

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291803** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.12.27

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

(22) Дата подачи заявки
2020.12.30

(54) **АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD73 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 62/956,847

(32) 2020.01.03

(33) US

(86) PCT/US2020/067533

(87) WO 2021/138467 2021.07.08

(71) Заявитель:
ИНСАЙТ КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:

Настри Орасио Г., Стюарт Шон М.,
Альмагро Хуан Карлос, Чжоу Цзин,
Буонпейн Ребекка А. (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Описаны антитела против CD73. Также описаны связанные с ними нуклеиновые кислоты, векторы экспрессии, клетки и фармацевтические композиции. Также описаны способы лечения злокачественных новообразований с помощью антител против CD73.

202291803
A1

202291803

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574706EARU/061

АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD73 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка испрашивает приоритет относительно предварительной заявки на патент США № 62/956847, поданной 3 января 2020 года, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Данная заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронной виде в формате ASCII и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная ASCII-копия, созданная 23 декабря 2020 года, называется «20443-0644WO1_SL.txt» и имеет размер 89020 байт.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Кластер дифференцировки 73 (CD73) представляет собой связанный с гликозилфосфатидилинозитолом (ГФИ) мембранный белок, который катализирует превращение внеклеточного аденозинмонофосфата (АМФ) в аденозин. Он функционирует как гомодимер, может отделяться от поверхности клетки и проявлять активность в виде растворимого белка в циркуляции. В дополнение к своей ферментативной функции CD73 также является молекулой клеточной адгезии и играет роль в регуляции миграции лейкоцитов. Известно, что уровни CD73 повышаются вследствие повреждения тканей или гипоксических условий, и уровни CD73 повышены в ряде солидных опухолей. Повышение уровня CD73 в опухоли способствует развитию обогащенного аденозином микроокружения опухоли, которое обладает многочисленными проопухолевыми и иммуносупрессивными эффектами. Следовательно, существует потребность в терапевтических средствах, нацеленных на CD73 при злокачественных новообразованиях.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте данного изобретения представлено антитело, которое связывается с CD73 человека, при этом антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область VH (CDR)1, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO: 1);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO: 2); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFDY (SEQ ID NO: 3); и

при этом антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO: 4);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO: 5); и CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO: 6).

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта антитело содержит тяжелую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта антитело содержит легкую цепь, при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта домен VH по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 22, и домен VL по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22, и домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах осуществления первого аспекта антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25.

Во втором аспекте данного изобретения представлено антитело, которое связывается с CD73 человека, при этом антитело связывается с CD73 человека в эпителии в пределах аминокислот 40-53 из SEQ ID NO: 70.

В третьем аспекте данного изобретения представлено антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления первого, второго и третьего аспектов антитело представляет собой гуманизированное антитело.

В некоторых вариантах осуществления первого, второго и третьего аспектов антитело представляет собой биспецифическое антитело, одноцепочечное антитело, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fab', фрагмент F_{sc}, фрагмент F_v, scF_v, sc(F_v)₂ или диатело.

В четвертом аспекте данного изобретения представлены нуклеиновая кислота или нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело, представленное в любом из аспектов с первого по третий.

В пятом аспекте данного изобретения представлены вектор экспрессии или векторы экспрессии, содержащие вышеуказанные нуклеиновую кислоту или нуклеиновые кислоты, представленное в четвертом аспекте.

В шестом аспекте данного изобретения представлена выделенная клетка, содержащая нуклеиновую кислоту или нуклеиновые кислоты, представленные в четвертом аспекте, или вектор экспрессии или векторы экспрессии, представленные в пятом аспекте.

В седьмом аспекте данного изобретения представлена выделенная клетка, содержащая первый вектор экспрессии, содержащий первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, содержащий домен VH антитела, представленного в любом из аспектов с первого по третий, функционально связанный с промотором, и второй вектор экспрессии, содержащий вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, содержащий домен VL антитела, представленного в любом из аспектов с первого по третий, функционально связанный с промотором.

В восьмом аспекте данного изобретения представлена выделенная клетка, которая продуцирует антитело, представленное в любом из аспектов с первого по третий.

В девятом аспекте данного изобретения представлен способ получения антитела, представленного в любом из аспектов с первого по третий, включающий в себя культивирование клетки, представленной в шестом или седьмом аспекте, и выделение антитела.

В десятом аспекте данного изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело, представленное в любом из аспектов с первого по третий, и фармацевтически приемлемый носитель.

В одиннадцатом аспекте данного изобретения представлен способ лечения злокачественного новообразований у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий в себя введение субъекту-человеку эффективного количества антитела, представленного в любом из аспектов с первого по третий.

В некоторых вариантах осуществления одиннадцатого аспекта злокачественное новообразование характеризуется высокоаденозиновым профилем.

В некоторых вариантах осуществления одиннадцатого аспекта злокачественное новообразование представляет собой рак головы и шеи, колоректальный рак, рак легкого, меланому, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак печени или почечно-клеточную карциному.

В двенадцатом аспекте данного изобретения представлено антитело, которое связывается с CD73 человека, при этом антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область VH (CDR)1, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GFTFSSYD (SEQ ID NO: 34);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность MSYDGSNK (SEQ ID

NO: 35) или MSYEGSNK (SEQ ID NO: 40); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ATEIAAKGDY (SEQ ID NO: 36); и

при этом антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO: 37);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AAS (SEQ ID NO: 38); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39).

В некоторых вариантах осуществления двенадцатого аспекта

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GFTFSSYD (SEQ ID NO: 34);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность MSYDGSNK (SEQ ID NO: 35);

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ATEIAAKGDY (SEQ ID NO: 36);

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO: 37);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AAS (SEQ ID NO: 38); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39). В некоторых вариантах осуществления домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит легкую цепь, при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления домен VH по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 62, и домен VL по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 62, и домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления двенадцатого аспекта

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GFTFSSYD (SEQ ID NO:

34);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность MSYEGSNK (SEQ ID NO: 40);

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ATEIAAKGDY (SEQ ID NO: 36);

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO: 37);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AAS (SEQ ID NO: 38); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39). В некоторых вариантах осуществления домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит легкую цепь, при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления домен VH по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 63, и домен VL по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 63, и домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31.

В тринадцатом аспекте данного изобретения представлено антитело, которое связывается с CD73 человека, при этом антитело связывается с CD73 человека в эпителии в пределах аминокислот 386-399 и 470-489 из SEQ ID NO: 70.

В четырнадцатом аспекте данного изобретения представлено антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

В пятнадцатом аспекте данного изобретения представлено антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления аспектов с двенадцатого по пятнадцатый антитело представляет собой гуманизированное антитело.

В некоторых вариантах осуществления аспектов с двенадцатого по пятнадцатый антитело представляет собой биспецифическое антитело, одноцепочечное антитело,

фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fab', фрагмент F_{sc}, фрагмент F_v, scF_v, sc(F_v)₂ или диатело.

В шестнадцатом аспекте данного изобретения представлены нуклеиновая кислота или нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело, представленное в любом из аспектов с двенадцатого по пятнадцатый.

В семнадцатом аспекте данного изобретения представлены вектор экспрессии или векторы экспрессии, содержащие нуклеиновую кислоту или нуклеиновые кислоты, представленное в шестнадцатом аспекте, функционально связанные с промотором.

В восемнадцатом аспекте данного изобретения представлена выделенная клетка, содержащая нуклеиновую кислоту или нуклеиновые кислоты, представленные в шестнадцатом аспекте, или вектор экспрессии или векторы экспрессии, представленные в семнадцатом аспекте.

В девятнадцатом аспекте данного изобретения представлена выделенная клетка, содержащая первый вектор экспрессии, содержащий первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, содержащий домен VH антитела, представленного в любом из аспектов с двенадцатого по пятнадцатый, функционально связанный с промотором, и второй вектор экспрессии, содержащий вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, содержащий домен VL антитела, представленного в любом из аспектов с двенадцатого по пятнадцатый, функционально связанный с промотором.

В двадцатом аспекте данного изобретения представлена выделенная клетка, которая продуцирует антитело, представленное в любом из аспектов с двенадцатого по пятнадцатый.

В двадцать первом аспекте данного изобретения представлен способ получения антитела, представленного в любом из аспектов с двенадцатого по пятнадцатый, включающий в себя культивирование клетки, представленной в восемнадцатом или девятнадцатом аспекте, и выделение антитела.

В двадцать втором аспекте данного изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело, представленное в любом из аспектов с двенадцатого по пятнадцатый, и фармацевтически приемлемый носитель.

В двадцать третьем аспекте данного изобретения представлен способ лечения злокачественного новообразования у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий в себя введение субъекту-человеку эффективного количества антитела по любому из аспектов с двенадцатого по пятнадцатый.

В некоторых вариантах осуществления двадцать третьего аспекта злокачественное новообразование характеризуется высокоаденозиновым профилем. В некоторых вариантах осуществления двадцать третьего аспекта злокачественное новообразование представляет собой рак головы и шеи, колоректальный рак, рак легкого, меланому, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак печени или почечно-клеточную карциному.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1А показаны аминокислотные последовательности вариабельного домена тяжелой цепи (VH) и вариабельного домена легкой цепи (VL) для гуманизированных антител CL25 - CL_hu10-4, HzCL25, CL25_hu_10-6 и CL25_hu_11-4.

На фиг. 1В показаны аминокислотные последовательности VH и VL для гуманизированных антител CL25 - CL25_hu_11-5, CL25_hu_11-6, CL25_hu_8-4 и CL25_hu_8-5.

На фиг. 1С показаны аминокислотные последовательности VH и VL для гуманизированных антител CL25 - CL25_hu_8-6, CL25_hu_9-4, CL25_hu_9-5 и CL25_hu_9-6.

На фиг. 1D показано выравнивание VH для CL25 и гуманизированных антител CL25. CDR согласно определению по IMGT подчеркнуты.

На фиг. 1Е показано выравнивание VL для CL25 и гуманизированных антител CL25. CDR согласно определению по IMGT подчеркнуты.

Фиг. 2А представляет собой график, показывающий связывание с клетками (измеренное на основании средней геометрической интенсивности флуоресценции - СГИФ, англ. «GMFI») для антител в указанных концентрациях на клетках MDA-MB-231.

Фиг. 2В представляет собой график, показывающий связывание с клетками (измеренное на основании СГИФ) для CL25 или изотипического контроля (ИК) в указанных концентрациях на клетках A375.

Фиг. 3А представляет собой график, показывающий ингибирование клеточного CD73 на клетках A375, на которые воздействовали антителами или изотипическим контролем (ИК) в указанных концентрациях.

Фиг. 3В представляет собой график, показывающий ингибирование клеточного CD73 на клетках MDA-MB-231, на которые воздействовали антителами или изотипическим контролем (ИК) в указанных концентрациях.

Фиг. 3С представляет собой график, показывающий ингибирование клеточного CD73 на клетках MDA-MB-231, на которые воздействовали антителами или изотипическим контролем (ИК) в указанных концентрациях.

Фиг. 4 представляет собой график, показывающий ингибирование рекомбинантного CD73 при воздействии антителами или изотипическим контролем (ИК) в указанных концентрациях.

Каждая из фиг. 5А-5N представляет собой график, показывающий процент пролиферации CD4+ Т-клеток из донорских клеток, на которые воздействовали антителом или изотипическим контролем в различных концентрациях.

Фиг. 6 представляет собой карту кристаллической структуры CD73 человека (4H2F.pdb) с эпитопом антитела CL25, обозначенным темно-серым цветом (и стрелками).

Фиг. 7 представляет собой график, показывающий уровни поверхностного CD73 после 24-часовой инкубации с указанным антителом или изотипическим контролем («ИК») или без воздействия («БВ»), измеренные с помощью непосредственно конъюгированного неконкурирующего антитела.

Фиг. 8 представляет собой график, показывающий средний объем опухоли в указанные сутки после инокуляции опухоли для мышей, которым вводили изотипический контроль (контрольный IgG), 1 мг/кг или 10 мг/кг HzCL25.

Фиг. 9 представляет собой график, показывающий процент ингибирования CD73 в опухолях, полученных из мышей, которым вводили изотипический контроль (контрольный IgG), 1 мг/кг или 10 мг/кг HzCL25.

Фиг. 10А представляет собой график, показывающий общие уровни поверхностного CD73 для одноклеточных суспензий только опухолевых клеток из мышей, получавших указанные антитела в указанных дозах, как определено на основании средней интенсивностью флуоресценции (СИФ, англ. «MFI») неконкурирующего антитела.

Фиг. 10В представляет собой график, показывающий занятость рецептора для одноклеточных суспензий только опухолевых клеток из мышей, получавших указанные антитела в указанных дозах, как определено на основании СИФ конкурирующего антитела.

Фиг. 11А представляет собой график, показывающий средний объем опухоли в указанные сутки после инокуляции, для 10 мг/кг изотипического контроля (сх00376-001) или HzCL25. Треугольники на оси x указывают сутки, в которые вводили указанные препараты.

Фиг. 11В представляет собой график, показывающий объем индивидуальных опухолей на 33-е сутки для мышей из фиг. 11А, которым вводили изотипический контроль (слева) или HzCL25 (справа).

Фиг. 12 представляет собой графики, показывающие концентрацию общего и свободного растворимого hCD73 в сыворотке крови мышей, получавших указанное антитело или изотипический IgG-контроль. Общий растворимый hCD73 выявляли с помощью неконкурирующего антитела (антитело X, внизу), а свободный растворимый hCD73 выявляли с помощью конкурирующего антитела (HzCL25,верху).

Фиг. 13А представляет собой график, показывающий связывание с клетками (СГИФ) для антитела 3-F03 в указанных концентрациях на клетках MDA-MB-231.

Фиг. 13В представляет собой график, показывающий связывание с клетками (измеренное на основании СГИФ) для 3-F03 или изотипического контроля (ИК) в указанных концентрациях на клетках A375.

Фиг. 14А представляет собой график, показывающий ингибирование клеточного CD73 на клетках A375, на которые воздействовали антителом 3-F03 или изотипическим контролем (ИК) в указанных концентрациях.

Фиг. 14В представляет собой график, показывающий ингибирование клеточного CD73 на клетках MDA-MB-231, на которые воздействовали антителом 3-F03 или изотипическим контролем (ИК) в указанных концентрациях.

Фиг. 15 представляет собой график, показывающий ингибирование рекомбинантного CD73 при воздействии 3-F03 или изотипического контроля (ИК) в

указанных концентрациях.

Каждая из фиг. 16А-16D представляет собой график, показывающий процент пролиферации CD4⁺ Т-клеток из донорских клеток, на которые воздействовали антителом 3-F03 или изотипическим контролем в различных концентрациях.

Фиг. 17 представляет собой карту кристаллической структуры CD73 человека (4H2F.pdb) с эпитопом антитела 3-F03, обозначенным темно-серым цветом (и стрелками).

Фиг. 18 представляет собой график, показывающий уровни поверхностного CD73 после 24-часовой инкубации с 3-F03, изотипическим контролем (ИК) или без воздействия (БВ), измеренные с помощью напрямую конъюгированного неконкурирующего антитела - CL43-Dy650.

Фиг. 19А представляет собой график, показывающий средний объем опухоли в указанные сутки после инокуляции, для 10 мг/кг изотипического контроля (сх00376-001) или 3-F03. Треугольники на оси x указывают сутки, в которые вводили указанные препараты.

Фиг. 19В представляет собой график, показывающий объем индивидуальных опухолей на 33-е сутки для мышей из фиг. 19А, которым вводили изотипический контроль (слева) или 3-F03 (справа).

Фиг. 20 представляет собой графики, показывающие концентрацию общего и свободного растворимого hCD73 в сыворотке крови мышей, получавших 3-F03 или изотипический контроль IgG. Общий растворимый hCD73 выявляли с помощью неконкурирующего антитела (антитело X, сверху), а свободный растворимый hCD73 выявляли с помощью конкурирующего антитела (3-F03, внизу).

На фиг. 21А - фиг. 21J показаны аминокислотные последовательности VH и VL для 3-F03 и иллюстративных вариантов 3-F03.

Фиг. 22 представляет собой график, показывающий клеточное связывание (СГИФ) для указанных антител в указанных концентрациях на клетках MDA-MB-231.

Фиг. 23 представляет собой график, показывающий ингибирование клеточного CD73 на клетках MDA-MB-231, на которые воздействовали указанными антителами или изотипическим контролем в указанных концентрациях.

На фиг. 24 показаны иллюстративные аминокислотные последовательности СН1-шарнир-СН2-СН3 тяжелой цепи IgG1 человека с мутацией N297A (SEQ ID NO: 73), СН1-шарнир-СН2-СН3 тяжелой цепи IgG1 человека с мутацией N297A с С-концевым лизином (SEQ ID NO: 75) и константная область легкой цепи каппа человека (SEQ ID NO: 74).

На фиг. 25А показаны последовательности ДНК, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь HzCL25.

На фиг. 25В показана последовательность ДНК, кодирующая тяжелую цепь 3-F03_411.

На фиг. 25С показаны последовательности ДНК, кодирующие легкую цепь 3-F03_411 и 3-F03_413, и тяжелую цепь 3-F03_413.

Фиг. 26 представляет собой график, показывающий концентрацию аденозина в

опухолях, на которые воздействовали контрольным изотипическим антителом, HzCL25 или 3-F03.

Фиг. 27 представляет собой график, показывающий ингибирование аденозина при указанных концентрациях антитела (Ат) HzCL25 и АМФ.

Фиг. 28 представляет собой график, показывающий ингибирование аденозина при указанных концентрациях антитела (Ат) 3-F03 и АМФ.

Фиг. 29 представляет собой график, показывающий ингибирование аденозина при указанных концентрациях антитела (Ат) HzCL25 и АМФ.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном изобретении представлены антитела против CD73 и связанные с ними нуклеиновые кислоты, векторы экспрессии, клетки и фармацевтические композиции. Антитела против CD73, описанные в данном документе, полезны для лечения или профилактики нарушений, таких как злокачественное новообразование (например, рак головы и шеи, колоректальный рак, рак легкого, меланома, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак печени или почечно-клеточная карцинома).

CD73

CD73 (также известный как «5'-нуклеотидаза» и «экто-5'-нуклеотидаза») представляет собой димерный фермент (ЕС: 3.1.3.5), который функционирует как гомодимер, связанный ГФИ-связью с внешней поверхностью плазматической мембраны. CD73 может отделяться от поверхности клетки и проявлять активность в виде растворимого белка в циркуляции. CD73 катализирует превращение внеклеточного АМФ в аденозин. Ферментативная активность CD73 требует связывания субстрата в открытой конформации CD73. После связывания с субстратом CD73 претерпевает значительные конформационные изменения от открытой к закрытой конформации для превращения АМФ в аденозин (см., например, работу Knapp et al., 2012, Structure, 20 (12): 2161-73). CD73 также функционирует как молекула клеточной адгезии и играет роль в регуляции миграции лейкоцитов.

Ферментативная активность CD73 играет роль в развитии и метастазировании рака (см., например, работы Stagg and Smyth, 2010, Oncogene, 29:5346-5358; Salmi and Jalkanen, 2012, OncoImmunology, 1:247-248, 2012; Stagg, 2012, OncoImmunology, 1:217-218; Zhang, 2012, OncoImmunology, 1:167-70). Сверхэкспрессия CD73 в раковых клетках нарушает адаптивные противоопухолевые иммунные реакции, усиливая рост опухоли и метастазирование (см., например, работы Niemelä et al., 2004, J. Immunol., 172:1646-1653; Sadej et al., 2006, Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 25:1119-1123; Braganhol et al., 2007, Biochim. Biophys. Acta., 1770:1352-1359; Zhang, 2010, Cancer Res., 70:6407-6411; Zhang, 2012, OncoImmunology, 1:67-70).

Иллюстративная аминокислотная последовательность зрелого белка CD73 человека (аминокислоты 27-549 белка под номером доступа NP_002517 базы данных GenBank) представляет собой:

WELTILHTNDVHSRLEQTSSESSKCVNASRCMGGVARLFTKVQQIRRAEPNVLL

LDAGDQYQGTIWFTVYKGAEVAHFMNALRYDAMALGNHEFDNGVEGLIEPLLKEAKF
 PILSANIKAKGPLASQISGLYLPYKVLPVGDEVVGVGIVGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEIT
 ALQPEVDKCLKTLNVNKIIALGHSGFEMDKLIAQKVRGVDVVVGGHSNTFLYTGNPPSKE
 VPAGKYPFIVTSDDGRKVPVVQAYAFGKYLGYLKIEFDERGNVISSHGPNILLNSSIPEDP
 SIKADINKWRIKLDNYSTQELGKTIVYLDGSSQSCRFRECNMGNLICDAMINNNLRHTDE
 MFWNHVSMCILNNGGIRSPIDERNNGTITWENLAAVLPFGGTFDLVQLKGSTLKKAFEH
 SVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDLSRKPGDRVVKLDVLCTKCRVPSYDPLKMDEVYK
 VILPNFLANGGDGFQMIKDELLRHDSGDQDINVVSTYISKMKVIYPAVEGRIKFS (SEQ
 ID NO: 70).

Иллюстративная аминокислотная последовательность зрелого белка CD73 мыши (аминокислоты 29-551 белка под номером доступа NP_035981 базы данных GenBank) представляет собой:

WELTILHTNDVHSRLEQTSDDSTKCLNASLCVGGVARLFTKVQQIRKEEPNVFLFL
 DAGDQYQGTIWFTVYKGLEVAHFMNILGYDAMALGNHEFDNGVEGLIDPLLRNVKFPI
 LSANIKARGPLAHQISGLFLPSKVLSVGGDEVVGVGIVGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEISAL
 QPEVDKCLKTLNVNKIIALGHSGFEMDKLIAQKVRGVDIVVGGHSNTFLYTGNPPSKEVP
 AGKYPFIVTADDGRQVPVVQAYAFGKYLGYLKVEFDDKGNVITSYGNPILLNSSIPEDA
 TIKADINQWRIKLDNYSTQELGRTIVYLDGSTQTCRFRECNMGNLICDAMINNNLRHPD
 EMFWNHVSMCIVNNGGIRSPIDEKNNGTITWENLAAVLPFGGTFDLVQLKGSTLKKAFE
 HSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDINRKPWNRVVQLEVLCTKCRVPIYEPLMDKVYK
 VTLPSYLANGGDGFQMIKDELLKHDSGDQDISVVSEYISKMKVVYPAVEGRIKFS (SEQ
 ID NO: 71).

Иллюстративная аминокислотная последовательность зрелого белка CD73 яванского макака представляет собой:

WELTILHTNDVHSRLEQTSSEDSSKCVNASRCMGGVARLFTKVQQIRRAEPNVLL
 LDAGDQYQGTIWFTVYKGAEVAHFMNALRYDAMALGNHEFDNGVEGLIEPLLKEAKF
 PILSANIKAKGPLASQISGLYLPYKVLPVGDEVVGVGIVGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEIT
 ALQPEVDKCLKTLNVNKIIALGHSGFETDKLIAQKVRGVDVVVGGHSNTFLYTGNPPSKE
 VPAGKYPFIVTSDDGRKVPVVQAYAFGKYLGYLKIEFDERGNVISSHGPNILLNSSIPEDP
 SIKADINKWRIKLDNYSTQELGKTIVYLDGSSQSCRFRECNMGNLICDAMINNNLRHAD
 EMFWNHVSMCILNNGGIRSPIDERNNGTITWENLAAVLPFGGTFDLVQLKGSTLKKAFE
 HSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDLSRKPGDRVVKLDVLCTKCRVPSYDPLKMDEIYK
 VILPNFLANGGDGFQMIKDELLRHDSGDQDINVVSTYISKMKVIYPAVEGRIKFS (SEQ
 ID NO: 72).

Антитела против CD73

В данном изобретении представлены антитела против CD73, которые полезны при лечении злокачественных новообразований. Эти антитела способны связывать CD73 человека.

В некоторых случаях антитела связывают CD73 человека и CD73 яванского макака. В некоторых случаях антитела связывают CD73 человека и CD73 яванского макака, и не

связывают CD73 мыши. Такие антитела против CD73 включают в себя последовательности моноклонального антитела против CD73, CL25, и его гуманизированной версии, HzCL25, при этом гуманизированная версия связывается с высокой аффинностью как с CD73 человека, так и с CD73 яванского макака (например, меньше чем около 0,5 нМ в открытых конформациях для CD73 как человека, так и яванского макака), и имеет неопределяемое связывание с CD73 мыши.

В некоторых случаях антитела связывают CD73 человека, CD73 яванского макака и CD73 мыши. Такие антитела против CD73 включают в себя последовательности моноклонального антитела против CD73 человека, 3-F03, которое связывается с высокой аффинностью с открытой конформацией каждого из CD73 человека, яванского макака и мыши (например, около 0,37 нМ для CD73 человека, около 0,734 нМ для CD73 яванского макака и около 1,66 нМ для CD73 мыши). Такие антитела против CD73 имеют неопределяемое связывание с закрытой конформацией каждого из CD73 человека, яванского макака и мыши в присутствии излишка нерасщепляемого лиганда CD73 - АРСР.

