(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 035766 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.08.07

(21) Номер заявки
201790986

(22) Дата подачи заявки
2015.11.19

(51) Int. Cl. ***C07K 16/28*** (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛО К CD73 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/083,056**
(32) **2014.11.21**
(33) **US**
(43) **2017.10.31**
(86) **PCT/US2015/061639**
(87) **WO 2016/081748 2016.05.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БРИСТОЛ-МАЙЕРС СКВИББ КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
Лонберг Нилс, Корман Алан Дж., Барнхарт Брайан С., Ямнюк Аарон П., Сринивасан Мохан, Хеннинг Карла А., Лэй Мин, Сега Эмануэла, Гудинаф Анджела, Джуре-Кункел Мариа Н., Чэнь Годун, Сэк Джон, Хуанг Ричард, Корбетт Мартин Дж., Майерс Джозеф Е. (US), Швайцер Лианг (CN), Хэтчер Сандра В., Хуан Хайчун, Чжан Пинпин (US)

(74) Представитель:
Угрюмов В.М., Лыу Т.Н., Гизатуллина Е.М., Карпенко О.Ю., Строкова О.В., Глухарёва А.О., Дементьев В.Н. (RU)

(56) STEVEN RUST ET AL.: "Combining phenotypic and proteomic approaches to identify membrane targets in a "triple negative" breast cancer breast cancer cell type", MOLECULAR CANCER, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 12, no. 1, 13 February 2013 (2013-02-13), page 11, XP021139556, ISSN: 1476-4598, DOI: 10.1186/1476-4598-12-11, whole document, especially the Abstract; page 6, right-hand column, first full paragraph; Figure 4

US-A1-2014235833

TERP M.G. ET AL.: "Anti-Human CD73 Monoclonal Antibody Inhibits Metastasis Formation in Human Breast Cancer by Inducing Clustering and Internalization of CD73 Expressed on the Surface of Cancer Cells", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 191, no. 8, 16 September 2013 (2013-09-16), pages 4165-4173, XP055245512, US, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1301274, whole document, especially the Abstract; page 4166, right-hand column, lines 10-19 and last paragraph; page 4167, paragraph 3

CANFIELD S.M. ET AL.: "THE BINDING AFFINITY OF HUMAN IGG FOR ITS HIGH AFFINITY FC RECEPTOR IS DETERMINED BY MULTIPLE AMINO ACIDS IN THE CH2 DOMAIN AND IS MODULATED BY THE HINGE REGION", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US, vol. 173, no. 6, 1 June 1991 (1991-06-01), pages 1483-1491, XP001181027, ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/JEM.173.6.1483, cited in the application, whole document, especially the Abstract; Table 1

US-A1-2013317203

WO-A1-2009053368

(57) В изобретении представлено выделенное человеческое антитело, которое связывается с человеческим кластером дифференцировки 73 (CD73) и содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 13, 14 и 15 соответственно, причем антитело содержит константный участок тяжелой цепи, который содержит шарнир IgG2 и CH1 домен IgG1. В изобретении также представлен способ лечения злокачественной опухоли, экспрессирующей CD73, с применением антитела согласно изобретению.

035766 B1

035766 B1

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на выдачу патента США № 62/083056 под названием "Антитела к CD73 и их применения", поданной 21 ноября 2014 г., содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Кластер дифференцировки 73 (CD73), также известный как экто-5'-нуклеотидаза (экто-5'NT, EC 3.1.3.5), представляет собой связанный с гликозил-фосфатидилинозитолом (GPI) фермент на клеточной поверхности, обнаруживающийся в большинстве тканей, но прежде всего экспрессирующийся в эндотелиальных клетках и субпопуляциях гемопоэтических клеток (Resta et al., Immunol Rev 1998; 161:95-109; и Colgan et al., Prinergic Signal 2006; 2:351-60). Известно, что CD73 катализирует дефосфорилирование внеклеточных нуклеозидмонофосфатов в нуклеозиды, такие как аденозин. Аденозин представляет собой широко исследуемую сигнальную молекулу, которая опосредует свои биологические эффекты через несколько рецепторов, в том числе A1, A2A, A2B и A3. Было показано, что аденозин регулирует пролиферацию и миграцию у многих злокачественных опухолей и обладает иммунодепрессивным эффектом за счет регуляции противоопухолевых Т-клеток (Zhang et al., Cancer Res 2010; 70:6407-11).

Сообщалось, что CD73 экспрессируется на многих злокачественных опухолях, в том числе злокачественных опухолях ободочной кишки, легкого, поджелудочной железы, яичника, мочевого пузыря, при лейкозе, глиоме, глиобластоме, меланоме, злокачественных опухолях щитовидной железы, пищевода, предстательной железы и молочной железы (Jin et al., Cancer Res 2010; 70:2245-55 и Stagg et al., PNAS 2010; 107:1547-52). Более того, экспрессию CD73 в злокачественной опухоли связывали с повышенной пролиферацией, миграцией, неоваскуляризацией, инвазионной способностью, метастазированием и меньшим сроком дожития у пациентов. Активность CD73 также была предложена в качестве прогностического маркера при папиллярных карциномах щитовидной железы. Хотя было показано, что CD73 регулирует взаимодействия клетка-клетка и клетка-матрикс на опухолевых клетках, экспрессию и активность CD73 связывали с ослабленными Т-клеточными реакциями и считали их связанными с устойчивостью к лекарственным средствам (Spychala et al., Pharmacol Ther 3000; 87:161-73). Таким образом, CD73 может регулировать развитие злокачественной опухоли как непосредственно, так и опосредовано, что привлекает внимание к его потенциалу в качестве новой терапевтической мишени.

С учетом постоянной потребности в улучшенных стратегиях для целенаправленного воздействия на заболевания, такие как злокачественные заболевания, очень желательными являются способы регулирования развития опухоли посредством нескольких механизмов, а также способы регулирования активности CD73 и соответствующие терапевтические средства.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

В данном документе представлены выделенные антитела, такие как моноклональные антитела (их антигенсвязывающие части), в частности человеческие моноклональные антитела, которые специфично связываются с CD73 и характеризуются желательными функциональными свойствами. Эти свойства включают в себя связывание с высокой аффинностью с человеческим CD73, связывание обезьяньим CD73 (например, с CD73 яванского макака) и способность к ингибированию ферментативной активности CD73. Антитела, описанные в данном документе, могут быть применены для ингибирования опухолевого роста, снижения продукции аденозина, стимуляции иммунной реакции и выявления белка CD73 в образце.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 проявляют по меньшей мере одно из следующих свойств:

(a) ингибирование ферментативной активности CD73;

(b) связывание с CD73 яванского макака;

(c) опосредованная антителом интернализация CD73 в клетки, например опухолевые клетки; и

(d) связывание с конформационным эпитопом, содержащим аминокислоты 65-83 и 157-172 в человеческом CD73.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 или их антигенсвязывающие части связываются с человеческим CD73 (мономерным и/или димерным CD73) с K_D, составляющей приблизительно от 10 до 0,1 нМ или менее при измерении, например, с помощью анализа SPR методом BIACORE®, и интернализируются в опухолевые клетки с $T_{1/2}$, составляющим не более 10 мин, при измерении, например, с помощью анализа вытеснения метки и как описано в разделе примеры.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 или их антигенсвязывающие части связываются с участками FTKVQQIRRAEPNVLLLDA (SEQ ID NO: 96) и/или LYLPYKVLPVGDEVVG (SEQ ID NO: 97) в человеческом CD73, например, причем эпитоп охватывает или перекрывается с FTKVQQIRRAEPNVLLLDA (SEQ ID NO: 96) и/или LYLPYKVLPVGDEVVG (SEQ ID NO: 97) в человеческом CD73.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 или их антигенсвязывающие части связываются с эпитопом на человеческом CD73 (SEQ ID NO: 1), который включает в себя все или часть аминокислотных остатков FTKVQQIRRAEPNVLLLDA (SEQ ID NO: 96) и/или LYLPYKVLPVGDEVVG (SEQ ID NO: 97). В соответствии с определенными вариантами осуществления эпитоп, связываемый антителами к CD73 или их антигенсвязывающими частями, определен, например, с

помощью HDX-MS и/или кристаллографии.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 содержат три CDR вариабельной тяжелой цепи и три CDR вариабельной легкой цепи, которые находятся в парах из вариабельной тяжелой цепи и вариабельной легкой цепи антител к CD73, описанных в данном документе, таких как цепи в табл. 35, например SEQ ID NO: 4 и 8; SEQ ID NO: 4 и 12; SEQ ID NO: 16 и 20; SEQ ID NO: 16 и 24; SEQ ID NO: 16 и 28; SEQ ID NO: 32 и 36; SEQ ID NO: 40 и 44; SEQ ID NO: 40 и 48; SEQ ID NO: 52 и 56; SEQ ID NO: 60 и 64; SEQ ID NO: 68 и 72; SEQ ID NO: 68 и 76; SEQ ID NO: 80 и 84; SEQ ID NO: 88 и 92; SEQ ID NO: 135 и 8 или SEQ ID NO: 135 и 12. Например, антитела к CD73 содержат:

(a) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно;

(b) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 13, 14 и 15 соответственно;

(c) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 17, 18 и 19 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 21, 22 и 23 соответственно;

(d) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 17, 18 и 19 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 25, 26 и 27 соответственно;

(e) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 17, 18 и 19 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 29, 30 и 31 соответственно;

(f) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 33, 34 и 35 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 37, 38 и 39 соответственно;

(g) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 41, 42 и 43 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 45, 46 и 47 соответственно;

(h) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 41, 42 и 43 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 49, 50 и 51 соответственно;

(i) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 53, 54 и 55 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 57, 58 и 59 соответственно;

(j) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 61, 62 и 63 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 65, 66 и 67 соответственно;

(k) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 69, 70 и 71 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 73, 74 и 75 соответственно;

(l) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 69, 70 и 71 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 77, 78 и 79 соответственно;

(m) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 81, 82 и 83 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 85, 86 и 87 соответственно; или

(n) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 89, 90 и 91 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 93, 94 и 95 соответственно.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 или их антигенсвязывающие части содержат последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 или их антигенсвязывающие части содержат последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, SEQ ID NO: 13, 14 и 15 соответственно.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 или их антигенсвязывающие части содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, имеющие аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 80% идентичны, например по меньшей мере 85, по меньшей мере 90, по меньшей мере 95, по меньшей мере 96, по меньшей мере 97, по меньшей мере 98

или по меньшей мере на 99% или более идентичны аминокислотным последовательностям вариабельного участка тяжелой цепи антител к CD73, описанных в данном документе, например содержащих аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 4, 16, 32, 40, 52, 60, 68, 80, 88, 135, 170-177, и/или вариабельного участка легкой цепи антител к CD73, описанных в данном документе, например содержащих аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 8, 12, 20, 24, 28, 36, 44, 48, 56, 64, 72, 76, 84 или 92.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 или их антигенсвязывающие части содержат последовательности вариабельного участка тяжелой цепи и легкой цепи, которые по меньшей мере на 80% идентичны, например по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 96, по меньшей мере на 97, по меньшей мере на 98 или по меньшей мере на 99% или более идентичны (например, на 100%) аминокислотным последовательностям: SEQ ID NO: 135 и 8; SEQ ID NO: 135 и 12; SEQ ID NO: 4 и 8; SEQ ID NO: 4 и 12; SEQ ID NO: 16 и 20; SEQ ID NO: 16 и 24; SEQ ID NO: 16 и 28; SEQ ID NO: 32 и 36; SEQ ID NO: 40 и 44; SEQ ID NO: 40 и 48; SEQ ID NO: 52 и 56; SEQ ID NO: 60 и 64; SEQ ID NO: 68 и 72; SEQ ID NO: 68 и 76; SEQ ID NO: 80 и 84; SEQ ID NO: 88 и 92; SEQ ID NO: 170 и любой из SEQ ID NO: 20, 24 и 28; любой из SEQ ID NO: 171-176 и SEQ ID NO: 8 или 12 или SEQ ID NO: 177 и 36.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 или их антигенсвязывающие части содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 135 и 8; SEQ ID NO: 135 и 12; SEQ ID NO: 4 и 8; SEQ ID NO: 4 и 12; SEQ ID NO: 16 и 20; SEQ ID NO: 16 и 24; SEQ ID NO: 16 и 28; SEQ ID NO: 32 и 36; SEQ ID NO: 40 и 44; SEQ ID NO: 40 и 48; SEQ ID NO: 52 и 56; SEQ ID NO: SEQ ID NO: 60 и 64; SEQ ID NO: 68 и 72; SEQ ID NO: 68 и 76; SEQ ID NO: 80 и 84; SEQ ID NO: 88 и 92; SEQ ID NO: 170 и любой из SEQ ID NO: 20, 24 и 28; любой из SEQ ID NO: 171-176 и SEQ ID NO: 8 или 12 или SEQ ID NO: 177 и 36.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержит вариабельный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 135, и вариабельный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 12.

В данном документе представлены антитела к CD73 или их антигенсвязывающие части соответственно, имеющие последовательности полноразмерных тяжелой цепи и легкой цепи, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичные аминокислотным последовательностям любого антитела к CD73, описанного в данном документе, например SEQ ID NO: 100 и 101; SEQ ID NO: 100 и 102; SEQ ID NO: 103 и 104; SEQ ID NO: 103 и 105; SEQ ID NO: 103 и 106; SEQ ID NO: 107 и 108; SEQ ID NO: 109 и 110; SEQ ID NO: 109 и 111; SEQ ID NO: 112 и 113; SEQ ID NO: 114 и 115; SEQ ID NO: 116 и 117; SEQ ID NO: 116 и 118; SEQ ID NO: 119 и 120; SEQ ID NO: 121 и 122; SEQ ID NO: 133 или 189 (без С-концевого лизина) и 101; SEQ ID NO: 133 или 189 и 102; SEQ ID NO: 189 и 101; SEQ ID NO: 189 и 102; любая из SEQ ID NO: 184-186 и любая из SEQ ID NO: 104-106; любая из SEQ ID NO: 187-207 и SEQ ID NO: 101 или 102 или любая из SEQ ID NO: 208-210 и SEQ ID NO: 108.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть содержат участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 133 или 189, и участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 101 или SEQ ID NO: 102.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 или их антигенсвязывающие части представляют собой антитела IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или их варианты. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 или их антигенсвязывающие части связываются с тем же эпитопом на CD73, что и антитела, имеющие вышеизложенные последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей (например, антитела CD73.4-1, CD73.4-2, CD73.3, 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 и/или 7A11).

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 или их антигенсвязывающие части содержат модифицированный константный участок тяжелой цепи, который включает в себя, например, человеческий CH1 домен, человеческий шарнирный домен, человеческий CH2 домен и человеческий CH3 домен в порядке от N- к C-концу, причем по меньшей мере 2 домена относятся к отличающемуся изотипу (например, изотипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4). Например, в соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок содержит шарнир человеческого IgG2, и по меньшей мере один из CH1, CH2 и CH3 доменов не относится к изотипу IgG2. В соответствии с определенными вариантами осуществления CH1 представляет собой CH1 домен человеческого IgG2, например, имеющий аминокислотную последовательность

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV (SEQ ID NO: 124).

Модифицированный константный участок может включать в себя шарнирный домен человеческого IgG2, например шарнирный домен человеческого IgG2, который снижает неоднородность в образовании связей с участием цистеина, например шарнирный домен человеческого IgG2, имеющий аминокислотную замену в C219, например C219S, по сравнению с шарнирным доменом человеческого IgG2 дикого

типа (SEQ NO 136), например шарнирным доменом человеческого IgG2, имеющим аминокислотную последовательность ERKSCVECPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 123). Модифицированный константный участок может включать в себя CH2 домен человеческого IgG1, которые ослабляет или устраняет эффекторные функции, например, CH2 домен человеческого IgG1, имеющий аминокислотные замены A330S и P331S, по сравнению с CH2 доменом человеческого IgG1 дикого типа (SEQ ID NO: 137), например CH2 домен человеческого IgG1 содержит аминокислотную последовательность

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY

NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAK (SEQ ID NO: 125).

Модифицированный константный участок может включать в себя CH3 домен человеческого IgG1 дикого типа, например, имеющий аминокислотную последовательность

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS

DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:

128).

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73 содержит модифицированный участок тяжелой цепи, например, содержащий: (i) шарнир IgG2 или (ii) шарнир IgG2 и CH1 домен IgG, при условии, что антитело не представляет собой антитело IgG2, например антитело не содержит константный участок тяжелой цепи IgG2 дикого типа.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 или их антигенсвязывающие части содержат любые из константных участков, описанных в данном документе, например константные участки, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные в SEQ ID NO: 126, 127, 129, 130, 162-169, 180-183, 267-282 и 300-347.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73 содержит VH и VL домены 11F11 или CD73.4 и константный участок тяжелой цепи, содержащий шарнир IgG2, или константный участок тяжелой цепи, содержащий шарнир IgG2 и CH1 домен IgG2. Константный участок тяжелой цепи может представлять собой IgG2CS-IgG1.1f (SEQ ID NO: 169) или IgG2CS-IgG1f (SEQ ID NO: 165), где "CS" относится к "C219S".

В данном документе представлены биспецифичные молекулы, содержащие антитела к CD73 или их антигенсвязывающие части, которые связаны с молекулой, характеризующейся второй специфичностью связывания, а также иммуноконъюгаты, содержащие антитела к CD73 или их антигенсвязывающие части, связанные со средством.

Также предполагаются молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие последовательности вариабельного участка тяжелой и/или легкой цепи антител к CD73, а также векторы экспрессии, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, и клетки, трансформированные с использованием векторов экспрессии.

Также предполагаются композиции и наборы, содержащие антитела к CD73 или их антигенсвязывающие части.

В данном документе представлен способ получения антител к CD73, предусматривающий экспрессию антитела к CD73, раскрытого в данном документе, в клетке и выделение антитела из клетки.

Также предполагаются способы применения антител к CD73, раскрытых в данном документе, например способы снижения уровней аденозина, например, в опухоли или около нее, например в опухолевой клетке, экспрессирующей CD73, способы стимуляции антигенспецифической Т-клеточной реакции, способы стимуляции иммунной реакции у субъекта, способы ингибирования роста опухолевых клеток у субъекта, способы лечения злокачественной опухоли, например, с помощью иммунотерапии. В соответствии с определенными вариантами осуществления злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль мочевого пузыря, злокачественную опухоль молочной железы, злокачественную опухоль матки/шейки матки, злокачественную опухоль яичника, злокачественную опухоль предстательной железы, злокачественную опухоль яичка, злокачественную опухоль пищевода, злокачественную опухоль желудочно-кишечного тракта, злокачественную опухоль поджелудочной железы, злокачественную опухоль ободочной и прямой кишки, злокачественную опухоль ободочной кишки, злокачественную опухоль почки, злокачественную опухоль головы и шеи, злокачественную опухоль легкого, злокачественную опухоль желудка, герминогенную злокачественную опухоль, злокачественную опухоль кости, злокачественную опухоль печени, злокачественную опухоль щитовидной железы, злокачественную опухоль кожи, злокачественные новообразования центральной нервной системы, лимфому, лейкоз, миелому, саркому и злокачественную опухоль, связанную с вирусом. Злокачественная опухоль может представлять собой метастазирующую злокачественную опухоль, невосприимчивую к лечению злокачественную опухоль или рецидивирующую злокачественную опухоль.

В соответствии с определенными вариантами осуществления способы, описанные в данном документе, дополнительно предусматривают введение одного или нескольких дополнительных терапевтических средств, например терапевтического средства, которое стимулирует иммунную систему, например антагониста PD-1, антагониста CTLA-4, антагониста LAG-3, антагониста GITR и/или антитела к CD39, антитела к A2AR или химического ингибитора A2AR.

Другие признаки и преимущества настоящего раскрытия будут очевидны из нижеследующего подробного описания и примеров, которые не следует истолковывать как ограничивающие.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 237) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 135) вариабельного участка тяжелой цепи человеческого моноклонального антитела CD73.4-1. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 5), CDR2 (SEQ ID NO: 6) и CDR3 (SEQ ID NO: 7) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 1B приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 140) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 8) вариабельного участка легкой цепи (VK1) человеческого моноклонального антитела CD73.4-1. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 9), CDR2 (SEQ ID NO: 10) и CDR3 (SEQ ID NO: 11) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 2A приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 237) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 135) вариабельного участка тяжелой цепи человеческого моноклонального антитела CD73.4-2. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 5), CDR2 (SEQ ID NO: 6) и CDR3 (SEQ ID NO: 7) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 2B приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 141) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 12) вариабельного участка легкой цепи человеческого моноклонального антитела CD73.4-2. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 13), CDR2 (SEQ ID NO: 14) и CDR3 (SEQ ID NO: 15) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 3A приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 139) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 4) вариабельного участка тяжелой цепи человеческого моноклонального антитела 11F11-1. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 5), CDR2 (SEQ ID NO: 6) и CDR3 (SEQ ID NO: 7) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 3B приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 140) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 8) вариабельного участка легкой цепи человеческого моноклонального антитела 11F11-1. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 9), CDR2 (SEQ ID NO: 10) и CDR3 (SEQ ID NO: 11) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 4A приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 139) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 4) вариабельного участка тяжелой цепи человеческого моноклонального антитела 11F11-2. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 5), CDR2 (SEQ ID NO: 6) и CDR3 (SEQ ID NO: 7) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 4B приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 141) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 12) вариабельного участка легкой цепи человеческого моноклонального антитела 11F11-2. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 13), CDR2 (SEQ ID NO: 14) и CDR3 (SEQ ID NO: 15) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 5A приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 142) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 16) вариабельного участка тяжелой цепи человеческого моноклонального антитела 4C3-1. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 17), CDR2 (SEQ ID NO: 18) и CDR3 (SEQ ID NO: 19) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 5B приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 143) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 20) вариабельного участка легкой цепи человеческого моноклонального антитела 4C3-1. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 21), CDR2 (SEQ ID NO: 22) и CDR3 (SEQ ID NO: 23) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 6A приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 142) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 16) вариабельного участка тяжелой цепи человеческого моноклонального антитела 4C3-2. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 17), CDR2 (SEQ ID NO: 18) и CDR3 (SEQ ID NO: 19) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 6B приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 144) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 24) вариабельного участка легкой цепи человеческого моноклонального антитела 4C3-2. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 25), CDR2 (SEQ ID NO: 26) и CDR3 (SEQ ID NO: 27) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 7A приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 142) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 16) вариабельного участка тяжелой цепи человеческого моноклонального антитела 4C3-3. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 17), CDR2 (SEQ ID NO: 18) и CDR3 (SEQ ID NO: 19) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 7B приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 145) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 28) вариабельного участка легкой цепи человеческого моноклонального антитела 4C3-3. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 29), CDR2 (SEQ ID NO: 30) и CDR3 (SEQ ID NO: 31) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 8A приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 146) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 32) вариабельного участка тяжелой цепи человеческого моноклонального антитела 4D4-1. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 33), CDR2 (SEQ ID NO: 34) и CDR3 (SEQ ID NO: 35) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 8B приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 147) и аминокислотная по-

следовательность (SEQ ID NO: 36) вариабельного участка легкой цепи человеческого моноклонального антитела 4D4-1. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 37), CDR2 (SEQ ID NO: 38) и CDR3 (SEQ ID NO: 39) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 9A приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 148) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 40) вариабельного участка тяжелой цепи человеческого моноклонального антитела 10D2-1. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 41), CDR2 (SEQ ID NO: 42) и CDR3 (SEQ ID NO: 43) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 9B приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 149) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 44) вариабельного участка легкой цепи человеческого моноклонального антитела 10D2-1. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 45), CDR2 (SEQ ID NO: 46) и CDR3 (SEQ ID NO: 47) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 10A приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 148) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 40) вариабельного участка тяжелой цепи человеческого моноклонального антитела 10D2-2. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 41), CDR2 (SEQ ID NO: 42) и CDR3 (SEQ ID NO: 43) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 10B приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 150) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 48) вариабельного участка легкой цепи человеческого моноклонального антитела 10D2-2. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 49), CDR2 (SEQ ID NO: 50) и CDR3 (SEQ ID NO: 51) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 11A приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 151) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 52) вариабельного участка тяжелой цепи человеческого моноклонального антитела 11A6-1. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 53), CDR2 (SEQ ID NO: 54) и CDR3 (SEQ ID NO: 55) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 11B приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 152) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 56) вариабельного участка легкой цепи человеческого моноклонального антитела 11A6-1. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 57), CDR2 (SEQ ID NO: 58) и CDR3 (SEQ ID NO: 59) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 12A приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 153) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 60) вариабельного участка тяжелой цепи человеческого моноклонального антитела 24H2-1. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 61), CDR2 (SEQ ID NO: 62) и CDR3 (SEQ ID NO: 63) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 12B приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 154) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 64) вариабельного участка легкой цепи человеческого моноклонального антитела 24H2-1. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 65), CDR2 (SEQ ID NO: 66) и CDR3 (SEQ ID NO: 67) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 13A приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 155) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 68) вариабельного участка тяжелой цепи человеческого моноклонального антитела 5F8-1. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 69), CDR2 (SEQ ID NO: 70) и CDR3 (SEQ ID NO: 71) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 13B приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 156) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 72) вариабельного участка легкой цепи человеческого моноклонального антитела 5F8-1. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 73), CDR2 (SEQ ID NO: 74) и CDR3 (SEQ ID NO: 75) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 14A приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 155) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 68) вариабельного участка тяжелой цепи человеческого моноклонального антитела 5F8-2. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 69), CDR2 (SEQ ID NO: 70) и CDR3 (SEQ ID NO: 71) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 14B приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 157) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 76) вариабельного участка легкой цепи человеческого моноклонального антитела 5F8-2. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 77), CDR2 (SEQ ID NO: 78) и CDR3 (SEQ ID NO: 79) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 15A приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 155) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 68) вариабельного участка тяжелой цепи человеческого моноклонального антитела 5F8-3. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 69), CDR2 (SEQ ID NO: 70) и CDR3 (SEQ ID NO: 71) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 15B приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 242) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 238) вариабельного участка легкой цепи человеческого моноклонального антитела 5F8-3. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 239), CDR2 (SEQ ID NO: 240) и CDR3 (SEQ ID NO: 241) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 16A приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 158) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 80) вариабельного участка тяжелой цепи человеческого моноклонального антитела 6E11-1. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 81), CDR2 (SEQ ID NO: 82) и CDR3 (SEQ ID NO: 83) выде-

лены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 16B приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 159) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 84) вариабельного участка легкой цепи человеческого моноклонального антитела 6E11-1. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 85), CDR2 (SEQ ID NO: 86) и CDR3 (SEQ ID NO: 87) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 17A приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 160) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 88) вариабельного участка тяжелой цепи человеческого моноклонального антитела 7A11-1. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 89), CDR2 (SEQ ID NO: 90) и CDR3 (SEQ ID NO: 91) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 17B приведена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 161) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 92) вариабельного участка легкой цепи человеческого моноклонального антитела 7A11-1. Участки CDR1 (SEQ ID NO: 93), CDR2 (SEQ ID NO: 94) и CDR3 (SEQ ID NO: 95) выделены, а также указаны полученные элементы V, D и J зародышевой линии.

На фиг. 18 показана аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 189) тяжелой цепи антитела к CD73 CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f и его вариабельный участок, CDR 1, 2 и 3, CH1, шарнирный, CH2 и CH3 домены.

На фиг. 19 показаны данные с SPR сенсограммы для связывания 600, 200, 66,7, 22,2, 7,4 и 2,5 нМ CD73-his человека (толстые линии) или CD73-his макака-крабоеда (тонкие линии) с CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f, захваченным на поверхности с иммобилизированным белком A при 25°C.

На фиг. 20A1 и 20A2 показано связывание антител 11F11, CD73.4 и CD73.10 с указанными константными участками тяжелой цепи с положительными по человеческому CD73 Calu6 клетками (линия клеток аденокарциномы легкого человека).

На фиг. 20B1 и 20B2 показано связывание антител 11F11, CD73.4 и CD73.10 с указанными константными участками тяжелой цепи с отрицательными по человеческому CD73 DMS114 клетками (линия клеток мелкоклеточной карциномы легкого).

На фиг. 20C1 и 20C2 показано связывание антител 11F11, CD73.4 и CD73.10 с указанными константными участками тяжелой цепи с положительными по CD73 макака-крабоеда CHO клетками.

На фиг. 20D1 и 20D2 показано связывание антител 11F11, CD73.4 и CD73.10 с указанными константными участками тяжелой цепи с отрицательными по CD73 макака-крабоеда CHO-K1 клетками.

На фиг. 20E показано связывание указанных антител с T-клетками от доноров D1 и D2.

На фиг. 20F показано связывание указанных антител с T-клетками от доноров D1 и D2.

На фиг. 21A1 и 21A2 показано ингибирование ферментативной активности связанного с гранулами человеческого CD73 антителами к CD73 11F11, CD73.4 и CD73.10 с указанными константными участками тяжелой цепи. Все антитела ингибировали ферментативную активность человеческого CD73.

На фиг. 21B1 и 21B2 показано ингибирование ферментативной активности связанного с гранулами CD73 макака-крабоеда антителами к CD73 11F11, CD73.4 и CD73.10 с указанными константными участками тяжелой цепи. Все антитела ингибировали ферментативную активность CD73 макака-крабоеда.

На фиг. 22A1 и 22A2 показано ингибирование ферментативной активности CD73 в положительных по CD73 человека Calu6 клетках антителами 11F11, CD73.4 и CD73.10 с указанными константными участками тяжелой цепи. Все антитела ингибировали ферментативную активность CD73 в этих клетках.

На фиг. 22B1 и 22B2 показано ингибирование ферментативной активности CD73 в отрицательных по CD73 человека DMS-114 клетках антителами 11F11, CD73.4 и CD73.10 с указанными константными участками тяжелой цепи.

На фиг. 22C показаны значения EC50 и Ymax для ингибирования активности эндогенного CD73 11F11 и $F(ab')_2$-фрагментами 11F11, которые определены в анализе cAMP с использованием Calu-6 и HEK/A2R клеток. На фиг. 22C также показаны значения EC50 и Ymax для 11F11 и $F(ab')_2$-фрагментов 11F11 в анализе интернализации в Calu-6. На чертеже показано, что Fab фрагмент 11F11 является неактивным в этих двух анализах.

На фиг. 22D показана динамика продуцирования аденозина из Calu6 клеток, обработанных антителом 11F11 или 4C3, которое измеряли с помощью LC/MS/MS, указывающая на то, что ингибирование ферментативной активности CD73 антителом 11F11 происходит быстрее, чем антителом 4C3.

На фиг. 23A показаны кинетические характеристики опосредованной антителом интернализации CD73 под действием следующих антител: антитела 11F11, 4C3, 6D11, CD73.3-IgG1.1f с легкой цепью 4C3Vk1 ("3-Vh-hHC-IgG1.1f/4C3Vk1"), CD73.4-IgG2CS с легкой цепью 11F11 Vk2 ("4-Vh-hHC-IgG2-C219S/11F11-Vk2"), CD73.10-IgG2CS ("CD73.10-Vh-hHC-IgG2-C219S"), CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f ("CD73.10-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f") и CD73.10-IgG1.1f ("CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f") в H2228 клетках. Антитела 11F11 (которое относится к изотипу IgG2), CD73.4-IgG2CS, CD73.10-IgG2CS и CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f интернализируются быстрее и в большей степени, чем остальные исследуемые антитела, которые относятся к изотипу IgG1.

На фиг. 23B показаны кинетические характеристики опосредованной антителом интернализации CD73 для тех же антител, что показаны на фиг. 23A, в HCC15 клетках (линия клеток немелкоклеточной карциномы легкого), показывающие результаты, подобные полученным в H2228 клетках (линия клеток

немелкоклеточной карциномы легкого).

На фиг. 23C показаны кинетические характеристики опосредованной антителом интернализации CD73 для тех же антител, что показаны на фиг. 23A и 23B, а также для CD73.11-IgG2CS ("11-Vh-hVC-IgG2-C219S") в Calu6 клетках, показывающие результаты, подобные полученным в H2228 и HCC15 клетках.

На фиг. 23D показаны кинетические характеристики опосредованной антителом интернализации CD73 для тех же антител, что показаны на фиг. 23C, в NCI-2030 клетках (линия клеток немелкоклеточной карциномы легкого), показывающие результаты, подобные полученным в H2228, HCC15 и Calu6 клетках.

На фиг. 23E показаны кинетические характеристики опосредованной антителом интернализации CD73 для указанных антител в Calu6 клетках, которые измерены с помощью проточной цитометрии.

На фиг. 23F показаны кинетические характеристики опосредованной антителом интернализации CD73 для указанных антител в NCI-H292 клетках (линии клеток мукоэпидермоидной карциномы легкого), которые измерены с помощью проточной цитометрии, но в этом случае антитела не отмывали после первого инкубирования клеток с антителами.

На фиг. 23G показано процентное содержание CD73, интернализированного в Calu6 клетки, обработанные указанными антителами, показывающее опосредованную антителом интернализацию CD73 под действием указанных антител в Calu6 клетки со временем.

На фиг. 23H показано процентное содержание CD73, интернализированного в NCI-H292 клетки, обработанные указанными антителами со временем, показывающее опосредованную антителом интернализацию CD73 под действием указанных антител в NCI-H292 клетки со временем.

На фиг. 23I показано процентное содержание CD73, интернализированного в SNU-C1 клетки (линия клеток карциномы ободочной кишки), обработанные указанными антителами со временем, показывающее опосредованную антителом интернализацию CD73 под действием указанных антител в SNU-C1 клетки со временем.

На фиг. 23J показано процентное содержание CD73, интернализированного в NCI-H1437 клетки (линия клеток немелкоклеточной карциномы легкого), обработанные указанными антителами со временем, показывающее опосредованную антителом интернализацию CD73 под действием указанных антител в NCI-H1437 клетки со временем.

На фиг. 23K показано процентное содержание CD73, интернализированного в Calu6 клетки, обработанные указанными антителами со временем, показывающее опосредованную антителом интернализацию CD73 под действием указанных антител в Calu6 клетки со временем.

На фиг. 23L показано процентное содержание CD73, интернализированного в NCI-H292 клетки, обработанные указанными антителами со временем, показывающее опосредованную антителом интернализацию CD73 под действием указанных антител в Calu6 клетки со временем.

На фиг. 23M показан уровень CD73 на поверхности Calu6 клеток, которые обрабатывали указанными антителами в концентрации 5 мкг/мл в течение 0, 5, 15 или 30 мин.

На фиг. 24A показаны срезы ксенотрансплантатов опухолей из животных, которые собирали через 4 суток после обработки животных контрольным антителом и окрашивали в отношении ферментативной активности CD73. Срезы показывают интенсивный коричневый цвет, указывающий на ферментативную активность CD73.

На фиг. 24B показаны срезы ксенотрансплантатов опухолей из животных, которые собирали через 1 сутки после обработки животных антителом 11F11 и окрашивали в отношении ферментативной активности CD73. Срезы имели значительно менее интенсивный коричневый цвет по сравнению со срезами контрольных опухолей, показанными на фиг. 24A, что указывает ингибирование ферментативной активности CD73 in vivo CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f уже спустя 1 сутки после начала обработки.

На фиг. 24C показаны срезы ксенотрансплантатов опухолей из животных, которые собирали через 2 суток после обработки животных CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f и окрашивали в отношении ферментативной активности CD73. Срезы имели значительно менее интенсивный коричневый цвет по сравнению со срезами контрольных опухолей, показанными на фиг. 24A, и по сравнению со срезами опухолей спустя 1 сутки обработки животных CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f, что указывает ингибирование ферментативной активности CD73 in vivo CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f спустя по меньшей мере 2 суток после начала обработки.

На фиг. 24D показаны срезы ксенотрансплантатов опухолей из животных, которые собирали через 3 суток после обработки животных CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f и окрашивали в отношении ферментативной активности CD73. Срезы имели значительно менее интенсивный коричневый цвет по сравнению со срезами контрольных опухолей, показанными на фиг. 24A, что указывает ингибирование ферментативной активности CD73 in vivo CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f спустя по меньшей мере 3 суток после начала обработки.

На фиг. 24E показаны срезы ксенотрансплантатов опухолей из животных, которые собирали через 7 суток после обработки животных CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f и окрашивали в отношении ферментативной активности CD73. Срезы имели значительно менее интенсивный коричневый цвет по сравнению со срезами контрольных опухолей, показанными на фиг. 24A, что указывает ингибирование ферментативной

активности CD73 in vivo CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f спустя по меньшей мере 7 суток после начала обработки.

На фиг. 24F показана динамика для ферментативной активности человеческого CD73 в опухолях SNUC1 у мышей с ксенотрансплантатами, обработанных контрольным антителом (не к CD73) или CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f в дозе 1, 3 или 10 мг/кг, показывающая, что антитело к CD73 эффективно снижает ферментативную активность CD73 в опухолях у мышей с ксенотрансплантатами.

На фиг. 25A показаны уровни ферментативной активности мышиного CD73 на срезах контрольных опухолей из Balb/c мышей, несущих изогенные опухоли 4T1 и получавших контрольный mIgG.

На фиг. 25B показаны срезы опухолей (4T1, 1-7 сутки) у Balb/c мышей, несущих изогенные опухоли 4T1, которых обрабатывали посредством подкожного введения антитела к мышиному CD73 TY23, показывающие, что TY23 подавляет ингибирование ферментативной активности CD73 in vivo.

На фиг. 26A показан уровень перекрестного блокирования 4C3 антителами к CD73 4C3, 7A11, 6E11, 5F8, 4C3, 11F11 и 11A6, который определяли с помощью проточной цитометрии.

На фиг. 26B показан уровень перекрестного блокирования 11F11 антителами к CD73 4C3, 7A11, 6E11, 5F8, 4C3, 11F11 и 11A6, который определяли с помощью проточной цитометрии.

На фиг. 27A приведена аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 283) человеческого CD73 и участки взаимодействия с CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f, которые представлены более темным серым цветом. Чем сильнее взаимодействие, тем темнее серый цвет.

На фиг. 27B показана модель взаимодействия между димерным белком человеческого CD73 и CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f.

На фиг. 28A показана кристаллографическая модель взаимодействия между человеческим CD73 и Fab'-фрагментом 11F11.

На фиг. 28B показана модель сложной структуры двух комплексов человеческого CD73 с 11F11.

На фиг. 28C показана модель взаимодействия между человеческим CD73 и антителом 11F11.

На фиг. 28D показана модель взаимодействия между 11F11 и человеческим CD73.

На фиг. 29A показаны данные SEC-MALS для комплексов человеческого CD73 и антитела. "CD73.4-гибрид" относится к CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f.

На фиг. 29B показаны данные DLS для комплексов человеческого CD73 и антитела.

На фиг. 30A показаны данные с SEC хроматограммы для комплексов hCD73-his с антителом CD73.4, содержащим отличающиеся константные участки, показывающие эффект шарнира и CH1 домена IgG2 в отношении размера комплексов антитело/антиген.

На фиг. 30B показаны данные DLS для комплексов hCD73-his с антителом CD73.4, содержащим отличающиеся константные участки, показывающие эффект шарнира и CH1 домена IgG2 в отношении размера комплексов антитело/антиген.

На фиг. 30C показаны данные MALS для комплексов hCD73-his с антителом CD73.4, содержащим отличающиеся константные участки, показывающие эффект шарнира и CH1 домена IgG2 в отношении размера комплексов антитело/антиген.

На фиг. 30D показана схематическая модель комплексов hCD73-his/mAb, полученная на основании определенных с помощью MALS масс на фиг. 30C.

На фиг. 30E показано, что на образование комплексов более высокого порядка оказывает воздействие CH1 участок. Гистограммы показывают % площади под пиками 1 и 2, показанными на графике, для каждого конструкта.

На фиг. 31 показан процент опосредованной антителом интернализации CD73 через 1, 4 или 21 ч после добавления каждого из показанных антител. Столбики для каждого антитела показаны в порядке от 21 ч (слева), 4 ч (посередине) и 1 ч (справа).

На фиг. 32A показано наложение данных SEC-хроматограммы для комплексов в молярном соотношении 1:1 hCD73-his с 16 разными антителами CD73.4, содержащими разные последовательности константного участка.

На фиг. 32B показана детализация данных хроматограммы с 11 по 19,5 мин на хроматограмме с фиг. 32A с указанными 4 отличающимися элюируемыми частицами.

На фиг. 32C показано процентное отношение площади сигнала на UV-хроматограмме для пика 2 с фиг. 32B, нанесенное на график для 16 разных комплексов антитело/CD73-his. Данные отсортированы слева направо в порядке возрастания площади пика.

На фиг. 33 показано связывание антитела с FcγR-his белками, захваченными на Fab к his. Данные отклика на связывание наносят на график в виде процента от теоретического Rmax из расчета стехиометрического соотношения mAb:FcγR 1:1 для реакции связывания. Столбики для каждого антитела показаны в порядке, представленном цветовой подписью внизу слайда.

На фиг. 34 показано связывание антитела с FcgR-his белками, захваченными на Fab к his. Данные отклика на связывание наносят на график в виде процента от теоретического Rmax из расчета стехиометрического соотношения mAb:FcγR 1:1 для реакции связывания. Столбики для каждого антитела показаны в порядке, представленном цветовой подписью внизу слайда.

На фиг. 35 показано выравнивание последовательностей VH и VL у различных антител к CD73. По-

следовательности CDR1, CDR2 и CDR3 VH и VL выделены жирным шрифтом.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

В данном документе описаны выделенные антитела, в особенности, моноклональные антитела, например человеческие моноклональные антитела, которые специфично связываются с CD73 и тем самым снижают активность CD73 ("антагонистические антитела к CD73"). В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела, описанные в данном документе, получены из конкретных последовательностей зародышевой линии для тяжелой и легкой цепей и/или содержат конкретные структурные признаки, такие как CDR участки, содержащие конкретные аминокислотные последовательности. В данном документе представлены выделенные антитела, способы получения таких антител, иммуноконъюгаты и биспецифичные молекулы, содержащие такие антитела, а также фармацевтические композиции, составленные таким образом, чтобы они содержали антитела. Также в данном документе представлены способы применения антител самих по себе или в комбинации с другими терапевтическими средствами (например, антителами) для снижения опухолевого роста и/или в качестве терапевтических средств для лечения злокачественной опухоли. Соответственно антитела к CD73, описанные в данном документе, могут быть применены в лечении в широком спектре терапевтических применений, в том числе, например, для ингибирования опухолевого роста, ингибирования метастазирования и усиления иммунной реакции в отношении опухоли.

Определения.

Для того чтобы настоящее описание можно было легче понять, в первую очередь определены некоторые термины. Дополнительные определения изложены в подробном описании.

Используемые в данном документе термины "кластер дифференцировки 73" или "CD73" относятся к ферменту (нуклеотидазе), способному к превращению внеклеточных нуклеозид-5'-монофосфатов в нуклеозиды, а именно аденозинмонофосфата (AMP) в аденозин. CD73 обычно обнаруживается в виде димера, заякоренного в клеточной мембране посредством гликозилфосфатидилинозитольного (GPI) мостика, обладает экзоферментной активностью и играет роль в передаче сигнала. Главной функцией CD73 является превращение им внеклеточных нуклеотидов (например, 5'-AMP) в аденозин, сильную иммунодепрессивную молекулу. Таким образом, экто-5'-нуклеотидаза катализирует дефосфорилирование пуриновых и пиримидиновых рибо- и дезоксирибонуклеозидмонофосфатов в соответствующий нуклеозид. Хотя CD73 характеризуется широкой субстратной специфичностью, он предпочитает пуриновые рибонуклеозиды.

CD73 также называется экто-5'нуклеазой (экто-5'NT, EC 3.1.3.5). Термин "CD73" включает в себя любые варианты или изоформы CD73, которые экспрессируются клетками в естественных условиях. Соответственно антитела, описанные в данном документе, могут давать перекрестную реакцию с CD73 из вида, отличного от человека (например, CD73 яванского макака). В качестве альтернативы антитела могут быть специфичными в отношении человеческого CD73 и могут не проявлять какой-либо перекрестной реактивности с другими видами. CD73 или любые его варианты и изоформы можно либо выделить из клеток или тканей, которые экспрессируют их в естественных условиях, или их можно получить с помощью методов на основе рекомбинации с использованием методик, хорошо известных из уровня техники и/или описанных в данном документе.

Были идентифицированы две изоформы человеческого CD73, обе из которых имеют одинаковые N-концевую и C-концевую части. Изоформа 1 (номер доступа NP_002517.1; SEQ ID NO: 1) представляет собой наиболее длинный белок, состоящий из 574 аминокислот и 9 экзонов. Изоформа 2 (номер доступа NP_001191742.1; SEQ ID NO: 2) кодирует более короткий белок, состоящий из 524 аминокислот, у которого отсутствуют аминокислоты 404-453. У изоформы 2 отсутствует альтернативный экзон в рамке считывания, что дает в результате транскрипт только с 8 экзонами, но с одинаковыми N- и C-концевыми последовательностями.

Последовательность белка CD73 яванского макака (макака-крабоеда) представлена в виде SEQ ID NO: 3. Оба из терминов "яванский макак" и "макак-крабоед" относятся к виду Macaca fascicularis и применяются в данном описании взаимозаменяемо.

Используемый в данном документе термин "антитело" может включать в себя целые антитела и любые их антигенсвязывающие фрагменты (т.е. "антигенсвязывающие части") или их отдельные цепи. В соответствии с одним вариантом осуществления "антитело" относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелых (H) цепи и две легких (L) цепи, соединенные дисульфидными связями, или к его антигенсвязывающей части. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельного участка тяжелой цепи (обозначаемого в данном документе сокращением V_H) и константного участка тяжелой цепи. В определенных встречающихся в естественных условиях антителах IgG, IgD и IgA константный участок тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. В определенных встречающихся в естественных условиях антителах каждая легкая цепь состоит из вариабельного участка легкой цепи (обозначаемого в данном документе сокращением V_L) и константного участка легкой цепи. Константный участок легкой цепи состоит из одного домена, CL. V_H и V_L участки можно дополнительно подразделить на участки с гипервариабельностью, называемые гипервариабельными участками (CDR), чередующиеся с участками, которые являются более консервативными, называемыми каркасными участками (FR). Каждый V_H и V_L со-

стоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные участки тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные участки антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, в том числе с различными клетками иммунной системы (например, эффекторными клетками) и первым компонентом (Clq) классической системы комплемента.

Тяжелая цепь антитела может содержать или не содержать концевой лизин (K) или концевые глицин и лизин (GK). Таким образом, любая из последовательностей тяжелой цепи и последовательностей константного участка тяжелой цепи, представленных в данном документе, может заканчиваться либо GK или G, либо у нее могут отсутствовать K или GK независимо от того, что обеспечивает последняя аминокислота в последовательности. Это обусловлено тем, что концевой лизин и иногда глицин и лизин отщепляются в ходе экспрессии антитела.

Антитела, как правило, специфично связываются со своим когнатным антигеном с высокой аффинностью, что отражается константой диссоциации (K_D), составляющей 10^{-7}-10^{-11} M или менее. Любая K_D, большая чем приблизительно 10^{-6} M, как обычно считается, указывает на неспецифическое связывание. Как используется в данном документе, антитело, которое "специфично связывается" с антигеном, относится к антителу, которое связывается с антигеном и практически идентичными антигенами с высокой аффинностью, это означает, что оно характеризуется K_D, составляющей 10^{-7} M или менее, предпочтительно 10^{-8} M или менее, еще более предпочтительно 5×10^{-9} M или менее и наиболее предпочтительно от 10^{-8} до 10^{-10} M или менее, но не связывается с высокой аффинностью с неродственными антигенами. Антиген является "практически идентичным" заданному антигену, если он проявляет высокий уровень идентичности последовательности с заданным антигеном, например если его последовательность по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95, по меньшей мере на 97 или по меньшей мере на 99% или более идентична последовательности заданного антигена. Например, антитело, которое специфично связывается с человеческим CD73, также может давать перекрестные реакции с CD73 из определенных видов приматов, отличных от человека (например, яванского макака), но могут не давать перекрестные реакции с CD73 из других видов или с антигеном, отличающимся от CD73.

Иммуноглобулин может происходить из любого из общеизвестных изотипов, в том числе без ограничения IgA, секреторного IgA, IgG и IgM. Изотип IgG делится на подклассы у определенных видов: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 у людей и IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 у мышей. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73, описанные в данном документе, относятся к подтипу человеческого IgG1 или IgG2. Иммуноглобулины, например человеческий IgG1, существуют в виде нескольких аллотипов, которые отличаются друг от друга не более чем несколькими аминокислотами. Например, "антитело" может включать в себя как встречающиеся в естественных условиях, так и не встречающиеся в естественных условиях антитела; моноклональные и поликлональные антитела; химерные и гуманизированные антитела; человеческие антитела и антитела, отличные от человеческих; полностью синтетические антитела и одноцепочечные антитела.

Используемый в данном документе термин "антигенсвязывающая часть" антитела относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность к специфичному связыванию с антигеном (например, человеческим CD73). Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемые термином "антигенсвязывающая часть" антитела, например антитела к CD73, описанного в данном документе, включают в себя: (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из V_L, V_H, CL и CH1 доменов; (ii) $F(ab')_2$-фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанные дисульфидным мостиком в шарнирном участке; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из V_H и CH1 доменов; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из V_L и V_H доменов одного плеча антитела, (v) dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), который состоит из V_H домена; и (vi) выделенный гипервариабельный участок (CDR) или (vii) комбинацию двух или более выделенных CDR, которые необязательно могут быть соединены синтетическим линкером. Более того, хотя два домена в Fv-фрагменте, V_L и V_H, кодируются отдельными генами, их можно соединить синтетическим линкером с использованием методов на основе рекомбинации, что обеспечивает возможность их получения в виде одной белковой цепи, в которой V_L и V_H участки спариваются с образованием моновалентных молекул, известных как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426 и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Предполагается, что такие одноцепочечные антитела также охватываются термином "антигенсвязывающая часть" антитела. Эти и другие возможные конструкты описаны в Chan & Carter (2010) Nat. Rev. Immunol. 10:301. Эти фрагменты антитела получают с использованием традиционных методик, известных специалисту в данной области техники, и фрагменты подвергают скринингу в отношении полезности таким же образом, что и интактные антитела. Антигенсвязывающие части можно получить с помощью методик с использованием рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов.

"Биспецифичное" или "бифункциональное антитело" представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две отличающиеся пары тяжелых/легких цепей, что приводит к образованию двух

сайтов связывания антигена со специфичностью в отношении отличающихся антигенов. Биспецифичные антитела можно получить с помощью ряда способов, в том числе слияния гибридом или связывания Fab'-фрагментов; см., например, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

Используемый в данном документе термин "моноклональное антитело" относится к антителу, которое проявляет одну специфичность связывания и аффинность в отношении конкретного эпитопа, или к композиции антител, в которой все антитела проявляют одну специфичность связывания и аффинность в отношении конкретного эпитопа. Как правило, такие моноклональные антитела будут происходить из одной клетки или нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело, и они будут передаваться по наследству без намеренного внесения каких-либо изменений в последовательность. Соответственно термин "человеческое моноклональное антитело" относится к моноклональному антителу, которое имеет вариабельные и необязательные константные участки, происходящие из последовательностей зародышевой линии человеческих иммуноглобулинов. В соответствии с одним вариантом осуществления человеческие моноклональные антитела получают с помощью гибридомы, например, полученной путем слияния В-клетки, полученной из трансгенного или трансхромосомного отличного от человека животного (например, трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий трансген человеческой тяжелой цепи и трансген легкой цепи) с иммортализированной клеткой.

Используемый в данном документе термин "рекомбинантное человеческое антитело" включает в себя все человеческие антитела, которые получены, экспрессируются, созданы или выделены с помощью рекомбинантных средств, такие как (a) антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным по отношению к генам человеческих иммуноглобулинов, или из гибридомы, полученной из него, (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела, например, из трансфектомы, (c) антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител, и (d) антитела, полученные, экспрессируемые, созданные или выделенные с помощью любых других средств, которые затрагивают сплайсинг последовательностей гена человеческого иммуноглобулина в другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат вариабельные и константные участки, в которых используются конкретные последовательности зародышевой линии человеческих иммуноглобулинов и которые кодируются генами зародышевой линии, но включают последующие перегруппировки и мутации, которые происходят, например, в ходе созревания антитела. Как известно из уровня техники (см., например, Lonberg (2005) Nature Biotech. 23(9):1117-1125), вариабельный участок содержит антигенсвязывающий домен, кодируемый различными генами, которые перегруппировываются с образованием антитела, специфичного к чужеродному антигену. Помимо перегруппировки, вариабельный участок может дополнительно модифицироваться за счет многочисленных изменений отдельных аминокислот (называемых соматической мутацией или гипермутацией), повышая аффинность антитела к чужеродному антигену. Константный участок будет меняться при дальнейшем ответе на антиген (т.е. переключение изотипа). Таким образом, подвергшиеся перегруппировке и соматической мутации последовательности нуклеиновой кислоты, которые кодируют полипептиды легкой цепи и тяжелой цепи иммуноглобулина в ответ на антиген, могут быть не идентичными исходным последовательностям зародышевого типа, но вместо этого они будут практически идентичными или подобными (т.е. идентичными по меньшей мере на 80%).

"Человеческое" антитело (HuMAb) относится к антителу, имеющему вариабельные участки, в которых как каркасные участки, так и CDR участки происходят из последовательностей зародышевой линии человеческих иммуноглобулинов. Более того, если антитело содержит константный участок, константный участок также происходит из последовательностей зародышевой линии человеческих иммуноглобулинов. Антитела, описанные в данном документе, могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями зародышевой линии человеческих иммуноглобулинов (например, мутации, вводимые посредством неспецифического или сайт-специфического мутагенеза in vitro или при соматической мутации in vivo). Тем не менее, не предполагается, что термин "человеческое антитело", используемый в данном документе, включает антитела, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были пересажены на человеческие каркасные последовательности. Термины "человеческие" антитела и "полностью человеческие" антитела используются синонимично.

"Гуманизированное" антитело относится к антителу, в котором некоторые, большинство или все из аминокислот за пределами CDR доменов антитела, не являющегося человеческим, заменены соответствующими аминокислотами, происходящими из человеческих иммуноглобулинов. В соответствии с одним вариантом осуществления гуманизированной формы антитела некоторые, большинство или все из аминокислот за пределами CDR доменов были заменены аминокислотами из человеческих иммуноглобулинов, тогда как некоторые, большинство или все аминокислоты в пределах одного или нескольких CDR участков являются неизменными. Небольшие добавления, делеции, вставки, замены или модификации аминокислот являются допустимыми при условии, что они не нарушают способность антитела к связыванию с конкретным антигеном. "Гуманизированное" антитело сохраняет антигенную специфичность, подобную специфичности исходного антитела.

"Химерное антитело" относится к антителу, в котором вариабельные участки происходят из одного вида, а константные участки происходят из другого вида, такому как антитело, в котором вариабельные участки происходят из мышиного антитела, а константные участки происходят из человеческого антитела.

"Модифицированный константный участок тяжелой цепи" относится к константному участку тяжелой цепи, содержащему константные домены CH1, шарнирный, CH2 и CH3, причем один или несколько из константных доменов происходят из отличающегося изотипа (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок включает в себя CH1 домен человеческого IgG2 и шарнир человеческого IgG2, слитый с CH2 доменом человеческого IgG1 и CH3 доменом человеческого IgG1. В соответствии с определенными вариантами осуществления такие модифицированные константные участки также включают в себя модификации аминокислот в пределах одного или нескольких из доменов по сравнению с аминокислотной последовательностью дикого типа.

Упоминание в данном документе антитела как "CD73.3" или "CD73.4" без указания идентификационной информации о константном участке, если не указано иное, относится к антителам, имеющим вариабельные участки CD73.3 или CD73.4 соответственно, с любым константным участком, описанным в данном документе.

Используемый в данном документе "изотип" относится к классу антител (например, антителу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE), который кодируется генами константного участка тяжелой цепи.

"Аллотип" относится к встречающимся в естественных условиях вариантам в пределах группы с конкретным изотипом, причем данные варианты отличаются несколькими аминокислотами (см., например, Jefferis et al. (2009) mAbs 1:1). Антитела, описанные в данном документе, могут относиться к любому аллотипу.

Если иное не определено в данном документе, номера всех аминокислот соответствуют нумерации аминокислот в антителе EU согласно системе Kabat (Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

Фразы "антитело, распознающее антиген" и "антитело, специфичное в отношении антигена" используются в данном документе взаимозаменяемо с термином "антитело, которое специфично связывается с антигеном".

Используемый в данном документе термин "выделенное антитело", как предполагается, относится к антителу, которое практически не содержит других антител с отличающимися антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфично связывается с CD73, практически не содержит антител, которые специфично связываются с антигенами, отличными от CD73). Выделенное антитело, которое специфично связывается с эпитопом CD73, тем не менее, может характеризоваться перекрестной реактивностью с другими белками CD73 из отличающихся видов.

Как используется в данном документе, антитело, которое "ингибирует CD73", относится к антителу, которое ингибирует биологическую и/или ферментную функцию CD73. Эти функции включают в себя, например, способность антитела ингибировать ферментативную активность CD73, например регулируемое CD73 продуцирование аденозина или снижение продуцирования с AMP.

Как используется в данном документе, антитело, которое "интернализируется", относится к антителу, которое пересекает клеточную мембрану после связывания с антигеном клеточной поверхности. Интернализация включает в себя опосредованную антителом интернализацию рецептора, например, CD73. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления антитело "интернализируется" в клетки, экспрессирующие CD73, с показателем $T_{1/2}$, равным приблизительно 10 мин или менее.

"Эффекторная функция" относится к взаимодействию Fc-участка антитела с Fc-рецептором или лигандом или к биохимическому явлению, которое является результатом такого взаимодействия. Иллюстративные "эффекторные функции" включают в себя связывание C1q, комплементзависимую цитотоксичность (CDC), связывание с Fc-рецептором, FcγR-опосредованные эффекторные функции, такие как ADCC и антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP) и снижение количества рецептора на клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора; BCR). Такие эффекторные функции обычно требуют объединения Fc-участка со связывающим доменом (например, вариабельным доменом антитела).

"Fc-рецептор" или "FcR" представляет собой рецептор, который связывается с Fc-участком в иммуноглобулине. FcR, которые связываются с антителом IgG, включают в себя рецепторы семейства FcγR, в том числе аллельные варианты и полученные в ходе альтернативного сплайсинга формы этих рецепторов. Семейство FcγR состоит из трех активирующих (FcγRI, FcγRIII и FcγRIV у мышей; FcγRIA, FcγRIIA и FcγRIIIA у людей) и одного ингибирующего (FcγRIIB) рецептора. Различные свойства человеческих FcγR приведены в табл. 1. У большинства характерных типов эффекторных клеток коэкспрессируются один или несколько активирующих FcγR и ингибирующий FcγRIIB, тогда как клетки-натуральные киллеры (NK) селективно экспрессируют один активирующий Fc-рецептор (FcγRIII у мышей и FcγRIIIA у

людей), а не ингибирующий FcγRIIB у мышей и людей. Человеческий IgG1 связывается с большинством Fc-рецепторов человека и считается эквивалентным мышиному IgG2a относительно типов активирующих Fc-рецепторов, с которыми он связывается.

Таблица 1

Свойства человеческих FcγR

Fcγ	Аллельные варианты	Аффинность в отношении человеческого IgG	Предпочтение к изотипу	Распространение в клетках
FcγRI	Не описаны	Высокая (K_D ~10 нМ)	IgG1=3>4>>2	Моноциты, макрофаги, активированные нейтрофилы, дендритные клетки?
FcγRIIA	H131	Низкая-	IgG1>3>2>4	Нейтрофилы, моноциты,

Fcγ	Аллельные варианты	Аффинность в отношении человеческого IgG	Предпочтение к изотипу	Распространение в клетках
		средняя		макрофаги, эозинофилы, дендритные клетки, тромбоциты
	R131	Низкая	IgG1>3>4>2	
FcγRIIIA	V158	Средняя	IgG1=3>>4>2	NK-клетки, моноциты, макрофаги, тучные клетки, эозинофилы, дендритные клетки?
	F158	Низкая	IgG1=3>>4>2	
FcγRIIB	I232	Низкая	IgG1=3=4>2	B-клетки, моноциты, макрофаги, дендритные клетки, тучные клетки
	T232	Низкая	IgG1=3=4>2	

"Шарнир", "шарнирный домен", или "шарнирный участок", или "шарнирный участок антитела" относится к домену в константном участке тяжелой цепи, который соединяет CH1 домен с CH2 доменом и включает в себя верхнюю, среднюю и нижнюю части шарнира (Roux et al. J. Immunol. 1998 161:4083). Шарнир обеспечивает изменяющиеся уровни гибкости между связывающими и эффекторными участками антитела, а также обеспечивает сайты для образования межмолекулярных дисульфидных связей между константными участками двух тяжелых цепей. Как используется в данном документе, шарнир начинается в Glu216 и заканчивается в Gly237 для всех изотипов IgG (Roux et al., 1998 J Immunol 161:4083). Последовательности шарниров дикого типа IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 приведены в табл. 2 и 31.

Таблица 2

Аминокислоты шарнирного участка

Тип Ig	C-концевой C_H1* (SEQ ID NO)	Верхний шарнир (SEQ ID NO)	Средний шарнир (SEQ ID NO)	Нижний шарнир (SEQ ID NO)
IgG1	VDKRV (284)	EPKSCDKTHT (286)	CPPCP (290)	APELLGG (298)
IgG2	VDKTV (285)	ERK	CCVECPPCP (291)	APPVAG (299)
IgG3 (17-15-15-15)	VDKRV (284)	ELKTPLGDTTHT (287)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)$_3$ (292)	APELLGG (298)
IgG3 (17-15-15)	VDKRV (284)	ELKTPLGDTTHT (287)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)$_2$ (293)	APELLGG (298)
IgG3 (17-15)	VDKRV (284)	ELKTPLGDTTHT (287)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)$_1$ (294)	APELLGG (298)
IgG3 (15-15-15)	VDKRV (284)	EPKS (288)	CDTPPPCPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)$_2$ (295)	APELLGG (298)
IgG3 (15)	VDKRV (284)	EPKS (288)	CDTPPPCPRCP (296)	APELLGG (298)
IgG4	VDKRV (284)	ESKYGPP (289)	CPSCP (297)	APEFLGG (298)

* C-концевые аминокислотные последовательности CH1 доменов.

Термин "шарнир" включает в себя шарниры дикого типа (такие как изложенные в табл. 2 и 31), а также их варианты (например, шарниры, не встречающиеся в естественных условиях, или модифицированные шарниры). Например, термин "шарнир IgG2" включает в себя шарнир дикого типа IgG2, который приведен в табл. 2, и варианты, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 мутаций и/или не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию, например замены, делеции или добавления. Иллюстративные варианты шарнира IgG2 включают в себя шарниры IgG2, в которых 1, 2, 3 или все 4 цистеина (C219, C220, C226 и C229) заменены на другую аминокислоту. В конкретном варианте осуществления IgG2 содержит замену C219S. Шарнир IgG2 также может содержать замену в C220 или замены в обеих из C219 и C220. Шарнир IgG2 может содержать замену, которая отдельно или вместе с одной или несколькими заменами в других участках тяжелой или легкой цепи будет приводить к тому, что антитело будет принимать форму A или B (см., например, Allen et al. (2009) Biochemistry 48:3755). В соответствии с определенными вариантами осуществления шарнир представляет собой гибридный шарнир, который содержит последовательности от по меньшей мере двух изотипов. Например, шарнир может содержать верхний, средний или нижний шарнир от одного изотипа, а остальную часть шарнира от одного или нескольких других изотипов. Например, шарнир может представлять собой шарнир IgG2/IgG1 и может содержать, например, верхний и средний шарниры IgG2 и нижний шарнир IgG1. Шарнир может обладать эффекторной функцией или может быть лишен эффекторной функции. Например, нижний шарнир IgG1 дикого типа обеспечивает

эффекторную функцию.

Термин "CH1 домен" относится к константному участку тяжелой цепи, связывающему вариабельный домен с шарниром в константном домене тяжелой цепи. Как используется в данном документе, CH1 домен начинается в A118 и заканчивается в V215. Термин "CH1 домен" включает в себя CH1 домены дикого типа (такие как имеющие SEQ ID NO: 98 для IgG1 и SEQ ID NO: 124 для IgG2), а также их варианты (например, CH1 домены, не встречающиеся в естественных условиях, или модифицированные CH1 домены). Например, термин "CH1 домен" включает в себя CH1 домены дикого типа и их варианты, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 мутаций и/или не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию, например замены, делеции или добавления. Иллюстративные CH1 домены включают в себя CH1 домены с мутациями, которые модифицируют биологическую активность антитела, такую как ADCC, CDC или период полувыведения. В данном документе предполагается модификации в CH1 домене, которые оказывают воздействие на биологическую активность антитела. CH1 домен может содержать замену C131S, причем данная замена может привести к тому, что антитело IgG2 или антитело, содержащее по меньшей мере часть антитела IgG2, такую как шарнир и/или шарнир и CH1, принимает B-форму в противоположность A-форме антитела.

Термин "CH2 домен" относится к константному участку тяжелой цепи, связывающему шарнир с CH3 доменом в константном домене тяжелой цепи. Как используется в данном документе, CH2 домен начинается в P238 и заканчивается в K340. Термин "CH2 домен" включает в себя CH2 домены дикого типа (такие как имеющие SEQ ID NO: 137 для IgG1; табл. 35), а также их варианты (например, CH2 домены, не встречающиеся в естественных условиях, или модифицированные CH2 домены). Например, термин "CH2 домен" включает в себя CH2 домены дикого типа и их варианты, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 мутаций и/или не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию, например замены, делеции или добавления. Иллюстративные CH2 домены включают в себя CH2 домены с мутациями, которые модифицируют биологическую активность антитела, такую как ADCC, CDC или период полувыведения. В соответствии с определенными вариантами осуществления CH2 домен содержит замены A330S/P331S, которые снижают эффекторную функцию. В данном документе предполагаются другие модификации в CH2 домене, которые оказывают воздействие на биологическую активность антитела.

Термин "CH3 домен" относится к константному участку тяжелой цепи, который является C-концевым относительно CH2 домена в константном домене тяжелой цепи. Как используется в данном документе, CH3 домен начинается в G341 и заканчивается в K447. Термин "CH3 домен" включает в себя CH3 домены дикого типа (такие как имеющие SEQ ID NO: 138 для IgG1; табл. 35), а также их варианты (например, CH3 домены, не встречающиеся в естественных условиях, или модифицированные CH3 домены). Например, термин "CH3 домен" включает в себя CH3 домены дикого типа и их варианты, имеющие 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 мутаций и/или не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию, например замены, делеции или добавления. Иллюстративные CH3 домены включают в себя CH3 домены с мутациями, которые модифицируют биологическую активность антитела, такую как ADCC, CDC или период полувыведения. В данном документе предполагаются модификации в CH3 домене, которые оказывают воздействие на биологическую активность антитела.

"CL домен" относится к константному домену легкой цепи. Термин "CL домен" включает в себя домены CL дикого типа и их варианты, например варианты, содержащие C214S.

"Fc-участок с нативной последовательностью" или "Fc с нативной последовательностью" содержит аминокислотную последовательность, которая является идентичной аминокислотной последовательности Fc-участка, обнаруживаемого в природе. Человеческие Fc-участки с нативной последовательностью включают в себя Fc-участок с нативной последовательностью человеческого IgG1; Fc-участок с нативной последовательностью человеческого IgG2; Fc-участок с нативной последовательностью человеческого IgG3 и Fc-участок с нативной последовательностью человеческого IgG4, а также их варианты, встречающиеся в естественных условиях. Fc с нативной последовательностью включает в себя различные аллотипы Fc (см., например, Jefferis et al. (2009) mAbs 1:1).

Термин "эпитоп" или "антигенная детерминанта" относится к сайту на антигене (например, CD73), с которым специфично связывается иммуноглобулин или антитело. Эпитопы в антигенах белков могут быть образованы как из смежных аминокислот (обычно линейный эпитоп), так и из несмежных аминокислот, располагающихся рядом при свертывании белка в третичную структуру (обычно конформационный эпитоп). Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, но не всегда сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные при свертывании в третичную структуру, как правило, теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, включает в себя по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения того, какие эпитопы связываются заданным антителом (т.е. картирования эпитопов), являются хорошо известными в уровне техники и включают, например, анализы с использованием иммуноблоттинга и иммунопреципитации, в которых перекрывающиеся или смежные пептиды (например, из CD73) исследуют в отношении способности реагировать с заданным антителом (например, антителом к CD73). Способы определения пространственной конформации эпитопов включают в себя методики из уровня техники, а также методики, описанные в

данном документе, например рентгеноструктурную кристаллографию, 2-мерный ядерный магнитный резонанс и HDX-MS (см., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G.E. Morris, Ed. (1996)).

Термин "картирование эпитопов" относится к процессу идентификации молекулярных детерминант на антигене, вовлеченных в распознавание антигена антителом.

Термин "связываются с одним и тем же эпитопом" в отношении двух или более антител означает, что антитела связываются с одним и тем же сегментом из аминокислотных остатков при определении с помощью заданного метода. Методики определения того, связываются ли антитела с "тем же эпитопом на CD73", что и антитела, описанные в данном документе, включают в себя, например, методы картирования эпитопов, такие как рентгеноструктурные анализы кристаллов комплексов антиген-антитело, обеспечивающие разрешение эпитопа в атомном масштабе, и масс-спектрометрии с использованием водородно/дейтериевого обмена (HDX-MS). В других способах отслеживается связывание антитела с фрагментами антигена (например, фрагментами, полученными в результате протеолиза) или мутированными вариантами антигена, причем потерю связывания вследствие модификации аминокислотного остатка в последовательности антигена часто считают указанием на компонент эпитопа (например, сканирующий аланином мутагенез - Cunningham & Wells (1985) Science 244:1081). Кроме того, для картирования эпитопов также можно применять вычислительные комбинаторные методы. Эти методы основываются на способности антитела, представляющего интерес, выделять на основе аффинности специфичные короткие пептиды из комбинаторных пептидных библиотек с использованием фагового дисплея.

Антитела, которые "конкурируют с другим антителом за связывание с мишенью", относятся к антителам, которые ингибируют (частично или полностью) связывание другого антитела с мишенью. Конкурируют ли два антитела друг с другом за связывание с мишенью, т.е. ингибирует ли одно антитело связывание другого антитела с мишенью, и в какой мере оно это связывание ингибирует, можно определить с использованием известных конкурентных экспериментов, например, таких как эксперименты, описанные в разделе примеры. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело конкурирует с другим антителом и ингибирует его связывание с мишенью по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%. Уровень ингибирования или конкуренции может отличаться в зависимости от того, какое антитело является "блокирующим антителом" (т.е. "холодным" антителом, которое вначале инкубируют с мишенью). Конкурентные анализы можно проводить, как описано, например, в Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harb Protoc; 2006; doi:10.1101/pdb.prot4277 или в главе 11 в "Using Antibodies" by Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999. Конкурирующие антитела связываются с тем же эпитопом, перекрывающимся эпитопом или со смежными эпитопами (например, что подтверждается стерическим несоответствием).

Другие конкурентные анализы связывания включают в себя прямой или непрямой твердофазный радиоиммунологический анализ (RIA), прямой или непрямой твердофазный иммуноферментный анализ (EIA), конкурентный сэндвич-анализ (см., Stahli et al., Methods in Enzymology 9:242 (1983)); прямой твердофазный EIA с использованием пары биотин-авидин (см. Kirkland et al., J. Immunol. 137:3614 (1986)); твердофазный анализ с прямым мечением, твердофазный сэндвич-анализ с прямым мечением (см., Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)); твердофазный RIA анализ с прямым мечением, с использованием метки I-125 (см., Morel et al., Mol. Immunol. 25(1):7 (1988)); прямой твердофазный EIA с использованием пары биотин-авидин (Cheung et al., Virology 176:546 (1990)) и RIA с прямым мечением (Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32:77 (1990)).

Используемые в данном документе термины "специфическое связывание", "селективное связывание", "селективно связывается" и "специфично связывается" относятся к связыванию антитела с эпитопом на предварительно определенном антигене, но не с другими антигенами. Как правило, антитело: (i) связывается с равновесной константой диссоциации (K_D), составляющей примерно менее чем 10^{-7} М, как, например, примерно менее чем 10^{-8}, 10^{-9} или 10^{-10} М или еще ниже при определении, например, с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на инструменте для измерения поверхностного плазмонного резонанса BIACORE® 2000 с использованием предварительно определенного антигена, например рекомбинантного человеческого CD73, в качестве анализируемого вещества, а антитела в качестве лиганда, или с помощью анализа связывания антитела с антиген-положительными клетками по Скэтчарду, и (ii) связывается с предварительно определенным антигеном с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза больше, чем его аффинность для связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеин), отличающимся от предварительно определенного или близкородственного антигена. Соответственно, если не указано иное, антитело, которое "специфично связывается с человеческим CD73", относится к антителу, которое связывается с растворимым или связанным с клеткой человеческим CD73 с K_D, составляющей 10^{-7} М или менее, как, например, примерно менее чем 10^{-8}, 10^{-9} или 10^{-10} М или еще ниже. Антитело, которое "дает перекрестную реакцию с CD73 яванского макака", относится к антителу, которое связывается с CD73 яванского макака с K_D, составляющей 10^{-7} М или менее, как, например, менее чем 10^{-8}, 10^{-9} или 10^{-10} М или еще ниже. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела, которые не дают перекрестных реакций с CD73 из отличного от человека вида, проявляют такое связывание с этими белками, которое практически невозможно выявить в стандартных

анализах связывания.

Термины "k ассоциации" или "k_a", используемые в данном документе, как предполагается, относятся к константе скорости ассоциации при взаимодействии конкретных антитела и антигена, тогда как предполагается, что термины "k диссоциации" или "k_d", используемые в данном документе, относятся к константе скорости диссоциации при взаимодействии конкретных антитела и антигена. Предполагается, что используемый в данном документе термин "K_D" относится к равновесной константе диссоциации, которую получают из отношения k_d к k_a (т.е. k_d/k_a) и которая выражена в виде молярной концентрации (M). Величины K_D для антител можно определить с использованием методов, общепринятых в данной области техники. Предпочтительным методом для определения K_D антитела является применение поверхностного плазмонного резонанса, предпочтительно с использованием биосенсорной системы, такой как система измерения поверхностного плазмонного резонанса Biacore®, или проточной цитометрии и анализа по Скэтчарду.

Термин "EC50" в контексте in vitro или in vivo анализа с использованием антитела или его антигенсвязывающего фрагмента относится к концентрации антитела или его антигенсвязывающей части, которая индуцирует реакцию, которая составляет 50% от максимальной реакции, т.е. находится посередине между максимальной реакцией и фоновым уровнем.

"Скорость интернализации" антитела или рецептора, например CD73, которая опосредуется антителом, например антителом к CD73, может быть представлена, например, $T_{1/2}$ для интернализации, например, как показано в разделе примеры. Скорость интернализации антитела к CD73 может быть повышена или увеличена по меньшей мере на 10, 30, 50, 75%, 2-, 3-, 5-кратно или более, приводя в результате к сокращению $T_{1/2}$ по меньшей мере на 10, 30, 50, 75%, 2-, 3-, 5-кратно или более при изменении константного участка тяжелой цепи антитела в модифицированный константный участок тяжелой цепи, например константный участок тяжелой цепи, который содержит шарнир IgG2 и CH1 домен IgG2. Например, вместо имеющегося $T_{1/2}$, составляющего 10 мин, модифицированный константный участок тяжелой цепи может повышать скорость интернализации и тем самым сокращать $T_{1/2}$ до 5 мин (т.е. двукратное повышение скорости интернализации или двукратное снижение $T_{1/2}$). "$T_{1/2}$" определен как время, за которое половина достигается половина от максимальной интернализации, которое измеряется с момента времени, когда антитело добавляют к клеткам. Максимальный уровень интернализации может представлять собой уровень интернализации при плато на графике, представляющем зависимость интернализации от концентраций антитела. Модифицированный константный участок тяжелой цепи может повышать максимальный уровень интернализации антитела по меньшей мере на 10, 30, 50, 75%, 2-, 3-, 5-кратно или более. Другой способ сравнения эффективностей интернализации у разных антител, таких как антитело с модифицированным константным участком тяжелой цепи и такое же антитело без него, заключается в сравнении уровня их интернализации при заданной концентрации антитела (например, 100 нМ) или в течение заданного времени (например, 2, 5, 10 или 30 мин). Сравнение уровней интернализации также можно выполнить путем сравнения уровней EC_{50} для интернализации. Можно определить уровень интернализации одного антитела по сравнению с уровнем интернализации у заданного (эталонного) антитела, например антитела, описанного в данном документе, например 11F11, или CD73.4-IgG2CS-IgG1, или CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f, и его можно указать в виде процента от величины, полученной с заданным (эталонным) антителом. Степень интернализации может быть повышена по меньшей мере на 10, 30, 50, 75%, 2-, 3-, 5-кратно или более, что можно сравнить с помощью любого из этих способов.

Используемый в данном документе термин "встречающийся в естественных условиях" применительно к объекту относится к тому факту, что объект может обнаруживаться в природе. Например, встречающейся в естественных условиях является последовательность полипептида или полинуклеотида, которая присутствует в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из природного источника и которая не была намеренно модифицирована человеком в лаборатории.

"Полипептид" относится к цепи, содержащей по меньшей мере два последовательно связанных аминокислотных остатка при отсутствии верхнего предела в отношении длины цепи. Один или несколько аминокислотных остатков в белке могут содержать модификацию, такую как без ограничения гликозилирование, фосфорилирование или дисульфидная связь. "Белок" может содержать один или несколько полипептидов.

Используемый в данном документе термин "молекула нуклеиновой кислоты", как предполагается, включает молекулы ДНК и молекулы РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть однонитевой или двунитевой и может представлять собой кДНК.

Также предполагаются "консервативные модификации последовательности" для последовательностей, изложенных в SEQ ID NO, описанных в данном документе, т.е. модификации нуклеотидной и аминокислотной последовательности, которые не нарушают связывание антитела, кодируемого нуклеотидной последовательностью или содержащего аминокислотную последовательность, с антигеном. Такие консервативные модификации последовательности включают консервативные нуклеотидные и аминокислотные замены, а также добавления и делеции нуклеотидов и аминокислот. Например, модификации могут быть введены в SEQ ID NO, описанные в данном документе, с помощью стандартных методик, известных в уровне техники, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез.

Консервативные модификации последовательности включают в себя консервативные аминокислотные замены, при которых аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток с подобной боковой цепью. Семейства аминокислотных остатков с подобными боковыми цепями были определены в уровне техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, прогнозируемый несущественный аминокислотный остаток в антителе к CD73 предпочтительно заменен на другой аминокислотный остаток из того же семейства боковой цепи. Способы идентификации консервативных нуклеотидных и аминокислотных замен, которые не исключают связывание с антигеном, являются хорошо известными в уровне техники (см., например, Brummell et al., Biochem. 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al. Protein Eng. 12(10):879-884 (1999); и Burks et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:412-417 (1997)).

В качестве альтернативы в соответствии с другим вариантом осуществления мутации можно вводить произвольно по всей кодирующей последовательности антитела к CD73 или ее части, как, например, с помощью насыщающего мутагенеза, и полученные в результате антитела к CD73 можно подвергать скринингу в отношении улучшенной активности связывания.

Применительно к нуклеиновым кислотам термин "значительная гомология" указывает на то, что две нуклеиновые кислоты или их определенные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении являются идентичными, при соответствующих нуклеотидных вставках или делециях, по меньшей мере приблизительно на 80% нуклеотидов, обычно по меньшей мере приблизительно на 90-95% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 98-99,5% нуклеотидов. В качестве альтернативы, практическая гомология существует, когда сегменты будут гибридизироваться при условиях селективной гибридизации с последовательностью, комплементарной их нити.

Применительно к полипептидам термин "значительная гомология" указывает на то, что два полипептида или их определенные последовательности при оптимальном выравнивании и сравнении являются идентичными при соответствующих аминокислотных вставках или делециях по меньшей мере приблизительно на 80% аминокислот, обычно по меньшей мере приблизительно на 90-95% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 98-99,5% аминокислот.

Процентная идентичность двух последовательностей зависит от числа идентичных положений, которые есть в обеих последовательностях в случае, когда последовательности подвергаются оптимальному выравниванию (т.е. % гомологии=число идентичных положений/общее число положений ×100), причем при определении с помощью оптимального выравниванию принимают во внимание число гэпов и длину каждого гэпа, которые следует ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процентной идентичности двух последовательностей можно выполнить с использованием математического алгоритма, как описано в неограничивающих примерах ниже.

Процентную идентичность двух нуклеотидных последовательностей можно определить с помощью программы GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступен на сайте http://www.gcg.com) при использовании матрицы NWSgapdna.CMP, и штрафа за открытие гэпа 40, 50, 60, 70 или 80, и штрафа за продолжение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Процентную идентичность двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей также можно определить с помощью алгоритма по E. Meyers and W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), при использовании таблицы веса остатков PAM120, штрафа за продолжение гэпа 12 и штрафа за открытие гэпа 4. Кроме того, процентную идентичность двух аминокислотных последовательностей можно определить с помощью алгоритма по Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)), который бы включен в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступен на сайте http://www.gcg.com), при использованием либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250, и штрафа за открытие гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4, и штрафа за продолжение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Описанные в данном документе последовательности нуклеиновой кислоты и белка также можно использовать в качестве "последовательности запроса" для проведения поиска в базах данных общего пользования, например, для идентификации родственных последовательностей. Такие поиски можно проводить с использованием программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0) из Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Поиски нуклеотидов с помощью BLAST можно проводить с использованием программы NBLAST, вес=100, длина слова=12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновой кислоты, описанным в данном документе. Поиски белков с помощью BLAST можно проводить с использованием программы XBLAST, вес=50, длина слова=3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных белковым молекулам, описанным в данном документе. Для получения выравниваний с гэпами с целью сравнения можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. При использовании программ

BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры по умолчанию в соответствующих программах (например, XBLAST и NBLAST); см. www.ncbi.nlm.nih.gov.

Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенном или практически чистом виде. Нуклеиновая кислота является "выделенной" или "сделанной практически чистой", если она очищена от других клеточных компонентов или других загрязняющих примесей, например других клеточных нуклеиновых кислот (например, других частей хромосомы) или белков, с помощью стандартных методик, в том числе щелочной обработки/обработки SDS (додецилсульфат натрия), центрифугирования в градиенте плотности CsCl, колоночной хроматографии, электрофореза в агарозном геле и других методик, широко известных в уровне техники; см., F. Ausubel, et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

Нуклеиновые кислоты, например кДНК, могут быть подвергнуты мутации в соответствии со стандартными методиками с обеспечением генных последовательностей. В случае кодирующих последовательностей эти мутации могут воздействовать на аминокислотную последовательность, если это необходимо. В частности, предполагаются последовательности ДНК, практически гомологичные или происходящие из нативных V, D, J, константных, переключающих и других таких последовательностей, описанных в данном документе.

Предполагается, что используемый в данном документе термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она была связана. Одним типов вектора является "плазмида", которая относится к петле кольцевой двунитевой ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, векторы млекопитающих, не относящиеся к эписомальным) могут интегрироваться в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и вследствие этого реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, определенные векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в данном документе "рекомбинантными векторами экспрессии" (или просто "векторами экспрессии"). В целом, векторы экспрессии, применимые в методиках с использованием рекомбинантной ДНК, часто имеют форму плазмид. В настоящем описании "плазмида" и "вектор" могут использоваться взаимозаменяемо, поскольку плазмида является наиболее широко используемой формой вектора. Тем не менее, также включены все остальные формы векторов экспрессии, такие как вирусные векторы (например, ретровирусы с дефектной репликацией, аденовирусы и аденоасоциированные вирусы), которые служат эквивалентным функциям.

Предполагается, что используемый в данном документе термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") относится к клетке, которая содержит нуклеиновую кислоту, которая в естественных условиях присутствует в клетке, и, возможно, клетку, в которую был введен рекомбинантный вектор экспрессии. Следует понимать, что такие термины, как предполагается, относятся не только к конкретной клетке субъекта, но также к потомству такой клетки. Поскольку определенные модификации могут происходить в последующих поколениях либо вследствие мутации, либо из-за воздействий окружающей среды, такое потомство, на самом деле, может не быть идентичным родительской клетке, но при этом все еще включено в объем используемого в данном документе термина "клетка-хозяин".

Используемый в данном документе термин "антиген" относится к любому натуральному или синтетическому иммуногенному веществу, такому как белок, пептид или гаптен. Антиген может представлять собой CD73 или его фрагмент.

"Иммунная реакция" относится к биологической реакции внутри позвоночного на чужеродные агенты, причем данная реакция защищает организм от этих агентов и вызываемых ими заболеваний. Иммунная реакция опосредуется действием клетки иммунной системы (например, Т-лимфоцита, В-лимфоцита, клетки-натурального киллера (NK), макрофага, эозинофила, тучной клетки, дендритной клетки или нейтрофила) и растворимых макромолекул, продуцируемых любой из этих клеток или печенью (в том числе антитела, цитокины и компоненты комплемента), что приводит в результате к селективному нацеливанию, связыванию, повреждению, разрушению и/или удалению из организма позвоночного проникших патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, злокачественных или других ненормальных клеток, или, в случаях аутоиммунных реакций или патологического воспаления, нормальных человеческих клеток или тканей. Иммунный ответ или реакция включает в себя, например, активацию или ингибирование Т-клетки, например эффекторной Т-клетки или Th-клетки, такой как CD4+ или CD8+ Т-клетка, или ингибирование Treg клетки.

"Иммуномодулятор" или "иммунорегулятор" относится к средству, например компоненту пути передачи сигнала, которое может быть задействовано в модуляции, регуляции или модификации иммунной реакции. "Модуляция", "регуляция" или "модификация" иммунной реакции относится к любому изменению в клетке иммунной системы или изменению активности такой клетки (например, эффекторной Т-клетки). Такая модуляция включает в себя стимуляцию или подавление иммунной системы, которые мо-

гут проявляться как повышение или снижение числа различных типов клеток, повышение или снижение активности этих клеток или любые другие изменения, которые могут происходить в иммунной системе. Были идентифицированы как ингибирующие, так и стимулирующие иммуномодуляторы, некоторые из которых усиленно функционируют в опухолевом микроокружении. Иммуномодулятор может быть расположен на поверхности Т-клетки. "Иммуномодулирующая мишень" или "иммунорегуляторная мишень" представляет собой иммуномодулятор, на который оказывает целенаправленное воздействие связывание вещества, средства, фрагмента, соединения или молекулы, и чья активность изменяется при таком связывании. Иммуномодулирующие мишени включают в себя, например, рецепторы на поверхности клетки ("иммуномодулирующие рецепторы") и лиганды рецепторов ("иммуномодирующие лиганды").

Повышенная способность к стимуляции иммунной реакции или иммунной системы может являться результатом усиленной агонистической активности костимулирующих Т-клеточных рецепторов и/или усиленной антагонистической активности ингибирующих рецепторов. Повышенная способность к стимуляции иммунной реакции или иммунной системы может отражаться в кратном повышении EC50 или максимального уровня активности в анализе, в котором измеряют иммунную реакцию, например, в анализе, в котором измеряют изменения высвобождения цитокинов или хемокинов, цитолитическую активность (определяемую непосредственно на клетках-мишенях или опосредованно через выявление CD107a или гранзимов) и пролиферацию. Способность к стимуляции иммунной реакции или активности иммунной системы может быть усилена по меньшей мере на 10, 30, 50, 75%, 2-, 3-, 5-кратно или более.

"Иммунотерапия" относится к лечению субъекта, пораженного заболеванием, или имеющего риск заражения, или страдающего от рецидива заболевания, с помощью способа, предусматривающего индукцию, усиление, подавление или иную модификацию иммунной реакции.

"Иммуностимулирующая терапия" или "иммуностимуляторная терапия" относится к терапии, результатом которой является повышение (индукция или усиление) иммунной реакции у субъекта, например, для лечения злокачественной опухоли.

"Усиление эндогенной иммунной реакции" означает повышение эффективности или силы существующей иммунной реакции у субъекта. Это повышение эффективности и силы может быть достигнуто, например, посредством преодоления механизмов, которые подавляют эндогенную иммунную реакцию хозяина, или посредством стимуляции механизмов, которые усиливают эндогенную иммунную реакцию хозяина.

"Эффекторные Т-клетки" ("T_{eff}") относятся к Т-клеткам (например, CD4+ и CD8+ Т-клеткам) с цитолитическими активностями, а также к Т-хелперным (Th) клеткам, которые секретируют цитокины, а также активируют другие иммунные клетки и управляют ими, но не включают регуляторные Т-клетки (Treg клетки).

Используемый в данном документе термин "связанный" относится к ассоциации двух или более молекул. Связь может быть ковалентной или нековалентной. Связь также может быть генетической (т.е. полученной путем слияния с использованием методов на основе рекомбинации). Такие связи можно получать с использованием широкого спектра методик, принятых в данной области техники, таких как химическая конъюгация и получение рекомбинантных белков.

Как используется в данном документе, "введение" относится к физическому введению субъекту композиции, содержащей терапевтическое средство, с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области техники. Предпочтительные пути введения для антител, описанных в данном документе, включают внутривенный, внутрибрюшинный, внутримышечный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например путем инъекции или инфузии. Используемая в данном документе фраза "парентеральное введение" означает способы введения, за исключением энтерального и местного введения, обычно путем инъекции и включает в себя без ограничения внутривенную, внутрибрюшинную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интралимфатическую, внутриочаговую, интракапсулярную, интраорбительную, внутрисердечную, интрадермальную, транстрахеальную, подкожную, внутрикожную, внутрисуставную, подкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию, а также in vivo электропорацию. В качестве альтернативы описанное в данном документе антитело можно вводить посредством непарентерального пути, такого как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также можно осуществлять, например, однократно, множество раз и/или в течение одного или нескольких длительных периодов.

Используемый в данном документе термин "опосредованная Т-клетками реакция" относится к реакции, опосредованной Т-клетками, в том числе эффекторными Т-клетками (например, $CD8^+$ клетками) и хелперными Т-клетками (например, $CD4^+$ клетками). Опосредованные Т-клетками реакции включают, например, Т-клеточную цитотоксичность и пролиферацию.

Используемый в данном документе термин "реакция цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL)" относится к иммунной реакции, индуцируемой цитотоксическими Т-клетками. CTL-реакции преимущественно опосредуются $CD8^+$ Т-клетками.

Используемые в данном документе термины "ингибирует" или "блокирует" (например, в отноше-

нии ингибирования/блокирования связывания или активности CD73) используются взаимозаменяемо и охватывают как частичное, так и полное ингибирование/блокирование.

Используемый в данном документе термин "злокачественная опухоль" относится к обширной группе заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом ненормальных клеток в организме. Нерегулируемое деление клеток приводить в результате к образованию злокачественных опухолей или клеток, которые внедряются в прилегающие ткани и могут метастазировать в удаленные части организма через лимфатическую систему или кровоток.

Используемые в данном документе термины "лечить", "осуществлять лечение" и "лечение" относятся к любому типу вмешательства или процессу, осуществляемому с субъектом, или к введению субъекту активного средства с целью обеспечения регрессии, облегчения, ослабления, ингибирования, или замедления, или предупреждения прогрессирования, развития, тяжести или повторного проявления симптома, осложнения, состояния или биохимических признаков, связанных с заболеванием. Профилактика относится к введению субъекту, который не имеет заболевания, для предупреждения возникновения заболевания или сведения к минимуму его воздействий, если оно возникло.

"Гематологическая злокачественная опухоль" включает в себя лимфому, лейкоз, миелому или злокачественную опухоль из лимфоидной ткани, а также злокачественную опухоль селезенки и лимфатических узлов. Иллюстративные лимфомы включают как В-клеточные лимфомы, так и Т-клеточные лимфомы. В-клеточные лимфомы включают как лимфомы Ходжкина, так и большинство неходжкинских лимфом. Неограничивающие примеры В-клеточных лимфом включают в себя диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфому ассоциированной со слизистой лимфоидной ткани, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (перекликается с хроническим лимфоцитарным лейкозом), лимфому из клеток мантийной зоны (MCL), лимфому Беркитта, средостенную В-крупноклеточную лимфому, макроглобулинемию Вальденстрема, узловую В-клеточную лимфому из клеток краевой зоны, селезеночную лимфому из клеток краевой зоны, внутрисосудистую В-крупноклеточную лимфому, первичную выпотную лимфому, лимфоидный гранулематоз. Неограничивающие примеры Т-клеточных лимфом включают в себя внеузловую Т-клеточную лимфому, ТТ-клеточную лимфому кожи, анапластическую крупноклеточную лимфому и ангиоиммунобластную Т-клеточную лимфому. Гематологические злокачественные опухоли также включают в себя лейкоз, такой как, без ограничения, вторичный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический миелолейкоз и острый лимфобластный лейкоз. Гематологические злокачественные опухоли дополнительно включают в себя миеломы, такие как, без ограничения, множественная миелома и вялотекущая множественная миелома. Термином "гематологическая злокачественная опухоль" охватываются другие гематологические злокачественные опухоли и/или ассоциированные с В- или Т-клетками злокачественные опухоли.

Термин "эффективная доза" или "эффективная дозировка" определяется как количество, достаточное для достижения или, по меньшей мере, частичного достижения желаемого эффекта. "Терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная доза" лекарственного или терапевтического средства представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при применении отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством способствует регрессии заболевания, подтверждаемой снижением тяжести симптомов заболевания, повышением частоты и длительности бессимптомных периодов заболевания или предупреждением ухудшения или инвалидизации, обусловленных поражением заболеванием. "Профилактически эффективное количество" или "профилактически эффективная доза" лекарственного средства представляет собой количество лекарственного средства, которое при введении отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством субъекту, имеющему риск развития заболевания или риск подвергнуться рецидиву заболевания, ингибирует развитие или появление рецидива заболевания. Способность терапевтического или профилактического средства содействовать регрессии заболевания или ингибировать развитие или появление рецидива заболевания можно оценить с использованием ряда способов, известных практикующему специалисту в данной области техники, как, например, в ходе клинических испытаний на субъектах-людях, в модельных системах на животных, прогнозирующих эффективность у людей, или путем анализа активности средства в in vitro анализах.

Например, противораковое средство представляет собой лекарственное средство, которое замедляет развитие злокачественной опухоли или способствует регрессии злокачественной опухоли у субъекта. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления терапевтически эффективное количество лекарственного средства способствует регрессии злокачественной опухоли до момента ликвидации злокачественной опухоли. "Способствует регрессии злокачественной опухоли" означает, что введение эффективного количества лекарственного средства самого по себе или в комбинации с противоопухолевым средством приводит в результате к уменьшению опухолевого роста или размера опухоли, некрозу опухоли, снижению тяжести по меньшей мере одного симптома заболевания, повышению частоты и длительности бессимптомных периодов заболевания, предупреждению ухудшения или инвалидизации, обусловленных поражением заболеванием, или иному ослаблению симптомов заболевания у пациента. Фармакологическая эффективность относится к способности лекарственного средства способствовать регрес-

сии злокачественной опухоли у пациента. Физиологическая безопасность относится к приемлемо низкому уровню токсичности или других неблагоприятных физиологических эффектов на клеточном уровне, на уровне органа и/или организма (неблагоприятные эффекты), являющихся результатом введения лекарственного средства.

В качестве примера для лечения опухолей терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства предпочтительно ингибирует рост клеток или опухолевый рост по меньшей мере приблизительно на 20, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 40, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 60 и даже более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80% в сравнении с субъектами, не получавшими лечение. В соответствии с наиболее предпочтительными вариантами осуществления терапевтически эффективное количество или дозировка лекарственного средства полностью ингибирует рост клеток или опухолевый рост, т.е. предпочтительно ингибирует рост клеток или опухолевый рост на 100%. Способность соединения к ингибированию опухолевого роста можно оценить с помощью анализов, описанных ниже. В качестве альтернативы, это свойство композиции можно оценить путем исследования способности соединения к ингибированию роста клеток, такое ингибирование можно измерить in vitro с помощью анализов, известных практикующему специалисту в данной области техники. В соответствии с другими предпочтительными вариантами осуществления, описанными в данном документе, можно наблюдать регрессию опухоли, и она может длиться в течение периода по меньшей мере приблизительно 20 суток, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 40 суток или еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 60 суток.

Термины "пациент" и "субъект" относятся к любому человеку или животному, отличному от человека, которое получает либо профилактическое, либо терапевтическое лечение. Например, способы и композиции, описанные в данном документе, можно применять для лечения субъекта, имеющего злокачественную опухоль. Термин "животное, отличное от человека" включает в себя всех позвоночных, например млекопитающих и позвоночных, не относящихся к млекопитающим, как, например, приматов, за исключением человека, овцу, собаку, корову, кур, амфибий, рептилий и т.д.

Описанные в данном документе различные аспекты описаны более подробно в следующих подразделах.

I. Антитела к CD73.

В данном документе описаны антитела, например полностью человеческие антитела, которые характеризуются конкретными функциональными признаками или свойствами. Например, антитела специфично связываются с человеческим CD73. Кроме того, антитела могут давать перекрестную реакцию с CD73 из одного или нескольких приматов, за исключением человека, таким как CD73 яванского макака.

Помимо специфичного связывания с растворимым и/или мембраносвязанным человеческим CD73, описанные в данном документе антитела проявляют одно или несколько из следующих функциональных свойств:

(a) ингибирование ферментативной активности CD73, приводящее в результате к уменьшению количества продуцируемого аденозина;

(b) связывание с CD73 макака-крабоеда;

(c) опосредованная антителом интернализация CD73 в клетки, например опухолевые клетки; и

(d) связывание с конформационным эпитопом, содержащим аминокислоты 65-83 и 157-172 в человеческом CD73.

Предпочтительно антитела к CD73 связываются с человеческим CD73 (мономерным или димерным; изоформой 1 или 2) с высокой аффинностью, например с K_D, составляющей 10^{-7} М или менее, 10^{-8} М или менее, 10^{-9} М или менее, 10^{-10} М или менее, 10^{-11} М или менее, 10^{-12} М или менее, от 10^{-12} до 10^{-7} М, от 10^{-11} до 10^{-7} М, от 10^{-10} до 10^{-7} М, от 10^{-9} до 10^{-7} М или от 10^{-10} до 10^{-8} М. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73 связывается с растворимым человеческим CD73, например, при определении с помощью анализа SPR методом BIACORE®, с K_D, составляющей 10^{-7} М или менее, 10^{-8} М или менее, 10^{-9} М (1 нМ) или менее, 10^{-10} М или менее, от 10^{-12} до 10^{-7} М, от 10^{-11} до 10^{-7} М, от 10^{-10} до 10^{-7} М, от 10^{-9} до 10^{-7} М, от 10^{-8} до 10^{-7} М или от 10^{-10} до 10^{-8} М. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73 связывается со связанным (например, связанным с клеточной мембраной, например, Calu6 клеток) человеческим CD73, например, при определении, которое описано далее в данном документе, с EC50, составляющей менее 1 нМ. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73 связывается со связанным человеческим CD73, например, со связанным с клеточной мембраной человеческим CD73, например, при определении с помощью проточной цитометрии и по графику Скэтчарда, с K_D, составляющей 10^{-7} М или менее, 10^{-8} М или менее, 10^{-9} М (1 нМ) или менее, 10^{-10} М или менее, от 10^{-12} до 10^{-7} М, от 10^{-11} до 10^{-8} М, от 10^{-10} до 10^{-8} М, от 10^{-9} до 10^{-8} М, от 10^{-11} до 10^{-9} М, от 10^{-10} до 10^{-8} М или от 10^{-10} до 10^{-9} М. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73 связывается с растворимым человеческим CD73 с K_D, составляющей 10^{-7} М или менее, 10^{-8} М или менее, 10^{-9} М (1 нМ) или менее, 10^{-10} М или менее, от 10^{-12} до 10^{-7} М, от 10^{-11} до 10^{-7} М, от 10^{-10} до 10^{-7} М, от 10^{-9} до 10^{-7} М, от 10^{-10} до 10^{-8} М или от 10^{-8} до 10^{-7} М, и со связанным человеческим CD73, например со связанным с клеточной мембраной человеческим CD73, с

K_D или EC_{50}, составляющими 10^{-7} М или менее, 10^{-8} М или менее, 10^{-9} М (1 нМ) или менее, 10^{-10} М или менее, от 10^{-12} до 10^{-7} М, от 10^{-11} до 10^{-8} М, от 10^{-10} до 10^{-8} М, от 10^{-9} до 10^{-8} М, от 10^{-11} до 10^{-9} М или от 10^{-10} до 10^{-9} М.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73 связывается с CD73 макака-крабоеда с высокой аффинностью, например оно связывается с CHO клеткой, экспрессирующей CD73 макака-крабоеда с EC50, составляющей от 0,1 до 10 нМ, как, например, с EC50, составляющей менее чем 1 нМ при определении, например, как описано далее в данном документе.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73, описанные в данном документе, также связываются с CD73 яванского макака, например связываются с мембраносвязанным CD73 яванского макака, например, с CHO клеткой, экспрессирующей CD73 макака-крабоеда, с EC_{50}, составляющей 100 нМ или менее, 10 нМ или менее, 1 нМ или менее, от 100 до 0,01 нМ, от 100 до 0,1 нМ, от 100 до 1 нМ или от 10 до 0,1 нМ, как измерено, например, в разделе примеры.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 является мономерным по меньшей мере на 90, 95, 98 или 99%, что определено, например, с помощью SEC (гель-хроматография). Антитела к CD73 также могут обладать биофизическими характеристиками, которые подобны характеристикам антител, описанных в данном документе, или находятся в пределах диапазона характеристик антител, описанных в данном документе.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 ингибируют ферментативную активность человеческого CD73 и/или CD73 макака-крабоеда, например, что определено в анализах со связанным с гранулами CD73, или что определено в клетках, например, Calu6, SKMEL24 или H292 клетках, или что определено в анализе in vivo, например, на модели ксенотрансплантата опухоли, например, как описано далее в разделе примеры. Антитела к CD73 могут характеризоваться ингибирующими активностями, которые являются, по меньшей мере, подобными активностям антител, описанных в данном документе, или находятся в пределах диапазона активностей антител, описанных в данном документе. Например, антитела к CD73 могут ингибировать ферментативную активность (продуцирование аденозина) человеческого CD73 (например, связанного с твердой подложкой CD73) с EC_{50}, составляющей менее чем 10 или менее чем 5 нМ или находящейся в диапазоне 1-10 или 5-10 нМ. Антитела к CD73 могут ингибировать активность человеческого CD73 на клетках, например Calu6 клетках, с EC_{50}, составляющей менее чем 10 или менее чем 1 нМ или находящейся в диапазоне 0,1-10, 0,1-1 или 0,1-0,5 нМ.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 интернализируются (и опосредуют интернализацию CD73) клеткой, с которой они связываются, что определено, например, в анализе интернализации при высоком содержании или с помощью метода FACS или проточной цитометрии, как описано далее в разделе примеры. Антитела к CD73 могут обладать характеристиками интернализации (EC50, $T_{1/2}$ и Ymax) и характеризоваться временем до достижения плато, которые являются, по меньшей мере, подобными таковым у антител, описанных в разделе примеры, или находятся в пределах диапазона таковых у антител, описанных в разделе примеры. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73 характеризуется $T_{1/2}$ интернализации, который составляет менее чем 1 ч, как, например, менее чем 30, менее чем 15, менее чем 12, менее чем 10, менее чем 7 или даже менее чем 5 мин, в одной или нескольких клеточных линиях, например, клеточных линиях упомянутых в разделе примеры, при определении, например, в анализе интернализации при высоком содержании (описанном в примере 6A). В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73 достигает максимальной опосредованной антителом к CD73 интернализации в течение 10 ч или менее, 6 ч или менее, 5 ч или менее, 4 ч или менее, 3 ч или менее, 2 ч или менее, 1 ч или менее, например в диапазоне от 10 мин до 10 ч, от 10 мин до 6 ч, от 1 до 10 ч или от 1 до 6 ч, при определении, например, с использованием анализа интернализации при высоком содержании, как описано, например, в примере 6A, или с использованием проточной цитометрии, как описано, например, в примере 6B. Максимальный уровень опосредованной антителом к CD73 интернализации CD73 может составлять по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90% или более в зависимости от типа клетки. Например, EC_{50} для опосредованной антителом к CD73 интернализации CD73 в Calu6 клетки при измерении в анализе интернализации при высоком содержании, описанном в разделе примеры, может составлять менее чем 10 нМ, например, 0,1-10, или 1-10, или 1-5 нМ, и Ymax может составлять по меньшей мере 90 или по меньшей мере 95%.

Антитела к CD73, например антитела, имеющие шарнир IgG2, CH1 домен IgG2 или шарнир IgG2 и CH1 домен IgG2, могут опосредовать следующие характеристики интернализации CD73, которые измерены в анализе интернализации при высоком содержании, например, как описано в примере 6A:

EC_{50}, составляющая 10 нМ или менее, 5 нМ или менее, 1 нМ или менее или 0,1-10 нМ или 0,1-1 нМ; Ymax (максимальный процент интернализации), составляющий по меньшей мере 90, 95 или 98% в Calu6 клетках, и $T_{1/2}$, составляющий менее чем 30 мин или менее чем 10 мин в Calu6 клетках;

$T_{1/2}$, составляющий менее чем 30 или менее чем 10 мин в человеческих клетках, например Calu6 клетках, HCC44 клетках, H2030 клетках, H2228 клетках, HCC15 клетках, SKLU1 клетках, SKMES1 клетках или SW900 клетках.

Антитела к CD73, например антитела, имеющие шарнир IgG2, CH1 домен IgG2 или шарнир IgG2 и

CH1 домен IgG2, могут опосредовать следующие характеристики интернализации CD73, которые измерены с помощью проточной цитомтерии, например, как описано в примере 6B:

$T_{1/2}$, составляющий 1 ч или менее, и Ymax, составляющий по меньшей мере 70% в Calu6 клетках;

$T_{1/2}$, составляющий 30 мин или менее, и Ymax, составляющий по меньшей мере 70% в NCI-H292 клетках;

$T_{1/2}$, составляющий 2 ч или менее, и Ymax, составляющий по меньшей мере 30% в SNUC1 клетках; и/или

$T_{1/2}$, составляющий 30 мин или менее, и Ymax, составляющий по меньшей мере 60% в NCI-H1437 клетках.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73 представляет собой антитело из группы 1, т.е. оно конкурирует за связывание с человеческим CD73 с 11F11, но не с 4C3.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 связываются с эпитопом, например конформационным эпитопом в N-концевой части человеческого CD73, например эпитопом, располагающимся в пределах аминокислот 65-83 в человеческом CD73 (SEQ ID NO: 96), что определено, например, с помощью HDX-MS, как описано далее в разделе примеры. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 связываются с аминокислотами 157-172 в человеческом CD73 (SEQ ID NO: 97) или с эпитопом, располагающимся в пределах аминокислот 157-172 в человеческом CD73 (SEQ ID NO: 97), что определено, например, с помощью HDX-MS. В качестве альтернативы, антитела к CD73 связываются с эпитопом, например прерывающимся эпитопом в N-концевой части человеческого CD73, что определено, например, с помощью HDX-MS.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 связываются с аминокислотами 65-83 и аминокислотами 157-172 в человеческом CD73 или с эпитопом в пределах аминокислот 65-83 и аминокислот 157-172 изоформы 1 или 2 человеческого CD73, т.е. с аминокислотными последовательностями FTKVQQIRRAEPNVLLLDA (SEQ ID NO: 96) и LYLPYKVLPVGDEVVG (SEQ ID NO: 97), что определено, например, с помощью HDX-MS. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 связываются со всеми или частью аминокислот 65-83 и аминокислот 157-172 в человеческом CD73, что определено, например, с помощью HDX-MS. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 связываются как с гликозилированным, так и негликозилированным человеческим CD73. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 связываются только с гликозилированным CD73, а не с негликозилированным CD73.

Антитела к CD73 могут конкурировать за связывание с CD73 с антителами (или ингибировать связывание антител) к CD73, содержащими CDR или вариабельные участки, описанные в данном документе, например CDR или вариабельные участки из антител CD73.4-1, CD73.4-2, CD73.3, 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 и/или 7A11. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 ингибируют связывание CD73.4-1, CD73.4-2, CD73.3, 11F11, 4C3, 4D4, 10D2, 11A6, 24H2, 5F8, 6E11 и/или 7A11 с человеческим CD73 по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или на 100%. В соответствии с определенными вариантами осуществления CD73.4-1, CD73.4-2, CD73.3, 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 и/или 7A11 ингибируют связывание антител к CD73 с человеческим CD73 по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или на 100%. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 ингибируют связывание CD73.4-1, CD73.4-2, CD73.3, 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 и/или 7A11 с человеческим CD73 по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или на 100%, и CD73.4-1, CD73.4-2, CD73.3, 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 и/или 7A11 ингибируют связывание антител к CD73 с человеческим CD73 по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или на 100% (например, конкурируют в обоих направлениях). Конкурентные эксперименты можно проводить, например, как описано далее в данном документе, например, в разделе примеры.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 ингибируют ферментативную активность CD73 и/или are интернализируются в клетки, не требуя перекрестного сшивания с образованием мультивалентных структур, что определено, например, по отсутствию необходимости связывания с FcR.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 характеризуются 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 из признаков, перечисленных в табл. 3.

Таблица 3

Потенциальные признаки антител к CD73

(1) связывание с человеческим CD73, например с изоформой 1 и 2 мономерного человеческого и димерного человеческого CD73, связанного с гранулами, например с K_D, составляющей 10 нМ или менее (например, от 0,01 до 10 нМ), например, при измерении с помощью анализа SPR методом BIACORE®;

(2) связывание с мембраносвязанным человеческим CD73, например с EC_{50}, составляющей 1 нМ или менее (например, от 0,01 до 1 нМ);

(3) связывание с CD73 яванского макака, например связывание с мембраносвязанным CD73 яван-

ского макака, например с EC_{50}, составляющей 10 нМ или менее (например, от 0,01 до 10 нМ);

(4) ингибирование ферментативной активности человеческого CD73, например с EC50, составляющей 10 нМ или менее;

(5) ингибирование ферментативной активности CD73 макака-крабоеда, например с EC50, составляющей 10 нМ или менее;

(6) ингибирование ферментативной активности эндогенного (клеточного) человеческого CD73 в Calu6 клетках с EC50, составляющей 10 нМ или менее;

(7) ингибирование ферментативной активности человеческого CD73 in vivo;

(8) интернализация, например, опосредуемая антителом (или зависимая от антитела) интернализация CD73 в клетки, например, с $T_{1/2}$, составляющим менее 1 ч, 30 или 10 мин, и/или Ymax, составляющим по меньшей мере 70, 80 или 90%;

(9) связывание с конформационным эпитопом на человеческом CD73, например прерывающимся эпитопом с аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 1), который включает в себя все или часть аминокислотных остатков FTKVQQIRRAEPNVLLLDA (SEQ ID NO: 96) и/или LYLPYKVLPVGDEVVG (SEQ ID NO: 97);

(10) конкуренция в любом из направлений или в обоих направлениях с CD73.4-1, CD73.4-2, CD73.3, 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 и/или 7A11 за связывание с человеческим CD73 и

(11) взаимодействие с человеческим CD73 по схеме, подобной CD73.4, что определено с помощью рентгеновской кристаллографии.

Будет понятно, что активность антитела, которое проявляет одно или несколько из этих функциональных свойств (например, биохимическую, иммунохимическую, клеточную, физиологическую или другие биологические активности или подобное) при определении в соответствии с методиками, известными в уровне техники и описанными в данном документе, связана со статистически значимым различием в конкретной активности, по сравнению с такой активностью, наблюдаемой в отсутствие антитела (например, или при наличии контрольного антитела с несоответствующей специфичностью). В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73, раскрытое в данном документе, снижает измеряемый параметр (например, объем опухоли, метастазирование опухоли, уровни аденозина, уровни cAMP) по меньшей мере на 10% от измеряемого параметра, более предпочтительно по меньшей мере на 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90%, и в соответствии с определенными предпочтительными вариантами осуществления более чем на 92, 94, 95, 97, 98 или 99%. И наоборот, антитело к CD73, раскрытое в данном документе, повышает измеряемый параметр по меньшей мере на 10%, как, например, по меньшей мере на 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 100% (т.е. 2-кратно), 3-, 5- или 10-кратно.

Стандартные анализы для оценки связывающей способности антител в отношении CD73 у различных видов известны в уровне техники, в том числе, например, ELISA, вестерн-блоттинг и RIA. Подходящие анализы подробно описаны в разделе примеры.

Кинетические характеристики связывания (например, аффинность связывания) для антител также можно оценить с помощью стандартных анализов, известных в уровне техники, как, например, с помощью анализа SPR методом BIACORE®. Анализы для оценки эффектов антител в отношении функциональных свойств CD73 (например, продуцирование аденозина, опухолевый рост и метастазирование, ингибирование Т-клеток) более подробно описаны ниже и в разделе примеры.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 не являются нативными антителами или не являются антителами, встречающимися в естественных условиях. Например, антитела к CD73 имеют посттрансляционные модификации, которые отличаются от таких модификаций у антител, встречающихся в естественных условиях, как, например, они имеют больше, меньше посттрансляционных модификаций или посттрансляционные модификации отличного типа.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 стимулируют функцию Teff (эффекторных Т-клеток) и/или ослабляют функцию Treg, например, за счет удаления CD73 с поверхности Т-клеток и/или за счет ингибирования его ферментативной активности.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD3 содержат, по меньшей мере, шарнир IgG2 и необязательно также CH1 домен IgG2 или фрагмент или производное шарнира и/или CH1 домена, и антитело принимает форму A (см., например, Allen et al. (2009) Biochemistry 48:3755). В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD3 содержат, по меньшей мере, шарнир IgG2 и необязательно также CH1 домен IgG2 или фрагмент или производное шарнира и/или CH1 домена, и антитело приняло форму B (см., например, Allen et al. (2009) Biochemistry 48:3755). В соответствии с определенными вариантами осуществления композиция содержит смесь антител к CD73 в форме A и антитела к CD73 в форме B.

В данном документе представлены антитела к человеческому CD73, которые: (i) содержат вариабельный участок, который связывается с участком на человеческом CD73, подобным участку, с которым связывается 11F11, но не связывается с участком, подобным участку, с которым связывается 4C3 (т.е. представляет собой антитело из группы 1); (ii) связываются с мономерным и димерным человеческим CD73 с K_D, составляющей 10 нМ или менее; (iii) ингибируют ферментативную активность (превращение

AMP в аденозин) человеческого CD73, например, на клетках, например Calu6 клетках, с EC_{50}, составляющей менее чем 10 нМ; и (iv) опосредуют зависимую от антитела интернализацию CD73 в клетки, например, с $T_{1/2}$, составляющим 1 ч или менее (или 30 или менее или 10 мин или менее), Ymax, составляющим 50% или более (или 60% или более, 70% или более, 80% или более или 90% или более) в человеческих клетках, например Calu6 клетках H2228 клетках, HCC15 клетках, H2030 клетках, SNUC1 клетках. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела содержат шарнир IgG2 или шарнир IgG2 и CH1 домен IgG2. В данном документе представлены антитела к человеческому CD73, которые: (i) содержат вариабельный участок, который связывается с участком на человеческом CD73, подобным участку, с которым связывается 11F11, но не связывается с участком, подобным участку, с которым связывается 4C3 (т.е. представляет собой антитело из группы 1); (ii) связываются с мономерным и димерным человеческим CD73 с K_D, составляющей 10 нМ или менее при определении с помощью метода SPR (Biacore); (iii) ингибируют ферментативную активность (превращение AMP в аденозин) человеческого CD73, например, на клетках, например Calu6 клетках, с EC_{50}, составляющей менее чем 10 нМ; и (iv) опосредуют зависимую от антитела интернализацию CD73 в клетки, например, с $T_{1/2}$, составляющим 30 мин или менее, Ymax, составляющим 80% или более в человеческих Calu6, H2228, HCC15 или H2030 клетках при определении с использованием анализа интернализации при высоком содержании, описанного в примере 6A.

В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления антитело к CD73, описанное в данном документе, не является значительно токсичным. Например, антитело к CD73 не является значительно токсичным в отношении органа человека, например одного или нескольких из печени, почки, головного мозга, легких и сердца, что определено, например, в клинических испытаниях. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73 не запускает в значительной степени нежелательную иммунную реакцию, например аутоиммунную реакцию или воспаление.

II. Иллюстративные антитела к CD73.

Вариабельные участки антител к CD73.

Конкретные антитела, описанные в данном документе, представляют собой антитела, например моноклональное антитела, имеющие последовательности CDR и/или вариабельного участка антител 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11, 7A11, CD73.3-1, -2 или -3, CD73.4-1 и -2, CD73.4-2, CD73.5-1 и -2, CD73.6-1 и -2, CD73.7-1 и -2, CD73.8-1 и -2, CD73.9-1 и -2, CD73.10-1 и -2 и CD73.11, а также антитела, по меньшей мере на 80% идентичные (например, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95 или по меньшей мере на 99% идентичные) их последовательностям вариабельного участка или CDR. В табл. 4 изложены SEQ ID NO для CDR VH и VL участков у каждого антитела, а также для VH и VL участков. Как описано далее в разделе примеры, определенные тяжелые цепи могут существовать с более чем одной легкой цепью, и SEQ ID NO для альтернативных легких цепей также представлены в таблице ниже.

Таблица 4

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

В данном документе представлены выделенные антитела или их антигенсвязывающая часть, со-

держащие вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, причем вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 16, 32, 40, 52, 60, 68, 80, 88, 135 и 170-177.

Также предполагаются выделенные антитела или их антигенсвязывающие части, содержащие вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, причем вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 12, 20, 24, 28, 36, 44, 48, 56, 64, 72, 76, 84, 92 и 238.

В данном документе предполагаются выделенные антитела или их антигенсвязывающая часть, содержащие:

(a) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 135 и 8 соответственно;

(b) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 135 и 12 соответственно;

(c) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 4 и 8 соответственно;

(d) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 4 и 12 соответственно;

(e) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 16 и 20 соответственно;

(f) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 16 и 24 соответственно;

(g) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 16 и 28 соответственно;

(h) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 32 и 36 соответственно;

(i) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 40 и 44 соответственно;

(j) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 40 и 48 соответственно;

(k) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 52 и 56 соответственно;

(l) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 60 и 64 соответственно;

(m) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 68 и 72 соответственно;

(n) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 68 и 76 соответственно;

(o) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 68 и 238 соответственно;

(p) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 80 и 84 соответственно;

(q) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 88 и 92 соответственно;

(r) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 170 и 20 соответственно;

(s) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 170 и 24 соответственно;

(t) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 170 и 28 соответственно;

(u) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 171 и 8 соответственно;

(v) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 171 и 12 соответственно;

(w) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 172 и 8 соответственно;

(x) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 172 и 12 соответственно;

(y) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 173 и 8 соответственно;

(z) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 173 и 12 соответственно;

(a2) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO:

174 и 8 соответственно;

(b2) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 174 и 12 соответственно;

(c2) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 175 и 8 соответственно;

(d2) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 175 и 12 соответственно;

(e2) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 176 и 8 соответственно;

(f2) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 176 и 12 соответственно; или

(g2) последовательности вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, содержащие SEQ ID NO: 177 и 36 соответственно.

Антитела к CD73 могут содержать CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой и легкой цепей антител к CD73, описанных в данном документе, например CD73.4-1, CD73.4-2, CD73.3, 11F11-1, 11F11-2, 11F11, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 5F8-3, 6E11 и 7A11, или их комбинации.

При условии, что каждое из этих антител связывается с CD73, и что специфичность связывания антигена обеспечивается преимущественно CDR1, 2 и 3 участками, последовательности CDR1, 2 и 3 V_H и последовательности CDR1, 2 и 3 V_L могут быть "смешанными и подобранными" (т.е. CDR из разных антител можно смешивать и подбирать, хотя каждое антитело должно содержать CDR1, 2 и 3 V_H и CDR1, 2 и 3 V_L) для создания других связывающихся с GITR молекул антител, описанных в данном документе. Связывание с CD73 у таких "смешанных и подобранных" антител можно исследовать с использованием анализов связывания, описанных выше и в разделе примеры (например, ELISA). Предпочтительно, если последовательности CDR V_H смешивают и подбирают, последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности V_H заменяют подобной(подобными) в плане структуры последовательностью(последовательностями) CDR. Аналогично, если последовательности CDR V_L смешивают и подбирают, последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности V_L предпочтительно заменяют подобной(подобными) в плане структуры последовательностью(последовательностями) CDR. Специалисту в данной области техники будет очевидно, что новые последовательности V_H и V_L можно создать, заменяя одну или несколько последовательностей CDR участка V_H и/или V_L подобными в плане структуры последовательностями из последовательностей CDR, раскрытых в данном документе для моноклональных антител CD73.4-1, CD73.4-2, 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 и/или 7A11. "Смешанные и подобранные" антитела, характеризующиеся аффинностью связывания, биологической активностью и/или другими свойствами, эквивалентными или превосходящими конкретные антитела, раскрытые в данном документе, можно выбрать для применения в способах согласно настоящему изобретению.

В данном документе предполагаются выделенные антитела или их антигенсвязывающая часть, содержащие:

(a) CDR1 вариабельного участка тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 17, 33, 41, 53, 61, 69, 81 и 89;

(b) CDR2 вариабельного участка тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 18, 34, 42, 54, 62, 70, 82 и 90;

(c) CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 19, 35, 43, 55, 63, 71, 83 и 91;

(d) CDR1 вариабельного участка легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 13, 21, 25, 29, 37, 45, 49, 57, 65, 73, 77, 85 и 93;

(e) CDR2 вариабельного участка легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 14, 22, 26, 30, 38, 46, 50, 58, 66, 74, 78, 86 и 94; и

(f) CDR3 вариабельного участка легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 15, 23, 27, 31, 39, 47, 51, 59, 67, 75, 79, 87 и 95;

причем антитело специфично связывается с человеческим CD73.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело содержит вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, причем CDR1, CDR2 и CDR3 участки вариабельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 5-7; 17-19; 33-35; 41-43; 53-55; 61-63; 69-71; 81-83 или 89-91;

причем антитело специфично связывается с человеческим CD73.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело содержит вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, причем CDR1, CDR2 и CDR3 участки вариабельного участка легкой цепи содержат:

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

причем антитело специфично связывается с человеческим CD73.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело содержит вариабельные уча-

стки тяжелой и легкой цепей, в которых:

(a) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 5-7 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 9-11 соответственно;

(b) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 5-7 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 13-15 соответственно;

(c) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 17-19 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 21-23 соответственно;

(d) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 17-19 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 25-27 соответственно;

(e) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 17-19 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 29-31 соответственно;

(f) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 33-35 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 37-39 соответственно;

(g) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 41-43 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 45-47 соответственно;

(h) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 41-43 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 49-51 соответственно;

(i) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 53-55 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 57-59 соответственно;

(j) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 61-63 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 65-67 соответственно;

(k) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 69-71 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 73-75 соответственно;

(l) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 69-71 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 77-79 соответственно;

(m) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 81-83 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 85-87 соответственно; или

(n) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи содержат SEQ ID NO: 89-91 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи содержат SEQ ID NO: 93-95 соответственно;

причем антитело специфично связывается с человеческим CD73 и необязательно обладает одной или несколькими из характеристик, перечисленных в табл. 3, например способностью к ингибированию дефосфорилирования AMP и опосредованию зависимо от рецептора интернализации CD73.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело содержит вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, в которых:

(a) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи состоят из SEQ ID NO: 5-7 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи состоят из SEQ ID NO: 9-11 соответственно;

(b) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи состоят из SEQ ID NO: 5-7 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи состоят из SEQ ID NO: 13-15 соответственно;

(c) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи состоят из SEQ ID NO: 17-19 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи состоят из SEQ ID NO: 21-23 соответственно;

(d) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи состоят из SEQ ID NO: 17-19 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи состоят из SEQ ID NO: 25-27 соответственно;

(e) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи состоят из SEQ ID NO: 17-19 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи состоят из SEQ ID NO: 29-31 со-

ответственно;

(f) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи состоят из SEQ ID NO: 33-35 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи состоят из SEQ ID NO: 37-39 соответственно;

(g) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи состоят из SEQ ID NO: 41-43 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи состоят из SEQ ID NO: 45-47 соответственно;

(h) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи состоят из SEQ ID NO: 41-43 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи состоят из SEQ ID NO: 49-51 соответственно;

(i) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи состоят из SEQ ID NO: 53-55 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи состоят из SEQ ID NO: 57-59 соответственно;

(j) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи состоят из SEQ ID NO: 61-63 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи состоят из SEQ ID NO: 65-67 соответственно;

(k) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи состоят из SEQ ID NO: 69-71 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи состоят из SEQ ID NO: 73-75 соответственно;

(l) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи состоят из SEQ ID NO: 69-71 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи состоят из SEQ ID NO: 77-79 соответственно;

(m) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи состоят из SEQ ID NO: 81-83 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи состоят из SEQ ID NO: 85-87 соответственно; или

(n) CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи состоят из SEQ ID NO: 89-91 соответственно, а CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного участка легкой цепи состоят из SEQ ID NO: 93-95 соответственно;

причем антитело специфично связывается с человеческим CD73 и необязательно обладает одной или несколькими из характеристик, перечисленных в табл. 3, например способностью к ингибированию дефосфорилирования AMP и опосредованию зависимо от рецептора интернализации CD73.

Константные домены тяжелой цепи у антител к CD73.

Константный участок тяжелой цепи у антител к CD73, описанных в данном документе, может относиться к любому изотипу, например IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, или их комбинациям и/или их модификациям. Антитело к CD73 может обладать эффекторной функцией, или может обладать ослабленной эффекторной функцией, или не обладать ею. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73, описанные в данном документе, содержат модифицированный константный участок тяжелой цепи, который предоставляет антителу улучшенные свойства. Как показано в разделе примеры, антитела к CD73, имеющие шарнир IgG2 и необязательно CH1 домен IgG2, такие как имеющие вариабельные участки антитела 11F11, интернализируются лучше и быстрее по сравнению с антителами, имеющими такой же вариабельный участок, но с шарниром или CH1, не относящимися к IgG2, например, по сравнению с антителами, имеющими шарнир IgG1 или шарнир IgG1 и CH1 IgG1. Например, антитело, содержащее вариабельные участки антитела 11F11 и содержащее шарнир IgG2 и необязательно CH1 домен IgG2 и CH2 домен IgG1 и CH3 домен IgG1, а также либо обладающее эффекторной функцией, либо не обладающее ею, более эффективно интернализируется в клетки после связывания с CD73 на клеточной мембране по сравнению с таким же антителом, но с шарниром IgG1 или шарниром IgG1 и CH1 доменом IgG1. Как показано далее в данном документе, антитело к CD73, имеющее шарнир IgG2, а остальную часть от антитела изотипа IgG1, интернализируется более эффективно, чем такое же антитело, в котором шарнир относится к изотипу IgG1. Антитело, имеющее, помимо шарнира IgG2, CH1 домен IgG2, интернализируется еще более эффективно, чем такое же антитело, в котором CH1 домен представляет собой CH1 домен IgG1. Как показано ниже в данном документе, антитела к CD73 с шарниром IgG2 и необязательно с CH1 IgG2 также могут образовывать большие комплексы антитело/антиген, чем антитела, имеющие шарнир IgG1 или шарнир IgG1 и CH1 IgG1. Повышенная интернализация, как оказывается, коррелирует с увеличенным размером комплекса антитело/антиген. Как дополнительно описано в разделе примеры, считается, что повышенная интернализация связана с более высокой или более низкой аффинностью антитела. Соответственно в данном документе представлены антитела к CD73, имеющие модифицированный константный участок тяжелой цепи, который опосредует опосредованную антителом интернализацию CD73, и при этом антитело с модифицированным константным участком тяжелой цепи связывается с CD73 с аффинностью, подобной аффинности у такого же антитела, но с отличающимся константным участком тяжелой цепи.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73 содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, который содержит шарнир изотипа IgG2 ("шарнир

IgG2") и CH1, CH2 и CH3 домен. В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит шарнир IgG2 и CH1, CH2 и CH3 домен, причем по меньшей мере один CH1, CH2 и CH3 доменов не относится к изотипу IgG2. В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит шарнир изотипа IgG2, CH1 изотипа IgG2, причем по меньшей мере один из доменов CH2 и CH3 не относится к изотипу IgG2. Шарнир IgG2 может представлять собой шарнир IgG2 дикого типа, например шарнир человеческого IgG2 дикого типа (например, имеющий SEQ ID NO: 136) или его вариант, при условии, что шарнир IgG2 сохраняет способность к приданию антителу усиленной активности (например, повышенной интернализации клеткой; повышенного ингибирования ферментативной активности; повышенной антагонистической или блокирующей активности; способности к образованию больших перекрестно-сшитых комплексов антитело/антиген; повышенной способности к стимуляции или усилению иммунной реакции и/или повышенного антипролиферативного или противоопухолевого эффекта) по сравнению с активностью у такого же антитела, которое содержит шарнир, не относящийся к IgG2, и необязательно CH1 домен, не относящийся к IgG2. В соответствии с определенными вариантами осуществления вариант шарнира IgG2 сохраняет жесткость или негибкость, подобные таковым у шарнира IgG2 дикого типа. Жесткость шарнира или антитела можно определить, например, с помощью компьютерного моделирования, электронной микроскопии, спектроскопии, такой как ядерный магнитный резонанс (NMR), рентгеноструктурной кристаллографии (B-факторы) или по скорости седиментации при аналитическом ультрацентрифугировании (AUC) для измерения или сравнения радиуса инерции у антител, содержащих шарнир. Шарнир или антитело может характеризоваться подобной или более высокой жесткостью в сравнении с другим шарниром, если содержащее шарнир антитело характеризуется значением, полученным в одном из анализов, описанных в предыдущем предложении, которое отличается от значения для такого же антитела с отличающимся шарниром, например шарниром IgG1, менее чем на 5, 10, 25, 50, 75 или 100%. Специалист в данной области техники будет способен определить на основании анализов, характеризуются ли шарнир или антитело жесткостью, по меньшей мере, подобной жесткости другого шарнира или антитела соответственно, интерпретируя результаты этих анализов. Иллюстративный вариант шарнира человеческого IgG2 представляет собой шарнир IgG2, который содержит замену одного или нескольких из четырех цистеиновых остатков (т.е. C219, C220, C226 и C229) на другую аминокислоту. Цистеин может быть заменен серином. Иллюстративный шарнир IgG2 представляет собой шарнир человеческого IgG2, содержащий мутацию C219X или мутацию C220X, где X представляет собой любую аминокислоту, за исключением серина. В соответствии с определенными вариантами осуществления шарнир IgG2 не содержит обе из замен C219X и C220X. В соответствии с определенными вариантами осуществления шарнир IgG2 содержит C219S или C220S, но не обе из C219S и C220S. Другие варианты шарнира IgG2, которые можно применять, включают в себя шарниры человеческого IgG2, содержащие замену C220, C226 и/или C229, например мутацию C220S, C226S или C229S (которую можно комбинировать с мутацией C219S). Шарнир IgG2 также может представлять собой шарнир IgG2, в котором часть шарнира относится к другому изотипу (т.е. он представляет собой химерный или гибридный шарнир) при условии, что жесткость химерного шарнира является, по меньшей мере, подобной жесткости шарнира IgG2 дикого типа. Например, шарнир IgG2 может представлять собой шарнир IgG2, в котором нижний шарнир (который определен в табл. 2) относится к изотипу IgG1 и представляет собой, например, нижний шарнир IgG1 дикого типа.

"Гибридный" или "химерный" шарнир считается относящимся к конкретному изотипу, если более половины последовательных аминокислот в шарнире происходят из этого изотипа. Например, шарнир, имеющий верхний и средний шарнир из IgG2 и нижний шарнир из IgG1 считают гибридным шарниром IgG2.

В соответствии с определенными вариантами осуществления CD73 антитело содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, который содержит шарнир IgG2, содержащий один из следующих шарниров:

ERKCCVECPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 348);

ERKSCVECPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 349);

ERKCSVECPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 350);

ERKXCVECPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 351);

ERKCXVECPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 352);

ERKCCVECPPCPAPPVAGX (SEQ ID NO: 353);

ERKSCVECPPCPAPPVAGX (SEQ ID NO: 354);

ERKCSVECPPCPAPPVAGX (SEQ ID NO: 355);

ERKXCVECPPCPAPPVAGX (SEQ ID NO: 356);

ERKCXVECPPCPAPPVAGX (SEQ ID NO: 357);

ERKCCVECPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 358);

ERKSCVECPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 359);

ERKCCSVECPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 360);

ERKXCVECPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 361);

ERKCXVECPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 362);

ERKCCVECPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 363);

ERKSCVECPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 364);

ERKCCSVECPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 365);

ERKXCVECPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 366);

ERKCXVECPPCPAPELLG (SEQ ID NO: 367);

ERKCCVECPPCPAP (SEQ ID NO: 368);

ERKSCVECPPCPAP (SEQ ID NO: 369);

ERKCSVECPPCPAP (SEQ ID NO: 370);

ERKXCVECPPCPAP (SEQ ID NO: 371) или

ERKCXVECPPCPAP (SEQ ID NO: 372),

где X представляет собой любую аминокислоту, за исключением цистеина, или любую из вышеуказанных последовательностей, в которых 1-5, 1-3, 1-2 или 1 аминокислота вставлена между аминокислотными остатками CVE и CPP. В соответствии с определенными вариантами осуществления вставлены THT или GGG.

В соответствии с определенными вариантами осуществления шарнир содержит SEQ ID NO: 348, 349, 350, 351 или 352, в которых 1, 2, 3 или все 4 аминокислоты P233, V234, A235 и G237 (соответствующие 4 C-концевым аминокислотам "PVAG" (SEQ ID NO: 373) удалены или заменены на другую аминокислоту, например аминокислоты на C-конце шарнира IgG1 (ELLG (SEQ ID NO: 374) или ELLGG (SEQ ID NO: 375). В соответствии с определенными вариантами осуществления шарнир содержит SEQ ID NO: 348, 349, 350, 351 или 352, в которых V234, A235 и G237 удалены или заменены на другую аминокислоту. В соответствии с определенными вариантами осуществления шарнир содержит SEQ ID NO: 348, 349, 350, 351 или 352, в которых A235 и G237 удалены или заменены на другую аминокислоту. В соответствии с определенными вариантами осуществления шарнир содержит SEQ ID NO: 348, 349, 350, 351 или 352, в которых G237 удалены или заменены на другую аминокислоту. В соответствии с определенными вариантами осуществления шарнир содержит SEQ ID NO: 348, 349, 350, 351 или 352, в которых V234 и A235 удалены или заменены на другую аминокислоту. Замена PVAG (SEQ ID NO: 373) в IgG2 на соответствующие аминокислоты шарнира IgG1, т.е. (ELLG (SEQ ID NO: 374) или ELLGG (SEQ ID NO: 375)) с получением гибридного шарнира, например, показанного выше, дает шарнир, обладающий преимуществами шарнира IgG2 и эффекторной функцией шарниров IgG1.

В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит шарнир, который состоит из или состоит, по существу, из одной из последовательностей, приведенных выше, например любой из SEQ ID NO: 348-372, и, например, не содержит дополнительные аминокислотные остатки в шарнире.

В соответствии с определенными вариантами осуществления 1 или 1-2 или 1-3 аминокислоты вставлены между шарниром и CH2 доменом, например, может быть добавлен дополнительный глицин.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73 содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, содержащий константный участок IgG1 или IgG2, в котором шарнир содержит делецию 1-10 аминокислот. Как показано в разделе примеры, антитело IgG1, у

которого отсутствуют аминокислотные остатки SCDKTHT (S219, C220, D221, K222, T223, H224 и T225; SEQ ID NO: 376), обеспечивало опосредованную антителом интернализацию CD73 более эффективно, чем такое же антитело, имеющее константный участок IgG1 дикого типа. Аналогично, в случае антитела IgG2 антитело IgG2, у которого отсутствуют аминокислотные остатки CCVE (C219, C220, V222 и E224; SEQ ID NO: 377), обеспечивало опосредованную антителом интернализацию CD73 более эффективно, чем такое же антитело, имеющее константный участок IgG1 дикого типа. Соответственно в данном документе представлен модифицированный константный участок тяжелой цепи, в котором шарнир содержит делецию 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислотных остатков, выбранных из остатков S219, C220, D221, K222, T223, H224 и T225 для антитела IgG1 и остатков C219, C220, V222 и E224 для антитела IgG2.

В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит CH1 домен, который представляет собой CH1 домен дикого типа из изотипа IgG1 или IgG2 ("CH1 домен IgG1" или "CH1 домен IgG2" соответственно). Также можно применять CH1 домены из изотипов IgG3 и IgG4 ("CH1 домен IgG3" и "CH1 домен IgG2" соответственно). CH1 домен также может представлять собой вариант CH1 домена дикого типа, например вариант CH1 домена IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа. Иллюстративные варианты CH1 доменов включают в себя A114C, T173C и/или C131, например C131S.

CH1 домен, например CH1 домен IgG2, может содержать замену C131S, причем данная замена придает антителу IgG2 или антителу, имеющему CH1 и шарнир IgG2, B-форму (или конформацию).

В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит CH1 домен, который относится к изотипу IgG2. В соответствии с определенными вариантами осуществления CH1 домен представляет собой CH1 домен IgG2 дикого типа, например, имеющий аминокислотную последовательность

ASTKGPSVFPLAP**C**S**R**STS**ES**TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

GLYSLSSVVTVPSS*NF*GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV (SEQ ID NO: 378).

В соответствии с определенными вариантами осуществления CH1 домен представляет собой вариант SEQ ID NO: 378 и содержит 1-10, 1-5, 1-2 или 1 аминокислотную замену или делецию по сравнению с SEQ ID NO: 378. Как дополнительно описано в разделе "Примеры", в данном документе было показано, что CH1 домен IgG2 или его варианты придают антителам к CD73 свойства улучшенной или измененной интернализации по сравнению с антителами IgG1 и еще более улучшенную или измененную интернализацию, когда антитела также содержат шарнир IgG2. В соответствии с определенными вариантами осуществления варианты CH1 IgG2 не содержат аминокислотную замену или делецию по одному или нескольким из следующих аминокислотных остатков: C131, R133, E137 и S138, причем данные аминокислотные остатки выделены жирным шрифтом и подчеркиванием в SEQ ID NO: 378, приведенной выше. Например, модифицированный константный участок тяжелой цепи может содержать CH1 домен IgG2, в котором ни одна из R133, E137 и S138 не заменена на другую аминокислоту или удалена или в котором ни одна из C131, R133, E137 и S138 не заменена на другую аминокислоту или удалена. В соответствии с определенными вариантами осуществления C131 заменена на другую аминокислоту, например C131S, причем данная замена запускает принятие антителом конформации B. Антитела как в конформации A, так и в конформации B, имеющие модифицированные константные участки тяжелой цепи, как было показано в данном документе, характеризуются повышенными активностями по сравнению с таким же антителом с константным участком IgG1.

В соответствии с определенными вариантами осуществления N192 и/или F193 (показаны в виде выделенных курсивом и подчеркиванием остатков в SEQ ID NO: 378, приведенной выше) заменены на другие аминокислоты, например, соответствующие аминокислоты в IgG1, т.е. N192S и/или F193L.

В соответствии с определенными вариантами осуществления один или несколько аминокислотных остатков в CH1 домене IgG2 заменены на соответствующие аминокислотные остатки в IgG4. Например, N192 может представлять собой N192S; F193 может представлять собой F193L; C131 может представлять собой C131K и/или T214 может представлять собой T214R.

Антитело может содержать модифицированный константный участок тяжелой цепи, содержащий CH1 домен IgG2 или его вариант и шарнир IgG2 или его вариант. Шарнир и CH1 домен могут представлять собой комбинацию любого шарнира IgG2 и CH1 домена IgG2, описанных в данном документе. В соответствии с определенными вариантами осуществления CH1 и шарнир IgG2 содержат следующую аминокислотную последовательность:

ASTKGPSVFPLAP**C**S**R**STS**ES**TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

GLYSLSSVVTVPSS*NF*GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 379)

или аминокислотную последовательность, которая отличается от нее не более чем 1-10 аминокислотами. Варианты аминокислот являются такими, как описано для шарнира и CH1 доменов выше.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела содержат, по меньшей мере, шарнир IgG2 и необязательно также CH1 домен IgG2 или фрагмент или производное шарнира и/или CH1 домена, и антитело приняло форму (конформации) A (см., например, Allen et al. (2009) Biochemistry

48:3755). В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 содержат, по меньшей мере, шарнир IgG2 и необязательно также CH1 домен IgG2 или фрагмент или производное шарнира и/или CH1 домена, и антитело приняло форму B (см., например, Allen et al. (2009) Biochemistry 48:3755).

В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит CH2 домен, который представляет собой CH2 домен дикого типа из изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 ("CH2 домен IgG1", "CH2 домен IgG2", "CH2 домен IgG3" или "CH2 домен IgG4" соответственно). CH2 домен также может представлять собой вариант CH2 домена дикого типа, например вариант CH2 домена IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа. Иллюстративные варианты CH2 доменов включают варианты, которые модулируют биологическую активность Fc-участка антитела, такую как ADCC или CDC, или модулируют период полувыведения антитела или его стабильность. В соответствии с одним вариантом осуществления CH2 домен представляет собой CH2 домен человеческого IgG1 с мутацией A330S и P331S, причем CH2 домен обладает пониженной эффекторной функцией в сравнении с таким же CH2 доменом без мутаций. CH2 домен может обладать усиленной эффекторной функцией. CH2 домены могут содержать одну или несколько из следующих мутаций: SE (S267E), SELF (S267E/L328F), SDIE (S239D/I332E), SEFF и GASDALIE (G236A/S239D/A330L/I332E), и/или одну или несколько мутаций по следующим аминокислотам: E233, G237, P238, H268, P271, L328 и A330. Другие мутации дополнительно изложены в других местах в данном документе.

В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит CH3 домен, который представляет собой CH3 домен дикого типа из изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 ("CH3 домен IgG1", "CH3 домен IgG2", "CH3 домен IgG3" или "CH3 домен IgG4" соответственно). CH3 домен также может представлять собой вариант CH3 домена дикого типа, например вариант CH3 домена IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 дикого типа. Иллюстративные варианты CH3 доменов включают варианты, которые модулируют биологическую активность Fc-участка антитела, такую как ADCC или CDC, или модулируют период полувыведения антитела или его стабильность.

В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит шарнир изотипа IgG2 и CH1 участок изотипа IgG2. Шарнир и CH1 IgG2 могут представлять собой шарнир и CH1 IgG2 дикого типа или их варианты при условии, что они обладают желаемой биологической активностью. В соответствии с определенными вариантами осуществления модифицированный константный участок тяжелой цепи содержит шарнир IgG2, содержащий мутацию C219S, и CH1 IgG2, которые могут относиться к дикому типу или содержать не более 1-10, 1-5, 1-3, 1-2 или 1 аминокислотную замену, делецию или добавление. Модифицированный константный участок тяжелой цепи может дополнительно содержать CH2 и CH3 домены дикого типа или мутированные CH2 и CH3 домены. Например, антитело к CD73 может содержать константный домен тяжелой цепи, содержащий CH1 домен IgG2, шарнир IgG2, который может содержать C219S, и CH2 и CH3 домены IgG1, причем у CH2 и CH3 домена может отсутствовать эффекторная функция, как, например, содержащие мутации A330S и P331S.

В целом, варианты CH1, шарнира, CH2 или CH3 доменов могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более мутаций, и/или не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 мутацию, или 1-10 или 1-5 мутаций, или могут содержать аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности дикого типа соответствующего домена (CH1, шарнира, CH2, или CH3 домена соответственно) при условии, что константный участок тяжелой цепи, содержащий конкретный вариант, сохраняет необходимую биологическую активность.

В табл. 5 изложены иллюстративные константные участки тяжелой цепи человека, содержащие человеческие CH1, шарнир, CH2 и/или CH3 домены, причем каждый домен представляет собой либо домен дикого типа, либо его вариант, который предоставляет желаемую биологическую активность константному участку тяжелой цепи. Незаполненная ячейка в табл. 5 указывает на то, что домен присутствует или не присутствует, и если он присутствует, то может относиться к любому изотипу, например IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Например, антитело, содержащее константный участок тяжелой цепи, представленный в табл. 5 под номером 1, представляет собой антитело, которое содержит константный участок тяжелой цепи, содержащий, по меньшей мере, шарнир IgG2, и которое также может содержать CH1, CH2 и/или CH3 домен, и если он присутствует, данный CH1, CH2 и/или CH3 домен относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В качестве еще одного примера для понимания табл. 5, антитело, содержащее константный участок тяжелой цепи, представленный под номером 8, представляет собой антитело, которое содержит константный участок тяжелой цепи, содержащий CH1 домен IgG1, шарнир IgG2 и CH2 домен IgG1, и которое также может содержать или не содержать CH3 домен, который, если он присутствует, может относиться к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Таблица 5

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

* Модифицированный константный участок тяжелой цепи.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, содержащее константный участок тяжелой цепи, приведенный в табл. 5, характеризуется повышенной биологической активностью по сравнению с таким же антителом, содержащим константный участок тяжелой цепи, который не содержит такой конкретный константный участок тяжелой цепи, или по сравнению с таким же антителом, которое содержит константный участок IgG1.

В соответствии с определенными вариантами осуществления способ улучшения биологической активности антитела к CD73, которое содержит шарнир, не относящийся к IgG2, и/или CH1 домен, не относящийся к IgG2, предусматривает обеспечение антитела к CD73, которое содержит шарнир, не относящийся к IgG2, и/или CH1 домен, не относящийся к IgG2, и замену шарнира, не относящегося к IgG2, и CH1 домена, не относящегося к IgG2, на шарнир IgG2 и CH1 домен IgG2 соответственно. Способ улучшения биологической активности антитела к CD73, которое не содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, может предусматривать обеспечение антитела к CD73, которое не содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, и замену его константного участка тяжелой цепи на модифицированный константный участок тяжелой цепи.

Иллюстративные модифицированные константные участки тяжелой цепи, которые могут быть связаны с вариабельными участками антитела к CD73, например, описанными в данном документе, приведены в табл. 6, в которой изложена идентификационная информация для каждого из доменов.

Таблица 6

Модифицированный константный участок тяжелой цепи	CH1	Шарнир	CH2	CH3	SEQ ID NO целого MHCCR
IgG1-IgG2-IgG1f	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:98	IgG2/IgG1 SEQ ID NO:178	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:137	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:180
IgG1-IgG2-IgG1f2	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:98	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:136	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:137	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:162
IgG1-IgG2CS-IgG1f	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:98	IgG2C219S/IgG1 SEQ ID NO:179	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:137	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:181
IgG1-IgG2CS-IgG1f2	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:98	IgG2 C219S SEQ ID NO:123	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:137	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:163
IgG2-IgG1f	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:124	IgG2/IgG1 SEQ ID NO:178	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:137	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:182
IgG2-IgG1f2	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:124	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:136	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:137	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:164
IgG2CS-IgG1f	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:124	IgG2C219S/IgG1 SEQ ID NO:179	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:137	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:183
IgG2CS-IgG1f2	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:124	IgG2 C219S SEQ ID NO:123	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:137	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:165
IgG1-IgG2-IgG1.1f	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:98	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:136	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:125	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:166
IgG1-IgG2CS-IgG1.1f	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:98	IgG2 C219S SEQ ID NO:123	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:125	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:167
IgG2-IgG1.1f	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:124	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:136	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:125	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:168
IgG2CS-IgG1.1f	IgG2 дикого типа SEQ ID NO:124	IgG2 C219S SEQ ID NO:123	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:125	IgG1 дикого типа SEQ ID NO:138	SEQ ID NO: 169

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, который содержит шарнир IgG2, содержащий SEQ ID NO: 123, 136, 178, 179 или 348-372, или его вариант, такой как шарнир IgG2, содержащий аминокислотную последовательность, которая: (i) отличается от SEQ ID NO: 123, 136, 178, 179 или 348-372 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO: 123, 136, 178, 179 или 348-372 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной заменой, добавлением или делецией; (iii) отличается от SEQ ID NO: 123, 136, 178, 179 или 348-372 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере приблизительно на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 123, 136, 178, 179 или 348-372, причем при любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и при этом модифицированный константный участок тяжелой цепи характеризуется повышенной биологической активностью по сравнению с активностью другого константного участка тяжелой цепи, например константного участка тяжелой цепи, который содержит шарнир, не относящийся к IgG2, или по сравнению с таким же модифицированным константным участком тяжелой цепи, который содержит шарнир, не относящийся к IgG2. Например, шарнир может относиться к дикому типу или содержать замены C219S, C220S или C219S и C220S.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело содержит модифицирован-

ный константный участок тяжелой цепи, который содержит CH1 домен IgG1, содержащий SEQ ID NO: 98, или CH1 домен IgG2, содержащий SEQ ID NO: 124 или вариант SEQ ID NO: 98 или 124, причем данный вариант: (i) отличается от SEQ ID NO: 98 или 124 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO: 98 или 124 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной заменой, добавлением или делецией; (iii) отличается от SEQ ID NO: 98 или 124 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере приблизительно на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 98 или 124, причем при любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и при этом модифицированный константный участок тяжелой цепи характеризуется повышенной биологической активностью по сравнению с активностью другого константного участка тяжелой цепи, например константного участка тяжелой цепи, который содержит шарнир, не относящийся к IgG2, или шарнир и CH1 домен, не относящиеся к IgG2, и по сравнению с таким же модифицированным константным участком тяжелой цепи, который содержит шарнир, не относящийся к IgG2, или шарнир и CH1 домен, не относящиеся к IgG2. CH1 домен IgG2 может содержать C131S или другие мутации, которые вызывают принятие антителом, содержащим шарнир и CH1 IgG2, либо A-, либо B-форму.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, который содержит CH2 домен IgG1, содержащий SEQ ID NO: 137 или 125 или вариант SEQ ID NO: 137 или 125, причем данный вариант: (i) отличается от SEQ ID NO: 137 или 125 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO: 137 или 125 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной заменой, добавлением или делецией; (iii) отличается от SEQ ID NO: 137 или 125 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере приблизительно на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 137 или 125, причем при любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и при этом модифицированный константный участок тяжелой цепи характеризуется повышенной биологической активностью по сравнению с активностью другого константного участка тяжелой цепи, например константного участка тяжелой цепи, который содержит шарнир, не относящийся к IgG2, или по сравнению с таким же модифицированным константным участком тяжелой цепи, который содержит шарнир, не относящийся к IgG2.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, который содержит CH3 домен IgG1, содержащий SEQ ID NO: 138 или вариант SEQ ID NO: 138, причем данный вариант: (i) отличается от SEQ ID NO: 138 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO: 138 не более чем 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной заменой, добавлением или делецией; (iii) отличается от SEQ ID NO: 138 1-5, 1-3, 1-2, 2-5 или 3-5 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере приблизительно на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 138, причем при любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и при этом модифицированный константный участок тяжелой цепи характеризуется повышенной биологической активностью по сравнению с активностью другого константного участка тяжелой цепи, например константного участка тяжелой цепи, который содержит шарнир, не относящийся к IgG2, или по сравнению с таким же модифицированным константным участком тяжелой цепи, который содержит шарнир, не относящийся к IgG2.

Модифицированные константные участки тяжелой цепи также могут содержать комбинацию CH1, шарнира, CH2 и CH3 доменов, описанных выше.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73 содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, содержащий любую из SEQ ID NO: 162-169, 180-183, 267-282 и 300-347 или вариант любой из SEQ ID NO: 162-169, 180-183, 267-282 и 300-347, причем данный вариант: (i) отличается от SEQ ID NO: 162-169, 180-183, 267-282 и 300-347 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO: 162-169, 180-183, 267-282 и 300-347 не более чем 10, 9, 8, 7, 6,5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной заменой, добавлением или делецией; (iii) отличается от SEQ ID NO: 162-169, 180-183, 267-282 и 300-347 1-5, 1-3, 1-2, 2-5, 3-5, 1-10 или 5-10 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере приблизительно на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной любой из SEQ ID NO: 162-169, 180-183, 267-282 и 300-347, причем при любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену; и при этом модифицированный константный участок тяжелой цепи характеризуется повышенной биологической активностью по сравнению с активностью другого константного участка тяжелой цепи, например константного участка тяжелой цепи, который содержит шарнир, не относящийся к IgG2, или CH1 домен, не относящийся к IgG2, и по сравне-

нию с таким же модифицированным константным участком тяжелой цепи, который содержит шарнир, не относящийся к IgG2, и/или CH1 домен, не относящийся к IgG2.

Модифицированные константные участки тяжелой цепи могут обладать: (i) подобной, ослабленной или усиленной эффекторной функцией (например, связыванием с FcγR, например FcγRIIR) по сравнению с константным участком тяжелой цепи дикого типа и/или (ii) подобным, пониженным или повышенным периодом полувыведения (или связыванием с FcRn-рецептором) по сравнению с константным участком тяжелой цепи дикого типа.

VH домен антитела к CD73, описанного в данном документе, может быть связан с константным участком тяжелой цепи, описанным в данном документе. Например, на фиг. 18 показана аминокислотная последовательность антитела CD73.4, связанного с константным участком тяжелой цепи IgG2CS-IgG1.1f (SEQ ID NO: 133 или 169). В данном документе также охватываются антитела, которые содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f (SEQ ID NO: 133 или 189) не более чем 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 или 1 аминокислотой (за счет замены, добавления или делеции), и/или которые являются по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичными аминокислотной последовательности тяжелой цепи CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f (SEQ ID NO: 133 или 189). Например, в данном документе охватываются антитела, содержащие тяжелую цепь CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f (SEQ ID NO: 133 или 189), и в которых C-концевые K, или GK, или PGK удалены или присутствуют. Другие варианты CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f (SEQ ID NO: 133 или 189) включают в себя варианты, имеющие тяжелую цепь, которая относится к отличающемуся аллотипу, и в которых, например, аминокислоты 356 и 358 представляют собой D и L соответственно. Варианты включают в себя варианты, имеющие дополнительный цистеин, введенный с помощью мутации в шарнир IgG2, например C220 (или имеет C220S вместо C219S), и варианты, которые не имеют мутаций A330S и/или P331S. Варианты CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f (SEQ ID NO: 133 или 189) предпочтительно характеризуются, по меньшей мере, подобными биохимическими свойствами и/или биологическими активностями, например эффективностью интернализации, ингибированием ферментативной активности CD73, аффинностью в отношении человеческого CD73 и связыванием с тем же или подобным эпитопом, по сравнению с CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f (SEQ ID NO: 133 или 189).

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 или их антигенсвязывающие части содержат любые из константных участков, описанных в данном документе, например константные участки, содержащие аминокислотные последовательности, изложенные в SEQ ID NO: 126, 127, 129, 130, 162-169, 180-183, 267-282 и 300-347.

Легкая цепь антитела к CD73 может содержать константный участок легкой цепи, содержащий SEQ ID NO: 131 или вариант SEQ ID NO: 131, причем данный вариант: (i) отличается от SEQ ID NO: 131 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более аминокислотными заменами, добавлениями или делециями; (ii) отличается от SEQ ID NO: 131 не более чем 10, 9, 8, 7, 6,5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотной заменой, добавлением или делецией; (iii) отличается от SEQ ID NO: 131 1-5, 1-3, 1-2, 2-5, 3-5, 1-10 или 5-10 аминокислотными заменами, добавлениями или делециями и/или (iv) содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере приблизительно на 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 131, причем при любом из (i)-(iv) аминокислотная замена может представлять собой консервативную аминокислотную замену или неконсервативную аминокислотную замену. Иллюстративная мутация CL включает в себя C124S.

Тяжелые и легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99, 98, 97, 96, 95, 90, 85, 80, 75 или 70% идентична любой из тяжелых или легких цепей, изложенных в табл. 35, которые подробно описаны в данном документе (или их вариабельные участки), могут быть применены для образования антител к человеческому CD73, обладающих желаемыми характеристиками, например характеристиками, описанными далее в данном документе. Иллюстративные варианты представляют собой варианты, содержащие аллотипическую вариацию, например, в константном домене. Тяжелые и легкие цепи, содержащие аминокислотную последовательность, которая отличается не более чем 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 или 1 аминокислотой (за счет замены, добавления или делеции) от любой из тяжелых или легких цепей, изложенных в табл. 35, как описано в данном документе, (или их вариабельных участков), могут быть применены для образования антител к человеческому CD73, обладающих желаемыми характеристиками, например таких антител, описанных далее в данном документе.

В соответствии с различными вариантами осуществления антитела, описанные выше, проявляют одно или несколько, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, десять или все из функциональных свойств, приведенных в табл. 3.

Такие антитела включают в себя, например, человеческие антитела, гуманизированные антитела или химерные антитела.

В соответствии с одним вариантом осуществления описанные в данном документе антитела к CD73 связываются как с гликозилированным (например, N-связанное или O-связанное гликозилирование), так и с негликозилированным человеческим CD73. Определенные антитела к CD73 могут связываться с гли-

козилированным, но не с негликозилированным CD73, или с негликозилированным, но не с гликозилированным CD73.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитела к CD73, описанные в данном документе, связываются с конформационным эпитопом.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитела к CD73, описанные в данном документе, связываются с аминокислотными остатками в пределах следующего участка в человеческом CD73:

FTKVQQIRRAEPNVLLLDA (SEQ ID NO: 96),

соответствующего аминокислотным остаткам 65-83 в человеческом CD73 (SEQ ID NO: 1 или 2), что определено, например, с помощью HDX-MS.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитела к CD73, описанные в данном документе, связываются со всеми или частью из следующих аминокислотных остатков в человеческом CD73: FTKVQQIRRAEPNVLLLDA (SEQ ID NO: 96), которые соответствуют аминокислотным остаткам 65-83 в человеческом CD73 (SEQ ID NO: 1 или 2), что определено, например, с помощью HDX-MS.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к CD73, описанное в данном документе, связывается с аминокислотными остатками в пределах следующего участка в человеческом CD73:

LYLPYKVLPVGDEVVG (SEQ ID NO: 97),

соответствующего аминокислотным остаткам 157-172 в человеческом CD73 (SEQ ID NO: 1 или 2), что определено, например, с помощью HDX-MS.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к CD73, описанное в данном документе, связывается со всеми или частью из следующих аминокислотных остатков в пределах человеческого CD73: LYLPYKVLPVGDEVVG (SEQ ID NO: 97), которые соответствуют аминокислотным остаткам 157-172 в человеческом CD73 (SEQ ID NO: 1 или 2), что определено, например, с помощью HDX-MS.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к CD73, описанное в данном документе, связывается с перемежающимися аминокислотными остатками в пределах следующих участков в человеческом CD73 (SEQ ID NO: 1 или 2):

FTKVQQIRRAEPNVLLLDA (SEQ ID NO: 96) и LYLPYKVLPVGDEVVG (SEQ ID NO: 97).

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к CD73, описанное в данном документе, связывается со всеми или частью перемежающихся аминокислотных остатков в пределах следующих участков в человеческом CD73 (SEQ ID NO: 1 или 2):

FTKVQQIRRAEPNVLLLDA (SEQ ID NO: 96) и LYLPYKVLPVGDEVVG (SEQ ID NO: 97),

которые соответствуют аминокислотным остаткам 65-83 и 157-172 в человеческом CD73 (SEQ ID NO: 1 или 2), что определено, например, с помощью HDX-MS.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 характеризуются взаимодействиями с человеческим CD73, которые соответствуют таковым, приведенным в табл. 30, что определено с помощью рентгеновской кристаллографии. Антитело может характеризоваться по меньшей мере 50, 60, 70, 80, 90, 95 или 99% одинаковых взаимодействий с человеческим CD73, которые приведены в табл. 30.

III. Антитела, имеющие конкретные последовательности зародышевой линии.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73 содержит вариабельный участок тяжелой цепи из конкретного гена зародышевой линии тяжелой цепи иммуноглобулина и/или вариабельный участок легкой цепи из конкретного гена зародышевой линии легкой цепи иммуноглобулина.

Как продемонстрировано в данном документе, были получены человеческие антитела, специфичные в отношении CD73, которые содержат вариабельный участок тяжелой цепи, который является продуктом гена или происходит из гена VH 3-33, гена VH 3-10, гена VH 3-15, VH 3-16, гена JH6b, гена VH 6-19, гена VH 4-34 и/или гена JH3b человеческой зародышевой линии. Соответственно в данном документе предполагаются выделенные моноклональные антитела, специфичные в отношении человеческого CD73, или их антигенсвязывающие части, содержащие вариабельный участок тяжелой цепи, который является продуктом или происходит из гена VH человеческой зародышевой линии, выбранного из группы, состоящей из: VH 3-33, VH 3-10, VH 3-15, VH 3-16, VH 6-19 и VH 4-34.

Были получены человеческие антитела, специфичные в отношении CD73, которые содержат вариабельный участок легкой цепи, который является продуктом гена или происходит из гена VK L6, гена VK L18, гена VK L15, гена VK L20, гена VK A27, гена JK5, гена JK4, гена JK2 и гена JK1 человеческой зародышевой линии. Соответственно в данном документе предполагаются выделенные моноклональные антитела, специфичные в отношении человеческого CD73, или их антигенсвязывающие части, содержащие вариабельный участок легкой цепи, который является продуктом или происходит из гена VK человеческой зародышевой линии, выбранного из группы, состоящей из VK L6, VK L18, VK L15, VK L20 и VK A27.

Предпочтительными антителами, описанными в данном документе, являются антитела, содержащие вариабельный участок тяжелой цепи, который является продуктом или происходит из одного из вышеперечисленных генов VH человеческой зародышевой линии, а также содержащие вариабельный

участок легкой цепи, который является продуктом или происходит из одного из вышеперечисленных генов VK человеческой зародышевой линии.

Как используется в данном документе, человеческое антитело содержит вариабельные участки тяжелой или легкой цепи, которые "являются продуктом" или "происходят из" конкретной последовательности зародышевой линии, если вариабельные участки антитела получены из системы, в которой используются гены зародышевой линии человеческих иммуноглобулинов. Такие системы включают иммунизацию трансгенной мыши, несущей гены человеческих иммуноглобулинов, антигеном, представляющим интерес, или скрининг библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемых на фаге, с использованием антигена, представляющего интерес. Человеческое антитело, которое "является продуктом" или "происходит из" последовательности зародышевой линии человеческого иммуноглобулина, можно идентифицировать как таковое путем сравнения аминокислотной последовательности человеческого антитела с аминокислотными последовательностями зародышевой линии человеческих иммуноглобулинов и выбора последовательности зародышевой линии человеческого иммуноглобулина, которая является наиболее близкой в плане последовательности (т.е. характеризуется наибольшей % идентичностью) к последовательности человеческого антитела. Человеческое антитело, которое "является продуктом" или "происходит из" последовательности зародышевой линии человеческого иммуноглобулина, может содержать отличающиеся аминокислоты по сравнению с последовательностью зародышевой линии, например, вследствие встречающихся в естественных условиях соматических мутаций или намеренного введения сайт-направленной мутации. Тем не менее, последовательность аминокислот выбранного человеческого антитела, как правило, по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, кодируемой геном зародышевой линии человеческих иммуноглобулинов, и содержит аминокислотные остатки, которые идентифицируют антитело как человеческое антитело при сравнении с аминокислотными последовательностями зародышевой линии человеческих иммуноглобулинов из других видов (например, мышиными последовательностями зародышевой линии). В определенных случаях аминокислотная последовательность человеческого антитела может быть по меньшей мере на 95% или даже по меньшей мере на 96, 97, 98 или 99% идентичной аминокислотной последовательности, кодируемой геном зародышевой линии иммуноглобулина. Как правило, человеческое антитело, происходящее из конкретной последовательности человеческой зародышевой линии, будет проявлять не более чем 10 аминокислот, отличающихся от аминокислотной последовательности, кодируемой геном зародышевой линии иммуноглобулина. В определенных случаях человеческое антитело может проявлять не более чем 5 или даже не более чем 4, 3, 2 или 1 аминокислоту, отличающуюся от аминокислотной последовательности, кодируемой геном зародышевой линии иммуноглобулина.

