPNF LANGGDGFQM IKDELLRHDS                      GDQDINVVSTYISKMKVIYP AVEGRIKFST                      GSHCHGSFSL IFLSLWAVIF VLYQ                 </p>
3	CD73 de cynomolgus	<p>                     MCPRAARAPA TLLAVGALL WSAAGAWELT                      ILIITNDVIHSR LEQTSSESSK                      CVNASRCMGGVARLFTKVQQ IRRRAEPNVLL                      LDAGDQYQGT IWFTVYKGAE VAHFMNALRY                      DAMALGNHEFDNGVEGLIEP LLKEAKFPIL                      SANIKAKGPL ASQISGLYLP YKVLPGDEV                      VGIVGYTSKETPFLSNPGTN LVFEDEITAL                      QPEVDKCLKTL NVNKIIALGH SGFETDKLIA                      QKVRGVDVVVGGHSNTFLYT GNPPSKEVPA                      GKYPFIVTSD DGRKVPVVQA YAFGKYLGYL                      KIEFDERGNVISSIHGNPILL NSSIPEDPSI                      KADINKWRIK LDNYSTQELG KTIVYLDGSS                      QSCRFRECNMGNLICDAMIN NNLRHADEMI                      WNHVSMCILN GGGIRSPIDE RNNGTITWEN                      LAAVLPFGGTFDLVQLKGST LKKA FEHSVH                      RYGQST'GFEFL QVGGIHVVYD LSRKPGDRVV                      KLDVLC TKCRVPSYDPLKMD EYK VILPNF                      LANGGDGFQM IKDELLRHDS GDQDINVVST                      YISKMKVIYP AVEGRIKFST GSHCHGSFSL                      IFLSFCAVIF VLYQ                 </p>
4	11F11 VH	<p>                     QVQLVESHGGGVVQPGRSLRLSCATSGFTFSNYGMH                      WVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGRFT                      ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSW                      YPDSFDIWGGQTMVTVSS                 </p>
5	11F11 VH CDR1	NYGMH
6	11F11 VH CDR2	VILYDGSNKYYPDSVKG
7	11F11 VH CDR3	GGSSWYPDSFDI
8	11F11 VK1	<p>                     EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSYLAWY                      QKQPGQAPRI LIYDASNRATGIPARFSGSGPGTDFE                      LTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWHLTIFGGGT'KVEIK                 </p>
9	11F11 VK1 CDR1	RASQGVSSYLA
10	11F11 VK1 CDR2	DASNRAT
11	11F11 VK1 CDR3	QQRSNWHLT

ES 2 807 182 T3

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
12	11F11 VK2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK
13	11F11 VK2 CDR1	RASQGISSWLA
14	11F11 VK2 CDR2	AASSLQS
15	11F11 VK2 CDR3	QQYNSYPLT
16	4C3 VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM IIWVRQAPGKGLEWVSGISWKSIGYADSVKGRF TISRDNKNSLFLQMNSLR AEDTALYYCVKGYVVI LTGLDYGWQGILVTVS S
17	4C3 VH CDR1	DYAMH
18	4C3 VH CDR2	GISWKSIGYADSVKG
19	4C3 VH CDR3	GYVILTGLDY
20	4C3 VK1	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWY QQKPGQAPRIILLYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF LTISSRLPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIK
21	4C3 VK1 CDR1	RASQSVSSYLAW
22	4C3 VK1 CDR2	ASSRATG
23	4C3 VK1 CDR3	QYGSSPLT
24	4C3 VK2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQGISSWLAW YQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGGGTKVEIK
25	4C3 VK2 CDR1	RASQGISSWLA
26	4C3 VK2 CDR2	AASSLQS
27	4C3 VK2 CDR3	QQYNSYPPT
28	4C3 VK3	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQGISSWLAW YQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGGGTKVEIK
29	4C3 VK3 CDR1	RASQGISSWLA
30	4C3 VK3 CDR2	AASSLQS
31	4C3 VK3 CDR3	QQYNSYPPT
32	4D4 VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGM HWVRQAPGKGLEWVAVIWYDESNKYYADSVKGR FTISRDNKNTLFLQMNSLR AEDTAVYYCARGYNS RWYPDAFDIWWQGMVT VSS
33	4D4 VH CDR1	NYGMH
34	4D4 VH CDR2	VIWYDESNKYYADSVKG
35	4D4 VH CDR3	GYNSRWYPDAFDI
36	4D4 VK1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK
37	4D4 VK1 CDR1	RASQGISSWLA

ES 2 807 182 T3

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
38	4D4 VK1 CDR2	AASSLQS
39	4D4 VK1 CDR3	QQYNSYPLT
40	10D2 VH1	QVQI.VHESGGGVVQPGRSLRL.SCAASGFIFSNYGLH WVRQAPGKGLEWVAVIRYDGSNKYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARGGSSW YPDGLDVWGQGTTVTV SS
41	10D2 VH1 CDR1	NYGLH
42	10D2 VH1 CDR2	VIRYDGSNKYYADSVKG
43	10D2 VH1 CDR3	GGSSWYPDGLDV
44	10D2 VK1	AIQLTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISSALAWY QQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFI LTISSLQPEDFATYYCQQFNSTPTFGGGTKVEIK
45	10D2 VK1 CDR1	RASQGISSALA
46	10D2 VK1 CDR2	DASSLES
47	10D2 VK1 CDR3	QQFNSTPT
48	10D2 VK2	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFI LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK
49	10D2 VK2 CDR1	RASQGISSWLA
50	10D2 VK2 CDR2	AASSLQS
51	10D2 VK2 CDR3	QQYNSYPLT
52	11A6 VH	EVQLVESGGNLVQPGRSLRL.SCAASGFIFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSGISWNNNDIGYADSVKGRF IISRDNKNSLYLQMNSLRPEDTALYYCVKGYVVI LTGLDYGWQGTPTVTVS S
53	11A6 VH CDR1	DYAMH
54	11A6 VH CDR2	GISWNNNDIGYADSVKG
55	11A6 VH CDR3	GYVILTGLDY
56	11A6 VK1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFI LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK
57	11A6 VK1 CDR1	RASQGISSWLA
58	11A6 VK1 CDR2	AASSLQS
59	11A6 VK1 CDR3	QQYNSYPLT
60	24H2 VH	QVQI.VHESGGGVVQPGRSLRL.SCAASGFIFSNYGM IHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGDNKYYADSVKGRF RFTISRDNKNTLFLQMNSLRRAEDTAVYYCARGGS SWYPDADFIDWQGTMTVTV SS
61	24H2 VH CDR1	NYGMH
62	24H2 VH CDR2	VIWDGDNKYYADSVKG
63	24H2 VH CDR3	GGSSWYPDADFI

ES 2 807 182 T3

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
64	24H2 VK1	DIQMTQSPSSI.SASVGDRVTTTCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGKVEIK
65	24H2 VK1 CDR1	RASQGISSWLA
66	24H2 VK1 CDR2	AASSLQS
67	24H2 VK1 CDR3	QQYNSYPLT
68	5F8 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMH WVRQAPGKGLVWVSRIISDGSSTGYADSVKGRFTI SRDNAKN'TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREFSSGW YFDYWGQGTI.VTVSS
69	5F8 VH CDR1	SYWMH
70	5F8 VH CDR2	RIISDGSSTGYADSVKG
71	5F8 VH CDR3	EFSSGWYFDY
72	5F8 VK1	AIQLTQSPSSI.SASVGDRVTTTCRASQGISSALAWY QQKPGKAPKLLIYDASSLESVPSRFSGSGSGTDF LTISSLQPEDFATYYCQQFSSYPRTTFGQGTKVEIK
73	5F8 VK1 CDR1	RASQGISSALA
74	5F8 VK1 CDR2	DASSLES
75	5F8 VK1 CDR3	QQFSSYPRT
76	5F8 VK2	DIQMTQSPSSI.SASVGDRVTTTCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTGFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPRTFGQGTKVEIK
77	5F8 VK2 CDR1	RASQGISSWLA
78	5F8 VK2 CDR2	AASSLQS
79	5F8 VK2 CDR3	QQYNSYPRT
80	6E11 VH	EVQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLFWVSGITWNSGGIGYADSVKGRF TISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDRYY SSWLLFDNWGQGILVTVSS
81	6E11 VH CDR1	DYAMH
82	6E11 VH CDR2	GITWNSGGIGYADSVKG
83	6E11 VH CDR3	DRYYSSWLLFDN
84	6E11 VK1	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAW YQQKPGQAPRIIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSFTFGPGTKVDIK
85	6E11 VK1 CDR1	RASQSVSSSYLA
86	6E11 VK1 CDR2	GASSRAT
87	6E11 VK1 CDR3	QHYGSSFT
88	7A11 VH	EVQLVESGGGLVQTGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLFWVSDISWNSDIIGYADSVKGRF TISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIYGS GSSFFDYWGQGILVTVSS

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
89	7A11 VH CDR1	DYAMH
90	7A11 VH CDR2	DISWNSDIIGYADSVKG
91	7A11 VH CDR3	DIYGS GSSFFDY
92	7A11 VK1	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQYISSWLAWY QQKPIFKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYHSYPPTFGQGRLEIK
93	7A11 VK1 CDR1	RASQYISSWLA
94	7A11 VK1 CDR2	AASSLQS
95	7A11 VK1 CDR3	QQYHSYPPT
96	epítipo n.º 1 de 11F11	FTKVQQIRRAEPNVL LLD A
97	epítipo n.º 2 de 11F11	LYLPYKVL P V G D E V V G
98	IgG1 CH1 tipo silvestre	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTTTPAVIQSSGLYSLSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVK
99	CD73 His-etiquetado	MCPRARAPATLLLALGAVLWPAAGAWELTILHT NDVHSRIEQTSEDSKCVNASRCMGGVARI LTKV QQIRRAEPNVL LLD AGDQYQGTIWFVYKGAEVA HFMNALRYDAMALGNHEFDNGVEGLIEPLLKEAK FPII.SANIKAKGPI.ASQISGLYLPYKVI.PVGDEVVGI VGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEITALQPEVDKLT LNVNKIIAI.GHSGFFMDKIJ.AQKVRGV D V V V G G H S NTFLYTG N P P S K E V P A G K Y P I T V T S D D G R K V P V V Q AYAFGKYLGYLKIEFDERGNVISSHIGNPILLNSSIPE DPSIKADINKWRIKI.DNYSTQELGKTIVYLDGSSQS CRFRECNMGNLICDAMINNL RHAD E T F W N H V S M CILNGGGIRSPIDER N N G T I T W E N L A A V L P F G G T F D LVQL.KGSTL.KKAFHSHVHRYGQSTGEFLQVGGIHV VYDL.SRKPGDRVVKLDVLC TKR V P S Y D P L K M D E VYK V I L P N F L A N G G D G F Q M I K D E L L R I I D S G D Q D I N VVSTYISKMKVIYPAVEGRIKHHHHHH
100	11F11 (cadena pesada de longitud completa)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCATSGFTFSNYGMH WVRQAPGKGLFVVAVILYDGSNKYYPDSVKGRIT ISRDN SKNTIYI.QMNSI.RAEDTAVYYCARGSSW YPDSFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST <u>SESTAALGCLVKDYFPEP V T V S W N S G A L T S G V H T F</u> <u>PAVLQSSGLYSLSSVTV P S S N F G T Q T Y T C N V D I I K</u> <u>PSNTKVDKTVERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPP</u> <u>KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV</u> <u>DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDW</u> <u>LNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTKSKTKGQPREPQV</u> <u>YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES</u> <u>NGQPENNYKTTTPMLDS D G S F F L Y S K L T V D K S R W</u> <u>QQGNVFSCSVMIEALINIIHYTQKSLSLSPGK</u>
101	11F11 (cadena ligera de longitud completa 1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSYLAWY QQKPGQAPRLIYDASNRAATGIPARFSGSGPGTDF LTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWHLTFGGGTKVEIKR <u>TVAAPSVEFIPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREA</u> <u>KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYISLSSLT</u> <u>TLSKADYEKIIKVVYACEVTIIQGLSSPVTKSFNRGEC</u>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
102	11F11 (cadena ligera de longitud completa 2)	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQGISSWLAWY</u> <u>QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT</u> <u>LTISLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIKR</u> <u>TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA</u> <u>KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTL</u> <u>TLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
103	4C3 (cadena pesada de longitud completa)	<u>EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM</u> <u>IIVWRQAPGKGLEWVSGISWKSGSIGYADSVKGRF</u> <u>TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCVKGYVI</u> <u>LTGLDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS</u> <u>GGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVITF</u> <u>AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNIKPS</u> <u>NTKVDKKEPKSCDKTIITCPPCPAPPELLGGPSVFLF</u> <u>PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSIIEDPEVKFNWY</u> <u>VDGVEVIINAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLIIQD</u> <u>WLNKKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ</u> <u>VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES</u> <u>NGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ</u> <u>QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK</u>
104	4C3 (cadena ligera de longitud completa 1)	<u>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWY</u> <u>QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFT</u> <u>LTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIKR</u> <u>TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA</u> <u>KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTL</u> <u>TLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
105	4C3 (cadena ligera de longitud completa 2)	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQGISSWLAWY</u> <u>YQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF</u> <u>TLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGQGTKEIKR</u> <u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE</u> <u>AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTL</u> <u>TLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
106	4C3 (cadena ligera de longitud completa 3)	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQGISSWLAWY</u> <u>YQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF</u> <u>TLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGQGTKEIKR</u> <u>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE</u> <u>AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTL</u> <u>TLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
107	4D4 (cadena pesada de longitud completa)	<u>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGM</u> <u>HWVRQAPGKGLEWVAWIWYDESNKYYADSVKGR</u> <u>FTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARGYNS</u> <u>RWYPDAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS</u> <u>RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV</u> <u>HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVD</u> <u>HKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPSVFL</u> <u>FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSIIEDPEVQFNW</u> <u>YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ</u> <u>DWLNKKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREP</u> <u>QVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW</u> <u>ESNGOPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR</u> <u>WQQGNVFSCSVMIEALINIIYTQKLSLSLSPGK</u>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
108	4D4 (cadena ligera de longitud completa 1)	<p>DIQMTQSPSSI.SASVGDRVTITCRASQGISSWLAWY            QKPKFKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGGTIDFI            LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIKR            TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA            KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTL            TLSKADYEKIIKVVYACEVTHIQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
109	10D2 (cadena pesada de longitud completa)	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGLH            WVRQAPGKGLEWVAVIRYDGSNKYYADSVKGRF            TISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARGGSSW            YPDGLDVWGQGITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS            TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT            FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVDPK            PSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLF            PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDIEDPEVQFNWYV            DGVVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLIIQDW            LINGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPOVY            TLPDSSEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN            GQPEPNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQF            GNVTFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
110	10D2 (cadena ligera de longitud completa 1)	<p>AIQI.TQSPSSI.SASVGDRVTITCRASQGISSALAWY            QKPKGKAPKLIJYDASSLESGVPSRFSGSGGTIDFI            LTISSLQPEDFATYYCQQFNNSYPLTFGGGTKVEIKRT            VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK            VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT            LSKADYEKIIKVVYACEVTHIQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
111	10D2 (cadena ligera de longitud completa 2)	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWY            QKPKFKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGGTIDFI            LTISSIQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIKR            TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA            KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTL            TLSKADYEKIIKVVYACEVTHIQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
112	11A6 (cadena pesada de longitud completa)	<p>EVQLVESGGNI.VQPGRSLRLSCAASGFTFDYAM            HWVRQAPGKGLEWVSGISWNNNDIGYADSVKGRF            IISRDNKNSLYLQMNSLRPEDTALYYCVKGYGYVI            LTGLDYWGQGITPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTI            GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFP            AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS            NTKVDKKEPKSCDKTHITCPPCPAPELGGPSVFLF            PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDIEDPEVKNWYV            VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD            WLNGLKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQ            VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES            NGQPEPNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ            QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
113	11A6 (cadena ligera de longitud completa 1)	<p>DIQMTQSPSSI.SASVGDRVTITCRASQGISSWLAWY            QKPKFKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGGTIDFI            LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIKR            TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA            KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTL            TLSKADYEKIIKVVYACEVTHIQGLSSPVTKSFNRGEC</p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
114	24H2 (cadena pesada de longitud completa)	<p> <u>QVQLVFSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGM</u>  <u>HWVRQAPGKGLEWVAVIWDGDNKYYADSVKGRFTISRDN</u>  <u>SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARGGS</u>  <u>SWYPDAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS</u>  <u>RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV</u>  <u>HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYTCNVD</u>  <u>HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFL</u>  <u>FPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFVNW</u>  <u>YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ</u>  <u>DWLNKKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREP</u>  <u>QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW</u>  <u>ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR</u>  <u>WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK</u> </p>
115	24H2 (cadena ligera de longitud completa 1)	<p> <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGSSWLAWY</u>  <u>QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGGTDFI</u>  <u>LTISSLQPEDFATYYCQQYNSTYPLTFGGGTKVEIKR</u>  <u>TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA</u>  <u>KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTL</u>  <u>TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> </p>
116	5F8 (cadena pesada de longitud completa)	<p> <u>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMII</u>  <u>WVRQAPGKGLVWVSRIISDGSSTGYADSVKGRFTI</u>  <u>SRDNAKNLTLQLMNSLRAEDTAVYYCAREISSGW</u>  <u>YFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG</u>  <u>GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALISGVHTFPA</u>  <u>VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSN</u>  <u>TKVDKKEPKSCDKTITCPPCPAPPELLGGPSVFLFP</u>  <u>PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV</u>  <u>DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW</u>  <u>LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV</u>  <u>YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN</u>  <u>GQPEENNYKTTTPVLDSDGSITFLYSKLTVDKSRWQQ</u>  <u>GNVFSCSVMIIEALINIIYTQKSLSLSPGK</u> </p>
117	5F8 (cadena ligera de longitud completa 1)	<p> <u>AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWY</u>  <u>QQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGGTDFI</u>  <u>LTISSLQPEDFATYYCQQFSSYPRTFGQGTKVEIKRT</u>  <u>VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK</u>  <u>VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT</u>  <u>LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> </p>
118	5F8 (cadena ligera de longitud completa 2)	<p> <u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGSSWLAWY</u>  <u>QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGGTGFT</u>  <u>LTISSLQPEDFATYYCQQYNSTYPRTFGQGTKVEIKR</u>  <u>TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA</u>  <u>KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTL</u>  <u>TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u> </p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
119	6E11 (cadena pesada de longitud completa)	EVQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSGITWNSGGIGYADSVKGRF TISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDRYY SSWLJFDNWGQGILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS <u>TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT</u> <u>FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK</u> <u>PSNTKVDK KVEPKSCDKTITCPPCPAPPELLGGPSVF</u> <u>LFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN</u> <u>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH</u> <u>QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE</u> <u>PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE</u> <u>WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS</u> <u>RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
120	6E11 (cadena ligera de longitud completa 1)	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAW YQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSFTFGPGTKVDIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA <u>KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTL</u> <u>TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
121	7A11 (cadena pesada de longitud completa)	EVQLVESGGGLVQTGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSDISWNSDIIGYADSVKGRF TISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIYGS GSSFFDYWGQGILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF <u>PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK</u> <u>SNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFL</u> <u>FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW</u> <u>YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ</u> <u>DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP</u> <u>QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW</u> <u>ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR</u> <u>WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
122	7A11 (cadena ligera de longitud completa 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCRASQYISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF LTISSLQPEDFAVYYCQYHSYPPITFGQGTREIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA <u>KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTL</u> <u>TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
123	Bisagra C219S	ERKSCVECPPCPAPPVAG
124	IgG2 CH1 (tipo silvestre)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTTFAVILQSSGLYSLSSVTV PSSNFGITQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV
125	IgG1 CH2 + A330S y P331S	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAK

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
126	región constante de IgG1 humana	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV CIVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLIHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
127	región constante de IgG1 humana (variante alotipo)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV CIVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLIHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRFEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
128	IgG1 CH3 + E356 y M358	GQPREPQVYTLPPSRFEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSI.SLS PGK
129	región constante de IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV CIVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLIHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
130	región constante de IgG2	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVTV VPSSNFGTQT YTCNVNHHKPS NTKVDKTVER KCCVECP PCPAPPVAG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCIVVDV IIEDPEVQFNW YVDGVEVIINA KTKPREEQFN STFRVSVLT VVIHQDWLNGKEYKCKVSNK LPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSGDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSQSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
131	cadena ligera kappa de IgG1 humana (CL)	RTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLILT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEFC
132	Extremo C de la cadena pesada	LSPGK

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
133	CD73.4-IgG2CS-IgG1.f, Secuencia AA	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGM HWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGGSS WYPDSFDI WGQGTMTVTVSSASTKGPSVFLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVII TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DII KPSNTKVDKTVERKSCVECP PAPPVAGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGK EYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVY TLPPSRLEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWFSN GQPENNYKTTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
134	CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f, secuencia NT	cagggtcagctgggtgagctctggggaggcgtggtccagcctgggaggtcc ctgagactctcctgtgcagcctctgattcaccctcagtaactatgcatgcactg gggccgccaggctccaggcaagggtggagtggtggcagttatattgatga tggaa gtaataaactatccagactccgtgaaggccgattcaccatc ccaaga gacaatccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgagga cacggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctgtgacctgattctttg atatctggggccaaggaa caatggcaccgtctctcagcgtcgaccaagggcc calcgttctccccctggcgcctgtccaggagcacc cccgagagcaccagcg gccctgggctgctgtcaaggactactccccgaaccgtgacggtgtcgtgg aactcaggcgtctgtaccagcggcgtgcacacctccagctgtctacagctct caggactctactccctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcaactcggca cccagactacacctgcaacgtagatcaaacagccagcaacaccaaggtggac aagacagttgagcgaatcctgtgtcagtgcccaccgtgccagcaccacct gtggcaggaccgtcagttctctctcccccaaacccaaggacacctcatg atctcccggacccctgaggtcacatgcgtgggtggacgtgagccacgaaga ccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgataatgcca gacaagccgcgggaggagcagtaaacagcagcagcagcagcagcagcagcagc ctcaccgtctgcaccaggactgctgaatggcaaggagtaaacaggtcaaggt ctccaacaaagccctccaagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc ggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccgggaggagat gaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtgcaaaaggctctatccagcga catcgcctgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagacc acgcctccgtgctggactcagcggctctctctctctatagcaagctaccgt ggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctcatgctcctgcatgcatg aggtctgcacaaccactacagcagaagagcctctccctgccccgggtaaa
135	CD73.4 VH (a.a.)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGM HWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGGSS WYPDSFDI WGQGTMTVTVSS
136	bisagra de IgG2 tipo silvestre	ERKCCVECP PAPPVAG
137	IgG1 CH2 tipo silvestre	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLIHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAK
138	IgG1 CH3 tipo silvestre	GQPREPQVYTLPPSRLEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWFSNGQPENNYKTTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL PGK

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
139	VH 11F11 - Secuencia de Nucleótidos	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCC TGGGAGGTCCCTGAGACTCTCTGTG CAACGTC TGGATTACCTTCAGTAACTATGGCA GCAC TGGGTCCGCCAGGC TCCAGGCAAGGGGCT GGAGTGGGTGGCAGTTATATTGTATGATGGAAGT AATAAATACTATCCAGACTCCGTGAAGGGCCGA TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGC TGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG ACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGCA GCAGCTGGTACCCTGATCTTTTGATATCTGGGG CCAAGGAACAATGGTCACCGTCTC TTCA
140	VK1 11F11 - Secuencia de Nucleótidos	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGT CTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTG CAGGGCCAGTCAGGGTGT TAGCAGCTACTTAGCC TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG CTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTG GCATCCCAGCCAGGTCAGTGGCAGTGGGCCCTG GGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGA GCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGT CAGCAG CGTAGCAACTGGCATCTCACTTTTCGGCGG AGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
141	VK2 11F11 - Secuencia de Nucleótidos	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGT GGGTCCCATCAAGGTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGC AACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCTCTCAC TTTTCGGCGG AGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
142	VH 4C3 - Secuencia de Nucleótidos	GAAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTG GTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCTGTG CAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCAT GCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCT GGAGTGGGTCTCAGGTATTAAGTTGGAAGAGTGG TAGCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCC CTGTATCTGCAAATGAAACAGTCTGAGAGCTGAG GACACGGCCTTGTATTACTGTGTAAGGGTATT ACGTTATTTTGCAGTGGCCTTGACTACTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTC A
143	VK1 4C3 - Secuencia de Nucleótidos	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGT CTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTG CAGGGCCAGTCAGAGTGT TAGCAGCTACTTAGCC TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTG GCATCCCAGACAGGTCAGTGGCAGTGGGCTCTG GGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGA GCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGT CAGCAG TATGGTAGCTCACCGCTCAC TTTTCGGCGGAGGGGA CCAAGGTGGAGATCAAA

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
144	VK2 4C3 - Secuencia de Nucleótidos	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCTTCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAAACCAGAGAAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGAAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTTACGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCCTCCAACGTTTCGGCCA GGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
145	VK3 4C3 - Secuencia de Nucleótidos	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCTTCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAAACCAGAGAAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGAAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTTACGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCCTCCAACGTTTCGGCCA AGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
146	VH 4D4 - Secuencia de Nucleótidos	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCGTCTGGATTACCTTTCAGTAACTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCT GGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGAAAG TAATAAACTACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACGGCTGTGTATTATTGTGCGAGAGGGTATA ACAGCAGGTGGTACCCTGATGCTTTTGATATCTG GGGCCAAGGGACAATGGTACCGTCTCTTCA
147	VK1 4D4 - Secuencia de Nucleótidos	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCTTCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAAACCAGAGAAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGAAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTTACGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGGA CCAAGGTGGAGATCAAA
148	VH1 10D2 - Secuencia de Nucleótidos	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCGTCTGGATTACCTTTCAGTAACTATGGCCT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCT GGAGTGGGTGGCAGTTATACGGTATGATGAAAG TAATAAACTACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG ATTACCACTCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAG GACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGGGGGGC AGCAGCTGGTACCCTGACGGTTTGGACGTCTGG GGCCAAGGGACCACGGTACCGTCTCTCTCA

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
149	VK1 10D2 - Secuencia de Nucleótidos	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG CCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAG CTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAG TTTAATAGTTACCCACCTTCGGCGGAGGGACCA AGGTGGAGATCAAA
150	VK2 10D2 - Secuencia de Nucleótidos	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGGA CCAAGGTGGAGATCAAA
151	VH 11A6 - Secuencia de Nucleótidos	GAAAGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGGGGAAACTTG GTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATGCCAT GCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAAGGGCCT GGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAATAAT GACATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGA TTCATCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCC TGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGACCTGAGG ACACGGCCTTGTATTATTGTGTAAGGGTTATTA CGTTATTTTGACTGGTCTTGACTACTGGGGCCAG GGAACCCCGGTCACCGTCTCCTC A
152	VK1 11A6 - Secuencia de Nucleótidos	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGGA CCAAGGTGGAGATCAAA
153	VH 24H2 - Secuencia de Nucleótidos	CAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCT GGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAGG TAATAAACTACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAA GACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGC AGCAGCTGGTACCCTGATGCTTTTGATATCTGGG GCCAAGGGACAAATGGTACCGTCTCTTCA

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
154	VK1 24H2 - Secuencia de Nucleótidos	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGA CCAAGGTGGAGATCAAA
155	VH 5F8 - Secuencia de Nucleótidos	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTA GTTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACTGGAT GCACTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCT GGTGTGGGTCTCACGTATTATTAAGTGTGGGAGT AGCACAGGTTACGCGGATTCCGTGAAGGGCCGA TTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACG CTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAG GACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGAGTTTA GCAGTGGCTGGTACTTTGACTACTGGGGCCAGGG AACCTGGTCAACCGTCTCCTCA
156	VK1 5F8 - Secuencia de Nucleótidos	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCTCCTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG CCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAAGCTCCTAAG CTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAG TTAGTAGTTACCCTCGGACGTTCCGGCCAAGGGA CCAAGGTGGAAAATCAAA
157	VK2 5F8 - Secuencia de Nucleótidos	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGGTTTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCTCGGACGTTCCGGCCAAGGGA CCAAGGTGGAAAATCAAA
158	VH 6E11 - Secuencia de Nucleótidos	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGCCTTG GTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCAT GCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCT GGAGTGGGTCTCAGGTATTACTTGAATAGTGGT GGCATAGGCTACCGGACCTCTGTAAGGGCCGA TTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAATCCCT TGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGG ACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAAAGATAGGTA TTACAGCAGTTGGCTCCTCTTTGACAACTGGGGC CAGGGAATCTGGTCAACCGTCTCTCA

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
159	VK1 6E11 - Secuencia de Nucleótidos	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGT CTTTGTCTCCAGGGGAAAAGAGCCACCCCTCTCTG CAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTT AGCCTGGTACCAGCAGAAACC'TGGCCAGGC'TCC CAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCC ACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAAGTGGCAGTGGG TCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGAC TGGAGCC'TGAAGA'TTTTGCAGTGTAT'ACTGT'CA GCAT'TATGGT'AGCT'CAT'TCAC'TTT'CGGCC'TGGG ACCAAAGTGGATATCAAA
160	VH 7A11 - Secuencia de Nucleótidos	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTG GTACAGACTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCC'IG'IG CAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCAT GCACTGGGTCCGGCAAAGCTCCAGGGAAAGGGCCT GGAGTGGGTCTCAGATATTAGTTGGAATAGTGAT A'TTATAGGC'TATGCGGAC'TCTGTGAAGGGCCGAT TCACCATCTCTAGAGACAACGCCAAGAACTCCCT GTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGA CACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAAAGATATTTAT GGTT'CGGGGAGT'CT'TTTT'TT'GACT'ACT'GGGGCC AGGGAATCCTGGTCACCGTCTC CTCA
161	VK1 7A11 - Secuencia de Nucleótidos	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGTATATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAAGCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTT'GCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTT'GCAACTTATTA'CTGCCAACAG TATCATAGTTACCCTCCCACCTTCGGCCA AGGGACACGACTGGAGAT'AAA
162	IgG1-IgG2-IgG1f2 (MHCCR)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERKCCVEC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVIFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
163	IgG1-IgG2CS-IgG1f2 (MHCCR)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERKSCVEC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHIEDPEVKFNWYVDGVEVIINAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVIFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
164	IgG2-IgG1f2 (MHCCR)	ASTKGPSVI:PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYI:PEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSNFGTQTYTCNVDIHKPSNTKVDKTVERKCCVEC <u>PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV</u> VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
165	IgG2CS-IgG1f2 (MHCCR)	ASTKGPSVF:PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVEC <u>PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV</u> VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
166	IgG1-IgG2-IgG1.1f (MHCCR)	ASTKGPSVI:PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYI:PEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNIHKPSNTKVDKKVERKCCVEC <u>PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV</u> VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
167	IgG1-IgG2CS-IgG1.1f (MHCCR)	ASTKGPSVF:PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERKSCVEC <u>PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV</u> VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
168	IgG2-IgG1.1f (MHCCR)	ASTKGPSVF:PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVEC <u>PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV</u> VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
169	IgG2CS-IgG1.1f (MHCCR)	ASTKGPSVIPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYIPIEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSNFGTQTYTCNVDIHKPSNTKVDKTVVERKSCVEC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRFEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
170	CD73.3 VH (a.a)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM IIWVRQAPGKGLEWVSGISWKSIGYADSVKGRF TISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTVLYYCVKGYVI LTGLDYGQGTMTVSS
171	CD73.5 VH (a.a)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCASSGFTFSNYGMH WVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGRFT ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSW YPDSFDIWGQGTMTVSS
172	CD73.6 VH (a.a)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGM IIWVRQAPGKGLEWVAVILYDSSNKYYPDSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSS WYPDSFDIWGQGTMTVSS
173	CD73.7 VH (a.a)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCASSGFTFSNYGMII WVRQAPGKGLEWVAVILYDSSNKYYPDSVKGRFT ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSW YPDSFDIWGQGTMTVSS
174	CD73.8 VH (a.a)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGM IIWVRQAPGKGLEWVAVIWDSSNKYYPDSVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSS WYPDSFDIWGQGTMTVSS
175	CD73.9 VH (a.a)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCASSGFTFSNYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDSSNKYYPDSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSS WYPDSFDIWGQGTMTVSS
176	CD73.10 VH (a.a)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGM HWVRQAPGKGLEWVAVIWDENKYYPDSVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSS WYPDSFDIWGQGTMTVSS
177	CD73.11 VH (a.a)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGM HWVRQAPGKGLEWVAVIWDENKYYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYNS RWYDPDAFDIWGQGTMTVSS
178	bisagra híbrida IgG2/IgG1	ERKCCVECPAPPELLGG
179	bisagra híbrida gG2 C219S/IgG1	ERKSCVECPAPPELLGG

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
180	IgG1-IgG2-IgG1f	<p>ASTKGPSVIPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYIPIEPTVTSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNIKPSNTKVDKKVERKCCVECPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
181	IgG 1-IgG2CS-IgG1f	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVTSWNSGALTSGVIITFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNIKPSNTKVDKKVERKSCVECPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVIINAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLIIQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMIEALIINIIYTQKSLSLSPGK</p>
182	IgG2-IgG1f	<p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVTSWNSGALTSGVIITFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
183	IgG2CS-IgG1f	<p>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVTSWNSGALTSGVIITFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDIKPSNTKVDKTVERKSCVECPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
184	mAb-CD73.3-Vh-hHC-IgG1.1f	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSGISWKSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKGYVILTGLDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNIIKPS NTKVDKRVKPC KSCDKTHTCP PCPAPEAEGA PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSD HEDPEVKIFNW YVDGVI:VHNA KIKPREBQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDDSGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MIIEALINIIYT QKSLSLSPG
185	mAb-CD73.3-Vh-hHC-IgG2-C219S	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWKSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKGY YVILTGLDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDPHKPS NTKVDKTVR KSCVECPKPC APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG VEVIINAKTKP REEQFNSTFR VSVLTVVHQ DWLNGKEYKC KVSNGKLPAP IEKTIKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTPPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPG
186	mAb-CD73.3-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWKSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKGY YVILTGLDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDPHKPS NTKVDKTVR KSCVECPKPC APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG VEVIINAKTKP REEQFNSTFR VSVLTVVHQ DWLNGKEYKC KVSNGKLPAP IEKTIKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTPPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPG

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
187	mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f	<p>           QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGITFS            NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDGSNKYY            PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED            TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMTVVS            SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV            KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS            SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP            SNTKVDKRVE PKSCDK'HTC PPCPAPEAFG            APSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV            SIIEDPEVKFN WYVDGVEVIIN AKTKPREEQY            NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK            ALPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTI.PPSRF            EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ            PENNYKTPP VLDSGSEFL YSKLTVDKSR            WQQGNVFSCS VMIEALINHY TQKLSLSPG         </p>
188	mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-C219S	<p>           QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS            NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDGSNKYY            PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED            TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMTVVS            SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV            KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS            SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP            SNTKVDKTVE RKSCVECPC PAPPVAGPSV            FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSIID            PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF            RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA            PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK            NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN            YKTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG            NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG         </p>
189	mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f (idéntica a SEQ ID NO: 133, excepto que carece de lisina C-terminal)	<p>           QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS            NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDGSNKYY            PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED            TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMTVVS            SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV            KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS            SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDIKP            SNTKVDKTVE RKSCVECPC PAPPVAGPSV            FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED            PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY            RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPS            SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK            NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN            YKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQG            NVFSCSVMIE ALHNHYTQKS LSLSPG         </p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
190	mAb-CD73.5-Vh-hHC-IgG1.1f	<p>QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS          NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDGSNKYY          PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED          TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGMVTVS          SASTKGPSVF PLAPSSKST'S GGTAALGCLV          KDYFPEPVTV SWNSGALTSV VHTFPAVLQS          SGLYSLSSVV TTPSSSI.GTQ TYICNVNHKP          SNTKVDKRVK PKSCDKTHTC PPCAPEAEG          APSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV          SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREFQY          NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KLYKCKVSNK          ALPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE          EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ          PENNYKTPP VLDSGSIFL YSKLTVDKSR          WQQGNVFCSS VMIEALIHNY TQKLSLSPG</p>
191	mAb-CD73.5-Vh-hHC-IgG2-C219S	<p>QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS          NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDGSNKYY          PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED          TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGMVTVS          SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV          KDYFPEPVTV SWNSGALTSV VHTFPAVLQS          SGLYSLSSVV TTPSSNFGTQ TYTCNVDHKP          SNTKVDKTVE RKSCVFCPPC PAPPVAGPSV          FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED          PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTP          RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA          PIEKTIKTK GQPREPQVYTLPPSREEMTK          NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN          YKTPPMIDSD DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG          NVFCSSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG</p>
192	mAb-CD73.5-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	<p>QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS          NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDGSNKYY          PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED          TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGMVTVS          SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV          KDYFPEPVTV SWNSGALTSV VHTFPAVLQS          SGLYSLSSVV TTPSSNFGTQ TYTCNVDHKP          SNTKVDKTVE RKSCVFCPPC PAPPVAGPSV          FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED          PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY          RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPS          SIEKTIKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTK          NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN          YKTPPVLDSD DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG          NVFCSSVMIE ALIHNYTQKSLSLSPG</p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
193	mAb-CD73.6-Vh-hHC-IgG1.1f	<p>QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS          NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDSSNKYY          PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED          TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMTVTS          SASTKGPSVF PLAPSSKST'S GGTAALGCLV          KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VIITFPAVLQS          SGLYSLSSVV TWPSSSI.GTQ TYICNVNHKP          SNTKVDKRVK PKSCDKTHTC PPCAPEAEG          APSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV          SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREFQY          NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KLYKCKVSNK          ALPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE          EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ          PENNYKTPP VLDSDGSI'L YSKLTVDKSR          WQQGNVFSCS VMHEALIHNY TQKLSLSPG</p>
194	mAb-CD73.6-Vh-hHC-IgG2-C219S	<p>QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS          NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDSSNKYY          PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED          TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMTVTS          SASTKGPSVF PLAPCSRST'S ESTAAALGCLV          KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VIITFPAVLQS          SGLYSLSSVV TWPSSNFGTQ TYTCNVDHKP          SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV          FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED          PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTP          RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA          PIEKTIKTK GQPREPQVYTLPPSREEMTK          NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN          YKTPPMI.DS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG          NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG</p>
195	mAb-CD73.6-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	<p>QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS          NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDSSNKYY          PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED          TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMTVTS          SASTKGPSVF PLAPCSRST'S ESTAAALGCLV          KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VIITFPAVLQS          SGLYSLSSVV TWPSSNFGTQ TYTCNVDIKP          SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV          FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED          PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY          RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPS          SIEKTIKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTK          NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN          YKTPPVL.DS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG          NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK</p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
196	mAb-CD73.7-Vh-hHC-IgG1.1f	<p>QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS          NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDSSNKYY          PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED          TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGMVTVS          SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV          KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS          SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP          SNTKVDKRVK PKSCDKTHC PPCAPEAEG          APSVFLFPPK PKDITLMISRT PEVTCVVVDV          SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY          NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KFYKCKVSNK          ALPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE          EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ          PENNYKTPP VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR          WQQGNVFCSS VMHEALHNHY TQKLSLSPG</p>
197	mAb-CD73.7-Vh-hHC-IgG2-C219S	<p>QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS          NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDSSNKYY          PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED          TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGMVTVS          SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAAALGCLV          KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS          SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP          SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV          FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED          PEVQFNWYVD GVEVIINAKTK PREEQFNSTF          RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA          PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK          NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN          YKTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG          NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG</p>
198	mAb-CD73.7-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	<p>QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS          NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDSSNKYY          PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED          TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGMVTVS          SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAAALGCLV          KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS          SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDIKP          SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV          FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED          PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY          RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPS          SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK          NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN          YKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQG          NVFSCSVMHIE ALHNHYTQKS LSLSPG</p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
199	mAb-CD73.8-Vh-hHC-IgG1.1f	<p>QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS          NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDSSNKYY          PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED          TAVYYCARGG SSWYPDSIDI WGQGTMTVTS          SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV          KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS          SGLYSLSSVV TVPSSSI.GTQ TYICNVNHKP          SNTKVDKRVK PKSCDKTHTC PPCPAPEAIG          APSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV          SHEDPEVKFN WYVDGVEVIIN AKTKPREEQY          NSTYRVVSVL TVLIHQDWLNG KEYKCKVSNK          ALPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE          EMTKIQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ          PENNYKTPPP VLDS DGSFFL YSKLTVDKSR          WQQGNVFSCS VMHEALHNIHY TQKLSLSPG</p>
200	mAb-CD73.8-Vh-hHC-IgG2-C219S	<p>QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS          NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDSSNKYY          PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED          TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMTVTS          SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV          KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS          SGLYSLSSVV TVPSSNI.GTQ TYICNVDHKP          SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV          FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED          PEVQFNWYVD GVEVIINAKTK PREEQFNSTF          RVVSVLTVVII QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA          PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK          NQVSLTCLVK GFYPSDI AVE WESNGQPENN          YKTTTPM L D S DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG          NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG</p>
201	mAb-CD73.8-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	<p>QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS          NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDSSNKYY          PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED          TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMTVTS          SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV          KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS          SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYICNVDIKP          SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV          FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED          PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PRHQYNSTY          RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPS          SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK          NQVSLTCLVK GFYPSDI AVE WESNGQPENN          YKTTTPV L D S DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG          NVFSCSVMHE ALHNIHYTQKS LSLSPG</p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
202	mAb-CD73.9-Vh-hHC-IgG1.1f	<p>QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS                      NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDSSNKYY                      PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED                      TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMTVTS                      SASTKGPSVF PLAPSSKST'S GGTAALGCLV                      KDYFPEPVTV SWNSGALTSV VHTFPAVLQS                      SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNIKP                      SNTKVDKRVK PKSCDKTIITC PPCAPEAEG                      APSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV                      SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY                      NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK                      ALPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE                      EMTKNQVSLT CLVKGFPYPSD IAVEWESNGQ                      PENNYKTPPP VLDSIDGSFHL YSKLTVDKSR                      WQQGNVFCSS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG</p>
203	mAb-CD73.9-Vh-hHC-IgG2-C219S	<p>QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS                      NYGMIIWVRQA PGKGLEWVAV IWYDSSNKYY                      PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED                      TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMTVTS                      SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV                      KDYFPEPVTV SWNSGALTSV VHTFPAVLQS                      SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP                      SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV                      FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED                      PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF                      RVVSVLTVVII QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA                      PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK                      NQVSLTCLVK GIYPSDIAVE WESNGQPENN                      YKTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG                      NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPG</p>
204	mAb-CD73.9-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	<p>QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS                      NYGMIIWVRQA PGKGLEWVAV IWYDSSNKYY                      PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED                      TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMTVTS                      SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV                      KDYFPEPVTV SWNSGALTSV VHTFPAVLQS                      SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP                      SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV                      FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED                      PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY                      RVVSVLTVLII QDWLNGKEYK CKVSNKALPS                      SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK                      NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN                      YKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQG                      NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPG</p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
205	mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f	<p>           QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS            NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDESNKYY            PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED            TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGMVTVS            SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV            KDYFPEPVTV SWNSGALTSV VHTFPAVLQS            SGLYSLSSVV TTPSSSLGTQ TYICNVNHKP            SNTKVDKRVK PKSCDKTHTC PPCPAPEAEG            APSVFLFPPK PKDITLMISRT PEVTCVVVDV            SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY            NSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNK            ALPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE            EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ            PENNYKTPP VLDSGDFL YSKLTVDKSR            WQQGNVFCSS VMIEALIHNY TQKSLSLSPG         </p>
206	mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-C219S	<p>           QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS            NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDESNKYY            PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED            TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGMVTVS            SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAAALGCLV            KDYFPEPVTV SWNSGALTSV VHTFPAVLQS            SGLYSLSSVV TTPSSNFGTQ TYTCNVDHKP            SNTKVDKTVE RKSCVECPC PAPPVAGPSV            FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED            PEVQFNWYVD GVEVIINAKTK PREEQFNSTF            RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA            PIKTIKTK GQPREPQVYTLPPSRHEMTK            NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN            YKTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG            NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG         </p>
207	mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	<p>           QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS            NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDESNKYY            PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED            TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGMVTVS            SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAAALGCLV            KDYFPEPVTV SWNSGALTSV VHTFPAVLQS            SGLYSLSSVV TTPSSNFGTQ TYTCNVDHKP            SNTKVDKTVE RKSCVECPC PAPPVAGPSV            FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED            PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY            RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPS            SIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTK            NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN            YKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQG            NVFSCSVMIE ALIHNYTQKS LSLSPG         </p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
208	mAb-CD73.11-Vh-hHC-IgG1.1f	<p>QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS                      NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDESNKYY                      ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED                      TAVYYCARGY NSRWYPDAFD IWGQGTMTVTV                      SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL                      VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVIITFP AVLQ                      SSGLYSLSSV VTPSSSLGT QTYICNVNHNK                      PSNTKVDKRV EPKSCDKTHT CPPCPAPEAE                      GAPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD                      VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ                      YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKLYKCKVSN                      KALPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR                      EEMTKNQVSL TCI.VKGFYPS DIAVEWESNG                      QPENNYKTP PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS                      RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSPG</p>
209	mAb-CD73.11-Vh-hHC-IgG2-C219S	<p>QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS                      NYGMIHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDESNKYY                      ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED                      TAVYYCARGY NSRWYPDAFD IWGQGTMTVTV                      SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL                      VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVIITFP AVLQ                      SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTCNV DHK                      PSNTKVDKTV ERKSCVECPP CPAPPVAGPS                      VLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDV SHE                      DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST                      FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP                      APIEKTISK TKGQPREPQVY TLPPSREEMT                      KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN                      NYKTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ                      GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG</p>
210	mAb-CD73.11-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	<p>QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS                      NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDESNKYY                      ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED                      TAVYYCARGY NSRWYPDAFD IWGQGTMTVTV                      SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL                      VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVIITFP AVLQ                      SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTCNV DIIK                      PSNTKVDKTV ERKSCVECPP CPAPPVAGPS                      VLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDV SHE                      DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST                      YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP                      SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT                      KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN                      NYKTPPVL.DSDGSFFL.YSK LTVDKSRWQQ                      GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG</p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
211	mAb-CD73.3-Vh-hHC-IgG1.1f	<p>gaagtgcagctggtggagctggtggaggctggtacagcctggcaggctccct  gagactctctgtgcagcctctggaftcaccitgagattatgcatgactgggt  ccggcaagctccagggaaggccctggagtggtctcaggtattagtggaga  gtgtagcalagcctalgcggactctggaaggccgallcaccalcaccagag  acaacgccagaactccctgtatctgcaaatgaacagctgagagctgaggaca  cggcctgtattactgtgccaagggtattacgtattttgactggcctgactactg  gggccagggaacctggtcaccgtctcagcgtcgaccaaggccctcctg  tgttctctggcccttcagcaagtcaccctggcggaacagccctctggg  ctgctgtgcaaggactacttcccagcctgtgaccgtctctgaaactctggc  gccctgacalcctggcgtgcacacctlccctgctgtcgtcagcttagcggcctgt  actctctgctctcctgctgacagtgccctccagctctctgggacccagacct  catctgcaacgtgaaccacaagccctcaacaccaaggtggacaagcgggtg  gaaccaagctctgcgacaagaccatacctgcccctcctgctctctgaa  gctgaaggcggccctagcgtgtctcttccctcaaaagcccaaggacacctg  atgatctccggacccctgaagtgacctgctggtgggtggtggtgctccacgag  gaccagaagtgaagtcaattggtactgtgacggcgtggaagtgcacaacgc  caagaccaagcctagagaggaaacagtaaacctccactaccgggtgtgtccg  tgtgacctgctgaccaggatggctgaacggcaagagtaacaagtgaag  gtgtccaacaaggccctgcttagctccatcgaagaccatctccaagctaaag  ggccagccccgcgagccccaggtgtacacactgctccatcccgggaagaga  tgaccaagaaccagggtgccccgactggctcgtgaagggtctlaccctccga  tatgcccgtggaatgggagccaacggccagcctgagaacaacataagacca  ccccctccgtgctgactccgacggctcattctctgtacagcaagctgacagt  ggalaagctccggggcagcaggggaacgtgtctcctgctccctgtatgcacga  ggctctgcacaacctacacagaagctcctgtctctgcccctggc</p>
212	mAb-CD73.3-Vh-hHC-IgG2-C219S	<p>gaagtgcagctggtggagctggtggaggctggtacagcctggcaggctccct  gagactctctgtgcagcctctggaftcaccitgagattatgcatgactgggt  ccggcaagctccagggaaggccctggagtggtctcaggtattagtggaga  gtgtagcalagcctalgcggactctggaaggccgallcaccalcaccagag  acaacgccagaactccctgtatctgcaaatgaacagctgagagctgaggaca  cggcctgtattactgtgccaagggtattacgtattttgactggcctgactactg  gggccagggaacctggtcaccgtctcagcgtcgaccaaggccctcctg  tgttctctggcccttgcctcccggctccactctgagtlaccgtctctggct  gccctgcaaggactacttcccagcctgtgaccgtctcctggaactctggcg  ctctgacctccggcgtgcacaccttccagcctgctcagctcctccggcctgta  ctctctgctcctcctgctgaccgtgccctcctccaactcggcaccagacctaca  cctgtaacgtggaccacaagccctcaacaccaaggtggacaagacctgga  cggaaagctctgctggaatgccctcctgcccctgacclctgtggctggccct  ccgtgttctgttcccccaagcccaaggacacctgatgatctcccggacc  ccgaagtgacctgctgtgtgtggtggtgtgtcccacgagaccggaggtcag  ttcaattggtactgtgacggcgtggaagtgcacaacgccaaagaccagcccag  agaggaaacagttcaactccactccgggtgtgtctgctgacctgtgtgca  ccaggactggctgaacggcaagagtaacaaggtgcaaggtgccaacaagggc  ctgctgccccatgaaaagaccatctccaagcaaaaggccagccccgcg  agcctcaggtgtacacactgctcctccagccgggaagagatgaccaagaacca  gggtgctcctgacctgtctgtgcaagggtctctaccctccgatactgctgtgaa  gggagctcaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccccctatgct  ggactccgacggctcattctctgtactccaagctgacagtggacaagctccgg  tggcagcagggaacgtgttctctgctgtgtatgcacgaggccctgcacaac  cactacaccagaagctcctgtcctgagccccggcaa</p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
213	mAb-CD73.3-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	<p>gaagtgcagctggaggagctggggaggcctgggtacagcctggcaggtccct  gagactcctctgtgcagcctctggattaccctttagattatgccatgactgggt  ccggcaagctccagggaaggccctggagtggtctcaggtattagtggaaaga  gtggtatagcatggctatgcggactctgtgaaggccgattaccatctccagag  acaacgccaagaactccctgtatctgcaaatgaacagctgagagctgaggaca  cggcctgttactgtgccaaagggtattacgttattttagctggcctgactactg  gggccagggaaccctggtcaccgtctctcagcgtcgaccaaggcccatcgtg  gtctccccctggcgcctgtctcaggagcactccgagagcacagcggccct  gggtctgctgtcaaggactactccccgaaccgggtgacgggtgctggaact  aggcctctgaccagcggcgtgcacacctccagctgctctacagctctcagg  actctactcctcagcagcgtgggtgaccgtgcccaccagcaactcggcacc  gacctacacctgcaacgtatgacacaagcccagcaacaccaaggtggacaag  acagttgagcgcacaactctgtctgagtgcccaccgtgcccagcaccactgtg  gcaggaccgtcagctctctctcccccaaaaccaaggacacctcatgatct  ccggaccctgaggteacatgctggtgggtggacgtgaccacgaagaccct  gaggtaagttcaactgtactgtgacggcgtggaggtgcataatgccaagac  aaagccgcgggagagcagtaacaacagcagtaaccgtgtgtgacagctctc  accgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctc  caacaagccctccaagcagcctcagaaaaacatctcaaaagccaagggg  cagccccgagaaccacagggttacacctgccccatcccgggagggagatga  ccaagaaccagggtcagctgacctgctggcaaaaggctctatcccagcgaca  tcgccgtggagtgaggagcaatggcagccgggagaacaactacaagaccac  gctctccgtctggactcgcagcgtctcttctctctatagcaagctaccgtgg  acaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctcatgctccgtgatgcatgag  gctctgcacaaccaactacacgcagaagacctctctctccccgggtaaa</p>
214	mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f	<p>caggltgcagctggaggagctggggaggcctgggtccagcctgggaggctcc  tgagactcctctgtgcagcctctggattaccctcagtaactatggcatgactgg  gtcctgccaggtccaggcaaggggctggagtggtggcagltataltgatgat  ggaagtaataaafactatccagactcctgaaggccgattaccatctccagag  acaattcaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggac  acggctgtgtlactgtgcgagagggggcagcagctggtacctgaltcttga  tatctggggccaaggaacatggtcaccgtctctcagcgtcgaacaggcc  ctcctgttctctgccccctcagcaagtccacctctggcggaaacagccgt  ctgggctgctgtcaaggactactccccagcctgtgaccgtctctggaact  ctggcgcctgacatctggcgtgcacaccttccctgctgtgctgagctlagcgg  cctgtactccctgtcctccgtctgacagtcccctcagctctctgggacccag  actacatctgcaacgtgaaccacaagccctcaacaccaagggtggacaagcg  ggltggaaccaagctctgcacaagaccatacctgccctccctgccctgctcc  tgaagctgaaggcgccttagcgtgttctgttccctccaagccaaggaacac  cctgatgatctcccggaccctgaagtgacctgcgtggtgggtggtgctccac  gaggaccagaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcaca  cgccaagaccaagcctagagaggaacaagtacaactccacctaccgggtggtgt  ccgtgctgaccgtctgaccaggallggctgaacggcaagagtaacaagtgc  aagggttccaacaaggccctgctagctccatcgaagaagaccatctccaaggt  aagggccagccccgcagccccaggtgtacacactgctccatccccgggaag  agatgaccaagaaccagggtgctctgacttgcctctgtaagggcttaccctc  cgatatgccgtggaatgggagtcacaagccagctgagaacaactacaaga  ccacctctccgtgctgactccgacggctcattctctctgacagcaagctgac  agtggaagtcctgggtggcagcaggggaacgtgttctctctgctccgtgatgca  caggctctgcacaaccaactacacagaagtcctgtctctgctccctggc</p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
215	mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-C219S	<p>caggtgcagctggtggagctggtggggaggcgtggfccaagcctgggaggfccc                      tgagactctctgtgcagcctctggaltcacctcagtaactatggcatgcaactgg                      gtccgccaggtccaggaagggtctggagtggtggcagttatattgatgat                      ggaagtaataaatactatccagactccgtgaaggccgattcacatctccagag                      acaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggac                      acggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctggfaccctgattctttga                      tatctggggccaaggaacaatgglcaccgtctcflcagcgtcgaccaaggggccc                      ctctgtgtttctctggcccctgtcctccggctccactctgagctaccctgctctg                      ggctgacctggtcaaggactctcccgagcctgtgaccgtgctctggaactctg                      gcgctctgacctccggcgtgcacaccttccagccgtgctgagctctccggcct                      gtaactctgtctccgtcgtgaccgtgcccctcctcaactctggcaaccagaccl                      gaacctgtaacgtggaccacaagccctcaacaccaagggtggacaagaccgtg                      gaaaggaaagtcctgctggaatgccctctctgacctgcaactctgtgctggc                      cctccgtgtctgttcccccaaggccaaggaacacctgatgaltctccggga                      cccccgaagtgacctgctgtgtgtgtgatgtgcccacgagggaccccgagggtg                      cagttcaattgtactgtgacggcgtggaagtgcacaacccaagaccgaagcc                      cagagaggaaacagttcaactcaactccgggtgggtgctgctgaccgtggf                      gcaccaggactggcgtgacggcaagaglacaaagtcaaggtgtcaacaag                      ggctgacctgccccatcgaagaccatctcaagcaaaaggccagcccc                      gcgagcctcagggtgtacacactgctcctccagccgggaagagatgaccaagaa                      ccagggtgctcctgacctgtctgtcaagggtcttaccctccgatatcgccgtg                      gaatggagtcacaacggccagcccagaaactacaagaccaccccccca                      tgcctggactccgacggctcallectctgactccaagctgacagtggaacagctc                      cgggtggcagcagggaacgtgtctctgctctgtgatgacgagccctgcaac                      aacctactacccagaagtcctctgacctgagccccggcaaa</p>
216	mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	<p>caggtgcagctggtggagctggtggggaggcgtggfccaagcctgggaggfccc                      tgagactctctgtgcagcctctggaltcacctcagtaactatggcatgcaactgg                      gtccgccaggtccaggaagggtctggagtggtggcagttatattgatgat                      ggaagtaataaatactatccagactccgtgaaggccgattcacatctccagag                      acaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggac                      acggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctgtgacctgattctttga                      tatctggggccaaggaacaatgglcaccgtctcflcagcgtcgaccaaggggccc                      atcggcttccccctggcggcctgtcctcagagcaactccgagagcagcagg                      cctgtggctgctgtgcaaggactacttccccgaaccggtgacgggtctgtgga                      actcaggcgtctgaccagcggcgtgcacacctccccagctgctctacagctc                      aggactctactcctcagcagcgtgtgtgaccgtgcccctcagcaactcggcac                      ccagacctacactgcaacgtatcacaagcccagcaacccaaggtggaca                      agacagttgagcgaatctgtgtcgtggtgcccaccgtgcccagcaccactg                      tggcaggacctcagctctctctctcccccaaaacccaaggacacctcatgat                      ctccggacccctgaggtcacatgctgtgtgtgagctgagccacgaagacc                      ctgaggtcaagttcaactgtactgtggacggcgtggagggtcatalaagccaaga                      caaagccgcgggaggagcaglacaaacagcagtlaccgtgtgtcagcgtccl                      caccgtctgaccagactggctgaatggcaaggagtacaagtcaaggtct                      ccaacaaagccctccaagcagcaltcgagaaaacctctc caaagccaaggg                      gcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggaggagatg                      accaagaaccaggtcagcctgacctgctgtgcaaaaggctctatcccagcgac                      atcggcgtggagtggtgagcaatggcgagccggagaacaactacaagacca                      cgctccctgtctggactccgacggctcttctctctatagcaagctaccgtg                      gacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctctatgctccgtgatcatga                      ggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgggtaaa</p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
217	mAb-CD73.5-Vh-hHC-IgG1.1f	<p>cagggtcagctggtagtctgggggagggcgtggccagcctgggaggtccc                      tgagactcctctgcaagctctggaffcaccctcagtaactatggcatgcaactgg                      gtcgccaggtccaggaaggggctggagtggtggcagttatattgatgat                      ggaagtaataatactatccagactccgtgaaggccgattcaccatctccagag                      acaatlccaagaacacgctglatcgaatgaacagcctgagagccgaggac                      acggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctgggtaccctgattctttga                      tatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctctcagcgtcgaccaaggggccc                      ctccgtgttctctggccccctccagcaagtcacacctctggcggaaacagccgt                      ctgggctgctgglcaaggactactlccccgagcctgtgaccgtgctctggaact                      ctggcggcctgacatctggcgtgacaccttccctgctgtgctgagctagcgg                      cctgtactcctgtctccgtctgacagtgcccctcagctctctgggcaaccag                      acctacatctgcaacgtgaaccacaagccctcaacaccaaggtgcaaacg                      ggtggaaccaagctctgcgacaagaccalacctgcccctctgcccctgctcc                      tgaagctgaaggcggccccctagcgtgtctctgttccctcaaaagccaagacac                      cctgatgatctcccggaccctgaagtgacctgcgtgggtggatgtgtccac                      gaggaaccagaagtgaagtcaattggtactgtgacggcgtggaagtgcaca                      cggcaagaccaagcctagagaggaaactgacaactccacctaccgggtggtgt                      ccgtgctgaccgtgctgcaccaggatggctgaacggcaagaglacaaagtgc                      aagggtgccaacaaggccctgcttagctccatcgaagaagaccatctcaaggct                      aaggggcagccccgcgagcccagggtgtacacactgctccatccccgggaag                      agatgaccaagaaccaggtgtcctgactgctctgtgaagggttctaccctc                      cgatctgccgtggaatgggagtcacaacggccagcctgagaacaactacaaga                      ccaccctcccgtgctgactccgacggctcattctctgtacagcaagctgac                      agtggaatgctccgggtggcagcaggggaactgttctctgctcctgtagtga                      cgaggctctgcacaaccactacacacagaagtcctgtctctgcccctggc</p>
218	mAb-CD73.5-Vh-hHC-IgG2-C219S	<p>cagggtcagctggtagtctgggggagggcgtggccagcctgggaggtccc                      tgagactcctctgcaagctctggaffcaccctcagtaactatggcatgcaactgg                      gtcgccaggtccaggaaggggctggagtggtggcagttatattgatgat                      ggaagtaataatactatccagactccgtgaaggccgattcaccatctccagag                      acaatlccaagaacacgctglatcgaatgaacagcctgagagccgaggac                      acggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctgggtaccctgattctttga                      tatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctctcagcgtcgaccaaggggccc                      ctctgttllctctggccccctgctcccggctccacctctgagtlaccctgctctg                      ggctgctggtcaaggactactlccccgagcctgtgaccgtgctctggaactctg                      gcgctctgacctccggcgtgcacacctlccagccgtgctgagctccctggcct                      gtactctgtctcctgctgaccgtgcccctctcaactcggcaccagacct                      acactgtaactgtgaccacaagccctcaacaccaagggtggacaagaccgtg                      gaacggaagctctgctggaatgcccctctgcccctgacctctgtgctggc                      ctctccgttctgttcccccaagcccaggacacctgatgatctcccggg                      cccccgaagtgacctgctggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtg                      cagttcaattgtactgtgacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccagacc                      cagagaggaaacagtlcaactccacctlccgggtggtgctgctgacctgggl                      gcaccaggactggctgaacggcaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaag                      ggctgctgccccatcgaagaccatctcgaagacaaggggcagcccc                      gcgagcctcagggtgtacacactgctcctccagcccgggaagagalaccaagaa                      ccagggtgctcctgacctgtctggtcaaggcttctaccctccgatatgccgtg                      gaatggagtcacaacggccagcccagaaactacaagaccaccccccca                      tctggactccgacggctcattctctgtactccaagctgacagtggaagctcc                      cgggtggcagcagggcaacgttctctgctctgtatgacagggcccctgca                      aaccactacaccagaagtcctgtcctgagccccggcaaa</p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
219	mAb-CD73.5-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	<p>caggtgcagctgggtggagctfgggggaggcgtggfccagcctgggaggtccc                      tgagactctctgtgcaagctctggattcacctcagtaactatggcatgcactgg                      gtccgccaggtccaggcaaggggctggagtggtggcagttatattgatgat                      ggaagtaataaatacatalccagactccgtgaagggccgattaccatctccagag                      acaatccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggac                      acggctgtgtattactgtgcaagggggcagcagctgggtaccctgattctttga                      talctggggccaaggaacaalggcaccgtctcagagcaccctcgagagcagcggg                      atcggcttccccctggcggcctgctccagagcaccctcgagagcagcggg                      ccctgggctgctgcaagggaclactcggcaaccgggagcgtgctgctggga                      actcaggcgtctgaccagcggcgtgcacacctccagctgctctacagctc                      aggactctactcctcagcagcgtgtgaccgtgcccctcagcaactcggcac                      ccagacctacacctgcaacgtagatcaaacgccagcaacccaaggtggaca                      agacagttgagcgcgaatcctgtgctgagtgcccaccgtgcccagcaccacctg                      tggcaggaccgctcagctctcctcctcccccaaaacccaaggacacctcatgat                      ctccggaccctgaggtcacatgctgtggtggagctgagccacgaagacc                      ctgaggtcaagttcaactgtgacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaa                      caaagccgcgggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcct                      caccgtctgcaaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcgaagctc                      ccaacaaagccctcccaagcagcaltcgagaaaaccatcctcaaaagccaag                      gcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggaggagatg                      accaagaaccaggtcagcctgacctgctgctcaaaaggctctatcccagc                      atcggcgtggagtgaggagcaatgggcagccgggagaacaactacaagacca                      cgcctccgtgctggactccgacggcctcttctctctatagcaagctaccgtg                      gacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctcatgctccgtgatgatga                      ggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgctccccgggtaaa</p>
220	mAb-CD73.6-Vh-hHC-IgG1.1f	<p>ggcatgcactgggtccgccaggtccaggcaagggtggagtggtggcag                      tlataatglatgallccaglaalaaactatccagactccgtgaagggccgattca                      ccattccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaalgaacagcctga                      gagccgaggacacggctgtgtattactgtcagagggggcagcagctgtgtac                      ccctgaltctllgalatctggggccaaggaacaatggtaccgtctctcagcgtc                      accaagggccctccgtgttctctggtgcccctccagcaagtcaccctctggcg                      gaacagccgctctgggctgctgcaaggactactcctccagcctgtgaccg                      tglctggaaactctggcggcctgacatctggcgtgcacacctcctctgtgtg                      cagcttagcggcctgtactcctgtctcctgctgtgacagtgccctcagctctc                      gggcaccagactacatctgcaacgtgaaccacaagccctccaacccaagg                      tggacaagcgggtggaaaccaagctctgcgacaagaccatacctgcccctcc                      tgcctgctcctgaagctgaaggcggccctagcgtgtctctgttccctccaaagc                      ccaaggacacctgatgatctccggaccctgaagtgacctgcgtggtgtgg                      atgtgtcccacgaggaccagaaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtgg                      aagtcacaacgccaagaccaagcclagagaggaaacagtaaacctccactac                      cgggtggtgtccgtgctgaccgtctgaccaggattggtgaacggcacaaga                      gtacaagtgcgaaggtlccaacaaggcccctgclagctccatcgaaaagaccat                      ctccaaggtcaaggccagccccggagccccaggtgtacacactgctcctcat                      cccgggaagagatgaccaagaaccaggtgctcctgactgctcctgtaagggc                      ttctacctccgatalcggcgtggaatggagtcacaaggccagcctgagaac                      aactacaagaccaccctccgtgctggactccgacggctcalttctctgtaca                      gcaagctgacagtgataagctccgggtggcagcaggggaacgtgtctcctgct                      cctgtgatgcacgaggtctgcaaacactacacacagaagctcctgtctctgtc                      cctlggc</p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
221	mAb-CD73.6-Vh-hHC-IgG2-C219S	<p>cagggtgcagctggaggagctgggggaggcgtggcagcctgggaggccct  gagacttctctgagcctctggattaccftcagtaactatggcatgactggg  tcgccaggtccaggcaaggggctggagtggtggcagttatattgtatgattc  cagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattaccatctccagagac  aafccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagccagagaccgaggacac  ggctgtgtallactgtcagagggggcagcagctggaccctgallctttgala  ctggggccaaggaacaatggcaccgtctctcagcgtcgaccaagggccct  ctgtgttctctggccctgctcccggteccctctgagctaccgtctctgg  gctgctgtgcaaggactlctcccagcctgtgaccgtgctcggaaactctgg  cgctctgacctccggcgtgcacacftccagccgtgctgagctctccggcctg  tactctctgctccgtgaccgtgcccctctcaactcggcaccagacctc  cactgtaacgtggaccacaagccctcaacaccaaggtggacaagaccgtgg  aacggagctctgctggaatgccctctgcccctgacctctgtgctgctgccc  ttcgtgttctctgtccccaaagccaaaggacacctgatgatctccggacc  cccgaagtgacctgctggtgggtggatgtgcccacgaggaccccagggtgca  gtcaattgtagctggacggcgtggaagtgcacaacgccaaagaccaagccca  gagaggaacagltcaactccacctccgggtggtgctgctgaccggtgctg  accaggactggctgaacggcaagagtacaagtcaaggtgccaacaaggg  cctgctgccccatcgaagaccatctccaagacaaggccagccccgc  gagcctcaggtgtacacactgctcccagccgggaagagatgaccaagaacc  agggtgccctgacctgtctggtcaagggtlctacccctccgatalcggctgga  atgggagtcacagccagcccgagaacaactacaagaccacccccccatg  ctgactccagcggctcattctctgtactccaagctgacagtggaacaagccc  gggtggcagcaggcaacgtgtctctgctgtgatgcagaggccctgcaca  accactacaccagaagtcctgtcccagccccgcaaa</p>
222	mAb-CD73.6-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	<p>cagggtgcagctggaggagctgggggaggcgtggcagcctgggaggccct  gagacttctctgagcctctggattaccftcagtaactatggcatgactggg  tcgccaggtccaggcaaggggctggagtggtggcagttatattgtatgattc  cagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattaccatctccagagac  aafccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagccagagaccgaggacac  ggctgtgtallactgtcagagggggcagcagctggaccctgallctttgala  ctggggccaaggaacaatggcaccgtctctcagcgtcgaccaagggccct  cggctlccccctggcgcctgctccagagcactccgagagcagaccggcc  ctgggtgctgtgcaaggactlctcccgaaccggtagcgtgctggtgaa  tcaggcgtctgaccagcggcgtgcacacctccagctgtcttacagctc  ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcccctccagcaactcggcacc  cagacttacactgcaacgtatgacacaagccagcaacaccaaggtggacaa  gacagttgagcgaatctgtgctgagtgcccaccgtgcccagcaccacctgt  ggcaggaccgtcagcttctcttccccaaaaccaagacacctcatgatc  tcccggacccctgaggtcacatgctgtggtggacgtgagccacgaagacc  tgaggcaagtcaactgtgtacgtggacggcgtggaggtgcalaatgccaagac  aaagccgctgggagagcaglacacagcagtaaccgtgtggtcagcgtctc  accgtctgcaccaggactgctgaatggcaagagtacaagtgcaaggtctc  caacaagccctcccaagcagcagcagaaaaccatctccaagccaaagg  cagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccggaggagatga  ccaagaaccaggtcagcctgacctgctgcaaaaggtctctatcccagcaga  tcgccgtggagtgaggagcaalggcagccggagaacaactacaagaccac  gctcccgtgctggactccagcgtctctctctctatagcaagctaccgtgg  acaagagcaggtggcagcagggaacgtctctctctatgcaagctaccgtgg  gctctgcacaaccactacacgcagaagaccctctctctctccccgggtaaa</p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
223	mAb-CD73.7-Vh-hHC-IgG1.1f	cagggtgcagctggtggagctgggggagggcgtggtccagcctgggaggtccct gagacttctctgtgcaagctctggatlcaccflcagtaactatggcatgcactggg tccgccaggtccaggcaaggggctggagtggtggcagttatattgatgatc cagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagac aallccaagaacacgctglalctgcaaatgaacagcclgagagccgaggacac ggctgtgtattactgtcggagggggcagcagctgtaccctgattctttgala tctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaaggggccct ccgtgtllcctctggcccctccagcaagtcaccctctggcggaaacgcccct gggtctgctgtcaaggactactfcccagcctgtgaccgtgtctgaaactct gggtccctgacatctggcgtgcacacctctctgtgtctgactgagcggc ctgtactccctgtctccgtcgtgacagtgcccctccagctctctgggcacccaga cctacatctgcaacgtgaaccacaagccctcaacaccaagggtggacaagcgg gtggaaccaagctctgcgacaagaccatactgcccctccctgctctct gaagctgaaggcggccctagcgtgtctctgtlccctccaagccaaggacacc ctgatgatctccggaccctgaagtgacctgctgtgtggtgatgtgtccacg aggaccagaagtgaaftcaatfgtacgtggacggcgtggaagtgcacaac gccaaagaccaagcclagagaggaacaglacaaactccacctaccgggtgtgtc cgtgtgaccgtgtgcaccaggtggctgaacggcaagagtacaagtgca aggtgtccaacaaggcccctgcttagctccatcgaagaccatctccaagctla agggccagccccgcgagccccagggtglacacactgctccatcccgggaaga gatgaccaagaaccagggtgcccctgacttgccctgtgaagggtcttaccctcc gatctgccgtggaatgggagtcacaacggccagcctgagaacaactacaagac caccctcccgtgtggaactcggaggtctatctctgtacageaagctgaca gtggataagtcccgggtgcagcaggggaacgtttctctgctccgtgatgcac gaggctctgcacaaccactacacagaagctctctgtcccctggc
224	mAb-CD73.7-Vh-hHC-IgG2-C219S	cagggtgcagctggtggagctgggggagggcgtggtccagcctgggaggtccct gagacttctctgtgcaagctctggatlcaccflcagtaactatggcatgcactggg tccgccaggtccaggcaaggggctggagtggtggcagttatattgatgatc cagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagac aallccaagaacacgctglalctgcaaatgaacagcclgagagccgaggacac ggctgtgtattactgtcggagggggcagcagctgtaccctgattctttgala tctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaaggggccct ctgtgttctctctggcccctgctcccgtccacctctgagctaccgctctgg gctgctgtcaaggactactfcccagcctgtgacctgtctctggaactctgg cgtctgacctccggcgtgcacacctlccagccgtgtgcaactctccggcctg tactctgtctctctgtgaccgtgcccctctccaactctggcaccagacctfa cacctgtaacgtggaccacaagccctcaacaccaaggtggacaagaccgtgg aacgggaagctctgctggaatgcccctctgcccctgacctctgtgctgtgccc ttcgtgtlctgtlcccccaagccaaggacacctgaltgatctccggacc cccgaagtgacctgctgtggtggtgatgtgtcccacgaggaccccagggtgca gttcaatfgtlactgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagccca gagaggaacagttcaactccacttcgggtggtgtccgtgtgactgctggtg accaggaactgctggaacggcaagaggtacaagtgcaaggtgtccaacaagg ccctgctgccccatcgaagaccalctccaagacaagggccagccccgc gagcctcaggtgtacacactgctcccagcggggaagagatgaccaagaacc aggtgtccctgacctgtctgtcaagggtcttaccctctcgatctgcccgtgga atgggagtcacaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccccctatg ctgactccgacggctcattctctgtactccaagctgacagtggaacaagtccc gggtggcagcagggcaactgtlctctctgctctgtgatgcacgagggccctgcaca accactacaccagaagtcctgtcccctgagccccggcaaa

