

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 964**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.10.2015 PCT/EP2015/073370**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016 WO16055609**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2015 E 15778310 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020 EP 3204417**

54 Título: **Bloqueo de CD73**

30 Prioridad:

10.10.2014 US 201462062323 P

20.02.2015 US 201562118549 P

16.03.2015 US 201562133597 P

06.07.2015 US 201562188881 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.04.2021

73 Titular/es:

**INNATE PHARMA (100.0%)
117, Avenue de Luminy
13009 Marseille, FR**

72 Inventor/es:

**PERROT, IVAN;
PATUREL, CARINE y
GAUTHIER, LAURENT**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 821 964 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

Bloqueo de CD73

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con compuestos de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos) que inhiben CD73. La invención también se relaciona con células que producen tales compuestos; procedimientos para elaborar tales compuestos, y anticuerpos, fragmentos, variantes y derivados de los mismos; composiciones farmacéuticas que comprenden las mismas; procedimientos de uso de los compuestos para diagnosticar, tratar o prevenir enfermedades, por ejemplo, cáncer.

Antecedentes de la invención

10 La CD73 (ecto-5'-nucleotidasa) es una proteína anclada a glucosilfosfatidilinositol (GPI) de 70 kDa normalmente expresada en células endoteliales y subconjuntos de células hematopoyéticas. CD73, junto con CD39, regula el metabolismo de adenosina trifosfato (ATP). CD39 (NTPDasa-1) convierte ATP en AMP, solamente con pequeñas cantidades de ADP que son liberadas, mientras CD73 cataliza la conversión de AMP a adenosina.

15 Adenosina trifosfato (ATP) y sus metabolitos AMP y adenosina, tienen funciones importantes en el metabolismo celular, señalización y homeostasis inmune. La liberación de trifosfatos de adenosina (ATP) extracelulares en respuesta a la muerte celular o estrés celular actúa para activar respuestas inmunológicas. Sin embargo, su metabolito de adenosina tiene actividad inmunosupresora. La adenosina extracelular se acumula en tejidos cancerosos y constituye un importante mecanismo de escape inmunológico del tumor. Entre otros efectos, la adenosina derivada del tumor inhibe profundamente linfocitos T efectores de infiltración mediante los receptores A2A
20 activadores de adenililciclasa.

La expresión de CD73 se ha indicado en una gama de células tumorales, incluyendo leucemia, cáncer de vejiga, glioma, glioblastoma, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de esófago y
25 cáncer de mama. La expresión de CD73 también se ha asociado con un fenotipo prometastático en melanoma y cáncer de mama. Se ha mostrado que la terapia con un anticuerpo que se une a CD73 murino puede inhibir el crecimiento del tumor de mama y metástasis en ratones (Stagg, et al., (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 104:1547-1552). Sin embargo los anticuerpos en general no reaccionan de forma cruzada con CD73 humano y de ratón, lo que complica el estudio de los anticuerpos y las funciones biológicas de CD73. Se ha mostrado que la eliminación genética de receptores A2A puede inducir el rechazo del tumor dependiente de linfocitos T (Ohta, et al., (2006) Proc Natl Acad Sci USA 103:13132-13137). La atenuación utilizando ARNip o sobreexpresión de CD73 en células
30 tumorales puede modular el crecimiento del tumor y la metástasis (Beavis et al., (2013 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110:14711-716; Stagg et al., (2010), supra; Jin et al., (2010) Cancer Res. 70: 2245-55). Los ratones CD73^{-/-} son protegidos contra tumores espontáneos y transplantados (Stagg et al., (2010) Cancer Res. 71: 2892-2900). En humanos, se ha mostrado que la alta expresión de CD73 es un pronóstico negativo para cáncer de mama triple negativo (Loi et al., (2013 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110: 11091-11096).

35 A pesar del interés prolongado en CD73 como un objetivo terapéutico, la actividad requerida de un agente para dirigirse a CD73 *in vivo* no se ha definido completamente. Aunque CD73 está expresado en células tumorales, también está expresado en diferentes células del sistema inmune, notablemente células T CD4 y CD8, así como células B. Mientras que se ha informado de que algunos anticuerpos se unen con el CD73 humano y aumentan la actividad o proliferación de células T o modificar la migración de células tumorales, queda por aclarar cómo
40 funcionan tales anticuerpos debido a que se ha informado de que la modulación de la célula T y transmisión mediada por CD73 de señales coestimulantes es posible sin dependencia en la actividad ecto-5'nucleotidasa de CD73 (Gutensohn et al., 1995 Cell Immunol. 161:213-217). En consecuencia, los anticuerpos genéricamente referidos como inhibidores CD73 pueden no actuar por medio de modulación de la actividad ecto-5'nucleotidasa de CD73. Se ha informado de que un anticuerpo, 7G2 (isotipo mIgG2, Life Technologies), inhibe CD73 y se ha estudiado el posible uso terapéutico de este anticuerpo (Häusler et al, 2014, Am J Transl Res, 6, 129-139). Sin embargo, este anticuerpo no se une a CD73 de superficie celular en citometría de flujo, o en el mejor de los casos únicamente con muy baja afinidad. Se ha informado de que otro anticuerpo que se une a CD73, clon AD2 (isotipo IgG1 de ratón), ocasiona el agrupamiento de los receptores e internalización pero tiene mínimo efecto en la actividad
45 enzimática. Se ha informado de que incluso otro agente, 1E9 (isotipo IgG3 de ratón, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), promueve la señalización de la célula T independientemente de la inhibición enzimática. Se ha informado de que un mAb adicional, 4G4 (isotipo IgG1, Novus Biologicals), induce el desprendimiento de CD73 de la superficie de la célula T. Se ha informado de que únicamente un agente, aunque no se caracteriza adicionalmente, tiene capacidad parcial de bloqueo enzimático en un ensayo utilizando CD73 recombinante (Sachsenmeier et al. ((2012) J. Biomed. Screening 17:993-998) y se describió después como un anticuerpo que induce la internalización intracelular (Rust et al., (2013) Mol. Cancer 12:11). Adicionalmente, un factor de complicación adicional es que los anticuerpos descritos en la bibliografía en general han sido isotipos murinos que tienen la capacidad de ser unidos por medio de
50 receptores Fcγ, haciendo difícil separar cualquier efecto potencial de bloqueo de los efectos mediados por Fc. Los anticuerpos anti-CD73 que están unidos por medio de receptores Fcγ pueden por ejemplo mediar en el agotamiento (por ejemplo, por medio de ADCC) de células tumorales que expresan CD73 (y posiblemente células inmunosupresoras que expresan CD73), y/o pueden provocar la producción de citocinas pro-inflamatorias en lugar
60

de cualquier efecto bloqueador verdadero. En consecuencia, el modo de acción de anticuerpos permanece elusivo.

5 Por lo tanto, a pesar del interés en el CD73 de objetivo, las características de los anticuerpos anti-CD73 más efectivos quedan por determinar. No se ha informado de anticuerpos que se unan al sitio activo de CD73. La expresión de CD73 en diferentes tipos de células, incluyendo células inmunes y células tumorales, combinadas con el uso de anticuerpos que en realidad no bloquean CD73 o no son bloqueadores puros, crean una configuración compleja para evaluación de la actividad subyacente de anticuerpos. Se necesitan nuevos ensayos y anticuerpos.

Sumario de la invención

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones y cualquier información que no quede dentro de las reivindicaciones se proporciona solo para información.

10 Los inventores han descubierto anticuerpos que se unen a un epítoto presente en CD73 expresado en la superficie de las células, incluyendo células tumorales, y que inhiben la actividad enzimática (ecto-5'-nucleotidasa) de la enzima CD73. Los anticuerpos pueden inhibir la actividad enzimática de la proteína CD73 unida a la membrana expresada en la superficie de las células. De manera ventajosa, estos anticuerpos se pueden utilizar como anticuerpos de bloqueo de CD73 puros, por ejemplo, inhiben la actividad enzimática de la proteína CD73 unida a la
15 membrana expresada en la superficie de células sin unirse sustancialmente a receptores Fcγ y/o sin dirigir sustancialmente ADCC hacia una célula que expresa CD73. Opcionalmente, los anticuerpos conservan un dominio Fc y mantienen la unión a FcRn humano.

Opcionalmente, en contraste con algunos anticuerpos con capacidad de agotar células tumorales que expresan CD73 (lo cual, por ejemplo, puede proporcionar eficacia completa en concentraciones iguales o sustancialmente más
20 bajas que la que proporciona saturación del receptor), los anticuerpos se pueden utilizar de manera ventajosa como bloqueadores puros y administrarse en una cantidad efectiva para neutralizar la actividad enzimática de CD73 durante un periodo de tiempo deseado, por ejemplo, 1 semana, 2 semanas, un mes, hasta la próxima administración sucesiva del anticuerpo anti-CD73.

Opcionalmente los anticuerpos son bloqueadores puros y dirigidos a neutralizar la actividad enzimática de CD73 en
25 el entorno del tumor. Opcionalmente los anticuerpos comprenden un dominio Fc modificado, por ejemplo, para disminuir la sensibilidad a la proteasa (por ejemplo, dirigida a proteasas tales como MMPs en el entorno del tumor) y/o para disminuir la unión a receptores Fcγ humanos (por ejemplo, CD16).

La descripción en un aspecto proporciona ensayos que se pueden utilizar para identificar anticuerpos de bloqueo de
30 función de CD73 verdadero. Como se muestra en la presente, en ensayos de bloqueo de enzima soluble anteriores, se encontró que la gran mayoría de anticuerpos para bloquear como anticuerpos bivalentes son positivos falsos, mientras que los anticuerpos de unión monovalente pueden tener poca o ninguna actividad de bloqueo, posiblemente debido a la incapacidad de bloquear el sitio activo o actuar como inhibidores alostéricos cuando no se unen a cada polipéptido de CD73 dentro del dímero de CD73. Ensayos celulares anteriores no pudieron distinguir entre mecanismos de acción, y los anticuerpos que se ha señalado que disminuyen la actividad de CD73 pueden
35 combinar múltiples mecanismos de acción, por ejemplo, inducción de internalización del receptor, desprendimiento del receptor y/o efectos mediados por el receptor Fcγ. Debido a que la actividad enzimática de CD73 residual puede resultar en suficiente generación de adenosina para mediar en efectos inmunosupresores, altos niveles del bloqueo de enzima mediado por anticuerpo son ventajosos a fin de mediar en un efecto terapéutico.

La descripción en un aspecto proporciona anticuerpos que se unen a un epítoto presente en el polipéptido de CD73
40 humano expresado en la superficie de células, incluyendo pero limitado a células tumorales, y que inhiben la actividad enzimática (ecto-5'-nucleotidasa) de la enzima CD73.

La descripción en un aspecto proporciona anticuerpos que pueden inhibir la actividad enzimática de la proteína CD73 recombinante soluble.

Los anticuerpos de la descripción no ocasionan internalización intracelular de, o más generalmente modulación
45 descendente de, CD73 expresado en la superficie de la célula y/o no depende en ese sentido de su actividad inhibidora de CD73. Los anticuerpos de la descripción pueden proporcionar mayor potencia inhibidora (la capacidad de neutralizar sustancialmente la actividad enzimática de CD73) que los anticuerpos que inhiben CD73 ocasionando la internalización de CD73. Opuesto a los anticuerpos que inhiben CD73 soluble por medio de otros mecanismos (por ejemplo, ocasionando la formación de oligómero del anticuerpo CD73), los anticuerpos de la descripción tienen
50 la capacidad de inhibir la actividad enzimática de CD73 en todas las concentraciones, incluyendo a mayor exceso (por ejemplo, 10 veces) de anticuerpo:enzima. Además, a diferencia de los anticuerpos que se unen a un epítoto en CD73 recombinante que se puedan modificar o ausentar de CD73 de la superficie de la célula (por ejemplo, anticuerpo 7G2) o con afinidad que es muy baja para traducirse en eficacia en células que expresan CD73, los presentes anticuerpos se unen con alta afinidad a un epítoto que está presente y/o permanece intacto en CD73 de
55 la superficie celular, proporcionando a los anticuerpos la capacidad de neutralizar potentemente la actividad enzimática de CD73 celular. Los presentes anticuerpos inhiben la actividad enzimática de CD73 en células pero puede opcionalmente inhibir también la actividad de ecto-5'-nucleotidasa de CD73 recombinante soluble (como se observó en un ensayo libre de célula que utiliza polipéptido de CD73 dímero soluble).

Además, se divulgan en la presente anticuerpos ejemplares (véase, por ejemplo, anticuerpos 11E1, 6E1, 3C12 y 8C7) que se cree que tienen la capacidad de actuar como inhibidores alostéricos de CD73 expresados por medio de células, por ejemplo, inhiben la actividad del polipéptido de CD73 humano sin unir al sitio de actividad enzimática del polipéptido de CD73, y/o que son inhibidores no competitivos de CD73, por ejemplo, inhiben la actividad del polipéptido de CD73 humano sin reducir detectablemente la unión entre el polipéptido de CD73 y un sustrato natural del mismo. Los anticuerpos ejemplares pierden unión a mutantes CD73 que tienen una sustitución en residuos A99, E129, K133, E134 y A135. En vista de la unión de los anticuerpos ejemplares a CD73 ambos en la presencia o ausencia del inhibidor APCP del sitio activo CD73, su epítoto en CD73 parece estar presente en CD73 no solo en la conformación "abierta" cuando no está unido al sustrato sino también en la conformación "cerrada" cuando está unido a un sustrato (por ejemplo, un sustrato natural tal como AMP o un inhibidor u otro compuesto que una el sitio activo tal como un análogo de AMP adenosina 5'-(α,β -metileno)difosfato (APCP)).

Por consiguiente, en un aspecto la descripción proporciona un inhibidor alostérico del polipéptido CD73. En un aspecto, el inhibidor alostérico es un anticuerpo. En un aspecto proporciona un anticuerpo que une el polipéptido de CD73 humano expresado en la superficie de una célula, que incluye pero se limita a células tumorales, y que inhibe la actividad enzimática (ecto-5'-nucleotidasa) del polipéptido de CD73, en donde el anticuerpo es un inhibidor alostérico del polipéptido de CD73.

Además, los anticuerpos ejemplares que aquí se describe que se unen a un epítoto en CD73 que está presente en la misma superficie cuando CD73 está presente como un dímero CD73, por ejemplo, que potencialmente permita que un anticuerpo se una bivalentemente a un dímero CD73, notablemente en la posición "cerrada" donde los sitios de unión están espacialmente más separados. En vista de la unión a CD73 unido a ligando, los anticuerpos aquí descritos pueden ser útiles para unir a CD73 cuando se unen a AMP, por ejemplo, en el entorno del tumor donde ADP ascendente y/o AMP están presentes en niveles significativos previo al tratamiento). El microambiente tumoral puede estar caracterizado por cualquier parámetro apropiado, por ejemplo, altos niveles de ADP (por ejemplo, generados por células muertas), tomado por CD39 en infiltrado estromal y celular (por ejemplo, células TReg) para rendir altos niveles de AMP, así como más generalmente por AMP, adenosina, por presencia o niveles de expresión de CD39 o células que expresan CD39, por la presencia o niveles de la expresión de CD73 o células que expresan CD73, por la presencia o niveles de la expresión del receptor de adenosina o células de expresión del receptor de adenosina. Por lo tanto, las moléculas de CD73 en el entorno tumoral pueden estar en la conformación de unión al sustrato, y la capacidad de unir e inhibir CD73 celular unido al sustrato (por ejemplo, células que expresan CD73 pre-incubadas con sustrato tal como AMP) además a CD73 no unido a sustrato puede proporcionar mayor capacidad para inhibir CD73 *in vivo*. Opcionalmente, los niveles de ADP o AMP (y/o ATP o adenosina) pueden evaluarse en el entorno tumoral previo al tratamiento. Los anticuerpos pueden tener una ventaja particular para el tratamiento en un individuo que tiene niveles significativos (por ejemplo, niveles altos, en comparación con una referencia) ADP, AMP, ATP o adenosina en la muestra tumoral.

Por consiguiente, en un aspecto la descripción proporciona un anticuerpo que une el polipéptido de CD73 humano expresado en la superficie de las células y que inhibe la actividad enzimática (ecto-5'-nucleotidasa) del polipéptido de CD73, en donde el anticuerpo tiene la capacidad de unirse bivalentemente a un dímero de polipéptido de CD73 simple (un dímero de polipéptido de CD73 soluble o un dímero de polipéptido de CD73 expresado por una célula). Opcionalmente, el anticuerpo se une con un primer dominio de unión a antígeno a un primer polipéptido de CD73 dentro del dímero y con un segundo dominio de unión a antígeno a un segundo polipéptido de CD73. En un aspecto el anticuerpo es un inhibidor alostérico del polipéptido de CD73.

Por consiguiente, en otro aspecto la descripción proporciona un anticuerpo que se une al polipéptido de CD73 humano expresado en la superficie de células y que inhibe la actividad enzimática (ecto-5'-nucleotidasa) del polipéptido de CD73, en donde el anticuerpo tiene la capacidad de unión del polipéptido de CD73 en la conformación de unión a sustrato.

A pesar de los esfuerzos en la bibliografía para seleccionar los anticuerpos de inhibición de CD73, los anticuerpos existentes no neutralizan el CD73 celular, o en el mejor de los casos la modulación descendente de CD73. Los inventores aquí proporcionan una explicación de por qué estos anticuerpos ya no inhiben CD73 en las células: los anticuerpos que tienen la capacidad de unir los homodímeros de CD73 en manera bivalente y que inhiben el CD73 recombinante en solución puede ocasionar oligomerización de los polipéptidos de CD73 y anticuerpos anti-CD73 en complejos (por ejemplo, estructuras que contienen más de dos o más anticuerpos y dos o más dímeros de CD73), presentando dificultades para distinguir un inhibidor real de un positivo falso.

Mediante el diseño de procedimientos de ensayo mejorados conducidos en excesos más altos de anticuerpo:enzima, aquí presentamos anticuerpos con unión bivalente a CD73 que no tienen dependencia tras la oligomerización. En particular, los anticuerpos anti-CD73 que se proporcionan en la presente tienen la capacidad de inhibir la actividad enzimática del polipéptido de CD73 dímérico humano soluble cuando los anticuerpos están en una configuración/ajuste donde no tienen capacidad de formar oligómeros, por ejemplo, cuando se proporcionan en un exceso molar sustancial (por ejemplo, al menos 10 veces, 20 veces, 100 veces, etc.) a los dímeros del polipéptido de CD73. Los anticuerpos que funcionan ocasionando oligomerización no consiguen inhibir CD73 cuando los anticuerpos proporcionados en un exceso molar sustancial a los dímeros de polipéptido de CD73. Los anticuerpos además se unen a un epítoto en CD73 que se mantiene cuando CD73 es expresado en la superficie celular.

Mediante el uso de este ensayo, también se identifica que los anticuerpos se unen bivalentemente a un dímero de CD73 simple; tales anticuerpos pueden haber mejorado la unión a CD73 y la actividad de bloqueo de CD73 *in vitro* e *in vivo* en células que expresan CD73. Los anticuerpos identificados por medio de estos procedimientos después fueron probados en ensayos de actividad enzimática celular utilizando anticuerpo purificado, y se encontró que neutralizan la actividad enzimática del CD73 celular. Los anticuerpos que inhiben CD73 por medio de inducción de internalización o que pierden unión significativa a CD73 celular fueron menos potentes y no tuvieron la capacidad de neutralizar la actividad enzimática, proporcionando en el mejor de los casos únicamente inhibición parcial de la actividad enzimática de CD73 en las células.

El epítipo en CD73 unido por estos anticuerpos está presente en polipéptidos de CD73 como se expresa por medio de una gama de células, por ejemplo, células cancerosas, células T de CD4, células T de CD8, células B, células transfectadas, y se une con alta afinidad como se determinó por medio de citometría de flujo. Por ejemplo, un anticuerpo puede estar caracterizado por una CE₅₀, como se determinó por medio de citometría de flujo, de no más de 5 µg/ml, opcionalmente no más de 2 µg/ml, no más de 1 µg/ml, no más de 0,5 µg/ml, no más de 0,1 µg/ml o no más de 0,05 µg/ml, para unión a células que expresan en su superficie un polipéptido de CD73. En un aspecto las células son células que están hechas para expresar CD73 en su superficie. En un aspecto las células son células que expresan endógenamente CD73 en su superficie, por ejemplo, células cancerosas, células leucémicas, células de cáncer de vejiga, células de glioma, células de glioblastoma, células de cáncer de ovario, células de melanoma, células de cáncer de próstata, células de cáncer de tiroides, células de cáncer de esófago o células de cáncer de mama.

En un aspecto, los anticuerpos neutralizantes de CD73 pueden caracterizarse por tener la capacidad de ocasionar una disminución en la actividad 5'-ectonucleotidasa de las células de CD73 por al menos 60%, 75% u 80%. En un aspecto, los anticuerpos neutralizantes de CD73 se pueden caracterizar por una CE₅₀ para inhibición de la actividad 5'-ectonucleotidasa de CD73 expresada por una célula de no más de 1 µg/ml, opcionalmente no más de 0,5 µg/ml, opcionalmente no más de 0,2 µg/ml.

Opcionalmente, la inhibición de la actividad 5'-ectonucleotidasa de CD73 expresado por una célula se determina evaluando la neutralización de la actividad 5'-ectonucleotidasa en células MDA-MB-231 por medio de la cuantificación de hidrólisis de AMP a adenosina (por ejemplo, ver el Ejemplo 5).

El epítipo en CD73 unido por medio de los anticuerpos neutralizantes aquí descritos no resulta en la modulación descendente de la expresión de CD73 en células (y, por ejemplo, no ocasiona concentración e internalización del complejo del anticuerpo CD73), incluyendo cuando anticuerpos de longitud completa se utilizan de manera que se unen a CD73 en manera bivalente. El anticuerpo anti-CD73 por lo tanto permanece unido, junto con CD73, en la superficie celular. En vista de la amplia expresión de tejido de CD73, anticuerpos que no desencadenan modulación descendente de CD73 y/o internalización puede proporcionar propiedades farmacológicas mejoradas y mayores cantidades de anticuerpo en el microambiente del tumor.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo aislado que específicamente se une al CD73 humano (por ejemplo, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 1 o 2) y el cual neutraliza la actividad 5'-ectonucleotidasa de un polipéptido de CD73 humano homodimérico en solución. En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que une e inhibe la actividad enzimática de un polipéptido de CD73 humano soluble, notablemente un anticuerpo que neutraliza el catabolismo mediado por CD73 de AMP a adenosina. En un aspecto, el anticuerpo se une a CD73 en manera bivalente. En un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo no reducido, por ejemplo, un anticuerpo silente FC. En un aspecto, el anticuerpo neutraliza CD73 en solución sin dependencia de la inducción de oligómeros del polipéptido de CD73: anticuerpo anti-CD73.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo aislado que específicamente se une al CD73 humano en la superficie de una célula que tiene la capacidad de neutralizar la actividad 5'-ectonucleotidasa de un polipéptido de CD73 humano soluble. En un aspecto, el anticuerpo no induce la oligomerización del CD73 soluble.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo aislado que específicamente se une al CD73 humano en la superficie de una célula y que tiene la capacidad de neutralizar la actividad 5'-ectonucleotidasa de CD73 celular (CD73 expresado por células). En un aspecto, se proporciona un anticuerpo aislado que específicamente une y neutraliza la actividad 5'-ectonucleotidasa de un CD73 humano en la superficie de una célula y que no está internalizado en células que expresan CD73 tras unirse a CD73. El anticuerpo no ocasiona multimerización y subsecuente internalización de CD73. En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que une y tiene la capacidad de inhibir la actividad enzimática de un polipéptido de CD73 humano recombinante en solución, en donde tal anticuerpo no está internalizado en células que expresan CD73. En un aspecto, el anticuerpo no internalizante se une a CD73 en manera bivalente. En un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo no reducido, por ejemplo, un anticuerpo silente Fc. El anticuerpo tiene la capacidad de neutralizar la actividad 5'-ectonucleotidasa de un polipéptido de CD73 humano dimérico en solución, además sin depender de la inducción de los oligómeros de polipéptidos CD73: anticuerpos anti-CD73.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo que se une específicamente de manera bivalente a polipéptidos CD73 humanos e inhibe la actividad enzimática del CD73 humano celular (y opcionalmente además CD73 humano soluble recombinante), en donde dicho anticuerpo no está internalizado en células que expresan CD73. De preferencia, el

anticuerpo carece sustancialmente de unión al receptor Fcγ (por ejemplo, por medio de su dominio Fc).

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo aislado que específicamente se une a CD73 humano en la superficie de la célula pre-incubada con AMP, y que tiene la capacidad de neutralizar la actividad 5'-ectonucleotidasa de la misma. Opcionalmente, neutralizar la actividad 5'-ectonucleotidasa se determina evaluando la neutralización de la actividad 5'-ectonucleotidasa en células MDA-MB-231 por medio de la cuantificación de hidrólisis de AMP a adenosina (por ejemplo, ver Ejemplo 5).

En cualquiera de los aspectos presentes, el anticuerpo puede estar caracterizado por tener la capacidad de unirse a un polipéptido de CD73 humano cuyo sitio activo está ocupado por un sustrato, por ejemplo, AMP, APCP. En cualquiera de los aspectos presentes, el anticuerpo puede estar caracterizado por tener la capacidad de inhibir la actividad 5'-ectonucleotidasa de una célula que expresa CD73 cuando tal célula ha sido pre-incubada con AMP. La invención también resulta, *inter alia*, del descubrimiento de un epítipo en CD73 humano que permita la dirección altamente efectiva para neutralizar la actividad de CD73 en células e individuos que padecen cáncer. Los anticuerpos compiten entre sí para la unión a CD73, (pero no compitieron con anticuerpos que bloquean CD73 soluble de referencia) que sugieren una región en CD73 lo cual es particularmente conveniente para la inhibición de la actividad enzimática de CD73 y que permanece presente en el polipéptido de CD73 cuando es expresado en la superficie celular. De manera ventajosa, el epítipo está presente en cada CD73 de primate no humano y humano, como se expresó en la superficie celular, así como en CD73 como se expresó por medio de las células de cáncer.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-CD73 que se une un determinante antigénico común presente en ambos, el CD73 soluble y CD73 expresados en la superficie celular.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-CD73 que se une a un determinante antigénico común presente en CD73 cuando es de conformación "abierta" (cuando el sitio activo de CD73 no está ocupado por/unido a un sustrato, por ejemplo, AMP, APCP) y CD73 "cerrado" cuando es de conformación "cerrada" (cuando el sitio activo de CD73 está ocupado por/unido a un sustrato, por ejemplo, AMP, APCP).

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-CD73 que se une a un determinante antigénico dentro de cada cadena de polipéptido de CD73 dentro de un dímero CD73, por ejemplo, en donde los determinantes antigénicos están presentes en una superficie común del dímero CD73.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-CD73 que se une a un epítipo en CD73 que comprende uno, dos, tres, cuatro o cinco de los residuos seleccionados del grupo que consiste en A99, E129, K133, E134, y A135 (con referencia a la SEQ ID NO: 1).

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-CD73 que tiene unión reducida a un polipéptido de CD73 que tiene una mutación en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: A99, E129, K133, E134 y A135 (con referencia a la SEQ ID NO: 1); opcionalmente, el polipéptido de CD73 mutante tiene las mutaciones: A99S, E129A, K133A, E134N y A135S.

Se proporciona en un aspecto un anticuerpo anti-CD73 que compite para unión a un epítipo en el CD73 unido por 11E1, 8C7, 3C12 y/o 6E1, (por ejemplo, que compite para unión a un epítipo en un polipéptido de CD73 con un anticuerpo que tiene CDR de cadena ligera y pesada o regiones variables de cualquiera de 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1).

En un aspecto de cualquiera de los presentes aspectos, se proporciona un compuesto de unión a antígeno que se une al mismo epítipo y/o compite para unión a un polipéptido de CD73 con anticuerpos monoclonales 11E1, 8C7, 3C12 y/o 6E1 (por ejemplo, que compite para unión a un polipéptido de CD73 con un anticuerpo que tiene los CDR de cadena ligera y pesada o regiones variables de cualquiera de 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1). En un aspecto, se proporciona un compuesto de unión a antígeno que se une al mismo epítipo y/o compite para unión a un polipéptido de CD73 con un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:

- (a) un anticuerpo que tiene respectivamente una región VH y VL de las SEQ ID NOS: 3 y 4 (11E1);
- (b) un anticuerpo que tiene respectivamente una región VH y VL de las SEQ ID NOS: 21 y 22 (6e1)
- (c) un anticuerpo que tiene respectivamente una región VH y VL de las SEQ ID NOS: 28 y 29 (8C7); y
- (d) un anticuerpo que tiene respectivamente una región VH y VL de las SEQ ID NOS: 36 y 37 (3C12).

En un aspecto, un anticuerpo anti-CD73 se une a un epítipo que comprende uno, dos o tres residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos en CD73 unido por 11E1, 6E1, 3C12 u 8C7. En un aspecto, los residuos de aminoácidos en CD73 se seleccionan del grupo que consiste en los residuos listados en la Tabla 1.

En un aspecto de cualquiera de los presentes aspectos, el anticuerpo puede tener una cadena ligera y/o pesada que tiene uno, dos o tres CDR de la respectiva cadena ligera y/o pesada de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo 11E1, 6E1, 3C12 y 8C7.

En cualquiera de los presentes aspectos, los anticuerpos anti-CD73 se pueden caracterizar por la unión a polipéptidos CD73 humanos expresados en la superficie de una célula (por ejemplo, una célula tumoral, una célula hecha para expresar CD73, por ejemplo, una línea de célula tumoral MDA-MB-231, o una célula huésped

recombinante hecha para expresar CD73, como se muestra en los Ejemplos), y opcionalmente además en donde el anticuerpo se une con alta afinidad como se determinó por citometría de flujo. Por ejemplo, un anticuerpo puede estar caracterizado por una CE_{50} , como se determinó por medio de citometría de flujo, de no más de 5 $\mu\text{g/ml}$, opcionalmente no más de 1 $\mu\text{g/ml}$, no más de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, no más de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ o no más de 0,05 $\mu\text{g/ml}$, para unión a células que expresan en su superficie un polipéptido de CD73, por ejemplo, células tumorales que expresan CD73, células que expresan en su superficie un polipéptido de CD73, linfocitos que expresan CD73, etc. Opcionalmente, un compuesto de unión a antígeno tiene una CE_{50} de no más de 1 $\mu\text{g/ml}$, opcionalmente no más de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, no más de 0,1 $\mu\text{g/ml}$, o no más de 0,05 $\mu\text{g/ml}$ para unión a (i) células que expresan en su superficie CD73 humano (por ejemplo, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) y/o (ii) células que expresan en su superficie CD73 de primate no humano (por ejemplo, un CD73 de mono cynomolgus).

En un aspecto de cualquiera de los presentes aspectos, el anticuerpo anti-CD73 es un anticuerpo tetramérico que comprende dos cadenas ligeras y dos pesadas, las cadenas pesadas que comprenden regiones Fc del isotipo humano y las cuales carecen sustancialmente de unión a receptores Fcy humanos (por ejemplo, CD16A, CD16B, CD32A, CD32B y/o CD64).

En un aspecto, los anticuerpos son administrados a un individuo que tiene un cáncer en una cantidad y frecuencia suficiente para neutralizar la actividad de CD73 en el microambiente tumoral. En un aspecto, los anticuerpos son administrados en una cantidad y frecuencia suficientes para disminuir la generación y/o concentración de adenosina en el microambiente tumoral. En un aspecto, los anticuerpos son administrados en una cantidad y frecuencia suficientes para aumentar la generación y/o concentración de ATP en el microambiente tumoral. En un aspecto, los anticuerpos son administrados en una cantidad y frecuencia suficiente para neutralizar la actividad de CD73 expresado por medio de células tumorales. En una modalidad, los anticuerpos son administrados en una cantidad y frecuencia suficiente para neutralizar la actividad de CD73 expresada por las células T CD4, células T CD8 y/o células B.