IV. Гомологичные антитела.

В данном документе охватываются антитела, имеющие вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, содержащие аминокислотные последовательности, которые являются гомологичными аминокислотным последовательностям предпочтительных антител, описанных в данном документе, и при этом антитела сохраняют желаемые функциональные свойства антител к CD73, описанных в данном документе.

Например, выделенное антитело к CD73 или его антигенсвязывающая часть могут содержать вариабельный участок тяжелой цепи и вариабельный участок легкой цепи, причем:

(a) вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 16, 32, 40, 52, 60, 68, 80, 88, 135 и 170-177, или содержит 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 или 1-50 изменений аминокислот (т.е. аминокислотных замен, добавлений или делеций) в сравнении с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 16, 32, 40, 52, 60, 68, 80, 88, 135 и 170-177 соответственно;

(b) вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 12, 20, 24, 28, 36, 44, 48, 56, 64, 72, 76, 84, 92 и 138, или содержит 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 или 1-50 изменений аминокислот (т.е. аминокислотных замен, добавлений или делеций) в сравнении с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 12, 20, 24, 28, 36, 44, 48, 56, 64, 72, 76, 84, 92 и 238 соответственно;

(c) антитело специфично связывается с CD73 и

(d) антитело проявляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или все из функциональных свойств, приведенных в табл. 3.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей со значениями процентной идентичности и/или изменениями аминокислот и функциями, обсуждаемыми выше (т.е. (a)-(d)), причем CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 19, 35, 43, 55, 63, 71, 83 и 91, и необязательно CDR1 вариабельного участка тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 17, 33, 41, 53, 61, 69, 81 и 89, и необязательно CDR2 вариабельного участка тяжелой цепи содержит аминокислотную

последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 18, 34, 42, 54, 62, 70, 82 и 90.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей со значениями процентной идентичности и/или изменениями аминокислот и функциями, обсуждаемыми выше (т.е. (a)-(d)), причем CDR3 вариабельного участка легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 15, 23, 27, 31, 39, 47, 51, 59, 67, 75, 79, 87, 95 и 241, и необязательно CDR1 вариабельного участка легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 13, 21, 25, 29, 37, 45, 49, 57, 65, 73, 77, 85, 93 и 239, и необязательно CDR2 вариабельного участка легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 14, 22, 26, 30, 38, 46, 50, 58, 66, 74, 78, 86, 94 и 240.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей со значениями процентной идентичности и/или изменениями аминокислот и функциями, обсуждаемыми выше (т.е. (a)-(d)), причем CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 19, 35, 43, 55, 63, 71, 83 и 91, и необязательно CDR1 вариабельного участка тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 17, 33, 41, 53, 61, 69, 81 и 89, и необязательно CDR2 вариабельного участка тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 18, 34, 42, 54, 62, 70, 82 и 90, и при этом CDR3 вариабельного участка легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 15, 23, 27, 31, 39, 47, 51, 59, 67, 75, 79, 87, 95 и 241, и необязательно CDR1 вариабельного участка легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 13, 21, 25, 29, 37, 45, 49, 57, 65, 73, 77, 85, 93 и 239, и необязательно CDR2 вариабельного участка легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 14, 22, 26, 30, 38, 46, 50, 58, 66, 74, 78, 86, 94 и 240.

В соответствии с различными вариантами осуществления антитело может представлять собой, например, человеческое антитело, гуманизированное антитело или химерное антитело.

Выделенное антитело к CD73 или его антигенсвязывающая часть могут содержать тяжелую цепь и легкую цепь, причем:

(a) тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 100, 103, 107, 109, 112, 114, 116, 119, 121, 133, 184-210, или содержит 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 или 1-50 изменений аминокислот (т.е. аминокислотных замен, добавлений или делеций) в сравнении с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 100, 103, 107, 109, 112, 114, 116, 119, 121, 133 и 184-210 соответственно;

(b) легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 101, 102, 104, 105, 106, 108, 110, 111, 113, 115, 117, 118, 120 и 122, или содержит 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 или 1-50 изменений аминокислот (т.е. аминокислотных замен, добавлений или делеций) в сравнении с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 101, 102, 104, 105, 106, 108, 110, 111, 113, 115, 117, 118, 120 и 122 соответственно;

(c) антитело специфично связывается с CD73 и

(d) антитело проявляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или все из функциональных свойств, приведенных в табл. 3.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 содержат тяжелые и легкие цепи со значениями процентной идентичности и/или изменениями аминокислот и функциями, обсуждаемыми выше (т.е. (a)-(d)), причем CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 19, 35, 43, 55, 63, 71, 83 и 91, и необязательно CDR1 вариабельного участка тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 17, 33, 41, 53, 61, 69, 81 и 89, и необязательно CDR2 вариабельного участка тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 18, 34, 42, 54, 62, 70, 82 и 90.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 содержат тяжелые и легкие цепи со значениями процентной идентичности и/или изменениями аминокислот и функциями, обсуждаемыми выше (т.е. (a)-(d)), причем CDR3 вариабельного участка легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 15, 23, 27, 31, 39, 47, 51, 59, 67, 75, 79, 87, 95 и 241, и необязательно CDR1 вариабельного участка легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 13, 21, 25, 29, 37, 45, 49, 57, 65, 73, 77, 85, 93 и 239, и необязательно CDR2 вариабельного участка легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 14, 22, 26, 30, 38, 46, 50, 58, 66, 74, 78, 86, 94 и 240.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 содержат тяжелые и

легкие цепи со значениями процентной идентичности и/или изменениями аминокислот и функциями, обсуждаемыми выше (т.е. (a)-(d)), причем CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 19, 35, 43, 55, 63, 71, 83 и 91, и необязательно CDR1 вариабельного участка тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 17, 33, 41, 53, 61, 69, 81 и 89, и необязательно CDR2 вариабельного участка тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 18, 34, 42, 54, 62, 70, 82 и 90, и при этом CDR3 вариабельного участка легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 15, 23, 27, 31, 39, 47, 51, 59, 67, 75, 79, 87, 95 и 241, и необязательно CDR1 вариабельного участка легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 13, 21, 25, 29, 37, 45, 49, 57, 65, 73, 77, 85, 93 и 239, и необязательно CDR2 вариабельного участка легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 14, 22, 26, 30, 38, 46, 50, 58, 66, 74, 78, 86, 94 и 240.

Также предполагаются антитела к CD73, содержащие VHCDR1, VHCDR2, VHCDR3, VLCDR1, VLCDR2 и/или VLCDR3, которые отличаются от соответствующих CDR в CD73.4-1, CD73.4-2, CD73.3, 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 и/или 7A11 изменениями 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 или 1-5 аминокислот (т.е. аминокислотными заменами, добавлениями или делециями). В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73 содержит 1-5 изменений аминокислот в каждом из 1, 2, 3, 4, 5 или 6 из CDR по сравнению с соответствующими последовательностями в CD73.4-1, CD73.4-2, CD73.3, 11F11-1, 11F11-2, 11F11, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 и/или 7A11. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73 содержит в сумме 1-5 изменений аминокислот во всех CDR по сравнению с CDR в CD73.4-1, CD73.4-2, CD73.3, 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 и/или 7A11.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73 содержит CDR VH и VL, состоящие из CDR в CD73.4-1 или CD73.4-2, причем одна или несколько из аминокислот в одном или нескольких CDR представляют собой аминокислоты из одного из других антител к CD73, раскрытых в данном документе.

Мутации (например, замены, добавления, делеции), которые можно произвести в последовательностях вариабельного участка у антител к CD73, могут быть определены, исходя из следующего: (i) мутации, которые были введены в антитела, как описано в разделе примеры; и (ii) сравнение аминокислотных остатков в каждом положении в вариабельных доменах антител к CD73, описанных в данном документе (см. табл. 35 и фиг. 35): отличающаяся аминокислота в определенном положении в антителах к CD73 может указывать на то, что аминокислотный остаток в этом положении может быть изменен на другой аминокислотный остаток без существенного воздействия на активности антитела; при этом, если такой же аминокислотный остаток находится в том же положении в нескольких или во всех антителах к CD73, это может указывать на то, что эта конкретная аминокислота должна быть сохранена и не должна быть изменена на другой остаток. Иллюстративные варианты осуществления приведены ниже.

В соответствии с определенными вариантами осуществления замену каркасного остатка можно ввести в положение 25 (...RLSCA**T**SGFTF... в 11F11) в вариабельный участок тяжелой цепи (например, консервативную замену, например, на S или A) антител к CD73, описанных в данном документе. Например, если аминокислота в этом положении представляет собой T, может быть введена замена на A или S; если аминокислота в этом положении представляет собой A, может быть введена замена на S или T; и, если аминокислота в этом положении представляет собой S, может быть введена замена на T или A. Антитела 24H2, 4D4, 10D2, 6E11, 7A11, 11A6 и 4C3 имеют A в этом положении, 11F11 имеет T в этом положении и 73.5, 73.7 и 73.9 имеют S в этом положении.

Аналогично, в соответствии с определенными вариантами осуществления замену каркасного остатка можно вводить в положение аминокислоты 94 (...AEDTA**V**YYCAR в 11F11) вариабельного участка тяжелой цепи (например, V на L или L на V). Например, антитела 11F11, 73.3-73.10, 24H2, 4D4, 5F8 и 10D2 имеют V в этом положении и 6E11, 7A11, 11A6 и 4C3 имеют L в этом положении.

В соответствии с определенными вариантами осуществления аминокислотные замены могут быть произведены в CDR2 вариабельного участка тяжелой цепи антител к CD73, раскрытых в данном документе. Например, аминокислота в положении 52 (...WVAVI**L**YDGSN... в 11F11) может быть заменена на W, или, если аминокислота в этом положении представляет собой W, то аминокислота может быть заменена на L (антитела 11F11 и 73.4-73.7 имеют L в этом положении, и антитела 73.8-73.10, 24H2 и 4D4 имеют W в этом положении).

Аналогично, в соответствии с определенными вариантами осуществления аминокислота в положении 54 (...VILYD**G**SNKYY... в 11F11) может быть заменена на S или E, или, если аминокислота в этом положении представляет собой S, то аминокислота может быть заменена на E. Антитела 11F11, 73.4, 73.5, 24H2, 10D2 и 5F8 имеют G в этом положении, антитела 73.6-73.9, 6E11, 7A11, 4C3 и 73.3 имеют S в этом положении, и антитела 73.10 и 4D4 имеют E в этом положении.

Другие допустимые замены в вариабельном участке могут быть определены на основании выравни-

вания последовательностей вариабельного участка тяжелой и легкой цепей на фиг. 35 с использованием принципа, подобного описанному выше.

Антитела, имеющие последовательности, гомологичные последовательностям CD73.3, CD73.4, CD73.5, CD73.6, CD73.7, CD73.8, CD73.9, CD73.10, CD73.11, 11F11, 4C3, 4D4, 10D2, 11A6, 24H2, 5F8, 6E11 и/или 7A11, например V_H и V_L участки с SEQ ID NO: 4, 16, 32, 40, 52, 60, 68, 80, 88, 135, 170-177 и с SEQ ID NO: 8, 12, 20, 24, 28, 36, 44, 48, 56, 64, 72, 76, 84, 92 соответственно, или тяжелые и легкие цепи с SEQ ID NO: 100, 103, 107, 109, 112, 114, 116, 119, 121, 133 и 184-210 и с SEQ ID NO: 101, 102, 104, 105, 106, 108, 110, 111, 113, 115, 117, 118, 120 и 122 соответственно, или CDR можно получить посредством мутагенеза (например, сайт-направленного или ПЦР-опосредованного мутагенеза) молекул нуклеиновой кислоты, например SEQ ID NO: 139, 142, 146, 148, 151, 153, 155, 158, 160, 237, и/или SEQ ID NO: 140, 141, 143, 144, 145, 147, 149, 150, 152, 154, 156, 157, 159, 161, или SEQ ID NO: 134, 243, 246, 250, 252, 255, 257, 259, 262, 264, и/или SEQ ID NO: 244, 245, 247, 248, 249, 251, 253, 254, 256, 258, 260, 261, 263, 265, 266, с последующим исследованием кодируемых измененных антител в отношении сохраненной функции с использованием функциональных анализов, описанных в данном документе.

V. Антитела с консервативными модификациями.

Антитела к CD73 могут содержать вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, причем одна или несколько из этих последовательностей CDR содержат определенные аминокислотные последовательности на основе предпочтительных антител, описанных в данном документе, например CD73.4-1, CD73.4-2, CD73.3, 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 и/или 7A11, или их консервативные модификации, и при этом антитела сохраняют желаемые функциональные свойства антител к CD73, описанных в данном документе. Соответственно выделенное антитело к CD73 или его антигенсвязывающая часть могут содержать вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, причем:

(a) последовательность CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 7, 19, 35, 43, 55, 63, 71, 83 и 91, и ее консервативные модификации, например 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 или 1-5 консервативных аминокислотных замен;

(b) последовательность CDR3 вариабельного участка легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 11, 15, 23, 27, 31, 39, 47, 51, 59, 67, 75, 79, 87 и 95, и ее консервативные модификации, например 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 или 1-5 консервативных аминокислотных замен;

(c) антитело специфично связывается с CD73 и

(d) антитело проявляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или все из функциональных свойств, приведенных в табл. 3.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления последовательность CDR2 вариабельного участка тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 6, 18, 34, 42, 54, 62, 70, 82 и 90, и ее консервативные модификации, например 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 или 1-5 консервативных аминокислотных замен; и последовательность CDR2 вариабельного участка легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 10, 14, 22, 26, 30, 38, 46, 50, 58, 66, 74, 78, 86 и 94, и ее консервативные модификации, например 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 или 1-5 консервативных аминокислотных замен. В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления последовательность CDR1 вариабельного участка тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 5, 17, 33, 41, 53, 61, 69, 81 и 89, и ее консервативные модификации, например 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 или 1-5 консервативных аминокислотных замен; и последовательность CDR1 вариабельного участка легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 9, 13, 21, 25, 29, 37, 45, 49, 57, 65, 73, 77, 85 и 93, и ее консервативные модификации, например 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4 или 1-5 консервативных аминокислотных замен.

В соответствии с различными вариантами осуществления антитела могут представлять собой, например, человеческие антитела, гуманизированные антитела или химерные антитела.

Консервативные аминокислотные замены также можно производить в частях антител, отличных от CDR, или дополнительно к заменам в CDR. Например, консервативные модификации аминокислот могут быть произведены в каркасном участке или в константном участке, например Fc-участке. Любая из замен, описанных в данном документе, может представлять собой консервативную замену. Вариабельный участок или тяжелая или легкая цепь могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25 или 1-50 консервативных аминокислотных замен по сравнению с последовательностями антител к CD73, представленных в данном документе. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73 содержит комбинацию консервативных и неконсервативных модификаций аминокислот.

VI. Антитела, которые связываются с тем же эпитопом на CD73, что и антитела, описанные в данном документе, или конкурируют с ними за связывание с CD73.

Также предполагаются антитела, которые конкурируют за связывание с CD73 с конкретными антителами к CD73, описанными в данном документе (например, антитела CD73.4, CD73.3, 11F11, 4C3, 4D4, 10D2, 11A6, 24H2, 5F8, 6E11 и 7A11). Такие конкурирующие антитела можно идентифицировать на основании их способности к конкурентному ингибированию связывания с CD73 одного или нескольких из моноклональных антител 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11, 7A11 и/или CD73.3 или CD73.4 (с любыми константными участками и легкими цепями, описанными в данном документе для этих антител) в стандартных анализах связывания CD73. Например, можно применять стандартные анализы ELISA или конкурентные анализы ELISA, в которых рекомбинантный белок человеческого CD73 иммобилизируют на планшете, добавляют различные концентрации не содержащего метки первого антитела, планшет промывают, добавляют меченое второе антитело, промывают и измеряют количество связавшейся метки. Если повышенная концентрация не содержащего метки (первого) антитела (также называемого "блокирующим антителом") ингибирует связывание меченого (второго) антитела, считается, что первое антитело ингибирует связывание второго антитела с мишенью на планшете, или считается, что оно конкурирует со связыванием второго антитела. В качестве дополнения или альтернативы, анализ SPR методом BIACORE® можно применять для оценки способности антител к конкуренции. Способность исследуемого антитела к ингибированию связывания антитела к CD73, описанного в данном документе, с CD73 демонстрирует, что исследуемое антитело может конкурировать с антителом за связывание с CD73.

В данном документе также представлены антитела к CD73, которые ингибируют связывание антитела к CD73, описанных в данном документе, с CD73 на клетках, например на опухолевых клетках, по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%, и/или чье связывание с CD73 на клетках, например на опухолевых клетках, ингибируется по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%, например, при измерении с помощью метода ELISA или FACS, как, например, при использовании анализа, описанного в предыдущем абзаце.

Антитела, которые конкурируют за связывание с антителами к CD73, описанными в данном документе, можно идентифицировать с использованием методов, известных в уровне техники. Например, можно иммунизировать мышей человеческим CD73, как описано в данном документе, получить гибридомы, а полученные в результате моноклональные антитела подвергнуть скринингу в отношении способности конкурировать с антителом, описанным в данном документе, за связывание с CD73. Мышей также можно иммунизировать меньшим фрагментом CD73, содержащим эпитоп, с которым связывается антитело. Эпитоп или участок, содержащий эпитоп, можно идентифицировать, например, посредством скрининга в отношении связывания с рядом перекрывающихся пептидов, охватывающим CD73. В качестве альтернативы можно применять метод по Jespers et al., Biotechnology 12:899, 1994 для управления селекцией антител, имеющих такой же эпитоп, что и описанное в данном документе антитело к CD73, и, следовательно, подобные ему свойства. При использовании фагового дисплея вначале тяжелую цепь антитела к CD73 спаривают с репертуаром легких цепей (предпочтительно человеческих) для селекции связывающегося с CD73 антитела, а затем новую легкую цепь спаривают с репертуаром тяжелых цепей (предпочтительно человеческих) для селекции связывающегося с CD73 антитела (предпочтительно человеческого), имеющего такой же эпитоп или участок с эпитопом, что и антитело к CD73, описанное в данном документе. В качестве альтернативы варианты антитела, описанного в данном документе, можно получить посредством мутагенеза кДНК, кодирующей тяжелую и легкую цепи антитела.

Методики определения того, что антитела связываются с "тем же эпитопом на CD73", что и антитела, описанные в данном документе, включают в себя, например, методы картирования эпитопов, такие как рентгеноструктурные анализы кристаллов комплексов антиген-антитело, обеспечивающие разрешение эпитопов в атомном масштабе. В других методах отслеживается связывание антитела с фрагментами антигена или мутированными вариантами антигена, причем потерю связывания вследствие модификации аминокислотного остатка в последовательности антигена часто считают показателем компонента эпитопа. Кроме того, для картирования эпитопов также можно применять вычислительные комбинаторные методы. Методы также могут основываться на способности антитела, представляющего интерес, выделять на основе аффинности специфичные короткие пептиды из комбинаторных пептидных библиотек с использованием фагового дисплея. Пептиды затем рассматривают как ключи к определению эпитопов, соответствующих антителу, используемому для скрининга пептидной библиотеки. Для картирования эпитопов также были разработаны вычислительные алгоритмы, с помощью которых, как было показано, картируют конформационные прерывающиеся эпитопы.

Сканирующий аланином мутагенез, который описан в Cunningham and Wells (1989) Science 244: 1081-1085; или некоторые другие формы точечного мутагенеза аминокислотных остатков в CD73 также можно использовать для определения функционального эпитопа для антитела к CD73. Тем не менее, исследования с использованием мутагенеза также могут выявить аминокислотные остатки, которые являются ключевыми для общей трехмерной структуры CD73, но которые не задействованы непосредственно

в контактах антитело-антиген, и, следовательно, могут быть необходимы другие методы для подтверждения функционального эпитопа, определенного при помощи этого метода.

Эпитоп или участок с эпитопом ("участок с эпитопом" представляет собой участок, содержащий эпитоп или перекрывающийся с эпитопом), связываемый специфичным антителом, также можно определить, оценивая связывание антитела с пептидами, содержащими фрагменты CD73, например неденатурированные или денатурированные фрагменты. Ряд перекрывающихся пептидов, охватывающий последовательность CD73 (например, человеческого CD73), можно синтезировать и подвергнуть скринингу в отношении связывания, например, в прямом анализе методом ELISA, конкурентом анализе методом ELISA (при котором пептиды оценивают в отношении их способности к предотвращению связывания антитела с CD73, связанным с лункой микротитровального планшета) или на чипе. Такие методы скрининга пептидов могут быть неспособны к выявлению некоторых прерывающихся функциональных эпитопов, т.е. функциональных эпитопов, которые включают аминокислотные остатки, которые не являются смежными по линии первичной последовательности полипептидной цепи CD73.

Эпитоп также можно идентифицировать с помощью метода определения структуры белков на основе MS, такого как масс-спектрометрия с использованием водородно/дейтериевого обмена (HDX-MS) и быстрого фотохимического окисления белков (FPOP). HDX-MS можно осуществлять, например, как описано далее в разделе примеры и в Wei et al. (2014) Drug Discovery Today 19:95; причем методы из данного источника специально включены в данный документ посредством ссылки. FPOP можно осуществлять, как описано, например, в Hambley and Gross (2005) J. American Soc. Mass Spectrometry 16:2057, причем методы из данного источника специально включены в данный документ посредством ссылки.

Эпитоп, связываемый антителами к CD73, также можно определить с помощью структурных методов, таких как рентгенографическое определение структуры кристалла (например, международная заявка WO 2005/044853), молекулярное моделирование и спектроскопия ядерного магнитного резонанса (NMR), в том числе определение с помощью NMR скоростей обмена H-D лабильных водородов в амидных группах в CD73, когда он является несвязанным и когда он связан в комплекс с антителом, представляющим интерес (Zinn-Justin et al. (1992) Biochemistry 31, 11335-11347; Zinn-Justin et al. (1993) Biochemistry 32, 6884-6891).

Что касается рентгеноструктурной кристаллографии, кристаллизацию можно проводить с использованием любого из методов, известных в уровне техники (например, Giege et al. (1994) Acta Crystallogr. D50:339-350; McPherson (1990) Eur. J. Biochem. 189:1-23), в том числе метод "microbatch" (например, Chayen (1997) Structure 5:1269-1274), метод диффузии паров из "висящей капли" (например, McPherson (1976) J. Biol. Chem. 251:6300-6303), затравливания и диализа. Желательно применение препарата белка с концентрацией, составляющей по меньшей мере приблизительно 1 мг/мл и предпочтительно от приблизительно 10 до приблизительно 20 мг/мл. Кристаллизация может лучше всего осуществляться в растворе осадителя, содержащем полиэтиленгликоль 1000-20000 (PEG; со средним молекулярным весом в диапазоне от приблизительно 1000 до приблизительно 20000 Да, предпочтительно от приблизительно 5000 до приблизительно 7000 Да, более предпочтительно приблизительно 6000 Да) в концентрациях в диапазоне от приблизительно 10 до приблизительно 30% (вес./об.). Также желательно, чтобы он включал стабилизирующее белок средство, например глицерин, в концентрации в диапазоне от приблизительно 0,5 до приблизительно 20%. Подходящая соль, такая как хлорид натрия, хлорид лития или цитрат натрия, также может быть желательна в растворе осадителя, предпочтительно в концентрации в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 1000 мМ. Осадитель предпочтительно стабилизирован буфером при pH от приблизительно 3,0 до приблизительно 5,0, предпочтительно приблизительно 4,0. Конкретные буферы, пригодные в растворе осадителя, могут изменяться и являются широко известными в уровне техники (Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Third ed., (1994) Springer-Verlag, New York). Примеры пригодных буферов включают в себя HEPES, Tris, MES и ацетатный буфер, но не ограничиваются ими. Кристаллы можно выращивать при широком диапазоне температур, в том числе 2, 4, 8 и 26°C.

Кристаллы антитело-антиген можно изучать с использованием широко известных рентгенодифрационных методик и можно уточнить с использованием компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Yale University, 1992, реализуется Molecular Simulations, Inc.; см., например, Blundell & Johnson (1985) Meth. Enzymol. 114 & 115, H.W. Wyckoff et al., eds., Academic Press; публикацию заявки на патент США № 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne (1993) Acta Cryst. D49:37-60; Bricogne (1997) Meth. Enzymol. 276A:361-423, Carter & Sweet, eds.; Roversi et al. (2000) Acta Cryst. D56:1313-1323), раскрытия которых тем самым включены посредством ссылки во всей своей полноте.

Антитела к CD73 могут связываться с тем же эпитопом, что и любое из антител к CD73, имеющих аминокислотные последовательности, описанные в данном документе, что определяется с помощью методики картирования эпитопов, такой как методика, описанная в данном документе. Антитела к CD73 также могут характеризоваться подобными взаимодействиями с человеческим CD73, например они могут характеризоваться по меньшей мере приблизительно 50, 60, 70, 80, 90, 95% или большим процентом взаимодействий, приведенных в табл. 30, что определено с помощью рентгеноструктурной кристаллографии.

VII. Сконструированные и модифицированные антитела.

VH и VL участки.

Также предполагаются сконструированные и модифицированные антитела, которые можно получить с использованием антитела, имеющего одну или несколько из последовательностей V_H и/или V_L, раскрытых в данном документе, в качестве исходного материала для конструирования модифицированного антитела, причем модифицированный антитело может иметь модифицированные свойства по сравнению с исходным антителом. Антитело можно конструировать, модифицируя один или несколько остатков в пределах одного или обоих вариабельных участков (т.е. V_H и/или V_L), например в пределах одного или нескольких CDR участков и/или в пределах одного или нескольких каркасных участков. В качестве дополнения или альтернативы антитело можно конструировать, модифицируя остатки в пределах константного участка(участков), например, для изменения эффекторной функции(функций) антитела.

Одним типом конструирования вариабельного участка, который можно осуществлять, является CDR-прививка. Антитела взаимодействуют с антигенами-мишенями преимущественно через аминокислотные остатки, которые расположены в шести гипервариабельных участках (CDR) тяжелой и легкой цепей. По этой причине аминокислотные последовательности в пределах CDR являются более различными у отдельных антител, чем последовательности за пределами CDR. Поскольку последовательности CDR являются ответственными за большинство взаимодействий антитело-антиген, представляется возможным обеспечение экспрессии рекомбинантных антител, которые имитируют свойства конкретных эталонных антител, путем конструирования векторов экспрессии, которые включают в себя последовательности CDR из конкретного эталонного антитела, привитые на каркасные последовательности из отличающегося антитела с отличающимися свойствами (см., например, Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) Nature 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. See. U.S.A. 86:10029-10033; патент США № 5225539 за авторством Winter и патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 за авторством Queen et al.)

Соответственно другой вариант осуществления, описанный в данном документе, относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающей части, содержащим вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 17, 33, 41, 53, 61, 69, 81 и 89, SEQ ID NO: 6, 18, 34, 42, 54, 62, 70, 82 и 90 и SEQ ID NO: 7, 19, 35, 43, 55, 63, 71, 83 и 91 соответственно, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, содержащие аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 13, 21, 25, 29, 37, 45, 49, 57, 65, 73, 77, 85 и 93, SEQ ID NO: 10, 14, 22, 26, 30, 38, 46, 50, 58, 66, 74, 78, 86 и 94 и SEQ ID NO: 11, 15, 23, 27, 31, 39, 47, 51, 59, 67, 75, 79, 87 и 95 соответственно. Таким образом, такие антитела содержат последовательности CDR V_H и V_L моноклональных антител CD73.4-1, CD73.4-2, 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 и 7A11, причем они могут содержать отличающиеся каркасные последовательности из этих антител.

Такие каркасные последовательности можно получить из баз данных ДНК общего пользования или опубликованных источников, которые включают последовательности генов зародышевой линии антител. Например, последовательности ДНК зародышевой линии для генов вариабельных участков тяжелой и легкой цепей человека можно найти в базе данных человеческих последовательностей зародышевой линии "VBase" (доступна в сети Интернет по адресу www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), а также в Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I.M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798; и Cox, J.P.L. et al. (1994) "A Directory of Human Germ-line VH Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836; причем содержание каждого из данных источников специально включено в данный документ посредством ссылки.

Предпочтительными каркасными последовательностями для применения в антителах, описанных в данном документе, являются такие последовательности, которые подобны в плане структуры каркасным последовательностям, применяемым в антителах, описанных в данном документе. Последовательности CDR1, 2 и 3 V_H и последовательности CDR1, 2 и 3 V_L можно привить на каркасные участки, которые имеют последовательность, идентичную обнаруживаемой в гене зародышевой линии иммуноглобулина, из которого происходит каркасная последовательность, или последовательности CDR можно привить на каркасные участки, которые содержат до 20 предпочтительно консервативных, аминокислотных замен в сравнении с последовательностями зародышевой линии. Например, было выявлено, что в определенных случаях выгодно подвергнуть мутации остатки в пределах каркасных участков для сохранения или усиления способности к связыванию антигена у антитела (см., например, патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 за авторством Queen et at).

Сконструированные антитела, описанные в данном документе, включают в себя те антитела, в которых были произведены модификации каркасных остатков в пределах V_H и/или V_L, например, для улучшения свойств антитела. Как правило, такие модификации каркаса производят для снижения иммуногенности антитела. Например, один подход заключается в "мутировании к первоначальному виду" одного или нескольких каркасных остатков в соответствующую последовательность зародышевой линии.

Более конкретно, антитело, которое подверглось соматической мутации, может содержать каркасные остатки, которые отличаются от последовательности зародышевой линии, из которой происходит антитело. Такие остатки можно идентифицировать посредством сравнения каркасных последовательностей антитела с последовательностями зародышевой линии, из которых происходит антитело. Для возвращения последовательностей каркасных участков в их конфигурацию зародышевой линии соматические мутации можно "мутировать к первоначальному виду" в последовательности зародышевой линии, например, с помощью сайт-направленного мутагенеза или ПЦР-опосредованного мутагенеза. Также предполагается охват таких антител, подвергшихся "мутированию к первоначальному виду".

Другой тип модификации каркаса включает мутирование одного или нескольких остатков в пределах каркасного участка или даже в пределах одного или нескольких CDR участков с удалением Т-клеточных эпитопов, чтобы таким образом снизить потенциальную иммуногенность антитела. Этот подход также называется "деиммунизацией" и более подробно описан в публикации заявки на патент США № 20030153043 за авторством Carr et al. Другим типом модификации вариабельного участка является мутирование аминокислотных остатков в пределах CDR участков для улучшения одного или нескольких свойств связывания (например, аффинности) у антитела, представляющего интерес. Сайт-направленный мутагенез или ПЦР-опосредованный мутагенез можно осуществлять для введения мутации(мутаций), и эффект в отношении связывания антитела или другого функционального свойства, представляющего интерес, можно оценить в in vitro или in vivo анализах, которые описаны в данном документе и приведены в разделе примеры. Предпочтительно вводят консервативные модификации (которые обсуждаются выше). Мутации могут представлять собой аминокислотные добавления, делеции или предпочтительно замены. Более того, изменениям подвергаются, как правило, не более одного, двух, трех, четырех или пяти остатков в пределах CDR участка.

Соответственно также предполагаются выделенные моноклональные антитела к CD73 или их антигенсвязывающие части, содержащие вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий: (a) CDR1 участок V_H, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 17, 33, 41, 53, 61, 69, 81 и 89, или аминокислотную последовательность с одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью аминокислотными заменами, делециями или добавлениями в сравнении с SEQ ID NO: 5, 17, 33, 41, 53, 61, 69, 81 и 89; (b) CDR2 участок V_H, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 18, 34, 42, 54, 62, 70, 82 и 90, или аминокислотную последовательность с одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью аминокислотными заменами, делециями или добавлениями в сравнении с SEQ ID NO: 6, 18, 34, 42, 54, 62, 70, 82 и 90; (c) CDR3 участок VH, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 19, 35, 43, 55, 63, 71, 83 и 91, или аминокислотную последовательность с одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью аминокислотными заменами, делециями или добавлениями в сравнении с SEQ ID NO: 7, 19, 35, 43, 55, 63, 71, 83 и 91; (d) CDR1 участок V_L, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 13, 21, 25, 29, 37, 45, 49, 57, 65, 73, 77, 85 и 93, или аминокислотную последовательность с одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью аминокислотными заменами, делециями или добавлениями в сравнении с SEQ ID NO: 9, 13, 21, 25, 29, 37, 45, 49, 57, 65, 73, 77, 85 и 93; (e) CDR2 участок V_L, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 14, 22, 26, 30, 38, 46, 50, 58, 66, 74, 78, 86 и 94, или аминокислотную последовательность с одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью аминокислотными заменами, делециями или добавлениями в сравнении с SEQ ID NO: 10, 14, 22, 26, 30, 38, 46, 50, 58, 66, 74, 78, 86 и 94; и (f) CDR3 участок V_L, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11, 15, 23, 27, 31, 39, 47, 51, 59, 67, 75, 79, 87 и 95, или аминокислотную последовательность с одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью аминокислотными заменами, делециями или добавлениями в сравнении с SEQ ID NO: 11, 15, 23, 27, 31, 39, 47, 51, 59, 67, 75, 79, 87 и 95.

Метиониновые остатки в CDR антител могут окисляться, приводя в результате к потенциальной химической деградации и последующему снижению активности антитела. Соответственно также предполагаются антитела к CD73, у которых один или несколько метиониновых остатков в CDR тяжелой и/или легкой цепей заменены на аминокислотные остатки, которые не подвергаются окислительной деградации.

Аналогично, из антител к CD73, в особенности, из CDR, могут быть удалены сайты дезамидирования.

Потенциальные сайты гликозилирования в антигенсвязывающем домене предпочтительно устраняют для предотвращения гликозилирования, что может препятствовать связыванию с антигеном; см., например, патент США № 5714350.

Целенаправленное связывание с антигеном.

В соответствии с различными вариантами осуществления антитело согласно настоящему изобретению модифицируют для селективного блокирования связывания с антигеном в тканях и средах, где связывание с антигеном будет вредным, но для обеспечения связывания с антигеном там, где оно будет полезным. В соответствии с одним вариантом осуществления создают "маску" из блокирующего пептида, которая специфично связывается с антигенсвязывающей поверхностью антитела и препятствует связы-

ванию с антигеном, причем данная маска связана с каждым из участвующих в связывании плечей антитела с помощью расщепляемого пептидазой линкера; см., например, патент США № 8518404, выданный CytomX. Такие конструкты являются полезными для лечения злокачественных опухолей, у которых уровни протеазы в опухолевом микроокружении являются значительно повышенными по сравнению с тканями, не относящимися к опухоли. Селективное расщепление расщепляемого линкера в опухолевом микроокружении позволяет отщеплять маскирующий/блокирующий пептид, обеспечивая возможность селективного связывания с антигеном в опухоли, а не в периферических тканях, в которых связывание с антигеном может вызвать нежелательные побочные эффекты.

В качестве альтернативы в соответствии со связанным вариантом осуществления разработано бивалентное связывающее соединение ("маскирующий лиганд"), содержащие два антигенсвязывающих домена, которое связывается с обеими антигенсвязывающими поверхностями (бивалентного) антитела и препятствует связыванию с антигеном, причем в данном связывающем соединении две маски для связывающих доменов связаны друг с другом (но не с антителом) с помощью расщепляемого линкера, например расщепляемого пептидазой; см., например, публикацию международной заявки № WO 2010/077643, поданной Tegopharm Corp. Маскирующие лиганды могут содержать антиген, с которым, как предполагается, связывается антитело, или могут быть получены из такого антигена, или могут быть созданы независимо. Такие маскирующие лиганды являются полезными для лечения злокачественных опухолей, у которых уровни протеазы в опухолевом микроокружении являются значительно повышенными по сравнению с тканями, не относящимися к опухоли. Селективное расщепление расщепляемого линкера в опухолевом микроокружении позволяет отщепление двух связывающих доменов друг от друга, снижая авидность в отношении антигенсвязывающих поверхностей антитела. Являющееся результатом отщепление маскирующего лиганда от антитела обеспечивает возможность селективного связывания с антигеном в опухоли, а не в периферических тканях, в которых связывание с антигеном может вызвать нежелательные побочные эффекты.

Fc и модифицированные Fc.

В дополнение к активности терапевтического антитела, обусловленной связыванием антигенсвязывающего домена с антигеном (например, блокирование когнатного лиганда или белка-рецептора в случае антагонистических антител или индукция передачи сигнала в случае агонистических антител), Fc-часть антитела обычно сложным образом взаимодействует с иммунной системой, вызывая любое количество биологических эффектов. Эффекторные функции, как, например, у Fc-участка иммуноглобулина, отвечающего за многие важные функции антитела, такие как антигензависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), комплементзависимая цитотоксичность (CDC) и антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), приводят в результате к цитолизу клеток-мишеней, хотя и за счет разных механизмов.

Антитела к CD73 могут содержать вариабельные домены антител, описанных в данном документе, с константными доменами, содержащими разные Fc-участки, которые выбраны исходя из биологических активностей (если они присутствуют) антитела для предполагаемого применения; Salfeld (2007) Nat. Biotechnol. 25:1369. Человеческие IgG, например, можно подразделить на четыре подкласса, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и каждый из них содержит Fc-участок, характеризующийся уникальным профилем для связывания с одним или несколькими из Fcγ рецепторов (активирующие рецепторы FcγRI (CD64), FcγRIIA, FcγRIIC (CD32); FcγRIIIA и FcγRIIB (CD16) и ингибирующий рецептор FcγRIIB) и для первого компонента комплемента (C1q). Человеческие IgG1 и IgG3 связываются со всеми Fcγ рецепторами; IgG2 связывается с $FcγRIIA_{H131}$ и с более низкой аффинностью с $FcγRIIA_{R131}$, $FcγRIIIA_{V158}$; IgG4 связывается с FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC и $FcγRIIIA_{V158}$; и ингибирующий рецептор FcγRIIB характеризуется более низкой аффинностью в отношении IgG1, IgG2 и IgG3, чем все другие Fcγ рецепторы; Bruhns et al. (2009) Blood 113:3716. Исследования показали, что FcγRI не связывается с IgG2, и FcγRIIIB не связывается с IgG2 или IgG4. Id. В целом, по активности ADCC человеческий $IgG1 \geqq IgG3 \gg IgG4 \geqq IgG2$. Как следствие, например, константный домен IgG1, а не IgG2 или IgG4, может быть выбран для применения в лекарственном средстве в случае, когда желаемой является ADCC; IgG3 может быть выбран в случае активации экспрессирующих FcγRIIIA NK-клеток, моноцитов или макрофагов и IgG4 может быть выбран, если антитело должно применяться для десенсибилизации при аллергии у пациентов. IgG4 также может быть выбран, если желательно, чтобы у антитела полностью отсутствовала эффекторная функция.

Соответственно вариабельные участки антител к CD73, описанные в данном документе, могут быть связаны (например, ковалентно связаны или слиты) с Fc, например Fc IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, который может относиться к любому аллотипу или изоаллотипу, например для IgG1: G1m, G1m1(a), G1m2(x), G1m3(f), G1m17(z); для IgG2: G2m, G2m23(n); для IgG3: G3m, G3m21(g1), G3m28(g5), G3m11(b0), G3m5(b1), G3m13(b3), G3m14(b4), G3m10(b5), G3m15(s), G3m16(t), G3m6(c3), G3m24(c5), G3m26(u), G3m27(v); см., например, Jefferis et al. (2009) mAbs 1:1. На выбор аллотипа могут оказывать влияние проблемы потенциальной иммуногенности, например, для сведения к минимуму образования антител к лекарственному средству.

Вариабельные участки, описанные в данном документе, могут быть связаны с Fc, содержащим одну или несколько модификаций, как правило, для изменения одного или нескольких функциональных

свойств антитела, таких как период полувыведения из сыворотки крови, фиксация комплемента, связывание с Fc-рецептором и/или антигензависимая клеточная цитотоксичность. Более того, антитело, описанное в данном документе, можно химически модифицировать (например, один или несколько химических фрагментов могут быть прикреплены к антителу), или его можно модифицировать с изменением его гликозилирования для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела. Каждый из этих вариантов осуществления более подробно описан ниже. Нумерация остатков в Fc-участке соответствует нумерации аминокислот в антителе EU согласно Kabat. Варианты последовательности, раскрытые в данном документе, представлены с упоминанием номера остатка, за которым следует аминокислота, которая заменяет встречающуюся в естественных условиях аминокислоту, и перед которым необязательно находится встречающийся в естественных условиях остаток в этом положении. В случае, когда в заданном положении могут присутствовать несколько аминокислот, например, если последовательности различаются у встречающихся в естественных условиях изотипов, или если в данном положении могут быть заменены несколько мутаций, их разделяют символами косой черты (например, "X/Y/Z").

Например, можно производить модификации в Fc-участке с целью получения варианта Fc с: (a) повышенной или пониженной антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (ADCC), (b) повышенной или пониженной комплементзависимой цитотоксичностью (CDC), (c) повышенной или пониженной аффинностью в отношении C1q и/или (d) повышенной или пониженной аффинностью в отношении Fc-рецептора по сравнению с исходным Fc. Такие варианты Fc-участка обычно будут содержать по меньшей мере одну модификацию аминокислоты в Fc-участке. Полагают, что комбинирование модификаций аминокислот будет особенно желательным. Например, вариантный Fc-участок может включать в себя две, три, четыре, пять замен и т.д., например, в конкретных положениях в Fc-участке, идентифицированных в данном документе. Иллюстративные варианты последовательности Fc раскрыты в данном документе, а также представлены в патентах США №№ 5624821; 6277375; 6737056; 6194551; 7317091; 8101720; PCT публикации международных заявок WO 00/42072; WO 01/58957; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752; WO 04/074455; WO 04/099249; WO 04/063351; WO 05/070963; WO 05/040217, WO 05/092925 и WO 06/020114.

Ослабление эффекторной функции.

Активность ADCC можно снизить путем модификации Fc-участка. В соответствии с определенными вариантами осуществления можно удалить сайты, которые воздействуют на связывание с Fc-рецепторами, предпочтительно сайты, за исключением сайтов связывания рецептора реутилизации. В соответствии с другими вариантами осуществления Fc-участок можно модифицировать с удалением сайта ADCC. Сайты ADCC являются известными в уровне техники; см., например, Sarmay et al. (1992J Molec. Immunol. 29 (5): 633-9, применительно к сайтам ADCC в IgG1. В соответствии с одним вариантом осуществления вариант человеческого IgG1 с G236R и L328R эффективно устраняет связывание с FcγR; Horton et al. (2011) J. Immunol. 186:4223 и Chu et al. (2008) Mol. Immunol. 45:3926. В соответствии с другими вариантами осуществления Fc, характеризующийся пониженным связыванием с FcγR, содержал аминокислотные замены L234A, L235E и G237A; Gross et al. (2001) Immunity 15:289.

Активность CDC также можно снизить путем модификации Fc-участка. Мутации в IgG1 в положениях D270, K322, P329 и P331, в частности аланиновые мутации D270A, K322A, P329A и P331A, значительно снижают способность соответствующего антитела к связыванию C1q и активации комплемента; Idusogie et al. (2000) J. Immunol. 164:4178; международная заявка WO 99/51642. Было показано, что модификация в положении 331 в IgG1 (например, P331S) снижает связывание комплемента; Tao et al. (1993) J. Exp. Med. 178:661 и Canfield & Morrison (1991) J. Exp. Med. 173:1483. В другом примере один или несколько аминокислотных остатков в положениях аминокислот 231-239 изменяют, чтобы посредством этого снизить способность антитела фиксировать комплемент; WO 94/29351.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления Fc с пониженной фиксацией комплемента имеет аминокислотные замены A330S и P331S; Gross et al. (2001) Immunity 15:289.

Для тех применений, когда эффекторная функция должна быть полностью исключена, например когда только связывание с антигеном является достаточным для создания желаемого терапевтического благоприятного воздействия, а эффекторная функция приводит только к нежелательным побочным эффектам (или повышает их риск), можно применять антитела IgG4, или могут быть разработаны антитела или фрагменты, у которых отсутствует Fc-участок или значительная его часть, или Fc может быть мутирован для полного исключения гликозилирования (например, N297A). В качестве альтернативы был создан гибридный конструкт человеческого IgG2 (C_H1 домен и шарнирный участок) и человеческого IgG4 (C_H2 и C_H3 домены), который лишен эффекторной функции, лишен способности к связыванию с FcγR (подобно IgG2) и неспособен к активации комплемента (подобно IgG4); Rother et al. (2007) Nat. Biotechnol. 25:1256; см. также Mueller et al. (1997) Mol. Immunol. 34:441; Labrijn et al. (2008) Curr. Op. Immunol. 20:479 (обсуждаются модификации Fc для ослабления эффекторной функции в целом).

В соответствии с другими вариантами осуществления Fc-участок изменяют посредством замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка на отличающийся аминокислотный остаток для ослабления эффекторной функции (всех эффекторных функций) антитела. Например, одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 и 322, можно заме-

нить отличающимся аминокислотным остатком так, чтобы антитело характеризовалось пониженной аффинностью в отношении эффекторного лиганда, но сохраняло способность к связыванию антигена, как у исходного антитела. Эффекторный лиганд, аффинность в отношении которого изменяют, может представлять собой, например, Fc рецептор (остатки 234, 235, 236, 237, 297) или C1 компонент комплемента (остатки 297, 318, 320, 322); патенты США №№ 5624821 и 5648260, оба за авторством Winter et al.

В международной заявке WO 88/007089 предлагались модификации в Fc-участке IgG для снижения связывания с FcγRI с целью снижения ADCC (234A; 235E; 236A; G237A) или для блокирования связывания с C1q компонентом комплемента с целью исключения CDC (E318A или V/K320A и K322A/Q); см. также Duncan & Winter (1988) Nature 332:563; Chappel et al. (1991) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 88:9036 и Sondermann et al. (2000) Nature 406:267 (обсуждаются эффекты этих мутаций в отношении связывания с FcγRIII).

Модификации Fc, ослабляющие эффекторную функцию, также включают в себя замены, вставки и делеции в положениях 234, 235, 236, 237, 267, 269, 325 и 328, как, например, 234G, 235G, 236R, 237K, 267R, 269R, 325L и 328R. Вариант Fc может содержать 236R/328R. Другие модификации для снижения взаимодействий с FcγR и комплементом включают в себя замены 297A, 234A, 235A, 237A, 318A, 228P, 236E, 268Q, 309L, 330S, 331 S, 220S, 226S, 229S, 238S, 233P и 234V. Эти и другие модификации рассматриваются в Strohl (2009) Current Opinion in Biotechnology 20:685-691. Эффекторные функции (как ADCC, так и активация комплемента) могут быть ослаблены при сохранении связывания неонатального FcR (сохранение периода полувыведения) посредством мутирования остатков IgG в одном или нескольких из положений 233-236 и 327-331, как, например, E233P, L234V, L235A, необязательно G236A, A327G, A330S и P331S в IgG1; E233P, F234V, L235A, необязательно G236A в IgG4; и A330S и P331S в IgG2; см. Armour et al. (1999) Eur. J. Immunol. 29:2613; международная заявка WO 99/58572. Другие мутации, которые ослабляют эффекторную функцию, включают в себя L234A и L235A в IgG1 (Alegre et al. (1994) Transplantation 57:1537); V234A и G237A в IgG2 (Cole et al. (1997) J. Immunol. 159:3613; см. также патент США № 5834597); и S228P и L235E для IgG4 (Reddy et al. (2000) J. Immunol. 164:1925). Другая комбинация мутаций для ослабления эффекторной функции у человеческого IgG1, включают в себя L234F, L235E и P331S. Oganesyan et al. (2008) Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 64:700; см., в целом, Labrijn et gal. (2008) Curr. Op. Immunol. 20:479. Дополнительными мутациями, которые, как было выявлено, ослабляют эффекторную функцию в случае слитого белка с Fc (IgG1) (абатацепт), являются C226S, C229S и P238S (нумерация остатков как в антителе EU). Davis et al. (2007) J. Immunol. 34:2204.

Другие варианты Fc, характеризующиеся пониженной ADCC и/или CDC, раскрыты в Glaesner et al. (2010) Diabetes Metab. Res. Rev. 26:287 (F234A и L235A для снижения ADCC и ADCP в IgG4); Hutchins et al. (1995) Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA) 92:11980 (F234A, G237A и E318A в IgG4); An et al. (2009) MAbs 1:572; и публикация заявки на патент США 2007/0148167 (H268Q, V309L, A330S и P331S в IgG2); McEarchern et al. (2007) Blood 109:1185 (C226S, C229S, E233P, L234V, L235A в IgG1); Vafa et al. (2014) Methods 65:114 (V234V, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S, P331S в IgG2).

В соответствии с определенными вариантами осуществления выбран Fc, у которого, по сути, отсутствует эффекторная функция, т.е. он характеризуется пониженным связыванием с FcγR и пониженной фиксацией комплемента. Иллюстративный Fc, например Fc IgG1, у которого отсутствует эффекторная функция, содержит следующие пять мутаций: L234A, L235E, G237A, A330S и P331S; Gross et al. (2001) Immunity 15:289. Иллюстративные тяжелые цепи, содержащие эти мутации, изложены в перечне последовательностей, который подробно изложен в табл. 35. Эти пять замен также можно объединить с N297A для исключения гликозилирования.

Усиление эффекторной функции.

В качестве альтернативы активность ADCC можно повысить путем модификации Fc-участка. По активности ADCC человеческий IgG1 ≧ IgG3 ≫ IgG4 ≧ IgG2, следовательно, константный домен IgG1, а не IgG2 или IgG4, можно выбрать для применения в лекарственном средстве в случае, когда ADCC является желательной. В качестве альтернативы Fc-участок можно модифицировать для повышения антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или для повышения аффинности в отношении Fcγ-рецептора путем модификации одной или нескольких аминокислот в следующих положениях: 234, 235, 236, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 262, 263, 264, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 313, 315, 320, 322, 324, 325, 326, 327, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 433, 434, 435, 436, 437, 438 или 439; см. международную заявку WO 2012/142515; см. также международную заявку WO 00/42072. Иллюстративные замены включают в себя 236A, 239D, 239E, 268D, 267E, 268E, 268F, 324T, 332D и 332E. Иллюстративные варианты включают в себя 239D/332E, 236A/332E, 236A/239D/332E, 268F/324T, 267E/268F, 267E/324T и 267E/268F/324T. Например, Fc человеческого IgG1, содержащие вариант с G236A, который необязательно можно объединить с I332E, как было показано, повышают аффинность связывания FcγIIA/FcγIIB примерно в 15 раз; Richards et al. (2008) Mol. Cancer Therap. 7:2517; Moore et al. (2010) mAbs 2:181. Другие модификации для усиления взаимодействий с FcγR и комплементом включают в себя замены 298A, 333A, 334A, 326A, 247I, 339D, 339Q, 280H, 290S, 298D, 298V, 243L, 292P, 300L, 396L, 305I и 396L, но не

ограничиваются ими. Эти и другие модификации рассматриваются в Strohl (2009) Current Opinion in Biotechnology 20:685-691. В частности, как ADCC, так и CDC могут быть повышены за счет изменений в положении E333 в IgG1, например E333A; Shields et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591. Применение мутаций P247I и A339D/Q для усиления эффекторной функции у IgG1 раскрыто в международной заявке WO 2006/020114, а применение D280H, K290S ± S298D/V раскрыто в международной заявке WO 2004/074455. Варианты K326A/W и E333A/S, как было показано, усиливают эффекторную функцию у человеческого IgG1, а E333S - у IgG2; Idusogie et al. (2001) J. Immunol. 166:2571.

В частности, сайты связывания для FcγR1, FcγRII, FcγRIII и FcRn на человеческом IgG1 были нанесены на карту, а также были описаны варианты с улучшенным связыванием; Shields et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604. Было показано, что конкретные мутации в положениях 256, 290, 298, 333, 334 и 339 улучшают связывание с FcγRIII, в том числе у мутантов с комбинациями T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A и S298A/E333A/K334A (характеризующихся повышенным связыванием с FcγRIIIa и активностью ADCC). Были идентифицированы другие варианты IgG1 с сильно повышенным связыванием с FcγRIIIa, в том числе варианты с мутациями S239D/I332E и S239D/I332E/A330L, у которых было показано наибольшее повышение аффинности в отношении FcγRIIIa, понижение связывания FcγRIIb и сильная цитотоксическая активность у особей яванского макака; Lazar et al. (2006) Proc. Nat'l Acad Sci. (USA) 103:4005; Awan et al. (2010) Blood 115:1204; Desjarlais & Lazar (2011) Exp. Cell Res. 317:1278. Введение тройных мутаций в антитела, такие как алемтузумаб (CD52-специфичное), трастузумаб (HER2/neu-специфичное), ритуксимаб (CD20-специфичное) и цетуксимаб (EGFR-специфичное), обуславливало значительно усиленную активность ADCC in vitro, а вариант с S239D/I332E проявлял усиленную способность к сокращению количества B-клеток у обезьян; Lazar et al. (2006) Proc. Nat'l Acad Sci. (USA) 103:4005. Кроме того, были идентифицированы мутанты IgG1, содержащие мутации L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L, которые проявляли усиленное связывание с FcγRIIIa и одновременно усиленную активность ADCC у трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий FcγRIIIa, в моделях B-клеточных злокачественных новообразований и злокачественной опухоли молочной железы; Stavenhagen et al. (2007) Cancer Res. 67:8882; патент США № 8652466; Nordstrom et al. (2011) Breast Cancer Res. 13:R123.

У разных изотипов IgG также проявляется различающаяся активность CDC (IgG3>IgG1>>IgG2≈IgG4); Dangl et al. (1988) EMBO J. 7:1989. Для применений, при которых желательной является повышенная CDC, также является возможным введение мутаций, которые повышают связывание с C1q. Способность к привлечению комплемента (CDC) может быть повышена за счет мутаций в K326 и/или E333 в IgG2, таких как K326W (которая снижает активность ADCC) и E333S, для повышения связывания с C1q, первым компонентом каскада реакций комплемента. Idusogie et al. (2001) J. Immunol. 166:2571. Введение S267E/H268F/S324T (по отдельности или в любой комбинации) в человеческий IgG1 усиливает связывание с C1q. Moore et al. (2010) mAbs 2:181. Fc-участок антитела "113F" гибридного изотипа IgG1/IgG3 из Natsume et al. (2008) Cancer Res. 68:3863 (фиг. 1 в данном источнике); также придает повышенную CDC; см. также Michaelsen et al. (2009) Scand. J. Immunol. 70:553; и Redpath et al. (1998) Immunology 93:595.

Дополнительные мутации, которые могут усиливать или ослаблять эффекторную функцию, раскрыты в Dall'Acqua et al. (2006) J. Immunol. 177:1129; см. также Carter (2006) Nat. Rev. Immunol. 6:343; Presta (2008) Curr. Op. Immunol, 20:460.

Также можно применять варианты Fc, которые повышают аффинность в отношении ингибирующего рецептора FcγRIIb, например, для повышения апоптоз-индуцирующей или адъювантной активности. Li & Ravetch (2011) Science 333:1030; Li & Ravetch (2012) Proc. Nat'l Acad. Sci (USA) 109:10966; публикация заявки на патент США 2014/0010812. Такие варианты могут предполагать антитело с иммуномодулирующими активностями в отношении FcγRIIb^{+} клеток, в том числе, например, B-клеток и моноцитов. В соответствии с одним вариантом осуществления варианты Fc обеспечивают селективно повышенную аффинность к FcγRIIb в сравнении с одним или несколькими активирующими рецепторами. Модификации для изменения связывания с FcγRIIb включают в себя одну или несколько модификаций в положении, выбранном из группы, состоящей из 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328 и 332 в соответствии с нумерацией аминокислот в антителе EU. Иллюстративные замены для усиления аффинности к FcγRIIb включают в себя 234D, 234E, 234F, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y и 332E, но не ограничиваются ими. Иллюстративные замены включают в себя 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W и 328Y. Другие варианты Fc для усиления связывания с FcγRIIb включают 235Y/267E, 236D/267E, 239D/268D, 239D/267E, 267E/268D, 267E/268E и 267E/328F. В частности, варианты человеческого IgGA1 с мутациями S267E, G236D, S239D, L328F и I332E, в том числе вариант с двойной мутацией S267E + L328F, являются особенно ценными при специфичном повышении аффинности в отношении ингибирующего FcγRIIb рецептора. Chu et al. (2008) Mol. Immunol. 45:3926; публикация заявки на патент США 2006/024298; международная заявка WO 2012/087928. Повышенная специфичность в отношении FcγRIIb (в отличие от FcγRIIa^{R131}) может быть получена путем добавления замены P238D. Mimoto et al. (2013) Protein. Eng. Des. & Selection 26:589; международная заявка WO 2012/115241.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело модифицируют для повышения его периода полувыведения из организма. Возможны различные подходы. Например, это может быть выполнено путем повышения аффинности связывания Fc-участка в отношении FcRn. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело изменено в пределах CH1 или CL участка таким образом, чтобы он содержал эпитоп, связывающийся с рецептором реутилизации, заимствованный из двух петель CH2 домена в Fc-участке IgG, как описано в патентах США №№ 5869046 и 6121022 за авторством Presta et al. Другие иллюстративные варианты Fc, которые повышают связывание с FcRn и/или улучшают фармакокинетические свойства, включают в себя замены в положениях 259, 308 и 434, в том числе, например, 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434H, 434F, 434Y и 434M. Другие варианты, которые повышают связывание Fc с FcRn, включают в себя: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton et al., 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216, Hinton et al. 2006 Journal of Immunology 176:346-356), 256A, 272A, 305A, 307A, 311A, 312A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields et al., Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(9):6591-6604), 252F, 252Y, 252W, 254T, 256Q, 256E, 256D, 433R, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H (Dall Acqua et al. Journal of Immunology, 2002, 169:5171-5180, Dall' Acqua et al., 2006, Journal of Biological Chemistry 281:23514-23524); см. патент США № 8367805.

Модификация определенных консервативных остатков в Fc IgG (I253/H310/Q311/H433/N434), как, например, вариант N434A (Yeung et al. (2009) J. Immunol. 182:7663), предлагалась в качестве способа повышения аффинности в отношении FcRn, тем самым повышая период полувыведения антитела из кровотока; WO 98/023289. Было показано, что комбинированный вариант Fc, содержащий M428L и N434S, повышает связывание с FcRn и повышает период полувыведения из сыворотки до пятикратного значения. Zalevsky et al. (2010) Nat. Biotechnol. 28:157. Комбинированный вариант Fc, содержащий модификации T307A, E380A и N434A, также увеличивает период полувыведения антител IgG1. Petkova et al. (2006J) Int. Immunol. 18:1759. Кроме того, было также показано, что комбинированные варианты Fc, содержащие M252Y/M428L, M428L/N434H, M428L/N434F, M428L/N434Y, M428L/N434A, M428L/N434M и M428L/N434S, увеличивают период полувыведения; WO 2009/086320.

Кроме того, комбинированный вариант Fc, содержащий M252Y, S254T и T256E, увеличивает период полувыведения почти в 4 раза. Dall'Acqua et al. (2006) J. Biol. Ghem. 281:23514. Родственная модификация IgG1, обеспечивающая повышенную аффинность в отношении FcRn, но уменьшенную зависимость от pH (M252Y/S254T/T256E/H433K/ N434F), была применена для создания конструкта IgG1 ("MST-HN Abdeg") для применения в качестве конкурента для предотвращения связывания других антител с FcRn, что приводило к в результате к повышенному клиренсу указанного другого антитела, либо эндогенного IgG (например, в условиях аутоиммунного процесса), либо другого экзогенного (терапевтического) mAb. Vaccaro et al. (2005) Nat. Biotechnol. 23:1283; международная заявка WO 2006/130834.

Другие модификации для повышения связывания с FcRn описаны в Yeung et al. (2010) J. Immunol. 182:7663-7671; 6277375; 6821505; в международных заявках WO 97/34631; WO 2002/060919.

В соответствии с определенными вариантами осуществления гибридные изотипы IgG можно применять для повышения связывания с FcRn и потенциально возможного увеличения периода полувыведения. Например, гибридный вариант IgG1/IgG3 можно сконструировать, заменяя соответствующие IgG1 положения в CH2- и/или CH3-участках аминокислотами из IgG3 в положениях, по которым два изотипа различаются. Следовательно, можно сконструировать гибридный вариант антитела IgG, который содержит одну или несколько замен, например 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R и 436F. В соответствии с другими вариантами осуществления, описанными в данном документе, гибридный вариант IgG1/IgG2 можно сконструировать, заменяя соответствующие IgG2 положения в CH2 и/или CH3 участках на аминокислоты из IgG1 в положениях, по которым два изотипа различаются. Следовательно, можно сконструировать гибридный вариант антитела IgG, который содержит одну или несколько замен, например одну или несколько из следующих аминокислотных замен: 233E, 234L, 235L, -236G (относится к вставке глицина в положении 236) и 327A; см. патент США № 8629113. Были получены последовательности гибрида IgG1/IgG2/IgG4, которые предположительно повышают период полувыведения из сыворотки и улучшают экспрессию; патент США № 7867491 (последовательность номер 18 в указанном источнике).

Период полувыведения из сыворотки у антител согласно настоящему изобретению также можно увеличить посредством пегилирования. Антитело можно пегилировать, например, для повышения периода полувыведения антитела из организма (например, из сыворотки). Для пегилирования антитела, как правило, осуществляют реакцию антитела или его фрагмента с полиэтиленгликолевым (PEG) реактивом, таким как реакционноспособное сложноэфирное или альдегидное производное PEG, в условиях, при которых одна или несколько групп PEG становятся прикрепленными к антителу или фрагменту антитела. Предпочтительно пегилирование выполняют посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования с использованием реакционноспособной молекулы PEG (или аналогичного реакционноспособного водорастворимого полимера). Предполагается, что используемый в данном документе термин "полиэтиленгликоль" охватывает любую из форм PEG, которые использовались для получения производных других белков, как, например, моно(C1-C10)алкокси- или арилоксиполиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеимид. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело, подлежащее пе-

гилированию, представляет собой агликозилированное антитело. Методы пегилирования белков известны в уровне техники, и их можно применять к антителам, описанным в данном документе; см., например, европейский патент EP 0154316 за авторством Nishimura et al. и европейский патент EP 0401384 за авторством Ishikawa et al.

В качестве альтернативы, в некоторых обстоятельствах желательным может быть уменьшение периода полувыведения антитела согласно настоящему изобретению, а не его увеличение. Модификации, такие как I253A (Hornick et al. (2000) J. Nucl. Med. 41:355) и H435A/R I253A или H310A (Kim et al. (2000) Eur. J. Immunol. 29:2819), в Fc человеческого IgG1 могут снижать связывание с FcRn, тем самым снижая период полувыведения (повышая клиренс) для применений в ситуациях, когда предпочтительным является быстрый клиренс, как, например, при медицинской визуализации; см. также Kenanova et al. (2005) Cancer Res. 65:622. Другие средства для повышения клиренса включают в себя смену формата антигенсвязывающих доменов согласно настоящему изобретению для создания фрагментов антитела, лишенных способности к связыванию с FcRn, таких как Fab фрагменты. Такая модификация может снижать период полувыведения из кровотока у антитела с пары недель до периода порядка нескольких часов. Селективное пегилирование фрагментов антитела можно затем использовать для тонкой настройки (повышения) периода полувыведения фрагментов антитела, если необходимо; Chapman et al. (1999) Nat. Biotechnol. 17:780. Фрагменты антитела также могут быть слиты с человеческим сывороточным альбумином, например, в конструкте слитого белка для повышения периода полувыведения; Yeh et al. (1992) Proc. Nat'l Acad. Sci. 89:1904. В качестве альтернативы, можно сконструировать биспецифичное антитело с первым антигенсвязывающим доменом согласно настоящему изобретению и вторым антигенсвязывающим доменом, который связывается с человеческим сывороточным альбумином (HSA); см. публикацию международной заявки WO 2009/127691 и ссылки на патентные документы, упоминаемые в ней. В качестве альтернативы, для повышения периода полувыведения к фрагментам антител могут быть добавлены специализированные полипетидные последовательности, например полипетидные последовательности "XTEN". Schellenberger et al. (2009) Nat. Biotechnol. 27:1186; публикация международной заявки WO 2010/091122.

Дополнительные варианты Fc.

При применении константного домена IgG4 предпочтительным обычно является включение замены S228P, которая имитирует последовательность шарнира в IgG1 и тем самым стабилизирует молекулы IgG4, например, снижая обмен Fab-областями между терапевтическим антителом и эндогенным IgG4 у пациента, получающего лечение; Labrijn et al. (2009) Nat. Biotechnol. 27:767; Reddy et al. (2000) J. Immunol. 164:1925.

Потенциальный сайт расщепления протеазой в шарнире конструктов IgG1 можно устранить с помощью модификаций D221G и K222S, что повышает стабильность антитела. WO 2014/043344.

Показатели аффинности и свойства связывания у Fc-варианта в отношении его лигандов (Fc-рецепторы) можно определить с помощью ряда методов in vitro анализа (биохимические или иммунологические анализы), известных в уровне техники, в том числе без ограничения методы оценки в равновесном состоянии (например, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) или радиоиммунологический анализ (RIA)) или методы оценки кинетических характеристик (например, анализ SPR методом BIACORE®), а также другие методы, такие как непрямые анализы связывания, анализы конкурентного ингибирования, резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET), электрофорез в геле и хроматографию (например, гель-фильтрацию). В этих и других методах может использоваться метка на одном или нескольких из оцениваемых компонентов, и/или в них может использоваться ряд методов выявления, включающих без ограничения хромогенные, флуоресцентные, люминесцентные или изотопные метки. Подробное описание аффинностей связывания и кинетических характеристик связывания можно найти в Paul, W. E., ed., Fundamental Immunology, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999), в которой делается упор на взаимодействие антитело-иммуноген.

В соответствии с другими вариантами осуществления гликозилирование антитела модифицируют с целью усиления или ослабления эффекторной функции. Например, агликозилированное антитело, у которого отсутствуют все эффекторные функции, можно получить посредством мутирования консервативного аспарагинового остатка в положении 297 (например, N297A), тем самым нарушая связывание с комплементом и FcγRI. Bolt et al. (1993) Eur. J. Immunol. 23:403; см. также Tao & Morrison (1989) J. Immunol. 143:2595 (где использовали N297Q в IgG1 для исключения гликозилирования в положении 297).

Хотя агликозилированные антитела обычно лишены эффекторной функции, для восстановления этой функции могут быть введены мутации. Агликозилированные антитела, например антитела, полученные в результате мутаций N297A/C/D/или H или полученные в системах (например, E. coli), которые не гликозилируют белки, можно дополнительно мутировать для восстановления связывания с FcγR, например S298G и/или T299A/G/или H (WO 2009/079242), или E382V и M428I (Jung et al. (2010) Proc. Nat'l Acad. Sci (USA) 107:604).

Кроме того, антитело с повышенной ADCC может быть получено посредством изменения гликозилирования. Например, было показано, что удаление фукозы из олигосахаридов, связанных с остатком Asn297 в тяжелой цепи, повышает ADCC, что обусловлено улучшенным связыванием с FcγRIIIa. Shields

et al. (2002) JBC 277:26733; Niwa et al. (2005) J. Immunol. Methods 306: 151; Cardarelli et al. (2009) Clin. Cancer Res. 15:3376 (MDX-1401); Cardarelli et al. (2010) Cancer Immunol. Immunotherap. 59:257 (MDX-1342). Такие антитела с низким содержанием фукозы можно получать, например, в нокаутных клетках яичника китайского хомячка (CHO, лишенных фукозилтрансферазы (FUT8) (Yamane-Ohnuki et al. (2004) Biotechnol. Bioeng. 87:614), или в других клетках, в которых образуются афукозилированные антитела; см., например, Zhang et al. (2011) mAbs 3:289 и Li et al. (2006) Nat. Biotechnol. 24:210 (в обеих описывается получение антител в подвергнутом воздействию методов гликоинженерии Pichia pastoris); Mossner et al. (2010) Blood 115:4393; Shields et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733; Shinkawa et al. (2003) J. Biol. Chem. 278:3466; европейский патент EP 1176195B1. ADCC также можно повысить, как описано в PCT публикации международной заявки WO 03/035835, в которой раскрыто применение варианта клеточной линии CHO, Lec13, с уменьшенной способностью к прикреплению фукозы к Asn(297)-связанным углеводам, что также приводит в результате к гипофукозилированию антител, экспрессирующихся в такой клетке-хозяине (см. также, Shields, R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740). В качестве альтернативы, аналоги фукозы можно добавлять в среду культивирования в ходе получения антитела для ингибирования включения фукозы в углевод на антителе. WO 2009/135181.

Повышение содержания структур с дополнительным остатком GlcNAc в точке ветвления в олигосахаридах, связанных с антителом, также повышает ADCC. В PCT публикации международной заявки WO 99/54342 за авторством Umana et al. описываются клеточные линии, сконструированные для экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, бета(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), таким образом, такие антитела, экспрессирующиеся в сконструированных клеточных линиях, проявляют повышенное содержание структур с дополнительным остатком GlcNAc в точке ветвления, что приводит в результате к повышенной активности ADCC у антител (см. также, Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180).

Были разработаны дополнительные варианты гликозилирования, которые лишены остатков галактозы, сиаловой кислоты, фукозы и ксилозы (так называемые GNGN гликоформы), которые проявляют повышенную ADCC и ADCP, но у которых понижена CDC, а также другие, которые лишены сиаловой кислоты, фукозы и ксилозы (так называемые G1/G2 гликоформы), которые проявляют повышенную ADCC, ADCP и CDC. Публикация заявки на патент США № 2013/0149300. Антитела с такими профилями гликозилирования необязательно получают в генетически модифицированных растениях N. benthamiana, в которых эндогенные гены ксилозил- и фукозилтрансферазы подверглись нокауту.

Методы гликоинженерии также можно применять для модификации противовоспалительных свойств конструкта IgG посредством изменения содержания α2,6-сиалила в углеводных цепях, прикрепленных к Asn297 в Fc-участках, причем повышенная доля α2,6-сиалилированных форм приводит в результате к повышенным противовоспалительным эффектам; см. Nimmerjahn et al. (2008) Ann. Rev. Immunol. 26:513. Напротив, снижение доли антител с α2,6-сиалилированными углеводами может быть полезным в случаях, когда противовоспалительные свойства не требуются. Способы модификации степени α2,6-сиалилирования антител, например, посредством селективной очистки α2,6-сиалилированных форм или посредством модификации с помощью фермента, представлены в публикации заявки на патент США № 2008/0206246. В соответствии с другими вариантами осуществления аминокислотная последовательность Fc-участка может быть модифицирована с целью имитации эффекта α2,6-сиалилирования, например, посредством включения модификации F241A. WO 2013/095966.

VIII. Физические свойства антитела.

Антитела, описанные в данном документе, могут содержать один или несколько сайтов гликозилирования в вариабельном участке либо легкой, либо тяжелой цепи. Такие сайты гликозилирования могут приводить в результате к повышенной иммуногенности антитела или к изменению pK антитела вследствие измененного связывания с антигеном (Marshall et al. (1972) Annu Rev Biochem 41:673-702; Gala and Morrison (2004) J. Immunol 172:5489-94; Wallick et al. (1988) J Exp Med 168:1099-109; Spiro (2002) Glycobiology 12:43R-56R; Parekh et al. (1985) Nature 316:452-7; Mimura et al. (2000) Mol Immunol 37:697-706). Известно, что гликозилирование происходит в мотивах, содержащих последовательность N-X-S/T. В некоторых случаях было бы предпочтительно иметь антитело к CD73, которое не содержит гликозилирование в вариабельном участке. Этого можно достичь либо посредством селекции антител, которые не содержат мотив гликозилирования в вариабельном участке, либо посредством мутирования остатков в пределах участка гликозилирования.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела, описанные в данном документе, не содержат сайты изомеризации аспарагина. Дезамидирование аспарагина может происходить в последовательностях N-G или D-G, и оно может приводить в результате к образованию остатка изоаспарагиновой кислоты, который может вносить изгиб в полипептидную цепь и может снижать ее стабильность (эффект изоаспарагиновой кислоты). Например, если аминокислотная последовательность Asp-Gly присутствует в последовательностях CDR тяжелой и/или легкой цепей антитела, последовательность заменена на аминокислотную последовательность, которая не подвергается изомеризации. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело содержит последовательность CDR2 вариабельного уча-

стка тяжелой цепи, изложенную в SEQ ID NO: 6, но при этом Asp или Gly в последовательности Asp-Gly (VILYDGSNKYYPDSVKG; SEQ ID NO: 6) заменен на аминокислотную последовательность, которая не подвергается изомеризации, например последовательность Asp-Ser или Ser-Gly.

Каждое антитело будет характеризоваться уникальной изоэлектрической точкой (pI), которая обычно попадает в диапазон значений pH от 6 до 9,5. pI для антитела IgG1, как правило, попадает в пределы диапазона значений pH 7-9,5, и pI для антитела IgG4, как правило, попадает в пределы диапазона значений pH 6-8. Существует предположение, что антитела с pI за пределами нормального диапазона могут характеризоваться некоторым развертыванием и нестабильностью в условиях in vivo. Следовательно, предпочтительно иметь антитело к CD73, которое имеет значение pI, попадающее в нормальный диапазон. Этого можно достичь либо посредством селекции антител с pI в нормальном диапазоне, либо посредством мутирования заряженных поверхностных остатков.

Каждое антитело будет иметь характерную температуру плавления, причем более высокая температура плавления указывает на более высокую общую стабильность in vivo (Krishnamurthy R and Manning M C (2002) Curr Pharm Biotechnol 3:361-71). В целом, предпочтительно, чтобы T_{M1} (температура начала развертывания) была больше чем 60°C, предпочтительно больше чем 65°C, еще более предпочтительно больше чем 70°C. Температуру плавления антитела можно измерить с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (Chen et al. (2003) Pharm Res 20:1952-60; Ghirlando et al. (1999) Immunol Lett 68:47-52) или кругового дихроизма (Murray et al. (2002) J. Chromatogr Sci 40:343-9).

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления выбирают антитела, которые не разрушаются быстро. Разрушение антитела можно измерить с помощью капиллярного электрофореза (CE) и MALDI-MS (Alexander A J and Hughes D E (1995) Anal Chem 67:3626-32).

В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления выбирают антитела, которые характеризуются минимальными эффектами агрегации, которые могут приводить к запуску нежелательной иммунной реакции и/или к измененным или неблагоприятным фармакокинетическим свойствам. Обычно приемлемыми являются антитела с агрегацией, составляющей 25% или менее, предпочтительно 20% или менее, еще более предпочтительно 15% или менее, еще более предпочтительно 10% или менее и еще более предпочтительно 5% или менее. Агрегацию можно измерить с помощью нескольких методик, в том числе с помощью колоночной гель-хроматографии (SEC), высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) и рассеяния света.

IX. Способы конструирования антител.

Как обсуждалось выше, антитела к CD73, имеющие последовательности V_H и V_L, раскрытые в данном документе, можно применять для создания новых антител к CD73 путем модификации последовательностей V_H и/или V_L или константного участка(участков), прикрепленного(прикрепленных) к ним. Таким образом, в соответствии с другим аспектом, описанным в данном документе, структурные признаки антитела к CD73, описанного в данном документе, например CD73.4, 11F11, 4C3, 4D4, 10D2, 11A6, 24H2, 5F8, 6E11 и/или 7A11, применяют для создания структурно родственных антител к CD73, которые сохраняют по меньшей мере одно функциональное свойство антител, описанных в данном документе, такое как связывание с человеческим CD73 и CD73 яванского макака. Например, один или несколько CDR участков в 11F11, 4C3, 4D4, 10D2, 11A6, 24H2, 5F8, 6E11 и/или 7A11 или их мутантных вариантов можно объединить с известными каркасными участками и/или другими CDR с использованием методов на основе рекомбинации для создания дополнительных сконструированных с помощью методов на основе рекомбинации антител к CD73, описанный в данном документе, как обсуждалось выше. Другие типы модификаций включают в себя описанные в предыдущем разделе. Исходным материалом для способа конструирования являются одна или несколько из последовательностей V_H и/или V_L, представленных в данном документе, или один или несколько их CDR участков. Для создания сконструированного антитела не нужно фактически получать (т.е. экспрессировать в виде белка) антитело, имеющее одну или несколько из последовательностей V_H и/или V_L, представленных в данном документе, или один или несколько их CDR участков. Предпочтительнее, информацию, содержащуюся в последовательности(последовательностях) используют в качестве исходного материала для создания последовательности(последовательностей) "второго поколения", происходящих из исходной последовательности(последовательностей), а затем последовательность(последовательности) "второго поколения" получают и экспрессируют в виде белка.

Соответственно в данном документе предполагаются способы получения антитела к CD73, предусматривающие:

(a) обеспечение: (i) последовательности вариабельного участка тяжелой цепи антитела, содержащей последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 17, 33, 41, 53, 61, 69, 81 и 89, последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 18, 34, 42, 54, 62, 70, 82 и 90, и/или последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, 19, 35, 43, 55, 63, 71, 83 и 91; и (ii) последовательности вариабельного участка легкой цепи антитела, содержащей последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9, 13, 21, 25, 29, 37, 45, 49, 57, 65, 73, 77, 85 и 93, последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 14, 22, 26, 30, 38, 46, 50, 58, 66, 74, 78, 86 и 94, и/или последовательность CDR3, выбранную из группы,

состоящей из SEQ ID NO: 11, 15, 23, 27, 31, 39, 47, 51, 59, 67, 75, 79, 87 и 95;

(b) изменение по меньшей мере одного аминокислотного остатка в пределах последовательности вариабельного участка тяжелой цепи антитела и/или последовательности вариабельного участка легкой цепи антитела с созданием по меньшей мере одной измененной последовательности антитела; и

(c) экспрессию измененной последовательности антитела в виде белка.

Для получения и экспрессии измененной последовательности антитела можно применять стандартные методики молекулярной биологии.

Предпочтительно антитело, кодируемое измененной последовательностью(последовательностями) антитела, представляет собой антитело, которое сохраняет одно, некоторые или все из функциональных свойств антител к CD73, описанных в данном документе, которые включают в себя свойства, приведенные в табл. 3.

Измененное антитело может проявлять одно или более, два или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, десять или все из функциональных свойств при использовании функциональных анализов, описанных в данном документе. Функциональные свойства измененных антител можно оценить с помощью стандартных анализов, доступных в уровне техники и/или описанных в данном документе, как, например, анализов, изложенных в разделе примеры (например, ELISA, FACS).

В соответствии с определенными вариантами осуществления способов конструирования антител, описанных в данном документе, мутации можно вводить произвольно или селективно по всей кодирующей последовательности антитела к CD73 или ее части и полученные в результате модифицированные антитела к CD73 можно подвергнуть скринингу в отношении активности связывания и/или других функциональных свойств, которые описаны в данном документе. Способы введения мутаций были описаны в уровне техники. Например, в PCT публикации международной заявки WO 02/092780 за авторством Short описываются способы создания и скрининга мутаций в антителе с использованием насыщающего мутагенеза, сборки с лигированием синтетических фрагментов или их комбинации. В качестве альтернативы, в PCT публикации международной заявки WO 03/074679 за авторством Lazar et al. описываются способы с использованием компьютерных методов скрининга для оптимизации физико-химических свойств антител.

X. Молекулы нуклеиновой кислоты.

Другой аспект, описанный в данном документе, относится к молекула нуклеиновой кислоты, которые кодируют антитела, описанные в данном документе. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенном или практически чистом виде. Нуклеиновая кислота является "выделенной" или "сделанной практически чистой", если она очищена от других клеточных компонентов или других загрязняющих примесей, например других клеточных нуклеиновых кислот (например, другой хромосомной ДНК, например хромосомной ДНК, которая связана с выделенной ДНК в природе) или белков, с помощью стандартных методик, в том числе щелочной обработки/обработки SDS, центрифугирования в градиенте плотности CsCl, воздействия рестрикционных ферментов, колоночной хроматографии, электрофореза в агарозном геле и других методик, широко известных в уровне техники; см., F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Нуклеиновая кислота, описанная в данном документе, может представлять собой, например, ДНК или РНК и может содержать или не содержать интронные последовательности. В соответствии с определенными вариантами осуществления нуклеиновая кислота представляет собой молекулу кДНК.

Нуклеиновые кислоты, описанные в данном документе, можно получить с использованием стандартных методик молекулярной биологии. В случае антител, экспрессируемых гибридомами (например, гибридомами, полученными из трансгенных мышей, несущих гены человеческого иммуноглобулина, как дополнительно описано ниже), кДНК, кодирующие легкие и тяжелые цепи антитела, производимого гибридомой, можно получить можно получить с помощью стандартных методик ПЦР-амплификации или клонирования кДНК В случае антител, получаемых из библиотеки генов иммуноглобулинов (например, с использованием методик фагового дисплея), нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, можно выделить из библиотеки.

Предпочтительными молекулами нуклеиновых кислот, описанными в данном документе, являются молекулы, кодирующие последовательности VH и VL у антител к CD73, описанных в данном документе, например моноклональных антител CD73.4 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11, 7A11, CD73.3 и/или CD73.4. Последовательности ДНК, кодирующие последовательности VH CD73.4 (CD73.4-1 и CD73.4-2) 11F11 (11F11-1 и 11F11-2), 4C3 (4C3-1, 4C3-2 и 4C3-3), 4D4, 10D2 (10D2-1 и 10D2-2), 11A6, 24H2, 5F8 (5F8-1 и 5F8-2), 6E11, 7A11, CD73.3 и CD73.4, изложены в SEQ ID NO: 4, 16, 32, 40, 52, 60, 68, 80, 88, 135 и 170 соответственно. Последовательности ДНК, кодирующие последовательности VL 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 7A11, CD73.3 и/или CD73.4, изложены в SEQ ID NO: 8, 12, 20, 24, 28, 36, 44, 48, 56, 64, 72, 76, 84 и 92 соответственно.