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
225	mAb-CD73.7-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	<p>cagggtgcagctggaggagctgggggagggcgtgggccagcctgggaggctccct  gagactctcctgtgcaagctctggattcaccctcagtaactatggcatgcactggg  tccgccaggtccaggcaaggggctggagtggtggcagttatattgatgattc  cagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagac  aallccaagaacacgctglatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacac  ggctgtgtattactgtcggagagggggcagcagctgtlaccctgattctttgata  ctggggccaaggaaacaatggtaccgtctctcagcgtcgaccaaggggcccat  cggcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagcggcc  ctgggctgctgtgcaaggactacttccccgaaccgggtgacggtgctgtggaac  tcaggcgtctgaccagcggcgtgcacacclcccagctgctcagcagctcga  ggactctactcctcagcagcgtgggtgaccgtgccctccagcaactctggcacc  cagacctacactgcaacgtatgcacaagcccagcaacaccaagggtggaca  gacagttgagcgcaaatcctgtgctgagtgcccaccgtgccagcaccacctgt  ggcaggaccgtcagcttctcttcccccaaaaccgaagacacctcatgac  tccggaccctgaggtacatgctgggtggacgtgagccacgaagacc  tgaggtcaagtcaactgtgacgtggagcggcgtggaggtgcataatgccaagac  aaagccgcgggaggagcagfacaacagcagctaccgtgtgtcagcgtcctc  accgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggaglacaaatgcaaggctc  caacaaagccctccaagcagcctcagaaaaacatctcaaaagccaagggg  cagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggaggagatga  ccaagaaccaggctcagcctgacctgctgcaaaaggcttctatcccagcgaca  tcgccgtggagtgaggagcaatggcgagccggagaacaactacaagaccac  gctcctccgtgctgactccgacggctctctctctctatagcaagctaccgtgg  acaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctcatgctccgtgatgcatgag  gctctgcacaaccactacacgcagaagacctctcctgtccccgggtaaa</p>
226	mAb-CD73.8-Vh-hHC-IgG1.1f	<p>cagggtgcagctggaggagctgggggagggcgtgggccagcctgggaggctccct  gagactctcctgtgcaagctctggattcaccctcagtaactatggcatgcactggg  tccgccaggtccaggcaaggggctggagtggtggcagttatattgatgattc  ccagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagaga  caallccaagaacacgctglatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggaca  cggctgtgtattactgtcggagagggggcagcagctgtlaccctgattctttgat  atctggggccaaggaaacaatggtaccgtctctcagcgtcgaccaaggggcc  ctcctgttctctgccccctcagcaagtccacctctggcgaacagccgt  ctgggctgctgtgcaaggactacttccccgagcctgtgacctgtctctggaact  ctggcgccctgacatctggcgtgcacaccttccctctgtgctgacgtctagcgg  cctgtactcctgtcctccgtgacagtgcccctcagctctctgggacccag  acctacatctgcaacgtgaaccacaagccctcaacaccaagggtgacaagcg  gggtgaaaccaagctcgcgacaagaccatacclgcccctcctgcccctgctcc  tgaagctgaaggcgcccctagcgtgtcctgttccctccaaagccaaggacac  cctgatgatctcccggaccctgaagtgacctgctggtggatggtgctccac  gaggaccagaagtgaaatcaatgggtacgtggacggcgtggaagtgacaa  cgccaagaccaagcctagagaggaaacagfacaactccacctaccgggtggtgt  ccgtgctgaccgtgctgcaccaggallggctgaacggcaaaagatcaaaatgc  aagggtgccaacaaggccctgctagctccatcgaaaaagaccatctcaaggt  aagggccagccccgcgagcccagggtgacacactgctccatccccgggaag  agatgaccaagaaccagggtgctcctgactgctcctgtgaagggttctaccctc  cgatctgcccgtggaatgggagtcacacggccagcctgagaacaactacaaga  ccacccctcccgtgctgactccgacggcctcattctctgtacagcaagctgac  agtgataagctcccgggtggcagcaggggaacgtgttctctctgctccgtgatgca  cgaggctctgcacaaccactacacagaagcctgtctctgtccccctggc</p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
227	mAb-CD73.8-Vh-hHC-IgG2-C219S	<p>cagggtgcagctggtggagctctgggggagggcgtggccagcctgggaggtccct  gagactctctgtgcagcctctggaftcaccftcagfaactatggcatgcactggg  tccgccagglccaggcaaggggctggagtggtggcagttatattglatgall  ccagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgaltcaccatctccagaga  caaltccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggaca  cggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctgtgacctgallctttgal  atctggggccaaggaacaatgtaccgtctctcagcgtcgaccaaggggccc  ctctgtgttctctggccccctgctccgggtccacctgagctaccctgctctg  ggctgctgtgcaaggactactlccccgagcctgtgacctgtgctctggaactctg  gcgctctgacctccggcgtgcacaccttccagccgtgctgagctctccggcct  gtactctctgctccctgctgacctgacctctccaactcggcaccagacct  aacctgtaacgtggaccacaagcccaccaacccaagggtggacaagaccgtg  gaaccgaagctctgctggaatgccctctgacctgacctctgtgctggc  ccttccgtgtctgttcccccaagcccaaggacacctgatgatctccggg  ccccgaagtgacctgctggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtg  cagttcaaltgtgacgtggacggcgtggaagtgcacaacccaagaccaagcc  cagagaggaacagttcaactccacctlccgggtggtgctgctgacctgggt  gcaccagactggctgaacggcaagagtacaagtgaaggtgccaacaag  ggcctgctgccccatcgaagaccatctccaagacaagggccagcccc  gcgagcctcaggtgtacacactgctccagccgggaagagatgaccaagaa  ccaggtgtccctgacctgtctggtcaagggtcttaccctccgatatcggcgtg  gaatggagtgcaacggccagcccgagaacaactacaagaccaccccccca  tgcgtggacccgacggctcaltctctgactccaagctgacagtggaagtc  cgtggcagcaggcaacgtgttctctgctctgtgatgcagagccctgcac  aacactacacccaagaagtcctgtccctgagccccggcaaa</p>
228	mAb-CD73.8-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	<p>cagggtgcagctggtggagctctgggggagggcgtggccagcctgggaggtccct  gagactctctgtgcagcctctggaftcaccftcagfaactatggcatgcactggg  tccgccagglccaggcaaggggctggagtggtggcagttatattglatgall  ccagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgaltcaccatctccagaga  caaltccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggaca  cggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctgtgacctgallctttgal  atctggggccaaggaacaatgtaccgtctctcagcgtcgaccaaggggccc  atcggcttccccctggcgcctgctccagagcaacctccagagcacagcgg  ccctgggctgectgtcaaggactactlccccgaaccgggtgacctgctggtga  actcagcgtctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctg  aggactctactcctcagcagcgtggtgacctgacctcagcaactcggcac  ccagacctacactgcaacgtagatcaaccccagcaacccaaggtggaca  agacagttgagcgaalccctgtctgagtgcccaccgtgcccagcaccacctg  tggcagcagcctcagcttctctctcccccaaaacccaaggacacctcatgat  ctccccgacccctgaggtcacatgctggtggtgacctgagccacgaagacc  ctgaggtcaagttcaactgtactgtgacctgacctgacctgacctgacctg  caaagccgcgggagggagcaglacacagcactgacctgtggtcagcgtct  caccgtctgaccagactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtct  ccaacaaagccctccaagcagcatcgagaaaaccatctccaagccaaggg  gcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccateccgggaggagatg  accaaagaaccaggtcagcctgacctgacctgacctgacctgacctgacctg  atcgccgtggagtgaggagcaatggcgagccggagaacaactacaagacca  cgcctcccgtctgactccgacctctctctctctatagcaagctcaccgtg  gacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctctctctctctctctctct  ggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctctctctctctctctctct</p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
229	mAb-CD73.9-Vh-hHC-IgG1.1f	<p>cagggtgcagctggtggagctctgggggagggcgtggtcagcctgggaggtccct  gagactctctgtgcaagctctggattacccttcagtaactatggcatgcaactggg  tccgccaggtccaggcaagggtctggagtggtggcagttatggtatgatt  ccagtaataaatactatccagactccgtgaaaggccgaltaccatctccagaga  caallccaagaacacgctglalcgcaaatgaacagcctlgagagccgaggaca  cggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctggfacctgattctttgat  atctggggccaaggacaatggtcaccgtctctcagcgtcgaccaagggcc  ctcctgtgttctctggcccctccagcaagtcacctctggcggaaacagccgt  ctgggctgctgtgcaaggactacttcccagagcctgtgaccgtgctggaact  ctggcgcctgacatctggcgtgcacaccttccctgtgtgctgagctagcgg  cctgtactcctgtctcctgctgtgacagtcccctcagctctctgggcaccag  acctacatctgcaacgtgaaccacaagccctccaacaccaaggtgacaagcg  gggtggaaccaagctcgcgacaagaccalacclgcccctcctgcccgtctc  tgaagctgaaggcggcccctagcgtgtctgttcccctcaaaagccaaggacac  cctgatgatctccggaccctgaagtacactgctgtggtggtggtggtgctccac  gaggaccagaagtgaagtcaattgtgtacgtggacggcgtggaagtgcaca  cgccaagaccaagcctagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgt  cctgtgtgaccgtctgaccaggallggctgaacggcaagagtlacaagtgc  aagggtgtcaacaaggccctgcttagctccatcgaaaagaccatctcaaggt  aagggccagccccggagcccaggtgtacacactgctccatccccgggaag  agatgaccaagaaccaggtgtccctgacttgcctcgtgaagggtctaccctc  cgatalcggcgtggaatgggaglcacaacggccagcctgagaacaactacaaga  ccacccctcccgtgtgactccgacggctcattctctgtacagcaagctgac  agtggataagtcccggctggcagcaggggaacgtgttctctgctccgtgatgca  cgaggtctgcaacaactacacagaagtcctgtctgtcccctggc</p>
230	mAb-CD73.9-Vh-hHC-IgG2-C219S	<p>cagggtgcagctggtggagctctgggggagggcgtggtcagcctgggaggtccct  gagactctctgtgcaagctctggattacccttcagtaactatggcatgcaactggg  tccgccaggtccaggcaagggtctggagtggtggcagttatggtatgatt  ccagtaataaatactatccagactccgtgaaaggccgaltaccatctccagaga  caallccaagaacacgctglalcgcaaatgaacagcctlgagagccgaggaca  cggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctggfacctgattctttgat  atctggggccaaggacaatggtcaccgtctctcagcgtcgaccaagggcc  ctcctgtgttctctggcccctgctcccgtccacctgtgactaccgtctctg  ggctgctgtgcaaggactacttcccagagcctgtgaccgtgctggaactctg  gcctctgacctccggcgtgcacaccttccagccgtgctgagctctccggcct  gtactctctgctcctcctgtgaccgtgcccctcctcaacttggcaccagacct  acactgtaactgtgaccacaagccctccaacaccaaggtgacaagaccgtg  gaacggaaagctctgctggaatgcccctcctgcccctgcaactctgtgctggc  cctlccgtgttctgttcccccaagccaaggacaccclgalgalctcccggga  ccccgaagtgacctgctggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtggtg  cagttcaattgtgtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccagcc  cagagaggaacagttcaactccaccttccgggtggtgctgctgacctggtg  gcaccaggactggctgaacggcaagagfacaagtcaaggtgtcacaag  ggcctgcccgtccccatcgaaaagaccatctccaagacaagggccaagcccc  gcgagcctcagggtgtacacactgctcccagccgggaagagatgaccaagaa  ccaggtgtcccctgacctgtgtgtaagggttctaccctccgatactgcccgtg  gaatgggagtcacaaggccagcccagacaacacacacacacacacacacac  tgcctggactccgacggctcallelctctgactccaagctgacagtggaagctc  cggggcagcagggcaacgtgttctctgctctgtgtgacagcagggccctgca  aaccactacaccagaagtcctgtcccctgagccccggcaaa</p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
231	mAb-CD73.9-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	<p>cagggtgcagctggtggagctctgggggagggcgtggtccagcctgggaggtccct  gagactctctgtgcaagctctggattcaccffcagtaactatggcatgcactggg  tccgccaggtccaggcaaggggctggagtggtggcagttatggtatgatt  ccagtaataaataclalccagactccgtgaagggccgattcaccatcaccagaga  caalfccaagaacacgctglalctgcaaatgaacagcctgagagccgaggaca  cggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctggfaccctgattctttgat  atctggggccaaggaacaatggtcaccgtctctcagcgtcgaccaagggccc  atcgggttccccctggcggcctgctccaggagcaccctccgagagcagcggg  ccctggctgctgcaaggaactacttcccgaaccggtgacgggtgctgtgga  aclcaggcgtctgaccagcggcglgcacacclcccagctgctctacagctctc  aggacttactcctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaactcggcac  ccagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacccaagggtgaca  agacagttgagcgaatctgtgtcagtgcccaccgtgccagcaccacctg  tggcaggaccgtcagcttctctctcccccaaaacccaaggacacctcatgat  ctccggacccctgagglcactgctggtggtggagctgagccacgaagacc  ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgataafccaaga  caaagccgcgggagagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtctct  caccgtctgaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtct  ccaacaaagccctccaagcagcatcgagaaaaccatctcaaaagccaaggg  gcagccccgagaaccacaggtglacacctgccccatcccgggagggagatg  accaagaaccaggtcagcctgacctgctgcaaaaggctctctccagcgac  atcgcctggtgagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagacca  cgctccctgctggtgactccgacggctctctctctctatagcaagctcaccgtg  gacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctcagctccgtgatgcatga  ggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgctccccgggtaaa</p>
232	mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f	<p>cagggtgcagctggggagctctgggggagggcgtggtccagcctgggaggtccct  gagactctctgtgcaagctctggattcaccffcagtaactatggcatgcactggg  tccgccaggtccaggcaaggggctggagtggtggcagttatggtatgatt  agagtaataaataclalccagactccgtgaagggccgattcaccatcaccagaga  caalfccaagaacacgctglalctgcaaatgaacagcctgagagccgaggaca  cggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctggfaccctgattctttgat  atctggggccaaggaacaatggtcaccgtctctcagcgtcgaccaagggccc  ctcctgttctctgccccctcagcaagtcaccctctggcggaaacagccgtct  ctgggctgctgcaaggaactacttcccagcctgtgaccgtgctctggaact  ctggcggcctgacatctggcgtgcacaccttccctgctgtgctgacglagcgg  cctgtactccctgtctcctgctgtgacagtccccagctctctgggacaccag  actacatctgcaacgtgaaccacaagccctccaacccaagggtgacaagcg  gggtgaaaccaagctctgcgacaagaccataclcccctccctgcccgtctcc  tgaagctgaaggcggccccctagcgtgttctgttccctccaagccaaggacac  cctgatgatctcccgaacctgaagtacgtcgtggtggtgatgtgcccac  gaggaccagaagtgaagttcaattgtacgtggacggcgtggaagtcacaa  cgccaagaccaagcctlagagaggaacagtacaacccacclaccgggtggtgl  ccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaagagttacaagtc  aagggttccaacaagggccctgctagctccatcgaaaagaccatctccaaggt  aagggccagccccgcgagcccaggtglacacaclgctcclcccgggaag  agatgaccaagaaccaggtgtccctgacttgcctctggaaggctctaccctc  cgatctgccgtggaatgggagttcaacggccagcctgagaacaactacaaga  ccaccctcccgtgctgactccgacggctcattctctctgacagcaagctgac  agtgalaagctccgggtggcagcaggggaacgtgttctctgctccgtgatgca  cgaggctctgcacaaccactacacagaaglcctgtctctgctccccgtg</p>





(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
237	CD73.4 (VH) - Secuencia de Nucleótidos	caggTgcagctggTggagTctgggggagggcTggtccagcctgggaggtccct gagactctctctgtgcagcctctggattcaccTtcagtaactatggcatgcactggg tccgccaggctccaggcaaggggctggagTgggtggcagttatattgatgatg gaagtaataaatactatccagactcctgtaaggggccgattcaccatcaccagaga caaltccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggaca cggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagcTggTaccctgattctttgat atctggggccaaggaacaatggtcaccgtctctca
238	5F8 VK3	EIVLTQSPATLSI.SPGFERATL.SCRASQSVSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSDYF LTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWWTFGQGTKVEIK
239	5F8 VK3 CDR1	RASQSVSSYLA
240	5F8 VK3 CDR2	DASNRAT
241	5F8 VK3 CDR3	QQRSNWWT
242	5F8 VK3 - Secuencia de Nucleótidos	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTA GTTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTG CAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACTGGAT GCACTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCT GGTGTGGGTCTCACGTAATTAATAGTGTGGGAGT AGCACAGGTTACGCGGATTCCGTGAAGGGCCGA TTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACG CTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAG GACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGAGTTA GCAGTGGCTGGTACTTTGACTACTGGGGCCAGGG AACCCTGGTACCCGTCTCCCTCA
243	11F11 (cadena pesada de longitud completa) - Sec NT	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGT GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCTGTG CAACGTCTGGATTACCTTCAGTAACTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCT GGAGTGGGTGGCAGTTATATTGTATGATGGAAGT AATAAATACTATCCAGACTCCGTGAAGGGCCGA TTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGC TGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG ACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGCA GCAGCTGGTACCCTGATCTTTTGTATCTGGGG CCAAGGAACAATGGTCACCGTCTCTTCAGCCTCC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCT GCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCC TGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGCAGGTGTCTGTGGAACTCAGGCGCTCTGACC AGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTTACAGT CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC CGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTAC ACCTGCAACGTAGATCACAAAGCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGACAGTGTGAGCGCAAAATGTTGT GTCCAGTGGCCACCGTGGCCAGCACCACTGTGG CAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAAACC CAAGGACACCCCTCATGATCTCCCCGACCCCTGAG GTACAGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCA

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
		CCGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTG GTCAGCGTCCACCGTTGTGCACCAGGACTGGC TGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA ACAAAGGCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC AGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGA TGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCGGT CAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATA CAAGACCACACCTCCCAATGCTGGACTCCGACGGC TCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACA AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
244	11F11 (cadena ligera de longitud completa 1) - Sec NT	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGT CTTTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACCTCTCTCTG CAGGGCCAGTCAGGGTGTAGCAGCTACTTAGCC TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGG CTCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTG GCATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGCTG GGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGA GCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGAGCAG CGTAGCAACTGGCATCTCACTTTCGGCGGAGGGGA CCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCACTCTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTG CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC AGTGGAAAGGTGGATAACGCCCCTCAATCGGGTA ACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAG TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCCGCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
245	11F11 (cadena ligera de longitud completa 2) - Sec NT	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGGA CCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCACTCTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTG CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC AGTGGAAAGGTGGATAACGCCCCTCAATCGGGTA ACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAG TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCCGCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT



(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
248	4C3 (cadena ligera de longitud completa 2) - Sec NT	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT                      CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCTTCACTTG                      TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC                      TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG                      TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG                      GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG                      GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA                      GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG                      TATAATAGTTACCCTCCAACGTTTCGGCCAGGGGA                      CCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCAC                      CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA                      GTTGAATCTTGAACTGCTCTGTGTGTGTGCTG                      CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC                      AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA                      ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA                      AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGA                      CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG                      TCTACGCTTGCGAAGTACCCATCAGGGCTGAG                      CTCGCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA                      GTGT</p>
249	4C3 (cadena ligera de longitud completa 3) - Sec NT	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT                      CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCTTCACTTG                      TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC                      TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG                      TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG                      GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG                      GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA                      GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG                      TATAATAGTTACCCTCCAACGTTTCGGCCAGGGGA                      CCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCAC                      CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA                      GTTGAATCTTGAACTGCTCTGTGTGTGTGCTG                      CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC                      AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA                      ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA                      AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGA                      CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG                      TCTACGCTTGCGAAGTACCCATCAGGGCTGAG                      CTCGCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA                      GTGT</p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
250	4D4 (cadena pesada de longitud completa) - Sec NT	<p>                     CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG                      GTCCAGCC'GGGAGG'FCCCTGAGACT'CTCCT'GTG                      CAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAACTATGGCAT                      GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCT                      GGAG'GGGTGGCAG'ITATATGGTATGATGAAAG                      TAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG                      ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG                      CTGTT'CT'GCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG                      GACACGGCTGTGTATTATTGTGCGAGAGGGTATA                      ACAGCAGGTGGTACCCTGATGCTTTTGATATCTG                      GGGCCAAGGGACAATGG'FCACCGT'CT'CT'FCAGCC                      TCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGC                      CCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGG                      CCGTGGGCT'GCC'GG'CAAGGACT'ACT'FCCCCGA                      ACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCTCTG                      ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTTAC                      AGTCT'FCAGGACT'CT'ACT'CCC'FCAGCAGCGTGGT                      GACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACC                      TACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAAC                      ACCAAGGTGGACAAGACAG'ITGAGCGCAAATGT                      TGTGTGAGTGGCCACCGTGGCCAGCACCACTG                      TGGCAGGACCGTCACTCTTCTCTTCCCCCAA                      ACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCT                      GAGGTACCGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC                      GAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTG                      GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG                      CCACGGGAGGAGCAGTTC AACAGCACGTTCCTG                      GTGGTCAGCGTCTCACCGTGTGTGCACCAGGACT                      GGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCT                      CCAACAAGGCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAA                      CCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC                      CACAGGTGTACACCT'GCCCCCA'FCCCGGGAGG                      AGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCC                      TGGTCAAAGGCTTCTACCCCAAGCACATCGCCGT                      GGAG'GGGAGAGCAA'GGGCAGCCGGAGAACA                      ACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGA                      CGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTG                      GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC                      TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAAC                      ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG                      TAAA                 </p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
251	4D4 (cadena ligera de longitud completa 1) - Sec NT	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCCTCACTGT  CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG  TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC  TGGTATCAGCAGAAAACCAGAGAAAAGCCCCAAG  TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG  GGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTG  GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA  GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG  TATAATAGTTACCCGCTCACCTTCGGCGGAGGGGA  CCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCAC  CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA  GTTGAAAATCTGGAACTGCTCTGTGTGTGTGCTG  CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC  AGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA  ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA  AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGA  CGCTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAAG  TCTACGCCTCGGAAGTACCCATCAGGGCCTGAG  CTCGCCCCGCACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA  GTGT</p>
252	10D2 (cadena pesada de longitud completa) - Sec NT	<p>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG  GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG  CAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAACTATGGCCT  GCACTGGGTCCCGCCAGGCCTCAGGCAAGGGGCT  GGAGTGGGTGGCAGTTATACGGTATGATGGAAG  TAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG  ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG  CTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAG  GACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGGGGGGC  AGCAGCTGGTACCCGGACGGTTTGGACGTCTGG  GGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTT  CCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCC  CTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGC  CCTGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA</p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
		<p>CCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTG                      ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGGCTGTCTTAC                      AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT                      GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGAC                      CTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAA                      CACCAAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATA                      TGGTCCCCCATGCCCATCATGCCCAGCACCTGAG                      TTCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCTCCC                      CAAAACCCAAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGAC                      CCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAG                      CCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTA                      CGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAAATGCCAAGAC                      AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTA                      CCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAAG                      GACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAG                      GTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGA                      AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG                      AGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGA                      GGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGCTGACCTG                      CCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCC                      GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC                      AACTACAAGACCACGCC'TCCCGTGTGGACTCCG                      ACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGT                      GGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTT                      CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC                      CACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGG                      GTAAA</p>
253	10D2 (cadena ligera de longitud completa 1) - Sec NT	<p>GCCATCCAGTGTGACCCAGTCTCCATCC'TCCC'TGT                      CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG                      CCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCC                      TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAG                      C'TCC'TGATCTATGATGCC'TCCAGT'TTGGAAAGT                      GGGTCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTGGATCTG                      GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA                      GCCTGAAAGATTTTGCAACTTATTAAGTCAACAG                      TTTAATAGTTACCCCACTTTCGGCGGAGGGACCA                      AGGTGGAGATCAAACGAAC'TGTGGCTGCACCAT                      CTGTCTTCATCTTCCCAGCATCTGATGAGCAGTT                      GAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG                      AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG                      TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAAATCGGGTAAC                      TCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG                      GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACG                      CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC                      TACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCT                      CGCCCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT                      GT</p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
254	10D2 (cadena ligera de longitud completa 2) - Sec NT	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT  CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG  TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC  TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG  TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG  GGGTCCCA'CAAGG'ITCAGCGGCAG'IGGAT'CTG  GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA  GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTA'CTGCCAACAG  TATAATAG'ITACCCGCTCAC'ITTCGGCGGAGGGA  CCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCAC  CATCTGT'IT'CAIT'IT'CCCGCCAT'ITGATGAGCA  GTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTG  CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC  AGTGGAAGGTGGATAAACGCCCTCCAATCGGGTA  ACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGACGCA  AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGTA  CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG  TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG  CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA  GTGT</p>
255	11A6 (cadena pesada de longitud completa) - Sec NT	<p>GAAG'IGCAGCTGG'IGGAA'IT'IGGGGAAAC'ITG  GTACAGCC'IGGCAGG'ITCCCTGAGACT'CTCCTGTG  CAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCAT  GCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAAGGGCCT  GGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAATAAT  GACATAGGCTATGCGGACT'CTG'IGAAGGGCCGA  TTCATCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAATCCC  TGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGACCTGAGG  ACACGGCCTTGTATTATTGTGTAAAAGGTTATTA  CG'ITAT'IT'IGACTGGIT'ITGACT'ACTGGGGCCAG  GGAAAC'CCCGGTAC'CGTCTCCTCAGCCTCCACCAAG  GGCCCATCGG'IT'ITCCCTTGGCACCT'CT'CCAAGAGCACCT  CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT  TCCCGAACC'GGTGACGGTGTCTGTGGAAC'TAGGCGCCCTGA  CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAG  GACT'CTACTCCCTCAGCAGCGTGG'IGACC'ITGCCCTCCAGCA  GCT'ITGGGCACCCAGACCTACAT'ITGCAAC'ITGAATCACAAGC  CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTT  GTGACAAAAC'ACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAC  TCTTGGGGGGACCG'ITAG'IT'ITCT'IT'ITCCCCAAAACCCAA  GGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGT  GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAA  CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA  GCCCGGGGAGGAGCAGTACAAACAGCACGTACCCTGTGGTCA  GCG'ITCT'ACC'GITCC'ITGCACCAGGACTGG'ITGAATGGCAAGG  AGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCA  TCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA  CCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC  AAGAACCAGGTACAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT  CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC  GGAGAACAAC'ACAAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGA  CGGCTCCT'ITCTCTTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG  CAGGTGGCAGCAGGGGAACG'IT'IT'CATGCT'ITCGTGA'ITGA  TGAGGCT'ITGCACAACC'ACTACACGCAGAAGAGCC'IT'CTCT  GTCTCCGGGTAAA</p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
256	11A6 (cadena ligera de longitud completa 1) - Sec NT	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCA'CC'CACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCC'AAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCGCTCAC'TTTCGGCGGAGGGA CCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTG CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGTAC AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG TCTACGCC'IGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
257	24H2 (cadena pesada de longitud completa) - Sec NT	<p>                     CAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG                      GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCTGTG                      CAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAACTATGGCAT                      GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCT                      GGAGTGGGTGGCAGTTATAATGGTATGATGGAGG                      TAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG                      ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG                      CTGTTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAA                      GACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGC                      AGCAGCTGGTACCCTGATGCTTTTGATATCTGGG                      GCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGCTTC                      CACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCC                      TGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCC                      CTGGGC'TGCC'TGGT'CAAGGACT'ACT'TCCCCGAAC                      CGGTGACGGTGTCTGTGGAACTCAGGCGCCCTGA                      CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACA                      GTCTTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG                      ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCT                      ACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACA                      CCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATG                      GTCCCCCATGCCATCATGCCCAGCACCTGAGTT                      CCTGGGGGGACCA'ICAGT'CTTCC'TGT'TCCCCCA                      AAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCC                      CTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC                      AGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACG                      TGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA                      AGCCGCGGGAGGAGCAGT'ICAACAGCACGT'ACC                      GTGTGGTCAGCGTCCCTACCGTCCCTGCACCAGGA                      CTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAAGTGAAGGT                      CTCCAAACAAGGCC'TCCCGTCCCTCCATCGAGAAA                      ACCAT'ICCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAG                      CCACAGGTGTACACCC'TGCCCCCATCCAGGAGG                      AGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCC                      TGGTCAAAGGCTTCTACCC'AGCGACATCGCCGT                      GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA                      ACTACAAGACCACGCC'TCCCGTGGTGGACTCCGA                      CGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAGGCTAACCCTG                      GACAAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTC                      TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC                      ACTACACACAGAAGAGCC'T'ICCC'TGTCTCTGGG                      TAAA                 </p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
258	24H2 (cadena ligera de longitud completa 1) - Sec NT	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT  CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACCTTG  TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC  TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAAGCCCCTAAG  TCCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG  GGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGAGTGGATCTG  GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA  GCCTGAAAGATTTTGCACCTTATTACTGCCAACAG  TATAATAGTTACCCTCTCACTTTTCGGCGGAGGGA  CCAAGGTGGAGATCAAACGAACCTGTGGCTGCAC  CATCTGTCTTCACTCTCCCGCCATCTGATGAGCA  GTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCCTG  CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC  AGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA  ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA  AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGA  CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAG  TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG  CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA  GTGT</p>
259	5F8 (cadena pesada de longitud completa) - Sec NT	<p>GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCCTA  GTTTCAGCCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG  CAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTACTGGAT  GCACTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCT  GGTGTGGGTCTCACGTATTATTAGTGATGGGAGT  AGCACAGGTTACGCGGATTCCGTGAAGGGCCGA  TTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACG  CTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAG  GACACGGCTGTGTATTAATCTGTGCAAGAGAGTPTA  GCAGTGGCTGGTACTTTGACTACTGGGGCCAGGG  AACCCTGGTCAACGCTCTCTCAGCCTCCACCAAGGGC  CCATCGGCTCTCCCCCTGGCAACCTCTCCAAAGAGCACCTCTG  GGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCC  CCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCA  GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACT  CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG  GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATACAAGCCCAGC  AACACCAAGGTGGACAAGAAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC  AAAACCTCACACATGCCACCCGTGCCACGACCTGAACCTCTG  GGGGACCGTCACTTCTCTTCCCCCAAAAACCAAGGAC  ACCTCAATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACATGCTGGTIG  GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCGAGGTTCAAGTCAACTGG  TACGTGGACGGCTGGAGGTCATAATGCCAAGACAAAAGCC  GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCT  CCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA  CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCCATCGA  GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC  AGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGA  ACCAGGTACGCTGACCTGCTTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA  GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGCAATGGGCAGCCGGAG  AACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC  TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAAGAGCAGG  TGGCAGCAGGGGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG  GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT  CCGGGTAAA</p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
260	5F8 (cadena ligera de longitud completa 1) - Sec NT	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT CTGCACTCTGFAAGGAGACAGAGTCACCACTCACTTG CCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCC TGGTATCAGCAGAAAACCAGGGAAAAGCTCCTAAG CTCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTTACAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAG TTTAGTAGTTACCTTCGGACGTTTCGGCCAAAGGGA CCAAGGTGGAAAATCAAACGAACTGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTG CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC AGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACACAAAG TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
261	5F8 (cadena ligera de longitud completa 2) - Sec NT	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCACTCTGFAAGGAGACAGAGTCACCACTCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAAACCAGAGAAAAGCCCCAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTTACAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGGTTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGA CCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCACTCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTG CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC AGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACACAAAG TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
262	6E11 (cadena pesada de longitud completa) - Sec NT	<p>                     GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGCCTTG                      GTACAGCCTGGCAGGTCCCCTGAGACTCTCCTGTG                      CAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCAT                      GCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCT                      GGAGTGGGTCTCAGGTATTACTTGAATAGTGGT                      GGCATAGGCTACGCGGACTCTGTGAAGGGCCGA                      TTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCC                      TGTATCTGCAAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGG                      ACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAAAGATAGGTA                      TTACAGCAGTTGGCTCCTCTTTGACAACCTGGGGC                      CAGGGAATCTGGTCACCGTCTCCCTCAGCCTCCACC                      AAGGGCCCAICGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCCTCAAGAGC                      ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC                      TACTTCCCCGAAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGGCC                      CTGACCAGCGGCCTGACACCTTCCCGGCCTGCTACAGTCTT                      CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCA                      GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACA                      AGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA                      TCTTGTGACAAAACACACATGCCACCGTGCCAGCACCT                      GAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTTCCCCCAAAC                      CCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCTTGAGGTCACAT                      GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGT                      TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA                      CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG                      GTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC                      AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAACAAAGCCCTCCAGCC                      CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA                      GAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGATGAGCTG                      ACCAAGAACAGGTACAGCTGACCTGCCTGGTCAAAAGGCTTC                      TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG                      CCGGAGAACAACACAGACCACGCTCCCGTGTCTGGACTCC                      GACGGCTCCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG                      AGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGCTCTCTCATGCTCCGTGATG                      CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC                      CTGTCTCCGGTAAA                 </p>
263	6E11 (cadena ligera de longitud completa 1) - Sec NT	<p>                     GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGT                      CTCTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACCCCTCTCTG                      CAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGCTACTT                      AGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCCTCC                      CAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCC                      ACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGG                      TCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGAC                      TGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCA                      GCATTATGGTAGCTCATTCACTTTCCGGCCCTGGG                      ACCAAAGTGGATATCAAACGAACCTGTGGCTGCA                      CCATCTGTCTCTCACTCTCCCGCCATCTGATGAGC                      AGTTGAAATCTGGAACCTGCTCTGTGTGTGCTT                      GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT                      ACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGG                      TAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG                      CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCT                      GACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA                      AGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG                      AGCTCGCCCTCACAAAGAGCTCTCAACAGGGGA                      GAGTGT                 </p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
264	7A11 (cadena pesada de longitud completa) - Sec NT	<p>GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGG                      GTACAGACTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCTGTG                      CAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCAT                      GCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCT                      GGAGTGGGTCTCAGATAATTAGTTGGAATAGTGT                      ATTATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGAT                      TCACCATCTCTAGAGACAACGCCAAGAACTCCCT                      GTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGA                      CACGGCCCTGTATTACTGTGCAAAAGATAATTAT                      GGTTCCGGGAGTCTTTTTTTGACTACTGGGCC                      AGGGAATCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTCCACCA                      AGGGCCCATCGGTCTTCCCTGGCACCTCCTCAAGAGCA                      CCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCGTGCAAGGACT                      ACTTCCCGAACC GG TGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCC                      TGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTC                      AGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAG                      CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACA                      GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAAT                      CTGTGACAAAACACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTG                      AACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCAAAACC                      CAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATG                      CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTT                      CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC                      AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG                      TCAGCGTCTACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA                      AGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCC                      CCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA                      GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGATGAGCTG                      ACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC                      TATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG                      CCGGAGAACAACACAAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCC                      GACGGCTCTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG                      AGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGTCCGTGATG                      CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCTCTCC                      CTGTCTCCGGTAAA</p>
265	7A11 (cadena ligera de longitud completa 1) - Sec NT	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCCTCAGTGT                      CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACCTGT                      TCGGGCGAGTCAGTATATTAGCAGCTGGTTAGCC                      TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCAAG                      TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG                      GGGTCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTGGATCTG                      GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA                      GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG                      TATCATAGTTACCCTCCACCTTCGGCCAAGGGA                      CACGACTGGAGATTAACGAACCTGTGGCTGCAC                      CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA                      GTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTG                      CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC                      AGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA                      ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA                      AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGA                      CGCTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAAACAAAAG                      TCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAG                      CTCGCCCGTACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA                      GTGT</p>

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
266	CD73.4.IgG2C219SIgG1.1f - Sec NT alternativa	caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc tctctgtcag cctctggatt caccttcagt aactatggca tgcactgggt ccgccaggct ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atattgtatg atggaagtaa taaatactat ccagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagggggc agcagctggt accctgattc ttttgatata tggggccaag gaacaatggt caccgtctct tcagcgtcga ccaagggccc atcggctctc cccctggcgc cctgctccag gagcaacctc gagagcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgaagggtg tcgtggaact caggcgtctc gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtgggtg accgtgccct ccagcaactt cggcaccag acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gacagttgag cgcaaatcct gtgtcgagtg cccaccgtgc ccagcaccac ctgtggcagg accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggctggagg tgcataatgc caagacaaag ccgctggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccaagc agcatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag aaccaggtea gectgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ccccggttg a

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
267	IgG1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
268	IgG2.3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKSCVECPP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
269	IgG2.3G1-AY	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKSCVECPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT I SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL PGK
270	IgG2.3G1-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKSCVECPP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
271	IgG2.5	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSGGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
272	IgG1.1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
273	IgG2.3G1.1f-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKSCVECPP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
274	IgG1-deltaTHT	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL PGK
275	IgG2.3-plusTHT	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKSCVETH CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMMLSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL LSPGK
276	IgG2.3-plusGGG	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKSCVEGGG CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMMLSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL LSPGK

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
277	IgG2.5G1.1f-KH	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSFLTTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI S KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
278	IgG2.5G1-AY	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPP CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT I SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGDSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
279	IgG2.5G1-KH	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSFLTTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT I S KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
280	IgG2.5-plusTHT	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVETH CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGDSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
281	IgG1-G2.3G1-AY	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKTKVERKSCVECPP CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT I SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGDSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
282	IgG1-G2.3G1-KH	ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVERKSCVECP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSFLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
283	CD73 de la Figura 27A	XCPRAARAPATLLLLALGAVLWPAAGAWELTILHTND VHSRLEQTSSESSKCVNASRCMGGVARLFTKVQQIR RAEPNVLDDAGDQYQGTIWFVYKGAEVAHFMNAL RYDAMALGNHEFDNGVEGLIEPLLKEAKFPILSANI KAKGPLASQISGLYLPYKVLVPGDEVVGVGYTSKE TPFLSNPGTNLVFEDEITALQPEVDKLTNLVNIKI ALHSGFEMDKLIAQKVRGVDVVVGGHSNTFLYTGN PPSKEVPAGKYPFIVTSDDGRKVPVQAYAFGKYL YLKIEFDERGNVISSHGNPILLNSSIPEDPSIKADI NKWRIKLDNYSTQELGKTIVYLDGSSQSCRFRNCM GNLICDAMINNNLRHADETFWNHVSMLNNGGIRS PIDERNNGTITWENLAAVLPFGGTFDLVQLKGSTLK KAFHESVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDLSRKPGR VVKLDVLCCKRVPSYDPLKMDDEVYKVI LPNFLANG GDGFQMIKDELLRHDSGDQDINVVSTYISKMKVIYP AVEGRIKHHHHH
284	Aminoácidos de la región bisagra	VDKRV
285	Aminoácidos de la región bisagra	VDKTV
286	Aminoácidos de la región bisagra	EPKSCDKTHT
287	Aminoácidos de la región bisagra	ELKTPLGDTTHT
288	Aminoácidos de la región bisagra	EPKS
289	Aminoácidos de la región bisagra	ESKYGPP
290	Aminoácidos de la región bisagra	CPPCP
291	Aminoácidos de la región bisagra	CCVECP
292	Aminoácidos de la región bisagra	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>3</sub>
293	Aminoácidos de la región bisagra	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>2</sub>
294	Aminoácidos de la región bisagra	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>1</sub>
295	Aminoácidos de la región bisagra	CDTPPPCPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP) <sub>2</sub>
296	Aminoácidos de la región bisagra	CDTPPPCPRCP
297	Aminoácidos de la región bisagra	CPSCP
298	Aminoácidos de la región bisagra	APELLGG
299	Aminoácidos de la región bisagra	APPVAG