Los anticuerpos serán útiles para inhibir catabolismo mediado por CD73 de AMP a adenosina, por ejemplo, disminuyendo la concentración de adenosina en el microambiente tumoral. Estos anticuerpos serán por lo tanto útiles en la inversión del efecto inmunosupresor de CD73 y/o adenosina en células T, células B y otras células que expresan receptores de adenosina, por ejemplo, en el tratamiento de cáncer. En un aspecto, el anticuerpo anti-CD73 neutraliza la inhibición mediada por adenosina de proliferación, producción de citocina, citotoxicidad y/o actividad NF κ B en células T.

Debido a que el catabolismo mediado por CD73 de AMP a adenosina es irreversible, mientras que el catabolismo de ATP a ADP y ADP a AMP por CD39 es reversible (por cinasa NDK y adenilato cinasa, respectivamente), los anticuerpos que bloquean el catabolismo mediado por CD73 irreversible aumentará la reserva de AMP, siendo así de uso en el aumento de concentraciones de ADP y ATP, por ejemplo, en el microambiente tumoral. Los anticuerpos pueden ser útiles para aumentar la formación de ADP a partir de AMP y la formación de ATP a partir de ADP. Debido a que ATP tiene funciones de activación inmune, los anticuerpos anti-CD73 pueden ser útiles en la activación de células T, por ejemplo en el tratamiento de cáncer.

Los anticuerpos serán útiles en la inhibición de la producción, cantidades y/o concentraciones de adenosina en microambiente tumoral.

Los anticuerpos que neutralizan la actividad de un dímero de polipéptido de CD73 humano soluble pueden además neutralizar CD73 en cualquier otro contexto adecuado, por ejemplo, en una célula indicadora hecha para expresar CD73, en una célula T, etc.

Se proporciona un procedimiento para tratar a un individuo, comprendiendo el procedimiento administrar a un individuo (por ejemplo, un individuo que tiene una enfermedad, un tumor, etc.) una cantidad terapéuticamente activa de cualquiera de los compuestos de unión a antígenos anti-CD73 descritos en la presente. En un aspecto se proporciona un procedimiento para tratar a un individuo, procedimiento que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en: administrar a un individuo (por ejemplo, un individuo que tiene una enfermedad, un tumor, etc.) una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto de unión a antígeno de la descripción que inhibe un polipéptido de CD73. En una modalidad, el anticuerpo inhibe un polipéptido de CD73 en un ensayo celular y opcionalmente además no celular, por ejemplo, un CD73 recombinante, un CD73 soluble. De preferencia el compuesto es un anticuerpo no reducido (un anticuerpo que no reduce células a las cuales se une, por ejemplo, un anticuerpo silente Fc). Opcionalmente, el compuesto se une a CD73 de manera bivalente. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humano o humanizado. Opcionalmente, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada de isotipo IgG4.

En un aspecto se proporciona un procedimiento para disminuir la adenosina producida por una célula que expresa CD73 (por ejemplo, una célula inmune y/o una célula tumoral en un individuo), o un procedimiento para la neutralización de la actividad enzimática de CD73 celular, procedimiento que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en: poner en contacto la célula que expresa CD73 con un compuesto de unión a antígeno de la descripción que inhibe CD73. En un aspecto, el paso de poner en contacto la célula que expresa CD73 con un compuesto de unión a antígeno de la descripción comprende administrar a un individuo una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto de unión a antígeno que inhibe un CD73. En un aspecto el individuo tiene

un cáncer.

En un aspecto se proporciona un procedimiento para disminuir la adenosina presente en el entorno tumoral (por ejemplo, en un individuo), procedimiento que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en: administrar a un individuo una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto de unión a antígeno que inhibe un polipéptido de CD73. En un aspecto el individuo tiene un cáncer.

En un aspecto, la cantidad activa de un compuesto de unión a antígeno que inhibe un polipéptido de CD73 es una cantidad efectiva para lograr y/o mantener (por ejemplo, hasta la subsecuente administración del compuesto de unión a antígeno) una concentración en sangre de al menos la CE_{50} , opcionalmente la CE_{70} , opcionalmente sustancialmente la CE_{100} , para inhibir el catabolismo mediado por CD73 de AMP a adenosina en un individuo. En un aspecto, la cantidad activa de un compuesto de unión a antígeno que inhibe un polipéptido de CD73 es una cantidad efectiva para lograr la CE_{50} , opcionalmente la CE_{70} , opcionalmente de manera sustancial la CE_{100} , para inhibir el catabolismo mediado por CD73 de AMP a adenosina en un tejido extravascular de un individuo. En un aspecto, la cantidad activa de un compuesto de unión a antígeno que inhibe un polipéptido de CD73 es una cantidad efectiva para lograr la CE_{50} , opcionalmente, la CE_{70} , opcionalmente de manera sustancial la CE_{100} , para inhibir el catabolismo mediado por CD73 de AMP a adenosina en un individuo. En una modalidad, la cantidad activa de un compuesto de unión a antígeno que inhibe un polipéptido de CD73 está entre 1 y 20 mg/kg del peso corporal. En una modalidad, la cantidad activa es administrada a un individuo semanalmente, cada dos semanas, mensualmente o incluso cada dos meses.

Opcionalmente el individuo es un humano que tiene o que es susceptible de tener un cáncer.

Los anticuerpos están opcionalmente caracterizados por la afinidad de unión (K_D) para un polipéptido de CD73 humano de menos de (mejor que) 10^{-9} M, de preferencia menos de 10^{-10} M, o preferentemente menos de 10^{-11} M, y/o por la unión de CD73 humano con CE_{50} más baja que (mejor unión que) 1 μ g/ml, de preferencia en donde el anticuerpo tiene una CE_{50} de no más de 0,5 μ g/ml, opcionalmente no más de 0,2 μ g/ml, opcionalmente no más de 0,1 μ g/ml, para la unión a células (por ejemplo, células tumorales) que expresan CD73 humano en la superficie celular.

Los anticuerpos son opcionalmente anticuerpos quiméricos, humanos o humanizados.

Los anticuerpos están opcionalmente caracterizados por una CE_{50} para la neutralización de la actividad enzimática de CD73 en las células que expresan CD73 de menos de (mejor que) 1 μ g/ml, opcionalmente menos de 0,5 μ g/ml.

En un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo que mantiene la especificidad de unión y capacidad para neutralizar la actividad enzimática de CD73. En una modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo que comprende un dominio Fc de isotipo IgG4, o un anticuerpo que comprende un dominio Fc de cualquier isotipo IgG humano (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) modificado para reducir la unión entre el dominio Fc y un receptor Fc γ (por ejemplo, CD16). De preferencia, el compuesto de unión a antígeno no comprende un dominio Fc con capacidad de inducir citotoxicidad celular mediada por anticuerpo (ADCC) y/o CDC; opcionalmente el compuesto de unión a antígeno no comprende un dominio Fc con capacidad de sustancialmente unirse a un polipéptido Fc γ R11A (CD16) (por ejemplo, comprende un dominio Fc sin capacidad de sustancialmente unirse a un polipéptido Fc γ R11A (CD16); carece de un dominio Fc (por ejemplo, un dominio CH2 y/o CH3; comprende un dominio Fc de isotipo IgG4). En un aspecto, el dominio Fc (por ejemplo, de isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humano) comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, sustitución) en comparación con un dominio Fc tipo silvestre, en donde la sustitución reduce la capacidad del dominio Fc (o anticuerpos que lo contienen) para unirse a un receptor Fc γ (por ejemplo, CD16) y/o para unirse al complemento. Opcionalmente, si un dominio Fc de isotipo IgG4 está presente, tal dominio Fc puede comprender una mutación de estabilización para disminuir la formación de medios anticuerpos tal como una mutación en la articulación, por ejemplo, una mutación S241P (S228P). Opcionalmente el compuesto de unión a antígeno consiste en o comprende un Fab, Fab', Fab'-SH, F (ab')₂, Fv, un diacuerpo, un fragmento de anticuerpo de cadena simple, o un anticuerpo multiespecífico que comprende múltiples diferentes fragmentos de anticuerpo. En un aspecto, el compuesto de unión a antígeno no está ligado a una fracción tóxica.

Se proporcionan también ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo humanizado o humano o fragmento de anticuerpo que tiene cualquiera de las propiedades anteriores, un vector que comprende tal ácido nucleico, una célula que comprende tal vector, y un procedimiento para producir un anticuerpo anti-CD73 humano, que comprende cultivar tal célula bajo condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo anti-CD73. La descripción también se refiere a composiciones, tales como composiciones farmacéuticamente aceptables y kits, que comprenden tales proteínas, ácidos nucleicos, vectores y/o células y típicamente uno o más ingredientes adicionales que pueden ser ingredientes activos o ingredientes inactivos que promueven la formulación, liberación, estabilidad, u otras características de la composición (por ejemplo, varios portadores). La descripción además se refiere a varios procedimientos nuevos y útiles para hacer y utilizar tales anticuerpos, ácidos nucleicos, vectores, células, organismos y/o composiciones, tal como en la modulación de actividades biológicas mediadas por CD73, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades relacionadas con las mismas, notablemente cánceres.

La descripción también proporciona procedimientos para producir o probar un anticuerpo el cual se une a y

neutraliza la actividad enzimática de CD73, comprendiendo tal procedimiento los pasos de:

- (a) proporcionar una pluralidad de anticuerpos que se unen a un polipéptido de CD73,
 (b) poner en contacto a cada uno de tales anticuerpos (por ejemplo, separadamente uno del otro) con un polipéptido de CD73 soluble (por ejemplo, en un ensayo libre de células, por ejemplo, en presencia de AMP), y
 5 (c) seleccionar un anticuerpo (por ejemplo, los del paso (b)) que neutraliza la actividad enzimática de dicho polipéptido de CD73 soluble. En un aspecto, los anticuerpos tienen la capacidad de unirse a CD73 en manera bivalente, por ejemplo, los anticuerpos son anticuerpos IgG de longitud completa. Opcionalmente, el paso (b) comprende poner en contacto cada uno de dichos anticuerpos con un polipéptido de CD73 soluble en un ensayo
 10 libre de células, en donde los anticuerpos se proporcionan en un exceso molar de anticuerpo (en comparación con el polipéptido de CD73). Opcionalmente, el polipéptido de CD73 es un dímero CD73 soluble. De manera opcional el paso (c) comprende seleccionar un anticuerpo que neutraliza la actividad enzimática de dicho polipéptido de CD73 soluble cuando los anticuerpos se proporcionan en un exceso molar de anticuerpo a dímeros CD73 (por ejemplo, en al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces o 100 veces de exceso molar).

En un aspecto, el paso de proporcionar una pluralidad de anticuerpos comprende inmunizar a un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido de CD73.

La descripción también proporciona un procedimiento para potenciar la actividad de linfocitos (por ejemplo, células T) en un sujeto que lo necesite, o para restablecer la actividad de linfocitos (por ejemplo, células T), o un procedimiento para mitigar la inhibición mediada por adenosina de linfocitos (por ejemplo, células T), cuyo procedimiento comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones anteriores.
 20 En un aspecto, el sujeto es un paciente que padece cáncer. Por ejemplo, el paciente puede estar padeciendo un tumor sólido, por ejemplo, cáncer colorrectal, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de mama o melanoma maligno. De manera alternativa, el paciente puede estar padeciendo un cáncer hematopoyético, por ejemplo, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, o linfoma que no es de Hodgkin.

La descripción también proporciona un procedimiento para el tratamiento de enfermedad en un individuo, comprendiendo el tratamiento administrar al individuo un anticuerpo anti-CD73 que neutraliza la actividad enzimática de CD73 para al menos un ciclo de administración en el cual el anticuerpo anti-CD73 se administra al menos una vez, opcionalmente al menos dos veces, en una cantidad efectiva para lograr, y/o para mantener entre dos administraciones sucesivas del anticuerpo anti-CD73, una concentración en sangre (suero) o un tejido extravascular (por ejemplo, entorno tumoral) que corresponde al menos a la CE_{50} (por ejemplo, una CE_{50} entre 0,01 y 0,5 $\mu\text{g/ml}$),
 30 opcionalmente la CE_{70} u opcionalmente la CE_{100} , para neutralización de la actividad enzimática de CD73 (por ejemplo, una CE_{100} entre 0,05 y 1 $\mu\text{g/ml}$, entre 0,1 y 1 $\mu\text{g/ml}$). El anticuerpo puede administrarse, por ejemplo, en una cantidad para lograr y/o mantener una concentración en circulación o en un tejido extravascular (por ejemplo, entorno tumoral) de al menos aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ o 2 $\mu\text{g/ml}$. Por ejemplo, para lograr una concentración en un tejido extravascular de entre 0,05 y 1 $\mu\text{g/ml}$, o entre 0,1 y 1 $\mu\text{g/ml}$, el anticuerpo anti-CD73 se administra en cantidades efectivas para lograr una concentración en circulación del anticuerpo anti-CD73 de entre 0,5 y 10 $\mu\text{g/ml}$, o entre 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$. Opcionalmente, el anticuerpo anti-CD73 se administra al menos dos veces y en cantidades efectivas para mantener la concentración del anticuerpo anti-CD73 al menos la concentración antes mencionada durante al menos 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, entre dos administraciones sucesivas del anticuerpo anti-CD73 y/o a lo largo del ciclo de administración.

La descripción también proporciona un procedimiento para el tratamiento de enfermedad en un individuo, comprendiendo el tratamiento administrar al individuo un anticuerpo anti-CD73 que neutraliza la actividad enzimática de CD73 para al menos un ciclo de administración en el cual el anticuerpo anti-CD73 se administra al menos una vez, opcionalmente al menos dos veces, en una cantidad efectiva para lograr, y/o para mantener entre dos administraciones sucesivas del anticuerpo anti-CD73, una concentración en sangre o tejido del anticuerpo anti-CD73 de al menos 1 $\mu\text{g/ml}$, opcionalmente al menos 10 $\mu\text{g/ml}$, opcionalmente entre 1 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Opcionalmente, el anticuerpo anti-CD73 se administra al menos dos veces y en cantidades efectivas para mantener una concentración continua en sangre o tejido del anticuerpo anti-CD73 de al menos 1 $\mu\text{g/ml}$, opcionalmente al menos 10 $\mu\text{g/ml}$, opcionalmente entre 1 y 100 $\mu\text{g/ml}$, durante al menos 1 semana, 2 semana, 3 semanas, 4 semanas, entre dos administraciones sucesivas del anticuerpo anti-CD73 y/o a lo largo del ciclo de administración.

Estos aspectos están descritos de manera más completa en, y aspectos adicionales, características y ventajas serán aparentes a partir de la descripción que aquí se proporciona.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la capacidad de los anticuerpos anti-CD73 para bloquear la actividad enzimática de CD73, evaluada por medio de la medición de capacidad de mAbs de prueba para afectar a la capacidad de CD73 para escindir AMP en adenosina + fosfato inorgánico que restablece la actividad de luciferasa y emisión de luz. Los resultados se expresan como actividad de enzima residual (%). Los anticuerpos 11E1, 8C7, 6E1 y 3C12 (no mostrado) ocasionan una fuerte disminución en la actividad enzimática, y continúa para reducir la actividad enzimática residual incluso cuando se proporciona en exceso, una configuración independiente de complejo inmune.

La figura 2 muestra los resultados de la valoración de anticuerpos por medio de ELISA en el polipéptido de CD73

humano recombinante soluble.

La figura 3 muestra los resultados de la valoración de anticuerpos por medio de citometría de flujo en líneas celulares huésped recombinantes que expresan CD73 de ratón, cynomolgus y humano. 11E1, 8C7, 3C12 y 6E1, pero no 7G2 o 1E9, se unen a células huésped recombinantes que expresan CD73 humano y cynomolgus (pero no de ratón) con excelente afinidad.

La figura 4 muestra los resultados de valoración de anticuerpos por medio de citometría de flujo en células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 humano que expresa de manera endógena CD73. 11E1, 8C7, 3C12 y 6E1, pero no 7G2 o 1E9, se unen a células MDA-MB-231 con excelente afinidad.

La figura 5 muestra anticuerpos 11E1, 8C7, 3C12 y 6E1 neutralizan la actividad enzimática de CD73 celular.

La figura 6 muestra la capacidad de varios anticuerpos para ocasionar la modulación descendente de la expresión de CD73 en las células. Cada uno de AD2, 7G2 y 1E9 ocasionó la modulación descendente de CD73, sin embargo ninguno de los anticuerpos 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1 ocasionó una disminución en la superficie celular de CD73.

La figura 7 muestra la valoración de anticuerpos por medio de citometría de flujo en célula que expresa mutantes de CD73 humano. El anticuerpo 3C12 se une al CD73 del tipo silvestre y mutante 2 pero no a mutante 3, mientras el anticuerpo AD2 se une a CD73 tipo silvestre y mutante 3, pero no a mutante 2.

La figura 8A muestra la estructura molecular del dímero CD73, con aminoácidos mutados en mutante 2 (pérdida de unión por medio de AD2) indicado (círculos blancos) en ambas configuraciones "abierta" o "cerrada". La figura 8B muestra la estructura molecular del dímero CD73, con aminoácidos mutados en mutante 3 (pérdida de unión por 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1) indicado en ambas configuraciones "abierta" o "cerrada". El sitio activo está indicado por medio del cuadro (líneas punteadas).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Como se utiliza en la descripción, "un" o "uno" puede significar uno o más. Como se utiliza en la reivindicación o las reivindicaciones, cuando se utiliza en conjunto con la palabra "que comprende", las palabras "un" o "uno" pueden significar uno o más que uno. Conforme aquí se utiliza "otro" puede significar al menos un segundo o más.

Donde se utiliza "que comprende" esto puede reemplazarse opcionalmente por "que consiste esencialmente en" o por "que consiste en".

El CD73 humano, también conocido como ecto-5'-nucleotidasa y como 5-prima-ribonucleótido fosfohidrolasa, EC 3.1.3.5, codificado por el gen *NT5E*, muestra actividades 5'-nucleotidasa, notablemente AMP-, NAD- y NMN-nucleosidasa. El CD73 cataliza la conversión en el pH neutro de 5-prima mononucleótidos purina a nucleósidos, siendo el sustrato preferido AMP. La enzima consiste de un dímero de 2 subunidades idénticas de 70 kD unidas por un vínculo de glicosilfosfatidilinositol a la superficie externa de la membrana de plasma. La secuencia de aminoácidos de la preproteína CD73 humana (monómero), incluyendo una secuencia de señal en aminoácidos 1-26, se muestra en Genbank bajo el número de acceso NP_002517, y como sigue:

```
MCPRAARAPA TLLLALGAVL WPAAGAWELT ILHTNDVHSR LEQTSSESSK CVNASRCMGG
VARLFTKVQQ IRRRAEPNVL LDAGDQYQGT IWFTVYKGAE VAHFMNALRY DAMALGNHEF
DNGVEGLIEP LLKEAKFPIL SANIKAKGPL ASQISGLYLP YKVLPVGDEV VGIVGYTSKE
TPFLSNPGTN LVFEDEITAL QPEVDKCLKL NVNKIIALGH SGFEMDKLIA QKVRGVDVVV
GGHSNTFLYT GNPPSKEVPA GKYPFIVTSD DGRKVPVVQA YAFGKYLGYL KIEFDERGNV
ISSHGPNPILL NSSIPEDPSI KADINKWRIK LDNYSTQELG KTIVYLDGSS QSCRFRECNM
GNLICDAMIN NNLRHTDEMF WNHVSMCILN GGGIRSPIDE RNNGTITWEN LAAVLPFGGT
FDLVQLKGST LKKAFFHSVH RYQSTGEFL QVGGIHHVVD LSRKPGDRVV KLDVLCTKCR
VPSYDPLKMD EVYKVIPLNF LANGGDGFQM IKDELLRHDS GDQDINVVST YISKMKVIYP
AVEGRIKFST GSHCHGSFSL IFLSLWAVIF VLYQ (SEQ ID NO: 1)
```

En el presente contexto, "neutralizar la actividad enzimática de CD73", se refiere a un proceso en el cual se inhibe la actividad 5'-nucleotidasa (5'-ectonucleotidasa) de CD73. Esto comprende, notablemente, la inhibición de la generación mediada por CD73 de adenosina, es decir la inhibición de catabolismo mediado por CD73 de AMP a adenosina. Esto se puede medir, por ejemplo, en un ensayo libre de células que mide la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la conversión de AMP a adenosina, ya sea directa o indirectamente. En un aspecto, una preparación de anticuerpo ocasiona al menos una disminución del 50% en la conversión de AMP a adenosina, al menos una disminución del 70% en la conversión de AMP a adenosina, o al menos una disminución del 80% en la conversión de AMP a adenosina, haciendo referencia, por ejemplo, a los ensayos aquí descritos.

Siempre que dentro de esta especificación completa se mencione "tratamiento de cáncer" o similar con referencia al agente de unión anti-CD73 (por ejemplo, anticuerpo), significa: (a) procedimiento de tratamiento de cáncer, comprendiendo dicho procedimiento el paso de administrar (para al menos un tratamiento) un agente de unión anti-CD73, (de preferencia en un material portador farmacéuticamente aceptable) a un individuo, un mamífero,

especialmente un humano, que necesita tal tratamiento, en una dosis que permita el tratamiento del cáncer, (una cantidad terapéuticamente efectiva), de preferencia en una dosis (cantidad) como aquí se especifica; (b) el uso de un agente de unión a anti-CD73 para el tratamiento de cáncer, o un agente de unión anti-CD73, para su uso en dicho tratamiento (especialmente en un humano); (c) el uso de un agente de unión anti-CD73 para la elaboración de una preparación farmacéutica para el tratamiento del cáncer, un procedimiento para utilizar un agente de unión anti-CD73 para la elaboración de una preparación farmacéutica para el tratamiento de cáncer, que comprende mezclar un agente de unión anti-CD73 con un portador farmacéuticamente aceptable, o una preparación farmacéutica que comprende una dosis efectiva de un agente de unión anti-CD73 que es apropiado para el tratamiento del cáncer; o (d) cualquier combinación de a), b) y c), de acuerdo con la materia permitida para patentar en un país donde esta solicitud sea presentada.

El término "anticuerpo", como se utiliza en la presente, se refiere a anticuerpos policlonales y monoclonales. Dependiendo del tipo de dominio constante en las cadenas pesadas, los anticuerpos son asignados a una de las cinco clases principales: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Varios de estos están además divididos en subclases o isotipos, tal como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y similares. Una unidad de estructura ejemplar de inmunoglobulina (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto de dos idénticos pares de cadenas de polipéptidos, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que es primariamente responsable del reconocimiento de antígeno. Las expresiones cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a estas cadenas ligera y pesada respectivamente. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan "alfa", "delta", "épsilon", "gama" y "mu", respectivamente. Las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. IgG son las clases ejemplares de anticuerpos aquí empleados debido a que son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y debido a que son más fácilmente elaboradas en un entorno de laboratorio. Opcionalmente el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Ejemplos particulares de anticuerpos son anticuerpos quiméricos, humanizados, humanos, o de otra forma humanos adecuados. Los "anticuerpos" también incluyen cualquier fragmento o derivado de cualquiera de los anticuerpos aquí descritos.

La expresión "específicamente se une a" significa que un anticuerpo puede unirse de preferencia en un ensayo de unión competitivo al socio vinculante, por ejemplo, CD73, como se evaluó utilizando ya sea formas recombinantes de las proteínas, epítopes en el mismo, o proteínas silvestres presentes en la superficie de células objetivo aisladas. Los ensayos de unión competitiva y otros procedimientos para determinar unión específica son además descritos más adelante y son bien conocidos en la técnica.

Cuando se dice que un anticuerpo "compite con" un anticuerpo monoclonal particular, significa que el anticuerpo compite con el anticuerpo monoclonal en un ensayo de unión que utiliza ya sea moléculas CD73 recombinantes o moléculas CD73 expresadas en superficie. Por ejemplo, si un anticuerpo de prueba reduce la unión de un anticuerpo de referencia a un polipéptido de CD73 o célula que expresa CD73 en un ensayo de unión, se dice que el anticuerpo "compite" respectivamente con el anticuerpo de referencia.

El término "afinidad", como se utiliza en la presente, significa la fuerza de la unión de un anticuerpo a un epítope. La afinidad de un anticuerpo se brinda por la constante de disociación K_d , definida como $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$, donde $[Ab-Ag]$ es la concentración molar del complejo anticuerpo-antígeno, $[Ab]$ es la concentración molar del anticuerpo sin unir y $[Ag]$ es la concentración molar del antígeno sin unir. La constante de afinidad K_a se define por $1/K_d$. Los procedimientos para determinar la afinidad de mAbs se pueden encontrar en Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Coligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), y Muller, Meth. Enzymol. 92:589-601 (1983). Un procedimiento estándar bien conocido en la técnica para determinar la afinidad de mAbs es el uso de la exploración de resonancia plasmónica de superficie (RPS) (tal como por análisis con un dispositivo analítico RPS BIAcore™).

Dentro del presente contexto un "determinante" designa un sitio de interacción o unión en un polipéptido.

El término "epítope" se refiere a un determinante antigénico, y es el área o región en un antígeno al cual se une un anticuerpo. Un epítope de proteína puede comprender residuos de aminoácido directamente involucrados en la unión así como residuos de aminoácidos los cuales son efectivamente bloqueados por el anticuerpo de unión a antígeno específico o péptido, es decir, residuos aminoácidos dentro de la "huella" del anticuerpo. Esta es la forma más simple o área estructural más pequeña en una molécula de antígeno complejo que puede combinar con, por ejemplo, un anticuerpo o un receptor. Los epítopes pueden ser lineales o conformacionales/estructurales. La expresión "epítope lineal" está definida como un epítope compuesto de residuos aminoácidos que están contiguos en la secuencia lineal de aminoácidos (estructura primaria). La expresión "epítope estructural o conformacional" está definida como un epítope compuesto de residuos aminoácidos que no están todos contiguos y por lo tanto representan partes separadas de la secuencia lineal de aminoácidos que se ponen en proximidad uno con otro por medio del plegado de la molécula (estructuras secundaria, terciaria y/o cuaternaria). Un epítope conformacional es dependiente de la estructura tridimensional. La expresión "conformacional" es por lo tanto a menudo utilizada de manera intercambiable con "estructural".

El término “reducir” o “reduciendo”, con respecto a las células que expresan CD73, significa un proceso, procedimiento o compuesto que resulta en la destrucción, eliminación, lisis o inducción de tal destrucción, eliminación o lisis, de manera que afecte negativamente al número de tales células que expresan CD73 presentes en una muestra o en un sujeto.

- 5 El término “internalización” utilizado de manera intercambiable con “internalización intracelular” se refiere a los eventos moleculares, bioquímicos y celulares asociados con el proceso de translocar una molécula de la superficie extracelular de una célula a la superficie intracelular de una célula. Los procesos responsables para internalización intracelular de moléculas son bien conocidos y pueden involucrar, *inter alia*, la internalización de moléculas extracelulares (tal como hormonas, anticuerpos, y pequeñas moléculas orgánicas); las moléculas asociadas a la membrana (tal como receptores de superficie celular); y complejos de moléculas asociadas a la membrana unidos a las moléculas extracelulares (por ejemplo, un ligando unido a un receptor transmembrana o un anticuerpo unido a una molécula asociada a la membrana). Por lo tanto, “inducir y/o incrementar la internalización” comprende eventos en donde la internalización intracelular se inicia y/o la velocidad y/o alcance de la internalización intracelular se incrementa.
- 10
- 15 El término “agente” aquí se utiliza para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto elaborado a partir de materiales biológicos. La expresión “agente terapéutico” se refiere a un agente que tiene actividad biológica.

Para los presentes propósitos, un anticuerpo “humanizado” o “humano” se refiere a un anticuerpo en el cual la región de esquema variable y constante de una o más inmunoglobulinas humanas se fusiona con la región de unión, por ejemplo, CDR, de una inmunoglobulina animal. Tales anticuerpos están diseñados para mantener la especificidad de unión del anticuerpo no humano del cual las regiones de unión se derivan, pero para evitar una reacción inmune contra el anticuerpo no humano. Tales anticuerpos pueden obtenerse a partir de ratón transgénico u otros animales que han sido “diseñados” para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta al desafío antigénico (véase, por ejemplo, Green et al. (1994) *Nature Genet* 7:13; Lonberg et al. (1994) *Nature* 368:856; Taylor et al. (1994) *Int Immun* 6:579). Un anticuerpo humano completo también puede construirse por medio de procedimientos de transfección genética o cromosómica, así como tecnología de presentación del fago, todo los cuales son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:552-553). Los anticuerpos humanos también se pueden generar mediante células B activadas *in vitro* (véase, por ejemplo, patentes de los Estados Unidos N.º 5.567.610 y 5.229.275).

20

25

- 30 Un “anticuerpo quimérico” es una molécula de anticuerpo en el cual (a) la región constante, o una porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia de manera que el sitio de unión a antígeno (región variable) está ligado a una región constante de una clase alterada o diferente, la función efectora y/o especie, o una molécula completamente diferente la cual confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.; o (b) la región variable, o una porción de la misma, es alterada, reemplazada o intercambiada con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada.
- 35

La expresión “región hipervariable” como se utiliza en la presente se refiere a los residuos aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable en general comprende residuos aminoácidos desde una “región determinante de complementariedad” o “CDR” (por ejemplo, residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat et al. 1991) y/o esos residuos de un “bucle hipervariable” (por ejemplo, residuos 26-32 (L1) 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol* 1987; 196:901-917), o un sistema similar para determinar aminoácidos esenciales responsables para unir a antígeno. Típicamente, la numeración de residuos aminoácidos en esta región se lleva a cabo por medio del procedimiento descrito en Kabat et al., *supra*. Frases tales como “posición Kabat”, “numeración de residuo de dominio variable como en Kabat” y “de acuerdo con Kabat” se refiere en la presente a este sistema de numeración para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera. Al utilizar el sistema de numeración Kabat, la secuencia de aminoácidos lineal real de un péptido puede contener menos o aminoácidos adicionales que corresponden a un acortamiento de, o inserción en, una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un inserto de aminoácido simple (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después de que el residuo 52 de CDR H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del residuo FR de cadena pesada 82. La numeración de Kabat de residuos puede estar determinada por un anticuerpo determinado por alineación en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat “estándar”.

40

45

50

- 55 Por residuos de “marco conservado” o “FR” como se utiliza en la presente significa la región de un dominio variable del anticuerpo exclusivo de esas regiones definidas como CDR. Cada marco conservado de dominio variable del anticuerpo puede además estar subdividido en regiones contiguas separadas por los CDR (FR1, FR2, FR3 y FR4).

Las expresiones “dominio Fc”, “porción Fc” y “región Fc” se refieren a un fragmento C terminal de una cadena pesada del anticuerpo, por ejemplo, desde aproximadamente aminoácido (aa) 230 a aproximadamente aa 450 de cadena pesada γ humana (gama) o su secuencia homóloga en otros tipos de cadenas pesadas de anticuerpo (por ejemplo, α , δ , ϵ y μ para anticuerpos humanos), o un alotipo que ocurre naturalmente del mismo. A menos que se

60

especifique de otra manera, la numeración de aminoácido de Kabat comúnmente aceptada para inmunoglobulinas se utiliza en toda esta descripción (véase, Kabat et al. (1991) *Sequences of Protein of Immunological Interest*, 5ª ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD).

5 Los términos “aislado”, “purificado” o “biológicamente puro” se refiere al material que es sustancialmente o esencialmente libre de componentes los cuales normalmente lo acompañan como se encuentra en su estado silvestre. La pureza y homogeneidad se determinan típicamente utilizando técnicas de química analítica tal como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. Una proteína que es la especie predominante presente en una preparación es sustancialmente purificada.

10 Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se utilizan en la presente de manera intercambiable para hacer referencia a un polímero de residuos aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros aminoácidos en los cuales uno o más residuos aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido correspondiente que ocurre naturalmente, así como para polímeros aminoácidos que ocurren naturalmente y polímero de aminoácidos que no ocurre naturalmente.

15 El término “recombinante” cuando se utiliza con referencia, por ejemplo, a una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico heterólogo o proteína o la alteración de un ácido nucleico silvestre o proteína, o que la célula es derivada de una célula así modificada. Por lo tanto, por ejemplo, células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma silvestre (no recombinante) de la célula o expresan genes silvestres que son de otra manera expresados anormalmente, infraexpresados o no expresados en absoluto.

20 Dentro del presente contexto, el término anticuerpo que se “une” a un polipéptido o epítope designa un anticuerpo que se une a tal determinante con especificidad y/o afinidad.

