

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290535 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.04

(22) Дата подачи заявки
2020.09.04

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К CD73

(31) 62/896,908
(32) 2019.09.06
(33) US
(86) PCT/EP2020/074804
(87) WO 2021/044005 2021.03.11
(71) Заявитель:
СЮМФОГЕН А/С (DK)

(72) Изобретатель:
Грандаль Микаэль Монрад, Геттинг
Торбен (DK), Лантто Юхан (SE),
Якобсен Янус Скоу, Хансен Ранди
Вест, Фрёлих Камилла (DK)
(74) Представитель:
Веселицкая И.А., Веселицкий М.Б.,
Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов
Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В.,
Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(57) В изобретении предложены антитела к CD73 и способы их применения для лечения заболеваний и состояний, связанных с активностью CD73, например рака.

202290535

A1

A1

202290535

АНТИТЕЛА К CD73

5 Перекрестная ссылка на родственную заявку

Настоящая заявка притязает на приоритет предварительной заявки на патент США 62/896908, поданной 6 сентября 2019 г., описание которой в полном объеме включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Перечень последовательностей

10 Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который представлен в электронном виде в формате ASCII, и в полном объеме включен в настоящее описание в качестве ссылки. Электронная копия перечня последовательностей, созданная 1 сентября 2020 г., обозначена как 022675_WO055_SL.txt и ее размер составляет 30355 байт.

15 Предпосылки создания изобретения

Опухолевые клетки находятся в сложном микроокружении (микроокружение опухоли или TME), которое влияет на каждую стадию онкогенеза. В TME повышенные концентрации иммуномодулирующих факторов, таких как аденозин, помогают опухолевым клеткам ускользать от
20 противоопухолевого иммунного ответа хозяина.

Аденозин связывается с четырьмя различными рецепторами (AR), которые экспрессируются на различных иммунных клетках, таких как CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки и естественные клетки-киллера (NK). Каждый из указанных пуринергических рецепторов, связанных с G-белком, т.е. A1R, A2AR, A2BR и
25 A3R, обладает различными свойствами и характеризуется различным распределением в клетке и ткани. Связывание аденозина с AR подавляет противоопухолевый ответ Т-клеток и NK-клеток, а также способствует развитию и активации иммуносупрессорных клеток, таких как регуляторные Т-клетки (Treg) и супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC), облегчая
30 тем самым развитие рака. Помимо иммунорегуляторного действия аденозиновых рецепторов, передача ими сигналов может также непосредственно влиять на выживаемость и пролиферацию раковых клеток.

Накопление аденозина в ТМЕ опосредуется ферментами клеточной поверхности CD73 и CD39, которые действуют в пути превращения внеклеточного АТФ в аденозин. CD73, который обозначают также как 5'-NT, представляет собой внеклеточный фермент, состоящий из двух субъединиц с молекулярной массой 65 кДа, сцепленных с помощью альфа-спирального линкера с образованием гомодимера. CD73, для которого характерна сверхэкспрессия многими раковыми клетками, опосредует гидролиз 5'-АМФ в аденозин, прежде всего в условиях гипоксии опухолей. Исследования продемонстрировали, что высокий уровень экспрессии CD73 приводит к ухудшенному прогнозу при различных видах рака, таких как трижды негативный рак молочной железы, рак легкого, рак яичника, рак почки, рак желудка и меланома. Ингибирование CD73 может быть эффективным подходом к терапии рака.

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящем описании предложены новые рекомбинантные антитела, таргетирующие CD73, а также фармацевтические композиции, содержащие одно или несколько указанных антител, и применение антител и фармацевтических композиций для лечения рака. По сравнению с доступными в настоящее время путями лечения указанных видов рака, предполагается, что антитела и композиции, указанные в настоящем описании, могут обеспечивать улучшенный клинический ответ либо индивидуально, либо в комбинации с другим противораковым терапевтическим средством.

Некоторые объекты изобретения, представленные в настоящем описании? относятся к антителу к CD73 или его антигенсвязывающему участку, где антитело связывается с тем же эпитопом человеческого CD73, что и антитело, которое содержит:

- а) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и 41, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 42;
- б) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и 41, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 42;

в) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11 и 41, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15 и 42; или

5 г) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 12 и 41, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16 и 42.

В некоторых вариантах осуществления изобретения тяжелая цепь указанного антитела содержит:

I) гипервариабельные участки тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 17-19 соответственно;

10 II) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9;

III) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; или

15 IV) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и 41;

и легкая цепь указанного антитела содержит:

I) гипервариабельные участки легкой цепи (L-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 20-22 соответственно;

20 II) вариабельный домен легкой цепи (VL), который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13;

III) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; или

25 IV) легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 42.

В некоторых вариантах осуществления изобретения тяжелая цепь указанного антитела содержит:

30 I) гипервариабельные участки тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23-25 соответственно;

II) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10;

III) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10;
или

IV) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности
SEQ ID NO: 10 и 41;

5 и легкая цепь указанного антитела содержит:

I) гипервариабельные участки легкой цепи (L-CDR)-1-3, содержащие
аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 26-28 соответственно;

10 II) вариабельный домен легкой цепи (VL), который содержит
аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную
аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14;

III) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;
или

IV) легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности
SEQ ID NO: 14 и 42.

15 В некоторых вариантах осуществления изобретения тяжелая цепь
указанного антитела содержит:

I) гипервариабельные участки тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, содержащие
аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 29-31 соответственно;

20 II) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), который содержит
аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную
аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11;

III) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11;
или

25 IV) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности
SEQ ID NO: 11 и 41;

и легкая цепь указанного антитела содержит:

I) гипервариабельные участки легкой цепи (L-CDR)-1-3, содержащие
аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 32-34 соответственно;

30 II) вариабельный домен легкой цепи (VL), который содержит
аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную
аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15;

III) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;
или

IV) легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15 и 42.

В некоторых вариантах осуществления изобретения тяжелая цепь указанного антитела содержит:

5 I) гипервариабельные участки тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 35-37 соответственно;

II) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12;

10 III) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; или

IV) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 12 и 41;

и легкая цепь указанного антитела содержит:

15 I) гипервариабельные участки легкой цепи (L-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 38-40 соответственно;

II) вариабельный домен легкой цепи (VL), который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16;

20 III) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; или

IV) легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16 и 42.

25 В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложено антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, где указанное антитело содержит H-CDR1-3 и L-CDR1-3, которые имеют аминокислотные последовательности:

a) SEQ ID NO: 17-22 соответственно;

б) SEQ ID NO: 23-28 соответственно;

30 в) SEQ ID NO: 29-34 соответственно; или

г) SEQ ID NO: 35-40 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложено антитело к CD73 или его

антигенсвязывающий участок, где указанное антитело содержит аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи и аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи, которые по меньшей мере на 90% идентичны аминокислотным

5 последовательностям:

- а) SEQ ID NO: 9 и 13 соответственно;
- б) SEQ ID NO: 10 и 14 соответственно;
- в) SEQ ID NO: 11 и 15 соответственно; или
- г) SEQ ID NO: 12 и 16 соответственно.

10 В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложено антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, где указанное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, которые содержат аминокислотные последовательности:

- 15
- а) SEQ ID NO: 9 и 13 соответственно;
 - б) SEQ ID NO: 10 и 14 соответственно;
 - в) SEQ ID NO: 11 и 15 соответственно; или
 - г) SEQ ID NO: 12 и 16 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в
20 настоящем описании, предложено антитело к CD73, которое содержит:

- а) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и 41, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 42;
- б) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и
25 41, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 42;
- в) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11 и 41, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15 и 42; или
- г) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 12 и
30 41, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16 и 42.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложено антитело к CD73 или его

антигенсвязывающий участок, которые связываются с эпитопом на человеческом CD73, содержащим:

- а) аминокислотные остатки R73, R109 и D168 в SEQ ID NO: 43;
- б) аминокислотный остаток R109 в SEQ ID NO: 43; или
- в) аминокислотные остатки I301, S302 и H304 в SEQ ID NO: 43.

5

В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложено антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, которые связываются с эпитопом на человеческом CD73, содержащим:

- а) аминокислотные остатки 27-31, 61-75 и 161-170 в SEQ ID NO: 43;
- б) аминокислотные остатки 61-70 и 161-170 в SEQ ID NO: 43; или
- в) аминокислотные остатки 27-31, 266-270 и 291-305 в SEQ ID NO: 43.

10

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанные в описании, обладает по меньшей мере одним из следующих свойств:

15

- а) ингибирует активность растворимого CD73 *in vitro*;
- б) ингибирует активность CD73 на клетках Calu-6 *in vitro*;
- в) ингибирует активность CD73 на клетках H292 *in vitro*;
- г) специфически связывается с CD73 человека и обезьян циномолгус,

20

который экспрессируется на клетках CHO-S;

д) связывается с ECD человеческого CD73 с K_D 1нМ или менее при оценке с помощью SPR;

е) связывается с ECD CD73 обезьян циномолгус с K_D 0,7нМ или менее при оценке с помощью SPR;

25

ж) не связывается с тем же эпитопом CD73, что и олеклумаб, CPX006 и/или 11E1;

з) связывается с эпитопом на гомодимере CD73 таким образом, чтобы происходило образование комплекса 1:1;

и) ингибирует активность растворимого CD73 более эффективно, чем олеклумаб, *in vitro*;

30

к) ингибирует активность CD73 на клетках Calu-6, H292 и Cynom-K1 *in vitro*;

л) ингибирует активность CD73 на клетках Calu-6, NCI-H1775, KYSE-30 и Capan-2 *in vitro*;

м) ингибирует выживаемость и/или пролиферацию клеток MDA-MB-231 и MDA-MB-468 *in vitro*;

5 н) ингибирует активность CD73 на первичных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках и CD19⁺ В-клетках *in vitro*;

о) восстанавливает пролиферацию CD4⁺ Т-клеток *in vitro*;

п) активирует CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки *in vitro*;

р) в комбинации с антителом к PD-1 восстанавливает пролиферацию Т-клеток в однонаправленной реакции в смешанной культуре лимфоцитов (MLR) в присутствии АМФ;

с) усиливает Т-клеточную активацию в присутствии АМФ в комбинации с антителом к PD-1 в однонаправленной MLR;

т) не стимулирует В-клеточную активацию *in vitro*;

15 у) не снижает уровни CD73 в клетках H292 *in vitro* более чем на 25%;

ф) ингибирует активность CD73 в опухолях, полученных из гуманизированных PBMC мышей с трансплантированными клетками A375;

х) ингибирует рост опухолей *in vivo* у мышей линии NOD-scid с трансплантированными клетками MDA-MB-231;

20 ц) ингибирует рост опухолей *in vivo* у гуманизированных PBMC мышей с трансплантированными клетками Calu-6; и

ч) ингибирует рост опухолей *in vivo* у гуманизированных PBMC мышей с трансплантированными клетками A375.

В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий участок обладает по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или всеми 23 указанными свойствами.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанные в описании, относится к IgG-типу, например, IgG₁-изотипу. Антитело может содержать по меньшей мере одну мутацию в F_C-области. Например, антитело может относиться к IgG₁ и содержать мутацию в одном или обоих аминокислотных положениях 234 и 235 тяжелой цепи, которые пронумерованы согласно схеме нумерации IMGT[®]. В

конкретных вариантах осуществления изобретения один или оба аминокислотных остатка в положениях 234 и 235 заменены в результате мутации с Leu на Ala.

5 В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанные в описании, и фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция может содержать дополнительно один или несколько следующих агентов: иммуностимулятор, 10 вакцина, химиотерапевтический агент, антинеопластический агент, антиангиогенный агент, ингибитор тирозинкиназы и ингибитор пути CD73.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложена выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь 15 или ее антигенсвязывающий участок, или нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь или ее антигенсвязывающий участок, или их обе, антитела к CD73 или его антигенсвязывающего участка, указанного в описании. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты может содержать нуклеотидную последовательность, представленную в 20 любой из SEQ ID NO: 1-8.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложен вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, указанную в описании, где вектор содержит дополнительно последовательность, контролирующую экспрессию.

25 В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложена клетка-хозяин, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь или ее антигенсвязывающий участок, и нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь или ее антигенсвязывающий участок антитела к CD73 или 30 его антигенсвязывающего участка, указанного в описании.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложен способ получения антитела к CD73 или его антигенсвязывающего участка, включающий получение клетки-хозяина,

указанной в описании, культивирование указанной клетки-хозяина в условиях, пригодных для экспрессии антитела или его участка, и выделение полученного в результате антитела или его участка.

5 В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложена биспецифическая связывающая молекула, которая содержит антигенсвязывающий участок одного или двух различных антител к CD73, указанных в описании.

10 В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложен способ снижения активности CD73 у пациента, который нуждается в этом, включающий введение указанному пациенту в терапевтически эффективном количестве антитела к CD73 или его антигенсвязывающего участка, фармацевтической композиции или биспецифической связывающей молекулы, указанных в описании.

15 В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложен способ повышения пролиферации CD4⁺ Т-клеток у пациента, который нуждается в этом, включающий введение указанному пациенту в терапевтически эффективном количестве антитела к CD73 или его антигенсвязывающего участка, фармацевтической композиции или биспецифической связывающей молекулы, указанных в описании.

20 В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложен способ стимуляции иммунной системы у пациента, который нуждается в этом, включающий введение указанному пациенту в терапевтически эффективном количестве антитела к CD73 или его антигенсвязывающего участка, фармацевтической композиции или биспецифической связывающей молекулы, указанных в описании.

25 В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложен способ лечения рака у пациента, включающий введение указанному пациенту в терапевтически эффективном количестве антитела к CD73 или его антигенсвязывающего участка, фармацевтической композиции или биспецифической связывающей молекулы, указанных в описании. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак возникает в ткани, выбранной из группы, состоящей из кожи, легкого, кишечника, ободочной кишки, яичника, головного мозга, предстательной железы, почки,

30

мягких тканей, кроветворной системы, головы и шеи, печени, кости, мочевого пузыря, молочной железы, желудка, матки, шейки матки и поджелудочной железы.

5 В некоторых вариантах осуществления изобретения лечение, указанное в описании, включает также введение пациенту иммуностимулятора, вакцины, химиотерапевтического агента, антинеопластического агента, антиангиогенного агента, ингибитора тирозинкиназы, ингибитора пути CD73 или применение лучевой терапии

10 В некоторых объектах изобретения, представленных в настоящем описании, предложено применение антитела к CD73 или его антигенсвязывающего участка, фармацевтической композиции или биспецифической связывающей молекулы, указанных в настоящем описании, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для:

- а) снижения активности CD73 у пациента;
- 15 б) повышения пролиферации CD4⁺ Т-клеток у пациента;
- в) стимуляции иммунной системы у пациента; или
- г) лечения рака у пациента.

В некоторых объектах изобретения, представленных в настоящем описании, предложены антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, фармацевтическая композиция или биспецифическая связывающая молекула, указанные в описании, для применения с целью:

- а) снижения активности CD73 у пациента;
- б) повышения пролиферации CD4⁺ Т-клеток у пациента;
- в) стимуляции иммунной системы у пациента; или
- 25 г) лечения рака у пациента.

Другие особенности, цели и преимущества изобретения объяснены в представленном ниже описании изобретения. Однако, как должно быть очевидно, подробное описание, с указанием вариантов осуществления и объектов изобретения, дано только в качестве иллюстрации, а не ограничения.

30 Различные изменения и модификации, подпадающие под объем изобретения, должны стать очевидными специалистам в данной области из подробного описания.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано;

на фиг. 1 – график, иллюстрирующий активность растворимого CD73 после обработки указанными антителами к CD73. Данные стандартизованы

5 относительно необработанных контролей и представлены в виде средних величин $\pm$ SEM;

на фиг. 2 – пара графиков, иллюстрирующих активность CD73, экспрессируемого на клетках Calu-6 (вверху) или клетках H292 (внизу) после обработки указанными антителами к CD73. Данные стандартизованы

10 относительно необработанных контролей и представлены в виде средних величин $\pm$ SEM;

на фиг. 3 – набор графиков, иллюстрирующих связывание указанных антител к CD73 и применяемого в качестве референс-антитела аналога (олеклумаб) с CD73 человека или обезьян циномолгус на клетках CHO-S. В качестве отрицательного контроля использовали ложно-трансфектированные

15 клетки CHO-S. «Контрольное Ат» представляет собой не специфическое в отношении CD73 антитело с дефицитом Fc γ R изотипа IgG₁-LALA. Данные представлены в виде средних величин $\pm$ SEM;

на фиг. 4 – схематическое изображение моделей конкуренции и групп эпитопов, идентифицированных для указанных антител к CD73. Соединительные черные линии указывают на перекрестную блокировку активности. Соединительными пунктирными линиями обозначены антитела, которые осуществляют блокировку только в одном направлении. Антитела группировали в соответствии с моделями конкуренции с другими антителами к CD73;

на фиг. 5 - эпитопы, с которыми связываются антитела 21127 (панель А), 21163 (панель Б), 21046 (панель В), аналог 11E1 (панель Г), аналог олеклумаб (панель Д) и аналог CPX006 (панель Е), картированные на кристаллической структуре димера CD73 (4H2G) в его открытом состоянии. Структуры представлены в виде изображения поверхности, на которой N-концевой домен

25

30

выделен светло-серым цветом, а С-концевой домен выделен серым цветом.

Аденозин показан в виде палочек белого цвета (обозначены стрелками).

Линейные эпитопы выделены темно-серым цветом, а контактирующие остатки – черным цветом;

на фиг. 6А и 6Б - серия SEC-MALS-профилей антител 21127, 21163, 21046 и аналогов 11Е1, олеклумаба и СРХ006, смешанных с CD73 в соотношениях МАт:CD73 1:1 (черные линии), 0,5:1 (темно-серые линии), 0,1:1 (светло-серые линии), 0:1 (серые штриховые линии) и 1:0 (черные штриховые линии).

5 Рассчитанные размеры различных пиков представлены в таблице 10;

на фиг. 7 – график, иллюстрирующий активность растворимого CD73 после обработки указанными антителами к CD73 и применяемым в качестве референс-антитела аналогом (олеклумаб). Контрольное Ат» представляет собой не обладающее специфичностью в отношении CD73 антитело изотипа IgG₁-LALA с дефицитом FcγR. Данные представлены в виде средних величин ± SEM.

10 Вертикальной пунктирной линией обозначена концентрация антитела, эквимоллярная концентрации растворимого рекомбинантного CD73;

на фиг. 8 – набор графиков, иллюстрирующих активность CD73, экспрессируемого на клетках Calu-6 (вверху), клетках H292 (в середине) и клетках Супом-К1 (внизу) после обработки указанными антителами к CD73 и применяемым в качестве референс-антитела аналогом (олеклумаб).

15 «Контрольное Ат» представляет собой не обладающее специфичностью в отношении CD73 антитело изотипа IgG₁-LALA с дефицитом FcγR. Данные стандартизованы относительно необработанных контролей и представлены в виде средних величин ± SEM;

на фиг. 9 - набор графиков, иллюстрирующих активность CD73, экспрессируемого на клетках H292, после обработки указанными антителами к CD73 и применяемым в качестве референс-антитела аналогом (олеклумаб) в течение 3 ч (вверху), 6 ч (в середине) или 24 ч (внизу). Данные стандартизованы относительно необработанных контролей и представлены в виде средних величин ± SEM;

на фиг. 10 – график, иллюстрирующий активность CD73, экспрессируемого 20 различными линиями раковых клеток, в присутствии указанных антител, оцененную с помощью анализа CellTiter-Glo. «Контрольное Ат» представляет собой не обладающее специфичностью в отношении CD73 антитело изотипа IgG₁-LALA с дефицитом FcγR. Каждая экспериментальная точка обозначает среднюю величину, полученную по трем техническим повторностям;

30

на фиг. 11 – пара графиков, иллюстрирующих воздействие блокировки активности CD73 на жизнеспособность двух клеточных линий трижды негативного рака молочной железы MBA-MB-231 (верхняя панель) и MBA-MB-468 (нижняя панель), которые выращивали в присутствии 300мкМ АМФ.

5 «Контрольное Ат» представляет собой не обладающее специфичностью в отношении CD73 антитело изотипа IgG₁-LALA с дефицитом FcγR. Все расчеты стандартизованы относительно необработанных контролей и данные представлены в виде средних величин ± SEM;

10 на фиг. 12- набор графиков, иллюстрирующих активность CD73, экспрессируемого первичными CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками и CD19⁺ В-клетками из здоровых доноров в присутствии указанных антител, оцененную с помощью анализа CellTiter-Glo. Активность стандартизована относительно необработанных клеток (100%). «Контрольное Ат» представляет собой не специфическое в отношении CD73 антитело с дефицитом FcγR изотипа IgG₁-
15 LALA. Данные представлены в виде средних значений по трем техническим повторностям ± SEM;

на фиг. 13 – график, иллюстрирующий пролиферацию CD4⁺ Т-клеток, обработанных гранулами анти-CD3/CD28, АМФ и указанными антителами к CD73 и применяемым в качестве референс-антитела аналогом (олеклумаб).
20 Данные стандартизованы относительно контролей, не обработанных АМФ, и представлены в виде средних величин ± SEM;

на фиг. 14 – пара графиков, иллюстрирующих активацию CD4⁺ Т-клеток (верхняя панель) и CD8⁺ Т-клеток (нижняя панель), обработанных гранулами анти-CD3/CD28, АМФ и 21127 или применяемым в качестве референс-антитела аналогом (олеклумаб). «Контрольное Ат» представляет собой не обладающее
25 специфичностью в отношении CD73 антитело изотипа IgG₁-LALA с дефицитом FcγR. Данные представлены в виде средних значений ± SEM;

на фиг. 15 – график, иллюстрирующий пролиферацию Т-клеток в односторонней реакции в смешанной культуре лимфоцитов (MLR) после
30 инкубации с антителом к PD-1 (12819), АМФ и указанным антителом к CD73 или применяемым в качестве референс-антитела аналогом (олеклумаб). «Контрольное Ат» представляет собой не обладающее специфичностью в отношении CD73 антитело изотипа IgG₁-LALA с дефицитом FcγR. Данные

стандартизованы относительно контролей, не обработанных АМФ, и представлены в виде средних величин $\pm$ SEM;

на фиг. 16 – пара графиков, иллюстрирующих пролиферацию Т-клеток в однонаправленной MLR после инкубации с (нижняя панель) или без (верхняя панель) АМФ и с взятыми в указанных концентрациях антител к PD-1 и/или к CD73. Комбинация 12819 + 21127 представляет собой смесь 1:1 двух антител, а указанные концентрации обозначают общую концентрацию смеси.

«Контрольное Ат» представляет собой не обладающее специфичностью в отношении CD73 антитело изотипа IgG₁-LALA с дефицитом Fc γ R. Данные стандартизованы относительно контролей, не обработанных АМФ, и представлены в виде средних величин $\pm$ SEM;

на фиг. 17А и 17Б – данные об активации В-клеток в PBMC из здорового донора, стимулированных указанными антителами (10 мкг/мл) и лигандом CD40 (0,5 мкг/мл). На фиг. 17А – серия графических изображений, демонстрирующих уровень CD69 на В-клетках (CD20⁺). На фиг. 17Б – серия графиков, иллюстрирующих среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) для антитела, окрашивающего маркеры В-клеточной активации CD25, CD69 и CD83. «IgG1-LALA-контроль» представляет собой не обладающее специфичностью в отношении CD73 антитело изотипа IgG₁-LALA с дефицитом Fc γ R. Данные представляют собой повторности, полученные для одного донора, и представлены в виде средних величин $\pm$ SEM;

на фиг. 18 – график, иллюстрирующий уровни CD73, экспрессируемого в клетках H292, через 24 ч после обработки указанным антителом к CD73 или применяемым в качестве референс-антитела аналогом (олеклумаб). Данные стандартизованы относительно необработанного контроля и представлены в виде средних величин $\pm$ SEM;

на фиг. 19 – пара графиков, иллюстрирующих активность CD73 на модели ксенотрансплантата человеческой меланомы A375 после обработки указанными антителами. Верхняя панель: данные для гуманизированных PBMC мышей с трансплантатом A375, которые получали различные дозы 21127 три раза в неделю в течение двух недель. Опухоли изымали через один день после введения последней дозы и анализировали в отношении активности CD73. Нижняя панель: данные для мышей линии NOD-*scid* с подкожным

трансплантатом A375, которых обрабатывали три раза в неделю в течение одной недели указанными антителами или комбинациями. Опухоли изымали в дни 3, 7, 10, 17 и 29 после последней обработки и анализировали в отношении активности CD73. Данные стандартизованы относительно необработанных контролей и

5 представлены в виде средних величин $\pm$ SEM;

на фиг. 20 – график, иллюстрирующий рост опухолей у мышей линии NOD-*scid* с подкожным трансплантатом клеток трижды негативного рака молочной железы человека линии MDA-MB-231. Мышей обрабатывали два раза в неделю антителом 21127 в дозе 10 мг/кг или применяемым в качестве референс-антитела аналогом (олеклумаб). Серой областью обозначен период обработки. Данные
10 представлены в виде средних величин $\pm$ SEM;

на фиг. 21 – пара графиков, иллюстрирующих эффект обработки антителом к CD73 21127 или наполнителем на рост опухолей у гуманизированных PBMC мышей с трансплантатами опухолевых клеток Calu-6 или A375. Серой областью
15 обозначен период обработки. Данные представлены в виде средних величин $\pm$ SEM. * $P < 0,05$.

Подробное описание изобретения

В настоящем описании предложены антитела к человеческому CD73, которые можно применять для подавления активности CD73 у пациента, такого
20 как больной раком. Если не указано иное, то в контексте настоящего описания «CD73» относится к человеческому CD73. Полипептидная последовательность человеческого CD73, которая находится в UniProt под регистрационным номером P21589 (5NTD_HUMAN) (SEQ ID NO: 43), представлена ниже:

25	10	20	30	40	50
	MCPRAARAPA	TLLLALGAVL	WPAAGAWELT	ILHTNDVHSR	LEQTSSESSK
	60	70	80	90	100
	CVNASRCMGG	VARLFTKVQQ	IRRAEPNVLL	LDAGDQYQGT	IWFTVYKGAE
	110	120	130	140	150
	VAHFMNALRY	DAMALGNHEF	DNGVEGLIEP	LLKEAKFPIL	SANIKAKGPL
30	160	170	180	190	200
	ASQISGLYLP	YKVLPVGDEV	VGIVGYTSKE	TPFLSNPGTN	LVFEDEITAL
	210	220	230	240	250
	QPEVDKLTLL	NVNKIIALGH	SGFEMDKLIA	QKVRGVDVVV	GGHSNTFLYT
	260	270	280	290	300
35	GNPPSKEVPA	GKYPFIVTSD	DGRKVPVVQA	YAFGKYLGYL	KIEFDERGNV
	310	320	330	340	350
	ISSHGNPILL	NSSIPEDPSI	KADINKWRIK	LDNYSTQELG	KTIVYLDGSS
	360	370	380	390	400
	QSCRFRECNM	GNLICDAMIN	NNLRHTDEMF	WNHVSMCILN	GGGIRSPIDE
40	410	420	430	440	450
	RNNGTITWEN	LA AVL PFGGT	FDLVQLKGST	LKKA FEHSVH	RYGQSTGEFL
	460	470	480	490	500
	QVGGIHVVYD	LSRKPGDRVV	KLDVLCTKCR	VPSYDPLKMD	EVYKVILPNF

510 520 530 540 550
LANGGDGFQM IKDELLRHDS GDQDINVVST YISKMKVIYP AVEGRIKFST
560 570
GSHCHGSFSL IFLSLWAVIF VLYQ

5

В контексте настоящего описания понятие «антитело» (Ат) или «иммуноглобулин» (Ig) относится к тетрамеру, который содержит две тяжелые (H) цепи (примерно 50-70 кДа) и две легкие (L) цепи (примерно 25 кДа), соединенные друг с другом дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельного домена тяжелой цепи (VH) и константного домена тяжелой цепи (CH). Каждая легкая цепь состоит из вариабельного домена легкой цепи (VL) и константного домена легкой цепи (CL). VH- и VL-домены можно дополнительно подразделять на области гипервариабельности, которые обозначают как «гипервариабельные участки (определяющие комплементарность участки) (CDR), перемежающиеся с более консервативными участками, которые обозначают как «каркасные участки» (FR). Каждый VH и VL состоит из трех CDR (в настоящем описании H-CDR обозначает CDR из тяжелой цепи; а L-CDR в настоящем описании обозначает CDR из легкой цепи) и четырех FR, которые расположены в направлении от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Нумерацию аминокислот и FR- и CDR-участков в тяжелой или легкой цепи можно осуществлять согласно IMGT®-номенклатуре (EU-нумерация; Lefranc и др., Dev Comp Immunol 27(1), сс. 255-277); или номенклатурам Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 и 1991)); Chothia и Lesk, J. Mol. Biol. 196, 1987, сс. 901-917; Chothia и др., Nature 342, 1989, сс. 878-883; MacCallum и др., J. Mol. Biol. 262, 1996, сс. 732-745; или Honegger и Plückthun, J. Mol. Biol. 309(3), 2001, сс. 657-670.

Понятие «рекомбинантное антитело» относится к антителу, которое экспрессируется из клетки или клеточной линии, содержащей нуклеотидную(ые) последовательность(и), которая(ые) кодирует(ют) антитело, при этом указанная(ые) нуклеотидная(ые) последовательность(и) не ассоциирована(ы) в естественных условиях с клеткой.

Понятие «выделенный белок», «выделенный полипептид» или «выделенное антитело» относится к белку, полипептиду или антителу, которые в силу своего происхождения или источника получения (1) не связаны с компонентами, с

35

которыми они ассоциированы в естественных условиях и которые сопровождают их в нативном состоянии, (2) не содержат других белков того же вида, (3) экспрессируются клеткой другого вида и/или (4) не встречаются в естественных условиях.

5 Таким образом, полипептид, химически синтезированный или синтезированный в клеточной системе, отличной от клетки, из которой он имеет происхождение в естественных условиях, будет рассматриваться как «выделенный» относительно компонентов, с которыми он ассоциирован в естественных условиях. Можно получать также белок, практически свободный от ассоциированных с ним в естественных условиях компонентов, путем выделения, используя методики очистки белков, хорошо известные в данной области.

15 Понятие «аффинность» относится к мере притяжения между антигеном и антителом. Присущую антителу аттрактивность в отношении антигена, как правило, выражают в виде константы аффинности связывания (K_D) в условиях равновесия конкретного взаимодействия антитело-антиген. Считается, что антитело специфически связывается с антигеном, когда $K_D \leq 1\text{ мМ}$, предпочтительно $\leq 100\text{ нМ}$. Константу аффинности связывания K_D можно измерять, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса (BIAcoreTM) или биослойной интерферометрии, например, используя систему IBIS MX96 SPR фирмы IBIS Technologies или систему OctetTM фирмы ForteBio.

20 Понятие «эпитоп» в контексте настоящего описания относится к участку (детерминанте) антигена, который специфически связывается с антителом или родственной молекулой, такой как биспецифическая связывающая молекула. Эпитопы (антигенные детерминанты), как правило, состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или углеводы, или боковые цепи сахаров, и обычно имеют специфические характеристики трехмерной структуры, а также специфические характеристики зарядов. Эпитоп может быть «линейным» или «конформационным». В линейном эпитопе все точки взаимодействия между белком (например, антигеном) и взаимодействующей молекулой (такой как антитело) расположены линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка. В конформационном эпитопе взаимодействие происходит через аминокислотные

остатки белка, отделенные друг от друга в первичной аминокислотной последовательности. После определения требуемого эпитопа на антигене можно создавать антитела к указанному эпитопу с помощью методик, хорошо известных в данной области. Например, антитело к линейному эпитопу можно создавать, например, путем иммунизации животного пептидом, имеющим аминокислотные остатки линейного эпитопа. Антитело к конформационному эпитопу можно создавать, например, путем иммунизации животного минидоменом, содержащим релевантные аминокислотные остатки конформационного эпитопа. Антитело к конкретному эпитопу можно создавать, например, путем иммунизации животного представляющей интерес молекулой-мишенью (например, CD73) или ее релевантной областью с последующим скринингом в отношении связывания с эпитопом.

Можно определять, связывается ли антитело с тем же самым эпитопом или конкурирует для связывания с антителом к CD73, представленным в настоящем описании, с помощью методов, известных в данной области, включая (но, не ограничиваясь только ими) анализы в условиях конкуренции, группировку эпитопов и сканирование аланином. В некоторых вариантах осуществления изобретения можно обеспечивать связывание антитела к CD73, представленного в настоящем описании, с CD73 в условиях насыщения и затем измерять способность тестируемого антитела связываться с CD73. Если тестируемое антитело обладает способностью связываться с CD73 одновременно в референс-антителом к CD73, то тестируемое антитело связывается с эпитопом, отличным от эпитопа референс-антитела к CD73. Однако, если тестируемое антитело не связывается одновременно с CD73, то тестируемое антитело связывается с тем же эпитопом, перекрывающимся эпитопом или с эпитопом, находящимся в непосредственной близости к эпитопу, с которым связывается антитело к CD73, представленное в настоящем описании. Указанный эксперимент можно осуществлять с использованием, например, ELISA, RIA, BIACORE™, SPR, биослойной интерферометрии или проточной цитометрии. Для решения вопроса о том, может ли антитело к CD73 перекрестно конкурировать с другим антителом к CD73, можно применять описанный выше метод конкуренции в двух направлениях, т.е. определять, может ли известное антитело блокировать тестируемое антитело, и наоборот. Указанные эксперименты по кросс-

конкуренции можно осуществлять, например, с помощью устройства IBIS MX96 SPR или системы Octet™.

Понятие «человеческое антитело» относится к антителу, в котором последовательности вариабельного домена и константного домена имеют происхождение из человеческих последовательностей. Под понятие попадают антитела, последовательности которых имеют происхождение из человеческих генов, но которые модифицированы, например, для снижения иммуногенности, повышения аффинности и/или повышения стабильности. Кроме того, под понятие попадают антитела, полученные рекомбинантно в нечеловеческих клетках, которые могут придавать гликозилирование, нетипичное для человеческих клеток. Под понятие попадают также антитела, полученные в трансгенных организмах кроме человека, которые содержат гены человеческих антител (например, в крысах OmniRat®).

В контексте настоящего описания понятие «антигенсвязывающий участок» антитела или (просто «участок антитела») относится к одному или нескольким участкам или фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, человеческим CD73 или его участком). Установлено, что некоторые фрагменты полноразмерного антитела могут осуществлять антигенсвязывающую функцию антитела. Примеры связывающих фрагментов, подпадающих под понятие «антигенсвязывающий участок», включают (I) Fab-фрагмент: одновалентный фрагмент, состоящий из VL-, VH-, CL- и CH1-доменов; (II) F(ab')₂-фрагмент: двухвалентный фрагмент, состоящий из двух Fab-фрагментов, сцепленных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (III) Fd-фрагмент, состоящий из VH- и CH1-доменов; (IV) Fv-фрагмент, состоящий из VL- и VH-доменов одного плеча антитела, (V) dAb-фрагмент, который состоит из VH-домена; и (VI) выделенный гипервариабельный участок (CDR), обладающий способностью специфически связываться с антигеном. Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, т.е. VL и VH, кодируются различными генами, их можно соединять с помощью методов рекомбинации синтетическим линкером, который придает им форму одной белковой цепи, в которой VL- и VH-домены спарены с образованием одновалентных молекул (которые обозначают как одноцепочечный Fv (scFv)). Также под объем настоящего изобретения подпадают антигенсвязывающие

молекулы, содержащие VH и/или VL. В случае VH, молекула может содержать также один или несколько из следующих участков CH1, шарнир, CH2 или CH3. Указанные одноцепочечные антитела также попадают под понятие «антигенсвязывающий участок» антитела. К ним относятся также другие формы одноцепочечных антител, такие как димерные антитела (диабоды). Димерные антитела представляют собой двухвалентные биспецифические антитела, в которых VH- и VL-домены экспрессируются на одной полипептидной цепи, но благодаря линкеру, который является слишком коротким, чтобы давать двум доменам на одной цепи спариваться друг с другом, обеспечивается спаривание доменов с комплементарным доменом другой цепи и создаются два антигенсвязывающих центра.