После получения фрагментов ДНК, кодирующих VH и VL сегменты, эти фрагменты ДНК можно

подвергнуть дополнительной манипуляции с помощью стандартных методик рекомбинантной ДНК, например, для превращения генов вариабельного участка в гены полноразмерной цепи антитела, в гены Fab-фрагмента или в ген scFv. При этих манипуляциях фрагмент ДНК, кодирующий VL или VH, является функционально связанным с другим фрагментом ДНК, кодирующим другой белок, такой как константный участок антитела или гибкий линкер. Предполагается, что термин "функционально связанный" при использовании в данном контексте означает, что два фрагмента ДНК соединены таким образом, что аминокислотные последовательности, кодируемые двумя фрагментами ДНК, остаются в одной рамке считывания.

Выделенную ДНК, кодирующую VH участок, можно превратить в ген полноразмерной тяжелой цепи, обеспечив функциональную связь ДНК, кодирующей VH, с другой молекулой ДНК, кодирующей константные участки тяжелой цепи (шарнир, CH1, CH2 и/или CH3). Последовательности генов константного участка тяжелой цепи человека известны в уровне техники (см., например, Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), и фрагменты ДНК, охватывающие эти участки, можно получить с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константный участок тяжелой цепи может представлять собой константный участок IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, например участок IgG1. В случае гена Fab-фрагмента тяжелой цепи ДНК, кодирующая VH, может быть функционально связана с другой молекулой ДНК, кодирующей только CH1 в константном участке тяжелой цепи.

Выделенную ДНК, кодирующую VL участок, можно превратить в ген полноразмерной легкой цепи (также как и ген легкой цепи Fab), обеспечив функциональную связь ДНК, кодирующей VL, с другой молекулой ДНК, кодирующей константный участок легкой цепи, CL. Последовательности генов константного участка легкой цепи человека известны в уровне техники (см., например, Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), и фрагменты ДНК, охватывающие эти участки, можно получить с помощью стандартной ПНР-амплификации. Константный участок легкой цепи может представлять собой константный участок каппа- или лямбда-цепи.

Для создания гена scFv обеспечивают функциональную связь фрагментов ДНК, кодирующих VH и VL, с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например кодирующим аминокислотную последовательность $(Gly_4\text{-}Ser)_3$, в результате чего последовательности VH и VL могут экспрессироваться в виде непрерывного одноцепочечного белка с VL и VH участками, соединенными гибким линкером (см., например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al, (1990) Nature 348:552-554).

Также в данном документе представлены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие последовательности VH и VL или полноразмерные тяжелые и легкие цепи, которые являются гомологичными таким последовательностям у антител, описанных в данном документе, например моноклональных антител 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 7A11, CD73.3 и/или CD73.4. Иллюстративные молекулы нуклеиновой кислоты кодируют последовательности VH и VL, которые по меньшей мере на 70% идентичны, например по меньшей мере на 75, по меньшей мере на 80, по меньшей мере на 85, по меньшей мере на 90, по меньшей мере на 95 или по меньшей мере на 99% идентичны молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим последовательности VH и VL или полноразмерные тяжелые и легкие цепи моноклональных антител 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 7A11, CD73.3 и/или CD73.4, например последовательностям, изложенным в табл. 35. Например, в данном документе представлены антитела к CD73, содержащие VH цепь и VL цепь, которые кодируются нуклеотидными последовательностями, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичными SEQ ID NO: 139 и SEQ ID NO: 140 или 141; SEQ ID NO: 237 и SEQ ID NO: 140 или 141; SEQ ID NO: 142 и SEQ ID NO: 143, 144 или 145; SEQ ID NO: 146 и SEQ ID NO: 147; SEQ ID NO: 148 и SEQ ID NO: 149 или 150; SEQ ID NO: 151 и SEQ ID NO: 152; SEQ ID NO: 153 и SEQ ID NO: 154; SEQ ID NO: 155 и SEQ ID NO: 156, или 157, или 242; SEQ ID NO: 158 и SEQ ID NO: 159; SEQ ID NO: 160 и SEQ ID NO: 161. Также предполагаются антитела к CD73, содержащие тяжелую цепь и легкую цепь, которые кодируются нуклеотидными последовательностями, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичными SEQ ID NO: 134, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 243, 266 (тяжелая цепь) и SEQ ID NO: 244 или 245 (легкая цепь); SEQ ID NO: 211, 212, 213 или 246 и SEQ ID NO: 247, 248 или 249; SEQ ID NO: 235, 236 или 250 и 251; SEQ ID NO: 252 и SEQ ID NO: 253 или 254; SEQ ID NO: 255 и SEQ ID NO: 256; SEQ ID NO: 257 и SEQ ID NO: 258; SEQ ID NO: 259 и SEQ ID NO: 260 или 261; SEQ ID NO: 262 и SEQ ID NO: 263; SEQ ID NO: 264 и SEQ ID NO: 265. В данном документе также предполагаются молекулы нуклеиновой кислоты с молчащими мутациями (т.е. изменениями оснований, которые не изменяют образующуюся в результате аминокислотную последовательность после трансляции молекулы нуклеиновой кислоты), например, для оптимизации кодонов.

XI. Получение антитела.

Различные антитела согласно настоящему изобретению, например антитела, которые конкурируют с антителами к человеческому CD73 или связываются с тем же эпитопом, что и антитела к человеческо-

му CD73, раскрытые в данном документе, могут быть получены с применением ряда известных методик, таких как стандартная методика гибридизации соматических клеток, описанная Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975). Несмотря на что что предпочтительными являются процедуры гибридизации соматических клеток, в принципе, для получения моноклональных антител также можно использовать другие методики, например вирусную или онкогенную трансформацию В-лимфоцитов, методики фагового дисплея с использованием библиотек генов человеческих антител.

Предпочтительной животной системой для получения гибридом является мышиная система. Получение гибридом у мыши является хорошо отлаженной процедурой. Протоколы иммунизации и методики выделения иммунизированных спленоцитов для слияния известны в уровне техники. Также известны клетки-партнеры для слияния (например, клетки миеломы мыши) и процедуры слияния.

Химерные или гуманизированные антитела, описанные в данном документе, можно получить на основе последовательности мышиного моноклонального антитела, полученного, как описано выше. ДНК, кодирующие иммуноглобулины с тяжелой и легкой цепями можно получить из представляющей интерес мышиной гибридомы, и их можно сконструировать таким образом, чтобы они содержали последовательности иммуноглобулина, не являющиеся мышиными (например, человеческие), с использованием стандартных методик молекулярной биологии. Например, для создания химерного антитела мышиные вариабельные участки можно связать с человеческими константными участками с помощью методов, известных в уровне техники (см., например, патент США № 4816567 за авторством Cabilly et al.). Для создания гуманизированного антитела мышиные CDR участки можно вставить в человеческий каркас с использованием методов, известных в уровне техники (см., например, патент США № 5225539 за авторством Winter, и патенты США №№ 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 за авторством Queen et al.).

В соответствии с одним вариантом осуществления антитела, описанные в данном документе, представляют собой человеческие моноклональные антитела. Такие человеческие моноклональные антитела, направленные против CD73, можно получать с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих части человеческой иммунной системы вместо мышиной системы. Эти трансгенные и трансхромосомные мыши включают мышей, называемых в данном документе HuMAb-мышами и KM-мышами соответственно, и которые собирательно называются в данном документе "мыши с человеческим Ig".

Мышь HuMAb® (Medarex, Inc.) содержит минилокусы с генами человеческого иммуноглобулина, которые кодируют не подвергшиеся перегруппировке последовательности тяжелой (μ и γ) и κ-легкой цепей человеческого иммуноглобулина, вместе с целенаправленными мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы μ- и κ-цепей (см., например, Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859). Соответственно мыши проявляют пониженную экспрессию мышиного IgM или κ и в ответ на иммунизацию введенные трансгены человеческих тяжелой и легкой цепей подвергаются переключению класса и соматической мутации с образованием высокоаффинных моноклональных человеческих IgGK (Lonberg, N. et al. (1994), выше; обсуждается в Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93, и в Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. NY. Acad. Sci. 764:536-546). Получение и применение HuMab-мышей и геномных модификаций, которые несут такие мыши, дополнительно описано в Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuaillon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724; Choi et al. (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuaillon et al. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591; и Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851, причем содержание каждого из данных источников специально включено в данный документ посредством ссылки во всей полноте; см., кроме того, патенты США №№ 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299 и 5770429, все за авторством Lonberg и Kay; патент США № 5545807 за авторством Surani et al.; PCT публикации международных заявок №№ WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 и WO 99/45962, все за авторством Lonberg и Kay; и PCT публикацию международной заявки № WO 01/14424 за авторством Korman et al.

В соответствии с определенными вариантами осуществления выработку антител, описанных в данном документе, индуцируют с использованием мыши, которая несет последовательности человеческого иммуноглобулина в трансгенах и трансхромосомах, такой как мышь, которая несет трансген человеческой тяжелой цепи и трансхромосому человеческой легкой цепи. Такие мыши, называемые в данном документе "KM-мышами", подробно описаны в PCT публикации международной заявки WO 02/43478 за авторством Ishida et al.

Кроме того, в уровне техники доступны альтернативные системы на основе трансгенных животных, экспрессирующих гены человеческих иммуноглобулинов, и их можно использовать для индукции выработки антител к CD73, описанных в данном документе. Например, можно использовать альтернативную трансгенную систему, называемую Xenomouse (Abgenix, Inc.); такие мыши описаны, например, в патентах США №№ 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6162963 за авторством Kucherlapati et al.

Более того, в уровне техники доступны альтернативные системы на основе трансхромосомных жи-

вотных, экспрессирующих гены человеческих иммуноглобулинов, и их можно использовать для индукции выработки антител к CD73, описанных в данном документе. Например, можно использовать мышей, несущих как трансхромосому с человеческой тяжелой цепью, так и трансхромосому с человеческой легкой цепью, называемых "TC-мышами"; такие мыши описаны в Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Более того, в уровне техники были описаны коровы, несущие трансхромосомы с человеческими тяжелой и легкой цепями (Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894), и их можно использовать для индукции выработки антител к CD73, описанных в данном документе.

Дополнительные описанные в уровне техники мышиные системы для индукции выработки человеческих антител, например человеческих антител к CD73, включают в себя: (i) мышь VelocImmune® (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.), у которой эндогенные мышиные вариабельные участки тяжелой и легкой цепей были заменены посредством гомологичной рекомбинации на человеческие вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, функционально связанные с эндогенными мышиными константными участками, в результате чего у мышей индуцируется выработка химерных антител (человеческий V/мышиный C), а затем их превращают в полностью человеческие антитела с помощью стандартных методик с использованием рекомбинантной ДНК; и (ii) мышь MeMo® (Merus Biopharmaceuticals, Inc.), где мышь содержит не подвергшиеся перегруппировке вариабельные участки тяжелой цепи человека, но также подвергшийся перегруппировке обычный человеческий вариабельный участок легкой цепи. Такие мыши и их применение для индукции выработки антител описаны, например, в патентных заявках WO 2009/15777, US 2010/0069614, WO 2011/072204, WO 2011/097603, WO 2011/163311, WO 2011/163314, WO 2012/148873, US 2012/0070861 и US 2012/0073004.

Человеческие моноклональные антитела, описанные в данном документе, также можно получить с использованием методов фагового дисплея для скрининга библиотек генов человеческих иммуноглобулинов. Такие методы фагового дисплея для выделения человеческих антител являются общепринятыми в данной области техники; см., например, патенты США №№ 5223409; 5403484 и 5571698 за авторством Ladner et al.; патенты США №№ 5427908 и 5580717 за авторством Dower et al; патенты США №№ 5969108 и 6172197 за авторством McCafferty et al. и патенты США №№ 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081 за авторством Griffiths et al.

Человеческие моноклональные антитела, описанные в данном документе, также можно получить с использованием SCID-мышей, в которых были воссозданы человеческие иммунные клетки, в результате чего в ответ на иммунизацию могут продуцироваться человеческие антитела. Такие мыши описаны, например, в патентах США №№ 5476996 и 5698767 за авторством Wilson et al.

Процедуры иммунизации.

Для получения полностью человеческих антител к CD73 трансгенных или трансхромосомных мышей, содержащих гены человеческих иммуноглобулинов (например, HCo12, HCo7 или KM-мышей), можно иммунизировать очищенным или обогащенным препаратом антигена CD73 и/или клетками, экспрессирующими CD73, как описано для других антигенов, например, в Lonberg et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851; и в международной заявке WO 98/24884. В качестве альтернативы мышей можно иммунизировать ДНК, кодирующей человеческий CD73. Предпочтительно при первой инфузии мыши будут иметь возраст 6-16 недель. Например, очищенный или обогащенный препарат (5-50 мкг) рекомбинантного антигена CD73 можно использовать для внутрибрюшинной иммунизации HuMAb-мышей. В том случае, если иммунизации с использованием очищенного или обогащенного препарата антигена CD73 не приводят в результате к образованию антител, мышей также можно иммунизировать клетками, экспрессирующими CD73, например, из клеточной линии, для стимуляции иммунных реакций. Иллюстративные клеточные линии включают в себя сверхэкспрессирующие CD73 стабильные клеточные линии CHO и Raji.

Накопленный опыт с использованием различных антигенов показал, что трансгенные мыши HuMAb реагируют наилучшим образом, когда первоначально их иммунизируют внутрибрюшинно (IP) или подкожно (SC) антигеном с адъювантом Райби с последующими IP/SC иммунизациями раз в две недели (в общей сложности до 10) антигеном в адъюванте Райби. Иммунные реакции можно отслеживать в ходе выполнения протокола иммунизации с использованием образцов плазмы, полученных из крови, забранной из ретроорбитального синуса. Плазму можно подвергать скринингу с помощью методов ELISA и FACS (как описано ниже), и мышей с достаточными титрами иммуноглобулина человеческого антитела к CD73 можно использовать для слияний. Мышей можно подвергнуть бустер-иммунизации антигеном внутривенно за 3 суток до умерщвления и удаления селезенки и лимфатических узлов. Ожидается, что может быть необходимо осуществление 2-3 слияний для каждой иммунизации. Каждым антигеном иммунизируют, как правило, от 6 до 24 мышей. Обычно используют линии HCo7, HCo12 и KM. Кроме того, оба трансгена HCo7 и HCo12 можно ввести посредством скрещивания в одну мышь, имеющую два разных трансгена человеческой тяжелой цепи (HCo7/HCo12).

Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к CD73 Для получения гибридом, продуцирующих человеческие моноклональные антитела, описанные в данном документе, спленоциты и/или клетки лимфатических узлов из иммунизированных мышей можно выделить и подвергнуть слиянию с соответствующей линией иммортализированных клеток, такой как линия клеток миеломы мыши.

Полученные в результате гибридомы можно подвергнуть скринингу в отношении продуцирования антигенспецифичных антител. Например, суспензии отдельных клеток лимфоцитов селезенки из иммунизированных мышей можно подвергнуть слиянию с Sp2/0 клетками несекретирующей миеломы мыши (ATCC, CRL 1581) с использованием 50% PEG. Клетки высаживали в количестве примерно 2×10^5 в плоскодонный микротитровальный планшет с последующим двухнедельным инкубированием в селективной среде, содержащей 10% фетальной сыворотки (fetal Clone Serum), 18% кондиционированной среды "653", 5% реактива origen (IGEN), 4 мМ L-глутамин, 1 мМ пируват натрия, 5 мМ HEPES, 0,055 мМ 2-меркаптоэтанола, 50 единиц/мл пенициллина, 50 мг/мл стрептомицина, 50 мг/мл гентамицина и 1X HAT (Sigma). Примерно через две недели клетки можно культивировать в среде, в которой HAT заменен на HT. Затем отдельные лунки можно подвергнуть скринингу в отношении человеческих моноклональных антител IgM и IgG с помощью метода ELISA. Если имеет место существенный рост гибридомы, среду можно подвергнуть наблюдению через 10-14 суток. Гибридомы, секретирующие антитело, можно пересадить, вновь подвергнуть скринингу, и если они все еще являются положительными в отношении человеческого IgG, моноклональные антитела можно субклонировать по меньшей мере дважды при использовании метода серийных разведений. Стабильные субклоны можно затем культивировать in vitro с получением небольших количеств антитела для характеристики в среде для тканевой культуры.

Чтобы очистить человеческие моноклональные антитела, отобранные гибридомы можно выращивать в двухлитровых вращающихся колбах для очистки моноклональных антител. Супернатанты можно профильтровать и концентрировать перед проведением аффинной хроматографии с использованием иммобилизированного на сефарозе белка A (Pharmacia, Пискатауэй, Нью-Джерси). Элюированный IgG можно подвергнуть проверке с помощью электрофореза в геле и высокоэффективной жидкостной хроматографии, чтобы гарантировать чистоту. Буферный раствор можно заменить на PBS, и концентрацию можно определить по OD280 (оптической плотности при длине волны 280 нм) с использованием коэффициента экстинкции 1,43. Моноклональные антитела можно разделить на аликвоты и хранить при -80°C.

XII. Получение антитела.

Получение трансфектом, продуцирующих моноклональные антитела к CD73 Антитела согласно настоящему изобретению, в том числе как специфичные антитела, последовательности для которых последовательности представлены, так и другие родственные антитела к CD73, могут вырабатываться в трансфектоме на основе клетки-хозяина, например, с помощью комбинации методик с использованием рекомбинантной ДНК и методов трансфекции генов, которые широко известны в уровне техники (Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Например, для экспрессии антител или фрагментов данных антител ДНК, кодирующие часть легкой и тяжелой цепей или полноразмерные легкую и тяжелую цепи, можно получить с помощью стандартных методик молекулярной биологии (например, ПЦР-амплификации или клонирования кДНК с использованием гибридомы, которая экспрессирует антитело, представляющее интерес) и ДНК можно встроить в векторы экспрессии таким образом, чтобы гены были функционально связаны с последовательностями контроля транскрипции и трансляции. В данном контексте термин "функционально связанный", как предполагается, означает, что ген антитела лигирован в вектор таким образом, что последовательности контроля транскрипции и трансляции в векторе выполняют свою целевую функцию, заключающуюся в регуляции транскрипции и трансляции гена антитела. Вектор экспрессии и последовательности контроля экспрессии выбирают таким образом, чтобы они были совместимы с используемой для экспрессии клеткой-хозяином. Ген легкой цепи антитело и ген тяжелой цепи антитела могут быть встроены в отдельные векторы или оба гена встроены в один и тот же вектор экспрессии. Гены антитела встраивают в вектор(векторы) экспрессии с помощью стандартных методов (например, лигирования комплементарных сайтов рестрикции в фрагмент гена антитела и вектор или лигирования тупых концов, если сайты рестрикции отсутствуют). Вариабельные участки легкой и тяжелой цепи в антителах, описанных в данном документе, можно применять для создания генов полноразмерного антитела для антител любого изотипа посредством встраивания этих вариабельных участков в векторы экспрессии, уже кодирующие константные участки тяжелой цепи и константные участки легкой цепи желаемого изотипа, в результате чего V_H сегмент является функционально связанным с C_H сегментом(сегментами) в векторе, а V_L сегмент является функционально связанным с C_L сегментом в векторе. В качестве дополнения или альтернативы, рекомбинантный вектор экспрессии может кодировать сигнальный пептид, который облегчает секрецию цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антитела можно клонировать в вектор таким образом, чтобы сигнальный пептид был связан в одной рамке считывания с аминоконцом в гене цепи антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (т.е. сигнальный пептид из белка, не являющегося иммуноглобулином).

Помимо генов цепей антитела, рекомбинантные векторы экспрессии могут нести регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепей антитела в клетке-хозяине. Предполагается, что термин "регуляторная последовательность" включает в себя промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования), которые контролируют транскрипцию или трансляцию генов цепей антитела. Такие регуляторные последовательности описаны, на-

пример, в Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Специалисту в данной области техники будет понятно, что построение вектора экспрессии, в том числе выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, уровень экспрессии желаемого белка и т.д. Предпочтительные регуляторные последовательности для экспрессии в клетке-хозяине из млекопитающего животного включают в себя вирусные элементы, которые приводят к высоким уровням экспрессии белка в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, происходящие из цитомегаловируса (CMV), вируса обезьян 40 (SV40), аденовируса (например, большой поздний промотор аденовируса (AdMLP)) и вируса полиомы. В качестве альтернативы, можно использовать невирусные регуляторные последовательности, такие как убиквитиновый промотор или β-глобиновый промотор. Кроме того, регуляторные элементы, состоящие из последовательностей из разных источников, такие как промоторная система SRa, которая содержит последовательности из раннего промотора SV40 и длинный концевой повтор из вируса Т-клеточного лейкоза человека типа 1 (Takebe, Y. et al. (1988) Mol Cell. Biol. 8:466-472).

Помимо генов цепей антитела и регуляторных последовательностей, рекомбинантные векторы экспрессии могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации) и гены селектируемых маркеров. Ген селектируемого маркера облегчает селекцию клеток-хозяев, в которые был введен вектор (см., например, патенты США №№ 4399216, 4634665 и 5179017, все за авторством Axel et al.). Например, как правило, ген селектируемого маркера придает клетке-хозяину, в которую был введен вектор, устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат. Предпочтительные гены селектируемых маркеров включают в себя ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для использования в dhfr- клетках-хозяевах с селекцией/увеличением численности с использованием метотрексата) и ген пео (для селекции с использованием G418).

Для экспрессии легких и тяжелых цепей вектор(векторы) экспрессии, кодирующие тяжелую и легкую цепи, трансфицируют в клетку-хозяина с помощью стандартных методик. Различные формы термина "трансфекция", как предполагается, охватывают широкий спектр методик, обычно используемых для введения экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяин, например электропорацию, осаждение с фосфатом кальция, трансфекцию с использованием DEAE-декстрана (диэтиламиноэтилдекстран) и т.п. Несмотря на то что теоретически возможно экспрессировать антитела, описанные в данном документе в любой из прокариотических или эукариотических клеток-хозяев, экспрессия антител в эукариотических клетках и наиболее предпочтительно в клетках-хозяевах из млекопитающего животного является наиболее предпочтительной, поскольку сборка и секреция свернутого надлежащим образом и иммунологически активного антитела в таких эукариотических клетках и, в частности, в клетках млекопитающего более вероятна, чем в прокариотических клетках. Прокариотическая экспрессия генов антитела, как сообщалось, является неэффективной для получения высоких выходов активного антитела (Boss, M. A. And Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13). Антитела согласно настоящему изобретению также могут вырабатываться в подвергнутых воздействию методов гликоинженерии штаммах дрожжей Pichiapastoris. Li et al. (2006) Nat. Biotechnol. 24:210.

Предпочтительные клетки-хозяева из млекопитающего животного для экспрессии рекомбинантных антител, описанных в данном документе, включают клетки яичника китайского хомячка (CHO клетки) (в том числе dhfr- CHO клетки, описанные в Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, используемые с селектируемым маркером DHFR, например, как описано в R.J. Kaufman and P.A. Sharp (1982) Mol. Biol. 759:601-621), миеломные NSO клетки, COS клетки и SP2 клетки. В частности, для применения с миеломными NSO клетками другой предпочтительной системой экспрессии является GS система экспрессии генов, раскрытая в патентных документах WO 87/04462, WO 89/01036 и EP 338841. Если рекомбинантные векторы экспрессии, кодирующие гены антитела вводят в клетки-хозяева из млекопитающего животного, антитела продуцируются при культивировании клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для обеспечения возможности экспрессии антитела клетках-хозяевах, или более предпочтительно для секреции антитела в среду культивирования, в которой выращиваются клетки-хозяева. Антитела можно выделять из среды культивирования с использованием стандартных методов очистки белков.

N- и C-концы полипептидных цепей антитела согласно настоящему изобретению могут отличаться от ожидаемой последовательности вследствие обычно наблюдаемых посттрансляционных модификаций. Например, C-концевые лизиновые остатки часто удаляются из тяжелых цепей антитела. Dick et al. (2008) Biotechnol. Bioeng. 100:1132. N-концевые глутаминовые остатки и в меньшей степени глутаматные остатки часто превращаются в пироглутаматные остатки как в легкой, так и тяжелой цепях терапевтических антител. Dick et al. (2007) Biotechnol. Bioeng. 97:544; Liu et al. (2011) JBC 28611211; Liu et al. (2011) J. Biol. Chem. 286:11211.

XIII. Анализы.

Антитела, описанные в данном документе, можно исследовать в отношении связывания с CD73, например, с помощью стандартного метода ELISA. Вкратце, микротитровальные планшеты покрывают очищенным CD73 в концентрации 1-2 мкг/мл в PBS, а затем блокируют 5% бычьим сывороточным аль-

бумином в PBS. Разведенные пробы антитела (например, разведенные пробы плазмы из иммунизированных CD73 мышей) добавляют в каждую лунку и инкубируют в течение 1-2 ч при 37°C. Планшеты промывают PBS/Tween, а затем инкубируют со вторичным реактивом (например, в случае человеческих антител, с Fc-специфичным поликлональным реактивом на основе козьего антитела к человеческому IgG), конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP), в течение 1 ч при 37°C. После промывания планшеты проявляют с использованием субстрата ABTS (Moss Inc, продукт: ABTS-1000) и анализируют с помощью спектрофотометра при OD 415-495. Образцы сыворотки из иммунизированных мышей затем подвергают дополнительному скринингу с помощью проточной цитометрии в отношении связывания с клеточной линией, экспрессирующей человеческий CD73, а не с контрольной клеточной линией, которая не экспрессирует CD73. Вкратце, связывание антител к CD73 оценивают путем инкубирования экспрессирующих CD73 CHO клеток с антителом к CD73 при разведении 1:20. Клетки промывают и связывание выявляют с использованием меченого PE Ab к человеческому IgG. Проточно-цитометрические анализы осуществляют с использованием проточного цитометра FACScan (Becton Dickinson, Сан-Хосе, Калифорния). Предпочтительно мышей, у которых проявляются наиболее высокие титры, будут использовать для слияний.

Анализ ELISA, который описан выше, можно использовать для скрининга в отношении антител и, следовательно, гибридом, которые продуцируют антитела, проявляющие положительную реактивность с иммуногеном CD73. Гимбридомы, продуцирующие антитела, которые связываются, предпочтительно с высокой аффинностью, с CD73, можно затем субклонировать и дополнительно охарактеризовать. Затем можно выбрать один клон от каждой гибридомы, который сохраняет реактивность родительских клеток (с помощью ELISA), для создания банка клеток и для очистки антитела.

Для очистки антител к CD73 отобранные гибридомы можно выращивать в двухлитровых вращающихся колбах для очистки моноклональных антител. Супернатанты можно профильтровать и концентрировать перед проведением аффинной хроматографии с использованием иммобилизированного на сефарозе белка A (Pharmacia, Пискатауэй, Нью-Джерси). Элюированный IgG можно подвергнуть проверке с помощью электрофореза в геле и высокоэффективной жидкостной хроматографии, чтобы гарантировать чистоту. Буферный раствор можно заменить на PBS, и концентрацию можно определить по OD280 с использованием коэффициента экстинкции 1,43. Моноклональные антитела можно разделить на аликвоты и хранить при -80°C.

Для того чтобы определить, связываются ли отобранные моноклональные антитела к CD73 с уникальными эпитопами, каждое антитело можно биотинилировать с использованием коммерчески доступных реактивов (Pierce, Рокфорд, Иллинойс). Связывание биотинилированных mAb можно выявить с использованием меченого стрептавидином зонда. Исследования конкуренции с использованием немеченых моноклональных антител и биотинилированных моноклональных антител можно осуществлять с использованием покрытых CD73 планшетов для ELISA, как описано выше.

Для определения изотипа очищенных антител можно провести ELISA анализы на изотип с использованием реактивов, специфичных в отношении антител конкретного изотипа. Например, для определения изотипа человеческого моноклонального антитела лунки микротитровальных планшетов можно покрыть антителом к человеческому иммуноглобулину в концентрации 1 мкг/мл в течение ночи при 4°C. После блокирования 1% BSA в планшетах осуществляют реакцию с исследуемыми моноклональными антителами или очищенными изотипическими контролями в концентрации 1 мкг/мл или менее при температуре окружающей среды в течение 1-2 ч. В лунках затем можно осуществлять реакцию со специфичными либо к человеческому IgG1, либо к человеческому IgM зондами, конъюгированными со щелочной фосфатазой. Планшеты проявляют и анализируют, как описано выше.

Для исследования связывания моноклональных антител с живыми клетками, экспрессирующими CD73, можно использовать проточную цитометрию, как описано в разделе примеры. Вкратце, клеточные линии, экспрессирующие мембраносвязанный CD73 (выращиваемые при стандартных условиях роста), смешивают с различными концентрациями моноклональных антител в PBS, содержащем 0,1% BSA, при 4°C в течение 1 ч. После промывания осуществляют реакцию клеток с меченым флуоресцеином антителом к IgG в тех же условиях, что и окрашивание первичным антителом. Образцы можно анализировать с помощью инструмента FACScan с использованием свойств переднего и бокового светорассеяния для установки гейта на отдельные клетки, и определяют связывание меченых антител. Можно использовать альтернативный анализ с помощью флуоресцентной микроскопии (в дополнение к проточно-цитометрическому анализу или вместо него). Клетки можно окрашивать точно так же, как описано выше, и оценивать с помощью флуоресцентной микроскопии. Этот метод обеспечивает возможность визуализации отдельных клеток, но может иметь уменьшенную чувствительность в зависимости от плотности антигена.

Антитела к CD73 можно дополнительно исследовать в отношении способности реагировать с антигеном CD73 с помощью вестерн-блоттинга. Вкратце, можно получить клеточные экстракты из клеток, экспрессирующих CD73, и подвергнуть их электрофорезу в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. После электрофореза разделенные антигены перенесут на нитроцеллюлозные мембраны, будут блокировать 20% мышиной сывороткой и пометят моноклональным антителом, подлежащим анализу.

Связывание с IgG можно выявить с использованием щелочной фосфатазы, пришитой к антителу к IgG, и проявить с использованием таблеток с субстратом BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., Сент-Луис, Миссури).

Методы анализа аффинности связывания, перекрестной реактивности и кинетических характеристик связывания у различных антител к CD73 включают в себя стандартные анализы, известные в уровне техники, например анализ поверхностного плазмонного резонанса (SPR) методом BIACORE® с использованием инструмента BIACORE® 2000 SPR (Biacore AB, Уппсала, Швеция).

XIV. Иммуноконъюгаты и производные антител.

Антитела, описанные в данном документе, можно применять для диагностических целей, в том числе для анализа образцов и in vivo визуализации, и для этого антитело (или его связывающий фрагмент) можно конъюгировать с соответствующим выявляемым средством с образованием иммуноконъюгата. В случае диагностических целей соответствующими средствами являются выявляемые метки, которые включают в себя радиоактивные изотопы для визуализации всего тела и радиоактивные изотопы, ферменты, флуоресцентные метки и другие подходящие маркирующие антитело элементы для анализа образцов.

Выявляемые метки могут относиться к различным типам, используемым в настоящее время в области in vitro диагностики, включая метки на основе частиц, в том числе золи металлов, такие как коллоидное золото, изотопы, такие как I^{125} или Tc^{99}, присутствующие, например, с пептидным хелатирующим средством типа N2S2, N3S или N4, хромофоры, в том числе флуоресцентные маркеры, биотин, люминесцентные маркеры, фосфоресцирующие маркеры и т.п., а также ферментные метки, которые превращают заданный субстрат в выявляемый маркер, и полинуклеотидные метки, которые выявляются после амплификации, такой как полимеразная цепная реакция. Биотинилированное антитело затем будет выявляться по связыванию с авидином или стрептавидином. Подходящий ферментные метки включают в себя пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и т.п. Например, метка может представлять собой фермент щелочную фосфатазу, выявляемую посредством измерения наличия или появления хемилюминесценции после превращения 1,2-диоксетановых субстратов, таких как адамантил-метокси-фосфорилоксифенилдиоксетан (AMPPD), динатрия 3-(4-(метоксиспиро{1,2-диоксетан-3,2'-(5'-хлор)трицикло{3.3.1.1 3,7}декан}-4-ил)фенилфосфат (CSPD), а также CDP и CDP-star® или других люминесцентных субстратов, хорошо известных специалистам в данной области техники, например хелатов подходящих лантаноидов, таких как тербий(III) и европий(III). Средства для выявления определяются выбранной меткой. Появление метки или продуктов ее реакции можно оценить невооруженным глазом в случае, когда метка представляет собой материал в виде частиц и накапливается на соответствующих уровнях, или с использованием инструментов, таких как спектрофотометр, люминометр, флуориметр и т.п., причем все они соответствуют стандартной практике.

Предпочтительно методы конъюгации приводят в результате к связям, которые являются практически (или почти) неиммуногенными, например пептидные- (т.е. амидные-), сульфидные- (стерически затрудненные), дисульфидные-, гидразоновые- и эфирные связи. Эти связи являются почти неиммуногенными и проявляют приемлемую стабильность в сыворотке (см., например, Senter, P.D., Curr. Opin. Chem. Biol. 13 (2009) 235-244; международные заявки WO 2009/059278; WO 95/17886).

В зависимости от химической природы фрагмента и антитела можно использовать разные стратегии конъюгирования. В случае, если фрагмент представляет собой встречающийся в естественных условиях или рекомбинантный полипетид длиной 50-500 аминокислот, существуют стандартные процедуры в пособиях, описывающих химические особенности синтеза белковых конъюгатов, которым легко может следовать специалист в данной области техники (см., например, Hackenberger, C.P.R., and Schwarzer, D., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 47 (2008) 10030-10074). В соответствии с одним вариантом осуществления используется реакция малеинимидо-фрагмента с цистеиновым остатком в антителе или фрагменте. Она является особенно подходящим связывающим химическим процессом в случае использования, например, Fab или Fab'-фрагмента антитела. В качестве альтернативы, в соответствии с одним вариантом осуществления выполняют связывание с С-концом антитела или фрагмента. С-концевую модификацию белка, например, Fab-фрагмента можно выполнить, как описано в источнике (Sunbul, M. and Yin, J., Org. Biomol. Chem. 7 (2009) 3361-3371).

В целом, сайт-специфичная реакция и ковалентное связывание основываются на превращении природной аминокислоты в аминокислоту с реакционной способностью, которая является нетипичной для реакционной способности других присутствующих функциональных групп. Например, конкретный цистеин в редком контексте последовательности может подвергаться ферментативному превращению в альдегид (см. Frese, M.A. и Dierks, T., ChemBioChem. 10 (2009) 425-427). Также возможно получить желательную модификацию аминокислоты при использовании специфичной ферментативной активности определенных ферментов в отношении реакции с природной аминокислотой в заданном контексте последовательности (см., например, Taki, M. et al., Prot. Eng. Des. Sel. 17 (2004) 119-126; Gautier, A. et al. Chem. Biol. 15 (2008) 128-136. Катализируемое протеазой образование C--N связей описано в Bordusa, F., Highlights in Bioorganic Chemistry (2004) 389-403.

Сайт-специфичной реакции и ковалентного связывания также можно достичь с помощью селективной реакции концевых аминокислот с соответствующими модифицирующими реактивами. Способность

N-концевого цистеина к реакции с бензонитрилами (см., Ren, H. et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 48 (2009) 9658-9662) можно использовать для достижения сайт-специфичного ковалентного связывания. Простое химическое лигирование также основывается на С-концевых цистеиновых остатках (Taylor, E. Vogel; Imperiali, B., Nucleic Acids and Molecular Biology (2009), 22 (Protein Engineering), 65-96). В европейском патенте EP 1074563 описывается метод конъюгирования, который основывается на более быстрой реакции цистеина в пределах отрезка из отрицательно заряженных аминокислот, чем цистеина, расположенного в отрезке из положительно заряженных аминокислот.

Фрагмент также может представлять собой синтетический пептид или пептидомиметик. В случае, если полипептид является химически синтезированным, аминокислоты с нетипичной химической реакционной способностью могут быть включены в ходе синтеза (см., например, de Graaf, A.J. et al., Bioconjug. Chem. 20 (2009) 1281-1295). Поскольку речь идет о широком спектре нетипичных функциональных групп, и их можно ввести в синтетический пептид, конъюгирование такого пептида с линкером является стандартной химической процедурой.

Для получения меченого одной меткой полипептида конъюгат со стехиометрическим соотношением 1:1 можно отделить от других побочных продуктов с помощью хроматографии. Эту процедуру может облегчить использование меченого красителем связывающего элемента в составе пары и заряженного линкера. При использовании данного вида меченого и имеющего сильный отрицательный заряд связывающего элемента в составе пары конъюгированные с одной меткой полипептиды легко отделяются от немеченых полипептидов и полипептидов, которые несут боле чем один линкер, поскольку различие в заряде и молекулярном весе можно использовать для разделения. Флуоресцентный краситель может быть полезен для очистки комплекса от несвязавшихся компонентов, таких как меченый моновалентный связывающий элемент.

В соответствии с одним вариантом осуществления фрагмент, прикрепленный к антителу к CD73, выбран из группы, состоящей из связывающего фрагмента, метящего фрагмента и биологически активного фрагмента.

Антитела, описанные в данном документе, также можно конъюгировать с терапевтическим средством с образованием иммуноконъюгата, такого как конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC). Подходящие терапевтические средства включают в себя антиметаболиты, алкилирующие средства, средства, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, ДНК-интеркаляторы, ДНК-сшивающие средства, ингибиторы гистондеацетилазы, ингибиторы ядерного экспорта, ингибиторы протеасомы, ингибиторы топоизомеразы I или II, ингибиторы белков теплового шока, ингибиторы тирозинкиназы, антибиотики и антимитотические средства. В ADC антитело и терапевтическое средство предпочтительно конъюгированы посредством расщепляемого линкера, такого как пептидильный, дисульфидный или гидразоновый линкер. Более предпочтительно линкер представляет собой пептидильный линкер, такой как Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO: 219), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser или Glu. ADC можно получать, как описано в патентах США №№ 7087600; 6989452 и 7129261; PCT публикациях международных заявок WO 02/096910; WO 07/038658; WO 07/051081; WO 07/059404; WO 08/083312 и WO 08/103693; публикациях заявок на патент США 20060024317; 20060004081 и 20060247295; раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки.

Другие применения антител к CD73, например, в качестве средств для монотерапии представлены в других местах в данном документе, например в разделе, относящемся к методам комплексного лечения.

Более конкретно, в ADC антитело конъюгировано с лекарственным средством, причем антитело функционирует в качестве нацеливающего средства для направления ADC к целевой клетке, экспрессирующей свой антиген, такой как клетка злокачественной опухоли. Предпочтительно антиген представляет собой опухолеассоциированный антиген, т.е. антиген, который экспрессируется или сверхэкспрессируется исключительно клеткой злокачественной опухоли. Попав туда, лекарственное средство высвобождается либо внутри целевой клетки, либо вблизи нее, действуя как терапевтическое средство. Для обзора механизма действия и применения ADC в терапии злокачественных опухолей, см. Schrama et al., Nature Rev. Drug Disc. 2006, 5, 147.

В случае лечения от злокачественных опухолей лекарственное средство предпочтительно представляет собой цитотоксическое лекарственное средство, которое вызывает гибель подвергшейся целенаправленному воздействию клетки злокачественной опухоли. Цитотоксические лекарственные средства, которые можно применять в ADC, включают в себя следующие типы соединений, а также их аналоги и производные:

(a) енедиины, такие как калихеамицин (см., например, Lee et al., J. Am. Chem. Soc. 1987, 109, 3464 и 3466) и унциаламицин (см., например, Davies et al., WO 2007/038868 A2 (2007) и Chowdari et al., US 8709431 B2 (2012));

(b) тубулизины (см., например, Domling et al., US 7778814 B2 (2010); Cheng et al., US 8394922 B2 (2013) и Cong et al., US 2014/0227295 Al;

(c) CC-1065 и дуокармицин (см., например, Boger, US 65458530 B1 (2003); Sufi et al., US 8461117 B2 (2013) и Zhang et al., US 2012/0301490 Al (2012));

(d) эпотилоны (см., например, Vite et al., US 2007/0275904 Al (2007) и US RE42930 E (2011));

(e) ауристатины (см., например, Senter et al., US 6844869 B2 (2005) и Doronina et al., US 7498298 B2 (2009));

(f) димеры пирролобензодиазепина (PBD) (см., например, Howard et al., US 2013/0059800 Al (2013); US 2013/0028919 Al (2013) и WO 2013/041606 Al (2013)) и

(g) майтансиноиды, такие как DM1 и DM4 (см., например, Chari et al., US 5208020 (1993) и Amphlett et al., US 7374762 B2 (2008)).

XV. Биспецифичные молекулы.

Антитела, описанные в данном документе, можно применять для образования биспецифичных молекул. Из антитела к CD73 или его антигенсвязывающих частей можно получить производные или их можно связать с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом для рецептора), с образованием биспецифичной молекулы, которая связывается по меньшей мере с двумя различными сайтами связывания или молекулами-мишенями. В действительности, описанное в данном документе антитело можно дериватизировать или связать более чем с одной другой функциональной молекулой с образованием мультиспецифичных молекул, которые связываются с более чем двумя разными сайтами связывания и/или молекулами-мишенями; также предполагается, что такие мультиспецифичные молекулы охватываются термином "биспецифичная молекула", используемым в данном документе. Для создания биспецифичной молекулы, описанной в данном документе, можно обеспечить функциональную связь (например, посредством химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) антитела, описанного в данном документе, с одной или несколькими другими связывающими молекулами, такими как другое антитело, фрагмент антитела, пептид или связывающий миметик, таким образом, чтобы в результате образовалась биспецифичная молекула.

Соответственно в данном документе предполагаются биспецифичные молекулы, содержащие по меньшей мере одну первую составляющую со специфичностью связывания в отношении CD73 и вторую составляющую со специфичностью связывания в отношении второго эпитопа-мишени. В соответствии с вариантом осуществления, описанным в данном документе, в котором биспецифичная молекула является мультиспецифичной, молекула может дополнительно включать третью составляющую со специфичностью связывания.

В соответствии с одним вариантом осуществления биспецифичные молекулы, описанные в данном документе, содержат в качестве составляющей со специфичностью связывания по меньшей мере одно антитело или фрагмент такого антитела, в том числе, например, Fab, Fab', F(ab')2, Fv или одноцепочечный Fv. Антитело может представлять собой димер легкой цепи или тяжелой цепи или любой его минимальный фрагмент, такой как Fv или одноцепочечный конструкт, который описан в Ladner et al. в патенте США № 4946778, содержание которого специально включено посредством ссылки.

Связывание биспецифичных молекул с их специфическими мишенями можно подтвердить с использованием методов, принятых в данной области техники, таких как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA), анализ методом FACS, биологический анализ (например, ингибирование роста) или вестерн-блоттинг анализ. В каждом из этих анализов обычно выявляют наличие комплексов белок-антитело, представляющих интерес в данном случае, при использовании меченого реактива (например, антитела), специфичного в отношении комплекса, представляющего интерес.

XVI. Композиции.

Также предполагаются композиции, например фармацевтические композиции, содержащие одно антитело к CD73 или комбинацию антител к CD73 или их антигенсвязывающую(антигенсвязывающие) часть(части), описанные в данном документе, составленные вместе фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции могут включать в себя одно антитело, или иммуноконъюгат, или биспецифичную молекулу, описанные в данном документе, или комбинацию (например, двух или более различных) антител, или иммуноконъюгатов, или биспецифичных молекул, описанных в данном документе. Например, фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, может содержать комбинацию антител (или иммуноконъюгатов или биспецифичных молекул), которые связываются с разными эпитопами на антигене-мишени или которые характеризуются взаимодополняющими активностями.

В соответствии с определенными вариантами осуществления композиция содержит антитело к CD73 в концентрации, составляющей по меньшей мере 1, 5, 10, 50, 100, 150, 200, 1-300 или 100-300 мг/мл.

Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, также можно вводить в рамках комплексной терапии, т.е. комбинировать с другими средствами. Например, комплексная терапия может включать в себя антитело к CD73, описанное в данном документе, комбинируемое по меньшей мере с одним другим противораковым средством и/или средством, стимулирующим (например, активирующим) Т-клетки. Примеры терапевтических средств, которые можно применять в комплексной терапии, более подробно описаны ниже в разделе, посвященном применениям антител, описанных в данном документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления терапевтические композиции, раскрытые

в данном документе, могут включать другие соединения, лекарственные средства и/или средства, применяемые для лечения злокачественной опухоли. Такие соединения, лекарственные средства и/или средства могут включать в себя, например, химиотерапевтические лекарственные средства, лекарственные средства на основе малых молекул или антитела, которые стимулируют иммунную реакцию в отношении заданной злокачественной опухоли. В некоторых случаях терапевтические композиции могут включать в себя, например, одно или несколько из средств, приведенных в разделе о методах комплексной терапии.

Как используется в данном документе, "фармацевтически приемлемый носитель" включает в себя любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотоничные средства и средства, задерживающие абсорбцию, и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Предпочтительно носитель является подходящим для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, посредством инъекции или инфузии). В зависимости от пути введения активное соединение, т.е. антитело, иммуноконъюгат или биспецифичную молекулу можно обеспечить покрытием из материала для защиты соединения от действия кислот и других естественных условий, которые могут инактивировать соединение.

Фармацевтические соединения, описанные в данном документе, могут включать в себя одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. "Фармацевтически приемлемая соль" относится к соли, которая сохраняет желаемую биологическую активность исходного соединения и не придает каких-либо нежелательных токсических эффектов (см., например, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Примеры таких солей включают в себя соли присоединения кислоты и соли присоединения основания. Соли присоединения кислоты включают в себя соли, полученные с нетоксичными неорганическими кислотами, такими как соляная, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, йодистоводородная, фосфористая и т.п., а также с нетоксичными органическими кислотами, такими как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксиалкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты и т.п. Соли присоединения основания включают в себя соли, полученные с щелочноземельными металлами, такими как натрий, калий, магний, кальций и т.п., а также с нетоксичными органическими аминами, такими как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и т.п.

Фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, также может включать в себя фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают в себя: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) растворимые в масле антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (BHA), бутилированный гидрокситолуол (BHT), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) средства, хелатирующие металлы, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в фармацевтических композициях, описанных в данном документе, включают в себя воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъекционные сложные эфиры органических кислот, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования материалов покрытия, таких как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и за счет использования поверхностно-активных веществ.

Эти композиции также могут содержать вспомогательные вещества, такие как консерванты, смачивающие средства, эмульгирующие средства и диспергирующие средства. Предотвращение присутствия микроорганизмов может обеспечиваться как за счет процедур стерилизации, supra, так и за счет включения различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т.п. Также может быть желательным включение в композиции изотоничных средств, таких как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, пролонгированная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть обусловлена включением средств, которые задерживают абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Фармацевтически приемлемые носители включают в себя стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсии непосредственно перед приемом. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных субстратов известно в уровне техники. За исключением тех случаев, когда любая общепринятая среда или средство являются несовместимыми с активным соединением, предполагается их применение в фармацевтических композициях, описанных в данном документе. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

Терапевтические композиции, как правило, должны быть стерильными и стабильными при условиях производства и хранения. Композицию можно составить в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства.

Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и за счет использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях предпочтительным является включение в композицию изотоничных средств, например сахаров, многоатомных спиртов, таких как маннит, сорбит, или хлорида натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть обусловлена включением в композицию средства, которое задерживает абсорбцию, например моностеаратных солей и желатина.

Стерильные инъекционные растворы можно приготовить путем включения активного соединения в требуемом количестве в соответствующий растворитель с одним из вышеперечисленных ингредиентов или их комбинацией, если это необходимо, с последующей стерилизацией с помощью микрофильтрации. Обычно дисперсии готовят путем включения активного соединения в стерильную среду, которая содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые дают порошок активного ингредиента, а также любого дополнительного желаемого ингредиента из их раствора, ранее подвергнутого стерилизации фильтрованием.

Количество активного ингредиента, который можно объединить с материалом-носителем с получением лекарственной формы для однократного введения, будет изменяться в зависимости от субъекта, подлежащего лечению, и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, который можно объединить с материалом-носителем с получением лекарственной формы для однократного введения, обычно будет являться таким количеством композиции, которое обеспечивает терапевтический эффект. В целом, из общего количества в виде ста процентов это количество будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,01 до приблизительно 99% активного ингредиента, предпочтительно от приблизительно 0,1 до приблизительно 70%, наиболее предпочтительно от приблизительно 1 до приблизительно 30% активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Схемы дозирования корректируют для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить одну разовую дозу, несколько разделенных доз можно вводить в течение некоторого времени или дозу можно пропорционально снижать или повышать, на что указывают потребности терапевтической ситуации. Особенно преимущественным является составление парентеральных композиций в единичной лекарственной форме для упрощения введения и равномерности дозирования. Единичная лекарственная форма, используемая в данном документе, относится к физически раздельным единицам, подходящим в качестве единичных доз для субъектов, подлежащих лечению; причем каждая единица содержит предварительно определенное количество активного соединения, рассчитанное для обеспечения желательного терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем. Требования в отношении единичных лекарственных форм, описанных в данном документе, диктуются: (a) индивидуальными характеристиками активного соединения и конкретным терапевтическим эффектом, который необходимо достичь, и (b) ограничениями в области получения составов, характерными для получения составов с таким активным соединением из соображений чувствительности у индивидов, и напрямую зависят от них.

В случае введения антитела доза находится в диапазоне от приблизительно 0,0001 до 100 и, как правило, от 0,01 до 5 мг/кг массы тела пациента. Например, дозы могут составлять 0,3, 1, 3, 5 или 10 мг/кг массы тела или в пределах диапазона 1-10 мг/кг. Иллюстративная схема дозирования предусматривает введение раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели, раз в четыре недели, раз в месяц, раз в три 3 месяца или раз в три-шесть месяцев.

В соответствии с некоторыми способами два или более моноклональных антител с разными специфичностями связывания вводят одновременно, в этом случае доза каждого вводимого антитела попадает в указанные диапазоны. Антитело обычно вводят несколько раз. Интервалы между отдельными дозами могут быть, например, недельными, месячными, трехмесячными или годичными. Интервалы также могут быть неодинаковыми, на что указывает измерение уровней антитела к антигену-мишени в крови пациента. В соответствии с некоторыми способами дозу корректируют для достижения концентрации антитела в плазме, составляющей приблизительно 1-1000 мкг/мл и в соответствии с некоторыми способами приблизительно 25-300 мкг/мл.

Антитело можно вводить в виде состава с замедленным высвобождением, причем в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота изменяются в зависимости от периода полувыведения антитела у пациента. Обычно наибольший период полувыведения проявляют человеческие антитела, за ними следуют гуманизированные антитела, химерные антитела и антитела, не являющиеся человеческими. Дозировка и частота введения могут изменяться в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. При профилактических применениях относительно низкую дозу вводят с относительно длинными интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение до конца своей жизни. При терапевтических применениях от-

носительно высокая доза с относительно короткими интервалами иногда требуются до тех пор, пока развитие заболевания ограничится или прекратится, и предпочтительно до тех пор, пока у пациента не проявится частичное или полное ослабление симптомов заболевания. После этого, введение пациенту можно осуществлять по профилактической схеме.

Фактические уровни дозы активных ингредиентов в фармацевтических композициях, описанных в данном документе, можно изменять с тем, чтобы получить количество активного ингредиента, которое является эффективным для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, при этом не являясь токсичным для пациента. Выбранный уровень дозы будет зависеть от ряда фармакокинетических факторов, в том числе от активности конкретных используемых композиций, описанных в данном документе, или их сложноэфирной, солевой или амидной формы, пути введения, времени введения, скорости выведения конкретного используемого соединения, длительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, используемых в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраста, пола, веса, состояния, общего состояния здоровья и анамнеза пациента, получающего лечение, и подобных факторов, известных в области медицины.

"Терапевтически эффективная доза" антитела к CD73, описанного в данном документе, предпочтительно приводит в результате к снижению тяжести симптомов заболевания, повышению частоты и длительности бессимптомных периодов заболевания или предупреждению ухудшения или инвалидизации, обусловленных поражением заболеванием. В случае злокачественной опухоли терапевтически эффективная доза предпочтительно предотвращает дальнейшее ухудшение физических симптомов, связанных со злокачественной опухолью. Симптомы поражения злокачественной опухолью являются широко известными в уровне техники и включают, например, необычные признаки родинки, изменение внешнего вида родинки, в том числе асимметрии, границ, цвета и/или диаметра, новообразованная пигментированная область кожи, ненормальную родинку, затемненную область под ногтем, уплотнения в молочной железе, изменения соска, кисты в молочной железе, боль в молочной железе, смерть, потерю массы, слабость, переутомление, затруднения с приемом пищи, потерю аппетита, хронический кашель, ухудшенную одышку, харкание кровью, кровь в моче, кровь в кале, тошноту, рвоту, печеночные метастазы, легочные метастазы, метастазы в кости, ощущение переполнения желудка, вздутие, жидкость в брюшной полости, вагинальное кровотечение, констипацию, вздутие живота, перфорацию толстой кишки, острый перитонит (инфекция, лихорадка, боль), боль, рвота с кровью, сильное потоотделение, лихорадку, высокое кровяное давление, анемию, диарею, разлитие желчи, головокружение, озноб, мышечные спазмы, метастазы в толстую кишку, легочные метастазы, метастазы в мочевой пузырь, печеночные метастазы, метастазы в кости, почечные метастазы и метастазы в поджелудочную железу, затрудненной глотание и т.п.

Терапевтически эффективная доза может предупредить или замедлить появление злокачественной опухоли, что может быть желательно, когда присутствуют ранние или предварительные признаки заболевания. Лабораторные анализы, используемые в диагностике злокачественных опухолей, включают в себя химические анализы (в том числе измерение уровней CD73), гематологические, серологические и радиологические анализы. Соответственно любой клинический или биохимический анализ, с помощью которого отслеживается любой из вышеизложенных показателей, можно использовать для определения того, присутствует ли конкретное лечебное средство в терапевтически эффективной дозе для лечения злокачественной опухоли. Специалист в данной области техники будет способен определить такие количества, исходя из таких факторов, как размеры субъекта, тяжесть симптомов у субъекта и конкретные выбранные композиция или путь введения.

Композицию, описанную в данном документе, можно вводить посредством одного или нескольких путей введения с использованием одного или нескольких из ряда способов, известных в уровне техники. Как будет понятно специалисту в данной области техники, путь и/или способ введения будет изменяться в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительные пути введения для антител, описанных в данном документе, включают внутривенный, внутримышечный, интрадермальный, внутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например путем инъекции или инфузии. Используемая в данном документе фраза "парентеральное введение" означает способы введения, за исключением энтерального и местного введения, обычно путем инъекции и включает в себя без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбительную, внутрисердечную, интрадермальную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, внутрикожную, внутрисуставную, подкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию.

В качестве альтернативы описанное в данном документе антитело можно вводить посредством непарентерального пути, такого как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

Активные соединения можно приготовить с носителями, которые будут защищать соединение от быстрого высвобождения, как, например, состав с контролируемым высвобождением, в том числе имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использо-

вать биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этилен-винилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимолочная кислота. Многие способы получения таких составов защищены патентами или являются общеизвестными специалистам в данной области техники; см., например, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Терапевтические композиции можно вводить с использованием медицинских устройств, известных в уровне техники. Например, в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления терапевтическую композицию, описанную в данном документе, можно вводить с использованием безыгольного устройства для подкожной инъекции, такого как устройства, раскрытые в патентах США №№ 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 или 4596556. Примеры широко известных имплантатов и модулей для применения с антителами к CD73, описанными в данном документе, включают в себя патент США № 4487603, в котором раскрыт имплантируемый инфузионный микронасос для дозирования лекарственного препарата с контролируемой скоростью; патент США № 4486194, в котором раскрыто терапевтическое устройство для введения лекарственных препаратов через кожу; патент США № 4447233, в котором раскрыт инфузионный насос для лекарственного препарата для доставки лекарственного препарата с точной скоростью инфузии; патент США № 4447224, в котором раскрыт имплантируемый инфузионный аппарат, обеспечивающий переменную скорость течения жидкости для непрерывной доставки лекарственного средства; патент США № 4439196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственного средства с многокамерными отсеками; и патент США № 4475196, в котором раскрыта осмотическая система доставки лекарственного средства. Эти патенты включены в данный документ посредством ссылки. Специалистам в данной области техники известны многие другие такие имплантаты, системы доставки и модули.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73, описанные в данном документе, могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечить надлежащее распространение in vivo. Например, гематоэнцефалический барьер (BBB) исключает многие высокогидрофильные соединения. Для обеспечения пересечения терапевтическими соединениями, описанными в данном документе, BBB (если это желательно) их можно составить, например, в липосомах. По поводу способов получения липосом, см., например, патенты США №№ 4522811; 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать один или несколько фрагментов, которые селективно транспортируются в конкретные клетки или органы, тем самым повышая целенаправленную доставку лекарственного средства (см., например, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Иллюстративные нацеливающие фрагменты включают в себя фолат или биотин (см., например, патент США № 5416016 за авторством Low et al.); маннозиды (Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); антитела (P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); рецептор поверхностно-активного белка A (Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); см. также K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994; Immunomethods 4:273.

XVII. Применения и способы.

Антитела, композиции антител и способы, описанные в данном документе, имеют многочисленные применения in vitro и in vivo, например ингибирование опухолевого роста, ингибирование метастазирования опухоли, усиление иммунной реакции, например, посредством снижения передачи сигнала с участием аденозина, или выявление CD73. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления антитела, описанные в данном документе, представляют собой человеческие антитела. Например, антитела к CD73, описанные в данном документе, можно вводить в клетки в культуре, in vitro или ex vivo, или субъектам-людям, например, in vivo, для ингибирования пролиферации опухолевых клеток. Соответственно в данном документе представлены способы модификации опухолевого роста у субъекта, предусматривающие введение субъекту антитела или его антигенсвязывающей части, описанных в данном документе, в результате чего снижается опухолевый рост у субъекта.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления способы являются особенно подходящими для лечения злокачественной опухоли in vivo. Для достижения антигенспецифичного ингибирования опухолевого роста антитела к CD73, описанные в данном документе, можно вводить вместе с антигеном, представляющим интерес, или антиген может уже присутствовать у субъекта, подлежащего лечению (например, субъекта-носителя опухоли). Если антитела к CD73 вводят вместе с другим средством, их можно вводить раздельно или одновременно.

Также охватываются способы выявления наличия антигена человеческого CD73 в образце или измерения количества антигена человеческого CD73, предусматривающие приведение образца и контрольного образца в контакт с человеческим моноклональным антителом или его антигенсвязывающей частью, которые специфично связываются с человеческим CD73, в условиях, которые обеспечивают возможность образования комплекса между антителом или его частью и человеческим CD73. Затем выявляют образование комплекса, причем различие в образовании комплекса между образцом по сравнению с контрольным образцом указывает на наличие антигена человеческого CD73 в образце. Более того, антитела к CD73, описанные в данном документе, можно применять для очистки человеческого CD73 по-

средством иммуноаффинной очистки.

Также охватываются способы стимуляции иммунной реакции (например, антигенспецифичной Т-клеточной реакции) у субъекта, предусматривающие введение субъекту антитела к CD73, описанного в данном документе, в результате чего у субъекта стимулируется иммунная реакция (например, антигенспецифичная Т-клеточная реакция). В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления субъект является субъектом-носителем опухоли, а стимулируется иммунная реакция в отношении опухоли. Опухоль может представлять собой солидную опухоль или опухолевые заболевания кроветворной и лимфоидной ткани, например гематологическую злокачественную опухоль. В соответствии с определенными вариантами осуществления опухоль представляет собой иммуногенную опухоль. В соответствии с определенными вариантами осуществления опухоль является неиммуногенной.

Эти и другие способы, описанные в данном документе, более подробно обсуждаются ниже.

Злокачественная опухоль.

Ингибирование CD73 антителами к CD73 может снижать опухолевый рост и метастазирование у пациента. Ингибирование CD73 антителами к CD73 может также усиливать иммунную реакцию в отношении клеток злокачественной опухоли у пациента. В данном документе представлены способы лечения субъекта, имеющего злокачественную опухоль, предусматривающие введение субъекту антитела к CD73, описанного в данном документе, в результате чего осуществляется лечение субъекта, например ингибируется или замедляется рост злокачественных опухолей и/или достигается регрессия опухолей. Антитело к CD73 можно применять само по себе для ингибирования роста злокачественных опухолей. В качестве альтернативы антитело к CD73 можно применять в сочетании с другим средством, например другими иммуногенными средствами, стандартными средствами для лечения злокачественной опухоли или другими антителами, как описано ниже.

Соответственно в данном документе предполагаются способы лечения злокачественной опухоли, например, посредством ингибирования роста опухолевых клеток, у субъекта, предусматривающие введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к CD73, описанного в данном документе или его антигенсвязывающей части. Антитело может представлять собой человеческое антитело к CD73 (такое как любое из человеческих антител к CD73 человека, описанных в данном документе). В качестве дополнения или альтернативы, антитело может представлять собой химерное или гуманизированное антитело к CD73, например химерное или гуманизированное антитело к CD73, содержащее антитело к CD73, описанное в данном документе, или его антигенсвязывающую часть.

Злокачественные опухоли, чей рост можно ингибировать с применением антител согласно настоящему изобретению, включают в себя злокачественные опухоли, как правило, восприимчивые к иммунотерапии. Неограничивающие примеры злокачественных опухолей для лечения включают в себя плоскоклеточную карциному, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, ороговевающий немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), не-NSCLC, глиому, злокачественную опухоль желудочно-кишечного тракта, злокачественную опухоль почки (например, светлоклеточную карциному), злокачественную опухоль яичника, злокачественную опухоль печени, злокачественную опухоль толстой и прямой кишки, злокачественную опухоль эндометрия, злокачественную опухоль почки (например, почечноклеточную карциному (RCC)), злокачественную опухоль предстательной железы (например, гормонорефрактерную аденокарциному предстательной железы), злокачественную опухоль щитовидной железы, нейробластому, злокачественную опухоль поджелудочной железы, глиобластому (мультиформную глиобластому), злокачественную опухоль шейки матки, злокачественную опухоль желудка, злокачественную опухоль мочевого пузыря, гепатому, злокачественную опухоль молочной железы, карциному толстой кишки и злокачественную опухоль (или карциному) головы и шеи, злокачественную опухоль желудка, герминогенную злокачественную опухоль, детскую саркому, синоназальную злокачественную опухоль из клеток-натуральных киллеров, меланому (например, метастатическую злокачественную меланому, такую как злокачественная меланома кожи или внутриглазная злокачественная меланома), злокачественную опухоль кости, злокачественную опухоль кожи, злокачественную опухоль матки, злокачественную опухоль заднепроходной области, злокачественную опухоль яичка, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, злокачественную опухоль пищевода, злокачественную опухоль тонкого кишечника, злокачественную опухоль эндокринной системы, злокачественную опухоль паращитовидной железы, злокачественную опухоль надпочечника, саркому мягких тканей, злокачественную опухоль мочеиспускательного канала, злокачественную опухоль полового члена, солидные опухоли детского возраста, злокачественную опухоль мочеточника, карциному почечной лоханки, злокачественное новообразование центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, опухолевый ангиогенез, опухоль позвоночника, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидную злокачественную опухоль, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, злокачественные опухоли, вызванные факторами окружающей среды, в том числе вызванные асбестом злокачественные опухоли, злокачественные опухоли, связанные с вирусом, (например, опухоль, связанная с вирусом папилломы человека (HPV) и гематологические злокачественные опухоли, происходящие из любой из двух основных линий клеток крови, т.е. миелоидной клеточной линии (которая дает гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, макрофаги и тучные клетки) или

лимфоидной клеточной линии (которая дает B, T, NK и плазматические клетки), такие как все типы лейкозов, лимфом и миелом, например острые, хронические, лимфоцитарные и/или миелогенные лейкозы, такие как острый лейкоз (ALL), острый миелогенный лейкоз (AML), хронический лимфолейкоз (CLL) и хронический миелолейкоз (CML), недифференцированный AML (M0), миелобластный лейкоз (M1), миелобластный лейкоз (M2; с созреванием клеток), промиелоцитарный лейкоз (M3 или вариант M3 [M3V]), миеломоноцитарный лейкоз (M4 или вариант M4 с эозинофилией [M4E]), моноцитарный лейкоз (M5), эритролейкоз (M6), мегакариобластный лейкоз (M7), выделенная гранулоцитарная саркома и хлорома; лимфомы, такие как лимфома Ходжкина (HL), неходжкинская лимфома (NHL), B-клеточные лимфомы, T-клеточные лимфомы, лимфоплазмоцитоидную лимфому, моноцитоидную B-клеточную лимфому, лимфому из лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (MALT), анапластическую (например, Ki 1+) крупноклеточную лимфому, T-клеточный лейкоз/лимфому взрослых, лимфому из клеток мантийной зоны, ангиоиммунобластную T-клеточную лимфому, лимфангиому, T-клеточную лимфому тонкой кишки, первичную медиастинальную B-клеточную лимфому, T-лимфобластную лимфому из клеток-предшественников, T-лимфобластную лимфому/T-лимфобластный лейкоз (T-Lbly/T-ALL), периферическую T-клеточную лимфому, лимфобластную лимфому, посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание, истинную гистиоцитарную лимфому, первичную лимфому центральной нервной системы, первичную выпотную лимфому, лимфобластную лимфому (LBL), гемобластозы из лимфоидной линии, острый лимфобластный лейкоз, диффузную B-крупноклеточную лимфому, лимфому Беркитта, фолликулярную лимфому, диффузную гистиоцитарную лимфому (DHL), иммунобластную крупноклеточную лимфому, B-лимфобластную лимфому из клеток предшественников, кожную T-клеточную лимфому (CTLC) (также называемую микозом грибовидным или синдром Сезари) и лимфоплазмацитоидную лимфому (LPL) с макроглобулинемией Вальденстрема; миеломы, такие как IgG-миелома, миелома легких цепей, несекреторная миелома, тлеющая миелома (также называемая вялотекущей миеломой), единичная плазмоцитома и множественные миеломы, хронический лимфолейкоз (CLL), волосатоклеточную лимфому; гемобластозы из клеток миелоидной линии, опухоли мезенхимального происхождения, в том числе фибросаркому и рабдомиосаркому; семиному, тератокарциному, опухоли центральной и периферической нервной системы, в том числе астроцитому, шванномы; опухоли мезенхимального происхождения, в том числе фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; а также другие опухоли, в том числе меланому, пигментную ксеродерму, кератоакантому, семиному, фолликулярную злокачественную опухоль щитовидной железы и тератокарциному, гемобластозы из клеток лимфоидной линии, например T-клеточные и B-клеточные опухоли, в том числе без ограничения T-клеточные нарушения, такие как T-клеточный пролимфоцитарный лейкоз (T-PLL), в том числе мелкоклеточного и мозговидного типа; лейкоз из больших гранулярных лимфоцитов (LGL), предпочтительно T-клеточного типа; a/d T-NHL печеночно-селезеночную лимфому; периферическую T-клеточную лимфому/T-клеточную лимфому из клеток, вышедших за пределы тимуса (плеоморфный и иммунобластный подтипы); T-клеточную лимфангиому (назальную); злокачественную опухоль головы и шеи, злокачественную опухоль шеи, злокачественную опухоль прямой кишки, злокачественную опухоль щитовидной железы; острую миелоидную лимфому, а также любые комбинации указанных злокачественных опухолей. Способы, описанные в данном документе, также можно применять для лечения метастазирующих злокачественных опухолей, невосприимчивых к лечению злокачественных опухолей (например, злокачественных опухолей, невосприимчивых к проводимой ранее иммунотерапии, например, с использованием блокирующего антитела к CTLA-4, или к PD-1, или к PD-L1) и рецидивирующих злокачественных опухолей.

Способы можно применять для лечения опухолей или злокачественных опухолей, которые являются положительными по CD73 или которые экспрессируют высокие уровни CD73. Способ может предусматривать вначале определение уровня CD73 на опухолях или опухолевых клетках и обработку антителом к CD73, например, описанным в данном документе, если опухоли или клетки экспрессируют CD73, например высокие уровни CD73.

Антитело к CD73 можно назначать в качестве монотерапии или только в качестве иммуностимулирующей терапии. Антитела к CD73, например антитела к CD73, описанные в данном документе, также можно комбинировать с иммуногенным средством, таким как клетки злокачественных опухолей, очищенные опухолевые антигены (в том числе рекомбинантные белки, пептиды и углеводные молекулы), клетки и клетки, трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He et al. (2004) J. Immunol. 173:4919-28). Неограничивающие примеры противоопухолевых вакцин, которые можно использовать, включают в себя пептиды из антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназы, или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF (дополнительно обсуждаются ниже).

Было показано, что у людей некоторые опухоли являются иммуногенными, как, например, меланомы. Снижая порог активации T-клеток посредством ингибирования CD73, можно активировать реакцию на опухоль у хозяина, что обеспечивает возможность лечения неиммуногенных опухолей или опухолей с ограниченной иммуногенностью.

Антитело к CD73, например антитело к CD73, описанное в данном документе, можно сочетать с протоколом вакцинации. Было разработано много экспериментальных стратегий по вакцинации (см.

Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738; см. также Restifo, N. and Sznol, M., Cancer Vaccines, Ch. 61, p. 3023-3043 in DeVita et al. (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition). В соответствии с одной из этих стратегий вакцину получают с использованием аутологичных или аллогенных опухолевых клеток. Было показано, что эти клеточные вакцины являются наиболее эффективными, когда опухолевые клетки трансдуцируют для экспрессии GM-CSF. GM-CSF, как было показано, является сильным активатором презентирования антигенов при противоопухолевой вакцинации (Dranoff et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 90: 3539-43).

Изучение экспрессии генов и паттернов экспрессии большого количества генов в различных опухолях привело к определению так называемых опухолеспецифичных антигенов (Rosenberg, S.A. (1999) Immunity 10: 281-7). Во многих случаях эти опухолеспецифичные антигены представляют собой дифференцировочные антигены, экспрессирующиеся в опухолях и в клетке, из которой возникает опухоль, например меланоцитарные антигены gp100, антигены MAGE и Тгр-2. Что более важно, многие из этих антигенов, как было показано, являются мишенями опухолеспецифичных Т-клеток, обнаруживаемых у хозяина. Ингибирование CD73 можно использовать в сочетании с набором рекомбинантных белков и/или пептидов, экспрессирующихся в опухоли, для того, чтобы вызвать иммунную реакцию на эти белки. Эти белки в норме воспринимаются иммунной системой как аутоантигены, и, следовательно, она проявляет к ним толерантность. Опухолевый антиген может включать белок теломеразы, который необходим для синтеза теломер хромосом и который экспрессируется более чем в 85% злокачественных опухолей человека и лишь в ограниченном количестве соматических тканей (Kim et al. (1994) Science 266: 2011-2013). Опухолевый антиген также может представлять собой "неоантигены", экспрессирующиеся в клетках злокачественной опухоли вследствие соматических мутаций, которые изменяют последовательность белка или создают слитые белки из двух неродственных последовательностей (т.е. bcr-abl в филадельфийской хромосоме) или идиотип из В-клеточных опухолей.

Другие противоопухолевые вакцины могут включать в себя белки из вирусов, связанных со злокачественными опухолями человека, таких как вирусы папилломы человека (HPV), вирусы гепатита (HBV и HCV) и вирус герпеса, ассоциированный с саркомой Капоши (KHSV). Другой формой опухолеспецифичного антигена, который можно использовать в сочетании с ингибированием CD73, являются очищенные белки теплового шока (HSP), выделенные из самой опухолевой ткани. Эти белки теплового шока содержат фрагменты белков из опухолевых клеток, и эти HSP являются высокоэффективными при доставке к антигенпрезентирующим клеткам для того, чтобы вызвать иммунитет к опухоли (Suot & Srivastava (1995) Science 269:1585-1588; Tamura et al. (1997) Science 278:117-120).

Дендритные клетки (DC) являются высокоактивными антигенпрезентирующими клетками, которые можно использовать для примирования с целью вызвать антигенспецифичные реакции. DC можно получать ex vivo и нагружать различными белковыми и пептидными антигенами, а также экстрактами опухолевых клеток (Nestle et al. (1998) Nature Medicine 4: 328-332). DC также можно трансдуцировать с использованием генетических средств для экспрессии этих опухолевых антигенов. Также можно осуществлять непосредственное слияние DC с опухолевыми клетками с целью иммунизации (Kugler et al. (2000) Nature Medicine 6:332-336). В качестве метода вакцинации иммунизацию DC можно эффективно комбинировать с ингибированием CD73 для того, чтобы активировать более сильные противоопухолевые реакции.

Ингибирование CD73 также можно сочетать со стандартными методами лечения злокачественной опухоли (например, хирургическим вмешательством, радиационным облучением и химиотерапией). Ингибирование CD73 эффективно комбинировать со схемами химиотерапии. В некоторых случаях представляется возможным снижение дозы вводимого химиотерапевтического реагента (Mokyr et al. (1998) Cancer Research 58: 5301-5304). Примером такой комбинации является антитело к CD73 в комбинации с декарбазином для лечения меланомы. Другим примером таких комбинаций является антитело к CD73 в комбинации с интерлейкином-2 (IL-2) для лечения меланомы. Научным обоснованием комбинированного применения ингибирования CD73 и химиотерапии является то, что гибель клеток, которая является следствием цитотоксического действия большинства химиотерапевтических соединений, должна приводить в результате к повышенным уровням опухолевого антигена в рамках пути презентирования антигена. Другими методами комплексной терапии, которые могут приводить в результате к синергии с ингибированием CD73 вследствие гибели клеток, являются радиационное облучение, хирургическое вмешательство и выключение эндокринной функции. При каждом из этих протоколов создается источник опухолевого антигена у хозяина. Также с ингибированием CD73 можно комбинировать ингибиторы ангиогенеза. Ингибирование ангиогенеза ведет к гибели опухолевых клеток, что может поставлять опухолевый антиген в пути презентирования антигена у хозяина.

Еще один пример такой комбинации представляет собой антитело к CD73 в комбинации с антителом к CD39, антителом к A2AR или химическим ингибитором или с антителом к A2BR или химическим ингибитором. Научным обоснованием комбинированного применения ингибирования CD73 и ингибирования CD39, A2AR или A2BR является то, что эти белки также связаны с биологической функцией CD73

и передачей сигнала с его участием. В частности, CD39 катализирует превращение ATP или ADP в AMP, таким образом обеспечивая субстрат (AMP) для ферментативной активности CD73 (т.е. превращения AMP в аденозин). Более того, аденозин является лигандом для четырех известных рецепторов, в том числе A1R, A2AR, A2BR и A3. Было показано, что A2AR и A2BR регулируют пролиферацию, рост, миграцию и метастазирование опухолевых клеток, а также активацию Т-клеток в опухолевом окружении посредством передачи сигнала с участием с AMP.

Антитела к CD73, описанные в данном документе, также можно применять в комбинации с биспецифичными антителами, которые целенаправленно воздействуют на экспрессирующие Fcα- или Fcγ-рецептор эффекторные клетки среди опухолевых клеток (см., например, патенты США №№ 5922845 и 5837243). Биспецифичные антитела можно применять для целенаправленного воздействия на два отдельных антигена. Например, биспецифичные антитела к Fc-рецептору/опухолевому антигену (например, Her-2/neu) применялись для направления макрофагов к сайтам опухоли. Такое целенаправленное воздействие может более эффективно активировать опухолеспецифичные реакции. В качестве альтернативы, антиген можно доставлять непосредственно в DC при использовании биспецифичных антител, которые связываются с опухолевым антигеном и маркером клеточной поверхности, специфичным для дендритных клеток.

Опухоли ускользают от иммунологического надзора хозяина посредством обширного ряда механизмов. Многие из этих механизмов можно преодолеть путем инактивации белков, которые экспрессируются опухолями и которые являются иммунодепрессивными. Они включают в себя, среди прочих, TGF-β (Kehrl et al. (1986) J. Exp. Med 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) Immunology Today 13: 198-200), и Fas лиганд (Hahne et al. (1996) Science 274: 1363-1365). Антитела к каждой из этих молекул можно применять в комбинации с антителами к CD73 для противодействия эффектам иммунодепрессивного средства и поддержки иммунным реакциям против опухоли у хозяина.

Другие антитела, которые активируют иммунологическую реактивность у хозяина можно применять в комбинации с антителами к CD73. Они включают в себя молекулы на поверхности дендритных клеток, которые активируют функцию DC и презентирование антигена. Антитела к CD40 способны эффективно заменять хелперную активность Т-клеток (Ridge et al. (1998) Nature 393: 474-478), и их можно применять в сочетании с антителами к CD73. Активирующие антитела к костимулирующим молекулам для Т-клеток, таким как OX-40 (Weinberg et al. (2000) Immunol 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero et al. (1997) Nature Medicine 3: 682-685 (1997) и ICOS (Hutloff et al. (1999) Nature 397: 262-266), также могут обеспечивать повышенные уровни активации Т-клеток. Ингибиторы PD1, PD-L1 или CTLA-4 (например, патент США № 5811097) также можно применять в сочетании с антителом к CD73.

Другие способы, описанные в данном документе, применяют для лечения пациентов, которые подверглись действию конкретных токсинов или патогенов. Соответственно в соответствии с еще одним аспектом, описанным в данном документе, предполагается способ лечения инфекционного заболевания у субъекта, предусматривающий введение субъекту антитела к CD73 или его антигенсвязывающей части, в результате чего осуществляется лечение инфекционного заболевания у субъекта. В качестве дополнения или альтернативы, антитело может представлять собой химерное или гуманизированное антитело.

Во всех из вышеуказанных способах ингибирования CD73 можно комбинировать с другими формами иммунотерапии, такими как лечение цитокинами (например, интерферонами, GM-CSF, G-CSF, IL-2) или терапия биспецифичными антителами, которая обеспечивает усиленное презентирование опухолевых антигенов (см., например, Holliger (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak (1994) Structure 2:1121-1123).

Методы комплексной терапии.

В дополнение к представленным выше методам комплексной терапии антитела к CD73, описанные в данном документе, также можно применять в комплексной терапии, например, для лечения злокачественной опухоли, как описано ниже.

В данном документе дополнительно представлены способы комплексной терапии, при которых антитело к CD73 вводят совместно с одним или несколькими дополнительными средствами, например антителами, которые являются эффективными при стимуляции иммунных реакций, таким образом дополнительно усиливая, стимулируя или повышая иммунные реакции у субъекта.

Обычно антитело к CD73, описанное в данном документе, можно комбинировать с: (i) агонистом костимулирующего рецептора и/или (ii) антагонистом ингибирующего сигнала на Т-клетках, оба из которых приводят в результате к усилению антигенспецифических Т-клеточных реакций (регуляторы иммунных контрольных точек). Большинство из костимулирующих и коингибирующих молекул являются членами суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF), и антитела к CD73, описанные в данном документе, можно вводить со средством, которое целенаправленно воздействует на член семейства IgSF, повышая иммунную реакцию. Одним важным семейством мембраносвязанных лигандов, которые связываются с костимулирующими или коингибирующими рецепторами, является семейство B7, которое включает в себя B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) и B7-H6. Другим семейством мембраносвязанных лигандов, которые связываются с костимулирующими или

коингибирующими рецепторами, является семейство молекул TNF, связывающихся с когнатными членами семейства TNF рецепторов, которые включают в себя CD40 и CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137, GITR, TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LTβR, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1, лимфотоксин α/TNFβ, TNFR2, TNFα, LTβR, лимфотоксин α 1p2, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY, NGFR (см., например, Tansey (2009) Drug Discovery Today 00:1). Активация Т-клеток также регулируется растворимыми цитокинами. Таким образом, антитела к CD73 можно применять в комбинации с: (i) антагонистами (или ингибиторами или блокирующими средствами) белков семейства IgSF, или семейства B7, или семейства TNF, которые ингибируют активацию Т-клеток, или антагонистами цитокинов, которые ингибируют активацию Т-клеток (например, IL-6, IL-10, TGF-β, VEGF; "иммунодепрессивные цитокины"), и/или (ii) агонистами стимулирующих рецепторов семейства IgSF, семейства B7 или семейства TNF или цитокинов, которые стимулируют активацию Т-клеток, для стимуляции иммунной реакции, например для лечения пролиферативных заболеваний, таких как злокачественная опухоль.

Например, Т-клеточные реакции можно стимулировать с помощью комбинации антител к CD73, описанной в данном документе, например CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f, и одного или нескольких из следующих средств:

(1) антагонист (ингибитор или блокирующее средство) белка, который ингибирует активацию Т-клеток (например, ингибиторы иммунологических контрольных точек), такого как CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2 и LAG-3, как описано выше, и один из следующих белков: TIM-3, галектин-9, CEACAM-1, BTLA, CD69, галектин-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, CD73, PD1H, LAIR1, TIM-1, TIM-4, CD39;

(2) агонист белка, который стимулирует активацию Т-клеток, такого как B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, GITR, GITRL, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, CD70, CD27, CD40, DR3 и CD28H.

Иллюстративные средства, которые модулируют один из вышеуказанных белков и которые можно комбинировать с антагонистическими антителами к CD73, например, описанными в данном документе, для лечения злокачественной опухоли, включают в себя Yervoy™ (иплимумаб) или тремелимумаб (для CTLA-4), галиксимаб (для B7.1), BMS-936558 (для PD-1), CT-011 (для PD-1), MK-3475 (для PD-1), AMP224 (для B7DC), BMS-936559 (для B7-H1), MPDL3280A (для B7-H1), MEDI-570 (для ICOS), AMG557 (для B7H2), MGA271 (для B7H3), IMP321 (для LAG-3), BMS-663513 (для CD137), PF-05082566 (для CD137), CDX-1127 (для CD27), антитело к OX40 (Providence Health Services), huMAbOX40L (для OX40L), атацицепт (для TACI), CP-870893 (для CD40), лукатумумаб (для CD40), дацетузумаб (для CD40), муромонаб-CD3 (для CD3), ипилумумаб (для CTLA-4).