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
300	G2-G1-G1-G1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCDK THCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP EVTICVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
301	G2.5-G1-G1-G1	ASTKGPSVFPLAP\$SRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCDK THCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP EVTICVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
302	G1-G2.3-G2-G2	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDRKRVKSCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP EVTICVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTFRVVSVLTIVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
303	G1-KRGESSNLF	ASTKGPSVFPLAP\$SRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYICNVNHKPSNTKVDRKRVKSCDK THCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP EVTICVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
304	G1-KRGEGS	ASTKGPSVFPLAP\$SRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDRKRVKSCDK THCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTP EVTICVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
		EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
305	G1-SNLF	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSSGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
306	IgG1- ITNDRTPR	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSSGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
307	G1-SNLFPR	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSSGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
308	G2-RKEGSGNSFL	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSSGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
309	G2-RKEGSG	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSKVHTFPAYLQSSGLYSLSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKSCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTFRVVSFLT VVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSPGK
310	G2-NSFL	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSKVHTFPAYLQSSGLYSLSVVT VPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKSCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTFRVVSFLT VVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSPGK
311	IgG2- TIDNTRP	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSKVHTFPAYLQSSGLYSLSVVT VPSSNFGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTFRVVSFLT VVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSPGK
312	G2-NSFLRP	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSKVHTFPAYLQSSGLYSLSVVT VPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVEPKSCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTFRVVSFLT VVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSPGK
313	G1-G1-G2-G1-AY	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSKVHTFPAYLQSSGLYSLSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDK THTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC EVTCCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSFLT VVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP LPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSPGK

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
314	G1-G1-G2-G1-KH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDRVEPKSCDK THTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
315	G2-G2.3-G1-G2-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVKDKTVERKSCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
316	G2.5-G2.3-G1-G2-KH	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVKDKTVERKSCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
317	G2-G2.3-G1-G2-AY	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVKDKTVERKSCVE CPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG
318	G2.5-G2.3-G1-G2-AY	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVKDKTVERKSCVE CPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
319	G1-G2.3-G1-G1-KH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHY TQKSLSLSPGK
320	G2-G1-G2-G2-AY	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ERKSCDK THTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPE EVTICVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNK LPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPM LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
321	G2.5-G1-G2-G2-AY	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ERKSCDK THTCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPE EVTICVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNK LPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPM LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
322	G1-G2-G1-G1-AY	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKSCVE CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNH YTQKSLSLSPGK
323	G2-G1-G2-G2-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ERKSCDK THTCPAPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PAPIEKTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPM DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALH NHYTQKSLSLSPG

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
324	G2.5-G1-G2-G2-KH	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKVERKSCDK THTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PAPIIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPML DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
325	IgG1-deltaBisagra	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGSE FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQK LSLSPGK
326	IgG2-deltaBisagra	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKVERKCP PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
327	IgG2.5-deltaBisagra	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKVERKCP PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
328	IgG1-deltaG237	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDK THTCPPCPAPELLGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
329	IgG2-plusG237	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKSCVE CPPCPAPPVAGGSPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPA PIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
330	IgG2.4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKSCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTI S KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
331	IgG2.3/4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKSSVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTI S KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
332	IgG2.3-V13	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKSCVECPPCPAPPV AGGSPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
333	IgG2.3-V14	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKSCVECPPCPAPPV AGGSPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDGEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
334	IgG2.3-V15	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDPKPKSTKVDKTKVERKSCVECPPCPAPPV AGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSD <del>ED</del> GEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS <del>VL</del> TVVHQ D <del>W</del> LNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI <del>S</del> SKTKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV <del>F</del> SC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
335	IgG2.3-V16	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDPKPKSTKVDKTKVERKSCVECPPCPAPPV AGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED <del>GE</del> V QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS <del>VL</del> TVVHQ D <del>W</del> LNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI <del>S</del> SKTKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV <del>F</del> SC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
336	IgG2.3-V17	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDPKPKSTKVDKTKVERKSCVECPPCPAPPV AGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSD <del>ED</del> GEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS <del>VL</del> TVVHQ D <del>W</del> LNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI <del>S</del> SKTKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV <del>F</del> SC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
337	IgG2.3-V18	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDPKPKSTKVDKTKVERKSCVECPPCPAPPV AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV <del>SH</del> EDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS <del>VL</del> TVVHQ D <del>W</del> LNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI <del>S</del> SKTKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV <del>F</del> SC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
338	IgG2.3-V19	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDPKPKSTKVDKTKVERKSCVECPPCPAPPV AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV <del>SH</del> EDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS <del>VL</del> TVVHQ D <del>W</del> LNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI <del>S</del> SKTKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV <del>F</del> SC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
339	IgG2.3G1-AY-V20	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDPKPKSTKVDKTKVERKSCVECPPCPAPPV LGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS <del>VL</del> TVLH QD <del>W</del> LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI <del>S</del> SKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV <del>F</del> SC CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
340	IgG2.3G1-AY-V21	ASTKGPSVFFPLAPCSRSTSESTAALGCLVVDYFFPEPVT VSWNSGALTSQVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDRKPSNTKVDKTVERRKSCVECPFCFAPPEL LGGDSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDHEDGE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTI SKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
341	IgG2.3G1-AY-V22	ASTKGPSVFFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFFPEPVT VSWNSGALTSQVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDRKPSNTKVDKTVERRKSCVECPFCFAPPEL LGGDSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDHEDGE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTI SKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
342	IgG2.3G1-AY-V23	ASTKGPSVFFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFFPEPVT VSWNSGALTSQVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDRKPSNTKVDKTVERRKSCVECPFCFAPPEL LGGDSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDHEDGE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTI SKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
343	IgG2.3G1-AY-V24	ASTKGPSVFFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFFPEPVT VSWNSGALTSQVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDRKPSNTKVDKTVERRKSCVECPFCFAPPEL LGGDSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDHEDGE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTI SKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
344	IgG2.3G1-AY-V25	ASTKGPSVFFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFFPEPVT VSWNSGALTSQVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDRKPSNTKVDKTVERRKSCVECPFCFAPPEL LGGDSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDHEDGE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTI SKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
345	IgG2.3G1-AY-V26	ASTKGPSVFFPLAPCSRSTSESTAALGCLVVDYFFPEPVT VSWNSGALTSQVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDRKPSNTKVDKTVERRKSCVECPFCFAPPEL LGGDSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDHEDGE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTI SKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
346	IgG2.3G1-AY-V27	ASTKGPVVFPLAPCSPSTGESTAALGCLVKDYFPEPVV VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDRKPSNTKVDKTVERRKSCVECPFCFAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV <del>E</del> HEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKITPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
347	IgG2.3G1-AY-V28	ASTKGPVVFPLAPCCRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVV VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDRKPSNTKVDKTVERRKSCVECPFCFAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV <del>E</del> HEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKITPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
348	Bisagra alternativa	ERKCCVECPFCFAPVAG
349	Bisagra alternativa	ERKSCVECPFCFAPVAG
350	Bisagra alternativa	ERKCSVECPFCFAPVAG
351	Bisagra alternativa	ERKXCVECPFCFAPVAG
352	Bisagra alternativa	ERKCVVECPFCFAPVAG
353	Bisagra alternativa	ERKCCVECPFCFAVAGX
354	Bisagra alternativa	ERKSCVECPFCFAVAGX
355	Bisagra alternativa	ERKCSVECPFCFAVAGX
356	Bisagra alternativa	ERKXCVECPFCFAVAGX
357	Bisagra alternativa	ERKCVVECPFCFAVAGX
358	Bisagra alternativa	ERKCCVECPFCFAPELLGG
359	Bisagra alternativa	ERKSCVECPFCFAPELLGG
360	Bisagra alternativa	ERKCCSVECPFCFAPELLGG
361	Bisagra alternativa	ERKXCVECPFCFAPELLGG
362	Bisagra alternativa	ERKCVVECPFCFAPELLGG
363	Bisagra alternativa	ERKCCVECPFCFAPELLG
364	Bisagra alternativa	ERKSCVECPFCFAPELLG
365	Bisagra alternativa	ERKCCSVECPFCFAPELLG
366	Bisagra alternativa	ERKXCVECPFCFAPELLG
367	Bisagra alternativa	ERKCVVECPFCFAPELLG
368	Bisagra alternativa	ERKCCVECPFCFAPEL
369	Bisagra alternativa	ERKSCVECPFCFAPEL
370	Bisagra alternativa	ERKCSVECPFCFAPEL
371	Bisagra alternativa	ERKXCVECPFCFAPEL
372	Bisagra alternativa	ERKCVVECPFCFAPEL

ES 2 807 182 T3

(continuación)

SEQ ID	Descripción	Secuencia
373	Porción de bisagra	PVAG
374	Porción de bisagra	ELLG
375	Porción de bisagra	ELLGG
376	Porción de bisagra	SCDKTHT
377	Porción de bisagra	CCVE
378	dominio CH1 de IgG2 wt	ASTKGPSVFPLAPCS <b>R</b> STSE <b>E</b> STAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSS <b>M</b> EGTQTYTCNV <b>D</b> HKPSNTK <b>V</b> DKTV
379	CH1 de IgG2 y bisagra	ASTKGPSVFPLAPCS <b>R</b> STSE <b>E</b> STAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAV <b>I</b> .QSSGLYSLSSVTV PSS <b>M</b> EGTQTYTCNV <b>D</b> HKPSNTK <b>V</b> DKT <b>V</b> ERKCC <b>V</b> EC PPCPAPPVAG
380	Porción de bisagra	CPPCPAP

El listado de secuencias proporciona las secuencias de las regiones variables maduras y las cadenas pesadas y ligeras (es decir, las secuencias no incluyen péptidos señal).

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une a Grupo de Diferenciación 73 (CD73) humano y que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada que comprenden las SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera que comprenden las SEQ ID NO: 13, 14 y 15, respectivamente, en donde el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada que comprende una bisagra de IgG2 y dominio CH1 de IgG2.
2. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, en el que el dominio bisagra comprende sustitución de aminoácidos C219S, según el índice de la UE del sistema de Kabat, en relación a un dominio bisagra de IgG2 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 136).
3. El anticuerpo aislado de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la región constante de la cadena pesada comprende:
- (a) un dominio CH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 124; y  
(b) un dominio bisagra que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 123.
4. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 135 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 12.
5. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 133 o 189 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 102.
6. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las cadenas pesadas y ligeras son cadenas pesadas y ligeras de longitud completa, respectivamente.
7. El anticuerpo aislado de la reivindicación 6, que es un anticuerpo de IgG.
8. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 133 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 102.
9. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 189 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 102.
10. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 que es un anticuerpo humano y presenta una o más de las siguientes propiedades:
- (a) se une a CD73 humano con una  $K_D$  de 10 nM o menos determinada por Resonancia de Plasmón Superficial (SPR);  
(b) inhibe la actividad enzimática de CD73;  
(c) internaliza CD73 por internalización de CD73 mediada por anticuerpo dentro de células, por ejemplo, células tumorales; y  
(d) se une a CD73 humana con una  $CE_{50}$  de 0,1 a 10 nM o menos como se mide por FACS.
11. El anticuerpo aislado de la reivindicación 7, en el que la región constante de la cadena pesada comprende además un dominio CH2 de IgG1 humana que comprende las sustituciones de aminoácidos A330S y P331S, según el índice de la UE del sistema de Kabat, en relación a un dominio CH2 de IgG1 humana tipo silvestre (SEQ ID NO: 137).
12. Una composición que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. La composición de la reivindicación 12, que comprende además uno o más agentes terapéuticos adicionales.
14. La composición de la reivindicación 13, en la que el agente terapéutico adicional es un anticuerpo antagonista de la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1), un anticuerpo antagonista del ligando 1 de muerte programada (PD-L1), un anticuerpo antagonista de la proteína 4 asociada a linfocito T citotóxica (CTLA-4) o un anticuerpo antagonista del gen-3 de activación de linfocito (LAG-3).

**Anti-CD73 CD73.4-1 VH**

	segmento V:	VH3 / 3-33
	segmento D:	D6 / 6-13
	segmento J:	JH3 / 3
1	Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG CAG CCT GGG AGG TCC	
52	L R L S C A A S G G F T F S N Y G M CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GGC ATG	CDR1
103	H W V R Q A P G K G L E W V A V I CAC TGG GTC CGC CAG CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA	CDR2
154	L Y D G S N K Y Y P D S V K G R F TTG TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT CCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC	
205	T I S R D N S K N T L Y L Q M N S ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC	
256	L R A E D T A V Y Y C A R G G S S CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGC AGC AGC	CDR3
307	W Y P D S F D I W G Q G T M V T V TGG TAC CCT GAT TCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGA ACA ATG GTC ACC GTC	
358	S S TCT TCA	

**Fig. 1A**



**Anti-CD73 CD73.4-2 VH**

segmento V: VH3 / 3-33  
 segmento D: D6 / 6-13  
 segmento J: JH3 / 3

1 Q V Q L V E S G G G G G C V V Q P G R S  
 CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC

52 L R L S C A A S G G F T F S N Y G M  
 CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GGC ATG  
 -CDR1

103 H W V R Q A P G K G L E W V A V I  
 CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA  
 -CDR2

154 L Y D G S N K Y Y P D S V K G R F  
 TTG TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT CCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

205 T I S R D N S K N T L Y L Q M N S  
 ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC

256 L R A E D T A V Y Y C A R G G S S  
 CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGC GGC AGC AGC  
 -CDR3

307 W Y P D S F D I W G Q G I M V T V  
 TGG TAC CCT GAT TCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGA ACA ATG GTC ACC GTC

358 S S  
 TCT TCA

**Fig. 2A**

**Anti-CD73 CD73.4-2 VK**

```

segmento V: VK1 / L15
segmento J: JK4 / 4

  D I Q M T Q S P S S L S A S V G D
1  GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

      -CDR1-
  R V T I T C R A S Q G I S S W L A
52  AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

      -CDR2-
  W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A
103  TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

      -CDR3-
  S S L Q S G V P S R F S G S G
154  TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

  T D F T L T I S S L Q P E D F A T
205  ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

      -CDR3-
  Y Y C Q Q Y N S Y P L T F G G I
256  TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC

  K V E I K
307  AAG GTG GAG ATC AAA
    
```

**Fig. 2B**

**Anti-CD73 11F11-1 VH**

: segmento V: VH3 / 3-33  
 : segmento D: D6 / 6-13  
 : segmento J: JH3 / 3

```

1   Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S
    CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG CAG CCT GGG AGG TCC

52  L R L S C A T S G F T F S N Y G M
    CTG AGA CTC ICC TGT GCA ACG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GGC ATG
    CDR1

103 H W V R Q A P G K G L E W V A V I
    CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA
    CDR2

154 L Y D G S N K Y Y P D S V K G R F
    TTG TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT CCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

205 T I S R D N S K N T L Y L Q M N S
    ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC

256 L R A E D T A V Y Y C A R G S S
    CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGC GGC AGC AGC
    CDR3

307 W Y P D S F D I W G Q G T M V T V
    TGG TAC CCT GAT TCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGA ACA ATG GTC ACC GTC

358 S S
    TCT TCA
    
```

**Fig. 3A**

**Anti-CD73 11F11-1 VK**

segmento V: VK3 / L20  
 segmento J: JK4 / 4

1 E I V L L T Q S P A T L S L S P G E  
 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

52 R A T L S C R A S Q G V S S Y L A  
 AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG GGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC

103 W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A  
 TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA

154 S N R A T G I P A R F S G S G P G  
 TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGC CCT GGG

205 T D F T L T I S S L E P E D F A V  
 ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT

256 Y Y C Q R S N W H L T F G G T  
 TAT TAC TGT CAG CAG CGT AGC AAC TGG CAT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC

307 K V E I K  
 AAG GTG GAG ATC AAA

**Fig. 3B**

**Anti-CD73 11F11-2 VH**

segmento V: VH3 / 3-33  
 segmento D: D6 / 6-13  
 segmento J: JH3 / 3

1 Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S  
 CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC

52 L R L S C A T S G F T F S N Y G M  
 CTG AGA CTC TCC TGT GCA ACG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GGC ATG  
 -CDR1

103 H W V R Q A P G K G L E W V A V I  
 CAC TGG GTC CGC CAG CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA  
 -CDR2

154 L Y D G S N K Y Y P D S V K G R F  
 TTG TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT CCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

205 T I S R D N S K N T L Y L Q M N S  
 ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC

256 L R A E D I A V Y Y C A R G S S  
 CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGC GGC AGC AGC  
 -CDR3

307 W Y P D S E F D I W G Q G T M V T V  
 TGG TAC CCT GAT TCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGA ACA ATG GTC ACC GTC

358 S S  
 TCT TCA

**Fig. 4A**

**Anti-CD73 11F11-2 VK**

segmento V: VK1 / L15  
 segmento J: JK4 / 4

1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D  
 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

52 R V T I T C R A S Q G I S S W L A  
 AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

103 W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A  
 TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

154 S S L Q S G V P S R F S G S G G  
 TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

205 T D F T L T I S S L Q P E D F A T  
 ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

256 Y Y C Q Q Y N S Y P L T F G G T  
 TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC

307 K V E I K  
 AAG GTG GAG ATC AAA

**Fig. 4B**

**Anti-CD73 4C3-1 VH**

segmento V: VH3 / 3-09  
 segmento D: D3 / 3-9  
 segmento J: JH4 / 4

1 E V Q L V E S G G G L V Q P G R S  
 GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGC AGG TCC

52 L R L S C A A S G G F T F D Y A M  
 CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GCC ATG  
 -CDR1

103 H W V R Q A P G K G L E W V S G I  
 CAC TGG GTC CCG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATT  
 -CDR2

154 S W K S G S I G Y A D S V K G R F  
 AGT TGG AAG AGT GGT AGC ATA GGC TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC

205 T I S R D N A K N S L Y L Q M N S  
 ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT

256 L R A E D T A L Y Y C V K G Y Y V  
 CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCC TTG TAT TAC TGT GTA AAA GGG TAT TAC GTT  
 -CDR3

307 I L T G L D Y W G Q G T L V T V S  
 ATT TTG ACT GGC CTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC

358 S  
 TCA

**Fig. 5A**



**Anti-CD73 4C3-2 VH**

segmento V: VH3 / 3-09  
 segmento D: D3 / 3-9  
 segmento J: JH4 / 4

```

1   E V Q L V E S G G L V Q P G R S
    GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGC AGG TCC

52  L R L S C A A S G F T F D Y A M
    CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GCC ATG

103 H W V R Q A P G K G L E W V S G I
    CAC TGG GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATT

154 S W K S G S I G Y A D S V K G R F
    AGT TGG AAG AGT GGT AGC ATA GGC TAT GCG GAC ICT GTG AAG GGC CGA TTC

205 T I S R D N A K N S L Y L Q M N S
    ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT

256 L R A E D T A L Y Y C V K Y Y V
    CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCC TTG TAT TAC TGT GTA AAA GGG TAT TAC GTT

307 I L T G L D Y W G Q G T L V T V S
    ATT TTG ACT GGC CTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC

358 S
    TCA
    
```

**Fig. 6A**



**Anti-CD73 4C3-3 VH**

segmento V: VH3 / 3-09  
 segmento D: D3 / 3-9  
 segmento J: JH4 / 4

1 E V Q L V E S G G G L V Q P G R S  
 GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGC AGG TCC

52 L R L S C A A S G F T F D Y A M  
 CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GCC ATG  
 -CDR1

103 H W V R Q A P G K G L E W V S G I  
 CAC TGG GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATT  
 -CDR2

154 S W K S G S I G Y A D S V K G R F  
 AGT TGG AAG AGT GGT AGC ATA GGC TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC

205 T I S R D N A K N S L Y L Q M N S  
 ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT

256 L R A E D T A L Y Y C V K G Y Y V  
 CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCC TTG TAT TAC TGT GTA AAA GGG TAT TAC GTT  
 -CDR3

307 I L T G L D Y W G Q G T L V T V S  
 ATT TTG ACT GGC CTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC

358 S  
 TCA

**Fig. 7A**



**Anti-CD73 4D4-1 VH**

segmento V: VH3 / 3-33  
 segmento D: D6 / 6-13  
 segmento J: JH3 / 3

1	Q V Q L V E S C G C V V Q P G R S CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC
52	L R L S C A A S G F T F S N Y G M CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GGC ATG
103	H W V R Q A P G K G L E W V A V I CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA
154	W Y D E S N K Y A D S V K G R F TGG TAT GAT GAA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC
205	T I S R D N S K N T L F L Q M N S ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG ITT CTG CAA ATG AAC AGC
256	L R A E D T A V Y Y C A R G Y N S CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAT TGT GCG AGA GGG TAT AAC AGC
307	R W Y P D A F D I W G Q G T M V T AGG TGG TAC CCT GAT GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC
358	V S S GTC TCT TCA

**Fig. 8A**

**Anti-CD73 4D4-1 VK**

segmento V: VK1 / L15  
 segmento J: JK4 / 4

1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D  
 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

52 R V T I T C R A S Q G I S S W L A  
 AGA GTC ACC AIC ACT IGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

103 W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A  
 TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

154 S S L Q S G V P S R F S G S G  
 TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

205 T D F T L T I S S L Q P E D F A T  
 ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

256 Y Y C Q Q Y N S Y P L T F G G T  
 TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC

307 K V E I K  
 AAG GTG GAG ATC AAA

**Fig. 8B**

**Anti-CD73 10D2-1 VH**

segmento V: VH3 / 3-33  
 segmento D: D6 / 6-13  
 segmento J: JH6 / 6

1 Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S  
 CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG CAG CCT GGG AGG TCC

52 L R L S C A A S G F T F S N Y G L  
 CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GGC CTG

103 H W V R Q A P G K G L E W V A V I  
 CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA

154 R Y D G S N K Y Y A D S V K G R F  
 CGG TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

205 T I S R D N S K N T L Y L Q M S S  
 ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC

256 L R A E D T A V Y Y C A R G S S  
 CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGG GGG GGC AGC AGC

307 W Y P D G L D V W G Q G T I V T V  
 TGG TAC CCG GAC GGT TTG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC

358 S S  
 TCC TCA

**Fig. 9A**



**Anti-CD73 10D2-2 VH**

segmento V: VH3 / 3-33  
 segmento D: D6 / 6-13  
 segmento J: JH6 / 6

1 Q V Q L V E S G G C V V Q P G R S  
 CAG GIG CAG CTG GTG GAG ICT GGG GGA GGC GIG GIC CAG CCT GGG AGG TTC

52 L R L S C A A S G F T F S CDR1  
 CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GGC CTG  
 N Y G L

103 H W V R Q A P G K G L E W V A CDR2  
 CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA  
 V I

154 R Y D G S N K Y A D S V K G R F  
 CGG TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

205 T I S R D N S K N T L Y L Q M S S  
 ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC

256 L R A E D T A V Y Y C A R CDR3  
 CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGG GGC AGC AGC  
 G S

307 W Y P D G L D V W G Q G T T V T V  
 TGG TAC CCG GAC GGT TTG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC

358 S S  
 TCC TCA

**Fig. 10A**

**Anti-CD73 10D2-2 VK**

segmento V: VK1 / L15  
 segmento J: JK4 / 4

1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D  
 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

52 R V T I T C R A S Q G I S S W L A  
 AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

103 W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A  
 TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

154 S S L Q S G V P S R F S G S G  
 TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

205 T D F T L T I S S L Q P E D F A T  
 ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

256 Y Y C Q Q Y N S Y P L T F G G T  
 TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC

307 K V E I K  
 AAG GTG GAG ATC AAA

**Fig. 10B**

**Anti-CD73 11A6-1 VH**

segmento V: VH3 / 3-09  
 segmento D: D3 / 3-9  
 segmento J: JH4 / 4

1 GAA GTG CAG CTG GTG GAA TCT GGG GGA AAC TTG GTA CAG CCT GGC AGG TCC  
 E V Q L V E S G G N L V Q P G R S  
 52 L R L S C A A S G F T F D Y A M  
 CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GCC ATG  
 CDR1  
 103 H W V R Q A P G K G L E W V S G I  
 CAC TGG GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATT  
 CDR2  
 154 S W N N N D I G Y A D S V K G R F  
 AGT TGG AAT AAT AAT GAC ATA GGC TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC  
 205 I I S R D N A K N S L Y L Q M N S  
 AIC AIC TCC AGA GAC AAC GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT  
 256 L R P E D T A L Y Y C V K G Y Y V  
 CTG AGA CCT GAG GAC ACG GCC TTG TAT TAT TGT GTA AAA GGT TAT TAC GTT  
 CDR3  
 307 I L T G L D Y W G Q G T P V T V S  
 ATT TTG ACT GGT CTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CCG GTC ACC GTC TCC  
 358 S  
 TCA

**Fig. 11A**

**Anti-CD73 11A6-1 VK**

segmento V: VK1 / L15  
 segmento J: JK4 / 4

```

1   D I Q M T Q S P S S L S A S V G D
    GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

52  R V T I T C R A S Q G I S S W L A
    AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

103 W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A
    TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

154 S S L Q S G V P S R F S G S G S G
    TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

205 T D F T L T I S S L Q P E D F A T
    ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

256 Y Y C Q Q Y N S Y P L T F G G T
    TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC

307 K V E I K
    AAG GTG GAG ATC AAA
    
```

**Fig. 11B**

**Anti-CD73 24H2-1 VH**

segmento V: VH3 / 3-33  
 segmento D: D6 / 6-13  
 segmento J: JH3 / 3

1 Q V Q L V E S G G V Q P G R S  
 CAG GTG CAA CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG CAG CCT GGG AGG TCC

52 L R L S C A A S G F T F S N Y G M  
 CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GGC ATG  
 CDR1

103 H W V R Q A P G K G L E W V A V I  
 CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA  
 CDR2

154 W Y D C G N K Y Y A D S V K G R F  
 TGG TAT GAT GGA GGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

205 T I S R D N S K N T L F L Q M N S  
 ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TTT CTG CAA ATG AAC AGC

256 L R A E D T A V Y Y C A R G S S  
 CTG AGA GCC GAA GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGC AGC AGC  
 CDR3

307 W Y P D A F D I W G Q G T M V T V  
 TGG TAC CCT GAT GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC

358 S S  
 TCT TCA

**Fig. 12A**

**Anti-CD73 24H2-1 VK**

	segmento V:	VK1 / L15
	segmento J:	JK4 / 4
1	D I Q M T Q S P S L S A S V G D	
	GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC	
52	R V T I T C R A S Q G I S S W L A	-CDR1
	AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC	
103	W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A	-CDR2
	TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA	
154	S S L Q S G V P S R F S G S G	
	TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG	
205	T D F T L T I S S L Q P E D F A T	
	ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT	
256	Y Y C Q Q Y N S Y P L T F G G T	-CDR3
	TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC	
307	K V E I K	
	AAG GTG GAG ATC AAA	

**Fig. 12B**

**Anti-CD73 5F8-1 VH**

segmento V: VH3 / 3-74  
 segmento D: D6 / 6-19  
 segmento J: JH4 / 4

1 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S  
 GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCC GGG GGA GGC TTA GTT CAG CCT GGG GGG TCC

52 L R L S C A A S G F T F S S Y W M  
 CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAC TGG ATG  
 \_\_\_\_\_ CDR1 \_\_\_\_\_

103 H W V R Q A P G K G L V W V S R I  
 CAC TGG GTC CGC CAA GCT CCA GGG AAG GGG CTG GTG TGG GTC TCA CGT ATT  
 \_\_\_\_\_ CDR2 \_\_\_\_\_

154 I S D G S S T G Y A D S V K G R F  
 ATT AGT GAT GGG AGT AGC ACA GGT TAC GCG GAT TCC GTG AAG GGC CGA TTC

205 T I S R D N A K N T L Y L Q M N S  
 ACC AIC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT

256 L R A E D T A V Y Y C A R E F S S  
 CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCA AGA GAG TTT AGC AGT  
 \_\_\_\_\_ CDR3 \_\_\_\_\_

307 G W Y F D Y W G Q G T L V T V S S  
 GGC TGG TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

**Fig. 13A**

**Anti-CD73 5F8-1 VK**

segmento V:  
segmento J:

VK1 / L18  
JK1 / 1

```

1      A I Q L T Q S P S S L S A S V G D
      GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

52     R V T I T C R A S Q G I S S A L A
      AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC

103    W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A
      TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC

154    S S L E S G V P S R F S G S G S G
      TCC AGT TTG GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

205    T D F T L T I S S L Q P E D F A T
      ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

256    Y Y C Q Q F S S Y P R T F G Q G T
      TAT TAC TGT CAA CAG TTT AGT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC

307    K V E I K
      AAG GTG GAA ATC AAA
  
```

**Fig. 13B**

**Anti-CD73 5F8-2 VH**

segmento V: VH3 / 3-74  
 segmento D: D6 / 6-19  
 segmento J: JH4 / 4

1	E V Q L V E S G G L V Q P G S GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCC GGG GGA GGC TTA GTT CAG CCT GGG GGG TCC
52	L R L S C A A S G F T F S Y W M CTG AGA CTC ICC IGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAC TGG ATG
103	H W V R Q A P G G K G L V W V S R I CAC TGG GTC CGC CAA GCT CCA GGG AAG GGG CTG GTG TGG GTC TCA CGT ATT
154	I S D G S S T G Y A D S V K G R F ATT AGT GAT GGG AGT AGC ACA GGT TAC GCG GAT TCC GTG AAG GGC CGA TTC
205	T I S R D N A K N T L Y L Q M N S ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT
256	L R A E D T A V Y Y C A R E F S S CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCA AGA GAG TTT AGC AGT
307	G W Y F D Y W G Q G T L V T V S S GGC TGG TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

**Fig. 14A**





**Anti-CD73 5F8-3 VK**

	segmento V:	VK3 / L6
	segmento J:	JK1 / 1
1	E I V L T Q S P A T L S L S P G E	
	GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA	
52	R A T L S C R A S Q S V S S Y L A	—CDR1—
	AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC	
103	W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A	—CDR2—
	TGG TAC CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC ATC TAT GAT GCA	
154	S N R A T G I P A R F S G S G	
	TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGC TCT GGG	
205	T D F T L T I S S L E P E D F A V	
	ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT	
256	Y Y C Q Q R S N W W T F G Q G T K	—CDR3—
	TAT TAC TGT CAG CAG CGT AGC AAC TGG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG	
307	V E I K	
	GTG GAA ATC AAA	

**Fig. 15B**

**Anti-CD73 6E11-1 VH**

segmento V: VH3 / 3-09  
 segmento D: D6 / 6-13  
 segmento J: JH4 / 4

1 E V Q L V E S G G A L V Q P G R S  
 GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GCC TTG GTA CAG CCT GGC AGG TCC

52 L R L S C A A S G G F T F D Y A M  
 CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GCC ATG  
 -CDR1-

103 H W V R Q A P G K G L E W V S G I  
 CAC TGG GTC CCG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATT  
 -CDR2-

154 T W N S G G I G Y A D S V K G R F  
 ACT TGG AAT AGT GGT GGC ATA GGC TAC GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC

205 T I S R D N A K N S L Y L Q M N S  
 ACC AIC ICC AGA GAC AAC GCC AAG AAC ICC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT

256 L R A E D I A L Y Y C A K A R Y Y  
 CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCC TTG TAT TAC TGT GCA AAA GAT AGG TAT TAC  
 -CDR3-

307 S S W L L F D N W G Q G I L V T V  
 AGC AGT TGG CTC CTC TTT GAC AAC TGG GGC CAG GGA ATT CTG GTC ACC GTC

358 S S  
 TCC TCA

**Fig. 16A**

**Anti-CD73 6E11-1 VK**

segmento V: VK3 / A27  
 segmento J: JK3 / 3

```

1   E I V L T Q S P G T L S L S P G E
    GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

52  R A T L S C R A S Q S V S S S Y L
    AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA

103 A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G
    GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT

154 A S S R A T G I P D R F S G S G S
    GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT

205 G T D F T L T I S R L E P E D F A
    GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA

256 V Y Y C Q H Y G S S F T F G P G T
    GTG TAT TAC TGT CAG CAT TAT GGT AGC TCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC

307 K V D I K
    AAA GTG GAT ATC AAA
    
```

**Fig. 16B**

**Anti-CD73 7A11-1 VH**

segmento V: VH3 / 3-09  
 segmento D: D3 / 3-10  
 segmento J: JH4 / 4

```

1   E V Q L V E S G G L V Q I G R S
    GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG ACT GGC AGG TCC

52  L R L S C A A S G F T F D D Y A M
    CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GCC ATG
    CDR1

103 H W V R Q A P G K G L E W V S D I
    CAC TGG GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GAT ATT
    CDR2

154 S W N S D I I G Y A D S V K G R F
    AGT TGG AAT AGT GAT ATT ATA GGC TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC

205 T I S R D N A K N S L Y L Q M N S
    ACC ATC TCT AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT

256 L R A E D T A L Y Y C A K D I Y G
    CTG AGA CCT GAG GAC ACG GCC TTG TAT TAC TGT GCA AAA GAT ATT TAT GGT
    CDR3

307 S G S S F F D Y W G Q G I L V T V
    TCG GGG AGT TCT TTT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ATC CTG GTC ACC GTC

358 S S
    TCC TCA
    
```

**Fig. 17A**



QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA**A**SGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPPDSVKGRFTISR  
 DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSWYPDSFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPFLAPCSRSTSESTA  
 ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFNGTQTYTCNVVDHKPSNTKVDK  
 TVERK**S**CVCECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
 PREEQYNSTYRVVSVLTVIHDWLNKGKEYKCKVSNKAL**PS**IEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ  
 VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSCVMHEALHN  
 HVTQKSLSPG

No subrayado: VH

CDRI, 2 y 3

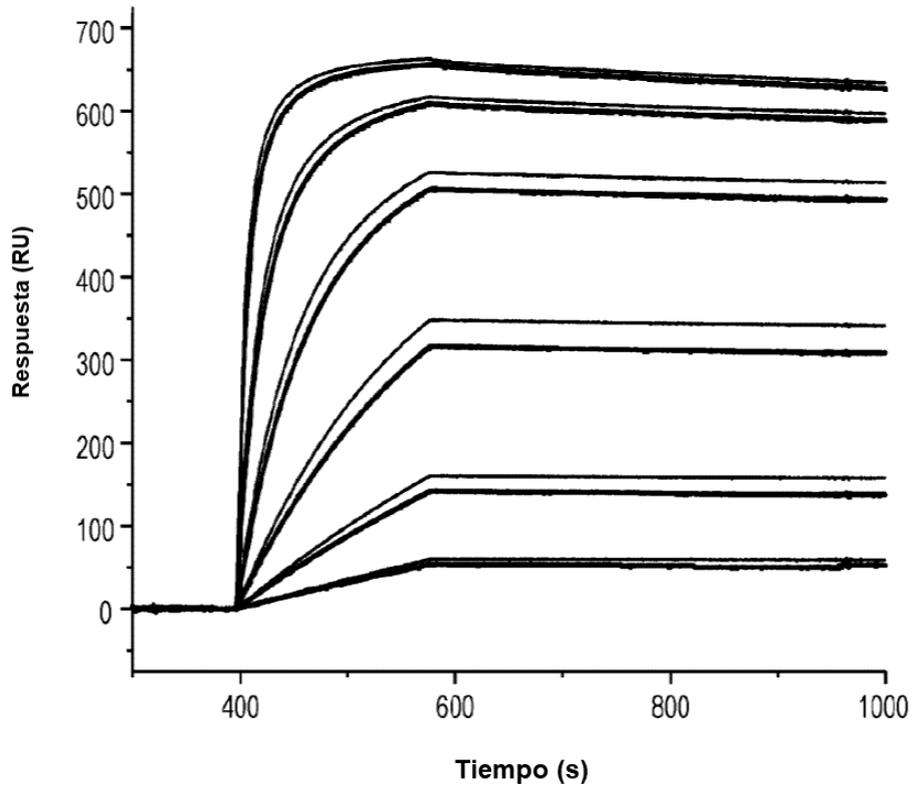
CH1

Bisagra

CH2

CH3

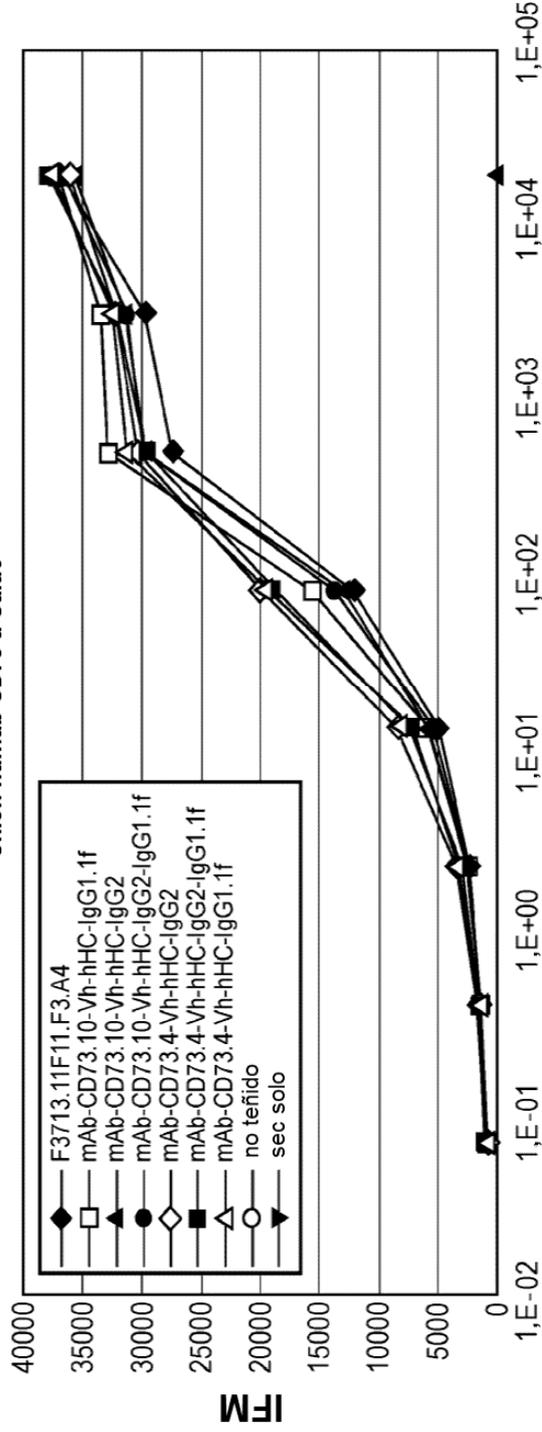
Fig. 18



**Fig. 19**

	ng/ml	20000	33333.33	555.56	92.59	15.43	2.57	0.43	0.07	Kd (ng/ml)
F3713.11F11.F3.A4		36600	29700	27400	12100	4828	2253	1293	788	188,18
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f		36900	33400	32800	15600	5598	2272	1505	822	126,85
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2		35700	31200	29600	13000	5860	2310	1316	843	162,27
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f		36500	31300	30000	13600	5143	2383	1192	708	156,46
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2		37400	32000	30500	19800	8250	3176	1810	1148	82,57
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f		37700	32000	29700	18500	7275	2858	1732	1076	96,41
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f		36000	32400	31300	18800	7315	3104	1633	793	85,00
no teñido		-8,27								
sec sólo		30,3								