Участки антител, такие как Fab- и F(ab')₂-фрагменты, можно получать из цельных антител с помощью общепринятых методик, таких как расщепление цельных антител папаином или пепсином. Кроме того, антитела, участки антител и иммуноадгезивные молекулы можно получать с использованием стандартных методик рекомбинантной ДНК, например, указанных в настоящем описании.

Класс (изотип) и подкласс антител к CD73 можно определять с помощью любого метода, известного в данной области. Как правило, класс или подкласс антитела можно определять с использованием антител, специфических для конкретного класса или подкласса антитела. Указанные антитела поступают в продажу. Класс и подкласс можно определять с помощью ELISA или Вестерн-блоттинга, а также других методик. Альтернативно этому, класс и подкласс можно определять путем секвенирования всей или части константной области тяжелых и/или легких цепей антител, сравнивая их аминокислотные последовательности с известными аминокислотными последовательностями иммуноглобулинов различных классов и подклассов и определяя класс и подкласс антител.

Если не указано иное, все номера аминокислотных остатков, указанных в настоящем описании, соответствуют системе нумерации IMGT[®] (EU-нумерация).

Антитела к CD73

В настоящем описании предложены антитела против CD73 и их антигенсвязывающие участки. В конкретном варианте осуществления

изобретения антитела, указанные в настоящем описании, представляют собой человеческие антитела, полученные в трансгенных животных (например, крысах), которые могут продуцировать антитела, кодируемые перегруппированными генами человеческих антител. В некоторых вариантах осуществления изобретения человеческие антитела могут содержать определенные мутации, например, для замены обусловленных праймером мутаций обратно на последовательность зародышевой линии (см., например, вариант последовательности «Symplex-corrected» в таблице 1).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к CD73, представленные в настоящем описании, имеют мутации «LALA» (L234A/L235A) в Fc-области. Эти мутации ослабляют связывание антитела с человеческим FcγR (Fc-гамма рецептором). Указанные антитела обладают преимуществом, поскольку характеризуются низким уровнем вторичных эффекторных функций и не истощают эффекторные Т-клетки или не таргетируют другие не злокачественные клетки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок конкурирует или перекрестно конкурирует за связывание с человеческим CD73 с указанным ниже антителом или связывается с тем же самым эпитопом человеческого CD73, что и антитело, содержащее

- а) HC, имеющую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и 41, и LC, имеющую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 42;
- б) HC, имеющую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и 41, и LC, имеющую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 42;
- в) HC, имеющую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11 и 41, и LC, имеющую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15 и 42; или
- г) HC, имеющую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 12 и 41, и LC, имеющую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16 и 42.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок имеет аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3) SEQ ID NO: 19, 25, 31 или 37.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок имеет CDR1-3 (H-CDR1-3) тяжелой цепи,

содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 17-19, 23-25, 29-31 или 35-37 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок имеет аминокислотную последовательность
5
вариабельного домена тяжелой цепи (VH), которая по меньшей мере на 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 9-12.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок имеет VH, содержащий аминокислотную
10
последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 9-12.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 имеет аминокислотную последовательность VH, которая по меньшей мере на 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73
15
содержит аминокислотную последовательность VH, представленную в любой из SEQ ID NO: 9-12, и аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 41.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или
20
его антигенсвязывающий участок имеет аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи (L-CDR3) SEQ ID NO: 22, 28, 34 или 40.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок имеет CDR1-3 легкой цепи (L-CDR1-3),
содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 20-22, 26-28, 32-
25
34 или 38-40, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок имеет аминокислотную последовательность
вариабельного домена легкой цепи (VL), которая по меньшей мере на 90%, 92%,
95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности,
30
представленной в любой из SEQ ID NO: 13-16.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок имеет VL, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 13-16.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 содержит аминокислотную последовательность VL, которая по меньшей мере на 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 13-16; и аминокислотную

5 последовательность константной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 содержит аминокислотную последовательность VL, представленную в любой из
10 SEQ ID NO: 13-16, и аминокислотную последовательность константной области легкой цепи SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 содержит любую из указанных выше тяжелых цепей и любую и указанных выше легких цепей.

15 В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, представленное/представленный в настоящем описании, содержит следующие аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3:

- а) SEQ ID NO: 17-22 соответственно;
20 б) SEQ ID NO: 23-28 соответственно;
в) SEQ ID NO: 29-34 соответственно; или
г) SEQ ID NO: 35-40 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, представленное/представленный в настоящем
25 описании, содержит VH и VL, которые на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны следующим аминокислотным последовательностям:

- а) SEQ ID NO: 9 и 13 соответственно;
б) SEQ ID NO: 10 и 14 соответственно;
30 в) SEQ ID NO: 11 и 15 соответственно; или
г) SEQ ID NO: 12 и 16 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, представленное/представленный в настоящем

описании, содержит VH и VL, которые содержат следующие аминокислотные последовательности:

- а) SEQ ID NO: 9 и 13 соответственно;
- б) SEQ ID NO: 10 и 14 соответственно;
- 5 в) SEQ ID NO: 11 и 15 соответственно; или
- г) SEQ ID NO: 12 и 16 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73, представленное в настоящем описании, содержит:

- а) HC, имеющую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и 41, и LC, имеющую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 42;
- 10 б) HC, имеющую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и 41, и LC, имеющую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 42;
- в) HC, имеющую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11 и 41, и LC, имеющую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15 и 42; или
- 15 г) HC, имеющую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 12 и 41, и LC, имеющую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16 и 42.

В настоящем описании предложено/предложен также антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, которое/который конкурирует или перекрестно конкурирует за связывание или связывается с тем же эпитопом, что и антитело 21028, 21046, 21127 или 21163.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, представленное/представленный в настоящем описании, содержит аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 антитела 21028, 21046, 21127 или 21163.

25 В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, представленное/представленный в настоящем описании, содержит VH и VL, аминокислотные последовательности которых идентичны по меньшей мере на 90% VH и VL соответственно антитела 21028, 21046, 21127 или 21163.

30 В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, представленное/представленный в настоящем описании, содержит VH и VL, которые представляют собой VH и VL соответственно антитела 21028, 21046, 21127 или 21163.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73, представленное в настоящем описании, представляет собой антитело 21028, 21046, 21127 или 21163 или антитело с такими же аминокислотными последовательностями, что и указанное антитело.

- 5 Класс антитела к CD73, полученного способами, указанными в настоящем описании, можно изменять или переключать на другой класс или подкласс. В некоторых вариантах осуществления изобретения представленную в настоящем описании молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую VL или VH, выделяют с использованием методов, хорошо известных в данной области, в результате чего она не включает нуклеотидные последовательности, кодирующие CL или CH соответственно. Затем молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие VL или VH, функционально связывают с нуклеотидной последовательностью, кодирующей CL или CH соответственно, из молекулы иммуноглобулина другого класса. Для достижения этого можно использовать вектор или молекулу нуклеиновой
- 10 кислоты, которая содержит последовательность CL или CH, описанную выше. Например, класс антитела к CD73, которое исходно относилось к IgM, можно переключать на класс IgG. Кроме того, переключение класса можно применять для превращения одного подкласса IgG в другой, например, с IgG₁ в IgG₂. Константную область легкой к-цепи можно заменять, например, на константную
- 15 область легкой λ-цепи или наоборот. Приведенный в качестве примера способ получения антитела, представленного в настоящем описании, с требуемым Ig-изотипом, содержит стадии выделения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела к CD73, и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь антитела к CD73, с получением переменного домена
- 20 тяжелой цепи, который связывает путем лигирования кодирующую последовательность переменного домена тяжелой цепи с кодирующей последовательностью константной области тяжелой цепи требуемого изотипа, экспрессии в клетке легкой цепи и тяжелой цепи, кодируемых лигированной последовательностью, и сбор антитела к CD73 требуемого изотипа.
- 25 Антитело к CD73, представленное в настоящем описании, может представлять собой молекулу IgG, IgM, IgE, IgA или IgD, но, как правило, относится к IgG-изотипу, например, IgG подкласса IgG₁, IgG_{2a} или IgG_{2b}, IgG₃, или IgG₄. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело имеет
- 30

изотип подкласса IgG₁. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело имеет изотип подкласса IgG₂.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 может содержать по меньшей мере одну мутацию в Fc-области. Известно большое количество различных мутаций Fc, указанные мутации изменяют эффекторную функцию антитела. Например, во многих случаях требуется снижать или элиминировать эффекторную функцию, например, если не требуется взаимодействия лиганд/рецептор или в случае конъюгатов антитело-лекарственное средство.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 содержит по меньшей мере одну мутацию в Fc-области, которая снижает эффекторную функцию, например, мутации в одном или нескольких из положений 228, 233, 234 и 235, где аминокислотные положения нумеруют согласно системе нумерации IMGT[®].

В некоторых вариантах осуществления изобретения, например, когда антитело относится к IgG₁-подклассу, один или оба аминокислотных остатка в положениях 234 и 235 могут быть изменены в результате мутации, например, с Leu на Ala (L234A/L235A). Указанные мутации снижают эффекторную функцию Fc-области антител IgG₁-подкласса. Аминокислотные положения нумеруют согласно системе нумерации IMGT[®].

В некоторых вариантах осуществления изобретения, если антитело относится IgG₄-подклассу, то оно может содержать мутацию S228P, где аминокислотное положение пронумеровано согласно системе нумерации IMGT[®].

Известно, что эта мутация снижает нежелательный обмен Fab-плечей.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73, предлагаемое в изобретении, или его антигенсвязывающий участок связывается с эпитопом CD73, который включает по меньшей мере один (например, по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре или по меньшей мере пять) следующих аминокислотных остатков в SEQ ID NO: 43: R73, R109, D168, I301, S302 и H304. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий участок связывается с эпитопом CD73, который содержит или состоит из остатков R73, R109 и D168 (такое как антитело 21127). В некоторых вариантах осуществления

изобретения антитело или его антигенсвязывающий участок связывается с эпитопом CD73, который содержит или состоит из остатка R109 (такое как антитело 21163). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий участок связывается с эпитопом CD73, который
5 содержит или состоит из остатков I301, S302 и H304 (такое как антитело 21046).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73, предлагаемое в изобретении, или его антигенсвязывающий участок связывается с эпитопом CD73, который содержит остатки 27-31, 61-70, 61-75, 161-170, 266-270 и/или 291-305 в SEQ ID NO: 43. В некоторых вариантах осуществления
10 изобретения антитело или его антигенсвязывающий участок связывается с эпитопом CD73, который содержит или состоит из остатков 27-31, 61-75 и 161-170 (такое как антитело 21127). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий участок связывается с эпитопом CD73, который содержит или состоит из остатков 61-70 и 161-170
15 (такое как антитело 21163). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий участок связывается с эпитопом CD73, который содержит или состоит из остатков 27-31, 266-270 и 291-305 (такое как антитело 21046).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его
20 участок связывается с эпитопом, состоящим из остатков 27-31 (или его фрагментом, таким как состоящий из 1, 2, 3 или 4 остатков фрагмент) SEQ ID NO: 43 (такие как антитела 21127 и 21046). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его участок связывается с эпитопом, состоящим из остатков 61-75 (или его фрагментом, таким как фрагмент,
25 состоящий из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 остатков, например, из остатков 61-70) SEQ ID NO: 43 (такие как антитела 21127 и 21163). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его участок связывается с эпитопом, состоящим из остатков 161-179 (или его фрагментом, таким как фрагмент, состоящий из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 остатков) SEQ ID NO: 43 (такие
30 как антитела 21127 и 21163). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его участок связывается с эпитопом, состоящим из остатков 266-270 (или его фрагментом, таким как состоящий из 1, 2, 3 или 4 остатков) SEQ ID NO: 43 (такое как антитело 21046). В некоторых вариантах осуществления

изобретения антитело или его участок связывается с эпитопом, состоящим из остатков 291-305 (или его фрагментом, таким как состоящий из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 остатков) SEQ ID NO: 43 (такое как антитело 21046).

5 Под объем изобретения подпадает также эпитоп с любой комбинацией вышеуказанных остатков или остатков, представленных в таблице 9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения аминокислотную последовательность, содержащую эпитоп CD73, указанный в настоящем описании, можно применять в качестве иммуногена (например, вводить животному или в качестве антигена для скрининга библиотек антител) для
10 создания или идентификации антител к CD73 или их антигенсвязывающих участков, которые связываются с указанным эпитопом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, (например, в концентрации 10 мкг/мл) ингибирует активность растворимого
15 CD73 по меньшей мере на 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% (например, по меньшей мере на 40%). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, в концентрации 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50 или 100 мкг/мл ингибирует активность растворимого CD73 по меньшей мере на 90%.

20 В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, (например, в концентрации 10 мкг/мл) ингибирует активность CD73 на клетках Calu-6 по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере на 75%).

25 В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, (например, в концентрации 10 мкг/мл) ингибирует активность CD73 на клетках H292 по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% (например, по меньшей мере на 80%).

30 В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, специфически связывается с CD73 человека, CD73 обезьян циномолгус или ими обоими, экспрессируемым(ими) на клетках CHO-S.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, связывается с внеклеточным доменом (ECD) CD73 человека, что характеризуется K_D , составляющей 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,09, 0,08, 0,07, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03, 0,02 или 0,01нМ или менее (например, 1нМ или менее), по данным, полученным с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в описании, связывается с внеклеточным доменом (ECD) CD73 обезьян циномолгус, что характеризуется K_D , составляющей 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,09, 0,08, 0,07, 0,06, 0,05, 0,04, 0,03, 0,02 или 0,01нМ или менее (например, 0,7нМ или менее), по данным, полученным с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, не связывается с тем же эпитопом CD73, что и олеклумаб, CPX006, 11E1 или любая их комбинация.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, связывает эпитоп на гомодимере CD73 таким образом, чтобы образовывался комплекс 1:1. В некоторых вариантах осуществления изобретения связывание антитела /CD73 приводит к образованию только комплекса 1:1. В некоторых вариантах осуществления изобретения связывание антитела /CD73 приводит к образованию главным образом комплекса 1:1. В конкретных вариантах осуществления изобретения связывание антитела или его антигенсвязывающего участка с CD73 приводит к образованию комплекса 1:1 вне зависимости от концентрации CD73.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, например, в концентрации 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мкг/мл или менее (например, в концентрации 10 мкг/мл или менее) ингибирует активность растворимого CD73. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок (например,

в концентрации 10 мкг/мл) ингибирует активность указанного CD73 более эффективно, чем олеклумаб. В конкретных вариантах осуществления изобретения (например, при применении антитела или его антигенсвязывающего участка в одной из указанных выше концентраций) активность CD73

5 ингибируется по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%.

Например, антитело или его антигенсвязывающий участок может ингибировать активность CD73 на 100% в концентрации 3 мкг/мл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, 10 например, в концентрации 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75 или 100 мкг/мл или менее (например, в концентрации 3 мкг/мл или менее) ингибирует активность CD73 на клетках Calu-6, H292, Супом-K1 или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок (например, в концентрации 10 15 мкг/мл) ингибирует активность указанного CD73 более эффективно, чем олеклумаб. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок остается более эффективным, чем олеклумаб, после дополнительной инкубации в течение 3, 6 или 24 ч. В конкретных вариантах осуществления изобретения (например, при применении 20 антитела или его антигенсвязывающего участка в одной из указанных выше концентраций) активность CD73 ингибируется по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании 25 (например, в концентрации 25 мкг/мл), ингибирует активность CD73 на любой клеточной линии или комбинации клеточных линий, указанных в таблице 11. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок ингибирует активность CD73 на клетках Calu-6, NCI-H1775, клетках KYSE-30, клетках Сарап-2 или на любой их комбинации. В 30 некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок ингибирует активность указанного CD73 более эффективно, чем олеклумаб.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, например, в концентрации 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20 или 25 мкг/мл или менее (например, в концентрации 0,01 мкг/мл или менее) ингибирует

5 выживаемость и/или пролиферацию клеток MDA-MB-231, клеток MDA-MB-468 или обеих линий клеток *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок (например, в концентрации 0,5 мкг/мл или более) ингибирует выживаемость /пролиферацию более эффективно, чем олеклумаб. В конкретных вариантах осуществления

10 изобретения (например, при применении антитела или его антигенсвязывающего участка в одной из указанных выше концентраций) количество жизнеспособных клеток снижается по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, например, в концентрации 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20 или 25 мкг/мл или менее (например, в концентрации 0,01 мкг/мл или менее) ингибирует активность

15 CD73 на первичных CD4⁺ клетках, CD8⁺ Т-клетках, CD19⁺ В-клетках или на любой их комбинации. В конкретных вариантах осуществления изобретения (например, при применении антитела или его антигенсвязывающего участка в

20 одной из указанных выше концентраций) активность CD73 ингибируется, например, по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, например, в концентрации 0,05, 0,1, 0,5 или 1 мкг/мл или менее (например, в

25 концентрации 0,01 мкг/мл или менее) восстанавливает пролиферацию CD4⁺ Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, например, в концентрации 0,1, 0,5, 1, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 или 100 мкг/мл или менее (например, в концентрации 25 мкг/мл или менее)

30 восстанавливает пролиферацию CD4⁺ Т-клеток до 100%. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок (например, в концентрации 0,1 мкг/мл или более) восстанавливает пролиферацию CD4⁺ Т-клеток более эффективно, чем олеклумаб. В конкретных

вариантах осуществления изобретения (например, при применении антитела или его антигенсвязывающего участка в одной из указанных выше концентраций) пролиферация Т-клеток восстанавливается по меньшей мере до 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%.

5 В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, например, в концентрации 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 1, 5, 10, 15 или 25 мкг/мл или менее (например, в концентрации 1 мкг/мл или менее) активирует CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73
10 или его антигенсвязывающий участок (например, в концентрации 0,1 мкг/мл или более) активирует CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки более эффективно, чем олеклумаб.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, например, в концентрации 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5 или 10 мкг/мл или менее
15 (например, в концентрации 0,01 мкг/мл или менее) в комбинации с антителом к PD-1 восстанавливает пролиферацию Т-клеток в присутствии АМФ в однонаправленной реакции в смешанной культуре лимфоцитов (MLR). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок (например, в концентрации 1 мкг/мл или менее) в
20 комбинации с антителом к PD-1 полностью восстанавливает пролиферацию Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок (например, в концентрации 0,1 мкг/мл или более) в комбинации с антителом к PD-1 восстанавливает пролиферацию Т-клеток более эффективно, чем олеклумаб. В конкретных вариантах
25 осуществления изобретения (например, при применении антитела или его антигенсвязывающего участка в одной из указанных выше концентраций в комбинации с антителом к PD-1) пролиферация Т-клеток восстанавливается по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или
30 его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, например, в концентрации 0,5, 1, 5, 10, 15 или 25 мкг/мл или менее (например, в концентрации 1 мкг/мл или менее) повышает активацию Т-клеток в присутствии АМФ в однонаправленной MLR. В некоторых вариантах осуществления

изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок в комбинации с антителом PD-1 (таким как 12819) повышает активацию Т-клеток в присутствии АМФ в однонаправленной MLR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании (например, в концентрации 10 мкг/мл) не стимулирует активацию В-клеток *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании (например, в концентрации 10 мкг/мл) стимулирует активацию В-клеток *in vitro*. Активацию В-клеток можно определять с помощью маркеров, таких, например, как CD25, CD69 и/или CD83.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании (например, в концентрации 25 мкг/мл) не снижает уровни CD73 в клетках H292 *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании (например, в концентрации 25 мкг/мл) снижает уровни CD73 в клетках H292 *in vitro*, например, до уровня, составляющего не более чем 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% по сравнению с необработанным контролем. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании (например, в концентрации 25 мкг/мл) лишь немного снижает уровни CD73 в клетках H292 *in vitro*. Например, в конкретных вариантах осуществления изобретения уровни CD73 снижаются не более чем, например, на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% или 35% (например, на 25%).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, ингибирует активность CD73 в опухолях, полученных из гуманизированных РВМС мышей с трансплантированными клетками A375 (например, когда мышей обрабатывают антителом или его антигенсвязывающим участком в дозе 5 мг/кг, 20 мг/кг или 50 мг/кг три раза в неделю в течение одной или двух недель). В конкретных вариантах осуществления изобретения активность CD73 сохраняется в течение по меньшей мере 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 50, 75, 100, 125,

150, 175 или 200 дней (например, по меньшей мере 28 дней) после окончания обработки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, ингибирует рост опухолей у мышей линии NOD-*scid* с трансплантированными клетками MDA-MB-231 (например, когда мышью обрабатывают антителом или его антигенсвязывающим участком в дозе 10 мг/кг дважды в неделю, осуществляя в целом 16 обработок). В конкретных вариантах осуществления изобретения ингибирование роста опухолей сохраняется при ограниченном увеличении объема опухолей (например, менее чем на 10, 20, 30, 40 или 50 мм³) в течение по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 или 200 дней (например, по меньшей мере 60 дней) после окончания обработки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, ингибирует рост опухолей в опухолях у гуманизированных PBMC мышей с трансплантированными клетками Calu-6 или A375 (например, когда мышью обрабатывают антителом или его антигенсвязывающим участком в дозе 10 мг/кг три раза в неделю, осуществляя в целом шесть обработок).

Под объем настоящего изобретения подпадает также антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок с любой комбинацией указанных выше свойств.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, обладает по меньшей мере одним (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или всеми 23) из следующих свойств:

- а) ингибирует активность растворимого CD73 *in vitro*;
- б) ингибирует активность CD73 на клетках Calu-6 *in vitro*;
- в) ингибирует активность CD73 на клетках H292 *in vitro*;
- г) специфически связывается с CD73 человека и обезьян циномоглус, который экспрессируется на клетках CHO-S;
- д) связывается с ECD человеческого CD73 с K_D 1нМ или менее при оценке с помощью SPR;

е) связывается с ECD CD73 обезьян циномоглус с K_D 0,7нМ или менее при оценке с помощью SPR;

ж) не связывается с тем же эпитопом CD73, что и олеклумаб, CPX006 и/или 11E1;

5 з) связывается с эпитопом на гомодимере CD73 таким образом, чтобы происходило образование комплекса 1:1;

и) ингибирует активность растворимого CD73 более эффективно, чем олеклумаб, *in vitro*;

10 к) ингибирует активность CD73 на клетках Calu-6, H292 и Cynom-K1 *in vitro*;

л) ингибирует активность CD73 на клетках Calu-6, NCI-H1775, KYSE-30 и Саран-2 *in vitro*;

м) ингибирует выживаемость и/или пролиферацию клеток MDA-MB-231 и MDA-MB-468 *in vitro*;

15 н) ингибирует активность CD73 на первичных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках и CD19⁺ В-клетках *in vitro*;

о) восстанавливает пролиферацию CD4⁺ Т-клеток *in vitro*;

п) активирует CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки *in vitro*;

20 р) в комбинации с антителом к PD-1 восстанавливает пролиферацию Т-клеток в однонаправленной реакции в смешанной культуре лимфоцитов (MLR) в присутствии АМФ;

с) усиливает Т-клеточную активацию в присутствии АМФ в комбинации с антителом к PD-1 в однонаправленной MLR;

т) не стимулирует В-клеточную активацию *in vitro*;

25 у) не снижает уровни CD73 в клетках H292 *in vitro* более чем на 25%;

ф) ингибирует активность CD73 в опухолях, полученных из гуманизированных PBMC мышей с трансплантированными клетками A375;

х) ингибирует рост опухолей *in vivo* у мышей линии NOD-scid с трансплантированными клетками MDA-MB-231;

30 ц) ингибирует рост опухолей *in vivo* у гуманизированных PBMC мышей с трансплантированными клетками Calu-6; и

ч) ингибирует рост опухолей *in vivo* у гуманизированных PBMC мышей с трансплантированными A375.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок обладает всеми свойствами, указанными в подпунктах а)-ч). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок обладает по меньшей мере свойствами, указанными в подпунктах а)-л), о) и у). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок обладает по меньшей мере свойствами, указанными в подпунктах а)-ж), и)-л) и о). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок обладает по меньшей мере свойствами, указанными в подпунктах а)-г), и)-л), о) и у).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, может ингибировать рост опухолей и/или индуцировать регресс роста опухолей *in vivo*, может замедлять или приводить к реверсии метастазирования у больного раком и/или может удлинять период выживания больного раком. Под объем изобретения подпадает также любая комбинация указанных выше свойств.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, повышает пролиферацию Т-клеток и/или снижает активность CD73 более эффективно, чем антитела к CD73, которые в настоящее время проходят клинические испытания. Например, в конкретных вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок обладает по меньшей мере одним из следующих свойств:

- в концентрации 0,1 мкг/мл повышает пролиферацию активированных CD4⁺ Т-клеток, культивируемых с 100мкМ АМФ, в большей степени, чем антитело с аминокислотными последовательностями HC и LC, содержащими:
- SEQ ID NO: 17 и 19 соответственно, которые описаны в публикации патента США 2016/0129108;
- SEQ ID NO: 14 и 13 соответственно, которые описаны в публикации патента США 2018/0009899; или
- SEQ ID NO: 3 и 4 соответственно, которые описаны в публикации патента США 2018/0030144;

и/или

- в концентрации 10 мкг/мл или выше снижает активность CD73 в клетках H292 после инкубации в течение 24 ч в большей степени, чем антитело с аминокислотными последовательностями HC и LC, содержащими:

- SEQ ID NO: 17 и 19 соответственно, которые описаны в публикации патента США 2016/0129108;

- SEQ ID NO: 14 и 13 соответственно, которые описаны в публикации патента США 2018/0009899; или

- SEQ ID NO: 3 и 4 соответственно, которые описаны в публикации патента США 2018/0030144;

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, может представлять собой часть более крупной молекулы иммуноадгезина, образованной путем ковалентной или нековалентной ассоциации антитела или участка антитела с одним или несколькими другими белками или пептидами.

Примеры указанных молекул иммуноадгезина включают созданные с применением коровой области стрептавидина тетрамерные молекулы scFv (Kipriyanov и др., Human Antibodies and Hybridomas 6, 1995, сс. 93-101) и созданные с применением остатка цистеина, маркерного пептида и C-концевой полигистидиновой метки двухвалентные и биотинилированные молекулы scFv (Kipriyanov и др., Mol. Immunol. 31, 1994, сс.1047-1058). Другие примеры включают либо ковалентное, либо нековалентное встраивание в молекулу одного или нескольких CDR из антитела для создания иммуноадгезина, который специфически связывается с представляющим интерес антигеном. В указанных вариантах осуществления изобретения CDR можно встраивать в качестве части более крупной полипептидной цепи, можно ковалентно связывать с другой полипептидной цепью или можно нековалентно встраивать.

В некоторых вариантах осуществления изобретения можно создавать слитое антитело или иммуноадгезин, которое/который содержит все антитело к CD73, представленное в настоящем описании, или его часть, которое/которая связана с другим полипептидом. В конкретных вариантах осуществления изобретения только переменные домены антитела к CD73 связывают с полипептидом. В конкретных вариантах осуществления изобретения VH-домен антитела к CD73 связывают с первым полипептидом, а VL-домен антитела к

CD73 связывают со вторым полипептидом таким образом, чтобы VH- и VL-домены могли взаимодействовать друг с другом, образуя антигенсвязывающий центр. В некоторых вариантах осуществления изобретения VH-домен отделяют от VL-домена с помощью линкера, так, чтобы VH- и VL-домены могли взаимодействовать друг с другом (например, одноцепочечные антитела). Затем конструкцию антитела VH-линкер-VL связывают с представляющим интерес полипептидом. Кроме того, можно создавать слитые антитела, в которых два (или большее количество) одноцепочечных антител связаны друг с другом. Это является ценным, если требуется создавать двухвалентное или многовалентное антитело на одной полипептидной цепи или если требуется создавать биспецифическое антитело.

Для создания одноцепочечного антитела (scFv) кодирующие VH и VL фрагменты ДНК функционально связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующим аминокислотную последовательность (Gly4-Ser)₃ (SEQ ID NO: 44), в результате чего последовательности VH и VL могут экспрессироваться в виде непрерывного одноцепочечного белка, VL- и VH-домены которого сцеплены с помощью гибкого линкера (см., например, Bird и др., Science 242, 1988, сс. 423-426; Huston и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1988, сс. 5879-5883 и McCafferty и др., Nature 348, 1990, сс. 552-554).

Одноцепочечное антитело может быть одновалентным, если используют только по одному VH и VL; двухвалентным, если используют по два VH и VL; или многовалентным, если используют больше двух каждого из VH и VL. Можно получать биспецифические или многовалентные антитела, которые связываются специфически с человеческим CD73 и, например, с другой молекулой.

В других вариантах осуществления изобретения можно получать другие модифицированные антитела с использованием молекул нуклеиновых кислот, кодирующих антитело к CD73. Например, можно получать «каппа-боди (kappa bodies)» (Ill и др., Protein Eng. 10, 1997, сс. 949-957), «минибоди (minibodies)» (Martin и др., EMBO J. 13, 1994, сс. 5303-5309), «диабоди (diabodies)» (Holliger и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 6444-6448) или (Янусины «Janusins» (Traunecker и др., EMBO J. 10, 1991, сс. 3655-3659 и Traunecker и др., Int. J. Cancer (Suppl.) 7, 1992, сс. 51-52 с помощью стандартных методов молекулярной биологии в соответствии с доктриной настоящего изобретения.

Антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, указанное/указанный в настоящем описании, можно дериватизировать или связывать с другой молекулой (например, с другим пептидом или белком). В целом, антитела или их участки дериватизируют таким образом, чтобы

5 дериватизация или мечение не оказывали отрицательного воздействия на связывание CD73. Таким образом, подразумевается, что антитела и участки антител, представленные в настоящем изобретении, включают как интактные, так и модифицированные формы человеческих антител к CD73, указанных в описании. Например, антитело или участок антитела, представленные в

10 настоящем описании, можно функционально связывать (путем химической сшивки, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или несколькими другими молекулами, такими как другое антитело (например, биспецифическое антитело или диабоди), идентифицирующий агент, фармацевтический агент и/или белок или пептид, которые могут опосредовать

15 ассоциацию антитела или участка антитела с другой молекулой (такой как коровая область стрептавидина или полигистидиновая метка).

Другой тип дериватизированных молекул получают путем поперечной сшивки двух или большего количества антител (одного и того же типа или различных типов, например, с получением биспецифических антител).

20 Приемлемые перекрестносшивающие агенты включают гетеробифункциональные агенты, имеющие две различные реакционноспособные группы, разделенные соответствующим спейсером (например, сложный эфир *m*-малеимидобензоил-*N*-гидроксисукцинимид), или гомобифункциональные агенты (например, дисукцинимидилсуберат). Указанные

25 линкеры поступают в продажу, например, от фирмы Pierce Chemical Company, Рокфорд, шт. Иллинойс.

Антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок можно дериватизировать также с помощью химической группы, такой как полиэтиленгликоль (ПЭГ), метильная или этильная группа или углеводная

30 группа. Указанные группы могут быть ценными для улучшения биологических характеристик антитела, например, удлинения времени полужизни в сыворотке.

Антитело или антигенсвязывающий участок, представленное/представленный в настоящем описании, можно также метить. В

контексте настоящего описания понятия «метка» или «меченый» относятся к включению другой молекулы в антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения метка представляет собой поддающийся обнаружения маркер, например, мечение представляет собой включение радиоактивномеченной

5 аминокислоты или присоединение к полипептиду биотинильных остатков, которые позволяют обнаруживать с использованием в качестве маркера авидина (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер, или ферментативную активность которого можно выявлять с помощью оптических или колориметрических методов). В некоторых вариантах осуществления

10 изобретения метка или маркер могут быть терапевтическими, например, представлять собой конъюгат лекарственного средства или токсин. Можно применять различные методы мечения полипептидов и гликопротеинов, известные в данной области. Примеры меток для полипептидов включают (но, не ограничиваясь только ими) следующие соединения: радиоизотопы или

15 радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентные метки (например, ФИТЦ, родамин, лантанид фосфора), ферментативные метки (например, пероксидаза из хрена, β -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные маркеры, биотинильные группы, предварительно определенные полипептидные эпитопы,

20 распознаваемые вторичным репортером (например, последовательности пар лейциновых молний, сайты связывания для вторичных антител, металлсвязывающие домены, эпитопные метки), магнитные агенты, такие как хелаты гадолиния, токсины, такие как коклюшный токсин, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидия бромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид,

25 винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол, пуромицин и их аналоги или их гомологи. В некоторых вариантах осуществления изобретения метки присоединяют с помощью спейсерных плечей

30 различной длины для уменьшения потенциальных стерических помех.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий участок, представленное/представленный в настоящем описании, можно конъюгировать с цитотоксическим агентом с образованием

иммуноконъюгата. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его антигенсвязывающий участок, представленное/представленный в настоящем описании, можно конъюгировать с радиоизотопом.

В конкретных вариантах осуществления изобретения антитела, представленные в настоящем описании, могут присутствовать в нейтральной форме (включая цвиттерионные формы) или в форме положительно или отрицательно заряженных видов. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела можно включать в комплексы с противоionsами с получением фармацевтически приемлемой соли.

Понятие «фармацевтически приемлемая соль» относится к комплексу, содержащему одно или несколько антител и один или несколько противоionsов, в которых противоionsы получают из фармацевтически приемлемых неорганических и органических кислот и оснований.

Композиции антител к CD73

В настоящем описании предложена также комбинированная терапия (например, композиция), которая включает одно, два, три, четыре или большее количество антител к CD73 или их антигенсвязывающих участков, указанных в описании. В конкретных вариантах осуществления изобретения комбинированная терапия (например, композиция) включает два антитела к CD73 или антигенсвязывающих участка. Комбинированная терапия может представлять собой, например, метод лечения с использованием указанных антител или антигенсвязывающих участков или фармацевтической композиции, содержащей указанные антитела или антигенсвязывающие участки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложена композиция, содержащая первое антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок и второе антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, в которой антитела представляют собой:

- антитела 21028 и 21046 соответственно;
- антитела 21028 и 21127 соответственно;
- антитела 21028 и 21163 соответственно;
- антитела 21046 и 21127 соответственно;
- антитела 21046 и 21163, соответственно; или
- антитела 21127 и 21163 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция содержит антитела или их антигенсвязывающие участки, которые связываются с одним и тем же эпитопом или конкурируют за связывание с указанными первым и вторым антителами.