Другие молекулы, которые можно комбинировать с антагонистическими антителами к CD73 для лечения злокачественной опухоли, включают в себя антагонисты ингибирующих рецепторов на NK-клетках или агонисты активирующих рецепторов на NK-клетках. Например, антагонистические антитела к CD73 можно комбинировать с антагонистами KIR (например, лирилумабом).

Активация Т-клеток также регулируется растворимыми цитокинами, и антитела к CD73 можно вводить субъекту, например, имеющему злокачественную опухоль, с антагонистами цитокинов, которые ингибируют активацию Т-клеток, или агонистами цитокинов, которые стимулируют активацию Т-клеток.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела к CD73 можно применять в комбинации с: (i) антагонистами (или ингибиторами или блокирующими средствами) белков семейства IgSF, или семейства B7, или семейства TNF, которые ингибируют активацию Т-клеток, или антагонистами цитокинов, которые ингибируют активацию Т-клеток (например, IL-6, IL-10, TGF-β, VEGF; "иммунодепрессивные цитокины"), и/или (ii) агонистами стимулирующих рецепторов семейства IgSF, семейства B7 или семейства TNF или цитокинов, которые стимулируют активацию Т-клеток, для стимуляции иммунной реакции, например, для лечения пролиферативных заболеваний, таких как злокачественная опухоль.

Другие дополнительные средства для методов комплексной терапии включают в себя средства, которые ингибируют или сокращают количество макрофагов или моноцитов, в том числе без ограничения антагонисты CSF-1R, такие как антагонистические антитела к CSF-1R, в том числе RG7155 (WO 11/70024, WO 11/107553, WO 11/131407, WO 13/87699, WO 13/119716, WO 13/132044) или PA-008 (WO 11/140249; WO 13169264; WO 14/036357).

Антитела к CD73 также можно вводить со средствами, которые ингибируют передачу сигнала с участием TGF-β.

Дополнительные средства, которые можно комбинировать с антителом к CD73, включают в себя средства, которые усиливают презентирование опухолевых антигенов, например вакцины на основе дендритных клеток, секретирующие GM-CSF клеточные вакцины, CpG-олигонуклеотиды и имиквимод, или терапевтические средства, которые усиливают иммуногенность опухолевых клеток (например, антрациклины).

Кроме того, другие терапевтические средства, которые можно комбинировать с антителом к CD73, включают в себя терапевтические средства, которые сокращают количество Treg клеток или блокируют их, например средство, которое специфично связывается с CD25.

Еще одним терапевтическим средством, которое можно комбинировать с антителом к CD73, является терапевтическое средство, которое ингибирует метаболический фермент, такой как индоламиндиоксигеназа (IDO), диоксигеназа, аргиназа или синтетаза оксида азота.

Другой класс средств, которые можно применять с антителом к CD73, включает в себя средства, которые ингибируют образование аденозина или ингибируют аденозиновый A2A-рецептор.

Другими терапевтическими средствами, которые можно комбинировать с антителом к CD73 для лечения злокачественной опухоли, включают в себя терапевтические средства, которые обращают/предотвращают анергию или истощение Т-клеток, и терапевтические средства, которые запускают активацию врожденного иммунитета и/или воспаления в сайте опухоли.

Антитело к CD73 можно комбинировать более чем с одним иммуноонкологическим средством и, например, можно комбинировать с комбинаторным подходом, при котором целенаправленно воздействуют на многие элементы в пути развития иммунной реакции, как, например, одно или несколько из следующих: терапевтическое средство, которое усиливает презентирование опухолевых антигенов (например, вакцина на основе дендритных клеток, секретирующие GM-CSF клеточные вакцины, CpG-олигонуклеотиды, имиквимод); терапевтическое средство, которое ингибирует отрицательную иммунную регуляцию, например, посредством ингибирования пути CTLA-4 и/или PD1/PD-L1/PD-L2 и/или сокращения количества или блокирования Treg или других иммуносупрессорных клеток; терапевтическое средство, которое стимулирует положительную иммунную регуляцию, например, с использование агонистов, которые стимулируют путь CD-137, OX-40 и/или GITR и/или стимулируют эффекторную функцию Т-клеток; терапевтическое средство, которое системно повышает встречаемость противоопухолевых Т-клеток; терапевтическое средство, которое сокращает количество Treg или ингибирует их, таких как Treg в опухоли, например, с использованием антагониста CD25 (например, даклизумаба) или путем сокращения количества ex vivo с использованием гранул со связанным антителом к CD25; терапевтическое средство, которое воздействует на функционирование супрессорных миелоидных клеток в опухоли; терапевтическое средство, которое усиливает иммуногенность опухолевых клеток (например, антрациклины); адоптивный перенос Т-клеток или NK-клеток, в том числе генетически модифицированных клеток, например клеток, модифицированных химерными антигенными рецепторами (CAR-T терапия); терапевтическое средство, которое ингибирует метаболический фермент, такой как индоламиндиоксигеназу (IDO), диоксигеназу, аргиназу или синтетазу оксида азота; терапевтическое средство, которое обращает/предотвращает анергию или истощение Т-клеток; терапевтическое средство, которое запускает активацию врожденного иммунитета и/или воспаления в сайте опухоли; введение иммуностимулирующих цитокинов; или блокирование иммунодепрессивных цитокинов.

Обычно антитела к CD73, описанные в данном документе, можно применять вместе с одним или несколькими из агонистических средств, которые связываются в качестве лиганда с положительно действующими костимулирующими рецепторами, блокирующих средств, которые ослабляют передачу сигнала через ингибирующие рецепторы, антагонистов и одного или нескольких средств, которые системно повышают встречаемость противоопухолевых Т-клеток, средств, которые ослабляют определенные иммунодепрессивные пути в опухолевом микроокружении (например, блокируют захват ингибирующего рецептора (например, взаимодействия PD-L1/PD-1), сокращают количество Treg или ингибируют их (например, с использованием моноклонального антитела к CD25 (например, даклизумаба) или путем сокращения количества ex vivo с использованием гранул со связанным антителом к CD25), ингибируют метаболические ферменты, такте как IDO, или обращают/предотвращают анергию или истощение Т-клеток), и средств, которые запускают активацию врожденного иммунитета и/или воспаления в сайтах опухолей. Повышенная интернализация ингибирующих рецепторов может обуславливать более низкий уровень потенциального ингибитора (при условии, что передача сигнала не происходит).

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73 вводят субъекту вместе с ингибитором BRAF, если субъект является положительным по мутации BRAF V600.

В данном документе представлены способы стимуляции иммунной реакции у субъекта, предусматривающие введение субъекту антагонистической молекулы по отношению к CD73, например антитела, и одного или нескольких дополнительных иммуностимулирующих антител, таких как антагонист по отношению к PD-1, например антагонистическое антитело, антагонист по отношению к PD-L1, например антагонистическое антитело, антагонист по отношению к CTLA-4, например антагонистическое антитело, и/или антагонист по отношению к LAG3, например антагонистическое антитело, в результате чего стимулируется иммунная реакция у субъекта, например, для ингибирования опухолевого роста или для стимуляции противовирусной реакции. В соответствии с одним вариантом осуществления субъекту вводят антагонистическое антитело к CD73 и антагонистическое антитело к PD-1. В соответствии с одним вариантом осуществления субъекту вводят антагонистическое антитело к CD73 и антагонистическое антитело к PD-L1. В соответствии с одним вариантом осуществления субъекту вводят антагонистическое антитело к CD73 и антагонистическое антитело к CTLA-4. В соответствии с одним вариантом осуществ-

ления антитело к CD73 представляет собой человеческое антитело, такое как антитело, описанное в данном документе. В качестве альтернативы, антитело к CD73 может представлять собой, например, химерное или гуманизированное антитело (например, полученное из мышиного mAb к CD73), такое как антитела, дополнительно описанные в данном документе. В соответствии с одним вариантом осуществления по меньшей мере одно дополнительное иммуностимулирующее антитело (например, антагонистическое антитело к PD-1, антагонистическое антитело к PD-L1, антагонистическое антитело к CTLA-4 и/или антагонистическое антитело к LAG3) представляет собой человеческое антитело. В качестве альтернативы по меньшей мере одно дополнительное иммуностимулирующее антитело может представлять собой, например, химерное или гуманизированное антитело (например, полученное из мышиного антитела к PD-1, антитела к PD-L1, антитела к CTLA-4 и/или антитела к LAG3).

В данном документе предполагаются способы лечения гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли), предусматривающие введение субъекту антагонистического антитела к CD73 и антагонистического антитела к PD-1. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73 вводят в субтерапевтической дозе, антитело к PD-1 вводят в субтерапевтической дозе или оба из них вводят в субтерапевтической дозе. Также в данном документе предполагаются способы изменения неблагоприятного явления, ассоциированного с лечением гиперпролиферативного заболевания с использованием иммуностимулирующего средства, предусматривающий введение субъекту антитела к CD73 и субтерапевтической дозы антитела к PD-1. В соответствии с определенными вариантами осуществления субъект представляет собой человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к PD-1 представляет собой моноклональное антитело с человеческой последовательностью, и антитело к CD73 представляет собой моноклональное антитело с человеческой последовательностью, такое как антитело, содержащее CDR или вариабельные участки 11F11, 4C3, 4D4, 10D2, 11A6, 24H2, 5F8, 6E11, 7A11, CD73.3, CD73.4, CD73.5, CD73.6, CD73.7, CD73.8, CD73.9, CD73.10 или CD73.11, описанных в данном документе, или другое антагонистическое антитело к CD73, описанное в данном документе.

Подходящие антагонисты PD-1 для применения в способах, описанных в данном документе, включают в себя без ограничения лиганды, антитела (например, моноклональные антитела и биспецифичные антитела) и мультивалентные средства. В соответствии с одним вариантом осуществления антагонист PD-1 представляет собой слитый белок, например Fc-слитый белок, такой как AMP-244. В соответствии с одним вариантом осуществления антагонист PD-1 представляет собой антитело к PD-1 или антитело к PD-L1.

Иллюстративным антителом к PD-1 является ниволумаб (BMS-936558) или антитело, которое содержит CDR или вариабельные участки из одного из антител 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 7D3, 5F4 и 4A11, описанных в международной заявке WO 2006/121168. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к PD1 представляет собой МК-3475 (ламбролизумаб), описанное в международной заявке WO 2012/145493; AMP-514, описанное в международной заявке WO 2012/145493; и CT-011 (пидилизумаб; ранее известный как CT-AcTibody или BAT; см., например, Rosenblatt et al. (2011) J. Immunotherapy 34:409). Дополнительные известные антитела к PD-1 и другие ингибиторы PD-1 включают в себя описанные в международных заявках WO 2009/014708, WO 03/099196, WO 2009/114335, WO 2011/066389, WO 2011/161699, WO 2012/145493, патентах США №№ 7635757 и 8217149 и публикации заявки на патент США № 2009/0317368. Можно применять любое из антител к PD-1, раскрытых в международной заявке WO 2013/173223. Антитело к PD-1, которое конкурирует за связывание с одним из этих антител и/или связывается с тем же эпитопом на PD-1, что и одно из этих антител, также можно применять в методах комплексного лечения.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к PD-1 связывается с человеческим PD-1 с K_D, составляющей 5×10^{-8} M или менее, связывается с человеческим PD-1 с K_D, составляющей 1×10^{-8} M или менее, связывается с человеческим PD-1 с K_D, составляющей 5×10^{-9} M или менее, или связывается с человеческим PD-1 с K_D, составляющей от 1×10^{-8} до 1×10^{-10} M или менее.

В данном документе предполагаются способы лечения гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли), предусматривающие введение субъекту антагонистического антитела к CD73 и антагонистического антитела к PD-L1. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73 вводят в субтерапевтической дозе, антитело к PD-L1 вводят в субтерапевтической дозе или оба из них вводят в субтерапевтической дозе. В данном документе представлены способы изменения неблагоприятного явления, ассоциированного с лечением гиперпролиферативного заболевания с использованием иммуностимулирующего средства, предусматривающие введение субъекту антитела к CD73 и субтерапевтической дозы антитела к PD-L1. В соответствии с определенными вариантами осуществления субъект представляет собой человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к PD-L1 представляет собой моноклональное антитело с человеческой последовательностью, и антитело к CD73 представляет собой моноклональное антитело с человеческой последовательностью, такое как антитело, содержащее CDR или вариабельные участки 11F11, 4C3, 4D4, 10D2, 11A6, 24H2, 5F8, 6E11, 7A11, CD73.3, CD73.4, CD73.5, CD73.6, CD73.7, CD73.8, CD73.9, CD73.10 или CD73.11, описанных в данном документе, или другое антагонистическое антитело к CD73, описанное в

данном документе.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к PD-L1 представляет собой BMS-936559 (называемое 12A4 в международной заявке WO 2007/005874 и патенте США № 7943743) или антитело, которое содержит CDR или вариабельные участки 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 и 13G4, которые описаны в PCT публикации международной заявки WO 07/005874 и патенте США № 7943743. В соответствии с определенным вариантом осуществления антитело к PD-L1 представляет собой MEDI4736 (также известное как антитело к B7-H1) или MPDL3280A (также известное как RG7446). Также можно применять любое из антител к PD-L1, раскрытых в международных заявках WO 2013/173223, WO 2011/066389, WO 2012/145493, патентах США №№ 7635757 и 8217149 и публикации заявки на патент США № 2009/145493. Антитела к PD-L1, которые конкурируют с любым из этих антител и/или связываются с тем же эпитопом, что и любое из этих антител, также можно применять в методах комплексного лечения.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к PD-L1 связывается с человеческим PD-L1 с K_D, составляющей 5×10^{-8} M или менее, связывается с человеческим PD-L1 с K_D, составляющей 1×10^{-8} M или менее, связывается с человеческим PD-L1 с K_D, составляющей 5×10^{-9} M или менее, или связывается с человеческим PD-L1 с K_D, составляющей от 1×10^{-8} до 1×10^{-10} M или менее.

В данном документе представлены способы лечения гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли), предусматривающие введение субъекту антитела к CD73, описанного в данном документе, и антагонистического антитела к CTLA-4. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73 вводят в субтерапевтической дозе, антитело к CTLA-4 вводят в субтерапевтической дозе или оба из них вводят в субтерапевтической дозе. В данном документе представлены способы изменения неблагоприятного явления, ассоциированного с лечением гиперпролиферативного заболевания с использованием иммуностимулирующего средства, предусматривающие введение субъекту антитела к CD73 и субтерапевтической дозы антитела к CTLA-4. В соответствии с определенными вариантами осуществления субъект представляет собой человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CTLA-4 представляет собой антитело, выбранное из группы: Yervoy™ (ипилимумаб или антитело 10D1, описанное в PCT публикации международной заявки WO 01/14424), тремелимумаб (ранее трицилимумаб, CP-675,206), моноклональное антитело или антитело к CTLA-4, описанное в любой из следующих публикаций: международные заявки WO 98/42752; WO 00/37504; патент США № 6207156; Hurwitz et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(17):10067-10071; Camacho et al. (2004) J. Clin. Oncology 22(145): Abstract No. 2505 (антитело CP-675206) и Mokyr et al. (1998) Cancer Res. 58:5301-5304. Можно применять любое из антител к CTLA-4, раскрытых в международной заявке WO 2013/173223.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CTLA-4 связывается с человеческим CTLA-4 с K_D, составляющей 5×10^{-8} M или менее, связывается с человеческим CTLA-4 с K_D, составляющей 1×10^{-8} M или менее, связывается с человеческим CTLA-4 с K_D, составляющей 5×10^{-9} M или менее, или связывается с человеческим CTLA-4 с K_D, составляющей от 1×10^{-8} до 1×10^{-10} M или менее.

В данном документе представлены способы лечения гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли), предусматривающие введение субъекту антитела к CD73 и антитела к LAG-3. В соответствии с дополнительными вариантами осуществления антитело к CD73 вводят в субтерапевтической дозе, антитело к LAG-3 вводят в субтерапевтической дозе или оба из них вводят в субтерапевтической дозе. В данном документе представлены способы изменения неблагоприятного явления, ассоциированного с лечением гиперпролиферативного заболевания с использованием иммуностимулирующего средства, предусматривающие введение субъекту антитела к CD73 и субтерапевтической дозы антитела к LAG-3. В соответствии с определенными вариантами осуществления субъект представляет собой человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к PD-1 представляет собой моноклональное антитело с человеческой последовательностью, и антитело к CD73 представляет собой моноклональное антитело с человеческой последовательностью, такое как антитело, содержащее CDR или вариабельные участки 11F11, 4C3, 4D4, 10D2, 11A6, 24H2, 5F8, 6E11, 7A11, CD73.3, CD73.4, CD73.5, CD73.6, CD73.7, CD73.8, CD73.9, CD73.10 или CD73.11, или другое антагонистическое антитело к CD73, описанное в данном документе. Примеры антител к LAG3 включают в себя антитела, содержащие CDR или вариабельные участки из антител 25F7, 26H10, 25E3, 8B7, 11F2 или 17E5, которые описаны в публикации заявки на патент США № 2011/0150892 и в международной заявке WO 2014/008218. В соответствии с одним вариантом осуществления антитело к LAG-3 представляет собой BMS-986016. Другие принятые в уровне техники антитела к LAG-3, которые можно применять, включают в себя IMP731, описанные в заявке на патент США № 2011/007023. Так можно использовать IMP-321. Антитела к LAG-3, которые конкурируют с любым из этих антител и/или связываются с тем же эпитопом, что и любое из этих антител, также можно применять в методах комплексного лечения.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к LAG-3 связывается с человеческим LAG-3 с K_D, составляющей 5×10^{-8} M или менее, связывается с человеческим LAG-3 с K_D, составляющей 1×10^{-8} M или менее, связывается с человеческим LAG-3 с K_D, составляющей 5×10^{-9} M или

менее, или связывается с человеческим LAG-3 с K_D, составляющей от 1×10^{-8} до 1×10^{-10} М или менее.

В соответствии с определенными вариантами осуществления антитело к CD73 вводят вместе с агонистическим антителом к GITR, например антителом, имеющим последовательности CDR из 6C8, например гуманизированным антителом, имеющим CDR из 6C8, как описано, например, в международной заявке WO 2006/105021; антителом, содержащим CDR из антитела к GITR, описанного в международной заявке WO 2011/028683; антителом, содержащим CDR из антитела к GITR, описанного в японской патентной заявке JP2008278814; или антителом, содержащим CDR из антитела к GITR, описанного патентном документе PCT/US2015/03 3991.

Введение антител к CD73, описанных в данном документе, и антагонистов, например антагонистических антител, одного или нескольких вторых антигенов-мишеней, таких как LAG-3, и/или CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, может усилить иммунную реакцию в отношении злокачественных клеток у пациента. Злокачественные опухоли, чей рост можно ингибировать с применением антител согласно настоящему раскрытию, включают в себя злокачественные опухоли, как правило, восприимчивые к иммунотерапии. Типичные примеры злокачественных опухолей для лечения с использованием комплексной терапии в соответствии с настоящим раскрытием включают в себя те злокачественные опухоли, которые специально перечислены выше при обсуждении монотерапии антителами к CD73.

В соответствии с определенными вариантами осуществления комбинацию терапевтических антител, обсуждаемых в данном документе, можно вводить одновременно в виде одной композиции в фармацевтически приемлемом носителе или одновременно в виде отдельных композиций с каждым антителом в фармацевтически приемлемом носителе. В соответствии с другим вариантом осуществления комбинацию терапевтических антител можно вводить последовательно. Например, антитело к CTLA-4 и антитело к CD73 можно вводить последовательно, как, например, антитело к CTLA-4 вводят первым, а антитело к CD73 - вторым, или антитело к CD73 вводят первым, а антитело к CTLA-4 - вторым. В качестве дополнения или альтернативы, антитело к PD-1 и антитело к CD73 можно вводить последовательно, как, например, антитело к PD-1 вводят первым, а антитело к CD73 - вторым, или антитело к CD73 вводят первым, а антитело к PD-1 - вторым. В качестве дополнения или альтернативы, антитело к PD-L1 и антитело к CD73 можно вводить последовательно, как, например, антитело к PD-L1 вводят первым, а антитело к CD73 - вторым, или антитело к CD73 вводят первым, а антитело к PD-L1 -вторым. В качестве дополнения или альтернативы, антитело к LAG-3 и антитело к CD73 можно вводить последовательно, как, например, антитело к LAG-3 вводят первым, а антитело к CD73 - вторым, или антитело к CD73 вводят первым, а антитело к LAG-3 -вторым.

Более того, если более чем одну дозу в ходе комплексной терапии вводят последовательно, порядок последовательного введения можно сменить на обратный или же сохранять тот же порядок при каждом моменте введения, последовательные введения можно комбинировать с одновременными введениями или любой их комбинацией. Например, первое введение комбинации антитела к CTLA-4 и антитела к CD73 может быть одновременным, второе введение может быть последовательным, причем антитело к CTLA-4 вводят первым, а антитело к CD73 - вторым, и третье введение может быть последовательным, примем антитело к CD73 вводят первым, а антитело к CTLA-4 -вторым, и т.д. В качестве дополнения или альтернативы, первое введение комбинации антитела к PD-1 и антитела к CD73 может быть одновременным, второе введение может быть последовательным, причем антитело к PD-1 вводят первым, а антитело к CD73 -вторым, и третье введение может быть последовательным, причем антитело к CD73 вводят первым, а антитело к PD-1 - вторым, и т.д. В качестве дополнения или альтернативы, первое введение комбинации антитела к PD-L1 и антитела к CD73 может быть одновременным, второе введение может быть последовательным, причем антитело к PD-L1 вводят первым, а антитело к CD73 - вторым, и третье введение может быть последовательным, причем антитело к CD73 вводят первым, а антитело к PD-L1 - вторым, и т.д. В качестве дополнения или альтернативы, первое введение комбинации антитела к LAG-3 и антитела к CD73 может быть одновременным, второе введение может быть последовательным, причем антитело к LAG-3 вводят первым, а антитело к CD73 - вторым, и третье введение может быть последовательным, причем антитело CD73 вводят первым, а антитело к LAG-3 - вторым, и т.д. Другой типичный режим дозирования может включать первое введение, которое является последовательным, причем антитело к CD73 вводят первым, а антитело к CTLA-4 (и/или антитело к PD-1, и/или антитело к PD-L1, и/или антитело к LAG-3) - вторым, а последующие введения могут быть одновременными.

В соответствии с одним вариантом осуществления субъект, имеющий заболевание, на которое может оказывать благоприятное воздействие стимуляция иммунной системы, например злокачественную опухоль или инфекционное заболевание, получает лечение путем введения субъекту иммуноонкологического средства и антитела к CD73, причем иммуноонкологическое средство представляет собой агонист CD137 (4-1BB), такой как агонистическое антитело к CD137. Подходящие антитела к CD137 включают в себя, например, урелумаб или PF-05082566 (WO 12/32433).

В соответствии с одним вариантом осуществления субъект, имеющий заболевание, на которое может оказывать благоприятное воздействие стимуляция иммунной системы, например злокачественную опухоль или инфекционное заболевание, получает лечение путем введения субъекту иммуноонкологического средства и антитела к CD73, причем иммуноонкологическое средство представляет собой агонист

OX40, такой как агонистическое антитело к OX40. Подходящие антитела к OX40 включают в себя, например, MEDI-6383, MEDI-6469 или MOXR0916 (RG7888; WO 06/029879).

В соответствии с одним вариантом осуществления субъект, имеющий заболевание, на которое может оказывать благоприятное воздействие стимуляция иммунной системы, например злокачественную опухоль или инфекционное заболевание, получает лечение путем введения субъекту иммуноонкологического средства и антитела к CD73, причем иммуноонкологическое средство представляет собой агонист CD40, такой как агонистическое антитело к CD40. В соответствии с определенными вариантами осуществления иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист CD40, такой как антагонистическое антитело к CD40. Подходящие антитела к CD40 включают в себя, например, лукатумумаб (HCD122), дацетузумаб (SGN-40), CP-870,893 или Chi Lob 7/4.

В соответствии с одним вариантом осуществления субъект, имеющий заболевание, на которое может оказывать благоприятное воздействие стимуляция иммунной системы, например злокачественную опухоль или инфекционное заболевание, получает лечение путем введения субъекту иммуноонкологического средства и антитела к CD73, причем иммуноонкологическое средство представляет собой агонист CD27, такой как агонистическое антитело к CD27. Подходящие антитела к CD27 включают в себя, например, варлилумаб (CDX-1127).

В соответствии с одним вариантом осуществления субъект, имеющий заболевание, на которое может оказывать благоприятное воздействие стимуляция иммунной системы, например злокачественную опухоль или инфекционное заболевание, получает лечение путем введения субъекту иммуноонкологического средства и антитела к CD73, причем иммуноонкологическое средство представляет собой MGA271 (для B7H3) (WO 11/109400).

В соответствии с одним вариантом осуществления субъект, имеющий заболевание, на которое может оказывать благоприятное воздействие стимуляция иммунной системы, например злокачественную опухоль или инфекционное заболевание, получает лечение путем введения субъекту иммуноонкологического средства и антитела к CD73, причем иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист KIR, такой как лирилумаб.

В соответствии с одним вариантом осуществления субъект, имеющий заболевание, на которое может оказывать благоприятное воздействие стимуляция иммунной системы, например злокачественную опухоль или инфекционное заболевание, получает лечение путем введения субъекту иммуноонкологического средства и антитела к CD73, причем иммуноонкологическое средство представляет собой антагонист IDO. Подходящие антагонисты IDO включают в себя, например, INCB-024360 (WO 2006/122150, WO 07/75598, WO 08/36653, WO 08/36642), индоксимод, NLG-919 (WO 09/73620, WO 09/1156652, WO 11/56652, WO 12/142237) или F001287.

В соответствии с одним вариантом осуществления субъект, имеющий заболевание, на которое может оказывать благоприятное воздействие стимуляция иммунной системы, например злокачественную опухоль или инфекционное заболевание, получает лечение путем введения субъекту иммуноонкологического средства и антитела к CD73, причем иммуноонкологическое средство представляет собой агонист Toll-подобного рецептора, например агонист TLR2/4 (например, бацилла Кальмета-Герена); агонист TLR7 (например, хилтонол или имиквимод); агонист TLR7/8 (например, резиквимод) или агонист TLR9 (например, CpG7909).

В соответствии с одним вариантом осуществления субъект, имеющий заболевание, на которое может оказывать благоприятное воздействие стимуляция иммунной системы, например злокачественную опухоль или инфекционное заболевание, получает лечение путем введения субъекту иммуноонкологического средства и антитела к CD73, причем иммуноонкологическое средство представляет собой ингибитор TGF-β, например GC1008, LY2157299, TEW7197 или IMC-TR1.

В соответствии с одним аспектом антитело к CD73 вводят последовательно перед введением второго средства, например иммуноонкологического средства. В соответствии с одним аспектом антитело к CD73 вводят одновременно со вторым средством, например иммуноонкологическим средством. В соответствии с еще одним аспектом антитело к CD73 вводят последовательно после введения второго средства. Введение двух средств может начинаться в моменты времени, которые разделены, например, 30, 60, 90, 120 мин, 3, 6, 12, 24, 36, 48 ч, 3, 5, 7 сутками или одной или несколькими неделями, или введение второго средства может начинаться, например, через 30, 60, 90, 120 мин, 3, 6, 12, 24, 36, 48 ч, 3, 5, 7 суток или одну или несколько недель после того, как было введено первое средство.

В соответствии с определенными аспектами антитело к CD73 и второе средство, например иммуноонкологическое средство, вводят пациенту одновременно, например вводят одновременно посредством инфузии, например, в течение периода, составляющего 30 или 60 мин. Антитело к CD73 можно составить совместно со вторым средством, например иммуноонкологическим средством.

Необязательно, антитело к CD73 в виде отдельного иммунотерапевтического средства или комбинации антитела к CD73 и одного или нескольких дополнительных иммунотерапевтических антител (например, блокада антитела к CTLA-4, и/или антитела к PD-1, и/или антитела к PD-L1, и/или антитела к LAG-3) можно дополнительно комбинировать с иммуногенным средством, таким как злокачественные клетки, очищенные опухолевые антигены (в том числе рекомбинантные белки, пептиды и углеводные

молекулы), клетки и клетки, трансфицированные генами, кодирующими иммуностимулирующие цитокины (He et al. (2004) J. Immunol. 173:4919-28). Неограничивающие примеры противоопухолевых вакцин, которые можно использовать, включают в себя пептиды из антигенов меланомы, такие как пептиды gp100, антигены MAGE, Trp-2, MART1 и/или тирозиназы, или опухолевые клетки, трансфицированные для экспрессии цитокина GM-CSF (дополнительно обсуждаются ниже). Ингибирование CD73 в комбинации с одним или несколькими дополнительными антителами (например, блокада CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3) можно дополнительно комбинировать со стандартными методами лечения злокачественных опухолей. Например, ингибирование CD73 в комбинации с одним или несколькими дополнительными антителами (например, блокада CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3) можно эффективно комбинировать с химиотерапевтическими схемами. В этих случаях представляется возможным снижение дозы другого химиотерапевтического реагента, вводимого с комбинацией согласно настоящему раскрытию (Mokyr et al. (1998) Cancer Research 58: 5301-5304). Примером такой комбинации является комбинация антагонистического антитела к CD73 с дополнительным антителом или без дополнительного антитела, такого как антитела к CTLA-4, и/или антитела к PD-1, и/или антитела к PD-L1, и/или антитела к LAG-3, и дополнительного декарбазина для лечения меланомы. Другим примером является комбинация антитела к CD73 с антителами к CTLA-4, и/или антителами к PD-1, и/или антителами к PD-L1, и/или антителами к LAG-3 или без них и дополнительного интерлейкина-2 (IL-2) для лечения меланомы. Научным обоснованием комбинированного применения ингибирования CD73 и блокады CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 с химиотерапией является то, что гибель клеток, которая является следствием цитотоксического действия большинства химиотерапевтических соединений, должна приводить в результате к повышенным уровням опухолевого антигена в рамках пути презентирования антигена. Другие методы комплексной терапии, которые могут приводить в результате к синергизму с ингибированием CD73 в комбинации с блокадой CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 или без такой блокады вследствие гибели клеток, включают в себя радиационное облучение, хирургическое вмешательство или выключение эндокринной функции. При каждом из этих протоколов создается источник опухолевого антигена у хозяина. Ингибиторы ангиогенеза также можно комбинировать с ингибированием CD73 в комбинации с блокадой CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3. Ингибирование ангиогенеза ведет к гибели опухолевых клеток, которые могут быть источником направления опухолевого антигена в пути презентирования антигена у хозяина.

Антагонистическое антитело к CD73 в качестве отдельного иммунотерапевтического средства или комбинацию антагонистических в отношении CD73 и блокирующих CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 антител можно применять в комбинации с биспецифичными антителами, которые нацеливают экспрессирующие Fcα- или Fcγ-рецептор эффекторные клетки на опухолевые клетки (см., например, патенты США №№ 5922845 и 5837243). Биспецифичные антитела можно применять для целенаправленного воздействия на два отдельных антигена. Т-клеточное звено в этих реакциях будет дополняться применением комбинированного ингибирования CD73 и блокады CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3.

В другом примере антагонистическое антитело к CD73 в виде отдельного иммунотерапевтического средства или комбинацию антитела к CD73 и дополнительного иммуностимулирующего средства, например антитела к CTLA-4, и/или антитела к PD-1, и/или антитела к PD-L1, и/или средства, воздействующего на LAG-3, например антитела, можно применять в сочетании с антителом к злокачественным новообразованиям, таким как Rituxan® (ритуксимаб), Herceptin® (трастузумаб), Bexxar® (тоситумомаб), Zevalin® (ибритумомаб), Campath® (алемтузумаб), Lymphocide® (эпртузумаб), Avastin® (бевацизумаб) и Tarceva® (эрлотиниб) и т.п. В качестве примера, и не вдаваясь в теорию, лечение использованием антитела к злокачественной опухоли или антитела к злокачественной опухоли, конъюгированного с токсином, может вести к гибели клеток злокачественной опухоли (например, опухолевых клеток), которая будет усиливать иммунную реакцию, опосредованную иммуностимулирующим средством, например средством, воздействующим на CD73, CTLA-4, PD-1, PD-L1 или LAG-3, например антителом. В соответствии с иллюстративным вариантом осуществления лечение гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли) может включать в себя противораковое средство, например антитело, в комбинации с антителом к CD73 и необязательно дополнительное иммуностимулирующее средство, например средство, противодействующее CTLA-4, и/или противодействующее PD-1, и/или противодействующее PD-L1, и/или противодействующее LAG-3, например антитело, одновременно или последовательно или любую их комбинацию, которая может усиливать противоопухолевые иммунные реакции у хозяина.

Опухоли ускользают от иммунологического надзора хозяина посредством обширного ряда механизмов. Многие из этих механизмов можно преодолеть путем инактивации белков, которые экспрессируются опухолями и которые являются иммунодепрессивными. Они включают в себя, среди прочих, TGF-β (Kehrl et al. (1986) J. Exp. Med. 163: 1037-1050), IL-10 (Howard & O'Garra (1992) Immunology Today 13: 198-200) и Fas лиганд (Hahne et al. (1996) Science 274: 1363-1365). Антитела к каждой из этих молекул можно дополнительно комбинировать с антителом к CD73 с дополнительным иммуностимулирующим средством или без дополнительного иммуностимулирующего средства, например средства, противодей-

ствующего CTLA-4, и/или противодействующего PD-1, и/или противодействующего PD-L1, и/или противодействующего LAG-3, такого как антитело, для противодействия эффектам иммунодепрессивных средств и поддержки иммунным реакциям против опухоли у хозяина.

Другие средства, например антитела, которые можно применять для активации иммунологической реактивности у хозяина можно также применять в комбинации с антителом к CD73 с дополнительным иммуностимулирующим средством или без дополнительного иммуностимулирующего средства, такого как антитело к CTLA-4, и/или антитело к PD-1, и/или антитело к PD-L1, и/или антитело к LAG-3. Они включают в себя молекулы на поверхности дендритных клеток, которые активируют функцию DC и презентирование антигена. Антитела к CD40 (Ridge et al., выше) можно применять в сочетании с антителом к CD73 и необязательно с дополнительным иммуностимулирующим средством, например средством, противодействующим CTLA-4, и/или противодействующим PD-1, и/или противодействующим PD-L1, и/или противодействующим LAG-3, например антителом. Другие активирующие антитела к костимулирующим молекулам Т-клеток, Weinberg et al., выше, Melero et al. выше, Hutloff et al., выше, также можно обеспечивать для повышенных уровней активации Т-клеток.

Как обсуждалось выше, в настоящее время трансплантацию костного мозга применяют для лечения ряда опухолей гемопоэтического происхождения. Иммунотерапию антителом к CD73 самим по себе или в комбинации с блокадой CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 можно применять для повышения эффективности пересаженных от донора опухолеспецифичных Т-клеток.

Несколько экспериментальных лечебных протоколов, которые включают ex vivo активацию и разращивание антигенспецифичных Т-клеток и адоптивный перенос этих клеток реципиентам для получения антигенспецифичных Т-клеток против опухоли (Greenberg & Riddell, выше). Эти способы также можно применять для активации Т-клеточных реакций в отношении инфекционных агентов, таких как CMV. Можно ожидать, что ex vivo активация в присутствии антитела к CD73 с дополнительным иммуностимулирующим терапевтическим средством или без дополнительного терапевтического иммуностимулирующего средства, например антител к CTLA-4, и/или антител к PD-1, и/или антител к PD-L1, и/или антител к LAG-3, повышает встречаемость и активность подвергнутых адоптивному переносу Т-клеток.

В данном документе предполагаются способы изменения неблагоприятного явления, ассоциированного с лечением гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественной опухоли) с использованием иммуностимулирующего средства, предусматривающий введение субъекту антитела к CD73 с субтерапевтической дозой средства, противодействующего CTLA-4, и/или противодействующего PD-1, и/или противодействующего PD-L1, и/или противодействующего LAG-3, например антитела, или без нее. Например, способы, описанные в данном документе, предполагают способ снижения частоты возникновения колита или диареи, вызванных иммуностимулирующим терапевтическим антителом, посредством введения пациенту непоглощаемого стероида. Как используется в данном документе, "непоглощаемый стероид" представляет собой глюкокортикоид, для которого проявляется значительный пресистемный метаболизм таким образом, что после метаболизма в печени биодоступность стероида является низкой, т.е. составляет менее приблизительно 20%. В соответствии с одним вариантом осуществления, описанным в данном документе, непоглощаемый стероид представляет собой будесонид. Будесонид является локально действующим глюкокортикостероидом, который значительно метаболизируется преимущественно печенью после перорального введения. ENTOCORT EC® (Astra-Zeneca) представляет собой pH-зависимый и зависимый от времени пероральный состав будесонида, разработанный для оптимизации доставки лекарственного средства в подвздошную кишку и по толстой кишке. ENTOCORT EC® одобрен в США для лечения болезни Крона со степенью тяжести от легкой до умеренной, затрагивающей подвздошную кишку и/или восходящую ободочную кишку. Обычная пероральная доза ENTOCORT EC® для лечения болезни Крона составляет 6-9 мг/сутки. ENTOCORT EC® высвобождается в кишечнике до поглощения и удерживается в слизистой кишки. После того как он проходит через являющуюся мишенью ткань слизистой кишки, ENTOCORT EC® значительно метаболизируется системой цитохрома P450 в печени в метаболиты с пренебрежимо малой глюкокортикоидной активностью. Вследствие этого биодоступность является низкой (приблизительно 10%). Низкая биодоступность будесонида приводит в результате к улучшенному терапевтическому индексу по сравнению с другими глюкокортикоидами с менее значительным пресистемным метаболизмом. Будесонид приводит в результате к меньшим неблагоприятным эффектам, в том числе меньшему подавлению гипоталамо-гипофизарной системы, чем системно действующие кортикостероиды. Тем не менее, хроническое введение ENTOCORT EC® может приводить в результате к системным эффектам глюкокортикоидов, таким как гиперкортицизм и адренальная супрессия; см. PDR 58th ed. 2004; 608-610.

В соответствии с дополнительными вариантами осуществления ингибирование CD73 с блокадой или без блокады CTLA-4, и/или PD-1, и/или PD-L1, и/или LAG-3 (т.е. иммуностимулирующими терапевтическими антителами к CD73 и необязательно антителами к CTLA-4, и/или антителами к PD-1, и/или антителами к PD-L1, и/или антителами к LAG-3) в сочетании с непоглощаемым стероидом можно дополнительно комбинировать с салицилатом. Салицилаты включают в себя 5-ASA средства, такие как, например, сульфасалазин (AZULFIDINE®, Pharmacia & UpJohn); олсалазин (DIPENTUM®, Pharmacia & UpJohn); балсалазид (COLAZAL®, Salix Pharmaceuticals, Inc.) и месаламин (ASACOL®, Procter & Gamble

Pharmaceuticals; PENTASA®, Shire US; CANASA®, Axcan Scandipharm, Inc.; ROWASA®, Solvay).

В соответствии со способами, описанными в данном документе, введение салицилата в комбинации с антителом к CD73 с антителами к CTLA-4, и/или антителами к PD-1, и/или антителами к PD-L1, и/или антителами к LAG-3 и непоглощаемым стероидом или без них может включать в себя любое накладывающееся или последовательное введение салицилата и непоглощаемого стероида с целью снижения частоты возникновения колита, вызванного иммуностимулирующими антителами. Таким образом, например, способы снижения частоты возникновения колита, вызванного иммуностимулирующими антителами, описанными в данном документе, охватывают введение салицилата и непоглощаемого стероида одновременно, или последовательно (например, салицилат вводят через 6 ч после непоглощаемого стероида), или в любой их комбинации. Кроме того, салицилат и непоглощаемый стероид можно вводить тем же путем (например, оба вводят перорально) или разными путями (например, салицилат вводят перорально, а непоглощаемый стероид вводят ректально), которые могут отличаться от пути(путей), используемого для введения антитела к CD73 и антител к CTLA-4, и/или антител к PD-1, и/или антител к PD-L1, и/или антител к LAG-3.

Антитела к CD73 и комбинацию терапевтических средств на основе антител, описанных в данном документе, также можно применять в сочетании с другими широко известными терапевтическими средствами, которые выбирают, исходя из их конкретной применимости в отношении показания для лечения (например, злокачественной опухоли). Комбинации антител к CD73, описанных в данном документе, можно применять последовательно с известным фармацевтически приемлемым средством(средствами).

Например, антитела к CD73 и комбинацию терапевтических средств на основе антител, описанных в данном документе, можно применять в комбинации (например, одновременно или раздельно) с дополнительным методом лечения, таким как облучение, химиотерапия (например, с использованием камптецина (CTP-11), 5-фторурацила (5-FU), цисплатина, доксорубицина, иринотекана, паклитаксела, гемцитабина, цисплатина, паклитаксела, карбоплатина-паклитаксела (Taxol), доксорубицина, 5-fu или камптецина + apo21/TRAIL (6-кратное комбинированное применение)), один или несколько ингибиторов протеасомы (например, бортезомиб или MG132), один или несколько ингибиторов Bc1-2 (например, BH3I-2' (bcl-xl ингибитор), ингибитор индоламиндиоксигеназы-1 (IDO1) (например, INCB24360), AT-101 (R-(-)-госсипольное производное), ABT-263 (малая молекула), GX-15-070 (обатоклакс) или антагонисты MCL-1 (белок дифференцировки клетки миелолейкоза 1)), антагонисты iAP (ингибитор белков апоптоза) (например, smac7, smac4, малая молекула-миметик smac, синтетические пептиды smac (см. Fulda et al., Nat Med 2002; 8:808-15), ISIS23722 (LY2181308), или AEG-35156 (GEM-640)), ингибиторы HDAC (гистондеацетилазы), антитела к CD20 (например, ритуксимаб), ингибиторы ангиогенеза (например, бевацизумаб), антиангиогенные средства, целенаправленно воздействующие на VEGF и VEGFR (например, авастин), синтетические тритерпеноиды (см. Hyer et al., Cancer Research 2005;65:4799-808), модуляторы c-FLIP (клеточный белок-ингибитор FLICE) (например, натуральные и синтетические лиганды PPARγ (γ рецептор, активируемый пролифератором пероксисом), 5809354 или 5569100), ингибиторы киназ (например, сорафениб), трастузумаб, цетуксимаб, темсиролимус, ингибиторы mTOR, такие как рапамицин и темсиролимус, бортезомиб, ингибиторы JAK2, ингибиторы HSP90, ингибиторы PI3K-AKT, леналидомид, ингибиторы GSK3P, ингибиторы IAP и/или генотоксичные лекарственные средства.

Антитела к CD73 и комбинацию терапевтических средств на основе антител, описанных в данном документе, можно дополнительно применять в комбинации с одним или несколькими антипролиферативными цитотоксическими средствами. Классы соединений, которые можно применять в качестве антипролиферативных цитотоксических средств, включают в себя без ограничения следующие.

Алкилирующие средства (в том числе без ограничения азотистые иприты, этилениминовые производные, алкилсульфонаты, нитрозомочевины и триазены): урамустин, хлорметин, циклофосфамид (CYTOXAN™) фосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, пипоброман, триэтиленмеламин, триэтилентиофосфорамин, бусульфан, кармустин, ломустин, стрептозоцин, дакарбазин и темозоломид.

Антиметаболиты (в том числе без ограничения антагонисты фолиевой кислоты, пиримидиновые аналоги, пуриновые аналоги и ингибиторы аденозиндезаминазы): метотрексат, 5-фторурацил, флоксуридин, цитарабин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, флударабин фосфат, пентостатин и гемцитабин.

Подходящие антипролиферативные средства для комбинирования с антагонистическими антителами к CD73, описанными в данном документе, включают в себя без ограничения таксаны, паклитаксел (паклитаксел коммерчески доступен как TAXOL™), доцетаксел, дискодермолид (DDM), диктиостатин (DCT), пелорусид A, эпотилоны, эпотилон A, эпотилон B, эпотилон C, эпотилон D, эпотилон E, эпотилон F, фураноэпотилон D, дезоксиэпотилон B1, [17]-дегидродезоксиэпотилон B, [18]дегидродезоксиэпотилоны B, C12,13-циклопропилэпотилон A, C6-C8-мостиковый эпотилон A, транс-9,10-дегидроэпотилон D, цис-9,10-дегидроэпотилон D, 16-десметилэпотилон B, эпотилон B10, дискодермолид, патупилон (EPO-906), KOS-862, KOS-1584, ZK-EPO, ABJ-789, XAA296A (дискодермолид), TZT-1027 (соблидотин), ILX-651 (тасидотин гидрохлорид), халихондрин B, эрибулин мезилат (E-7389), гемиастерлин (HTI-286), E-7974, криптофицины, LY-355703, иммуноконъюгаты с майтанзиноидом (DM-1), MKC-1, ABT-751, T1-38067, T-900607, SB-715992 (испинесиб), SB-743921, MK-0731, STA-5312, элеутеробин, 17-бета-ацетокси-2-этокси-6-оксо-B-гомо-эстра-1,3,5(10)-триен-3-ол, циклостерпин, изолаулима-

лид, лаулималид, 4-эпи-7-дегидрокси-14,16-дидеметил-(+)-дискодермолиды и криптотилон 1 в дополнение к другим средствам, стабилизирующим микротрубочки, известным в уровне техники.

В случаях, когда желательно сделать аберрантно пролиферирующие клетки неактивными совместно с лечением с использованием антител к CD73, описанных в данном документе, или перед ним, гормоны и стероиды (в том числе синтетические аналоги), такие как 17а-этинилэстрадиол, диэтилстильбестрол, тестостерон, преднизон, флуоксиместрон, дромостанолон пропионат, тестолактон, мегестролацетат, метилпреднизолон, метилтестостерон, преднизолон, триамцинолон, хлортрианизен, гидроксипрогестерон, аминоглютетимид, эстрамустин, медроксипрогестеронацетат, леупролид, флутамид, торемифен, ZOLADEX™, также можно вводить пациенту. При использовании способов или композиций, описанных в данном документе, в случае необходимости также можно вводить другие средства, применяемые в модулировании роста или метастазирования опухоли в клинических условиях, такие как антимиметики.

Способы безопасного и эффективного введения химиотерапевтических средств известны специалистам в данной области техники. Кроме того, их введение описано в стандартной литературе. Например, введение многих из химиотерапевтических средств описано в Настольном справочнике врача (Physicians' Desk Reference (PDR)), например, редакции 1996 г. (Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, USA); раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки на него.

Химиотерапевтическое средство(средства) и/или лучевая терапия можно назначать в соответствии с терапевтическими протоколами, широко известными в уровне техники. Специалистам в данной области техники будет очевидно, что назначение химиотерапевтического средства(средств) и/или лучевой терапии может изменяться в зависимости от заболевания, подлежащего лечению, и от известных эффектов химиотерапевтического средства(средств) и/или лучевой терапии в отношении данного заболевания. В соответствии со знаниями клинического врача терапевтические протоколы (например, величины дозы и время введения) также можно изменять, принимая во внимание наблюдаемые воздействия вводимых терапевтических средств на пациента и принимая во внимание наблюдаемые реакции заболевания на вводимые терапевтические средства.

Иллюстративные варианты осуществления

1. Выделенное человеческое антитело или его антигенсвязывающая часть, которые связываются с человеческим кластером дифференцировки 73 (CD73) и проявляют одно или несколько из следующих свойств:

(a) ингибируют ферментативную активность CD73;

(b) интернализируются в опухолевые клетки или

(c) связываются с конформационным эпитопом, содержащим аминокислоты 65-83 и 157-172 в человеческом CD73.

2. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 1, причем антитело интернализируется в опухолевые клетки с $T_{1/2}$, составляющим не более чем 10 мин при измерении с помощью анализа вытеснения метки.

3. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 1 или 2, причем антитело связывается с растворимым человеческим CD73 с K_D, составляющей приблизительно 0,1-10 нМ или менее при измерении с помощью анализа SPR методом BIACORE®.

4. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело связывается с человеческим CD73 с EC_{50}, составляющей 0,1-10 нМ или менее при измерении с помощью метода FACS.

5. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело связывается с CD73 яванского макака с EC_{50}, составляющей 0,1-10 нМ или менее при измерении с помощью метода FACS.

6. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело связывается с эпитопом на человеческом CD73 (SEQ ID NO: 1), который включает в себя аминокислотные остатки FTKVQQIRRAEPNVLLLDA (SEQ ID NO: 96) и/или LYLPYKVLPVGDEVVG (SEQ ID NO: 97).

7. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 6, причем эпитоп охватывает или перекрывается с аминокислотными остатками FTKVQQIRRAEPNVLLLDA (SEQ ID NO: 96) и/или LYLPYKVLPVGDEVVG (SEQ ID NO: 97).

8. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело выбрано из группы, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или его варианта.

9. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые связываются с человеческим CD73 и содержат три CDR вариабельного участка тяжелой цепи и три CDR вариабельного участка легкой цепи, которые находятся соответственно в парах из вариабельных участков тяжелой и легкой цепей, выбранных из группы, состоящей из:

(a) SEQ ID NO: 4 и 8;

(b) SEQ ID NO: 4 и 12;

(c) SEQ ID NO: 16 и 20;

(d) SEQ ID NO: 16 и 24;
(e) SEQ ID NO: 16 и 28;
(f) SEQ ID NO: 32 и 36;
(g) SEQ ID NO: 40 и 44;
(h) SEQ ID NO: 40 и 48;
(i) SEQ ID NO: 52 и 56;
(j) SEQ ID NO: 60 и 64;
(k) SEQ ID NO: 68 и 72;
(l) SEQ ID NO: 68 и 76;
(m) SEQ ID NO: 80 и 84;
(n) SEQ ID NO: 88 и 92;
(o) SEQ ID NO: 135 и 8 и
(p) SEQ ID NO: 135 и 12.

10. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые связываются с человеческим CD73, содержащим:

(a) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно;

(b) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 13, 14 и 15 соответственно;

(c) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 17, 18 и 19 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 21, 22 и 23 соответственно;

(d) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 17, 18 и 19 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 25, 26 и 27 соответственно;

(e) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 17, 18 и 19 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 29, 30 и 31 соответственно;

(f) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 33, 34 и 35 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 37, 38 и 39 соответственно;

(g) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 41, 42 и 43 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 45, 46 и 47 соответственно;

(h) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 41, 42 и 43 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 49, 50 и 51 соответственно;

(i) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 53, 54 и 55 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 57, 58 и 59 соответственно;

(j) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 61, 62 и 63 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 65, 66 и 67 соответственно;

(k) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 69, 70 и 71 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 73, 74 и 75 соответственно;

(l) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 69, 70 и 71 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 77, 78 и 79 соответственно;

(m) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 81, 82 и 83 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 85, 86 и 87 соответственно; или

(n) последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 89, 90 и 91 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 93, 94 и 95 соответственно.

11. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 10, причем антитело содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 9, 10 и 11 соответственно.

12. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 11,

причем антитело содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, и/или последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 13, 14 и 15 соответственно.

13. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые связываются с человеческим CD73 и содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, причем вариабельный участок тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 16, 32, 40, 52, 60, 68, 80, 88 и 135.

14. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые связываются с человеческим CD73 и содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, причем вариабельный участок легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 12, 20, 24, 28, 36, 44, 48, 56, 64, 72, 76, 84 и 92.

15. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые связываются с человеческим CD73 и содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей, которые по меньшей мере на 85% идентичны аминокислотным последовательностям вариабельных участков тяжелой и легкой цепей соответственно, выбранным из группы, состоящей из:

(a) SEQ ID NO: 4 и 8;
(b) SEQ ID NO: 4 и 12;
(c) SEQ ID NO: 16 и 20;
(d) SEQ ID NO: 16 и 24;
(e) SEQ ID NO: 16 и 28;
(f) SEQ ID NO: 32 и 36;
(g) SEQ ID NO: 40 и 44;
(h) SEQ ID NO: 40 и 48;
(i) SEQ ID NO: 52 и 56;
(j) SEQ ID NO: 60 и 64;
(k) SEQ ID NO: 68 и 72;
(l) SEQ ID NO: 68 и 76;
(m) SEQ ID NO: 80 и 84;
(n) SEQ ID NO: 88 и 92;
(o) SEQ ID NO: 135 и 8 и
(p) SEQ ID NO: 135 и 12.

16. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 15, причем вариабельные участки тяжелой и легкой цепей содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную вариабельным участкам тяжелой и легкой цепей соответственно, выбранным из группы, состоящей из (a)-(p).

17. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 16, причем вариабельные участки тяжелой и легкой цепей содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную вариабельным участкам тяжелой и легкой цепей соответственно, выбранным из группы, состоящей из (a)-(p).

18. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 17, в котором вариабельные участки тяжелой и легкой цепей содержат вариабельные участки тяжелой и легкой цепей соответственно, выбранные из группы, состоящей из (a)-(p).

19. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 18, причем антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 135, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 8.

20. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 18, причем антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 135, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 12.

21. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые связываются с тем же эпитопом на CD73, что и антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-20.

22. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из вариантов осуществления 9-21, причем антитело проявляет любое из следующих свойств:

(1) связывание с растворимым человеческим CD73, например с K_D, составляющей 10 нМ или менее (например, от 0,01 до 10 нМ), например, при измерении с помощью анализа SPR методом BIACORE®;

(2) связывание с мембраносвязанным человеческим CD73, например с EC_{50}, составляющей 1 нМ или менее (например, от 0,01 до 1 нМ);

(3) связывание с CD73 яванского макака, например связывание с мембраносвязанным CD73 яванского макака, например с EC_{50}, составляющей 10 нМ или менее (например, от 0,01 до 10 нМ);

(4) ингибирование ферментативной активности человеческого CD73, например, с EC_{50}, составляющей 10 нМ или менее;

(5) ингибирование ферментативной активности CD73 макака-крабоеда, например, с EC_{50}, составляющей 10 нМ или менее;

(6) ингибирование ферментативной активности человеческого CD73 in vivo;

индукция или усиление активации Т-клеток без необходимости перекрестного сшивания с образованием мультивалентных структур;

(7) интернализация в клетки, например, с $T_{1/2}$, составляющим менее чем 10 мин;

(8) связывание с конформационным эпитопом на человеческом CD73, например прерывающимся эпитопом с аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO: 1), который включает в себя аминокислотные остатки FTKVQQIRRAEPNVLLLDA (SEQ ID NO: 96) и/или LYLPYKVLPVGDEVVG (SEQ ID NO: 97);

(9) связывание с гликозилированным, но не с негликозилированным человеческим CD73; и

(10) конкуренция в любом из направлений или в обоих направлениях с CD73.4-1, CD73.4-2, CD73.3, 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4, 10D2-1, 10D2-2, 11A6, 24H2, 5F8-1, 5F8-2, 6E11 и/или 7A11 за связывание с человеческим CD73.

23. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая часть, которые связываются с CD73 и содержат последовательности тяжелой цепи и легкой цепи, которые по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны аминокислотным последовательностям тяжелой и легкой цепей соответственно, выбранным из группы, состоящей из:

(a) SEQ ID NO: 100 и 101 соответственно;

(b) SEQ ID NO: 100 и 102 соответственно;

(c) SEQ ID NO: 103 и 104 соответственно;

(d) SEQ ID NO: 103 и 105 соответственно;

(e) SEQ ID NO: 103 и 106 соответственно;

(f) SEQ ID NO: 107 и 108 соответственно;

(g) SEQ ID NO: 109 и 110 соответственно;

(h) SEQ ID NO: 109 и 111 соответственно;

(i) SEQ ID NO: 112 и 113 соответственно;

(j) SEQ ID NO: 114 и 115 соответственно;

(k) SEQ ID NO: 116 и 117 соответственно;

(l) SEQ ID NO: 116 и 118 соответственно;

(m) SEQ ID NO: 119 и 120 соответственно;

(n) SEQ ID NO: 121 и 122 соответственно;

(o) SEQ ID NO: 133 и 101 соответственно и

(p) SEQ ID NO: 133 и 102 соответственно;

24. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 23, причем тяжелая и легкая цепи содержат тяжелые и легкие цепи, выбранные из группы, состоящей из (a)-(p).

25. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 24, причем антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 135, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 101.

26. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 24, причем антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 135, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 102.

27. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из вариантов осуществления 23-26, причем антитело проявляет любое из следующих свойств:

(a) ингибирует ферментативную активность CD73;

(b) интернализируется в опухолевые клетки или

(c) связывается с конформационным эпитопом, содержащим аминокислоты 65-83 и 157-172 в человеческом CD73.

28. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, причем антитело связывается с CD73 яванского макака.

29. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантами осуществления 10-22, причем антитело содержит Fc с отсутствующей эффекторной функцией.

30. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантами осуществления 1-7 и 9-22, причем антитело содержит модифицированный константный участок тяжелой цепи, содержащий человеческий CH1 домен, человеческий шарнирный домен, человеческий CH2 домен и человеческий CH3 домен в порядке от N- к C-концу.

31. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 30,

причем модифицированный константный участок содержит по меньшей мере 2 домена отличающихся изотипов, выбранных из группы изотипов, состоящей из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

32. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 30 или 31, причем модифицированный константный участок содержит CH1 домен человеческого IgG2 и по меньшей мере один из CH2, CH3 и шарнирного доменов не представляет собой изотип IgG2.

33. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 32, причем CH1 домен IgG2 содержит аминокислотную последовательность

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

GLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV (SEQ ID NO: 124).

34. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из вариантов осуществления 30-33, причем модифицированный константный участок содержит шарнирный домен человеческого IgG2, который снижает неоднородность в образовании связей с участием цистеина.

35. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 34, причем шарнирный домен содержит аминокислотную замену C219 по сравнению с шарнирным доменом человеческого IgG2 дикого типа (SEQ NO: 136).

36. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 35, причем шарнирный домен содержит аминокислотную последовательность ERKSCVECPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 123).

37. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из вариантов осуществления 30-36, причем модифицированный константный участок содержит CH2 домен человеческого IgG1, который ослабляет или устраняет эффекторные функции.

38. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 37, причем CH2 домен содержит аминокислотные замены A330S и P331S по сравнению с CH2 доменом человеческого IgG1 дикого типа (SEQ ID NO: 137).

39. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 38, причем CH2 домен содержит аминокислотную последовательность

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK

PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAK (SEQ ID NO:

125).

40. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из вариантов осуществления 30-39, причем модифицированный константный участок содержит CH3 домен человеческого IgG1.

41. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантом осуществления 40, причем CH3 домен содержит аминокислотную последовательность

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP

VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID

NO: 128).

42. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с любым из вариантов осуществления 9-29, причем антитело или его антигенсвязывающая часть представляют собой человеческое или гуманизированное антитело.

43. Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с вариантами осуществления 1-8, причем метиониновые остатки в CDR участках заменены на аминокислотные остатки, которые не подвергаются окислению.

44. Биспецифичная молекула, содержащая антитело в соответствии с любым из предыдущих вариантов осуществления, связанное с молекулой, характеризующейся второй специфичностью связывания.

45. Иммуноконъюгат, содержащий антитело в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-43, связанное со вторым отличающимся средством.

46. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая вариабельный участок тяжелой и/или легкой цепи антитела или его антигенсвязывающей части в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-43.

47. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с вариантом осуществления 46.

48. Клетка, трансформированная вектором экспрессии в соответствии с вариантом осуществления 47.

49. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающую часть, биспецифичную молекулу или иммуноконъюгат в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-45 и носитель.

50. Набор, содержащий антитело или его антигенсвязывающую часть, или биспецифичную молекулу, или иммуноконъюгат в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-45 и инструкции к применению.

51. Способ получения антитела к CD73 или его антигенсвязывающей части, предусматривающий экспрессию антитела или его антигенсвязывающей части в клетке в соответствии с вариантом осуществления 48 и выделение антитела или его антигенсвязывающей части из клетки.

52. Способ снижения уровней аденозина в опухолевой клетке, экспрессирующей CD73, предусматривающий приведение клетки в контакт с антителом, его антигенсвязывающей частью, биспецифичной молекулой или иммуноконъюгатом в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-45, в результате чего уровни аденозина снижаются.

53. Способ стимуляции Т-клеточной реакции в отношении опухолевой клетки, экспрессирующей CD73, у субъекта, нуждающегося в этом, предусматривающий введение эффективного количества антитела или его антигенсвязывающей части, биспецифичной молекулы или иммуноконъюгата в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-45, в результате чего стимулируется Т-клеточная реакция в отношении опухолевой клетки.

54. Способ стимуляции иммунной реакции у субъекта, предусматривающий введение субъекту антитела или его антигенсвязывающей части, биспецифичной молекулы или иммуноконъюгата в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-45, в результате чего у субъекта стимулируется иммунная реакция.

55. Способ в соответствии с вариантом осуществления 54, при котором субъект имеет опухолевую клетку, экспрессирующую CD73, и стимулируется иммунная реакция в отношении опухолевой клетки.

56. Способ ингибирования роста опухолевых клеток, экспрессирующих CD73, у субъекта, предусматривающий введение субъекту антитела или его антигенсвязывающей части, биспецифичной молекулы или иммуноконъюгата в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-45, в результате чего ингибируется рост опухоли у субъекта.

57. Способ лечения злокачественной опухоли, предусматривающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающей части, биспецифичной молекулы или иммуноконъюгата в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-45 для лечения злокачественной опухоли.

58. Способ в соответствии с вариантом осуществления 57, при котором злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из злокачественной опухоли мочевого пузыря, злокачественной опухоли молочной железы, злокачественной опухоли матки/шейки матки, злокачественной опухоли яичника, злокачественной опухоли предстательной железы, злокачественной опухоли яичка, злокачественной опухоли пищевода, злокачественной опухоли желудочно-кишечного тракта, злокачественной опухоли поджелудочной железы, злокачественной опухоли ободочной и прямой кишок, злокачественной опухоли ободочной кишки, злокачественной опухоли почки, злокачественной опухоли головы и шеи, злокачественной опухоли легкого, злокачественной опухоли желудка, герминогенной злокачественной опухоли, злокачественной опухоли кости, злокачественной опухоли печени, злокачественной опухоли щитовидной железы, злокачественной опухоли кожи, новообразований центральной нервной системы, лимфомы, лейкоза, миеломы, саркомы и злокачественной опухоли, связанной с вирусом.

59. Способ в соответствии с вариантом осуществления 57 или 58, при котором злокачественная опухоль представляет собой метастазирующую злокачественную опухоль, невосприимчивую к лечению злокачественную опухоль или рецидивирующую злокачественную опухоль.

60. Способ в соответствии с любым из вариантов осуществления 53-59, дополнительно предусматривающий введение одного или нескольких дополнительных терапевтических средств.

61. Способ в соответствии с вариантом осуществления 60, причем дополнительное терапевтическое средство представляет собой иммунопотенциирующую молекулу (например, антагонист PD-1, антагонист CTLA-4, антагонист LAG-3), антитело к CD39 или антитело к A2AR.

62. Способ выявления наличия человеческого CD73 в образце, предусматривающий приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающей частью в соответствии с любым из вариантов осуществления 1-45 при условиях, которые обеспечивают возможность образования комплекса между антителом или его антигенсвязывающей частью и CD73, и выявление образования комплекса.

Настоящее раскрытие дополнительно иллюстрируется следующими примерами, которые не следует толковать как дополнительное ограничение. Содержание всех чертежей и всех источников, последовательности из Genbank, патенты и опубликованные патентные заявки, цитируемые в данной заявке, специально включены в данный документ посредством ссылки. В частности, раскрытия PCT публикаций международных заявок WO 09/045957, WO 09/073533, WO 09/073546, WO 09/054863 и PCT/US2013/072918 и публикация заявки на патент США № 2011/0150892 специально включены в данный документ посредством ссылки.

Примеры

Пример 1. Получение антител к человеческому CD73.

Человеческие моноклональные антитела к человеческому CD73 получали в линиях Hco7, Hco27, Hco20, Hco12, Hco17 и Hc2 трансгенных мышей HuMAb® ("HuMAb" является торговым названием Medarex, Inc., Принстон, Нью-Джерси) и KM-мышей (линия KM Mouse® содержит трансхромосому SC20, которая описана в PCT публикации международной заявки WO 02/43478). Мышей HC2/KCo27 HuMAb и KM-мышей получали, как описано в патентах США №№ 5770429 и 5545806, полные раскрытия которых тем самым включены в данный документ посредством ссылки.

Мышей, в том числе различные генотипы трансгенных мышей (такие как KM, Hco7, Hco27, Hco20,

Hco12, Hco17 и Hc2), иммунизировали в соответствии с разными стратегиями иммунизации (разный антиген, разные дозы, длительность, пути введения (в подушечку стопы (fp), внутрибрюшинно (ip) и подкожно (sc)) и адъювант (CFA/IFA, Райби и антитело) и т.д.). Проводили слияния клеток из мышей, подвергали слитые клетки скринингу и идентифицировали антитела из этих слитых клеток. Дополнительная характеристика приводила к выделению антител, представляющих особый интерес, в том числе антител, обозначенных 11F11-1, 11F11-2, 4C3-1, 4C3-2, 4C3-3, 4D4-1, 10D2-1, 10D2-2, 11A6-1, 24H2-1, 5F8-1, 5F8-2, 6E11-1 и 7A11-1. В табл. 7 (ниже) представлены изотип IgG и аллотип тяжелых цепей, а также тип легкой цепи для каждого антитела. Антитела, которые отличаются только легкой цепью, представлены отличающейся цифрой после тире. Например, 11F11-1 имеет такую же тяжелую цепь, что и 11F11-2, а 11F11-1 имеет легкую цепь VK1, тогда как 11F11-2 имеет легкую цепь VK2. Если не определено иное, рекомбинантные антитела, основанные на VH участках антител в таблице, получали с преобладающей легкой цепью.

Таблица 7

Клон	**Изотип**	**Преобладающая легкая цепь**	**Другие экспрессируемые легкие цепи**
11F11	IgG2	VK2	VK1
4C3	IgG1za	VK1	VK2, VK3
4D4	IgG2	VK1	
10D2	IgG4	VK2	VK1
11A6	IgG1za	VK1	
24H2	IgG4	VK1	
5F8	IgG1za	VK1	VK2
6E11	IgG1za	VK1	
7A11	IgG1za	VK1	

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности для полноразмерной последовательности тяжелой и легкой цепей, VH и VL доменов и CDR каждого антитела представлены в перечне последовательностей и в табл. 35. Аминокислотные последовательности VH и VL также представлены на фиг. 1A-17B, и выравнивание аминокислотных последовательностей VH и VL для различных антител представлено на фиг. 35 (последовательности CDR выделены жирным шрифтом).

Пример 2. Аминокислотные замены в вариабельных участках и изотипические варианты.

Каркасный участок VH участка антитела 11F11 подвергали мутации посредством введения одной или нескольких из мутаций по следующим аминокислотным остаткам (показаны окружающие аминокислоты, а мутированная аминокислота подчеркнута): T25 (мутация в каркасном участке; ...RLSCA<u>T</u>SGFTF...), L52 (мутация в CDR2; WVAVI<u>L</u>YDGSN...), G54 (мутация в CDR2; ...VILYD<u>G</u>SNKYY...) и V94 (мутация в каркасном участке; ...AEDTA<u>V</u>YYCAR...). Названия конструктов и замены в каждом из них изложены в табл. 8.

Таблица 8

Название Ab	Создаваемое Ab	Замена
CD73.3	4C3	V94A
CD73.4	11F11	T25A
CD73.5		T25S
CD73.6		T25A, G54S
CD73.7		T25S, G54S
CD73.8		T25A, L52W, G54S
CD73.9		T25S, L52W, G54S
CD73.10		T25A, L52W, G54E
CD73.11*	4D4	A25, W52, E54

* CD73.11 представляет собой 4D4 и содержит эти аминокислотные остатки, когда оно выделено. Они приведены в таблице с целью сравнения.

Константный участок антител 11F11 и 4D4 также был модифицирован посредством "переключения" его на константный участок IgG2 (CH1, шарнир, CH2 и CH3) с заменой C219S ("IgG2CS"; SEQ ID NO: 267), константный участок IgG1 с отсутствующей эффекторной функцией с заменами L234A, L235E, G237A, A330S и P331S ("IgG1.1f"; SEQ ID NO: 268) или гибридный константный участок IgG1/IgG2 с отсутствующей эффекторной функцией, который содержит CH1 и шарнир из IgG2 (с C219S) и CH2 и CH3 из IgG1 (с A330S/P331S) ("IgG2CS-IgG1.1f" или "IgG2C219S-IgG1.1f"; SEQ ID NO: 169). Конструкты, которые были получены, приведены в табл. 9.

Таблица 9

Название Ab	Создаваемое Ab	Замена в VH	Константный участок	Название Ab
CD73.4	11F11	T25A	IgG2CS	CD73.4-IgG2CS
CD73.4		T25A	IgG2CS-IgG1.1f	CD73.4-IgG2CS IgG1.1f
CD73.6		T25A, G54S	IgG2CS-IgG1.1f	CD73.6-IgG2CS IgG1.1f
CD73.8		T25A, L52W, G54S	IgG2CS-IgG1.1f	CD73.8-IgG2CS IgG1.1f
CD73.10		T25A, L52W, G54E	IgG2CS-IgG1.1f	CD73.10-IgG2CS IgG1.1f
CD73.10		T25A, L52W, G54E	IgG1.1f	CD73.10- IgG1.1f
CD73.10		T25A, L52W, G54E	IgG2CS	CD73.10-IgG2CS
CD73.11	4D4	A25, W52, E54	IgG2CS	CD73.11-IgG2CS

Аминокислотная последовательность CD73.4-IgG2CS IgG1.1f показана на фиг. 18 (SEQ ID NO: 189).

Ab CD73.3-CD73.11 получали следующим образом. VK2 легкой цепи (SEQ ID NO: 102) использовали для антител, полученных из 11F11 (CD73.4, CD73.6, CD73.8 и CD73.10). Тяжелые и легкие цепи экспрессировали в HEK293-6E клетках и среду культивирования собирали через 5 суток после трансфекции.

Связывание конструктов с человеческими FcγR измеряли посредством SPR. Данные связывания с hCD64 и hCD32a-H131 для молекул IgG1.l и IgG2 согласовались с ожидаемыми величинами для разных Fc. IgG1.1f является наиболее инертным Fc. IgG2 и IgG2-C219S показывали типичное связывание с FcR для IgG2. Как ожидалось, данные для IgG2-C219S-G1.1f говорят о значительно более слабом связывании, чем у IgG1 или IgG2 дикого типа, но повышенном связывании в сравнении с IgG1.1f. IgG2-C219S-G1.1f характеризовался слабым связыванием с hCD32a-H131 (K_D составляет 2,3 мкМ), и аффинность связывания со всеми остальными FcγR составляла менее чем 5 мкМ. Аффинность связывания IgG2-C219S-G1.1f с FcγR макака-крабоеда составляла более чем 5 мкМ. SPR анализ связывания IgG2-C219S-G1.1f с человеческим FcRn показывал pH-зависимое связывание (сильное при pH 6 и слабое связывание с быстрой диссоциацией при pH 7,4).

Оказалось, что у рекомбинантных препаратов часто отсутствовал C-концевой Lys в тяжелой цепи. Например, у 97% тяжелых цепей Ab CD73.4.IgG2-C219S-G1.1f отсутствовал C-концевой лизин. Определенные препараты имели пиро-Q на N-концевом Q (глутамин) в тяжелой цепи. Например, 94% N-концевого глутамина в тяжелой цепи Ab CD73.4.IgG2-C219S-G1.1f представляли собой пиро-Q.

Пример 3. Характеристики связывания у антител к CD73.

А. Поверхностный плазмонный резонанс (SPR).

Кинетические характеристики и аффинность связывания с CD73 исследовали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при использовании инструмента Biacore T100 (GE Healthcare) при 25°C.

В одном формате эксперимента исследовали связывание N-концевого домена hCD73 (состоящий из остатков 26-336 в человеческом CD73; названный N-hCD73) с антителами, которые были захвачены на поверхностях с иммобилизированным белком A. Для этих экспериментов белок A (Pierce) иммобилизировали до плотности 3000-4000 RU (относительные единицы) на поверхности проточных кювет 1-4 сенсорного чипа CM5 (GE Healthcare) с использованием стандартного химического процесса на основе этил(диметиламинопропил)карбодиимида (EDC)/N-гидроксисукцинилимида (NHS) при блокировании этаноламином в подвижном буфере с 0,01 M HEPES с pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 мМ EDTA, 0,005% об./об. tween 20. Кинетические эксперименты проводили, вначале захватывая антитела (5-10 мкг/мл) на поверхностях с белком A с использованием времени контактирования 30 с при скорости потока 10 мкл/мин, причем связывание осуществляли с 600, 200, 66,7, 22,2, 7,4 и 2,5 нМ N-hCD73-his при использовании времени ассоциации 180 с и времени диссоциации 360 с при скорости потока 30 мкл/мин. Подвижный буфер для кинетических экспериментов представлял собой 10 мМ фосфат натрия, 130 мМ хлорид натрия, 0,05% tween 20, pH 7,1. Поверхности регенерировали после каждого цикла с использованием двух 30-секундных импульсных введений 10 мМ глицина с pH 1,5 при скорости потока 30 мкл/мин. Данные сенсограммы сравнивали с двумя совокупностями, а затем подгоняли к модели связывания 1:1 Ленгмюра с использованием программного обеспечения для оценки Biacore T100 версии 2.0.4 для определения константы скорости ассоциации (ka), константы скорости диссоциации (kd) и равновесной константы диссоциации (K_D).

Результаты представлены в табл. 10. В таблице собраны данные из разных экспериментов. В случае антител, для которых показаны два или более наборов чисел, каждый набор соответствует данным, полученным в отдельном эксперименте.

Таблица 10

Кинетические характеристики связывания mAb к CD73 с N-hCD73-his (hCD73(26-336)His) при 25°C

mAb	Fc	ka (1/M c)	kd (1/c)	KD (нМ)
11F11	IgG2	2,6 E+05	4,2 E-04	1,6
		2,9 E+05	1,6 E-04	0,56
4C3	IgG1	2,2 E+04	2,4 E-03	110
		2,4 E+04	2,2 E-03	92
4D4	IgG2	8,2 E+04	7,7 E-04	9,4
		7,9 E+04	4,9 E-04	6,2
10D2	IgG4	6,1 E+05	9,5 E-04	1,6
11A6	IgG1	5,5 E+04	7,6 E-03	140
1H9	IgG1	3,3 E+05	9,3 E-04	2,8
24H2	IgG4	2,3 E+05	3,2 E-03	14
5F8	IgG1	1,5 E+05	6,0 E-03	41
6E11	IgG1	5,7 E+04	1,4 E-03	25
7A11	IgG1	8,8 E+05	3,8 E-04	0,43
CD73.4	IgG1.1f	4,2 E+05	3,9 E-04	0,92
CD73.4	IgG2-C219S	2,9 E+05	1,6 E-04	0,55
		2,8 E+05	3,3 E-04	1,2
		2,9 E+05	3,7 E-04	1,3
		3,5 E+05	4,4 E-04	1,2
CD73.4	IgG2-C219S-IgG1.1f	3,1 E+05	3,5 E-04	1,1
		3,3 E+05	1,4 E-04	0,43
		3,1 E+05	1,3 E-04	0,42
		3,2 E+05	1,5 E-04	0,47
		3,1 E+05	4,1 E-04	1,4
		2,7 E+05	3,8 E-04	1,4
		3,0 E+05	4,1 E-04	1,4
		3,1 E+05	4,2 E-04	1,3
		3,2 E+05	4,3 E-04	1,3
		2,9 E+05	4,0 E-04	1,4
CD73.10	IgG1.1f	2,7 E+05	1,3 E-03	4,7
CD73.10	IgG2-C219S	2,2 E+05	1,4 E-03	6,2
		2,2 E+05	1,8 E-03	8,3
CD73.10	IgG2-C219S-IgG1.1f	2,4 E+05	1,4 E-03	5,7
		2,3 E+05	1,60E-03	6,8
CD73.3	IgG1.1f	1,6 E+04	3,6 E-03	220
CD73.11	IgG2-C219S	8,0 E+04	2,8 E-04	3,5
		7,9 E+04	5,1 E-04	6,5
CD73.6	IgG1.1f	3,7 E+05	2,5 E-04	0,68
CD73.6	IgG2-C219S-IgG1.1f	3,0 E+05	2,2 E-04	0,72

K_D в таблице представляет собой K_D для моновалентного связывания, т.е. K_D для связывания антител с N-концевой частью человеческого CD73, которое является моновалентным.

Мутация G54S переносится и, как оказывается, немного повышает аффинность, в то же время удаляя спрогнозированный сайт изомеризации DG. Оказывается, что мутация L52W вызывает снижение аффинности примерно в 10 раз. Варианты 4D4 имеют уникальные последовательности CDR3 и отличающиеся кинетические характеристики (более медленная ассоциация в сравнении с молекулами 11F11).

Средняя K_D из 10 экспериментов для CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f составляет 1,1 ± 0,4 нМ. Мутация T25A в отношении 11F11 не оказывает воздействие на аффинность.

Результаты показывают, что все антитела к CD73 связываются с человеческим CD73 с хорошей аффинностью и характеризуются меньшей скоростью диссоциации.

Результаты исследований связывания указывают на то, что активность связывания сохранялась после введения мутаций в 11F11, 4C3 или 4D4 или "переключения" изотипа, хотя некоторые антитела характеризуются пониженной аффинностью по сравнению с исходным антителом (т.е. 11F11, 4C3 или 4D4). В частности, CD73.10 (T25A, L52W, G54E) характеризуется большей скоростью диссоциации, чем у CD73.4 (T25A) или CD73.11 (4D4). Сравнение всех молекул IgG2 указывает на то, что 11F11 и CD73.4 (11F11-T25A) характеризуются наивысшей аффинностью моновалентного связывания с CD73 (K_D=1,1 нМ ± 0,4 нМ). CD73.10 (11F11-T25A, L52W, G54E) характеризуется аффинностью в отношении CD73, которая ~10-кратно ниже, чем у 11F11 или CD73.4. Это говорит о том, что любая из мутаций L52W или G54E или обе мутации снижают аффинность CD73 в случае, когда они находятся в комбинации с другими последовательностями 11F11. 4D4 и CD73.11 характеризуются аффинностью, сравнимой с CD73.10

(K_D ~5 нМ), но имеют отличающиеся кинетические характеристики. Полагают, что эпитоп 4C3 включает в себя участки N- и C-доменов CD73 вследствие того, что измеренная K_D для связывания с выделенным N-доменом является небольшой (K_D=100-200 нМ).

Также исследовалось связывание CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f с CD73 макака-крабоеда. Специфичность CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f для связывания с CD73 яванского макака сравнивали со специфичностью связывания с человеческим CD73 с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием инструмента Biacore T100 (GE Healthcare) при 25°C. Полноразмерный внеклеточный домен либо человеческого CD73 (состоящий из остатков 27-547 в человеческом CD73, связанных с His-меткой, названный hCD73-his), либо CD73 яванского макака (состоящий из остатков 27-547 в CD73 яванского макака, связанных с His-меткой, названный cy-CD73-his) исследовали в отношении связывания с антителами, которые были захвачены на поверхностях с иммобилизированным белком A. Для этих экспериментов белок A (Pierce) иммобилизировали до плотности 3000-4000 RU (относительные единицы) на поверхности проточных кювет 1-4 сенсорного чипа CM5 (GE Healthcare) с использованием стандартного химического процесса на основе этил(диметиламинопропил)карбодиимида (EDC)/N-гидроксисукцинилимида (NHS) при блокировании этаноламином в подвижном буфере с 0,01 M HEPES с pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 мМ EDTA, 0,005% об./об. tween 20. Эксперименты проводили, вначале захватывая антитела (5-10 мкг/мл) на поверхностях с белком A с использованием времени контактирования 30 с при скорости потока 10 мкл/мин, причем связывание осуществляли с 600, 200, 66,7, 22,2, 7,4 и 2,5 нМ hCD73-his или cyno-CD73-his при использовании времени ассоциации 180 с и времени диссоциации 360 с при скорости потока 30 мкл/мин. Подвижный буфер для этих экспериментов представлял собой 10 мМ фосфат натрия, 130 мМ хлорид натрия, 0,05% tween 20, pH 7,1. Поверхности регенерировали после каждого цикла с использованием двух 30-секундных импульсных введений 10 мМ глицина с pH 1,5 при скорости потока 30 мкл/мин.

Результаты, которые показаны на фиг. 19, указывают на то, что CD73.4-IgG2-C219S- IgG1.1f связывается с CD73 макака-крабоеда и человеческим CD73 с подобной аффинностью и кинетическими характеристиками. CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f связывается с полноразмерным димером человеческого CD73 и CD73 макака-крабоеда с K_D, составляющей менее чем 1 нМ. Не наблюдалось существенной перекрестной реактивности CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f с мышиным или крысиным CD73.

Кинетические характеристики и аффинность выделенного Fab-фрагмента от антитела 11F11 также оценивали с помощью SPR. В этих экспериментах Fab-домен из мышиного антитела к метке из 6xHis иммобилизировали на сенсорном чипе CM5 с использованием EDC/NHS до плотности ~3000 RU. Полноразмерный hCD73-his захватывали до значения плотности 10 RU (условные единицы) на Fc2 (1 мкг/мл hCD73-his), значения плотности 40 RU на Fc3 (5 мкг/мл hCD73-his) и значения плотности 160 RU на Fc4 (20 мкг/мл hCD73-his) с использованием времени контактирования 30 с при 10 мкл/мин. Затем Fab-фрагмент 11F11 (очищенный от расщепленного пепсином антитела 11F11 с уменьшенным содержанием L-цистеина) исследовали в отношении связывания в концентрациях 400, 135, 44,4, 14,8, 4,9, 1,7, 0,55 нМ с использованием времени ассоциации 180 с, времени диссоциации 600 с при 30 мкл/мин в подвижном буфере с 10 мМ фосфатом натрия, 130 мМ хлоридом натрия, 0,05% tween 20, pH 7,1. Поверхности регенерировали после каждого цикла с использованием двух 15-секундных импульсных введений 10 мМ глицина с pH 2,0 при скорости потока 30 мкл/мин. Данные сенсограммы сравнивали с двумя совокупностями, а затем подгоняли к модели связывания 1:1 Ленгмюра с использованием программного обеспечения для оценки Biacore T100 версии 2.0.4 для определения константы скорости ассоциации (ka), константы скорости диссоциации (kd) и равновесной константы диссоциации (K_D). Результаты представлены в табл. 11 ниже.