25 El término “identidad” o “idéntico”, cuando se utiliza en una relación entre las secuencias de dos o más polipéptidos, se refiere al grado de relación de secuencia entre polipéptidos, conforme se determinó por el número de coincidencias entre series de dos o más residuos aminoácidos. La “Identidad” mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre las más pequeñas de dos o más secuencias con alineaciones de huecos (si los hay) dirigidos por un programa informático o modelo matemático (es decir, “algoritmos”) en particular. La identidad de polipéptidos relacionados puede ser calculada fácilmente por procedimientos conocidos. Tales procedimientos incluyen, pero no están limitados a, los descritos en *Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1*, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo et al., *SIAM J. Applied Math.* 48, 1073 (1988).

35 Los procedimientos para determinar la identidad están diseñados para brindar la coincidencia más grande entre las secuencias probadas. Los procedimientos para determinar la identidad se describen en programas informáticos públicamente disponibles. Los procedimientos de programa informático para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen el paquete de programa GCG, incluyendo GAP (Devereux et al., *Nucl. Acid. Res.* 12, 387 (1984); *Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.*), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215, 403-410 (1990)). El programa BLASTX está públicamente disponible de the National Center for Biotechnology Information (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., *supra*). El bien conocido algoritmo Smith Waterman también se puede utilizar para determinar la identidad.

Producción de anticuerpos

45 El agente anti-CD73 que se puede utilizar para el tratamiento de cánceres se une a una porción extracelular de polipéptido de CD73 humano y neutraliza la actividad enzimática de CD73 expresada en la superficie de una célula, por ejemplo, una célula tumoral. En un aspecto el agente inhibe la actividad 5'-ectonucleotidasa de CD73. En un aspecto el anticuerpo inhibe la generación mediada por CD73 de adenosina. En un aspecto el anticuerpo inhibe el catabolismo mediado por CD73 de AMP a adenosina. En un aspecto el anticuerpo inhibe la inhibición mediada por adenosina de la actividad del linfocito (por ejemplo, células T). En una modalidad el anticuerpo se une y/o inhibe el sitio activo enzimático en CD73. En un aspecto, el agente es un anticuerpo seleccionado de un anticuerpo de longitud completa, un fragmento de anticuerpo y una molécula derivada de anticuerpo sintético o semi-sintético.

En un aspecto, el agente es un anticuerpo seleccionado de un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo quimérico.

55 En un aspecto, el agente es un fragmento de un anticuerpo que comprende un dominio constante seleccionado de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

En un aspecto, el agente es un fragmento de anticuerpo seleccionado de un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento Fab'-SH, un fragmento F(ab)2, un fragmento F(ab')2, un fragmento Fv, un Ig de cadena pesada (un Ig de

camello o llama), un fragmento V_{HH} , un FV de dominio simple y un fragmento de anticuerpo de cadena simple.

En un aspecto, el agente es una molécula derivada de anticuerpo sintético o semi-sintético seleccionada de un scFV, un dsFV, un minicuerpo, un diacuerpo, un triacuerpo, un cuerpo kappa, un IgNAR; y un anticuerpo multiespecífico.

- 5 La presente descripción por lo tanto se refiere a anticuerpos u otros agentes de unión a antígeno que se unen a CD73.

En un aspecto, el anticuerpo está al menos parcialmente en forma purificada.

En un aspecto, el anticuerpo está en forma esencialmente aislada.

- 10 Los anticuerpos pueden producirse por una variedad de técnicas conocidas en este campo. Típicamente, son producidos por medio de inmunización de un animal no humano, de preferencia un ratón, con un inmunógeno que comprende un polipéptido de CD73, de preferencia un polipéptido de CD73 humano. El polipéptido de CD73 puede comprender la secuencia de longitud completa de un polipéptido de CD73 humano, o un fragmento o derivado del mismo, típicamente un fragmento inmunogénico, es decir, una porción del polipéptido que comprende un epítipo expuesto en la superficie de células que expresan un polipéptido de CD73. Tales fragmentos típicamente contienen al menos aproximadamente 7 aminoácidos consecutivos de la secuencia de polipéptido maduro, incluso de mayor preferencia al menos aproximadamente 10 aminoácidos consecutivos de los mismos. Los fragmentos típicamente están esencialmente derivados del dominio extracelular del receptor. En un aspecto, el inmunógeno comprende un polipéptido de CD73 humano del tipo silvestre en una membrana lipídica, típicamente en la superficie de una célula. En un aspecto específico, el inmunógeno comprende células intactas, particularmente células humanas intactas, opcionalmente tratadas o lisadas. En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de CD73 recombinante.

- 20 El paso para inmunizar a un mamífero no humano con un antígeno se puede llevar a cabo en cualquier manera bien conocida en la técnica para estimular la producción de anticuerpos en un ratón (véase, por ejemplo, E. Harlow y D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988)). El inmunógeno está suspendido o disuelto en un tampón, opcionalmente con un adyuvante, tal como adyuvante de Freund completo o incompleto. Los procedimientos para determinar la cantidad de inmunógeno, tipos de tampones y cantidades de adyuvante son bien conocidos para los expertos en la técnica y no están limitados de ninguna manera. Estos parámetros pueden ser diferentes para diferentes inmunógenos, pero son fácilmente dilucidados.

- 25 De manera similar, la ubicación y frecuencia de inmunización suficiente para estimular la producción de anticuerpos también es bien conocida en la técnica. En un protocolo de inmunización típico, se inyecta en los animales no humanos intraperitonealmente antígeno en el día 1 y nuevamente aproximadamente una semana después. Esto es seguido por medio de la repetición de inyecciones del antígeno aproximadamente el día 20, opcionalmente con un adyuvante tal como adyuvante incompleto de Freund. Las inyecciones de repetición se efectúan intravenosamente y se pueden repetir durante varios días consecutivos. Esto es seguido por una inyección de refuerzo en el día 40, ya sea intravenosamente o intraperitonealmente, típicamente sin adyuvante. Este protocolo resulta en la producción de células B que producen anticuerpo específico de antígeno después de aproximadamente 40 días. Otros protocolos también se pueden utilizar siempre que resulten en la producción de células B que expresan un anticuerpo dirigido al antígeno utilizado en inmunización.

- 30 Para preparación de anticuerpo policlonal, el suero es obtenido de un animal no humano inmunizado y los anticuerpos presentes en el mismo aislados por medio de técnicas bien conocidas. El suero puede ser purificado por afinidad utilizando cualquiera de los inmunógenos arriba expuestos ligados a un soporte sólido de manera que se obtienen anticuerpos que reaccionan con polipéptidos CD73.

En un aspecto alternativo, los linfocitos de un mamífero no humano no inmunizado son aislados, cultivados *in vitro* y después expuestos al inmunógeno en el cultivo celular. Los linfocitos después son recolectados y se lleva a cabo el paso de fusión descrito más adelante.

- 35 Para anticuerpos monoclonales, el siguiente paso es el aislamiento de esplenocitos del mamífero no humano inmunizado y la subsecuente fusión de esos esplenocitos con una célula inmortalizada a fin de formar un hibridoma que produce anticuerpo. El aislamiento de esplenocitos de un mamífero no humano es bien conocido en la técnica y típicamente involucra extraer el bazo de un mamífero no humano anestesiado, cortarlo en pequeñas piezas y exprimir los esplenocitos de la cápsula esplénica a través de una malla de nylon de un tamiz celular en un tampón apropiado de manera que produzca una suspensión de célula simple. Las células fueron lavadas, centrifugadas y resuspendidas en un tampón que lisa cualquier glóbulo rojo. La solución es centrifugada nuevamente y los linfocitos restantes en el precipitado son finalmente resuspendidos en tampón reciente.

- 40 Una vez aislados y presentes en la suspensión celular simple, los linfocitos se pueden fusionar a una línea celular inmortal. Este es típicamente una línea celular de mieloma de ratón, aunque muchas otras líneas celulares inmortalizadas útiles para crear hibridomas son conocidas en la técnica. Las líneas de mieloma murino incluyen, pero no se limitan a, las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles de Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Estados Unidos, X63 Ag8653 y células SP-2 disponibles de the American Type Culture

Collection, Rockville, Maryland, Estados Unidos. La fusión se efectúa utilizando polietilenglicol o similar. Los hibridomas resultantes después son cultivados en medios selectivos que contienen una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parental, sin fusionar. Por ejemplo, si las células de mieloma parental carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirán hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes de HGPRT.

Los hibridomas son típicamente cultivados en un estrato alimentador de macrófagos. Los macrófagos son de preferencia de camadas del mamífero no humano utilizado para aislar esplenocitos y son típicamente sensibilizados con adyuvante incompleto de Freund o similar varios días antes de colocar en placa los hibridomas. Los procedimientos de fusión están descritos en Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice," pp. 59-103 (Academic Press, 1986).

Las células se dejan crecer en el medio de selección durante tiempo suficiente para la formación de colonias y producción de anticuerpos. Esto es generalmente entre aproximadamente 7 y aproximadamente 14 días.

Las colonias de hibridoma después son ensayadas para la producción de anticuerpos que específicamente se unen a productos de gen de polipéptido de CD73. El ensayo es típicamente un ensayo tipo ELISA colorimétrico, aunque se puede emplear cualquier ensayo que pueda ser adaptado a los pocillos en los que se cultivan los hibridomas. Otros ensayos incluyen radioinmunoensayos o clasificación celular activada por fluorescencia. Los pocillos positivos para la producción del anticuerpo deseado son examinados para determinar si están presentes una o más colonias distintas. Si está presente más de una colonia, las células pueden ser re-clonadas y cultivadas para asegurar que únicamente una célula simple ha dado lugar a la colonia produciendo el anticuerpo deseado. Típicamente, los anticuerpos también serán probados para determinar la capacidad de unirse a polipéptidos CD73, por ejemplo, células que expresan CD73.

Los hibridomas que se confirma que producen un anticuerpo monoclonal pueden crecer en grandes cantidades en un medio apropiado, tal como DMEM o RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* como tumores de ascitis en un animal.

Después de suficiente crecimiento para producir el anticuerpo monoclonal deseado, el medio de cultivo que contiene anticuerpo monoclonal (o el líquido ascítico) se separa de las células y se purifica el anticuerpo monoclonal presente en el mismo. La purificación se logra típicamente por electroforesis en gel, diálisis, cromatografía utilizando proteína A o proteína G-Sepharose, o un Ig anti-ratón ligado a un soporte sólido tal como agarosa o microesferas Sepharose (todos descritos, por ejemplo, en the Antibody Purification Handbook, Biosciences, publicación N.º 18-1037-46, Edition AC). El anticuerpo unido es típicamente eluido de columnas de proteína A/proteína G utilizando tampones bajos en pH (tampones de glicina o acetato de pH 3,0 o menos) con neutralización inmediata de fracciones que contienen anticuerpos. Estas fracciones son combinadas, dializadas y concentradas conforme sea necesario.

Los pocillos positivos con una colonia aparente sencilla son típicamente re-clonados y analizados nuevamente para asegurar que está siendo detectado y producido únicamente un anticuerpo monoclonal.

Los anticuerpos también pueden producirse por medio de la selección de bibliotecas combinatorias de inmunoglobulinas, como se describió, por ejemplo, en (Ward et al. Nature, 341 (1989) p. 544).

La identificación de uno o más anticuerpos que se unen a CD73, particularmente de manera sustancial o esencialmente el mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal 11E1, 8C7 o 6E1, se pueden determinar rápidamente al utilizar cualquiera de una variedad de ensayos de cribado inmunológico en los cuales la competencia de anticuerpo puede analizarse. Muchos de tales ensayos están rutinariamente practicados y son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos N.º 5.660.827, expedida el 26 de Agosto de 1997). Se entenderá que en realidad determinar el epítipo al cual un anticuerpo aquí descrito se une no es de ninguna manera necesario para identificar un anticuerpo que se une al mismo o sustancialmente el mismo epítipo que el anticuerpo monoclonal descrito en la presente.

Por ejemplo, donde los anticuerpos de prueba que se van a examinar son obtenidos de diferentes animales de origen; o son incluso de un isotipo Ig diferente, puede emplearse un ensayo de competición sencilla en el cual los anticuerpos de control (11E1, 8C7 o 6E1, por ejemplo) y de prueba son mezclados (o pre-adsorbidos) y aplicados a una muestra que contiene polipéptidos CD73. Los protocolos que se basan en la transferencia western y el uso de análisis BIACORE son adecuados para su uso en tales estudios de competencia.

En ciertos aspectos, se pre-mezclan los anticuerpos de control (11E1, 8C7, 3C12 o 6E1, por ejemplo) con cantidades variantes de los anticuerpos de prueba (por ejemplo, aproximadamente 1:10 o aproximadamente 1:100) durante un periodo de tiempo previo a la aplicación a la muestra de antígeno CD73. En otros aspectos, las cantidades de control y variantes de anticuerpos de prueba pueden simplemente mezclarse durante la exposición a la muestra de antígeno CD73. Siempre que uno pueda distinguir los anticuerpos unidos de los libres (por ejemplo, utilizando técnicas de lavado o separación para eliminar anticuerpos no unidos) y 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1 de los anticuerpos de prueba (por ejemplo, al utilizar anticuerpos secundarios de isotipo específico o de especies específicas o mediante marcado específico de 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1 con un marcador detectable) uno puede

determinar si los anticuerpos de prueba reducen la unión de 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1 a los antígenos, indicando que el anticuerpo de prueba reconoce sustancialmente el mismo epítoto que 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1. La unión de los anticuerpos de control (marcados) en ausencia de un anticuerpo completamente irrelevante puede servir como el alto valor de control. El bajo valor de control puede obtenerse al incubar los anticuerpos marcados (11E1, 8C7, 3C12 o 6E1) con anticuerpos sin marcar de exactamente el mismo tipo (11E1, 8C7, 3C12 o 6E1), donde la competencia ocurriría y reduciría la unión de los anticuerpos marcados. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la reactividad del anticuerpo marcado en la presencia de un anticuerpo de prueba es indicativo de un anticuerpo de prueba que reconoce sustancialmente el mismo epítoto, es decir uno con "reacción cruzada" o que compite con el anticuerpo marcado (11E1, 8C7, 3C12 o 6E1). Cualquier anticuerpo de prueba que reduzca la unión de 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1 a antígenos CD73 por al menos aproximadamente 50%, tal como al menos aproximadamente 60%, o de mayor preferencia al menos aproximadamente 80% o 90% (por ejemplo, aproximadamente 65-100%), en cualquier proporción de 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1: anticuerpo de prueba entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 1:100 se considera que es un anticuerpo que se une a sustancialmente el mismo epítoto o determinante como 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1. De preferencia, tal anticuerpo de prueba reducirá la unión de 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1 al antígeno CD73 por al menos aproximadamente 90% (por ejemplo, aproximadamente 95%).

La competencia también se puede evaluar por medio de, por ejemplo, una prueba de citometría de flujo. En tal prueba, las células que portan un polipéptido de CD73 determinado se puede incubar primero con 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1, por ejemplo, y después con el anticuerpo de prueba marcado con un fluorocromo o biotina. Se dice que el anticuerpo compite con 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1 si la unión obtenida después de la preincubación con una cantidad de saturación de 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1 es aproximadamente 80%, de preferencia aproximadamente 50%, aproximadamente 40% o menos (por ejemplo, aproximadamente 30%, 20% o 10%) de la unión (como se midió por medio de fluorescencia) obtenida por el anticuerpo sin preincubación con 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1. Alternativamente, se dice que un anticuerpo compite con 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1 si la unión obtenida con un anticuerpo marcado 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1 (por un fluorocromo o biotina) en células preincubadas con una cantidad de saturación de anticuerpo de prueba es aproximadamente 80%, de preferencia aproximadamente 50%, aproximadamente 40%, o menos (por ejemplo, aproximadamente 30%, 20% o 10%) de la unión obtenida sin preincubación con el anticuerpo de prueba.

También se puede emplear un ensayo de competencia sencilla en el cual un anticuerpo de prueba es pre-adsorbido y aplicado en concentración de saturación a una superficie en la cual un antígeno CD73 es inmovilizado. La superficie en el ensayo de competencia sencilla es de preferencia un chip BIACORE (u otro medio adecuado para análisis de resonancia plasmónica de superficie). El anticuerpo de control (por ejemplo, 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1) después se pone en contacto con la superficie en una concentración de saturación de CD73 y se mide la unión a CD73 y superficie del anticuerpo de control. Esta unión del anticuerpo de control se compara con la unión del anticuerpo de control a la superficie que contiene CD73 en la ausencia del anticuerpo de prueba. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la unión de la superficie que contiene CD73 por el anticuerpo de control en presencia de un anticuerpo de prueba indica que el anticuerpo de prueba reconoce sustancialmente el mismo epítoto que el anticuerpo de control de manera que el anticuerpo de prueba tiene una "reacción cruzada" con el anticuerpo de control. Cualquier anticuerpo de prueba que reduce la unión de anticuerpo de control (tal como 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1) a un antígeno CD73 por al menos 30% o más, de preferencia aproximadamente 40%, puede considerarse un anticuerpo que se une a sustancialmente al mismo epítoto o determinante que un control (por ejemplo, 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1). De preferencia, tal anticuerpo de prueba reducirá la unión del anticuerpo de control (por ejemplo, 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1) al antígeno CD73 por al menos aproximadamente 50% (por ejemplo, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70% o más). Se apreciará que el orden de anticuerpos de control y prueba pueden invertirse: es decir, el anticuerpo de control puede ser unido primero a la superficie y el anticuerpo de prueba se pone en contacto con la superficie después en un ensayo de competencia. De preferencia, el anticuerpo que tiene afinidad más alta para el antígeno CD73 está unido a la superficie primero, ya que se espera que la disminución en la unión vista para el segundo anticuerpo (asumiendo que los anticuerpos son de reacción cruzada) será de mayor magnitud. Ejemplos adicionales de tales ensayos se proporcionan en, por ejemplo, Saunal (1995) *J. Immunol. Methods* 183: 33-41.

Los anticuerpos se unirán a células que expresan CD73 de un individuo o individuos con una enfermedad caracterizada por expresión de células positivas para CD73, es decir un individuo que es candidato para tratamiento con uno de los procedimientos descritos en la presente que utiliza un anticuerpo anti-CD73. Por consiguiente, una vez que se obtiene un anticuerpo que específicamente reconoce CD73 en células, este puede ser opcionalmente probado para su capacidad de unión a células positivas para CD73 (por ejemplo, células cancerosas). En particular, antes de tratar a un paciente con uno de los presentes anticuerpos, uno puede opcionalmente probar la capacidad del anticuerpo para unirse a células malignas tomadas del paciente, por ejemplo, en una muestra de sangre o biopsia de tumor, para maximizar la probabilidad de que la terapia sea beneficiosa en el paciente.

En un aspecto, los anticuerpos son validados en un inmunoensayo para probar su capacidad para unirse a células que expresan CD73, por ejemplo, células malignas. Por ejemplo, se lleva a cabo una muestra de sangre o biopsia de tumor y se recolectan las células tumorales. La capacidad de un determinado anticuerpo para unirse a las células es evaluada después utilizando procedimientos estándar bien conocidos para los expertos en la técnica. Los anticuerpos pueden unirse por ejemplo a una proporción sustancial (por ejemplo, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o más) de células que se sabe que expresan CD73, por ejemplo, células tumorales, de un porcentaje

significativo de individuos o pacientes (por ejemplo, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más). Los anticuerpos se pueden utilizar para propósitos de diagnóstico para determinar la presencia o nivel de células malignas en un paciente, por ejemplo, como un biomarcador para valorar si un paciente es adecuado para el tratamiento con un agente anti-CD73, o para su uso en los procedimientos terapéuticos aquí descritos. Para evaluar la unión de los anticuerpos a las células, los anticuerpos pueden marcarse ya sea directa o indirectamente. Cuando son marcados indirectamente, típicamente se agrega un anticuerpo marcado secundario.

La determinación de si un anticuerpo se une dentro de una región de epítipo se puede llevar a cabo de maneras conocidas para la persona experta en la técnica. Como un ejemplo de tales procedimientos de caracterización/mapeo, una región de epítipo para un anticuerpo anti-CD73 se puede determinar por medio de una "huella" de epítipo que utiliza modificación química de los carboxilos/aminas expuestos en la proteína CD73. Un ejemplo específico de tal técnica de huella es el uso de HXMS (intercambio de hidrógeno-deuterio detectado por espectrometría de masa) en donde se produce un intercambio de hidrógeno/deuterio de receptor y protones de amida de proteína de ligando, unión, y nuevo intercambio, en donde los grupos de amida de cadena principal que participan en la unión a proteína están protegidos del nuevo intercambio y por lo tanto permanecerán deuterados. Las regiones relevantes se pueden identificar en este punto por medio de proteólisis péptica, separación por cromatografía líquida de alto rendimiento de microboro rápido, y/o espectrometría de masa por ionización con electropulverización. Véase, por ejemplo, Ehring H, *Analytical Biochemistry*, Vol. 267 (2) pp. 252-259 (1999) Engen, J. R. y Smith, D. L. (2001) *Anal. Chem.* 73, 256A-265A. Otro ejemplo de una técnica de identificación de epítipo adecuado es un mapeo de epítipo de resonancia magnética nuclear (RMN), donde típicamente son comparadas la posición de las señales en espectro RMN bidimensional del antígeno libre y el antígeno en complejo con el péptido de unión a antígeno, tal como un anticuerpo. El antígeno típicamente es selectivamente marcado de manera isotópica con ¹⁵N de manera que únicamente se ven señales que corresponden al antígeno y no señales del péptido de unión a antígeno en el espectro de RMN. Las señales de antígeno que se originan de los aminoácidos involucrados en la interacción con el péptido de unión a antígeno típicamente cambiará la posición en el espectro del complejo en comparación con el espectro del antígeno libre, y los aminoácidos involucrados en la unión pueden identificarse de esa manera. Véase, por ejemplo, Ernst Schering Res Found Workshop. 2004; (44): 149-67; Huang et al., *Journal of Molecular Biology*, Vol. 281 (1) pp. 61-67 (1998); y Saito y Patterson, *Methods*. Jun 1996; 9 (3): 516-24.

La caracterización/mapeo del epítipo también se puede llevar a cabo utilizando procedimientos de espectrometría de masa. Véase, por ejemplo, Downard, *J Mass Spectrom.* Abr 2000; 35 (4): 493-503 y Kiselar y Downard, *Anal Chem.* 1 de mayo de 1999; 71 (9): 1792-1801. Las técnicas de digestión de proteasa también pueden ser útiles en el contexto de la identificación y mapeo del epítipo. Las secuencias/regiones relevantes para determinantes antigénicos se pueden determinar por medio de digestión de proteasa, por ejemplo, al utilizar tripsina en una proporción de aproximadamente 1:50 a CD73 o digestión durante una noche en y pH 7-8, seguido por análisis de espectrometría de masas (EM) para identificación de péptido. Los péptidos protegidos de la separación de tripsina por el ligante anti-CD73 pueden posteriormente identificarse por medio de la comparación de muestras sujetas a digestión de tripsina y muestras incubadas con anticuerpo y después sujetas a digestión, por ejemplo, por medio de tripsina (revelando de esa manera una huella para el ligante). Otras enzimas como quimotripsina, pepsina, etc., también o alternativamente se pueden utilizar en procedimientos de caracterización de epítipo similar. Además, la digestión enzimática puede proporcionar un rápido procedimiento para analizar si una secuencia de determinante antigénico potencial está dentro de una región del polipéptido de CD73 que no está expuesto a la superficie y, por consiguiente, muy probablemente no es relevante en términos de inmunogenicidad/antigenicidad.

La mutagénesis dirigida al sitio es otra técnica útil para dilucidación de un epítipo de unión. Por ejemplo, en "exploración de alanina" cada residuo dentro de un segmento de proteína es remplazado con un residuo de alanina, y las consecuencias para afinidad de unión medida. Si la mutación lleva a una reducción significativa en la afinidad de unión, lo más probable es que esté involucrada en la unión. Anticuerpos monoclonales específicos para epítopes estructurales (es decir, anticuerpos que no se unen a la proteína desplegada) se pueden utilizar para verificar que el remplazo de alanina no tenga influencia en el plegado general de la proteína. Véase, por ejemplo, Clackson y Wells, *Science* 1995; 267:383-386; y Wells, *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:1-6.

También se puede utilizar microscopía electrónica para la "huella" del epítipo. Por ejemplo, Wang et al., *Nature* 1992; 355:275-278 utilizó aplicación coordinada de microscopía crioelectrónica, reconstrucción de imagen tridimensional, y cristalografía de rayos X para determinar la huella física de un fragmento de Fab en la superficie de la cápside del virus de mosaico del caupí silvestre.

Otras formas de ensayo "libre de marca" para evaluación del epítipo incluye resonancia plasmónica superficial (RPS, BIACORE) y espectroscopia de interferencia por reflectometría (RifS). Véase, por ejemplo, Fägerstam et al., *Journal Of Molecular Recognition* 1990;3:208-14; Nice et al., *J. Chroma-togr.* 1993; 646:159-168; Leipert et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998; 37:3308-3311; Kröger et al., *Biosensors and Bioelectronics* 2002; 17:937-944.

Se debe notar también que un anticuerpo que se une al mismo o sustancialmente el mismo epítipo que un anticuerpo se puede identificar en uno o más de los ensayos de competencia ejemplares descrito en la presente.

Después de la inmunización y producción de anticuerpos en un vertebrado o célula, se pueden llevar a cabo pasos de selección particular para aislar anticuerpos como se reivindica. A este respecto, en un aspecto específico, la

descripción también se relaciona con procedimientos para producir tales anticuerpos, que comprenden: (a) inmunizar a un mamífero no humano con un inmunógeno que comprende un polipéptido de CD73; y (b) preparar anticuerpos a partir de dicho animal inmunizado; y (c) seleccionar anticuerpos a partir del paso (b) que tienen la capacidad de unirse a CD73.

5 Típicamente, un anticuerpo anti-CD73 que se proporciona en la presente tiene una afinidad para un polipéptido de CD73 (por ejemplo, como un homodímero CD73) en el rango de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^{11} M⁻¹ (por ejemplo, aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{10} M⁻¹). Por ejemplo, en un aspecto particular la descripción proporciona un anticuerpo anti-CD73 que tiene una constante de disociación promedio (K_D) de menos de 1×10^{-9} M con respecto a CD73, conforme se determinó por medio de, por ejemplo, la exploración de resonancia
10 plasmónica superficial (RPS) (tal como por análisis con un dispositivo analítico de RPS BIAcore™). En un aspecto ejemplar más particular, la descripción proporciona anticuerpos anti-CD73 que tienen un K_D de aproximadamente 1×10^{-8} M a aproximadamente 1×10^{-10} M, o aproximadamente 1×10^{-9} M a aproximadamente 1×10^{-11} M, para CD73.

15 Los anticuerpos pueden estar caracterizados, por ejemplo, por una K_D media de no más de aproximadamente (es decir mejor afinidad que) 100, 60, 10, 5 o 1 nanomolar, de preferencia sub-nanomolar u opcionalmente no más de aproximadamente 500, 200, 100 o 10 picomolar. La K_D se puede determinar por ejemplo inmovilizando proteínas CD73 humanas producidas recombinantemente en una superficie de chip, seguido de la aplicación del anticuerpo que se va a probar en la solución. En una modalidad, el procedimiento comprende además un paso (d), seleccionar anticuerpos de (b) que tienen la capacidad de competir para la unión a CD73 con el anticuerpo, 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1.

20 En un aspecto de cualquiera de los aspectos, los anticuerpos preparados de acuerdo con los presentes procedimientos son anticuerpos monoclonales. En otro aspecto, el animal no humano utilizado para producir anticuerpos de acuerdo con los presentes procedimientos es un mamífero, tal como un roedor, bovino, porcino, ave, caballo, conejo, cabra, u oveja.

25 ADN que codifica un anticuerpo que une a un epítoto presente en los polipéptidos CD73 está aislado de un hibridoma y colocado en un vector de expresión apropiada para transfección en un huésped apropiado. El huésped después es utilizado para la producción recombinante del anticuerpo, o variantes del mismo, tal como una versión humanizada de ese anticuerpo monoclonal, fragmentos activos del anticuerpo, anticuerpos quiméricos que comprenden la porción de reconocimiento de antígeno del anticuerpo, o versiones que comprenden una fracción detectable.

30 ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la descripción, por ejemplo, el anticuerpo 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1, se puede aislar y secuenciar fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que tienen la capacidad de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). En un aspecto, se proporciona un ácido nucleico que codifica una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo anti-CD73 de cualquier aspecto presente. Una vez aislado, el ADN se
35 puede colocar en vectores de expresión, los cuales son después transfectados en células huésped tal como células *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otra manera proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Como se describió en otra parte en la presente especificación, tales secuencias de ADN pueden modificarse por cualquiera de un gran número de propósitos, por ejemplo, para anticuerpos humanizantes, produciendo fragmentos o derivados, o para modificar la secuencia del anticuerpo, por ejemplo, en el sitio de unión a antígeno a fin de optimizar la especificidad de la unión del anticuerpo. En una modalidad, se proporciona una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica una cadena ligera y/o una cadena pesada de un anticuerpo (por ejemplo, 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1), así como una célula huésped recombinante que comprende (por ejemplo, en su genoma) tal ácido nucleico. La expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo es bien
40 conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Skerra et al., Curr. Opin. Immunol., 5, pp. 256 (1993); y Pluckthun, Immunol. 130, p. 151 (1992).

Opcionalmente, se puede especificar que los anticuerpos de la descripción son anticuerpos diferentes a cualquiera de uno o más de los anticuerpos 7G2 (Life Technologies Corp.), anticuerpo 4G4 (Abcam, producto ref. ab81720), anticuerpo AD2 (Biolegend Corp, producto ref. 344004), anticuerpo 1E9 (Santa Cruz Biotechnology Corp., producto sc-32299), el anticuerpo 067-213 descrito en el documento US 2014/0235833, el anticuerpo anti-CD73 referido en Sachsenmeier et al. ((2012) J. Biomed. Screening 17:993-998 y/o en Rust et al. (2013) Mol. Cancer 12:11, o anticuerpo MEDI9447 (Medimmune Corp, Gaithersburg MD) referido en Huang et al. (2015) AACR Annual meeting; Abstract 1538, o derivados de los anteriores, por ejemplo, que comprendan la región de unión a antígeno o CDR de cadena pesada y/o ligera, por completo o en parte. En otros aspectos, los anticuerpos antes mencionados pueden,
55 dependiendo de la naturaleza del anticuerpo, modificarse de manera que tengan las características de los anticuerpos de la presente descripción.

Una vez que se identifica que los anticuerpos tienen la capacidad de unión a CD73 y/o tienen otras propiedades deseadas, también típicamente serán evaluados, utilizando procedimientos estándar que incluyen los descritos en la presente, por su capacidad para unirse a otros polipéptidos, incluyendo polipéptidos no relacionados. Idealmente, los anticuerpos únicamente se unen con afinidad sustancial a CD73, y no se unen en un nivel significativo a polipéptidos no relacionados, u otros polipéptidos de la familia 5'-nucleotidasa. Sin embargo, se apreciará que, siempre que la
60

afinidad para CD73 es sustancialmente mayor (por ejemplo, 10x, 100x, 500x, 1000x, 10.000x, o más) que lo que es para otros polipéptidos no relacionados, después los anticuerpos son adecuados para su uso en los presentes procedimientos.

5 En una modalidad, los anticuerpos anti-CD73 se pueden preparar de manera que no tengan unión específica sustancial a receptores Fc γ humanos, por ejemplo, cualquiera de uno o más de CD16A, CD16B, CD32A, CD32B y/o CD64. Tales anticuerpos pueden comprender regiones constantes de varias cadenas pesadas que se sabe bien que no se unen a receptores Fc γ . Uno de tal ejemplo es una región constante IgG4 humana tipo silvestre (IgG4 tiene mínima unión al receptor Fc γ). Una región constante IgG4 humana puede comprender además una sustitución estabilizante S228P (S241P) para conservar la capacidad de unión bivalente *in vivo* previniendo el intercambio de rama Fab. Alternativamente, los fragmentos de anticuerpo que no comprenden (o comprenden porciones de) regiones constantes, tales como fragmentos F(ab')₂, se pueden utilizar para evitar la unión del receptor Fc. La unión del receptor Fc se puede evaluar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, probar la unión de un anticuerpo a la proteína del receptor Fc en un ensayo BIACORE. También, generalmente cualquier isotipo IgG de anticuerpo puede utilizarse en el cual la porción Fc se modifica (por ejemplo, introduciendo 1, 2, 3, 4, 5 o más sustitutos de aminoácidos) para reducir o eliminar la unión a receptores Fc (véase, por ejemplo, documento WO 03/101485). Los ensayos tales como ensayos basados en células, para valorar la unión del receptor Fc son bien conocidos en la técnica, y se describen en, por ejemplo, el documento WO 03/101485.