5 В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция содержит антитело или его антигенсвязывающий участок, которое/который содержит аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 указанного первого антитела, и антитело или его антигенсвязывающий участок, которое/который содержит аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3
10 указанного второго антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция содержит антитело или его антигенсвязывающий участок, которое/который содержит VH и VL, аминокислотные последовательности которых идентичны по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%
15 аминокислотным последовательностям VH и VL соответственно указанного первого антитела, и антитело или его антигенсвязывающий участок, которое/который содержит VH и VL, аминокислотные последовательности которых идентичны по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% аминокислотным последовательностям VH и VL
20 соответственно указанного второго антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция содержит антитело или его антигенсвязывающий участок, которое/который содержит аминокислотные последовательности VH и VL указанного первого антитела, и антитело или его антигенсвязывающий участок, которое/который содержит
25 аминокислотные последовательности VH и VL указанного второго антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция содержит антитело или его антигенсвязывающий участок, которое/который содержит аминокислотные последовательности HC и LC указанного первого антитела, и антитело или его антигенсвязывающий участок, которое/который содержит
30 аминокислотные последовательности HC и LC указанного второго антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанная композиция может содержать один, два или большее количество антител или их антигенсвязывающих участков, выбранных из группы, которая состоит из:

а) антитела, содержащего H-CDR1-3, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 17-19, 23-25, 29-31 или 35-57 соответственно;

б) антитела, VH-последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9, 10, 11 или 12;

5 в) антитела, VH которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, 10, 11 или 12;

г) антитела, HC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и 41, 10 и 41, 11 и 41 или 12 и 41;

10 д) антитела, содержащего L-CDR1-3, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 20-22, 26-28, 32-34 или 38-40 соответственно;

е) антитела, VL-последовательность которого по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13, 14, 15 или 16;

ж) антитела, VL которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, 14, 15 или 16;

15 з) антитела, LC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 42, 14 и 42, 15 и 42 или 16 и 42;

и) антитела, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 17-22, 23-28, 29-34 или 35-40 соответственно;

20 к) антитела, содержащего VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности, по меньшей мере на 90% идентичны аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 9 и 13, 10 и 14, 11 и 15 или 12 и 16 соответственно;

25 л) антитела, содержащего VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и 13, 10 и 14, 11 и 15 или 12 и 16 соответственно; и

м) антитела, содержащего HC и LC, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и 41 и 13 и 42; 10 и 41 и 14 и 42; 11 и 41 и 15 и 42; или 12 и 41 и 16 и 42 соответственно.

30 В некоторых вариантах осуществления изобретения содержащая антитело к CD73 композиция, указанная в настоящем описании, может ингибировать рост опухолей и/или индуцировать регресс роста опухолей *in vivo*, может замедлять или приводить к реверсии метастазирования у больного раком и/или может

удлинять период выживания больного раком. Под объем изобретения подпадает также любая комбинация указанных выше свойств.

В настоящем описании предложен также способ получения содержащей антитело к CD73 композиции, указанной в настоящем описании, включающий

5 получение первого антитела к CD73 или антигенсвязывающего участка и второго антитела к CD73 или антигенсвязывающего участка и смешение двух антител или их участков.

Биспецифические связывающие молекулы

В настоящем описании предложена также биспецифическая молекула,

10 которая имеет связывающую специфичность (например, содержат антигенсвязывающие участки, такие как шесть CDR или VH и VL) антитела к CD73, указанного в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифическая связывающая молекула дополнительно имеет связывающую специфичность другого, отличного от первого, антитела к CD73

15 (например, другого антитела к CD73, указанного в настоящем описании), или антитела, мишенью которого является другой белок, такой как раковый антиген или другая молекула клеточной поверхности, активность которой опосредует болезненное состояние, такое как рак. Указанные биспецифические связывающие молекулы известны в данной области, и примеры различных типов

20 биспецифических связывающих молекул представлены также в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления изобретения биспецифическая связывающая молекула может связываться с CD73 и PD-1, CD73 и PD-L1 или CD73 и CTLA-4.

Молекулы нуклеиновых кислот и векторы

В настоящем описании предложены также молекулы нуклеиновых кислот и

25 последовательности, кодирующие антитела к CD73 и их антигенсвязывающие участки, указанные в настоящем описании. В некоторых вариантах изобретения различные молекулы нуклеиновых кислот кодируют аминокислотные последовательности тяжелых цепей и легких цепей антитела к CD73 или

30 антигенсвязывающего участка. В других вариантах осуществления изобретения одна и та же молекула нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотные последовательности тяжелых цепей и легких цепей антитела к CD73 или антигенсвязывающего участка.

Подразумевается, что ссылка на нуклеотидную последовательность включает ее комплемент, если специальное не указано иное. Таким образом, следует понимать, что ссылка на нуклеиновую кислоту, имеющую определенную последовательность, охватывает комплементарную ей цепь с ее

5 комплементарной последовательностью. В контексте настоящего описания понятие «полинуклеотид» означает полимерную форму нуклеотидов, имеющую по меньшей мере 10 оснований в длину, либо рибонуклеотидов, либо дезокстрибонуклеотидов, или модифицированную форму любого типа нуклеотидов. Под понятие подпадают одно- и двухцепочечные формы.

10 В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленного в настоящем описании, предложена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь или ее антигенсвязывающий участок, или нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь или ее антигенсвязывающий участок, или их обе, антитела
15 к CD73 или его антигенсвязывающего участка, указанного в настоящем описании.

В настоящем описании предложены также нуклеотидные последовательности, которые по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичны одной или нескольким нуклеотидным
20 последовательностям, перечисленным в настоящем описании, например, нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 1-8, или нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из SEQ ID NO: 9-16. Понятие «процент идентичности последовательности» в
25 контексте нуклеотидных последовательностей относится к остаткам в двух последовательностях, которые являются одинаковыми при выравнивании до максимального соответствия. Длина участка, на котором осуществляют сравнение идентичности последовательности, может составлять по меньшей мере примерно девять нуклеотидов, обычно по меньшей мере примерно 18
30 нуклеотидов, более часто по меньшей мере примерно 24 нуклеотида, как правило по меньшей мере примерно 28 нуклеотидов, более конкретно по меньшей мере примерно 32 нуклеотида и предпочтительно по меньшей мере примерно 36, 48 или большее количество нуклеотидов. В данной области

существует несколько известных различных алгоритмов, которые можно применять для оценки идентичности нуклеотидной последовательности.

Например, полинуклеотидные последовательности можно сравнивать с использованием FASTA, Gap или Bestfit, которые представляют собой

5 программы, входящие в пакет программ Wisconsin, версия 10.0, фирмы Genetics Computer Group (GCG), Мэдисон, шт. Висконсин. Программа FASTA, которая включает, например, программы FASTA2 и FASTA3, обеспечивает осуществление выравнивания и определения процента идентичности

10 последовательности областей наилучшего перекрытия между запрашиваемой и исследуемой последовательностями (см., например, Pearson, Methods Enzymol. 183, 1990, сс. 63-98; Pearson, Methods Mol. Biol. 132, 2000, сс. 185-219; Pearson, Methods Enzymol. 266, 1996, сс. 227-258 и Pearson, J. Mol. Biol. 276, 1998, сс. 71-84, публикации включены в настоящее описание в качестве ссылки). Если не

15 указано иное, то используются задаваемые по умолчанию параметры для конкретной программы или алгоритма. Например, процент идентичности последовательностей между нуклеотидными последовательностями можно определять, используя FASTA с ее задаваемыми по умолчанию параметрами (размер слова - 6 и коэффициент NOPAM для матрицы подсчета баллов), или используя Gap с ее задаваемыми по умолчанию параметрами, которые в

20 представлены в GCG, версии 6.1, включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, которая состоит из

25 SEQ ID NO: 1-8. В конкретных вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 1 и 5, SEQ ID NO: 2 и 6, SEQ ID NO: 3 и 7 или SEQ ID NO: 4 и 8.

В любом из указанных выше вариантов осуществления изобретения молекулы нуклеиновых кислот могут быть выделенными. Молекулы

30 нуклеиновых кислот, которые в настоящем описании рассматриваются как «выделенные» или «очищенные», представляют собой нуклеиновые кислоты, которые (1) отделены от нуклеиновых кислот геномной ДНК или клеточной

РНК, являющихся источником их происхождения; и/или (2) не встречаются в естественных условиях.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, представленных в настоящем описании, предложен вектор, пригодный для экспрессии одной или
5 обеих цепей антитела или его антигенсвязывающего участка, указанного в настоящем описании. Понятие «вектор» в контексте настоящего описания означает молекулу нуклеиновой кислоты, которая может транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой плазмиду, т.е. кольцевой
10 двухцепочечный участок ДНК, в который могут встроены путем лигирования дополнительные сегменты ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представляет собой вирусный вектор, при этом в вирусный ген могут быть встроены путем лигирования дополнительные сегменты ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор обладает способностью
15 к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую он интродуцирован (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный сайт инициации репликации, и эписомальные векторы для клеток млекопитающих). В других вариантах осуществления изобретения векторы (например, неэписомальные векторы для клеток млекопитающих) могут интегрироваться в геном клетки-
20 хозяина после интродукции в клетку-хозяина и реплицироваться в ней вместе с геномом хозяина. Кроме того, некоторые векторы могут контролировать экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы в контексте настоящего описания обозначают как «рекомбинантные экспрессионные векторы» (или просто «экспрессионные векторы»).

25 В настоящем описании предложены векторы, содержащие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют тяжелую цепь, легкую цепь или и тяжелую, и легкую цепи антитела к CD73, указанного в настоящем описании, или его антигенсвязывающего участка. В конкретных вариантах осуществления изобретения вектор, представленный в настоящем описании, содержит молекулу
30 нуклеиновой кислоты, указанную в настоящем описании. В настоящем описании предложены также векторы, содержащие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют слитые белки, модифицированные антитела, фрагменты

антител и зонды для них. Вектор может содержать также контролирующую экспрессию последовательность.

В контексте настоящего описания понятие «контролирующая экспрессию последовательность» означает полинуклеотидные последовательности, которые являются необходимыми для воздействия на экспрессию и процессинг кодирующих последовательностей, с которыми они соединены. Контролирующие экспрессию последовательности включают соответствующие иницирующие транскрипцию, терминацию последовательности, последовательности промотора и энхансера; сигналы, влияющие на процессинг РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования; последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые усиливают эффективность трансляции (т.е. консенсусная последовательность Козак); последовательности, которые повышают стабильность белков; и при необходимости последовательности, которые усиливают секрецию белков. Природа указанных контролирующих последовательностей отличается в зависимости от организма-хозяина; у прокариот указанные контролирующие последовательности, как правило, включают промотор, сайт связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции; у эукариот, как правило, контролирующие последовательности включают промоторы и последовательность терминации транскрипции. Подразумевается, что понятие «контролирующие последовательности» включает, как минимум, все компоненты, присутствие которых является важным для экспрессии и процессинга, и может включать также дополнительные компоненты, присутствие которых является целесообразным, например, лидерные последовательности и последовательности партнеров по слиянию.

Молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую и/или легкую цепь антитела к CD73 или его антигенсвязывающего участка, указанного в настоящем описании, можно выделять из любого источника, который продуцирует указанное антитело или его участок. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы нуклеиновых кислот выделяют из В-клеток, которые экспрессируют антитело к CD73, выделенных из животного, иммунизированного антигеном человеческого CD73, или из иммортализованной клетки, полученной

из указанной В-клетки. Методы выделения нуклеиновых кислот, кодирующих антитела, хорошо известны в данной области. мРНК можно выделять и использовать для получения кДНК, предназначенной для применения в полимеразной цепной реакции (ПЦР), или кДНК, клонирующей гены антитела. В
5 конкретных вариантах осуществления изобретения молекулу нуклеиновой кислоты, указанную в настоящем описании, можно синтезировать, а не выделять.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты, указанная в настоящем описании, содержит нуклеотидную
10 последовательность, которая кодирует VH-домен антитела к CD73 или антигенсвязывающего участка, указанных в настоящем описании, сцепленную в рамке считывания с нуклеотидной последовательностью, кодирующей константную область тяжелой цепи из любого источника. Аналогично этому, молекула нуклеиновой кислоты, указанная в настоящем описании, может
15 содержать нуклеотидную последовательность, которая кодирует VL-домен антитела к CD73 или антигенсвязывающего участка, указанных в настоящем описании, сцепленную в рамке считывания с нуклеотидной последовательностью, кодирующей константную область легкой цепи из любого источника.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют VH и/или VL, могут быть «преобразованы» в гены полноразмерного антитела. В конкретных вариантах осуществления изобретения молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют VH- или VL-домены, преобразуют в гены полноразмерного антитела путем
25 инсерции в экспрессионный вектор, уже кодирующий константную область тяжелой цепи (CH) или константную область легкой цепи (CL) соответственно, таким образом, что VH-сегмент функционально связан с CH-сегментом(ами) в векторе, и/или VL-сегмент функционально связан с CL-сегментом в векторе. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы нуклеиновых
30 кислот, кодирующие VH- и/или VL-домены, преобразуют в гены полноразмерного антитела путем связывания, например, лигирования, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей VH- и/или VL-домен, с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CH- и/или CL-область, с использованием

стандартных методов молекулярной биологии. Молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют полноразмерные тяжелые и/или легкие цепи, затем можно экспрессировать из клетки, в которую они были интродуцированы, и выделять антитело к CD73.

Молекулы нуклеиновых кислот можно применять для рекомбинантной экспрессии больших количеств антител к CD73. Молекулы нуклеиновых кислот можно применять также для получения химерных антител, биспецифических антител, одноцепочечных антител, иммуноадгезинов, димерных антител, мутантных антител и производных антител, указанных в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулу нуклеиновой кислоты, представленную в настоящем описании, применяют в качестве зонда или ПЦР-праймера для конкретной последовательности антитела. Например, нуклеиновую кислоту можно применять в качестве зонда в диагностических методах или в качестве ПЦР-праймера для амплификации областей ДНК, которые можно применять, среди прочего, для выделения дополнительных молекул нуклеиновых кислот, кодирующих переменные домены антител к CD73. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы нуклеиновых кислот представляют собой олигонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотиды имеют происхождение из высоковариабельных доменов тяжелой и легкой цепей представляющего интерес антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотиды кодируют все или часть из одного или нескольких CDR антитела к CD73 или их антигенсвязывающих участков, предлагаемых в изобретении, которые указаны в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы нуклеиновых кислот и векторы можно применять для получения мутантных антител к CD73. Антитела можно изменять путем мутации в переменных доменах тяжелой и/или легкой цепей, например, для изменения связывающих свойств антитела. Например, мутацию можно осуществлять в одном или нескольких CDR для увеличения или уменьшения K_D антитела к CD73, для увеличения или уменьшения k_{off} или для изменения связывающей специфичности антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения осуществляют одну или несколько мутаций, затрагивающих аминокислотный остаток, который, как

известно, подлежит изменению по сравнению с зародышевой линией в моноклональном антителе, представленном в настоящем описании. Мутации можно осуществлять в CDR или каркасной области вариабельного домена или в константной области. В конкретных вариантах осуществления изобретения мутации осуществляют в вариабельном домене. В конкретных вариантах осуществления изобретения осуществляют одну или несколько мутаций, затрагивающих аминокислотный остаток, который, как известно, подлежит изменению по сравнению с зародышевой линией, в CDR или каркасном участке вариабельного домена антитела или его антигенсвязывающего участка, представленного в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления изобретения каркасный(ые) участок(и) изменяют в результате мутации так, чтобы образовавшийся(еся) каркасный(ые) участок(тки) имел(и) аминокислотную последовательность соответствующего гена зародышевой линии. Мутацию можно осуществлять в каркасном участке или константной области, например, для удлинения времени полужизни антитела к CD73 (см, например, публикацию PCT WO 00/09560). Мутацию в каркасном участке или константной области можно осуществлять также для изменения иммуногенности антитела и/или для создания сайта для ковалентного или нековалентного связывания с другой молекулой. Согласно настоящему описанию антитело может иметь мутации в любом одном или в любых нескольких CDR или каркасных участках вариабельного домена или в константной области.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к CD73, представленные в настоящем описании, или их антигенсвязывающие участки экспрессируют путем встраивания ДНК, которые кодируют частичные или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, полученные согласно описанному выше методу, в экспрессионные векторы так, чтобы гены были функционально слиты с необходимыми контролирующими экспрессию последовательностями, такими как контролирующие транскрипцию и трансляцию последовательности. Экспрессионные векторы включают плазмиды, ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы (AAV), вирусы растений, такие как вирус мозаики цветной капусты, вирус табачной мозаики, космиды, YAC, полученные из EBV эписомы и т.п. Кодировующую последовательность антитела можно

встраивать путем лигирования в вектор, так, чтобы контролирующие транскрипцию и трансляцию последовательности в векторе осуществляли свойственные им функции регуляции транскрипции и трансляции кодирующей последовательности антитела. Экспрессионный вектор и контролирующие экспрессию последовательности можно выбирать так, чтобы они были совместимы с применяемой для экспрессии клеткой-хозяином. Кодирующую последовательность легкой цепи антитела и кодирующую последовательность тяжелой цепи антитела можно встраивать в один и тот же вектор или в различные векторы и можно функционально связывать с одними и теми же или с различными контролирующими экспрессию последовательностями (например, промоторами). В некоторых вариантах осуществления изобретения обе кодирующие последовательности встраивают в один и тот же экспрессионный вектор, и их можно функционально связывать с одними и теми же контролирующими экспрессию последовательностями (например, общим промотором), с отдельными идентичными контролирующими экспрессию последовательностями (например, промоторами), или с различными контролирующими экспрессию последовательностями (например, промоторами). Кодирующие антитело последовательности можно встраивать в экспрессионный вектор стандартными методами (например, путем лигирования комплементарных сайтов рестрикции во фрагмент и вектор гена антитела или путем лигирования «затупленных» концов, если отсутствуют какие-либо сайты рестрикции).

Пригодным является вектор, который кодирует функционально полную последовательность CH или CL человеческого иммуноглобулина с соответствующими сайтами рестрикции, сконструированными так, чтобы любую последовательность VH или VL можно было легко встраивать и экспрессировать согласно описанному выше. Гены, кодирующие HC и LC в указанных векторах, могут содержать интронные последовательности, которые могут приводить к увеличению общего выхода белка антитела путем стабилизации соответствующей мРНК. Интронные последовательности фланкированы сайтом-донором сплайсинга и сайтом-акцептором сплайсинга, которые определяют, где должен происходить сплайсинг РНК. Интронные последовательности могут быть локализованы либо в переменных, либо в константных областях цепей

антитела, либо и в переменных, и константных областях, если присутствует несколько интронов. Полиаденилирование и терминация транскрипции могут происходить в нативных сайтах хромосом в прямом направлении относительно кодирующих областей. Рекомбинантный экспрессионный вектор может кодировать также сигнальный пептид, который облегчает секрецию цепи антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антитела можно клонировать в векторе таким образом, чтобы сигнальный пептид был связан в рамке считывания с аминоконцом цепи иммуноглобулина. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (т.е. сигнальный пептид из белка, не относящегося к иммуноглобулинам).

Помимо генов цепей антитела рекомбинантные экспрессионные векторы, представленные в настоящем описании, могут нести регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепей антитела в клетке-хозяине. Как должно быть очевидно специалистам в данной области, конструкция экспрессионного вектора, включая выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор подлежащей трансформации клетки-хозяина, уровень экспрессии требуемого белка и т.д. Предпочтительные регуляторные последовательности для экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих включают вирусные элементы, которые обеспечивают высокие уровни экспрессии белка в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, имеющие происхождение из ретровирусных LTR, цитомегаловирусов (CMV) (например, промотор/энхансер CMV), обезьяньего вируса 40 (SV40) (например, промотор/энхансер SV40), аденовируса (например, основной поздний промотор аденовируса (AdMLP)), полиомы и сильных промоторов млекопитающих, таких как нативные промоторы иммуноглобулина и актина. Дополнительные сведения о вирусных регуляторных элементах и их последовательностях см., например, в патентах США 5168062, 4510245 и 4968615. В данной области известны методы экспрессии антител в растениях, включая описание промоторов и векторов, а также трансформации растений (см., например, патент США 6517529). Методы экспрессии полипептидов в клетках бактерий или клетках грибов, например клетках дрожжей, также хорошо известны в данной области.

Помимо генов цепей антитела и регуляторных последовательностей рекомбинантные экспрессионные векторы, представленные в настоящем описании, могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, регулирующие репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, сайты инициации репликации), и селективируемые маркерные гены. Селективируемые маркерные гены облегчают отбор клеток-хозяев, в которые интродуцирован вектор (см., например, патенты США 4399216, 4634665 и 5179017). Например, как правило, селективируемый маркерный ген придает устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, клетке-хозяину, в которую интродуцирован вектор. Например, селективируемые маркерные гены включают ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для применения в dhfr⁻-клетках-хозяевах для отбора/амплификации), ген нео (для отбора G418) и ген глутаматсинтетазы.

Клетки-хозяева и способы получения антител и композиций антител

В настоящем описании предложены также способы получения композиций антител и антигенов и их антигенсвязывающих участков, указанных в настоящем описании. Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способу получения антитела к CD73 или его антигенсвязывающего участка, указанного в настоящем описании, включающему получение рекомбинантной клетки-хозяина, содержащей нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь или ее антигенсвязывающий участок, и нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь или ее антигенсвязывающий участок антитела к CD73 или его антигенсвязывающего участка, указанного в настоящем описании; культивирование указанной клетки-хозяина в условиях, приемлемых для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего участка; и выделение образовавшегося антитела или его антигенсвязывающего участка. Антитела или антигенсвязывающие участки, полученные с помощью указанной экспрессии в указанных рекомбинантных клетках-хозяевах, в контексте настоящего описания обозначают как «рекомбинантные» антитела или антигенсвязывающие участки. В настоящем описании предложены также клетки-потомки указанных клеток-хозяев и антитела или антигенсвязывающие участки, полученные в них.

В контексте настоящего описания понятие «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин») означает клетку, в которую интродуцирован рекомбинантный экспрессионный вектор. Согласно определению рекомбинантная клетка-хозяин не встречается в естественных условиях. В настоящем описании предложены клетки-хозяева, которые могут содержать, например, вектор, указанный в настоящем описании. В настоящем описании предложены также клетки-хозяева, которые содержат, например, нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь или ее антигенсвязывающий участок, нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или ее антигенсвязывающий участок, или их обе, антитела к CD73 или его антигенсвязывающего участка, указанного в настоящем описании. Как должно быть очевидно, «рекомбинантная клетка-хозяин» и «клетка-хозяин» означают не только конкретную рассматриваемую клетку, а также потомство указанной клетки. Поскольку некоторые модификации могут произойти в последующих поколениях либо в результате мутации, либо под воздействием окружающей среды, то указанное потомство фактически может не быть идентичным родительской клетке, однако все еще подпадает под объем понятия «клетка-хозяин», применяемого в настоящем описании.

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующих антитела к CD73 и их антигенсвязывающие участки, и векторы, содержащие указанные молекулы нуклеиновых кислот, можно применять для трансфекции приемлемой клетки-хозяина из млекопитающего, растения, бактерии или дрожжей. Трансформацию можно осуществлять с помощью любого известного метода интродукции полинуклеотидов в клетку-хозяина. Методы интродукции гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области и включают опосредуемую декстраном трансфекцию, осаждение фосфатом кальция, опосредуемую полибренном трансфекцию, слияние протопластов, электропорацию, капсулирование полинуклеотида(ов) в липосомах и непосредственную микроинъекцию ДНК в ядра. Кроме того, молекулы нуклеиновых кислот можно интродуцировать в клетки млекопитающих с помощью вирусных векторов. Методы трансформации клеток хорошо известны в данной области (см., например, патенты США 4399216, 4912040, 4740461 и 4959455). Методы трансформации клеток растений хорошо известны в данной

области, они включают, например, опосредуемую *Agrobacterium* трансформацию, биобалистическую трансформацию, непосредственную инъекцию, электропорацию и вирусную трансформацию. Методы трансформации клеток бактерий и дрожжей также хорошо известны в данной области.

Линии клеток млекопитающих, которые можно применять в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны в данной области и включают многие линии иммортализованных клеток, доступных из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Они включают, среди прочего, клетки яичника китайского хомячка (CHO), NS0-клетки, SP2-клетки, НЕК-293Т-клетки, клетки 293 Freestyle (фирма Invitrogen), NIH-3Т3-клетки, HeLa-клетки, клетки почки детеныша хомяка (ВНК), клетки почки зеленой африканской мартышки (COS), клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Нер G2), А549-клетки и многие другие клеточные линии. Наиболее предпочтительные клеточные линии выбирают, определяя, для каких клеточных линий характерны высокие уровни экспрессии. Другие клеточные линии, которые можно применять, представляют собой линии клеток насекомых, такие как Sf9- или Sf21-клетки. Когда рекомбинантные экспрессионные векторы, кодирующие гены антитела, интродуцируют в клетки-хозяева млекопитающих, то антитела получают путем культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для экспрессии антитела в клетках-хозяевах, или более предпочтительно секретируют антитела в культуральную среду, в которой выращивают клетки-хозяева. Антитела можно выделять из культуральной среды с использованием стандартных методов очистки белков. Растительные клетки-хозяева включают, например, клетки *Nicotiana*, *Arabidopsis*, ряски, кукурузы, пшеницы, картофеля и т.д. Бактериальные клетки-хозяева включают клетки видов *E. coli* и *Streptomyces*. Дрожжевые клетки-хозяева включают клетки *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*.

Кроме того, экспрессию антител, представленных в настоящем описании, или их антигенсвязывающих участков из клеточных линий-продуцентов можно повышать с помощью многочисленных известных методик. Например, применение системы экспрессии гена глутаминсинтетазы (GS-система) представляет собой общепринятый подход к повышению экспрессии в

определенных условиях. GS-система обсуждена полностью или частично в европейских патентах EP 0216846, 0256055, 0323997 и 0338841.

Вероятно, антитела, экспрессируемые различными клеточными линиями или в трансгенных животных, могут иметь схемы гликозилирования, отличающиеся друг от друга. Однако все антитела, кодируемые молекулами нуклеиновых кислот, указанными в описании, или содержащие аминокислотные последовательности, представленные в описании, являются частью настоящего описания, вне зависимости от статуса гликозилирования антител и, более конкретно, вне зависимости от присутствия или отсутствия пост-трансляционной(ых) модификации(й).

Фармацевтические композиции

Другим объектом изобретения, представленным в настоящем описании, является фармацевтическая композиция, содержащая в качестве действующего вещества (или в виде единственного действующего вещества) антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, биспецифическую связывающую молекулу или композицию антител, которые представлены в настоящем описании. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции предназначены для облегчения, предупреждения и/или лечения рака, например, рака, указанного в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления изобретения рак находится в ткани, такой как кожа, легкое, кишечник, ободочная кишка, яичник, головной мозг, предстательная железа, почка, мягкие ткани, кроветворная система, голова и шея, печень, кость, мочевого пузырь, молочная железа, желудок, матка, шейка матки и поджелудочная железа. В конкретных вариантах осуществления изобретения рак представляет собой меланому, рак головы и шеи, рак молочной железы (например, трижды негативный рак молочной железы), рак мочевого пузыря, рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого), рак поджелудочной железы (например, протоковую аденокарциному поджелудочной железы), рак яичника, почечно-клеточную карциному, рак предстательной железы, колоректальный рак, холангиокарциному, рак щитовидной железы или рак яичка.

Фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, могут содержать одно/один/одну или несколько антител к CD73, антигенсвязывающих участков, композиций антител или биспецифических связывающих молекул, представленных в настоящем описании, например, одно
5 или два антитела к CD73, один или два антигенсвязывающих участка или одну или две биспецифических связывающих молекулы. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция содержит одно антитело к CD73, представленное в настоящем описании, или один его антигенсвязывающий участок. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция
10 содержит два различных антитела к CD73, представленных в настоящем описании, или два их антигенсвязывающих участка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция может содержать по меньшей мере одно антитело к CD73 или один его антигенсвязывающий участок, представленное/представленный в настоящем
15 описании, например, одно антитело к CD73 или один участок, и одно или несколько дополнительных антител, мишенью которых является один или несколько релевантных рецепторов клеточной поверхности, например, один или несколько релевантных для рака рецепторов.

Как правило, антитела, антигенсвязывающие участки и биспецифические связывающие молекулы, представленные в настоящем описании, можно
20 применять в виде препаративной формы в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемым(и) эксципиентом(ами), например, описанными ниже.

Понятие «эксципиент» в контексте настоящего описания относится к
25 любому ингредиенту, отличному от соединения(ий), представленного(ых) в настоящем описании. Выбор эксципиента(ов) в большей степени должен зависеть от таких факторов, как конкретный путь введения, воздействие эксципиента на растворимость и стабильность и природа лекарственной формы. В контексте настоящего описания «фармацевтически приемлемый эксципиент»
30 включает любой и все растворители, диспергирующие среды, материалы для нанесения покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, регулирующие изотоничность и замедляющие абсорбцию агенты и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Некоторыми примерами

фармацевтически приемлемых эксципиентов являются вода, физиологический раствор, забуренный фосфатом физиологический раствор, декстроза, глицерин, этанол и т.п., а также их комбинации. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию регулирующие изотоничность агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия.

Дополнительными примерами фармацевтически приемлемых субстанций являются смачивающие агенты или взятые в минорных количествах вспомогательные субстанции, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты или буферы, которые увеличивают срок годности при хранении или эффективность антитела.

Фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, и способы их получения должны быть очевидны специалистам в данной области. Указанные композиции и методы их получения описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 19-ое изд., изд-во Mack Publishing Company, 1995. Фармацевтически композиции предпочтительно производят в условиях, соответствующих GMP (надлежащая производственная практика).

Фармацевтическую композицию, представленную в настоящем описании, можно приготавливать, упаковывать или продавать оптом в виде единичной стандартной дозы или в виде множества единичных стандартных доз. В контексте настоящего описания «стандартная доза» содержит дискретное количество фармацевтической композиции, содержащей предварительно определенное количество действующего вещества. Количество действующего вещества, как правило, равно дозе действующего вещества, которую следует вводить субъекту, или соответствующей части такой дозы, такой как, например, половина или одна треть такой дозы.

Препаративные формы фармацевтической композиции, пригодные для парентерального введения, как правило, содержат действующее вещество в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем, таким как стерильная вода или стерильный изотонический физиологический раствор. Указанные препаративные формы можно получать, упаковывать или продавать в форме, приемлемой для болюсного введения или для непрерывного введения. Инъецируемые препаративные формы можно получать, упаковывать или продавать в форме стандартной дозы, например, в виде ампул, или в виде

содержащих несколько доз контейнеров с дополнением консерванта.

Препаративные формы для парентерального введения включают (но, не ограничиваясь только ими) суспензии, растворы, эмульсии в масляных или водных наполнителях, пасты и т.п. Указанные препаративные формы могут
5 содержать также один или несколько дополнительных ингредиентов, включая (но, не ограничиваясь только ими) суспендирующие, стабилизирующие или диспергирующие агенты. В некоторых вариантах препаративной формы для парентерального введения действующее вещество находится в сухом виде (т.е. порошкообразном или гранулированном), предназначенной для восстановления приемлемым наполнителем (например, стерильной свободной от пирогенов
10 водой) перед парентеральным введением восстановленной композиции.

Парентеральные препаративные формы включают также водные растворы, которые могут содержать эксципиенты, такие как соли, углеводы и забуферивающие агенты (предпочтительно до рН, составляющего от 3 до 9), но
15 для некоторых вариантов применения их более целесообразно приготавливать в виде стерильных неводных растворов или в виде высушенной формы, предназначенной для применения в сочетании с приемлемым наполнителем, таким как стерильная свободная от пирогенов вода. Примеры вводимых парентерально форм включают растворы или суспензии в стерильных водных
20 растворах, например, водных растворах пропиленгликоля или декстрозы.

Указанные лекарственные формы при необходимости можно соответствующим образом забуферивать. Другие вводимые парентерально препаративные формы, которые можно применять, включают формы, которые содержат действующее вещество в микрокристаллическом виде или в препарате в виде липосомы.

Препаративные формы для парентерального введения можно приготавливать для
25 немедленного и/или модифицированного высвобождения. Препаративные формы с модифицированным высвобождением включают формы с замедленным, постоянным, импульсным, контролируемым, целенаправленным и запрограммированным высвобождением.

30 В некоторых вариантах осуществления изобретения стерильные инъекционные растворы можно приготавливать путем включения антитела к CD73, его антигенсвязывающего участка, биспецифической связывающей молекулы или композиции антител в требуемом количестве в соответствующем

растворителе индивидуально или при необходимости в комбинации с перечисленными выше ингредиентами с последующей стерилизацией фильтрацией. Как правило, дисперсии приготавливают путем включения действующего вещества в стерильном наполнителе, который содержит основную дисперсионную среду и при необходимости другие ингредиенты из тех, которые перечислены выше. В случае стерильных порошков, предназначенных для приготовления стерильных инъектируемых растворов, предпочтительными методами получения являются вакуумная сушка и сушка вымораживанием, которые позволяют получать порошок действующего вещества плюс любого дополнительного требуемого ингредиента из их ранее простерилизованного фильтрацией раствора. Требуемую текучесть раствора можно поддерживать, например, применяя покрытие, такое как лецитин, поддерживая требуемый размер частиц в случае дисперсии, или путем применения поверхностно-активных веществ. Можно обеспечивать пролонгированную абсорбцию инъектируемых композиций путем включения в композицию агента, замедляющего абсорбцию, например, солей, таких как моностеараты, или желатина и/или, используя модифицирующие высвобождение покрытия (например, замедляющие высвобождение покрытий).

Антитела, представленные в настоящем описании, можно вводить также интраназально или с помощью ингаляции, как правило, в виде сухого порошка (либо индивидуально, в виде смеси, либо в виде включающей смешанные компоненты частицы, например, смешанной с пригодным фармацевтически приемлемым эксципиентом) с использованием ингалятора для сухого порошка; в виде аэрозольного спрея из баллона под давлением, насоса, спрея, распылителя (предпочтительно распылителя, использующего электрогидродинамику для получения мелкодисперсного тумана) или небулайзера, с использованием или без использования приемлемого пропеллента; или в виде назальных капель.

Антитела и участки антител, представленные в настоящем описании, можно приготавливать также для введения оральным путем. Оральное введение может включать проглатывание, в результате чего соединение попадает в желудочно-кишечный тракт, и/или буккальное введение, введение через язык или сублингвальное введение, при котором соединение попадает в кровоток непосредственно из ротовой полости. Препаративные формы, пригодные для

орального введения, включают твердые, полутвердые и жидкие системы, такие как таблетки; мягкие или твердые капсулы, содержащие мульти- или нанодисперсные частицы, жидкости или порошки; пастилки (включая наполненные жидкостью); жевательные резинки; гели; быстро диспергирующиеся лекарственные формы; пленки; овулы; спреи; и буккальные/мукоадгезивные пластыри. Жидкие препаративные формы включают суспензии, растворы, сиропы и эликсиры. Указанные препаративные формы можно использовать в качестве наполнителей в мягких или твердых капсулах (изготовленных, например, из желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы), и они, как правило, содержат носитель, например, воду, этанол, полиэтиленгликоль, пропиленгликоль, метилцеллюлозу или приемлемое масло, и один или несколько эмульгирующих агентов и/или суспендирующих агентов. Жидкие препаративные формы можно получать также путем восстановления твердых форм, например, из саше.

Терапевтические применения антител и композиций, представленных в настоящем описании

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела к CD73 и их антигенсвязывающие участки, композиции антител к CD73 и биспецифические связывающие молекулы, представленные в настоящем описании, применяют для снижения активности CD73 у млекопитающих (например, у человека), которые нуждаются в этом. Например, врач может усиливать противоопухолевую активность у пациента путем введения антитела к CD73, представленного в настоящем описании, индивидуально или в комбинации с другими терапевтическими агентами (последовательно или одновременно). Антитело к CD73 снижает активность CD73, ингибируя путь, который подавляют противоопухолевый ответ пациента.