Таблица 11

Кинетические характеристики связывания 11F11-Fab с поверхностью с hCD73-his при 25°C

Поверхностная плотность hCD73-his (RU)	ka (1/M c)	kd (1/c)	K_D (нМ)
10	1,2 E+06	8,7 E-04	0,73
40	1,2 E+06	8,7 E-04	0,73
160	1,1 E+06	8,5 E-04	0,77

Таким образом, результаты показывают, что Fab-фрагмент 11F11 характеризуется высокой аффинностью в отношении hCD73 (K_D ~0,74 нМ).

B. Связывание антитела к CD73 с положительными по CD73 клетками.

Кривые титрования для связывания получали с антителами к CD73 на Calu6 (клетки, эндогенно экспрессирующие CD73; линия клеток аденокарциномы легкого человека), DMS114 (отрицательные по CD73; линия клеток мелкоклеточного рака легкого человека), CHO-cynoCD73 (трансфицированные CD73 макака-крабоеда) и CHO-K1 (отрицательные по CD73 макака-крабоеда) клетках с использованием вторичного козьего антитела к человеческому IgG (H+L), конъюгированного с Alexa Fluor® 647, № в каталоге Invitrogen A-21445, с использованием следующего способа:

100000 клеток высевали в 100 мкл PBS+2% FBS на лунку и блокировали в течение 20 мин. С использованием 96-луночного планшета с глубокими U-образными лунками объемы антитела и PBS+2%

FBS объединяли, как указано в табл. 12 ниже.

Таблица 12

Клон	[Маточный раствор] (мг/мл)	[Краситель] (мг/мл)	Объем Ab (мкл)	Объем TM (мкл)
11F11	3,70	0,020	2,92	537,1
CD73.10-IgG1.1f	1,3	0,020	8,31	531,7
CD73.10-IgG2	1	0,020	10,80	529,2
CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f	1	0,020	1-/80	529,2
CD73.4-IgG2	2,3	0,020	4,70	535,3
CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f	2	0,020	5,40	534,6
CD73.4-IgG1.1f	2,3	0,020	4,70	535,3

Серийное разведение с 8 разными концентрациями получали посредством разведения шестой части объема (90 мкл) в 450 мкл PBS+2% FBS. Планшет с клетками осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1500 об/мин. Добавляли 100 мкл разведенного антитела на лунку планшета. 100 мкл PBS+2% FBS добавляли во все остальные лунки. Планшеты подвергали окрашиванию на льду в течение 45 мин, осаждали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 мин и промывали дважды в 200 мкл PBS+2% FBS на лунку. Содержимое лунок, в которые добавляли неконъюгированное антитело, а также одной лунки без окрашивания на клеточную линию ресуспендировали в 100 мкл вторичного APC-антитела к человеческому антителу (20 мкг/мл). 100 мкл PBS+2% FBS добавляли во все остальные лунки и проводили окрашивание на льду в течение 45 мин. Планшеты осаждали центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 мин и промывали в 200 мкл PBS+2% FBS на лунку. Планшеты промывали снова, их содержимое ресуспендировали в 200 мкл 2% FBS в PBS на лунку и образцы прогоняли.

Результаты, которые показаны на фиг. 20A1, 20A2, 20B1, 20B2, 20C1, 20C2, 20D1, 20D2 и в табл. 13, указывают на то, что все антитела к CD73 связываются с клетками, которые в естественных условиях экспрессируют CD73 (Calu6 клетки), и CHO клетками, трансфицированными для экспрессии CD73 макака-крабоеда, но что антитела не связываются с клетками, которые не экспрессируют CD73 (DMS114 и CHO-K1). Значения EC_{50} для связывания, полученные для каждого антитела, показаны в табл. 13.

Таблица 13

Антитело	EC50, нМ Calu6	EC50, нМ CHO-cynoCD73
11F11	0,78	0,58
CD73.10-IgG1.1f	0,64	0,67
CD73.10-IgG2	0,85	1,24
CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f	0,85	1,27
CD73.4-IgG2	0,49	0,34
CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f	0,53	0,51
CD73.4-IgG1.1f	0,43	0,45

EC_{50} для связывания CD73.4-IgG2-IgG1.1f с линиями человеческих опухолевых клеток составляла 0,5 нМ (диапазон 0,3-0,67 нМ). EC_{50} для связывания CD73.4-IgG2- IgG1.1f с CHO клетками, трансфицированными CD73 макака-крабоеда, составляла 0,3 нМ (диапазон 0,1-0,5 нМ).

Также определяли связывание антитела CD73.4 с человеческими B- и T-клетками. Человеческую кровь от двух доноров, D316 и D329, получали от Immunsciences, BMS. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли с использованием среды для разделения клеток в градиенте плотности Lympholyte-H. PBMC инкубировали с серийно разведенными мечеными FITC антителами CD73.4-IgG2, CD73.4-IgG2-IgG1.1f или CD73.4-IgG1.1f, и T- и B-клетки идентифицировали с использованием меченых флуорохромом антител к CD3 и CD20. Клетки от обоих доноров собирали для неокрашенных контрольных образцов и контрольных образцов для FMO (флуоресценция образцов с комбинацией антител без одного). Результаты, которые показаны на фиг. 20E и F и в табл. 14, указывают на то, что антитела специфично связываются с человеческими B- и T-клетками.

Таблица 14

IC_{50} для связывания антител к CD73 с B- и T-клетками

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

Пример 4. Биофизические характеристики антител к CD73.

A. Гель-хроматография в сочетании с подключенным к системе детектором многоуглового рассеяния света (SEC-MALS).

Олигомерное строение mAb к CD73 оценивали с помощью гель-хроматографии в сочетании с подключенным к системе детектором многоуглового рассеяния света (SEC-MALS). Изократические разделения проводили на колонке Shodex PROTEIN KW-803, соединенной с прибором Prominence Shimadzu UFLC, в буфере, содержащем 200 мМ K_2HPO_4, 150 мМ NaCl, pH 6,8, содержащем 0,02% азида Na (отфильтрованный через фильтр с размером ячейки 0,1 мкм), который прогоняли со скоростью потока 0,5 мл/мин. Образцы впрыскивали на колонку с использованием автоматического дозатора SIL-20AC Prominence Shimadzu и получали данные от трех детекторов, работающих в реальном масштабе времени и соединенных последовательно: спектрофотометр Prominence SPD-20AD с диодной матрицей для измерения в УФ/видимой областях спектра, за которым следовал детектор многоуглового рассеяния света Wyatt miniDAWN™ TREOS, а затем рефрактометрический детектор Wyatt Optilab T-rEX. Данные (которые показаны в табл. 15 ниже) собирали и анализировали с использованием программного обеспечения Astra (Wyatt) и Labsolutions (Shimadzu). Результаты представлены в табл. 15.

B. Дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC).

Термическую стабильность mAb к CD73 определяли с использованием капиллярного инструмента для DSC MicroCal (GE Healthcare). Антитела анализировали в концентрациях 0,5-0,75 мг/мл в PBS с pH 7,1. Для стабилизации фонового уровня у DSC инструмента и получения соответствующей термической истории несколько термограмм для буфера самого по себе как в ячейке для образца, так и в эталонной ячейке записывали перед анализом образца. Термограммы для образцов, содержащих mAb в ячейке для образца и PBS с pH 7,1 в эталонной ячейке. Все термограммы получали при температуре 10-110°C и при скорости сканирования 60°/ч с использованием 5-минутного периода термостатирования перед циклом и при отсутствии периода термостатирования после цикла. Данные (которые показаны в табл. 15 ниже) анализировали с использованием программного обеспечения для анализа MicroCal Origin Cap DSC. Соответствующие значения с термограмм для холостых проб буфер-буфер вычитали из данных для образец-буфер и значения температуры в средней точке перехода (Tm) определяли посредством аппроксимации данных к модели "non-2-state". Результаты представлены в табл. 15. Tm1, Tm2 и Tm3 представляют собой значения Tm для разных доменов в антителах.

Таблица 15

SEC-MALS и DSC

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

Результаты показывают, что все антитела преимущественно являются мономерными и являются стабильными.

Пример 5. Ингибирование ферментативной активности с участием Ab к CD73.

А. Ингибирование ферментативной активности связанного с гранулами CD73.

Для оценки ингибирования антителами к CD73 активности фермента CD73, связанного с гранулами, использовали следующие материалы и методы.

Материалы.

ТМ буфер: 25 мМ Tris, 5 мМ $MgCl_2$ в воде,

0,5 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 8,0,

промывочный буфер (10 мл 0,5 мМ фосфат натрия, pH 8,0; 10 мл 5 М NaCl; 34 мл воды; 10 мкл Tween-20),

динатриевая соль аденозин-5'-монофосфата, Sigma, кат. № 01930-%G, 300 мМ в ТМ буфере,

гидрат динатриевой соли аденозин-5'-трифосфата, Sigma, кат. № A6419-1G, 100 мМ в ТМ буфере,

rhCD73, 0,781 мг/мл,

CD73 макака-крабоеда, Sino Biological Inc, кат. № 90192-C08H,

магнитные гранулы с his-меткой, Invitrogen, кат. № 10103D,

набор для люминесцентного анализа клеточной жизнеспособности CellTiter-Glo®, Promega, кат. № G7572,

mAbO, неродственное антитело, которое не связывается с CD73.

Методы.

Серийное разведение с 6 концентрациями антител к CD73 приведено в табл. 16 (максимальная концентрация 10 мкг/мл) выполняли посредством объединения объемов, как предписано в табл. 16, и 3-кратного разведения (перенося 225 в 450 мкл ТМ буфера). Все антитела с шарниром IgG2 содержали мутацию C219S.

Таблица 16

Клон	[Маточный раствор] (мг/мл)	[Рабочий раствор] (мг/мл)	Объем Ab (мкл)	Объем ТМ (мкл)
mAbO	5,38	0,010	1,25	673,7
F3713.11F11.F3.A4	3,70	0,010	1,82	673,2
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1F	1,3	0,010	5,19	669,8
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2	1	0,010	6,75	668,3
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	1	0,010	6,75	668,3
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2	2,3	0,010	2,93	672,1
mAb-CD73.10-Vh-hHCIgG2-IgG1.1f	2	0,010	3,38	671,6
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f	2,3	0,010	2,93	672,1

Магнитные гранулы (2 мкл гранул на образец) промывали в 1 мл натрий-фосфатного буфера в микроцентрифужной пробирке. Гранулы опускали на дно с использованием магнита и ресуспендировали в 400 мкл ТМ буфера. Для каждого вида CD73 в отдельной пробирке CD73 (75 нг на образец) объединяли с ТМ для доведения объема до 400 мкл. Третью пробирку подготавливали для холостой пробы с гранулами (без CD73). Суспензию гранул объединяли с раствором rhCD73 и смешивали на шейкере в течение 5 мин при комнатной температуре. Гранулы опускали на дно с использованием магнита и гранулы промывали в 1 мл промывочного буфера. Гранулы опускали на дно с использованием магнита и ресуспендировали в ТМ буфере (40 мкл на образец). Гранулы переносили в 96-луночные планшеты для ПЦР (40 мкл на лунку). В планшеты добавляли серийно разведенные HuMab к CD73 в количестве 200 мкл на лунку и хорошо перемешивали. Планшеты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Готовили 700 мкл каждого из 400 мкМ ATP (8X) и 1,2 мМ AMP (8X). 650 мкл каждого из них объединяли с получением 4X маточной смеси AMP/ATP. Гранулы опускали на дно и промывали дважды с использованием 200 мкл ТМ буфера на лунку. Гранулы снова опускали на дно с использованием магнита и ресуспендировали в 30 мкл ТМ буфера. 30 мкл гранул переносили в 96-луночные черные планшеты. 10 мкл 4× маточного раствора AMP/ATP (конечная концентрация 150 мкМ AMP/50 мкМ ATP) добавляли и смешивали. Добавляли в контрольные лунки (конечная концентрация 150 мкМ AMP и/или 50 мкМ ATP) в объеме 40 мкл. Планшеты инкубировали в течение 15 мин при 37°C.

Результаты показаны на фиг. 21A1, 21A2, 21B1 и 21B2 и в табл. 17.

Таблица 17

mAB	Fc	EC50 (нМ)
11F11	IgG2	3,98
4C3	IgG1	3,63
4D4	IgG2	5,31
10D2	IgG1	6,94
11A6	IgG1	3,12
24H2	IgG1	4,18
5F8	IgG1	5,76
6E11	IgG1	3,71
7A11	IgG1	2,86
CD73.4	IgG1.1f	3,25
CD73.4	IgG2-C219S	2,72
CD73.4	IgG2-C219S-IgG1.1f	2,97
CD73.10	IgG1.1f	4,69
CD73.10	IgG2-C219S	7,54
CD73.10	IgG2-C219S-IgG1.1f	4,84

Результаты ингибирования ферментативной активности CD73 макака-крабоеда изложены в табл. 18.

Таблица 18

mAB	Fc	EC50 (нМ)
CD73.4	IgG1.1f	7,123
CD73.4	IgG2-C219S	3,658
CD73.4	IgG2-C219S-IgG1.1f	4,572
CD73.10	IgG1.1f	10,2
CD73.10	IgG2-C219S	8,783
CD73.10	IgG2-C219S-IgG1.1f	9,935

Результаты показывают, что антитела дозозависимым образом ингибируют ферментативную активность человеческого CD73. CD73.4.IgG2-C219S-IgG1.1f характеризуется EC_{50}, составляющей 2,97 (диапазон 2,9-3,1 нМ) в анализе ингибирования рекомбинантного человеческого фермента CD73. CD73.4.IgG2-C219S-IgG1.1f характеризуется EC_{50}, составляющей 3,7 (диапазон 1,6-12,6 нМ) в анализе ингибирования рекомбинантного фермента CD73 макака-крабоеда. Таким образом, все исследуемые антитела к CD73 ингибируют ферментативную активность связанного с гранулами человеческого CD73 и CD73 макака-крабоеда.

B. Ингибирование ферментативной активности CD73 в Calu6 клетках.

В этом примере описывается оценка Calu6 (CD73-положительных) и DMS-114 (CD73-отрицательных) клеток в отношении дефосфорилирования AMP CD73 после обработки антителами к CD73.

Материалы.

Антитела к CD73; см. таблицу ниже,

контрольное антитело MabO, 5,38 мг/мл,

TM буфер: 25 мМ Tris, 5 мМ $MgCl_2$ в воде,

динатриевая соль аденозин-5'-монофосфата, Sigma, кат. № 01930-5G, 300 мМ в TM буфере,

гидрат динатриевой соли аденозин-5'-трифосфата, Sigma, кат. № A6419-1G, 100 мМ в TM буфере,

rhCD73, 0,781 мг/мл,

набор для люминесцентного анализа клеточной жизнеспособности CellTiter-Glo®, Promega, кат. № G7572.

Методы.

Антитела подвергали серийному разведению посредством объединения объемов очищенных антител и PBS, как предписывается в табл. 19 ниже, в 96-луночном планшете с U-образными лунками. Выполняли серийные разведения с 6 концентрациями антител (максимальная концентрация 25 мкг/мл, 300 мкл), а также 5-кратные разведения, перенося 60 мкл в 240 мкл PBS. Все антитела с шарниром IgG2 содержали мутацию C219S.

Таблица 19

Клон	Конц. (мг/мл)	Объем Ab (мкл)	Объем PBS (мкл)
mAbO	5,38	1,39	298,6
F3713.11F11.F3.A4	3,70	2,03	298,0
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1F	1,3	5,77	294,2
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2	1	7,50	292,5
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	1	7,50	292,5
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2	2,3	3,26	296,7
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	2	3,75	296,3
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f	2,3	3,26	296,7

Клетки собирали с использованием раствора версена и подсчитывали. Планшеты засевали, клетки осаждали центрифугированием при 1500 об./мин в течение 5 мин и ресуспендировали в 100 мкл серийно разведенного антитела. Содержимое всех остальных лунок ресуспендировали в 100 мкл PBS. Инкубирование проходило при 37°C в течение 20 мин. 15 мл 180 мкМ маточного раствора AMP готовили в TM буфере.

Содержимое планшетов осаждали центрифугированием при 1500 об./мин в течение 5 мин и планшеты однократно промывали 200 мкл PBS/лунку. Содержимое планшетов снова осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 100 мкл AMP. Содержимое всех остальных лунок ресуспендировали в 100 мкл TM буфера. Клетки инкубировали с AMP в течение 60 мин при 37°C. Готовили 7,5 мл 60 мкМ маточного раствора ATP в TM буфере. Содержимое планшетов осаждали центрифугированием при 1500 об./мин в течение 5 мин и 50 мкл супернатанта переносили в черные 96-луночные планшеты. Добавляли 50 мкл ATP. rhCD73 добавляли в определенные лунки в количестве 75 нг на лунку в качестве положительного контроля. Лунки, в которые не вносили rhCD73, доводили до 100 мкл TM буфером. Конечная концентрация составляла 90 мкМ AMP: 30 мкМ ATP. Инкубирование проводили при 37°C в течение 15 мин. Для анализа CellTiterGlo (в котором выявляют ATP) добавляли 100 мкл реактива на лунку и производили считывание планшета.

Результаты, которые показаны на фиг. 22A1, 22A2, 22B1, 22B2 и в табл. 20, указывают на то, что антитела к CD73 ингибируют дефосфорилирование AMP (или снижают переработку AMP) в положительных по человеческому CD73 Calu6 клетках, но не оказывают воздействие в отрицательных по CD73 DMS114 клетках. EC_{50} для блокады эндогенного клеточного CD73 в линии человеческих опухолевых клеток Calu6 антителом CD73.4-IgG2S-IgG1.1f составляет 0,39 нМ (диапазон 0,31-0,48 нМ). Эти эксперименты повторяли в NCI-H292 (линия клеток мукоэпидермоидной карциномы) и SK-MEL-24 (линия клеток меланомы человека) клетках, и результаты были аналогичными (табл. 20).

Таблица 20

Антитело	EC50 для связывания с Calu6 [1] (нМ)	EC50 для ингибирования фермента[2] (нМ)	EC50 для ингибирования в Calu6 [3] (нМ)	EC50 для ингибирования в SKMEL24 [3] (нМ)	EC50 для ингибирования в H292 [3] (нМ)
11F11	0,78	3,980	0,70	3,15	0,81
4C3	2,00	3,63	3,43	13,29	4,48
4D4	0,82	5,31			
11A6	1,93	3,12	2,21		
5F8	11,65	5,76	8,10	110,19	13,46
7A11	0,35	2,86	0,95	3,72	1,31
24H2		4,18			
10D2		6,94			
6E11	0,63	3,71	1,54	3,43	1,34
CD73.4-IgG2CS	0,49	2,72	0,34		
CD73.4-IgG1.1f	0,43	3,25	0,37		
CD73.4-IgG2S-IgG1.1f	0,53	2,97	0,39		
CD73.10- IgG2S-IgG1.1f	0,85	4,84	0,77		
CD73.10-IgG1.1f	0,64	4,69	0,77		
CD73.10- IgG2S	0,85	7,54	0,84		

[1] Определение связывания с помощью титрования на Calu6 клетках с эндогенной экспрессией CD73. Антитела исследовали в 2-6 независимых экспериментах, и указано среднее значение.
[2] Данные из раздела А в этом примере. Антитела исследовали в 1-5 независимых экспериментах, и указано среднее значение.
[3] Ингибирование активности клеточного CD73 в указанной клеточной линии. Антитела исследовали в 2-4 независимых экспериментах, и указано среднее значение.

С. Ингибирование ферментативной активности CD73 в анализе cAMP с двумя клеточными линиями.

Гомогенный анализ флуоресценции cAMP с временным разрешением (HTRF).

Получали серийные разведения антител к CD73 PBS буфером, содержащим 0,2% BSA, и их переносили в количестве 5 мкл/лунку в 384-луночный планшет proxiplate с белым дном (PerkinElmer, Уолтем, Массачусетс). Calu-6 клетки собирали и ресуспендировали в PBS, содержащем 0,2% BSA, затем 5 мкл клеток (300 клеток/лунку) добавляли в планшет. Клетки инкубировали с антителами в течение 10 мин при 37°C с 5% CO_2 и 95% влажности с последующим добавлением 5 мкл/лунку 80 мМ AMP. Клетки дополнительно инкубировали с AMP в течение 30 мин при 37°C. В течение этого времени HEK293/A2AR клетки собирали и их разводили до количества 0,4 млн/мл в PBS, содержащем 0,2% BSA. Их добавляли в планшет для анализа в количестве 5 мкл/лунку и продолжали инкубировать при 37°C в течение 1 ч. Анализы HRTF осуществляли с использованием набора для выявления гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF) HiRange cAMP detection kit (Cisbio, Бедфорд, Массачусетс) посредством добавления d2, конъюгированного с cAMP, в количестве 10 мкл/лунку и криптата европия, конъюгированного с антителом к cAMP, в количестве 10 мкл/лунку в лизирующем буфере в соответствии с инструкциями производителя. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин и сигналы резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) (665 и 615 нМ) считывали с использованием планшет-ридера EnVision (PerkinElmer, Уолтем, Массачусетс). Сигнал FRET рассчитывали в виде соотношения сигнала от каналов с длиной волны 665 нм (акцептор) и 615 нм (донор) и умножали на 10000. Измеряли IC_{50} и Ymax. Ymax определяли посредством сравнения с 100 нМ дозой 11F11 в качестве внутреннего максимума. Все расчетные значения определяли в виде процента ингибирования в сравнении с этим контролем, который принимали за 100%.

Результаты, которые показаны в табл. 21, указывают на то, что mAb к CD73 демонстрировали разные значения эффективности и активности в этом анализе cAMP с использованием системы для совместного культивирования клеточных линий. Все Ab показывали некоторое снижение выработки аденозина, и степень ингибирования была подобной для большинства подвергшихся скринингу Ab. Наибольшее ингибирование наблюдали для 11F11, 11A6, 4C3 и 5F8.

Таблица 21

Вещество	IC50 (нМ)	Ymax
APCP	1,29	97
11A6	4,87	84
5F8	13,17	80
4C3	9,02	80
11F11	0,75	76
7A11	0,95	45

Анализы ингибирования ферментативной активности также проводили с Fab и $F(ab')_2$ 11F11. Результаты, которые показаны на фиг. 22C, указывают на то, что ингибирование ферментативной активности происходило с $F(ab')_2$-фрагментом, а не с Fab-фрагментом. Таким образом, Fc участок не требуется для ингибирования 11F11 ферментативной активности, но требуется бивалентность.

Ингибирование ферментативной активности в Calu6 клетках также определяли для антител CD73.4, содержащих различные константные участки тяжелой цепи, которые показаны в табл. 26, с использованием анализа cAMP описанного выше. Результаты, выраженные в виде EC_{50} и уровней ингибирования относительно фона ("S:B"), представлены в двух последних столбцах в табл. 28. Результаты указывают на то, что все антитела CD73.4 ингибируют ферментативную активность человеческого CD73 в Calu6 клетках.

D. Динамика ингибирования ферментативной активности CD73.

Ингибирование ферментативной активности также оценивали в динамике посредством оценки образования аденозина с помощью LC/MS/MS. Calu6 клетки инкубировали с 11F11 или 4C3 в течение 30 мин, 2 или 4 ч с последующим добавлением 50 мкМ AMP и оценкой выработки аденозина с помощью LC/MS/MS с использованием стандартных методов.

Условия масс-спектрометрии (Xevo TQ-S).

Инструмент: Xevo TQ-S (с Waters 2777C).

Настройки = CD73_adenosine_MRM_tune2.ipr	
Ионизация: (+) ESI	Температура десольватации (°C): 500
Напряжение на капилляре (кВ): 0,9	Поток газа для десольватации (л/час): 1000
Напряжение на конусе (В): см. ниже	Поток газа через конус (л/час): 150
Расстояние до источника V): 50	Давление на небулайзере (бар): 7,0
LM разрешение 1: 2,81	HM разрешение 1: 15,00
LM разрешение 2: 2,93	HM разрешение 2: 15,00
Энергия иона 1: 0,4	Энергия иона 2: 0,9
Поток газа при столкновении (мл/мин.): 0,15	Столкновение: см. ниже
Образец направляли в отходы в течение первых 0,5 мин.	
Waters Xevo TQ-S	Серийный номер: WAA021

Результаты, которые показаны на фиг. 22D, указывают на то, что время инкубирования оказывает влияние в момент времени 30 мин и что ингибирование под действием 11F11 происходит быстрее, чем под действием 4C3. Хотя оба антитела обеспечивали равное ингибирование в более поздние моменты времени, антитело 11F11 быстрее ингибирует ферментативную активность CD73 в клетках.

Пример 6. Опосредованная антителом интернализация CD73.

Опосредованную антителом к CD73 интернализацию CD73 измеряли в двух разных анализах.

A. Анализ интернализации при высоком содержании (анализ с 2-часовым фиксированным периодом времени).

Антитела к CD73 использовали для исследования зависимой от антитела к CD73 интернализации CD73 в Calu6 клетках посредством оценки экспрессии клетками после 2 ч инкубирования с антителом. Клетки (2000 клеток/лунка) в 20 мкл полной среды (среда RPMI 1640 Gibco с 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки) высевали в 384-луночный планшет BD Falcon и выращивали в течение ночи при 37°C с 5% CO_2 и 95% влажности. Антитела к CD73 серийно разводили PBS буфером, содержащим 0,2% BSA, и добавляли в количестве 5 мкл/лунку в планшет с клетками. Клетки инкубировали с антителами в течение 2 ч при 37°C с 5% CO_2 и 95% влажности с последующим однократным промыванием PBS буфером. Формальдегид (конечная концентрация 4% в PBS) затем добавляли в планшет с клетками в количестве 20 мкл/лунка и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. После этого всю жидкость отсасывали и клетки однократно промывали 30 мкл PBS. Выявляющее антитело (2,5 мкг/лунка антитела Ab CD73.10.IgG2C219S к CD73) добавляли в количестве 15 мкг/лунка в планшет с зафиксированными клетками. Клетки инкубировали при 4°C в течение ночи. На следующий день планшет дважды промывали PBS буфером с последующим добавлением вторичного антитела, со-

держащего козье антитело к человеческому антителу, конъюгированное с Alexa-488, и DAPI, окрашивание проводили в течение 1 ч при комнатной температуре. После 3 промываний в PBS буфере визуализацию планшета осуществляли на Arrayscan Vti (Cellomics, Питтсбург, Пенсильвания). Измеряли IC_{50} и Ymax. Ymax определяли посредством сравнения с 100 нМ дозой 11F11 в качестве внутреннего максимума. Все расчетные значения определяли в виде процента интернализации в сравнении с этим контролем, который принимали за 100%.

Результаты представлены в табл. 22.

Таблица 22

mAb	Константный участок	Группа эпитопа	EC50 (нМ)	Ymax
11F11	IgG2	1	0,58	98
4C3	IgG1	2	ND	NA
4D4	IgG2	1	0,38	104
10D2	IgG1	1	ND	29
11A6	IgG1	1	ND	NA
24H2	IgG1	1	8,2	51
5F8	IgG1	2	ND	NA
6E11	IgG1	1	ND	NA
7A11	IgG1	1	2,59	50
CD73.4	IgG2-C219S-IgG1.1f	1	1,2	97
CD73.10	IgG1.1f	1	6,18	64
CD73.10	IgG2-C219S	1	0,67	99
CD73.10	IgG2-C219S-IgG1.1f	1	0,87	99

ND=не выявлялось,
NA=не применялось.

Таким образом, результаты указывают на то, что EC_{50} для интернализации CD73, опосредованной CD73.4.IgG2-C219S-IgG1.1f в линии клеток Calu6, экспрессирующих человеческий CD73, составляла 1,2 нМ, и что максимальный уровень интернализации у клеточной линии составлял 97,5%.

Анализы интернализации также проводили с Fab и $F(ab')_2$ 11F11. Результаты, которые показаны на фиг. 22C, указывают на то, что интернализация происходила с $F(ab')_2$-фрагментом, но не с Fab-фрагментом. Таким образом, Fc участок не требуется для интернализации 11F11.

Исследования кинетических характеристик интернализации проводили для оценки скорости интернализации. Клетки (2000 клеток/лунка) в 20 мкл полной среды (среда RPMI 1640 Gibco с 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки) высевали в 384-луночный планшет BD Falcon и выращивали в течение ночи при 37°C с 5% CO_2 и 95% влажности. Антитела к CD73 разводили PBS буфером, содержащим 0,2% BSA, до концентрации 10 мкг/мл и добавляли в количестве 5 мкл/лунку в планшет с клетками. Клетки инкубировали с антителами в течение периода времени от 0 до 2 ч при 37°C с последующим однократным промыванием PBS буфером. Клетки затем фиксировали с использованием формальдегида (конечная концентрация 4% в PBS) при комнатной температуре в течение 10 мин, а затем однократно промывали 30 мкл PBS. Выявляющее антитело (2,5 мкг/лунка антитела Abs CD73.10.IgG2C219S к CD73) разводили PBS буфером, содержащим 0,2% BSA, и добавляли в количестве 15 мкл/лунка в планшет с зафиксированными клетками. Планшет инкубировали при 4°C в течение ночи. На следующий день после 3 промываний в PBS буфере добавляли вторичное козье антитело к человеческому антителу, конъюгированное с Alexa-488, с DAPI. Клетки окрашивали в течение 60 мин при комнатной температуре, после 3 промываний получали изображения с использованием Arrayscan Vti (Cellomics, Питтсбург, Пенсильвания). Результаты представлены на фиг. 23A-23D и в табл. 23 и 24. Значения в табл. 24 получены на основе данных, показанных на фиг. 1A-J.

Таблица 23

Клеточная линия	Тип клеток	11F11(IgG2) $T_{1/2}$ (мин.)	6E11 1 $T_{1/2}$ (мин.)	CD73.10.IgG1.1f $T_{1/2}$ (мин.)
Calu6	Аденокарцинома легкого человека	3,9	60,9	14,4
HCC44	Немелкоклеточная карцинома легкого	3,3	27,9	23,5
H2030	Немелкоклеточная карцинома легкого	3,3	40,3	18,3
H647	Немелкоклеточная карцинома легкого	45,7	Нет данных	Нет данных
H2228	Немелкоклеточная карцинома легкого	10,9	36,5	35,7
HCC15	Немелкоклеточная карцинома легкого	2,2	84,4	37,9
SKLU1	Аденокарцинома легкого	6,8	18,0	17,2
SKMES1	Меланома	2,2	62,8	32,3
SW900	Плоскоклеточная карцинома легкого	10,3	94,9	43,4

Таблица 24

$T_{1/2}$ и % интернализации антител к CD73 в 4 линиях клеток человека

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

Результаты указывают на то, что антитела группы 1 (11F11 и его производные CD73.4 и CD73.10) показывают хорошую EC_{50} для интернализации и максимальные значения интернализации (97,5%), хотя некоторые антитела интернализировались больше, чем остальные. 11F11 было наиболее активным и интернализировалось за минуты, достигая плато за 30 мин, тогда как 6E11 (также антитело группы 1, IgG1) интернализировалось более медленно, достигая плато приблизительно приблизительно за 1 ч (фиг. 23A-D). Антитела группы 2 (5F8 и 4C3) не интернализировалось в значительной степени. Кроме того, наличие шарнира и CH1 домена IgG2 повышали скорость и степень интернализации. Эту тенденцию наблюдали в нескольких клеточных линиях (фиг. 23 A-D и табл. 24).

B. Интернализация, измеренная с помощью проточной цитометрии.

Опосредованную антителом к CD73 интернализацию CD73 также исследовали с помощью проточной цитометрии. Указанные клетки инкубировали с указанным антителом в концентрации 10 мкг/мл в течение 30 мин на льду, промывали несколько раз и переносили в среду температурой 37°C в течение указанного времени. Клетки собирали одновременно после указанного времени инкубирования. Клетки

вновь окрашивали первичным антителом (тем же антителом, используемым для первоначального инкубирования) с последующим окрашиванием вторичным антителом к человеческому антителу. Клетки затем анализировали в отношении экспрессии CD73 с помощью проточной цитометрии.

Результаты, которые показаны на фиг. 23E и в табл. 25, согласуются с полученными в анализах интернализации, описанных выше, и указывают на то, что все антитела с шарниром и CH1 IgG2, индуцировали быструю и полную интернализацию. Уровни CD73 оставались низкими спустя 22 ч после отмывки, указывая на то, что интернализация является длительной.

Подобные результаты, показанные на фиг. 23F и в табл. 25, получали в клеточной линии NCI-H292, в которой антитело сохранялось в культуре в течение времени инкубирования (без отмывки). Опять-таки, эти данные указывают на быструю и значительную интернализацию и сохранение понижающей регуляции эндогенного CD73.

Анализы интернализации также проводили с использованием человеческих SNU-C1 (линия клеток злокачественной опухоли толстой кишки) и NCI-H1437 (линия клеток немелкоклеточной карциномы легкого) клеток. Результаты, которые показаны на фиг. 23I и J и в табл. 25, также указывают на быструю интернализацию, причем максимальный уровень достигался за 5 ч, а максимальный уровень интернализации составлял приблизительно 50% для CD73.4.IgG2-C219S-IgG1.1f в SNU-C1 и 60% в NCI-H1437 клетках. На фиг. 23G и H показаны подобные кинетические характеристики интернализации для CD73.4.IgG2-C219S-IgG1.1f в Calu6 и NCI-H292 клетках. Для графиков, на которых показан % интернализированного CD73, эта величина была получена следующим образом:

$$\%\ \text{интернализированного}\ CD73 = 100 - \left(\frac{MFI_{t=x} - MFI_{\text{фон}}}{MFI_{t=0} - MFI_{\text{фон}}} \times 100\right),$$

где для каждого антитела $MFI_{t=x}$ представляет собой MFI (средняя интенсивность флуоресценции) в заданный момент времени, $MFI_{t=0}$ представляет собой максимальную флуоресценцию при t=0 и $MFI_{\text{фон}}$ представляет собой MFI только вторичного Ab.

Таблица 25

Значения EC_{50} для опосредованной антителом интернализации CD73 в нескольких клеточных линиях

	Calu6		NCI-H292		SNU-C1		SNU-C1 (без отмывки)		NCI-H1437		NCI-H1437 (без отмывки)	
	Ymax (%)	$T_{1/2}$ (часы)	Ymax (%)	$T_{1/2}$ (часы)	Ymax (%)	$T_{1/2}$ (часы)	Ymax (%)	$T_{1/2}$ (часы)	Ymax (%)	$T_{1/2}$ (часы)	Ymax (%)	$T_{1/2}$ (часы)
mAb-CD73.4-IgG2-IgG1.1f	76,8	0,5661	77,64	0,2633	48,96	0,4954	38,39	1,025	63,12	0,3164	62,78	0,3418
mAb-CD73.4-IgG2	75,59	0,6003	78,42	0,2766	-	-	-	-	-	-	-	-
mAb-CD73.4-IgG1.1f	44,99	1,737	51,49	0,2087	30,58	0,9915	33,16	2,33	49,76	0,4915	49,95	0,5384

Дополнительные анализы интернализации проводили на Calu6 и H292 клетках для того, чтобы дополнительно выделить роль изотипа при интернализации. Анализы интернализации проводили, как описано выше (протокол без стадии отмывки от антител), и антитела различных гибридных изотипов, показанные в табл. 26, поддерживали в культуре в концентрации 10 мкг/мл в течение времени инкубирования. В случае экспериментов с проточной цитометрией способ из примера 6B адаптировали к анализу с высокой пропускной способностью в 96-луночных планшетах (в отличие от 48-луночных планшетов) и с 50000 клетками на лунку.

Таблица 26

Константные участки, исследуемые с вариабельными участками CD73.4

Конструкты	**SEQ ID NO константного участка**	**Описание**
IgG1f	267	IgG1f дикого типа
IgG1.1f	272	Стандартное инертное IgG1.1f
IgG2.3	268	A-форма IgG2 (C219S)
IgG2.5	271	B-форма IgG2 (C131S)
IgG2.3G1-KH	270	CH1, верхний шарнир и нижний шарнир/верхний CH2 от IgG2.3, все остальное от IgG1f

IgG2.5G1-KH	279	CH1, верхний шарнир и нижний шарнир/верхний CH2 от IgG2.5, все остальное от IgG1f
IgG2.3G1-AY	269	CH1 и верхний шарнир от IgG2.3, все остальное от IgG1f
IgG2.5G1-AY	278	CH1 и верхний шарнир от IgG2.5, все остальное от IgG1f
IgG1-G2.3G1-KH	282	CH1 от IgG1, верхний шарнир и нижний шарнир/верхний CH2 от IgG2.3, все остальное от IgG1f
IgG1-G2.3G1-AY	281	CH1 от IgG1, верхний шарнир от IgG2.3, все остальное от IgG1f
IgG2.3G1.1f-KH	273	CH1, верхний шарнир и нижний шарнир/верхний CH2 от IgG2.3, все остальное от IgG1.1f
IgG2.5G1.1f-KH	277	CH1, верхний шарнир и нижний шарнир/верхний CH2 от IgG2.5, все остальное от IgG1.1f
IgG1-deltaTHT	274	IgG1 с удаленной из шарнира последовательностью THT
IgG2.3-plusTHT	275	IgG2.3 с добавленной в шарнир последовательностью THT (из IgG1)
IgG2.5-plusTHT	280	IgG2.5 с добавленной в шарнир последовательностью THT (из IgG1)
IgG2.3-plusGGG	276	IgG2.3 с добавленной в шарнир гибкой последовательностью GGG

Было показано, что связывание с FcγR являлось таким, как ожидалось, для каждого конструкта, т.е. связывание FcγR обусловлено нижним шарниром/CH2 участком.

Результаты показаны на фиг. 23K-M и в табл. 27 и 28. Данные, приведенные в табл. 27, получали с использованием того же протокола, что описан в примере 6B. Данные, приведенные в табл. 28, получали с использованием того же протокола, что описан в примере 6A.

Таблица 27

Ymax и $T_{1/2}$ для опосредованной антителом интернализации CD73 в Calu6 и NCI-292 клетках

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

Таблица 28

Характеристики интернализации и ингибирования фермента для CD73.4 с различными константными участками в Calu6 клетках

№	Клоны mAb к CD73	Интернализация		Ингибирование CD73	
		Максимальная	Скорость	EC50 (нМ)	S:B
1	CD73.4-IgG1f/LC-11F11-Vk2	+	+	2,01	2
2	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3G1-AY-pTT5-SP5	++++	++++	2,37	56
3	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3G1-KH	++++	+++	1,70	52
4	CD73.4-Vh-hHC-G1-G2.3-G1-AY	++	++	0,38	6
5	CD73.4-Vh-hHC-G1-G2.3-G1-KH	++	++	0,63	3
6	CD73.4-Vh-hHC-IgG1-deltaTHT	++	+++	0,31	6
7	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3-plusTHT	++++	++++	1,54	33
8	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3-plusGGG	++++	++++	1,26	26
9	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5	++++	++++	2,17	51
10	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5G1.1f-KH	++	++++	0,87	45
11	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5G1.1-AY	+++	++++	0,43	92
12	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5G1.1-KH	+++	++++	0,44	42
13	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5plusTHT/LC	++++	++++	0,90	44
14	CD73.4-Vh-hHC-IgG2-C219S/LC	++++	++++	1,56	28
15	CD73.4-Vh-hHC-IgG2-C219S/LC	++++	++++	1,78	41
16	CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f+K/LC	+	+	0,70	2
17	CD73.4-Vh-hHC-IgG2C219S-IgG1.1f	++++	++++	1,28	12

Фиг. 23K-M и табл. 27 и 28 указывают на то, что антитела, имеющие шарнир и CH1 домен изотипа IgG2, являются наиболее эффективными в возбуждении интернализации CD73, тогда как антитела, которые имеют шарнир и CH1 домен IgG1, соответствуют более низким кривым на чертеже, т.е. более низкой степени интернализации. Кроме того, антитела только с шарниром от IgG2 характеризуются повышенной интернализацией в сравнении с шарниром человеческого IgG1. Следовательно, антитела, имеющие шарнир и CH1 домен изотипа IgG2, обладают лучшими характеристиками интернализации по сравнению с антителами с изотипом IgG1.

Таким образом, антитело к CD73 mAb-CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f индуцировало быструю интернализацию, зависящую от исследуемой клеточной линии. Значение $T_{1/2}$ для интернализации варьировало от нескольких минут до периода менее часа. Большинство исследуемых клеточных линий имели $T_{1/2}$ менее 10 мин. Практически полная интернализация индуцировалась для некоторых клеточных линий, и у всех исследуемых клеток присутствовало по меньшей мере 50% снижение экспрессии CD73 на поверхности, которое, как правило, достигало максимальных уровней к 5 ч, а в некоторых случаях гораздо раньше.

Данные SEC-MALS и DLS демонстрируют, что комплексы большего размера образуются между hCD73-his и mAb, содержащими шарнир и CH1 участок IgG2 (IgG2-C219S или IgG2-C219S-IgG1.1f), в сравнении с содержащими шарнир и CH1 участок IgG1 (IgG1.1f).

Пример 7. Ингибирование ферментативной активности CD73 в опухолях в модели ксенотрансплантата у животного.

Мышей, несущих подкожные опухоли из человеческих Calu6 клеток, обрабатывали CD73.10-IgG1.1, CD73.10-IgG2CS или CD73.10-IgG2CS-IgG1.1 после 7 суток роста. Антитела вводили IP в дозе 10 мг/кг. Опухоли собирали через 1, 2, 3 и 7 суток после введения антитела, заливали в OCT и быстро замораживали в охлажденном изопентане. Залитые в OCT опухоли нарезали на 5-6-мкм срезы и позволяли им высохнуть в течение ночи при RT. Срезы опухолей фиксировали в течение 2,5 мин с использованием смеси холодного 10% формалина, стабилизированного фосфатным буфером, и ацетона в соотношении 1:1, затем их подвергали предварительному инкубированию в течение 1 ч при RT в 50 мМ Tris-малеатном буфере с pH 7,4, содержащем 2 мМ $CaCl_2$ и 0,25 М сахарозу. После 1 ч предварительного инкубирования буфер удаляли и заменяли на такой же буфер, дополненный 5 мМ $MnCl_2$, 2 мМ $Pb(NO_3)_2$, 2,5% декстраном T200, 2,5 мМ левамизолом и 1 мМ AMP. Ферментативную реакцию проводили в течение 1 ч при 37°C. После промывания DI водой срезы инкубировали в течение точного периода 1 мин с 1% $(NH_4)_2S$, за которым следовало быстрое промывание DI водой. Проводили контр-окрашивание срезов гематоксилином, их обезвоживали и монтировали с использованием заливочной среды на основе ксилола. Коричневый цвет указывает на присутствие активного CD73, тогда как отсутствие коричневого цвета указывает на то, что ферментативная активность CD73 ингибируется антителом.

Результаты указывают на то, что CD73.10-IgG1.1, CD73.10-IgG2CS и CD73.10-IgG2CS-IgG1.1 ингибируют ферментативную активность CD73 in vivo. Типичные окрашенные срезы опухолей из мышей, обработанных антителом CD73.10-IgG2CS-IgG1.1, показаны на фиг. 24A-E. Окрашенные срезы опухолей из мышей, обработанных остальными двумя антителами, были подобными. Степень ингибирования CD73 коррелировала с уровнями антитела в сыворотке. Таким образом, немного более высокий уровень активности CD73, наблюдаемый в образце, полученном в день 3, коррелировал с более низким уровнем

антитела в сыворотке, чем в образце, полученном в день 7.

Эксперимент, подобный описанному выше, проводили на мышах, несущих подкожные ксенотрансплантаты опухолей из SNUC1 клеток, которые получены из линии клеток карциномы ободочной кишки человека, и обрабатывали антителом к CD73 CD73.4IgG2CS-IgG1.1f. Мышей с опухолями SNUC1 обрабатывали CD73.4IgG2CS-IgG1.1f в IP дозе 1, 3 и 10 мг/кг в день 0. Опухоли собирали через 24, 48, 72, 96 и 168 ч после введения дозы. Анализ ингибирования ферментативной активности CD73 проводили, как описано выше. Количественное определение интенсивности коричневого окрашивания проводили с использованием программного обеспечения Image Pro Premier (Media Cybernetics).

Результаты, которые представлены на графике на фиг. 24F, показывали, что активность CD73 существенно снижается у животных, которым вводили дозу антитела к CD73, по сравнению с мышами, которых обрабатывали контрольным антителом, указывая на сильное ингибирование фермента CD73 антителом во всех трех концентрациях. Таким образом, антитело к CD73 CD73.4CS-IgG1.1f эффективно ингибирует ферментативную активность CD73 in vivo. Кинетические характеристики ингибирования CD73 антителами к CD73 также определяли в модели на основе изогенной опухоли 4T1. TY/23 (крысиное антитело к мышиному антителу к CD73) или контроль из IgG (10 мг/кг) вводили инъекцией на 7 сутки после инъекции опухолевых клеток 4T1. Опухоль, селезенку, цельную кровь и сыворотку собирали на 1, 2, 3, 6 и 7 сутки после обработки Ab. Ингибирование активности CD73 измеряли, как описано выше, в срезах, полученных в указанный день. Типичные срезы опухолей показаны на фиг. 25A и B. Данные указывают на то, что TY/23 ингибирует активность CD73 in vivo.

Пример 8. Сортировка эпитопов и перекрестное блокирование на основе проточной цитометрии.

Исследования сортировки эпитопов осуществляли с помощью интерферометрии в биослое (BLI) с использованием инструмента Octet RED (Pall Fortebio) при 25°C. Для этих исследований 20-30 мкг/мл hCD73-his захватывали на сенсорах с антителами к пентагистидиновым последовательностям с использованием фазы загрузки длительностью 90-180 с. Конкуренцию антитела оценивали, обеспечивая связывание заданного антитела (mAb1) с поверхностями с hCD73-his в течение 180 с, за этим следовало непосредственное воздействие раствора второго антитела (mAb2) в течение 180 с. Сигнал от связывания для mAb2 после предварительного связывания mAbl сравнивали с mAb2 в отсутствие конкуренции для определения того, конкурируют ли mAbl и mAb2 за связывание с поверхностями с hCD73-his. Эти эксперименты осуществляли для многочисленных пар mAb в обоих порядках (mAb1, затем mAb2; и mAb2, затем mAb1) для получения профилей конкуренции и группы эпитопов (кратко изложены в табл. 29 ниже).

Как показано в табл. 29, анализ сортировки эпитопов выявил 2 группы эпитопов.

Таблица 29

Антитело	Группа 1	Группа 2
7A11	X	
6E11	X	
11F11	X	
5F8		X
4C3		X
11A6		X

Антитела также подвергались перекрестному блокированию на основе проточной цитометрии. Эксперимент проводили следующим образом с использованием одного набора антител, меченых флуоресцентной меткой, и второго набора немеченых антител: высевали 100000 NCI-H292 клеток на лунку. Содержимое планшета осаждали центрифугированием и клетки ресуспендировали в 100 мкл 2% FBS в PBS на лунку. Клетки блокировали на льду в течение 20 мин. Немеченое антитело, которое указано, в 2% FBS в PBS добавляли в каждую лунку. Содержимое планшета осаждали центрифугированием и клетки ресуспендировали в 100 мкл на лунку разведенного меченого антитела (10 мкг/мл), т.е. либо 4C3, либо 11F11, конъюгированного с FITC. 6 лунок с клетками инкубировали без антитела и ресуспендировали в 100 мкл только 2% FBS в PBS (для контролей). Клетки затем инкубировали на льду в течение 30 мин. Клетки промывали дважды 2% FBS в PBS и образцы ресуспендировали в 140 мкл 2% FBS в PBS и анализировали на проточном цитометре FacsCalibur (Becton Dickinson).

Результаты перекрестного блокирования на основе проточной цитометрии, которые показаны на фиг. 26A и B, подтверждают данные сортировки эпитопов с помощью SPR, изложенные выше. Например, 7A11 конкурирует с 11F11, а 4C3 - нет.

Пример 9. Картирование эпитопов с помощью HDX.

В этом примере описывается применение HDX-MS для идентификации эпитопа на человеческом CD73, с которым связывается CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f.

С помощью метода масс-спектрометрии с использованием водородно/дейтериевого обмена (HDX-MS) исследуют конформацию белка и динамику конформационных превращений в растворе посредством мониторинга скорости и степени дейтериевого обмена для атомов водорода в амидных группах ос-

това белка (за исключением пролина). Уровень обмена при HDX зависит от доступности белка для растворителя и водородных связей, и рост массы белка при HDX можно точно измерить с помощью MS. Когда эту методику применяют в паре с ферментативным расщеплением, можно выяснить структурные особенности на уровне пептида, создавая возможность для разграничения обращенных к поверхности пептидов и пептидов, свернутых внутрь. При экспериментах по картированию эпитопов проводят эксперименты с мечением дейтерием и последующим гашением параллельно для антигена и комплекса антиген/mAb, за этим следует расщепление пепсином, разделение пептидов и MS-анализ в реальном масштабе времени.

Перед картированием эпитопов для CD73.4-IgG2-CS-IgG1.1f на CD73 с помощью HDX-MS проводили эксперименты с недейтерированными молекулами для получения перечня пептидов, обычно получаемых в результате расщепления, для рекомбинантного человеческого полноразмерного ECD димерного CD73 (12 мкМ) и белкового комплекса рекомбинантного человеческого CD73 и mAb к CD73 (молярное отношение 1:1, 12 мкМ для mAb к CD73), обеспечивающего 88% охват последовательности для полноразмерного ECD CD73. В эксперименте с HDX-MS 5 мкл CD73 (SEQ ID NO: 99) или CD73 с mAb CD73.4-IgG2-CS-IgG1.1f разводили в 55 мкл буфера с D_2O (10 мМ фосфатный буфер, D_2O, pD 7,0) для того, чтобы начать реакции мечения при комнатной температуре. Используемый белок CD73 представлял собой гликозилированный полноразмерный димерный hCD73, имеющий SEQ ID NO: 99, также показана ниже). Реакции осуществляли в течение разных периодов времени: 20 с, 1, 10 и 240 мин. По окончании периода каждой реакции мечения реакцию гасили посредством добавления гасящего буфера (100 мМ фосфатный буфер с 4 М GdnCl и 0,4 М TCEP, pH 2,5, 1:1, об./об.) и 50 мкл гашеного образца впрыскивали в систему Waters HDX-MS для анализа. Уровни поглощения дейтерия для пептидов, обычно получаемых в результате расщепления, отслеживали в отсутствие/в присутствии mAb к CD73.

Используемый белок CD73 имел аминокислотную последовательность, имеющую SEQ ID NO: 99.

Измерения HDX-MS на mAb к CD73 в CD73 указывают на то, что mAb CD73.4-IgG2-CS-IgG1.1f распознает прерывающийся эпитоп, состоящий из двух пептидных участков в N-концевом участке CD73:

пептидный участок 1 (65-83): FTKVQQIRRAEPNVLLLDA (SEQ ID NO: 96),

пептидный участок 2 (157-172): LYLPYKVLPVGDEVVG (SEQ ID NO: 97).

Трехмерное изображение взаимодействия (фиг. 27B) показывает, что эти два участка геометрически близки. Подробная карта взаимодействия показана на фиг. 27A.

Пример 10. Кристаллическая структура 11F11, связывающегося с CD73.

В этом примере описана кристаллическая структура Fab' 11F11, связанного с CD73(26-336)His.

CD73(26-336)His очищали от временно трансфицированных HEK-293 E клеток с использованием стандартных протоколов, использовали без дополнительной обработки или подвергали дегликозилированию посредством обработки PNGase F и концентрировали до концентрации 1,2 мг/мл. Fab' антитела 11F11 получали посредством расщепления пепсином 11F11 с использованием стандартных протоколов и концентрировали до концентрации 1,1 мг/мл.

Комплекс образовывался при инкубировании равных объемов дегликозилированного hCD73(26-336)His и Fab' 11F11 в течение ночи при 4°C, очищали с использованием колонки GE Superdex 200 26/60 и концентрировали до концентрации 9,5 мг/мл с использованием центрифужного концентратора с MWCO (граница отсечки по молекулярному весу задерживаемых компонентов) 10 кДа.

Кристаллы выращивали в сидячих каплях, в экспериментах с диффузией пара каплю, которая составляла 0,25 мкл белка, смешивали с 0,25 мкл резервуарного раствора. Проводили более 7100 экспериментов по кристаллизации. Исходные зерна кристаллов имели небольшой размер приблизительно 10 мкм. Оптимизированные кристаллы имели размер 200-300 мкм. Оптимизация кристаллизации включала скрининг добавок, детергентов, осадителей, pH, температуры и типа буфера. Условия, которые обеспечивали возможность образования кристаллов, были следующими: резервуарный раствор состоял из 34% пропиленгликоль P400, 0,1 M Na/K PO_4 pH 6,5 и 15 мкМ CYMAL-7; эксперименты с кристаллизацией проводили при комнатной температуре, а затем помещали в условия с температурой 4°C для инкубирования; и инкубировали при 4°C в течение 7 суток. Образование кристаллов наблюдали только с гликозилированным белком CD73.

Кристаллы собирали напрямую из кристаллизационной капли и помещали непосредственно в жидкий N2. Более 100 кристаллов подвергали скринингу в отношении дифракции в собственной лаборатории.

Данные собирали с использованием меленького пучка, очень слабой аттенюации и спирального сбора данных по каналу 22ID SER-CAT с высокоскоростным CCD детектором Rayonix MX-33HS. Наборы данных собирали при 4,1, 3,8, 3,5 Å и в конце при 3,05 Å. Данные, обработанные и нормированные с использованием стандартного HKL2000 (Otwinowski Z., Minor W., Methods in Enzymology 276, 307-326 (1997)), до 96% получали с разрешением 3,04 Å.

Поиск BLAST (Altschul et al. (1990) "Basic local alignment search tool", J. Mol. Biol. 215:403-410) использовали для поиска наиболее близкой модели для N-концевого домена CD73 и Fc- и Fv-доменов в базе данных для белков RCSB для применения в поиске методом молекулярного замещения: модель для CD73 происходила из записи 4H1S в базе данных PDB (Heuts et al. Chembiochem. 2012 Nov 5;

13(16):2384-91).

Ее использовали в качестве начальной модели для поиска PHASER (McCoy et al. J. Appl. Cryst. (2007), 40, 658-674) методом молекулярного замещения. В поиске CD73 обнаружили 5 молекул в асимметричной единице. Сохраняя CD73 фиксированным, в поиске с использованием поисковой модели тяжелой цепи было обнаружено 2 молекулы в асимметричной единице. Сохраняя CD73 и тяжелые цепи фиксированными, в третьем поиске методом PHASER для легкой цепи также было обнаружено 2 молекулы в асимметричной единице. Сложную модель для пяти полных комплексов получали из результатов с частичным разрешением посредством наложения данных для пяти CD73 и сочетания тяжелых и легких цепей. Ее использовали в качестве начальной модели для уточнения с использованием BUSTER (Bricogne et al. (2011) BUSTER version 2.11.6. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd).

Была повторно подобрана модель, и аминокислоты в ней изменяли, чтобы отразить последовательности 11F11. Модель подвергалась существенной коррекции в ручном режиме для построения и уточнения модели. В общей сложности пять циклов уточнения BUSTER проводили для завершения уточнения. Окончательный R-фактор составлял 20,59% (R-free фактор=24,58%) для 27484 атомов в белке и 24 молекул растворителя.

Изображения кристаллической структуры комплекса изложены на фиг. 28A-D.

Кристаллическая структура показывает, что все, кроме одного из взаимодействий, происходят из остатков в CDR участках, и что большинство из взаимодействий происходят из VH домена с двумя дополнительными взаимодействиями из VL домена (фиг. 28A). Взаимодействующие остатки в человеческом CD73 и Fab' 11F11 приведены в табл. 30.

Таблица 30

Остаток в CD73	Взаимодействие	Тяжелая цепь 11F11		Легкая цепь 11F11	
		Остаток	Расстояние (Å)	Остаток	Расстояние (Å)
Phe-65	VDW			Ser-30	4,0
				Ser-31	3,5
				Trp-32	3,8
Gln-69	VDW			Trp-32	3,9
Arg-73	VDW			Ser-53	3,8
Asn-106	VDW	Tyr-100	3,6		
Ala-107				Trp-32	3,7
Arg-109	H-связь	Pro-100A	2,8	Tyr-91	3,0
	VDW	Tyr-100	3,4	Trp-32	3,5
				Asn-92	3,5
Tyr-100	H-связь	Tyr-100	3,0		
Lys-136	VDW	Trp-99	3,3		
		Tyr-100	3,6		
Phe-137	VDW	Trp-99	3,6		
		Tyr-100	3,3		
Pro-138	VDW	Trp-99	3,4		
Lys-162	Солевой мостик	Asp-53	2,8		

	VDW	Tyr-52A	3,2		
		Trp-99	3,8		
Leu-164	VDW	Tyr-52A	3,6		
Pro-165	VDW	Asn-31	3,2		
		Tyr-52A	3,6		
		Ser-97	3,5		
Gly-167	Н-связь	Asn-31	2,7		
	VDW	Tyr-32	3,7		
Asp-168	Н-связь	Thr-28	2,9		
	VDW	Asn-31	3,3		
		Phe-27	3,4		
Glu-169	Н-связь	Asn-31	2,9		
Val-170	VDW	Asn-31	3,5		
Ser-319	Н-связь			Ser-67	2,7
				Gly-68	3,0
	VDW			Ser-30	3,8
				Ser-67	3,8
Ile-320	VDW			Ser-30	4,0

Модель, основывающая на сложной структуре двух комплексов CD73(NDT)/11F11, наложенной на димер CD73 (PDB Entry 4H1S), говорит о том, что 11F11 связывается с поверхностью на CD73 вдали от поверхности взаимодействия в димере, это говорит о том, что Fab не препятствует образованию димера.

Сравнение результатов картирования с помощью FIDX-MS и рентгеноструктурного анализа комплекса CD73/11F11 показывает, что они в основном согласовались, показывая подобный эпитоп на CD73 (65-83 и 157-172). Тем не менее, рентгеновская структура показывает дополнительные взаимодействия (менее чем 6 Å) в участке от Met-105 до Asp-111 (в том числе Н-связи в Arg-109 и Tyr-110), от Lys-135 до Pro-139 и от Asp-317 до Ile-320 (в том числе Н-связи в Ser-319).

Пример 11. Воздействие разных шарниров/Fc на размер комплексов антитело/CD73.

Как показано в вышеизложенных примерах, антитела к CD73 с шарниром и CH1 IgG2 являются лучшими ингибиторами ферментативной активности CD73 на клетках и интернализируются лучше, чем такие же антитела с шарниром IgG1. Исходя из этого наблюдения и того факта, что шарнир IgG2 является более жестким, чем шарнир IgG1, выдвинули гипотезу, что большие комплексы образуются между антигеном и антителами, имеющими шарнир IgG2, по сравнению с антителами, имеющими шарнир IgG1. Следующий эксперимент проводили для анализа этой гипотезы.

Структуру и олигомерное строение комплексов CD73/антитело в растворе оценивали с помощью SEC-MALS и DLS. Для этих исследований антитела, содержащие константный участок либо IgG1, либо IgG2, смешивали в изменяющихся молярных отношениях с рекомбинантными белками, содержащими либо полноразмерный внеклеточный домен человеческого CD73, содержащий С-концевую полигистидиновую метку (аминокислотные остатки 26-546 в человеческом CD73, называемый "hCD73-his"), либо фрагмент, соответствующий N-концевому домену человеческого CD73 (аминокислотные остатки 26-336, называемый "N-hCD73-his").

Олигомерное строение комплексов CD73/антитело оценивали с помощью гель-хроматографии в сочетании с подключенным к системе детектором многоуглового рассеяния света (SEC-MALS). Изократические разделения проводили на колонке Shodex PROTEIN KW-803, соединенной с прибором Prominence Shimadzu UFLC, в буфере, содержащем 200 мМ K_2HPO_4, 150 мМ NaCl, pH 6,8, содержащем 0,02% азида Na (отфильтрованный через фильтр с размером ячейки 0,1 мкм), который прогоняли со скоростью потока 0,5 мл/мин. Образцы впрыскивали на колонку с использованием автоматического дозатора SIL-20AC Prominence Shimadzu и получали данные от трех детекторов, работающих в реальном масштабе времени и соединенных последовательно: спектрофотометр Prominence SPD-20AD с диодной матрицей для измерения в УФ/видимой областях спектра, за которым следовал детектор многоуглового рассеяния света Wyatt miniDAWN™ TREOS, а затем рефрактометрический детектор Wyatt Optilab T-rEX. Данные собирали и анализировали с использованием программного обеспечения Astra (Wyatt) и Labsolutions (Shimadzu).

Исследования динамического рассеяния света (DLS) проводили на планшет-ридере Wyatt DynaPro в 384-луночных планшетах при 25°C. Параметры эксперимента предусматривали 20 сборов данных по 5 с

каждый на измерение, и измерения записывали в четырех повторностях, причем приводили среднее значение и стандартное отклонение. Автокорреляционные функции для интенсивности подбирали с использованием алгоритма "регуляризации" в программном обеспечении Dynamics (Wyatt Technologies).

Краткое изложение результатов SEC-MALS и DLS представлено на фиг. 29A и B. Анализ антитела отдельно показал значения времени удержания (приблизительно 16-17 мин), массы (140-150 кДа) и гидродинамические радиусы (5,0-5,4 нм) для каждого антитела, что является типичным для мономерного моноклонального антитела. Данные для белка hCD73-his согласовались с тем, что белок принимает ожидаемую димерную структуру в растворе, в частности масса, определенная на основе данных SEC-MALS (120 кДа), соответствовала ожидаемой для димера CD73-his (117 кДа) и не соответствовала той, которая ожидалась бы для мономера hCD73-his (58,5 кДа). Данные для N-hCD73 соответствовали рекомбинантному белку N-домена, который является мономерным в растворе (измеренная с помощью SEC-MALS масса=38 кДа в сравнении с ожидаемой массой в мономерной форме=35,0 кДа), что ожидалось, поскольку участок внеклеточного домена полноразмерного CD73, который отвечает за димеризацию белка, содержится в C-концевом домене без вклада остатков в N-домене.

Было выявлено, что эквимолярные смеси заданного антитела с N-hCD73-his элюируются в виде единой частицы в SEC с меньшим временем удержания, чем антитело или N-hCD73-his по отдельности, о том же говорили и большие гидродинамические радиусы (Rh), измеренные с помощью DLS, которые соответствовали образованию комплексов. Данные MALS указывают массы для этих комплексов, составляющие примерно 210 кДа. Это согласуется с тем, что одна молекула N-hCD73-his связывается с каждым из двух Fab доменов заданного антитела с образованием комплекса 1:2 антитело:N-hCD73-his.

Данные SEC-MALS для смесей антител к CD73 с димером hCD73-his показывают, что смесь элюируется раньше, чем любое из hCD73-his или антитела отдельно, это говорит о том, что образуются комплексы. Сравнение данных для mAb, которые содержат одинаковый вариабельный участок, но разные константные домены, показывает, что значения времени элюирования для комплексов hCD73-his с mAb, содержащими константные домены IgG2 (IgG2-C219S, IgG2-C219S-IgG1.1f), меньше, чем для комплексов hCD73-his с mAb, содержащими константный домен IgG1.1f. Кроме того, определенные с помощью MALS значения массы для комплексов hCD73-his с mAb, содержащими константный домен IgG2, являются большими, чем для комплексов hCD73-his с mAb, содержащими константный домен IgG1. Данные DLS дополнительно показывают, что гидродинамический радиус у комплексов hCD73-his с mAb, содержащими константный домен IgG2, является большим, чем у комплексов hCD73-his с mAb, содержащими константный домен IgG1. Например, данные SEC-MALS и DLS для CD73.4 с тремя разными константными участками (IgG2-C219S, IgG2-C219S-IgG1.1f или IgG1.1f) показаны на фиг. 30. На ней можно увидеть, что комплекс hCD73-his с CD73.4, содержащим константный домен IgG2, характеризуется меньшими значениями времени удержания (фиг. 30A), большими гидродинамическими радиусами (фиг. 30B) и большими значениями массы, определенными с использованием MALS (фиг. 30C), в сравнении с комплексами hCD73-his с CD73.4-IgG1.1f. Основанная на значениях массы, полученных с использованием MALS, схематическая модель для структуры и стехиометрического состава комплексов между hCD73-his и антителами показана на фиг. 30D, причем комплексы, содержащие CD73.4-IgG1.1f, преимущественно образуют меньшие 2:2 (пик 1=~550 кДа) или 4:4 mAb/CD73 димерные комплексы (пик 2=~1300 кДа), тогда как CD73.4-IgG2-C219S или CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f образуют намного большие комплексы (>3000 кДа) с hCD73-his, для которых невозможно уверенно смоделировать точную структуру и стехиометрический состав.

Антитела CD73.4, имеющие константные участки тяжелой цепи, которые изложены в табл. 26, также исследовали в отношении размера образованных комплексов. Как показано на фиг. 30D, результаты указывают на то, что комплексы более высокого порядка образуются с антителами, имеющими CH1 домен IgG2, по сравнению с антителами, имеющими CH1 домен IgG1.

В совокупности данные SEC-MALS и DLS демонстрируют, что комплексы большего размера образуются между hCD73-his и mAb, содержащими шарнир и CH1 участок IgG2 (IgG2-C219S или IgG2-C219S-IgG1.1f), в сравнении с содержащими шарнир и CH1 участок IgG1 (IgG1.1f). Кроме того, антитела, имеющие CH1 домен IgG2, образуют большие комплексы, чем антитела, имеющие CH1 домен IgG1.

Пример 12. Значимость определенных аминокислотных остатков в CH1 и шарнире IgG2 в улучшении опосредованной антителом интернализации CD73.

Антитела к CD73 (CD73.4) с константными участками тяжелой цепи, приведенными в табл. 31, получали и исследовали, как описано выше, в анализах опосредованной антителом интернализации CD73.

Таблица 31

Константные участки тяжелой цепи, которые были слиты с вариабельными участками антитела к CD73

Описание	Конструкты	SEQ ID NO константного участка
CH1 домен от IgG2, причем все остальное от IgG1. Также, мутант Cys>Ser для уменьшения потенциальной неоднородности образования дисульфидных связей:	G2-G1-G1-G1	300
	G2.5-G1-G1-G1	301
CH1 домен от IgG1, причем все остальное от IgG2.3:	G1-G2.3-G2-G2	302
Замена CH1 участков в IgG1 на такие участки IgG2 либо по отдельности, либо вместе	G1-KRGEGSSNLF	303
	G1-KRGEGS	304
	G1-SNLF	305
	IgG1-ITNDRTPR	306
	G1-SNLFPR	307
Замена CH1 участков в IgG2 на такие участки IgG1 либо по отдельности, либо вместе:	G2-RKEGSGNSFL	308
	G2-RKEGSG	309
	G2-NSFL	310
	IgG2-TIDNTRRP	311
	G2-NSFLRP	312
IgG1 с остатками из IgG2 в CH2 домене:	G1-G1-G2-G1-AY	313
	G1-G1-G2-G1-KH	314
IgG2 с остатками из IgG1 в CH2 домене:	G2-G2.3-G1-G2-KH	315
	G2.5-G2.3-G1-G2-KH	316
	G2-G2.3-G1-G2-AY	317
	G2.5-G2.3-G1-G2-AY	318
Обмен шарнирных участков между IgG1 и IgG2:	G1-G2.3-G1-G1-KH	319
	G2-G1-G2-G2-AY	320
	G2.5-G1-G2-G2-AY	321
	G1-G2-G1-G1-AY	322
	G2-G1-G2-G2-KH	323
	G2.5-G1-G2-G2-KH	324
Укороченные варианты шарнира	IgG1–delta-шарнир	325
	IgG2–delta-шарнир	326
	IgG2.5–delta-шарнир	327
	IgG1 – deltaG237	328
	IgG2 – plusG237	329
Другие	IgG2.4	330
	IgG2.3/4	331

Результаты, которые показаны на фиг. 31, обеспечивают следующую информацию в отношении интернализации CD73.

Оказывается, что CH2 домен не оказывает воздействие, на что указывают следующие факты:

a) наблюдалось очень небольшое различие в способности к интернализации у антител, содержащих модифицированный константный участок тяжелой цепи с форматом "AY" (имеющий шарнир IgG2ERKCCVECPPCPAPPVAG (SEQ ID NO: 8), по сравнению с участком с форматом "KH" (ERKCCVECPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 22) (набор 5, 6 и 7);

b) участки с замененным CH2 сравнимы с G1 или G2 дикого типа (наборы 5 и 6) и

c) остаток 237 не оказывает влияние на интернализацию: ни добавление остатка "G" к шарниру IgG2, ни удаление C-концевого "G" в шарнире IgG1 не оказывали воздействие на интернализацию (набор 9).

Это говорит о том, что CH2 домен не оказывает воздействие на интернализацию (т.е. CH2 домен может происходить от IgG1 или IgG2).

Замена CH1 участков, указанная в наборе 3 (KRGEGSSNLF; KRGEGS; SNLF; ITNDRTPR и SNLFPR), в IgG1 на CH1 участки из IgG2 обеспечивает незначительное преимущество, т.е. интернализация остается подобной интернализации IgG1; см. набор 3);

Замена CH1 участков, указанных в наборе 4 (RKEGSGNSFL; RKEGSG; NSFL; TIDNTRRP и NSFLRP), в IgG2 на CH1 участки из IgG1 оказывала различное воздействие: изменение NSFL не оказывало воздействие, тогда как другие 2 участка (RKEGSG и RP) были задействованы (см. набор 4). На основании результатов для наборов 3 и 4 оказывается, что существует взаимодействие между CH1 участком и шарниром, причем RKEGSG и RP участки являются более важными, чем NSFL участок.

Шарнирный участок оказывает воздействие на интернализацию, т.е. шарнир IgG2 обеспечивает лучшую интернализацию по сравнению с шарниром IgG1 (см. наборы 7 и 8). Кроме того, IgG1 с делецией (G1-delta-шарнир) улучшает интернализацию в сравнении с IgG1. IgG2 с делецией (G2-delta-шарнир) обеспечивает подобный уровень интернализации по сравнению с уровнем интернализации для шарнира IgG2. Это говорит о том, что шарнирный участок оказывает влияние на интернализацию, причем данный эффект усиливается CH1 IgG2 (G2-G1-G2-G2-AY является сравнимым G1-G2-G1-G1-AY).

IgG2.4 (C220S) характеризуется подобной или пониженной интернализацией в сравнении с IgG2.3

(C219S). IgG2.3/4 (C219S/C220S) характеризуется значительно пониженной интернализацией в сравнении с IgG2.3 или IgG2.4 самими по себе (см. набор 10). Это говорит о том, что интернализация антитела с шарниром IgG2 и C219S является приблизительно такой же, что и у антитела с шарниром IgG2 с C220S, причем в обоих случаях результат значительно лучше, чем у антитела с шарниром IgG2 с обеими из C219S и C220S.

IgG2.5 (мутация C131S) характеризовался пониженной интернализацией в сравнении с конструктами с C131 (см. наборы 1, 6 и 7).

Таким образом, эти результаты указывают на то, что как CH1 домен, так и шарнир являются значимыми в опосредованной антителом интернализации CD73, и что антитело, имеющее последовательности IgG2 из этих доменов, интернализируется с большей эффективностью по сравнению с антителом, имеющим эти участки из IgG1.

Пример 13. Антитела, имеющие шарнир и/или CH1 домен IgG2, образуют высокомолекулярные комплексы.

Антитела CD73.4, имеющие константные участки тяжелой цепи, изложенные в табл. 26, также исследовали в отношении образования высокомолекулярных комплексов с помощью экспериментов SEC-MALS и DLS, как описано в примере 11.

Три из 16 антител в этом исследовании исследовались ранее: CD73.4-IgG1.1f, CD73.4-IgG2-C219S (также называемое CD73.4-IgG2.3) и CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f (также называемое CD73.4-IgG2.3G1.1f-KH). Данные SEC-MALS и DLS для антител самих по себе показывали значения времени удержания, массы и гидродинамические радиусы для каждого антитела, которые являются типичными для мономерного моноклонального антитела. Эквимолярные комплексы каждого антитела (5,5 мкМ) с hCD73-his (5,5 мкМ) показывали большие значения времени удержания для всех комплексов в сравнении с антителом или hCD73-his самим по себе, что указывает на образование комплексов. Наложение данных с SEC хроматограммы для каждого из 16 комплексов показано на фиг. 32A. Данные с хроматограммы можно поделить на 4 отдельных пика, которые показаны на фиг. 32B. Пик 1 содержит наиболее крупные частицы, причем определенные с использованием MALS значения массы предполагают комплексы с эквивалентной массой большей, чем комплексы 4:4 hCD73-his:mAb. Пик 2 содержит частицы с определенными с использованием MALS значениями массы, которые предполагают комплексы, примерно соответствующие комплексам 2:2 hCD73-his:mAb. Пик 3 представляет собой меньшие частицы с низким уровнем сигнала и определенными с использованием MALS значениями массы, которые предполагают комплексы, примерно соответствующие комплексам 1:1 hCD73-his:mAb. Пик 4 соответствует элюированию отдельных mAb, причем определенные с использованием MALS значения массы соответствуют несвязанному антителу. Для количественного определения относительных количеств каждой из частиц 4 пика с каждой хроматограммы интегрировали в виде пика 1 (<12,9 мин), пика 2 (12,9-15,1 мин), пика 3 (15,1-16,7 мин), пика 4 (16,7-19,3 мин). Интегрирование также включало дополнительный интегрированный диапазон, называемый пиком 5 (>19,3 мин), чтобы учесть любые низкомолекулярные частицы, которыми, как оказалось, можно пренебречь (<3,5% для всех комплексов). Процентное содержание каждого вида частиц из этого интегрирования приведено в табл. 32. Все комплексы содержали малый процент пика 3 (приблизительно 6-9%), но переменные количества других пиков. Наиболее примечательным является то, что все комплексы между hCD73-his и антителами, содержащими CH1 домен из hIgG1, имели значительно большее процентное содержание комплексов меньшего размера (пик 2), тогда как комплексы, содержащие CH1 домен из hIgG2, имели большее процентное содержание комплексов большего размера (пик 1) (табл. 32 и фиг. 32C). Это говорит о важной роли не только шарнирного участка, но также и CH1 домена в образовании комплексов более высокого порядка.

Таблица 32

Значения времени удержания для антител CD73.4 с модифицированными константными участками тяжелой цепи

	% UV				
	Пик 1	**Пик 2**	**Пик 3**	**Пик 4**	**Пик 5**
Комплексы	**<12,9 мин.**	**12,9-15,1 мин.**	**15,1-16,7 мин.**	**16,7-19,3 мин.**	**>19,3 мин.**
CD73.4-IgG2.3 + hCD73-his	37,0	23,8	7,7	28,6	2,9
CD73.4-IgG2.3G1.1f-KH + hCD73-his	36,0	23,8	7,9	29,3	3,0
CD73.4-IgG1.1f + hCD73-his	28,4	36,2	7,4	25,6	2,3
CD73.4-IgG1f + hCD73-his	26,0	36,5	7,5	27,8	2,2
CD73.4-IgG2.3G1-AY + hCD73-his	30,2	24,3	8,1	34,4	3,0
CD73.4-IgG2.3G1-KH + hCD73-his	34,9	23,4	7,9	30,7	3,0
CD73.4-IgG1-G2.3G1-AY + hCD73-his	14,6	29,2	6,4	48,3	1,6
CD73.4-IgG1-G2.3G1-KH + hCD73-his	23,8	32,6	7,0	34,5	2,1
CD73.4-IgG1-deltaTHT + hCD73-his	28,3	35,4	7,0	26,9	2,4
CD73.4-IgG2.3-plusTHT + hCD73-his	30,6	24,3	8,3	33,7	3,2
CD73.4-IgG2.3-plusGGG + hCD73-his	30,0	23,9	8,2	34,9	2,9
CD73.4-IgG2.5 + hCD73-his	31,7	24,4	8,4	32,5	3,1
CD73.4-IgG2.5G1.1f-KH + hCD73-his	30,7	24,3	8,9	32,7	3,4
CD73.4-IgG2.5G1-AY + hCD73-his	26,3	24,8	8,1	38,3	2,6
CD73.4-IgG2.5G1-KH + hCD73-his	21,4	24,1	7,0	45,6	1,9
CD73.4-IgG2.5-plusTHT + hCD73-his	32,6	23,5	8,3	32,6	3,0

Пример 14. Связывание с Fc рецептором для антител со сконструированными константными доменами.

В этом примере демонстрируется, что антитела, имеющие модифицированные константные участки тяжелой цепи, которые содержат CH1 и шарнир IgG2, связываются с FcγR, когда они содержат CH2 и CH3 домены IgG1.

В дополнение к связыванию антигена вариабельными доменами антитела могут захватывать Fc-гамма рецепторы (FcgR) посредством взаимодействия с константными доменами. Эти взаимодействия опосредуют эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) и антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). Активность эффекторной функции является высокой в случае изотипа IgG1, но является очень низкой или отсутствует в случае IgG2 и IgG4 вследствие того, что эти изотипы характеризуются более низкой аффинностью в отношении FcgR. Кроме того, эффекторная функция IgG1 может быть модифицирована посредством мутации аминокислотных остатков в константных участках для изменения аффинности и селективности в отношении FcgR.

Связывание антител с Fc-гамма рецепторами (FcγR или FcgR) исследовали с использованием технологий на основе биосенсоров, в том числе метода измерения поверхностного плазмонного резонанса (SPR) Biacore и метода интерферометрии в биослое (BLI) Fortebio. Исследования SPR проводили на инструменте Biacore T100 (GE Healthcare) при 25°C. Fab-фрагмент из мышиного антитела к метке из 6xHis иммобилизировали на сенсорном чипе CM5 с использованием EDC/NHS до плотности ~3000 RU. Различные his-меченые FcgR (7 мкг/мл) захватывали посредством C-концевой his-метки с использованием времени контактирования 30 с при скорости потока 10 мкл/мин и связывание антитела в концентрации 1,0 мкМ оценивали в подвижном буфере с 10 мМ $NaPO_4$, 130 мМ NaCl, 0,05% p20 (PBS-T) и с pH 7,1. FcgR, используемые для этих экспериментов, включали в себя CD64 (FcgR1), CD32a-H131 (FcgRIIa-H131), CD32a-R131 (FcgRIIa-R131), CD32b (FcgRIIb), CD16a-V158 (FcgRIIIa-V158), CD16b-NAl (FcgRIIIb-NA1) и CD16B-NA2 (FcgRIIIb-NA2). Эксперименты BLI проводили на инструменте Fortebio Octet RED (Pall, Fortebio) при 25°C в 10 мМ $NaPO_4$, 130 мМ NaCl, 0,05% p20 (PBS-T) и с pH 7,1. Антитела захватывали из неразбавленных супернатантов экспрессионной среды на покрытые белком A сенсоры с последующим связыванием аналитов hCD32a-H131, hCD32a-R131, hCD32b, hCD16a-V158 в концентрации 1 мкМ или hCD64 в концентрации 0,1 мкМ.

Вначале получали антитела, которые содержат модифицированные Fc домены IgG1, в том числе замены S267E (SE) и S267E/L328F (SELF), а также различные комбинации мутаций P238D, P271G, H268D, A330R, G237D, E233D, называемые V4, V7, V8, V9 и V12. Связывание этих антител исследовали с помощью Biacore SPR в сравнении с антителами IgG1f, IgG2.3 (IgG2-C219S) и IgG4.1 (IgG4-S228P), а также антителом IgG1.1f, которое было подвергнуто воздействию методов генной инженерии для снижения связывания со всеми FcgR. Результаты, которые показаны на фиг. 33, демонстрируют ожидаемые свойства связывания с FcgR для IgG1f, IgG2.3 и IgG4.1 и мутантных антител IgG1, в том числе повышен-

ное связывание с CD32a-H131, CD32a-R131 и CD32b для SE и SELF, а также повышенную селективность мутантов V4, V7, V8, V9 и V12 в отношении CD32b в сравнении с CD32a-H131 и CD32a-R131, фиг. 33.

Следующий набор конструктов использовали для обеспечения с помощью методов генной инженерии эффекторной функцией изотипа IgG2, у которого в ином случае эффекторная функция отсутствует. Для этого исследования мутации, описанные выше, вводили в контекст константного участка IgG2.3 или гибрида IgG2.3/IgG1f, названного IgG2.3G1-AY (табл. 33). Антитела экспрессировали в малом масштабе в виде супернатантов и исследовали в отношении связывания с FcgR с использованием технологии на основе биосенсора для интерферометрии в биослое методом Fortebio Octet. Поскольку антитела присутствовали в супернатантах в низкой концентрации, эксперимент проводили, захватывая антитела из супернатантов с использованием сенсоров, покрытых белком A, с последующим связыванием с аналитами FcgR в растворе. Контроль с очищенным IgG1f и IgG1f из супернатанта, в том числе с антителами IgG1 дикого типа, SE, P238D, V4 и V12, также включали для сравнения, и каждое из этих контрольных антител демонстрировало ожидаемые свойства связывания с FcgR (фиг. 34). Антитело IgG2.3 также демонстрировало ожидаемый профиль связывания с заметным связыванием только с CD32a-H131. Тем не менее, все мутации для введения мутаций S267E, L328F, P238D, P271G, H268D, A330R, G237D или E233D в IgG2.3 оказались неспособны рекапитулировать аффинность в отношении FcgR у соответствующих сконструированных mAb IgG1 (фиг. 34). В отличие от этого, конструкт IgG2.3G1-AY был способен полностью сохранить свойства связывания с FcgR у IgG1 дикого типа при сохранении CH1 и шарнирного участков IgG2.3. Кроме того, все мутанты IgG2.3G1-AY, содержащие S267E, L328F, P238D, P271G, H268D, A330R, G237D и E233D, демонстрировали свойства связывания с FcgR, сравнимые с вариантами mAb IgG1, содержащими те же мутации (фиг. 34). Это демонстрирует успешное конструирование антител с CH1 и шарнирным участками IgG2, сочетающимися с эффекторной функцией IgG1 дикого типа или мутантного IgG1.