Антитело HzCL25

Антитело HzCL25 представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG1/каппа с аланином в положении аспарагин-297 (N297, согласно нумерации ЕС) константной области тяжелой цепи для снижения эффекторной функции. Оно специфически связывает CD73 человека и яванского макака с высокой аффинностью ($K_D \leq 0,5$ нМ) и обладает низкой эффекторной функциональностью.

HzCL25 было сконструировано из химерной версии антитела CL25. Мышиные переменный домен тяжелой цепи CL25 (VH) и переменный домен легкой цепи (VL) были получены от мыши, иммунизированной рекомбинантным CD73 человека (SEQ ID NO: 70), содержащим гистидиновую метку (HIS-tag). Были определены последовательности антител В-клеток и мышиные переменный домен тяжелой цепи (VH) (SEQ ID NO: 26) и переменный домен легкой цепи (VL) (SEQ ID NO: 27) были экспрессированы в виде химер с Fc IgG1 человека (константная область тяжелой цепи, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и константная область легкой цепи каппа, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74). В таблице 1, приведенной ниже, показаны аминокислотные последовательности областей, определяющих комплементарность (CDR), CL25 в соответствии с системами нумерации IMGT, по Чотиа (Chothia), по AbM, по Кабату (Kabat) и по областям контакта. В таблице 1, приведенной ниже, также показаны аминокислотные последовательности зрелых VH и VL CL25.

Таблица 1. CDR, VH и VL CL25

	IMGT	Чотиа	AbM	Кабат	Контакт
CDR1	GYTFTSYG	GYTFTSY	GYTFTSYGL	SYGLS	TSYGLS
VH	(SEQ ID NO:	(SEQ ID NO:	S	(SEQ ID NO:	(SEQ ID NO:

	1)	7)	(SEQ ID NO: 12)	14)	16)
CDR2 VH	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 2)	YPGSGN (SEQ ID NO: 8)	EIYPGSGNT Y (SEQ ID NO: 13)	EIYPGSGNT YYNEKFKG (SEQ ID NO: 15)	WIGEIYPGS GNTY (SEQ ID NO: 28)
CDR3 VH	ARYDYLG SYGFDY (SEQ ID NO: 3)	YDYLGSSYG FDY (SEQ ID NO: 9)	YDYLGSSYG FDY (SEQ ID NO: 9)	YDYLGSSYG FDY (SEQ ID NO: 9)	ARYDYLGSS YGF (SEQ ID NO: 18)
CDR1 VL	QDVSTA (SEQ ID NO: 4)	KASQDVSTA VA (SEQ ID NO: 10)	KASQDVSTA VA (SEQ ID NO: 10)	KASQDVSTA VA (SEQ ID NO: 10)	STAVAWY (SEQ ID NO: 19)
CDR2 VL	SAS (SEQ ID NO: 5)	SASYRYN (SEQ ID NO: 29)	SASYRYN (SEQ ID NO: 29)	SASYRYN (SEQ ID NO: 29)	LLIYSASYR Y (SEQ ID NO: 20)
CDR3 VL	QQHYNTPY T (SEQ ID NO: 6)	QQHYNTPYT (SEQ ID NO: 6)	QQHYNTPYT (SEQ ID NO: 6)	QQHYNTPYT (SEQ ID NO: 6)	QQHYNTPY (SEQ ID NO: 21)
VH	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCRASGYTFTSYGLSWVKQRTGQGLEWIGEI YPGSGNTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARYDYLG SSYGFYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 26)				
VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSAS YRYNGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYNTPYTFGGGTKL EIK (SEQ ID NO: 27)				

Чтобы сконструировать HzCL25, последовательности VH и VL CL25 были выровнены с генами VH и VK человека по базе данных. CDR (таблица 1) из мышинового антитела CL25 были привиты к генам VH и VK человека.

В таблице 2, приведенной ниже, показаны аминокислотные последовательности CDR HzCL25 в соответствии с системами нумерации IMGT, по Чотиа, по AbM, по Кабату и по областям контакта. В таблице 2, приведенной ниже, также показаны аминокислотные последовательности зрелых VH, VL, тяжелой цепи и легкой цепи HzCL25.

Таблица 2. Аминокислотные последовательности CDR, VH, VL, тяжелой цепи и легкой цепи H₂CL25

	IMGT	Чотиа	AbM	Кабат	Контакт
CDR1 VH	GYTFTSYG (SEQ ID NO: 1)	GYTFTSY (SEQ ID NO: 7)	GYTFTSYGL S (SEQ ID NO: 12)	SYGLS (SEQ ID NO: 14)	TSYGLS (SEQ ID NO: 16)
CDR2 VH	IYPGSGNT (SEQ ID NO: 2)	YPGSGN (SEQ ID NO: 8)	EIYPGSGNT Y (SEQ ID NO: 13)	EIYPGSGNT YYNEKFKG (SEQ ID NO: 15)	WMGEIYPGS GNTY (SEQ ID NO: 17)
CDR3 VH	ARYDYLG SSYGFYD (SEQ ID NO: 3)	YDYLGSSYG FDY (SEQ ID NO: 9)	YDYLGSSYG FDY (SEQ ID NO: 9)	YDYLGSSYG FDY (SEQ ID NO: 9)	ARYDYLGSS YGFYD (SEQ ID NO: 18)
CDR1 VL	QDVSTA (SEQ ID NO: 4)	KASQDVSTA VA (SEQ ID NO: 10)	KASQDVSTA VA (SEQ ID NO: 10)	KASQDVSTA VA (SEQ ID NO: 10)	STAVAWY (SEQ ID NO: 19)
CDR2 VL	SAS (SEQ ID NO: 5)	SASYRYS (SEQ ID NO: 11)	SASYRYS (SEQ ID NO: 11)	SASYRYS (SEQ ID NO: 11)	LLIYSASYR Y (SEQ ID NO: 20)
CDR3 VL	QQHYNTP YT (SEQ ID NO: 6)	QQHYNTPYT (SEQ ID NO: 6)	QQHYNTPYT (SEQ ID NO: 6)	QQHYNTPYT (SEQ ID NO: 6)	QQHYNTPY (SEQ ID NO: 21)
VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFTSYGLSWVRQMPGKGLEWMGEIYPGSGNTYYNEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCYDYLGSSYGFYDWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 22)				
VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYSASYRYSQVDFRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 23)				
Тяжелая	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFTSYGLSWVRQMPGKGLEWMGEIYPGSGNTYYNEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCYDY				

цепь	LGSSYGFDYWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 24)
Легкая цепь	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVTSTAVAWYQQKPGQPPELLIYSAS YRYSQVPRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYNTPTFGGGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC (SEQ ID NO: 25)

Антитела против CD73 могут включать в себя CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, и CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из HzCL25 или CL25. В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из HzCL25 (см. таблицу 2). В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из HzCL25 (см. таблицу 2). В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из HzCL25 (см. таблицу 2), и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из HzCL25 (см. таблицу 2). В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из CL25 (см. таблицу 1). В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из CL25 (см. таблицу 1). В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из CL25 (см. таблицу 1), и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из CL25 (см. таблицу 1). В некоторых случаях антитела против CD73 могут иметь, например, 1, 2 или 3 замещения в пределах одной (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) или шести CDR из HzCL25 или CL25. В некоторых случаях антитела: (i) ингибируют клеточный CD73 (например, снижение активности клеточного CD73 по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 3); и/или (ii) ингибируют растворимый CD73 (например, снижение активности растворимого CD73 по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по

меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 4); и/или (iii) связывают CD73 человека или яванского макака в открытой конформации с высокой аффинностью (например, $K_D \leq 0,5$ нМ), но не связывают в значительной степени CD73 мыши в открытой конформации (например, как определено с помощью анализа связывания, описанного в примере 6); и/или (iv) связывают CD73 человека или яванского макака в закрытой конформации с высокой аффинностью (например, $K_D \leq 0,5$ нМ), но не связывают в значительной степени CD73 мыши в закрытой конформации; и/или (v) связываются с эпитопом в пределах аминокислот 40-53 из SEQ ID NO: 70 (т. е. в пределах TKVQQIRRAEPNVL (SEQ ID NO: 76)) (например, как определено с помощью анализа связывания, описанного в примере 6); и/или (vi) снижают АМФ-опосредованную супрессию пролиферации Т-клеток (например, снижение пролиферации Т-клеток по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 5); и/или (vii) снижают уровни CD73 на клеточной поверхности (например, на раковых клетках, например, на раковых клетках меланомы, например, по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 8); и/или (viii) уменьшают рост опухоли (например, опухолей меланом, например, по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 9); и/или (ix) снижают уровни свободного CD73 на поверхности клеток (например, раковых клеток, например, раковых клеток меланомы, например, по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 11).

Антитела против CD73 могут содержать CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из HzCL25 или CL25 согласно определению по IMGT, или согласно альтернативному определению CDR, такому как, но не ограничиваясь ими, определению по Кабату,

определению по Чотиа, определению CDR по AbM определению по областям контакта. Такие антитела против CD73 могут содержать нуль, одно, два или три замещения в CDR1 VH и/или в CDR2 VH, и/или в CDR3 VH из HzCL25 или CL25. В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 могут содержать CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из HzCL25 или CL25 согласно определению по IMGT, или согласно альтернативному определению CDR, такому как, но не ограничиваясь ими, определению по Кабату, определению по Чотиа, определению CDR по AbM определению по областям контакта. Такие антитела против CD73 могут содержать нуль, одно, два или три замещения в CDR1 VL и/или в CDR2 VL, и/или в CDR3 VL из HzCL25 или CL25. В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно. В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 7, 8 и 9, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 10, 11 и 6, соответственно. В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 12, 13 и 9, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 10, 11 и 6, соответственно. В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 14, 15 и 9, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 10, 11 и 6, соответственно. В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 16, 17 и 18, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 19, 20 и 21, соответственно. В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 7, 8 и 9, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 10, 29 и 6, соответственно. В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 12, 13 и 9, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 10, 29 и 6, соответственно. В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 14, 15 и 9, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 10, 29 и 6, соответственно. В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 16, 28 и 18, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 19, 20 и 21, соответственно. В некоторых случаях такие антитела: (i) ингибируют клеточный CD73 (например, снижение активности клеточного CD73 по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей

мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 3); и/или (ii) ингибируют растворимый CD73 (например, снижение активности растворимого CD73 по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 4); и/или (iii) связывают CD73 человека или яванского макака в открытой конформации с высокой аффинностью (например, $K_D \leq 0,5$ нМ), но не связывают в значительной степени CD73 мыши в открытой конформации (например, как определено с помощью анализа связывания, описанного в примере 6); и/или (iv) связывают CD73 человека или яванского макака в закрытой конформации с высокой аффинностью (например, $K_D \leq 0,5$ нМ), но не связывают в значительной степени CD73 мыши в закрытой конформации; и/или (v) связываются с эпитопом в пределах аминокислот 40-53 из SEQ ID NO: 70 (т. е. в пределах TKVQQIRRAEPNVL (SEQ ID NO: 76)) (например, как определено с помощью анализа связывания, описанного в примере 6); и/или (vi) снижают АМФ-опосредованную супрессию пролиферации Т-клеток (например, снижение пролиферации Т-клеток по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 5); и/или (vii) снижают уровни CD73 на клеточной поверхности (например, на раковых клетках, например, на раковых клетках меланомы, например, по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 8); и/или (viii) уменьшают рост опухоли (например, опухолей меланом, например, по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 9); и/или (ix) снижают уровни свободного CD73 на поверхности клеток (например, раковых клеток, например, раковых клеток меланомы, например, по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по

меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 11).

В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84. В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1-3, соответственно), при этом VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84. В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат тяжелую цепь, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1-3, соответственно), при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 24. В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81. В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4-6, соответственно), при этом VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81. В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности,

указанной в SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат легкую цепь, содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4-6, соответственно), при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 25. В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат: (i) аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84; и (ii) аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81. В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат: (i) содержат VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1-3, соответственно), при этом VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84; и (ii) VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4-6, соответственно), при этом VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81. В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат: (i) аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 24; и (ii) аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат: (i) содержат тяжелую цепь, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1-3, соответственно), при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную

последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 24; и (ii) легкую цепь, содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4-6, соответственно), при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 25.

В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH, указанному в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84. В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1-3, соответственно), при этом VH содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH, указанному в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84. В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL, указанному в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81. В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4-6, соответственно), при этом VL содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере

мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL, указанному в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81. В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH, указанному в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL, указанному в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81. В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат: (i) VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из H₂CL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1-3, соответственно), при этом VH содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH, указанному в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84, и (ii) VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из H₂CL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4-6, соответственно), при этом VL содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL, указанному в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81.

В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере

на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH из HzCL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 22). В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1-3, соответственно), при этом VH содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH из HzCL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 22). В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат VH, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична тяжелой цепи из HzCL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 24). В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат тяжелую цепь, содержащую VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1-3, соответственно), при этом VH содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH из HzCL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 22), при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по

меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична тяжелой цепи из HzCL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 24). В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24. В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL из HzCL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 23). В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4-6, соответственно), при этом VL содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL из HzCL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 23). В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат VL, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична легкой цепи из HzCL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 25). В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат легкую цепь, содержащую VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4-6, соответственно), при этом VL содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на

93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL из HzCL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 23), при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична легкой цепи из HzCL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 25). В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25. В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат: (i) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH из HzCL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 22); и (ii) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL из HzCL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 23). В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат: (i) VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1-3, соответственно), при этом VH содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH из HzCL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 22), и (ii) VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4-6, соответственно), при этом VL содержит аминокислотную

последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL из HzCL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 23). В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат: VH, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22, и (ii) VL, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат: (i) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична тяжелой цепи из HzCL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 24); и (ii) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична легкой цепи из HzCL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 25). В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат: (i) тяжелую цепь, содержащую VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1-3, соответственно), при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична тяжелой цепи из HzCL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 24), и (ii) легкую цепь, содержащую VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4-6, соответственно), при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична легкой цепи из HzCL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 25).

мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична легкой цепи из HzCL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 25). В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат: (i) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24, и (ii) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25.

CD73-связывающий эпитоп HzCL25 находится в пределах аминокислотной последовательности TKVQQIRRAEPNVL (SEQ ID NO: 76) (т. е. аминокислот 40-53 из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 70). В данном изобретении представлены антитела, которые связываются с CD73 в пределах последовательности TKVQQIRRAEPNVL (SEQ ID NO: 76). В данном изобретении также представлены антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и HzCL25. В данном изобретении также представлены антитела, которые конкурентно ингибируют связывание HzCL25 с CD73 человека.

В некоторых вариантах осуществления VH HzCL25 связан с константной областью тяжелой цепи, содержащей домен CH1 и шарнирный домен. В некоторых вариантах осуществления VH HzCL25 связан с константной областью тяжелой цепи, содержащей домен CH3. В некоторых вариантах осуществления в домене CH3 отсутствует С-концевой аминокислотный остаток лизина (К). В некоторых вариантах осуществления домен CH3 содержит С-концевой аминокислотный остаток лизина (К). В определенных вариантах осуществления VH HzCL25 связан с константной областью тяжелой цепи, содержащей домен CH1, шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3 из IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления в домене CH3 из IgG1 человека отсутствует С-концевой аминокислотный остаток лизина (К). В некоторых вариантах осуществления домен CH3 из IgG1 человека содержит С-концевой аминокислотный остаток лизина (К). В определенных вариантах осуществления такое антитело содержит одну или большее число мутаций в константной области тяжелой цепи, которые повышают стабильность антитела. В определенных вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит замещения, которые модифицируют свойства антитела (например, снижают связывание с рецептором Fc, повышают или снижают гликозилирование антитела, снижают связывание с C1q). В определенных вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит аланин в положении аспарагин-297 (N297, согласно нумерации ЕС) константной области тяжелой цепи для снижения эффекторной функции.

В определенных вариантах осуществления антитело против CD73 представляет собой антитело IgG. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG1. В другом варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG4. В другом варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG2. В определенных вариантах осуществления антитело против CD73 содержит константную

область тяжелой цепи, в которой отсутствуют один или большее число аминокислотных остатков лизина (K) относительно константной области тяжелой цепи дикого типа. Например, в определенных вариантах осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи, в которой отсутствует С-концевой аминокислотный остаток лизина (K) в домене СН3 константной области тяжелой цепи. В определенных вариантах осуществления антитело против CD73 содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 73. В определенных вариантах осуществления антитело против CD73 содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 75. В определенных вариантах осуществления антитело против CD73 содержит константную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 74. В определенных вариантах осуществления антитело против CD73 содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 73, константную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 74. В определенных вариантах осуществления антитело против CD73 содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 75, константную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 74.

Антитело 3-F03

Антитело 3-F03 представляет собой моноклональное антитело IgG1/каппа человека с аланином в положении аспарагин-297 (N297, согласно нумерации ЕС) константной области тяжелой цепи для снижения эффекторной функции. 3-F03 специфически связывает CD73 человека, яванского макака и мыши с высокой аффинностью ($K_D \leq 2$ нМ), и обладает низкой эффекторной функциональностью.

3-F03 было сконструировано из последовательностей, полученных в результате нескольких раундов отбора из одной донорской библиотеки. Кассеты scFv из этого пула затем рекомбинировали в библиотеку векторов дрожжевого дисплея, которую подвергали отбору с помощью FACs с использованием CD73 мыши (SEQ ID NO: 71). Аминокислотные последовательности дрожжевой кассеты scFv 3-F03 указаны в SEQ ID NO: 77 и 65, соответственно:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMS
YDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQ
GTLVTVSS (SEQ ID NO: 77); и

AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQ
SGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ ID NO:
65).

Чтобы сконструировать антитело 3-F03, дрожжевые VH и VL 3-F03 модифицировали следующим образом и клонировали в каркас IgG1/каппа человека. Для получения VH удаляли N-концевой глутамат (E) дрожжевого VH 3-F03 (SEQ ID NO: 77), а

треонин (Т) в положении Н77 по Кабату из SEQ ID NO: 77 (т. е. положение 78 в SEQ ID NO:77) замещали аланином (А). Для получения VL удаляли N-концевой аланин (А) из SEQ ID NO: 65. Полученное в результате полноразмерное антитело 3-F03 человека содержит VH и VL, указанные в аминокислотных последовательностях SEQ ID NO: 60 и 61, соответственно. Полученное в результате полноразмерное антитело 3-F03 человека указано в данном документе как «3-F03». В таблице 3, приведенной ниже, показаны аминокислотные последовательности CDR 3-F03 в соответствии с системами нумерации IMGT, по Чотиа, по AbM, по Кабату и по областям контакта. В таблице 3, приведенной ниже, также показаны аминокислотные последовательности зрелых VH, VL, тяжелой цепи и легкой цепи 3-F03.

Таблица 3. Аминокислотные последовательности CDR, VH и VL 3-F03

	IMGT	Чотиа	AbM	Кабат	Контакт
CDR1 VH	GFTFSSYD (SEQ ID NO: 34)	GFTFSSY (SEQ ID NO: 41)	GFTFSSYDM H (SEQ ID NO: 46)	SYDMH (SEQ ID NO: 49)	SSYDMH (SEQ ID NO: 53)
CDR2 VH	MSYDGSNK (SEQ ID NO: 35)	SYDGSN (SEQ ID NO: 42)	VMSYDGSN KY (SEQ ID NO: 47)	VMSYDGSN KYYADSVK G (SEQ ID NO: 50)	WVAVMSYD GSNKY (SEQ ID NO: 54)
CDR3 VH	ATEIAAKG DY (SEQ ID NO: 36)	EIAAKGDY (SEQ ID NO: 52)	EIAAKGDY (SEQ ID NO: 52)	EIAAKGDY (SEQ ID NO: 52)	ATEIAAKGD (SEQ ID NO: 56)
CDR1 VL	QGISNY (SEQ ID NO: 37)	RASQGISNY LA (SEQ ID NO: 44)	RASQGISNY LA (SEQ ID NO: 44)	RASQGISNY LA (SEQ ID NO: 44)	SNYLAWY (SEQ ID NO: 57)
CDR2 VL	AAS (SEQ ID NO: 38)	AASTLQS (SEQ ID NO: 45)	AASTLQS (SEQ ID NO: 45)	AASTLQS (SEQ ID NO: 45)	LLIYAASTL Q (SEQ ID NO: 58)
CDR3 VL	QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39)	QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39)	QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39)	QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39)	QQSYSTP (SEQ ID NO: 59)
VH	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALY LQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 60)				
VL	IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCCQQSYSTPHFGQGTRLEIK				

	IMGT	Чотиа	AbM	Кабат	Контакт
	(SEQ ID NO: 61)				
HC	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVM SYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMN SLRAEDTAVYYCATEIAA KGDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 66)				
LC	IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO: 31)				

Варианты 3-F03 также описаны в данном документе. 3-F03_411 идентичен 3-F03, за исключением того, что тяжелая цепь 3-F03_411: (i) содержит N-концевой глутамат (E), который отсутствует в 3-F03, и (ii) не содержит C-концевой лизин, присутствующий в 3-F03. В таблице 4, приведенной ниже, показаны аминокислотные последовательности зрелых VH, VL, тяжелой цепи и легкой цепи 3-F03_411. 3-F03_413 идентичен 3-F03_411, за исключением того, что он содержит глутамат (E) в положении H53 VH по Кабату (положение 54 в SEQ ID NO: 60) вместо аспарагиновой кислоты (D). В таблице 5, приведенной ниже, показаны аминокислотные последовательности CDR 3-F03_413 в соответствии с системами нумерации IMGT, по Чотиа, по AbM, по Кабату и по областям контакта. В таблице 5, приведенной ниже, также показаны аминокислотные последовательности зрелых VH, VL, тяжелой цепи и легкой цепи 3-F03_413. Дополнительные варианты описаны в приведенных ниже примерах (см. **фиг. 21A - фиг. 21J**).

Таблица 4. Аминокислотные последовательности HC и LC 3-F03_411

	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVA VMSYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMN SLRAEDTAVYYCAT EIAAKGDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 62)
VL	IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEI

	K (SEQ ID NO: 61)
Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVA VMSYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCAT EIAAKGDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 30)
Легкая цепь	IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO: 31)

Таблица 5. Аминокислотные последовательности CDR, VH, VL, HC, LC 3-F03_413

	IMGT	Чотиа	AbM	Кабат	Контакт
CDR1 VH	GFTFSSYD (SEQ ID NO: 34)	GFTFSSY (SEQ ID NO: 41)	GFTFSSYDM H (SEQ ID NO: 46)	SYDMH (SEQ ID NO: 49)	SSYDMH (SEQ ID NO: 53)
VH CDR2	MSYEGSNK (SEQ ID NO: 40)	SYEGSN (SEQ ID NO: 43)	VMSYEGSN KY (SEQ ID NO: 48)	VMSYEGSN KYYADSVK G (SEQ ID NO: 51)	WVAVMSYE GSNKY (SEQ ID NO: 55)
CDR3 VH	ATEIAAKG DY (SEQ ID NO: 36)	EIAAKGDY (SEQ ID NO: 52)	EIAAKGDY (SEQ ID NO: 52)	EIAAKGDY (SEQ ID NO: 52)	ATEIAAKGD (SEQ ID NO: 56)
CDR1 VL	QGISNY (SEQ ID NO: 37)	RASQGISNY LA (SEQ ID NO: 44)	RASQGISNY LA (SEQ ID NO: 44)	RASQGISNY LA (SEQ ID NO: 44)	SNYLAWY (SEQ ID NO: 57)
CDR2 VL	AAS (SEQ ID NO: 38)	AASTLQS (SEQ ID NO: 45)	AASTLQS (SEQ ID NO: 45)	AASTLQS (SEQ ID NO: 45)	LLIYAASTL Q (SEQ ID NO: 58)

	IMGT	Чотиа	AbM	Кабат	Контакт
CDR3 VL	QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39)	QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39)	QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39)	QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39)	QQSYSTP (SEQ ID NO: 59)
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAV MSYEGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALY LQMNSLRAEDTAVYYCATEIA AKGDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 63)				
VL	IQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGRLEIK (SEQ ID NO: 61)				
HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAV MSYEGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALY LQMNSLRAEDTAVYYCATEIA AKGDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPK SNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 33)				
LC	IQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGRLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQEQ SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEE C (SEQ ID NO: 31)				

Антитела против CD73 могут включать в себя CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, и CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03 или 3-F03_413. В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03 (см. таблицу 3). В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03 (см. таблицу 3). В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03 (см. таблицу 3), и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03 (см. таблицу 3). В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03_413 (см. таблицу 5). В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03_413 (см. таблицу 5). В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03_413 (см. таблицу 5), и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и

CDR3 VL из 3-F03_413 (см. таблицу 5). В некоторых случаях антитела против CD73 могут иметь, например, 1, 2 или 3 замещения в пределах одной (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) или шести CDR из 3-F03 или 3-F03_413. В некоторых случаях такие антитела: (i) ингибируют клеточный CD73 (например, снижение активности клеточного CD73 по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 15); и/или (ii) ингибируют растворимый CD73 (например, снижение активности растворимого CD73 по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 16); и/или (iii) связывают CD73 человека, яванского макака или мыши в открытой конформации с высокой аффинностью (например, $K_D \leq 2$ нМ) (например, как определено с помощью анализа связывания, описанного в примере 18); и/или (iv) не связывают CD73 человека, яванского макака и мыши в закрытой конформации; и/или (v) связываются с эпитопом в пределах аминокислот 386-399 из SEQ ID NO: 70 (т.е. в пределах AAVLPFGGTFDLVQ (SEQ ID NO: 78), аминокислот 470-489 из SEQ ID NO: 70 (т.е. в пределах ILPNFLANGGDFQMIKDEL (SEQ ID NO: 79)) (например, как определено с помощью анализа связывания, описанного в примере 6); и/или (vi) снижают АМФ-опосредованную супрессию пролиферации Т-клеток (например, снижение пролиферации Т-клеток по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 17); и/или (vii) снижают уровни CD73 на клеточной поверхности (например, на раковых клетках, например, на раковых клетках меланомы, например, по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 20); и/или (viii) уменьшают рост опухоли (например, опухолей меланом, например, по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на

97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 21).