En un aspecto, el anticuerpo puede comprender una o más mutaciones específicas en la región Fc que resulta en anticuerpos "silentes Fc" que tienen mínima interacción con células efectoras. Las funciones efectoras silenciadas pueden obtenerse por mutación en la región Fc de los anticuerpos y se han descrito en la técnica: mutación N297A, las mutaciones LALA, (Strohl, W., 2009, Curr. Opin. Biotechnol. vol. 20(6):685-691); y D265A (Baudino et al., 2008, J. Immunol. 181: 6664-69) ver también Heusser et al., documento WO2012/065950. En un aspecto, un anticuerpo comprende una, dos, o tres o más sustituciones de aminoácidos en la región de articulación. En un aspecto, el anticuerpo es un IgG1 o IgG2 y comprende una, dos o tres sustituciones en los residuos 233-236, opcionalmente 233-238 (numeración EU). En un aspecto el anticuerpo es un IgG4 y comprende una, dos o tres sustituciones en residuos 327, 330 y/o 331 (numeración EU). Ejemplos de anticuerpos IgG1 Fc silentes son LALA mutante que comprende mutación L234A y L235A en la secuencia de aminoácidos Fc IgG1. Otro ejemplo de una mutación silente Fc es una mutación en el residuo D265, o en D265 y P329 por ejemplo como se utilizó en un anticuerpo IgG1 como la mutación DAPA (D265A, P329A) (US 6.737.056). Otro anticuerpo IgG1 silente comprende una mutación en el residuo N297 (por ejemplo, mutación N297A, N297S), lo cual resulta en anticuerpos aglicosilados/no glicosilados. Otras mutaciones silentes incluyen: sustituciones en residuos L234 y G237 (L234A/G237A); sustituciones en los residuos S228, L235 y R409 (S228P/L235E/R409K,T,M,L); sustituciones en los residuos H268, V309, A330 y A331 (H268Q/V309L/A330S/A331S); sustituciones en los residuos C220, C226, C229 y P238 (C220S/C226S/C229S/P238S); sustituciones en los residuos C226, C229, E233, L234 y L235 (C226S/C229S/E233P/L234V/L235A; sustituciones en los residuos K322, L235 y L235 (K322A/L234A/L235A); sustituciones en los residuos L234, L235 y P331 (L234F/L235E/P331S); sustituciones en los residuos 234, 235 y 297; sustituciones en residuos E318, K320 y K322 (L235E/E318A/K320A/K322A); sustituciones en los residuos (V234A, G237A, P238S); sustituciones en los residuos 243 y 264; sustituciones en los residuos 297 y 299; sustituciones tal como residuos 233, 234, 235, 237 y 238 definidos por el sistema de numeración EU, comprenden una secuencia seleccionada de PAAAP, PAAAS y SAAAS (véase, documento WO2011/066501).

Los anticuerpos Fc silentes resultan en baja o no actividad ADCC, lo que significa que un anticuerpo silente muestra una actividad ADC que está por debajo de 50% de lisis celular específica. De preferencia un anticuerpo carece sustancialmente de actividad ADCC, por ejemplo, el anticuerpo Fc silente muestra una actividad ADCC (lisis celular específica) que está por debajo de 5% o por debajo de 1%. Los anticuerpos Fc silentes también pueden resultar en la falta de reticulación mediada por Fc γ R de CD73 en la superficie de una expresión de CD73.

En una modalidad, el anticuerpo tiene una sustitución en una región constante de cadena pesada en cualquiera de uno, dos, tres, cuatro, cinco o más de los residuos seleccionados del grupo que consiste en: 220, 226, 229, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 243, 264, 268, 297, 298, 299, 309, 310, 318, 320, 322, 327, 330, 331 y 409 (numeración de residuos en la región constante de cadena pesada está de acuerdo con la numeración EU conforme a Kabat). En un aspecto, el anticuerpo comprende una sustitución en los residuos 234, 235 y 322. En un aspecto, el anticuerpo tiene una sustitución en los residuos 234, 235 y 331.

En un aspecto, el anticuerpo Fc silente comprende un dominio Fc que comprende una sustitución de aminoácido en los residuos 234, 235 y 331, por ejemplo, la mutación "TM" que tiene sustituciones L234F, L235E y P331S. En un aspecto, el anticuerpo comprende un dominio Fc que comprende una sustitución de aminoácido en los residuos 234, 235 y 322, o en los residuos 234, 235 y 331, descritos en la publicación de Patente de los Estados Unidos N.º US2015/0125444, en donde 234 es F (fenilalanina); residuo 235 es Alanina (A), Asparagina (N), Fenilalanina (F), Glutamina (Q) o Valina (V); residuo 322 es Alanina (A), Ácido Aspártico (D), Ácido Glutámico (E), Histidina (H), Asparagina (N) o Glutamina (Q); y residuo 331 es Alanina (A) o Glicina (G). Los residuos aminoácidos están indicados de acuerdo con la numeración EU conforme a Kabat.

En una modalidad, el anticuerpo comprende un dominio Fc que comprende una sustitución de aminoácido que incrementa la unión a polipéptidos FcRn humanos a fin de aumentar la semivida *in vivo* del anticuerpo. Mutaciones

ejemplares se describen en Strohl, W., 2009, Curr. Opin. Biotechnol. vol. 20(6):685-691. Ejemplos de sustituciones utilizadas en anticuerpos de isotipo IgG1 humano son sustituciones en los residuos M252, S254 y T256; sustituciones en los residuos T250 y M428; sustituciones en el residuo N434; sustituciones en los residuos H433 y N434; sustituciones en los residuos T307, E380 y N434; sustituciones en los residuos T307, E380 y N434; sustituciones en los residuos M252, S254, T256, H433, N434 y 436; sustituciones en el residuo I253; sustituciones en los residuos P257, N434, D376 y N434.

En una modalidad, el anticuerpo comprende un dominio Fc que comprende una sustitución de aminoácido que confiere la sensibilidad disminuida a la división por proteasas. Las metaloproteinasas de matriz (MMP) representan la familia más prominente de proteinasas asociadas con tumorigénesis. Mientras que las células de cáncer pueden expresar MMP, el volumen de MMP extracelular se proporciona por medio de diferentes tipos de células estromales que infiltran el tumor y produce cada uno un conjunto específico de proteinasas e inhibidores de proteina, los cuales son liberados en el espacio extracelular y alteran específicamente el medio alrededor del tumor. Los MMP presentes en el microambiente tumoral pueden dividir anticuerpos dentro de la región de articularción y pueden por lo tanto llevar a la inactivación de anticuerpos terapéuticos que están diseñados para funcionar dentro del sitio del tumor. En una modalidad, el dominio Fc que comprende una sustitución de aminoácido ha disminuido la sensibilidad a la división por cualquiera de una, dos, tres o más (o todas) de las proteasas seleccionadas del grupo que consiste en: GluV8, IdeS, gelatinasa A (MMP2), gelatinasa B (MMP-9), metaloproteinasa-7 de matriz (MMP-7), estromelina (MMP-3) y macrófago elastasa (MMP-12). En un aspecto, el anticuerpo que disminuyó la sensibilidad a la división comprende un dominio Fc que comprende una sustitución de aminoácido en los residuos E233-L234 y/o L235. En un aspecto, el anticuerpo comprende un dominio Fc que comprende una sustitución de aminoácido en los residuos E233, L234, L235 y G236. En un aspecto, el anticuerpo comprende un dominio Fc que comprende una sustitución de aminoácido en uno o más residuos 233-238, por ejemplo, de manera que la secuencia E233-L234-L235-G236 es reemplazada por P233-V234-A235 (G236 se elimina). Véase, por ejemplo, documentos WO99/58572 y WO2012087746.

Un compuesto de unión a antígeno puede en cualquier paso deseado valorarse para su capacidad de inhibir la actividad enzimática de CD73, notablemente para bloquear la actividad 5'-nucleotidasa de CD73 y para reducir la producción de adenosina por una célula que expresa CD73, y a su vez restablece la actividad de y/o atenúa la inhibición mediada por adenosina de los linfocitos.

La capacidad de un anticuerpo de inhibir la actividad enzimática de CD73 se puede probar en un ensayo libre de célula que utiliza CD73 humano soluble recombinante (como dímeros) y AMP, donde la conversión de AMP a adenosina (y/o inhibición de los mismos) se detecta directamente (por ejemplo, mediante la medición de sustratos y productos, es decir AMP, adenosina y/o fosfato), o indirectamente. En un ejemplo, AMP y/o adenosina son detectados por medio de HPLC antes y después de la incubación del compuesto de prueba con CD73 recombinante. El CD73 recombinante está disponible, por ejemplo, de R&D Systems (Minneapolis, MN).

La actividad inhibidora (es decir potencial de mejora de citotoxicidad) de un anticuerpo también se puede valorar en cualquiera de varias maneras. Por ejemplo, en un ensayo indirecto, se utiliza un reactivo a base de luciferasa (por ejemplo, sistema CellTiter-Glo® disponible de Promega), para detectar la desaparición de AMP. La reacción de luciferasa en el ensayo es inhibida por AMP. Al agregar la enzima CD73 a la reacción se degrada el AMP, y atenúa la inhibición, produciendo una señal detectable (véase, Ejemplo 2 en el presente documento).

Los ensayos que utilizan CD73 soluble incluirán probar en condiciones donde los anticuerpos se proporcionan en un exceso molar sustancial (por ejemplo, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, etc) a los dímeros de polipéptido de CD73. Cuando se proporcionan en exceso molar a la enzima, los anticuerpos anti-CD73 ya no tendrán la capacidad de formar complejos multiméricos de anticuerpos y dímeros de CD73; los anticuerpos que conservan la inhibición de la actividad enzimática de CD73 se pueden seleccionar después.

La capacidad de un anticuerpo para inhibir la actividad enzimática de 5'-ectonucleotidasa de CD73 puede alternativamente o además también probarse en un ensayo celular (utilizando células que expresan CD73). De manera ventajosa, los anticuerpos se pueden probar o examinar primero en el ensayo libre de célula para identificar anticuerpos que bloquean la actividad de la enzima para reducir la probabilidad de seleccionar anticuerpos que inhiban CD73 ocasionando la internalización de CD73, y después probarse como anticuerpo purificado en ensayos celulares. Los ensayos celulares se pueden llevar a cabo como se muestra en los presentes Ejemplos. Por ejemplo, una línea celular que expresa CD73 (por ejemplo, línea celular MDA-MB-231) se coloca en placas de 96 pocillos de fondo plano en presencia de anticuerpos anti-CD73 y se incuban. AMP se agrega a las células y se incuban a 4°C (para evitar la modulación descendente de CD73). Las placas después son centrifugadas y el sobrenadante es transferido a la placa de cultivo de 96 pocillos de fondo plano. Después se cuantifica el fosfato libre producido por medio de la hidrólisis de AMP en adenosina. Una disminución en la hidrólisis de AMP en adenosina en presencia de anticuerpo indica que el anticuerpo inhibe CD73 celular.

En una modalidad, una preparación de anticuerpo ocasiona al menos una disminución del 50% en la actividad enzimática de un polipéptido de CD73, de preferencia al menos una disminución del 60%, 70% u 80% en la actividad enzimática de un polipéptido de CD73 (por ejemplo, un polipéptido de CD73 homodimérico soluble; CD73 expresado por células).

La actividad de un anticuerpo también se puede medir en un ensayo indirecto para su capacidad de modular la actividad de linfocitos, por ejemplo, para atenuar la inhibición mediada por adenosina de la actividad del linfocito, o para ocasionar la activación de la actividad del linfocito. Esto se puede resolver, por ejemplo, utilizando un ensayo de liberación de citocina. En otro ejemplo, un anticuerpo se puede evaluar en un ensayo indirecto por su capacidad de modular la proliferación de linfocitos.

El anticuerpo se puede probar por su capacidad de internalizar o inducir la modulación descendente de CD73, por ejemplo, bien por internalización o por inducción de desprendimiento de CD73 de la superficie celular. Si un anticuerpo anti-CD73 se internaliza después de unirse en una célula de mamífero, o si un polipéptido de CD73 experimenta internalización intracelular (por ejemplo, después de estar unido por un anticuerpo) se puede determinar por medio de varios ensayos que incluyen esos descritos en los ejemplos experimentales en la presente (por ejemplo, el Ejemplo 7). En otros ejemplos, para probar la internalización *in vivo*, el anticuerpo de prueba es marcado e introducido en un animal que se sabe que tiene CD73 expresado en la superficie de ciertas células. El anticuerpo se puede radiomarcarse o marcar con fluorescencia o partículas de oro, por ejemplo. Los animales adecuados para este ensayo incluye un mamífero tal como un ratón desnudo que contiene un trasplante de tumor que expresa CD73 humano o xenoinsero, o un ratón en el cual las células transfectadas con CD73 humano han sido introducidas, o un ratón transgénico que expresa el transgén de CD73 humano. Los controles apropiados incluyen animales que no recibieron el anticuerpo de prueba y que recibieron un anticuerpo no relacionado, y los animales que recibieron un anticuerpo a otro antígeno en las células de interés, cuyo anticuerpo se sabe que está internalizado después de la unión al antígeno. El anticuerpo se puede administrar al animal, por ejemplo, por medio de inyección intravenosa. En intervalos de tiempo adecuados, las secciones de tejido del animal se pueden preparar utilizando procedimientos conocidos o como se describió en los ejemplos experimentales más adelante, y analizados mediante microscopía óptica o microscopía electrónica, para internalización así como la ubicación del anticuerpo internalizado en la célula. Para internalización *in vitro*, las células se pueden incubar en placas de cultivo de tejido en presencia o ausencia de los anticuerpos relevantes agregados al medio de cultivo y procesados para análisis microscópico en puntos de tiempo deseados. La presencia de un anticuerpo marcado, internalizado en las células puede visualizarse directamente por medio del microscopio o por autorradiografía si se utiliza el anticuerpo radiomarcado. Opcionalmente, en el microscopio, pueden valorarse la co-localización con un polipéptido conocido u otro componente celular; por ejemplo, la co-localización con marcador endosómico/lisosómico LAMP-1 (CD107a) puede proporcionar información acerca de la localización subcelular del anticuerpo internalizado. Alternativamente, en un ensayo bioquímico cuantitativo, una población de células que comprende células que expresan CD73 son puestas en contacto *in vitro* o *in vivo* con un anticuerpo de prueba radiomarcado y las células (si hicieron contacto *in vivo*, las células son después aisladas tras una cantidad adecuada de tiempo) son tratadas con una proteasa o sometidas a un lavado ácido para eliminar un anticuerpo no internalizado en la superficie celular. Las células son trituradas y se mide la cantidad de proteasa resistente, conteos radioactivos por minuto (cpm) asociados con cada lote de células pasando el homogeneizado a través de un contador de centelleo. En función de la actividad específica conocida del anticuerpo radiomarcado, el número de moléculas del anticuerpo internalizadas por célula se puede deducir a partir de los conteos de centelleo de las células molidas. Las células son "puestas en contacto" con un anticuerpo *in vitro* de preferencia en forma de solución tal como agregando las células al medio de cultivo celular en la placa de cultivo o matraz y mezclando el pocillo del anticuerpo con el medio para asegurar la exposición uniforme de las células al anticuerpo.

Epítopes del anticuerpo

En un aspecto, los anticuerpos se unen a un determinante antigénico común presente en ambos, CD73 soluble y CD73 expresado en la superficie celular.

En un aspecto, los anticuerpos se unen sustancialmente al mismo epítipo que el anticuerpo 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1. En una modalidad, los anticuerpos se unen a un epítipo de CD73 que al menos parcialmente se superpone con, o incluye al menos un residuo en, el epítipo unido por el anticuerpo 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1. Los residuos unidos por el anticuerpo pueden especificarse como que están presentes en la superficie del polipéptido de CD73, por ejemplo, en un polipéptido de CD73 expresado en la superficie de una célula. Los residuos aminoácidos en CD73 unido por el anticuerpo se pueden seleccionar por ejemplo del grupo que consiste en los residuos listados en la Tabla 1.

La unión del anticuerpo anti-CD73 a células transfectadas con CD73 mutantes puede medirse y compararse con la capacidad del anticuerpo anti-CD73 para unirse al polipéptido de CD73 del tipo silvestre (por ejemplo, SEQ ID NOS: 1 o 2). Una reducción en la unión entre un anticuerpo anti-CD73 y un polipéptido de CD73 mutante (por ejemplo, un CD73 mutante de la Tabla 1) significa que hay una reducción en la afinidad de unión (por ejemplo, como se midió por medio de procedimientos conocidos tales como prueba FACS de células que expresan un mutante particular, o por medio de la prueba Biacore de unión a polipéptidos mutantes) y/o una reducción en la capacidad de unión total del anticuerpo anti-CD73 (por ejemplo, como se evidenció por medio de una disminución en Bmax en un diagrama de concentración de anticuerpo anti-CD73 frente a la concentración de polipéptido). Una reducción significativa en la unión indica que el residuo mutado está directamente involucrado en la unión al anticuerpo anti-CD73 o está en estrecha proximidad a la proteína de unión cuando el anticuerpo anti-CD73 está unido a CD73.

En algunos aspectos, una reducción significativa en la unión significa que la afinidad y/o capacidad de unión entre un

5 anticuerpo anti-CD73 y un polipéptido de CD73 mutante se reduce en más de 40%, más de 50%, más de 55%, más de 60%, más de 65%, más de 70%, más de 75%, más de 80%, más de 85%, más de 90% o más de 95% en relación a la unión entre el anticuerpo y un polipéptido de CD73 tipo silvestre. En ciertos aspectos, la unión es reducida por debajo de límites detectables. En algunas modalidades, una reducción significativa en la unión se evidencia cuando la unión de un anticuerpo anti-CD73 a un polipéptido de CD73 mutante es menor de 50% (por ejemplo, menos de 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15% o 10%) de la unión observada entre el anticuerpo anti-CD73 y un polipéptido de CD73 del tipo silvestre.

10 En algunos aspectos, se proporcionan los anticuerpos anti-CD73 que muestran unión significativamente más baja para un polipéptido de CD73 mutante en el cual un residuo en un segmento que comprende un residuo aminoácido unido por medio del anticuerpo 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1 es sustituido con un aminoácido diferente. En un aspecto, el mutante es un mutante seleccionado de los mutantes 1-15 de la Tabla 1, por ejemplo, mutante 3, o a un mutante que comprende una o más de las sustituciones de aminoácidos de tal mutante 3, en comparación con la unión a un polipéptido de CD73 de tipo silvestre (por ejemplo, el polipéptido de SEQ ID NO: 1).

15 Opcionalmente un anticuerpo que pierde unión a uno o más mutantes de los mutantes 1-15 no muestra unión significativamente más baja para uno o más polipéptidos de CD73 mutantes de la Tabla 1, por ejemplo, uno o más (o todos) de los mutantes 2, 5, 6 o 7.

En un aspecto, los anticuerpos anti-CD73 tienen unión reducida a un polipéptido de CD73 que tiene una mutación en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: A99, E129, K133, E134 y A135 (con referencia a la SEQ ID NO. 1); opcionalmente, el polipéptido de CD73 mutante tiene las mutaciones: A99S, E129A, K133A, E134N y A135S.

20 Opcionalmente, en un aspecto, los anticuerpos anti-CD73 no tienen unión reducida a un polipéptido de CD73 que tiene una mutación en un residuo seleccionado del grupo que consiste en: Q70, R73, A74, A107 y R109 (con referencia a la SEQ ID NO: 1); opcionalmente, el polipéptido de CD73 mutante tiene las mutaciones: A99S, Q70S, R73A, A74E, A107I y R109G.

25 En un aspecto, los anticuerpos anti-CD73 se unen a un epítipo en CD73 que comprende uno, dos, tres, cuatro o cinco de los residuos seleccionados del grupo que consiste en A99, E129, K133, E134 y A135 (con referencia a la SEQ ID NO: 1).

Opcionalmente, en un aspecto, los anticuerpos anti-CD73 no se unen a un epítipo en CD73 que comprende uno, dos, tres, cuatro o cinco de los residuos seleccionados del grupo que consiste en Q70, R73, A74, A107 y R109 (con referencia a la SEQ ID NO: 1).

30 Secuencias de CDR de anticuerpo

Anticuerpo 11E1

35 La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 11E1 está listada como SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera está listada como SEQ ID NO: 4. En un aspecto específico, la descripción proporciona un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo o determinante que los anticuerpos monoclonales 11E1; opcionalmente el anticuerpo comprende la región hipervariable del anticuerpo 11E1. En cualquiera de los aspectos en la presente, el anticuerpo 11E1 puede estar caracterizado por las secuencias de aminoácidos y/o secuencias de ácido nucleico que lo codifican. En un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende la porción Fab o F(ab')₂ de 11E1. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende la región variable de cadena pesada de 11E1. De acuerdo con un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende las CDR de la región variable de cadena pesada de 11E1. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende además la región variable de cadena ligera variable de 11E1 o una, dos o tres de las CDR de la región variable de cadena ligera de 11E1. Opcionalmente cualquiera de una o más CDR de cadena pesada o ligera puede contener una, dos, tres, cuatro o cinco o más modificaciones de aminoácido (por ejemplo, sustituciones, inserciones o supresiones). Opcionalmente, se proporciona un anticuerpo donde cualquiera de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera que comprende parte o toda la región de unión a antígeno del anticuerpo 11E1 se fusiona con una región constante de inmunoglobulina del tipo IgG humano, opcionalmente una región constante humana, opcionalmente un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humano, que opcionalmente comprende además una sustitución de aminoácido para reducir la función efectora (unión a receptores Fcγ humanos).

50 En otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende: una región HCDR1 de 11E1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la Tabla A, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos del mismo, opcionalmente en donde uno o más de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; una región HCDR2 de 11E1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la Tabla A, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, opcionalmente en donde uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región HCDR3 de 11E1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la Tabla A, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, opcionalmente en donde uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido

diferente; una región LCDR1 de 11E1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la Tabla A, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, opcionalmente en donde uno o más de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; una región LCDR2 de 11E1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la Tabla A, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, opcionalmente en donde uno o más de estos aminoácidos se pueden sustituir por un aminoácido diferente; una región LCDR3 de 11E1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la Tabla A, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, opcionalmente en donde uno o más de estos aminoácidos pueden suprimirse o sustituirse por un aminoácido diferente. Las secuencias HCDR1, 2, 3 y LCDR1, 2, 3 pueden opcionalmente especificarse como que son todas (o cada uno de manera independiente) las del sistema de numeración Kabat (como se indicó en la Tabla A para cada CDR), las del sistema de numeración Chotia como se indicó en la Tabla A para cada CDR), las del sistema de numeración IMGT como se indicó en la Tabla A para cada CDR), o cualquier otro sistema de numeración adecuada.

Anticuerpo 6E1

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 6E1 se lista como SEQ ID NO: 21, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera se lista como la SEQ ID NO: 22. En un aspecto específico, la descripción proporciona un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo o determinante que los anticuerpos monoclonales 6E1; opcionalmente el anticuerpo comprende la región hipervariable del anticuerpo 6E1. En cualquiera de los presentes aspectos, el anticuerpo 6E1 puede caracterizarse por las secuencias de aminoácidos y/o secuencias de ácido nucleico que lo codifican. En un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende la porción Fab o F(ab')₂ de 6E1. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende la región variable de cadena pesada de 6E1. De acuerdo con un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende las tres CDR de la región variable de cadena pesada de 6E1. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende además la región variable de cadena ligera variable de 6E1 o una, dos o tres de las CDR de la región variable de cadena ligera de 6E1. Opcionalmente cualquiera de uno o más de tales CDR de cadena pesada o ligera pueden contener una, dos, tres, cuatro o cinco o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, inserciones o supresiones). Opcionalmente, se proporciona un anticuerpo donde cualquiera de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera que comprende parte o todo de una región de unión a antígeno del anticuerpo 6E1 se fusionan a una región constante de inmunoglobulina del tipo IgG humano, opcionalmente una región constante humana, opcionalmente un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humano, que opcionalmente además comprende una sustitución de aminoácido para reducir la función efectora (de unión a receptores Fcγ humanos)

En otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende: una región HCDR de 6E1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la Tabla A, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, opcionalmente en donde uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región HCDR2 de 6E1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la Tabla A, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, opcionalmente en donde uno o más de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; una región HCDR3 de 6E1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la Tabla A, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, opcionalmente en donde uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR1 de 6E1, que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la Tabla A, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, opcionalmente en donde uno o más de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; una región LCDR2 de 6E1, que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la Tabla A, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, opcionalmente en donde uno o más de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente; una región LCDR3 de 6E1, que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la Tabla A, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, opcionalmente en donde uno o más de estos aminoácidos pueden sustituirse por un aminoácido diferente. Las secuencias HCDR1, 2, 3 y LCDR1, 2, 3 se pueden especificar opcionalmente como todas (o cada una independientemente) las del sistema de numeración Kabat (como se indica en la Tabla A para cada CDR), las del sistema de numeración Chotia como se indicó en la Tabla A para cada CDR), las del sistema de numeración IMGT como se indica en la Tabla A para cada CDR), o cualquier otro sistema de numeración adecuado.

Anticuerpo 3C12

La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3C12 se lista como SEQ ID NO: 36, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera se enumera como SEQ ID NO: 37. En un aspecto específico, la descripción proporciona un anticuerpo que se une esencialmente al mismo epítipo o determinante que los anticuerpos monoclonales 3C12; opcionalmente el anticuerpo comprende la región hipervariable del anticuerpo 3C12. En cualquiera de los presentes aspectos, el anticuerpo 3C12 puede estar caracterizado por las secuencias de aminoácidos y/o secuencias de ácido nucleico que lo codifican. En un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende la porción Fab o F(ab'), de 3C12. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende la región variable de cadena pesada de 3C12. De acuerdo con un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende las tres CDR de la región variable de cadena pesada de 3C12. También se proporciona un

- anticuerpo monoclonal que comprende además la región variable de cadena ligera variable de 3C12 o una, dos o tres de las CDR de la región variable de cadena ligera de 3C12. Opcionalmente cualquiera de una o más de tales CDR de cadena ligera o suave puede contener una, dos, tres, cuatro o cinco o más modificaciones de aminoácido (por ejemplo, sustituciones, inserciones o eliminaciones). Opcionalmente, se proporciona un anticuerpo donde cualquiera de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera que comprende parte o toda de una región de unión a antígeno del anticuerpo 3C12 se fusionan a una región constante de inmunoglobulina del tipo IgG humano, opcionalmente una región constante humana, opcionalmente un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humano, que opcionalmente comprende además una sustitución de aminoácido para reducir la función efectora (unión a receptores Fc γ humanos).
- En otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende: una región HCDR1 de 3C12 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la Tabla A, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, opcionalmente en donde uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región HCDR2 de 3C12 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la Tabla A, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, opcionalmente en donde uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región HCDR3 de 3C12 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la Tabla A, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, opcionalmente en donde uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR1 de 3C12 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la Tabla A, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, opcionalmente en donde uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR2 de 3C12 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la Tabla A, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos del mismo, opcionalmente en donde uno o más de estos aminoácidos pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR3 de 3C12 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la Tabla A, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, opcionalmente en donde uno o más de estos aminoácidos pueden eliminarse o sustituirse por un aminoácido diferente. Las secuencias HCDR1, 2, 3 y LCDR1, 2, 3 pueden opcionalmente especificarse como todas (o cada una, de manera independiente) del sistema de numeración Kabat (como se indicó en la Tabla A para cada CDR), del sistema de numeración Chotia como se indicó en la Tabla A para cada CDR), del sistema de numeración IMGT como se indicó en la Tabla A para cada CDR), o cualquier otro sistema de numeración adecuado.

Anticuerpo 8C7

- La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 8C7 se lista como SEQ ID NO: 28, la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera se lista como la SEQ ID NO: 29. En un aspecto específico, la descripción proporciona un anticuerpo que une esencialmente el mismo epítipo o determinante como anticuerpos monoclonales 8C7; opcionalmente el anticuerpo comprende la región hipervariable del anticuerpo 8C7. En cualquiera de los aspectos en la presente, el anticuerpo 8C7 se puede caracterizar por las secuencias de aminoácido y/o secuencias de ácido nucleico que lo codifican. En un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende la porción Fab o F(ab')₂ de 8C7. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende la región variable de cadena pesada de 8C7. De acuerdo con un aspecto, el anticuerpo monoclonal comprende las tres CDR de la región variable de cadena pesada de 8C7. También se proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende además la región variable de cadena ligera variable de 8C7 o una, dos o tres de las CDR de la región variable de cadena ligera de 8C7. Opcionalmente cualquiera de una o más de tales CDR de cadena pesada o ligera puede contener una, dos, tres, cuatro o cinco o más modificaciones de aminoácido (por ejemplo, sustituciones, inserciones o eliminaciones). Opcionalmente, se proporciona un anticuerpo donde cualquiera de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera que comprenden parte o toda de una región de unión a antígeno del anticuerpo 8C7 se fusionan a una región constante de inmunoglobulina del tipo IgG humano, opcionalmente una región constante humana, opcionalmente un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humano, que opcionalmente comprende además una sustitución de aminoácido para reducir la función efectora (de unión a receptores Fc γ humano).
- En otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende: una región HCDR1 de 8C7 que comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la Tabla A, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, opcionalmente en donde uno o más de estos aminoácidos puede ser sustituido por un aminoácido diferente; una región HCDR2 de 8C7 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la Tabla A, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, opcionalmente en donde uno o más de estos aminoácidos puede ser sustituido por un aminoácido diferente; una región HCDR3 de 8C7 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la Tabla A, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, opcionalmente en donde uno o más de estos aminoácidos puede ser sustituido por un aminoácido diferente; una región LCDR1 de 8C7 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la Tabla A, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, opcionalmente en donde uno o más de estos aminoácidos puede ser sustituido por un aminoácido diferente; una región LCDR2 de 8C7 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la Tabla A, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, opcionalmente en donde uno o más de estos aminoácidos pueden ser

5 sustituidos por un aminoácido diferente; una región LCDR3 de 8C7 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la Tabla A, o una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de la misma, opcionalmente en donde uno o más de estos aminoácidos pueden eliminarse o sustituirse por un aminoácido diferente. Las secuencias HCDR1, 2, 3 y LCDR1, 2, 3 pueden opcionalmente especificarse como todas (o cada una, de manera independiente) del sistema de numeración Kabat (como se indicó en la Tabla A para cada CDR), del sistema de numeración Chotia como se indicó en la Tabla A para cada CDR), del sistema de numeración IMGT como se indicó en la Tabla A para cada CDR), o cualquier otro sistema de numeración adecuado.

En otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo que se une a CD73 humano que comprende:

10 (a) las regiones hipervariables de la región variable de cadena pesada de las SEQ ID NO: 3, 21, 28 o 36, opcionalmente en donde uno, dos, tres o más aminoácidos son sustituidos por un aminoácido diferente; y (b) las regiones hipervariables de la región variable de cadena ligera de las SEQ ID NO: 3, 22, 29 o 37, opcionalmente en donde uno, dos, tres o más aminoácidos son sustituidos por un aminoácido diferente.