Таблица 33

Конструкты IgG2, полученные с помощью методов конструирования

Набор	ID	Конструкт	Seq ID №
1	IgG2.3	hHC-IgG2-C219S	268
	IgG2.3-V13	hHC-IgG2-C219S – P238D	332
	IgG2.3-V14	hHC-IgG2-C219S – P238D,P271G	333
	IgG2.3-V15	hHC-IgG2-C219S – P238D,H268D,P271G	334
	IgG2.3-V16	hHC-IgG2-C219S – P238D,P271G,A330R	335
	IgG2.3-V17	hHC-IgG2-C219S – P238D,H268D,P271G,A330R	336
	IgG2.3-V18	hHC-IgG2-C219S – S267E	337
	IgG2.3-V19	hHC-IgG2-C219S – S267E,L328F	338
2	IgG2.3G1	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f	269
	IgG2.3G1-AY-V20	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – P238D	339
	IgG2.3G1-AY-V21	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – P238D,P271G	340
	IgG2.3G1-AY-V22	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – P238D,H268D,P271G	341
	IgG2.3G1-AY-V23	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – P238D,P271G,A330R	342
	IgG2.3G1-AY-V24	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – P238D,H268D,P271G,A330R	343
	IgG2.3G1-AY-V25	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – G237D,P238D,H268D,P271G,A330R	344
	IgG2.3G1-AY-V26	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – E233D,G237D,P238D,H268D,P271G,A330R	345
	IgG2.3G1-AY-V27	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – S267E	346
	IgG2.3G1-AY-V28	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – S267E,L328F	347

Эту стратегию конструирования дополнительно изучали путем конструирования других антител в формате IgG2.3G1-AY, IgG2.3G1-AY-S267E (IgG2.3G1-AY-V27), а также вариантов в B-форме IgG2 (IgG2.5G1-AY и IgG2.5G1-AY-V27) и других гибридных антител, содержащих разные комбинации константных доменов IgG1 и IgG2 и исследования связывания этих антител с his-мечеными FcgR, захваченными на Fab к his, с использованием технологии SPR Biacore. В соответствии с данными Octet для супернатанта данные SPR показывали, что антитела IgG2.3G1-AY и IgG2.3G1-AY-V27 характеризовались свойствами связывания с FcgR, сравнимыми с IgG1f и IgG1f-S267E соответственно, несмотря на содержание CH1 и шарнирного участка у антитела IgG2 в A-форме (IgG2.3) (табл. 34). Подобные данные так-

же получали при использовании антител IgG2.5G1-AY и IgG2.5G1-AY-V27, они демонстрировали успешное конструирование антител IgG2 в B-форме (содержащих мутацию C131S, называемых IgG2.5), имеющих эффекторные функции, подобные IgG1f или модифицированному IgG1f. Данные для нескольких других антител с константными участками IgG2.3G1-AY, IgG2.3G1-AY-V27, IgG2.5G1-AY или IgG2.5G1-AY-V27, но отличающимися вариабельными участками показывали, что эта стратегия конструирования является широко применимой к другим антителам независимо от вариабельных доменов (табл. 34). Другие конструкты, которые демонстрируют свойства связывания с FcgR, подобные IgG1f, включают в себя IgG1-G2.3G1-AY и IgGldeltaTHT, тогда как несколько из конструктов с модифицированными константными участками были неспособны сохранять свойства связывания с FcgR, подобные IgG1f, в том числе конструкты IgG2.3G1-KH, IgG2.5G1-KH, IgG2.3plusTHT, IgG2.5plusTHT и IgG2.3plusGGG (табл. 34).

Таблица 34

Значения %Rmax для связывания антитела в концентрации 1 мкМ с FcgR-his белками, захваченными на Fab к his

mAb	hCD64	hCD32a-H131	hCD32a-R131	hCD32b	hCD16a-V158	hCD16B-NA2
mAb8-IgG1f	80%	82%	51%	27%	51%	21%
mAb9-IgG1f	70%	33%	19%	4%	28%	10%
CD73.4-IgG1f	65%	46%	26%	6%	43%	17%
CD73.4-IgG1.1f	2%	0%	2%	1%	0%	0%
mAb11-IgG2.3	2%	44%	17%	5%	1%	0%
CD73.4-IgG2.3	3%	48%	11%	1%	1%	0%
mAb6-IgG2.3	3%	66%	14%	3%	1%	0%
mAb4-IgG2.3	1%	39%	6%	1%	1%	0%
mAb5-IgG2.3	6%	100%	30%	4%	3%	0%
mAb12-IgG2.3	2%	39%	7%	1%	1%	0%
mAb13-IgG2.3	2%	40%	7%	1%	1%	0%
mAb11-IgG2.5	0%	40%	13%	3%	0%	-1%
mAb7-IgG2.5	4%	72%	19%	2%	2%	0%
mAb8-IgG2.5	3%	59%	14%	3%	2%	0%
mAb10-IgG2.5	1%	29%	5%	1%	1%	0%
CD73.4-IgG2.5	3%	40%	7%	1%	1%	0%
mAb6-IgG2.5	3%	75%	17%	4%	2%	0%

mAb4-IgG2.5	2%	46%	8%	1%	1%	0%
mAb5-IgG2.5	6%	89%	26%	5%	4%	1%
mAb12-IgG2.5	1%	36%	6%	1%	1%	0%
mAb13-IgG2.5	-2%	39%	4%	-2%	0%	-2%
mAb8-IgG2.3G1-AY	77%	61%	38%	10%	38%	13%
mAb10-IgG2.3G1-AY	67%	23%	14%	4%	24%	8%
CD73.4-IgG2.3G1-AY	65%	38%	20%	5%	38%	14%
mAb7-IgG2.5G1-AY	80%	73%	45%	12%	47%	19%
mAb8-IgG2.5G1-AY	77%	70%	45%	17%	48%	22%
CD73.4-IgG2.5G1-AY	65%	43%	24%	7%	40%	16%
CD73.4-IgG2.3G1-KH	2%	15%	2%	0%	2%	0%
CD73.4-IgG2.5G1-KH	2%	17%	2%	0%	3%	0%
CD73.4-IgG2.3G1.1f-KH	1%	10%	1%	0%	1%	0%
CD73.4-IgG2.5G1.1f-KH	1%	6%	1%	0%	1%	0%
mAb7-IgG2.3G1-AY-V27	84%	68%	92%	76%	26%	7%
mAb8-IgG2.3G1-AY-V27	78%	67%	80%	67%	24%	7%
mAb10-IgG2.3G1-AY-V27	69%	24%	57%	40%	12%	3%
mAb7-IgG2.5G1-AY-V27	81%	74%	89%	84%	32%	9%
mAb8-IgG2.5G1-AY-V27	77%	76%	79%	77%	33%	10%
CD73.4-IgG1-G2.3G1-AY	66%	50%	31%	10%	48%	23%
CD73.4-IgG1-G2.3G1-KH	2%	18%	2%	0%	4%	1%
CD73.4-IgG1deltaTHT	65%	43%	23%	6%	42%	17%
CD73.4-IgG2.3plusTHT	3%	42%	8%	1%	1%	0%
CD73.4-IgG2.5plusTHT	2%	34%	7%	1%	1%	0%
CD73.4-IgG2.3plusGGG	3%	43%	8%	1%	1%	0%

В своей совокупности эти данные показывают, что последовательность в IgG1, находящаяся непосредственно со стороны С-конца от консервативного мотива CPPCPAP (SEQ ID NO: 38) в шарнирном участке, придает опосредованную FcgR эффекторную функцию, тогда как CH1 и верхние части шарнира антитела могут быть заменены на последовательности IgG2 или модифицированного IgG2, чтобы потенциально объединить эффекторные функции IgG1 и модифицированного IgG1 с лучшими свойствами интернализации или передачи сигнала у антител, содержащих CH1 и/или шарнирного участков IgG2.

Эквиваленты.

Специалист в данной области техники поймет или будет способен определить многие эквиваленты описанных в данном документе конкретных вариантов осуществления с использованием не более чем стандартного экспериментирования. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются следующими пунктами формулы изобретения.

Краткое изложение перечня последовательностей

Таблица 35

SEQ ID	Описание	Последовательность
1	Изоформа 1 человеческого CD73	MCPRAARAPA TLLLALGAVL WPAAGAWELT ILHTNDVHSR LEQTSEDSSK CVNASRCMGG VARLFTKVQQ IRRAEPNVLL LDAGDQYQGT IWFTVYKGAE VAHFMNALRY DAMALGNHEFDNGVEGLIEP LLKEAKFPIL SANIKAKGPL ASQISGLYLP YKVLPVGDEV VGIVGYTSKE TPFLSNPGTN LVFEDEITAL QPEVDKLKTL NVNKIIALGH SGFEMDKLIA QKVRGVDVVV GGHSNTFLYT GNPPSKEVPA GKYPFIVTSD DGRKVPVVQA YAFGKYLGYL KIEFDERGNV ISSHGNPILL NSSIPEDPSI KADINKWRIK LDNYSTQELG KTIVYLDGSS QSCRFRECNM GNLICDAMIN NNLRHTDEMF WNHVSMCILN GGGIRSPIDE RNNGTITWEN LAAVLPFGGT FDLVQLKGST LKKAFEHSVH RYGQSTGEFL QVGGIHVVYD LSRKPGDRVV KLDVLCTKCRVPSYDPLKMD EVYKVILPNF LANGGDGFQM IKDELLRHDS GDQDINVVST YISKMKVIYP AVEGRIKFST GSHCHGSFSL IFLSLWAVIF VLYQ
2	Изоформа 2 человеческого CD73	MCPRAARAPA TLLLALGAVL WPAAGAWELT ILHTNDVHSR LEQTSEDSSK CVNASRCMGGVARLFTKVQQ IRRAEPNVLL LDAGDQYQGT IWFTVYKGAE VAHFMNALRY DAMALGNHEFDNGVEGLIEP LLKEAKFPIL SANIKAKGPL ASQISGLYLP YKVLPVGDEV VGIVGYTSKETPFLSNPGTN LVFEDEITAL QPEVDKLKTL NVNKIIALGH SGFEMDKLIA QKVRGVDVVVGGHSNTFLYT GNPPSKEVPA GKYPFIVTSD DGRKVPVVQA YAFGKYLGYL KIEFDERGNVISSHGNPILL NSSIPEDPSI KADINKWRIK LDNYSTQELG KTIVYLDGSS QSCRFRECNMGNLICDAMIN NNLRHTDEMF WNHVSMCILN GGGIRSPIDE RNNGIHVVYD LSRKPGDRVVKLDVLCTKCR VPSYDPLKMD EVYKVILPNF LANGGDGFQM IKDELLRHDS GDQDINVVSTYISKMKVIYP AVEGRIKFST GSHCHGSFSL IFLSLWAVIF VLYQ

3	CD73 яванского макака	MCPRAARAPA TLLLAVGALL WSAAGAWELT ILHTNDVHSR LEQTSEDSSK CVNASRCMGGVARLFTKVQQ IRRAEPNVLL LDAGDQYQGT IWFTVYKGAE VAHFMNALRY DAMALGNHEFDNGVEGLIEP LLKEAKFPIL SANIKAKGPL ASQISGLYLP YKVLPVGDEV VGIVGYTSKETPFLSNPGTN LVFEDEITAL QPEVDKLKTL NVNKIIALGH SGFETDKLIA QKVRGVDVVVGGHSNTFLYT GNPPSKEVPA GKYPFIVTSD DGRKVPVVQA YAFGKYLGYL KIEFDERGNVISSHGNPILL NSSIPEDPSI KADINKWRIK LDNYSTQELG KTIVYLDGSS QSCRFRECNMGNLICDAMIN NNLRHADEMF WNHVSMCILN GGGIRSPIDE RNNGTITWEN LAAVLPFGGTFDLVQLKGST LKKAFEHSVH RYGQSTGEFL QVGGIHVVYD LSRKPGDRVV KLDVLCTKCRVPSYDPLKMD EIYKVILPNF LANGGDGFQM IKDELLRHDS GDQDINVVST YISKMKVIYPAVEGRIKFST GSHCHGSFSL IFLSFCAVIF VLYQ
4	VH 11F11	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCATSGFTFSNYGMH WVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSW YPDSFDIWGQGTMVTVSS
5	CDR1 VH 11F11	NYGMH
6	CDR2 VH 11F11	VILYDGSNKYYPDSVKG
7	CDR3 VH 11F11	GGSSWYPDSFDI
8	VK1 11F11	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGPGTDFT LTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWHLTFGGGTKVEIK
9	CDR1 VK1 11F11	RASQGVSSYLA
10	CDR2 VK1 11F11	DASNRAT
11	CDR3 VK1 11F11	QQRSNWHLT
12	VK2 11F11	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK
13	CDR1 VK2 11F11	RASQGISSWLA
14	CDR2 VK2 11F11	AASSLQS
15	CDR3 VK2 11F11	QQYNSYPLT
16	VH 4C3	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSGISWKSGSIGYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCVKGYYVI LTGLDYWGQGTLVTVS S

17	CDR1 VH 4C3	DYAMH
18	CDR2 VH 4C3	GISWKSGSIGYADSVKG
19	CDR3 VH 4C3	GYYVILTGLDY
20	VK1 4C3	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFT LTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIK
21	CDR1 VK1 4C3	RASQSVSSYLAW
22	CDR2 VK1 4C3	ASSRATG
23	CDR3 VK1 4C3	QYGSSPLT
24	VK2 4C3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTFTCRASQGISSWLAW YQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGQGTKVEIK
25	CDR1 VK2 4C3	RASQGISSWLA
26	CDR2 VK2 4C3	AASSLQS
27	CDR3 VK2 4C3	QQYNSYPPT
28	VK3 4C3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTFTCRASQGISSWLAW YQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGQGTKVEIK
29	CDR1 VK3 4C3	RASQGISSWLA
30	CDR2 VK3 4C3	AASSLQS
31	CDR3 VK3 4C3	QQYNSYPPT
32	VH 4D4	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGM HWVRQAPGKGLEWVAVIWYDESNKYYADSVKGR FTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARGYNS RWYPDAFDIWGQGTMVT VSS
33	CDR1 VH 4D4	NYGMH
34	CDR2 VH 4D4	VIWYDESNKYYADSVKG
35	CDR3 VH 4D4	GYNSRWYPDAFDI
36	VK1 4D4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK
37	CDR1 VK1 4D4	RASQGISSWLA
38	CDR2 VK1 4D4	AASSLQS
39	CDR3 VK1 4D4	QQYNSYPLT
40	VH1 10D2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGLH WVRQAPGKGLEWVAVIRYDGSNKYYADSVKGRF TISRDNSKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARGGSSW YPDGLDVWGQGTTVTV SS
41	CDR1 VH1 10D2	NYGLH
42	CDR2 VH1 10D2	VIRYDGSNKYYADSVKG

43	CDR3 VH1 10D2	GGSSWYPDGLDV
44	VK1 10D2	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWY QQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPTFGGGTKVEIK
45	CDR1 VK1 10D2	RASQGISSALA
46	CDR2 VK1 10D2	DASSLES
47	CDR3 VK1 10D2	QQFNSYPT
48	VK2 10D2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK
49	CDR1 VK2 10D2	RASQGISSWLA
50	CDR2 VK2 10D2	AASSLQS
51	CDR3 VK2 10D2	QQYNSYPLT
52	VH 11A6	EVQLVESGGNLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSGISWNNNDIGYADSVKGRF IISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTALYYCVKGYYVI LTGLDYWGQGTPVTVS S
53	CDR1 VH 11A6	DYAMH
54	CDR2 VH 11A6	GISWNNNDIGYADSVKG
55	CDR3 VH 11A6	GYYVILTGLDY
56	VK1 11A6	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK
57	CDR1 VK1 11A6	RASQGISSWLA
58	CDR2 VK1 11A6	AASSLQS
59	CDR3 VK1 11A6	QQYNSYPLT
60	VH 24H2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGM HWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGGNKYYADSVKG RFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARGGS SWYPDAFDIWGQGTMVTV SS
61	CDR1 VH 24H2	NYGMH
62	CDR2 VH 24H2	VIWYDGGNKYYADSVKG
63	CDR3 VH 24H2	GGSSWYPDAFDI
64	VK1 24H2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK
65	CDR1 VK1 24H2	RASQGISSWLA
66	CDR2 VK1 24H2	AASSLQS
67	CDR3 VK1 24H2	QQYNSYPLT

68	VH 5F8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMH WVRQAPGKGLVWVSRIISDGSSTGYADSVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREFSSGW YFDYWGQGTLVTVSS
69	CDR1 VH 5F8	SYWMH
70	CDR2 VH 5F8	RIISDGSSTGYADSVKG
71	CDR3 VH 5F8	EFSSGWYFDY
72	VK1 5F8	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWY QQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQFSSYPRTFGQGTKVEIK
73	CDR1 VK1 5F8	RASQGISSALA
74	CDR2 VK1 5F8	DASSLES
75	CDR3 VK1 5F8	QQFSSYPRT
76	VK2 5F8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTGFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPRTFGQGTKVEIK
77	CDR1 VK2 5F8	RASQGISSWLA
78	CDR2 VK2 5F8	AASSLQS
79	CDR3 VK2 5F8	QQYNSYPRT
80	VH 6E11	EVQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSGITWNSGGIGYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDRYY SSWLLFDNWGQGILVTV SS
81	CDR1 VH 6E11	DYAMH
82	CDR2 VH 6E11	GITWNSGGIGYADSVKG
83	CDR3 VH 6E11	DRYYSSWLLFDN
84	VK1 6E11	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSFTFGPGTKVDIK
85	CDR1 VK1 6E11	RASQSVSSSYLA
86	CDR2 VK1 6E11	GASSRAT
87	CDR3 VK1 6E11	QHYGSSFT
88	VH 7A11	EVQLVESGGGLVQTGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSDISWNSDIIGYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIYGS GSSFFDYWGQGILVTV SS
89	CDR1 VH 7A11	DYAMH
90	CDR2 VH 7A11	DISWNSDIIGYADSVKG
91	CDR3 VH 7A11	DIYGSGSSFFDY
92	VK1 7A11	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQYISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYHSYPPTFGQGTRLEIK

93	CDR1 VK1 7A11	RASQYISSWLA
94	CDR2 VK1 7A11	AASSLQS
95	CDR3 VK1 7A11	QQYHSYPPT
96	Эпитоп №1 11F11	FTKVQQIRRAEPNVLLLDA
97	Эпитоп №2 11F11	LYLPYKVLPVGDEVVG
98	CH1 IgG1 дикого типа	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
99	His-меченый CD73	MCPRAARAPATLLLALGAVLWPAAGAWELTILHT NDVHSRLEQTSEDSSKCVNASRCMGGVARLFTKV QQIRRAEPNVLLLDAGDQYQGTIWFTVYKGAEVA HFMNALRYDAMALGNHEFDNGVEGLIEPLLKEAK FPILSANIKAKGPLASQISGLYLPYKVLPVGDEVVGI VGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEITALQPEVDKLKT LNVNKIIALGHSGFEMDKLIAQKVRGVDVVVGGHS NTFLYTGNPPSKEVPAGKYPFIVTSDDGRKVPVVQ AYAFGKYLGYLKIEFDERGNVISSHGNPILLNSSIPE DPSIKADINKWRIKLDNYSTQELGKTIVYLDGSSQS CRFRECNMGNLICDAMINNNLRHADETFWNHVSM CILNGGGIRSPIDERNNGTITWENLAAVLPFGGTFD LVQLKGSTLKKAFEHSVHRYGQSTGEFLQVGGIHV VYDLSRKPGDRVVKLDVLCTKCRVPSYDPLKMDE VYKVILPNFLANGGDGFQMIKDELLRHDSGDQDIN VVSTYISKMKVIYPAVEGRIKHHHHHH
100	11F11 (полноразмерная тяжелая цепь)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCATSGFTFSNYGMH WVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSW YPDSFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHK PSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
101	11F11 (полноразмерная легкая цепь 1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGPGTDFT LTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWHLTFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
102	11F11 (полноразмерная легкая цепь 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

103	4C3 (полноразмерная тяжелая цепь)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSGISWKSGSIGYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCVKGYYVI LTGLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
104	4C3 (полноразмерная легкая цепь 1)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFT LTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
105	4C3 (полноразмерная легкая цепь 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTFTCRASQGISSWLAW YQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
106	4C3 (полноразмерная легкая цепь 3)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTFTCRASQGISSWLAW YQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGQGTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
107	4D4 (полноразмерная тяжелая цепь)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGM HWVRQAPGKGLEWVAVIWYDESNKYYADSVKGR FTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARGYNS RWYPDAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
108	4D4 (полноразмерная легкая цепь 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

109	10D2 (полноразмерная тяжелая цепь)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGLH WVRQAPGKGLEWVAVIRYDGSNKYYADSVKGRF TISRDNSKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARGGSSW YPDGLDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
110	10D2 (полноразмерная легкая цепь 1)	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWY QQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPTFGGGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
111	10D2 (полноразмерная легкая цепь 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
112	11A6 (полноразмерная тяжелая цепь)	EVQLVESGGNLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSGISWNNNDIGYADSVKGRF IISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTALYYCVKGYYVI LTGLDYWGQGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
113	11A6 (полноразмерная легкая цепь 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

114	24H2 (полноразмерная тяжелая цепь)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGM HWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGGNKYYADSVKG RFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARGGS SWYPDAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
115	24H2 (полноразмерная легкая цепь 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
116	5F8 (полноразмерная тяжелая цепь)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMH WVRQAPGKGLVWVSRIISDGSSTGYADSVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREFSSGW YFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
117	5F8 (полноразмерная легкая цепь 1)	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWY QQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQFSSYPRTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
118	5F8 (полноразмерная легкая цепь 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTGFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPRTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

119	6E11 (полноразмерная тяжелая цепь)	EVQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSGITWNSGGIGYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDRYY SSWLLFDNWGQGILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
120	6E11 (полноразмерная легкая цепь 1)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSFTFGPGTKVDIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
121	7A11 (полноразмерная тяжелая цепь)	EVQLVESGGGLVQTGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSDISWNSDIIGYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIYGS GSSFFDYWGQGILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
122	7A11 (полноразмерная легкая цепь 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQYISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYHSYPPTFGQGTRLEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
123	Шарнир с C219S	ERKSCVECPPCPAPPVAG
124	CH1 IgG2 (дикого типа)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV
125	CH2 IgG1 + A330S и P331S	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAK

126	Константный участок человеческого IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
127	Константный участок человеческого IgG1 (аллотипический вариант)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
128	CH3 IgG1 + E356 и M358	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
129	Константный участок IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
130	Константный участок IgG2	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVER KCCVECP PCPAPPVAG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVVSVLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
131	Легкая каппа-цепь (CL) человеческого IgG1	RTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
132	С-конец тяжелой цепи	LSPGK

133	CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f, аминокислотная последовательность	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGM HWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSS WYPDSFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
134	CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f, нуклеотидная последовательность	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtcc ctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactg ggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatattgtatga tggaagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccaga gacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgagga cacggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctggtaccctgattcttttg atatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggcc catcggtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagcg gccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtgg aactcaggcgctctgaccagcggcgtgcacaccttcccagctgtcctacagtcct caggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaacttcggca cccagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggac aagacagttgagcgcaaatcctgtgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacct gtggcaggaccgtcagtcttcctcttcccccccaaaacccaaggacaccctcatg atctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaaga ccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaa gacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtc ctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggt ctccaacaaagccctcccaagcagcatcgagaaaaccatctccaaagccaaag ggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagat gaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcga catcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagacc acgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaagctcaccgt ggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatg aggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgggtaaa
135	VH CD73.4 (а.к.)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGM HWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSS WYPDSFDIWGQGTMVTVSS
136	Шарнир IgG2 дикого типа	ERKCCVECPPCPAPPVAG
137	CH2 IgG1 дикого типа	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
138	CH3 IgG1 дикого типа	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK

139	VH 11F11 - нуклеотидная последовательность	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAACGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCT GGAGTGGGTGGCAGTTATATTGTATGATGGAAGT AATAAATACTATCCAGACTCCGTGAAGGGCCGA TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGC TGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG ACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGCA GCAGCTGGTACCCTGATTCTTTTGATATCTGGGG CCAAGGAACAATGGTCACCGTCTC TTCA
140	VK1 11F11 - нуклеотидная последовательность	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGT CTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG CAGGGCCAGTCAGGGTGTTAGCAGCTACTTAGCC TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG CTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTG GCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGCCTG GGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGA GCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAG CGTAGCAACTGGCATCTCACTTTCGGCGG AGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
141	VK2 11F11 - нуклеотидная последовательность	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCTCTCACTTTCGGCGG AGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
142	VH 4C3 - нуклеотидная последовательность	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTG GTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATGCCAT GCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCT GGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAAGAGTGG TAGCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCC CTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAG GACACGGCCTTGTATTACTGTGTAAAAGGGTATT ACGTTATTTTGACTGGCCTTGACTACTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTC A
143	VK1 4C3 - нуклеотидная последовательность	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGT CTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG CAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCC TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTG GCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTG GGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGA GCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAG TATGGTAGCTCACCGCTCACTTTCGGCGGAGGGA CCAAGGTGGAGATCAAA

144	VK2 4C3 - нуклеотидная последовательность	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCTTCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCTCCAACGTTCGGCCA GGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
145	VK3 4C3 - нуклеотидная последовательность	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCTTCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCTCCAACGTTCGGCCA AGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
146	VH 4D4 - нуклеотидная последовательность	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCT GGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGAAAG TAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACGGCTGTGTATTATTGTGCGAGAGGGTATA ACAGCAGGTGGTACCCTGATGCTTTTGATATCTG GGGCCAAGGGACAATGGTCACCGT CTCTTCA
147	VK1 4D4 - нуклеотидная последовательность	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGA CCAAGGTGGAGATCAAA
148	VH1 10D2 - нуклеотидная последовательность	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGGCCT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCT GGAGTGGGTGGCAGTTATACGGTATGATGGAAG TAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAG GACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGGGGGGC AGCAGCTGGTACCCGGACGGTTTGGACGTCTGG GGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC CTCA

149	VK1 10D2 - нуклеотидная последовательность	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG CCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAG CTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAG TTTAATAGTTACCCCACTTTCGGCGGAGGGACCA AGGTGGAGATCAAA
150	VK2 10D2 - нуклеотидная последовательность	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGA CCAAGGTGGAGATCAAA
151	VH 11A6 - нуклеотидная последовательность	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGGGGAAACTTG GTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATGCCAT GCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCT GGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAATAAT GACATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGA TTCATCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCC TGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGACCTGAGG ACACGGCCTTGTATTATTGTGTAAAAGGTTATTA CGTTATTTTGACTGGTCTTGACTACTGGGGCCAG GGAACCCCGGTCACCGTCTCCTC A
152	VK1 11A6 - нуклеотидная последовательность	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGA CCAAGGTGGAGATCAAA
153	VH 24H2 - нуклеотидная последовательность	CAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCT GGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAGG TAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAA GACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGC AGCAGCTGGTACCCTGATGCTTTTGATATCTGGG GCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTC TTCA

154	VK1 24H2 - нуклеотидная последовательность	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGA CCAAGGTGGAGATCAAA
155	VH 5F8 - нуклеотидная последовательность	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTA GTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTACTGGAT GCACTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCT GGTGTGGGTCTCACGTATTATTAGTGATGGGAGT AGCACAGGTTACGCGGATTCCGTGAAGGGCCGA TTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACG CTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAG GACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGAGTTTA GCAGTGGCTGGTACTTTGACTACTGGGGCCAGGG AACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
156	VK1 5F8 - нуклеотидная последовательность	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG CCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAG CTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAG TTTAGTAGTTACCCTCGGACGTTCGGCCAAGGGA CCAAGGTGGAAATCAAA
157	VK2 5F8 - нуклеотидная последовательность	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGGTTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCTCGGACGTTCGGCCAAGGGA CCAAGGTGGAAATCAAA
158	VH 6E11 - нуклеотидная последовательность	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGCCTTG GTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATGCCAT GCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCT GGAGTGGGTCTCAGGTATTACTTGGAATAGTGGT GGCATAGGCTACGCGGACTCTGTGAAGGGCCGA TTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCC TGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGG ACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAAGATAGGTA TTACAGCAGTTGGCTCCTCTTTGACAACTGGGGC CAGGGAATTCTGGTCACCGTCTC CTCA

159	VK1 6E11 - нуклеотидная последовательность	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGT CTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG CAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTT AGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCC CAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCC ACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGG TCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGAC TGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCA GCATTATGGTAGCTCATTCACTTTCGGCCCTGGG ACCAAAGTGGATATCAAA
160	VH 7A11 - нуклеотидная последовательность	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTG GTACAGACTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATGCCAT GCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCT GGAGTGGGTCTCAGATATTAGTTGGAATAGTGAT ATTATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGAT TCACCATCTCTAGAGACAACGCCAAGAACTCCCT GTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGA CACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAAGATATTTAT GGTTCGGGGAGTTCTTTTTTTGACTACTGGGGCC AGGGAATCCTGGTCACCGTCTC CTCA
161	VK1 7A11 - нуклеотидная последовательность	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGTATATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATCATAGTTACCCTCCCACCTTCGGCCA AGGGACACGACTGGAGATTAAA
162	IgG1-IgG2-IgG1f2 (MHCCR)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERKCCVEC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
163	IgG1-IgG2CS-IgG1f2 (MHCCR)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERKSCVEC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK

164	IgG2-IgG1f2 (MHCCR)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVEC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
165	IgG2CS-IgG1f2 (MHCCR)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVEC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
166	IgG1-IgG2-IgG1.1f (MHCCR)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERKCCVEC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
167	IgG1-IgG2CS-IgG1.1f (MHCCR)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERKSCVEC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
168	IgG2-IgG1.1f (MHCCR)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVEC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK

169	IgG2CS-IgG1.1f (MHCCR)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVEC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
170	VH CD73.3 (а.к.)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAM HWVRQAPGKGLEWVSGISWKSGSIGYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTVLYYCVKGYYVI LTGLDYWGQGTLVTVSS
171	VH CD73.5 (а.к.)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCASSGFTFSNYGMH WVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSW YPDSFDIWGQGTMVTVSS
172	VH CD73.6 (а.к.)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGM HWVRQAPGKGLEWVAVILYDSSNKYYPDSVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSS WYPDSFDIWGQGTMVTVSS
173	VH CD73.7 (а.к.)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCASSGFTFSNYGMH WVRQAPGKGLEWVAVILYDSSNKYYPDSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSW YPDSFDIWGQGTMVTVSS
174	VH CD73.8 (а.к.)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGM HWVRQAPGKGLEWVAVIWYDSSNKYYPDSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSS WYPDSFDIWGQGTMVTVSS
175	VH CD73.9 (а.к.)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCASSGFTFSNYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWYDSSNKYYPDSVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSS WYPDSFDIWGQGTMVTVSS
176	VH CD73.10 (а.к.)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGM HWVRQAPGKGLEWVAVIWYDESNKYYPDSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSS WYPDSFDIWGQGTMVTVSS
177	VH CD73.11 (а.к.)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGM HWVRQAPGKGLEWVAVIWYDESNKYYADSVKGR FTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARGYNS RWYPDAFDIWGQGTMVTVSS
178	Гибридный шарнир IgG2/IgG1	ERKCCVECPPCPAPELLGG
179	Гибридный шарнир IgG2 C219S/IgG1	ERKSCVECPPCPAPELLGG

180	IgG1-IgG2-IgG1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERKCCVEC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
181	IgG1-IgG2CS-IgG1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERKSCVEC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
182	IgG2-IgG1f	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVEC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
183	IgG2CS-IgG1f	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVEC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
184	mAb-CD73.3-Vh-hHC-IgG1.1f	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSGISWKSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKGYYVILTGLDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAEGA PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG

185	mAb-CD73.3-Vh-hHC-IgG2-C219S	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWKSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKGY YVILTGLDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVER KSCVECPPCP APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC KVSNKGLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPG
186	mAb-CD73.3-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWKSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKGY YVILTGLDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVER KSCVECPPCP APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPSS IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPG
187	mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDGSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEAEG APSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
188	mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-C219S	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDGSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP

		SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
189	mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f (идентичный SEQ ID NO: 133, за исключением отсутствия С-концевого лизина)	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDGSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
190	mAb-CD73.5-Vh-hHC-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDGSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEAEG APSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
191	mAb-CD73.5-Vh-hHC-IgG2-C219S	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDGSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
192	mAb-CD73.5-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDGSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED

		TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
193	mAb-CD73.6-Vh-hHC-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDSSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNIIKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEAEG APSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
194	mAb-CD73.6-Vh-hHC-IgG2-C219S	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDSSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
195	mAb-CD73.6-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDSSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG

		NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
196	mAb-CD73.7-Vh-hHC-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDSSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEAEG APSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
197	mAb-CD73.7-Vh-hHC-IgG2-C219S	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDSSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
198	mAb-CD73.7-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDSSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
199	mAb-CD73.8-Vh-hHC-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDSSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEAEG APSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV

		SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
200	mAb-CD73.8-Vh-hHC-IgG2-C219S	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDSSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
201	mAb-CD73.8-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDSSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
202	mAb-CD73.9-Vh-hHC-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDSSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEAEG APSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
203	mAb-CD73.9-Vh-hHC-IgG2-C219S	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDSSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV

		KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
204	mAb-CD73.9-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDSSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
205	mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDESNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEAEG APSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
206	mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-C219S	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDESNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG

207	mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDESNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
208	mAb-CD73.11-Vh-hHC-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDESNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCARGY NSRWYPDAFD IWGQGTMVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKRV EPKSCDKTHT CPPCPAPEAE GAPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSPG
209	mAb-CD73.11-Vh-hHC-IgG2-C219S	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDESNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCARGY NSRWYPDAFD IWGQGTMVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKSCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG
210	mAb-CD73.11-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDESNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCARGY NSRWYPDAFD IWGQGTMVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKSCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP

		SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG
211	mAb-CD73.3-Vh-hHC-IgG1.1f	gaagtgcagctggtggagtctgggggaggcttggtacagcctggcaggtccct gagactctcctgtgcagcctctggattcacctttgatgattatgccatgcactgggt ccggcaagctccagggaagggcctggagtgggtctcaggtattagttggaaga gtggtagcataggctatgcggactctgtgaagggccgattcaccatctccagag acaacgccaagaactccctgtatctgcaaatgaacagtctgagagctgaggaca cggccttgtattactgtgccaaagggtattacgttattttgactggccttgactactg gggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcgtcgaccaagggcccctccg tgtttcctctggccccttccagcaagtccacctctggcggaacagccgctctggg ctgcctggtcaaggactacttccccgagcctgtgaccgtgtcctggaactctggc gccctgacatctggcgtgcacaccttccctgctgtgctgcagtctagcggcctgt actccctgtcctccgtcgtgacagtgccctccagctctctgggcacccagaccta catctgcaacgtgaaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagcgggtg gaacccaagtcctgcgacaagacccatacctgccctccctgccctgctcctgaa gctgaaggcgcccctagcgtgttcctgttccctccaaagcccaaggacaccctg atgatctcccggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccacgag gacccagaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgc caagaccaagcctagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccg tgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgcaag gtgtccaacaaggccctgcctagctccatcgaaaagaccatctccaaggctaag ggccagccccgcgagccccaggtgtacacactgcctccatcccgggaagaga tgaccaagaaccaggtgtccctgacttgcctcgtgaagggcttctacccctccga tatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaactacaagacca cccctcccgtgctggactccgacggctcattcttcctgtacagcaagctgacagt ggataagtcccggtggcagcaggggaacgtgttctcctgctccgtgatgcacga ggctctgcacaaccactacacacagaagtccctgtctctgtcccctggc
212	mAb-CD73.3-Vh-hHC-IgG2-C219S	gaagtgcagctggtggagtctgggggaggcttggtacagcctggcaggtccct gagactctcctgtgcagcctctggattcacctttgatgattatgccatgcactgggt ccggcaagctccagggaagggcctggagtgggtctcaggtattagttggaaga gtggtagcataggctatgcggactctgtgaagggccgattcaccatctccagag acaacgccaagaactccctgtatctgcaaatgaacagtctgagagctgaggaca cggccttgtattactgtgccaaagggtattacgttattttgactggccttgactactg gggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcgtcgaccaagggcccctctg tgtttcctctggccccttgctcccggtccacctctgagtctaccgctgctctgggct gcctggtcaaggactacttccccgagcctgtgaccgtgtcctggaactctggcg ctctgacctccggcgtgcacacctttccagccgtgctgcagtcctccggcctgta ctctctgtcctccgtcgtgaccgtgccctcctccaacttcggcacccagacctaca cctgtaacgtggaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagaccgtggaa cggaagtcctgcgtggaatgccctccttgccctgcacctcctgtggctggcccctt ccgtgttcctgttcccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccggaccc ccgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggaccccgaggtgcag ttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccag agaggaacagttcaactccaccttccgggtggtgtccgtgctgaccgtggtgca ccaggactggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaagggc ctgcctgcccccatcgaaaagaccatctccaagacaaagggccagccccgcg agcctcaggtgtacacactgcctcccagccgggaagagatgaccaagaacca ggtgtccctgacctgtctggtcaagggcttctacccctccgatatcgccgtggaat gggagtccaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccccccccatgct ggactccgacggctcattcttcctgtactccaagctgacagtggacaagtcccgg tggcagcagggcaacgtgttctcctgctctgtgatgcacgaggccctgcacaac cactacacccagaagtccctgtccctgagccccggcaa

213	mAb-CD73.3-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	gaagtgcagctggtggagtctgggggaggcttggtacagcctggcaggtccct gagactctcctgtgcagcctctggattcacctttgatgattatgccatgcactgggt ccggcaagctccagggaagggcctggagtgggtctcaggtattagttggaaga gtggtagcataggctatgcggactctgtgaagggccgattcaccatctccagag acaacgccaagaactccctgtatctgcaaatgaacagtctgagagctgaggaca cggccttgtattactgtgccaaagggtattacgttattttgactggccttgactactg gggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcgtcgaccaagggcccatcg gtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagcggccct gggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactc aggcgctctgaccagcggcgtgcacaccttcccagctgtcctacagtcctcagg actctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaacttcggcaccca gacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaag acagttgagcgcaaatcctgtgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacctgtg gcaggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatct cccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccct gaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagac aaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctc accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctc caacaaagccctcccaagcagcatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggg cagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatga ccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgaca tcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccac gcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaagctcaccgtgg acaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgggtaaa
214	mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccc tgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactgg gtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatattgtatgat ggaagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagag acaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggac acggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctggtaccctgattcttttga tatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggccc ctccgtgtttcctctggccccttccagcaagtccacctctggcggaacagccgct ctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagcctgtgaccgtgtcctggaact ctggcgccctgacatctggcgtgcacaccttccctgctgtgctgcagtctagcgg cctgtactccctgtcctccgtcgtgacagtgccctccagctctctgggcacccag acctacatctgcaacgtgaaccacaagcccctccaacaccaaggtggacaagcg ggtggaacccaagtcctgcgacaagacccatacctgccctccctgccctgctcc tgaagctgaaggcgcccctagcgtgttcctgttccctccaaagcccaaggacac cctgatgatctcccggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccac gaggacccagaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaa cgccaagaccaagcctagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgt ccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgc aaggtgtccaacaaggccctgcctagctccatcgaaaagaccatctccaaggct aagggccagccccgcgagccccaggtgtacacactgcctccatcccgggaag agatgaccaagaaccaggtgtccctgacttgcctcgtgaagggcttctacccctc cgatatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaactacaaga ccacccctcccgtgctggactccgacggctcattcttcctgtacagcaagctgac agtggataagtcccggtggcagcaggggaacgtgttctcctgctccgtgatgca cgaggctctgcacaaccactacacacagaagtccctgtctctgtcccctggc
215	mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-C219S	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccc tgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactgg gtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatattgtatgat ggaagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagag

		acaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggac acggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctggtaccctgattcttttga tatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggccc ctctgtgtttcctctggccccttgctcccggtccacctctgagtctaccgctgctctg ggctgcctggtcaaggactacttccccgagcctgtgaccgtgtcctggaactctg gcgctctgacctccggcgtgcacacctttccagccgtgctgcagtcctccggcct gtactctctgtcctccgtcgtgaccgtgccctcctccaacttcggcacccagacct acacctgtaacgtggaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagaccgtg gaacggaagtcctgcgtggaatgccctccttgccctgcacctcctgtggctggc ccttccgtgttcctgttccccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccgga cccccgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggaccccgaggtg cagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcc cagagaggaacagttcaactccaccttccgggtggtgtccgtgctgaccgtggt gcaccaggactggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaag ggcctgcctgccccccatcgaaaagaccatctccaagacaaagggccagcccc gcgagcctcaggtgtacacactgcctcccagccgggaagagatgaccaagaa ccaggtgtccctgacctgtctggtcaagggcttctacccctccgatatcgccgtg gaatgggagtccaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccccccca tgctggactccgacggctcattcttcctgtactccaagctgacagtggacaagtcc cggtggcagcagggcaacgtgttctcctgctctgtgatgcacgaggccctgcac aaccactacacccagaagtccctgtccctgagccccggcaaa
216	mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccc tgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactgg gtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatattgtatgat ggaagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagag acaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggac acggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctggtaccctgattcttttga tatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggccc atcggtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagcgg ccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtgga actcaggcgctctgaccagcggcgtgcacaccttcccagctgtcctacagtcctc aggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaacttcggcac ccagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggaca agacagttgagcgcaaatcctgtgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacctg tggcaggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgat ctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacc ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaga caaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcct caccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtct ccaacaaagccctcccaagcagcatcgagaaaaccatctccaaagccaaagg gcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatg accaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgac atcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagacca cgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaagctcaccgtg gacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatga ggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtcccccgggtaaa
217	mAb-CD73.5-Vh-hHC-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccc tgagactctcctgtgcaagctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactgg gtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatattgtatgat ggaagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagag acaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggac acggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctggtaccctgattcttttga tatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggccc ctccgtgtttcctctggccccttccagcaagtccacctctggcggaacagccgct

		ctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagcctgtgaccgtgtcctggaact ctggcgccctgacatctggcgtgcacaccttccctgctgtgctgcagtctagcgg cctgtactccctgtcctccgtcgtgacagtgccctccagctctctgggcacccag acctacatctgcaacgtgaaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagcg ggtggaacccaagtcctgcgacaagacccatacctgccctccctgccctgctcc tgaagctgaaggcgcccctagcgtgttcctgttccctccaaagcccaaggacac cctgatgatctcccggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccac gaggacccagaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaa cgccaagaccaagcctagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgt ccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgc aaggtgtccaacaaggccctgcctagctccatcgaaaagaccatctccaaggct aagggccagccccgcgagccccaggtgtacacactgcctccatcccgggaag agatgaccaagaaccaggtgtccctgacttgcctcgtgaagggcttctacccctc cgatatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaactacaaga ccacccctcccgtgctggactccgacggctcattcttcctgtacagcaagctgac agtggataagtcccggtggcagcaggggaacgtgttctcctgctccgtgatgca cgaggctctgcacaaccactacacacagaagtccctgtctctgtccccctggc
218	mAb-CD73.5-Vh-hHC-IgG2-C219S	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccc tgagactctcctgtgcaagctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactgg gtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatattgtatgat ggaagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagag acaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggac acggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctggtaccctgattcttttga tatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggccc ctctgtgtttcctctggccccttgctcccggtccacctctgagtctaccgctgctctg ggctgcctggtcaaggactacttccccgagcctgtgaccgtgtcctggaactctg gcgctctgacctccggcgtgcacacctttccagccgtgctgcagtcctccggcct gtactctctgtcctccgtcgtgaccgtgccctcctccaacttcggcacccagacct acacctgtaacgtggaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagaccgtg gaacggaagtcctgcgtggaatgccctccttgccctgcacctcctgtggctggc ccttccgtgttcctgttccccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccgga cccccgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggaccccgaggtg cagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcc cagagaggaacagttcaactccaccttccgggtggtgtccgtgctgaccgtggt gcaccaggactggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaag ggcctgcctgcccccatcgaaaagaccatctccaagacaaagggccagcccc gcgagcctcaggtgtacacactgcctcccagccgggaagagatgaccaagaa ccaggtgtccctgacctgtctggtcaagggcttctacccctccgatatcgccgtg gaatgggagtccaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccccccca tgctggactccgacggctcattcttcctgtactccaagctgacagtggacaagtcc cggtggcagcagggcaacgtgttctcctgctctgtgatgcacgaggccctgcac aaccactacacccagaagtccctgtccctgagccccggcaaa
219	mAb-CD73.5-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccc tgagactctcctgtgcaagctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactgg gtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatattgtatgat ggaagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagag acaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggac acggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctggtaccctgattcttttga tatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggccc atcggtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagcgg ccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtgga actcaggcgctctgaccagcggcgtgcacaccttcccagctgtcctacagtcctc aggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaacttcggcac ccagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggaca

		agacagttgagcgcaaatcctgtgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacctg tggcaggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgat ctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacc ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaga caaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcct caccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtct ccaacaaagccctcccaagcagcatcgagaaaaccatctccaaagccaaagg gcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatg accaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgac atcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagacca cgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaagctcaccgtg gacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatga ggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgggtaaa
220	mAb-CD73.6-Vh-hHC-IgG1.1f	ggcatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcag ttatattgtatgattccagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattca ccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctga gagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctggtac cctgattcttttgatatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcg accaagggcccctccgtgtttcctctggcccctttccagcaagtccacctctggcg gaacagccgctctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagcctgtgaccg tgtcctggaactctggcgccctgacatctggcgtgcacaccttccctgctgtgctg cagtctagcggcctgtactccctgtcctccgtcgtgacagtgccctccagctctct gggcacccagacctacatctgcaacgtgaaccacaagccctccaacaccaagg tggacaagcgggtggaacccaagtcctgcgacaagacccataacctgccctccc tgccctgctcctgaagctgaaggcgcccctagcgtgttcctgttccctccaaagc ccaaggacaccctgatgatctcccggacccctgaagtgacctgcgtggtggtgg atgtgtcccacgaggacccagaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtgg aagtgcacaacgccaagaccaagcctagagaggaacagtacaactccacctac cgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaaga gtacaagtgcaaggtgtccaacaaggccctgcctagctccatcgaaaagaccat ctccaaggctaagggccagccccgcgagccccaggtgtacacactgcctccat cccgggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacttgcctcgtgaagggc ttctacccctccgatatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaac aactacaagaccacccctcccgtgctggactccgacggctcattcttcctgtaca gcaagctgacagtggataagtcccggtggcagcaggggaacgtgttctcctgct ccgtgatgcacgaggctctgcacaaccactacacacagaagtccctgtctctgtc ccctggc
221	mAb-CD73.6-Vh-hHC-IgG2-C219S	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccct gagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactggg tccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatattgtatgattc cagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagac aattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacac ggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctggtaccctgattcttttgata tctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggcccct ctgtgtttcctctggccccttgctcccggtccacctctgagtctaccgctgctctgg gctgcctggtcaaggactacttccccgagcctgtgaccgtgtcctggaactctgg cgctctgacctccggcgtgcacacctttccagccgtgctgcagtcctccggcctg tactctctgtcctccgtcgtgaccgtgccctcctccaacttcggcacccagaccta cacctgtaacgtggaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagaccgtgg aacggaagtcctgcgtggaatgccctccttgccctgcacctcctgtggctggccc ttccgtgttcctgttccccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccggacc cccgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggacccccgaggtgca gttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagccca gagaggaacagttcaactccacctccgggtggtgtccgtgctgaccgtggtgc accaggactggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaaggg cctgcctgcccccatcgaaaagaccatctccaagacaaagggccagccccgc

		gagcctcaggtgtacacactgcctcccagccgggaagagatgaccaagaacc aggtgtccctgacctgtctggtcaagggcttctacccctccgatatcgccgtgga atgggagtccaacggccagcccgagaacaactacaagaccaccccccccatg ctggactccgacggctcattcttcctgtactccaagctgacagtggacaagtccc ggtggcagcagggcaacgtgttctcctgctctgtgatgcacgaggccctgcaca accactacacccagaagtccctgtccctgagccccggcaaa
222	mAb-CD73.6-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccct gagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactggg tccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatattgtatgattc cagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagac aattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacac ggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctggtaccctgattcttttgata tctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggcccat cggtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagcggcc ctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaac tcaggcgctctgaccagcggcgtgcacaccttcccagctgtcctacagtcctca ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaacttcggcacc cagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaa gacagttgagcgcaaatcctgtgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacctgt ggcaggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatc tcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccc tgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagac aaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctc accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctc caacaaagccctcccaagcagcatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggg cagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatga ccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgaca tcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccac gcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaagctcaccgtgg acaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgggtaaa
223	mAb-CD73.7-Vh-hHC-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccct gagactctcctgtgcaagctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactggg tccgccaggctccaggcaagggctggagtgggtggcagttatattgtatgattc cagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagac aattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacac ggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctggtaccctgattcttttgata tctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggcccct ccgtgtttcctctggccccttccagcaagtccacctctggcggaacagccgctct gggctgcctggtcaaggactacttccccgagcctgtgaccgtgtcctggaactct ggcgccctgacatctggcgtgcacaccttccctgctgtgctgcagtctagcggc ctgtactccctgtcctccgtcgtgacagtgccctccagctctctgggcacccaga cctacatctgcaacgtgaaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagcgg gtggaacccaagtcctgcgacaagacccatacctgccctccctgccctgctcct gaagctgaaggcgcccctagcgtgttcctgttccctccaaagcccaaggacacc ctgatgatctcccggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccacg aggacccagaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaac gccaagaccaagcctagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtc cgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgca aggtgtccaacaaggccctgcctagctccatcgaaaagaccatctccaaggcta agggccagccccgcgagccccaggtgtacacactgcctccatcccgggaaga gatgaccaagaaccaggtgtccctgacttgcctcgtgaagggcttctacccctcc gatatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaactacaagac cacccctcccgtgctggactccgacggctcattcttcctgtacagcaagctgaca

		gtggataagtcccggtggcagcaggggaacgtgttctcctgctccgtgatgcac gaggctctgcacaaccactacacacagaagtccctgtctctgtcccctggc
224	mAb-CD73.7-Vh-hHC-IgG2-C219S	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccct gagactctcctgtgcaagctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactggg tccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatattgtatgattc cagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagac aattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacac ggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctggtaccctgattcttttgata tctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggcccct ctgtgtttcctctggccccttgctcccggtccacctctgagtctaccgctgctctgg gctgcctggtcaaggactacttccccgagcctgtgaccgtgtcctggaactctgg cgctctgacctccggcgtgcacacctttccagccgtgctgcagtcctccggcctg tactctctgtcctccgtcgtgaccgtgccctcctccaacttcggcacccagaccta cacctgtaacgtggaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagaccgtgg aacggaagtcctgcgtggaatgccctccttgccctgcacctcctgtggctggccc ttccgtgttcctgttccccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccggacc cccgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggaccccgaggtgca gttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagccca gagaggaacagttcaactccaccttccgggtggtgtccgtgctgaccgtggtgc accaggactggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaaggg cctgcctgcccccatcgaaaagaccatctccaagacaaagggccagccccgc gagcctcaggtgtacacactgcctcccagccgggaagagatgaccaagaacc aggtgtccctgacctgtctggtcaagggcttctacccctccgatatcgccgtgga atgggagtccaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccccccccatg ctggactccgacggctcattcttcctgtactccaagctgacagtggacaagtccc ggtggcagcagggcaacgtgttctcctgctctgtgatgcacgaggccctgcaca accactacacccagaagtccctgtccctgagccccggcaaa
225	mAb-CD73.7-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccct gagactctcctgtgcaagctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactggg tccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatattgtatgattc cagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagac aattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacac ggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctggtaccctgattcttttgata tctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggcccat cggtcttcccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagcggcc ctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaac tcaggcgctctgaccagcggcgtgcacaccttcccagctgtcctacagtcctca ggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaacttcggcacc cagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaa gacagttgagcgcaaatcctgtgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacctgt ggcaggaccgtcagtcttcctcttcccccccaaaacccaaggacaccctcatgatc tcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccc tgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagac aaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctc accgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctc caacaaagccctcccaagcagcatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggg cagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatga ccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgaca tcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccac gcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaagctcaccgtgg acaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgag gctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgggtaaa

226	mAb-CD73.8-Vh-hHC-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccct gagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactggg tccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatggtatgatt ccagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagaga caattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggaca cggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctggtaccctgattcttttgat atctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggccc ctccgtgtttcctctggccccttccagcaagtccacctctggcggaacagccgct ctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagcctgtgaccgtgtcctggaact ctggcgccctgacatctggcgtgcacaccttccctgctgtgctgcagtctagcgg cctgtactccctgtcctccgtcgtgacagtgccctccagctctctgggcacccag acctacatctgcaacgtgaaccacaagcccctccaacaccaaggtggacaagcg ggtggaacccaagtcctgcgacaagacccatacctgcccctccctgccctgctcc tgaagctgaaggcgcccctagcgtgttcctgttccctccaaagcccaaggacac cctgatgatctcccggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccac gaggacccagaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaa cgccaagaccaagcctagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgt ccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgc aaggtgtccaacaaggccctgcctagctccatcgaaaagaccatctccaaggct aagggccagccccgcgagccccaggtgtacacactgcctccatcccgggaag agatgaccaagaaccaggtgtccctgacttgcctcgtgaagggcttctacccctc cgatatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaactacaaga ccacccctcccgtgctggactccgacggctcattcttcctgtacaccaagctgac agtggataagtcccggtggcagcaggggaacgtgttctcctgctccgtgatgca cgaggctctgcacaaccactacacacagaagtccctgtctctgtcccctggc
227	mAb-CD73.8-Vh-hHC-IgG2-C219S	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccct gagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactggg tccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatggtatgatt ccagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagaga caattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggaca cggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctggtaccctgattcttttgat atctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggccc ctctgtgtttcctctggccccttgctcccggtccacctctgagtctaccgctgctctg ggctgcctggtcaaggactacttccccgagcctgtgaccgtgtcctggaactctg gcgctctgacctccggcgtgcacacctttccagccgtgctgcagtcctccggcct gtactctgtcctccgtcgtgaccgtgccctcctcaacttcggcacccagacct acacctgtaacgtggaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagaccgtg gaacggaagtcctgcgtggaatgccctccttgccctgcacctcctgtggctggc ccttccgtgttcctgttccccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccgga cccccgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggaccccgaggtg cagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcc cagagaggaacagttcaactccaccttccgggtggtgtccgtgctgaccgtggt gcaccaggactggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaag ggcctgcctgcccccatcgaaaagaccatctccaagacaaagggccagcccc gcgagcctcaggtgtacacactgcctcccagccgggaagagatgaccaagaa ccaggtgtccctgacctgtctggtcaagggcttctacccctccgatatcgccgtg gaatgggagtccaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccccccca tgctggactccgacggctcattcttcctgtactccaagctgacagtggacaagtcc cggtggcagcagggcaacgtgttctcctgctctgtgatgcacgaggccctgcac aaccactacacccagaagtccctgtccctgagccccggcaaa
228	mAb-CD73.8-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccct gagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactggg tccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatggtatgatt ccagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagaga caattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggaca

		cggctgtgtattactgtgcgagaggggcagcagctggtaccctgattcttttgat atctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggccc atcggtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagcgg ccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtgga actcaggcgctctgaccagcggcgtgcacaccttcccagctgtcctacagtcctc aggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaacttcggcac ccagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggaca agacagttgagcgcaaatcctgtgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacctg tggcaggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgat ctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacc ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaga caaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcct caccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtct ccaacaaagccctcccaagcagcatcgagaaaaccatctccaaagccaaagg gcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatg accaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgac atcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagacca cgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaagctcaccgtg gacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatga ggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgggtaaa
229	mAb-CD73.9-Vh-hHC-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccct gagactctcctgtgcaagctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactggg tccgccaggctccaggcaagggctggagtgggtggcagttatatggtatgatt ccagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagaga caattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggaca cggctgtgtattactgtgcgagaggggcagcagctggtaccctgattcttttgat atctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggccc ctccgtgtttcctctggccccttccagcaagtccacctctggcggaacagccgct ctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagcctgtgaccgtgtcctggaact ctggcgccctgacatctggcgtgcacaccttccctgctgtgctgcagtctagcgg cctgtactccctgtcctccgtcgtgacagtgccctccagctctctgggcacccag acctacatctgcaacgtgaaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagcg ggtggaacccaagtcctgcgacaagacccatacctgccctccctgccctgctcc tgaagctgaaggcgcccctagcgtgttcctgttccctccaaagcccaaggacac cctgatgatctcccggaccccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccac gaggacccagaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaa cgccaagaccaagcctagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgt ccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgc aaggtgtccaacaaggccctgcctagctccatcgaaaagaccatctccaaggct aagggccagccccgcgagccccaggtgtacacactgcctccatcccgggaag agatgaccaagaaccaggtgtccctgacttgcctcgtgaagggcttctacccctc cgatatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaactacaaga ccaccccctcccgtgctggactccgacggctcattcttcctgtacagcaagctgac agtggataagtcccggtggcagcaggggaacgtgttctcctgctccgtgatgca cgaggctctgcacaaccactacacacagaagtccctgtctctgtcccctggc
230	mAb-CD73.9-Vh-hHC-IgG2-C219S	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccct gagactctcctgtgcaagctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactggg tccgccaggctccaggcaagggctggagtgggtggcagttatatggtatgatt ccagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagaga caattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggaca cggctgtgtattactgtgcgagaggggcagcagctggtaccctgattcttttgat atctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggccc ctctgtgtttcctctggccccttgctcccggtccacctctgagtctaccgctgctctg ggctgcctggtcaaggactacttccccgagcctgtgaccgtgtcctggaactctg

		gcgctctgacctccggcgtgcacacctttccagccgtgctgcagtcctccggcct gtactctctgtcctccgtcgtgaccgtgccctcctccaacttcggcacccagacct acacctgtaacgtggaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagaccgtg gaacggaagtcctgcgtggaatgccctccttgccctgcacctcctgtggctggc ccttccgtgttcctgttccccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccgga cccccgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggaccccgaggtg cagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcc cagagaggaacagttcaactccaccttccgggtggtgtccgtgctgaccgtggt gcaccaggactggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaag ggcctgcctgcccccatcgaaaagaccatctccaagacaaagggccagcccc gcgagcctcaggtgtacacactgcctcccagccgggaagagatgaccaagaa ccaggtgtccctgacctgtctggtcaagggcttctacccctccgatatcgccgtg gaatgggagtccaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccccccca tgctggactccgacggctcattcttcctgtactccaagctgacagtggacaagtcc cggtggcagcagggcaacgtgttctcctgctctgtgatgcacgaggccctgcac aaccactacacccagaagtccctgtccctgagccccggcaaa
231	mAb-CD73.9-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccct gagactctcctgtgcaagctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactggg tccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatggtatgatt ccagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagaga caattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggaca cggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctggtaccctgattcttttgat atctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggccc atcggtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagcgg ccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtgga actcaggcgctctgaccagcggcgtgcacaccttcccagctgtcctacagtcctc aggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaacttcggcac ccagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggaca agacagttgagcgcaaatcctgtgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacctg tggcaggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgat ctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacc ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaga caaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcct caccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtct ccaacaaagccctcccaagcagcatcgagaaaaccatctccaaagccaaagg gcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatg accaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgac atcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagacca cgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaagctcaccgtg gacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatga ggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgggtaaa
232	mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccct gagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactggg tccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatggtatgatg agagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagaga caattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggaca cggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctggtaccctgattcttttgat atctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggccc ctccgtgtttcctctggccccttccagcaagtccacctctggcggaacagccgct ctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagcctgtgaccgtgtcctggaact ctggcgccctgacatctggcgtgcacaccttccctgctgtgctgcagtctagcgg cctgtactccctgtcctccgtcgtgacagtgccctccagctctctgggcacccag acctacatctgcaacgtgaaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagcg ggtggaacccaagtcctgcgacaagacccatacctgccctccctgccctgctcc tgaagctgaaggcgcccctagcgtgttcctgttccctccaaagcccaaggacac

		cctgatgatctcccggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccac gaggacccagaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaa cgccaagaccaagcctagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgt ccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgc aaggtgtccaacaaggccctgcctagctccatcgaaaagaccatctccaaggct aagggccagccccgcgagccccaggtgtacacactgcctccatcccgggaag agatgaccaagaaccaggtgtccctgacttgcctcgtgaagggcttctacccctc cgatatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaactacaaga ccacccctcccgtgctggactccgacggctcattcttcctgtacagcaagctgac agtggataagtcccggtggcagcaggggaacgtgttctcctgctccgtgatgca cgaggctctgcacaaccactacacacagaagtccctgtctctgtcccctggc
233	mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-C219S	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccct gagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactggg tccgccaggctccaggcaagggctggagtgggtggcagttatatggtatgatg agagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagaga caattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggaca cggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctggtaccctgattcttttgat atctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggccc ctctgtgtttcctctggcccttgctcccggtccacctctgagtctaccgctgctctg ggctgcctggtcaaggactacttccccgagcctgtgaccgtgtcctggaactctg gcgctctgacctccggcgtgcacacctttccagccgtgctgcagtcctccggcct gtactctctgtcctccgtcgtgaccgtgccctcctccaacttcggcacccagacct acacctgtaacgtggaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagaccgtg gaacggaagtcctgcgtggaatgccctccttgccctgcacctcctgtggctggc ccttccgtgttcctgttccccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccgga cccccgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggaccccgaggtg cagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcc cagagaggaacagttcaactccacctccgggtggtgtccgtgctgaccgtggt gcaccaggactggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaag ggcctgcctgccccccatcgaaaagaccatctccaagacaaagggccagcccc gcgagcctcaggtgtacacactgcctcccagccgggaagagatgaccaagaa ccaggtgtccctgacctgtctggtcaagggcttctacccctccgatatcgccgtg gaatgggagtccaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccccccca tgctggactccgacggctcattcttcctgtactccaagctgacagtggacaagtcc cggtggcagcagggcaacgtgttctcctgctctgtgatgcacgaggccctgcac aaccactacacccagaagtccctgtccctgagccccggcaaa
234	mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccct gagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactggg tccgccaggctccaggcaagggctggagtgggtggcagttatatggtatgatg agagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagaga caattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggaca cggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctggtaccctgattcttttgat atctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggccc atcggtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagcgg ccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtgga actcaggcgctctgaccagcggcgtgcacaccttcccagctgcctacagtcctc aggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaacttcggcac ccagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggaca agacagttgagcgcaaatcctgtgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacctg tggcaggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgat ctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacc ctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaga caaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcct caccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtct ccaacaaagccctcccaagcagcatcgagaaaaccatctccaaagccaaagg

		gcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatg accaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgac atcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagacca cgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaagctcaccgtg gacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatga ggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgggtaaa
235	mAb-CD73.11-Vh-hHC-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccct gagactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtaactatggcatgcactggg tccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatggtatgatg aaagtaataaatactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagaga caattccaagaacacgctgtttctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacac ggctgtgtattattgtgcgagagggtataacagcaggtggtaccctgatgcttttg atatctggggccaagggacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggcc cctccgtgtttcctctggccccttccagcaagtccacctctggcggaacagccgc tctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagcctgtgaccgtgtcctggaac tctggcgccctgacatctggcgtgcacaccttccctgctgtgctgcagtctagcg gcctgtactcccctgtcctccgtcgtgacagtgccctccagctctctgggcaccca gacctacatctgcaacgtgaaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagc gggtggaacccaagtcctgcgacaagacccatacctgccctccctgccctgctc ctgaagctgaaggcgcccctagcgtgttcctgttcccctccaaagcccaaggaca ccctgatgatctcccggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtccca cgaggacccagaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcaca acgccaagaccaagcctagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggt gtccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagt gcaaggtgtccaacaaggccctgcctagctccatcgaaaagaccatctccaag gctaagggccagccccgcgagccccaggtgtacacactgcctccatcccggg aagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacttgcctcgtgaagggcttctacc cctccgatatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaactac aagaccacccctcccgtgctggactccgacggctcattcttcctgtacagcaagc tgacagtggataagtcccggtggcagcaggggaacgtgttctcctgctccgtga tgcacgaggctctgcacaaccactacacacagaagtccctgtctctgtcccctgg c
236	mAb-CD73.11-Vh-hHC-IgG2-C219S	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccct gagactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtaactatggcatgcactggg tccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatggtatgatg aaagtaataaatactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagaga caattccaagaacacgctgtttctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacac ggctgtgtattattgtgcgagagggtataacagcaggtggtaccctgatgcttttg atatctggggccaagggacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggcc cctctgtgtttcctctggccccttgctcccggtccacctctgagtctaccgctgctct gggctgcctggtcaaggactacttccccgagcctgtgaccgtgtcctggaactct ggcgctctgacctccggcgtgcacacctttccagccgtgctgcagtcctccggc ctgtactctctgtcctccgtcgtgaccgtgccctcctccaacttcggcacccagac ctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagaccg tggaacggaagtcctgcgtggaatgccctccttgccctgcacctcctgtggctgg ccttccgtgttcctgttccccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccgg acccccgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggaccccgaggt gcagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagc ccagagaggaacagttcaactccaccttccgggtggtgtccgtgctgaccgtgg tgcaccaggactggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaag ggcctgcctgcccccatcgaaaagaccatctccaagacaaagggccagcccc gcgagcctcaggtgtacacactgcctcccagccgggaagagatgaccaagaa ccaggtgtccctgacctgtctggtcaagggcttctacccctccgatatcgccgtg gaatgggagtccaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccccccca

		tgctggactccgacggctcattcttcctgtactccaagctgacagtggacaagtcc cggtggcagcagggcaacgtgttctcctgctctgtgatgcacgaggccctgcac aaccactacacccagaagtccctgtccctgagccccggcaaa
237	CD73.4 (VH) – нуклеотидная последовательность	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccct gagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactggg tccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatattgtatgatg gaagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagaga caattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggaca cggctgtgtattactgtgcgagaggggcagcagctggtaccctgattcttttgat atctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttca
238	VK3 5F8	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFT LTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWWTFGQGTKVEIK
239	CDR1 VK3 5F8	RASQSVSSYLA
240	CDR2 VK3 5F8	DASNRAT
241	CDR3 VK3 5F8	QQRSNWWT
242	VK3 5F8 – нуклеотидная последовательность	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTA GTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTACTGGAT GCACTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCT GGTGTGGGTCTCACGTATTATTAGTGATGGGAGT AGCACAGGTTACGCGGATTCCGTGAAGGGCCGA TTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACG CTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAG GACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGAGTTTA GCAGTGGCTGGTACTTTGACTACTGGGGCCAGGG AACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
243	11F11 (полноразмерная тяжелая цепь) – нуклеотидная последовательность	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAACGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCT GGAGTGGGTGGCAGTTATATTGTATGATGGAAGT AATAAATACTATCCAGACTCCGTGAAGGGCCGA TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGC TGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGG ACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGCA GCAGCTGGTACCCTGATTCTTTTGATATCTGGGG CCAAGGAACAATGGTCACCGTCTCTTCAGCCTCC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCT GCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCC TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCTCTGACC AGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGT CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC CGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTAC ACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGT GTCGAGTGCCCACCGTGCCCAGCACCACCTGTGG CAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCA

		CGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTG GTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGC TGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA ACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC AGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGA TGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTA CAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGC TCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACA AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
244	11F11 (полноразмерная легкая цепь 1) – нуклеотидная последовательность	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGT CTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG CAGGGCCAGTCAGGGTGTTAGCAGCTACTTAGCC TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG CTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTG GCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGCCTG GGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGA GCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAG CGTAGCAACTGGCATCTCACTTTCGGCGGAGGGA CCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTG CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
245	11F11 (полноразмерная легкая цепь 2) – нуклеотидная последовательность	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGA CCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTG CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
246	4C3 (полноразмерная тяжелая цепь) – нуклеотидная последовательность	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTG GTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG

		CAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATGCCAT GCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCT GGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAAGAGTGG TAGCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCC CTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAG GACACGGCCTTGTATTACTGTGTAAAAGGGTATT ACGTTATTTTGACTGGCCTTGACTACTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACC TCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTG ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC AGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT TGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAA CTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCA AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCG TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCC ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTA TCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC GGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAA
247	4C3 (полноразмерная легкая цепь 1) – нуклеотидная последовательность	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGT CTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG CAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCC TGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGG CTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTG GCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTG GGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGA GCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAG TATGGTAGCTCACCGCTCACTTTCGGCGGAGGGA CCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTG CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
248	4C3 (полноразмерная легкая цепь 2) – нуклеотидная последовательность	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCTTCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC

		TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCTCCAACGTTCGGCCAGGGGA CCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTG CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
249	4C3 (полноразмерная легкая цепь 3) – нуклеотидная последовательность	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCTTCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCTCCAACGTTCGGCCAAGGGA CCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTG CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
250	4D4 (полноразмерная тяжелая цепь) – нуклеотидная последовательность	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCT GGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGAAAG TAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACGGCTGTGTATTATTGTGCGAGAGGGTATA ACAGCAGGTGGTACCCTGATGCTTTTGATATCTG GGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGCC TCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGC CCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGG CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA ACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCTCTG ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTAC AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT GACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACC TACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAAC

		ACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGT TGTGTCGAGTGCCCACCGTGCCCAGCACCACCTG TGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC GAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACT GGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCC TGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG TAAA
251	4D4 (полноразмерная легкая цепь 1) – нуклеотидная последовательность	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGA CCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTG CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
252	10D2 (полноразмерная тяжелая цепь) – нуклеотидная последовательность	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGGCCT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCT GGAGTGGGTGGCAGTTATACGGTATGATGGAAG TAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAG GACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGGGGGGGC AGCAGCTGGTACCCGGACGGTTTGGACGTCTGG GGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTT CCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCC CTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA

		CCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTG ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTAC AGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGAC CTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAA CACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATA TGGTCCCCCATGCCCATCATGCCCAGCACCTGAG TTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCC CAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTA CGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG GTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGA AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAG AGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGA GGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTG CCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGT GGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGG GTAAA
253	10D2 (полноразмерная легкая цепь 1) – нуклеотидная последовательность	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG CCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAG CTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAG TTTAATAGTTACCCCACTTTCGGCGGAGGGACCA AGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCAT CTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTT GAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC TCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACG CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC TACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT GT
254	10D2 (полноразмерная легкая цепь 2) – нуклеотидная последовательность	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGA

		CCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTG CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
255	11A6 (полноразмерная тяжелая цепь) – нуклеотидная последовательность	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGGGGAAACTTG GTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATGCCAT GCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCT GGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAATAAT GACATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGA TTCATCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCC TGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGACCTGAGG ACACGGCCTTGTATTATTGTGTAAAAGGTTATTA CGTTATTTTGACTGGTCTTGACTACTGGGGCCAG GGAACCCCGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAG GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCT CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGA CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAG GACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTT GTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAC TCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAA GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCA TCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC GGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAA
256	11A6 (полноразмерная легкая цепь 1) – нуклеотидная последовательность	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGA CCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCAC

		CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTG CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
257	24H2 (полноразмерная тяжелая цепь) – нуклеотидная последовательность	CAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCT GGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAGG TAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAA GACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGC AGCAGCTGGTACCCTGATGCTTTTGATATCTGGG GCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGCTTC CACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCC TGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCC CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC CGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGA CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACA GTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCT ACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATG GTCCCCCATGCCCATCATGCCCAGCACCTGAGTT CCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCCA AAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC AGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACG TGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGA CTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT CTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAG CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCC TGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGG TAAA
258	24H2 (полноразмерная легкая цепь 1) – нуклеотидная последовательность	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG

		GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGA CCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTG CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
259	5F8 (полноразмерная тяжелая цепь) – нуклеотидная последовательность	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTTA GTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTACTGGAT GCACTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCT GGTGTGGGTCTCACGTATTATTAGTGATGGGAGT AGCACAGGTTACGCGGATTCCGTGAAGGGCCGA TTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACG CTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAG GACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGAGTTTA GCAGTGGCTGGTACTTTGACTACTGGGGCCAGGG AACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGC CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTG GGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACT CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC AAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTG GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGA GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAC AGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGA ACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC TCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT CCGGGTAAA
260	5F8 (полноразмерная легкая цепь 1) – нуклеотидная последовательность	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG CCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAG CTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG

		GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAG TTTAGTAGTTACCCTCGGACGTTCGGCCAAGGGA CCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTG CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
261	5F8 (полноразмерная легкая цепь 2) – нуклеотидная последовательность	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGGTTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATAATAGTTACCCTCGGACGTTCGGCCAAGGGA CCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTG CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
262	6E11 (полноразмерная тяжелая цепь) – нуклеотидная последовательность	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGCCTTG GTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATGCCAT GCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCT GGAGTGGGTCTCAGGTATTACTTGGAATAGTGGT GGCATAGGCTACGCGGACTCTGTGAAGGGCCGA TTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCC TGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGG ACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAAGATAGGTA TTACAGCAGTTGGCTCCTCTTTGACAACTGGGGC CAGGGAATTCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACC AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGC ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCC CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCA GCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACA AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAA TCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCT GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAAC CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT

		TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCGGGTAAA
263	6E11 (полноразмерная легкая цепь 1) – нуклеотидная последовательность	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGT CTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG CAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTT AGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCC CAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCC ACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGG TCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGAC TGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCA GCATTATGGTAGCTCATTCACTTTCGGCCCTGGG ACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCA CCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGC AGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT ACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGG TAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAG CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCT GACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG AGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGA GAGTGT
264	7A11 (полноразмерная тяжелая цепь) – нуклеотидная последовательность	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTG GTACAGACTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATGCCAT GCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCT GGAGTGGGTCTCAGATATTAGTTGGAATAGTGAT ATTATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGAT TCACCATCTCTAGAGACAACGCCAAGAACTCCCT GTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGA CACGGCCTTGTATTACTGTGCAAAAGATATTTAT GGTTCGGGGAGTTCTTTTTTTGACTACTGGGGCC AGGGAATCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCA AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCA CCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCC TGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTC AGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAA GCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAAT CTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTG AACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATG CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC

		AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCC GACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCGGGTAAA
265	7A11 (полноразмерная легкая цепь 1) – нуклеотидная последовательность	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGTATATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCCTAAG TCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTG GGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTG GGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAG TATCATAGTTACCCTCCCACCTTCGGCCAAGGGA CACGACTGGAGATTAAACGAACTGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTG CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAG CTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
266	CD73.4.IgG2C219SIgG1.1f – альтернативная нуклеотидная последовательность	caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt aactatggca tgcactgggt ccgccaggct ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atattgtatg atggaagtaa taaatactat ccagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagggggc agcagctggt accctgattc ttttgatatc tggggccaag gaacaatggt caccgtctct tcagcgtcga ccaagggccc atcggtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc gagagcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgctct gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcaactt cggcacccag acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gacagttgag cgcaaatcct gtgtcgagtg cccaccgtgc

		ccagcaccac ctgtggcagg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccaagc agcatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta taqcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ccccgggttg a
267	IgG1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
268	IgG2.3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
269	IgG2.3G1-AY	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
270	IgG2.3G1-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP

		SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
271	IgG2.5	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
272	IgG1.1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
273	IgG2.3G1.1f-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
274	IgG1-deltaTHT	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
275	IgG2.3-plusTHT	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVETHT CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS

		TFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
276	IgG2.3-plusGGG	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVEGGG CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
277	IgG2.5G1.1f-KH	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
278	IgG2.5G1-AY	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
279	IgG2.5G1-KH	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
280	IgG2.5-plusTHT	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVETHT CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK

		GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
281	IgG1-G2.3G1-AY	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVERKSCVECPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
282	IgG1-G2.3G1-KH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVERKSCVECPP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
283	CD73 с фигуры 27A	XCPRAARAPATLLLALGAVLWPAAGAWELTILHTND VHSRLEQTSEDSSKCVNASRCMGGVARLFTKVQQIR RAEPNVLLLDAGDQYQGTIWFTVYKGAEVAHFMNAL RYDAMALGNHEFDNGVEGLIEPLLKEAKFPILSANI KAKGPLASQISGLYLPYKVLPVGDEVVGIVGYTSKE TPFLSNPGTNLVFEDEITALQPEVDKLKTLNVNKII ALGHSGFEMDKLIAQKVRGVDVVVGGHSNTFLYTGN PPSKEVPAGKYPFIVTSDDGRKVPVVQAYAFGKYLG YLKIEFDERGNVISSHGNPILLNSSIPEDPSIKADI NKWRIKLDNYSTQELGKTIVYLDGSSQSCRFRECNM GNLICDAMINNNLRHADETFWNHVSMCILNGGGIRS PIDERNNGTITWENLAAVLPFGGTFDLVQLKGSTLK KAFEHSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDLSRKPGDR VVKLDVLCTKCRVPSYDPLKMDEVYKVILPNFLANG GDGFQMIKDELLRHDSGDQDINVVSTYISKMKVIYP AVEGRIKHHHHHH
284	Аминокислоты шарнирного участка	VDKRV
285	Аминокислоты шарнирного участка	VDKTV
286	Аминокислоты шарнирного участка	EPKSCDKTHT
287	Аминокислоты шарнирного участка	ELKTPLGDTTHT
288	Аминокислоты шарнирного участка	EPKS
289	Аминокислоты шарнирного участка	ESKYGPP
290	Аминокислоты шарнирного участка	CPPCP
291	Аминокислоты шарнирного участка	CCVECPPCP
292	Аминокислоты шарнирного участка	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)$_3$
293	Аминокислоты шарнирного участка	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)$_2$
294	Аминокислоты шарнирного участка	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)$_1$

295	Аминокислоты шарнирного участка	CDTPPPCPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)$_2$
296	Аминокислоты шарнирного участка	CDTPPPCPRCP
297	Аминокислоты шарнирного участка	CPSCP
298	Аминокислоты шарнирного участка	APELLGG
299	Аминокислоты шарнирного участка	APPVAG
300	G2-G1-G1-G1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
301	G2.5-G1-G1-G1	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
302	G1-G2.3-G2-G2	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
303	G1-KRGEGSSNLF	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
304	G1-KRGEGS	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR

		EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
305	G1-SNLF	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
306	IgG1-ITNDRTPR	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
307	G1-SNLFPR	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVERKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
308	G2-RKEGSGNSFL	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
309	G2-RKEGSG	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP

		IEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
310	G2-NSFL	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
311	IgG2-TIDNTRRP	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
312	G2-NSFLRP	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVEPKSCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
313	G1-G1-G2-G1-AY	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
314	G1-G1-G2-G1-KH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL

		PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
315	G2-G2.3-G1-G2-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
316	G2.5-G2.3-G1-G2-KH	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
317	G2-G2.3-G1-G2-AY	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVE CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG
318	G2.5-G2.3-G1-G2-AY	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVE CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
319	G1-G2.3-G1-G1-KH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT

		CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
320	G2-G1-G2-G2-AY	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPM LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
321	G2.5-G1-G2-G2-AY	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPM LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
322	G1-G2-G1-G1-AY	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCVE CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
323	G2-G1-G2-G2-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCDK THTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPML DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG
324	G2.5-G1-G2-G2-KH	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCDK THTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPML

		DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
325	IgG1-delta-шарнир	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
326	IgG2-delta-шарнир	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCPPC PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
327	IgG2.5-delta-шарнир	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCPPC PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
328	IgG1-deltaG237	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG
329	IgG2-plusG237	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVE CPPCPAPPVAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPA PIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH

		YTQKSLSLSPGK
330	IgG2.4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCSVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
331	IgG2.3/4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSSVE CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP IEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
332	IgG2.3-V13	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPPV AGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
333	IgG2.3-V14	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPPV AGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDGEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
334	IgG2.3-V15	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPPV AGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDEDGEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
335	IgG2.3-V16	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPPV AGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDGEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPRPIEKTISKTKGQPREPQVY

		TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
336	IgG2.3-V17	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPPV AGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDEDGEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPRPIEKTISKTKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
337	IgG2.3-V18	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPPV AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
338	IgG2.3-V19	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPPV AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQ DWLNGKEYKCKVSNKGFPAPIEKTISKTKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
339	IgG2.3G1-AY-V20	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPEL LGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
340	IgG2.3G1-AY-V21	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPEL LGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDGE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
341	IgG2.3G1-AY-V22	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPEL LGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDEDGE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

342	IgG2.3G1-AY-V23	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPEL LGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDGE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPRPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
343	IgG2.3G1-AY-V24	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPEL LGGDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDEDGE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPRPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
344	IgG2.3G1-AY-V25	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPEL LGDDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDEDGE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPRPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
345	IgG2.3G1-AY-V26	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPDL LGDDSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDEDGE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPRPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
346	IgG2.3G1-AY-V27	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
347	IgG2.3G1-AY-V28	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNF GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
348	Альтернативный шарнир	ERKCCVECPPCPAPPVAG
349	Альтернативный шарнир	ERKSCVECPPCPAPPVAG

350	Альтернативный шарнир	ERKCSVECPPCPAPPVAG
351	Альтернативный шарнир	ERKXCVECPPCPAPPVAG
352	Альтернативный шарнир	ERKCXVECPPCPAPPVAG
353	Альтернативный шарнир	ERKCCVECPPCPAPPVAGX
354	Альтернативный шарнир	ERKSCVECPPCPAPPVAGX
355	Альтернативный шарнир	ERKCSVECPPCPAPPVAGX
356	Альтернативный шарнир	ERKXCVECPPCPAPPVAGX
357	Альтернативный шарнир	ERKCXVECPPCPAPPVAGX
358	Альтернативный шарнир	ERKCCVECPPCPAPELLGG
359	Альтернативный шарнир	ERKSCVECPPCPAPELLGG
360	Альтернативный шарнир	ERKCCSVECPPCPAPELLGG
361	Альтернативный шарнир	ERKXCVECPPCPAPELLGG
362	Альтернативный шарнир	ERKCXVECPPCPAPELLGG
363	Альтернативный шарнир	ERKCCVECPPCPAPELLG
364	Альтернативный шарнир	ERKSCVECPPCPAPELLG
365	Альтернативный шарнир	ERKCCSVECPPCPAPELLG
366	Альтернативный шарнир	ERKXCVECPPCPAPELLG
367	Альтернативный шарнир	ERKCXVECPPCPAPELLG
368	Альтернативный шарнир	ERKCCVECPPCPAP
369	Альтернативный шарнир	ERKSCVECPPCPAP
370	Альтернативный шарнир	ERKCSVECPPCPAP
371	Альтернативный шарнир	ERKXCVECPPCPAP
372	Альтернативный шарнир	ERKCXVECPPCPAP
373	Часть шарнира	PVAG
374	Часть шарнира	ELLG
375	Часть шарнира	ELLGG
376	Часть шарнира	SCDKTHT
377	Часть шарнира	CCVE
378	CH1 домен IgG2 wt	ASTKGPSVFPLAP**C**S**R**STS**ES**TAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSS*NF*GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV
379	CH1 и шарнир IgG2	ASTKGPSVFPLAP**C**S**R**STS**ES**TAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSS*NF*GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVEC PPCPAPPVAG
380	Часть шарнира	CPPCPAP

В перечне последовательностей представлены последовательности зрелых вариабельных участков тяжелой и легкой цепей (т.е. последовательности не включают в себя сигнальные пептиды).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное человеческое антитело, которое связывается с человеческим кластером дифференцировки 73 (CD73) и содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, содержащие SEQ ID NO: 5, 6 и 7 соответственно, и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, содержащие SEQ ID NO: 13, 14 и 15 соответственно, причем антитело содержит константный участок тяжелой цепи, который содержит шарнир IgG2 и CH1 домен IgG1.