Антитела против CD73 могут содержать CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03 или 3-F03_413 согласно определению по IMGT, или согласно альтернативному определению CDR, такому как, но не ограничиваясь ими, определению по Кабату, определению по Чотиа, определению CDR по AbM определению по контактирующим областям. Такие антитела против CD73 могут содержать нуль, одно, два или три замещения в CDR1 VH и/или в CDR2 VH, и/или в CDR3 VH из 3-F03 или 3-F03_413. В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 могут содержать CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03 или 3-F03_413 согласно определению по IMGT, или согласно альтернативному определению CDR, такому как, но не ограничиваясь ими, определению по Кабату, определению по Чотиа, определению CDR по AbM определению по областям контакта. Такие антитела против CD73 могут содержать нуль, одно, два или три замещения в CDR1 VL и/или в CDR2 VL, и/или в CDR3 VL из 3-F03 или 3-F03_413. В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 34, 35 и 36, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 37, 38 и 39, соответственно. В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 41, 42 и 52, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 44, 45 и 39, соответственно. В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 46, 47 и 52, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 44, 45 и 39, соответственно. В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 49, 50 и 52, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 44, 45 и 39, соответственно. В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 53, 54 и 56, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 57, 58 и 59, соответственно. В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 34, 40 и 36, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 37, 38 и 39, соответственно. В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 41, 43 и 52, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 44, 45 и 39, соответственно. В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 46, 48 и 52, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 44, 45 и 39, соответственно. В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 49, 51 и 52, соответственно, и VL, содержащий

CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 44, 45 и 39, соответственно. В некоторых случаях антитело против CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 53, 55 и 56, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 57, 58 и 59, соответственно. В некоторых случаях такие антитела: (i) ингибируют клеточный CD73 (например, снижение активности клеточного CD73 по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 15); и/или (ii) ингибируют растворимый CD73 (например, снижение активности растворимого CD73 по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 16); и/или (iii) связывают CD73 человека, яванского макака или мыши в открытой конформации с высокой аффинностью (например, $K_D \leq 2$ нМ) (например, как определено с помощью анализа связывания, описанного в примере 18); и/или (iv) не связывают CD73 человека, яванского макака и мыши в закрытой конформации; и/или (v) связываются с эпитопом в пределах аминокислот 386-399 из SEQ ID NO: 70 (т.е. в пределах AAVLPFGGTFDLVQ (SEQ ID NO: 78), аминокислот 470-489 из SEQ ID NO: 70 (т.е. в пределах ILPNFLANGGDGFQMIKDEL (SEQ ID NO: 79)) например, как определено с помощью анализа связывания, описанного в примере 6); и/или (vi) снижают АМФ-опосредованную супрессию пролиферации Т-клеток (например, снижение пролиферации Т-клеток по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 17); и/или (vii) снижают уровни CD73 на клеточной поверхности (например, на раковых клетках, например, на раковых клетках меланомы, например, по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 20); и/или (viii) уменьшают рост опухоли (например, опухолей меланом, например, по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по

меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 21).

В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88. В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03 или его варианта (например, 3-F03_411 или 3-F03_413) (см., например, таблицу 3 и таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34-36, соответственно, или в SEQ ID NO: 34, 40 и 36, соответственно), при этом VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88. В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 30, 33 и 66. В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат тяжелую цепь, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03 или его варианта (например, 3-F03_411 или 3-F03_413) (см., например, таблицу 3 и таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34-36, соответственно, или в SEQ ID NO: 34, 40 и 36, соответственно), при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 30, 33 и 66. В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03 или его варианта (например, 3-F03_411 или 3-F03_413) (см., например, таблицу 3 и таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно), при этом VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число

(например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат легкую цепь, содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03 или его варианта (например, 3-F03_411 или 3-F03_413) (см., например, таблицу 3 и таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно), при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31. В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат: (i) аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88; и (ii) аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат: (i) VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03 или его варианта (например, 3-F03_411 или 3-F03_413) (см., например, таблицу 3 и таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34-36, соответственно, или SEQ ID NO: 34, 40 и 36, соответственно), при этом VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88; и (ii) VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03 или его варианта (например, 3-F03_411 или 3-F03_413) (см., например, таблицу 3 и таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно), при этом VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат: (i) аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,

10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 30, 33 и 66; и (ii) аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат: (i) тяжелую цепь, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03 или его варианта (например, 3-F03_411 или 3-F03_413) (см., например, таблицу 3 и таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34-36, соответственно, или SEQ ID NO: 34, 40 и 36, соответственно), при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 30, 33 и 66; и (ii) легкую цепь, содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03 или его варианта (например, 3-F03_411 или 3-F03_413) (см., например, таблицу 3 и таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно), при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31.

В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH, указанному в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88. В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03 или его варианта (например, 3-F03_411 или 3-F03_413) (см., например, таблицу 3 и таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34-36, соответственно, или в SEQ ID NO: 34, 40 и 36, соответственно), при этом VH содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH, указанному в любой из последовательностей с

SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88. В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL, указанному в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03 или его варианта (например, 3-F03_411 или 3-F03_413) (см., например, таблицу 3 и таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно), при этом VL содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL, указанному в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH, указанному в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88, и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL, указанному в SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат: (i) VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03 или его варианта (например, 3-F03_411 или 3-F03_413) (см., например, таблицу 3 и таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34-36, соответственно, или в SEQ ID NO: 34, 40 и 36, соответственно), при этом VH содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL, указанному в SEQ ID NO: 61, 64 и 65.

мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH, указанному в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88, и (ii) VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03 или его варианта (например, 3-F03_411 или 3-F03_413) (см., например, таблицу 3 и таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно), при этом VL содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL, указанному в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 61, 64 и 65.

В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH из 3-F03_411 или 3-F03_413 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 62 или 63, соответственно). В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03_411 (см. таблицу 3, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34-36, соответственно), при этом VH содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH из 3-F03_411 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 62). В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03_413 (см. таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34, 40 и 36, соответственно), при этом VH содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере

мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH из 3-F03_411 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 63). В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат VH, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат VH, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична тяжелой цепи из 3-F03_411 или 3-F03_F13 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 30 или 33, соответственно). В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат тяжелую цепь, содержащую VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03_411 (см. таблицу 3, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34-36, соответственно), при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична тяжелой цепи из 3-F03_411 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 30). В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат тяжелую цепь, содержащую VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03_413 (см. таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34, 40 и 36, соответственно), при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична тяжелой цепи из 3-F03_413 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 33). В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность,

указанную в SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33. В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL из 3-F03_411 или 3-F03_413 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 61). В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03_411 или 3-F03_413 (см. таблицу 3, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно), при этом VL содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL из 3-F03_411 или 3-F03_413 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 61). В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат VL, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична легкой цепи из 3-F03_411 или 3-F03_413 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31). В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат легкую цепь, содержащую VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03_411 или 3-F03_413 (см. таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно), при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична легкой цепи из 3-F03_411 или 3-F03_413 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31).

мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична легкой цепи из 3-F03_411 или 3-F03_413 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31). В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31. В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH из 3-F03_411 или 3-F03_413 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 62 или 63, соответственно), и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL из 3-F03_411 или 3-F03_413 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 61). В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат: (i) VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03_411 (см. таблицу 3, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34-36, соответственно), при этом VH содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH из 3-F03 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 62), и (ii) VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03_411 (см. таблицу 3, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно), при этом VL содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL из 3-F03 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 61). В определенных вариантах осуществления антитела против CD73 содержат: (i) VH,

содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03_413 (см. таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34, 40 и 36, соответственно), при этом VH содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH из 3-F03_413 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 63), и (ii) VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03_413 (см. таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно), при этом VL содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL из 3-F03_413 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 61).

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD73 содержит: (i) VH, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 62; и (ii) VL, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD73 содержит: (i) VH, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 63; и (ii) VL, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична тяжелой цепи из 3-F03_411 или 3-F03_413 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 30 или 33), и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична легкой цепи из 3-F03_411 или 3-F03_413 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31). В некоторых

вариантах осуществления антитела против CD73 содержат: (i) тяжелую цепь, содержащую VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03_411(см. таблицу 3, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34-36, соответственно), при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична тяжелой цепи из 3-F03_411 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 30), и (ii) легкую цепь, содержащую VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03_411 (см. таблицу 3, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно), при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична легкой цепи из 3-F03 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31). В некоторых вариантах осуществления антитела против CD73 содержат: (i) тяжелую цепь, содержащую VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03_413 (см. таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34, 40 и 36, соответственно), при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична тяжелой цепи из 3-F03 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 33), и (ii) легкую цепь, содержащую VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03_413 (см. таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно), при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична легкой цепи из 3-F03 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31).

мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична легкой цепи из 3-F03_413 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31). В некоторых вариантах осуществления антитело против CD73 содержит: (i) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30; и (ii) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD73 содержит: (i) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33; и (ii) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31.

CD73-связывающий эпитоп 3-F03 (и его вариантов, например, 3-F03_411 и 3-F03_413) содержит AAVLPFGGTFDLVQ (SEQ ID NO: 78) (т. е. аминокислоты 386-399 из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 70) и ILPNFLANGGDGFQMIKDEL (SEQ ID NO: 79) (т. е. аминокислоты 470-489 из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 70). В данном изобретении представлены антитела, которые связываются с CD73 в эпитопе в пределах последовательностей AAVLPFGGTFDLVQ (SEQ ID NO: 78) и ILPNFLANGGDGFQMIKDEL (SEQ ID NO: 79). В данном изобретении представлены антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и 3-F03 (или его вариант, например, 3-F03_411 или 3-F03_413). В данном изобретении также представлены антитела, которые конкурентно ингибируют связывание 3-F03 (или его варианта, например, 3-F03_411 или 3-F03_413) с CD73 человека.

В некоторых вариантах осуществления VH 3-F03 (или его вариант, например, 3-F03_411 или 3-F03_413) связан с константной областью тяжелой цепи, содержащей домен CH1 и шарнирный домен. В некоторых вариантах осуществления VH 3-F03 (или его варианта, например, 3-F03_411 или 3-F03_413) связан с константной областью тяжелой цепи, содержащей домен CH3. В некоторых вариантах осуществления в домене CH3 отсутствует С-концевой аминокислотный остаток лизина (К). В некоторых вариантах осуществления домен CH3 содержит С-концевой аминокислотный остаток лизина (К). В определенных вариантах осуществления VH 3-F03 (или его варианта, например, 3-F03_411 или 3-F03_413) связан с константной областью тяжелой цепи, содержащей домен CH1, шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3 из IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления в домене CH3 из IgG1 человека отсутствует С-концевой аминокислотный остаток лизина (К). В некоторых вариантах осуществления домен CH3 из IgG1 человека содержит С-концевой аминокислотный остаток лизина (К). В определенных вариантах осуществления такое антитело содержит одну или большее число мутаций в константной области тяжелой цепи, которые повышают стабильность антитела. В определенных вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит замещения, которые модифицируют свойства антитела (например, снижают связывание с рецептором Fc, повышают или снижают гликозилирование антитела, снижают связывание с C1q). В определенных вариантах осуществления константная

область тяжелой цепи содержит аланин (А) в положении аспарагин-297 (N297, согласно нумерации ЕС) константной области тяжелой цепи для снижения эффекторной функции.

В определенных вариантах осуществления антитело против CD73 представляет собой антитело IgG. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG1. В другом варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG4. В определенном варианте осуществления антитело против CD73 содержит константную область тяжелой цепи, в которой отсутствуют один или большее число аминокислотных остатков лизина (К) относительно константной области тяжелой цепи дикого типа. Например, в определенных вариантах осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи, в которой отсутствует С-концевой аминокислотный остаток лизина (К) в домене СН3 константной области тяжелой цепи. В определенных вариантах осуществления антитело против CD73 содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 73. В определенных вариантах осуществления антитело против CD73 содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 75. В определенных вариантах осуществления антитело против CD73 содержит константную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 74. В определенных вариантах осуществления антитело против CD73 содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 73, константную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 74. В определенных вариантах осуществления антитело против CD73 содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 75, константную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 74.

Фрагменты антител

В некоторых случаях антитело против CD73 представляет собой фрагмент антитела. Фрагменты описанных антител, описанных в данном документе, (например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc и Fv) можно получать путем протеолитического расщепления интактных антител. Например, фрагменты антител можно получать путем обработки целого антитела ферментом, таким как папаин, пепсин или плазмин. Расщепление целых антител папаином приводит к образованию фрагментов F(ab)₂ или Fab; расщепление целых антител пепсином приводит к образованию F(ab')₂ или Fab'; а расщепление целых антител плазмином приводит к образованию фрагментов Fabc.

В качестве альтернативы фрагменты антител можно получать рекомбинантно. Например, нуклеиновые кислоты, кодирующие фрагменты антител, представляющие интерес, можно сконструировать, ввести в вектор экспрессии и экспрессировать в подходящих клетках-хозяевах. См., например, работы Co, M.S. et al., J. Immunol., 152:2968-2976 (1994); Better, M. and Horwitz, A.H., Methods in Enzymology, 178:476-496

(1989); Plueckthun, A. and Skerra, A., *Methods in Enzymology*, 178:476-496 (1989); Lamoyi, E., *Methods in Enzymology*, 121:652-663 (1989); Rousseaux, J. et al., *Methods in Enzymology*, (1989) 121:663-669 (1989); and Bird, R.E. et al., *TIBTECH*, 9:132-137 (1991)). Фрагменты антител могут экспрессироваться в *E. Coli* и секретироваться из нее, что позволяет легко получать большое количество указанных фрагментов. Фрагменты антител можно выделять из фаговых библиотек антител. В качестве альтернативы фрагменты Fab'-SH можно непосредственно выделять из *E. coli* и химически соединять с образованием фрагментов $F(ab)_2$ (Carter et al., *Bio/Technology*, 10:163-167 (1992)). Согласно другому подходу фрагменты $F(ab')_2$ можно непосредственно выделять из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Фрагменты Fab и $F(ab')_2$ с увеличенным периодом полужизни *in vivo*, содержащие остатки эпитопа связывания рецептора реутилизации, описаны в патенте США № 5869046.

Миниантитела

В некоторых случаях антитело против CD73 представляет собой миниантитело. Миниантитела антител против CD73 включают в себя диатела, одноцепочечные (scFv) и одноцепочечные $(Fv)_2$ (sc(Fv) $_2$) антитела.

«Диатело» представляет собой бивалентное миниантитело, сконструированное путем слияния генов (см., например, Holliger, P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90:6444-6448 (1993); EP 404097; WO 93/11161). Диатела представляют собой димеры, состоящие из двух полипептидных цепей. Домены VL и VH каждой полипептидной цепи диатела связаны линкерами. Число аминокислотных остатков, которые образуют линкер, может составлять от 2 до 12 остатков (например, 3-10 остатков, или пять, или около пяти остатков). Линкеры полипептидов в диателе, как правило, слишком короткие, чтобы позволить VL и VH связываться друг с другом. Следовательно, VL и VH, кодируемые в одной и той же полипептидной цепи, не могут образовывать одноцепочечный фрагмент варибельной области, а вместо этого образуют димер с другим одноцепочечным фрагментом варибельной области. Вследствие этого диатело имеет два антигенсвязывающих сайта.

scFv представляет собой одноцепочечное полипептидное антитело, полученное путем связывания VH и VL с линкером (см., например, работы Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85: 5879-5883 (1988); и Plickthun, "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol.113, Ed Resenbarg and Moore, Springer Verlag, New York, pp. 269-315, (1994)). Порядок соединения VH и VL не ограничен особым образом, и они могут быть расположены в любом порядке. Примеры порядков расположения включают в себя: [VH] линкер [VL]; или [VL] линкер [VH]. Варибельный домен тяжелой цепи и варибельный домен легкой цепи в scFv можно получить из любого антитела против CD73, описанного в данном документе.

sc(Fv) $_2$ представляет собой миниантитело, в котором два VH и два VL связаны линкером с образованием одной цепи (Hudson, et al., *J. Immunol. Methods*, (1999) 231: 177-189 (1999)). sc(Fv) $_2$ можно получить, например, путем соединения scFv-фрагментов с

линкером. $sc(Fv)_2$ согласно данному изобретению включает в себя антитела, предпочтительно - в которых два VH и два VL расположены в порядке: VH, VL, VH и VL ([VH] линкер [VL] линкер [VH] линкер [VL]), начиная с N-конца одноцепочечного полипептида; тем не менее, порядок двух VH и двух VL не ограничивается вышеуказанным порядком расположения, и они могут быть расположены в любом порядке.

Биспецифические антитела

В некоторых случаях антитело против CD73 представляет собой биспецифическое антитело. Биспецифические антитела представляют собой антитела, которые обладают специфичностью связывания с по меньшей мере двумя различными эпитопами. Иллюстративные биспецифические антитела могут связываться с двумя различными эпитопами белка CD73. Другие такие антитела могут объединять в себе сайт связывания CD73 с сайтом связывания другого белка. Биспецифические антитела можно получить в виде полноразмерных антител или их низкомолекулярных форм (например, биспецифические антитела $F(ab')_2$, биспецифические антитела $sc(Fv)_2$, биспецифические антитела - диатела).

Классическое получение полноразмерных биспецифических антител основано на коэкспрессии двух пар легкая цепь/тяжелая цепь иммуноглобулина, при этом две цепи имеют разную специфичность (Millstein et al., Nature, 305: 537-539 (1983)). В другом подходе варьируемые домены антител с желаемой специфичностью связывания сливают с последовательностями константных доменов иммуноглобулинов. ДНК, кодирующие слитые структуры тяжелой цепи иммуноглобулина и, если желательно, легкой цепи иммуноглобулина, вставляют в отдельные векторы экспрессии и совместно трансфицируют в подходящую клетку-хозяина. Это обеспечивает повышенную гибкость в регулировании пропорций трех полипептидных фрагментов. Тем не менее, возможно вставить кодирующие последовательности для двух или для всех трех полипептидных цепей в один вектор экспрессии, когда экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных соотношениях приводит к высоким выходам.

Согласно другому подходу, описанному в патенте США № 5731168, между парой молекул антител можно сконструировать поверхность взаимодействия таким образом, чтобы максимизировать процент гетеродимеров, получаемых из культуры рекомбинантных клеток. Предпочтительная поверхность взаимодействия содержит по меньшей мере часть домена СН3. В данном способе одну или большее число малых боковых цепей аминокислот с поверхности взаимодействия первой молекулы антитела заменяют более крупными боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). На поверхность взаимодействия второй молекулы антитела создают компенсационные «полости», имеющие размер, идентичный или сходный с размером большой (-их) боковой (-ых) цепи (цепей), путем замены больших аминокислотных боковых цепей меньшими (например, аланином или треонином). Это обеспечивает механизм увеличения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими

как гомодимеры.

Биспецифические антитела включают в себя перекрестно-сшитые или «гетероконъюгатные» антитела. Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть связано с авидином, другое - с биотином. Гетероконъюгатные антитела можно получать с применением любых подходящих способов перекрестного сшивания.

Технология «диатела» обеспечивает альтернативный механизм для получения биспецифических фрагментов антител. Фрагменты содержат VH, соединенный с VL посредством линкера, который является слишком коротким, чтобы позволить соединение между двумя доменами на одной цепи. Соответственно, домены VH и VL одного фрагмента вынуждены соединяться с комплементарными доменами VL и VH другого фрагмента, тем самым образуя два антигенсвязывающих участка.

Поливалентные антитела

В некоторых случаях антитело против CD73 представляет собой поливалентное антитело. Поливалентное антитело может быть интернализовано (и/или катаболизировано) клеткой, экспрессирующей антиген, с которым связываются антитела, быстрее, чем бивалентное антитело. Антитела, описанные в данном документе, могут представлять собой поливалентные антитела с тремя или большим числом антигенсвязывающих сайтов (например, четырехвалентные антитела), которые можно легко получить путем рекомбинантной экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидные цепи антитела. Поливалентное антитело может содержать домен димеризации и три или большее число антигенсвязывающих сайтов. Иллюстративный домен димеризации содержит (или состоит из) область Fc и шарнирную область. Поливалентное антитело может содержать (или состоять из) от трех до около восьми (например, четырех) антигенсвязывающих сайтов. Поливалентное антитело необязательно содержит по меньшей мере одну полипептидную цепь (например, по меньшей мере две полипептидные цепи), при этом полипептидная (-ые) цепь (цепи) содержит (-ат) два или большее число переменных доменов. Например, полипептидная (-ые) цепь (цепи) может (могут) содержать VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, где VD1 представляет собой первый переменный домен, VD2 представляет собой второй переменный домен, Fc представляет собой полипептидную цепь области Fc, X1 и X2 представляют собой аминокислоту или пептидный спейсер, а n равно 0 или 1.

Конъюгированные антитела

В некоторых случаях антитело против CD73 представляет собой конъюгированное антитело. Антитела, описанные в данном документе, могут представлять собой конъюгированные антитела, которые связаны с различными молекулами, включая макромолекулярные вещества, такие как полимеры (например, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полиэтиленимин (ПЭИ), модифицированный ПЭГ (ПЭИ-ПЭГ), сополимеры полиглутаминовой кислоты (ПГА) и N-2-гидроксипропилметакриламида (ГПМА), гиалуроновая кислота, радиоактивные материалы (например, ⁹⁰Y, ¹³¹I), флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества, гаптены, ферменты, хелаты металлов,

лекарственные вещества и токсины (например, калихеамицин, экзотоксин А *Pseudomonas*, рицин (например, дегликозилированная цепь рицина А)).

В одном варианте осуществления, чтобы улучшить цитотоксическое действие антител против CD73 и, следовательно, их терапевтическую эффективность, антитела конъюгируют с высокотоксичными веществами, включая радиоизотопы и цитотоксические агенты. Эти конъюгаты могут избирательно доставлять токсическую нагрузку к месту-мишени (т. е. к клеткам, экспрессирующим антиген, распознающийся антителом), в то время как клетки, которые не распознаются антителом, сохраняются. Чтобы свести к минимуму токсичность, конъюгаты, как правило, конструируют на основе молекул с коротким периодом полужизни в сыворотке крови (следовательно, применяют мышинные последовательности, и изотипы IgG3 или IgG4).

В определенных вариантах осуществления антитело против CD73 модифицируют фрагментом, который улучшает его стабилизацию и/или удержание в циркуляции, например, в крови, сыворотке крови или других тканях, например, по меньшей мере в 1,5, 2, 5, 10 или 50 раз. Например, антитело против CD73 может быть связано (например, конъюгировано) с полимером, например, по существу неантигенным полимером, таким как полиалкиленоксид или полиэтиленоксид. Подходящие полимеры существенно различаются по массе. Можно применять полимеры со средней молекулярной массой в диапазоне от около 200 до около 35000 Дальтон (или от около 1000 до около 15000 и от 2000 до около 12500). Например, антитело против CD73 может быть конъюгировано с водорастворимым полимером, например, гидрофильным поливиниловым полимером, например, поливиниловым спиртом или поливинилпирролидоном. Примеры таких полимеров включают в себя гомополимеры полиалкиленоксида, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ) или полипропиленгликоли, полиоксиэтилированные полиолы, их сополимеры и их блок-сополимеры, при условии, что сохраняется растворимость таких блок-сополимеров в воде. Дополнительные полезные полимеры включают в себя полиоксиалкилены, такие как полиоксиэтилен, полиоксипропилен, и блок-сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена; полиметакрилаты; карбомеры; и разветвленные или неразветвленные полисахариды.