В конкретных вариантах осуществления изобретения антитела или их антигенсвязывающие участки, композиции или биспецифические связывающие молекулы предназначены для применения для лечения CD73-позитивного рака. Рак может находиться в одной или нескольких тканях, таких как кожа, легкое, кишечник, ободочная кишка, яичник, головной мозг, предстательная железа, почка, мягкие ткани, кроветворная система, голова и шея, печень, кость, мочевой пузырь, молочная железа, желудок, матка, шейка матки и

поджелудочная железа. В некоторых вариантах осуществления изобретения виды рака, которые лечат с помощью антител к CD73, антигенсвязывающих участков, биспецифических связывающих молекул и/или композиций антител, представленных в настоящем описании, могут включать, например, меланому (например, прогрессирующую или метастатическую меланому), базально-клеточный рак кожи, глиобластому, глиому, глиосаркому, астроцитому, менингиому, нейробластому, рак коры надпочечников, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак полости рта, рак слюнных желез, рак носоглотки, рак молочной железы, рак щитовидной железы, рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого и плоскоклеточный рак легкого), рак пищевода, рак желудочно-пищеводного перехода, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, первичный рак брюшины, рак печени, гепатоцеллюлярную карциному, рак желчевыводящих путей, холангиокарциному, рак ободочной кишки, колоректальную карциному, рак яичников, рак фаллопиевых труб, рак мочевого пузыря, рак верхних мочевыводящих путей, уротелиальный рак, почечно-клеточную карциному, рак почки, рак мочеполовой системы, рак шейки матки, рак предстательной железы, рак яичка, фибросаркому, липосаркому, рабдомиосаркому, остеосаркому, гистиоцитому, рак поджелудочной железы, рак эндометрия, рак аппендикса, прогрессирующий рак клеток Меркеля, множественную миелому, саркому, хориокарциному, эритролейкоз, острый лимфобластный лейкоз, острый моноцитарный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфолейкоз, острый лимфобластный лейкоз, тучноклеточный лейкоз, лимфому из малых лимфоцитов, лимфому Беркитта, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, моноцитарную лимфому, HTLV-ассоциированный Т-клеточный лейкоз/лимфому, мезотелиому и солидные опухоли. Рак может находиться, например, на ранней, промежуточной, поздней, местнораспространенной или метастатической стадии, и может быть рецидивирующим или нечувствительным к другим терапевтическим средствам (например, другим анти-CD73 терапевтическим средствам), или для него может отсутствовать стандартная терапия.

В некоторых вариантах осуществления изобретения виды рака, которые лечат с помощью антител к CD73, антигенсвязывающих участков, композиций и/или биспецифических связывающих молекул, представленных в настоящем описании, могут включать, например, меланому, рак головы и шеи, рак

5 молочной железы (например, трижды негативный рак молочной железы), рак мочевого пузыря, рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого), рак поджелудочной железы (например, протоковую аденокарциному поджелудочной железы), рак яичника, почечно-клеточную карциному, рак предстательной железы, колоректальный рак, холангиокарциному, рак щитовидной железы или

10 рак яичка.

Понятия «лечить», «процесс лечения» и «лечение» относятся к методу облегчения или устранения биологического нарушения и/или по меньшей мере одного из сопутствующих ему симптомов. В контексте настоящего описания «облегчение» заболевания, нарушения или состояния означает уменьшение

15 тяжести и/или частоты появления симптомов заболевания, нарушения или состояния. Кроме того, ссылки в контексте настоящего описания на «лечение» включают ссылки на терапевтическое, паллиативное и профилактическое лечение.

«Терапевтически эффективное количество» означает количество

20 терапевтического агента, которое после введения должно в некоторой степени облегчать один или несколько симптомов подлежащего лечению нарушения. Терапевтически эффективное количество противоракового терапевтического средства может, например, приводить к замедлению роста опухоли, уменьшению опухоли, повышению выживаемости, элиминации раковых клеток, замедлению

25 или уменьшению прогрессирования заболевания, реверсированию метастазирования или другим клиническим конечным точкам, которые медицинские работники рассматривают, как желательные.

Антитела к CD73 или их антигенсвязывающие участки, композиции антител или биспецифические связывающие молекулы, указанные в описании,

30 можно вводить индивидуально или в комбинации с одним или несколькими другими лекарственными средствами или антителами (или в виде любой их комбинации). Таким образом, фармацевтические композиции, способы и применения, указанные в настоящем описании, включают также варианты

комбинаций (совместное введение) с другими активными агентами, подробно описанными ниже.

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятия «совместное введение», «вводимые совместно» и «в комбинации с» касательно антител к CD73 и их антигенсвязывающих участков, композиций антител и биспецифических связывающих молекул, представленных в настоящем описании, в сочетании с одним или несколькими другими терапевтическими агентами, означают, относятся и включают следующие варианты:

а) одновременное введение указанной комбинации

антитела/антигенсвязывающего участка/композиции антител/биспецифической связывающей молекулы, представленных в настоящем описании, и терапевтического(их) средства(ов) пациенту, нуждающемуся в лечении, когда указанные компоненты объединены в виде в одной лекарственной формы, из которой в организме указанного пациента указанные компоненты высвобождаются практически в одно и тоже время;

б) практически одновременное введение указанной комбинации

антитела/антигенсвязывающего участка/композиции антител/биспецифической связывающей молекулы, представленных в настоящем описании, и терапевтического(их) агента(ов) пациенту, нуждающемуся в лечении, когда указанные компоненты приготовлены отдельно друг от друга в виде различных лекарственных форм, которые принимаются практически одновременно указанным пациентом, после чего указанные компоненты высвобождаются практически в одно и тоже время в организме указанного пациента,

в) последовательное введение указанной комбинации

антитела/антигенсвязывающего участка/композиции антител/биспецифической связывающей молекулы, представленных в настоящем описании, и терапевтического(их) агента(ов) пациенту, нуждающемуся в лечении, когда указанные компоненты приготовлены отдельно друг от друга в виде различных лекарственных формы, которые принимаются в последовательные моменты времени указанным пациентом со значительным временным интервалом между каждым введением, после чего указанные компоненты высвобождаются в организме указанного пациента в значительно отличающиеся моменты времени;

и

г) последовательное введение указанной комбинации антитела/антигенсвязывающего участка/композиции антител/биспецифической связывающей молекулы, представленных в настоящем описании, и терапевтического(их) агента(ов) пациенту, нуждающемуся в лечении, когда
5 указанные компоненты объединены в виде в одной лекарственной формы, из которой в организме указанного пациента указанные компоненты высвобождаются контролируемым образом, в результате чего они высвобождаются в организме указанного пациента одновременно, последовательно и/или в перекрывающиеся друг друга промежутки времени, в
10 одно и то же и/или разное время, при этом для введения каждого компонента можно использовать либо одни и тот же, либо отличный от него путь.

Антитела к CD73 и их антигенсвязывающие участки, композиции антител или биспецифические связывающие молекулы, представленные в настоящем описании, можно применять без дополнительных терапевтических обработок,
15 т.е. в виде автономной терапии (монотерапия). Альтернативно этому, лечение антителами к CD73 или их антигенсвязывающими участками, композициями антител или биспецифическими связывающими молекулами, представленными в настоящем описании, может включать по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое лечение (комбинированная терапия), например,
20 иммуностимулятором, противораковым агентом (например, химиотерапевтическим агентом, антинеопластическим агентом, антиангиогенным агентом или ингибитором тирозинкиназы) или вакциной (например, противоопухолевой вакциной).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело или его
25 антигенсвязывающий участок, композицию антитела или биспецифическую связывающую молекулу можно вводить совместно или включать в состав в сочетании с другим препаратом/лекарственным средством для лечения рака. Дополнительное терапевтическое лечение может включать, например, применение иммуностимулятора, вакцины, химиотерапевтического агента,
30 антинеопластического агента, антиангиогенного агента, ингибитора тирозинкиназы, ингибитора пути CD73 и/или лучевой терапии. В некоторых вариантах осуществления изобретения дополнительное терапевтическое лечение может включать применение другого противоракового антитела.

Фармацевтические продукты (изделия), содержащие антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, композицию антител или биспецифическую связывающую молекулу, указанные в настоящем описании, и по меньшей мере один другой агент (например, химиотерапевтический, антинеопластический или антиангиогенный агент), можно применять для комбинированного лечения путем одновременного, раздельного или последовательного применения в противораковой терапии. Другой агент может представлять собой любое средство, пригодное для лечения конкретного рассматриваемого рака, например, средство, выбранное из группы, состоящей из алкилирующих агентов, например, производных платины, таких как цисплатин, карбоплатин и/или оксалиплатин; растительных алкалоидов, например, паклитаксела, доцетаксела и/или иринотекана; противоопухолевых антибиотиков, например, доксорубицина (адриамицина), даунорубицина, эпирубицина, идарубицина, митоксантрона, дактиномицина, блеомицина, актиномицина, лютеомицина и/или митомицина; ингибиторов топоизомеразы, таких как топотекан; антиметаболитов, например, фторурацила и/или других фторпиримидинов; FOLFOX; осимертиниба; циклофосфамида; антрациклина; дакарбазина; гемцитабина; или любых их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, композиция антител или биспецифическая связывающая молекула, указанные в настоящем описании, восстанавливают чувствительность к другому агенту.

Антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, композицию антител или биспецифическую связывающую молекулу, представленные в настоящем описании, можно применять также в комбинации с другими противораковыми терапиями, такими как вакцины, цитокины, ингибиторы ферментов, иммуностимуляторы и Т-клеточные терапии. Касательно вакцин, она может представлять собой белковую, пептидную или ДНК-вакцину, содержащую один или несколько антигенов, релевантных для подлежащего лечению рака, или вакцину, содержащую дендритные клетки наряду с антигеном. Приемлемые цитокины включают, например, IL-2, IFN-гамма и GM-CSF. Примером типичного ингибитора ферментов, который может обладать противораковой активностью, является ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), например, 1-метил-D-триптофан (1-D-MT). Понятие «адаптивная Т-

клеточная терапия» относится к различным методикам иммунотерапии, которые включают размножение или конструирование собственных Т-клеток пациентов для распознавания и атаки на их опухоли.

Предусматривается также, что антитело к CD73 или его
5 антигенсвязывающий участок, композицию антител или биспецифическую связывающую молекулу, представленные в настоящем описании, можно применять во вспомогательной терапии в сочетании с ингибиторами тирозинкиназ. Они представляют собой синтетические главным образом
10 являющиеся производными хиназолина низкомолекулярные молекулы, которые взаимодействуют с внутриклеточным тирозинкиназным доменом рецепторов и ингибируют индуцированное лигандом фосфорилирование рецептора, например, конкурируя за внутриклеточный сайт связывания Mg-АТФ.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, композицию антител или биспецифическую
15 связывающую молекулу можно применять в комбинации с медикаментозным лечением/лекарственным средством, которое опосредует активацию иммунной системы, включающим (но, не ограничиваясь только им) агент, который модулирует экспрессию или активность A2AR, A1AR, A2BR, A3AR, ADA, ALP, BTLA, B7-H3, B7-H4, CTLA-4, CD27, CD28, CD39, CD40, CD47, CD55, CD122,
20 CD137, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, CTLA-3, CEACAM (например, CEACAM-1 и/или CEACAM-5), GAL9, GITR, HVEM, LAG-3, LY108, LAIR1, ICOS, IDO, KIR, NKG2A, PAP, PD-1/PD-L1/PD-L2, OX40, TIGIT, TIM-3, TGFR-бета, TNFR2, VISTA, LILRB2, CMTM6 и/или 2B4. В некоторых вариантах осуществления изобретения агент модулирует экспрессию CD39, NKG2A, LAG-
25 3, TIM-3 или TNFR2. В конкретных вариантах осуществления изобретения агент представляет собой низкомолекулярный ингибитор. В конкретных вариантах осуществления изобретения агент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое/который связывается с одной из указанных выше молекул. В конкретных вариантах осуществления изобретения агент представляет собой антитело к PD-L1 (например, дурвалумаб или атезолизумаб), антитело к PD-1 или антитело к CTLA-4. Предусматривается также, что антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, композицию антител или биспецифическую связывающую молекулу, представленные в
30

настоящем описании, можно применять в комбинации с цитокином (например, IL-1, IL-2, IL-12, IL-15 или IL-21), ингибитором EGFR, ингибитором VEGF и т.д.

В конкретных вариантах осуществления изобретения антитела и их антигенсвязывающие участки, композиции антител или биспецифические связывающие молекулы, представленные в настоящем описании, можно применять в комбинации с ингибитором аденозинергического пути, мишенью которого может являться, например, CD73, CD39 или CD38, или ингибитором аденозинового рецептора, выбранного из A1R, A2AR, A2BR и/или A3R.

Указанные ингибиторы включают (но, не ограничиваясь только ими)

ингибиторы AR1 (например, DPCPX, SCH58261 и FSPTP), ингибиторы A2AR (например, PBF-509, CPI-444, AZD4635, ZM241385, AB928, истрадефиллин, SYN-115, ANR94, PSB1115, PSB603 и NIR178), ингибиторы A2B (например, miR-128b, ATL801, аминофиллин, MRS1754, IPDX и PBF-1129) и ингибиторы A3R (например, MRS1191, MRS1220, MRS1523 и CF-102). Другие примеры указанных ингибиторов включают другие антитела к CD73, а также антитела к CD39 и к CD38. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, биспецифическую молекулу или композицию антител, представленные в настоящем описании, можно вводить в комбинации с A001421, APCP, олеклумабом, CPX-006/CPI-006, CPX-016, NZV-930, BMS-986179, IPH53, PT199, дурвалумабом, атезолизумабом, даратумумабом или изатуксимабом.

Под объем настоящего описания подпадает также применение последовательностей (например, последовательностей шести CDR или VH и VL) антитела к CD73 или его антигенсвязывающего участка, указанного в описании, для получения химерного антигенного рецептора, который можно применять в CAR-T-технологии.

Как должно быть очевидно, антитела и их антигенсвязывающие участки, композиции антител и биспецифические связывающие молекулы, представленные в настоящем описании, можно применять в способе лечения, указанном в описании, можно применять для лечения, указанного в описании, и/или применять для приготовления медикаментозного средства для лечения, указанного в описании. В настоящем описании предложены также наборы и

изделия, содержащие антитела и их антигенсвязывающие участки, композиции антител и биспецифические связывающие молекулы, указанные в описании.

Доза и путь введения

Антитела или их антигенсвязывающие участки, композиции антител или биспецифические связывающие молекулы, представленные в настоящем описании, можно вводить в эффективном количестве для лечения рассматриваемого состояния, т.е. в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого результата. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как конкретное состояние, подлежащее лечению, возраст, пол и вес пациента, и в зависимости от того, вводят ли антитела в качестве индивидуального лечения или в комбинации с одним или несколькими дополнительными противораковыми вариантами лечения.

Режимы дозирования можно регулировать для обеспечения оптимального требуемого ответа. Например, можно применять одно болюсное введение, можно вводить несколько разделенных доз в течение времени или дозу можно пропорционально уменьшать или увеличивать в соответствии с требованиями терапевтической ситуации. Наиболее целесообразно приготавливать парентеральные композиции в виде стандартной дозы лекарственного средства для простоты введения и однородности дозирования. В контексте настоящего описания понятие «стандартная доза лекарственного средства» относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве однократных доз для пациентов/субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество действующего вещества, рассчитанное для получения желаемого терапевтического действия, в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация для стандартных доз лекарственного средства, представленных в настоящем описании, как правило, диктуется и напрямую зависит от (а) уникальных характеристик терапевтического агента и конкретного терапевтического или профилактического действия, которое должно достигаться, и (б) известных в данной области ограничений, связанных с изготовлением указанного действующего вещества для лечения чувствительности у индивидуумов.

Таким образом, специалистам в данной области должно быть очевидно, основываясь на представленном описании, что дозу и схему приема (режим дозирования) регулируют в соответствии с методами, хорошо известными в области терапии. Так, можно легко устанавливать максимальную переносимую дозу, и также можно определять эффективное количество, обеспечивающее 5 ощутимую терапевтическую пользу для пациента, а также требования к временным параметрам введения каждого агента для обеспечения ощутимой терапевтической пользы для пациента. Соответственно, хотя в описании приведены примеры определенных режимов дозирования и введения, эти 10 примеры никоим образом не ограничивают дозу и режим введения для пациента при воплощении на практике настоящего изобретения.

Следует отметить, что уровни доз могут варьироваться в зависимости от типа и серьезности состояния, которое требуется облегчать, и они могут включать одну или несколько доз. Также должно быть очевидно, что для любого 15 конкретного субъекта конкретные режимы дозирования должны корректироваться с течением времени в соответствии с индивидуальными потребностями и профессиональным суждением специалиста, осуществляющего или контролирующего введение композиций, и что диапазоны доз, изложенные в настоящем описании, являются только примерными и не предназначены для 20 ограничения области применения или воплощения на практике композиции. Кроме того, режим дозирования композиций, представленных в настоящем описании, может быть основан на различных факторах, включая тип заболевания, возраст, вес, пол, медицинское состояние пациента, серьезность состояния, путь введения и конкретное применяемое антитело. Таким образом, 25 режим дозирования может варьироваться в широких пределах, но его можно легко определять с использованием стандартных методов. Например, дозы могут быть скорректированы на основе фармакокинетических или фармакодинамических параметров, которые могут включать клинические действия, такие как токсические действия и/или лабораторные показатели.

30 Таким образом, под объем настоящего описания подпадает повышение дозы в организме пациента, что определяет специалист в данной области. Определение соответствующих доз и режимов хорошо известно в соответствующей области и

должно стать очевидным специалисту в данной области после ознакомления с настоящим описанием.

Эффективное количество для терапии опухоли можно оценивать по его способности стабилизировать прогрессирование заболевания и/или облегчать симптомы у пациента и предпочтительно приводить к реверсии прогрессирования заболевания, например, путем уменьшения размера опухоли. Способность антитела, антигенсвязывающего участка, композиции антител или биспецифической связывающей молекулы, представленных в настоящем описании, ингибировать рак можно оценивать с помощью анализов *in vitro*, например, описанных в примерах, а также с помощью приемлемых животных моделей, с использованием которых можно прогнозировать эффективность в отношении опухолей человека. Приемлемые режимы дозирования следует выбирать для получения оптимального терапевтического ответа в каждой конкретной ситуации, для решения вопроса о том, осуществлять ли введение в виде одного болюса или в виде непрерывной инфузии, и с возможной корректировкой дозы, требуемой в каждом случае.

Антитела или их антигенсвязывающие участки, композиции антител или биспецифические связывающие молекулы, представленные в настоящем описании, можно вводить с помощью любого метода введения пептидов, белков или антител, приемлемых в данной области и, как правило, пригодных для парентерального введения. В контексте настоящего описания «парентеральное введение» включает любой путь введения, характеризующийся физическим нарушением ткани субъекта и введением через разрыв в ткани, что, как правило, приводит к прямому введению в кровоток, в мышцу или во внутренний орган. Таким образом, парентеральное введение включает (но, не ограничиваясь только указанным) введение путем инъекции, путем внесения через хирургический разрез, путем внесения через проникающую через ткань нехирургическую рану и т.п. В частности, предполагается, что парентеральное введение включает (но, не ограничиваясь только ими) подкожные, внутрибрюшинные, внутримышечные, надчревные, внутриполостные, внутривенные, внутриартериальные, внутрибололочные, интрауретральные, внутричерепные, внутриопухолевые и внутрисиновиальные инъекции или инфузии. Конкретные варианты

осуществления изобретения включают внутривенные и подкожные пути введения.

Диагностические применения и композиции

Антитела и антигенсвязывающие участки, представленные в настоящем описании, можно применять также в диагностических процессах (например, *in vitro*, *ex vivo*). Например, антитела и антигенсвязывающие участки можно применять для детекции/измерения уровня CD73 в образце из организма пациента (например, в образце ткани или образце общей воды, таком как воспалительный экссудат, кровь, сыворотка, желудочной сок, слюна или моча).

Приемлемые методы детекции и измерения включают иммунологические методы, такие как проточная цитометрия, твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), хемилюминесцентные анализы, радиоиммуноанализы и иммуногистологические анализы. Настоящее описание относится также в наборам (например, диагностическим наборам), содержащим антитела и антигенсвязывающие участки, указанные в описании.

Изделия и наборы

В настоящем описании представлены также изделия, например, наборы, содержащие один или несколько контейнеров (например, одноразовые или многоразовые контейнеры), которые содержат фармацевтическую композицию, включающую антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, композицию или биспецифическую связывающую молекулу, указанные в описании, необязательно дополнительную биологически активную молекулу (например, другой терапевтический агент), и инструкции по применению.

Антитело или антигенсвязывающий участок, композицию или биспецифическую связывающую молекулу и необязательную дополнительную биологически активную молекулу можно упаковывать по отдельности в приемлемую упаковку, такую как флакон или ампула, изготовленные из инертного стекла или пластика. В конкретных вариантах осуществления изобретения флакон или ампула содержит концентрированный маточный раствор (например, 2-, 5-, 10-кратный или более концентрированный) антитела или антигенсвязывающего участка, композиции или биспецифической связывающей молекулы и необязательно дополнительной биологически активной молекулы. В конкретных вариантах осуществления изобретения изделия, такие как наборы, включают медицинское

устройство для введения антитела или антигенсвязывающего участка, композиции или биспецифической связывающей молекулы и/или биологически активной молекулы (например, шприц и иглу); и/или соответствующий разбавитель (например, стерильную воду и нормальный физиологический раствор). В настоящем описании представлены также методы приготовления указанных изделий.

Если не указано иное, то научные и технические понятия, используемые в настоящем описании, должны иметь обычные значения, которые очевидны специалистам в данной области. Ниже описаны примеры методов и материалов, хотя методы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным, также можно применять при осуществлении на практике или при тестировании настоящего изобретения. В случае противоречия в качестве решающей следует рассматривать настоящую спецификацию, включая определения.

Как правило, номенклатура, используемая в связи с указанными в описании методами культивирования клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики, аналитической химии, синтетической органической химии, медицинской и фармацевтической химии, а также химии белков и нуклеиновых кислот и гибридизации, и путями их применения, хорошо известна и широко используется в данной области. Ферментативные реакции и методы очистки осуществляют согласно спецификациям производителя, как это обычно осуществляют в данной области, или в соответствии с указаниями, представленными в настоящем описании.

Кроме того, если из контекста не следует иное, то понятия, упоминаемые в единственном числе, могут включать множественное число, а понятия, упоминаемые во множественном числе, могут включать единственное число. Должно быть очевидно, что в настоящей спецификации и вариантах осуществления изобретения слова «иметь» и «включать» или варианты, такие как «имеет», «имеющий», «содержит» или «содержащий» подразумевают включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение любого другого целого числа или группы целых чисел.

Все публикации и другие упомянутые в настоящем описании ссылки включены в настоящее описание в полном объеме. Хотя в настоящем описании процитирован ряд документов, указанное цитирование не означает признания

того, что какой-либо из этих документов является частью общих знаний в данной области.

Для лучшего понимания настоящего описания ниже приведены примеры. Указанные примеры приведены только в целях иллюстрации и не должны быть истолкованы как каким-либо образом ограничивающие объем настоящего описания.

Примеры

Пример 1. Клонирование антител к CD73 из крысиных В-клеток

Материалы и методы

10 Антитела против человеческого CD73 выделяли из популяции антител, полученных из крыс OmniRat[®] (Osborn и др., J Immunol. 190(4), 2013, сс. 1481-1490), трансгенной линии крыс фирмы Ligand Pharmaceuticals Inc., которые продуцируют антитела полностью человеческих идиотипов. Клонирование полученных из крыс генов антител из отсортированных в виде единичных клеток В-клеток, секретирующих антитела (ASC), осуществляли с помощью технологии обнаружения антител Symplex[™] (Meijer и др., J Mol Biol 358(3), 2006, сс. 764-772).

Конструкциями популяции антител, кодирующими полностью человеческие иммуноглобулины в формате IgG₁-LALA (см. ниже), трансфектировали НЕК293-клетки. Клеточные супернатанты подвергали скринингу в отношении связывания с CD73, экспрессируемым на поверхности CHO-клеток, применяя проточную цитометрию в формате с высокой пропускной способностью. CD73-реактивные клоны анализировали путем секвенирования ДНК и экстрагировали кодирующие антитела последовательности ДНК. Отобранные клоны антител экспрессировали и оценивали их функциональность согласно описанным ниже методам.

Миссенс-мутации на аминоконцах тяжелых и легких цепей, которые интродуцировали с помощью дегенеративных праймеров при осуществлении клонирования кодирующих антитела к ДНК-фрагментов с использованием технологии Symplex[™], подвергали обратной коррекции в последовательность зародышевой линии. В таблице 1 представлены нуклеотидные последовательности переменных доменов тяжелых и легких цепей антител зародышевой линии, обозначенных как 21028, 21046, 21127 и 21163. Процесс

коррекции включал коррекцию аминоконцевой последовательности в зародышевую линию, а также оптимизацию предпочтительных кодонов.

Мишени для сопоставления с последовательностями человеческой зародышевой линии идентифицировали с помощью поиска гомологии с использованием

5 программы Blast для переменных областей тяжелых цепей и легких цепей.

Белковые последовательности переменных доменов, константных областей и гиперпеременных участков (CDR) антител 21028, 21046, 21127 и 21163 представлены в таблице 2, таблице 3 и таблице 4 соответственно.

Результаты

10 В таблице 1 представлены нуклеотидные последовательности, кодирующие переменные домены антител 21028, 21046, 21127 и 21163.

Таблица 1: Нуклеотидные последовательности антител 21028, 21046, 21127 и 21163

	Последовательность (5' → 3')
21028 VH SEQ ID NO: 1	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCAGGCAGAAAGCCT GAGACTGTCTTGTGCTGCCTCTGGCTTTTCCTTCGACGATTACGCTATGCACTGG GTGCGGCAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCTGGCATCAGCTGGCAC TCCGATAACATCGGCTACGCTGATTCCGTGAAGGGCAGATTACCATCTCCAGA GACAATGCCAAGAAGTCCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCTGAGGAT ACCGCCTTTTACTATTGCGCCAAGGATGGCCCAAGATATAGGGGCTCCTATTAC TACTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACAGTCTCGAGT
21046 VH SEQ ID NO: 2	GAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCCTGGTGCAGCCTGGCAGATCTCT GAGACTGTCTTGTGCTGGCTTCTGGTTTTACTTTTGATGACTATGCCATGCACTGG GTGCGGCAGGCTCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCTGGCATCAGCTGGAA TTCCGGCTCTATCGGCTACGCTGACAGCGTGAAAGGCAGATTACCATCTCCAG AGACAATGCCAAGAAGCAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCTGAGG ATACCGCTTTCTATTACTGCGCTCAGGGCGGCTATGCTATCCTGACCGCCCTGGA GTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTCTCGAGT
21127 VH SEQ ID NO: 3	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGCGGCCTGGTGCAACCAGGCAGAAAGCCT GAGACTGTCTTGTGCTGCCTCCGGTTTTACTTTTCGATGACTTCGCTATGCATTGG GTGCGGCAGGCCCCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCTGGCATCTCTTGAAT AGCGGCAACATCGGCTACGCCGACTCTGTGAAGGGCAGATTACCATCTCCAGA GACAACGCCAAGAAGTCCCTGTATCTCCAAATGAACTCCCTGAGAGCTGAGGAT ACCGCTCTGTACTATTGCGCCAAGGATAAGTCCGGCTCTCCTTACTATTACTACG GCATGGACGTGTGGGGCCAGGGCACAAATGGTGACCGTCTCGAGT
21163 VH SEQ ID NO: 4	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCAGGCGGCTCCCTG AGACTGTCTTGTGCTGCCTCCGGCTTTAGCTTCTCCACCTATTGGATGAACTGGG TGCGCCAGGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCAATATCAAGCAGGAT GGCTCCGAGAAGTACTATGTGGACTCCGTGAAGGGCAGATTACCATCTCCAGA GACAATGCCAAGAAGTCCCTGTATCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGAT ACCGCCGTGTACTATTGTGCCAGGGATATCAGCTCCTCTTGGTTTTACTATTACG GCATGGACGTGTGGGGCCAGGGCACAACTGGTGACCGTCTCGAGT
21028 VL SEQ ID NO: 5	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCTACACTGTCCGCCAGCGTGGGCGATAGG GTGACCATCACATGCCGGGCCTCTCAGTCCATCAGCAACTGGCTGGCTTGGTAC CAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTATAAGGCTTCCAGCCTG GAGAGCGGCGTGCCATCTAGATTCTCTGGCTCCGGCAGCGGCACCGAGTTTACC CTGACAATCTCTCCCTGCAGCCAGACGATTTTCGCTACATACTATTGTCAGCAGT ACAATTCTTATCCCCCATCACCTTTGGCCAGGGCACACGCTGGAGATCAAG

	Последовательность (5' → 3')
21046 VL SEQ ID NO: 6	GACATCCAGATGACCCAGTCCCCTTCCAGCCTGTCCGCCTCCGTGGGCGATAGG GTGACCATCACATGCCGGGCCTCTCAGGGCATCTCCAACCTACCTGGCTTGGTTCC AGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGAGCCTGATCTATGCCGCTTCTAGCCTGC AAAGCGGCGTGCCATCTAAGTTCTCTGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTTACCC TGACAATCAGCTCTCTGCAGCCAGAGGATTTGCCACATACTATTGTCAGCAGT ACAATTCTTATCCCCCTGACATTCGGCGGTGGAACCTAAGGTGGAGATCAAG
21127 VL SEQ ID NO: 7	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCTCCTCCGTGTCCGCCTCCGTGGGCGATAGA GTGACCATCACATGCAGGGCTACACAGGGAATCTCTAGGCGGCTGGCTTGGTAC CAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTATGCCGCTTCTAGCCTG CAATCTGGCGTGCCATCCAGGTTCTCTGGATCCGGAAGCGGAACCGACTTTACC CTGACAATCAGCTCTCTGCAGCCAGAGGATTTGCCACATACTATTGTCAGCAG GCTAACTCCTTCCCCCTGACTTTTCGGCGGTGGAACAAAAGTGGAGATCAAG
21163 VL SEQ ID NO: 8	GACATCCAGCTGACACAGAGCCCATCTTTCCTGTCCGCCTCCGTGGGCGATAGG GTGACCATCACATGCCGGGCCTCTCAGGGCATCTCCAGCTACCTGGCTTGGTAT CAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCTGCTTCTACCCTG CAGTCCGGAGTGCTAGCAGGTTCTCTGGCTCCGGCAGCGGCACAGAGTTTACC CTGACAATCTCTAGCCTGCAACCAGAGGACTTCGCCACCTACTATTGTCAGCAG CTGAACTCCTATCCCCCTACATTCGGCGGTGGAACCAAAGTCGAAATCAAG

В таблице 2 представлены выведенные аминокислотные последовательности антител 21028, 21046, 21127 и 21163. CDR выделены жирным шрифтом/подчеркнуты.

5 Таблица 2: Аминокислотные последовательности варьируемых доменов антител

21028, 21046, 21127 и 21163

	Последовательность (от N-конца к С-концу)
21028 VH SEQ ID NO: 9	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAAS <u>GFSFDDY</u> AMHWVRQAPGKGLEWVS <u>GISWHSDNIGY</u> ADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAFYY <u>CAKD</u> <u>GPRYRGSYYYFDYW</u> GQGTLTVTVSS
21046 VH SEQ ID NO: 10	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCVAS <u>GFTFDDY</u> AMHWVRQAPGKGLEWVS <u>GISWNSGSI</u> GYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAFYY <u>CAQG</u> <u>GYAILTALEYW</u> GQGTLTVTVSS
21127 VH SEQ ID NO: 11	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAAS <u>GFTFDDF</u> AMHWVRQAPGKGLEWVS <u>GISWNSGNI</u> GYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYY <u>CAKD</u> <u>KSGSPYYYYGMDVW</u> GQGTMVTVSS
21163 VH SEQ ID NO: 12	EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAAS <u>GFSFSTYW</u> WMNWVRQAPGKGLEWVA <u>NIKODGSEK</u> YYVDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY <u>CAR</u> <u>DISSWFYYYGMDVW</u> GQGTTVTVSS
21028 VL SEQ ID NO: 13	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS <u>QGISNWL</u> AWYQQKPGKAPKLLIY <u>KA</u> <u>SSLESGVPSRFS</u> SGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYY <u>COQYNSYSPITF</u> GQGTR LEIK
21046 VL SEQ ID NO: 14	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS <u>QGISNYL</u> AWFQQKPGKAPKSLIY <u>AAS</u> <u>SLQSGVPSKFS</u> SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY <u>COQYNSYPLTF</u> GGGGTK VEIK
21127 VL SEQ ID NO: 15	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRAT <u>QGISRRL</u> AWYQQKPGKAPKLLIY <u>AA</u> <u>SSLQSGVPSRFS</u> SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY <u>COQANSFPLTF</u> GGGGTK VEIK
21163 VL SEQ ID NO: 16	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRAS <u>QGISSYL</u> AWYQQKPGKAPKLLIY <u>AAS</u> <u>TLQSGVPSRFS</u> SGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYY <u>COQLNSYPPTF</u> GGGGTKV EIK

В таблице 3 представлены аминокислотные последовательности константных областей тяжелых и легких цепей (CH и CL соответственно). «IgG₁ LALA» означает присутствие мутаций «LALA» в тяжелой цепи (L234A/L235A, нумерация согласно системе нумерации Кэбота), которые, как известно снижают эффекторную функцию Fc-области антител в виде IgG₁ (Hezareh и др., J Virol. 75(24), 2001, сс. 12161-12168; Hessel и др., Nature 449(7158), 2007, сс. 101-104).

Таблица 3. Аминокислотные последовательности константных областей антител 21028, 21046, 21127 и 21163

Фрагмент	Последовательность (от N-конца к C-концу)
IgG ₁ -LALA CH, добавленная к VH SEQ ID NO: 41	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSPGK
Каппа-CL, добавленная к VL SEQ ID NO: 42	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

В таблице 4 представлены аминокислотные последовательности CDR тяжелых и легких цепей антител 21028, 21046, 21127 и 21163, в которых CDR определяли согласно IMGT-системе.

Таблица 4: Аминокислотные последовательности CDR антител 21028, 21046, 21127 и 21163

Обозначение	Последовательность (от N-конца к C-концу)					
	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
21028	GFSFDDYA SID 17	ISWHSDNI SID 18	CAKDGPRYRGSYYYFDYW SID 19	QSI SNW SID 20	KAS SID 21	CQQYNSYSPITF SID 22
21046	GFTFDDYA SID 23	ISWNSGSI SID 24	CAQGGYAILTALEYW SID 25	QGISNY SID 26	AAS SID 27	CQQYNSYPLTF SID 28
21127	GFTFDDFA SID 29	ISWNSGNI SID 30	CAKDKSGSPYYYYGMDVW SID 31	QGISRR SID 32	AAS SID 33	CQQANSFPLTF SID 34
21163	GFSFSTYW SID 35	IKQDGSEK SID 36	CARDISSSWFYYYYGMDVW SID 37	QGISSY SID 38	AAS SID 39	CQQLNSYPPTF SID 40

SID: SEQ ID NO:

В таблице 5 представлена информация о SEQ ID NO антител 21028, 21046, 21127 и 21163. Если не указано иное, то последовательности представляют собой аминокислотные последовательности.

Таблица 5: SEQ ID NO: антител 21028, 21046, 21127 и 21163

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

nt: нуклеотид
aa: аминокислота

Пример 2. Скрининг антител к CD73 на основе анализа активности в отношении растворимого CD73

Панель антител к CD73 оценивали в отношении способности ингибировать ферментативную активность растворимого рекомбинантного CD73. Антитела к CD73 инкубировали в концентрации 10 мкг/мл с рекомбинантным CD73 (фирма SinoBiological Incorporated), АМФ и АТФ в течение 30 мин при 37°C. Активность CD73 изучали, измеряя ингибирование АМФ по уровню АТФ с использованием CellTiter-Glo® 2.0 (фирма Promega Corporation) согласно методу, описанному у Sachsenmeier и др., Journal of Biomolecular Screening 17(7), 2012, сс. 993-998).