Unión humab CD73 a Calu6



ng/ml humab CD73

Fig. 20A1

Unión anticuerpo CD73 a Calu6

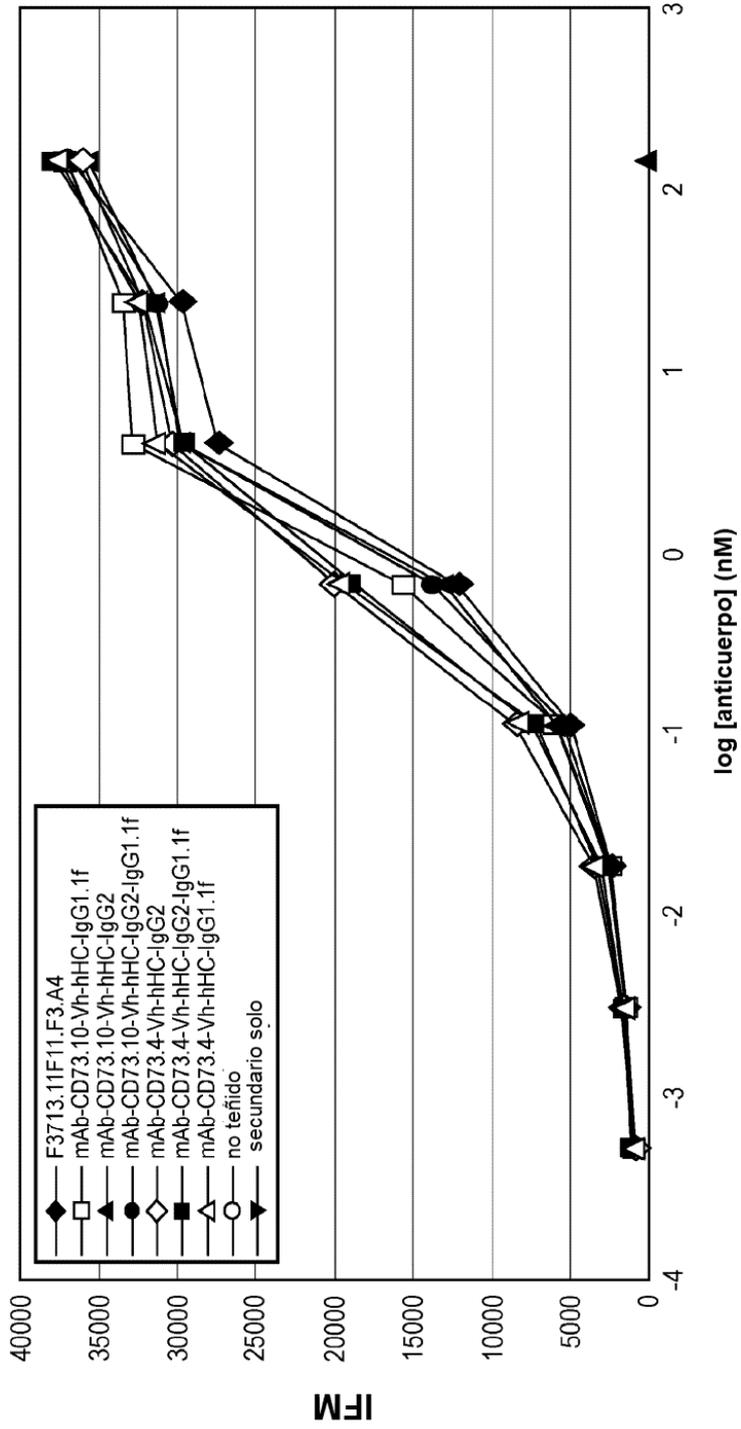


Fig. 20A2

	20000	3333,33	555,56	92,59	15,43	2,57	0,43	0,07
F3713.11F11.F3.A4	96,2	37,6	29,7	30,2	31,3	20,9	30,7	23,1
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f	59,2	33,5	30,4	29,1	25,6	20	25,4	20,8
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2	58,1	27,8	28,2	31,4	31	20,5	23,8	21,4
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	59,6	35,5	29,1	23,2	29,5	23,6	23,9	23,2
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2	132	40,9	35,7	25,9	29	20,8	26	18,6
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	129	36,5	23,8	24,7	23,1	19,2	26,4	21,9
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f	96,6	48,1	28,4	28,3	28,2	25,3	25,7	21,4
no teñido	0,378							
sec solo	39,5							

Unión humab CD73 a DMS114

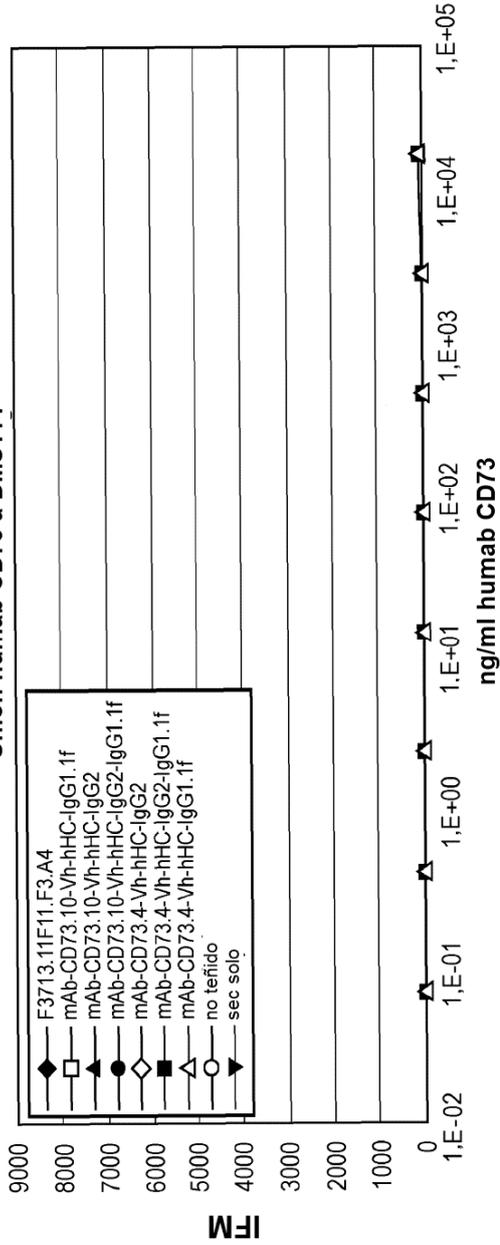


Fig. 20B1

Unión anticuerpo CD73 a DMS114

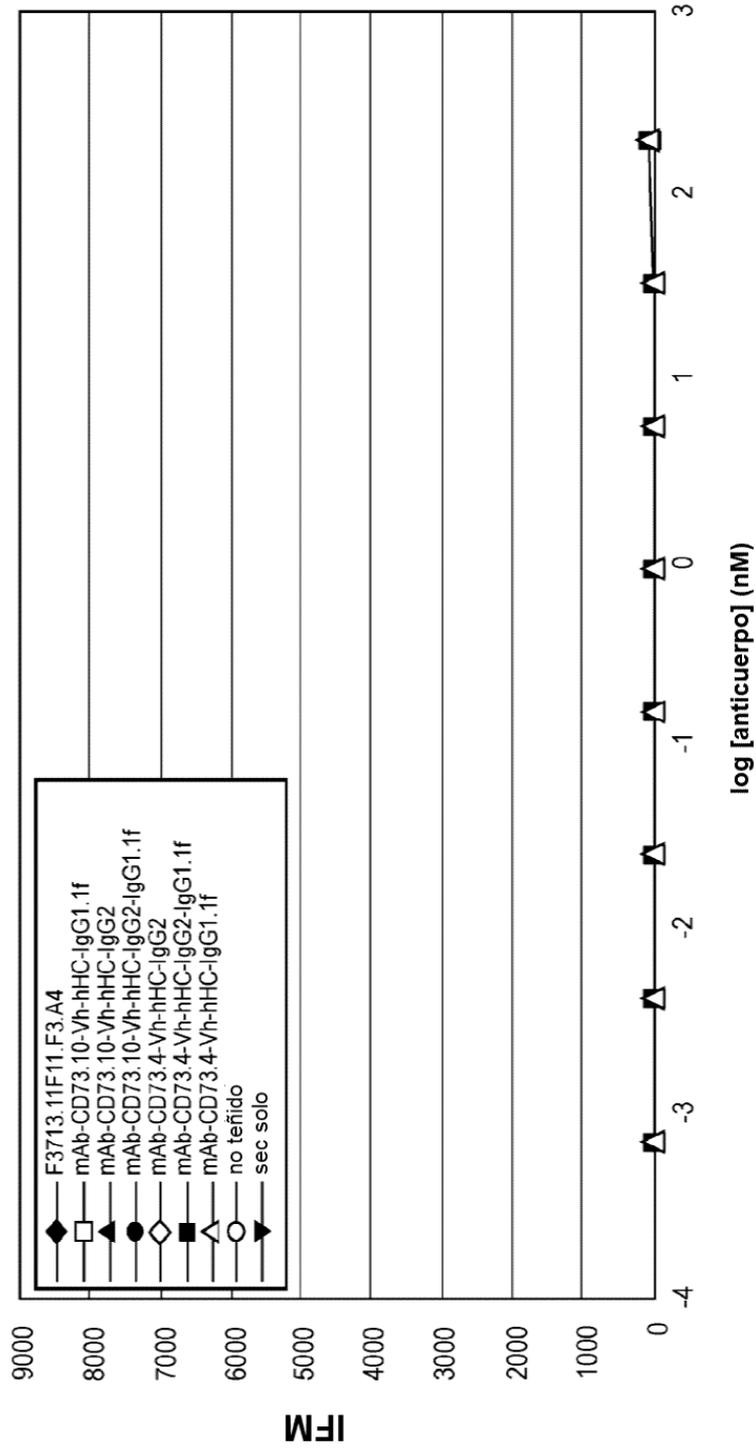


Fig. 20B2

	ng/ml	20000	3333.33	555.56	92.59	15.43	2.57	0.43	0.07	Kd (ng/ml)
F3713.11F11.F3.A4		2656	1994	1638	1474	1152	670	342	200	20.73
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f		2159	1802	1738	1594	1054	542	207	129	16.74
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2		2060	1698	1528	1350	775	326	173	118	26.59
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f		2101	1690	1529	1336	807	371	193	104	25.69
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2		2814	2092	1804	1644	1420	891	487	289	15.55
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f		2753	2072	1755	1573	1426	804	487	255	14.75
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f		2186	1855	1758	1703	1515	816	458	202	7.11
no teñido		4.81								
sec solo		18.5								

Unión humab CD73 a CHO-cynoCD73

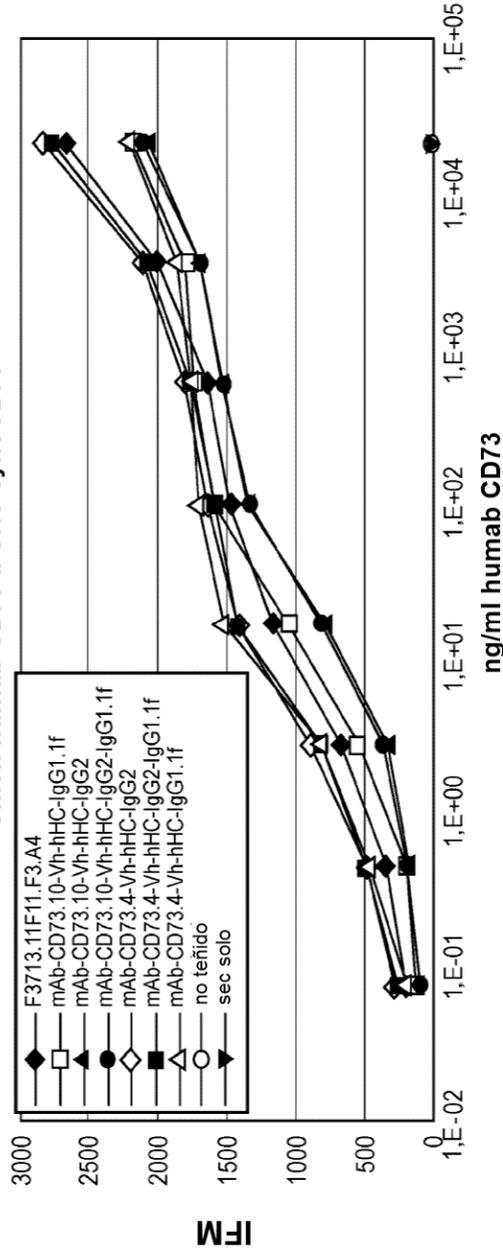
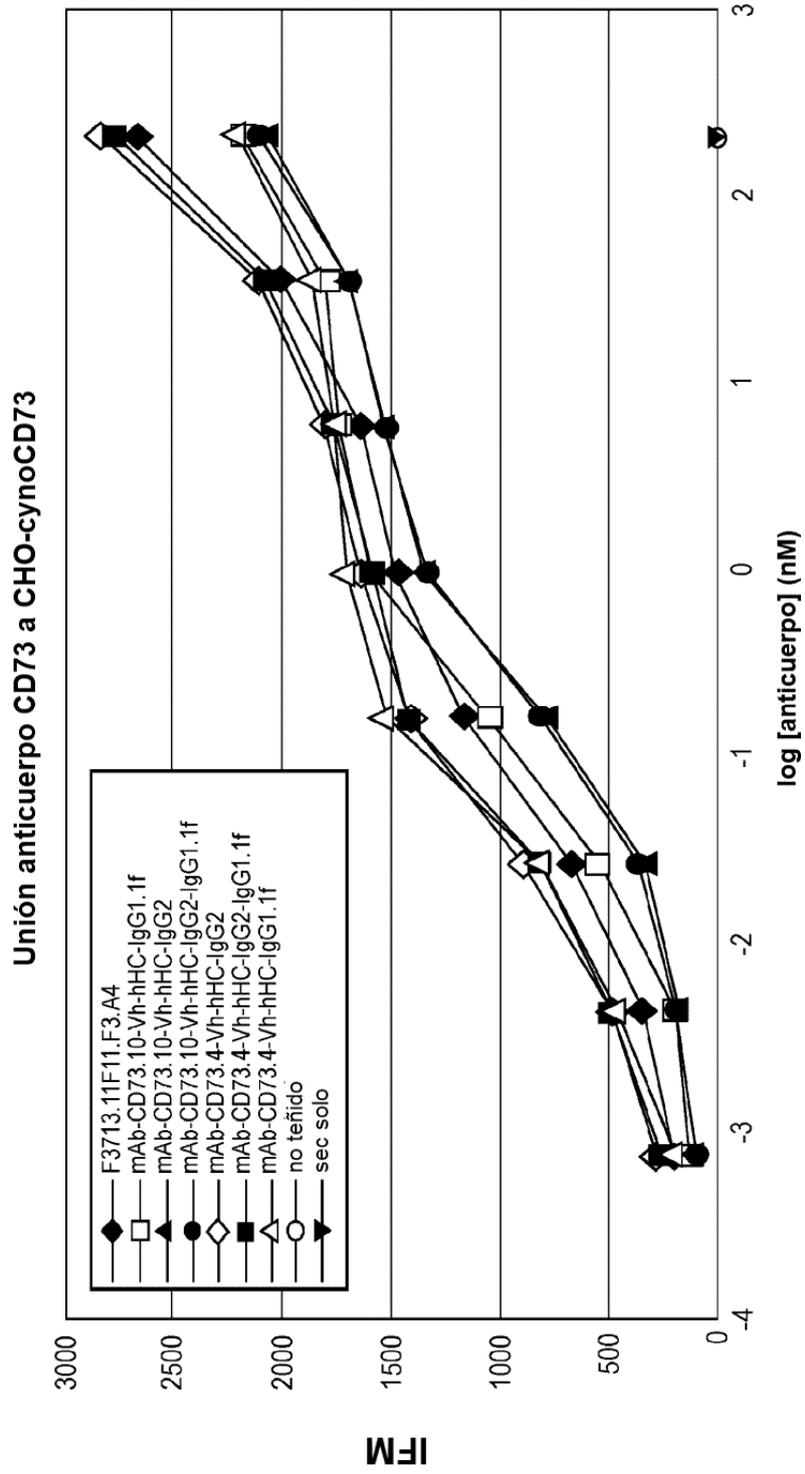


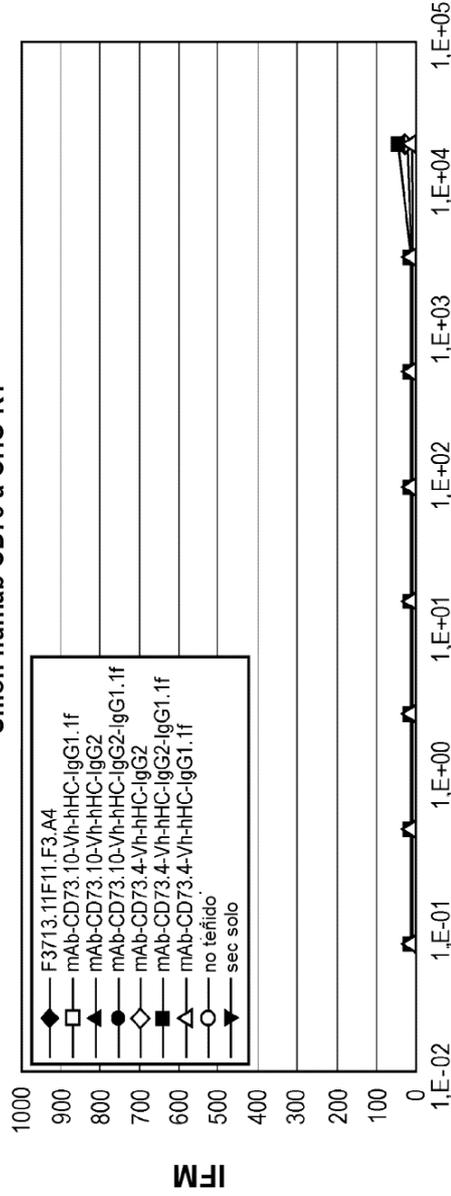
Fig. 20C1



**Fig. 20C2**

	ng/ml	20000	3333,33	555,56	92,59	15,43	2,57	0,43	0,07
F3713.11F11.F3.A4		22,2	15,4	15,9	13,9	14,1	17,3	14,7	17,1
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f		21,6	20,4	15,4	16,5	12	13,5	10,3	18,9
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2		17,9	12,9	10,5	14	13,9	17,9	15,1	7,57
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f		13	14,7	13,2	14,4	10,9	11,6	14,5	14,9
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2		42,6	15	13,3	9,42	9,74	16,7	11,3	9,5
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f		44,6	10,9	11,7	8,92	7,34	8,08	12,2	12,9
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f		17,5	12,5	11,1	14,8	15,6	13,3	7,81	6,31
no teñido		6,85							
sec solo		12,7							

Unión humab CD73 a CHO-K1



ng/ml humab CD73  
Fig. 20D1

Unión anticuerpo CD73 a CHO-K1

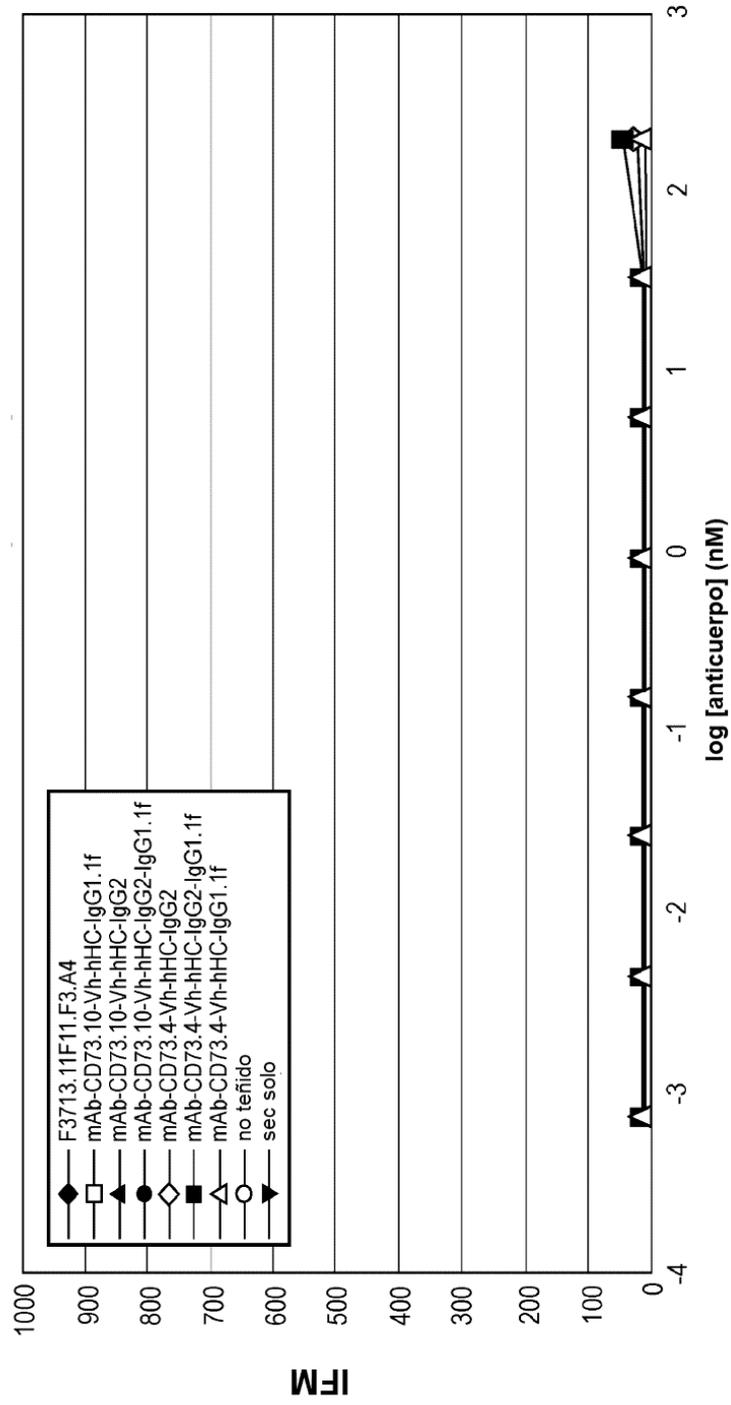


Fig. 20D2

Unión a linfocitos T humanos

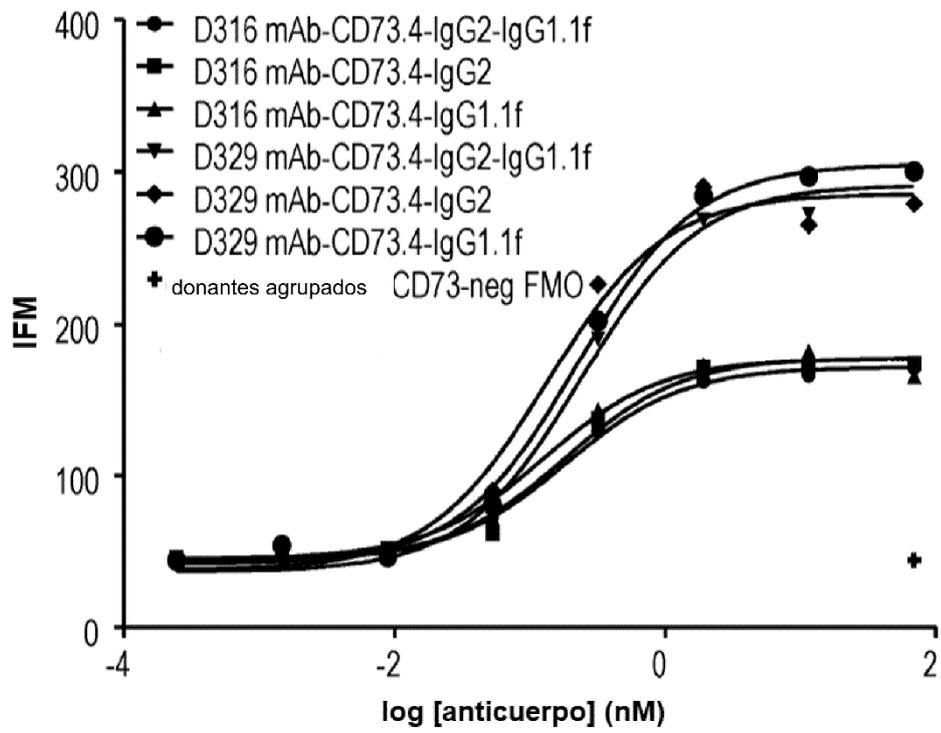
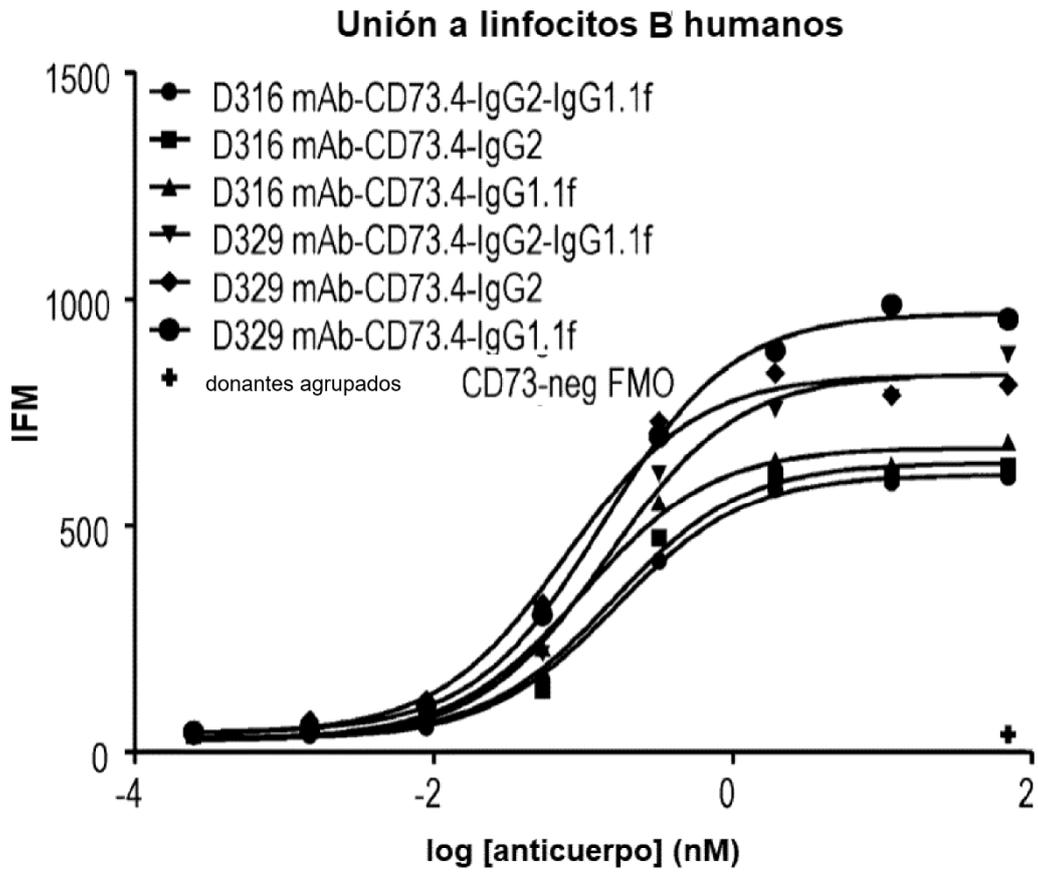
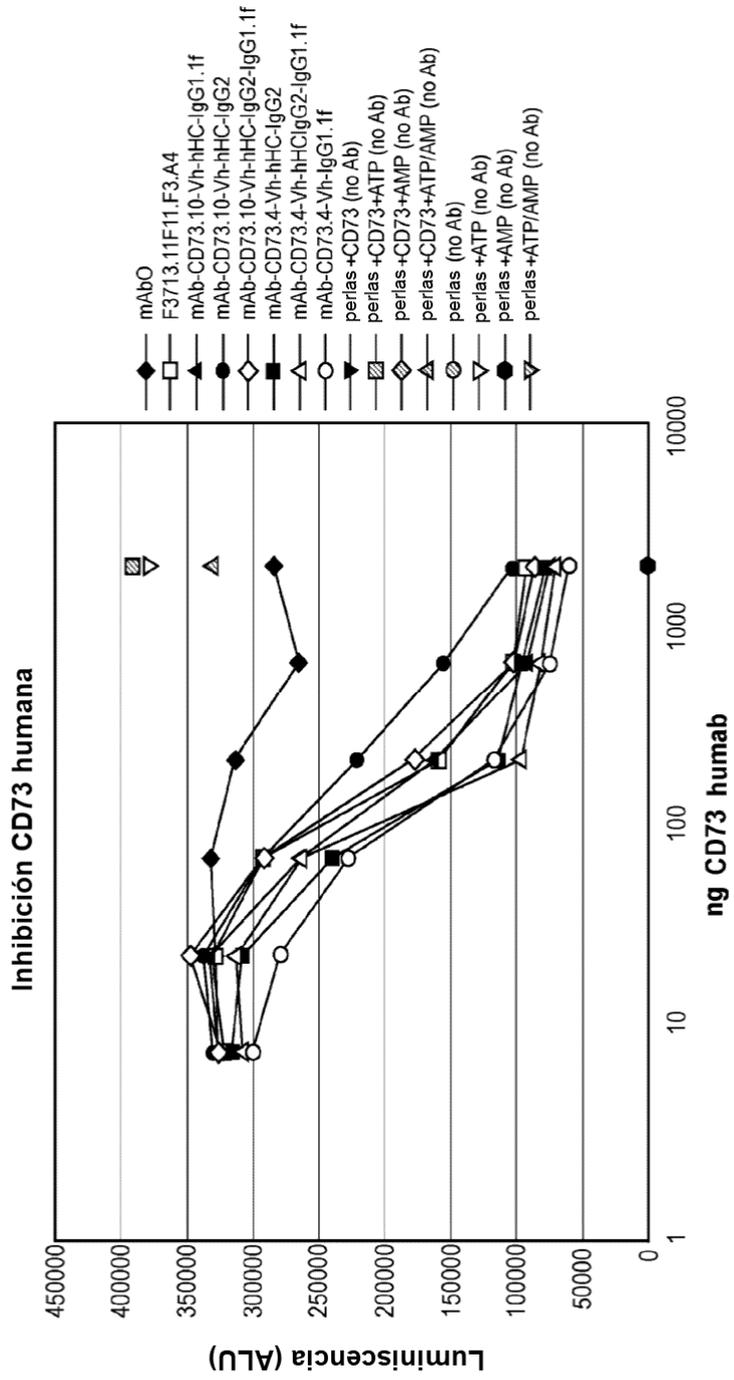
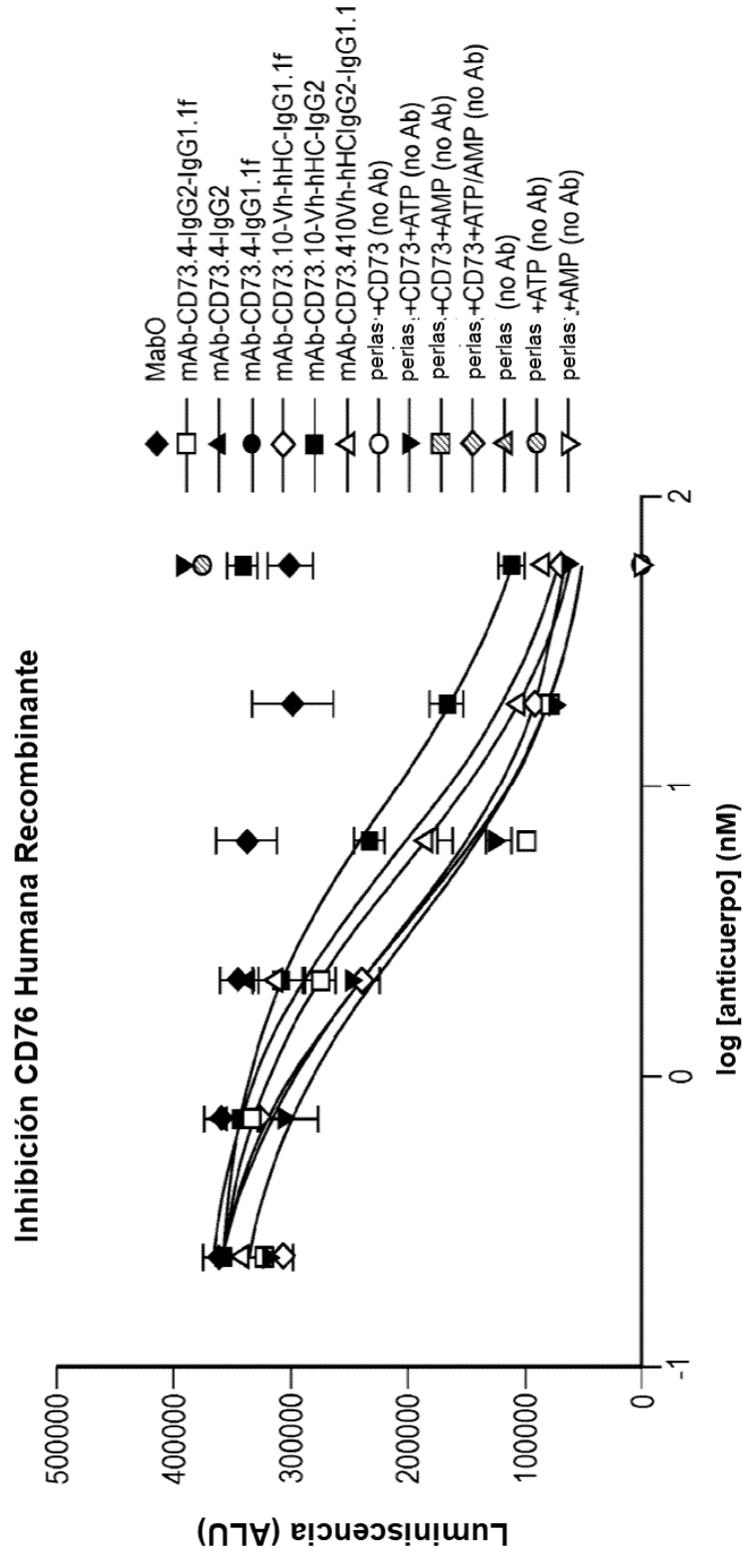