Описанные выше конъюгированные антитела можно получать путем выполнения химических модификаций антител, соответственно, или их низкомолекулярных форм, описанных в данном документе. Способы модификации антител хорошо известны в данной области техники (например, US 5057313 и US 5156840).

Способы получения антител

Антитела могут продуцироваться в бактериальных или эукариотических клетках. Некоторые антитела, например, Fab, могут продуцироваться в бактериальных клетках, например, в клетках *E. coli*. Антитела также могут продуцироваться в эукариотических клетках, таких как трансформированные клеточные линии (например, CHO, 293E, COS). В дополнение к этому, антитела (например, scFv) могут экспрессироваться в дрожжевой клетке, такой как *Pichia* (см., например, работу Powers et al., *J Immunol Methods*. 251: 123-

35 (2001)), *Hanseula* или *Saccharomyces*. Для получения антитела, представляющего интерес, конструируют полинуклеотид, кодирующий антитело, вводят его в вектор экспрессии и затем экспрессируют его в подходящих клетках-хозяевах. Для подготовки рекомбинантного вектора экспрессии, трансфекции клеток-хозяев, отбора трансформантов, культивирования клеток-хозяев и выделения антитела применяют стандартные методики молекулярной биологии.

Если антитело должно экспрессироваться в бактериальных клетках (например, *E. coli*), вектор экспрессии должен обладать характеристиками, которые позволяют амплифицировать вектор в бактериальных клетках. В дополнение к этому, если в качестве хозяина применяют такую *E. coli*, как JM109, DH5 α , HB101 или XL1-Blue, вектор должен иметь промотор, например, промотор *lacZ* (Ward et al., 341: 544-546 (1989), промотор *agaV* (Better et al., *Science*, 240: 1041-1043 (1988)) или промотор T7, который может обеспечить эффективную экспрессию в *E. coli*. Примеры таких векторов включают в себя, например, векторы серий M13, векторы серий pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script, pGEX-5X-1 (Pharmacia), систему «QIAexpress» (QIAGEN), pEGFP и pET (когда применяют данный вектор экспрессии, хозяином, предпочтительно, является BL21, экспрессирующая РНК-полимеразу T7). Вектор экспрессии может содержать сигнальную последовательность для секреции антитела. Для продуцирования в периплазму *E. Coli* можно применять сигнальную последовательность *pelB* (Lei et al., *J. Bacteriol.*, 169: 4379 (1987)) в качестве сигнальной последовательности для секреции антитела. Для бактериальной экспрессии можно применять способы с использованием хлорида кальция или способы электропорации для введения вектора экспрессии в бактериальную клетку.

Если антитело должно экспрессироваться в клетках животных, таких как клетки CHO, COS и NIH3T3, вектор экспрессии включает в себя промотор, необходимый для экспрессии в указанных клетках, например, промотор SV40 (Mulligan et al., *Nature*, 277: 108 (1979)), промотор MMLV-LTR, промотор EF1 α (Mizushima et al., *Nucleic Acids Res.*, 18: 5322 (1990)) или промотор CMV. В дополнение к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноглобулин или его домен, рекомбинантные векторы экспрессии могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации), и гены селективируемых маркеров. Ген селективируемого маркера облегчает отбор клеток-хозяев, в которые был введен данный вектор (см., например, патенты США № 4399216, 4634665 и 5179017). Например, ген селективируемого маркера, как правило, придает устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, клетке-хозяину, в которую был введен данный вектор. Примеры векторов с селективируемыми маркерами включают в себя pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV и pOP13.

В одном варианте осуществления антитела продуцируются в клетках млекопитающих. Иллюстративные клетки-хозяева, происходящие из млекопитающих, для экспрессии антитела включают в себя клетки яичника китайского хомяка (клетки CHO)

(включая клетки dhfr-СНО, описанные в работе Urlaub and Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, применяемые с селективируемым маркером DHFR, например, как описано в работе Kaufman and Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621), клетки эмбриональной почки человека 293 (например, 293, 293E, 293T), клетки COS, клетки NIH3T3, лимфоцитарные клеточные линии, например, клетки миеломы NS0 и клетки SP2, и клетку трансгенного животного, например, трансгенного млекопитающего. Например, клетка представляет собой эпителиальную клетку млекопитающего.

В иллюстративной системе для экспрессии антител рекомбинантный вектор экспрессии, кодирующий как тяжелую цепь антитела, так и легкую цепь антитела против CD73 (например, CL25, HzCL25, 3-F03, 3-F03_411 или 3-F03_413), вводят в клетки dhfr-СНО путем трансфекции, опосредованной фосфатом кальция. В пределах рекомбинантного вектора экспрессии каждый из генов тяжелой и легкой цепей антитела функционально связан с регуляторными элементами энхансера/промотора (например, полученными из SV40, CMV, аденовируса и т.п., такими как регуляторный элемент энхансера CMV/промотора AdMLP или регуляторный элемент энхансера SV40/промотора AdMLP) для обеспечения высоких уровней транскрипции генов. Рекомбинантный вектор экспрессии также несет ген DHFR, который делает возможным селекцию клеток СНО, которые были трансфицированы вектором с использованием селекции/амплификации с помощью метотрексата. Отобранные трансформированные клетки-хозяева культивируют, чтобы сделать возможной экспрессию тяжелой и легкой цепей антитела, и выделяют антитело из культуральной среды.

Антитела также могут продуцироваться трансгенным животным. Например, в патенте США № 5849992 описывается способ экспрессии антитела в молочной железе трансгенного млекопитающего. Конструируют трансген, который содержит специфический по отношению к молоку промотор и нуклеиновые кислоты, кодирующие представляющее интерес антитело и сигнальную последовательность для секреции. Молоко, вырабатываемое самками таких трансгенных млекопитающих, содержит в себе представляющее интерес секретлируемое антитело. Антитело можно выделить из молока или, для некоторых применений, использовать непосредственно. Также представлены животные, содержащие одну или большее число нуклеиновых кислот, описанных в данном документе.

Антитела согласно данному изобретению можно выделять из внутренней среды или из внешней среды (например, культуральной среды) клетки-хозяина и очищать до получения чистых и гомогенных антител. Для выделения и очистки антител можно применять способы выделения и очистки, обычно применяемые для очистки антител, без ограничения каким-либо конкретным способом. Антитела можно выделять и очищать посредством соответствующего выбора и комбинирования, например, колоночной хроматографии, фильтрации, ультрафильтрации, высаливания, осаждения растворителем, экстракции растворителем, дистилляции, иммунопреципитации, электрофореза в ДСН-полиакриламидном геле, изоэлектрического фокусирования, диализа и

перекристаллизации. Хроматография включает в себя, например, аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, гелефильтрацию, обращенно-фазовую хроматографию и адсорбционную хроматографию (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Хроматографию можно осуществлять с использованием жидкофазной хроматографии, такой как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и быстрая жидкостная хроматография белка (БЖХБ). Колонки, применяемые для аффинной хроматографии, включают в себя колонку с белком А и колонку с белком G. Примеры колонок для использования с белком А включают в себя Hyper D, POROS и Sepharose FF (GE Healthcare Biosciences). Данное изобретение также включает в себя антитела, которые являются высокоочищенными с использованием указанных способов очистки.

Полинуклеотиды, векторы экспрессии и клетки

В данном изобретении также представлены полинуклеотиды и векторы, кодирующие антитело против CD73 или его часть (например, VH, VL, HC или LC), описанную в данном документе. Полинуклеотиды согласно данному изобретению могут быть в форме РНК или в форме ДНК. В некоторых случаях полинуклеотид представляет собой ДНК. В некоторых случаях полинуклеотид представляет собой комплементарную ДНК (кДНК). В некоторых случаях полинуклеотид представляет собой РНК.

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH любого из антител, описанных в данном документе (см., например, таблицы 1, 2, 3 и 5). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL любого из антител, описанных в данном документе (см., например, таблицы 1, 2, 3 и 5). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует тяжелую цепь, содержащую VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH любого из антител, описанных в данном документе (см., например, таблицы 1, 2, 3 и 5). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует легкую цепь, содержащую VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL любого из антител, описанных в данном документе (см., например, таблицы 1, 2, 3 и 5). В некоторых случаях полинуклеотид функционально связан с промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH любого из антител, описанных в данном документе (см., например, таблицы 1, 2, 3 и 5); и (ii) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид содержит VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL любого из антител, описанных в данном документе (см., например, таблицы 1, 2, 3 и 5). В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид содержит тяжелую цепь, содержащую VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH любого из антител, описанных в данном документе (см., например, таблицы 1, 2, 3 и 5); и (ii) вторую

последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид содержит легкую цепь, содержащую VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL любого из антител, описанных в данном документе (см., например, таблицы 1, 2, 3 и 5). В некоторых случаях первая нуклеиновая кислота функционально связана с первым промотором и вторая нуклеиновая кислота функционально связана со вторым промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует VH из CL25 или из его варианта (например, из его гуманизированной версии - HzCL25). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22. В некоторых случаях полинуклеотид функционально связан с промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует VL из CL25 или из его варианта (например, из его гуманизированной версии - HzCL25). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23. В некоторых случаях полинуклеотид функционально связан с промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид содержит VH из CL25

или из его варианта (например, из его гуманизированной версии - HzCL25); и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид содержит VL из CL25 или из его варианта (например, из его гуманизированной версии - HzCL25). В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84; и (ii) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81. В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84; и (ii) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81. В некоторых случаях первая нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность, указанную в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84, и вторая нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность, указанную в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81. В некоторых случаях первая нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22, и вторая нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23. В некоторых случаях первая нуклеиновая кислота функционально связана с первым промотором и вторая нуклеиновая кислота функционально связана со вторым промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует тяжелую цепь из CL25 или из его варианта (например, из его гуманизированной версии - HzCL25). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 24. В некоторых случаях полинуклеотид

кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 24. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24. В некоторых случаях полинуклеотид содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 89. В некоторых случаях полинуклеотид функционально связан с промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует легкую цепь из CL25 или из его варианта (например, из его гуманизированной версии - HzCL25). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 25. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 25. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25. В некоторых случаях полинуклеотид содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 90. В некоторых случаях полинуклеотид функционально связан с промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует тяжелую цепь из CL25 или из его варианта (например, из его гуманизированной версии - HzCL25) и легкую цепь из CL25 или из его варианта (например, из его гуманизированной версии - HzCL25). В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 24; и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 25. В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 24; и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или

удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 25. В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24; и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25. В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 89; и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 90. В некоторых случаях первая нуклеиновая кислота функционально связана с первым промотором и вторая нуклеиновая кислота функционально связана со вторым промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует VH из 3-F03 или из его варианта (например, из 3-F03_411 или 3-F03_413). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 62. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 63. В некоторых случаях полинуклеотид функционально связан с промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует VL из 3-F03 или из его варианта (например, из 3-F03_411 или 3-F03_413). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид,

содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61. В некоторых случаях полинуклеотид функционально связан с промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид содержит VH из 3-F03 или из его варианта (например, из 3-F03_411 или 3-F03_413); и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид содержит VL из 3-F03 или из его варианта (например, из 3-F03_411 или 3-F03_413). В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88; и (ii) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88; и (ii) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В некоторых случаях первая нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность, указанную в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88, и вторая нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность, указанную в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В некоторых случаях первая нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 62, и вторая нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61. В некоторых случаях первая нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 63, и вторая нуклеиновая

кислота кодирует аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61. В некоторых случаях первая нуклеиновая кислота функционально связана с первым промотором и вторая нуклеиновая кислота функционально связана со вторым промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует тяжелую цепь из 3-F03 или из его варианта (например, из 3-F03_411 или 3-F03_413). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 30, 33 и 66. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 30, 33 и 66. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 30, 33 и 66. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33. В некоторых случаях полинуклеотид содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 91. В некоторых случаях полинуклеотид содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 93. В некоторых случаях полинуклеотид функционально связан с промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует легкую цепь из 3-F03 или из его варианта (например, из 3-F03_411 или 3-F03_413). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31. В некоторых случаях полинуклеотид содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 92. В некоторых случаях полинуклеотид функционально связан с промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует тяжелую цепь из 3-F03 или из его варианта (например, из 3-F03_411 или 3-F03_413) и легкую цепь из 3-F03 или из его

варианта (например, из 3-F03_411 или 3-F03_413). В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 30, 33 и 66; и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31. В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 30, 33 и 66; и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31. В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 30, 33 и 66; и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31. В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30; и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31. В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33; и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31. В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 91; и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 92. В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 93;

и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 92. В некоторых случаях первая нуклеиновая кислота функционально связана с первым промотором и вторая нуклеиновая кислота функционально связана со вторым промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид, описанный в данном документе, является выделенным.

В данном изобретении также представлены векторы, кодирующие антитела против CD73 или их части (например, VH, VL, HC или LC), описанные в данном документе. В данном изобретении также представлены векторы экспрессии, содержащие один или большее число полинуклеотидов, описанных в данном документе. Различные типы векторов экспрессии известны в данной области техники и описаны в данном документе (например, см. раздел «Способы получения антител» выше).

В данном изобретении также представлены клетки, содержащие антитела против CD73, описанные в данном документе. В данном изобретении также представлены клетки, содержащие один или большее число полинуклеотидов, описанных в данном документе. В данном изобретении также представлены клетки, содержащие один или большее число векторов экспрессии, описанных в данном документе. Различные типы клеток известны в данной области техники и описаны в данном документе (например, см. раздел «Способы получения антител» выше).

Антитела против CD73 с измененным гликозилированием

Различные гликоформы могут оказывать существенное влияние на свойства терапевтического средства, включая фармакокинетику, фармакодинамику, взаимодействие с рецепторами и тканеспецифическое нацеливание (Graddis et al., 2002, Curr Pharm Biotechnol. 3: 285-297) В частности, для антител структура олигосахарида может влиять на свойства, относящиеся к устойчивости к протеазам, на опосредованный рецептором FcRn период полужизни антитела в сыворотке крови, фагоцитоз и обратную связь с антителом, в дополнение к эффекторным функциям антитела (например, связывание с комплексом C1 комплемента, что индуцирует комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ, англ. «CDC»), и связывание с рецепторами FcγR, которые отвечают за модуляцию пути антиген-зависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ, англ. «ADCC»)) (Nose and Wigzell, 1983; Leatherbarrow and Dwek, 1983; Leatherbarrow et al., 1985; Walker et al., 1989; Carter et al., 1992, PNAS, 89: 4285-4289).

Соответственно, другие средства модуляции эффекторной функции антител включает в себя изменение гликозилирования константной области антитела. Измененное гликозилирование включает в себя, например, уменьшение или увеличение числа гликозилированных остатков, изменение профиля или расположения гликозилированных остатков, а также изменение структуры (структур) углеводной части. Олигосахариды, обнаруживаемые в IgG человека, влияют на степень их эффекторной функции (Raju, T.S. BioProcess International April 2003, 44-53); микрогетерогенность олигосахаридов IgG человека может влиять на биологические функции, такие как КЗЦ и АЗКЦ, связывание с

различными рецепторами Fc и связывание с белком Clq (Wright A. & Morrison SL. TIBTECH 1997, 15 26-32; Shields et al. J Biol Chem. 2001 276 (9): 6591-604; Shields et al. J Biol Chem. 2002; 277 (30): 26733-40; Shinkawa et al. J Biol Chem. 2003 278 (5): 3466-73; Umana et al. Nat Biotechnol. 1999 Feb; 17 (2): 176-80). Например, способность IgG связывать Clq и активировать каскад комплемента может зависеть от присутствия, отсутствия или модификации углеводной части, расположенной между двумя доменами CH2 (которая обычно закреплена на Asn297) (Ward and Ghetie, Therapeutic Immunology 2: 77-94 (1995). Следовательно, в некоторых случаях антитело против CD73 содержит замещение Asn297Ala относительно константной области дикого типа.

Сайты гликозилирования в Fc-содержащем полипептиде, например, антителе, таком как антитело IgG, можно идентифицировать с помощью стандартных методик. Идентификация сайта гликозилирования может быть экспериментальной или основанной на анализе последовательности, или на данных моделирования. Были описаны консенсусные мотивы, то есть аминокислотные последовательности, распознаваемые различными гликозилтрансферазами. Например, консенсусный мотив для мотива N-связанного гликозилирования часто представляет собой NXT или NXS, где X может представлять собой любую аминокислоту, кроме пролина. Также был описан ряд алгоритмов для определения местоположения потенциального мотива гликозилирования. Соответственно, для идентификации потенциальных сайтов гликозилирования в антителе или Fc-содержащем фрагменте последовательность антитела исследуют, например, с использованием общедоступных баз данных, таких как веб-сайт, предоставляемый Центром анализа биологических последовательностей (см. NetNGlyc services для прогнозирования N-связанных сайтов гликозилирования и NetOGlyc services для прогнозирования O-связанных сайтов гликозилирования).

Исследования in vivo подтвердили снижение эффекторной функции агликозилированных антител. Например, агликозилированное антитело против CD8 не способно разрушать CD8-несущие клетки у мыши (Isaacs, 1992 J. Immunol. 148: 3062), а агликозилированное антитело против CD3 не индуцирует синдром высвобождения цитокинов у мыши или человека (Boyd, 1995, см. выше; Friend, 1999, Transplantation 68: 1632). Агликозилированные формы антитела против CD73 также обладают сниженной эффекторной функцией.

Важно отметить, что, хотя удаление гликанов в домене CH2, по-видимому, оказывает значительное влияние на эффекторную функцию, другие функциональные и физические свойства антитела остаются неизменными. В частности, было показано, что удаление гликанов не влияло существенным образом на период полужизни в сыворотке крови и связывание с антигеном (Nose, 1983, см. выше; Tao, 1989, см. выше; Dorai, 1991, см. выше; Hand, 1992, см. выше; Hobbs, 1992 Mol. Immunol. 29: 949).

Антитела против CD73 согласно данному изобретению можно модифицировать или изменять с целью обеспечения повышенной (-ых) или сниженной (-ых) эффекторной (-ых) функции (функции) (по сравнению со вторым CD73-специфическим антителом).

Способы изменения сайтов гликозилирования антител описаны, например, в патентных документах US 6350861 и US 5714350, WO 05/18572 и WO 05/03175; указанные способы можно применять для получения антител против CD73 согласно данному изобретению с измененным, сниженным или отсутствующим гликозилированием.

Показания

Антитела против CD73 согласно данному изобретению могут модулировать активность CD73. Соответственно, соединения, соли или стереоизомеры, описанные в данном документе, можно применять в способах ингибирования CD73 путем приведения CD73 в контакт с любым одним или большим числом из антител или композиций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитела можно применять в способах ингибирования активности CD73 у индивидуума/пациента, нуждающегося в таком ингибировании, путем введения эффективного количества антитела, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления модулирование представляет собой ингибирование. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт происходит *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт происходит *ex vivo* или *in vitro*.

Другой аспект данного изобретения относится к способам лечения CD73-ассоциированного заболевания или нарушения у индивидуума (например, пациента) путем введения индивидууму, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества или дозы одного или большего числа антител согласно данному изобретению или их фармацевтической композиции. CD73-ассоциированное заболевание или нарушение может включать в себя любое заболевание, нарушение или патологическое состояние, которые прямо или косвенно связаны с экспрессией или активностью CD73, включая сверхэкспрессию и/или аномальные уровни активности.

Другой аспект данного изобретения относится к способам лечения заболевания или нарушения (например, онкологического заболевания) у индивидуума (например, пациента) путем введения индивидууму, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества или дозы одного или большего числа антител согласно данному изобретению или их фармацевтической композиции, при этом заболевание или нарушение характеризуется высокоаденозиновым профилем. Способы определения того, что заболевание или нарушение имеет высокоаденозиновый профиль, известны в данной области техники. Например, можно выполнять анализ экспрессии генов опухолевой ткани с использованием определенной панели генов, чувствительных к аденозину.

Соединения согласно данному изобретению полезны при лечении заболеваний, связанных с активностью CD73, включая, например, онкологические заболевания, воспалительные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, нейродегенеративные заболевания, иммуномодуляторные нарушения, заболевания центральной нервной системы и диабет.

Основываясь на убедительной роли CD73 в многочисленных иммуносупрессивных механизмах, разработка ингибиторов может стимулировать иммунную систему для

подавления прогрессирования опухоли. Антитела против CD73 можно применять для лечения, отдельно или в комбинации с другими способами лечения, рака мочевого пузыря, рака легкого (например, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ, англ. «NSCLC»), метастазирований в легкие), меланомы (например, метастатической меланомы), рака молочной железы, рака шейки матки, рака яичника, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака предстательной железы, рака почки, рака кожи, рака щитовидной железы, рака печени (например, гепатоцеллюлярной карциномы), рака матки, рака головы и шеи (например, плоскоклеточного рака головы и шеи) и почечно-клеточной карциномы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак предстательной железы представляет собой метастатическую кастрационно-резистентную карциному предстательной железы (мККПЖ, англ. «mCRPC»). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения колоректальный рак представляет собой колоректальную карциному (КК, англ. «CRC»).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения заболевание или нарушение представляет собой рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого), меланому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, плоскоклеточную карциному органов головы и шеи, рак предстательной железы, рак печени, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак мочевого пузыря, рак кожи, рак матки, рак почки, рак желудка или саркому. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения саркома представляет собой опухоль Аскина, гроздевидную саркому, хондросаркому, саркому Юинга, злокачественную гемангиоэндотелиому, злокачественную шванному, остеосаркому, альвеолярную мягкотканную саркому, ангиосаркому, филоидную цистосаркому, возвышающуюся дерматофибросаркому, десмоидную опухоль, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, эпителиоидную саркому, внескелетную хондросаркому, внескелетную остеосаркому, фибросаркому, гастроинтестинальную стромальную опухоль (ГИСО, англ. «GIST»), гемангиоперицитому, гемангиосаркому, саркому Капоши, лейомиосаркому, липосаркому, лимфангиосаркому, лимфосаркому, злокачественную опухоль оболочек периферических нервов (ЗООПН, англ. «MPNST»), нейрофибросаркому, рабдомиосаркому, синовиальную саркому или недифференцированную плеоморфную саркому.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения заболевание или нарушение представляет собой рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи), колоректальный рак, рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ)), меланому, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак печени (например, гепатоцеллюлярную карциному) или почечно-клеточную карциному.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения заболевание или нарушение представляет собой мезотелиому или аденокарциному. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения заболевание или нарушение представляет собой мезотелиому. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения заболевание или нарушение представляет собой аденокарциному.

СКМП (супрессорные клетки миелоидного происхождения, англ. «MDSC») представляют собой гетерогенную группу иммунокомпетентных клеток миелоидного происхождения (семейство клеток, происходящих из стволовых клеток костного мозга). Численность СКМП усиленно увеличивается в патологических ситуациях, таких как хронические инфекции и онкологические заболевания, в результате измененного кроветворения. СКМП отличаются от других типов миелоидных клеток тем, что они обладают сильной иммуносупрессивной активностью, а не иммуностимулирующими свойствами. Подобно другим миелоидным клеткам, СКМП взаимодействуют с другими типами иммунокомпетентных клеток, включая Т-клетки, дендритные клетки, макрофаги и естественные клетки-киллеры, чтобы регулировать их функции. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соединения и т. д., описанные в данном документе, можно применять в способах, относящихся к раковой ткани (например, опухолям) с высокой инфильтрацией СКМП, включая солидные опухоли с высоким базальным уровнем макрофагов и/или инфильтрации СКМП.

В некоторых вариантах осуществления антитела согласно данному изобретению можно применять для лечения воспаления легких, включая индуцированный блеомицином фиброз легких и связанное с дефицитом аденозиндезаминазы повреждение.

В некоторых вариантах осуществления антитела согласно данному изобретению можно применять для лечения воспалительных заболеваний, таких как аллергические реакции (например, CD73-зависимые аллергические реакции) и другие CD73-иммунные реакции. Другие воспалительные заболевания, которые можно лечить антителами согласно данному изобретению, включают в себя респираторные нарушения, сепсис, реперфузионное повреждение и тромбоз.

В некоторых вариантах осуществления антитела согласно данному изобретению можно применять в качестве средства для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца (инфаркт миокарда, стенокардия, сердечная недостаточность), цереброваскулярное заболевание (инсульт, преходящее нарушение мозгового кровообращения), болезнь периферических артерий, атеросклероз аорты и аневризма. Атеросклероз является основным этиологическим фактором многих типов сердечно-сосудистых заболеваний. Атеросклероз начинается в подростковом возрасте с липидных полосок, которые в зрелом возрасте прогрессируют до бляшек и, наконец, приводят к тромботическим явлениям, которые вызывают закупорку сосудов, что приводит к клинически значимой морбидности и смертности.