Данные об ингибировании ферментативной активности CD73 после обработки антителами к CD73 представлены на фиг. 1. Установлено, что активность CD73 после обработки различными антителами к CD73 сильно варьировалась, свидетельствуя о том, что некоторые антитела не обладали функциональной активностью в этом анализе, в то время как другие антитела сильно ингибировали активность CD73.

Пример 3. Скрининг антител к CD73 на основе клеточного анализа активности CD73

Панель антител к CD73 оценивали в отношении способности ингибировать активность CD73, экспрессируемого на линиях раковых клеток. Антитела к CD73 инкубировали в концентрации 10 мкг/мл с экспрессирующими CD73 клеточными линиями в течение 30 мин при 37°C с последующим добавлением субстрата CD73, т.е. АМФ, и дополнительным инкубацией в течение 3 ч при

37°C. Активность CD73 изучали путем добавления АТФ к супернатантам и измерения ингибирования АМФ по уровню АТФ с использованием CellTiter-Glo® 2.0 (фирма Promega Corporation) согласно методу, описанному у Sachsenmeier и др, выше.

5 Данные об активности CD73, экспрессируемого на двух различных линиях раковых клеток, после обработки антителами к CD73 представлены на фиг. 2. Установлено, что активность CD73 после обработки различными антителами к CD73 сильно варьировалась; некоторые антитела не обладали функциональной активностью в этом анализе, в то время как другие антитела сильно
10 ингибировали активность CD73. Важно отметить, что одни и те же десять антител оказались наиболее активными при изучении на обеих клеточных линиях.

Пример 4. Клонирование применяемых для сравнения аналогов антител к CD73

15 Материалы и методы

Аминокислотные последовательности, кодирующие вариабельные домены тяжелых и легких цепей аналогов антител, которые представлены в таблице 6, получали из перечисленных патентов или заявок на патент. Белковые последовательности путем обратной трансляции преобразовывали в
20 последовательности ДНК с использованием предпочтительных человеческих кодонов. Получали путем синтеза генов соответствующие последовательности ДНК и клонировали в экспрессионных векторах, содержащих константные области человеческих тяжелых и легких цепей, получая в результате экспрессии полноразмерные цепи антител. Изотип человеческого антитела, выбранный для
25 экспрессии, представлен в колонке, в которой указан формат антитела, наряду с дополнительными мутациями, интродуцированными, если это имело место, в Fc-область. СНО-клетки трансфектировали полученными экспрессионными плазмидами с использованием стандартной системы экспрессии белков. Супернатанты соответствующих антител очищали с использованием для очистки
30 стандартной колоночной хроматографии с белком А.

Таблица 6: Перечень полученных путем синтеза генов аналогов антител и соответствующих форматов антител

Антитело	Формат антитела	Источник
MEDI9447 (олеклумаб, фирма MedImmune)	IgG ₁ -TM (с ослабленной эффекторной функцией тройной мутант L234F, L235E и P331S)	Публикация патента США 2016/0129108 A1 (SEQ ID NO: 17 и 19)
CPX006 (фирма Corvus)	IgG ₁ -N297Q (негликозилированный)	Публикация патента США 2018/0009899 A1 (SEQ ID NO: 14 и 13)
11E1 (фирма Innate Pharma)	IgG ₁ -LALA	Публикация патента США 2018/0030144 A1 (SEQ ID NO: 3 и 4)

Пример 5. Непосредственное связывание антител с CD73 с клетками CHO-

5 S, трансфектированными белком CD73 человека или обезьян циномолгус

Связывание антител к CD73 21028, 21046, 21127 и 21163 с белком CD73 человека или обезьян циномолгус, экспрессируемым на клетках CHO-S, оценивали и сравнивали со связыванием применяемого в качестве аналога олеклумабом.

10 Антитела к CD73 инкубировали с клетками хомячка линии CHO-S, кратковременно экспрессирующими CD73 человека или обезьян циномолгус, в течение 30 мин при 4°C. Клетки дважды промывали и затем инкубировали в течение еще 20 мин с конъюгированным с AF647 вторичным антителом к человеческому IgG (H+L). После стадии очистки связывание антитела
15 определяли, используя проточный цитометр с высокой пропускной способностью iQue Screener PLUS (фирма Sartorius), измеряя среднее геометрическое значение (GeoMean) AF647-сигнала в каждой лунке. Каждую концентрацию анализировали в трех повторностях и строили по 12 точкам кривую титрования для каждого антитела.

20 Кривые связывания антител с CD73 человека или обезьян циномолгус, экспрессируемым на клетках, представлены на фиг. 3. Анализируемые антитела связывались с клетками, экспонирующими белок CD73 человека и обезьян циномолгус, с различной силой и эффективностью. В частности, МАт 21127 связывалось с CD73 человека и обезьян циномолгус наиболее сильно по
25 сравнению с другими протестированными антителами.

Пример 6. Измерение аффинности антитела и Fab-фрагмента с
внеклеточным доменом (ECD) CD73 человека и обезьян циномолгус

В этом примере продемонстрировано связывание Fab-фрагментов антител к CD73 и антител к CD73 с внеклеточными доменами (ECD) рекомбинантного CD73 человека и обезьян циномолгус, измеренное с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Материалы и методы

Кинетические анализы связывания МАт к CD73 и Fab-фрагментов осуществляли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR), используя устройство с непрерывным потоком для печати макромолекул (Continuous Flow Microspotter) (CFM, фирма Wasatch Microfluidics, Солт-Лейк-Сити, США), объединенным с устройством IBIS MX96 SPR (фирма IBIS Technologies, Нидерланды). Синтезировали кДНК CD73, кодирующие внеклеточные домены CD73 человека и обезьян циномолгус, и каждую клонировали в векторе, содержащем промотор CMV и либо С-концевую 6×гистидиновую последовательность (SEQ ID NO: 45) для получения меченного His CD73 ECD, либо последовательность Fc IgG1 (аминокислоты (AA) P101-K330), получая слияние С-конца Fc IgG1 с клонированным CD73 ECD.

Меченные His и имеющие Fc-слияние конструкции временно экспрессировали с помощью системы экспрессии ExpiCHO™ и очищали с помощью либо Ni-NTA-хроматографии, либо стандартных процедур MabSelect™ SuRe™ соответственно. Fab-фрагменты антител к CD73 создавали путем расщепления полноразмерных антител к виде IgG1 с помощью фермента GingisKHAN, используя набор фирмы Genovis (Швеция). Аффинность Fab-фрагментов измеряли путем захвата меченных Fc антигенов на G-a-hu-IgG Fc SensEye® в течение 15 мин, применяя CFM. После нанесения пятен (печати) SensEye® помещали в биосенсор IBIS MX96 и иммобилизованные антигены фиксировали с помощью набора SensEye FixIt. Кинетический анализ осуществляли путем инъекции мономерных Fab-фрагментов в возрастающих концентрациях от 0,8нМ до 300нМ. После каждого цикла инъекции Fab-фрагмента поверхность регенерировали с помощью 10мМ глицина, pH 3, 10% глицерина. Ассоциацию Fab осуществляли в течение 15 мин и диссоциацию антигена осуществления в течение 15 мин. Аффинность полноразмерных

моноклональных антител (МАт) измеряли, осуществляя захват МАт на G-a-hu-IgG Fc SensEye[®] (фирма Ssens BV, Нидерланды) в течение 15 мин, используя устройство Continuous Flow Microspotter (CFM, фирма Wasatch Microfluidics, Солт-Лейк-Сити, США). После нанесения пятен SensEye закрепляли в IBIS
5 MX96 и нанесенные в виде пятен МАт фиксировали с использованием набора SensEye FixIt (фирма Ssens BV, Нидерланды). Кинетический анализ осуществляли путем применения серии кинетического титрования, вводя увеличивающиеся концентрации меченных His антигенов от 0,16нМ до 10нМ в виде 2-кратных разведений. Поверхность регенерировали перед следующим
10 циклом инъекции антигена обезьян циномолгус с помощью 100мМ Н₃РО₄, рН 3. Ассоциацию МАт осуществляли в течение 15 мин, а диссоциацию антигена осуществления в течение 45 мин. Установленные ответы связывания аппроксимировали с помощью простой модели связывания 1: 1 Ленгмюра с помощью программного обеспечения Scrubber 2.0, предназначенного для расчета
15 константы скорости реакции ассоциации (k_{on} или k_a), скорости реакции диссоциации (k_{off} или k_d) и аффинности (K_D). Кинетические параметры связывания оценивали в среднем по шести независимым точкам измерения.

Результаты

Аффинности связывания и кинетические параметры Fab-фрагментов
20 антител к CD73 и полноразмерных антител представлены в таблице 7 и таблице 8 соответственно. Полноразмерные антитела связывались с человеческим CD73 с высокой аффинностью, величины которой находились в субнаномолярном диапазоне. Все антитела распознавали CD73 человека и обезьян циномолгус, при этом кинетические параметры оказались сопоставимыми с параметрами
25 применяемых для сравнения антител (аналоги 11E1, олеклумаб и CPX006). Все антитела характеризовались очень медленными константами скорости диссоциации, обуславливающими высокие измеренные величины аффинности. Аффинности, характеризующие одновалентное связывание Fab-фрагментов, оказались в 20-245 раз более слабыми по сравнению с аффинностями
30 соответствующих полноразмерных антител. На скорости диссоциации (k_d) сильное влияние оказывало изменение формата, при этом Fab-фрагменты характеризовались существенно более быстрой диссоциацией от CD73, чем интактные антитела.

Различия в кинетике связывания интактных антител и Fab-фрагментов позволяют предположить, что антитела связываются с гомодимером CD73 и что высокая аффинность, установленная для полноразмерных антител, является результатом эффектов авидности. Известно, что CD73 существует в виде нековалентного гомодимера (Knapp и др., Structure 20(12), 2012, сс. 2161-2173), и ранее было установлено, что связывание аналогов 11E1 и олеклумаба зависит от двухвалентного связывания с гомодимером CD73, при этом различия в кинетике связывания между полноразмерными антителами и Fab-фрагментами (Perrot, Cell Reports 27(8), 2019, сс. 2411-2425) были сходными с указанными в настоящем описании.

SPR-анализ антител к CD73 и Fab-фрагментов продемонстрировал, что для антител к CD73 характерно двухвалентное связывание с димерным CD73 и что аффинности связывания полноразмерных антител, примеры которых представлены в настоящем описании, сопоставимы с аффинностями приведенных для сравнения МАт, касательно связывания с гомодимером CD73.

Таблица 7: Кинетика связывания Fab-фрагментов антител к CD73 с CD73 ECD человека (Hs) и обезьян циномолгус (Cy), измеренная с помощью SPR

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

Таблица 8: Кинетика связывания антител к CD73 с CD73 ECD человека (Hs) и обезьян циномолгус (Cy), измеренная с помощью SPR

МАт	CD73 ECD	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (нМ)
21127	Hs	3,2E+05	7,0E-05	0,22
	Cy	3,8E+05	9,0E-05	0,24
21163	Hs	6,5E+04	5,5E-05	0,91
	Cy	1,0E+05	6,2E-05	0,66
21046	Hs	1,9E+05	8,3E-06	0,04

МАт	CD73 ECD	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (нМ)
	Cy	2,1E+05	1,1E-05	0,05
Аналог 11E1	Hs	5,7E+04	5,6E-06	0,10
	Cy	8,4E+04	1,3E-05	0,14
Аналог олеклумаб	Hs	1,1E+05	2,5E-06	0,02
	Cy	1,4E+05	6,6E-06	0,06
Аналог CPX006	Hs	1,7E+05	2,4E-06	0,02
	Cy	2,8E+04	1,4E-05	0,33

Пример 7. Эпитопная группировка антител к CD73

В этом примере описано объединение антител к CD73 в зависимости от групп эпитопов на основе моделей парной конкуренции. Антитела, принадлежащие к различным эпитопным группам, распознают разные эпитопы ECD CD73.

Материалы и методы

Изучение парной конкуренции антител осуществляли с помощью SPR, используя устройство IBIS-MX96 (фирма IBIS, Нидерланды). Антитела к CD73 разводили до концентрации 3 мкг/мл в 3ФР и наносили в виде пятен на G-a-hu-IgG Fc SensEye[®] путем захвата в течение 15 мин с использованием устройства Continuous Flow Microspotter с последующей блокадой оставшихся сайтов связывания герцептином (трастузумаб) и химической перекрестной сшивкой с помощью набора SensEye FixIt (фирма IBIS, Нидерланды). После подготовки сенсора осуществляли анализ конкуренции антител, используя классический сэндвич-анализ. Антиген CD73-His ECD разводили в 3ФР, 0,05% Твин 20 и содержащим 200нМ герцептин подвижным буфером, после чего инъецировали в концентрации 10нМ и захватывали с помощью массива конъюгированных антител к CD73. Затем осуществляли индивидуальные инъекции антител к CD73, разведенных до концентрации 100нМ, для создания моделей конкуренции. Данные анализировали с помощью Epitope Binning 2.0 (фирма Wasatch, США).

Результаты

Модель конкуренции 16 антител к CD73 представлена на фиг. 4. Изученные антитела к CD73 были отнесены к четырем перекрывающимся основным эпитопным группам: 1, 2, 3 и 4. Группа 1 включала аналоги олеклумаб и 11E1, которые перекрестно блокируют друг друга. Установлено, что антитела олеклумаб и 11E1 связываются с перекрывающимися эпитопами в верхней части N-концевого домена и напротив каталитического сайта CD73 (Geoghegan и др.,

MABS 8(3), 2016, сс. 454-467) и Perrot и др., Cell Reports 27, 2019, сс. 2411-2425). Все антитела в группе 1 перекрестно блокировали антитела в группе 2. Группа 2 включала антитела 21385, 21127 и 21163, для которых характерны сопоставимые модели конкуренции, это позволяет предположить, что антитела
5 связываются со сходными эпитопами. Антитела в группе 2 перекрестно блокировали все протестированные антитела кроме антител из группы 4. Группу 4 антител можно подразделить на две подгруппы; антитела из групп 4а и 4b конкурировали с одним или несколькими антителами из группы 3. Антитело 21046 (группа 4а) и аналог CPX006 (группа 4b) конкурировали с различными
10 антителами из группы 3, это свидетельствует о том, что два антитела имеют близко родственные, но не идентичные эпитопы, с которыми они связываются.

И, наконец, антитела 21127 и 21163 (группа 2) связывались с уникальным(и) эпитопом(ами) CD73, который(е) имеет(ют) некоторое перекрытие с эпитопом(ами) аналогов 11E1 и олеклумаба (группа 1). Эпитоп(ы)
15 антител 21127 и 21163 отличался(лись) от эпитопа(ов) аналога CPX006 (группа 4). Антитело 21046 (группа 4а) связывалось с эпитопом, сходным с эпитопом аналога CPX006 (группа 4b), но отличным от эпитопов антител 21127 и 21163 (группа 2) и аналогов 11E1 и олеклумаба (группа 1).

Пример 8. Картирование эпитопов антител к CD73 с помощью мутагенеза CD73

20

В этом примере продемонстрировано, каким образом эпитопы, с которыми связываются антитела 21127, 21163 и 21046, можно подразделять на линейные эпитопы и индивидуальные контактирующие остатки путем измерения аффинности и кинетики связывания с 94 различными мутантами CD73.

Материалы и методы

25

Белковые последовательности CD73 человека и крыс (*Rattus norvegicus*) загружали из UniProt (регистрационные номера P21589 и P21588 соответственно). Полноразмерные белковые последовательности CD73 обезьян циномоглус (*Macaca fascicularis*) и кур (*Gallus gallus*) загружали из NCBI
30 (XP_005552488.1 и XP_004940453.1 соответственно). Общедоступные структуры CD73 PDB 4H2F (открытая), 4H2G (открытая) и 4H2I (закрытая) применяли для картирования экспонированных на поверхности аминокислотных остатков. Положения экспонированных на поверхности остатков, которые

отличались в CD73 человека и крыс, заменяли путем мутации на аланин. Для картирования линейных эпитопов антител создавали химерные белки CD73, в которых 10 аминокислот в последовательности человеческого CD73 ECD последовательно заменяли на куриную последовательность в сегментах, перекрывающих 5 аминокислот.

кДНК, кодирующую внеклеточный домен человеческого CD73, синтезировали и клонировали в векторе, содержащем промотор CMV и Fc-последовательность человеческого Ig (остатки P101-K330), получая C-концевое слияние Fc Ig с клонированным CD73 ECD. Слитые конструкции дикого типа (wt) и мутантного человеческого CD73 с Fc создавали с помощью стандартных методик синтеза генов, и белки кратковременно экспрессировали в 2 мл культур, используя систему экспрессии ExpiCHO™.

Затем слитые конструкции человеческий CD73-Fc собирали, супернатанты тестировали в отношении связывания с Fab-фрагментами антител к CD73 с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Супернатанты культур, содержащие слитые белки CD73, иммобилизовывали на G-a-hu-IgG Fc SensEye® (фирма Ssens BV, Нидерланды) в течение 15 мин, используя устройство Continuous Flow Microspotter (CFM, фирма Wasatch Microfluidics, Солт-Лейк-Сити, США)). После нанесения пятен SensEye закрепляли в биосенсоре IBIS MX96 и захваченные белки фиксировали с помощью набора SensEye FixIt (фирма Ssens BV, Нидерланды). Кинетический анализ осуществляли путем применения серии кинетического титрования, при проведении которого мономерные Fab-фрагменты антител, предлагаемых в изобретении, инъецировали в увеличивающихся концентрациях от 0,8нМ до 500нМ. После каждого цикла инъекции Fab-фрагмента поверхность регенерировали с помощью 10мМ глицина, pH 3, 10% глицерина. Ассоциацию Fab осуществляли в течение 15 мин и диссоциацию антигена осуществления в течение 15 мин.

Установленные ответы связывания аппроксимировали с помощью простой модели связывания 1: 1 Ленгмюра с использованием программного обеспечения Scrubber 2.0, предназначенного для расчета константы скорости реакции ассоциации (k_{on} или k_a), скорости реакции диссоциации (k_{off} или k_d) и аффинности (K_D).

Результаты

Эпитопы CD73, распознаваемые антителами 21127, 21163 и 21046 и аналогами 11E1, олеклумабом и CPX006, картировали, используя конструкции химерных рецепторов, в которых состоящие из 10 аминокислот сегменты в последовательности человеческого CD73 заменены на куриную последовательность; или с помощью сканирования аланином, при осуществлении которого экспонированные на поверхности аминокислоты, которые отличались в CD73 человека и крыс, заменяли путем мутации на аланин. Аффинности связывания антител с CD73 дикого типа и с мутантами измеряли с помощью SPR, и применяли отсечение при наличии по меньшей мере 5-кратного снижения аффинности по сравнению с wt или отклонение от модели связывания по типу 1:1 для выявления конструкций с выраженным снижением связывания с антителами к CD73 (таблица 9).

Таблица 9: Обобщение данных о специфичности связывания антител 21127, 21163, и 21046 и аналогов 11E1, олеклумаба и CPX006

Антитело	Линейные эпитопы	Контактирующие остатки
21127	27-31, 61-75, 161-170	R73, R109, D168
21163	61-70, 161-170	R109
21046	27-31, 266-270, 291-305	I301, S302, H304
Аналог 11E1	126-135, 156-170	E129, K133, E134
Аналог олеклумаб	161-170, 206-215	V170, K206, N211
Аналог CPX006	206-210, 231-235, 266-270, 296-305	R297, I301

Идентифицированные линейные эпитопы и контактирующие остатки картировали на кристаллической структуре гомодимера CD73 в его открытом состоянии (фиг. 5). Было установлено, что все эпитопы, распознаваемые антителами 21127, 21163 и 21046 и аналогами 11E1, олеклумабом и CPX006, находятся в N-концевом домене CD73 (фиг. 5). Установлено, что эпитопы антител 21127 и 21163 и аналогов 11E1 и олеклумаба локализованы на поверхности, перпендикулярной границе раздела, характеризующей димеризацию гомодимера CD73, и на противоположной стороне относительно

каталитического центра (фиг. 5, панели А, Б, Г и Д). Установлено, что эпитопы четырех антител являлись различными, связываясь с различными контактирующими остатками и линейными эпитопами. Антитела, связывающиеся с поверхностью на верхней части структуры CD73, могут блокировать ферментативную активность путем блокировки фермента в открытой неактивной конформации, предотвращая переход в закрытое активное состояние (Perrot и др., Cell Reports 27, 2019, сс. 2411-2425).

Установлено, что эпитопы антитела и аналога CPX006 находятся на передней части N-концевого домена, чуть выше каталитического центра CD73 (фиг. 5, панели В и Е). Эти два антитела отличались касательно распознаваемых линейных эпитопов и контактирующих остатков.

В целом, картирование эпитопов с разрешением одной аминокислоты продемонстрировало, что из приведенных в качестве примера антител к CD73 каждое имело отличающиеся от других эпитопы, с которыми они связывались. Антитела 21127 и 21163 связывались со сходными эпитопами на верхней части N-концевого домена CD73; эти эпитопы отличались от эпитопов аналогов 11E1, олеклумаба и CPX006. Антитело 21046 и аналог CPX006 связывались с перекрывающимися, но все еще отличающимися, эпитопами в передней части N-концевого домена CD73.

Пример 9. Стехиометрия комплексов антитело/CD73, образовавшихся в растворе

В этом примере описан размер комплексов антитело /CD73 ECD, образовавшихся в растворе, определенный с помощью SEC-MALS (гель-фильтрация- многоугольное рассеяние света).

Материалы и методы

Антитела к CD73 и меченный His CD73 анализировали в различных соотношениях, а также индивидуально для анализа размера комплексов, образовавшихся между гомодимером CD73 и антителами к CD73. Образцы приготавливали путем смешения 900 пмолей CD73-His с 900, 450, 90 или 0 пмолями антитела, разведенного в 3ФР, pH 7,4. Образцы инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре с последующим разделением с помощью ультра-ЖХВР с использованием устройства UltiMate 3000 (фирма Thermo Scientific) и SEC-колонки X-Bridge (фирма Waters) при скорости потока

1,2 мл/мин. Подвижный буфер для образца содержал 0,01М цитрат, 250мМ L-аргинин·HCl, pH 6,0. После разделения с помощью ЖХВР все образцы анализировали с использованием детектора MiniDAWN TREOS MALS (фирма Wyatt) и детектора показателя преломления Optilab T-rEX (фирма Wyatt).

5 Графики экспериментальных данных создавали с помощью GraphPad Prism.

Результаты

Двухвалентное связывание антител с гомодимером CD73 может блокировать фермент в неактивной конформации (Geoghegan и др., MABS 8(3), 2016, сс. 454-467 и Perrot и др., Cell Reports 27, 2019, сс. 2411-2425). Механизм блокировки может осуществляться посредством перекрестного сшивания гомодимеров CD73 или связывания одного димера CD73 в неактивном состоянии. Для характеристики стехиометрии комплексов антитело/CD73, образовавшихся в растворе, определяли размеры белковых комплексов с помощью SEC-MALS. Размер комплекса 1:1 антитело/гомодимер CD73 находился в диапазоне 270-280 кДа, который рассчитывали на основе индивидуальных молекулярных масс антитела и гомодимера CD73 (примерно 150 и 125 кДа соответственно). На фиг. 6А и 6Б и в таблице 10 представлены SEC-MALS-профили и размеры образовавшихся комплексов для антител 21127, 21163 и 21046 и аналогов 11Е1, олеклумаба и CPX006, связывающихся с гомодимером CD73 в различных молярных соотношениях. В индивидуальных погонах CD73 и каждого из антител обнаружен монодисперсный пик, соответствующий ожидаемым размерам для белков, и подтверждающий отсутствие агрегатов (фиг. 6А и 6Б, пунктирные линии). В SEC-MALS-профиле антитела 21127, связанного с CD73, обнаружен один основной пик (пик 2) среднего размера 276 кДа, соответствующий размеру предсказанного комплекса 21127:гомодимер CD73 (1:1), и один пик меньшего размера (пик 1), соответствующий либо избытку 21127, либо избытку димеров CD73. Антитело 21163 и аналоги 11Е1 и CPX006 образовывали главным образом комплексы 1:1, но для них обнаружена тенденция к образованию комплексов более высокого порядка при самом высоком соотношении антитело:CD73 (1:1). Полидисперсные комплексы более высокого порядка наиболее характерны для аналогов CPX006 и 11Е1. Антитело 21046 и аналог олеклумаб образовывали более крупные комплексы, свидетельствующие о том, что эти антитела главным образом

перекрестно сшивают различные димеры CD73, что уже было продемонстрировано для олеклумаба (MEDI9447) (Geoghegan и др., MABS 8(3), 2016, сс. 454-467).

Таблица 10: Молекулярные массы (ММ, кДа) комплексов, образовавшихся при смешении в различных соотношениях CD73 и антител к CD73, измеренные с помощью SEC-MALS

Белок	Соотношение МАт:CD73 (n:n)	Пик 1 (ММ, кДа)	Пик 2 (ММ, кДа)	Peak 3 (ММ, кДа)	Peak 4 (ММ, кДа)
CD73	0:1	124	-	-	-
Антитело	1:0	151	-	-	-
21127	1:1	144	269	-	-
	0,5:1	140	277	-	-
	0,1:1	128	282	-	-
21163	1:1	197	280	606	-
	0,5:1	143	278	464	-
	0,1:1	129	279	-	-
21046	1:1	194	382	552	863
	0,5:1	97	199	521	794
	0,1:1	137	969	480	815
Аналог 11E1	1:1	116	270	511	802
	0,5:1	127	277	566	3372
	0,1:1	123	265	704	11848
Аналог олеклумаб	1:1	116	389	682	1039
	0,5:1	127	870	559	1007
	0,1:1	123	194	432	821
Аналог CPX006	1:1	124	148	246	363
	0,5:1	118	143	245	349
	0,1:1	120	121	236	339

Представленные в таблице 10 пики соответствуют пикам 1-4, представленных на хроматограммах на фиг. 6А и 6Б, в направлении справа налево. Пик 1 соответствует либо несвязанному гомодимеру CD73/избытку гомодимера CD73 (~125 кДа), либо несвязанному антителу/избытку антитела (~150 кДа). Пики 2-4 соответствуют комплексам МАт:CD73 различного размера и различной стехиометрии, при этом размер ~275 кДа соответствует стехиометрическому соотношению 1:1.

Как представлено в таблице 10 и на фиг. 6А и 6Б, антитело 21127 связывается с эпитопом на гомодимере CD73 таким образом, чтобы образовывался комплекс 1:1 вне зависимости от концентрации CD73. Антитело

21163 и аналоги 11E1 и CPX006 в первую очередь связываются с димером CD73 с образованием комплекса 1:1, но также для них характерна в различной степени тенденция к образованию комплексов более высокого порядка. Антитело 21046 и аналог олеклумаб связываются с гомодимером CD73 только с образованием олигомерных комплексов, что свидетельствует о перекрестном сшивании нескольких димеров CD73.

Пример 10. Функциональность антител к CD73, оцененная с использованием анализа активности растворимого CD73

Способность антител к CD73 21028, 21046, 21127 и 21163 ингибировать ферментативную активность растворимого рекомбинантного CD73 оценивали более подробно и сравнивали с аналогом олеклумабом в анализе активности растворимого CD73. Антитела к CD73 инкубировали с рекомбинантным CD73, АМФ и АТФ в течение 2 ч при 37°C. Активность CD73 изучали, измеряя ингибирование АМФ по уровню АТФ, используя CellTiter-Glo® 2.0 (фирма Promega Corporation) согласно методу, описанному у Sachsenmeier и др., выше.

Данные об ингибировании ферментативной активности CD73 после обработки антителами к CD73 в указанных концентрациях или аналогом олеклумабом представлены на фиг. 7. Установлено, что ингибирующая функция антител к CD73 зависела от концентрации и что все антитела к CD73 ингибировали активность CD73, хотя с различной силой и эффективностью. Кроме того, установлено, что аналог олеклумаб ингибировал ферментативную активность CD73 менее эффективно при использовании этого антитела в более высоких концентрациях. Аналогичные результаты опубликованы для олеклумаба (прежнее название MEDI9447) фирмой MedImmune (Geoghegan и др., MABS 8(3), 2016, сс. 454-467). Кроме того, антитела 21028 и 21046 ингибировали ферментативную активность CD73 несколько в меньшей степени в более высоких концентрациях по сравнению со средними концентрациями. В противоположность этому, для антител 21127 и 21163 обнаружено максимальное ингибирование ферментативной активности CD73 во всех концентрациях, превышающих примерно 3 мкг/мл.

Пример 11. Функциональность антител к CD73, оцененная с использованием клеточного анализа активности CD73

Способность антител к CD73 21028, 21046, 21127 и 21163 ингибировать активность CD73, экспрессируемого на клетках, оценивали более подробно и сравнивали с аналогом олеклумабом. Антитела к CD73 инкубировали с экспрессирующими CD73 человеческими клеточными линиями (Calu-6 и H292) или с экспрессирующей CD73 клеточной линией обезьян циномолгус (Cynom-K1) в течение 30 мин при 37°C, после чего добавляли субстрат CD73, АМФ, и дополнительно инкубировали в течение 3 ч при 37°C. Активность CD73 изучали, добавляя к супернатанту АТФ и измеряя ингибирование АМФ по уровню АТФ, используя CellTiter-Glo[®] 2.0 (фирма Promega Corporation) согласно методу, ранее описанному у Sachsenmeier и др., выше.

Данные об ингибировании активности CD73 после обработки антителами к CD73 представлены на фиг. 8. Установлено, что ингибирующая функция антител к CD73 зависела от концентрации и что все антитела ингибировали активность как человеческого CD73, так и CD73 обезьян циномолгус, хотя с различной силой и эффективностью. Антитела 21127 и 21163 обладали наиболее высокой эффективностью при изучении на двух человеческих клеточных линиях Calu-6 и H292, однако активности всех четырех протестированных антител значительно превышали активность аналога олеклумаба на всех трех клеточных линиях.

Пример 12. Функциональность антител к CD73, оцененная с использованием длительного клеточного анализа активности CD73

Способность антител к CD73 21028, 21046, 21127 и 21163 ингибировать активность CD73, экспрессируемого на клеточных линиях, оценивали более подробно и сравнивали с аналогом олеклумабом с использованием длительного клеточного анализа. Антитела к CD73 инкубировали с экспрессирующими CD73 человеческой клеточной линией H292 в течение 30 мин при 37°C, после чего добавляли субстрат CD73, АМФ, и дополнительно инкубировали в течение 3, 6 или 24 ч при 37°C. Активность CD73 изучали, добавляя к супернатанту АТФ и измеряя ингибирование АМФ по уровню АТФ, используя CellTiter-Glo[®] 2.0 (фирма Promega Corporation) согласно методу, описанному у Sachsenmeier и др., выше.

Данные об ингибировании активности CD73 после обработки различными антителами к CD73 представлены на фиг. 9. Установлено, ингибирующая функция антител к CD73 зависела от концентрации и что все антитела ингибировали активность CD73, хотя с различной силой и эффективностью.

5 Следует отметить, что инкубация клеток с антителами в течение периода времени вплоть до 24 ч, позволила выявить более детально отличие антител 21127 и 21163 от аналога олеклумаба (и от двух других протестированных антител к CD73).

10 Пример 13. Эффективность антител к CD73, изученная на линиях раковых клеток

Оценивали способность антител к CD73 21127, 21046, 21163 ингибировать активность CD73, экспрессируемого на большой панели линий раковых клеток, обладающих широким спектром экспрессии CD73 и уровней активности. Панель клеток охватывала несколько признаков рака, имеющего происхождение из
15 различных тканей, представленных в таблице 11.

Материалы и методы

Антитела к CD73 инкубировали в концентрации 25 мкг/мл с экспрессирующими CD73 клеточными линиями в течение 30 мин при 37°C, после чего добавляли субстрат CD73, АМФ, и дополнительно инкубировали в
20 течение 3 ч при 37°C. Активность в клетках CD73 оценивали, добавляя к супернатанту АТФ и измеряя ингибирование АМФ по уровню АТФ, используя CellTiter-Glo® 2.0 (фирма Promega Corporation) согласно методу, описанному у Sachsenmeier и др., выше. Активность CD73 оценивали с помощью люминесценции.

25 Результаты

Данные о воздействии антител к CD73 на активность CD73, экспрессируемого на 20 различных линиях раковых клеток, представлены на
фиг. 10. Установлено, что активность CD73 варьировалась после обработки различными антителами к CD73. Некоторые антитела (21046 и аналог
30 олеклумаб) обладали определенной способностью ингибировать CD73 при более низких уровнях активности CD73 в клетках, но не могли ингибировать фермент при самых высоких уровнях активности, в то время как другие антитела (21127 и 21163) сильно ингибировали активность CD73 даже при самых высоких уровнях

активности, что установлено, например, для клеточных линий Calu-6, NCI-H1775, KYSE-30 и Capan-2.

Таблица 11: Перечень клеточных линий и тканей происхождения

Клеточная линия	Признак, подтип болезни (если это применимо)
A375	Рак кожи, карцинома
A549	Немелкоклеточный рак легкого, аденокарцинома
ASPC-1	Рак поджелудочной железы, экзокринная аденокарцинома
BFTC-905	Рак мочевого пузыря, переходно-клеточная карцинома
BT-474	Рак молочной железы, карцинома
Calu-3	Немелкоклеточный рак легкого, аденокарцинома
Calu-6	Немелкоклеточный рак легкого
Capan-2	Рак поджелудочной железы, экзокринная аденокарцинома
Detroit 562	Рак головы и шеи, плоскоклеточная карцинома, гортань
DU145	Рак предстательной железы, аденокарцинома
H292	Немелкоклеточный рак легкого, мукоэпидермоидная карцинома
H441	Рак легкого, папиллярная аденокарцинома
HCT-116	Колоректальный рак, аденокарцинома
KYSE-30	Рак пищевода, плоскоклеточная карцинома
MCF-7	Рак молочной железы, карцинома
MDA-MB-468	Рак молочной железы, карцинома
NCI-H1975	Немелкоклеточный рак легкого, аденокарцинома
SKBR-3	Рак молочной железы, карцинома
T47D	Рак молочной железы, протоковая карцинома

5 Пример 14. Определение *in vitro* активности антител к CD73, проведенное с использованием клеточного анализа жизнеспособности

В этом примере описана функциональная характеристика *in vitro* антитела 21127 с помощью анализа жизнеспособности с использованием двух линий раковых клеток, выращиваемых в присутствии 300мкМ АМФ.

10 Материалы и методы

Оценивали *in vitro* способность антител непосредственно ингибировать жизнеспособность (выживаемость и/или пролиферация) клеточных линий трижды негативного рака молочной железы MDA-MB-231 и MDA-MB-468. Клетки высевали из расчета 1000 клеток/лунку в 384-луночный планшет в среду RPMI 1640 Glutamax (MDA-MB-231) или DMEM (MDA-MB-468), дополненную 2% FBS и 1% P/S, и инкубировали в течение 4 дней во влажной камере при 37°C

с антителами, в концентрациях, титрованных от 25 мкг/мл, в присутствии АМФ (аденозинмонофосфат, фирма Sigma-Aldrich) в концентрации 300мкМ.

Жизнеспособность клеток оценивали количественно с помощью реагента для определения клеточной пролиферации WST-1 (фирма Roche) согласно

5 инструкциям производителя.

Результаты

Установлено, что 21127 и аналог олеклумаб отличались друг от друга по функциональным показателям (фиг. 11). Для антитела 21127 характерно выраженное воздействие на обе клеточные линии, при этом для линии МВА-МВ-231 характерно снижение жизнеспособных клеток примерно до 60%, а для линии МВА-МВ-468 до 0% жизнеспособных клеток по сравнению с необработанными клетками (т.е., различие в количестве жизнеспособных клеток по сравнению со средним фоновым уровнем было ниже предела обнаружения). Для аналога олеклумаба характерно отсутствие существенного воздействия на жизнеспособность клеток линии МВА-МВ-231, но определенное воздействие на клетки линии МВА-МВ-468, при этом количество жизнеспособных клеток снижалось примерно до 70-80% по сравнению с необработанными клетками.