En otro aspecto, la descripción proporciona un anticuerpo que se une a CD73 humano que comprende:

15 (a) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada como se muestra en cualquiera de las SEQ ID NO: 5-7 o 30-32, opcionalmente en donde uno, dos, tres o más aminoácidos en una CDR pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente;

(b) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada como se muestra en cualquiera de las SEQ ID NO: 8-10, 23, 24 o 23, opcionalmente en donde uno, dos, tres o más aminoácidos en una CDR pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente;

20 (c) una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada como se muestra en cualquiera de las SEQ ID NO: 11-13, 25 o 27, opcionalmente en donde uno, dos, tres o más aminoácidos en una CDR pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente;

(d) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera como se muestra en cualquiera de las SEQ ID NO: 14, 15, 16, 34 o 35 opcionalmente en donde uno, dos, tres o más aminoácidos en una CDR pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente;

25 (e) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera como se muestra en cualquiera de las SEQ ID NO: 17 o 18, opcionalmente en donde uno, dos, tres o más aminoácidos en una CDR pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente; y/o

(f) una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera como se muestra en cualquiera de las SEQ ID NO: 19 o 20, opcionalmente en donde uno, dos, tres o más aminoácidos en una CDR pueden ser sustituidos por un aminoácido diferente.

30

En otro aspecto de cualquiera de los aspectos en la presente, cualquiera de las CDR 1, 2 y 3 de las cadenas ligera y pesada de 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1 se pueden caracterizar por una secuencia de al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos de las mismas, y/o como una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad de la secuencia con la CDR particular o el conjunto de CDR listados en la SEQ ID NO correspondiente.

35

En un aspecto de cualquiera de los aspectos en la presente, cualquier anticuerpo puede comprender una cadena ligera y/o pesada que tiene secuencias de CDR1, 2 y/o 3 de acuerdo con la fórmula respectiva seleccionada de las Fórmulas respectivas (I) a (V). En cualquiera de los presentes aspectos una HCDR1-3 o LCDR-1-3 particular puede especificarse como una secuencia de las Fórmulas respectivas (I) a (VI). En un aspecto preferido, el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende las tres LCDR y una cadena pesada que comprende las tres HCDR.

40

En un aspecto, HCDR1 comprende una secuencia de aminoácidos de la Fórmula (I):

S - Y - N - M - Xaa₁ (SEQ ID NO: 38),

45 en donde Xaa₁ puede ser una sustitución conservadora o no conservadora de cualquiera de los aminoácidos indicados o una eliminación o inserción, opcionalmente en donde Xaa₁ es Y (Tyr) o N (Asn).

En un aspecto, HCDR2 comprende una secuencia de aminoácidos de la Fórmula (IIa):

Y - I - D - P - Y - N - G - G - Xaa₂ - S - Y - N - Xaa₃ - Xaa₄ - F - K - G (SEQ ID NO: 39), o una sub-secuencia de la misma, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la Fórmula (IIb):

Y - I - D - P - Y - N - G - G - Xaa₂ (SEQ ID NO: 40)

50 en donde Xaa₂ puede ser una sustitución conservadora o no conservadora de cualquiera de los aminoácidos indicados o una eliminación o inserción, opcionalmente en donde Xaa₂ es S (Ser) o T (Thr); en donde Xaa₃ puede ser una sustitución conservadora o no conservadora de cualquiera de los aminoácidos indicados o una eliminación o inserción, opcionalmente en donde Xaa₃ es Q (Gln) o L (Leu); en donde Xaa₄ puede ser una sustitución conservadora o no conservadora de cualquiera de los aminoácidos indicados o una eliminación o inserción, opcionalmente en donde Xaa₄ es K (Lys) o T (Thr).

55

En un aspecto, HCDR3 comprende una secuencia de aminoácidos de la Fórmula (III):

G - Y - Xaa₅ - N - Y - K - A - W - F - A - Y (SEQ ID NO: 41),

en donde Xaa₅ puede ser una sustitución conservadora o no conservadora de cualquiera de los aminoácidos indicados o una eliminación o una inserción, opcionalmente en donde Xaa₅ es G (Gly) o N (Asn).

En un aspecto, LCDR1 comprende una secuencia de aminoácidos de la fórmula (IV)

K - A - S - Q - S - V - Xaa₆ - N - D - V - A (SEQ ID NO: 42),

en donde Xaa₆ puede ser una sustitución conservadora o no conservadora de cualquiera de los aminoácidos indicados o una eliminación o inserción, opcionalmente en donde Xaa₆ es T (Thr) o S (Ser).

5 En un aspecto, LCDR2 comprende una secuencia de aminoácidos de la Fórmula (V):

Y - A - S - Xaa₇ - R - Y - T (SEQ ID NO: 43),

en donde Xaa₇ puede ser una sustitución conservadora o no conservadora de cualquiera de los aminoácidos indicados o una eliminación o una inserción, opcionalmente en donde Xaa₇ es T (Thr) o N (Asn)

En un aspecto, LCDR3 comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 o 20.

10 En un aspecto, un anticuerpo puede comprender una cadena pesada que comprende:

a. una CDR1 de cadena pesada (HCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38; y/o

b. una CDR2 de cadena pesada (HCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 (o 40); y/o

15 c. una CDR3 de cadena pesada (HCDR3) que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 41.

En una modalidad, un anticuerpo puede comprender una cadena ligera que comprende:

a. una CDR1 de cadena ligera (LCDR1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ ID NO: 42; y/o

b. una CDR2 de cadena ligera (LCDR2) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43; y/o

20 c. una CDR3 de cadena ligera (LCDR3) que comprenden una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 o 20.

En cualquiera de los anticuerpos, por ejemplo, 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1, la región variable especificada y secuencias de CDR pueden comprender modificaciones de secuencia, por ejemplo, una sustitución (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más modificaciones de secuencia). En un aspecto, unas CDR 1, 2 y/o 3 de las cadenas ligera y pesada comprenden una, dos, tres o más sustituciones de aminoácido, donde el residuo sustituido es un residuo presente en una secuencia de origen humano. En un aspecto la sustitución es una modificación conservadora. Una modificación de secuencia conservadora se refiere a una modificación de aminoácido que no afecta o altera de manera significativa las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y supresiones de aminoácidos. Las modificaciones se pueden introducir a un anticuerpo por medio de técnicas estándar conocidas en este campo, tal como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras son típicamente esas en las cuales un residuo de aminoácido es reemplazado con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral con propiedades fisicoquímicas similares. Las secuencias de región variable y CDR específicas pueden comprender una, dos, tres, cuatro o más inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos. En donde se realizan sustituciones, de preferencia las sustituciones serán modificaciones conservadoras. Las familias de residuos aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. 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 sin carga (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 de beta ramificada (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones de CDR de un anticuerpo pueden remplazarse con otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadena lateral y el anticuerpo alterado pueden probarse para función retenida (es decir, las propiedades establecidas en la presente) utilizando los ensayos aquí descritos.

45 Las secuencias de las CDR, de acuerdo con los sistemas de definiciones IMGT, Kabat y Chothia, se han resumido en la Tabla A más adelante. Las secuencias de las regiones variables de los anticuerpos están listadas en la Tabla B más adelante (si las secuencias líder están presentes cualquier cadena de anticuerpo puede especificarse para iniciar en la posición del aminoácido siguiendo el final de la secuencia líder), y cada CDR destacada. En cualquiera de los presentes aspectos, una secuencia VL o VH puede especificarse o numerarse de manera que contenga o carezca de un péptido de señal o cualquier parte de la misma.

50

Tabla A

mAb	definición de CDR	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID	Secuencia	SEQ ID	Secuencia	SEQ ID	Secuencia
1E11	Kabat	5	SYNMY	8	YIDPYNGGTSYNQKFKG	11	GYGNYKAWFAY
	Chotia	6	GYAFTSY	9	PYNG	12	YGNYKAWFA
	IMGT	7	GYAFTSYN	10	IDPYNGGT	13	ARGYGNKAW FAY
6E1	Kabat	5	SYNMY	23	YIDPYNGGSSYNQKFKG	25	GYNNYKAWFAY
	Chotia	6	GYAFTSY	9	PYNG	26	YNNYKAWFA
	IMGT	7	GYAFTSYN	24	IDPYNGGS	27	ARGYNNYKAW FAY
8C7	Kabat	30	SYNMN	33	YIDPYNGGSSYNLTFKG	11	GYGNYKAWFAY
	Chotia	31	GYAFASY	9	PYNG	12	YGNYKAWFA
	IMGT	32	GYAFASYN	24	IDPYNGGS	13	ARGYGNKAWFAY
3C12	Kabat	30	SYNMN	33	YIDPYNGGSSYNLTFKG	11	GYGNYKAWFAY
	Chotia	31	GYAFASY	9	PYNG	12	YGNYKAWFA
	IMGT	32	GYAFASYN	24	IDPYNGGS	13	ARGYGNKAWFAY
mAb	definición de CDR	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		SEQ	Secuencia	SEQ	Secuencia	SEQ ID	Secuencia
1E11	Kabat	14	KASQSVTNDV A	17	YASNRYT	19	QQDYSSLT
	Chotia	15	SQSVTND	18	YAS	20	DYSSL
	IMGT	16	QSVTND	18	YAS	19	QQDYSSLT
6E1	Kabat	14	KASQSVTNDV A	17	YASNRYT	19	QQDYSSLT

(continuación)

mAb	definición de CDR	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID	Secuencia	SEQ ID	Secuencia	SEQ ID	Secuencia
	Chotia	15	SQSVTND	18	YAS	20	DYSSL
	IMGT	16	QSVTND	18	YAS	19	QQDYSSLT
8C7	Kabat	44	KASQSVSNDV A	17	YASTRYT	19	QQDYSSLT
	Chotia	34	SQSVSND	18	YAS	20	DYSSL
	IMGT	35	QSVSND	18	YAS	19	QQDYSSLT
3C12	Kabat	44	KASQSVSNDV A	17	YASTRYT	19	QQDYSSLT
	Chotia	34	SQSVSND	18	YAS	20	DYSSL
	IMGT	35	QSVSND	18	YAS	19	QQDYSSLT

Tabla B

	SEQ ID NO:	Secuencia de Aminoácido
11E1 VH	3	EIQLQQSGPELVKPGASVKVSKASGYAFTSYNMYWVKQSHGKSLE WIGYIDPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNSLTSEDSAV YYCARGYGNKAWFAYWGQGLVTVSA
11E1 VL	4	DAVMTQTPKFLVLSAGDRVTITCKASQSVTNDVAWYQQKPGQSPKLL IYYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSL TFGAGTKLELK
6E1 VH	21	EFQLQQSGPELVKPGASVKVSKASGYAFTSYNMYWVKQSHGKRLE WIGYIDPYNGGSSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNLSLTSEDSAV YYCARGYNNYKAWFAYWGQGLVTVSA
6E1 VL	22	SIVMTQTPKFLVLSAGDRVTITCKASQSVTNDVAWYQQKPGQSPKLLI YYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFFTISTMQAEDLAVYFCQQDYSSL TFGAGTKLELK
8C7 VH	28	EVQLQQSGPELVKPGASVKVSKASGYAFASYNMNWVKQSHGKSL DWIGYIDPYNGGSSYNLTFKGGKATLTVDKSSTAYMHLNSLTSEDSAV YYCARGYGNKAWFAYWGQGLVTVSAASTKGP
8C7 VL	29	SIVMTPTPKFLVLSAGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLI YYASTRYTGVPDRFTGSGYGTDFFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSL TFGAGTKLELKRTVAAP
3C12 VH	36	QIQLQQSGPELVKPGASVKVSKASGYAFASYNMNWVKQSHGKSLD WIGYIDPYNGGSSYNLTFKGGKATLTVDKSSTAYMHLNSLTSEDSAVY YCARGYGNKAWFAYWGQGLVTVSAASTKGP
3C12 VL	37	DVVMTPKFLVLSAGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLL IYYASTRYTGVPDRFTGSGYGTDFFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSL TFGAGTKLELKRTVAAP

Los fragmentos y derivados de anticuerpos (los cuales están abarcados por el término “anticuerpo” o “anticuerpos” como se utilizan en esta solicitud, a menos que se manifieste de otra manera o claramente se contradiga por el contexto) pueden producirse por técnicas que son conocidas en este campo. Los “fragmentos” comprenden una porción del anticuerpo intacto, generalmente el sitio de unión a antígeno o región variable. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; cualquier fragmento de anticuerpo que es un polipéptido que tiene una estructura primaria que consiste en una secuencia ininterrumpida de residuos aminoácidos contiguos (aquí referidos como un “fragmento de anticuerpo de cadena simple” o “polipéptido de cadena simple”), que incluye sin limitación (1) moléculas Fv de cadena simple (2) polipéptidos de cadena simple que contienen únicamente un dominio variable de cadena ligera, o un fragmento del mismo que contenga las tres CDR del dominio variable de cadena ligera, sin una fracción de cadena pesada asociada y (3) polipéptidos de cadena simple que contienen únicamente una región variable de cadena pesada, o un fragmento de la misma que contenga las tres CDR de la región variable de cadena pesada, sin una fracción de cadena ligera asociada; y anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos) formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Se encuentran incluidos, *inter alia*, un nanocuerpo, anticuerpo de dominio, anticuerpo de dominio simple o un “dAb”.

En ciertas modalidades, el ADN de un hibridoma que produce un anticuerpo se puede modificar antes de la inserción en un vector de expresión, por ejemplo, al sustituir con la secuencia de codificación de dominios constantes de cadena ligera y pesada humanos en lugar de secuencias homólogas no humanas (por ejemplo, Morrison et al., PNAS pp. 6851 (1984)), o al unir de manera covalente a la secuencia de codificación de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido distinto de inmunoglobulina. De esa manera, se preparan anticuerpos “quimérico” o “híbrido” que tienen la especificidad de unión del anticuerpo original. Típicamente, tales polipéptidos distintos de inmunoglobulina sustituyen los dominios constantes de un anticuerpo.

Opcionalmente un anticuerpo es humanizado. Las formas “humanizadas” de anticuerpos son cadenas de inmunoglobulina, inmunoglobulinas quiméricas específicas o fragmentos de las mismas (tal como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂, u otras sub-secuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen mínima secuencia derivada de la

inmunoglobulina murina. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor son reemplazados por residuos de una CDR del anticuerpo original (anticuerpo donante) manteniendo al mismo tiempo la especificidad deseada, afinidad y capacidad del anticuerpo original.

5 En algunos ejemplos, los residuos de marco conservado Fv de la inmunoglobulina humana pueden reemplazarse por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no son encontrados ya sea en el anticuerpo receptor o en las secuencias de CDR o marco conservado importadas. Estas modificaciones están hechas para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las del anticuerpo original y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales ver Jones et al., *Nature*, 321, pp. 522 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332, pp. 323 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2, pp. 593 (1992); Verhoeven et Science, 239, pp. 1534; y Patente de los Estados Unidos N.º 4.816.567). Los procedimientos para humanizar los anticuerpos son bien conocidos en la técnica.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligero como pesado, a utilizarse en la elaboración de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado procedimiento de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo es examinada contra la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humano. La secuencia humana que es la más cercana a la del ratón es entonces aceptada como el marco conservado humano (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.* 151, pp. 2296 (1993); Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196, 1987, pp. 901). Otro procedimiento utiliza un marco conservado particular de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas pesada y ligera. El mismo marco conservado puede utilizarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *PNAS* 89, pp. 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151, p. 2623 (1993)).

Es además importante que los anticuerpos sean humanizados con retención de alta afinidad para CD73 y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr esta meta, de acuerdo con un procedimiento, los anticuerpos humanizados son preparados por medio de un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales que utilizan modelos tridimensionales de las secuencias humanizadas y parentales. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan probables estructuras tridimensionales de secuencias de inmunoglobulina candidata seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos FR se pueden seleccionar y combinar a partir del consenso e importar secuencias de manera que la característica deseada del anticuerpo, tal como afinidad aumentada para el antígeno de objetivo, se logra. En general, los residuos de CDR están directamente y más sustancialmente involucrados en influir en la unión a antígeno.

Otro procedimiento para elaborar anticuerpos monoclonales "humanizados" es utilizar un XenoMouse (Abgenix, Fremont, CA) como el ratón utilizado para la inmunización. Un XenoMouse es un huésped murino acorde del que sus genes de inmunoglobulina han sido reemplazados por genes de inmunoglobulina humana funcional. Por lo tanto, los anticuerpos producidos por este ratón o en hibridomas elaborados a partir de células B de este ratón, ya están humanizados. El XenoMouse está descrito en la Patente de los Estados Unidos N.º 6.162.963.

Los anticuerpos humanos también pueden producirse de acuerdo con otras varias técnicas, tal como utilizando, para inmunización, otros animales transgénicos que han sido diseñados para expresar un repertorio de anticuerpo humano (Jakobovitz et al., *Nature* 362 (1993) 255), o al seleccionar repertorios de anticuerpo utilizando procedimientos de presentación en fago. Tales técnicas son conocidas para la persona experta y pueden implementarse iniciando a partir de anticuerpos monoclonales conforme se describe en la presente solicitud.

Formulaciones de anticuerpo

50 Un anticuerpo anti-CD73 puede estar incorporado en una formulación farmacéutica comprendiendo en una concentración de 1 mg/ml a 500 mg/ml, en donde tal formulación tiene un pH de 2,0 a 10,0. La formulación puede comprender además un sistema de tampón, conservador o conservadores, agente o agentes de tonicidad, agente o agentes quelantes, estabilizadores y tensioactivos. En un aspecto, la formulación farmacéutica es una formulación acuosa, es decir la formulación comprende agua. Tal formulación es típicamente una solución o una suspensión. En un aspecto adicional, la formulación farmacéutica es una solución acuosa. La expresión "formulación acuosa" está definida como una formulación que comprende al menos 50% p/p de agua. De manera análoga, la expresión "solución acuosa" está definida como una solución que comprende al menos 50% p/p de agua y la expresión "suspensión acuosa" está definida como una suspensión que comprende al menos 50% p/p de agua.

En otro aspecto, la formulación farmacéutica es una formulación liofilizada, por medio de la cual el médico o el paciente agrega solventes y/o diluyentes antes del uso.

En otro aspecto, la formulación farmacéutica es una formulación seca (por ejemplo, liofilizada o secada por pulverización) lista para su uso sin ninguna disolución previa.

5 En un aspecto adicional, la formulación farmacéutica comprende una solución acuosa de tal anticuerpo, y un tampón, en donde el anticuerpo está presente en una concentración de 1 mg/ml o superior, y en donde tal formulación tiene un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 10,0.

En otro aspecto, el pH de la formulación está en el rango seleccionado de la lista que consiste en aproximadamente 2,0 a aproximadamente 10,0, aproximadamente 3,0 a aproximadamente 9,0, aproximadamente 4,0 a aproximadamente 8,5, aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0 y aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5.

10 En un aspecto adicional, el tampón es seleccionado del grupo que consiste en acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, fosfato de dihidrógeno sódico, fosfato de hidrógeno disódico, fosfato sódico y tris (hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o mezclas de los mismos. Cada uno de estos tampones específicos constituye un aspecto alternativo.

15 En un aspecto adicional, la formulación comprende además un conservante farmacéuticamente aceptable. En un aspecto adicional, la formulación comprende además un agente isotónico. En un aspecto adicional, la formulación también comprende un agente quelante. En un aspecto adicional la formulación comprende además un estabilizador. En un aspecto adicional, la formulación comprende además un tensioactivo. Por conveniencia se hace referencia a Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19ª edición, 1995.

20 Es posible que otros ingredientes puedan estar presentes en la formulación farmacéutica del péptido. Tales ingredientes adicionales pueden incluir agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes voluminizadores, modificadores de tonicidad, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo, albúmina de suero humano, gelatina o proteínas) y un zwitterión (por ejemplo, un aminoácido tal como betaína, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Tales ingredientes adicionales, por supuesto, no deben afectar
25 de manera adversa a la estabilidad global de la formulación farmacéutica.

Las composiciones farmacéuticas que contienen un anticuerpo pueden administrarse a un paciente que necesite tal tratamiento en varios sitios, por ejemplo, en sitios tópicos, por ejemplo, sitios de la mucosa y piel, en sitios que evitan la absorción, por ejemplo, administración en una arteria, en una vena, en el corazón, y en sitios que involucran absorción, por ejemplo, administración en la piel, bajo la piel, en un músculo o en el abdomen. La administración de
30 composiciones farmacéuticas puede ser a través de varias rutas de administración, por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago e intestino, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de los bronquiolos y alvéolos o una combinación de los mismos, epidérmica, cutánea, transdérmica, vaginal, rectal, ocular, por ejemplo, a través de la conjuntiva, ureteral, y parenteral a pacientes que necesitan tal tratamiento.

35 Las formulaciones de anticuerpo adecuadas también pueden determinarse al examinar experiencias con otros anticuerpos monoclonales terapéuticos desarrollados. Diversos anticuerpos monoclonales han mostrado ser eficientes en situaciones clínicas, tal como Rituxan (Rituximab), Herceptin (Trastuzumab) Xolair (Omalizumab), Bexxar (Tositumomab), Campath (Alemtuzumab), Zevalin, Oncolym y formulaciones similares se pueden utilizar con los anticuerpos. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal puede suministrarse en una concentración de 10 mg/ml ya sea en viales de 100 mg (10 ml) o 500 mg (50 ml) de un solo uso, formulados para administración IV en 9,0 mg/ml
40 de cloruro de sodio, 7,35 mg/ml de citrato de sodio dihidratado, 0,7 mg/ml de polisorbato 80 y agua estéril para inyección. El pH se ajusta a 6,5. En otro aspecto, el anticuerpo es suministrado en una formulación que comprende aproximadamente 20 mM de Na-Citrato, aproximadamente 150 nM de NaCl, en pH de aproximadamente 6,0.

Diagnóstico y tratamiento de tumores malignos

45 También se proporcionan procedimientos para tratar a un individuo, notablemente un paciente humano, al utilizar un anticuerpo anti-CD73 como se describió en la presente. En un aspecto, la descripción proporciona el uso de un anticuerpo como se describe en la presente en la preparación de una composición farmacéutica para administrar a un paciente humano. Típicamente, el paciente padece de, o está en riesgo de, cáncer.

Por ejemplo, en un aspecto, se proporciona un procedimiento para restaurar o potenciar la actividad de linfocitos en
50 un paciente que lo necesite, que comprende el paso de administrar un anticuerpo anti-CD73 neutralizante a tal paciente. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD73 humano o humanizado, cuyo anticuerpo reduce o anula la actividad 5'-nucleotidasa de CD73 humano. En un aspecto, el procedimiento dirigido a aumentar la actividad de linfocitos (por ejemplo, células T) en pacientes que tienen una enfermedad en la cual la actividad de linfocito aumentada es beneficiosa o que es causada o caracterizada por inmunosupresión, células
55 inmunosupresoras, o, por ejemplo, adenosina generada por células T CD4, células T CD8, células B). Los procedimientos serán particularmente útiles, por ejemplo, en pacientes que tienen un tumor sólido en el cual se sospecha que el microambiente tumoral (y producción en el mismo de adenosina mediada por CD73) puede contribuir a la falta de reconocimiento por el sistema inmunológico (escape inmunológico). El tumor puede, por

ejemplo, estar caracterizado por células inmunitarias que expresan CD73, por ejemplo, células T CD4, células T CD8, células B.

Muy específicamente, los procedimientos y composiciones se utilizan para el tratamiento de una variedad de cánceres y otras enfermedades proliferativas. Debido a que estos procedimientos operan reduciendo la adenosina que inhibe la actividad anti-tumoral de linfocitos y posiblemente de manera adicional al aumentar ATP que puede aumentar la actividad anti-tumoral de los linfocitos, estos son aplicables a un muy amplio rango de cánceres, que incluyen en particular tumores sólidos en los cuales la adenosina en el microambiente tumoral puede tener una función importante al inhibir la respuesta inmunológica anti-tumoral. En un aspecto, un paciente humano tratado con un anticuerpo anti-CD73 tiene cáncer de hígado, cáncer óseo, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de la cabeza o cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC), melanoma, cáncer uterino, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, linfoma que no es Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer de pene, tumores sólidos de la infancia, linfoma de linfocitos, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de pelvis renal, neoplasma del sistema nervioso central (SNC), linfoma SNC primario, angiogénesis tumoral, tumor de la columna vertebral, glioma del tronco encefálico, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de célula escamosa, cánceres inducidos por el medio ambiente que incluyen los inducidos por asbesto, neoplasias hematológicas que incluyen, por ejemplo, mieloma múltiple, linfoma de células B, linfoma de Hodgkin/linfoma de células B mediastinal primario, linfomas que no son Hodgkin, linfoma mielóide aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfática crónica, linfoma folicular, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de Burkitt, linfoma inmunoblástico de célula grande, linfoma B-linfoblástico precursor, linfoma de células de manto, leucemia linfoblástica aguda, micosis fungoide, linfoma de células grandes anaplásico, linfoma de células T, y linfoma T-linfoblástico precursor, y cualquier combinación de tales cánceres. La presente descripción también aplica al tratamiento de cánceres metastásicos. Los pacientes son sometidos a pruebas o seleccionados para uno o más de los atributos clínicos antes descritos antes de, durante o después del tratamiento.

En un aspecto, el anticuerpo anti-CD73 es administrado en una cantidad efectiva para lograr y/o mantener en un individuo (por ejemplo, durante 1, 2, 3, 4 semanas, y/o hasta la administración subsecuente del compuesto de unión a antígeno) una concentración de sangre de al menos la CE₅₀, opcionalmente la CE₇₀, opcionalmente de manera sustancial la CE₁₀₀, para neutralización de la actividad enzimática de CD73. En un aspecto, la cantidad activa del anticuerpo anti-CD73 es una cantidad efectiva para lograr la CE₅₀, opcionalmente la CE₇₀, opcionalmente la CE₁₀₀, para neutralización de la actividad enzimática de CD73 en un tejido extravascular de un individuo. En un aspecto, la cantidad activa del anticuerpo anti-CD73 es una cantidad efectiva para lograr (o mantener) en un individuo la CE₅₀, opcionalmente la CE₇₀, opcionalmente de manera sustancial la CE₁₀₀, para la inhibición de neutralizar la actividad enzimática de CD73.

Opcionalmente, en un aspecto, en contraste con algunos anticuerpos que están dirigidos al agotamiento de las células tumorales que expresan CD73 por ADCC (lo cual, por ejemplo, puede proporcionar eficacia completa en concentraciones iguales o sustancialmente más bajas que las que proporcionan saturación del receptor), el anticuerpo anti-CD73 es un bloqueador puro (actividad mediada por el receptor Fcγ no sustancial) y es administrado en una cantidad efectiva para neutralizar la actividad enzimática de CD73 durante un periodo de tiempo deseado, por ejemplo, 1 semana, 2 semanas, un mes, hasta la siguiente administración sucesiva del anticuerpo anti-CD73.

En un aspecto, el anticuerpo anti-CD73 es administrado en una cantidad efectiva para lograr y/o mantener (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 semanas, y/o hasta la subsecuente administración del anticuerpo anti-CD73) en un individuo una concentración de sangre de al menos la CE₅₀, opcionalmente la CE₇₀, opcionalmente de manera sustancial la CE₁₀₀, para inhibición del catabolismo mediado por CD73 de AMP a adenosina (por ejemplo, valorando la neutralización de la actividad 5'ectonucleotidasa en células MDA-MB-231 por medio de la cuantificación de hidrólisis de AMP a adenosina, ver el Ejemplo 5). En un aspecto, la cantidad del anticuerpo anti-CD73 es una cantidad efectiva para lograr (o mantener) la CE₅₀, opcionalmente la CE₇₀, opcionalmente de manera sustancial la CE₁₀₀, para la inhibición del catabolismo mediado por CD73 de AMP a adenosina en un tejido extravascular de un individuo.

En una modalidad, se proporciona un procedimiento para tratar o prevenir el cáncer en un individuo, comprendiendo el procedimiento administrar a un individuo que tiene una enfermedad un anticuerpo anti-CD73 en una cantidad que logra o mantiene un periodo específico de tiempo una concentración en circulación, opcionalmente en un tejido extravascular de interés (por ejemplo, el tumor o entorno tumoral), que es más alta que la concentración requerida para células que expresan CD73 con saturación del receptor de 50%, 70%, (por ejemplo, 90%) o completa en circulación (por ejemplo, como se valoró en PBMC). Opcionalmente la concentración lograda es al menos 20%, 50%, o 100% más alta que la concentración requerida para la saturación del receptor específico.

En un aspecto, se proporciona un procedimiento para tratar o prevenir cáncer en un individuo, comprendiendo el procedimiento administrar al individuo un anticuerpo anti-CD73 en una cantidad que logra o mantiene durante un periodo de tiempo específico una concentración en circulación, opcionalmente en un tejido extravascular de interés (por ejemplo, el tumor o entorno del tumor), que es más alta que la CE₅₀, opcionalmente CE₇₀ u opcionalmente

CE₁₀₀, para unión a las células que expresan CD73 (por ejemplo, como se valoró mediante titulación de anticuerpo anti-CD73 en células que expresan CD73, por ejemplo, células MDA-MB-231 como en el Ejemplo 4). Opcionalmente la concentración lograda es al menos 20%, 50% o 100% más alta que la CE₅₀, opcionalmente CE₇₀ u opcionalmente CE₁₀₀, para unión a células que expresan CD73.

- 5 En cualquier aspecto, el anticuerpo puede tener, por ejemplo, una CE₅₀, opcionalmente CE₇₀ u opcionalmente CE₁₀₀, para unión a células que expresan CD₇₃ en PBMC humano de entre 0,5-100 ng/ml, opcionalmente 1-100 ng/ml, opcionalmente 30-100 ng/ml, por ejemplo, 30-90 ng/ml, (por ejemplo, como se valoró por medio de titulación del anticuerpo anti-CD73 en células que expresan CD73, por ejemplo, células MDA-MB-231 como en el Ejemplo 4). Por ejemplo, la CE₅₀ puede ser aproximadamente 30, 37, 39, 43, 57, 58, 61, 62, 90, 95, 143 ng/ml.
- 10 La CE₅₀ para neutralización de la actividad enzimática de CD73 con el anticuerpo anti-CD73 puede estar, por ejemplo, entre aproximadamente 0,01 µg/ml y 1 µg/ml, opcionalmente entre 0,1 µg/ml y 10 µg/ml, opcionalmente entre 0,1 µg/ml y 1 µg/ml. Por ejemplo, la CE₅₀ puede ser aproximadamente 0,1 µg/ml, aproximadamente 0,2 µg/ml o aproximadamente 0,3 µg/ml. Por lo tanto una cantidad de este anticuerpo anti-CD73 es, por ejemplo, administrado a fin de lograr y/o mantener una concentración de sangre de al menos 0,1 µg/ml, opcionalmente al menos 0,2 µg/ml,
- 15 opcionalmente al menos 1 µg/ml u opcionalmente al menos 2 µg/ml.

20 Cuando los tejidos externos a la vasculatura son dianas (el entorno del tumor, por ejemplo, en el tratamiento de tumores sólidos), se cree típicamente que es necesaria una dosis aproximadamente 10 veces más alta, en comparación a la dosis que proporciona la concentración correspondiente en circulación. Una cantidad de anticuerpo anti-CD73 administrada de manera que logra (y/o mantiene) una concentración en la circulación (sangre) de aproximadamente 1 µg/ml, 2 µg/ml, 10 µg/ml o 20 µg/ml se espera que logre (y/o mantiene) una concentración de tejido extravascular (por ejemplo, tejido tumoral) de aproximadamente 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, respectivamente.

25 En una modalidad, un anticuerpo anti-CD73 es, por ejemplo, administrado en una cantidad de manera que logre y/o mantenga una concentración en el tejido (por ejemplo, entorno tumoral) de al menos 0,1 µg/ml, opcionalmente al menos 0,2 µg/ml, opcionalmente al menos 1 µg/ml u opcionalmente al menos 2 µg/ml. El anticuerpo puede, por ejemplo, administrarse en una cantidad para lograr y/o mantener una concentración en la sangre de al menos aproximadamente 1 µg/ml, 2 µg/ml, 10 µg/ml o 20 µg/ml, por ejemplo, entre 1-100 µg/ml, 10-100 µg/ml, 1-50 µg/ml, 1-20 µg/ml o 1-10 µg/ml. La cantidad administrada puede ajustarse a fin de mantener la concentración deseada para la duración de un periodo de tiempo específico siguiendo la administración (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 semanas, etc.).

30 En algunos aspectos, una cantidad de anticuerpo anti-CD73 se administra de manera que obtenga una concentración en la sangre (suero) o un tejido extravascular (por ejemplo, entorno tumoral) que corresponda a al menos la CE₇₀ o la CE₁₀₀ para neutralización de la actividad enzimática de CD73. El anticuerpo puede, por ejemplo, administrarse en una cantidad para lograr y/o mantener una concentración en la sangre o un tejido extravascular (por ejemplo, entorno tumoral) de al menos aproximadamente 1 µg/ml, 2 µg/ml, 10 µg/ml o 20 µg/ml.