2. Выделенное антитело по п.1, где шарнирный домен содержит аминокислотную замену в C219S по индексу EU системы Kabat относительно шарнирного домена человеческого IgG2 дикого типа (SEQ NO: 136).

3. Выделенное антитело по п.1 или 2, где константный участок тяжелой цепи содержит:

(a) CH1 домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 124; и

(b) шарнирный домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123.

4. Выделенное антитело по любому из пп.1-3, где антитело содержит вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 135, и вариабельный участок легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 12.

5. Выделенное антитело по любому из пп.1-3, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 133 или 189, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 102.

6. Выделенное антитело по любому из пп.1-3, где тяжелая и легкая цепи представляют собой полноразмерные тяжелую и легкую цепи соответственно.

7. Выделенное антитело по п.6, которое представляет собой антитело IgG.

8. Выделенное антитело по любому из пп.1-3, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 133, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 102.

9. Выделенное антитело по любому из пп.1-3, где антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 189, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 102.

10. Антитело по любому из пп.1-9, которое является человеческим антителом и проявляет одно или более из следующих свойств:

(a) связывается с человеческим CD73 с K_D, составляющей 10 нМ или менее при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR);

(b) ингибирует ферментативную активность CD73;

(c) интернализирует CD73 посредством опосредуемой антителом интернализации CD73 в клетки, такие как опухолевые клетки;

(d) связывается с человеческим CD73 с EC_{50}, составляющей от 0,1 до 10 нМ при измерении с помощью диаграммы рассеяния возбужденной флуоресценции сортированных клеток (FACS).

11. Выделенное антитело по п.7, в котором CH2 домен включает аминокислотные замены A330S и P331S.

12. Композиция для лечения злокачественной опухоли, экспрессирующей CD73, содержащая антитело по любому из пп.1-11 и фармацевтически приемлемый носитель.

13. Композиция по п.12, дополнительно содержащая один или более дополнительных терапевтических средств, в которой дополнительное терапевтическое средство представляет собой антагонистическое антитело к белку-1 программируемой смерти клеток (PD-1), антагонистическое антитело к лиганду 1 программируемой смерти клеток (PD-L1), антагонистическое антитело к цитотоксическому Т-лимфоцит-ассоциированному белку 4 (CTLA-4) или антагонистическое антитело к гену-3 активации лимфоцитов (LAG-3).

14. Способ лечения злокачественной опухоли, экспрессирующей CD73, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела по любому из пп.1-11 для лечения злокачественной опухоли.

15. Способ по п.14, при котором злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из злокачественной опухоли мочевого пузыря, злокачественной опухоли молочной железы, злокачественной опухоли матки/шейки матки, злокачественной опухоли яичника, злокачественной опухоли предстательной железы, злокачественной опухоли яичка, злокачественной опухоли пищевода, злокачественной опухоли желудочно-кишечного тракта, злокачественной опухоли поджелудочной железы, колоректальной злокачественной опухоли, злокачественной опухоли толстой кишки, злокачественной опухоли почки, злокачественной опухоли головы и шеи, злокачественной опухоли легкого, злокачественной опухоли желудка, герминогенной злокачественной опухоли, злокачественной опухоли кости, злокачественной опухоли печени, злокачественной опухоли щитовидной железы, злокачественной опухоли кожи, новообразований центральной нервной системы, лимфомы, лейкоза, миеломы, саркомы и злокачественной опухоли, связанной с вирусом.

16. Способ по п.14 или 15, при котором злокачественная опухоль представляет собой метастазирующую злокачественную опухоль, невосприимчивую к лечению злокачественную опухоль или рецидивирующую злокачественную опухоль.

17. Способ по любому из пп.14-16, дополнительно предусматривающий введение одного или нескольких дополнительных терапевтических средств, при котором дополнительное терапевтическое средство представляет собой иммунопотенциирующую молекулу, такую как антагонист PD-1, антагонист PD-L1, антагонист CTLA-4, антагонист LAG-3; антитело к CD39 или антитело к A2AR.

18. Способ выявления наличия человеческого CD73 в образце, включающий приведение образца в контакт с антителом по любому из пп.1-11 при условиях, которые обеспечивают возможность образования комплекса между антителом и CD73, и выявление образования комплекса.

VH антитела к CD73 CD73.4-1

```
V-сегмент:   VH3 / 3-33
D-сегмент:   D6 / 6-13
J-сегмент:   JH3 / 3

      Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S
1     CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC
                                                          _CDR1_________
      L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   N   Y   G   M
52    CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GGC ATG
                                                                  _CDR2_
      H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   V   I
103   CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA

      L   Y   D   G   S   N   K   Y   Y   P   D   S   V   K   G   R   F
154   TTG TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT CCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

      T   I   S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S
205   ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC
                                                          _CDR3_________
      L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   G   G   S   S
256   CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGC AGC AGC

      W   Y   P   D   S   F   D   I   W   G   Q   G   T   M   V   T   V
307   TGG TAC CCT GAT TCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGA ACA ATG GTC ACC GTC

      S   S
358   TCT TCA
```

Фиг. 1A

VK антитела к CD73 CD73.4-1

V-сегмент: VK3 / L20
J-сегмент: JK4 / 4

```
        E   I   V   L   T   Q   S   P   A   T   L   S   L   S   P   G   E
1      GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

                                _CDR1_____________________________________
        R   A   T   L   S   C   R   A   S   Q   G   V   S   S   Y   L   A
52     AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG GGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC

                                                                    _CDR2___
        W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   D   A
103    TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA

       ________________
        S   N   R   A   T   G   I   P   A   R   F   S   G   S   G   P   G
154    TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG CCT GGG

        T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   E   P   E   D   F   A   V
205    ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT

                    _CDR3_____________________________
        Y   Y   C   Q   Q   R   S   N   W   H   L   T   F   G   G   G   T
256    TAT TAC TGT CAG CAG CGT AGC AAC TGG CAT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC

        K   V   E   I   K
307    AAG GTG GAG ATC AAA
```

Фиг. 1B

VH антитела к CD73 CD73.4-2

V-сегмент: VH3 / 3-33
D-сегмент: D6 / 6-13
J-сегмент: JH3 / 3

```
        Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S
1      CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC

                                                            _CDR1___________
        L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   N   Y   G   M
52     CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GGC ATG

       ____                                                 _CDR2___
        H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   V   I
103    CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA

       ____________________________________________________________________
        L   Y   D   G   S   N   K   Y   Y   P   D   S   V   K   G   R   F
154    TTG TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT CCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

        T   I   S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S
205    ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC

                                                            _CDR3___________
        L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   G   G   S   S
256    CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGC AGC AGC

       ____________________________________
        W   Y   P   D   S   F   D   I   W   G   Q   G   T   M   V   T   V
307    TGG TAC CCT GAT TCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGA ACA ATG GTC ACC GTC

        S   S
358    TCT TCA
```

Фиг. 2A

VK антитела к CD73 CD73.4-2

V-сегмент: VK1 / L15
J-сегмент: JK4 / 4

```
        D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
1      GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

                                _CDR1_____________________________________
        R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A
52     AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

                                                                    _CDR2___
        W   Y   Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A
103    TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

       ________________
        S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154    TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

        T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205    ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

                    _CDR3_____________________________
        Y   Y   C   Q   Q   Y   N   S   Y   P   L   T   F   G   G   G   T
256    TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC

        K   V   E   I   K
307    AAG GTG GAG ATC AAA
```

Фиг. 2B

VH антитела к CD73 11F11-1

V-сегмент: VH3 / 3-33
D-сегмент: D6 / 6-13
J-сегмент: JH3 / 3

```
        Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S
1      CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC

                                                        _CDR1_________
        L   R   L   S   C   A   T   S   G   F   T   F   S   N   Y   G   M
52     CTG AGA CTC TCC TGT GCA ACG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GGC ATG

                                                                  _CDR2___
        H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   V   I
103    CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA

        L   Y   D   G   S   N   K   Y   Y   P   D   S   V   K   G   R   F
154    TTG TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT CCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

        T   I   S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S
205    ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC

                                                        _CDR3_________
        L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   G   G   S   S
256    CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGC AGC AGC

        W   Y   P   D   S   F   D   I   W   G   Q   G   T   M   V   T   V
307    TGG TAC CCT GAT TCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGA ACA ATG GTC ACC GTC

        S   S
358    TCT TCA
```

Фиг. 3A

VK антитела к CD73 11F11-1

V-сегмент: VK3 / L20
J-сегмент: JK4 / 4

```
        E   I   V   L   T   Q   S   P   A   T   L   S   L   S   P   G   E
1      GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

                                _CDR1_____________________________________
        R   A   T   L   S   C   R   A   S   Q   G   V   S   S   Y   L   A
52     AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG GGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC

                                                                  _CDR2___
        W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   D   A
103    TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA

        S   N   R   A   T   G   I   P   A   R   F   S   G   S   G   P   G
154    TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG CCT GGG

        T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   E   P   E   D   F   A   V
205    ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT

                        _CDR3_____________________________
        Y   Y   C   Q   Q   R   S   N   W   H   L   T   F   G   G   G   T
256    TAT TAC TGT CAG CAG CGT AGC AAC TGG CAT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC

        K   V   E   I   K
307    AAG GTG GAG ATC AAA
```

Фиг. 3B

VH антитела к CD73 11F11-2

V-сегмент: VH3 / 3-33
D-сегмент: D6 / 6-13
J-сегмент: JH3 / 3

```
        Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S
1      CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC

                                                        _CDR1_________
        L   R   L   S   C   A   T   S   G   F   T   F   S   N   Y   G   M
52     CTG AGA CTC TCC TGT GCA ACG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GGC ATG

                                                                  _CDR2___
        H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   V   I
103    CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA

        L   Y   D   G   S   N   K   Y   Y   P   D   S   V   K   G   R   F
154    TTG TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT CCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

        T   I   S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S
205    ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC

                                                        _CDR3_________
        L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   G   G   S   S
256    CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGC AGC AGC

        W   Y   P   D   S   F   D   I   W   G   Q   G   T   M   V   T   V
307    TGG TAC CCT GAT TCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGA ACA ATG GTC ACC GTC

        S   S
358    TCT TCA
```

Фиг. 4A

VK антитела к CD73 11F11-2

```
V-сегмент:   VK1 / L15
J-сегмент:   JK4 / 4

     D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
1    GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

                            _CDR1_____________________________________
     R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A
52   AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

                                                                _CDR2___
     W   Y   Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A
103  TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

     _________________
     S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154  TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

     T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205  ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

                    _CDR3_____________________________
     Y   Y   C   Q   Q   Y   N   S   Y   P   L   T   F   G   G   G   T
256  TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC

     K   V   E   I   K
307  AAG GTG GAG ATC AAA
```

Фиг. 4B

VH антитела к CD73 4C3-1

```
V-сегмент:   VH3 / 3-09
D-сегмент:   D3 / 3-9
J-сегмент:   JH4 / 4

     E   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   R   S
1    GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGC AGG TCC

                                                    _CDR1___________
     L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   D   D   Y   A   M
52   CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GCC ATG

     ___                                                    _CDR2___
     H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   S   G   I
103  CAC TGG GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATT

     _____________________________________________________________
     S   W   K   S   G   S   I   G   Y   A   D   S   V   K   G   R   F
154  AGT TGG AAG AGT GGT AGC ATA GGC TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC

     T   I   S   R   D   N   A   K   N   S   L   Y   L   Q   M   N   S
205  ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT

                                                    _CDR3___________
     L   R   A   E   D   T   A   L   Y   Y   C   V   K   G   Y   Y   V
256  CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCC TTG TAT TAC TGT GTA AAA GGG TAT TAC GTT

     _____________________________
     I   L   T   G   L   D   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S
307  ATT TTG ACT GGC CTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC

     S
358  TCA
```

Фиг. 5A

VK антитела к CD73 4C3-1

```
V-сегмент:          VK3 / A27
J-сегмент:          JK4 / 4

     E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E
1    GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

                            _CDR1_____________________________________
     R   A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S       Y   L
52   AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC ... TAC TTA

     _______
     A   W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G
103  GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT

     _CDR2_____________________________
     A   S   S   R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S
154  GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT

     G   T   D   F   T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A
205  GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA

                            _CDR3_____________________________
     V   Y   Y   C   Q   Q   Y   G   S   S   P   L   T   F   G   G   G
256  GTG TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AGC TCA CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG

     T   K   V   E   I   K
307  ACC AAG GTG GAG ATC AAA
```

Фиг. 5B

VH антитела к CD73 4C3-2

```
V-сегмент:   VH3 / 3-09
D-сегмент:   D3 / 3-9
J-сегмент:   JH4 / 4

     E   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   R   S
1   GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGC AGG TCC

                                                        _CDR1_________
     L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   D   D   Y   A   M
52  CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GCC ATG

                                                                _CDR2___
     H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   S   G   I
103 CAC TGG GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATT

     S   W   K   S   G   S   I   G   Y   A   D   S   V   K   G   R   F
154 AGT TGG AAG AGT GGT AGC ATA GGC TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC

     T   I   S   R   D   N   A   K   N   S   L   Y   L   Q   M   N   S
205 ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT

                                                        _CDR3_________
     L   R   A   E   D   T   A   L   Y   Y   C   V   K   G   Y   Y   V
256 CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCC TTG TAT TAC TGT GTA AAA GGG TAT TAC GTT

     I   L   T   G   L   D   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S
307 ATT TTG ACT GGC CTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC

     S
358 TCA
```

Фиг. 6А

VK антитела к CD73 4C3-2

```
V-сегмент:        VK1 / L15
J-сегмент:        JK1 / 1

     D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
1   GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

                            _CDR1_____________________________________
     R   V   T   F   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A
52  AGA GTC ACC TTC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

                                                                _CDR2___
     W   Y   Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A
103 TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

     S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154 TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

     T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205 ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

                _CDR3_____________________________
     Y   Y   C   Q   Q   Y   N   S   Y   P   P   T   F   G   Q   G   T
256 TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCT CCA ACG TTC GGC CAG GGG ACC

     K   V   E   I   K
307 AAG GTG GAA ATC AAA
```

Фиг. 6В

VH антитела к CD73 4C3-3

```
V-сегмент:   VH3 / 3-09
D-сегмент:   D3 / 3-9
J-сегмент:   JH4 / 4

     E   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   R   S
1   GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGC AGG TCC

                                                        _CDR1_________
     L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   D   D   Y   A   M
52  CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GCC ATG

                                                                _CDR2___
     H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   S   G   I
103 CAC TGG GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATT

     S   W   K   S   G   S   I   G   Y   A   D   S   V   K   G   R   F
154 AGT TGG AAG AGT GGT AGC ATA GGC TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC

     T   I   S   R   D   N   A   K   N   S   L   Y   L   Q   M   N   S
205 ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT

                                                        _CDR3_________
     L   R   A   E   D   T   A   L   Y   Y   C   V   K   G   Y   Y   V
256 CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCC TTG TAT TAC TGT GTA AAA GGG TAT TAC GTT

     I   L   T   G   L   D   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S
307 ATT TTG ACT GGC CTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC

     S
358 TCA
```

Фиг. 7А

VK антитела к CD73 4C3-3

```
          V-сегмент:          VK1 / L15
          J-сегмент:          JK1 / 1

          D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
1        GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

                                  _CDR1_____________________________________
          R   V   T   F   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A
52       AGA GTC ACC TTC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

                                                                  _CDR2___
          W   Y   Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A
103      TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

         _______________
          S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154      TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

          T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205      ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

                      _CDR3_____________________________
          Y   Y   C   Q   Q   Y   N   S   Y   P   P   T   F   G   Q   G   T
256      TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCT CCA ACG TTC GGC CAA GGG ACC

          K   V   E   I   K
307      AAG GTG GAA ATC AAA
```

Фиг. 7B

VH антитела к CD73 4D4-1

```
        V-сегмент:   VH3 / 3-33
        D-сегмент:   D6 / 6-13
        J-сегмент:   JH3 / 3

          Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S
1        CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC

                                                          _CDR1_________
          L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   N   Y   G   M
52       CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GGC ATG

                                                                  _CDR2___
         _____                                                    _____
          H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   V   I
103      CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA

         _____________________________________________________________
          W   Y   D   E   S   N   K   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   F
154      TGG TAT GAT GAA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

          T   I   S   R   D   N   S   K   N   T   L   F   L   Q   M   N   S
205      ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TTT CTG CAA ATG AAC AGC

                                                          _CDR3_________
          L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   G   Y   N   S
256      CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAT TGT GCG AGA GGG TAT AAC AGC

         _____________________________________
          R   W   Y   P   D   A   F   D   I   W   G   Q   G   T   M   V   T
307      AGG TGG TAC CCT GAT GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC

          V   S   S
358      GTC TCT TCA
```

Фиг. 8A

VK антитела к CD73 4D4-1

```
          V-сегмент:          VK1 / L15
          J-сегмент:          JK4 / 4

          D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
1        GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

                                  _CDR1_____________________________________
          R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A
52       AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

                                                                  _CDR2___
          W   Y   Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A
103      TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

         _______________
          S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154      TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

          T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205      ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

                      _CDR3_____________________________
          Y   Y   C   Q   Q   Y   N   S   Y   P   L   T   F   G   G   G   T
256      TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC

          K   V   E   I   K
307      AAG GTG GAG ATC AAA
```

Фиг. 8B

VH антитела к CD73 10D2-1

```
V-сегмент:   VH3 / 3-33
D-сегмент:   D6 / 6-13
J-сегмент:   JH6 / 6

     Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S
1    CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC

                                                        _CDR1_________
     L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   N   Y   G   L
52   CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GGC CTG

                                                                _CDR2___
     H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   V   I
103  CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA

     R   Y   D   G   S   N   K   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   F
154  CGG TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

     T   I   S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   S   S
205  ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC

                                                        _CDR3_________
     L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   G   G   S   S
256  CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGG GGG GGC AGC AGC

     W   Y   P   D   G   L   D   V   W   G   Q   G   T   T   V   T   V
307  TGG TAC CCG GAC GGT TTG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC

     S   S
358  TCC TCA
```

Фиг. 9A

VK антитела к CD73 10D2-1

```
V-сегмент:        VK1 / L18
J-сегмент:        JK4 / 4

     A   I   Q   L   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
1    GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

                            _CDR1_____________________________________
     R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   A   L   A
52   AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC

                                                                _CDR2___
     W   Y   Q   Q   K   P   G   K   A   P   K   L   L   I   Y   D   A
103  TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC

     S   S   L   E   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154  TCC AGT TTG GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

     T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205  ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

                    _CDR3_____________________
     Y   Y   C   Q   Q   F   N   S   Y   P   T   F   G   G   G   T   K
256  TAT TAC TGT CAA CAG TTT AAT AGT TAC CCC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG

     V   E   I   K
307  GTG GAG ATC AAA
```

Фиг. 9B

VH антитела к CD73 10D2-2

```
V-сегмент:   VH3 / 3-33
D-сегмент:   D6 / 6-13
J-сегмент:   JH6 / 6

     Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S
1    CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC

                                                        _CDR1_________
     L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   N   Y   G   L
52   CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GGC CTG

                                                                _CDR2___
     H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   V   I
103  CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA

     R   Y   D   G   S   N   K   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   F
154  CGG TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

     T   I   S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   S   S
205  ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AGC AGC

                                                        _CDR3_________
     L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   G   G   S   S
256  CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGG GGG GGC AGC AGC

     W   Y   P   D   G   L   D   V   W   G   Q   G   T   T   V   T   V
307  TGG TAC CCG GAC GGT TTG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC

     S   S
358  TCC TCA
```

Фиг. 10A

VK антитела к CD73 10D2-2

```
V-сегмент:          VK1 / L15
J-сегмент:          JK4 / 4

     D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
1    GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

                            _CDR1_____________________________________
     R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A
52   AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

                                                                _CDR2___
     W   Y   Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A
103  TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

     _______________
     S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154  TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

     T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205  ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

                    _CDR3_____________________________
     Y   Y   C   Q   Q   Y   N   S   Y   P   L   T   F   G   G   G   T
256  TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC

     K   V   E   I   K
307  AAG GTG GAG ATC AAA
```

Фиг. 10B

VH антитела к CD73 11A6-1

```
V-сегмент:   VH3 / 3-09
D-сегмент:   D3 / 3-9
J-сегмент:   JH4 / 4

     E   V   Q   L   V   E   S   G   G   N   L   V   Q   P   G   R   S
1    GAA GTG CAG CTG GTG GAA TCT GGG GGA AAC TTG GTA CAG CCT GGC AGG TCC

                                                        _CDR1___________
     L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   D   D   Y   A   M
52   CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GCC ATG

     ___                                                        _CDR2___
     H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   S   G   I
103  CAC TGG GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATT

     _______________________________________________________________
     S   W   N   N   N   D   I   G   Y   A   D   S   V   K   G   R   F
154  AGT TGG AAT AAT AAT GAC ATA GGC TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC

     I   I   S   R   D   N   A   K   N   S   L   Y   L   Q   M   N   S
205  ATC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT

                                                        _CDR3___________
     L   R   P   E   D   T   A   L   Y   Y   C   V   K   G   Y   Y   V
256  CTG AGA CCT GAG GAC ACG GCC TTG TAT TAT TGT GTA AAA GGT TAT TAC GTT

     _____________________________
     I   L   T   G   L   D   Y   W   G   Q   G   T   P   V   T   V   S
307  ATT TTG ACT GGT CTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CCG GTC ACC GTC TCC

     S
358  TCA
```

Фиг. 11A

VK антитела к CD73 11A6-1

```
V-сегмент:          VK1 / L15
J-сегмент:          JK4 / 4

     D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
1    GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

                            _CDR1_____________________________________
     R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A
52   AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

                                                                _CDR2___
     W   Y   Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A
103  TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

     _______________
     S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154  TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

     T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205  ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

                    _CDR3_____________________________
     Y   Y   C   Q   Q   Y   N   S   Y   P   L   T   F   G   G   G   T
256  TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC

     K   V   E   I   K
307  AAG GTG GAG ATC AAA
```

Фиг. 11B

VH антитела к CD73 24H2-1

```
      V-сегмент:   VH3 / 3-33
      D-сегмент:   D6 / 6-13
      J-сегмент:   JH3 / 3

        Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S
1      CAG GTG CAA CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC

                                                          _CDR1_________
        L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   N   Y   G   M
52     CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GGC ATG

                                                                  _CDR2___
        H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   V   I
103    CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA

        W   Y   D   G   G   N   K   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   F
154    TGG TAT GAT GGA GGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

        T   I   S   R   D   N   S   K   N   T   L   F   L   Q   M   N   S
205    ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TTT CTG CAA ATG AAC AGC

                                                          _CDR3_________
        L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   G   G   S   S
256    CTG AGA GCC GAA GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGC AGC AGC

        W   Y   P   D   A   F   D   I   W   G   Q   G   T   M   V   T   V
307    TGG TAC CCT GAT GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC

        S   S
358    TCT TCA
```

Фиг. 12A

VK антитела к CD73 24H2-1

```
         V-сегмент:          VK1 / L15
         J-сегмент:          JK4 / 4

        D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
1      GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

                                _CDR1_____________________________________
        R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A
52     AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

                                                                  _CDR2___
        W   Y   Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A
103    TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

        S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154    TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

        T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205    ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

                    _CDR3_____________________________
        Y   Y   C   Q   Q   Y   N   S   Y   P   L   T   F   G   G   G   T
256    TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC

        K   V   E   I   K
307    AAG GTG GAG ATC AAA
```

Фиг. 12B

VH антитела к CD73 5F8-1

```
      V-сегмент:   VH3 / 3-74
      D-сегмент:   D6 / 6-19
      J-сегмент:   JH4 / 4

        E   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   G   S
1      GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCC GGG GGA GGC TTA GTT CAG CCT GGG GGG TCC

                                                          _CDR1_________
        L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   S   Y   W   M
52     CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAC TGG ATG

                                                                  _CDR2___
        H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   V   W   V   S   R   I
103    CAC TGG GTC CGC CAA GCT CCA GGG AAG GGG CTG GTG TGG GTC TCA CGT ATT

        I   S   D   G   S   S   T   G   Y   A   D   S   V   K   G   R   F
154    ATT AGT GAT GGG AGT AGC ACA GGT TAC GCG GAT TCC GTG AAG GGC CGA TTC

        T   I   S   R   D   N   A   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S
205    ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT

                                                          _CDR3_________
        L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   E   F   S   S
256    CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCA AGA GAG TTT AGC AGT

        G   W   Y   F   D   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S
307    GGC TGG TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

Фиг. 13A

VK антитела к CD73 5F8-1

```
          V-сегмент:          VK1 / L18
          J-сегмент:          JK1 / 1

        A   I   Q   L   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
1      GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

                                _CDR1_____________________________________
        R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   A   L   A
52     AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC

                                                                    _CDR2___
        W   Y   Q   Q   K   P   G   K   A   P   K   L   L   I   Y   D   A
103    TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC

       _________________
        S   S   L   E   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154    TCC AGT TTG GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

        T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205    ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

                    _CDR3_________________________
        Y   Y   C   Q   Q   F   S   S   Y   P   R   T   F   G   Q   G   T
256    TAT TAC TGT CAA CAG TTT AGT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC

        K   V   E   I   K
307    AAG GTG GAA ATC AAA
```

Фиг. 13B

VH антитела к CD73 5F8-2

```
      V-сегмент:   VH3 / 3-74
      D-сегмент:   D6 / 6-19
      J-сегмент:   JH4 / 4

        E   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   G   S
1      GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCC GGG GGA GGC TTA GTT CAG CCT GGG GGG TCC

                                                        _CDR1_________
        L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   S   Y   W   M
52     CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAC TGG ATG

       ___                                                          _CDR2___
        H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   V   W   V   S   R   I
103    CAC TGG GTC CGC CAA GCT CCA GGG AAG GGG CTG GTG TGG GTC TCA CGT ATT

       _____________________________________________________________
        I   S   D   G   S   S   T   G   Y   A   D   S   V   K   G   R   F
154    ATT AGT GAT GGG AGT AGC ACA GGT TAC GCG GAT TCC GTG AAG GGC CGA TTC

        T   I   S   R   D   N   A   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S
205    ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT

                                                        _CDR3_________
        L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   E   F   S   S
256    CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCA AGA GAG TTT AGC AGT

       _____________________
        G   W   Y   F   D   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S
307    GGC TGG TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

Фиг. 14A

VK антитела к CD73 5F8-2

```
          V-сегмент:          VK1 / L15
          J-сегмент:          JK1 / 1

        D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
1      GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

                                _CDR1_____________________________________
        R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A
52     AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

                                                                    _CDR2___
        W   Y   Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A
103    TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

       _________________
        S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154    TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

        T   G   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205    ACA GGT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

                    _CDR3_________________________
        Y   Y   C   Q   Q   Y   N   S   Y   P   R   T   F   G   Q   G   T
256    TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC

        K   V   E   I   K
307    AAG GTG GAA ATC AAA
```

Фиг. 14B

VH антитела к CD73 5F8-3

V-сегмент: VH3 / 3-74
D-сегмент: D6 / 6-19
J-сегмент: JH4 / 4

```
        E   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   G   S
1      GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCC GGG GGA GGC TTA GTT CAG CCT GGG GGG TCC

                                                        _CDR1_________
        L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   S   Y   W   M
52     CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAC TGG ATG

       ___                                                      _CDR2___
        H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   V   W   V   S   R   I
103    CAC TGG GTC CGC CAA GCT CCA GGG AAG GGG CTG GTG TGG GTC TCA CGT ATT

       _____________________________________________________
        I   S   D   G   S   S   T   G   Y   A   D   S   V   K   G   R   F
154    ATT AGT GAT GGG AGT AGC ACA GGT TAC GCG GAT TCC GTG AAG GGC CGA TTC

        T   I   S   R   D   N   A   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S
205    ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT

                                                        _CDR3_________
        L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   E   F   S   S
256    CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCA AGA GAG TTT AGC AGT

       _____________________ _
        G   W   Y   F   D   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S
307    GGC TGG TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

Фиг. 15A

VK антитела к CD73 5F8-3

V-сегмент: VK3 / L6
J-сегмент: JK1 / 1

```
        E   I   V   L   T   Q   S   P   A   T   L   S   L   S   P   G   E
1      GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

                                _CDR1_____________________________________
        R   A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   Y   L   A
52     AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC

                                                                _CDR2___
        W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   D   A
103    TGG TAC CAA CAG AAA CCT GGG CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA

       _____________ _
        S   N   R   A   T   G   I   P   A   R   F   S   G   S   G   S   G
154    TCC AAC AGG GCC ACT GGG ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG

        T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   E   P   E   D   F   A   V
205    ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT

                        _CDR3_____________________
        Y   Y   C   Q   Q   R   S   N   W   W   T   F   G   Q   G   T   K
256    TAT TAC TGT CAG CAG CGT AGC AAC TGG TGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG

        V   E   I   K
307    GTG GAA ATC AAA
```

Фиг. 15B

VH антитела к CD73 6E11-1

V-сегмент: VH3 / 3-09
D-сегмент: D6 / 6-13
J-сегмент: JH4 / 4

```
        E   V   Q   L   V   E   S   G   G   A   L   V   Q   P   G   R   S
1      GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GCC TTG GTA CAG CCT GGC AGG TCC

                                                        _CDR1_________
        L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   D   D   Y   A   M
52     CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GCC ATG

       ___                                                      _CDR2___
        H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   S   G   I
103    CAC TGG GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATT

       _____________________________________________________
        T   W   N   S   G   G   I   G   Y   A   D   S   V   K   G   R   F
154    ACT TGG AAT AGT GGT GGC ATA GGC TAC GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC

        T   I   S   R   D   N   A   K   N   S   L   Y   L   Q   M   N   S
205    ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT

                                                        _CDR3_________
        L   R   A   E   D   T   A   L   Y   Y   C   A   K   D   R   Y   Y
256    CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCC TTG TAT TAC TGT GCA AAA GAT AGG TAT TAC

       _____________________________ _
        S   S   W   L   L   F   D   N   W   G   Q   G   I   L   V   T   V
307    AGC AGT TGG CTC CTC TTT GAC AAC TGG GGC CAG GGA ATT CTG GTC ACC GTC

        S   S
358    TCC TCA
```

Фиг. 16A

VK антитела к CD73 6E11-1

```
V-сегмент:        VK3 / A27
J-сегмент:        JK3 / 3

     E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E
1    GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

                                _CDR1___________________________________
     R   A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   S   Y   L
52   AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA

___                                                                 _CDR2
 A   W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G
103  GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT

_____________________
 A   S   S   R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S
154  GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT

 G   T   D   F   T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A
205  GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA

                        _CDR3___________________________
 V   Y   Y   C   Q   H   Y   G   S   S   F   T   F   G   P   G   T
256  GTG TAT TAC TGT CAG CAT TAT GGT AGC TCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC

 K   V   D   I   K
307  AAA GTG GAT ATC AAA
```

Фиг. 16B

VH антитела к CD73 7A11-1

```
V-сегмент:    VH3 / 3-09
D-сегмент:    D3 / 3-10
J-сегмент:    JH4 / 4

     E   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   L   V   Q   T   G   R   S
1    GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG ACT GGC AGG TCC

                                                        _CDR1_________
     L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   D   D   Y   A   M
52   CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GCC ATG

___                                                     _CDR2___
 H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   S   D   I
103  CAC TGG GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GAT ATT

_____________________________________________________
 S   W   N   S   D   I   I   G   Y   A   D   S   V   K   G   R   F
154  AGT TGG AAT AGT GAT ATT ATA GGC TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC

 T   I   S   R   D   N   A   K   N   S   L   Y   L   Q   M   N   S
205  ACC ATC TCT AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT

                                                        _CDR3_________
 L   R   A   E   D   T   A   L   Y   Y   C   A   K   D   I   Y   G
256  CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCC TTG TAT TAC TGT GCA AAA GAT ATT TAT GGT

_____________________________________
 S   G   S   S   F   F   D   Y   W   G   Q   G   I   L   V   T   V
307  TCG GGG AGT TCT TTT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ATC CTG GTC ACC GTC

 S   S
358  TCC TCA
```

Фиг. 17A

VK антитела к CD73 7A11-1

```
V-сегмент:        VK1 / L15
J-сегмент:        JK5 / 5

     D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
1    GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

                                _CDR1___________________________________
     R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   Y   I   S   S   W   L   A
52   AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG TAT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

                                                                _CDR2___
     W   Y   Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A
103  TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

_____________________
 S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154  TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

 T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205  ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

                        _CDR3___________________________
 Y   Y   C   Q   Q   Y   H   S   Y   P   P   T   F   G   Q   G   T
256  TAT TAC TGC CAA CAG TAT CAT AGT TAC CCT CCC ACC TTC GGC CAA GGG ACA

 R   L   E   I   K
307  CGA CTG GAG ATT AAA
```

Фиг. 17B

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA**A**SGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSWYPDSFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDK
TVERK**S**CVECPPCPAPPVAGPSVTLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP**SS**IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPG

Не подчеркнуто: VH

CDR1, 2 и 3

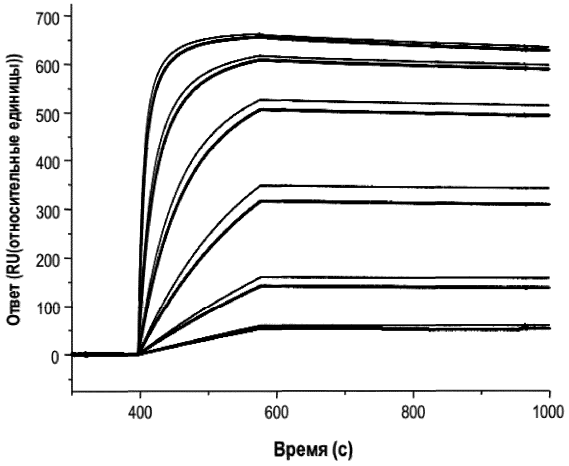
CH1

Шарнир

CH2

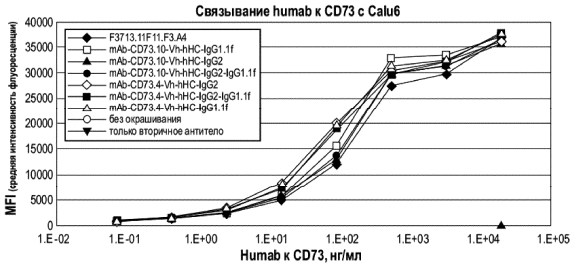
CH3

Фиг. 18

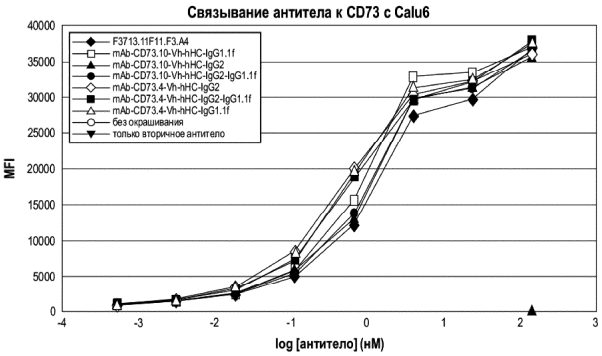


Фиг. 19

нг/мл	20000	3333.33	555.56	92.59	15.43	2.57	0.43	0.07	Kd (нг/мл)
F3713.11F11.F3.A4	36600	29700	27400	12100	4828	2253	1293	788	**188.18**
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f	36900	33400	32800	15600	5598	2272	1505	822	**126.85**
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2	35700	31200	29600	13000	5860	2310	1316	843	**162.27**
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	36500	31300	30000	13600	5143	2383	1192	706	**156.46**
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2	37400	32000	30500	19800	8250	3176	1810	1148	**82.57**
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	37700	32000	29700	18500	7275	2858	1732	1076	**96.41**
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f	36000	32400	31300	18800	7315	3104	1633	793	**85.00**
без окрашивания	-8.27								
только вторичное антитело	30.3								

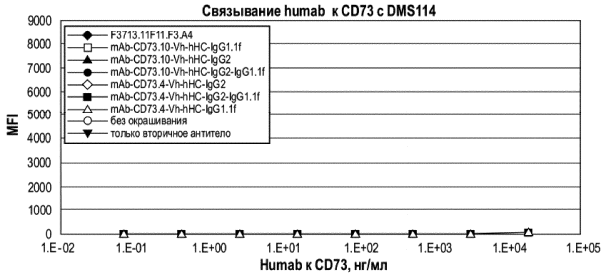


Фиг. 20A1

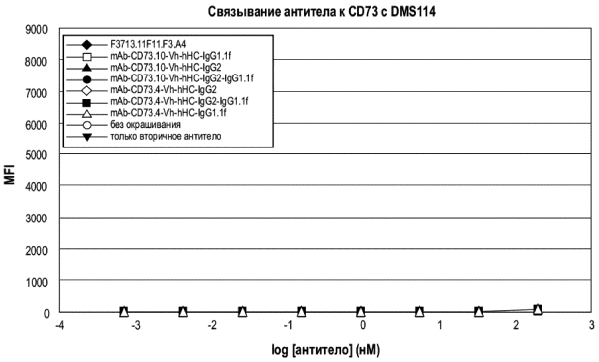


Фиг. 20A2

нг/мл	20000	3333.33	555.56	92.59	15.43	2.57	0.43	0.07
F3713.11F11.F3.A4	96.2	37.6	29.7	30.2	31.3	20.9	30.7	23.1
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f	59.2	33.5	30.4	29.1	25.6	20	25.4	20.8
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2	58.1	27.8	28.2	31.4	31	20.5	23.8	21.4
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	59.6	35.5	29.1	23.2	29.5	23.6	23.9	23.2
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2	132	40.9	35.7	25.9	29	20.8	26	18.6
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	129	36.5	23.8	24.7	23.1	19.2	26.4	21.9
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f	96.6	48.1	28.4	28.3	28.2	25.3	25.7	21.4
без окрашивания	0.378							
только вторичное антитело	39.5							

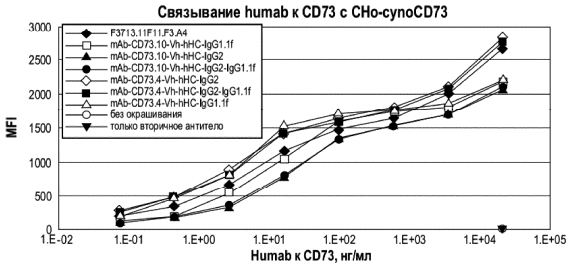


Фиг. 20B1

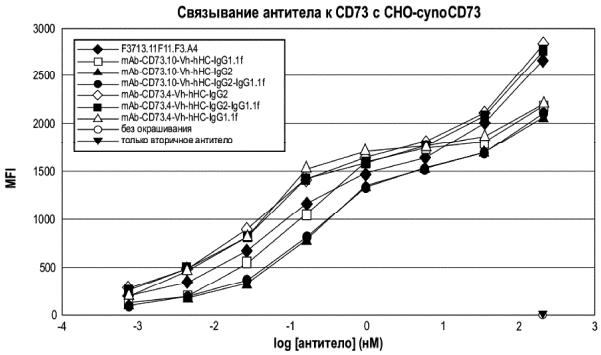


Фиг. 20B2

нг/мл	20000	3333.33	555.56	92.59	15.43	2.57	0.43	0.07	Kd (нг/мл)
F3713.11F11.F3.A4	2656	1994	1638	1474	1152	670	342	200	**20.73**
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f	2159	1802	1738	1594	1054	542	207	129	**16.74**
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2	2060	1698	1528	1350	775	326	173	118	**26.59**
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	2101	1690	1529	1336	807	371	193	104	**25.69**
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2	2814	2092	1804	1644	1420	891	487	289	**15.55**
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	2753	2072	1755	1573	1426	804	487	255	**14.75**
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f	2186	1855	1758	1703	1515	816	458	202	**7.11**
без окрашивания	4.81								
только вторичное антитело	18.5								

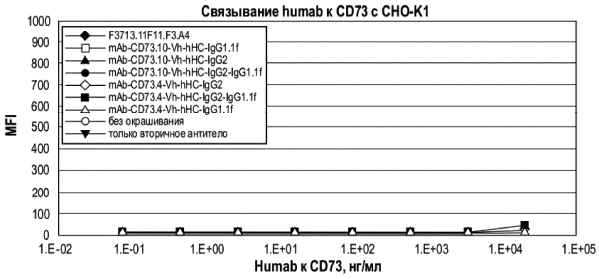


Фиг. 20C1

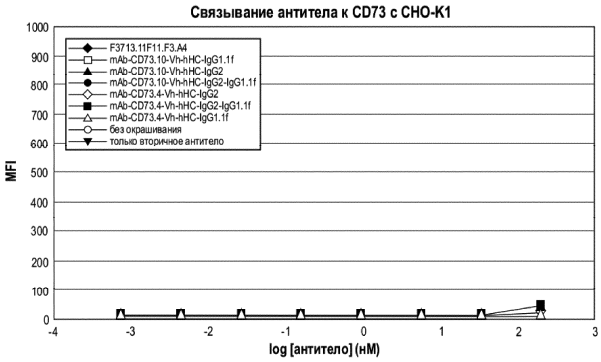


Фиг. 20C2

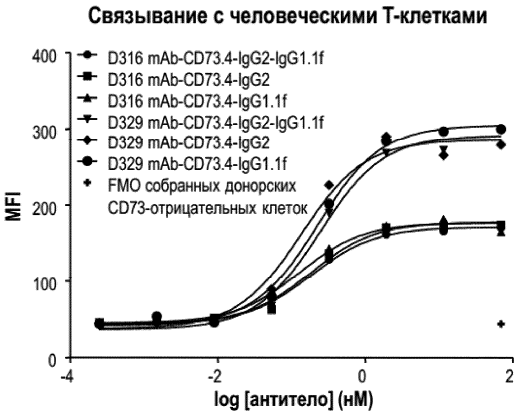
нг/мл	20000	3333.33	555.56	92.59	15.43	2.57	0.43	0.07
F3713.11F11.F3.A4	22.2	15.4	15.9	13.9	14.1	17.3	14.7	17.1
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f	21.6	20.4	15.4	16.5	12	13.5	10.3	18.9
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2	17.9	12.9	10.5	14	13.9	17.9	15.1	7.57
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	13	14.7	13.2	14.4	10.9	11.6	14.5	14.9
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2	42.6	15	13.3	9.42	9.74	16.7	11.3	9.5
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	44.6	10.9	11.7	6.92	7.34	8.06	12.2	12.9
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f	17.5	12.5	11.1	14.8	15.6	13.3	7.81	6.31
без окрашивания	6.85							
только вторичное антитело	12.7							



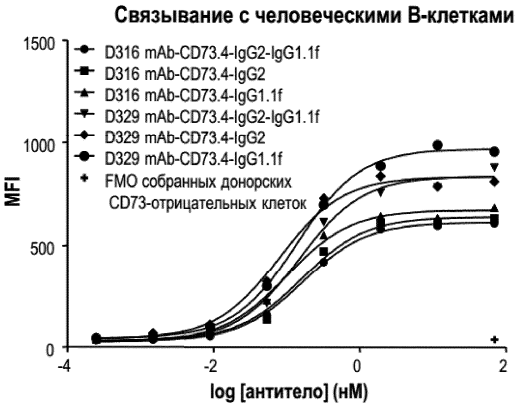
Фиг. 20D1



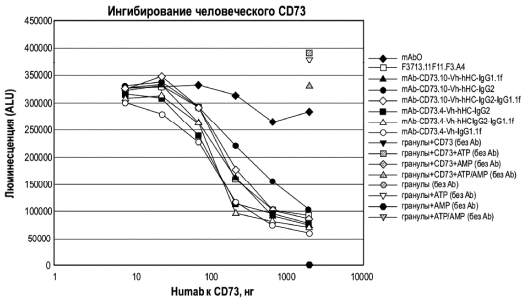
Фиг. 20D2



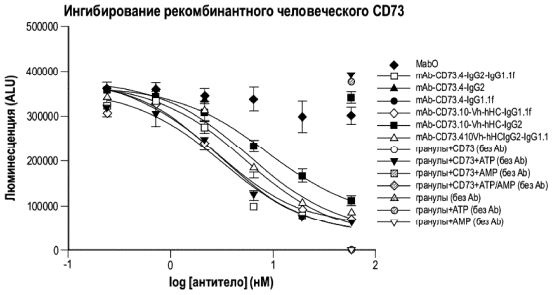
Фиг. 20E



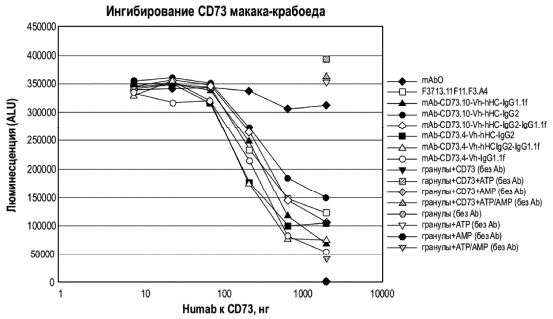
Фиг. 20F



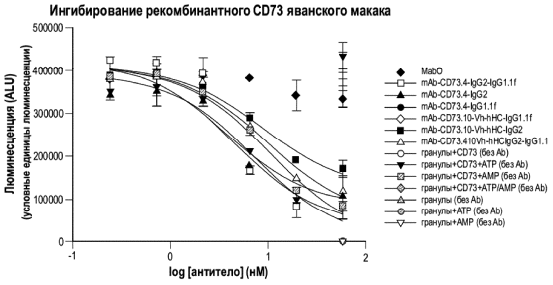
Фиг. 21A1



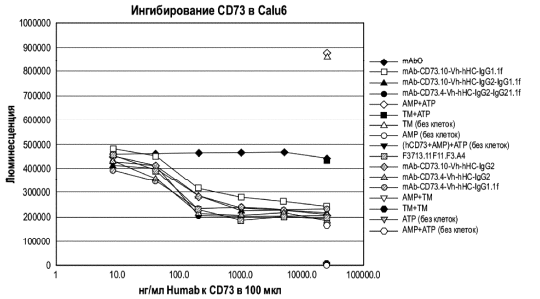
Фиг. 21A2



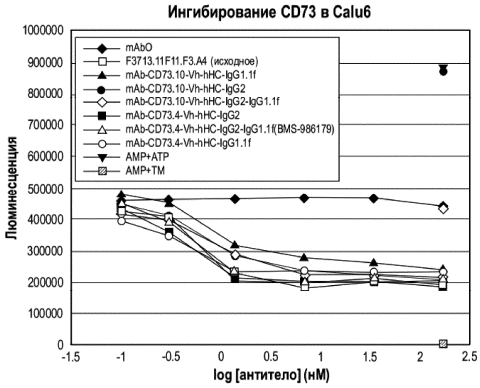
Фиг. 21B1



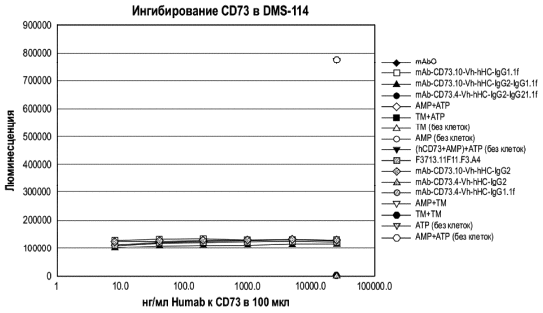
Фиг. 21B2



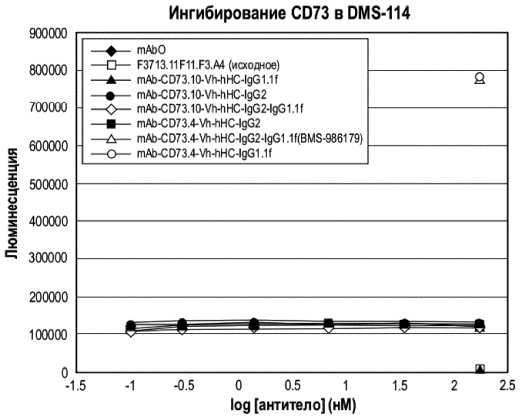
Фиг. 22A1



Фиг. 22A2



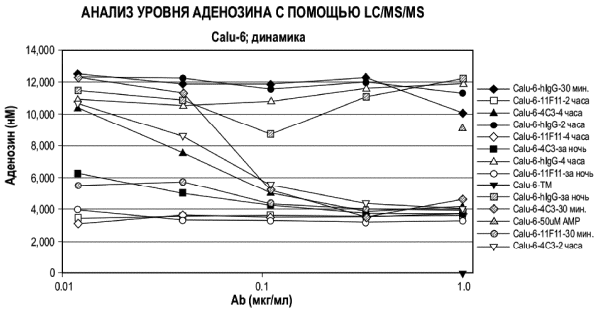
Фиг. 22B1



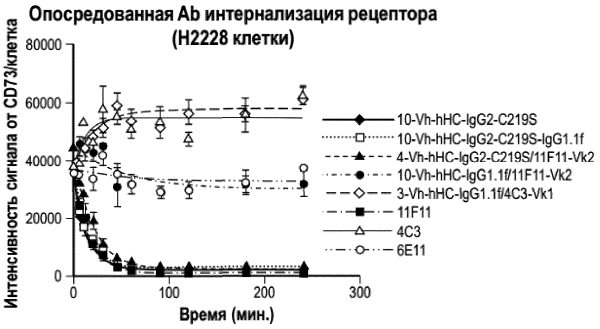
Фиг. 22B2

	Анализ cAMP (Calu-6+HEK/A2AR)			Интернализация (Calu-6)		
ID клона	EC50, нМ	YMAX	График	EC50, нМ	YMAX	График
11F11	0,64	95	MDA-001271.01-001	0,26	100	MDA-001271.01-001
11F11 Fab	Неактивно		CTL-000001.01-001	Неактивно		CTL-000001.01-001
11F11 Fab'2	0,49	87	CTL-000001.01-001	0,10	110	CTL-000001.01-001

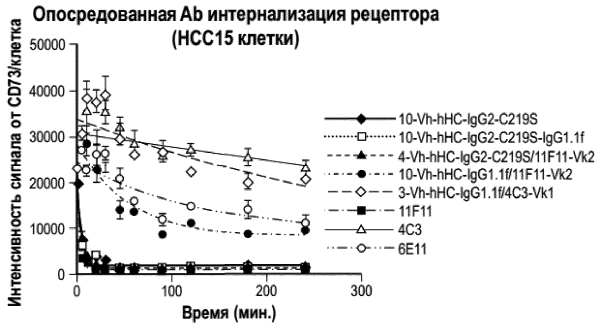
Фиг. 22C



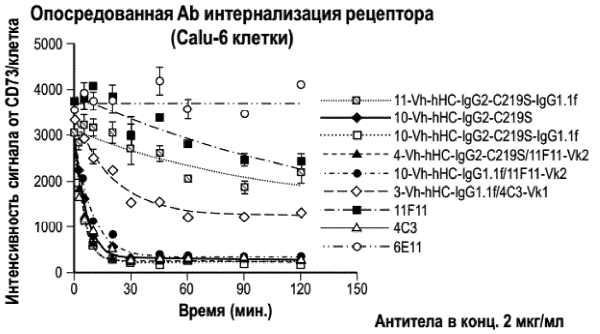
Фиг. 22D



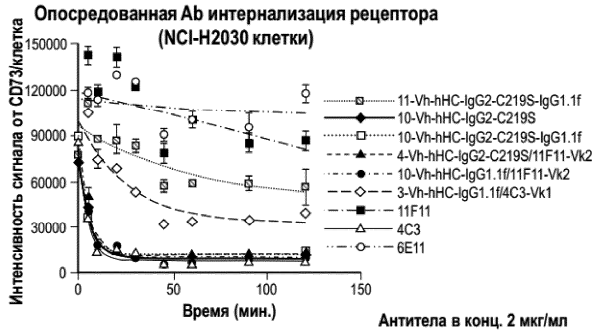
Фиг. 23A



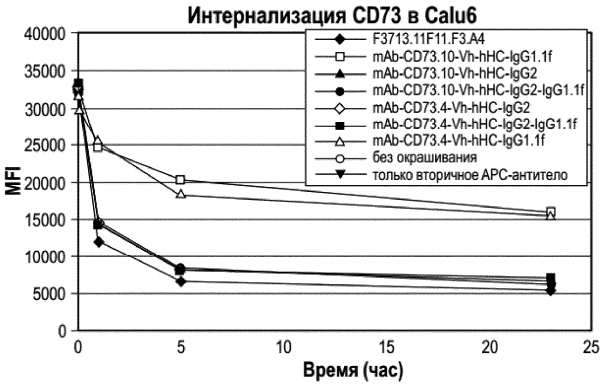
Фиг. 23B



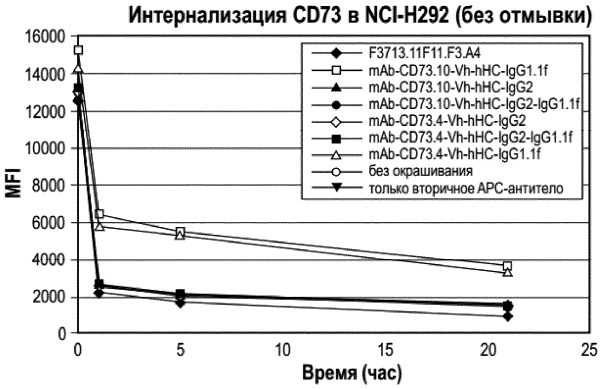
Фиг. 23C



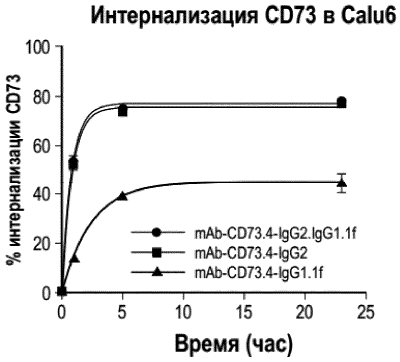
Фиг. 23D



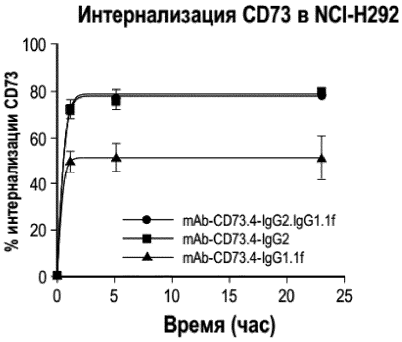
Фиг. 23E



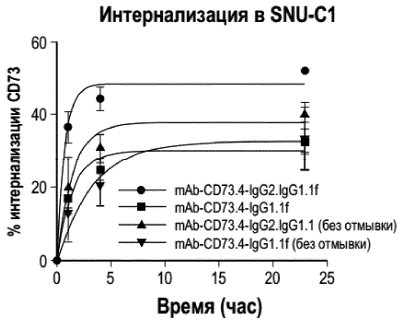
Фиг. 23F



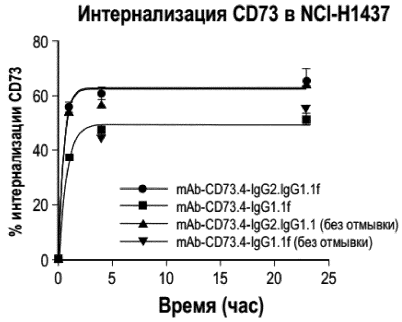
Фиг. 23G



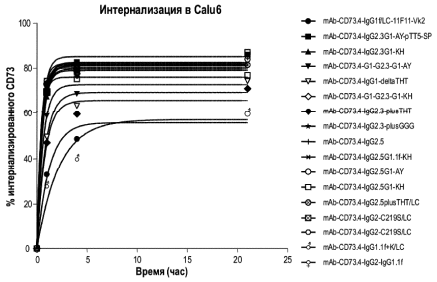
Фиг. 23H



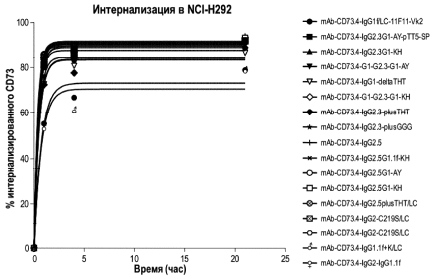
Фиг. 23I



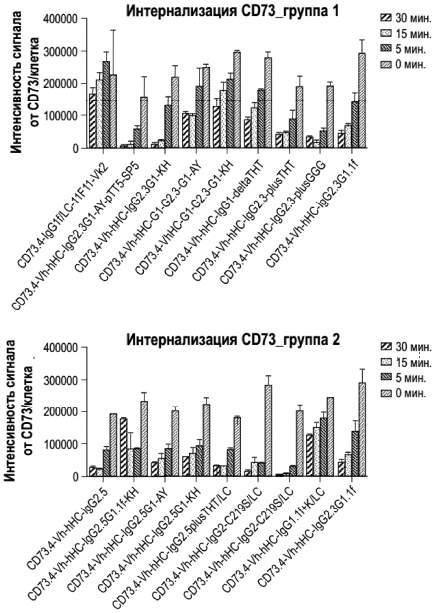
Фиг. 23J



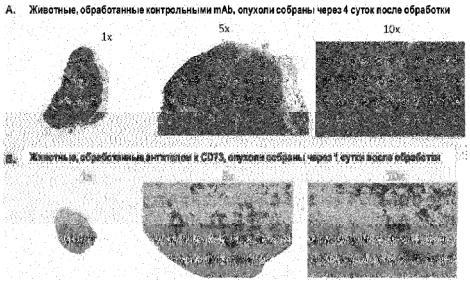
Фиг. 23K



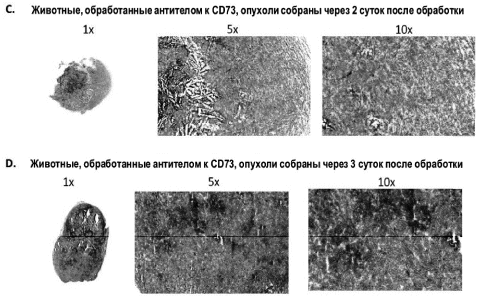
Фиг. 23L



Фиг. 23M

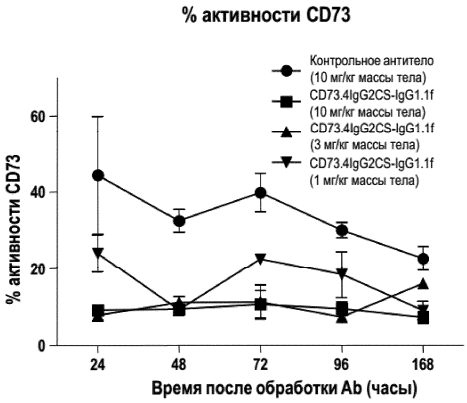


Фиг. 24A, B



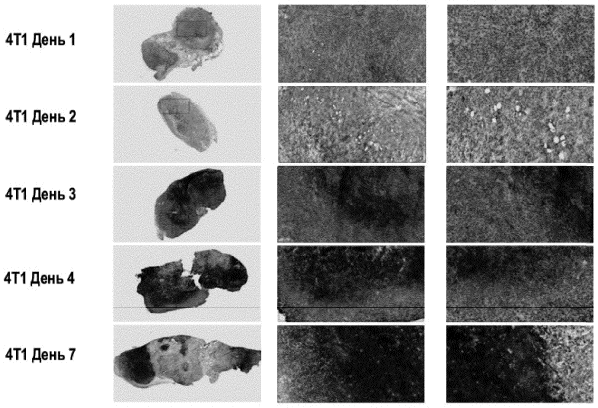
Фиг. 24C, D

Фиг. 24E

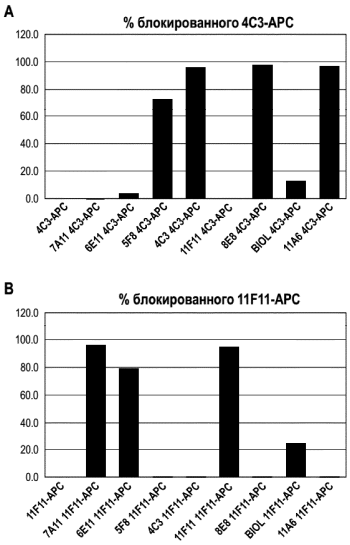


Фиг. 24F

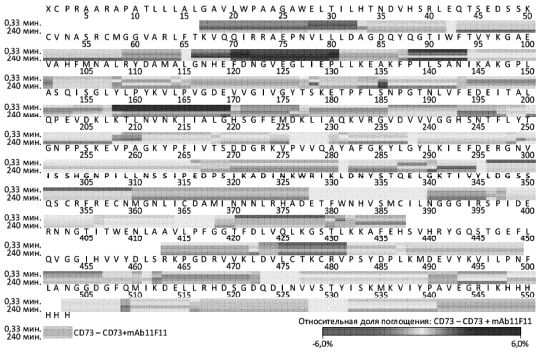
Фиг. 25A



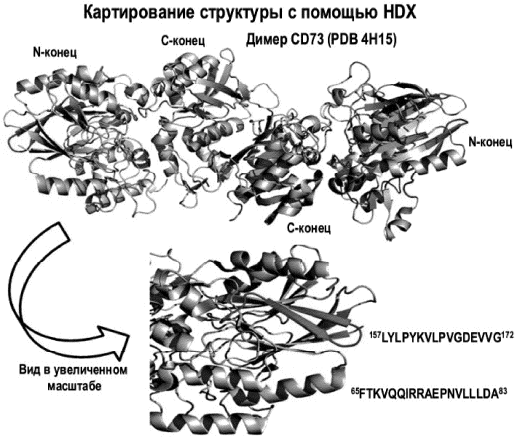
Фиг. 25B



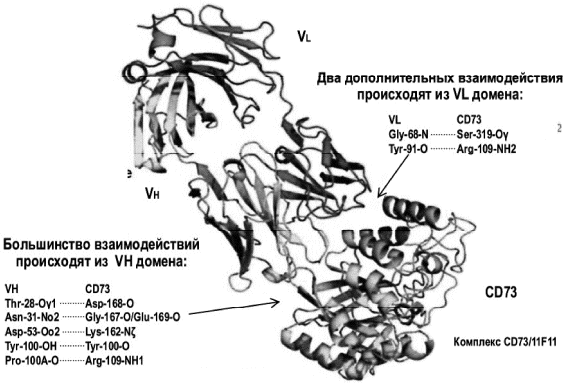
Фиг. 26A, B



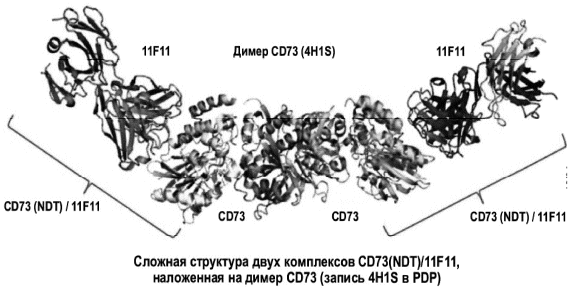
Фиг. 27A



Фиг. 27B

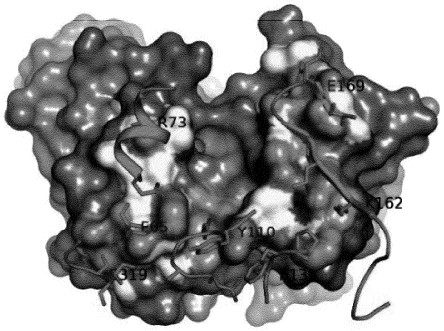


Фиг. 28A



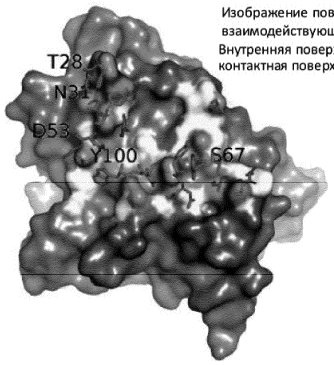
Фиг. 28B

Изображение поверхности 11F11 (серым) с взаимодействующими остатками CD73(пурпурным). Внутренняя поверхность показаны желтым и контактная поверхность показана оранжевым



Фиг. 28C

Изображение поверхности CD73 (серым) с взаимодействующими остатками 11F11 (пурпурным). Внутренняя поверхность показана желтым и контактная поверхность показана оранжевым



Фиг. 28D

Таблица 25. Данные SEC-MALS для комплексов CD73/mAb

Мишень	mAb	Молярное отношение	Мишень (мкМ)	[mAb] (мкМ)	UV-время элюирования (мин.)				SEC UV- интегрирование в %				MW (кДа)			
					Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 4	Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 4	Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 4
	CD73.10-IgG1.1f	0:1		4	~2.0	~14.0	~17.3		0.3	0.3	99.4		n/a	62	140	
	CD73.10-IgG2-C219S	0:1		4	~2.0	~17.5			0.1	99.5			73	150		
	CD73.3-IgG1.1f	0:1		4	~16.3				100.0				150			
	11F11-Fab	0:1		8	~2.0	~17.7	~20.2		0.8	0.6	98.7		n/a	19	47	
hCD73-his		1:0	4		~17.1	~18.4			2.8	97.2			280	120		
N-hCD73-his		1:0	8		~19.3				100.0				38			
hCD73-his	CD73.10-IgG1.1f	1:1	4	4	~11.7	~12.7	~16.9		34.2	67.2	3.0		1100	540	180	
hCD73-his	CD73.10-IgG2-C219S	1:1	4	4	~10.3	~11.1			6.4	93.3			110000	3400		
hCD73-his	CD73.3-IgG1.1f	1:1	4	4	~12.0	~13.0	~14.8		17.5	78.3	4.0		960	530	260	
hCD73-his	11F11-Fab	1:2	4	8	~12.6	~14.7	~16.8	~20.1	0.9	90.7	0.8	7.7	300	310	85	40
N-hCD73-his	CD73.10-IgG1.1f	2:1	8	4	~14.6	~17.1			86.5	13.5			210	140		
N-hCD73-his	CD73.10-IgG2-C219S	2:1	8	4	~14.7	~17.3			87.1	12.9			210	150		
N-hCD73-his	CD73.3-IgG1.1f	2:1	8	4	~15.3	~16.2	~19.3		6.4	68.7	24.9		170	160	42	
N-hCD73-his	11F11-Fab	1:1	8	8	~17.4	~20.0			95.3	4.7			84	44		
hCD73		1:0	2.5	0	~16.9				100.0				120			
hCD73	CD73.4-гибрид	1:0.25	2.5	0.625	~11.8	~13.4	~17.1		42.0	21.6	36.4		1200	520	120	
hCD73	CD73.4-гибрид	1:0.5	2.5	1.25	~11.7	~13.4	~17.1		71.9	15.8	13.4		1900	540	130	
hCD73	CD73.4-гибрид	1:1	2.5	2.5	~11.5	~13.4	~17.1		95.3	1.9	2.8		3300	1000	530	
hCD73	CD73.4-гибрид	1:2	2.5	5	~11.7	~13.4	~15.3	~17.1	52.5	17.7	0.6	29.3	1700	500	220	140
hCD73	CD73.4-гибрид	1:4	2.5	10	~11.7	~13.4	~15.3	~17.1	24.1	16.2	1.2	58.8	1300	500	200	140
hCD73		1:0	2.5	0	~16.9	~18.2			97.6	2.4			120	73		
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:0.25	2.5	0.625	~12.3	~13.1	~17.1		11.8	49.5	38.6		830	530	120	
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:0.5	2.5	1.25	~12.3	~13.1	~17.1		31.1	54.8	3.3	10.7	890	540	120	81
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:1	2.5	2.5	~12.1	~12.3	~13.1	~17.0	55.2	44.5	2.1	2.2	1100	560	280	160
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:2	2.5	5	~12.3	~13.1	~15.3	~17.0	22.3	44.1	2.8	30.7	910	530	210	140
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:4	2.5	10	~12.3	~13.2	~15.5	~17.0	9.1	31.0	2.4	57.4	810	510	200	140
N-hCD73	CD73.4-гибрид	1:1	5	2.5	~13.9	~14.7	~15.9	~17.0	0.7	88.3	8.1	2.8	390	210	180	150
N-hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:1	5	2.5	~13.4	~14.7			1.7	98.3			360	210		
	CD73.4-гибрид	0:1	0	5	~15.9	~16.9			0.4	99.6			290	140		
	CD73.4-IgG1.1f	0:1	0	5	~14.2	~15.9	~17.1		0.8	1.2	98.2		81	120	140	
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S	1:1	2.5	2.5	~11.5	~13.4	~17.3		95.0	2.1	2.8		3400	970	480	
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f	1:1	2.5	2.5	~11.5	~13.4	~17.3		94.7	2.3	3.0		3600	1100	580	
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:1	2.5	2.5	~11.7	~13.0	~15.1	~17.0	60.0	35.3	2.3	2.5	1300	550	270	160
hCD73	CD73.10-IgG2-C219S	1:1	2.5	2.5	~11.8	~16.9			96.2	3.2			2000	310		
hCD73	CD73.10-IgG2CS-1.1	1:1	2.5	2.5	~11.8	~16.9			96.6	2.5	0.9		2000	320	390	
hCD73	CD73.10-IgG1.1f	1:1	2.5	2.5	~12.1	~13.0	~16.5		35.1	62.1	2.7		1000	530	170	
hCD73		1:0	2.5	0	~17.3	~18.4			97.2	2.8			120	60		
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f	1:1	5	5	~11.5	~13.4	~17.3		93.9	2.6	3.5		4800	1300	740	
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f	1:1	1	1	~11.5	~13.4	~15.0	~17.3	84.4	7.6	2.5	5.4	2900	660	460	240

* Молярные концентрации определены для мономера N-hCD73, мономера 11F11-Fab, димера hCD73-his и mAb (бивалентное)

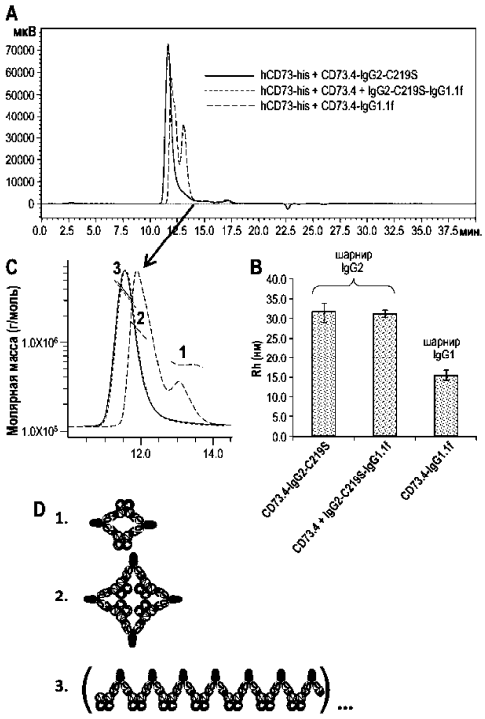
Фиг. 29A

Таблица 26. Данные DLS для комплексов CD73/mAb

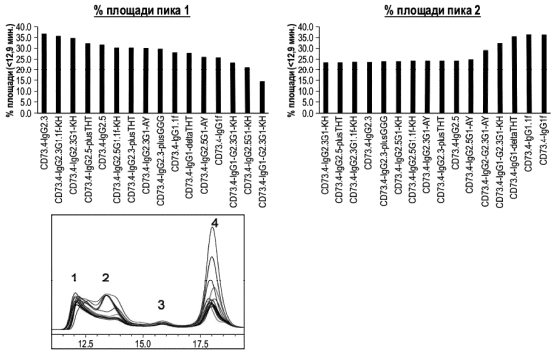
Мишень	mAb	Молярное отношение*	мишень] (мкМ)	[mAb] (мкМ)	DLS					
					Rh	Rh SD	%Pd	%Pd SD	Масса, %	SD %массы
	CD73.10-IgG1.1f	0:1		4	5.0	0.6	11.0	6.0	100.0	0.0
	CD73.10-IgG2-C219S	0:1		4	5.2	0.1	11.9	2.3	100.0	0.0
	CD73.3-IgG1.1f	0:1		4	5.1	0.5	11.6	6.9	100.0	0.0
	11F11-Fab	0:1		8	3.4	0.2	22.0	5.3	100.0	0.1
hCD73-his		1:0	4		4.3	0.3	10.6	5.2	99.8	0.2
N-hCD73-his		1:0	8		2.3	0.2	19.3	12.3	99.9	0.2
hCD73-his	CD73.10-IgG1.1f	1:1	4	4	12.8	0.7	32.4	6.7	100.0	0.0
hCD73-his	CD73.10-IgG2-C219S	1:1	4	4	2.9	1.5	7.5	0.8	73.9	11.5
hCD73-his	CD73.3-IgG1.1f	1:1	4	4	10.8	0.1	28.2	0.6	100.0	0.0
hCD73-his	11F11-Fab	1:2	4	8	6.4	0.1	15.1	4.3	100.0	0.0
N-hCD73-his	CD73.10-IgG1.1f	2:1	8	4	6.6	0.3	15.3	6.5	100.0	0.0
N-hCD73-his	CD73.10-IgG2-C219S	2:1	8	4	6.5	0.2	15.7	5.7	100.0	0.1
N-hCD73-his	CD73.3-IgG1.1f	2:1	8	4	5.8	0.3	12.8	5.3	100.0	0.0
N-hCD73-his	11F11-Fab	1:1	8	8	4.2	0.1	12.6	4.7	100.0	0.0
hCD73		1:0	2.5	0	4.5	0.1	12.3	4.3	99.9	0.2
hCD73	CD73.4-гибрид	1:0.25	2.5	0.625	13.2	1.7	46.5	5.9	99.9	0.1
hCD73	CD73.4-гибрид	1:0.5	2.5	1.25	17.5	1.0	31.7	8.8	62.6	25.8
hCD73	CD73.4-гибрид	1:1	2.5	2.5	29.9	1.0	25.1	2.1	22.3	4.9
hCD73	CD73.4-гибрид	1:2	2.5	5	14.4	0.1	31.3	5.5	68.7	25.8
hCD73	CD73.4-гибрид	1:4	2.5	10	11.4	0.9	42.9	3.5	90.2	17.5
hCD73		1:0	2.5	0	4.7	0.1	18.6	3.3	99.8	0.1
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:0.25	2.5	0.625	10.4	1.5	38.6	15.9	81.3	37.1
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:0.5	2.5	1.25	12.9	0.6	35.5	5.4	88.3	23.2
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:1	2.5	2.5	14.7	0.5	34.3	3.9	100.0	0.0
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:2	2.5	5	11.6	0.4	24.9	8.5	65.0	32.5
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:4	2.5	10	8.1	4.0	33.0	16.9	84.2	31.7
N-hCD73	CD73.4-гибрид	1:1	5	2.5	6.7	0.3	13.9	7.0	100.0	0.0
N-hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:1	5	2.5	6.5	0.1	7.4	3.2	100.0	0.0
	CD73.4-гибрид	0:1	0	5	5.4	0.2	15.7	5.7	99.9	0.1
	CD73.4-IgG1.1f	0:1	0	5	5.3	0.4	13.6	7.9	100.0	0.0
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S	1:1	2.5	2.5	31.7	2.4	31.6	11.4	19.3	12.2
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f	1:1	2.5	2.5	31.2	0.9	30.8	3.8	17.5	11.4
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:1	2.5	2.5	15.6	1.2	32.7	8.0	100.0	0.0
hCD73	CD73.10-IgG2-C219S	1:1	2.5	2.5	23.9	1.2	26.7	4.4	36.3	5.3
hCD73	CD73.10-IgG2CS-1.1	1:1	2.5	2.5	25.6	2.3	30.1	8.8	35.9	9.1
hCD73	CD73.10-IgG1.1f	1:1	2.5	2.5	13.5	1.2	31.6	12.0	83.2	31.5
hCD73		1:0	2.5	0	4.2	0.8	24.4	12.8	99.1	0.7
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f	1:1	5	5	35.3	3.8	35.2	13.9	6.7	4.4
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f	1:1	1	1	25.5	3.2	32.9	2.9	60.7	27.5

* Молярные концентрации определены для мономера N-hCD73, мономера 11F11-Fab, димера hCD73-his и mAb (бивалентного)

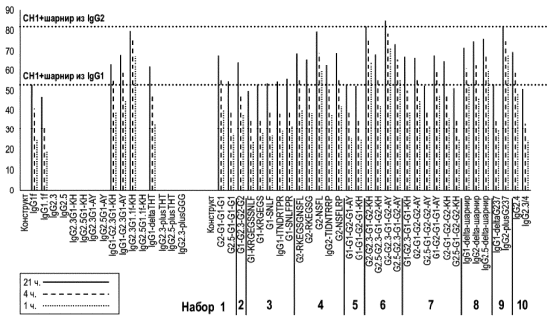
Фиг. 29B



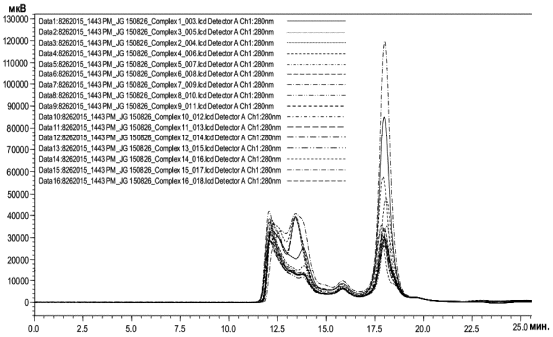
Фиг. 30A-D



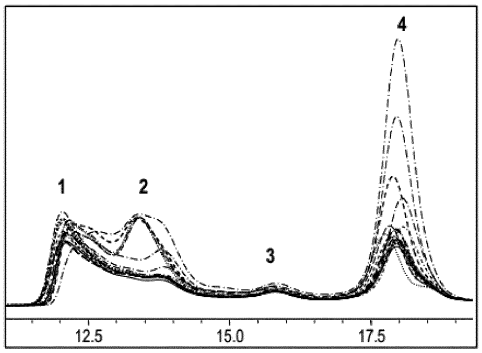
Фиг. 30E



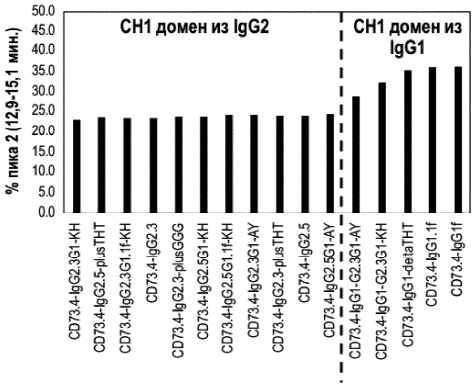
Фиг. 31



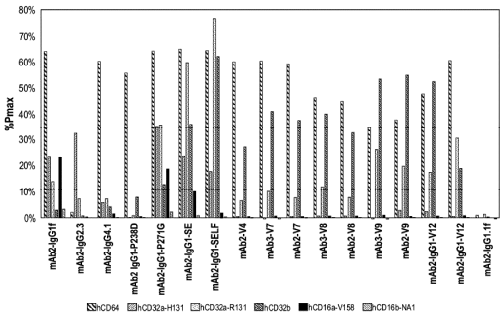
Фиг. 32A



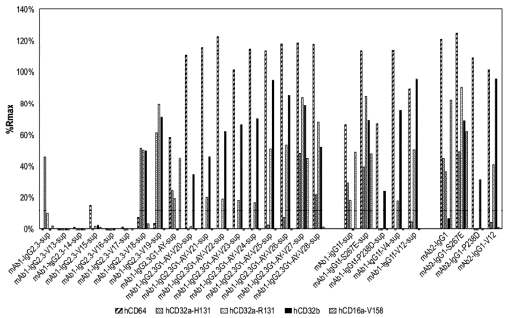
Фиг. 32B



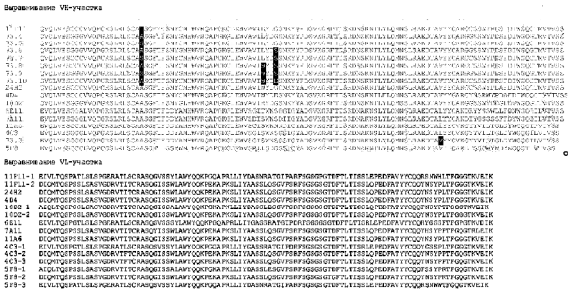
Фиг. 32C



Фиг. 33



Фиг. 34



Фиг. 35