Сходное действие можно ожидать для линий раковых клеток, имеющих происхождение из других тканей.

20 Пример 15. Ингибирование CD73, экспрессируемого на первичных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках и CD19⁺ В-клетках из здоровых доноров, антителами к CD73

Оценивали способность антител к CD73 ингибировать активность CD73, экспрессируемого на первичных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках и CD19⁺ В-клетках из здоровых доноров.

25 Материалы и методы

Первичные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки и CD19⁺ В-клетки выделяли из лейкоцитарной пленки РВМС (мононуклеарные клетки периферической крови), используя магнитные гранулы (MACS) с соответствующей специфичностью согласно инструкциям производителя (фирма Miltenyi Biotec). Полученные титрованием с четырехкратных разведением антитела к CD73 в концентрациях от 50 до 0,003 мкг/мл инкубировали с выделенными первичными клетками в течение 30 мин при 37°C, после чего добавляли субстрат CD73, АМФ, и дополнительно инкубировали в течение 20 ч (CD19⁺ В-клетки) или 40 ч (CD4⁺ и

CD8⁺ Т-клетки) при 37°C. Активность CD73 оценивали, добавляя к супернатанту АТФ и измеряя ингибирование АМФ по уровню АТФ с использованием CellTiter-Glo[®] 2.0 (фирма Promega Corporation) согласно методу, описанному у Sachsenmeier и др., выше.

5 Результаты

Данные об активности CD73, экспрессируемого на первичных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках и CD19⁺ В-клетках, после обработки антителами к CD73 представлены на фиг. 12. Установлено, что активность CD73 после обработки антителом 21127 и аналогом олеклумабом сильно отличалась. При применении антитела 21127 в
10 более высоких концентрациях обнаружено почти полное ингибирование активности CD73 во всех типах первичных клеток, в то время как для аналога олеклумаба установлено лишь слабое ингибирование активности CD73 в CD19⁺ В-клетках и CD8⁺ Т-клетках и лишь частичное ингибирование в CD4⁺ Т-клетках. Способность аналога олеклумаба ингибировать активность CD73 коррелировала
15 с уровнем экспрессии CD73, поскольку CD4⁺ Т-клетки периферической крови из здоровых доноров в среднем имеют ограниченную экспрессию CD73, в то время как CD19⁺ В-клетки в среднем экспрессируют более высокие уровни CD73, на CD8⁺ Т-клетки в среднем экспрессируют промежуточные уровни (Allard и др., Immunol Rev 276(1), 2017, сс. 121-144).

20 Пример 16. Функциональность антител к CD73, оцененная с использованием анализа пролиферации Т-клеток

Оценивали способность антител к CD73 21028, 21046, 21127 и 21163 ингибировать активность CD73, экспрессируемого на CD4⁺ Т-клетках, и сравнивали с активностью аналога олеклумаба в анализе *in vitro*. CD4⁺ Т-клетки
25 выделяли из здорового донора и активировали с помощью анти-CD3/CD28-гранул (фирма Thermo Fisher Scientific), АМФ и антител к CD73 в течение 48 ч, после чего добавляли 3Н-тимидин (фирма PerkinElmer Corporation) в течение еще 24 ч. Пролиферацию Т-клеток измеряли по включению 3Н-тимидина и стандартизовали относительно контролей, необработанных АМФ.

30 Данные о пролиферации Т-клеток после обработки различными антителами к CD73 представлены на фиг. 13. Установлено, что стимулирующая функция антител к CD73 в отношении пролиферации Т-клеток зависела от концентрации и что все антитела стимулировали пролиферацию Т-клеток, хотя с различной

силой и эффективностью. Все антитела кроме аналога олеклумаба полностью восстанавливали пролиферацию Т-клеток, при этом антитело 21127 оказалось наиболее эффективным.

Пример 17. Функциональность антител к CD73, оцененная с использованием анализа активации Т-клеток

Оценивали способность антитела к CD73 ингибировать активность CD73, экспрессируемого на CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках, и сравнивали с активностью аналога олеклумаба в анализе *in vitro*. CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки выделяли из здоровых доноров и активировали с помощью анти-CD3/CD28-гранул (фирма Thermo Fisher Scientific), АМФ и антител к CD73 в течение 72 ч, после чего собирали супернатант. Активацию Т-клеток измеряли по уровням IFN-γ в супернатанте с помощью ELISA (фирма Thermo Fisher Scientific).

Данные об активации Т-клеток после обработки различными антителами к CD73, представлены на фиг. 14. Установлено, что симулирующая функция антитела 21127 в отношении активации Т-клеток зависела от концентрации и что обработка 21127 приводила к более высоким уровням IFN-γ по сравнению с аналогом олеклумабом.

Пример 18. Функциональность антител к CD73, оцененная с использованием анализа на основе однонаправленной MLR

Оценивали способность антитела к CD73 ингибировать активность CD73 в однонаправленной реакции в смешанной культуре лимфоцитов (MLR) и сравнивали с активностью аналога олеклумаба в анализе *in vitro*.

Дендритные клетки (DC) и CD4⁺ Т-клетки, выделенные из двух различных здоровых доноров, совместно культивировали для индукции аллоантигенспецифической реакции, приводящей к производству цитокинов и активации и/или пролиферации Т-клеток. DC дифференцировались из CD14⁺ моноцитов к 7 дню культивирования с колониестимулирующим фактором гранулоцитов-макрофагов (GM-CSF) в концентрации 20 нг/мл и интерлейкином-4 (IL-4) в концентрации 20 нг/мл и их смешивали в соотношении 1:10 с CD4⁺ Т-клетками, выделенными из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), полученных из материала здорового донора. При осуществлении однонаправленной MLR проводили инкубацию с антителом к PD-1 в концентрации 25 мкг/мл (12819; см. публикацию патента PCT WO 2017/055547),

50мкМ АМФ и антителом к CD73 в указанных концентрациях в течение 48 ч, после чего добавляли 3Н-тимидин (фирма PerkinElmer Corporation) в течение еще 24 ч. Пролиферацию измеряли по включению 3Н-тимидина и стандартизовали относительно контролей, необработанных АМФ.

5 Данные о пролиферации Т-клеток после обработки различными антителами к CD73 представлены на фиг. 15. Установлено, что стимулирующая функция антител к CD73 в отношении пролиферации зависела от концентрации и что как антитело 21127, так и аналог олеклумаб стимулировали пролиферацию Т-клеток. Однако только антитело 21127 полностью восстанавливало пролиферацию.

10 Пример 19. Изучение комбинации антител к CD73 и к PD-1 с использованием анализа на основе однонаправленной MLR

В этом примере оценивали способность комбинации антитела к PD-1 (12819) и антитела к CD73 (21127) усиливать активацию Т-клеток в однонаправленной реакции в смешанной культуре лимфоцитов (MLR).

15 Дендритные клетки (DC) и CD4⁺ Т-клетки, выделенные из двух различных здоровых доноров, совместно культивировали для индукции аллоантигенспецифической реакции, приводящей к производству цитокинов и активации и/или пролиферации Т-клеток. DC дифференцировались из CD14⁺ моноцитов к 7 дню культивирования с колониестимулирующим фактором гранулоцитов-макрофагов (GM-CSF) в концентрации 20 нг/мл интерлейкина-4 (IL-4) в концентрации 20 нг/мл и их смешивали в соотношении 1:10 с CD4⁺ Т-клетками, выделенными из мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), полученных из материала здорового донора. При осуществлении однонаправленной MLR проводили инкубацию с 50мкМ АМФ или без АМФ и с антителом к CD73 21127 и/или антителом к PD-1 (12819; см. публикацию патента РСТ WO 2017/055547) в течение 72 ч, после чего собирали супернатант. Комбинацию антитела к CD73 21127 и антитела к PD-1 12819 добавляли, используя соотношение двух антител 1:1. Активацию Т-клеток количественно оценивали по уровням IFN- γ в супернатанте с помощью ELISA (фирма Thermo Fisher Scientific) и стандартизовали относительно контролей, необработанных АМФ.

Данные об активации Т-клеток в однонаправленной MLR, измеренной по уровням IFN- γ после обработки антителом 12819 и/или 21127, представлены на

фиг. 16. Установлено, что антитело к PD-1 12819 сильно активировало
однаправленную MLR в отсутствии АМФ и как с одновременной инкубацией
с антителом 21127, так и без нее (верхняя панель). Активация однаправленной
MLR антителом к PD-1 оказалась существенно более низкой, когда в
5 однаправленную MLR добавляли АМФ (нижняя панель). Однако объединение
антитела к PD-1 и антитела к CD73 21127 по меньшей мере частично
восстанавливало сильную активацию Т-клеток, что подчеркивает преимущество
комбинации антитела к PD-1/антитела к CD73.

Пример 20. Функциональность антител к CD73, оцененная с
10 использованием анализа активации В-клеток

Оценивали способность антител 21046 и 21127 стимулировать активацию
В-клеток с помощью анализа *in vitro* активации В-клеток. РВМС из здорового
донора стимулировали в течение ночи 21046, 21127 или аналогом олеклумабом
(10 мкг/мл), а также лигандом CD40 (0,5 мкг/мл). Осуществляли анализ с
15 использованием проточной цитометрии с установкой дискриминационного окна
на В-клетки (CD20⁺) и оценивали активацию В –клеток по повышающей
регуляции маркеров активации В-клеток CD25, CD69 и CD83.

Как продемонстрировано на фиг. 17А и 17Б, антитело 21046 стимулировало
сильную повышающую регуляцию маркеров активации В-клеток CD25, CD69 и
20 CD83, в то время как антитело 21127 и аналог олеклумаб обладали
ограниченным действием в отношении активации В-клеток .

Пример 21. Индуцированное антителами к CD73 снижение уровней CD73 в
H292-клетках

Оценивали способность антител к CD73 21127, 21028, 21046 и 21163
25 модулировать уровни CD73 в клеточной линии и сравнивали с аналогом
олеклумабом. Антитела к CD73 инкубировали с человеческой клеточной линией
H292 в течение 24 ч при 37°C в концентрации 25 мкг/мл с последующим
лизисом клеток и оценкой уровней CD73 с помощью метода Simple Western
(фирма ProteinSimple).

30 На фиг. 18 продемонстрированы уровни CD73 после обработки антителом
21127, 21028, 21046 или 21163 или аналогом олеклумабом. Инкубация с
антителом к CD73 21046 или аналогом олеклумабом приводила к некоторой

понижающей модуляции CD73, в то время как другие антитела к CD73 оказывали умеренное воздействие на уровни CD73, если оказывали его вообще.

Пример 22. Функциональность антитела к CD73, изученная на моделях ксенотрансплантатов человеческих опухолей

В этом примере продемонстрирована способность антитела к CD73 21127 ингибировать ферментативную активность CD73, экспрессированного на клетках, выделенных из ксенотрансплантатов человеческих опухолей.

Материалы и методы

Клетки меланомы человека линии A375 инокулировали подкожно в боковые области 6-8-недельных самок мышей линии NOG или NOD-*scid*. В одном примере (фиг. 19, верхняя панель) человеческие РВМС инъецировали внутрибрюшинно через 1 день после инокуляции опухолевых клеток. Размеры опухолей определяли трижды в неделю кронциркулем в двух измерениях, а объем опухолей в мм³ рассчитывали согласно формуле: (ширина)² × длина × 0,5. Мышей обрабатывали три раза в неделю путем внутрибрюшинной инъекции применяемого в качестве наполнителя буфера или (1) антитела 21127, (2) аналога олеклумаба или (3) антитела 21127 в комбинации с антителом к мышинному CD73 TY/23 (фирма BioXcell). В отличие от аналога олеклумаба антитело 21127 не давало перекрестную реакцию с мышинным CD73. Поэтому для сравнения ингибирования активности CD73 в опухолевой массе, которая содержит также мышинные клетки, экспрессирующие CD73 (эндотелиальные и стромальные клетки), антитело 21127 объединяли с антителом к мышинному CD73 TY/23. Антитела применяли в дозах 5 мг/кг, 20 мг/кг или 50 мг/кг. В различные моменты времени после прекращения обработок опухоли изымали и диссоциировали с использованием набора для диссоциации опухолей и устройства для диссоциации gentleMACS Octo (фирма Miltenyi). Полученную клеточную суспензию инкубировали с субстратом CD73, АМФ, в течение 3 ч при 37°C. Активность CD73 определяли путем добавления АТФ к супернатантам и измерения ингибирования АМФ по уровню АТФ, используя CellTiter-Glo[®] 2.0 (фирма Promega Corporation) согласно методу, описанному у Sachsenmeier и др., выше.

Результаты

Для антитела 21127 продемонстрировано зависящее от дозы ингибирование активности CD73 в опухолях, собранных из гуманизированных с помощью РВМС мышей с трансплантированными клетками меланомы человека линии А375 после повторяющегося дозирования в течение 2 недель (фиг. 19 верхняя панель). Установлено также, что воздействие на ферментативную активность CD73 сохранялось в течение длительного периода времени после прекращения обработок.

Как продемонстрировано на фиг. 19, нижняя панель, аналог олеклумаб ингибировал активность CD73 в течение 16 дней после обработки, и ферментативная активность полностью восстанавливалась в день 28 после обработок. В отличие от этого, для антитела 21127 при его применении индивидуально или в комбинации с TY/23, установлено ингибирование активности CD73 в течение 28 дней после прекращения обработок.

Пример 23. *In vivo* эффективность антитела CD73 на модели ксенотрансплантатов человеческой опухоли без иммунных клеток

В этом примере продемонстрирована способность антител к CD73 ингибировать рост опухолей на модели ксенотрансплантата человеческого трижды негативного рака молочной железы.

Раковые клетки человеческого трижды негативного рака молочной железы линии MDA-MB-231 инокулировали подкожно в боковые области 6-8-недельных самок мышей линии NOD-*scid*. Размеры опухолей определяли трижды в неделю кронциркулем в двух измерениях, а объем опухолей в мм³ рассчитывали согласно формуле: (ширина)² × длина × 0,5. Мышей обрабатывали три раза в неделю, осуществляя в целом 16 обработок, путем внутрибрюшинной инъекции применяемого в качестве наполнителя буфера, антитела 21127 или аналога олеклумаба, с последующим периодом наблюдения. Антитела применяли в дозе 10 мг/кг. Двусторонний дисперсионный анализ с критерием Бонферрони для множественных сравнений применяли для сравнения объемов опухолей в обработанных группах в каждый момент времени. Статистический анализ осуществляли с помощью GraphPad Prism, версия 5.0 (фирма GraphPad Software, Inc.).

Установлено, что антитело 21127 и аналог олеклумаб обладали выраженным ингибирующим действием во время обработок (фиг. 20). После прекращения обработок обнаружен повторный рост опухолей, обработанных аналогом олеклумабом. В противоположность этому, у мышей, обработанных антителом 21127, рост опухолей эффективно контролировался во время обработок с ограниченным увеличением размера опухолей в течение 60 дней после обработок.

Пример 24. *In vivo* эффективность антитела CD73 на моделях ксенотрансплантатов человеческих опухолей у мышей, созданных с использованием человеческих РВМС

В этом примере продемонстрирована эффективность *in vivo* антитела к CD73 21127 на гуманизированных РВМС мышах с трансплантированными клетками карциномы легкого человека или клетками меланомы человека.

Клетки из линии клеток карциномы легкого человека Calu-6 или линии клеток меланомы у человека A375 подкожно трансплантировали мышам линии NOG за один день до внутрибрюшинной инъекции человеческих РВМС. Обработку начинали в день инъекции РВМС и мышей обрабатывали три раза неделю, осуществляя в целом 6 обработок, путем внутрибрюшинной инъекции применяемого в качестве наполнителя буфера, антитела 21127 в дозе 10 мг/кг (n=10/группу). Размеры опухолей определяли трижды в неделю кронциркулем в двух измерениях, а объем опухолей в мм³ рассчитывали согласно формуле: (ширина)² × длина × 0,5. Двусторонний дисперсионный анализ с критерием Бонферрони для множественных сравнений применяли для сравнения объемов опухолей в обработанных группах в каждый момент времени. Статистический анализ осуществляли с помощью GraphPad Prism, версия 5.0 (фирма GraphPad Software, Inc.).

Как продемонстрировано на фиг. 21, обработка антителом 21127 приводила к существенному замедлению роста опухолей (P<0,05 относительно применяемого в качестве контроля наполнителя) при изучении на двух моделях ксенотрансплантатов опухолей человека (Calu-6 и A375) у мышей, созданных с использованием человеческих РВМС. Каждый график на фиг. 21 соответствует одному донору человеческих РВМС.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, где антитело связывается с тем же эпитопом человеческого CD73, что и антитело, которое
5 содержит:

а) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и 41, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 42;

10 б) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и 41, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 42;

в) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11 и 41, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15 и 42; или

15 г) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 12 и 41, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16 и 42.

2. Антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок по п. 1, в котором

а) тяжелая цепь указанного антитела содержит:

20 I) гипервариабельные участки тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 17-19 соответственно;

II) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9;

25 III) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; или

IV) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и 41; и

б) легкая цепь указанного антитела содержит:

30 I) гипервариабельные участки легкой цепи (L-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 20-22 соответственно;

II) вариабельный домен легкой цепи (VL), который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13;

III) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;

5 или

IV) легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 42.

10 3. Антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок по п. 1, в котором

а) тяжелая цепь указанного антитела содержит:

I) гипервариабельные участки тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23-25 соответственно;

15 II) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10;

III) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10;

или

20 IV) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и 41; и

б) легкая цепь указанного антитела содержит:

I) гипервариабельные участки легкой цепи (L-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 26-28 соответственно;

25 II) вариабельный домен легкой цепи (VL), который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14;

III) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;

или

30 IV) легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 42.

4. Антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок по п. 1, в котором

а) тяжелая цепь указанного антитела содержит:

I) гипервариабельные участки тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 29-31 соответственно;

II) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 11;

III) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; или

IV) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11 и 41; и

б) легкая цепь указанного антитела содержит:

I) гипервариабельные участки легкой цепи (L-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 32-34 соответственно;

II) вариабельный домен легкой цепи (VL), который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15;

III) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; или

IV) легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15 и 42.

5. Антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок по п. 1, в котором

а) тяжелая цепь указанного антитела содержит:

I) гипервариабельные участки тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 35-37 соответственно;

II) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12;

III) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; или

IV) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 12 и 41; и

б) легкая цепь указанного антитела содержит:

5 I) гипервариабельные участки легкой цепи (L-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 38-40 соответственно;

II) вариабельный домен легкой цепи (VL), который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16;

10 III) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; или

IV) легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16 и 42.

15 6. Антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, где указанное антитело содержит следующие аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3:

а) SEQ ID NO: 17-22 соответственно;

б) SEQ ID NO: 23-28 соответственно;

в) SEQ ID NO: 29-34 соответственно; или

20 г) SEQ ID NO: 35-40 соответственно.

7. Антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, где указанное антитело содержит аминокислотную последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и аминокислотную последовательность вариабельного домена легкой цепи, которые по меньшей мере на 90% идентичны следующим аминокислотным последовательностям:

а) SEQ ID NO: 9 и 13 соответственно;

б) SEQ ID NO: 10 и 14 соответственно;

в) SEQ ID NO: 11 и 15 соответственно; или

30 г) SEQ ID NO: 12 и 16 соответственно.

8. Антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, где указанное антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен

легкой цепи, которые содержат следующие аминокислотные последовательности:

- а) SEQ ID NO: 9 и 13 соответственно;
- б) SEQ ID NO: 10 и 14 соответственно;
- 5 в) SEQ ID NO: 11 и 15 соответственно; или
- г) SEQ ID NO: 12 и 16 соответственно.

9. Антитело к CD73, которое содержит:

- а) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9 и 41, и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 42;
- 10 б) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 10 и 41, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 42;
- в) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11 и 41, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15 и 42;
- 15 или
- г) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 12 и 41, и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16 и 42.

20 10. Антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, которое/который связывается с эпитопом на человеческом CD73, содержащим:

- а) аминокислотные остатки R73, R109 и D168 SEQ ID NO: 43;
- б) аминокислотный остаток R109 в SEQ ID NO: 43; или
- в) аминокислотные остатки I301, S302 и H304 SEQ ID NO: 43.

25 11. Антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок, которое/который связывается с эпитопом на человеческом CD73, содержащим:

- а) аминокислотные остатки 27-31, 61-75 и 161-170 SEQ ID NO: 43;
- б) аминокислотные остатки 61-70 и 161-170 SEQ ID NO: 43; или
- 30 в) аминокислотные остатки 27-31, 266-270 и 291-305 SEQ ID NO: 43.

12. Антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок по одному из п.п. 1-11, где антитело или его антигенсвязывающий участок обладает по меньшей мере одним из следующих свойств:

- а) ингибирует активность растворимого CD73 *in vitro*;
- 5 б) ингибирует активность CD73 на клетках Calu-6 *in vitro*;
- в) ингибирует активность CD73 на клетках H292 *in vitro*;
- г) специфически связывается с CD73 человека и обезьян циномолгус, который экспрессируется на клетках CHO-S;
- д) связывается с ECD человеческого CD73 с K_D 1нМ или менее при оценке с помощью SPR;
- 10 е) связывается с ECD CD73 обезьян циномолгус с K_D 0,7нМ или менее при оценке с помощью SPR;
- ж) не связывается с тем же эпитопом CD73, что и олеклумаб, CPX006 и/или 11E1;
- 15 з) связывается с эпитопом на гомодимере CD73 таким образом, чтобы образовывался комплекс 1:1;
- и) ингибирует активность растворимого CD73 более эффективно, чем олеклумаб, *in vitro*;
- к) ингибирует активность CD73 на клетках Calu-6, H292 и Cynom-K1 *in vitro*;
- 20 л) ингибирует активность CD73 на клетках Calu-6, NCI-H1775, KYSE-30 и Саран-2 *in vitro*;
- м) ингибирует пролиферацию клеток MDA-MB-231 и MDA-MB-468 *in vitro*;
- н) ингибирует активность CD73 на первичных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках и CD19⁺ В-клетках *in vitro*;
- 25 о) восстанавливает пролиферацию CD4⁺ Т-клеток *in vitro*;
- п) активирует CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки *in vitro*;
- р) в комбинации с антителом к PD-1 восстанавливает пролиферацию Т-клеток в однонаправленной реакции в смешанной культуре лимфоцитов (MLR) в присутствии АМФ;
- 30 с) усиливает Т-клеточную активацию в присутствии АМФ в комбинации с антителом к PD-1 в однонаправленной MLR;
- т) не стимулирует В-клеточную активацию *in vitro*;

- у) не снижает уровни CD73 в клетках H292 *in vitro* более чем на 25%;
- ф) ингибирует активность CD73 в опухолях, полученных из гуманизированных PBMC мышей с трансплантированными клетками A375;
- х) ингибирует рост опухолей *in vivo* у мышей линии NOD-scid с трансплантированными клетками MDA-MB-231;
- ц) ингибирует рост опухолей *in vivo* у гуманизированных PBMC мышей с трансплантированными клетками Calu-6; и
- ч) ингибирует рост опухолей *in vivo* у гуманизированных PBMC мышей с трансплантированными A375.

13. Антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок по п. 12, где антитело или его антигенсвязывающий участок обладает по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или всеми 23 указанными свойствами.

14. Антитело к CD73 по одному из п.п. 1-13, где антитело относится к IgG-типу.

15. Антитело к CD73 по п. 14, где антитело относится к IgG₁-изотипу.

16. Антитело к CD73 по одному из п.п. 1-15, где антитело содержит по меньшей мере одну мутацию в F_C-области.

17. Антитело к CD73 по одному из п.п. 1-16, где антитело относится к IgG₁-изотипу и содержит мутацию в одном или нескольких аминокислотных положениях 234 и 235, пронумерованных согласно системе нумерации IMGT[®].

18. Антитело к CD73 по п. 17, в котором один или оба аминокислотных остатка в положениях 234 и 235 заменены в результате мутации с Leu на Ala.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок по одному из п.п. 1-18 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

20. Фармацевтическая композиция по п. 19, дополнительно содержащая иммуностимулятор, вакцину, химиотерапевтический агент, антинеопластический агент, антиангиогенный агент, ингибитор тирозинкиназы или ингибитор CD73-пути.

21. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь или ее антигенсвязывающий участок, или нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь или ее антигенсвязывающий участок, или их обе, антитела к CD73 по одному из п.п. 1-18.

22. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, где указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 1-8.

23. Вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 21 или п. 22, где указанный вектор содержит дополнительно последовательность, контролирующую экспрессию.

24. Клетка-хозяин, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь или ее антигенсвязывающий участок, и нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь или ее антигенсвязывающий участок антитела к CD73 по одному из п.п. 1-18.

25. Способ получения антитела к CD73 или его антигенсвязывающего участка, включающий получение клетки-хозяина по п. 24, культивирование указанной клетки-хозяина в условиях, пригодных для экспрессии антитела или его участка, и выделение полученного в результате антитела или его участка.

26. Биспецифическая связывающая молекула, которая содержит антигенсвязывающий участок одного или двух различных антител к CD73 по одному из п.п. 1-18.

27. Способ снижения активности CD73 у пациента, который нуждается в этом, включающий введение указанному пациенту в терапевтически эффективном количестве антитела к CD73 или его антигенсвязывающего участка по одному из п.п. 1-18, фармацевтической композиции по п. 19 или п. 20 или биспецифической связывающей молекулы по п. 26.

28. Способ повышения пролиферации CD4⁺ Т-клеток у пациента, который нуждается в этом, включающий введение указанному пациенту в терапевтически эффективном количестве антитела к CD73 или его антигенсвязывающего участка по одному из п.п. 1-18, фармацевтической композиции по п. 19 или п. 20 или биспецифической связывающей молекулы по п. 26.

29. Способ стимуляции иммунной системы у пациента, который нуждается в этом, включающий введение указанному пациенту в терапевтически эффективном количестве антитела к CD73 или его антигенсвязывающего участка по одному из п.п. 1-18, фармацевтической композиции по п. 19 или п. 20 или биспецифической связывающей молекулы по п. 26.

30. Способ лечения рака у пациента, включающий введение указанному пациенту в терапевтически эффективном количестве антитела к CD73 или его антигенсвязывающего участка по одному из п.п. 1-18, фармацевтической композиции по п. 19 или п. 20 или биспецифической связывающей молекулы по п. 26.

31. Способ по п. 30, в котором рак имеет происхождение из ткани, выбранной из группы, состоящей из кожи, легкого, кишечника, ободочной кишки, яичника, головного мозга, предстательной железы, почки, мягких тканей, кроветворной системы, головы и шеи, печени, кости, мочевого пузыря, молочной железы, желудка, матки, шейки матки и поджелудочной железы.

32. Способ по п. 30, в котором рак представляет собой меланому, рак головы и шеи, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, немелкоклеточный

рак легкого, рак поджелудочной железы, рак яичника, почечно-клеточную карциному, рак предстательной железы, колоректальный рак, холангиокарциному, рак щитовидной железы или рак яичка.

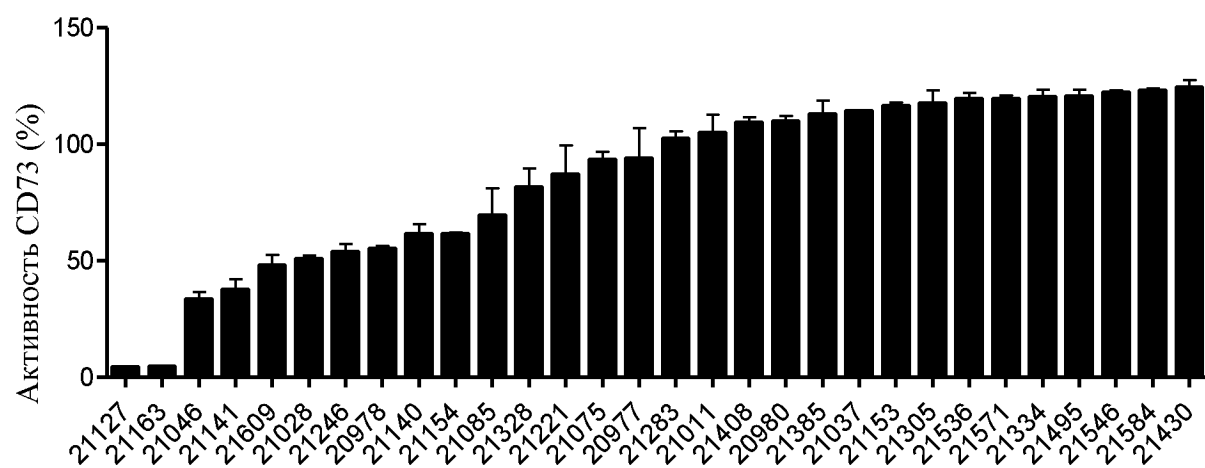
5 33. Способ по одному из п.п. 27-32, дополнительно включающий введение пациенту иммуностимулятора, вакцины, химиотерапевтического агента, антинеопластического агента, антиангиогенного агента, ингибитора тирозинкиназы, ингибитора пути CD73 или применение лучевой терапии.

10 34. Применение антитела к CD73 или его антигенсвязывающего участка по одному из п.п. 1-18, фармацевтической композиции по п. 19 или п. 20 или биспецифической связывающей молекулы по п. 26 для приготовления лекарственного средства, предназначенного для:

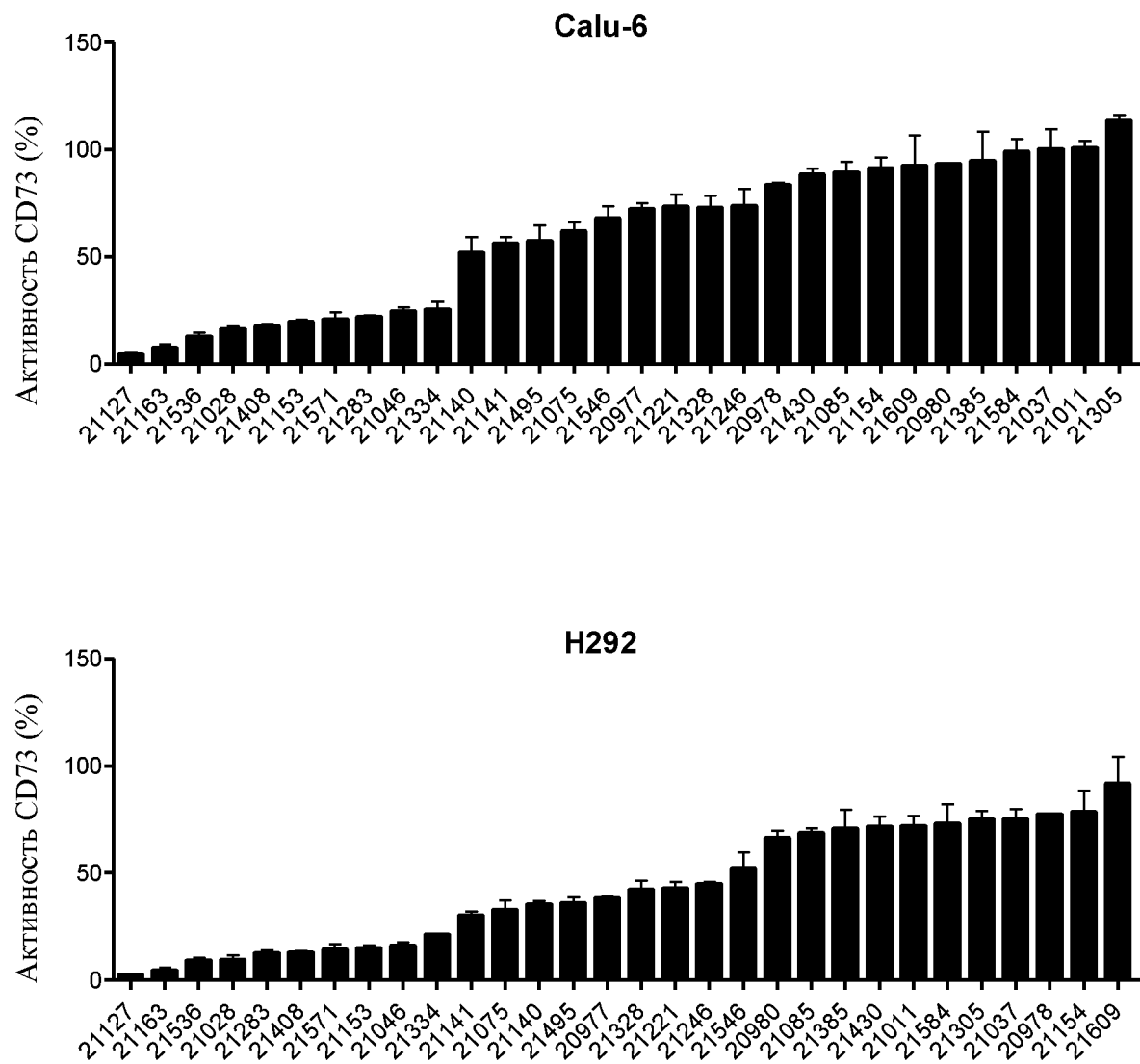
- а) снижения активности CD73 у пациента;
- 15 б) повышения пролиферации CD4⁺ Т-клеток у пациента;
- в) стимуляции иммунной системы у пациента; или
- г) лечения рака у пациента.

20 35. Антитело к CD73 или его антигенсвязывающий участок по одному из п.п. 1-18, фармацевтическая композиция по п. 19 или п. 20 или биспецифическая связывающая молекула по п. 26, для применения для:

- а) снижения активности CD73 у пациента;
- б) повышения пролиферации CD4⁺ Т-клеток у пациента;
- в) стимуляции иммунной системы у пациента; или
- 25 г) лечения рака у пациента.