35 La CE₅₀, CE₇₀ o la CE₁₀₀ se puede valorar, por ejemplo, en un ensayo celular para neutralización de la actividad enzimática de CD73 como se muestra en los ejemplos de la presente (por ejemplo, neutralización de actividad 5'ectonucleotidasa en células MDA-MB-231 por cuantificación de hidrólisis de AMP a adenosina, ver el Ejemplo 5). "CE₅₀" con respecto a la neutralización de la actividad enzimática de CD73, se refiere a la concentración eficiente del anticuerpo anti-CD73 que produce 50% de su respuesta máxima o efecto con respecto a la neutralización de la actividad enzimática). La "CE₇₀" con respecto a la neutralización de la actividad enzimática de CD73, se refiere a la concentración eficiente del anticuerpo anti-CD73 que produce 70% de su respuesta o efecto máximo. La "CE₁₀₀" con respecto a la neutralización de la actividad enzimática de CD73, se refiere a la concentración eficiente del anticuerpo anti-CD73 que produce sustancialmente su máxima respuesta o efecto con respecto a tal neutralización de la actividad enzimática.

45 En algunos aspectos, particularmente para el tratamiento de tumores sólidos, la concentración obtenida está diseñada para llevar a una concentración en los tejidos (al exterior de la vasculatura, por ejemplo, en el tumor o entorno tumoral) que corresponda a al menos la CE₅₀ para neutralización de la actividad enzimática, opcionalmente en aproximadamente, o al menos aproximadamente, la CE₁₀₀.

50 En un aspecto, la cantidad de anticuerpo anti-CD73 es entre 1 y 20 mg/kg de peso corporal. En un aspecto, la cantidad es administrada a un individuo semanalmente, cada dos semanas, mensualmente o cada dos meses.

55 En un aspecto se proporciona un procedimiento para tratar a un individuo humano que tiene un cáncer, que comprende administrar al individuo una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CD73 de la descripción durante al menos un ciclo de administración (opcionalmente al menos 2, 3, 4 o más ciclos de administración), en donde el ciclo es un periodo de ocho semanas o menos, en donde para cada uno de al menos un ciclo, una, dos, tres o cuatro dosis del anticuerpo anti-CD73 son administradas en una dosis de 1-20 mg/kg de peso corporal. En un aspecto, el anticuerpo anti-CD73 es administrado por infusión intravenosa.

Los protocolos de tratamiento adecuado para tratar a un humano incluyen, por ejemplo, administrar al paciente una cantidad conforme se describe en la presente de un anticuerpo anti-CD73, en donde el procedimiento comprende al

menos un ciclo de administración en el cual se administra al menos una dosis del anticuerpo anti-CD73. Opcionalmente, se administran al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 dosis del anticuerpo anti-CD73. En un aspecto, el ciclo de administración es entre 2 semanas y 8 semanas.

5 En un aspecto, se proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad (por ejemplo, un cáncer, un tumor sólido, un tumor hematológico) en un individuo, comprendiendo el procedimiento administrar a un individuo que tiene una enfermedad (por ejemplo, un cáncer, un tumor sólido) un anticuerpo anti-CD73 que neutraliza la actividad enzimática de CD73 durante al menos un ciclo de administración, comprendiendo el ciclo de administración al menos una primera y segunda (y opcionalmente una 3^a, 4^a, 5^a, 6^a, 7^a y/u 8^a o más) administración del anticuerpo anti-CD73, en donde el anticuerpo anti-CD73 es administrado en una cantidad efectiva para lograr, o mantener entre
10 dos administraciones sucesivas, una concentración en sangre (suero) del anticuerpo anti-CD73 de al menos 0,1 µg/ml, opcionalmente al menos 0,2 µg/ml, opcionalmente al menos 1 µg/ml u opcionalmente al menos 2 µg/ml (por ejemplo, para el tratamiento de un tumor hematológico), u opcionalmente al menos aproximadamente 1 µg/ml, 2 µg/ml, 10 µg/ml o 20 µg/ml, por ejemplo, entre 1-100 µg/ml, 1-50 µg/ml, 1-20 µg/ml o 1-10 µg/ml (por ejemplo, para tratamiento de un tumor sólido, para tratamiento de un tumor hematológico). En un aspecto, se mantiene una
15 concentración de sangre continua específica, en donde la concentración de la sangre no cae sustancialmente por debajo de la concentración de sangre específica para la duración del periodo de tiempo específico (por ejemplo, entre dos administraciones de anticuerpo, número de semanas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas), es decir aunque la concentración de sangre puede variar durante el periodo de tiempo específico, la concentración de sangre específica mantenida representa una concentración "pequeña" o mínima. En una modalidad, una cantidad terapéuticamente activa de un anticuerpo anti-CD73 es una cantidad de tal anticuerpo con capacidad de proporcionar (al menos) la concentración de CE₅₀, opcionalmente la concentración de CE₇₀ opcionalmente la concentración de CE₁₀₀, en la sangre y/o en un tejido para neutralización de la actividad enzimática de CD73 durante un periodo de al menos aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, o aproximadamente un mes, siguiendo la administración del anticuerpo.

25 Previo a o durante un curso del tratamiento con un anticuerpo anti-CD73 de la descripción, la presencia o niveles o células que expresan CD73, adenosina, ADP y/o niveles de AMP pueden valorarse dentro y/o adyacente a un tumor del paciente para valorar si el paciente es apto para el tratamiento (por ejemplo, para anticipar si es probable que el paciente responda al tratamiento). La presencia o niveles aumentados o células que expresan CD73, niveles de adenosina, ADP y/o AMP pueden indicar que un individuo es apto para el tratamiento con (por ejemplo, que se beneficie de) un anticuerpo anti-CD73 de la descripción (incluyendo pero no limitado a un anticuerpo que inhibe CD73 unido al sustrato).

30 Previo a o durante un curso del tratamiento con un anticuerpo anti-CD73 de la descripción, los niveles de adenosina, ADP y/o AMP también se pueden valorar dentro y/o adyacente a un tumor del paciente para valorar si el paciente se beneficia del tratamiento con un anticuerpo anti-CD73. Los niveles disminuidos de adenosina, ADP y/o AMP en comparación con una administración (o dosis del anticuerpo) comparado con los niveles previos al tratamiento (o dosis del anticuerpo) pueden indicar que un individuo se beneficia del tratamiento con un anticuerpo anti-CD73 de la descripción (incluyendo pero no limitado a un anticuerpo que inhibe el CD73 unido al sustrato). Opcionalmente, si un paciente se beneficia del tratamiento con un anticuerpo anti-CD73, los procedimientos pueden comprender además administrar una dosis adicional del anticuerpo anti-CD73 al paciente (por ejemplo, continuando el tratamiento).

40 En un aspecto, valorando los niveles de adenosina, ADP y/o AMP dentro y/o adyacente a un tumor del paciente la muestra de tejido comprende obtener del paciente una muestra biológica de un tejido humano seleccionado del grupo que consiste en tejido de un paciente con cáncer, por ejemplo, tejido canceroso, tejido próximo a o en la periferia de un cáncer, tejido adyacente al cáncer, tejido no tumoral adyacente o tejido adyacente normal, y detectar niveles de adenosina, ADP y/o AMP dentro del tejido. Los niveles del paciente pueden ser comparar el nivel a un
45 nivel de referencia, por ejemplo, que corresponda a un individuo saludable.

En un aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para el tratamiento o prevención del cáncer en un individuo que lo necesite, comprendiendo el procedimiento:

- a) detectar células que expresan CD73 (o adenosina, ADP y/o AMP) el entorno tumoral, opcionalmente dentro del tumor y/o dentro del tejido adyacente, y
- 50 b) después de determinar que el entorno del tumor comprende células que expresan CD73 (o adenosina, ADP y/o AMP), opcionalmente en un nivel que está incrementado en comparación con un nivel de referencia, administrar al individuo un anticuerpo anti-CD73. Opcionalmente, detectar las células que expresan CD73 (o adenosina, ADP y/o AMP) dentro del entorno tumoral comprende obtener del individuo una muestra biológica que comprende tejido canceroso y/o tejido cercano a o en la periferia de un cáncer (por ejemplo, tejido adyacente al cáncer, tejido tumoral no adyacente o tejido adyacente normal), y detectar niveles de células que expresan
55 CD73 (o adenosina, ADP y/o AMP). Las células que expresan CD73 pueden comprender, por ejemplo, células tumorales, células T CD4, células T CD8, células B.

Un paciente que tiene un cáncer puede tratarse con el anticuerpo anti-CD73 con o sin un paso de detección previa para valorar la expresión de CD73 en células en el microambiente tumoral (por ejemplo, en células tumorales, células T CD4, células T CD8, células B). Opcionalmente, los procedimientos de tratamiento pueden comprender un
60 paso de detectar un ácido nucleico de CD73 o polipéptido en una muestra biológica de un tumor de un individuo (por

ejemplo, en tejido canceroso, tejido cercano a o en la periferia de un cáncer, tejido adyacente al cáncer, tejido no tumoral adyacente o tejido adyacente normal). Una determinación de que la muestra biológica comprende células que expresan CD73 (por ejemplo, que visiblemente expresan; que expresan CD73 en un nivel alto, alta intensidad de tinción con un anticuerpo anti-CD73, en comparación con una referencia) indica que el paciente tiene un cáncer que puede tener un beneficio importante del tratamiento con un agente que inhibe CD73. En un aspecto, el procedimiento comprende determinar el nivel de expresión de un ácido nucleico CD73 o polipéptido en una muestra biológica y comparar el nivel a un nivel de referencia que corresponde a un individuo saludable. Una determinación de que una muestra biológica comprende células que expresan ácido nucleico de CD73 o polipéptido en un nivel que es incrementado en comparación con el nivel de referencia indica que el paciente tiene un cáncer que puede tratarse con un anticuerpo anti-CD73 de la descripción. Opcionalmente, la detección de un polipéptido de CD73 en una muestra biológica comprende detectar polipéptido de CD73 expresado en la superficie de una célula maligna, una célula T CD4, célula T CD8, célula B. En un aspecto, una determinación de que una muestra biológica comprende células que de manera importante expresa ácido nucleico de CD73 o polipéptido indica que el paciente tiene un cáncer que puede tratarse con un anticuerpo anti-CD73 de la descripción. “Visiblemente expresado”, cuando se refiere a un polipéptido de CD73, significa que el polipéptido de CD73 está expresado en un número sustancial de células tomadas de un paciente determinado. Aunque la definición de la expresión “visiblemente expresado” no está ligado por un valor de porcentaje preciso, en algunos ejemplos un receptor que se dice que es “visiblemente expresado” estará presente en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o más de las células tumorales tomadas de un paciente.

Determinar si un individuo tiene un cáncer caracterizado por células que expresan un polipéptido de CD73 puede, por ejemplo, comprender obtener una muestra biológica (por ejemplo, realizando una biopsia) del individuo que comprende células del entorno del cáncer (por ejemplo, tumor o tejido adyacente al tumor), poner tales células en contacto con un anticuerpo que se une a un polipéptido de CD73, y detectar si las células expresan CD73 en su superficie. Opcionalmente, al determinar si un individuo tiene células que expresan CD73 comprende llevar a cabo un ensayo de inmunohistoquímica.

En un aspecto, la descripción proporciona un procedimiento para el tratamiento o prevención de un cáncer en un individuo que lo necesite, comprendiendo el procedimiento:

- a) determinar el estatus de polipéptido de CD73 de células dentro del entorno tumoral, opcionalmente dentro del tumor y/o dentro del tejido adyacente, y
- b) después de determinar que el entorno tumoral comprende células que expresan polipéptido de CD73, opcionalmente en un nivel que está incrementado en comparación con un nivel de referencia, administrar al individuo un anticuerpo anti-CD73. En un aspecto, las células son células tumorales. En otro aspecto, las células dentro del entorno del tumor, tumor y/o tejido adyacente no son células inmunes no malignas, por ejemplo, células T. Opcionalmente, determinar el estatus del polipéptido de CD73 dentro del entorno tumoral comprende obtener de un individuo una muestra biológica que comprende tejido canceroso y/o tejido cercano a o en la periferia de un cáncer (por ejemplo, tejido adyacente al cáncer, tejido no tumoral adyacente o tejido adyacente normal), poner en contacto tales células con un anticuerpo que se une a un polipéptido de CD73, y detectar células que expresan CD73.

Las composiciones del anticuerpo se pueden utilizar como monoterapia o tratamientos combinados con uno o más de otros agentes terapéuticos, incluyendo agentes regularmente utilizados para el propósito terapéutico particular para el cual el anticuerpo está siendo administrado. El agente terapéutico adicional normalmente será administrado en cantidades y regímenes de tratamiento típicamente utilizados para ese agente en una monoterapia para la enfermedad o afección particular que está siendo tratada. Tal agente terapéutico incluye, pero no se limita a agentes anticancerígenos y agentes quimioterapéuticos.

En un aspecto, el segundo o segundo agente terapéutico adicional es un anticuerpo u otra proteína que contiene dominio de Fc con capacidad de inducir ADCC hacia una célula a la cual está unida, por ejemplo, por medio de CD16 expresado por una célula NK. Típicamente, tal anticuerpo u otra proteína comprenderá un dominio que se une a un antígeno de interés, por ejemplo, un antígeno presente en una célula tumoral (antígeno tumoral), y un dominio Fc o porción del mismo, y mostrará la unión al antígeno por medio del dominio de unión al antígeno y receptores Fcγ (por ejemplo, CD16) mediante el dominio Fc. En un aspecto, su actividad ADCC estará mediada al menos en parte por CD16. En un aspecto, el agente terapéutico adicional es un anticuerpo que tiene un dominio Fc humano modificado o silvestre, por ejemplo, un dominio Fc de un anticuerpo humano IgG1 o IgG3. La expresión “citotoxicidad mediada por célula dependiente del anticuerpo” o “ADCC” es una expresión bien entendida en la técnica, y se refiere a una reacción mediada por célula en la cual las células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcRs) reconocen el anticuerpo unido en una célula objetivo y posteriormente ocasionan lisis de la célula objetivo. Las células de citotoxicidad no específica que median en ADCC incluyen células citolíticas naturales (NK), macrófagos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos. La expresión “anticuerpo que induce ADCC” se refiere a un anticuerpo que demuestra ADCC conforme se midió por medio de ensayos conocidos para los expertos en la técnica. Tal actividad está típicamente caracterizada por la unión de la región Fc con varios FcRs. Sin estar limitada por ningún mecanismo particular, los expertos en la técnica reconocerán que la capacidad de un anticuerpo de demostrar ADCC puede ser, por ejemplo, en virtud de su subclase (tal como IgG1 o IgG3), por mutaciones introducidas en la región Fc, o en virtud de modificaciones a los patrones de carbohidrato en la región Fc del

anticuerpo.

En un aspecto, el segundo o segundo agente terapéutico adicional es un agente (por ejemplo, un anticuerpo) que inhibe CTLA-4 o el eje PD-1 (es decir PD-1 o PD-L1). Los anticuerpos que se unen a CTLA-4, PD1 o PD-L1 se pueden utilizar, por ejemplo, a las dosis y/o frecuencias ejemplares en que tales agentes son utilizados como monoterapia, por ejemplo, como se describe más adelante.

PD-1 es un miembro inhibidor de la familia CD28 de receptores que también incluye CD28, CTLA-4, ICOS y BTLA. PD-1 está expresado en células B activadas, células T, y células mieloides Okazaki et al. (2002) Curr. Opin. Immunol. 14: 391779-82; Bennett et al. (2003) J Immunol 170:711-8). Se han identificado dos ligandos para PD-1, PD-L1 y PD-L2, que se ha mostrado que subregulan la activación de la célula T después de la unión a PD-1 (Freeman et al. (2000) J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. (2001) Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. (2002) Eur J Immunol 32:634-43). PD-L1 es abundante en una variedad de cánceres humanos (Dong et al. (2002) Nat. Med. 8:787-9). La interacción entre PD-1 y PD-L1 resulta en una disminución en los linfocitos que se infiltran al tumor, una disminución en la proliferación mediada por el receptor de la célula T, y una evasión inmune por medio de las células cancerígenas. La inmunosupresión puede invertirse al inhibir la interacción local de PD-1 con PD-L1, y el efecto es aditivo cuando la interacción de PD-1 con PD-L2 también es bloqueada. El bloqueo de PD-1 puede involucrar de manera ventajosa el uso de un anticuerpo que impide la señalización de PD-1 inducida por PD-L1, por ejemplo, al bloquear la interacción con su ligando natural PD-L1. En un aspecto el anticuerpo se une a PD-1 (un anticuerpo anti-PD-1); tal anticuerpo puede bloquear la interacción entre PD-1 y PD-L1 y/o entre PD-1 y PD-L2. En otro aspecto el anticuerpo se une a PD-L1 (un anticuerpo anti-PD-L1) y bloquea la interacción entre PD-1 y PD-L1.

Existen actualmente al menos seis agentes que bloquean la ruta de PD-1/PD-L1 que son comercializados o están en evaluación clínica, cualquiera de estos puede ser útil en la combinación con los anticuerpos anti-CD73 de la descripción. Un agente es BMS-936558 (Nivolumab/ONO-4538, Bristol-Myers Squibb; anteriormente MDX-1106). Nivolumab, (nombre comercial Opdivo®) es un mAb anti-PD-L1 IgG4 completamente humano aprobado por la FDA que inhibe la unión del ligando PD-L1 a ambos PD-1 y CD80 y está descrito como anticuerpo 5C4 en el documento WO 2006/121168. Para pacientes con melanoma, se observó OR más significativa en una dosis de 3 mg/kg, mientras que para otros tipos de cáncer fue en 10 mg/kg. Nivolumab generalmente se dosifica en 10 mg/kg cada 3 semanas hasta la progresión del cáncer.

MK-3475 (mAb anti-PD1 IgG4 humano de Merck), también referido como lambrolizumab o pembrolizumab (nombre comercial Keytruda®) ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de melanoma y está siendo probada en otros cánceres. Pembrolizumab fue probado en 2 mg/kg o 10 mg/kg cada 2 o 3 semanas hasta la progresión de la enfermedad. Construcciones de ADN que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos humanizados h409A1 se han depositado en American Type Culture Collection Patent Depository (10801 University Blvd., Manassas, VA). El plásmido que contiene el ADN que codifica la cadena pesada de h409A-1 se depositó el 9 de Junio de 2008 e identificó como 081469_SPD-H y el plásmido que contiene el ADN que codifica la cadena ligera de h409A1 se depositó el 9 de junio de 2008 y se identificó como 0801470_SPD-L1 1.

MPDL3280A/RG7446 (anti-PD-L1 de Roche/Genentech) es un mAb anti-PD-L1 humano que contiene un dominio Fc diseñado para optimizar la eficacia y seguridad al reducir la unión de FcγR y consecuente citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Las dosis de ≤1, 10, 15 y 25 mg/kg de MPDL3280A fueron administradas cada 3 semanas durante hasta 1 año. En el ensayo de fase 3, MPDL3280A es administrado en 1200 mg por infusión intravenosa cada tres semanas en NSCLC.

AMP-224 (Amplimmune y GSK) es una inmunoadhesina que comprende un dominio extracelular PD-L2 fusionado a un dominio Fc.

Pidlizumab (CT-011; CureTech) (mAb anti-PD1 IgG1 humanizado de CureTech/Teva), Pidlizumab (CT-011; CureTech) (véase, por ejemplo, documento WO2009/101611) Treinta pacientes con FL recidivante sensible a rituximab fueron tratados con 3 mg/kg intravenoso de CT-011 cada 4 semanas para 4 infusiones en combinación con rituximab en dosis de 375 mg/m² semanalmente durante 4 semanas, iniciando 2 semanas después de la primera infusión de CT-011.

Además los anticuerpos PD-1 conocidos y otros inhibidores PD-1 incluyen AMP-224 (una proteína de fusión B7-DC/IgG1 con licencia de GSK), AMP-514 descrita en el documento WO 2012/145493, anticuerpo MEDI-4736 (un anti-PD-L1 desarrollado por AstraZeneca/Medimmune) descrito en los documentos WO2011/066389 y US2013/034559, anticuerpo YW243.55.S70 (un anti-PD-L1) descrito en el documento WO2010/077634, MDX-1105, también conocido como BMS-936559, es un anticuerpo anti-PD-L1 desarrollado por Bristol-Myers Squibb descrito en el documento WO2007/005874, y anticuerpos e inhibidores descritos en los documentos WO2006/121168, WO2009/014708, WO2009/114335 y WO2013/019906. Están descritos ejemplos adicionales de anticuerpos anti-PD1 en el documento WO2015/085847 (Shanghai Hengrui Pharmaceutical Co. Ltd.), por ejemplo, los anticuerpos que tienen CDR1, 2 y 3 de dominio variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y/o SEQ ID NO: 8, respectivamente, y CDR1, 2 y 3 de dominio variable de cadena pesada de anticuerpo de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5, respectivamente, en donde las referencias de SEQ ID NO son la numeración de acuerdo con el documento WO2015/085847. También se pueden utilizar anticuerpos que compiten con cualquiera de estos anticuerpos para unión a PD-1 o PD-L1.

CTLA-4 (proteína 4 asociada a linfocito T citotóxico), también conocido como CD152 es otro miembro inhibidor de la familia de CD28 de los receptores, y está expresado en las células T. Los anticuerpos que se unen a e inhiben CTLA-4 son conocidos en la técnica. En un ejemplo, el anticuerpo es ipilimumab (nombre comercial Yervoy[®], Bristol-Myers Squibb), un anticuerpo IgG humano. Un régimen de administración ejemplar para Yervoy es 3 mg/kg intravenosamente durante 90 minutos cada tres semanas. En un ejemplo, el anticuerpo utilizado en combinación con los anticuerpos anti-CD73 de la descripción es un anticuerpo que compite con ipilimumab para unión a CTLA-4.

En los procedimientos de tratamiento, el compuesto de unión a CD73 y el segundo agente terapéutico puede ser administrado separadamente, junto o secuencialmente, o en un cóctel. En algunos aspectos, el compuesto de unión a antígeno es administrado antes de la administración del segundo agente terapéutico. Por ejemplo, el compuesto de unión a CD73 puede administrarse aproximadamente 0 a 30 días antes de la administración del segundo agente terapéutico. En algunos aspectos, un compuesto de unión a CD73 es administrado de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 semanas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 1 semana, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 6 horas, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 8 horas a 1 día, o de aproximadamente 1 a 5 días antes de la administración del segundo agente terapéutico. En algunos aspectos, un compuesto de unión a CD73 es administrado concurrentemente con la administración de los agentes terapéuticos. En algunos aspectos, un compuesto de unión a CD73 es administrado después de la administración del segundo agente terapéutico. Por ejemplo, un compuesto de unión a CD73 puede administrarse aproximadamente de 0 a 30 días después de la administración del segundo agente terapéutico. En algunos aspectos, un compuesto de unión a CD73 es administrado de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 semanas, de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 1 semana, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 6 horas, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 8 horas a 1 día, o de aproximadamente 1 a 5 días después de la administración del segundo agente terapéutico.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de nuevos anticuerpos anti-huCD73

Para obtener anticuerpos de CD73 anti-humano, ratones Balb/c fueron inmunizados con una proteína recombinante de dominio extracelular de dominio extracelular CD73-His humano (clonada y producida en Innate Pharma como se describe más adelante). Los ratones recibieron una primo-inmunización con una emulsión de 50 µg de proteína CD73 y adyuvante completo de Freund, intraperitonealmente, una 2^a inmunización con una emulsión de 50 µg de proteína CD73 y adyuvante incompleto de Freund, intraperitonealmente, y finalmente un estímulo con 10 µg de proteína CD73, intravenosamente. Las células inmunes del bazo se fusionaron 3 días después de la estimulación con células B inmortalizadas X63.Ag8.653, y cultivadas en presencia de células del bazo irradiadas. Los hibridomas fueron colocados en placas en un medio que contiene metilcelulosa semi-sólida y clones en crecimiento fueron escogidos utilizando un aparato clonepix 2 (Molecular Devices).

Selección primaria: el sobrenadante (SN) de clones en crecimiento fueron probados en una selección primaria por citometría de flujo utilizando líneas celulares huésped parentales y recombinantes que expresan huCD73, cynoCD73 o moCD73. Las células huésped recombinantes que expresan HuCD73 y cynoCD73 fueron teñidos con 0,35 µM y 0,035 µM de CFSE, respectivamente. Para la selección de citometría de flujo, todas las células fueron igualmente mezcladas y la presencia de anticuerpos que reaccionan en sobrenadantes fue revelada por medio del anticuerpo policlonal anti ratón de cabra (pAb) marcado con PE. Se encontró que 47 anticuerpos se unen a CD73 tanto humano como de cynomolgus. Todos los anticuerpos que se unieron a huCD73 y cynoCD73 fueron producidos como anticuerpos IgG1 humanos quiméricos con una mutación de cadena pesada N297Q (numeración Kabat EU) lo cual resulta en la falta de glicosilación ligada a N y sustancial falta de unión a receptores Fcγ.

Segunda selección: esta selección informativa (véase, Ejemplo 2) se hizo en la proteína CD73 recombinante para evaluar las propiedades de bloqueo de la actividad enzimática de CD73 de los 47 anticuerpos seleccionados. Parece que 35/47 anticuerpos bloquean parcial o completamente la actividad de CD73.

Clonación, producción y purificación de huCD73 recombinante

Biología Molecular

La proteína huCD73 fue clonada a partir de ADNc de MIAPACA-2 utilizando los siguientes cebadores TACGACTCACAAAGCTTGCCGCCACCATGTGTCCCCGAGCCGCGCG (SEQ ID NO: 45) (directo) y CCGCCCCGACTCTAGAtcaGTGATGGTGATGGTGcttgatccgacctcaactg SEQ ID NO: 46) (inverso). El producto de PCR purificado después se clonó en un vector de expresión utilizando el sistema de clonación de InFusion. Una marca 6xHis fue agregada en la parte de C terminal de la proteína para el paso de purificación.

Secuencia de aminoácido del huCD73:

MCPRAARAPATLLLALGAVLWPAAGAWELTILHTNDVHS
 RLEQTSSESSKCVNASRCMGGVARLFTKVQQIRRAEPNVLLLD
 AGDQYQGTIWFTVYKGAEVAHFMNALRYDAMALGNHEFDNGV
 EGLIEPLLKEAKFPILSANIKAKGPLASQISGLYLPYKVLVPGDE
 VVGIVGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEITALQPEVDKCLKTLNVN
 KIIALGHSGFEMDKLIAQKVRGVDVVVGGHSNTFLYTGNPPSKE
 VPAGKYPFIVTSDDGRKVPVVQAYAFGKYLGYLKIEFDERGNVI
 SSHGNPILLNSSIPEDPSIKADINKWRIKLDNYSTQELGKTIVYL
 DGSSQSCRFRECNMGNLICDAMINNNLRHTDEMFWNHVSMCIL
 NGGGIRSPIDERNNGTITWENLAAVLPFGGTFDLVQLKGSTLKK
 AFEHSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDLRSRKPGRVVKLDVLC
 TKCRVPSYDPLKMDEVYKVILPNFLANGGDGFQMIKDELLRHDS
 GDQDINVVSTYISKMKVIYPAVEGRIKHHHHHH (SEQ ID NO: 2)

Expresión y purificación de las proteínas huCD73

Después de la validación de la secuencia clonada, las células fueron nucleofectadas y el grupo de producción después fue sub-clonado para obtener un clon de célula que produce la proteína huCD73. El sobrenadante del clon de huCD73 cultivado en tubo fue recolectado y purificado utilizando columna Ni-NTA y eluido utilizando 250 nM de imidazol. Las proteínas purificadas después se cargaron en una columna de cromatografía de exclusión de tamaño S200. La proteína purificada correspondiente a un dímero se formuló en un tampón de 20 mM de Tris de pH 7,5, 120 mM de NaCl y 4 mM de CaCl₂ para ensayos de actividad de enzima, aunque el tampón de la formulación es suplementado con 20% de glicerol.

Ejemplo 2: Evaluación de bloqueo de CD73 soluble

La capacidad de los anticuerpos anti-CD73 para bloquear la actividad enzimática de CD73 se evaluó conforme se describe en Sachsenmeier et al. (J Biomol Screening, 2012). Brevemente, 500 ng/ml de CD73-his humano recombinante fueron incubados en microplacas blancas de fondo plano de 96 pocillos en presencia de rango de dosis de Abs anti-CD73 o de control de isotipo. Las placas fueron incubadas durante 1h a 37°C. 12,5 μM de ATP y 125 μM de AMP fueron agregados a cada pocillo y las placas se incubaron a 37°C durante 30 minutos adicionales. Cell Titer Glo que contiene luciferasa/luciferina (Promega) es agregada a los pocillos, las placas se incubaron durante 5 minutos a TA en la oscuridad y la luz emitida se midió utilizando un aparato Enspire (Perkin Elmer).

Se sabe que el exceso de AMP bloquea la actividad luciferasa dependiente de ATP. La adición de CD73 que escinde AMP a la adenosina + fosfato inorgánico restaura la actividad luciferasa y emisión de luz. Por lo tanto, los anticuerpos que bloquean la actividad enzimática de CD73 disminuirán la emisión de luz.

El porcentaje de inhibición de la enzima se evalúa conforme se describe a continuación:

- Condiciones:

- ATP+AMP: inhibición máxima de luciferasa (100%)
- ATP+AMP+CD73: no inhibición de luciferasa (0%)

- Fórmula:

$$\text{Actividad de CD73 residual: } \frac{(\text{CD73+Ab+ATP+AMP}) - (\text{ATP+AMP})}{(\text{CD73+ATP+AMP}) - (\text{ATP+AMP})} * 100$$

Se encontró que 35 anticuerpos obtenidos en el Ejemplo 1, así como mAbs 7G2, 4G4 y 1E9 de referencia, inhiben la actividad de CD73 al utilizar esta configuración experimental.

Considerando los resultados dispares presentados con los anticuerpos de referencia, se consideró si el bloqueo de CD73 puede surgir de la reticulación de dímeros de CD73 por los anticuerpos bivalentes en lugar de bloqueo real del sitio enzimático. Es decir, los anticuerpos pueden estar causando los complejos oligoméricos de los dímeros de CD73 debido a que mAbs de unión bivalente pueden unirse a dos homodímeros de CD73 diferentes, conduciendo a

su vez a complejos de proteína más grandes). Después se probó esta posibilidad al realizar ensayos de bloqueo en relaciones altas de anticuerpo:dímeros de CD73. En esta configuración los mAbs están muy en exceso y puede ocurrir la inducción de complejos oligoméricos, lo que permite observar el bloqueo funcional real de CD73. En esta configuración, prácticamente todos los anticuerpos, incluyendo los mAbs de referencia 4G4 y 1E9, no inhibieron la actividad enzimática de CD73.

Los anticuerpos 11E1, 8C7, 3C12 y 6E1 bloquearon funcionalmente CD73 en todas las concentraciones probadas. Los resultados de los ejemplos se muestran en la figura 1, para mAbs 11E1, 8C7 y 6E1. Un anticuerpo adicional (resultados no mostrados) posteriormente se encontró que tiene baja afinidad para CD73 expresada en la superficie de las células, por lo tanto posiblemente representa un epítipo que no es adecuado para unión de alta afinidad a la superficie celular CD73. Los anticuerpos de referencia de anti-CD73 disponibles presentados en recientes publicaciones también fueron probados: 7G2, 4G4 y 1E9 se evaluaron para bloqueo de CD73. Los resultados (véase, la figura 1) muestran que 7G2 bloqueó CD73 mientras que 4G4 y 1E9 no bloquearon la actividad de CD73, debido a que la actividad de la enzima residual se recuperó a aproximadamente el nivel inicial o el control negativo. El anticuerpo AD2 también se evaluó y se encontró que no bloquea la actividad de CD73 en ninguna concentración. 4G4 y 1E9 por lo tanto representan la clase de anticuerpos que no inhiben específicamente CD73 en este ensayo, posiblemente ocasionando oligomerización en solución. Por lo tanto, los anticuerpos 7G2, 11E1, 8C7, 3C12 y 6E1 funcionalmente bloquearon CD73 en este ensayo.