В некоторых вариантах осуществления антитела согласно данному изобретению можно применять в качестве средства для лечения нарушений двигательной активности; патологий, вызванных дегенерацией стриатонигральной дофаминовой системы; и болезни Паркинсона; некоторых мотивационных симптомов депрессии.

В некоторых вариантах осуществления соединения согласно данному изобретению можно применять в качестве средства для лечения диабета и связанных с ним нарушений, таких как инсулинорезистентность. Диабет влияет на продуцирование аденозина и

экспрессию рецепторов аденозина A_{2B} (A_{2BR}), которые стимулируют продуцирование ИЛ-6 и ЦРБ, инсулинорезистентность и связь между однонуклеотидными полиморфизмами (ОНП, англ. «SNP») гена A_{2BR} (ОНП ADORA_{2B}) и маркерами воспаления. Повышенный уровень передачи сигналов A_{2BR} при диабете может частично повышать инсулинорезистентность за счет повышения провоспалительных медиаторов. Селективные антитела против CD73 могут быть полезны для лечения инсулинорезистентности.

Термины «индивидуум», или «пациент», или «субъект», употребляемые взаимозаменяемо, относятся к любому животному, включая млекопитающих, предпочтительно - к мышам, крысам, другим грызунам, кроликам, собакам, кошкам, свиньям, крупному рогатому скоту, овцам, лошадям или приматам, и наиболее предпочтительно - к человеку (т. е. к субъекту-человеку).

Фраза «терапевтически эффективное количество» относится к количеству активного антитела или фармацевтического агента, которое вызывает биологический или лекарственный ответ в ткани, системе, животном, индивидууме или человеке, который является желаемым для исследователя, ветеринара, врача или другого клинициста.

При употреблении в контексте данного документа термин «лечение» относится к одному или большему числу из: (1) ингибирования заболевания; например, ингибирования заболевания, патологического состояния или нарушения у индивида, который ощущает или проявляет патологию или симптоматику заболевания, патологического состояния или нарушения (т. е. прекращение дальнейшего развития патологии и/или симптоматики); и (2) ослабления заболевания; например, ослабления заболевания, патологического состояния или нарушения у индивида, который ощущает или проявляет патологию или симптоматику заболевания, патологического состояния или нарушения (т. е. обратное развитие патологии и/или симптоматики), такого как уменьшение тяжести заболевания.

В некоторых вариантах осуществления антитела согласно данному изобретению полезны для профилактики или снижения риска развития любого из заболеваний, указанных в данном документе; например, для профилактики или снижения риска развития заболевания, патологического состояния или нарушения у индивидуума, который может быть предрасположен к заболеванию, патологическому состоянию или нарушению, но еще не испытывает или не проявляет патологию или симптоматику заболевания.

Фармацевтические композиции

Антитело против CD73, описанное в данном документе, можно сформулировать в виде фармацевтической композиции для введения субъекту, например, для лечения нарушения, описанного в данном документе. Как правило, фармацевтическая композиция включает в себя фармацевтически приемлемый носитель. При употреблении в контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый носитель» обозначает все возможные растворители, дисперсионные среды, покрытия оболочкой,

антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие всасывание агенты и т. п., являющиеся физиологически совместимыми. Композиция может включать в себя фармацевтически приемлемую соль, например, соль присоединения кислоты или соль присоединения основания (см., например, работу Berge, S.M., et al. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66: 1-19).

Составление фармацевтических композиций хорошо известно в данной области техники и дополнительно описано, например, в Gennaro (ed.), *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7th Ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727); и Kibbe (ed.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association*, 3rd ed. (2000) (ISBN: 091733096X).

Фармацевтические композиции могут иметь различные формы. К ним относятся, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории. Предпочтительная форма может зависеть от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Как правило, композиции для агентов, описанных в данном документе, представлены в форме растворов для инъекций или инфузий.

Композицию можно составить в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для стабильного хранения при высокой концентрации. Стерильные инъекционные растворы можно получать путем включения агента, описанного в данном документе, в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или с комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, в случае необходимости, с последующей стерилизацией фильтрацией. В общем случае дисперсии получают путем включения агента, описанного в данном документе, в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка, которые приводят к получению порошка агента, описанного в данном документе, вместе с любым дополнительным активным ингредиентом из его ранее стерильно-профильтрованного раствора. Надлежащую текучесть раствора можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию агента, замедляющего всасывание, например, моностеаратных солей и желатина.

В определенных вариантах осуществления антитело против CD73 можно составлять с носителем, который будет защищать соединение от быстрого

высвобождения, например, как в случае состава с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно применять биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэферы и полимолочная кислота. Многие способы получения таких составов запатентованы или общеизвестны. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York (1978).

Введение

Антитело против CD73 можно вводить субъекту, например, субъекту, нуждающемуся в этом, например, субъекту-человеку, множеством способов. Для многих применений способ введения является одним из следующих: внутривенная (в/в) инъекция или инфузия, подкожная (п/к) инъекция, внутривнутрибрюшинная (в/б) или внутримышечная (в/м) инъекция. Также возможно применение внутрисуставной доставки. Также можно применять другие способы парентерального введения. Примеры таких способов включают в себя: внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, транстрахеальную, подкожную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, а также эпидуральную и интрастернальную инъекции. В некоторых случаях введение может быть пероральным.

Способ и/или путь введения антитела также можно адаптировать к конкретному случаю, например, путем мониторинга субъекта, например, с использованием томографического сканирования, например, для визуализации опухоли.

Антитело можно вводить в виде фиксированной дозы или в дозе мг/кг массы пациента. Дозу также можно выбирать таким образом, чтобы снизить или избежать образования антител против антитела против CD73. Схемы введения доз корректируют для обеспечения желаемого ответа, например, терапевтического ответа или комбинированного терапевтического эффекта. В общем случае дозы антитела против CD73 (и, необязательно, второго агента) можно применять для того, чтобы обеспечить субъекта агентом в биодоступных количествах.

Единичная дозированная форма, или «фиксированная доза», или «единичная доза», при употреблении в контексте данного документа относятся к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для подлежащих лечению субъектов; каждая единица содержит predetermined количество активного соединения, рассчитанное так, чтобы оказывать необходимый терапевтический эффект, вместе с необходимым фармацевтическим носителем и, необязательно, вместе с другим агентом. Можно вводить одну или множество доз. В качестве альтернативы или дополнения антитело можно вводить путем непрерывной инфузии.

Ниже приведены примеры практического применения данного изобретения. Их не следует рассматривать как ограничивающие объем данного изобретения каким-либо образом.

ПРИМЕРЫ

Нижеследующие примеры представлены для лучшей иллюстрации заявляемого изобретения и не должны истолковываться как ограничивающие объем данного изобретения. В той мере, в которой упоминаются конкретные материалы, они служат лишь в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения данного изобретения. Специалист в данной области техники может разработать эквивалентные средства или реагенты, не прибегая к изобретательским способностям и не отклоняясь от объема данного изобретения.

Пример 1: получение моноклональных антител против CD73 человека

Для получения моноклональных антител против CD73 человека мышей иммунизировали рекомбинантным белком CD73 человека (SEQ ID NO: 70), содержащим С-концевую гистидиновую метку, и выделяли В-клетки из селезенки и лимфатических узлов мышей. Последовательности антител В-клеток определяли с помощью парного секвенирования VH/VL В-клеток 10x Genomics. Пары VH/VL мыши экспрессировали в виде химер с Fc huIgG1 человека (SEQ ID NO: 73 и 74) и исследовали на предмет связывания и функциональности. В результате процесса было получено антитело, обозначенное как CL25. В таблице 1, приведенной выше, показаны аминокислотные последовательности CDR CL25 в соответствии с системами нумерации IMGT, по Чотиа, АбМ, по Кабату и по областям контакта, а также зрелые VH, VL, тяжелая цепь и легкая цепь.

Химерное антитело CL25 (содержащее VH мыши с SEQ ID NO: 26 и VL мыши с SEQ ID NO: 27) гуманизировали для минимизации иммуногенности каркасов антител при сохранении специфической активности. Гуманизацию выполняли путем выравнивания последовательностей VH и VL с генами VH и VK человека по базе данных. CDR (**таблица 1**) из мышинового антитела CL25 прививали к нескольким наивысшим генам VH и VK человека. Последовательности VH и VL иллюстративных гуманизированных антител CL25 показаны на **фиг. 1А - фиг. 1С**. Выравнивания VH и VL из CL25 и иллюстративных гуманизированных антител CL25 показаны на **фиг. 1D** и **фиг. 1Е**, соответственно. Также исследовали несколько каркасных мутаций, присутствующих в CL25 мыши, вместе с CDR-областями мыши (**фиг. 1А - фиг. 1Е**). Для дальнейших исследований выбрали гуманизованную версию CL25, имеющую VH с SEQ ID NO: 22 и VL с SEQ ID NO: 23, обозначенную в данном документе как «HzCL25». В таблице 2, приведенной выше, показаны аминокислотные последовательности CDR HzCL25 в соответствии с системами нумерации IMGT, по Чотиа, АбМ, по Кабату и по областям контакта, а также зрелые VH, VL, тяжелая цепь и легкая цепь.

Пример 2: связывание моноклональных антител против CD73 человека с CD73 на клеточной поверхности

Для исследования связывания гуманизированных и негуманизированных клонов CL25 с CD73 на клеточной поверхности клетки MDA-MB-231 или A375 промывали и помещали в 96-луночные планшеты в концентрации 5×10^4 клеток/луночку. Клетки

окрашивали антителами в указанных концентрациях в течение 30 минут на льду (**фиг. 2А** и **фиг. 2В**). Затем клетки промывали и окрашивали вторичным антителом козы против мыши, конъюгированным с фикоэритрином (PE), в течение 30 минут на льду. Затем клетки промывали и анализировали методом проточной цитометрии. Средняя геометрическая интенсивность флуоресценции (СГИФ) окрашивания CD73 представлена на графике (**фиг. 2А** и **фиг. 2В**). Как CL25, так и HzCL25 продемонстрировало высокую активность связывания с клетками с высоким уровнем поверхностного CD73 (клетки MDA-MB-231) и умеренным уровнем поверхностного CD73 (исследовано на клетках A375).

Пример 3: ингибирование клеточного CD73, опосредованное моноклональным антителом против CD73 человека

Для измерения способности антитела против CD73 ингибировать активность клеточного CD73 клетки A375 и MDA-MB-231 промывали бессывороточной средой RPMI (ThermoFisher) и высевали в 96-луночные планшеты в концентрации 8×10^4 клеток/лунку для A375 или 1×10^4 клеток/лунку для MDA-MB-231. Клетки инкубировали с антителами или APCP в указанных концентрациях при температуре 37°C с 5% CO₂ в течение 30 минут (**фиг. 3А**, **фиг. 3В** и **фиг. 3С**). Затем добавляли аденозинмонофосфат (АМФ) до конечной концентрации в 100 мкМ и инкубировали клетки еще 3 часа при температуре 37°C с 5% CO₂. Планшеты центрифугировали в течение 1-2 минут при 300 g и переносили по 25 мкл супернатанта в новые 96-луночные планшеты. Применяли анализ АМФ-Glo в соответствии с инструкциями производителя (Promega). В данном анализе относительные единицы люминесценции (ОЕЛ, англ. «RLU») напрямую коррелируют с концентрацией АМФ. Результаты представлены на **фиг. 3А**, **фиг. 3В** и **фиг. 3С**.

Как CL25, так и HzCL25 продемонстрировало высокую активность в ингибировании клеточного CD73 в обоих исследованных типах клеток (**фиг. 3А**, **фиг. 3В** и **фиг. 3С**). HzCL25 продемонстрировало способность ингибировать клеточный CD73, подобную таковой у CL25 (**фиг. 3А**, **фиг. 3В** и **фиг. 3С**).

Пример 4: ингибирование растворимого CD73, опосредованное моноклональным антителом против CD73 человека

Для измерения способности антител против CD73 ингибировать активность рекомбинантного белка CD73 рекомбинантный CD73 человека (rhuCD73) (SEQ ID NO: 70) добавляли в 96-луночные планшеты в конечной концентрации 0,008 мкг/мл с антителами (**фиг. 4**) или аденозин-5'-[α,β -метилден]дифосфатом (APCP) в указанных концентрациях и инкубировали при температуре 37°C с 5% CO₂ в течение 30 минут. После 30-минутной инкубации добавляли АМФ до конечной концентрации в 100 мкМ и инкубировали реакции еще 3 часа при температуре 37°C с 5% CO₂. По 25 мкл супернатанта переносили в новые 96-луночные планшеты. Применяли анализ АМФ-Glo в соответствии с инструкциями производителя. В данном анализе ОЕЛ напрямую коррелируют с концентрацией АМФ. Результаты представлены на **фиг. 4**. Как CL25, так и HzCL25 продемонстрировало высокую активность без «хук-эффекта» (**фиг. 4**). HzCL25

продемонстрировало способность ингибировать клеточный CD73, подобную таковой у CL25 (фиг. 4).

Пример 5: обращение вспять АМФ-опосредованной супрессии пролиферации Т-клеток, опосредованное моноклональным антителом против CD73 человека

Для измерения способности антител против CD73 обращать вспять АМФ-опосредованную супрессию пролиферации Т-клеток первичные CD4⁺ Т-клетки человека выделяли из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК, англ. «PBMC») с использованием набора для выделения CD4⁺ Т-клеток человека (Miltenyi Biotec). Выделенные CD4⁺ Т-клетки метили карбоксифлуоресцеин-сукцинимидиловым эфиром (CFSE) (BD Biosciences) в концентрации 1 мкМ в соответствии с протоколом производителя. CFSE-меченные клетки ресуспендировали в среде RPMI, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 60 МЕ/мл рекомбинантного ИЛ-2 человека. Около 50000 клеток на лунку добавляли в 96-луночный планшет с круглодонными лунками. В клеточную суспензию добавляли Т-активирующие гранулы Dynabeads CD3/CD28 в соотношении гранулы : клетки, равном 1 : 1, и инкубировали в течение 1 часа при температуре 37°C. В предназначенные для этого лунки добавляли последовательные разведения антител и инкубировали в течение 30 минут при температуре 37°C. Наконец, добавляли АМФ в конечной концентрации в 1000 мкМ, и всю культуру инкубировали в течение 5 суток при температуре 37°C в инкубаторе. Через 5 суток определяли пролиферацию CD4⁺ Т-клеток методом проточной цитометрии на основе CFSE с использованием анализатора LSRFORTESSA X-20 (BD Biosciences).

Антитело против CD73 обратило вспять АМФ-опосредованную супрессию пролиферации CD4⁺ Т-клеток зависимым от концентрации образом в образцах многих различных доноров-людей (фиг. 5А-5N).

Пример 6: аффинность связывания

Ферментативная активность CD73 требует связывания субстрата в открытой конформации. После связывания с субстратом CD73 должен претерпеть значительное конформационное изменение от открытой к закрытой конформации, чтобы преобразовать АМФ в аденозин. Связывание антител, которое ингибирует или модулирует указанное конформационное изменение, потенциально снижает скорость превращения АМФ в аденозин.

Для оценки аффинности связывания HzCL25 проводили поверхностный плазмонный резонанс (ППР, англ. «SPR») с использованием прибора Biacore 8K (GE Healthcare) при температуре 25°C. Рабочий буфер для ППР (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА и 0,05% об./об. сурфактанта P20, pH 7,4) готовили из буфера 10X HBS-EP (GE Healthcare). Антитела против Fc человека (GE Healthcare) иммобилизовали с помощью аминосвязывания во всех шестнадцати проточных ячейках сенсорного чипа CM5 серии S (GE Healthcare). Уровни иммобилизации составляли ~9000 отн. ед. для всех проточных ячеек. Желаемого уровня захвата антитела против CD73 достигали путем пропускания соответствующей концентрации антитела против CD73 через активную

проточную ячейку каждого канала. Нерасщепляющийся аналог АДФ - APCP (аденозин-5'-(α,β -метилен) дифосфат) - в присутствии Zn^{2+} можно применять для сдвига конформационного равновесия CD73 с открытой конформации на закрытую. Следовательно, рекомбинантный CD73 инкубировали с рабочим буфером для ППР в присутствии 100 мкМ APCP и 10 мкМ $ZnCl_2$ («закрытый» рабочий буфер для ППР) для изучения связывания антитела против CD73 с CD73 в закрытой конформации. Для достижения этой цели использовали функцию «АВА-введения» в Biacore 8K. Для открытой конформации последовательность «АВА-введения» начиналась с 60-секундного введения рабочего буфера. Затем вводили серию концентраций CD73 с 3-кратным последовательным разведением, приготовленную из исходного материала CD73 (BPS Bioscience), и рабочий буфер в течение 180 секунд, сразу же после чего вводили рабочий буфер в течение 240 секунд. Для закрытой конформации обычный рабочий буфер для ППР заменяли на «закрытый» рабочий буфер для ППР. Поверхность регенерировали 30-секундным введением 3 М $MgCl_2$. Параметры кинетики связывания и аффинности получали на основе встраивания данных в общую модель связывания 1 к 1. Аффинности связывания, кинетические константы скорости ассоциации и скорости диссоциации с CD73 человека, яванского макака и мыши в открытой или в закрытой конформациях показаны в таблице 6, приведенной ниже. Результаты, представленные в таблице 6, обеспечивают то, что фармакокинетические данные яванского макака будут отражать фармакокинетические данные человека.

Таблица 6: аффинности связывания, кинетические константы скорости ассоциации и скорости диссоциации с CD73 человека (SEQ ID NO: 70), яванского макака (SEQ ID NO: 72) и мыши (SEQ ID NO: 71) в открытой или закрытой конформациях для указанных антител (Ат).

Антител о	CD73	Открытая			Закрытая		
		k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)
CL25	Человек	> 1E+06	3,94E-04	< 3,94E-10	9,03E+05	3,44E-04	3,81E-10
	Яванский макак	> 1E+06	6,58E-04	< 6,58E-10	9,36E+05	4,95E-04	5,29E-10
	Мышь	Нет связывания			Нет связывания		
HzCL25	Человек	> 1E+06	4,49E-04	< 4,49E-10	Не проводили		
	Яванский макак	> 1E+06	4,68E-04	< 4,68E-10	Не проводили		
	Мышь	Нет связывания			Не проводили		

CL25_ hu_8-4	Челове к	7,70E+05	1,76E-03	2,29E-09	Не проводили
CL25_ hu_8-5	Челове к	> 1E+06	9,49E-04	7,18E-10	Не проводили
CL25_ hu_8-6	Челове к	7,15E+05	1,11E-03	1,55E-09	Не проводили
CL25_ hu_9-4	Челове к	3,82E+05	2,64E-03	6,90E-09	Не проводили
CL25_ hu_9-5	Челове к	5,65E+05	1,14E-03	2,02E-09	Не проводили
CL25_ hu_9-6	Челове к	4,24E+05	9,53E-04	2,25E-09	Не проводили
CL25_ hu_10-4	Челове к	8,87E+05	1,07E-03	1,20E-09	Не проводили
CL25_ hu_10-6	Челове к	5,24E+05	9,20E-04	1,75E-09	Не проводили
CL25_ hu_11-4	Челове к	6,24E+05	1,55E-03	2,48E-09	Не проводили
CL25_ hu_11-5	Челове к	7,99E+05	1,17E-03	1,46E-09	Не проводили
CL25_ hu_11-6	Челове к	5.50E+05	1,01E-03	1,84E-09	Не проводили

Пример 7: картирование эпитопов

Для картирования эпитопа CL25 проводили масс-спектрометрию водородно-дейтериевого обмена (ВДО, англ. «HDX»). CD73 инкубировали в оксиде дейтерия либо отдельно, либо в комплексе с Fab CL25. Дейтериевый обмен проводили при температуре 20°C в течение 0 секунд, 60 секунд, 600 секунд или 3600 секунд. Реакцию обмена останавливали низким pH, а белки расщепляли пепсином/протеазой VIII. Уровни дейтерия в идентифицированных пептидах мониторировали по сдвигу массы в жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС, англ. «LC-MS»). Для всех пептидов строили кривые накопления дейтерия с течением времени обмена в зависимости от времени. Пептиды со значительным снижением поглощения дейтерия при связывании с Fab определили как эпитопы каждого из антител. Эпитоп, определенный с помощью ВДО-МС для CL25, нанесен на кристаллическую структуру CD73 человека (4H2F.pdb) (фиг. 6) и представляет собой TKVQQIRRAEPNVL (SEQ ID NO: 76) (т. е. аминокислоты 40-53 из SEQ ID NO: 70).

Пример 8: уровни CD73 на клеточной поверхности

Для измерения количества CD73 на поверхности клеток после воздействия антителами, клетки MDA-MB-231 ресуспендировали в среде (RPMI-1640 с 10% ЭТС) и высевали в 96-луночные планшеты в концентрации 1×10^5 клеток/луночка. Указанные антитела добавляли в конечной концентрации 10 мкг/мл и планшеты инкубировали при температуре 37°C с 5% CO₂ в течение 24 часов. Клетки извлекали с помощью реактива Versene и переносили в новые 96-луночные планшеты. Клетки промывали и окрашивали неконкурирующим антителом, напрямую конъюгированным с Dy650, в концентрации 10 мкг/мл в течение 30 минут на льду. Клетки промывали и анализировали методом проточной цитометрии. Плотность рецепторов CD73 на клеточной поверхности определяли на основании объема связывания антитела (ОСА, англ. «ABC») с использованием гранул Quantum Simply Cellular. Воздействие на клетки с помощью CL25 в течение 24 часов привело к снижению уровней CD73 на клеточной поверхности (фиг. 7).

Пример 9: влияние антитела против CD73 на рост опухоли

Исследовали эффективность антитела CL25 *in vivo*. HzCL25 суспендировали в 1-кратном фосфатно-солевом буфере (ФСБ) (Life Technologies) для внутрибрюшинного введения hu-CD34 мышам NSG (Jackson laboratories). 1xФСБ и IgG1 человека с инактивированным Fc, суспендированный в 1xФСБ, включили в данное исследование в качестве контролей. Мыши с гуманизированной иммунной системой были приобретены у Jackson Labs (г. Бар Харбор, штат Мэн, США). Кратко, 3-недельные самки мышей NSG/NOD SCID получали однократную дозу облучения, токсичную для предшественников иммунных клеток, а затем «спасались» путем инъекции CD34⁺ клеток из пуповинной крови человека. Через 12 недель (чтобы обеспечить восстановление и приживание иммунокомпетентных клеток человека) мышам помещали в AALAS-сертифицированный виварий Исследовательского института Incyte. Данная группа мышам состояла из реципиентов трех различных людей-иммунодоноров, чтобы обеспечить лучшую репрезентативность индивидуальных вариаций иммунного ответа.

Левую боковую область брюха мышам выбривали за сутки до инокуляции 5×10^6 клеток линии меланомы человека A375 (ATCC, г. Манассас, штат Виргиния, США), суспендированными в матригеле (Corning Life Sciences, г. Тьюксбери, штат Массачусетс, США). На 11-е сутки размеры опухоли измеряли штангенциркулем, а объем оценивали по формуле: объем=[L (длина) x W2 (ширина)]/2. Мышей рандомизированно распределяли на 3 группы по 5 или 6 мышам приблизительно среднего объема (~200 мм³) и донорской репрезентативности. Опухоли измеряли каждые 2-4 суток на протяжении всего исследования.

HzCL25 разводили в ФСБ до концентраций в 1 и 0,1 мг/мл, и готовили свежий раствор соответствующего изотипического контроля (сх00376-001) в концентрации 1 мг/мл утром в день введения. Каждые шесть суток, начиная с 11-х суток, мышам вводили антитело путем внутрибрюшинной инъекции в дозе 10 мл/кг, достигая эффективных доз 1 и 10 мг/кг массы тела. Всего вводили три дозы.

Через сорок восемь часов после третьей и последней дозы мышей подвергали эвтаназии путем удушения в CO₂. Опухоли выделяли хирургическим путем, помещали в среду, содержащую протеазы, помещали на лед, а затем расщепляли на одноклеточные суспензии с помощью реактива GentleMacs Tissue Disruptor (Miltenyi, г. Оберн, штат Калифорния, США). Клетки оставались на льду во время процесса подготовки к проточной цитометрии и ферментативному анализу.

Мыши, которым вводили HzCL25, демонстрировали ингибирование роста опухоли при обеих дозах; низкая доза статистически значимым образом ($p = 0,026$, двусторонний t-тест) замедлила рост на 56% (**фиг. 8**).