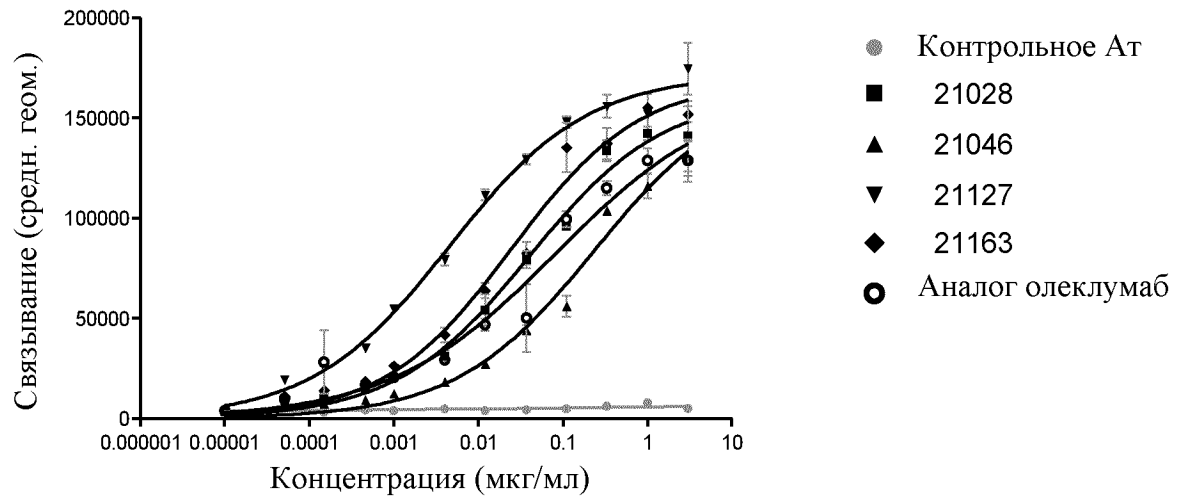


Фиг. 1

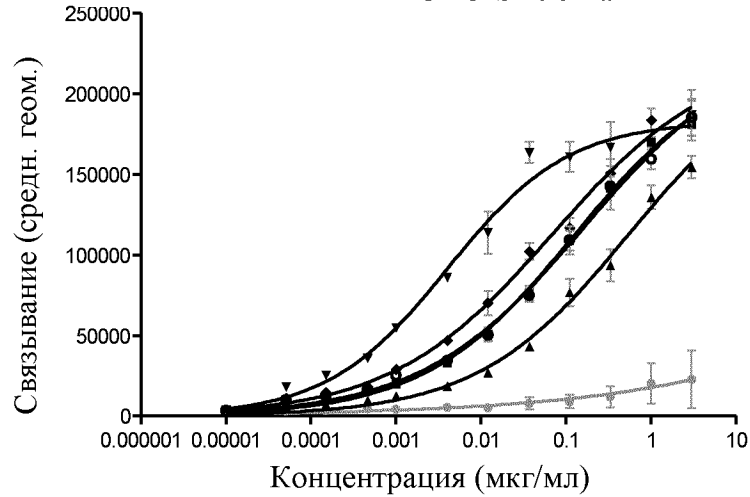


Фиг. 2

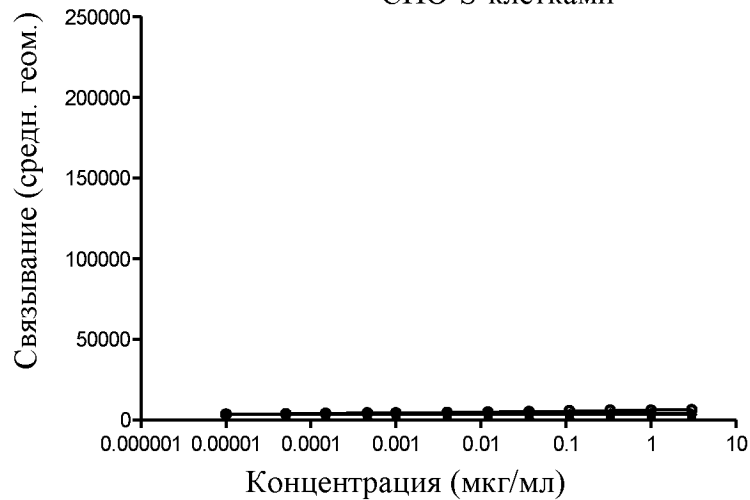
Связывание с трансфектированными человеческим CD73
CHO-S-клетками



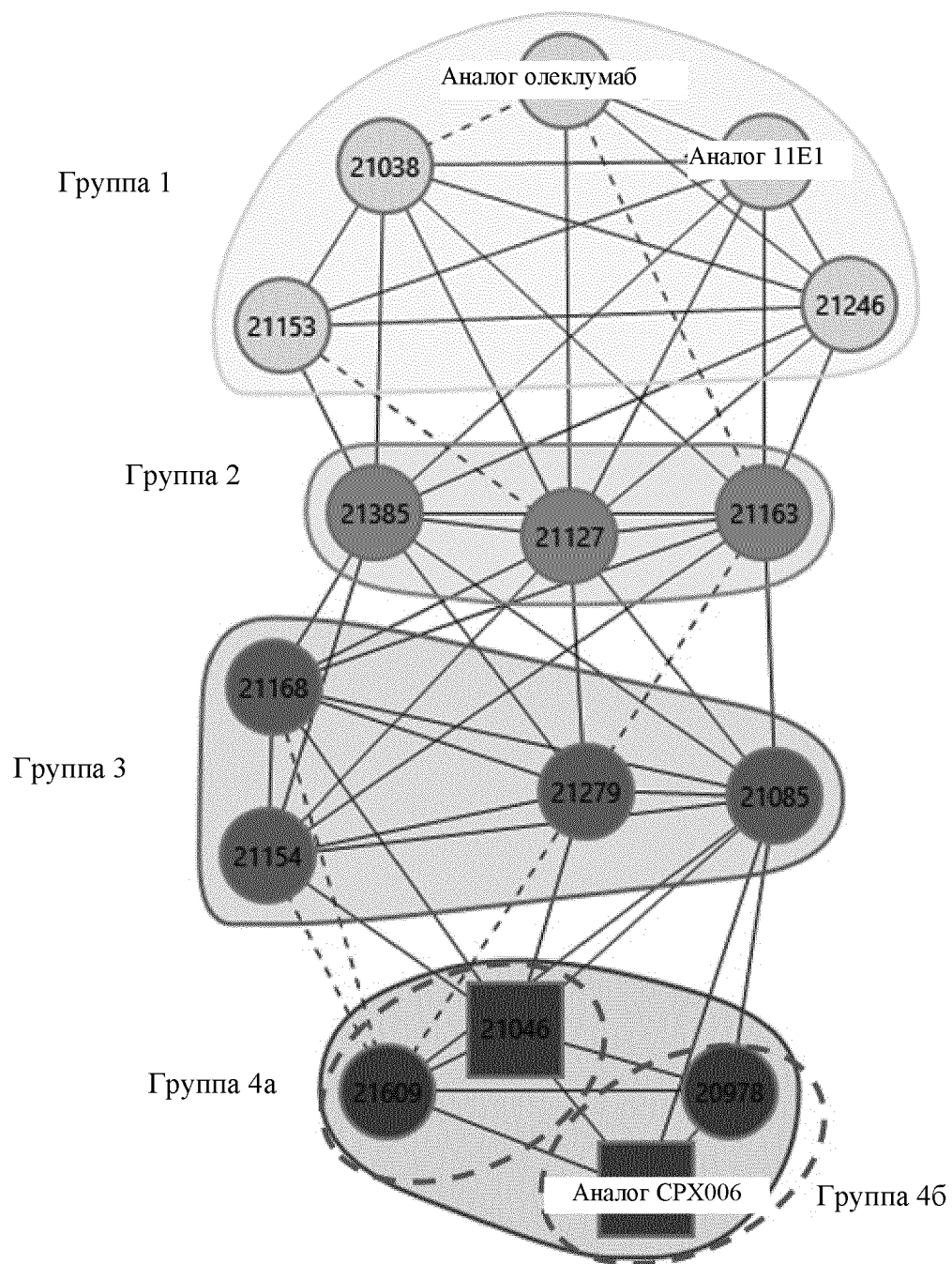
Связывание с трансфектированными CD73 обезьян циномолгус
CHO-S-клетками



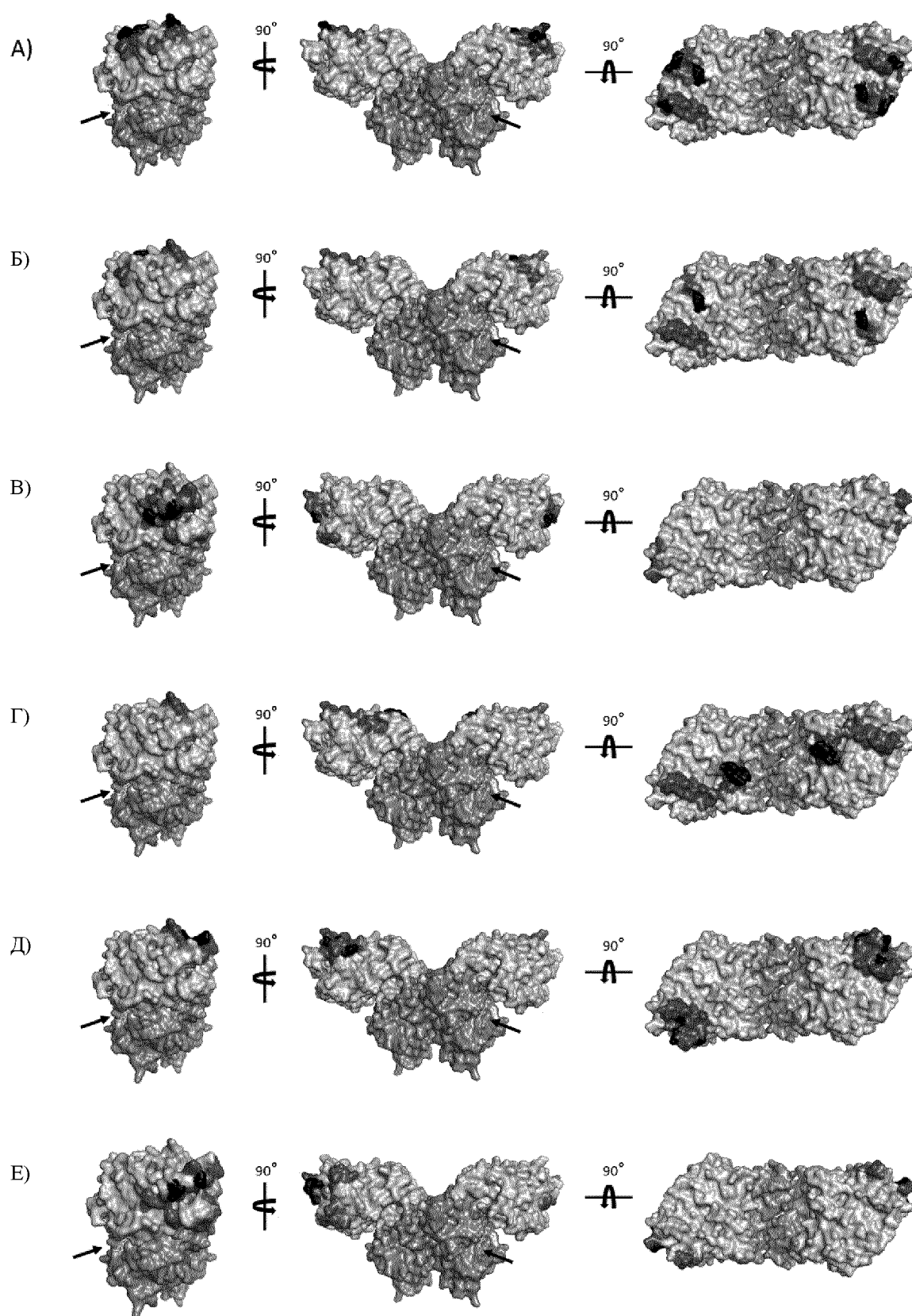
Связывание с ложно-трансфектированными
CHO-S-клетками



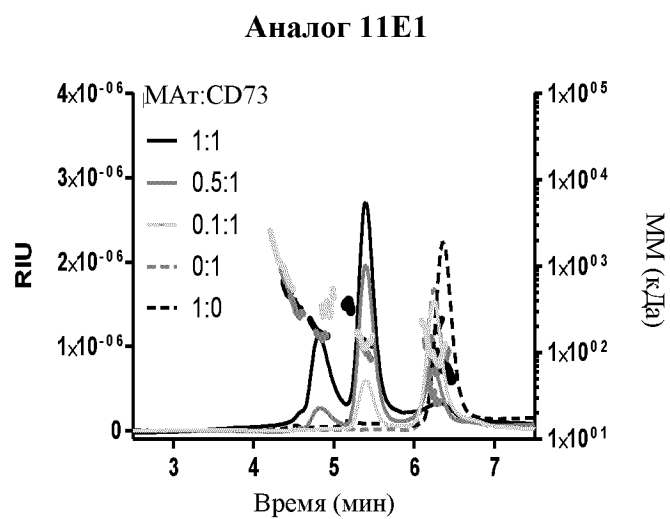
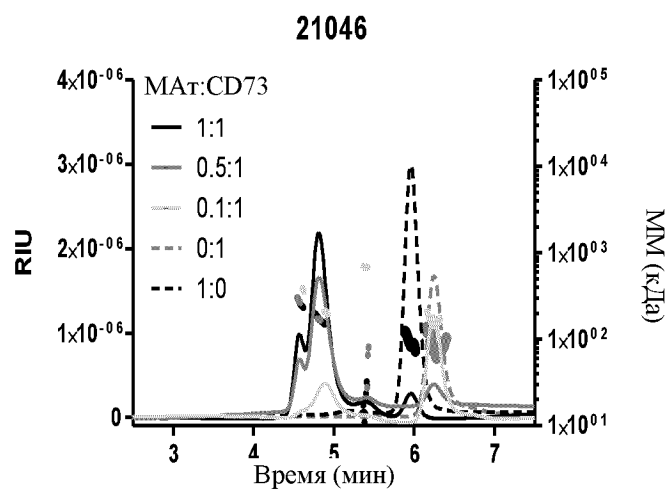
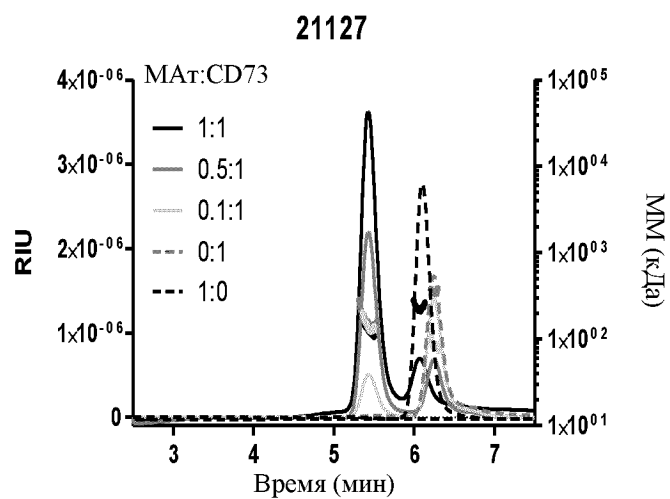
Фиг. 3

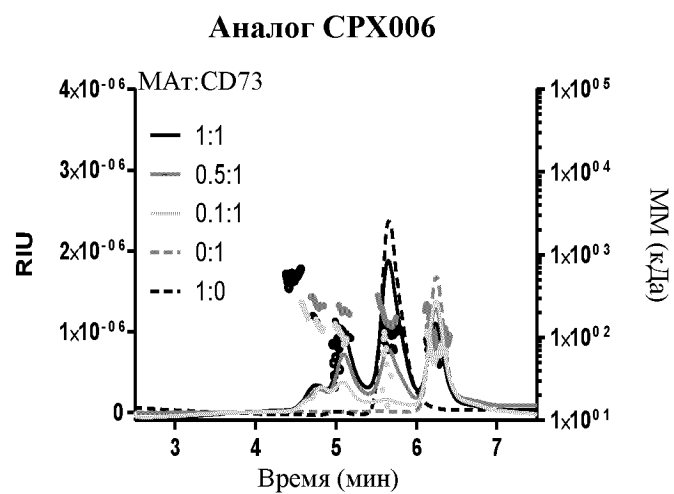
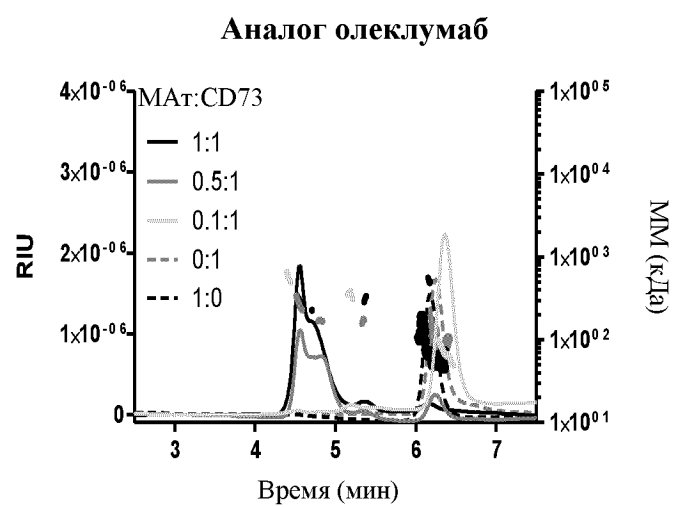
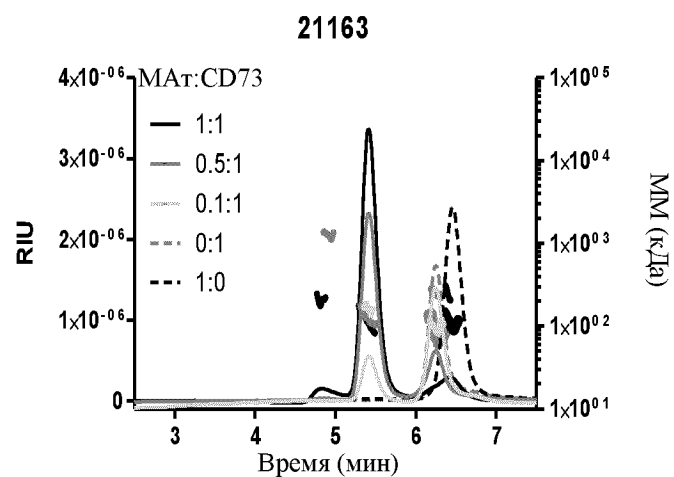