Los valores de EC₅₀ para bloqueo de CD73 se muestran en la siguiente tabla.

Ab	CE50 (µg/ml)
1E11	0,41
6E1	0,33
8C7	1,29
3C12	0,41

Ejemplo 3: Titulación de Ab en rec de la proteína de CD73 por medio de ELISA

Los anticuerpos que funcionalmente bloquearon el CD73 recombinante soluble se caracterizaron más plenamente por la unión a CD73 humano recombinante soluble.

5 µg/ml de proteína de CD73 humano recombinante (IPH, isoforma E6) se recubrieron en placas de ELIXA MaxiSorp (Nunc) en PBS, durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron 5 veces en tampón de lavado (PBS, 0,05% Tween20) y sitios no específicos se saturaron agregando 200 µl/w de tampón de bloqueo inicial TBS (Thermo Fisher). El rango de dosis de anticuerpos anti-CD73 se incubaron durante 2h a 37°C. Las placas se lavaron 5 veces en tampón de lavado y se agregó anticuerpo secundario de fragmento Fc IgG anti-humano de cabra o anti ratón de cabra acoplado a HRP (Bethyl, 1/50000) durante 1 h a TA para detectar anticuerpos anti-CD73 unidos. Las placas se lavaron 5 veces en tampón de lavado y se reveló el anticuerpo secundario unido al agregar TMB (sustrato HRP) e incubando las placas durante 5 a 10 min a TA en la oscuridad. La reacción enzimática se detuvo al agregar HCl 1M y se midió D.O. en 450 nm. La densidad óptica frente a la concentración de Ab anti-CD73 se trazó en gráficas y se calculó CE50 utilizando el software GraphPad Prism.

Los resultados se muestran en la figura 2. Los anticuerpos, 11E1, 8C7, 6E1 y 7G2 todos se unieron a CD73 recombinante soluble. Los valores de CE₅₀ para unión se muestran en la siguiente tabla.

Anticuerpo	CE50 (µg/ml)
11E1	0,012
6E1	0,014
8C7	0,009
3C12	0,014
7G2	0,037

Ejemplo 4: titulación de citometría de flujo

Las líneas celulares huésped recombinantes que expresan CD73 humano, de cynomolgus y de ratón o adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 humano que endógenamente expresa CD73 se utilizaron para evaluar la capacidad de los anticuerpos anti-CD73 para unirse a CD73 humano y para reaccionar de manera cruzada en CD73

5 cynomolgus y/o ratón. Las células MDA-MB-231 están disponibles de ATCC (HTB-26 de referencia). 10⁵ células resuspendidas en PBS/0,2% BSA/0,02% NaN₃ (llamado "tampón de tinción") son distribuidas en microplacas de 96 pocillos de fondo redondo. El rango de dosis de anticuerpos anti-CD73 se agregó a las placas y las células se incubaron durante 45 min a 4°C. Las células se lavaron tres veces en tampón de tinción por medio de placas giratorias en 400 g durante 3 min a 4°C. Los anticuerpos secundarios de fragmento Fc IgG anti-ratón de cabra o anti-humano de cabra acoplado a PE (Beckman Coulter) diluidos en tampón de tinción se agregaron a las células y las placas se incubaron durante 30 minutos adicionales a 4°C. Las células se lavaron tres veces conforme se describió antes y se analizaron en un citómetro de flujo Accury C6 equipado con un lector de placa HTFC.

10 La mediana de fluorescencia frente a concentración de anticuerpos se trazó en gráficas y CE50 se calculó utilizando el programa GraphPad Prism.

Los resultados se muestran en la figura 3 para nuevos mAbs 11E1, 8C7, 3C12 y 6E1, así como mAbs 7G2 y 1E9 de referencia. mAbs 11E1, 8C7, 3C12 y 6E1 se unen a células huésped recombinantes que expresan CD73 humano o cynomolgus (pero no de ratón) con excelente afinidad. MAbs 7G2 y 1E9, sin embargo, muestran unión deficiente a células que expresan CD73 humano o cynomolgus.

15 Los experimentos se repitieron utilizando células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 humano que endógenamente expresan CD73. Nuevamente mAbs 11E1, 8C7, 3C12 y 6E1 se unen con excelente afinidad mientras que mAbs 7G2 y 1E9 muestran unión deficiente. Los resultados en las células MDA-MB-231 se muestran en la figura 4.

20 Es posible que 7G2 y 1E9 se unan a un epítipo en CD73 que se presenta de manera diferente en CD73 recombinante y CD73 en la superficie de las células que expresan CD73, incluyendo notablemente células tumorales humanas que endógenamente expresan CD73, resultando en mAbs que se unen bien a CD73 recombinante (por ejemplo, utilizado en inmunización) pero no a CD73 de la superficie celular. Por otra parte, los epítopes unidos por 11E1, 8C7, 3C12 y 6E1, permanecen presentes en CD73 de la superficie celular.

25 Los experimentos se repitieron después utilizando células de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 que endógenamente expresan CD73. Las células se pre-incubaron a 37°C durante 30 minutos en presencia o no de 200 μM de adenosina 5'-(α,β-metileno)difosfato (APCP), seguido por la adición de anticuerpos. APCP es un análogo de ADP y se une de manera irreversible al sitio activo de CD73. Cuando está unido por APCP, CD73 cambia la conformación de una conformación "abierta" a una conformación "cerrada". mAbs 11E1, 8C7, 3C12 y 6E1 se unieron a células MDA-MB-231 con buena afinidad ambos en la presencia y ausencia de APCP. En presencia de APCP, la CE50 fue similar a ese observado en ausencia de APCP. El nivel para unión máxima de 11E1, 8C7, 3C12 y 6E1 fue más alto en ausencia de APCP que en presencia de APCP, mientras que lo inverso fue verdadero para AD2. Las cantidades de CE50 se muestran en la siguiente tabla.

Anticuerpo	CE50 (ng/ml)	
	Medio	APCP
11E1	61,11	37,5
3C12	57,22	43,11
6E1	58,39	39,48
8C7	90,29	143,4
AD2	62,89	95,92

Ejemplo 5: Bloqueo de actividad de CD73 celular

Parte A: Bloqueo en células tumorales MDA-MB-231

35 Se evaluó la capacidad de los anticuerpos anti-CD73 para neutralizar la actividad enzimática 5'-ectonucleotidasa de CD73 expresado en la superficie celular. La línea celular tumoral MDA-MB-231 se utilizó como un modelo de línea celular tumoral que expresa CD73.

40 Todos los reactivos utilizados en el experimento detallado más adelante fueron diluidos en TBS pH7,5 (Tris 20mM pH7,5, NaCl 150mM). La línea celular MDA-MB-231 es recuperada en PBS-EDTA y lavada dos veces en TBS pH7,5. De 0,5 a 1x10⁵ células se colocaron en placas de 96 pocillos de fondo plano en presencia del rango de dosis de anticuerpos anti-CD73 y se incubaron durante 2 horas a 4°C. Se agregó AMP en 200mM a las células durante un periodo de incubación de 30 minutos a 4°C (para evitar la modulación descendente de CD73). Las placas después se centrifugaron y 50μl de sobrenadante se transfirieron en placa de cultivo de 96 pocillos de fondo plano. El fosfato libre producido por la hidrólisis de AMP en adenosina se cuantificó utilizando el Equipo de Detección de Fosfato Verde Malaquita (R&D Systems) y siguiendo TDS proporcionado por el fabricante. La concentración de fosfato

45

contra concentración de Ab anti-CD73 se trazó en gráficas y CE50 se calculó utilizando el software GraphPad Prism.

Los resultados se muestran en la figura 5. Los anticuerpos 11E1, 8C7, 3C12 y 6E1 neutralizaron la actividad enzimática de CD73 celular, con valores de CE₅₀ que se muestran en la siguiente tabla.

Ab	CE50 (µg/ml)
1E11	0,195
6E1	0,209
8C7	0,319
3C12	0,210

5 Cada anticuerpo logró una disminución de más de 75%, o más de 80% de la actividad enzimática. El anticuerpo 7G2, consistente con unión deficiente a CD73 celular (véase, Ejemplo 4), no neutralizó la actividad enzimática de CD73 celular. El anticuerpo 7G2, consistente con su capacidad limitada para unirse a CD73 de la superficie celular, no neutralizó la actividad enzimática de CD73 en ninguna concentración, y únicamente suscitó una inhibición parcial ligera en las concentraciones más altas probadas.

10 En cada caso, para los anticuerpos no internalizantes 1E11, 6E1, 8C7 y 3C12, los valores de CE₅₀ requeridos para la neutralización de la actividad enzimática de CD73 celular en la célula MDA-MB-231 fueron varias veces más altos que los valores de CE₅₀ requeridos para unirse a CD73 de la superficie celular en células MDA-MB-231.

Parte B: Bloqueo en células tumorales MDA-MB-231, H292 y A375

15 La capacidad de los anticuerpos anti-CD73 para neutralizar la actividad de la actividad enzimática de 5'-ectonucleotidasa de CD73 expresado en la superficie celular se evaluó utilizando el mismo ensayo como se indicó antes, esta vez en múltiples experimentos utilizando tres líneas celulares tumorales que expresan líneas CD73 en paralelo: la línea celular tumoral de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231, la línea celular de cáncer de pulmón H292 (véase, por ejemplo, referencia ATCC CRL-1848), y la línea celular de cáncer de melanoma A375 (véase, por ejemplo, referencia ATCC CRL-1619). Las concentraciones efectivas requeridas para neutralización (CE, por ejemplo, CE₅₀, CE₇₀, CE₁₀₀) que se muestran en la siguiente tabla se calcularon como una media de experimentos repetidos en los tres diferentes tipos de célula que expresa CD73.

Anticuerpo	1E11	3C12	6E1	8C7
N=	8	8	8	2
CE ₅₀ (µg/ml)	0,10	0,14	0,13	0,21
CE ₇₀ (µg/ml)	0,15	0,18	0,19	0,46
CE ₁₀₀ (µg/ml)	0,52	0,30	0,68	0,72

Ejemplo 6: Estudio de competencia de citometría de flujo

25 Una línea celular huésped recombinante que expresa CD73 humano se utilizó para evaluar la competencia entre nuestros candidatos y otros anticuerpos anti-CD73 comerciales. 10⁵ células resuspendidas en tampón de tinción fueron distribuidas en microplacas de 96 pocillos de fondo redondo. Una dosis fija de anticuerpos de prueba (1 µg/ml) se agregó a las células en presencia o no de un rango de dosis de anticuerpos CD73 anti-humano de ratón de referencia. Las células se incubaron durante 45 minutos a 4°C después se lavaron tres veces como se describió antes. Los anticuerpos secundarios de fragmento Fc IgG anti-humano de cabra o acoplados a PE (Beckman Coulter) diluidos en tampón de tinción se agregaron a las células y las placas se incubaron durante 30 minutos adicionales a 4°C. Las células se lavaron tres veces y se analizaron en un citómetro de flujo Accury C6 equipado con lector de placa HTFC.

30 Se trazó la mediana de fluorescencia contra concentración de anticuerpos. Para estudiar los epítopes de anticuerpos que neutralizan CD73, se evaluó la capacidad de anticuerpos conocidos para bloquear la unión de nuevos anticuerpos a CD73 de membrana celular como competencia entre anticuerpos. El anticuerpo de referencia 7G2, que se ha mostrado en el Ejemplo 2 que tiene la capacidad de neutralizar CD73 sin dependencia en la inducción de oligomerización, pero el cual no se une o neutraliza CD73 en ensayos celulares, se probó con nuevos candidatos de anticuerpo. Ni los anticuerpos 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1 compitieron con 7G2 para unión a CD73, mostrando que 7G2 se une a un área en CD73 distinta de esa de los nuevos anticuerpos.

Ejemplo 7: La modulación descendente de CD73

5 La línea celular de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 humano que endógenamente expresa CD73 se utilizó para evaluar la capacidad de anticuerpos anti-CD73 para inhibir la expresión de CD73. 10⁵ células resuspendidas en tampón de tinción fueron distribuidas en microplacas de 96 pocillos de fondo plano. Se agregaron 10 µg/ml de anticuerpos anti-CD73 a las células y las placas se incubaron a 4°C o 37°C durante un tiempo. En T=10min, 30min, 1h, 2h, 3h y 4h, las células fueron recubiertas utilizando PSB/2mM EDTA, lavadas tres veces en tampón de tinción como se describió anteriormente y se incubaron a 4°C hasta el final del tiempo. Se agregaron 10 µg/ml de anticuerpo anti-CD73 de no competencia acoplado a AlexaFluor 647 a las células y las placas se incubaron durante 30 min a 4°C. Las células se lavaron tres veces y se analizaron en un citómetro de flujo Accury C6 equipado con un lector de placa HTFC.

10 El porcentaje de tiempo de expresión contra incubación se trazó en gráficas.

15 Los anticuerpos se evaluaron por su capacidad de ocasionar la modulación descendente de expresión de CD73 en células, y se compararon con mAbs de referencia AD2, 7G2 y 1E9. Cada uno de AD2, 7G2 y 1E9 ocasionó la modulación descendente de CD73, lo que sugiere que estos mAbs pueden estar ocasionando la concentración e internalización de CD73. AD2 provocó una disminución por encima del 20% mientras que 7G2 y 1E9 provocó cada uno una disminución por encima del 50% de receptor en la superficie celular. Ninguno de los anticuerpos 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1 provocó una disminución de CD73 en la superficie celular. Los resultados se muestran en la figura 6.

Ejemplo 8: Mapeo del epítipo

20 A fin de definir los epítopes de anticuerpos anti-CD73, diseñamos mutantes de CD73 definidos por sustituciones de aminoácidos expuestos en la superficie molecular sobre la superficie de CD73. Los mutantes fueron transfectados en células Hek-293T, como se muestra en la siguiente tabla. Las mutaciones de aminoácido de objetivo en la Tabla 1 a continuación se muestran utilizando la numeración de SEQ ID NO: 1.

Tabla 1

<i>Mutante</i>	<i>Sustituciones</i>						
1	E46A	S49A	V52A	N53A	R56L	M58V	
2	Q70S	R73A	A74E	A107I	R109G		
3	A99S	E129A	K133A	E134N	A135S		
4	K145A	K147A	S152H	S155A	Y161S	E203A	K206A
5	P165S	D168G	N211A	E296A	R297A		
6	K179A	E196A	I197S	T198A	E224A	M225S	Q231A
7	K262A	F265S	I266A	K274Q	I292A	S302A	H304Y
8	P318A	S319A	K321A	N325A	K326Q		
9	Y345A	D347A	S349A	S352A	D399A	R401A	
10	D460A	L461S	S462A	R463A	G466W	D467N	K471A
11	D473A	K478A	R480A	S483A	D485A	K488E	E491K
12	N503A	Q509A	K512S	D513A			
13	R354A	R395A	Q444A	T446A			
14	D332A	N333A	T336A	E409A			
15	H375A	E378A	R517A	S520A	D522A		

Generación de mutantes

25 Los mutantes de CD73 son generados por PCR. Las secuencias amplificadas son ejecutadas en gel de agarosa y purificadas utilizando el equipo de Extracción de Gel de Limpieza de PCR Macherey Nagel (referencia 740609). Los productos de PCR purificados generados para cada mutante después son ligados a un vector de expresión, con el sistema de ClonTech InFusion. Los vectores que contienen las secuencias mutadas son preparados como Miniprep y secuenciados. Después de la secuenciación, los vectores que contienen las secuencias mutadas son preparados como Midiprep utilizando el Sistema Midiprep de Plásmido Promega PureYield™. Las células HEK293T son cultivadas en medio DMEM (Invitrogen), transfectadas con vectores utilizando Lipofectamine 2000 de Invitrogen e incubadas a 37°C en un incubador de CO2 durante 24 horas previo a la prueba para expresión del transgén.

30

El análisis de citometría de flujo de unión a anti-CD73 a las células transfectadas HEK293T

Los anticuerpos anti-CD73 son probados para su unión a cada mutante por medio de citometría de flujo. Un primer experimento se llevó a cabo para determinar anticuerpos que pierden su unión a uno o varios mutantes en una concentración. Para confirmar una pérdida de unión, la titulación de anticuerpos se realiza en los anticuerpos para los cuales la unión parecía estar afectada por las mutaciones de CD73 (1–0,1–0,01–0,001 µg/ml). Los anticuerpos 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1 perdieron unión al mutante 3 de CD73, pero no a cualquier otro mutante. El mutante 3 contiene sustituciones de aminoácido en residuos A99, E129, K133, E134 y A135, que indica que uno o más, o todos de, los residuos del mutante son importantes para el epítipo de núcleo de estos anticuerpos. El anticuerpo AD2 que ocasiona la acumulación e internalización de CD73 no perdió unión al mutante 3; AD2 a su vez perdió unión al mutante 2 que tiene sustituciones en residuos Q70, R73, A74, A107 y R109. Los resultados ejemplares para los anticuerpos 3C12 y AD2 se muestran en la figura 7. El anticuerpo 7G2 perdió unión a los mutantes 5, 6 y 7 (pero no a los mutantes 2 o 3).

Quando es unido por ligandos del sitio activo como se ilustró por el aglutinante APCP análogo de ADP de manera irreversible, el CD73 cambia la conformación de una conformación “abierta” a una conformación “cerrada”. Como se muestra en el Ejemplo 4, mAbs 11E1, 8C7, 3C12 y 6E1 unidos al CD73 celular ambos en presencia y ausencia de APCP, que indica que el epítipo de estos anticuerpos continua presente en CD73 cuando el sitio activo está ocupado. La figura 8A muestra la estructura molecular del dímero de CD73, con aminoácidos mutados en el mutante 2 (pérdida de unión por AD2) indicados (círculos blancos) en ambas configuraciones “abierta” o “cerrada”. La figura 8B muestra la estructura molecular del dímero CD73, con aminoácidos mutados en el mutante 3 (pérdida de unión por 11E1, 8C7, 3C12 o 6E1) indicado en ambas configuraciones “abierta” o “cerrada”. El sitio activo está indicado por el cuadro (líneas punteadas). De manera interesante, se puede ver en la figura 8B que cuando el CD73 asume una forma dimérica, los aminoácidos mutados en el mutante 3 están en una superficie común del dímero de CD73, por ejemplo, en o aproximadamente en un plano (otros epítopos de otros mutantes no lo están). Finalmente a partir de una comparación de los aminoácidos dentro del mutante 3 se puede ver que estos residuos están relativamente distantes del sitio activo enzimático (indicado en la figura 8B), consistente con un modo de acción que involucra la inhibición alostérica de CD73.

Ejemplo 9: Afinidad de unión a CD73 por medio de Resonancia Plasmónica de Superficie (RPS)

Biacore T100 procedimiento general y reactivos

Las mediciones de la RPS se realizaron en un aparato Biacore T100 (Biacore GE Healthcare) a 25°C. En todos los experimentos con Biacore, HBS-EP+ (Biacore GE Healthcare) y NaOH 10 mM sirvió como tampón de ejecución y tampón de regeneración respectivamente. Los sensogramas se analizaron con el software de Evaluación Biacore T100. La proteína A se compró de (GE Healthcare). Las proteínas de CD73 dímérico soluble humano fueron clonadas, producidas y purificadas en Innate Pharma.

Inmovilización de Proteína-A

Las proteínas de Proteína-A se inmovilizaron covalentemente a grupos carboxilos en el estrato de dextrano en un Sensor Chip CM5. La superficie de chip se activó con EDC/NHS (N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida clorhidrato y N-hidroxusuccinimida (Biacore GE Healthcare). La Proteína-A se diluyó a 10 µg/ml en tampón de acoplamiento (10 mM de acetato, pH 5,6) y se inyectó hasta que se consiguió el nivel de inmovilización apropiada (es decir 2000 RU). La desactivación de los grupos activados restantes se llevó a cabo utilizando 100 mM de etanolamina pH 8 (Biacore GE Healthcare).

Estudio de afinidad

El estudio de afinidad se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo cinético de captura estándar recomendado por el fabricante (asistente cinético de Biacore GE Healthcare). Las diluciones seriales de proteínas de CD73 díméricas solubles recombinantes humanas, que oscila de 1,23 a 300 nM se inyectaron secuencialmente sobre los anticuerpos anti-CD73 capturados y se permitió que se desasociaran durante 10 min antes de la regeneración. Las configuraciones del sensograma completo se ajustaron utilizando el modelo de unión cinético 1:1. Las afinidades bivalentes y asociación cinética y constantes de tasa de disociación se muestran más adelante en la Tabla 2.

Tabla 2

Ab CD73	KD (nM)
1E11	0,822
3C12	0,682
6E1	0,819

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INNATE PHARMA

<120> BLOQUEO DE CD73

<130> CD73-1

5 <150> US 62/062.323
<151> 10-10-2014

<150> US 62/118.549
<151> 20-02-2015

10 <150> US 62/133.597
<151> 16-03-2015

<150> US 62/188.881
<151> 06-07-2015

<160> 46

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1
<211> 574
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Met Cys Pro Arg Ala Ala Arg Ala Pro Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15

Gly Ala Val Leu Trp Pro Ala Ala Gly Ala Trp Glu Leu Thr Ile Leu
20 25 30

His Thr Asn Asp Val His Ser Arg Leu Glu Gln Thr Ser Glu Asp Ser
35 40 45

Ser Lys Cys Val Asn Ala Ser Arg Cys Met Gly Gly Val Ala Arg Leu
50 55 60

Phe Thr Lys Val Gln Gln Ile Arg Arg Ala Glu Pro Asn Val Leu Leu
65 70 75 80

Leu Asp Ala Gly Asp Gln Tyr Gln Gly Thr Ile Trp Phe Thr Val Tyr
85 90 95

Lys Gly Ala Glu Val Ala His Phe Met Asn Ala Leu Arg Tyr Asp Ala
100 105 110

20 Met Ala Leu Gly Asn His Glu Phe Asp Asn Gly Val Glu Gly Leu Ile
115 120 125

ES 2 821 964 T3

Glu Pro Leu Leu Lys Glu Ala Lys Phe Pro Ile Leu Ser Ala Asn Ile
 130 135 140

Lys Ala Lys Gly Pro Leu Ala Ser Gln Ile Ser Gly Leu Tyr Leu Pro
 145 150 155 160

Tyr Lys Val Leu Pro Val Gly Asp Glu Val Val Gly Ile Val Gly Tyr
 165 170 175

Thr Ser Lys Glu Thr Pro Phe Leu Ser Asn Pro Gly Thr Asn Leu Val
 180 185 190

Phe Glu Asp Glu Ile Thr Ala Leu Gln Pro Glu Val Asp Lys Leu Lys
 195 200 205

Thr Leu Asn Val Asn Lys Ile Ile Ala Leu Gly His Ser Gly Phe Glu
 210 215 220

Met Asp Lys Leu Ile Ala Gln Lys Val Arg Gly Val Asp Val Val Val
 225 230 235 240

Gly Gly His Ser Asn Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Asn Pro Pro Ser Lys
 245 250 255

Glu Val Pro Ala Gly Lys Tyr Pro Phe Ile Val Thr Ser Asp Asp Gly
 260 265 270

Arg Lys Val Pro Val Val Gln Ala Tyr Ala Phe Gly Lys Tyr Leu Gly
 275 280 285

Tyr Leu Lys Ile Glu Phe Asp Glu Arg Gly Asn Val Ile Ser Ser His
 290 295 300

Gly Asn Pro Ile Leu Leu Asn Ser Ser Ile Pro Glu Asp Pro Ser Ile
 305 310 315 320

Lys Ala Asp Ile Asn Lys Trp Arg Ile Lys Leu Asp Asn Tyr Ser Thr
 325 330 335

Gln Glu Leu Gly Lys Thr Ile Val Tyr Leu Asp Gly Ser Ser Gln Ser
 340 345 350

Cys Arg Phe Arg Glu Cys Asn Met Gly Asn Leu Ile Cys Asp Ala Met
 355 360 365

Ile Asn Asn Asn Leu Arg His Thr Asp Glu Met Phe Trp Asn His Val
 370 375 380

ES 2 821 964 T3

Ser Met Cys Ile Leu Asn Gly Gly Gly Ile Arg Ser Pro Ile Asp Glu
385 390 395 400

Arg Asn Asn Gly Thr Ile Thr Trp Glu Asn Leu Ala Ala Val Leu Pro
405 410 415

Phe Gly Gly Thr Phe Asp Leu Val Gln Leu Lys Gly Ser Thr Leu Lys
420 425 430

Lys Ala Phe Glu His Ser Val His Arg Tyr Gly Gln Ser Thr Gly Glu
435 440 445

Phe Leu Gln Val Gly Gly Ile His Val Val Tyr Asp Leu Ser Arg Lys
450 455 460

Pro Gly Asp Arg Val Val Lys Leu Asp Val Leu Cys Thr Lys Cys Arg
465 470 475 480

Val Pro Ser Tyr Asp Pro Leu Lys Met Asp Glu Val Tyr Lys Val Ile
485 490 495

Leu Pro Asn Phe Leu Ala Asn Gly Gly Asp Gly Phe Gln Met Ile Lys
500 505 510

Asp Glu Leu Leu Arg His Asp Ser Gly Asp Gln Asp Ile Asn Val Val
515 520 525

Ser Thr Tyr Ile Ser Lys Met Lys Val Ile Tyr Pro Ala Val Glu Gly
530 535 540

Arg Ile Lys Phe Ser Thr Gly Ser His Cys His Gly Ser Phe Ser Leu
545 550 555 560

Ile Phe Leu Ser Leu Trp Ala Val Ile Phe Val Leu Tyr Gln
565 570

<210> 2
<211> 553
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

Met Cys Pro Arg Ala Ala Arg Ala Pro Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15

Gly Ala Val Leu Trp Pro Ala Ala Gly Ala Trp Glu Leu Thr Ile Leu
20 25 30

ES 2 821 964 T3

His Thr Asn Asp Val His Ser Arg Leu Glu Gln Thr Ser Glu Asp Ser
 35 40 45

Ser Lys Cys Val Asn Ala Ser Arg Cys Met Gly Gly Val Ala Arg Leu
 50 55 60

Phe Thr Lys Val Gln Gln Ile Arg Arg Ala Glu Pro Asn Val Leu Leu
 65 70 75 80

Leu Asp Ala Gly Asp Gln Tyr Gln Gly Thr Ile Trp Phe Thr Val Tyr
 85 90 95

Lys Gly Ala Glu Val Ala His Phe Met Asn Ala Leu Arg Tyr Asp Ala
 100 105 110

Met Ala Leu Gly Asn His Glu Phe Asp Asn Gly Val Glu Gly Leu Ile
 115 120 125

Glu Pro Leu Leu Lys Glu Ala Lys Phe Pro Ile Leu Ser Ala Asn Ile
 130 135 140

Lys Ala Lys Gly Pro Leu Ala Ser Gln Ile Ser Gly Leu Tyr Leu Pro
 145 150 155 160

Tyr Lys Val Leu Pro Val Gly Asp Glu Val Val Gly Ile Val Gly Tyr
 165 170 175

Thr Ser Lys Glu Thr Pro Phe Leu Ser Asn Pro Gly Thr Asn Leu Val
 180 185 190

Phe Glu Asp Glu Ile Thr Ala Leu Gln Pro Glu Val Asp Lys Leu Lys
 195 200 205

Thr Leu Asn Val Asn Lys Ile Ile Ala Leu Gly His Ser Gly Phe Glu
 210 215 220

Met Asp Lys Leu Ile Ala Gln Lys Val Arg Gly Val Asp Val Val Val
 225 230 235 240

Gly Gly His Ser Asn Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Asn Pro Pro Ser Lys
 245 250 255

Glu Val Pro Ala Gly Lys Tyr Pro Phe Ile Val Thr Ser Asp Asp Gly
 260 265 270

Arg Lys Val Pro Val Val Gln Ala Tyr Ala Phe Gly Lys Tyr Leu Gly
 275 280 285

ES 2 821 964 T3

Tyr Leu Lys Ile Glu Phe Asp Glu Arg Gly Asn Val Ile Ser Ser His
 290 295 300
 Gly Asn Pro Ile Leu Leu Asn Ser Ser Ile Pro Glu Asp Pro Ser Ile
 305 310 315 320
 Lys Ala Asp Ile Asn Lys Trp Arg Ile Lys Leu Asp Asn Tyr Ser Thr
 325 330 335
 Gln Glu Leu Gly Lys Thr Ile Val Tyr Leu Asp Gly Ser Ser Gln Ser
 340 345 350
 Cys Arg Phe Arg Glu Cys Asn Met Gly Asn Leu Ile Cys Asp Ala Met
 355 360 365
 Ile Asn Asn Asn Leu Arg His Thr Asp Glu Met Phe Trp Asn His Val
 370 375 380
 Ser Met Cys Ile Leu Asn Gly Gly Gly Ile Arg Ser Pro Ile Asp Glu
 385 390 395 400
 Arg Asn Asn Gly Thr Ile Thr Trp Glu Asn Leu Ala Ala Val Leu Pro
 405 410 415
 Phe Gly Gly Thr Phe Asp Leu Val Gln Leu Lys Gly Ser Thr Leu Lys
 420 425 430
 Lys Ala Phe Glu His Ser Val His Arg Tyr Gly Gln Ser Thr Gly Glu
 435 440 445
 Phe Leu Gln Val Gly Gly Ile His Val Val Tyr Asp Leu Ser Arg Lys
 450 455 460
 Pro Gly Asp Arg Val Val Lys Leu Asp Val Leu Cys Thr Lys Cys Arg
 465 470 475 480
 Val Pro Ser Tyr Asp Pro Leu Lys Met Asp Glu Val Tyr Lys Val Ile
 485 490 495
 Leu Pro Asn Phe Leu Ala Asn Gly Gly Asp Gly Phe Gln Met Ile Lys
 500 505 510
 Asp Glu Leu Leu Arg His Asp Ser Gly Asp Gln Asp Ile Asn Val Val
 515 520 525
 Ser Thr Tyr Ile Ser Lys Met Lys Val Ile Tyr Pro Ala Val Glu Gly

ES 2 821 964 T3

530

535

540

Arg Ile Lys His His His His His His
545 550

<210> 3
<211> 120
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

5

<400> 3

Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Gly Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 4
<211> 106
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10

<400> 4

ES 2 821 964 T3

Asp Ala Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr
 85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 5

Ser Tyr Asn Met Tyr
 1 5

<210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 6

Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr
 1 5

<210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 7

Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr Asn
 1 5

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 8

ES 2 821 964 T3

Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

5 <210> 9
<211> 4
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 9

Pro Tyr Asn Gly
1

10 <210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 10

Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr
1 5

15 <210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 11

Gly Tyr Gly Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

20 <210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 12

Tyr Gly Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala
1 5

25 <210> 13
<211> 13
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
30 <400> 13

Ala Arg Gly Tyr Gly Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

35 <210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 14

Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp Val Ala
1 5 10

ES 2 821 964 T3

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

5 <400> 15

Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp
1 5

<210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10 <400> 16

Gln Ser Val Thr Asn Asp
1 5

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

15 <400> 17

Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

<210> 18
<211> 3
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20 <400> 18

Tyr Ala Ser
1

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

25 <400> 19

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr
1 5

<210> 20
<211> 5
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

30 <400> 20

Asp Tyr Ser Ser Leu
1 5

<210> 21
<211> 120
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

35 <400> 21

<210> 21
<211> 120
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

40 <400> 21

ES 2 821 964 T3

Glu Phe Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met His Leu Asn Asn Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Asn Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 22
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 22

5

ES 2 821 964 T3

Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Met Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr
 85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 23

Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 24
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10

<400> 24

Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Ser
 1 5

<210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 25

Gly Tyr Asn Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

20

<210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

ES 2 821 964 T3

<400> 26

Tyr Asn Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala
1 5

<210> 27

<211> 13

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 27

Ala Arg Gly Tyr Asn Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 28

10 <211> 126

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 28

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ala Ser Tyr
20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Asp Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Leu Thr Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Gly Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

15 <210> 29

<211> 112

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 29

20 Ser Ile Val Met Thr Pro Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly

ES 2 821 964 T3

Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Leu Thr Phe Lys
1 5 10 15

Gly

5 <210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 34

Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
1 5

10 <210> 35
<211> 6
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 35

Gln Ser Val Ser Asn Asp
1 5

15 <210> 36
<211> 126
<212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 36