Пример 10: анализ ферментативной активности ex vivo

Для оценки ферментативной активности CD73 у несущих опухоли мышей, которым вводили HzCL25, одноклеточные суспензии гомогенатов опухоли из эксперимента, представленного на **фиг. 8**, сортировали на наличие живых клеток с использованием микрогранул Dead Cell Removal MicroBeads (Miltenyi Biotec). После отбора клеток высевали по 10000 живых клеток на лунку с 100 мкМ АМФ. В качестве положительного контроля использовали клетки, обработанные с помощью 250 мкМ АРСР. После обработки применяли набор АМФ-glo (Promega; № по каталогу: V5011) для определения ферментативной активности CD73 в соответствии с рекомендациями производителя. Люминесценцию использовали в качестве меры для определения уровня АМФ, и показания от каждого животного нормализовывали относительно показателей культуры, обработанной АРСР, при этом считали, что культуры, обработанные АРСР, демонстрируют максимальное ингибирование активности CD73 (**фиг. 9**). Как показано на **фиг. 9**, HzCL25 продемонстрировал дозозависимое ингибирование ферментативной активности CD73 в отношении опухолевых клеток.

Пример 11: свободный поверхностный CD73 на опухолях, на которые воздействовали антителом против CD73

Для оценки охвата рецепторов после воздействия, суспензии отдельных клеток гомогенатов опухолей из эксперимента, представленного на **фиг. 8**, окрашивали конъюгированными с флуорохромом антителами против красителя жизнеспособности (Biolegend, № по каталогу: 423110), CD45 человека (Biolegend, № по каталогу: 304036), CD45 мыши (BD Biosciences, № по каталогу: 563410), CD90.2 мыши (BD Biosciences, № по каталогу: 565257) и конкурирующим (AF488-конъюгированным антителом CL25) или неконкурирующим антителом (PE-конъюгированное антитело X). Выполняли проточную цитометрию и анализ клеток с использованием проточного цитометра BD FACSymphony и программного пакета FlowJo, соответственно. Анализ проводили путем гейтирования популяции живых клеток с последующим исключением клеток мыши и иммунокомпетентных клеток человека, сосредоточив внимание на популяции опухолевых клеток. Уровни общего CD73 в опухолевых клетках определяли с помощью неконкурирующего антитела против CD73, меченного флуорофором. Антитело HzCL25 снижало уровни общего CD73 в опухолевых клетках (**фиг. 10A**) дозозависимым образом.

На клетках, экспрессирующих CD73, измеренный на **фиг. 10А**, измеряли свободный поверхностный CD73 с использованием конкурирующего антитела (CL25), меченного флуорофором (**фиг. 10В**). Воздействие с помощью HzCL25 привело к дозозависимому снижению свободного поверхностного CD73 (**фиг. 10В**). Кроме того, снижение уровней свободного поверхностного CD73 для обеих доз было значительно меньшим по сравнению с опухолями, обработанными IgG (**фиг. 10В**).

Пример 12: фармакокинетические и фармакодинамические исследования антитела против CD73 in vivo

Для оценки эффективности HzCL25 in vivo самкам мышей, восстановленных клетками CD34⁺ человека (возраст 21 неделя; The Jackson Laboratory, г. Бар Харбор, штат Мэн, США), подкожно инокулировали по 5×10^6 клеток меланомы человека A375 (ATCC# CRL-1619). Лечение несущих опухоль мышей начинали через 7 суток после инокуляции, когда объем опухоли достигал около 330 мм³. Гуманизированным мышам NSG, которым были привиты клетки A375, вводили внутривенно HzCL25 в дозе 10 мг/кг каждые 5 суток. Исследуемые животные получили в общей сложности по 6 доз антитела, при этом последнюю дозу вводили на 32-е сутки. Опухоли выделяли из мышей с опухолями, превышающими 10% от массы их тела, на 26-е и 29-е сутки, и из всех остальных животных на 33-е сутки. Сыворотку крови собирали у всех животных на 26-е сутки, снова у мышей с опухолями, превышающими 10% от массы их тела, на 29-е сутки, и у всех остальных животных на 33-е сутки. К 26-м суткам (в это время IgG-контрольная группа достигла своей конечной точки средней эффективности) HzCL25 обеспечивал умеренное, но незначительное ингибирование роста опухоли на 14% (**фиг. 11А**). Однако введение доз, продленное до 32-х суток, выявило заметные различия в скорости роста опухолей и выживаемости между животными, получавшими HzCL25, и теми оставшимися мышами, которые получали IgG-контроль (**фиг. 11В**).

На 22-е сутки начали отдельное исследование фармакодинамики (ФД) с использованием HzCL25 в дозе 10 мг/кг каждые 3 суток; в общей сложности ввели 2 дозы антитела. Опухоли у животных для исследования ФД собирали на 27-е сутки, через 48 часов после введения второй дозы антитела. Для измерения растворимого CD73 человека (hCD73) в сыворотке крови мышей после воздействия антителами, MSD-планшеты покрывали неконкурирующим захватывающим антителом IgG в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали при температуре 4°C в течение ночи. Планшеты промывали и добавляли разведенные в соотношении 1:5 образцы сыворотки крови мышей. Получали стандартную кривую с использованием рекомбинантного CD73 человека (rhCD73). Планшеты инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре со встряхиванием при 600 об/мин. Планшеты промывали и добавляли конкурирующее (HzCL25) или неконкурирующее (антитело X) антитела, непосредственно конъюгированные с сульфогруппой, в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре со встряхиванием при 600 об/мин. Планшеты промывали, добавляли 150 мкл буфера для детекции и анализировали с помощью планшетного анализатора MSD. Уровни

растворимого hCD73 в образцах сывороток крови мышей рассчитывали по стандартной кривой. Хотя воздействие антителом HzCL25 привело к небольшой стабилизации растворимого CD73 человека у мышей, уровень растворимого CD73 человека все еще оставался намного ниже уровня антител у мышей (фиг. 12).

Пример 13: получение моноклонального антитела 3-F03 против CD73 человека

Для получения дополнительных моноклональных антител против CD73 человека проводили несколько циклов отбора из библиотеки одного донора. Библиотеку из около $1.5E12$ частиц фага обогащали в течение трех циклов паннирования с использованием 200 нМ биотинилированного CD73 человека (SEQ ID NO: 70). Затем кассеты scFv из данного пула рекомбинировали в вектор дрожжевого дисплея и получили библиотеку из около $5.4E7$. Проводили селекцию библиотеки в трех циклах FACS с использованием 100 нМ биотинилированного CD73 мыши (SEQ ID NO: 71). Из конечного продукта селекции получали уникальные последовательности путем секвенирования колоний дрожжей по Сэнгеру. Из указанного пула идентифицировали последовательность scFv 3-F03 дрожжей, которая содержит VH, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 77, и VL, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 65.

Чтобы сконструировать полноразмерное антитело 3-F03 человека, последовательности scFv 3-F03 дрожжей модифицировали перед клонированием в каркас IgG1 человека, содержащий константную область IgG1 человека, указанную в SEQ ID NO: 73, и константную область легкой цепи каппа человека, указанную в SEQ ID NO: 74. Для получения VH удаляли N-концевой глутамат (E) из SEQ ID NO: 77, а треонин (T) в положении H77 по Кабату из SEQ ID NO: 77 (т. е. положение 78 в SEQ ID NO: 77) замещали аланином (A). Для получения VL удаляли N-концевой аланин (A) из SEQ ID NO: 65. Полученное в результате полноразмерное антитело 3-F03 человека содержит VH и VL, указанные в аминокислотных последовательностях SEQ ID NO: 60 и 61, соответственно. Полученное в результате полноразмерное антитело 3-F03 человека содержит тяжелую цепь и легкую цепь, указанные в аминокислотных последовательностях SEQ ID NO: 66 и 31, соответственно. Данное антитело указано в данном документе как «3-F03». В таблице 3, приведенной выше, показаны аминокислотные последовательности CDR 3-F03 в соответствии с системами нумерации IMGT, по Чотиа, AbM, по Кабату и по областям контакта, а также зрелые VH, VL, тяжелая цепь и легкая цепь.

Пример 14: связывание 3-F03 с CD73 на клеточной поверхности

Связывание 3-F03 с CD73 на клеточной поверхности выполняли так, как описано в примере 2, приведенном выше. 3-F03 демонстрирует высокую активность связывания с клетками, имеющими высокий уровень поверхностного CD73 (MDA-MB-231), и с клетками, имеющими умеренный уровень CD73 (клетки A375) (фиг. 13A и фиг. 13B).

Пример 15: 3-F03-опосредованное ингибирование клеточного CD73

Способность 3-F03 ингибировать активность клеточного CD73 оценивали так, как описано в примере 3, приведенном выше. Результаты представлены на **фиг. 14А** и **фиг. 14В**.

Клон 3-F03 продемонстрировал максимальное ингибирование клеточного CD73 в обоих тестируемых типах клеток по сравнению с АРСР - низкомолекулярным ингибитором CD73 (**фиг. 14А** и **фиг. 14В**).

Пример 16: 3-F03-опосредованное ингибирование растворимого CD73

Способность 3-F03 ингибировать активность рекомбинантного белка CD73 оценивали так, как описано в примере 4, приведенном выше, за исключением того, что использовали 0,025 мкг/мл rhuCD73. Результаты представлены на **фиг. 15**. Антитело 3-F03 продемонстрировало высокую активность (**фиг. 15**). Антитело 3-F03 не имело «хук-эффекта».

Пример 17: обращение вспять АМФ-опосредованной супрессии пролиферации Т-клеток, опосредованное моноклональным антителом против CD73 человека

Способность 3-F03 обращать вспять АМФ-опосредованную супрессию пролиферации Т-клеток оценивали так, как описано в примере 5, приведенном выше. 3-F03 обратило вспять АМФ-опосредованную супрессию пролиферации CD4+ Т-клеток зависимым от концентрации образом у множества различных людей-доноров (**фиг. 16А-16D**).

Пример 18: аффинность связывания антитела против CD73

Аффинность связывания 3-F03 оценивали так, как описано в примере 6, приведенном выше. Аффинности связывания, кинетические константы скорости ассоциации и скорости диссоциации с CD73 человека, яванского макака и мыши в открытой или в закрытой конформациях показаны в таблице 7, приведенной ниже.

Таблица 7: аффинности связывания, кинетические константы скорости ассоциации и скорости диссоциации с CD73 человека, яванского макака и мыши в открытой или в закрытой конформациях.

Название образца	CD73	Открытая			Закрытая		
		k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (М)
3-F03	Человек	2,15E+05	7,96E-05	3,70E-10	Нет связывания		
	Яванский макак	3,01E+05	2,21E-04	7,34E-10	Нет связывания		
	Мышь	2,17E+05	3,60E-04	1,66E-09	Нет связывания		

Пример 19: картирование эпитопов из 3-F03

Эпитоп 3-F03 картировали так, как описано в примере 7, приведенном выше. Эпитопы, определенные с помощью ВДО-МС для 3-F03, нанесены на кристаллическую структуру CD73 человека (4H2F.pdb) (**фиг. 17**) и представляют собой AAVLPFGGTFDLVQ (SEQ ID NO: 78) (т. е. аминокислоты 386-399 из SEQ ID NO: 70) и ILPNFLANGGDGFQMIKDEL (SEQ ID NO: 79) (т. е. аминокислоты 470-489 из SEQ ID

NO: 70).

Пример 20: влияние 3-F03 на уровни CD73 на клеточной поверхности

Количество CD73 на клеточной поверхности после воздействия антителом 3-F03 оценивали так, как описано в примере 8, приведенном выше. 3-F03 резко снижал уровень обнаруживаемого CD73 на клеточной поверхности по сравнению с контрольным изотипическим антителом или необработанными клетками (фиг. 18).

Пример 21: исследования in vivo

Эффективность 3-F03 in vivo оценивали так, как описано в примере 12, приведенном выше. К 26-м суткам, когда IgG-контрольная группа достигла своей конечной точки средней эффективности, 3-F03 обеспечивал умеренное, но статистически значимое ингибирование роста опухоли на 8% (фиг. 19A). Однако введение доз, продленное до 32-х суток, выявило заметные различия в скорости роста опухолей и выживаемости между животными, получавшими 3-F03, и теми оставшимися мышами, которые получали IgG-контроль (фиг. 19B).

Также оценивали ФД-свойства 3-F03 так, как описано в примере 12, приведенном выше. Воздействие антителом 3-F03 не привело к стабилизации растворимого CD73 человека у мышей, поскольку не было обнаружено заметного увеличения общего или свободного растворимого CD73 человека при воздействии 3-F03 (фиг. 20).

Пример 22: варианты 3-F03

Последовательности легкой цепи 3-F03 (LC, SEQ ID NO: 66) и тяжелой цепи (HC, SEQ ID NO: 31) использовали для построения модели гомологии. На фиг. 21A - фиг. 21J указаны аминокислотные последовательности VH и VL иллюстративных вариантов 3-F03. Антитела, содержащие указанные последовательности VH и VL, содержали константную область тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 73, и константную область легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 74. В таблице 8 указаны значения аффинности и кинетики связывания иллюстративных вариантов 3-F03. Ни одна из исследованных мутаций не оказала существенного влияния на связывание с CD73 по технологии Biacore. Все исследованные мутации обладали аффинностью в пределах десятикратной аффинности, продемонстрированной антителом 3-F03, причем большинство из них - в пределах трехкратной аффинности, продемонстрированной антителом 3-F03.

Таблица 8: аффинность и кинетика связывания по Biacore для вариантов 3-F03. - =отсутствует.

Название образца	Место мутации (нумерация по Кабату)				k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	K_D (M)
	VH1 (E или -)	VH53 (D, E или S)	VH77 (A или T)	VL1 (A, D или -)			
3-F03_396	E	D	T	A	1,39E+05	1,78E-04	1,28E-09
3-F03_408	E	D	T	-	1,40E+05	1,86E-04	1,33E-09

3-F03_402	-	D	T	A	1,32E+05	1,84E-04	1,39E-09
3-F03_384	E	D	T	D	1,40E+05	1,98E-04	1,41E-09
3-F03_399	E	D	A	A	1,38E+05	1,97E-04	1,43E-09
3-F03_411	E	D	A	-	1,39E+05	2,04E-04	1,47E-09
3-F03_414	-	D	T	-	1,31E+05	1,98E-04	1,51E-09
3-F03_390	-	D	T	D	1,29E+05	2,12E-04	1,64E-09
3-F03_398	E	E	T	A	9,26E+04	1,59E-04	1,71E-09
3-F03_387	E	D	A	D	1,37E+05	2,38E-04	1,74E-09
3-F03_386	E	E	T	D	9,23E+04	1,64E-04	1,78E-09
3-F03_401	E	E	A	A	9,15E+04	1,67E-04	1,82E-09
3-F03_413	E	E	A	-	9,13E+04	1,71E-04	1,88E-09
3-F03_405	-	D	A	A	1,26E+05	2,39E-04	1,90E-09
3-F03_410	E	E	T	-	9,01E+04	1,76E-04	1,95E-09
3-F03_389	E	E	A	D	9,17E+04	1,89E-04	2,06E-09
3-F03_393	-	D	A	D	1,14E+05	2,39E-04	2,09E-09
3-F03_417	-	D	A	-	1,34E+05	2,84E-04	2,12E-09
3-F03_392	-	E	T	D	8,08E+04	1,80E-04	2,23E-09
3-F03_404	-	E	T	A	8,35E+04	1,89E-04	2,26E-09
3-F03_419	-	E	A	-	8,28E+04	2,00E-04	2,41E-09
3-F03_416	-	E	T	-	9,01E+04	2,21E-04	2,45E-09
3-F03_407	-	E	A	A	8,74E+04	2,35E-04	2,69E-09
3-F03_395	-	E	A	D	7,12E+04	2,10E-04	2,94E-09
3-F03_388	E	S	A	D	1,15E+05	8,68E-04	7,56E-09
3-F03_397	E	S	T	A	6,07E+04	4,89E-04	8,04E-09
3-F03_385	E	S	T	D	6,33E+04	5,38E-04	8,50E-09
3-F03_400	E	S	A	A	6,15E+04	5,29E-04	8,60E-09
3-F03_409	E	S	T	-	6,02E+04	5,46E-04	9,06E-09
3-F03_403	-	S	T	A	5,79E+04	5,41E-04	9,34E-09
3-F03_415	-	S	T	-	5,99E+04	6,06E-04	1,01E-08
3-F03_391	-	S	T	D	5,69E+04	5,84E-04	1,03E-08
3-F03_406	-	S	A	A	7,41E+04	7,65E-04	1,03E-08
3-F03_412	E	S	A	-	5,27E+04	6,38E-04	1,21E-08
3-F03_394	-	S	A	D	4,84E+04	6,30E-04	1,30E-08
3-F03_418	-	S	A	-	5,55E+04	7,99E-04	1,44E-08

Для исследования связывания сконструированных вариантов 3-F03 с CD73 на клеточной поверхности клетки MDA-MB-231 промывали и помещали в 96-луночные планшеты в концентрации 5×10^4 клеток/луночку. Клетки окрашивали антителами в указанных концентрациях в течение 1 часа на льду. Затем клетки промывали и окрашивали вторичным антителом козы против мыши, конъюгированным с PE, в течение 30 минут на льду. Затем клетки промывали и анализировали методом проточной цитометрии. СГИФ окрашивания CD73 представлена на графике (фиг. 22). Каждый из вариантов 3-F03 имел подобный профиль связывания, за исключением 3-F03_417, который продемонстрировал несколько более высокое значение Y_{max} (фиг. 22). Эти данные подтверждают исследования по технологии Biacore (таблица 8): указанные мутации не привели к существенному изменению связывания CD73 человека для указанных вариантных клонов.

Чтобы проверить способность вариантов 3-F03 ингибировать активность клеточного CD73, клетки MDA-MB-231 промывали бессывороточной средой RPMI и высевали по 1×10^4 клеток/луночку в 96-луночные планшеты. Клетки инкубировали с антителами или APCP в указанных концентрациях при температуре 37°C с 5% CO_2 в течение 30 минут. Затем добавляли АМФ до конечной концентрации в 100 мкМ и инкубировали клетки еще 3 часа при температуре 37°C с 5% CO_2 . Планшеты центрифугировали в течение 1-2 минут при 300 g и переносили по 25 мкл супернатанта в новые 96-луночные планшеты. Применяли анализ АМФ-Glo в соответствии с инструкциями производителя. В данном анализе ОЕЛ напрямую коррелируют с концентрацией АМФ. Антитело 3-F03 продемонстрировало максимальное ингибирование среди вариантов 3-F03 (фиг. 23). Варианты 3-F03_417, 3-F03_411 и 3-F03_413 продемонстрировали немного более низкую активность, чем 3-F03 (фиг. 23). Вариант 3-F03_412 не ингибировал мембранно-связанный CD73 на MDA-MB-231 клетках (фиг. 23).

Пример 23: уровни аденозина в опухолях, на которые воздействовали антителом против CD73

Способность HzCL25 и 3-F03 модулировать внутриопухолевый аденозин оценивали *in vivo*. Самкам мышей, восстановленным клетками CD34+ человека (возраст 29 недель; The Jackson Laboratory, г. Бар Харбор, штат Массачусетс, США) подкожно инокулировали по 3×10^6 клеток MDA-MB-231 (ATCC# HTB-26), суспендированных в матригеле (Corning Life Sciences), в левую боковую область брюха; в каждой группе воздействия было по три мыши. Лечение несущих опухоль мышей начинали через 10 суток после инокуляции, когда объем опухоли достигал около 240 мм^3 . HzCL25, 3-F03 или изотипический IgG-контроль разводили до 1 мг/мл в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) и вводили мышам путем внутрибрюшинной инъекции в дозе 10 мг/кг на 12-е сутки и повторно, через 5 суток, на 17-е сутки. На 18-е сутки мышам подвергали эвтаназию, опухоли выделяли хирургическим путем, помещали в криопробирки и замораживали в жидком азоте.

Чтобы определить концентрацию аденозина в опухолях, образцы замороженной

ткани разрезали и подвергали количественному масс-спектрометрическому сканированию (МСС) MALDI в трех повторностях, с пространственным разрешением в 80 мкм. На основании наборов МСС-данных, полученных из указанных срезов ткани, и серии разведений стандартов, нанесенных на контрольные срезы, выполняли количественное определение аденозина в выбранных срезах ткани с помощью программного обеспечения для множественной визуализации. Концентрации аналитов в каждой представляющей интерес области экстраполировали из калибровочной кривой. Представляющие интерес области, содержащие опухоль, идентифицировали путем окрашивания серийных срезов гематоксилином и эозином.

Как показано на **фиг. 26**, воздействие антителом HzCL25 или 3-F03 привело к снижению внутриопухолевых концентраций аденозина на 35% и 42%, соответственно.

Пример 24: ингибирование ферментативной активности CD73 антителами против CD73

Молекулярный механизм ингибирования, вызываемого антителами 3-F03 и HzCL25, исследовали с помощью ферментативного анализа, в котором использовали рекомбинантный полноразмерный CD73 и измеряли продукцию аденозина с помощью ЖХ-МС. Полученные данные анализировали с использованием модели смешанного ингибирования, и результаты для 3-F03 и HzCL25 обобщены в таблице 9.

Кратко, активность ингибирования агентов измеряли в ферментативном анализе с использованием раствора натриевой соли аденозин- $^{13}\text{C}_{10}$, $^{15}\text{N}_5$ -5'-монофосфата (650676, Sigma) в качестве субстрата, а продукт - аденозин - выявляли с помощью ЖХ-МС. Антитела последовательно разводили в буфере и переносили по 5 мкл в 96-луночный планшет. В планшет добавляли по 20 мкл рекомбинантного CD73 в концентрации 0,5 пМ в буфере для анализа (25 мМ Tris, 5 мМ MgCl_2 , 0,005% Brij35 pH 7,5) и преинкубировали в течение 2 часов при температуре 25°C. Анализ начинали добавлением 25 мкл раствора, содержащего АМФ в различных концентрациях. Реакции проводили в течение 0,5 часа при температуре 25°C, а затем останавливали с помощью 50 мкл метанола.

Результаты показали, что HzCL25 является неконкурентным ингибитором со значением K_i , равным $0,3 \pm 0,2$ нМ, и значением α , близким к единице (**фиг. 27**). 3-F03 представляет собой смешанный ингибитор с K_i , равным $1,5 \pm 0,7$ нМ, и α , равным 19 ± 12 , что указывает на то, что 3-F03 обладает более высокой аффинностью к свободному ферменту, чем к ферментативному субстрату, и демонстрирует конкурентную природу (**фиг. 28**).

Кроме того, антитело HzCL25 продемонстрировало «хук-эффект», при котором наблюдалась потеря ингибирования при высоких концентрациях агента (**фиг. 29**). Это указывает на то, что стехиометрия молекулярных взаимодействий HzCL25 и CD73 изменяется по мере изменения соотношения их концентраций, что смещает популяцию молекул от ингибированных форм к неингибированным формам.

Таблица 9. Обобщение кинетических параметров для HzCL25 и 3-F03.

Агент	Механизм действия	K_i (нМ)	α	K_m (мкМ)
-------	-------------------	------------	----------	-------------

3-F03 IgG	Смешанное ингибирование	$1,5 \pm 0,7$	19 ± 12	$1,4 \pm 0,5$
H _z CL25 IgG	Неконкурентное ингибирование	$0,3 \pm 0,2$	$2,1 \pm 1,7$	$0,9 \pm 0,3$

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Хотя данное изобретение было изложено в сочетании с его подробным описанием, вышеприведенное описание предназначено для иллюстрации, а не для ограничения объема данного изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации входят в объем следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое связывается с CD73 человека, при этом антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область VH (CDR)1, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO: 1);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO: 2); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFY (SEQ ID NO: 3); и

при этом антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO: 4);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO: 5); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO: 6).

2. Антитело по п. 1, где домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22.

3. Антитело по п. 1, где антитело содержит тяжелую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24.

4. Антитело по п. 1, где домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23.

5. Антитело по п. 1, где антитело содержит легкую цепь, при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25.

6. Антитело по п. 1, где домен VH по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 22, и домен VL по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 23.

7. Антитело по п. 1, где домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22, и домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23.

8. Антитело по п. 1, где антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25.

9. Антитело, которое связывается с CD73 человека, при этом антитело связывается с CD73 человека в эпитопе в пределах аминокислот 40-53 из SEQ ID NO: 70.

10. Антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

11. Антитело по п. 1, п. 9 или п. 10, которое представляет собой гуманизированное антитело.

12. Антитело по любому из пп. 1-10, где антитело представляет собой биспецифическое антитело, одноцепочечное антитело, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fab', фрагмент F_{sc}, фрагмент F_v, scF_v, sc(F_v)₂ или диатело.

13. Нуклеиновая кислота или нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело по любому из пп. 1-12.

14. Вектор экспрессии или векторы экспрессии, содержащие нуклеиновую кислоту или нуклеиновые кислоты по п. 13, функционально связанные с промотором.

15. Выделенная клетка, содержащая нуклеиновую кислоту или нуклеиновые кислоты по п. 13, или вектор экспрессии или векторы экспрессии по п. 14.

16. Выделенная клетка, содержащая первый вектор экспрессии, содержащий первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, содержащий домен VH антитела по любому из пп. 1-12, функционально связанную с промотором, и второй вектор экспрессии, содержащий вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, содержащий домен VL антитела по любому из пп. 1-12, функционально связанную с промотором.