Фиг. 4

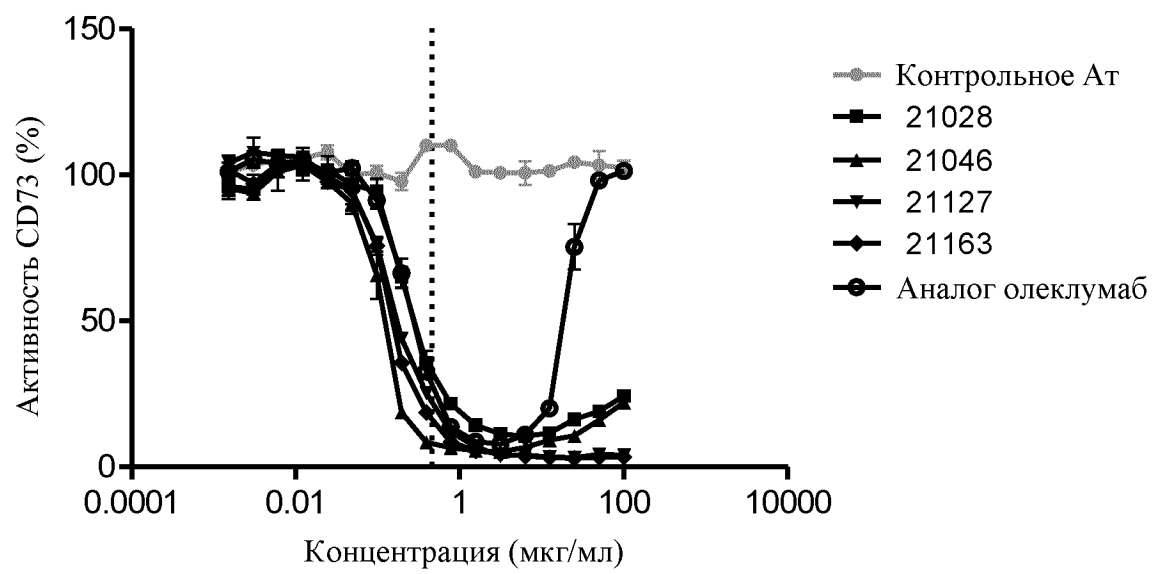


Фиг. 5

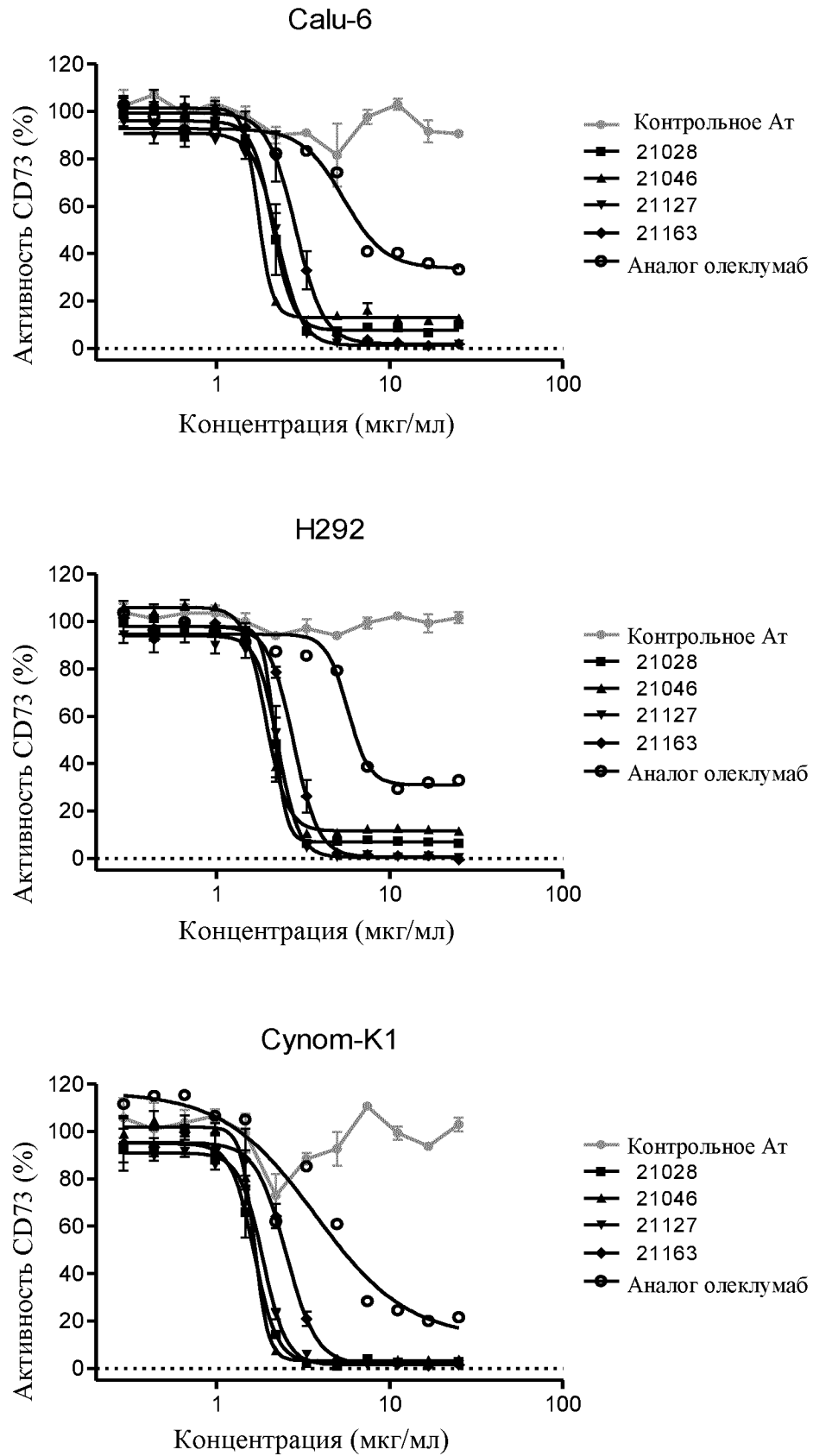
**Фиг. 6А**



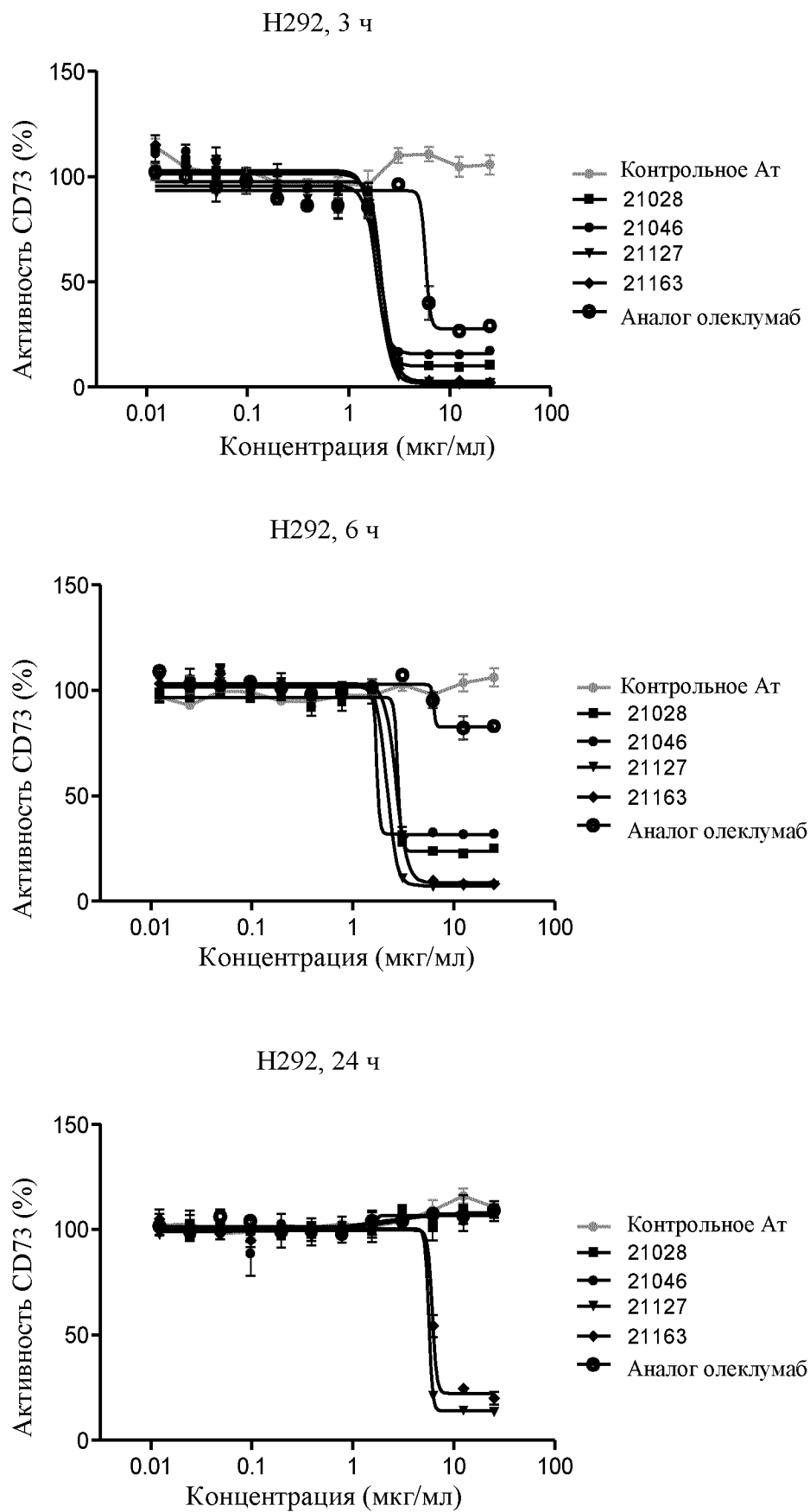
Фиг. 6Б



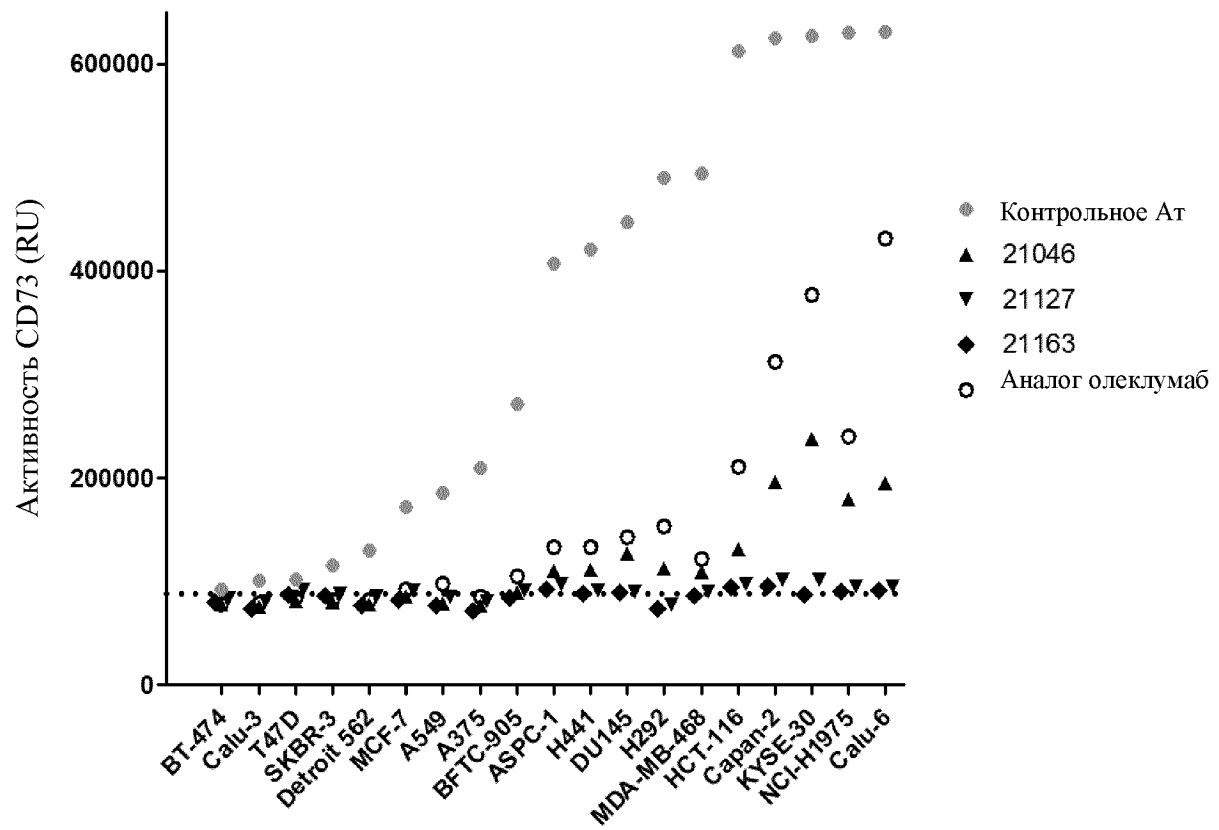
Фиг. 7



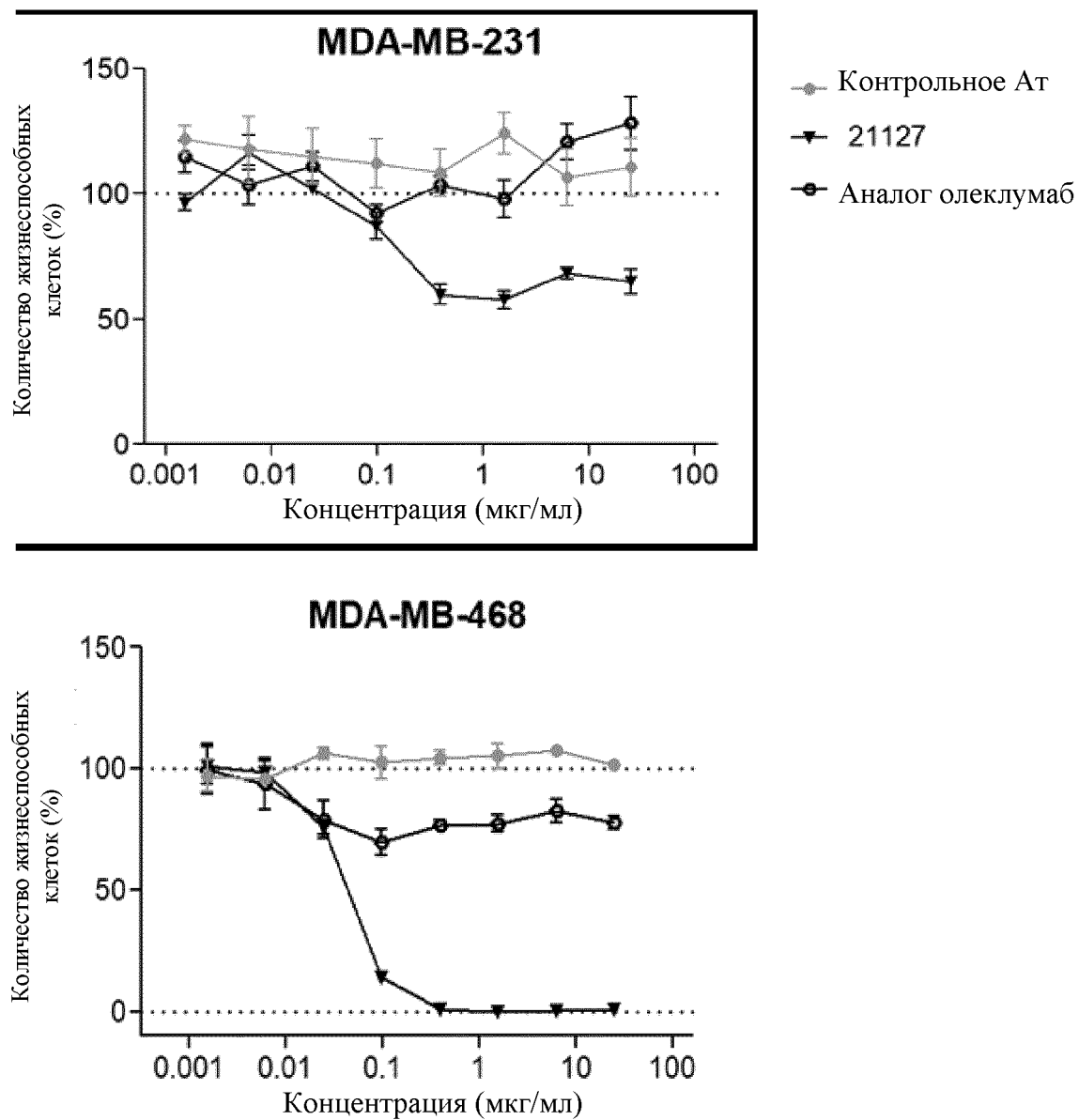
Фиг. 8



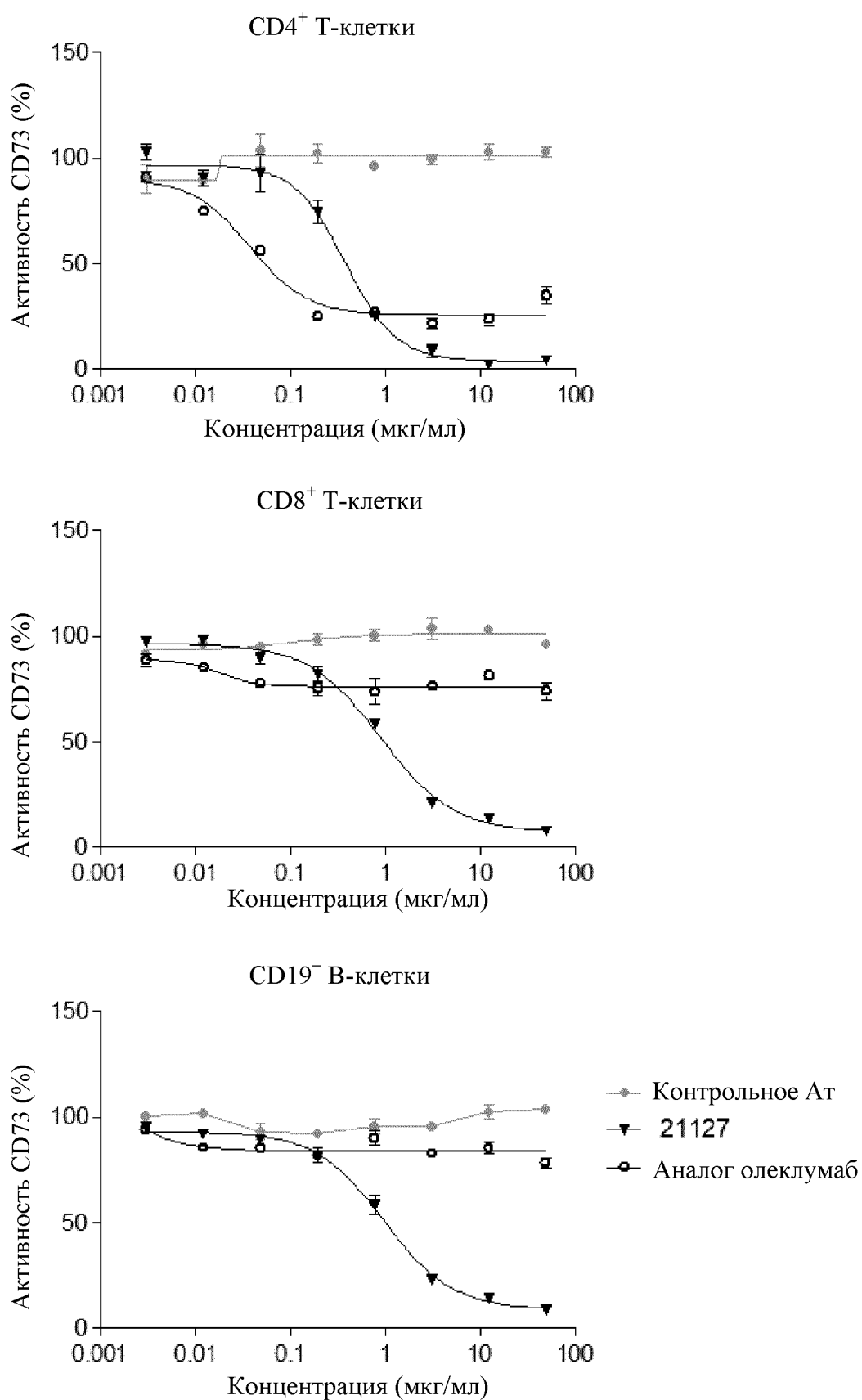
Фиг. 9



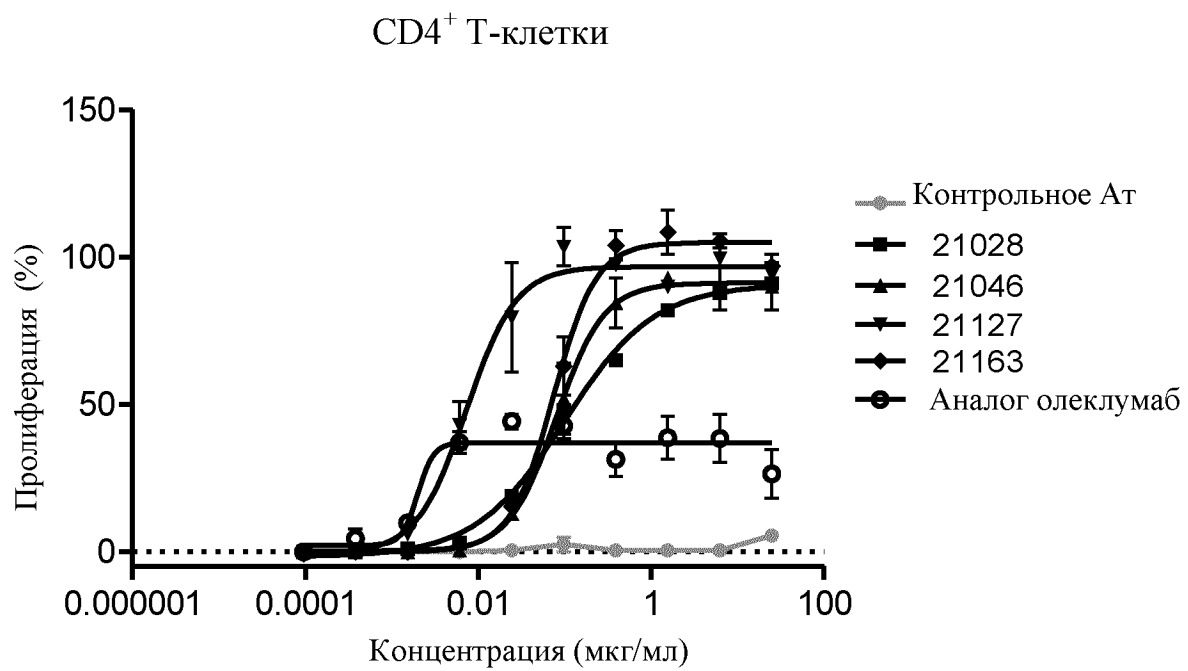
Фиг. 10



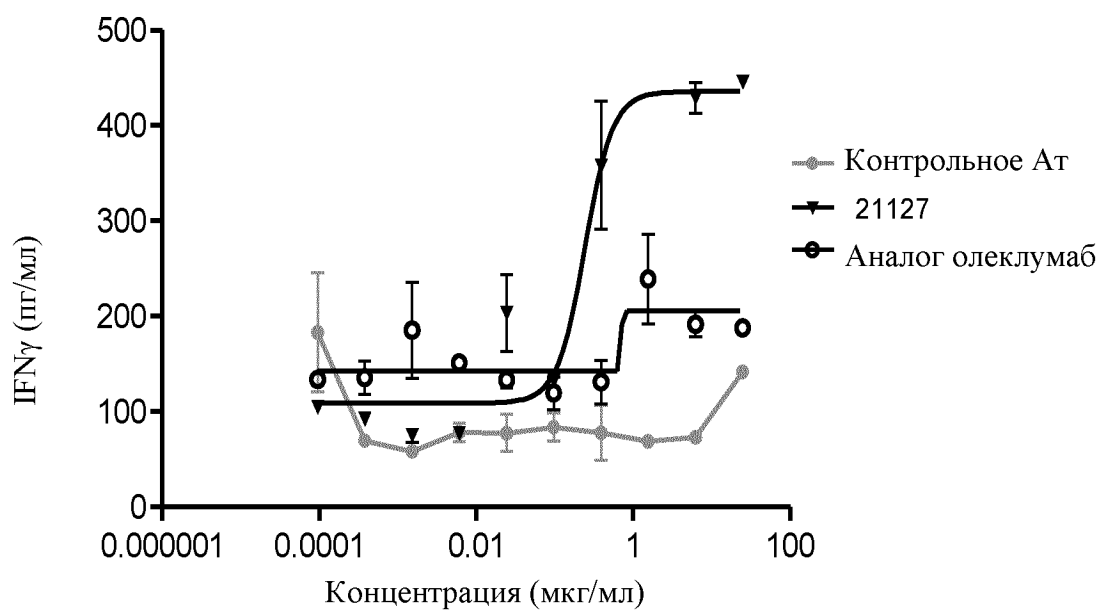
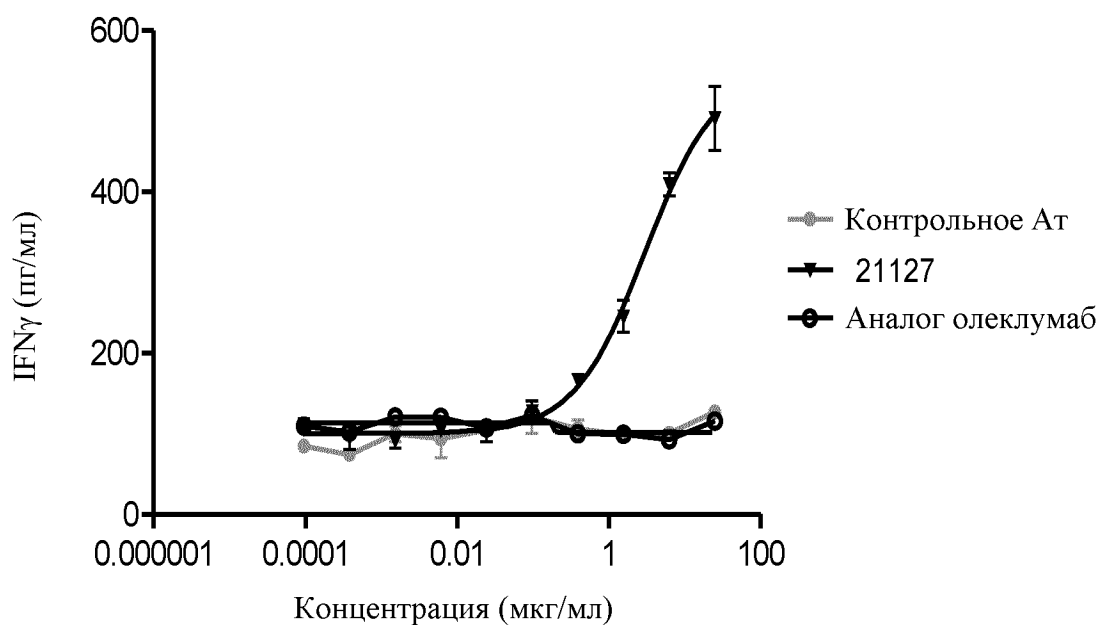
Фиг. 11



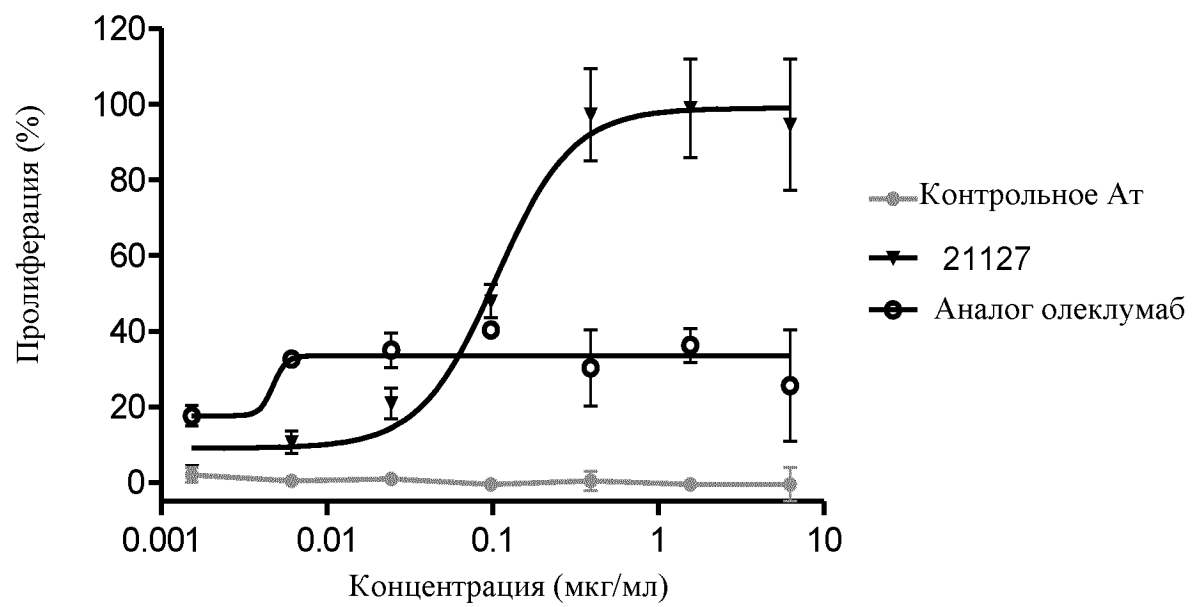
Фиг. 12



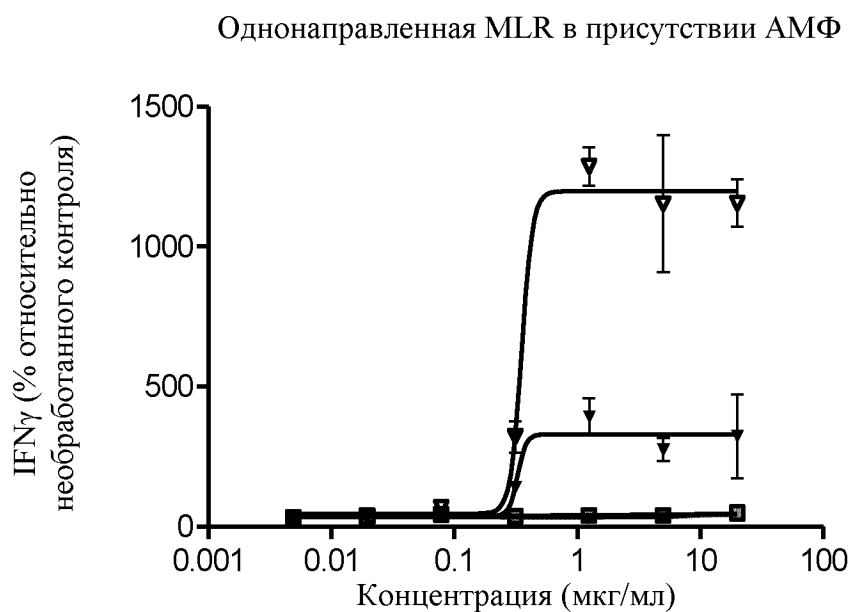
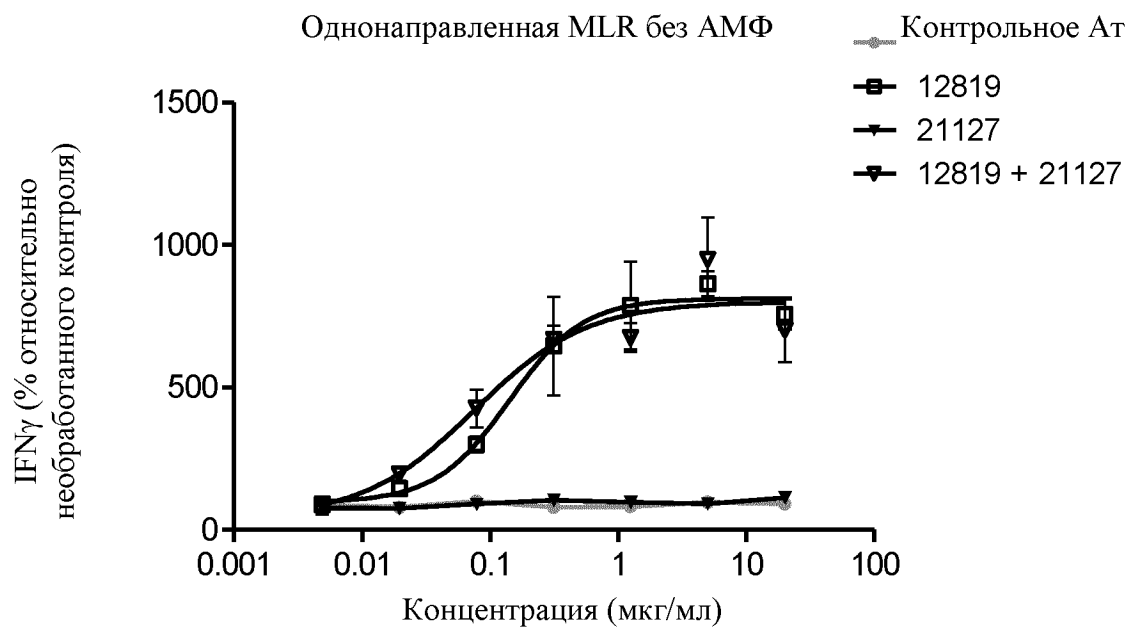
Фиг. 13

CD8⁺ Т-клеткиCD8⁺ Т-клетки

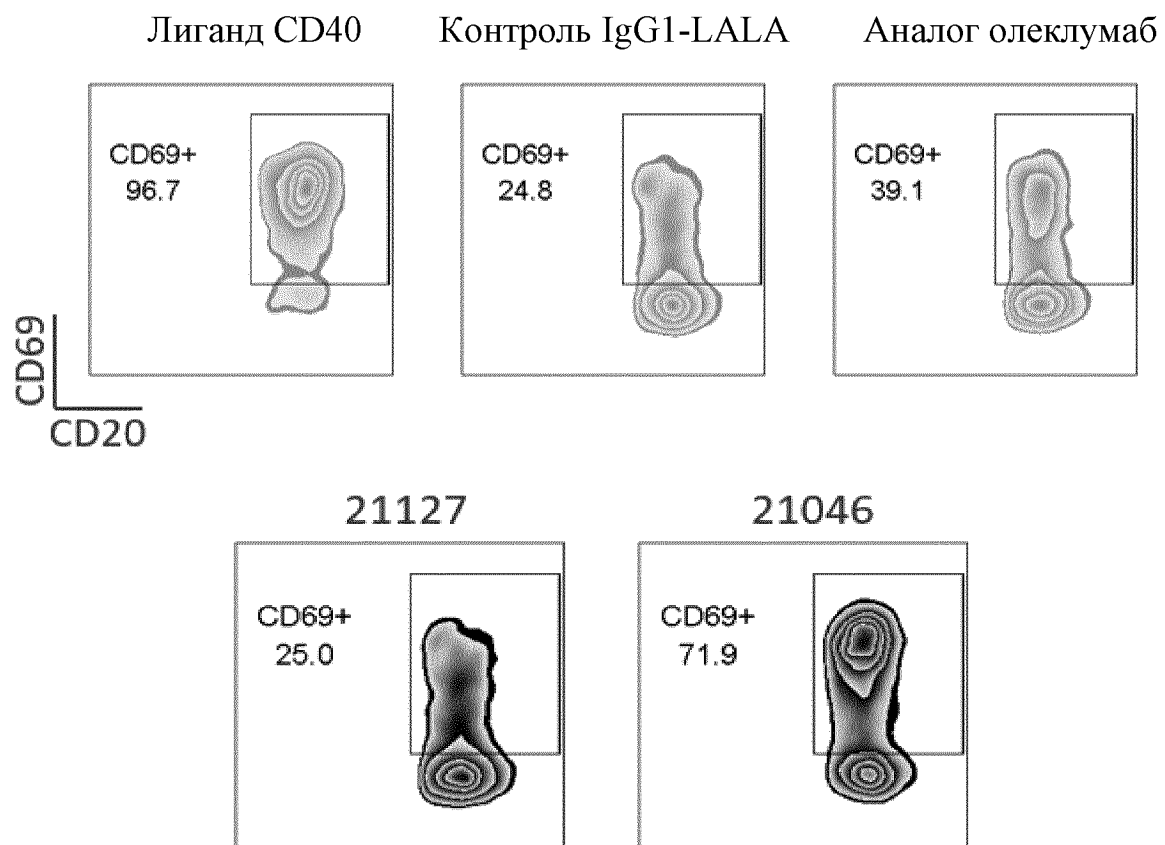
Фиг. 14



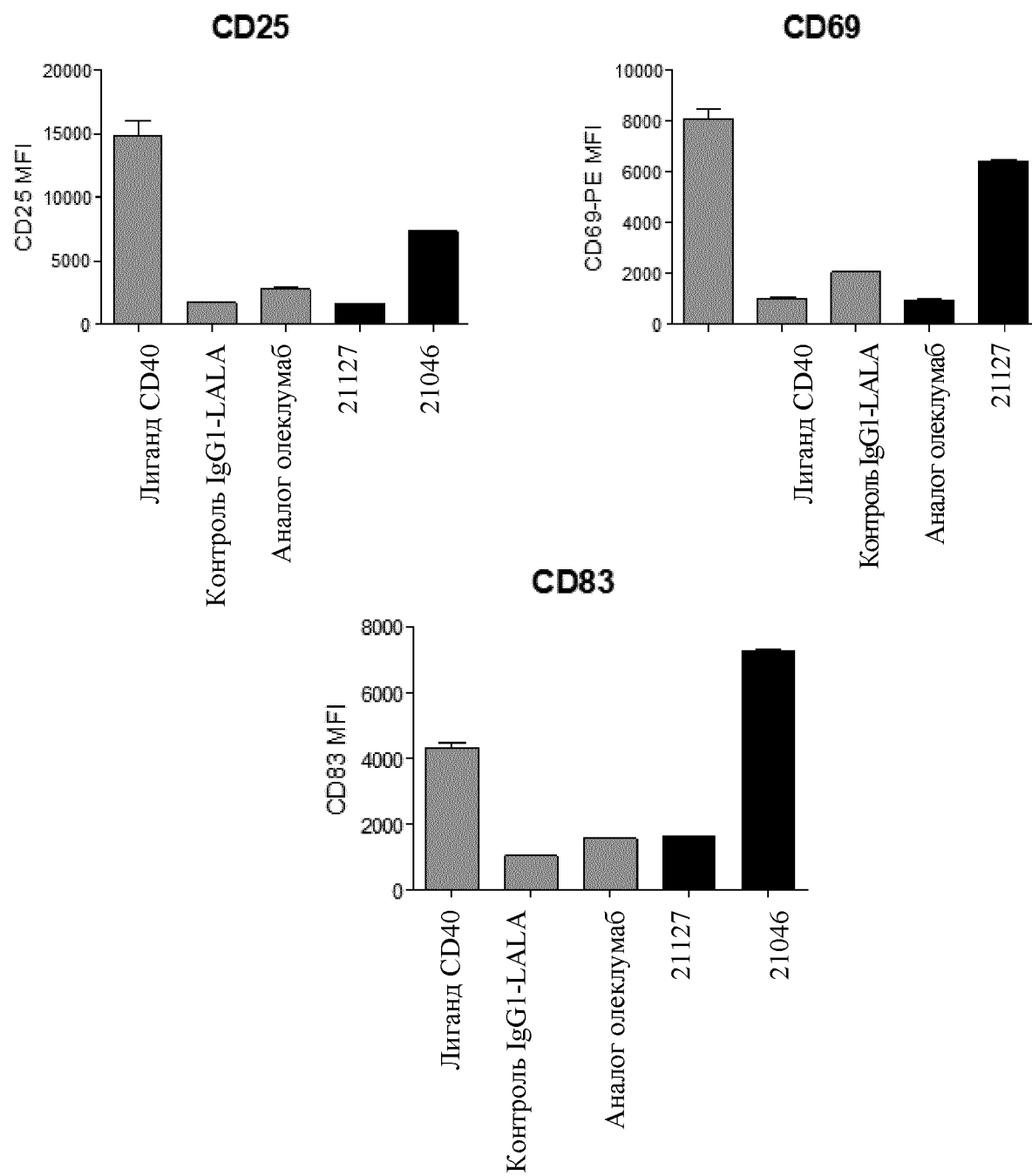
Фиг. 15



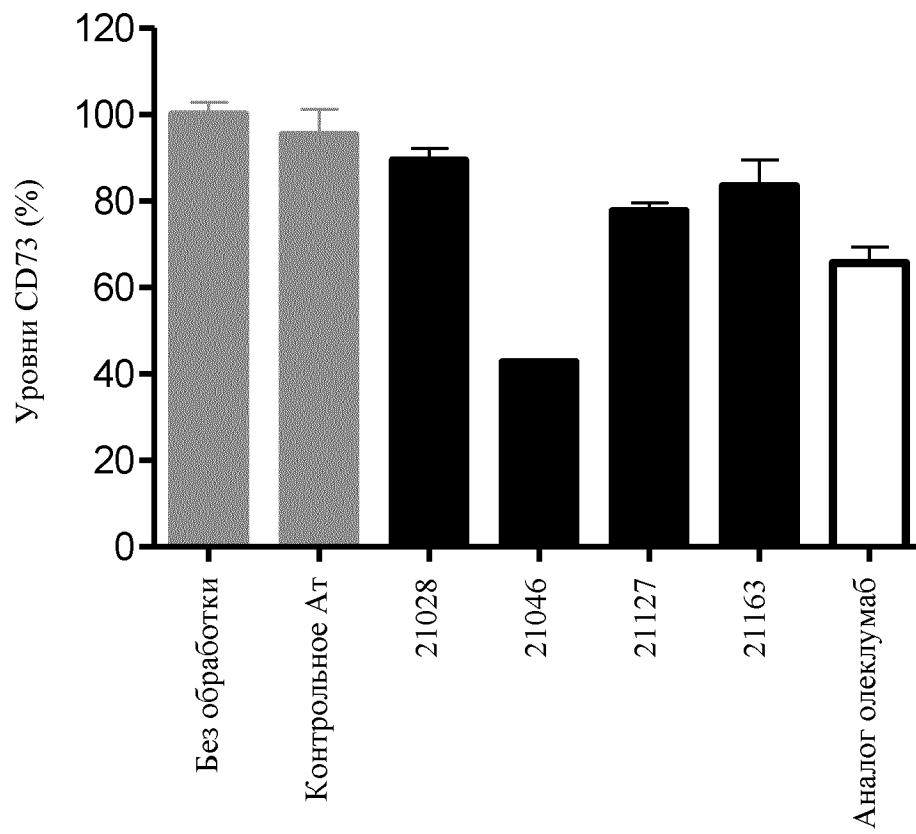
Фиг. 16



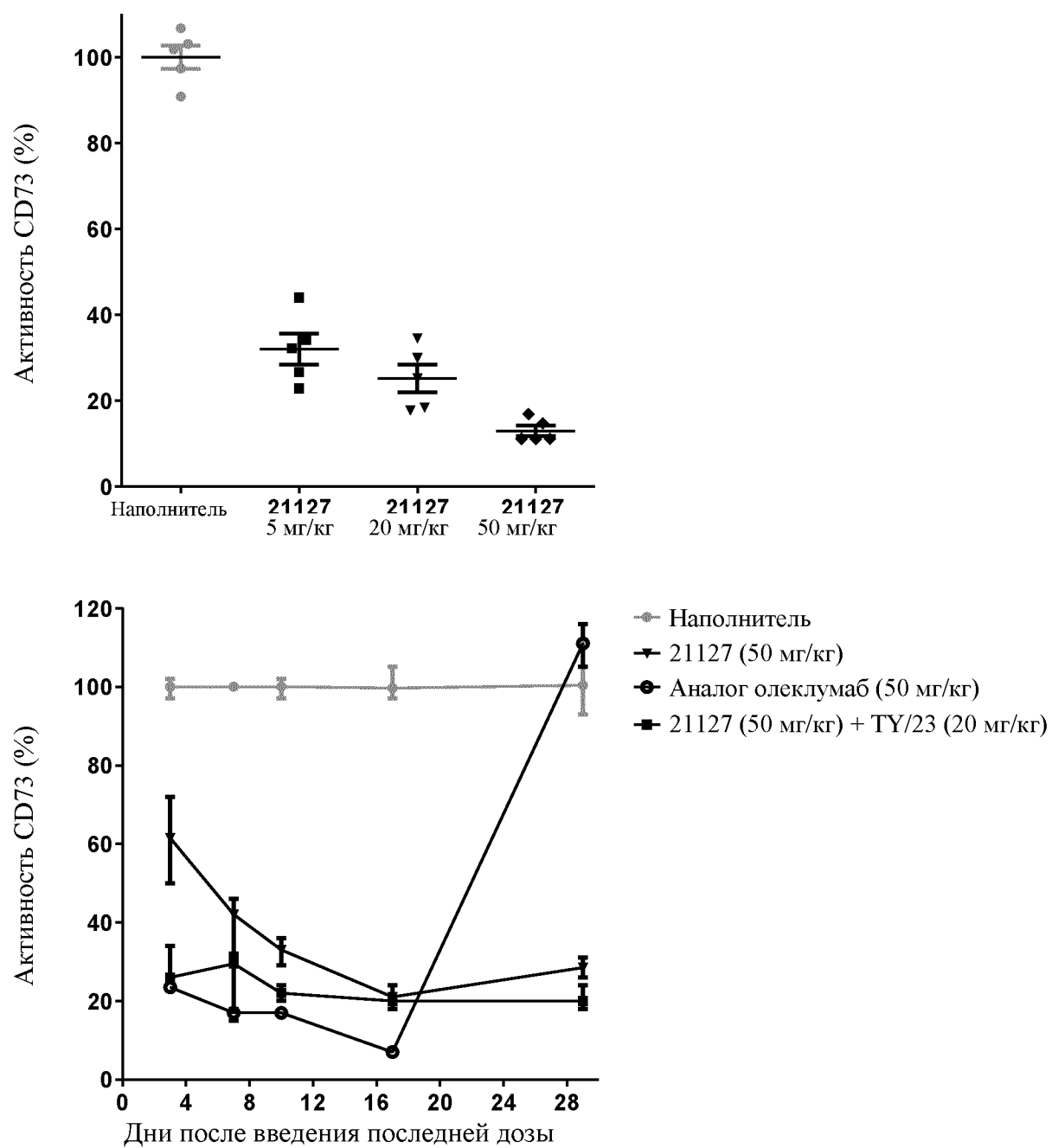
Фиг. 17А



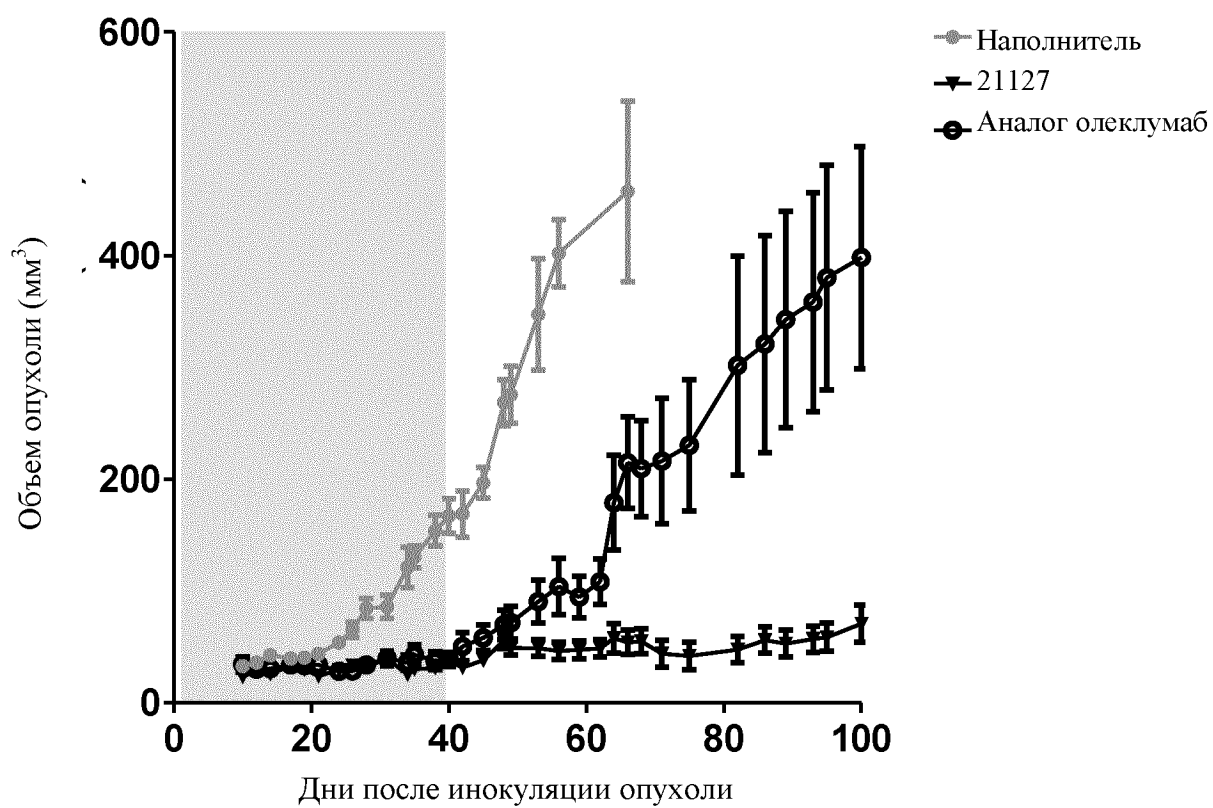
Фиг. 17Б



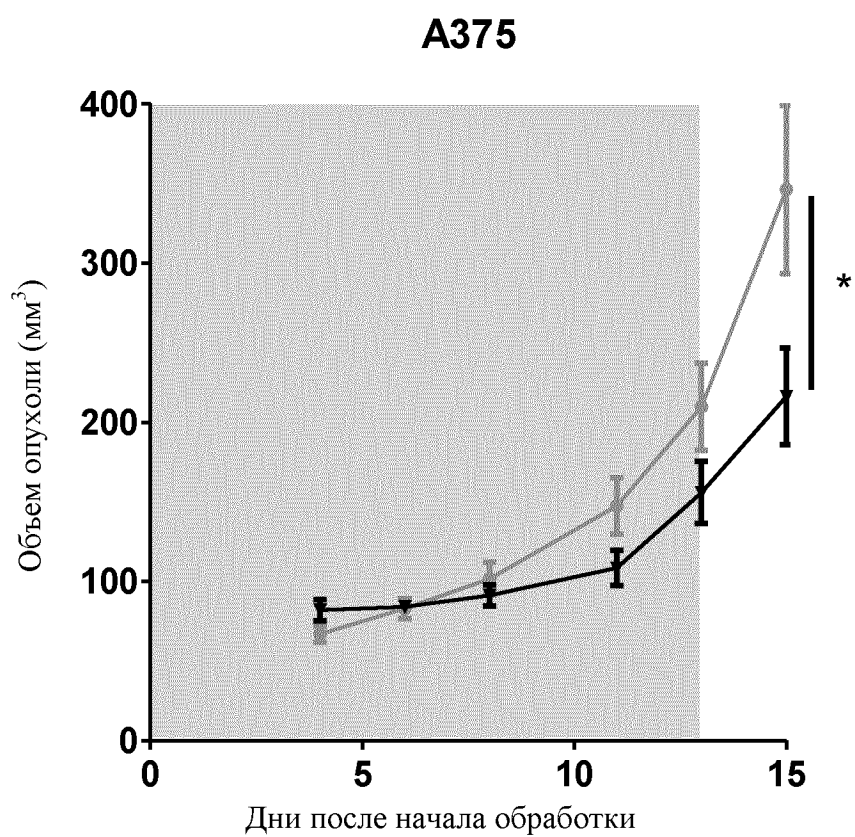
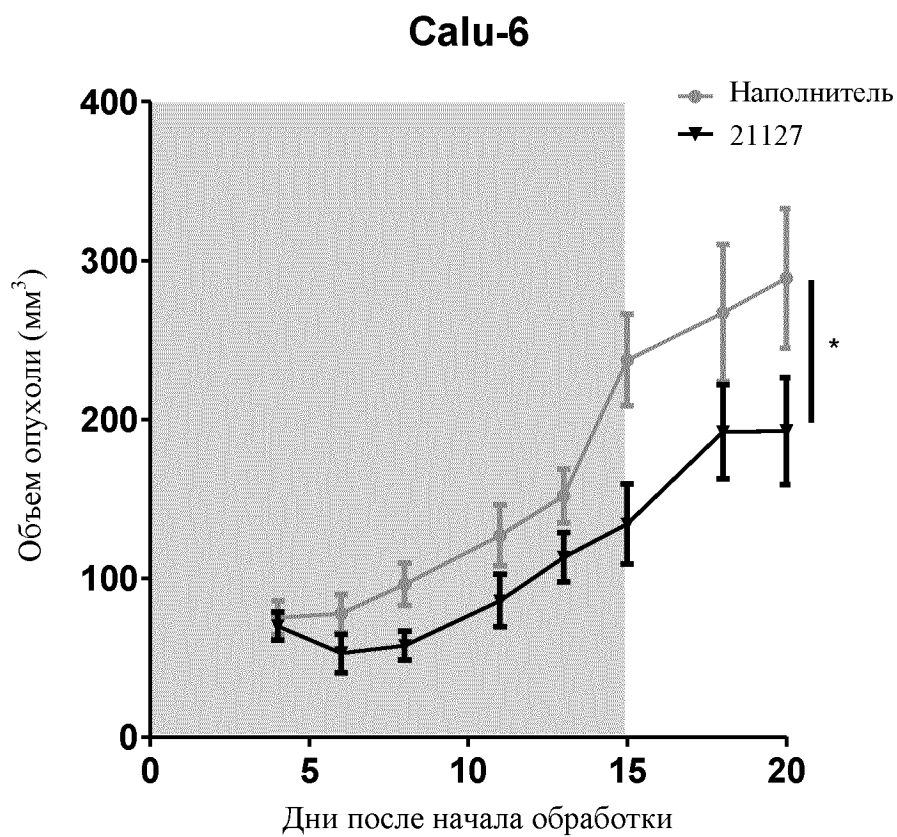
Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21