ES 2 821 964 T3

Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ala Ser Tyr
 20 25 30

Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Leu Thr Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Gly Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

- <210> 37
- <211> 112
- <212> PRT
- <213> *Mus musculus*
- <400> 37

5

ES 2 821 964 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Thr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr
 85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

5 <210> 38
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> X
 <222> (5)..(5)
 <223> X es cualquier aminoácido

10 <400> 38

Ser Tyr Asn Met Xaa
 1 5

15 <210> 39
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<220>
 <221> X
 <222> (9)..(9)
 <223> X es cualquier aminoácido

20 <220>
 <221> X
 <222> (13)..(13)
 <223> X es cualquier aminoácido

25 <220>
 <221> X
 <222> (14)..(14)
 <223> X es cualquier aminoácido

<400> 39

ES 2 821 964 T3

Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Xaa Ser Tyr Asn Xaa Xaa Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

5 <210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <220>
 <221> X
 <222> (9)..(9)
 <223> X es cualquier aminoácido
 10 <400> 40

Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Xaa
 1 5

15 <210> 41
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <220>
 <221> X
 <222> (3)..(3)
 <223> X es cualquier aminoácido
 20 <400> 41

Gly Tyr Xaa Ala Ala Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

25 <210> 42
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <220>
 <221> X
 <222> (7)..(7)
 <223> X es cualquier aminoácido
 30 <400> 42

Lys Ala Ser Gln Ser Val Xaa Asn Asp Val Ala
 1 5 10

35 <210> 43
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <220>
 <221> X
 <222> (4)..(4)
 <223> X es cualquier aminoácido
 40 <400> 43

Tyr Ala Ser Xaa Arg Tyr Thr
 1 5

ES 2 821 964 T3

<210> 44
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 44

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala
1 5 10

<210> 45
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 45

tacgactcac aagcttgccg ccaccatgtg tccccgagcc gcgcg 45

<210> 46
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 46

ccgccccgac tctagatcag tgatggtgat gatggtgctt gatccgacct tcaactg 57

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo aislado que específicamente se une a un polipéptido CD73 humano en la superficie de una célula y que tiene capacidad de neutralizar la actividad 5'-ectonucleotidasa de la misma, en donde el anticuerpo no induce la internalización del complejo del anticuerpo-CD73, y en donde dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en:
- (a) anticuerpo monoclonal que comprende (i) una cadena pesada que comprende CDR 1, 2 y 3 de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3 y (ii) una cadena ligera que comprende CDR 1, 2 y 3 de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 4;
- 10 (b) anticuerpo monoclonal que comprende (i) una cadena pesada que comprende CDR 1, 2 y 3 de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 21 y (ii) una cadena ligera que comprende CDR 1, 2 y 3 de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 22;
- (c) anticuerpo monoclonal que comprende (i) una cadena pesada que comprende CDR 1, 2 y 3 de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 28 y (ii) una cadena ligera que comprende CDR 1, 2 y 3 de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 29; y
- 15 (d) anticuerpo monoclonal que comprende (i) una cadena pesada que comprende CDR 1, 2 y 3 de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 36 y (ii) una cadena ligera que comprende CDR 1, 2 y 3 de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 37;
- en donde la numeración de CDR es de acuerdo con Kabat.
- 20 2. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une a un dímero de polipéptido CD73 de manera bivalente.
3. El anticuerpo aislado de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo carece de unión, a través de un dominio Fc, con los polipéptidos CD16A, CD16B, CD32A, CD32B y CD64.
4. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo actúa como un inhibidor alostérico de un polipéptido CD73 humano expresado por una célula.
- 25 5. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es capaz de neutralizar la actividad 5'-ectonucleotidasa de un polipéptido CD73 humano soluble.
6. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo se caracteriza por una CE₅₀ para neutralización de la actividad 5'-ectonucleotidasa de CD73 celular de no más de 1 µg/ml, en donde la neutralización de la actividad enzimática de CD73 se determina evaluando la neutralización de la actividad 5'-ectonucleotidasa en células MDA-MB-231 cuantificando la hidrólisis de AMP a adenosina.
- 30 7. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo se une a un polipéptido CD73 que se une al sustrato adenosina 5'-(α,β-metileno)difosfato (APCP) o AMP.
8. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es capaz de neutralizar la actividad 5'-ectonucleotidasa de un polipéptido CD73 dimérico humano soluble cuando el anticuerpo se proporciona a un exceso molar de 10 veces o mayor al dímero de polipéptido CD73.
- 35 9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende CDR 1, 2 y 3 de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 36 y una cadena ligera que comprende CDR 1, 2 y 3 de la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 37; en donde la numeración de las CDR es de acuerdo con Kabat.
- 40 10. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG4 o un anticuerpo que tiene un dominio Fc que está modificado para reducir la unión entre el dominio Fc y un receptor Fcγ.
- 45 11. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es un Fab, Fab', Fab'-SH, F (ab')₂, Fv, un diacuerpo, fragmento de anticuerpo de cadena sencilla o un anticuerpo multiespecífico que comprende múltiples fragmentos de anticuerpos diferentes.
12. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. Un ácido nucleico que codifica una cadena pesada y ligera de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o un hibridoma o célula hésped recombinante que produce el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 50 14. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o una composición de la reivindicación 12, para su uso en el tratamiento del cáncer.

15. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el cáncer es una leucemia, cáncer de vejiga, glioma, glioblastoma, cáncer de ovario, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de esófago o un cáncer de mama.

Figura 1

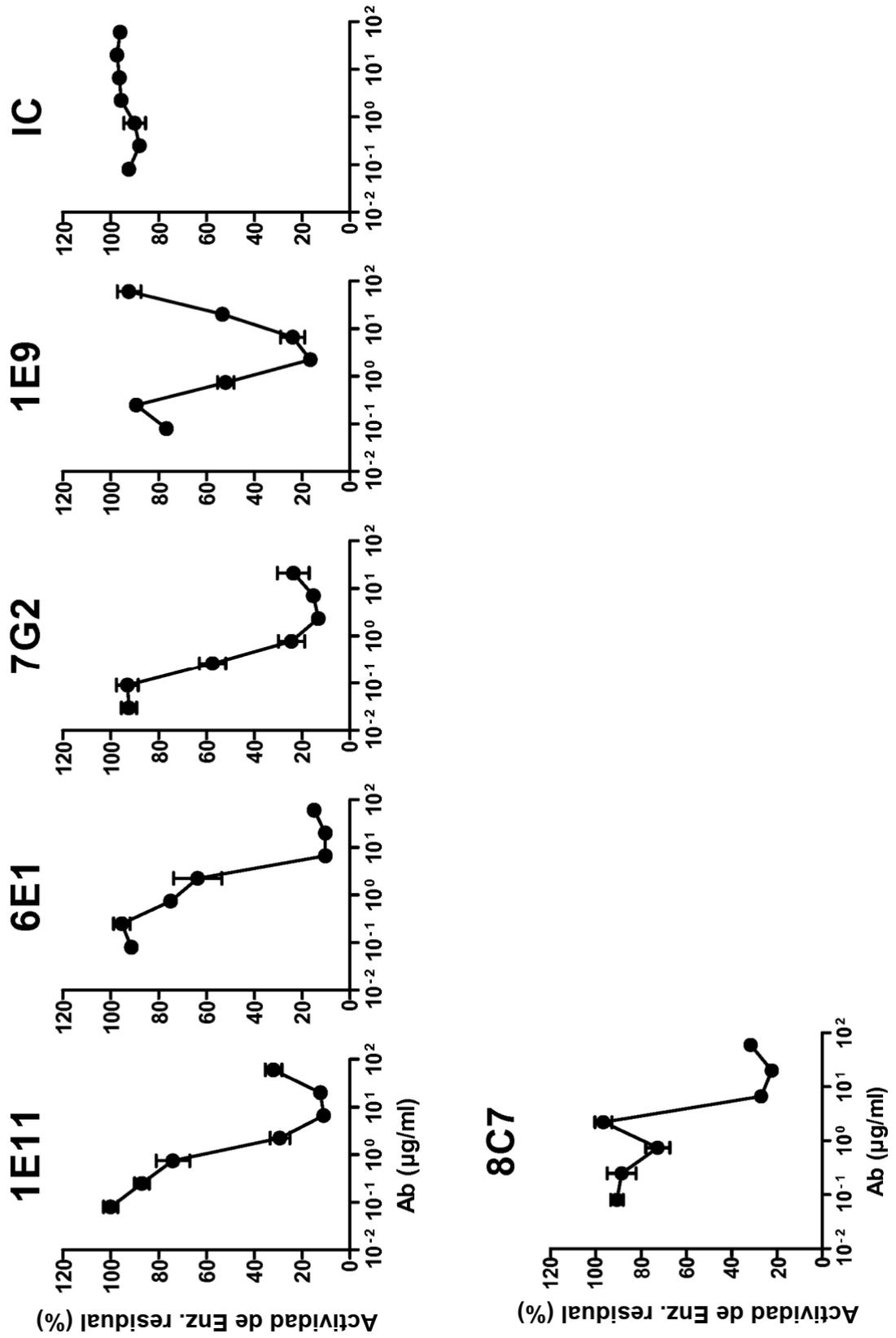


Figura 2

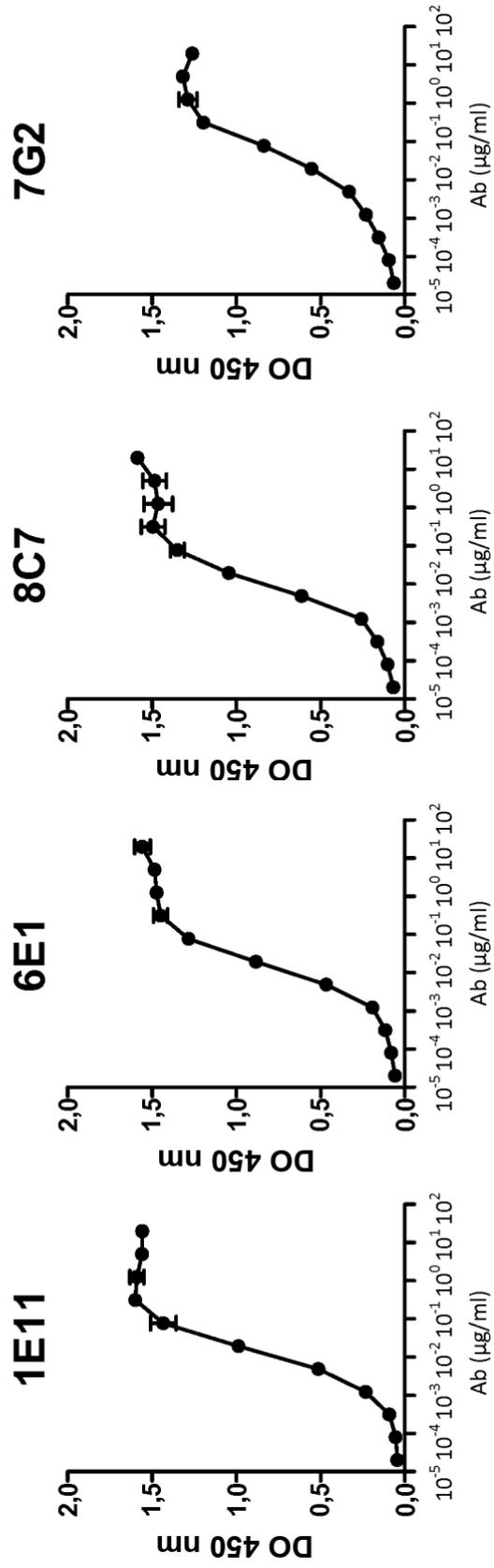


Figura 3

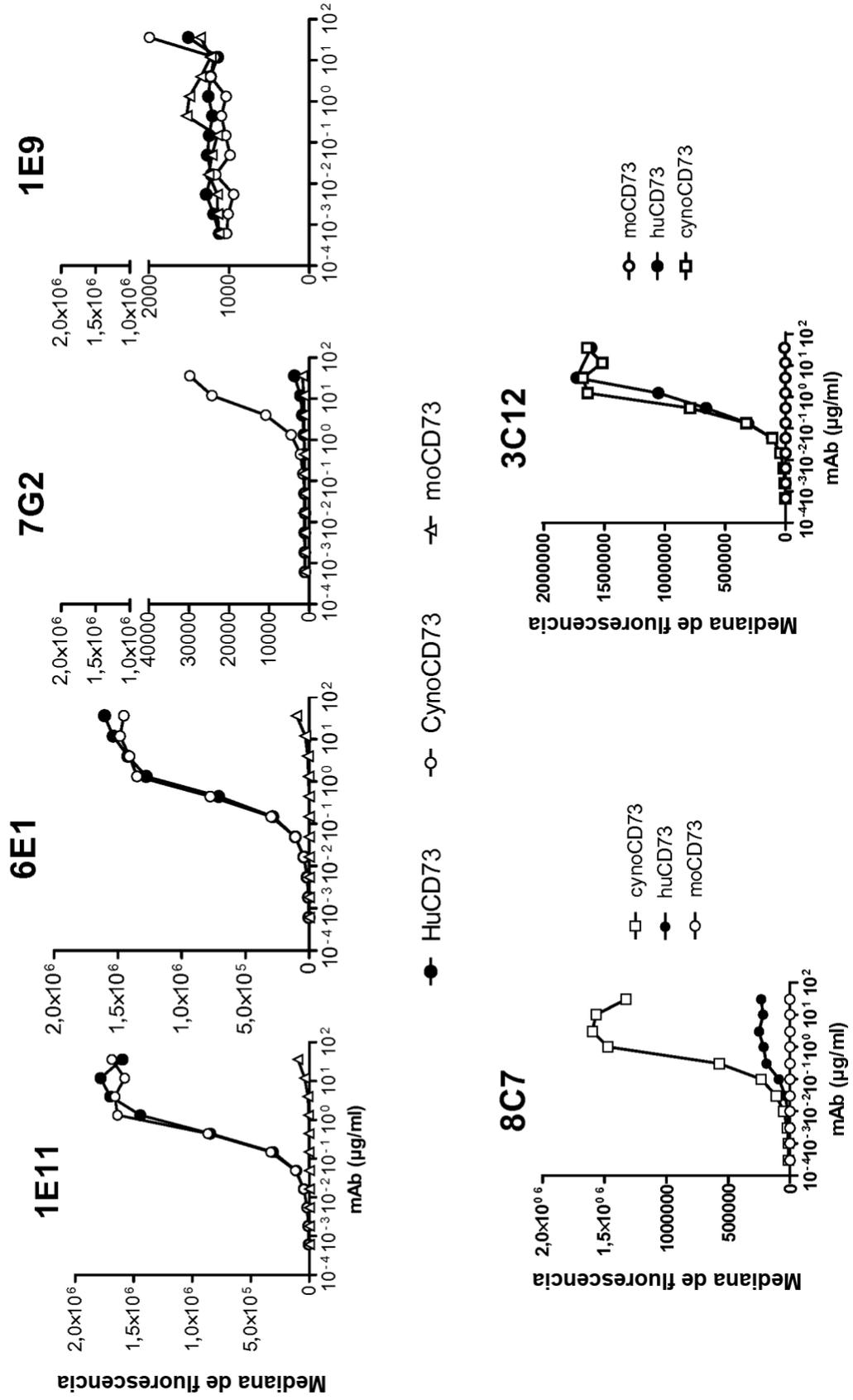


Figura 4

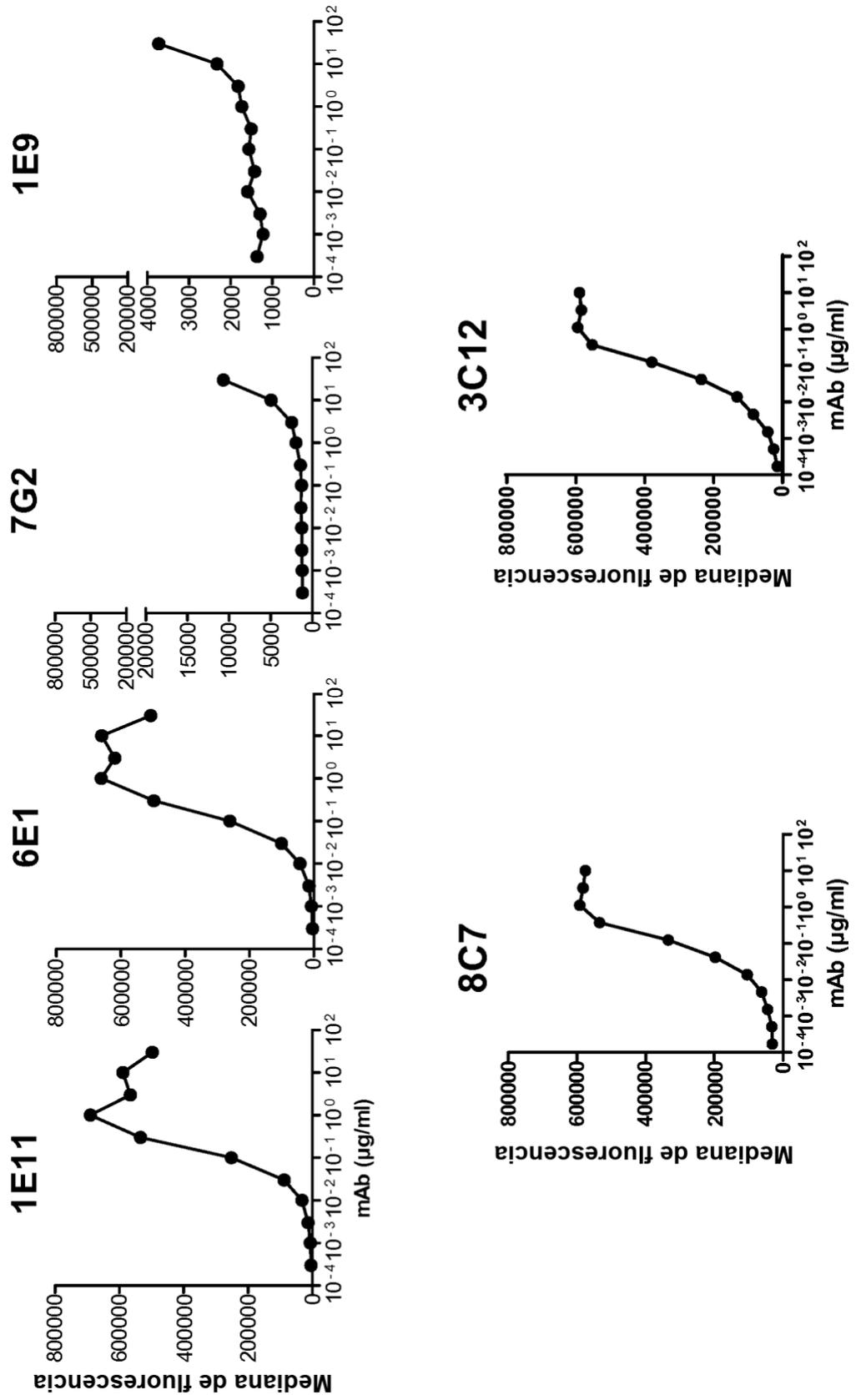


Figura 5

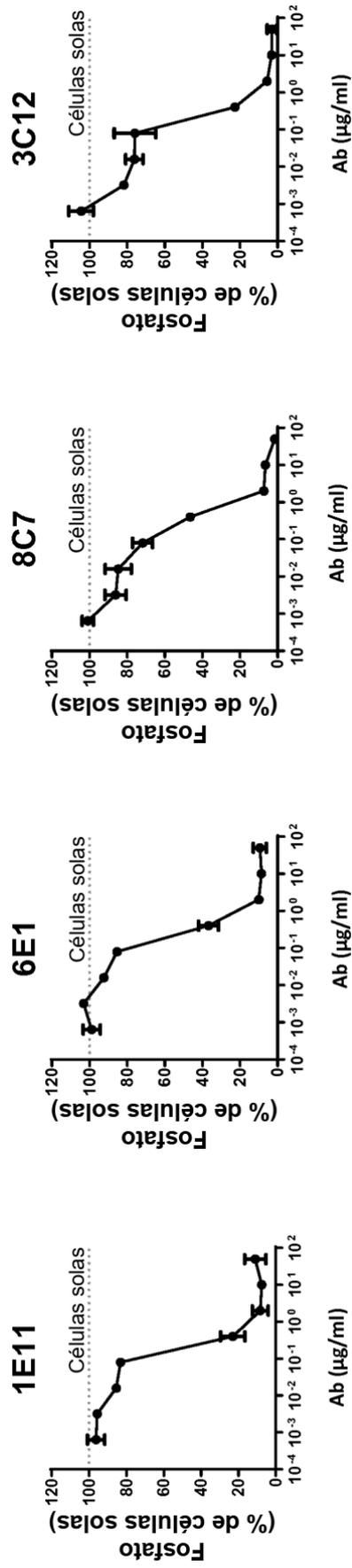


Figura 6

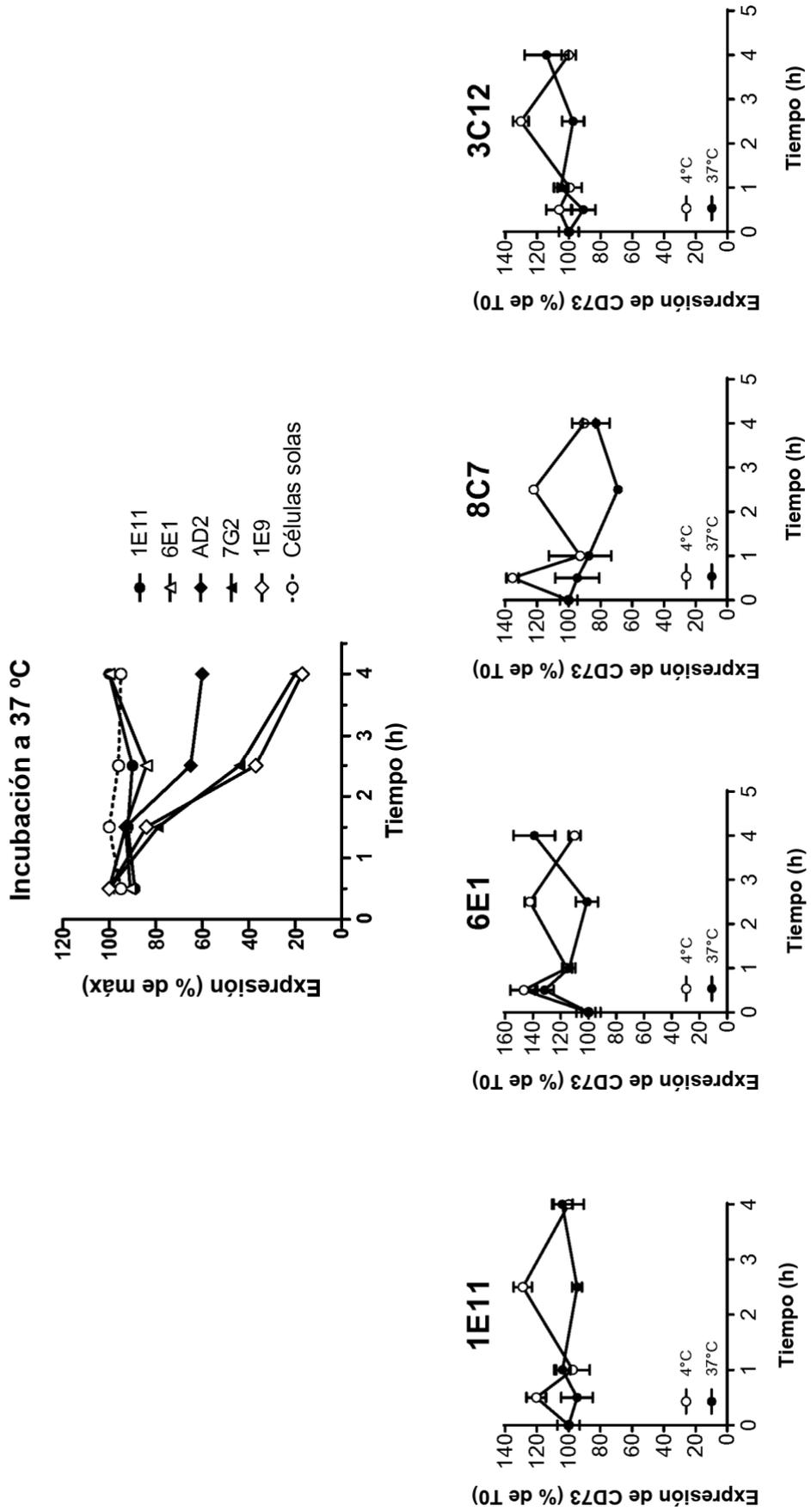


Figura 7

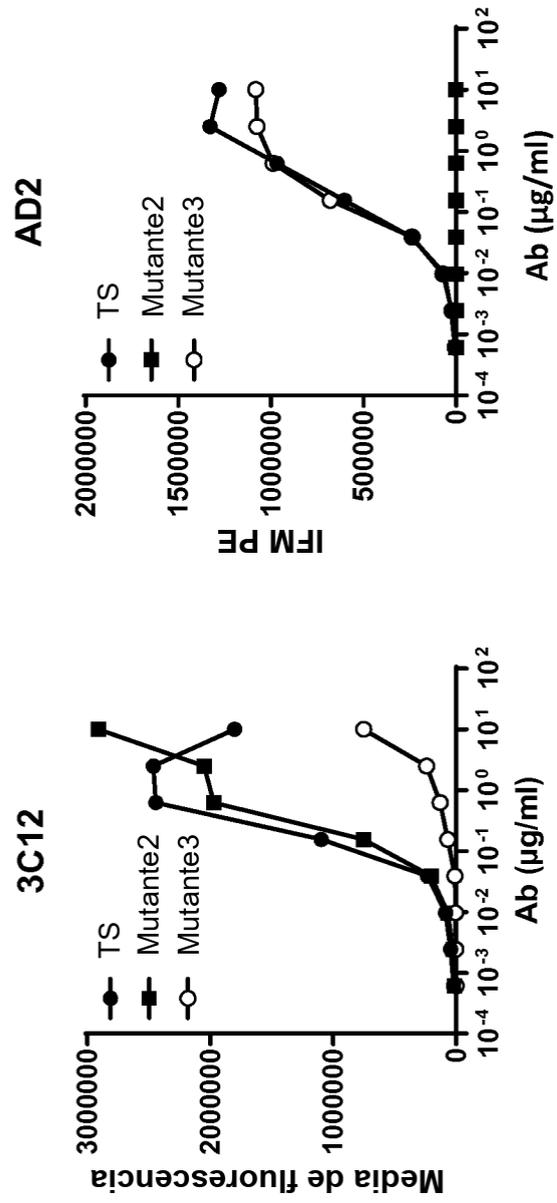
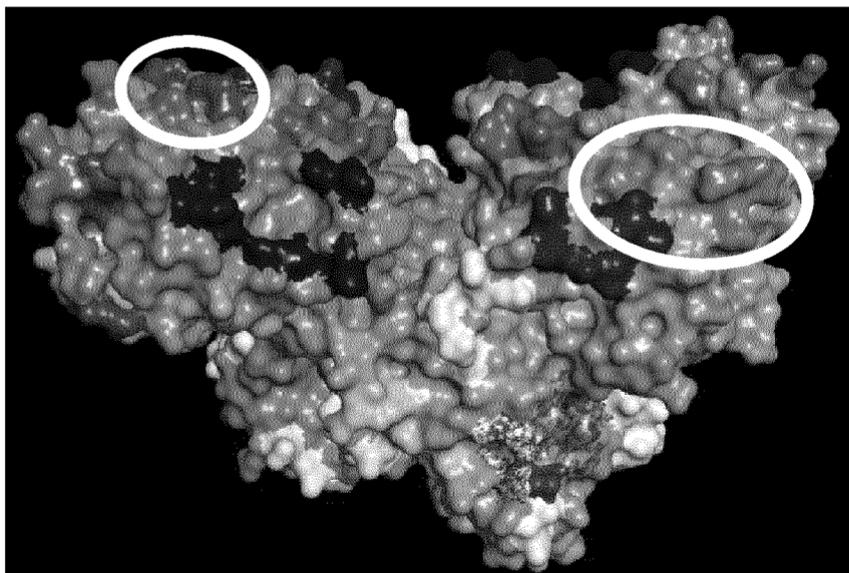


Figura 8A

ABIERTA



CERRADA

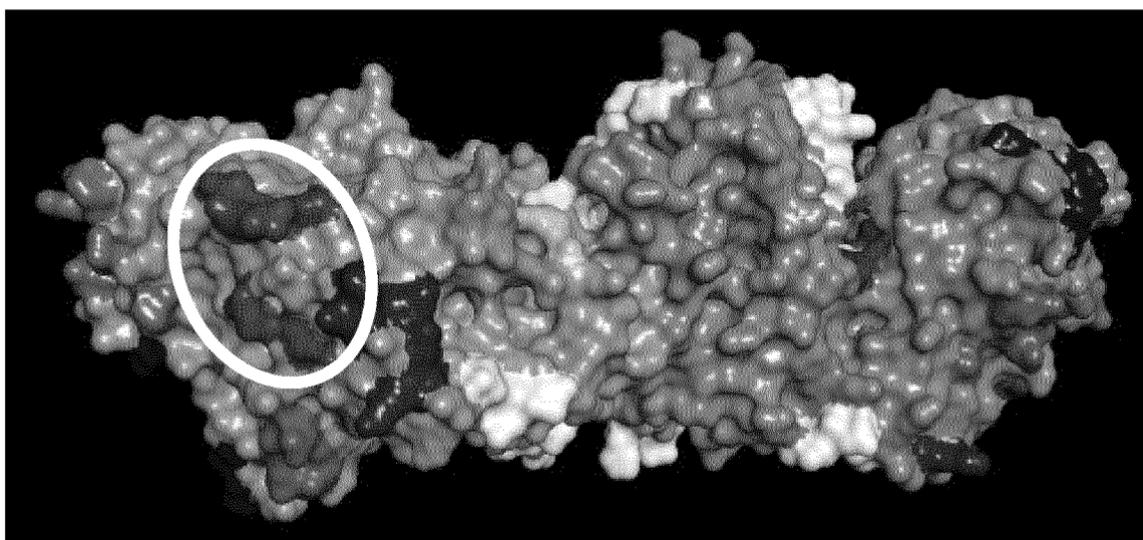
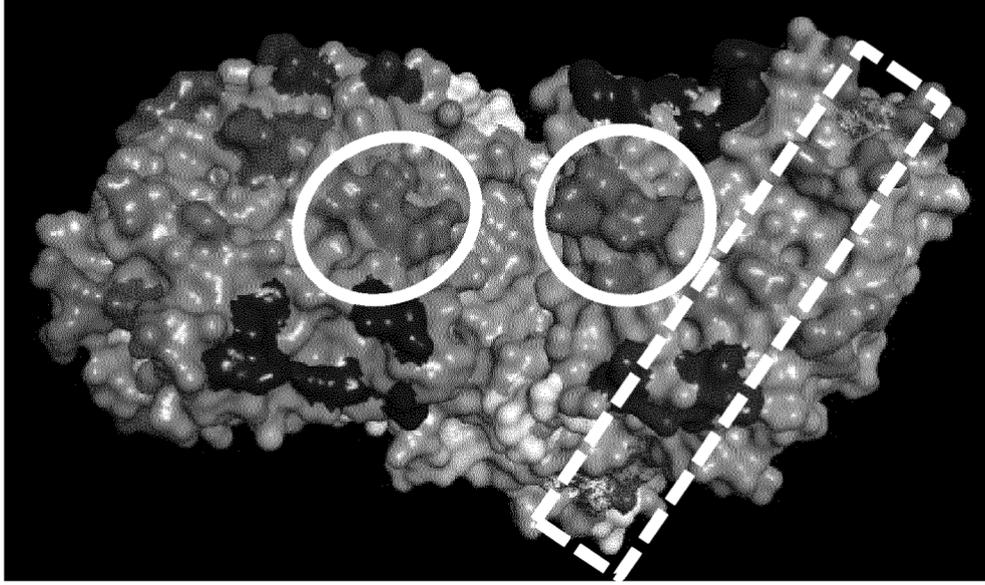


Figura 8B

ABIERTA



CERRADA