Fig. 20E

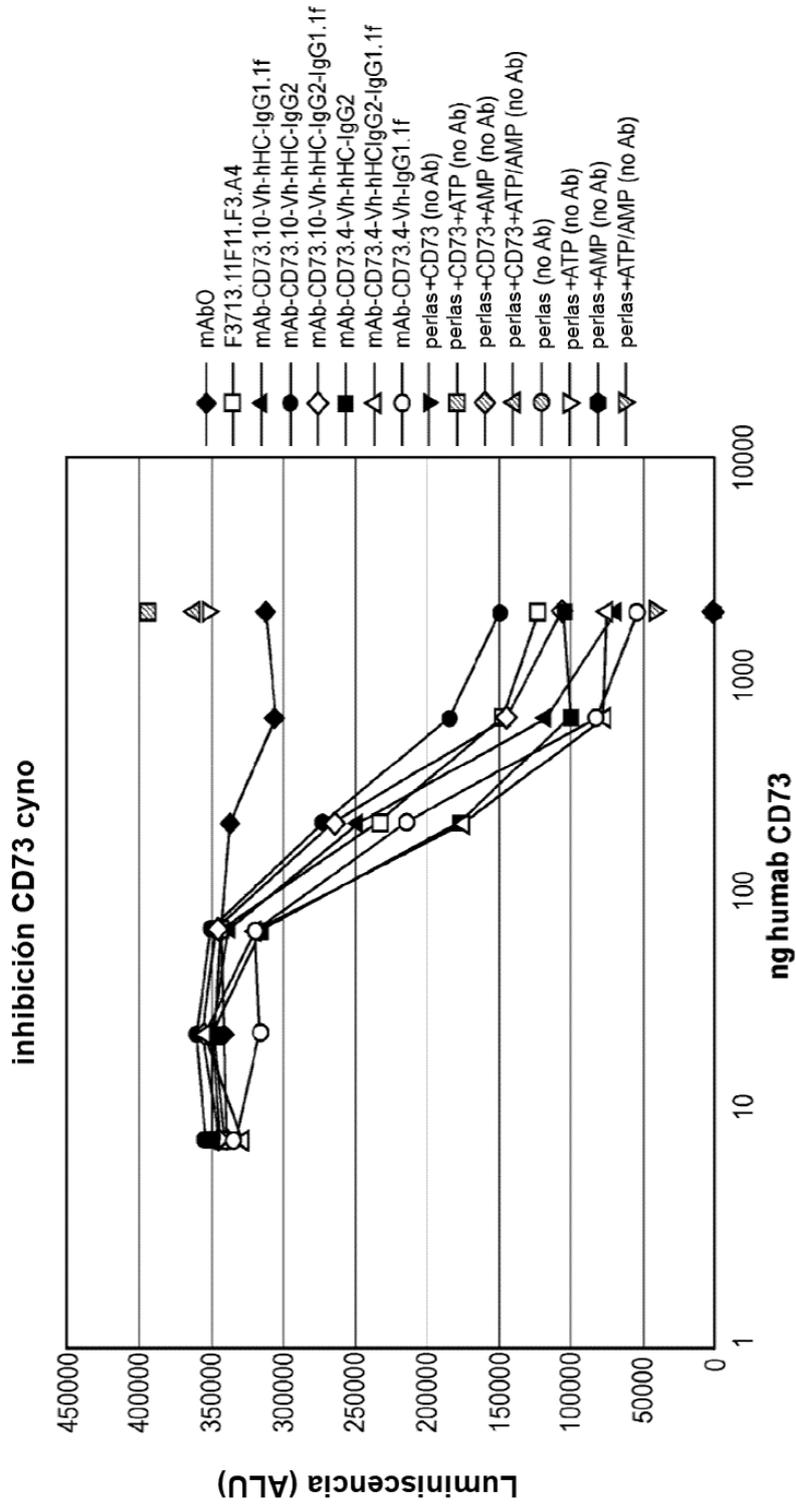


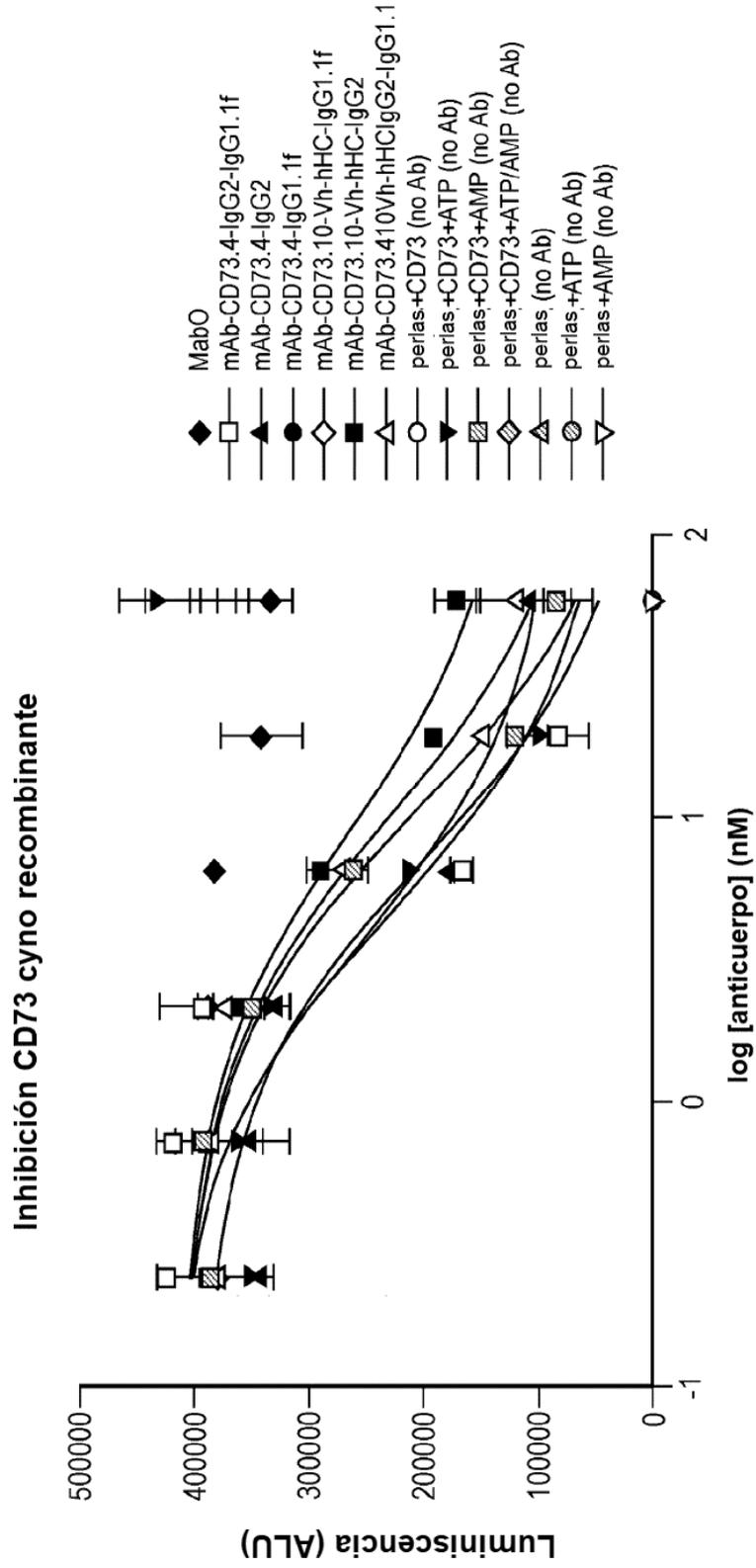
**Fig. 20F**

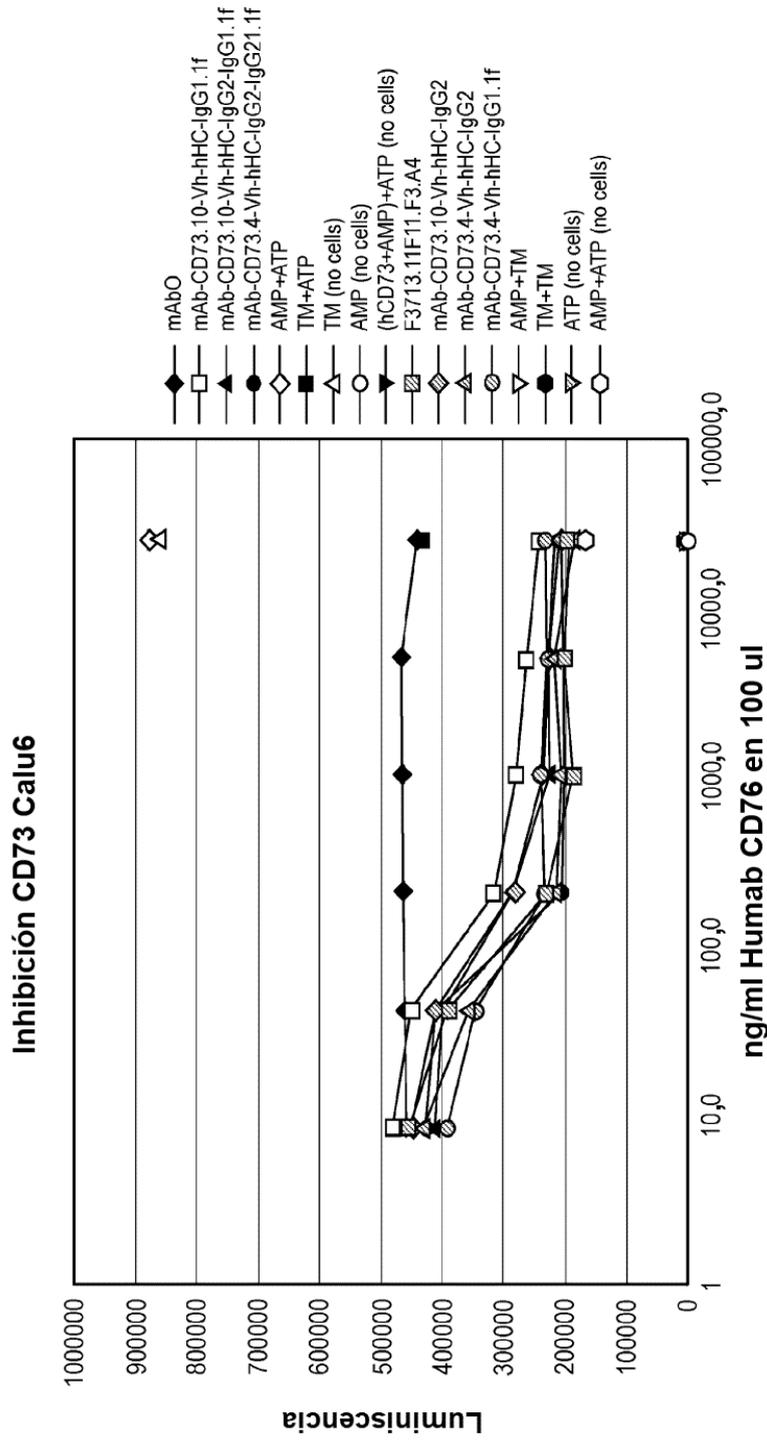




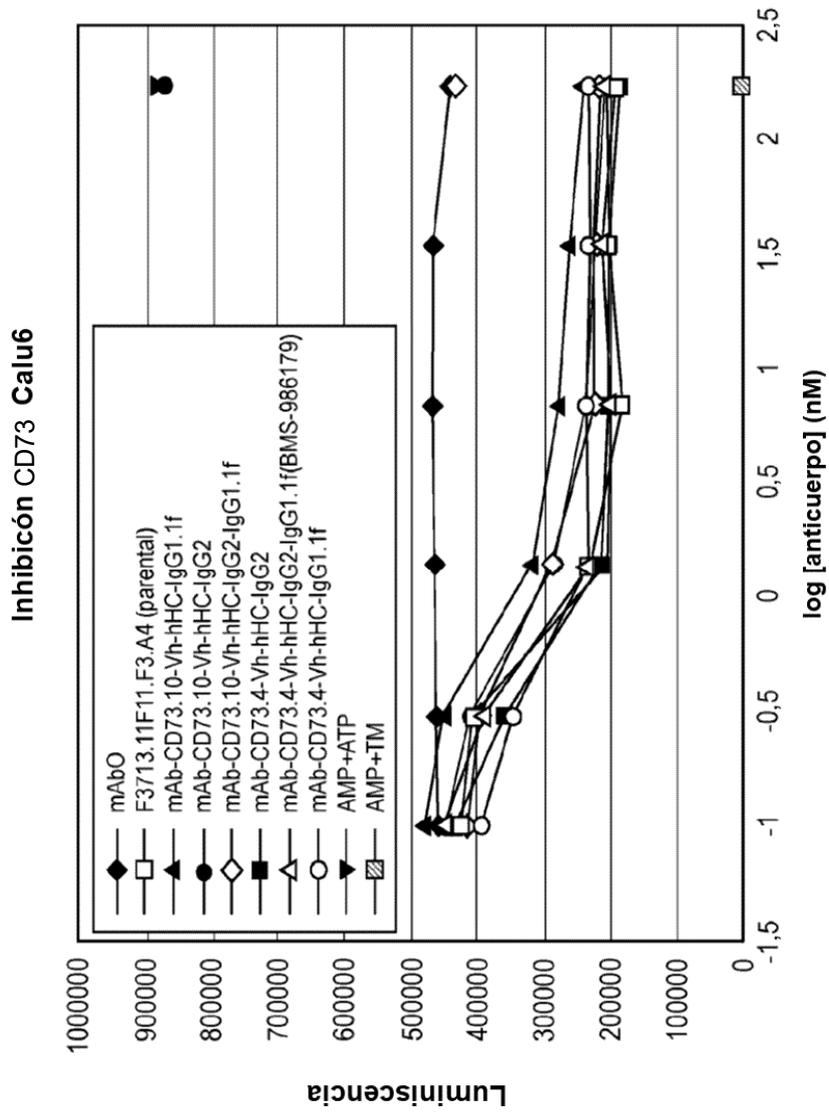
**Fig. 21A2**



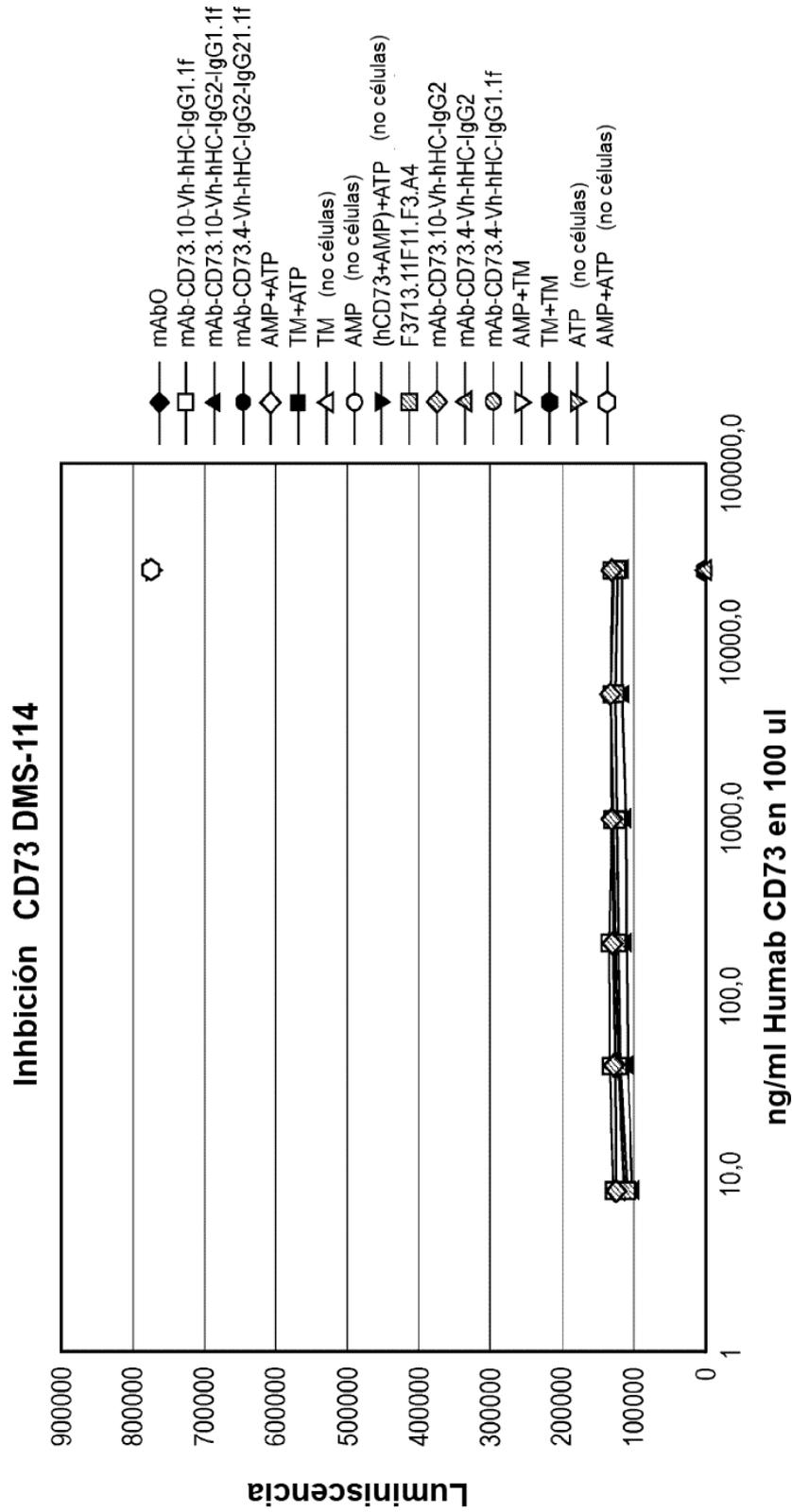




**Fig. 22A1**



**Fig. 22A2**



**Fig. 22B1**

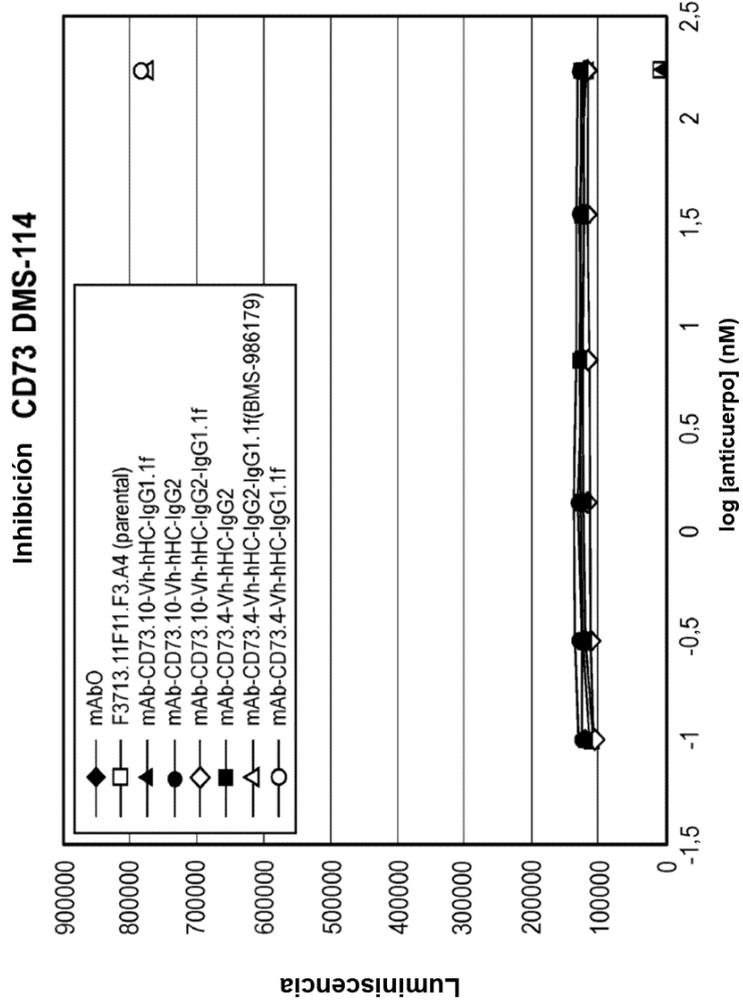
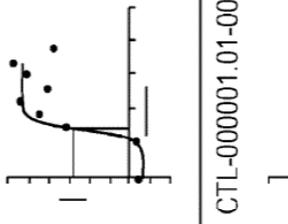
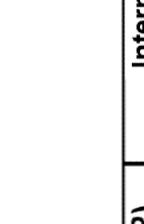
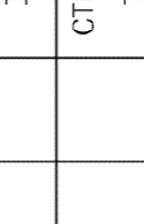
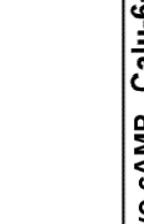
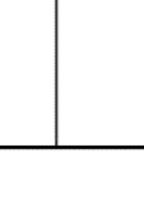
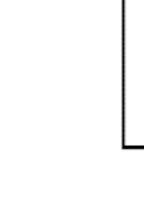
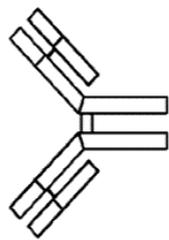
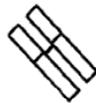


Fig. 22B2

Clón ID	Ensayo cAMP Calu-6+HEK/A2AR)			Internalización (Calu-6)		
	CE50, nM	YMAX	Gráfica	CE50, nM	YMAX	Gráfica
11F11	0,64	95	MDA-001271.01-001 	0,26	100	MDA-001271.01-001 
11F11 Fab	Inactivo		CTL-000001.01-001 	Inactivo		CTL-000001.01-001 
11F11 Fab'2	0,49	87	CTL-000001.01-001 	0,10	110	CTL-000001.01-001 



IgG

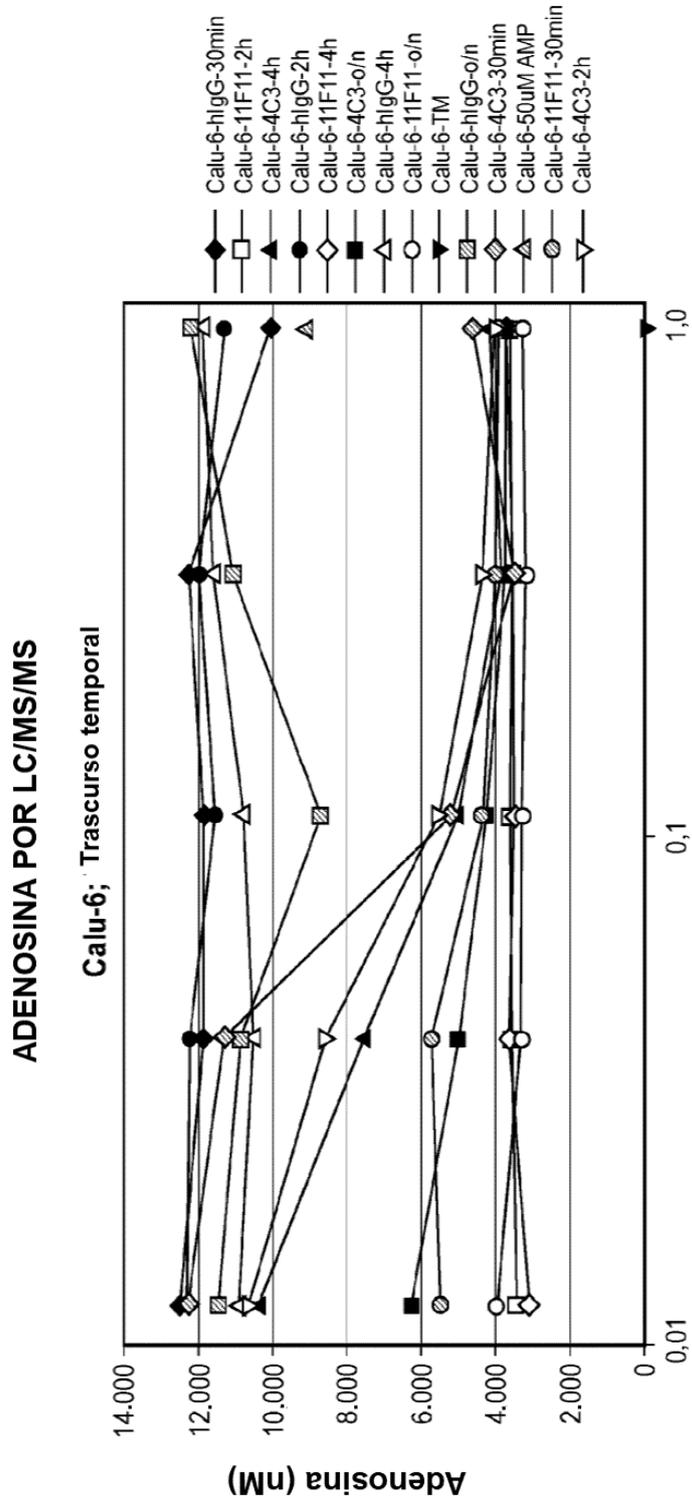


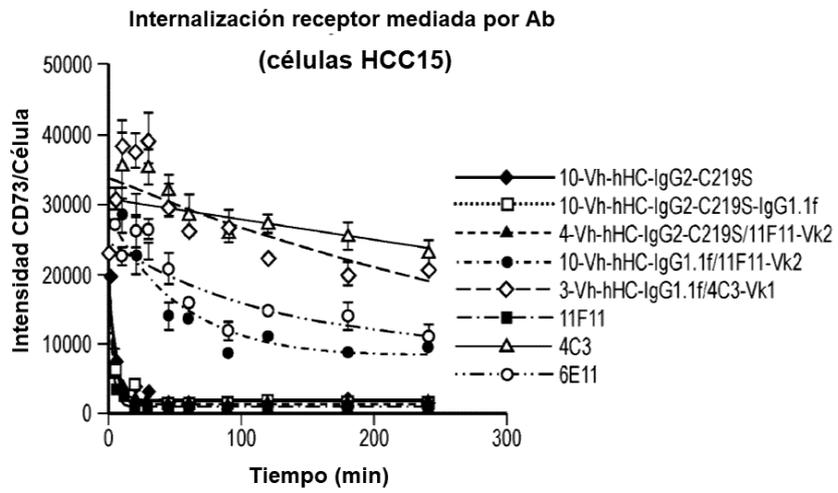
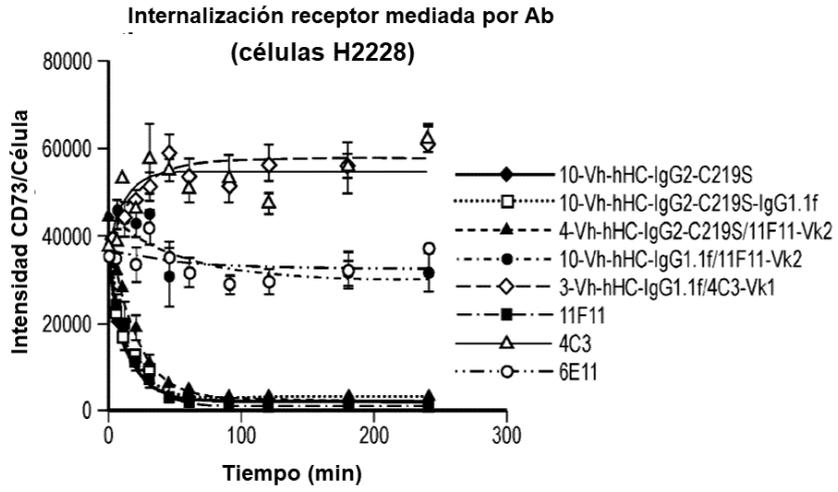
Fab