17. Выделенная клетка, которая продуцирует антитело по любому из пп. 1-12.

18. Способ получения антитела по любому из пп. 1-12, включающий в себя культивирование клетки по п. 15 или п. 16 и выделение антитела.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 1-12, и фармацевтически приемлемый носитель.

20. Способ лечения злокачественного новообразования у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий в себя введение субъекту-человеку эффективного количества антитела по любому из пп. 1-12.

21. Способ по п. 20, где злокачественное новообразование характеризуется высокоаденозиновым профилем.

22. Способ по п. 20 или п. 21, где злокачественное новообразование представляет собой рак головы и шеи, колоректальный рак, рак легкого, меланому, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак печени или почечно-клеточную карциному.

23. Антитело, которое связывается с CD73 человека, при этом антитело содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область VH (CDR)1, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GFTFSSYD (SEQ ID NO: 34);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность MSYDGSNK (SEQ ID NO: 35) или MSYEGSNK (SEQ ID NO: 40); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ATEIAAKGDY (SEQ ID

NO: 36); и

при этом антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO: 37);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AAS (SEQ ID NO: 38); и
CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39).

24. Антитело по п. 23, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GFTFSSYD (SEQ ID NO: 34);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность MSYDGSNK (SEQ ID NO: 35);

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ATEIAAKGDY (SEQ ID NO: 36);

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO: 37);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AAS (SEQ ID NO: 38); и
CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39).

25. Антитело по п. 24, где домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 62.

26. Антитело по п. 24, где антитело содержит тяжелую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30.

27. Антитело по п. 24, где домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61.

28. Антитело по п. 24, где антитело содержит легкую цепь, при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31.

29. Антитело по п. 24, где домен VH по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 62, и домен VL по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 61.

30. Антитело по п. 24, где домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 62, и домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61.

31. Антитело по п. 24, где антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31.

32. Антитело по п. 23, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GFTFSSYD (SEQ ID NO: 34);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность MSYEGSNK (SEQ ID NO: 40);

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ATEIAAKGDY (SEQ ID NO: 36);

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO: 37);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AAS (SEQ ID NO: 38); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39).

33. Антитело по п. 32, где домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 63.

34. Антитело по п. 32, где антитело содержит тяжелую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33.

35. Антитело по п. 32, где домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61.

36. Антитело по п. 32, где антитело содержит легкую цепь, при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31.

37. Антитело по п. 32, где домен VH по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 63, и домен VL по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 61.

38. Антитело по п. 32, где домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 63, и домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61.

39. Антитело по п. 32, где антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31.

40. Антитело, которое связывается с CD73 человека, где антитело связывается с CD73 человека в эпитопе в пределах аминокислот 386-399 и 470-489 из SEQ ID NO: 70.

41. Антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

42. Антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

43. Антитело по п. 23, п. 32, п. 40, п. 41 или п. 42, которое представляет собой гуманизированное антитело.

44. Антитело по любому из пп. 23-42, где антитело представляет собой биспецифическое антитело, одноцепочечное антитело, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fab', фрагмент F_{sc}, фрагмент F_v, scF_v, sc(F_v)₂ или диатело.

45. Нуклеиновая кислота или нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело по любому из пп. 23-44.

46. Вектор экспрессии или векторы экспрессии, содержащие нуклеиновую кислоту или нуклеиновые кислоты по п. 45, функционально связанные с промотором.

47. Выделенная клетка, содержащая нуклеиновую кислоту или нуклеиновые кислоты по п. 45, или вектор экспрессии или векторы экспрессии по п. 46.

48. Выделенная клетка, содержащая первый вектор экспрессии, содержащий первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, содержащий домен VH антитела по любому из пп. 23-44, функционально связанную с промотором, и второй вектор экспрессии, содержащий вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, содержащий домен VL антитела по любому из пп. 23-44, функционально связанную с промотором.

49. Выделенная клетка, которая продуцирует антитело по любому из пп. 23-44.

50. Способ получения антитела по любому из пп. 23-44, включающий в себя культивирование клетки по п. 47 или п. 48 и выделение антитела.

51. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп. 23-44 и фармацевтически приемлемый носитель.

52. Способ лечения злокачественного новообразования у субъекта-человека, нуждающегося в этом, включающий в себя введение субъекту-человеку эффективного количества антитела по любому из пп. 23-44.

53. Способ по п. 52, где злокачественное новообразование характеризуется высокоаденозиновым профилем.

54. Способ по п. 52 или п. 53, где злокачественное новообразование представляет собой рак головы и шеи, колоректальный рак, рак легкого, меланому, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак печени или почечно-клеточную карциному.

По доверенности

1/51

Фиг. 1А**CL25_hu_10-4 VH**

EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYTF TSYGLSWVRQMPGKGLEWMGEIYPGSG
NTYYNEKFKGQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMY YCARYDYL GSSYGFDYWG
AGTTVTVSS (SEQ ID NO:22)

CL25_hu_10-4 VL

DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLLYSASYRYS
GVPSRFRSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO:80)

HzCL25 VH

EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYTF TSYGLSWVRQMPGKGLEWMGEIYPGSG
NTYYNEKFKGQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMY YCARYDYL GSSYGFDYWG
AGTTVTVSS (SEQ ID NO:22)

HzCL25 VL

DIVMTQSPDSLAVSLGERAT INCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYSASYRYS
GVPDFRSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDEVAVYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO:23)

CL25_hu_10-6 VH

EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYTF TSYGLSWVRQMPGKGLEWMGEIYPGSG
NTYYNEKFKGQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMY YCARYDYL GSSYGFDYWG
AGTTVTVSS (SEQ ID NO:22)

CL25_hu_10-6 VL

AIRMTQSPSSFSA STGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYS
GVPSRFRSGSGSGTDFTLTIS CLQSEDFATYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO:81)

CL25_hu_11-4 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTF TSYGLSWVRQATGQGLEWMGEIYPGSG
NTYYNEKFKGRVTMTANTS I STAYMELSSLRSEDTAVYYCARYDYL GSSYGFDYWG
AGTTVTVSS (SEQ ID NO:82)

CL25_hu_11-4 VL

DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLLYSASYRYS
GVPSRFRSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO:80)

Фиг. 1В**CL25_hu_11-5_VH**

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGLSWVRQATGQGLEWMGEIYPGSG
NTYYNEKFKGRVTMTANTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARYDYLGSSYGFDYWG
AGTTVTVSS (SEQ ID NO:82)

CL25_hu_11-5_VL

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYSASYRYS
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO:23)

CL25_hu_11-6_VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGLSWVRQATGQGLEWMGEIYPGSG
NTYYNEKFKGRVTMTANTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARYDYLGSSYGFDYWG
AGTTVTVSS (SEQ ID NO:82)

CL25_hu_11-6_VL

AIRMTQSPSSFSASTGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO:81)

CL25_hu_8-4_VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGLSWVRQATGQGLEWMGEIYPGSG
NTYYNEKFKGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARYDYLGSSYGFDYWG
AGTTVTVSS (SEQ ID NO:83)

CL25_hu_8-4_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYS
GVPDRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO:80)

CL25_hu_8-5_VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGLSWVRQATGQGLEWMGEIYPGSG
NTYYNEKFKGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARYDYLGSSYGFDYWG
AGTTVTVSS (SEQ ID NO:83)

CL25_hu_8-5_VL

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYSASYRYS
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO:23)

Фиг. 1С

CL25_hu_8-6 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGLSWVRQATGQGLEWMGEIYPGSG
NTYYNEKFKGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSED TAVYYCARYDYLGSSYGF DYWG
AGTTVTVSS (SEQ ID NO:83)

CL25_hu_8-6 VL

AIRMTQSPSSFSASTGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO:81)

CL25_hu_9-4 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSG
NTYYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARYDYLGSSYGF DYWG
AGTTVTVSS (SEQ ID NO:84)

CL25_hu_9-4 VL

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYS
GVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO:80)

CL25_hu_9-5 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSG
NTYYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARYDYLGSSYGF DYWG
AGTTVTVSS (SEQ ID NO:84)

CL25_hu_9-5 VL

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYSASYRYS
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEADVAVYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO:23)

CL25_hu_9-6 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSG
NTYYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARYDYLGSSYGF DYWG
AGTTVTVSS (SEQ ID NO:84)

CL25_hu_9-6 VL

AIRMTQSPSSFSASTGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO:81)

Фиг. 1D

```

CL25      QVQLVQSGAEELARPGASVKLSKRASGYTFRTSYGLSWVKQRTGQGLEWIGEIYPGSGNTYY 60
CL_hu_10-4 EVQLVQSGAEVKKKPGESLKISCKGSGYTFRTSYGLSWVRQMPGKGLEWMGEIYPGSGNTYY 60
HzCL25    EVQLVQSGAEVKKKPGESLKISCKGSGYTFRTSYGLSWVRQMPGKGLEWMGEIYPGSGNTYY 60
CL25_hu_10-6 EVQLVQSGAEVKKKPGESLKISCKGSGYTFRTSYGLSWVRQMPGKGLEWMGEIYPGSGNTYY 60
CL25_hu_9-4  QVQLVQSGAEVKKKPGSSVKVSCASGYTFRTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSGNTYY 60
CL25_hu_9-5  QVQLVQSGAEVKKKPGSSVKVSCASGYTFRTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSGNTYY 60
CL25_hu_9-6  QVQLVQSGAEVKKKPGSSVKVSCASGYTFRTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSGNTYY 60
CL25_hu_11-4 QVQLVQSGAEVKKKPGASVKVSCASGYTFRTSYGLSWVRQATGQGLEWMGEIYPGSGNTYY 60
CL25_hu_11-5 QVQLVQSGAEVKKKPGASVKVSCASGYTFRTSYGLSWVRQATGQGLEWMGEIYPGSGNTYY 60
CL25_hu_11-6 QVQLVQSGAEVKKKPGASVKVSCASGYTFRTSYGLSWVRQATGQGLEWMGEIYPGSGNTYY 60
CL25_hu_8-4  QVQLVQSGAEVKKKPGASVKVSCASGYTFRTSYGLSWVRQATGQGLEWMGEIYPGSGNTYY 60
CL25_hu_8-5  QVQLVQSGAEVKKKPGASVKVSCASGYTFRTSYGLSWVRQATGQGLEWMGEIYPGSGNTYY 60
CL25_hu_8-6  QVQLVQSGAEVKKKPGASVKVSCASGYTFRTSYGLSWVRQATGQGLEWMGEIYPGSGNTYY 60
:*** *****: :** *:*:*:*:*:*****:* *:*:*:*:*****

```

```

CL25      NEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARYDYLGSYGFDFYWGQGTTLTVS 120
CL_hu_10-4 NEKFKGQVTISADKSIISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARYDYLGSYGFDFYWGAGTTVTVS 120
HzCL25    NEKFKGQVTISADKSIISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARYDYLGSYGFDFYWGAGTTVTVS 120
CL25_hu_10-6 NEKFKGQVTISADKSIISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARYDYLGSYGFDFYWGAGTTVTVS 120
CL25_hu_9-4  NEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARYDYLGSYGFDFYWGAGTTVTVS 120
CL25_hu_9-5  NEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARYDYLGSYGFDFYWGAGTTVTVS 120
CL25_hu_9-6  NEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYFCARYDYLGSYGFDFYWGAGTTVTVS 120
CL25_hu_11-4 NEKFKGRVTMTANTSISTAYMELSSLRSEDVAVYFCARYDYLGSYGFDFYWGAGTTVTVS 120
CL25_hu_11-5 NEKFKGRVTMTANTSISTAYMELSSLRSEDVAVYFCARYDYLGSYGFDFYWGAGTTVTVS 120
CL25_hu_11-6 NEKFKGRVTMTANTSISTAYMELSSLRSEDVAVYFCARYDYLGSYGFDFYWGAGTTVTVS 120
CL25_hu_8-4  NEKFKGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDVAVYFCARYDYLGSYGFDFYWGAGTTVTVS 120
CL25_hu_8-5  NEKFKGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDVAVYFCARYDYLGSYGFDFYWGAGTTVTVS 120
CL25_hu_8-6  NEKFKGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDVAVYFCARYDYLGSYGFDFYWGAGTTVTVS 120
*****:.*: : * *****: ** :.*:*:*:***** ***** **:*

```

```

CL25      S 120 (SEQ ID NO:26)
CL_hu_10-4 S 121 (SEQ ID NO:22)
HzCL25    S 121 (SEQ ID NO:22)
CL25_hu_10-6 S 121 (SEQ ID NO:22)
CL25_hu_9-4  S 121 (SEQ ID NO:84)
CL25_hu_9-5  S 121 (SEQ ID NO:84)
CL25_hu_9-6  S 121 (SEQ ID NO:84)
CL25_hu_11-4 S 121 (SEQ ID NO:82)
CL25_hu_11-5 S 121 (SEQ ID NO:82)
CL25_hu_11-6 S 121 (SEQ ID NO:82)
CL25_hu_8-4  S 121 (SEQ ID NO:83)
CL25_hu_8-5  S 121 (SEQ ID NO:83)
CL25_hu_8-6  S 121 (SEQ ID NO:83)

```

Фиг. 1E

```

CL25      DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYNGVPD 60
HzCL25    DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYSASYRYSGVPD 60
CL25_hu_11-5  DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYSASYRYSGVPD 60
CL25_hu_8-5   DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYSASYRYSGVPD 60
CL25_hu_9-5   DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYSASYRYSGVPD 60
CL25_hu_10-4  DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSGVPS 60
CL25_hu_11-4  DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSGVPS 60
CL25_hu_8-4   DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSGVPS 60
CL25_hu_9-4   DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSGVPS 60
CL25_hu_10-6  AIRMTQSPSSFSASTGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSGVPS 60
CL25_hu_11-6  AIRMTQSPSSFSASTGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSGVPS 60
CL25_hu_8-6   AIRMTQSPSSFSASTGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSGVPS 60
CL25_hu_9-6   AIRMTQSPSSFSASTGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSGVPS 60
* **** . :. * * : * : * . ***** : ****.*****.***.

```

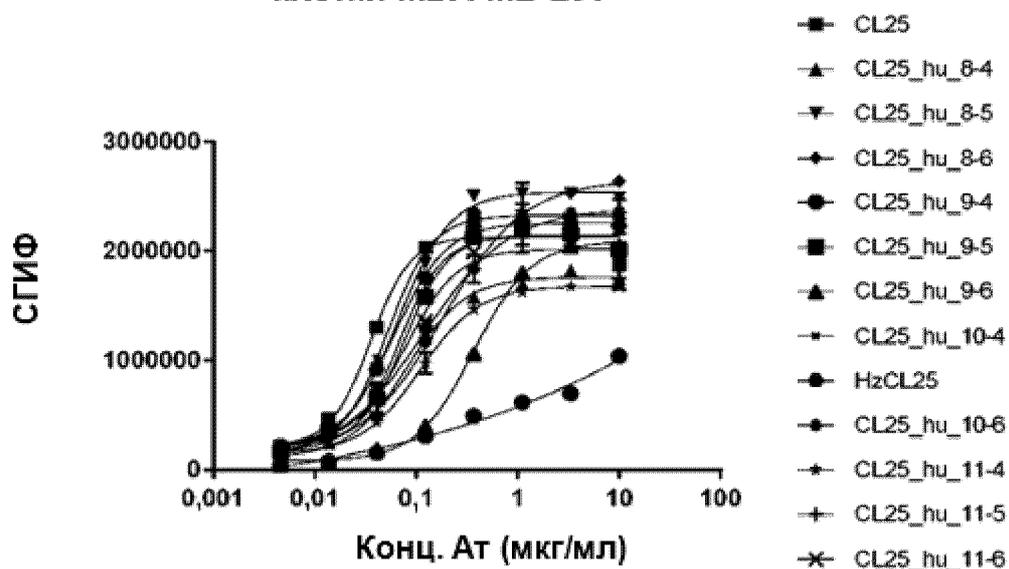
```

CL25      RFTSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:27)
HzCL25    RFTSGSGTDFTLTISSLQAEDEVAVYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:23)
CL25_hu_11-5  RFTSGSGTDFTLTISSLQAEDEVAVYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:23)
CL25_hu_8-5   RFTSGSGTDFTLTISSLQAEDEVAVYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:23)
CL25_hu_9-5   RFTSGSGTDFTLTISSLQAEDEVAVYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:23)
CL25_hu_10-4  RFTSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:80)
CL25_hu_11-4  RFTSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:80)
CL25_hu_8-4   RFTSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:80)
CL25_hu_9-4   RFTSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:80)
CL25_hu_10-6  RFTSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:81)
CL25_hu_11-6  RFTSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:81)
CL25_hu_8-6   RFTSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:81)
CL25_hu_9-6   RFTSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:81)
**;*****;*;***;* **.* *****