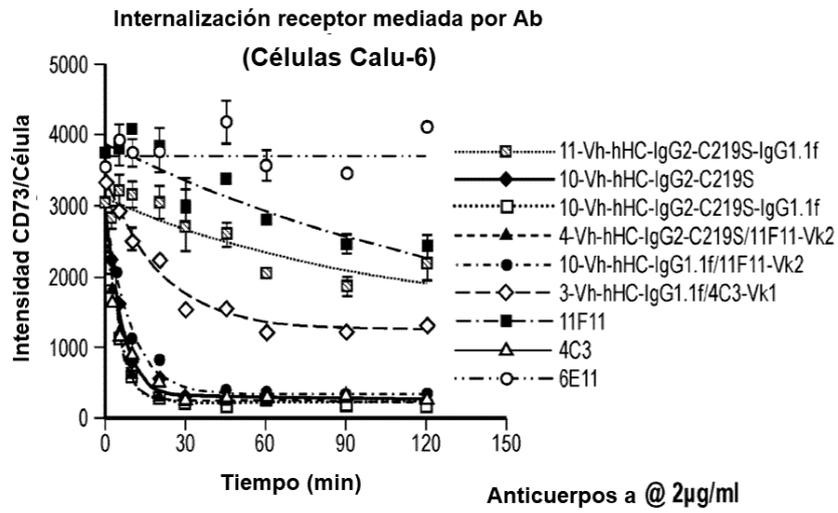


F(ab')<sub>2</sub>

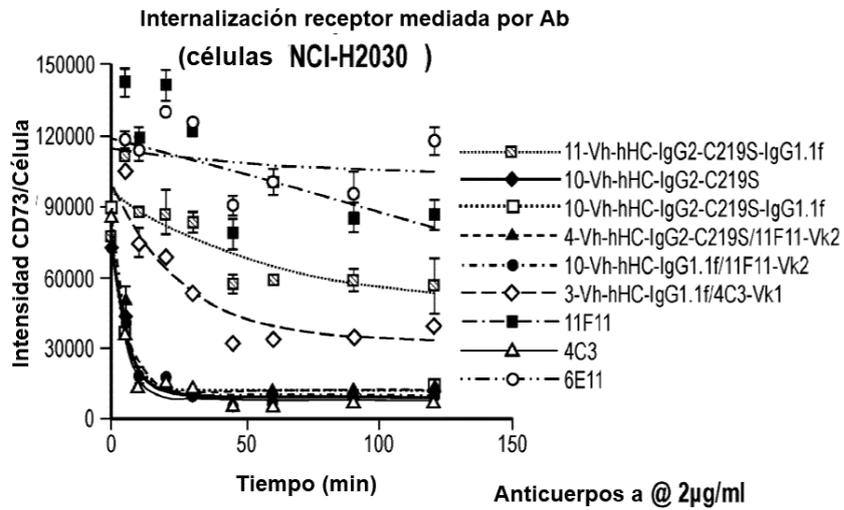
**Fig. 22C**



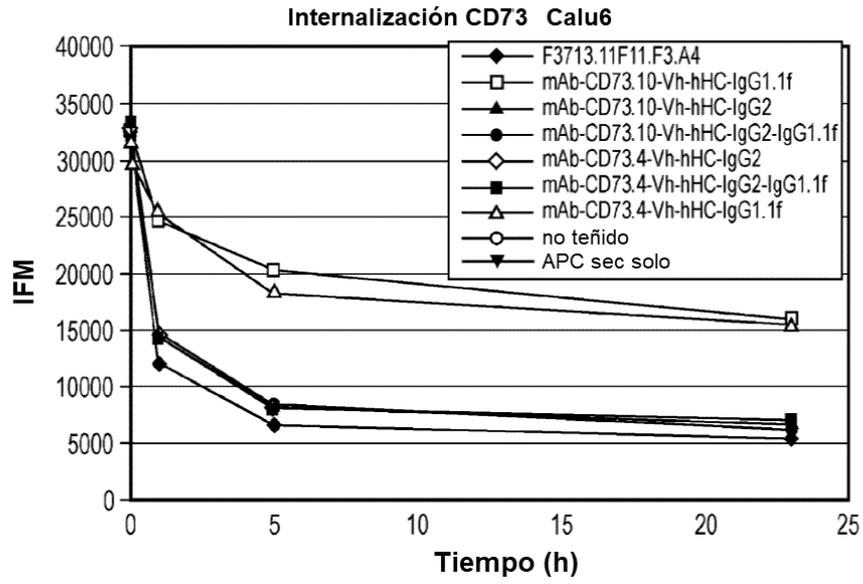




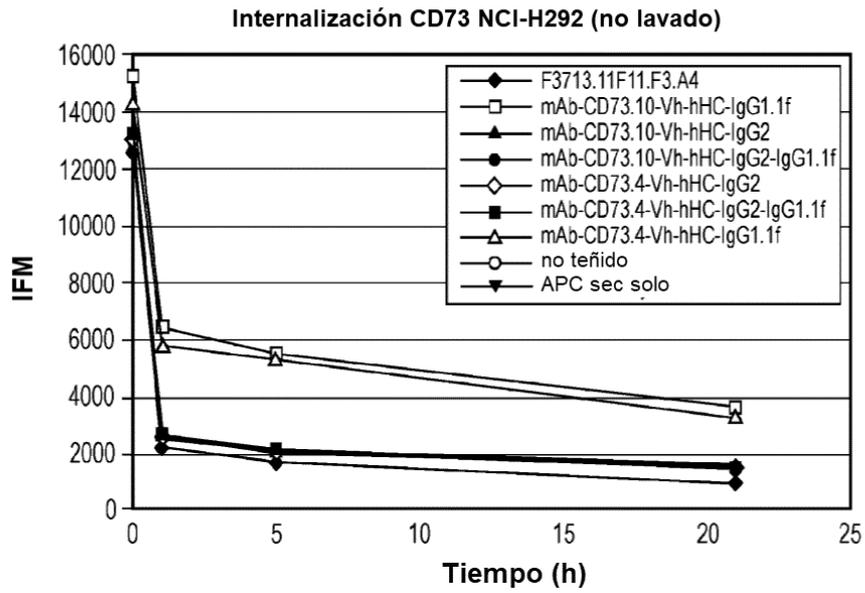
**Fig. 23C**



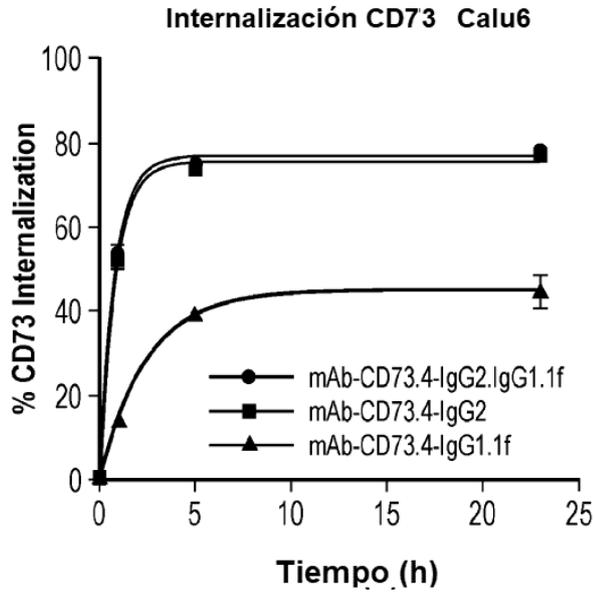
**Fig. 23D**



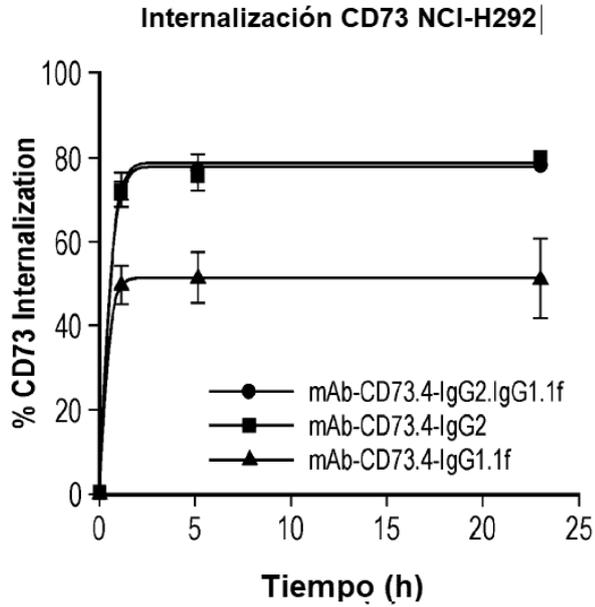
**Fig. 23E**



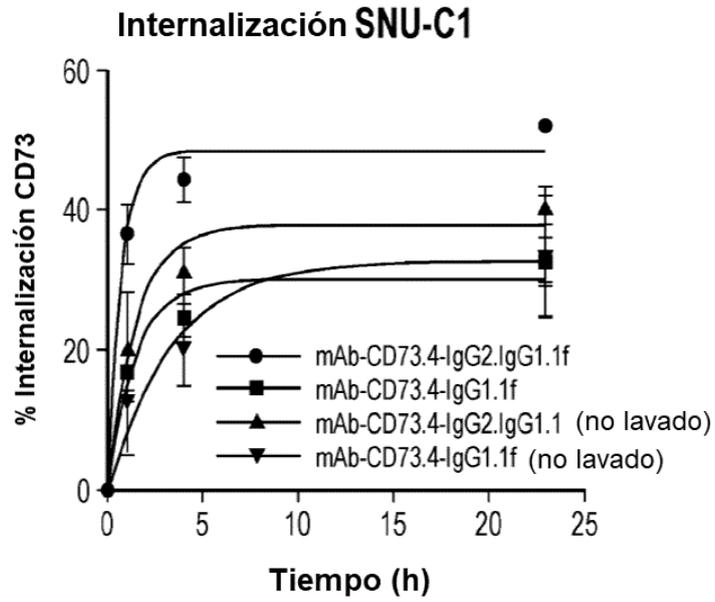
**Fig. 23F**



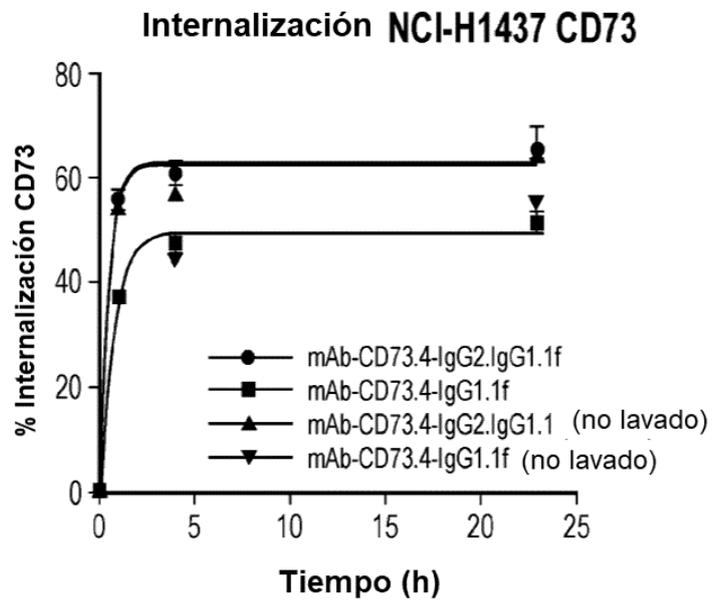
**Fig. 23G**



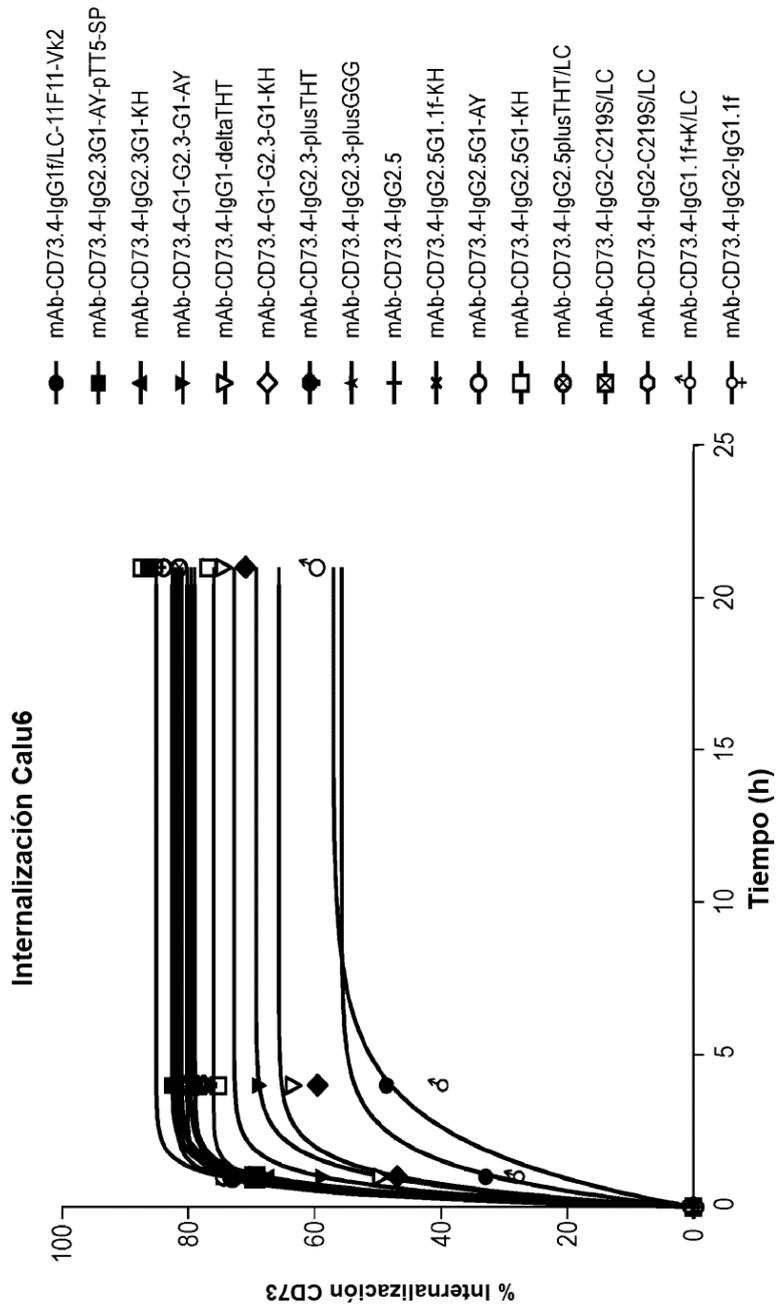
**Fig. 23H**



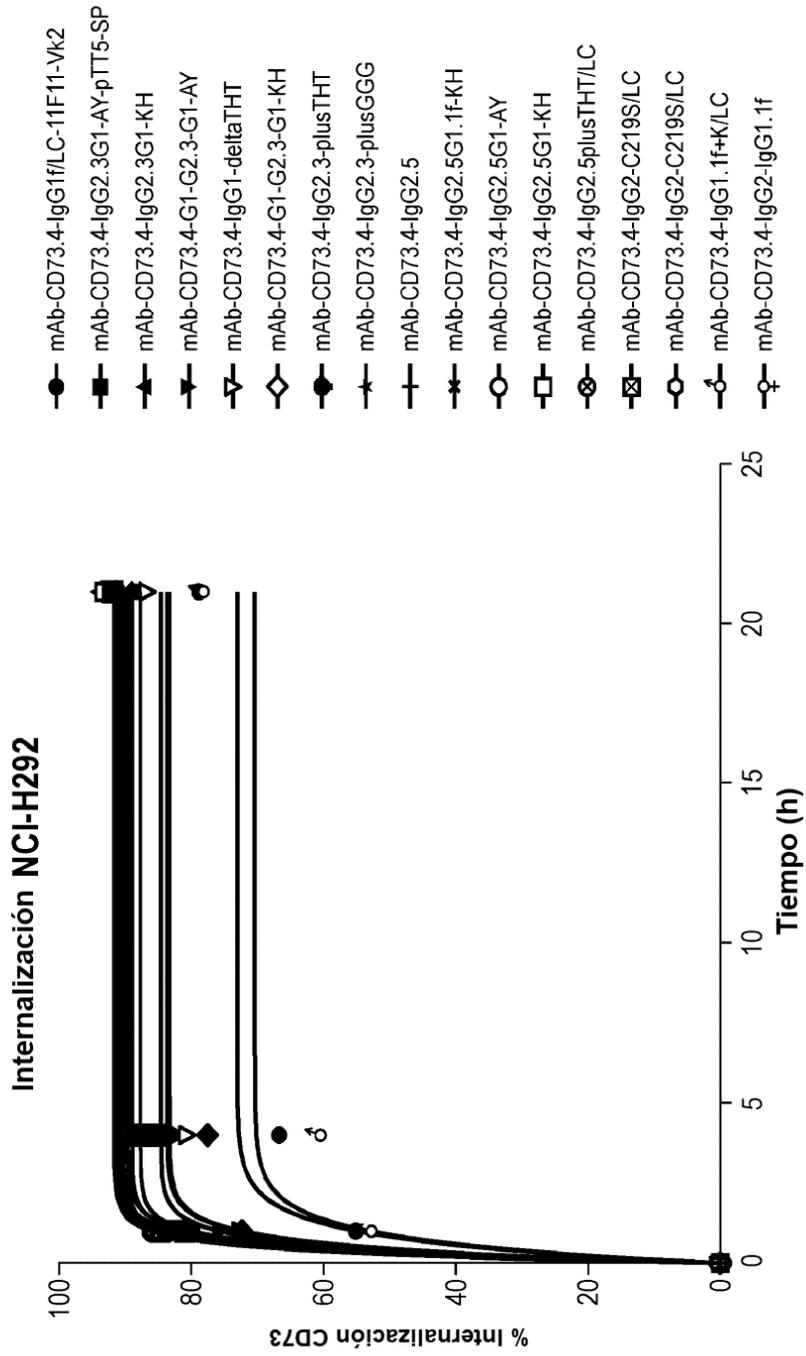
**Fig. 23I**



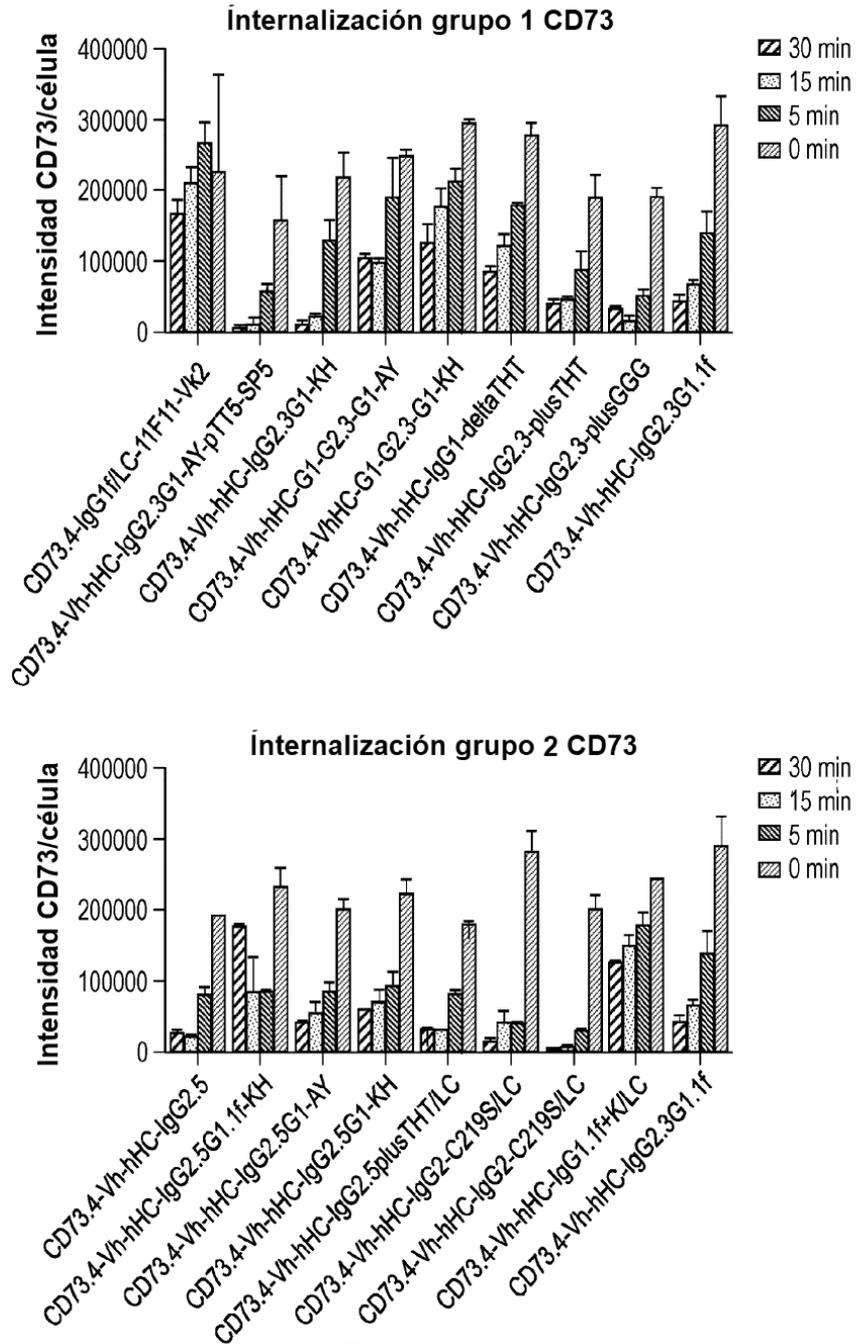
**Fig. 23J**



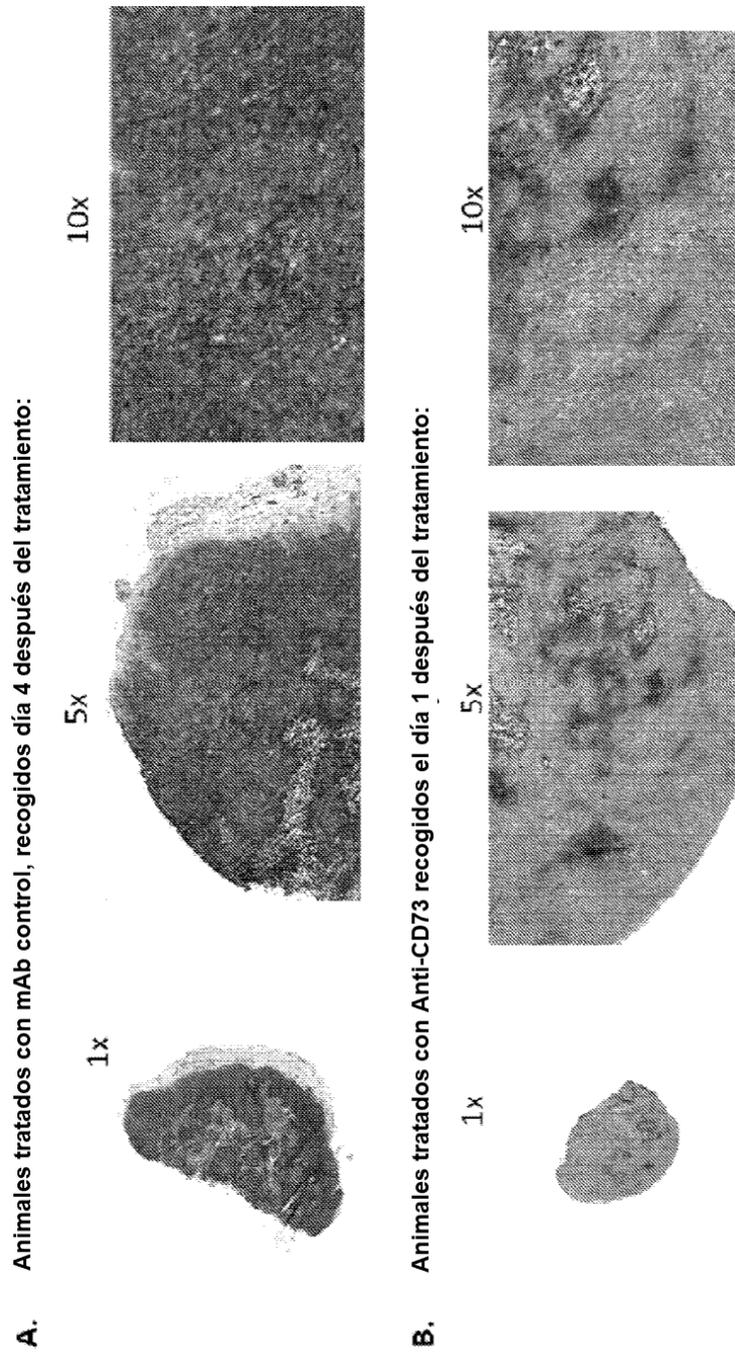
**Fig. 23K**



**Fig. 23L**

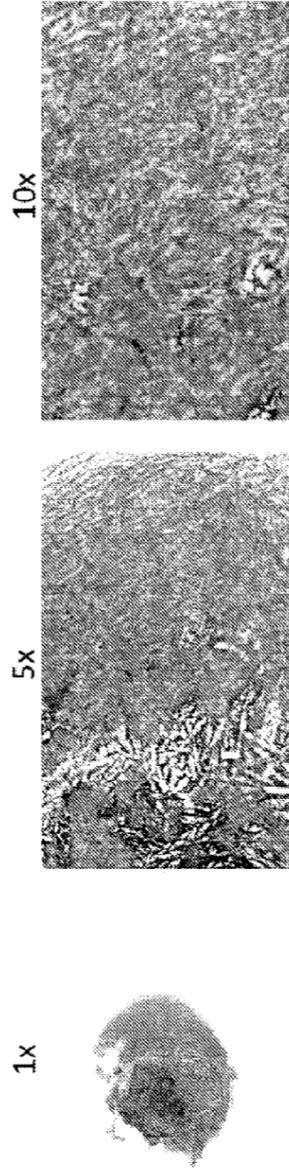


**Fig. 23M**

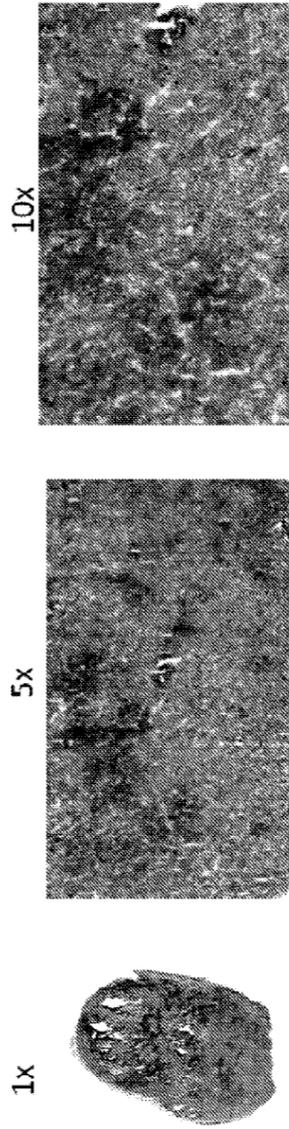


**Fig. 24A-B**

**C.** Animales tratados con Anti-CD73 recogidos día 2 después del tratamiento:

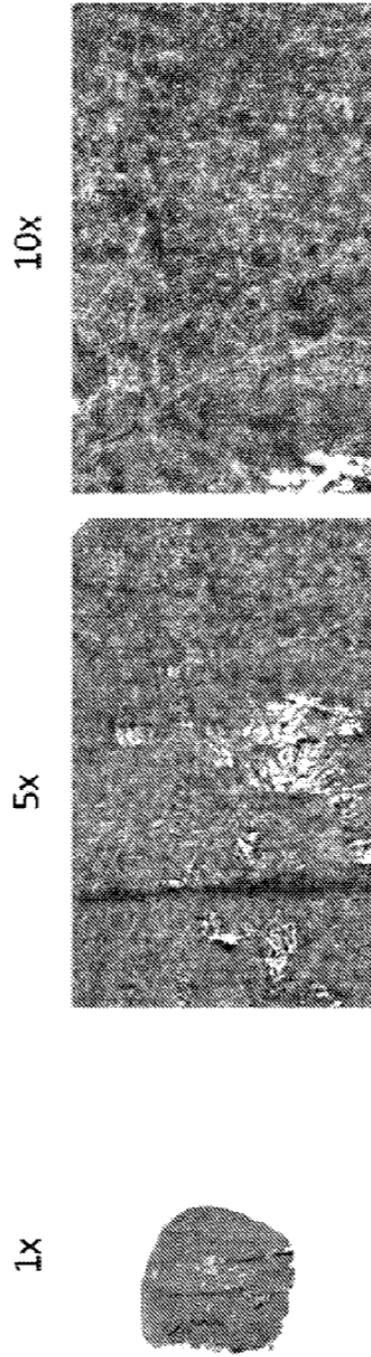


**D.** Animales tratados anti-CD73 recogidos día 3 tratamiento:

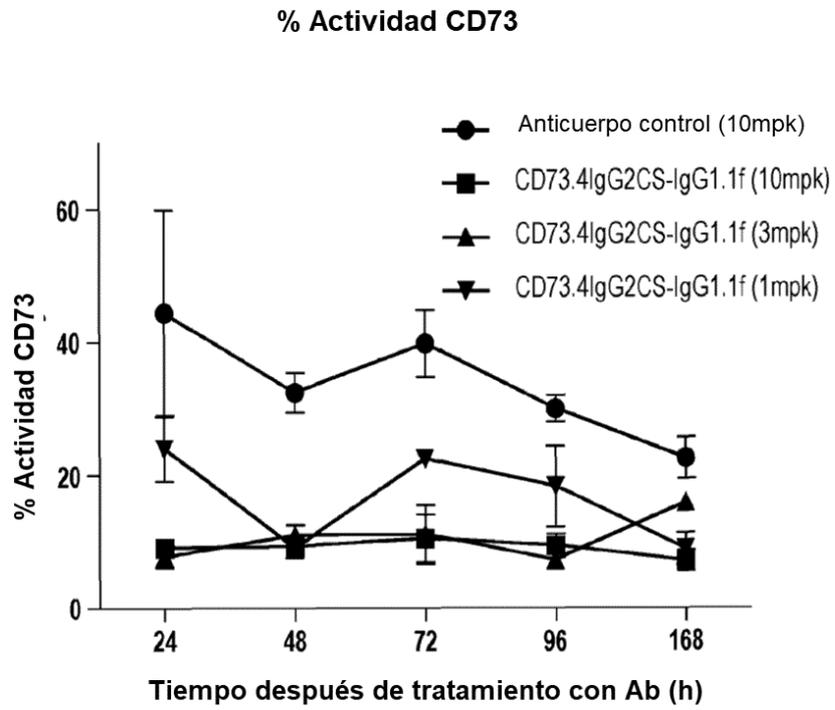


**Fig. 24C-D**

**E. Animales tratados con Anti-CD73 recogidos día 7 después del tratamiento:**

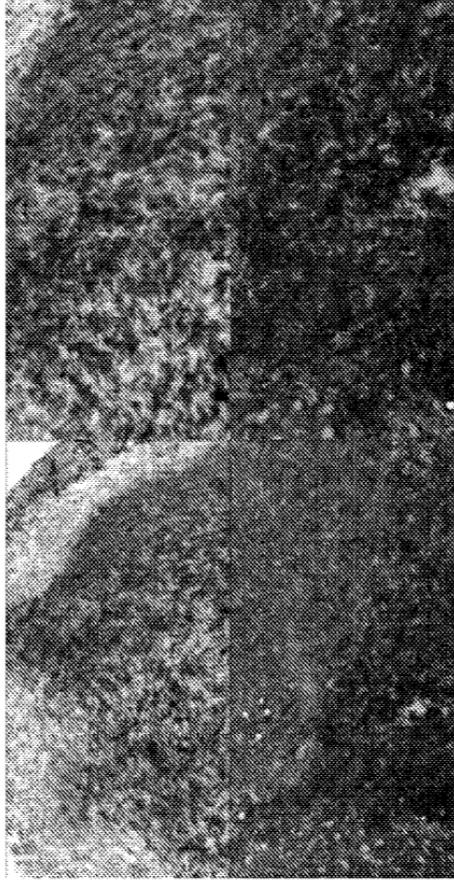


**Fig. 24E**



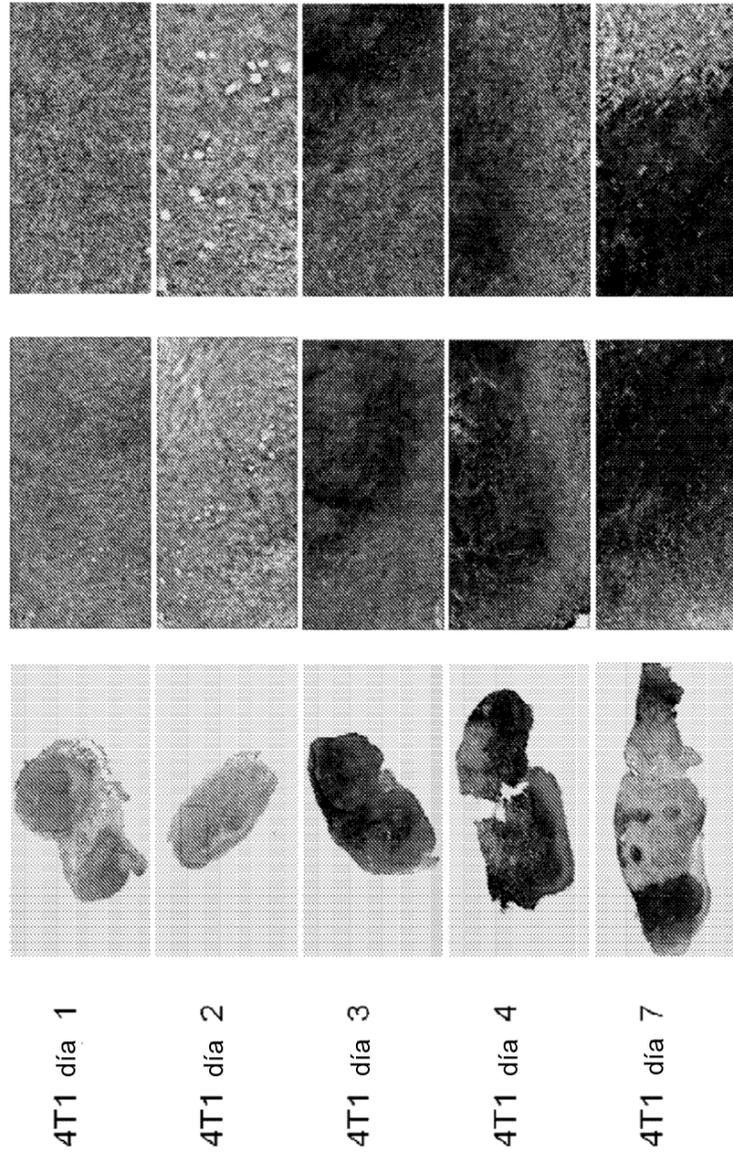
**Fig. 24F**

TUMORES CONTROL

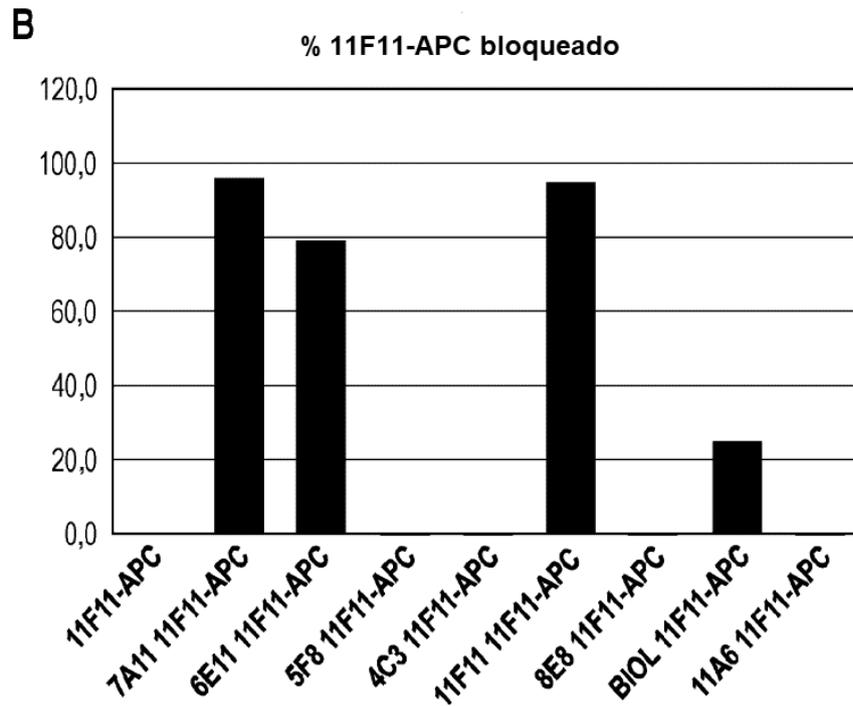
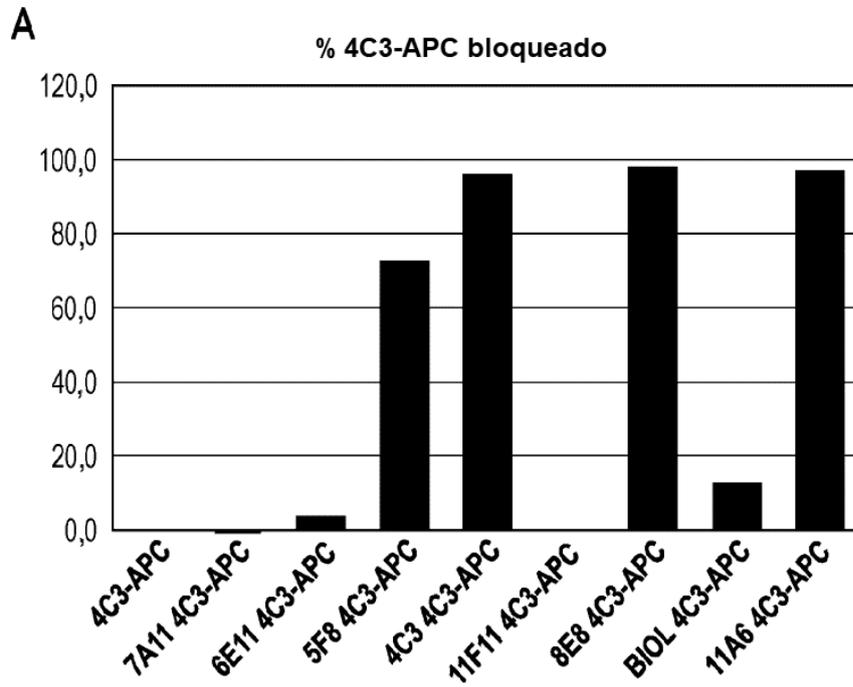


TUMORES DOSIFICADOS TY23

*Fig. 25A*



**Fig. 25B**



**Fig. 26A-B**

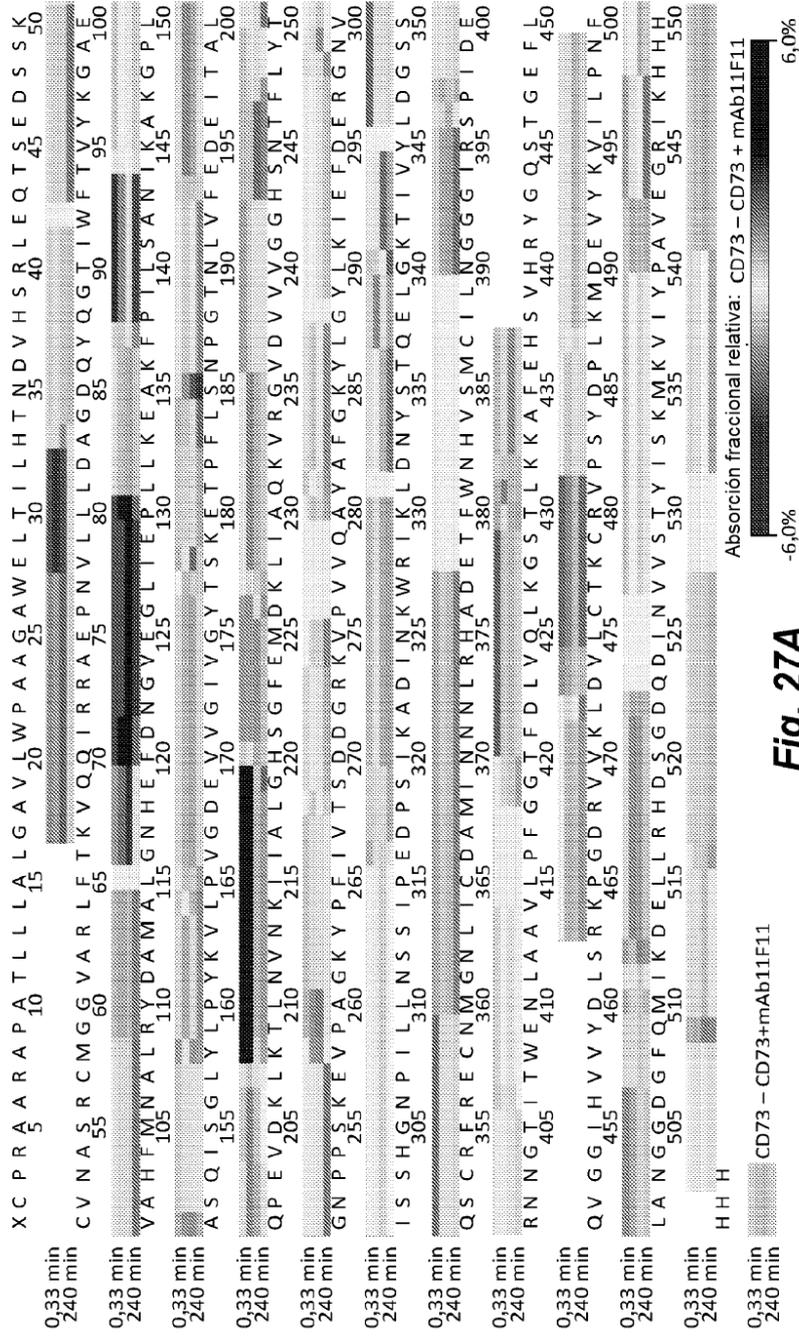
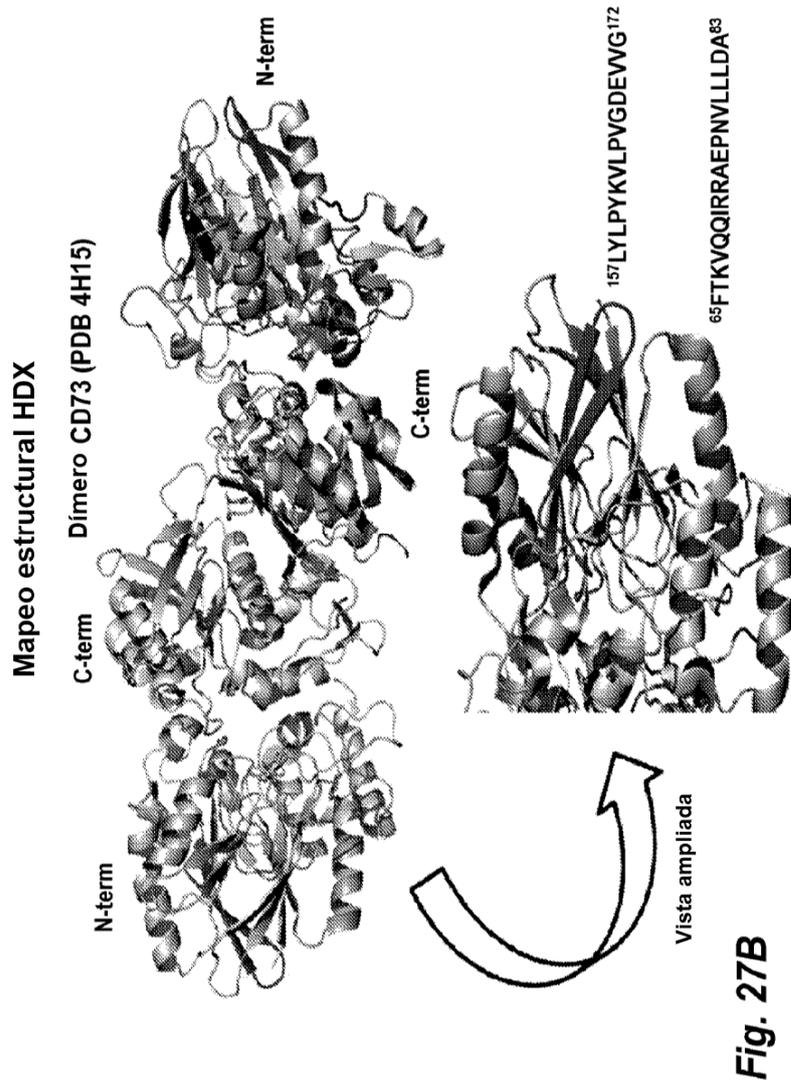
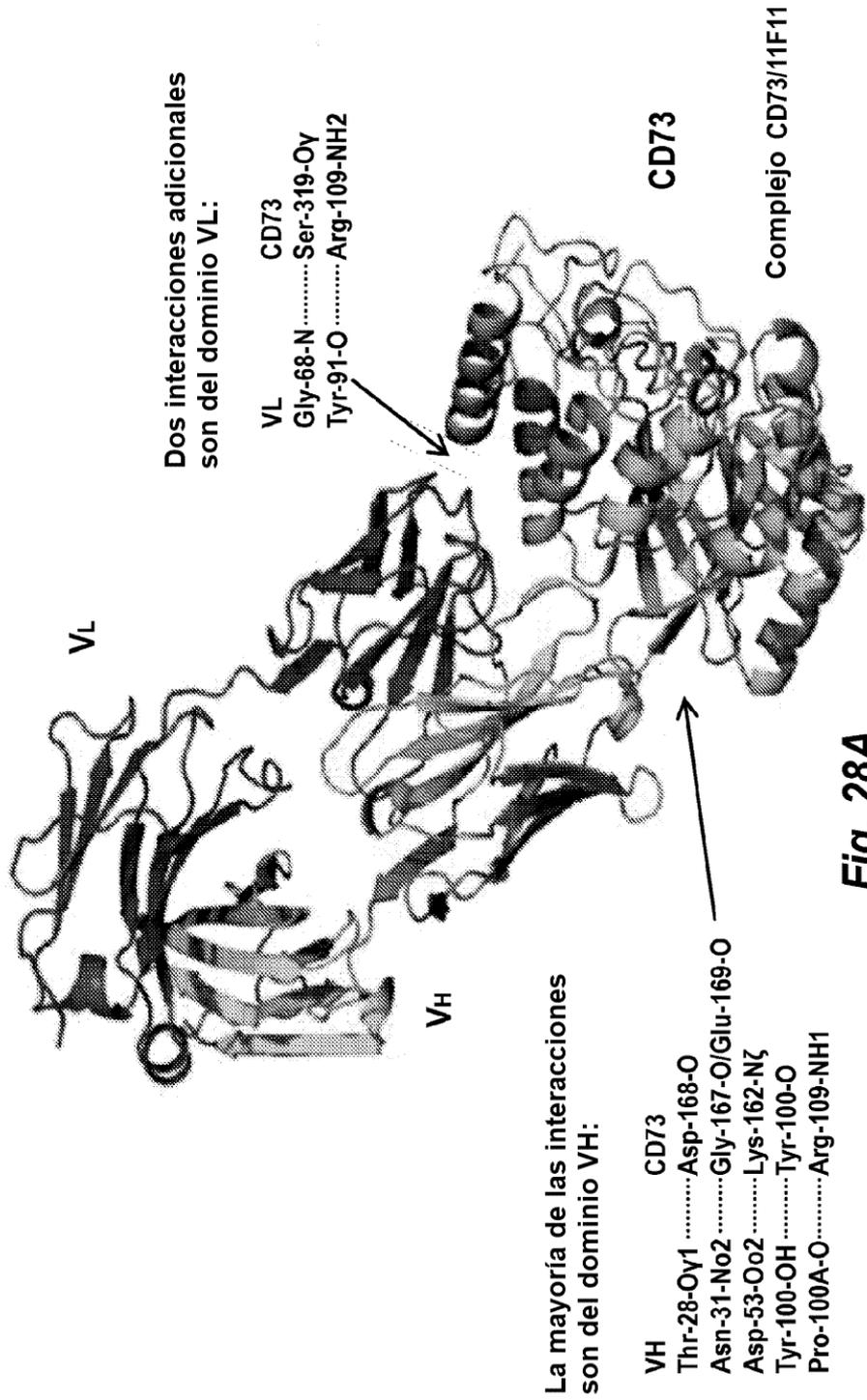
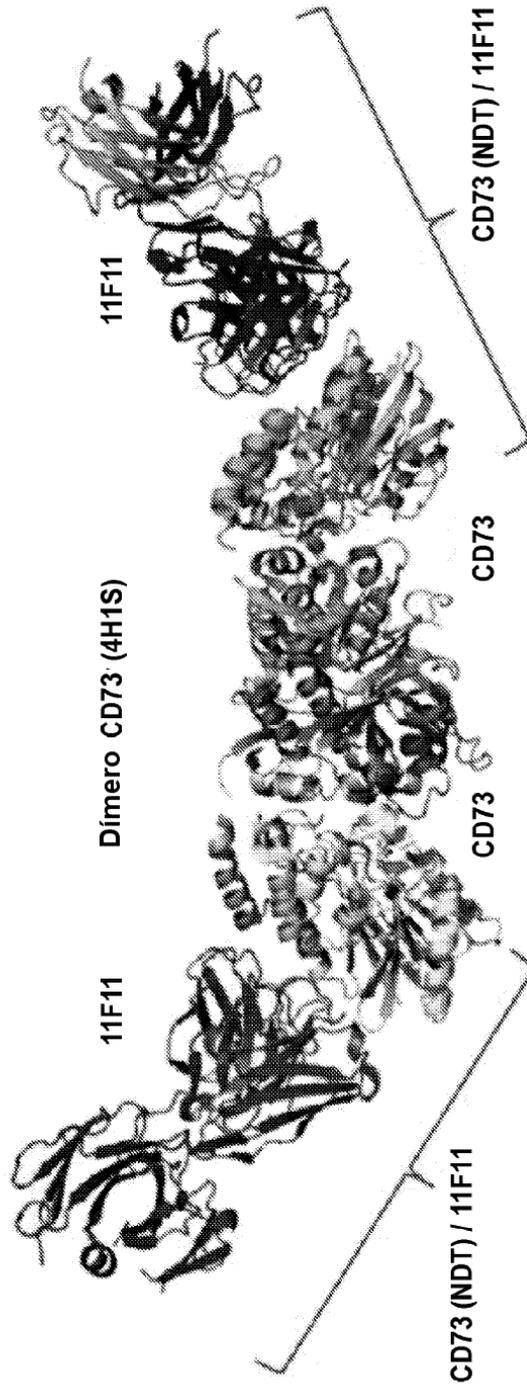


Fig. 27A



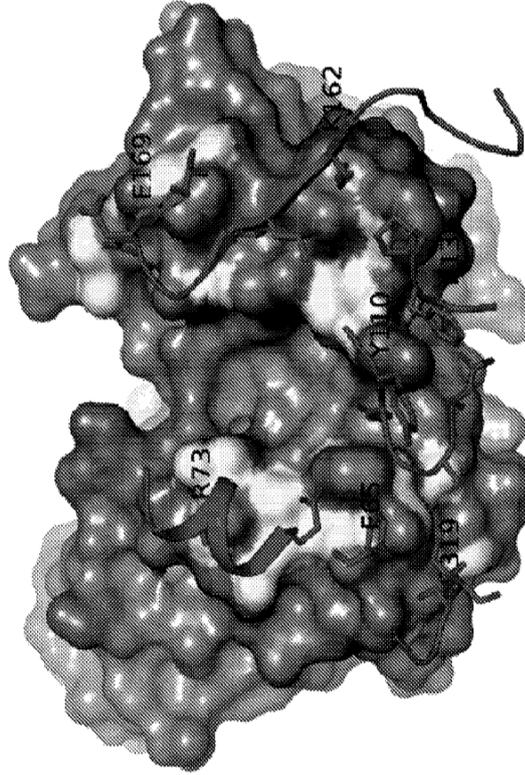




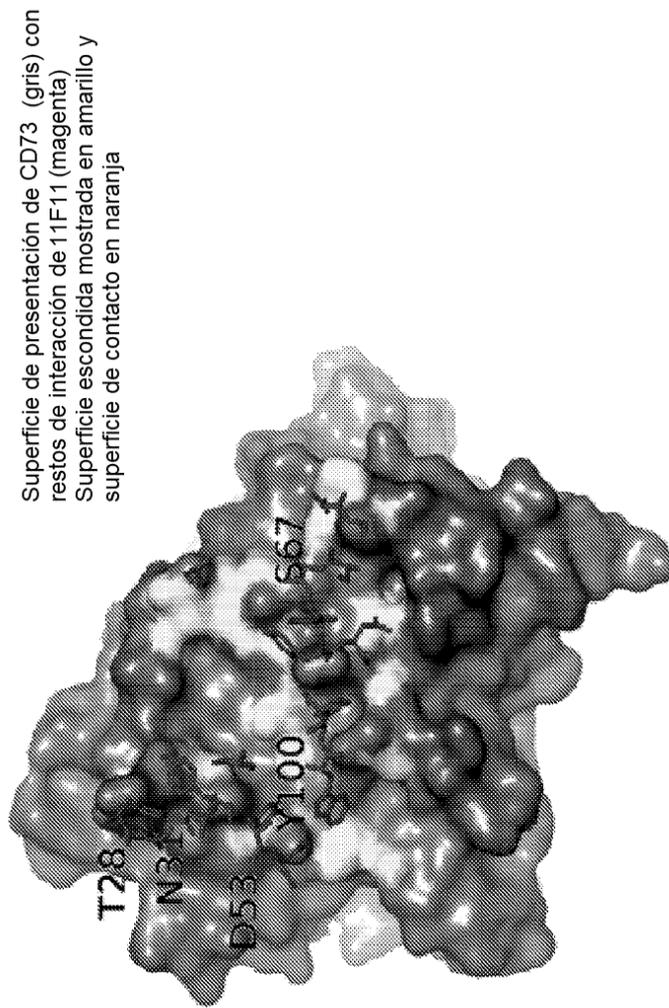
Estructura compuesta de dos complejos CD73(NDT)/11F11 superpuestos sobre el dímero CD73 (Entrada PDP 4H1S)

**Fig. 28B**

Superficie de presentación de 11F11 (gris) con  
restos de interacción de CD73 (magenta)  
Superficie escondida mostrada en amarillo y  
superficie de contacto en naranja



**Fig. 28C**



**Fig. 28D**

Tabla 25: datos SEC-MALS para complejos CD73/mAb

Diana	mAb	Rel molar	[diana] (uM)	[mAb] (uM)	Tiempo elución UV (min)				integración UV SEC en %				PM <sup>w</sup> (kDa)			
					Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4
	CD73.10-IgG1.1f	0:1		4	~2,0	~14,0	~17,3		0,3	0,3	99,4		n/a	62	140	
	CD73.10-IgG2-C219S	0:1		4	~2,0	~17,5			0,1	99,5			73	150		
	CD73.3-IgG1.1f	0:1		4	~16,3				100,0				150			
hCD73-his	11F11-Fab	0:1	4	8	~17,1	~18,4	~20,2		2,8	97,2			n/a	19	47	
N-hCD73-his		1:0	8		~19,3				100,0				280	120		
hCD73-his	CD73.10-IgG1.1f	1:1	4	4	~11,7	~12,7	~16,9		6,4	93,3	3,0		1100	540	180	
hCD73-his	CD73.10-IgG2-C219S	1:1	4	4	~10,3	~11,1			6,4	93,3			110000	3400		
hCD73-his	CD73.3-IgG1.1f	1:1	4	4	~12,0	~13,0	~14,8		17,5	78,3	4,0		960	530	260	
hCD73-his	11F11-Fab	1:2	4	8	~12,6	~14,7	~16,8	~20,1	0,9	90,7	0,8	7,7	300	310	85	40
N-hCD73-his	CD73.10-IgG1.1f	2:1	8	4	~14,6	~17,1			86,5	13,5			210	140		
N-hCD73-his	CD73.10-IgG2-C219S	2:1	8	4	~14,7	~17,3			87,1	12,9			210	150		
N-hCD73-his	CD73.3-IgG1.1f	2:1	8	4	~15,3	~16,2	~19,3		6,4	68,7	24,9		170	160	42	
N-hCD73-his	11F11-Fab	1:1	8	8	~17,4	~20,0			95,3	4,7			84	44		
hCD73		1:0	2,5	0	~16,9				100,0				120			
hCD73	CD73.4-hybrid	1:0,25	2,5	0,625	~11,8	~13,4	~17,1		42,0	21,6	36,4		1200	520	120	
hCD73	CD73.4-hybrid	1:0,5	2,5	1,25	~11,7	~13,4	~17,1		71,9	15,8	13,4		1900	540	130	
hCD73	CD73.4-hybrid	1:1	2,5	2,5	~11,5	~13,4	~17,1		95,3	1,9	2,8		3300	1000	530	
hCD73	CD73.4-hybrid	1:2	2,5	5	~11,7	~13,4	~15,3	~17,1	52,5	17,7	0,6	29,3	1700	500	220	140
hCD73	CD73.4-hybrid	1:4	2,5	10	~11,7	~13,4	~15,3	~17,1	24,1	16,2	1,2	58,6	1300	500	200	140
hCD73		1:0	2,5	0	~16,9	~18,2			97,6	2,4			120	73		
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:0,25	2,5	0,625	~12,3	~13,1	~17,1		11,8	49,5	38,6		830	530	120	
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:0,5	2,5	1,25	~12,3	~13,1	~17,1		31,1	54,8	3,3		890	540	120	81
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:1	2,5	2,5	~12,1	~12,3	~13,1	~17,0	55,2	44,5	2,1	2,2	1100	560	280	160
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:2	2,5	5	~12,3	~13,1	~15,3	~17,0	22,3	44,1	2,8	30,7	910	530	210	140
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:4	2,5	10	~12,3	~13,2	~15,3	~17,0	9,1	31,0	2,4	57,4	810	510	200	140
N-hCD73	CD73.4-hybrid	1:1	5	2,5	~13,9	~14,7	~15,9	~17,0	0,7	88,3	8,1		390	210	180	150
N-hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:1	5	2,5	~13,4	~14,7			1,7	98,3			360	210		
N-hCD73	CD73.4-hybrid	0:1	0	5	~15,9	~16,9			0,4	99,6			290	140		
N-hCD73	CD73.4-IgG1.1f	0:1	0	5	~14,2	~15,9	~17,1		0,6	1,2	98,2		81	120	140	
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S	1:1	2,5	2,5	~11,5	~13,4	~17,3		95,0	2,1	2,8		3400	970	480	
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f	1:1	2,5	2,5	~11,5	~13,4	~17,3		94,7	2,3	3,0		3600	1100	580	
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:1	2,5	2,5	~11,7	~13,0	~15,1	~17,0	60,0	35,3	2,3	2,5	1300	550	270	160
hCD73	CD73.10-IgG2-C219S	1:1	2,5	2,5	~11,8	~16,9			96,2	3,2			2000	310		
hCD73	CD73.10-IgG2CS-1.1	1:1	2,5	2,5	~11,8	~16,9			96,6	2,5	0,9		2000	320	390	
hCD73	CD73.10-IgG1.1f	1:1	2,5	2,5	~12,1	~13,0	~16,5		35,1	62,1	2,7		1000	530	170	
hCD73		1:0	2,5	0	~17,3	~18,4			97,2	2,8			120	60		
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f	1:1	5	5	~11,5	~13,4	~17,3		93,9	2,6	3,5		4800	1300	740	
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f	1:1	1	1	~11,5	~13,4	~15,0	~17,3	84,4	7,5	2,5	5,4	2900	660	460	240

\*Las concentraciones se definen como monómero N-hCD73, monómero 11F11-Fab, dímero hCD73-his, y mAb (bivalente)

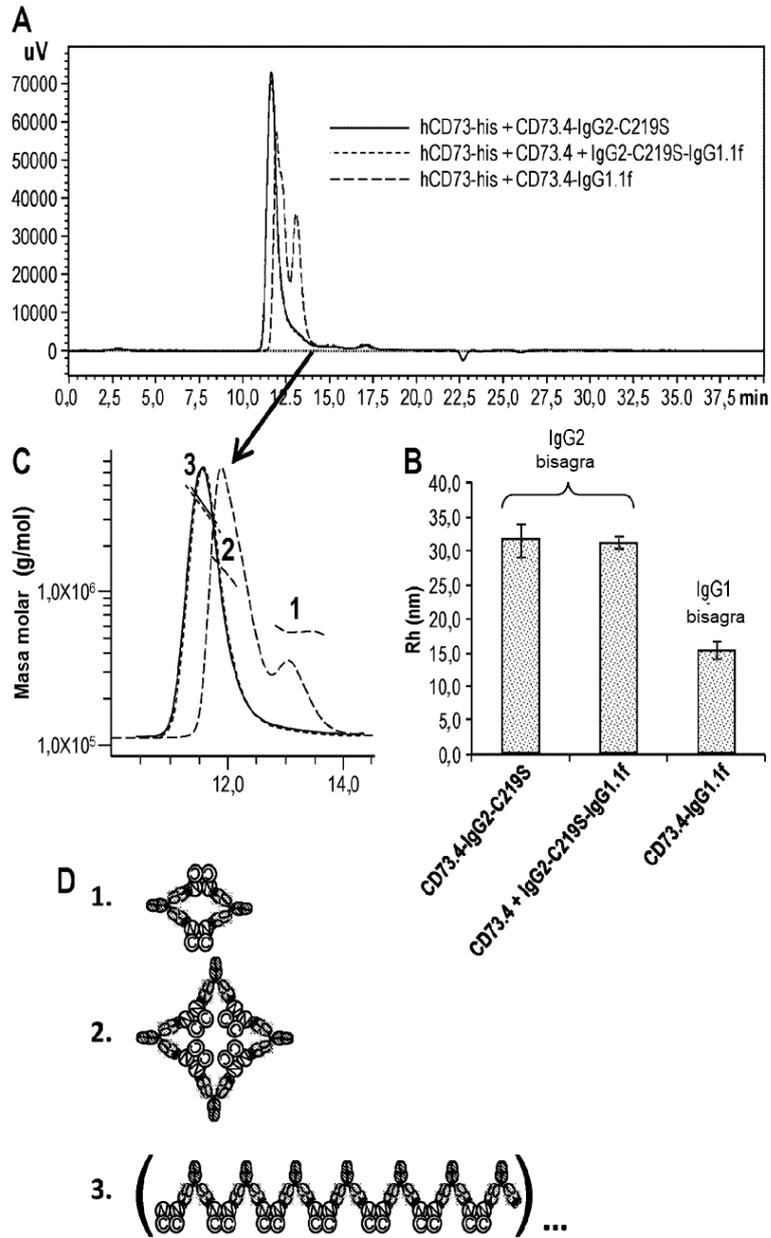
Fig. 29A

Tabla 26: datos DLS para complejos CD73/mAb

Diana	mAb	Rel molar	[diana] (uM)	[mAb] (uM)	DLS					
					Rh	Rh SD	%Pd	%Pd SD	%Mas	%Mas SD
	CD73.10-IgG1.1f	0:1		4	5,0	0,6	11,0	6,0	100,0	0,0
	CD73.10-IgG2-C219S	0:1		4	5,2	0,1	11,9	2,3	100,0	0,0
	CD73.3-IgG1.1f	0:1		4	5,1	0,5	11,6	6,9	100,0	0,0
	11F11-Fab	0:1		8	3,4	0,2	22,0	5,3	100,0	0,1
hCD73-his		1:0	4		4,3	0,3	10,6	5,2	99,8	0,2
N-hCD73-his		1:0	8		2,3	0,2	19,3	12,3	99,9	0,2
hCD73-his	CD73.10-IgG1.1f	1:1	4	4	12,8	0,7	32,4	6,7	100,0	0,0
hCD73-his	CD73.10-IgG2-C219S	1:1	4	4	2,9	1,5	7,5	0,8	73,9	11,5
hCD73-his	CD73.3-IgG1.1f	1:1	4	4	10,8	0,1	28,2	0,6	100,0	0,0
hCD73-his	11F11-Fab	1:2	4	8	6,4	0,1	15,1	4,3	100,0	0,0
N-hCD73-his	CD73.10-IgG1.1f	2:1	8	4	6,6	0,3	15,3	6,5	100,0	0,0
N-hCD73-his	CD73.10-IgG2-C219S	2:1	8	4	6,5	0,2	15,7	5,7	100,0	0,1
N-hCD73-his	CD73.3-IgG1.1f	2:1	8	4	5,8	0,3	12,8	5,3	100,0	0,0
N-hCD73-his	11F11-Fab	1:1	8	8	4,2	0,1	12,6	4,7	100,0	0,0
hCD73		1:0	2,5	0	4,5	0,1	12,3	4,3	99,9	0,2
hCD73	CD73.4-hybrid	1:0,25	2,5	0,625	13,2	1,7	46,5	5,9	99,9	0,1
hCD73	CD73.4-hybrid	1:0,5	2,5	1,25	17,5	1,0	31,7	8,8	62,6	25,8
hCD73	CD73.4-hybrid	1:1	2,5	2,5	29,9	1,0	25,1	2,1	22,3	4,9
hCD73	CD73.4-hybrid	1:2	2,5	5	14,4	0,1	31,3	5,5	68,7	25,8
hCD73	CD73.4-hybrid	1:4	2,5	10	11,4	0,9	42,9	3,5	90,2	17,5
hCD73		1:0	2,5	0	4,7	0,1	18,6	3,3	99,8	0,1
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:0,25	2,5	0,625	10,4	1,5	38,6	15,9	81,3	37,1
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:0,5	2,5	1,25	12,9	0,6	35,5	5,4	88,3	23,2
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:1	2,5	2,5	14,7	0,5	34,3	3,9	100,0	0,0
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:2	2,5	5	11,6	0,4	24,9	8,5	65,0	32,5
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:4	2,5	10	8,1	4,0	33,0	16,9	84,2	31,7
N-hCD73	CD73.4-hybrid	1:1	5	2,5	6,7	0,3	13,9	7,0	100,0	0,0
N-hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:1	5	2,5	6,5	0,1	7,4	3,2	100,0	0,0
	CD73.4-hybrid	0:1	0	5	5,4	0,2	15,7	5,7	99,9	0,1
	CD73.4-IgG1.1f	0:1	0	5	5,3	0,4	13,6	7,9	100,0	0,0
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S	1:1	2,5	2,5	31,7	2,4	31,6	11,4	19,3	12,2
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f	1:1	2,5	2,5	31,2	0,9	30,8	3,8	17,5	11,4
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:1	2,5	2,5	15,6	1,2	32,7	8,0	100,0	0,0
hCD73	CD73.10-IgG2-C219S	1:1	2,5	2,5	23,9	1,2	26,7	4,4	36,3	5,3
hCD73	CD73.10-IgG2CS-1.1	1:1	2,5	2,5	25,6	2,3	30,1	8,8	35,9	9,1
hCD73	CD73.10-IgG1.1f	1:1	2,5	2,5	13,5	1,2	31,6	12,0	83,2	31,5
hCD73		1:0	2,5	0	4,2	0,8	24,4	12,8	99,1	0,7
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f	1:1	5	5	35,3	3,8	35,2	13,9	6,7	4,4
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f	1:1	1	1	25,5	3,2	32,9	2,9	60,7	27,5

\* Las concentraciones molares se definen como monómero N-hCD73, monómero 11F11-Fab, dímero hCD73-his y mAb (bivalente)

Fig. 29B



**Fig. 30A-D**

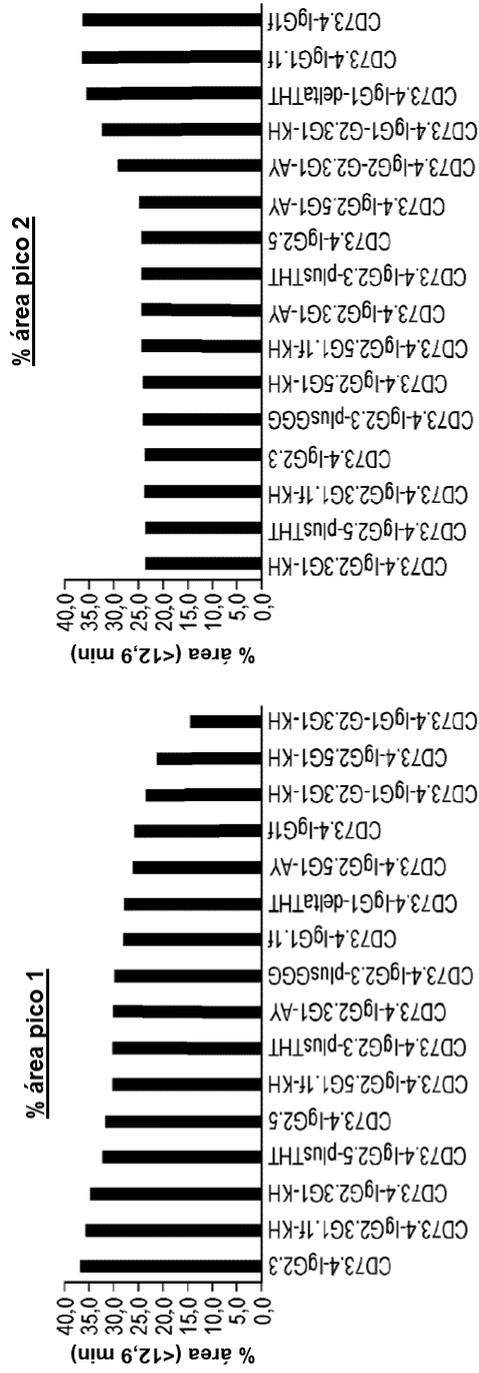


Fig. 30E



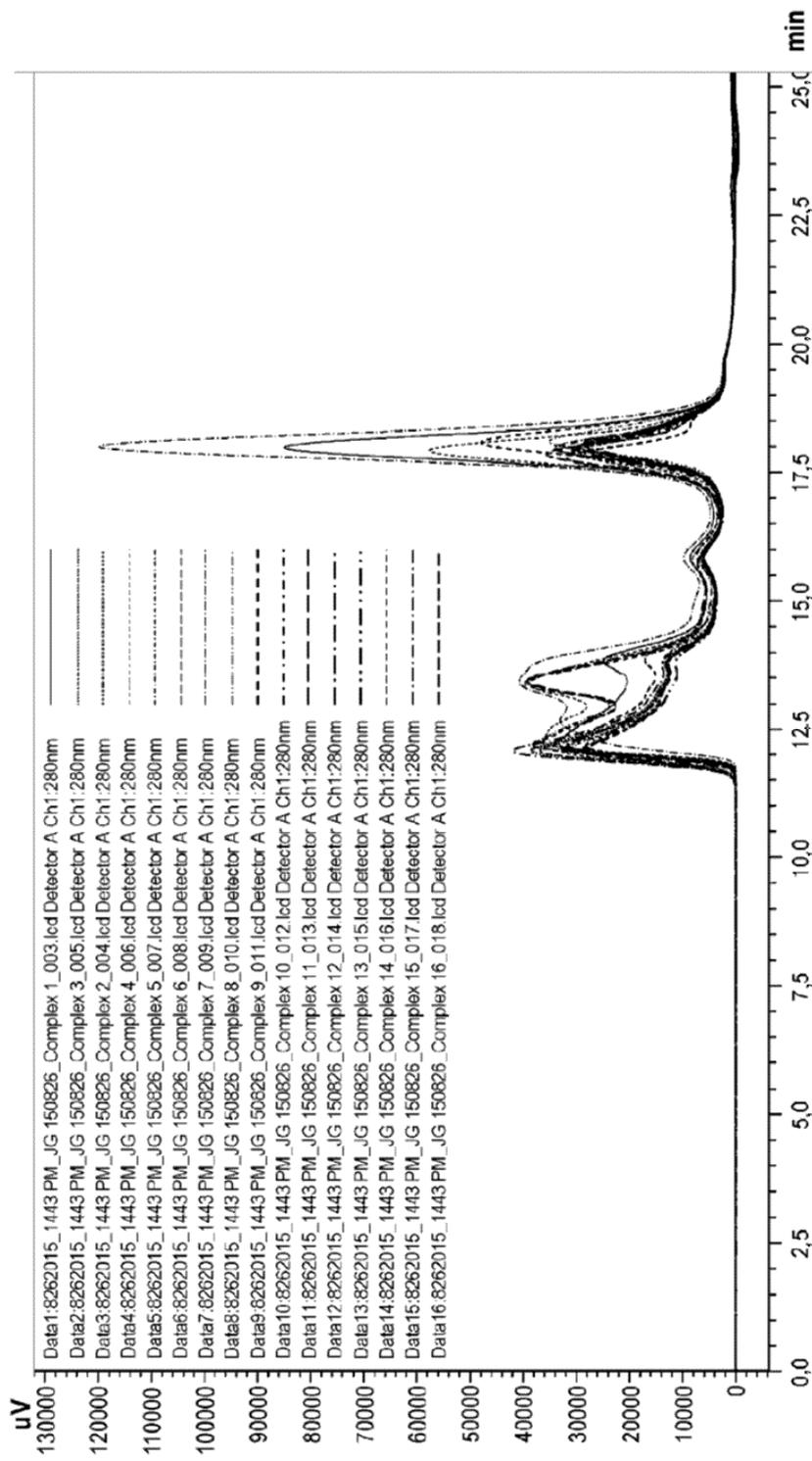
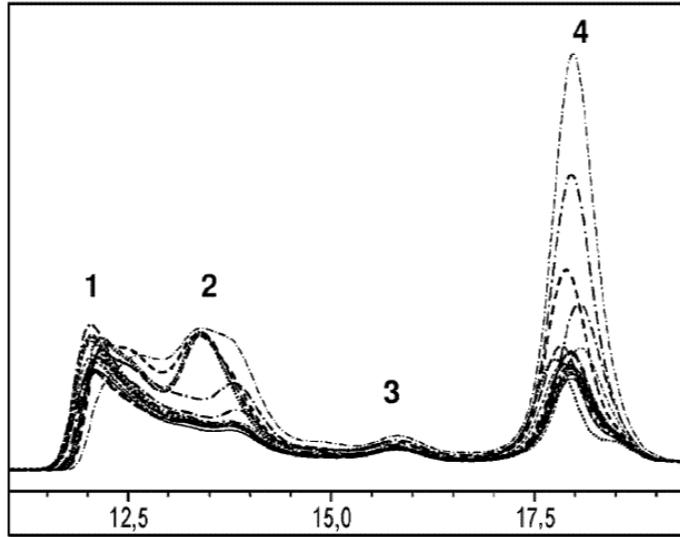
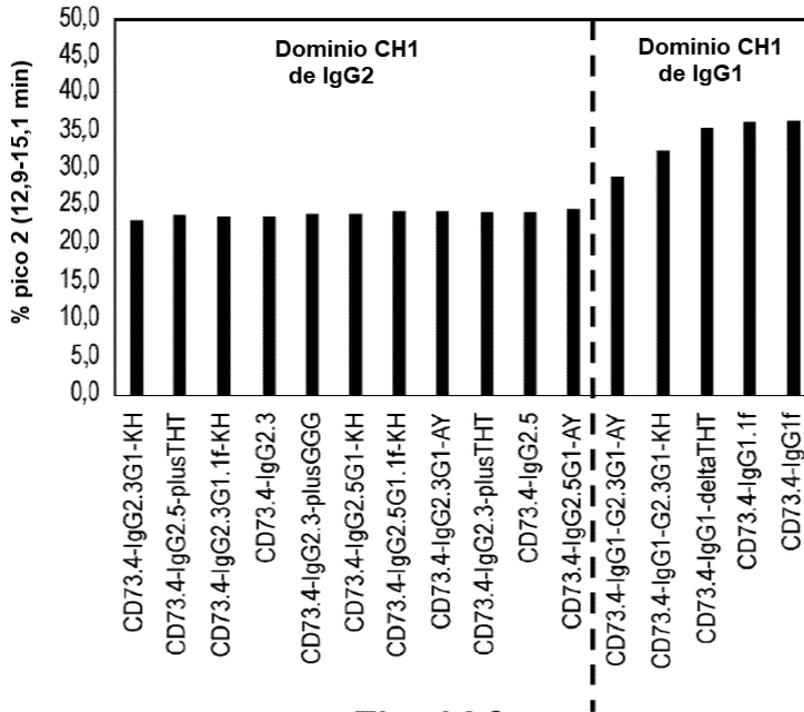


Fig. 32A



**Fig. 32B**



**Fig. 32C**

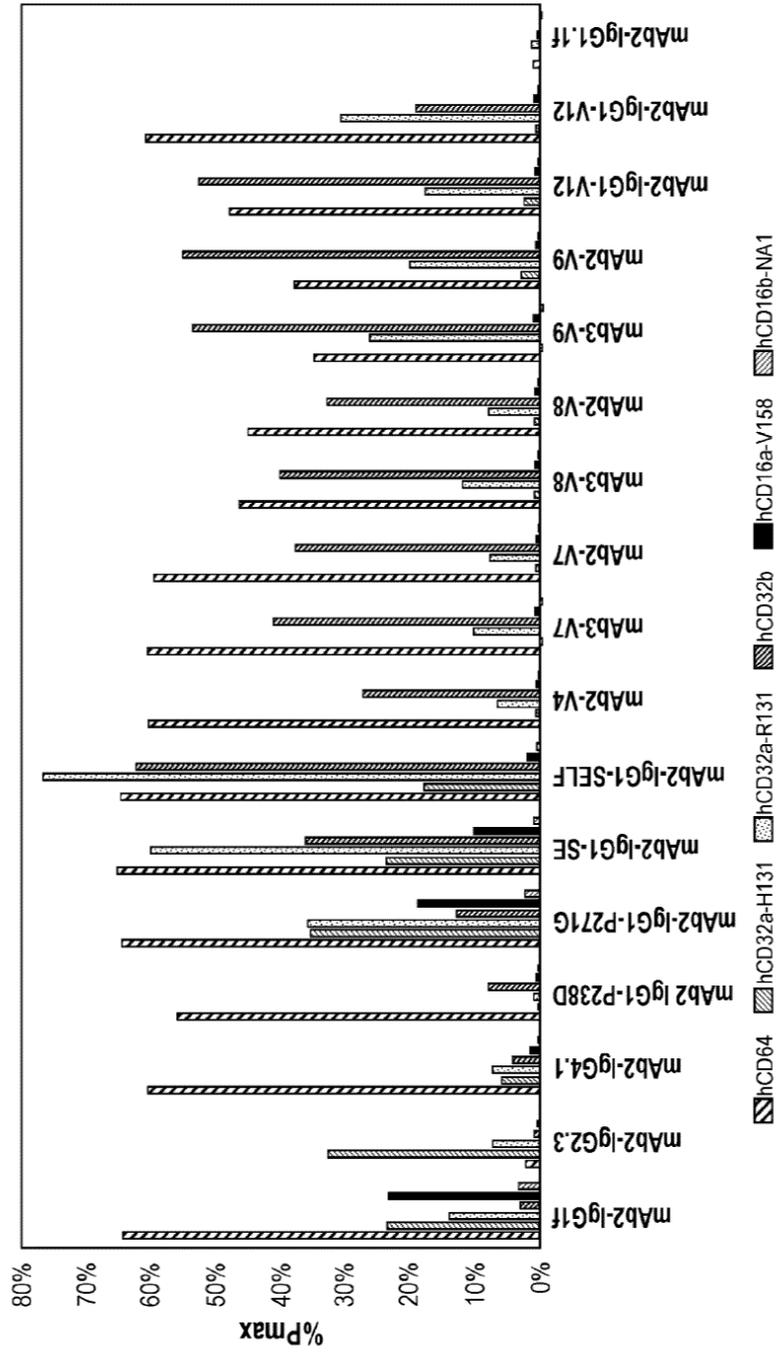


Fig. 33

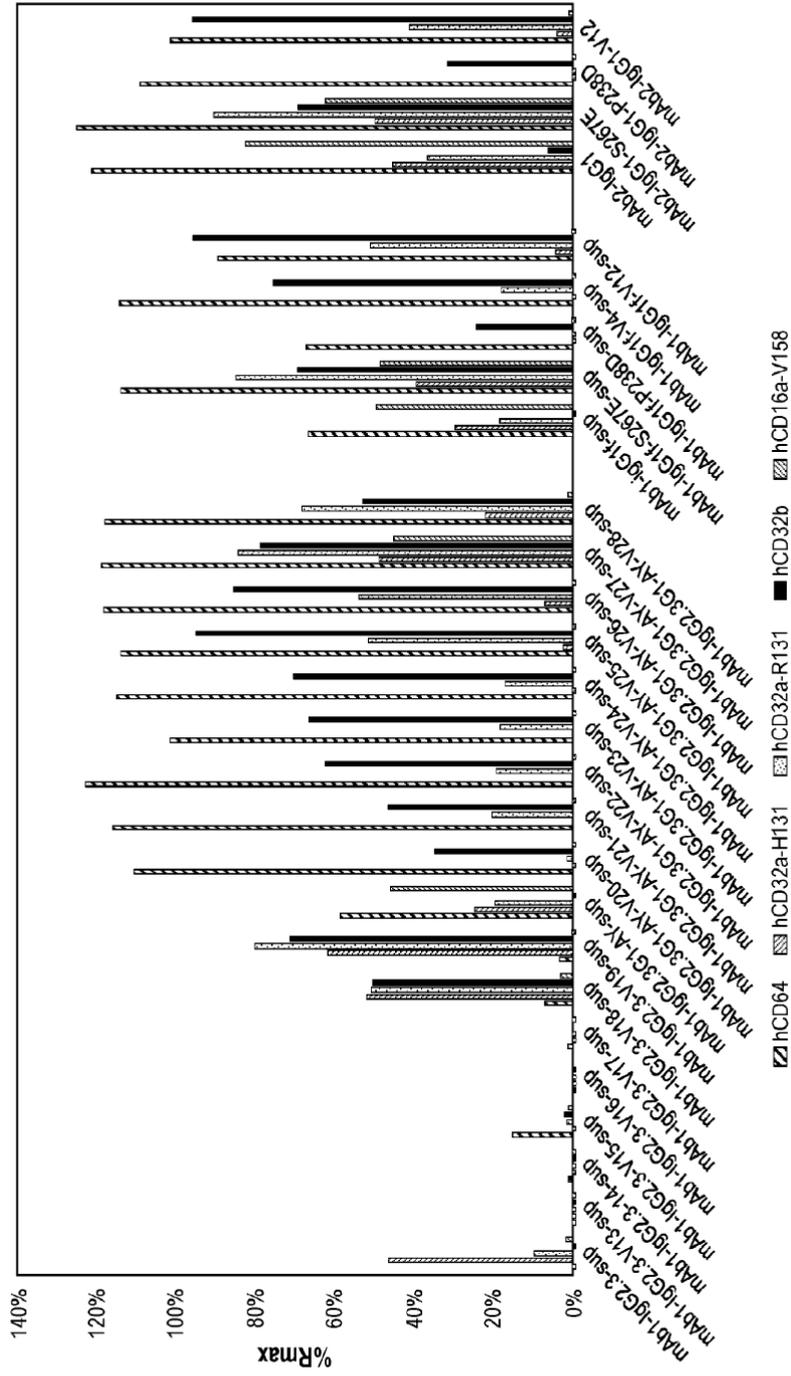


Fig. 34

alineamiento región VH

11F11 QVQLVSEGGGVVQPGKRSRLRSCAASGFTFSNYGCMHWRVQAPGKGLIEWAVLIDGSKNYKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYCARGGSSWSPDSFDLWGQGTMTVTVSS  
 73-4 QVQLVSEGGGVVQPGKRSRLRSCAASGFTFSNYGCMHWRVQAPGKGLIEWAVLIDGSKNYKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYCARGGSSWSPDSFDLWGQGTMTVTVSS  
 73-5 QVQLVSEGGGVVQPGKRSRLRSCAASGFTFSNYGCMHWRVQAPGKGLIEWAVLIDGSKNYKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYCARGGSSWSPDSFDLWGQGTMTVTVSS  
 73-6 QVQLVSEGGGVVQPGKRSRLRSCAASGFTFSNYGCMHWRVQAPGKGLIEWAVLIDGSKNYKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYCARGGSSWSPDSFDLWGQGTMTVTVSS  
 73-7 QVQLVSEGGGVVQPGKRSRLRSCAASGFTFSNYGCMHWRVQAPGKGLIEWAVLIDGSKNYKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYCARGGSSWSPDSFDLWGQGTMTVTVSS  
 73-8 QVQLVSEGGGVVQPGKRSRLRSCAASGFTFSNYGCMHWRVQAPGKGLIEWAVLIDGSKNYKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYCARGGSSWSPDSFDLWGQGTMTVTVSS  
 73-9 QVQLVSEGGGVVQPGKRSRLRSCAASGFTFSNYGCMHWRVQAPGKGLIEWAVLIDGSKNYKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYCARGGSSWSPDSFDLWGQGTMTVTVSS  
 73-10 QVQLVSEGGGVVQPGKRSRLRSCAASGFTFSNYGCMHWRVQAPGKGLIEWAVLIDGSKNYKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYCARGGSSWSPDSFDLWGQGTMTVTVSS  
 24H2 QVQLVSEGGGVVQPGKRSRLRSCAASGFTFSNYGCMHWRVQAPGKGLIEWAVLIDGSKNYKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYCARGGSSWSPDSFDLWGQGTMTVTVSS  
 4D4 QVQLVSEGGGVVQPGKRSRLRSCAASGFTFSNYGCMHWRVQAPGKGLIEWAVLIDGSKNYKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYCARGGSSWSPDSFDLWGQGTMTVTVSS  
 10D2 QVQLVSEGGGVVQPGKRSRLRSCAASGFTFSNYGCMHWRVQAPGKGLIEWAVLIDGSKNYKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYCARGGSSWSPDSFDLWGQGTMTVTVSS  
 6E11 QVQLVSEGGGVVQPGKRSRLRSCAASGFTFSNYGCMHWRVQAPGKGLIEWAVLIDGSKNYKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYCARGGSSWSPDSFDLWGQGTMTVTVSS  
 7A11 QVQLVSEGGGVVQPGKRSRLRSCAASGFTFSNYGCMHWRVQAPGKGLIEWAVLIDGSKNYKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYCARGGSSWSPDSFDLWGQGTMTVTVSS  
 11A6 QVQLVSEGGGVVQPGKRSRLRSCAASGFTFSNYGCMHWRVQAPGKGLIEWAVLIDGSKNYKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYCARGGSSWSPDSFDLWGQGTMTVTVSS  
 4C3 QVQLVSEGGGVVQPGKRSRLRSCAASGFTFSNYGCMHWRVQAPGKGLIEWAVLIDGSKNYKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYCARGGSSWSPDSFDLWGQGTMTVTVSS  
 73-3 QVQLVSEGGGVVQPGKRSRLRSCAASGFTFSNYGCMHWRVQAPGKGLIEWAVLIDGSKNYKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYCARGGSSWSPDSFDLWGQGTMTVTVSS  
 5F8 QVQLVSEGGGVVQPGKRSRLRSCAASGFTFSNYGCMHWRVQAPGKGLIEWAVLIDGSKNYKYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYCARGGSSWSPDSFDLWGQGTMTVTVSS

alineamiento región VL

11F11-1 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQCVSSYLAWYQQKPKQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLSLEPEDFAVYYCOQRSNMHLTFGGGTKVEIK  
 11F11-2 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISWLAAYQQKPKAPKSLIYAASSLQSGVPRFRSGSGSGTDFTLTISLSLEPEDFAVYYCOQYNSYPLTFGGGTKVEIK  
 24H2 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISWLAAYQQKPKAPKSLIYAASSLQSGVPRFRSGSGSGTDFTLTISLSLEPEDFAVYYCOQYNSYPLTFGGGTKVEIK  
 4D4 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISWLAAYQQKPKAPKSLIYAASSLQSGVPRFRSGSGSGTDFTLTISLSLEPEDFAVYYCOQYNSYPLTFGGGTKVEIK  
 10D2-1 AIQLTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISWLAAYQQKPKAPKSLIYAASSLQSGVPRFRSGSGSGTDFTLTISLSLEPEDFAVYYCOQYNSYPLTFGGGTKVEIK  
 10D2-2 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISWLAAYQQKPKAPKSLIYAASSLQSGVPRFRSGSGSGTDFTLTISLSLEPEDFAVYYCOQYNSYPLTFGGGTKVEIK  
 6E11 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQCVSSYLAWYQQKPKQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLSLEPEDFAVYYCOQYNSYPLTFGGGTKVEIK  
 7A11 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISWLAAYQQKPKAPKSLIYAASSLQSGVPRFRSGSGSGTDFTLTISLSLEPEDFAVYYCOQYNSYPLTFGGGTKVEIK  
 11A6 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISWLAAYQQKPKAPKSLIYAASSLQSGVPRFRSGSGSGTDFTLTISLSLEPEDFAVYYCOQYNSYPLTFGGGTKVEIK  
 4C3-1 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQCVSSYLAWYQQKPKQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLSLEPEDFAVYYCOQYNSYPLTFGGGTKVEIK  
 4C3-2 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISWLAAYQQKPKAPKSLIYAASSLQSGVPRFRSGSGSGTDFTLTISLSLEPEDFAVYYCOQYNSYPLTFGGGTKVEIK  
 4C3-3 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISWLAAYQQKPKAPKSLIYAASSLQSGVPRFRSGSGSGTDFTLTISLSLEPEDFAVYYCOQYNSYPLTFGGGTKVEIK  
 5F8-1 AIQLTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISWLAAYQQKPKAPKSLIYAASSLQSGVPRFRSGSGSGTDFTLTISLSLEPEDFAVYYCOQYNSYPLTFGGGTKVEIK  
 5F8-2 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISWLAAYQQKPKAPKSLIYAASSLQSGVPRFRSGSGSGTDFTLTISLSLEPEDFAVYYCOQYNSYPLTFGGGTKVEIK  
 5F8-3 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQCVSSYLAWYQQKPKQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLSLEPEDFAVYYCOQYNSYPLTFGGGTKVEIK

Fig. 35