```

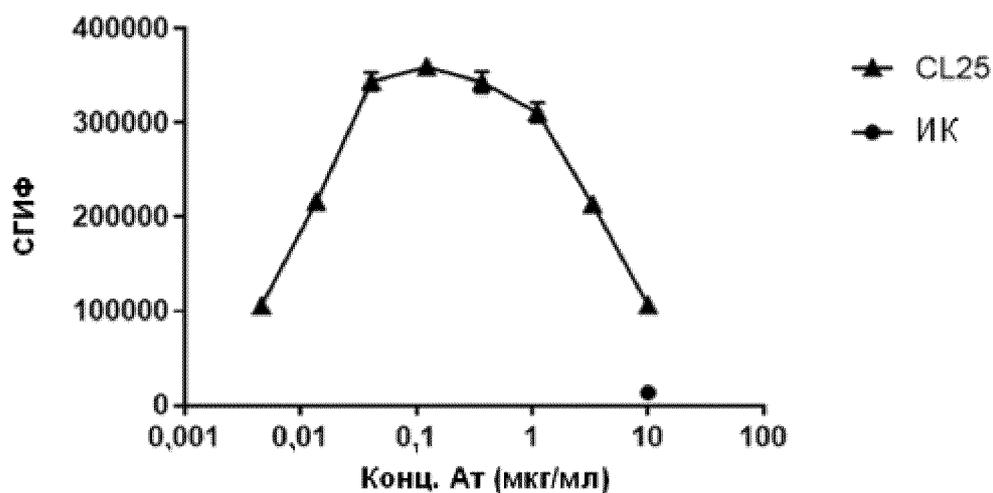
Фиг. 2А

Клеточное связывание –
клетки MDA-MB-231



Фиг. 2В

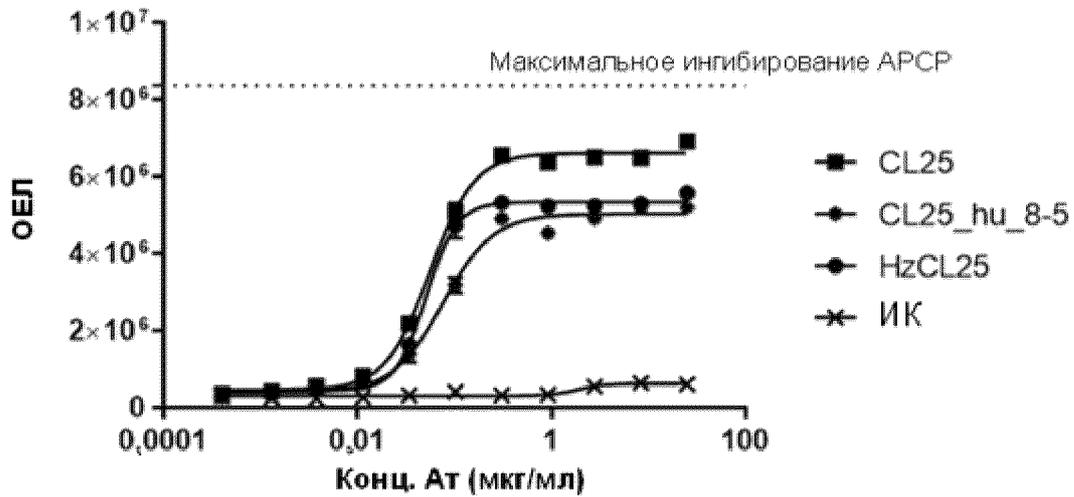
Клеточное связывание – клетки А375



7/51

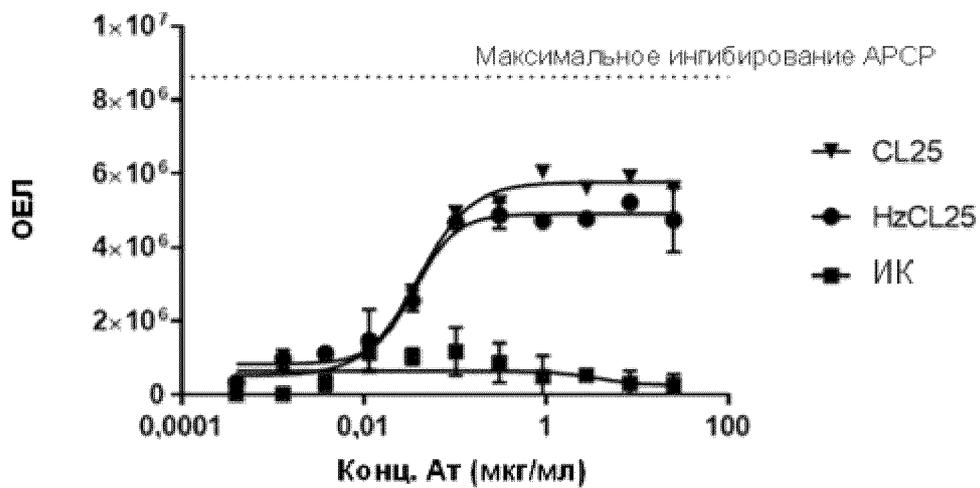
Фиг. 3А

Ингибирование клеточного CD73 – клетки A375



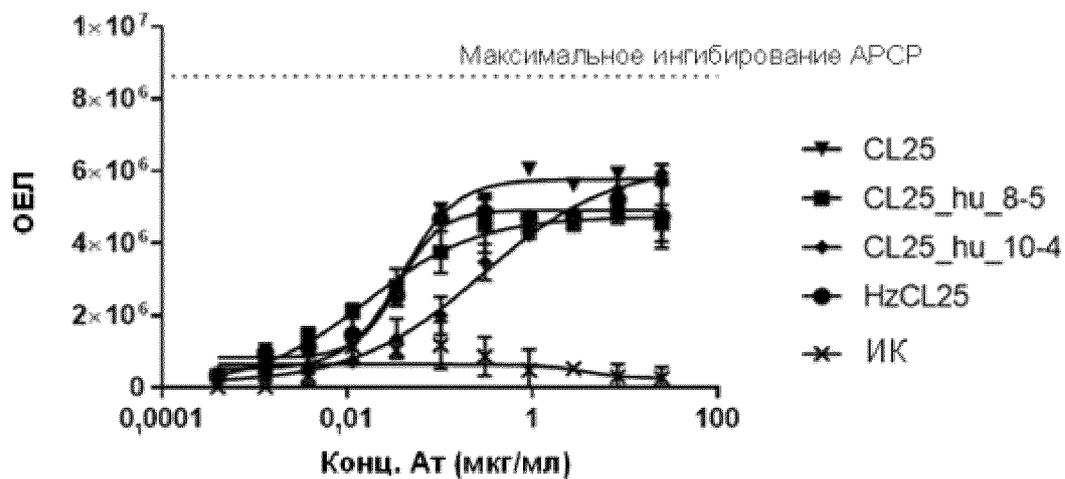
Фиг. 3В

Ингибирование клеточного CD73 – клетки MDA-MB-231



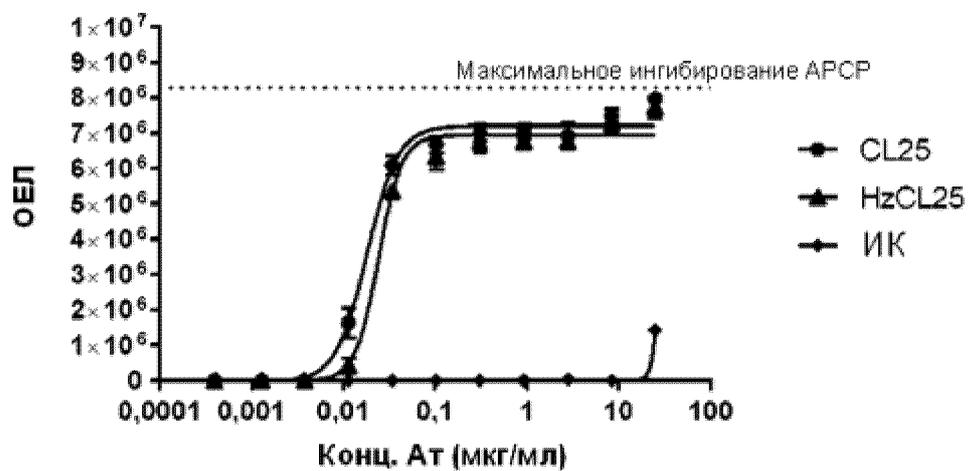
Фиг. 3С

Ингибирование клеточного CD73 – клетки MDA-MB-231

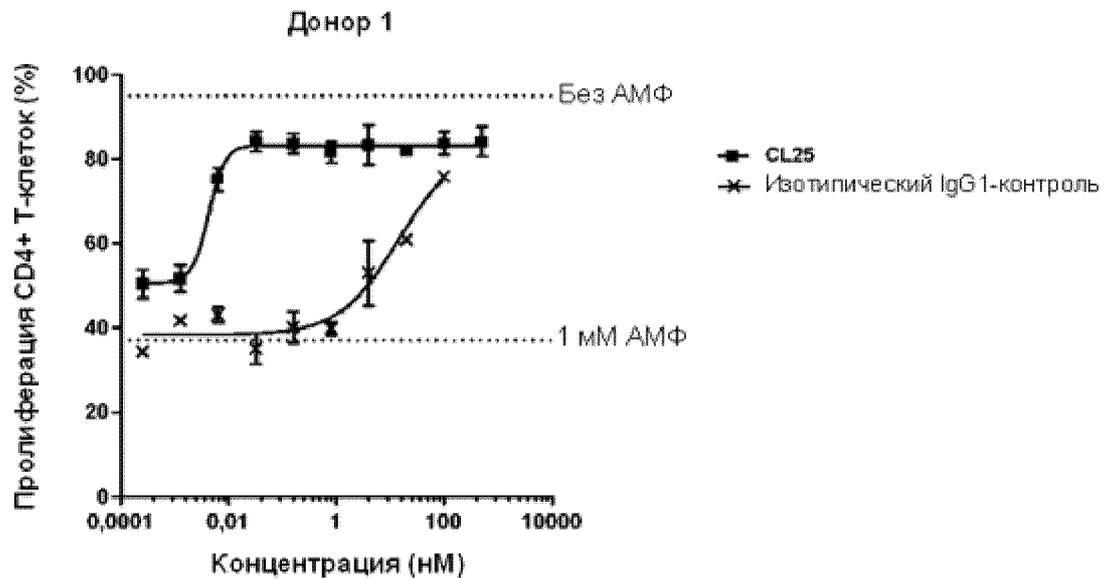


Фиг. 4

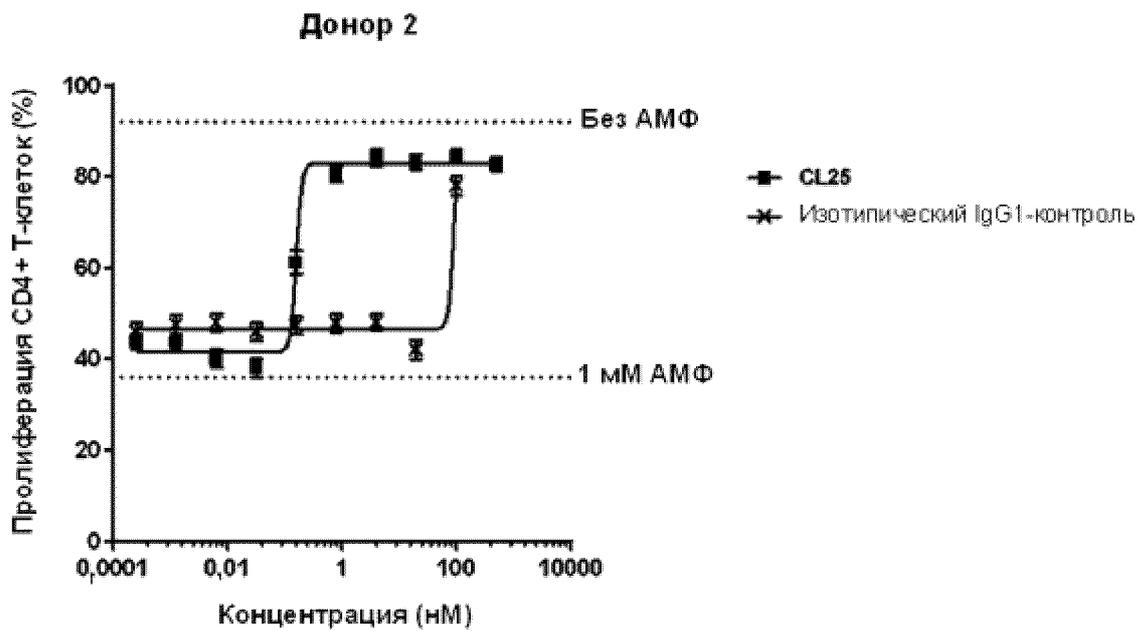
Ингибирование рекомбинантного CD73



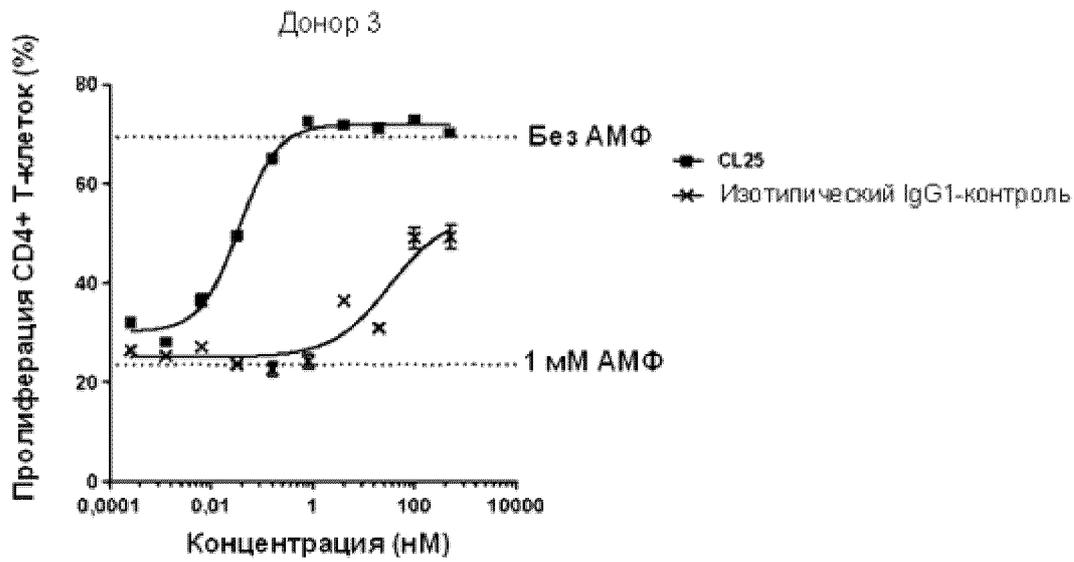
Фиг. 5А



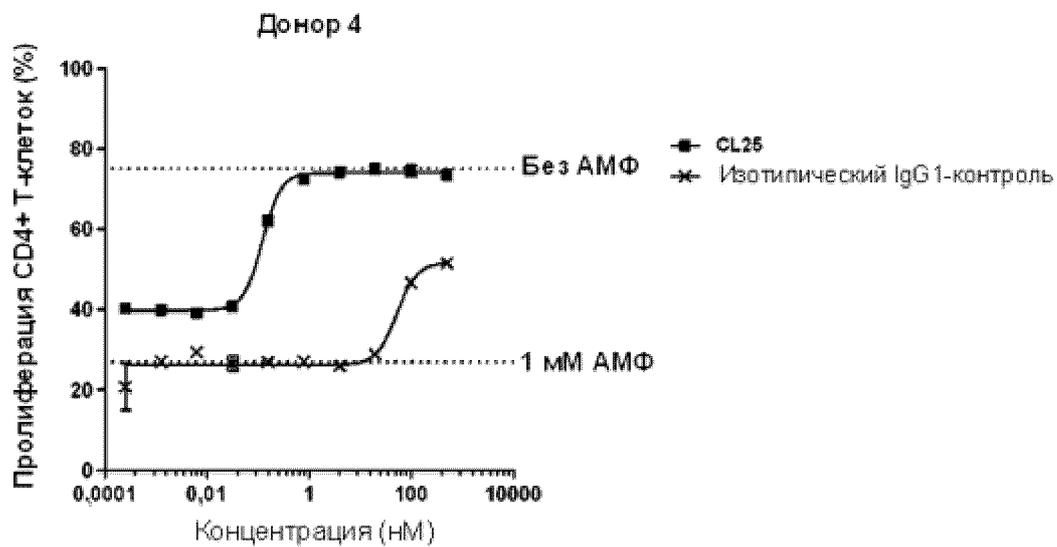
Фиг. 5В



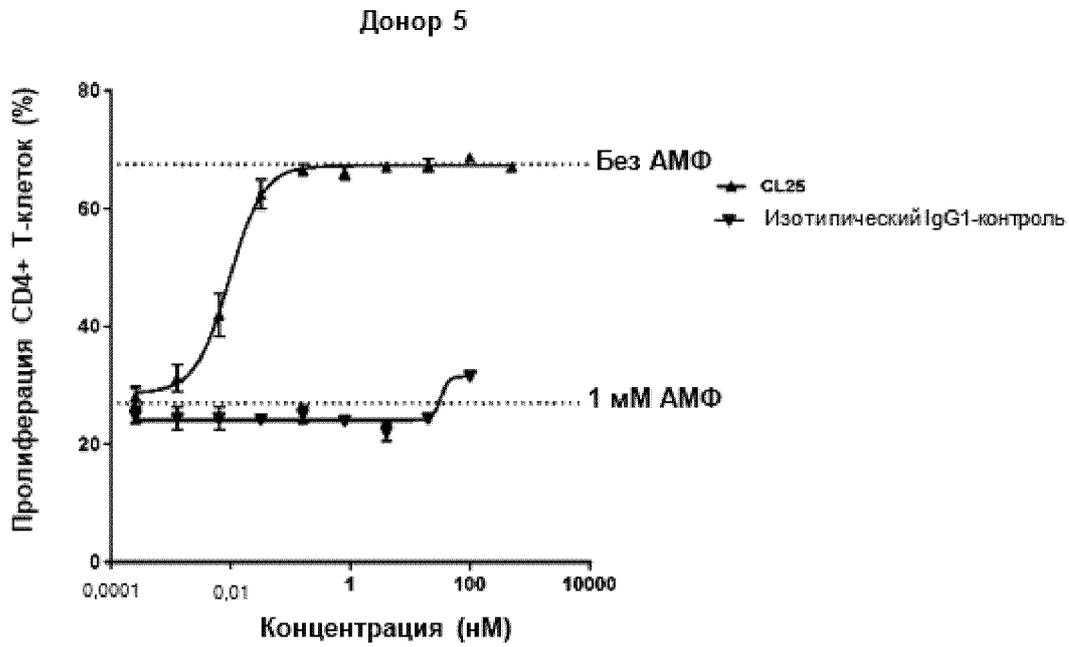
Фиг. 5С



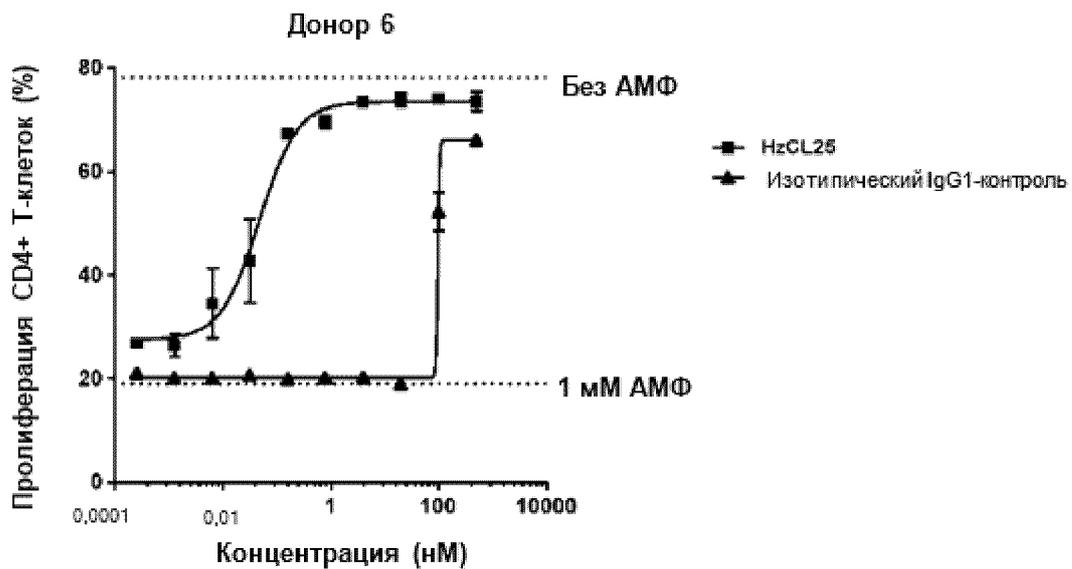
Фиг. 5D



Фиг. 5Е

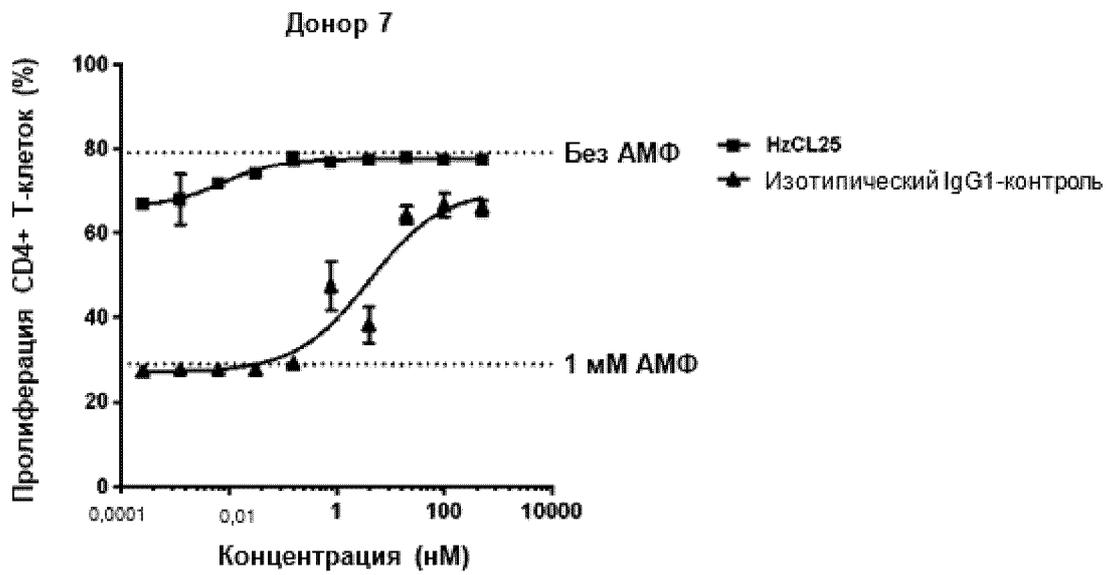


Фиг. 5F

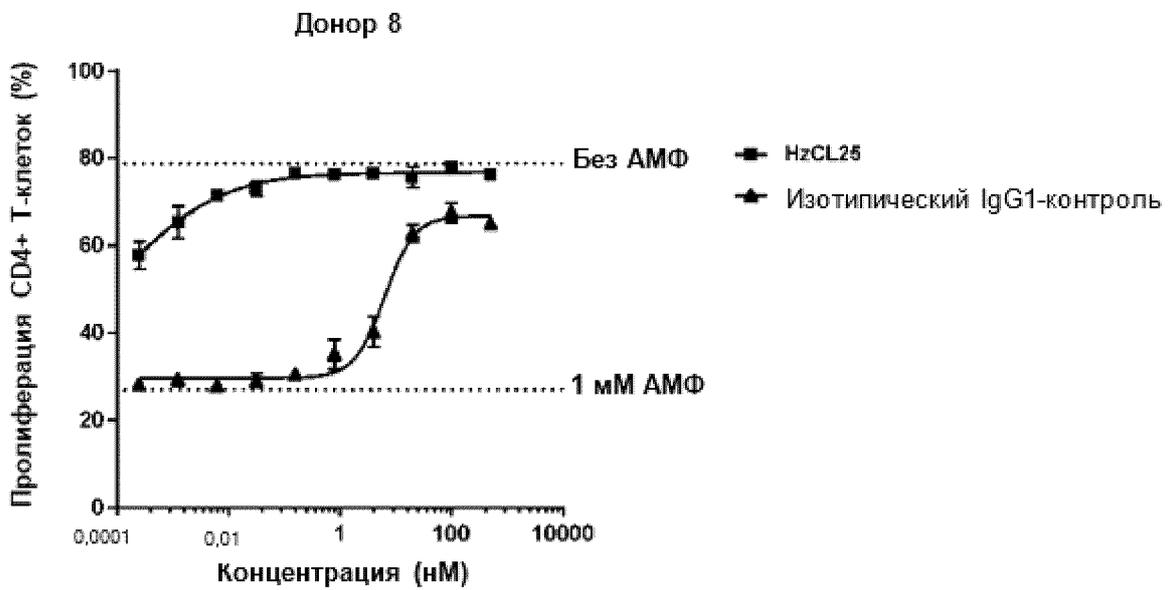


13/51

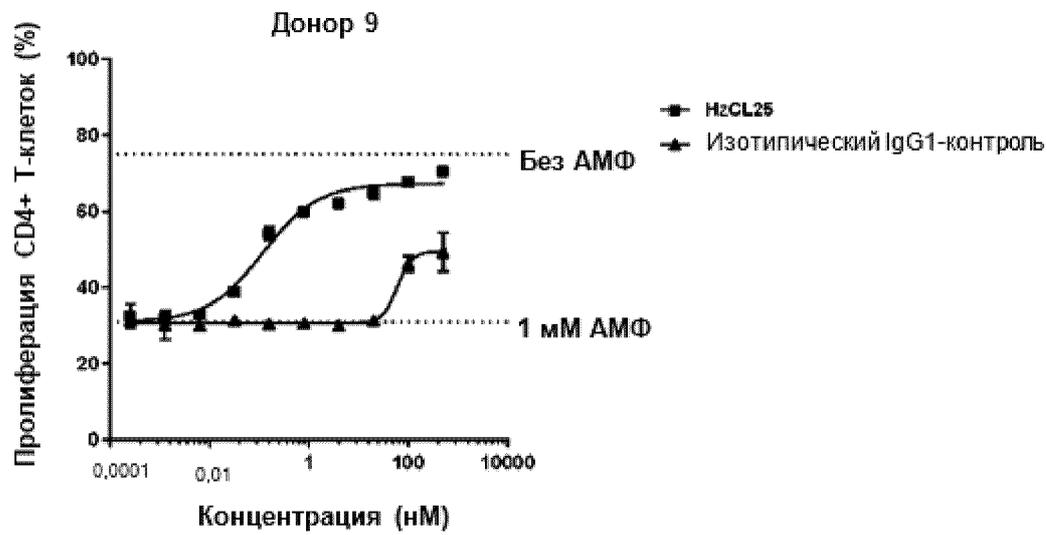
Фиг. 5G



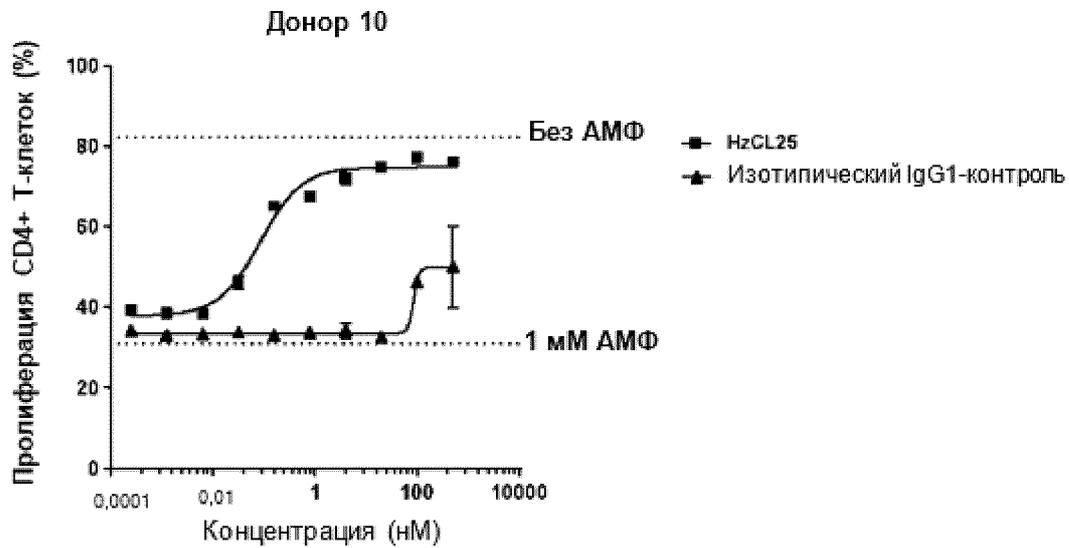
Фиг. 5H



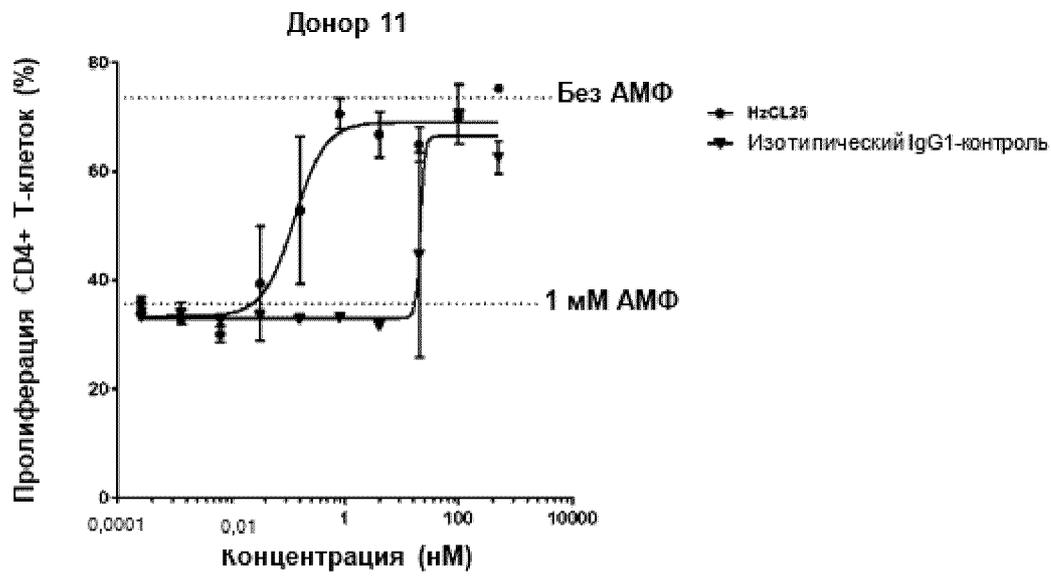
Фиг. 5I



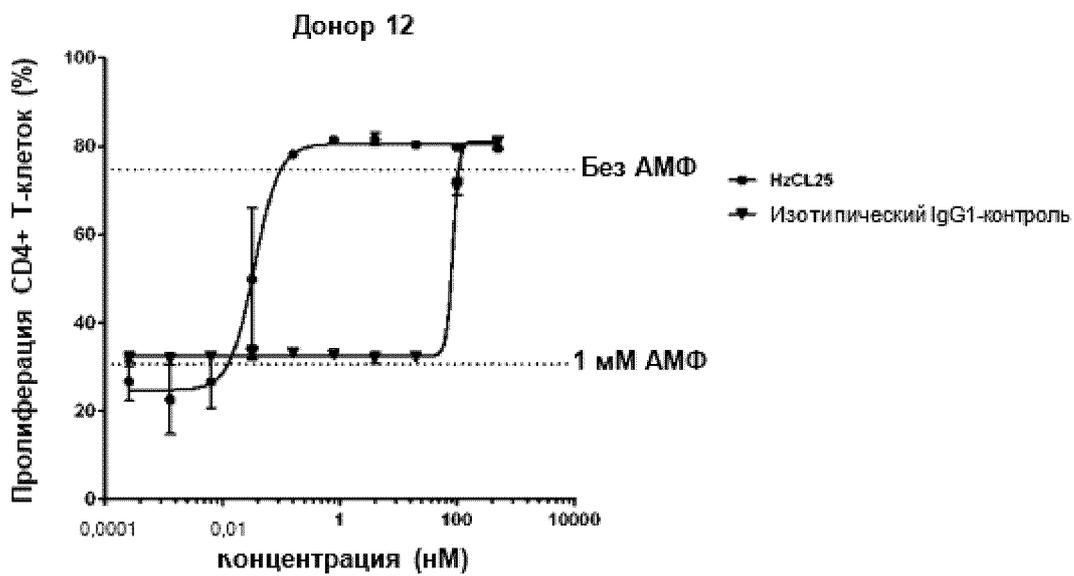
Фиг. 5J



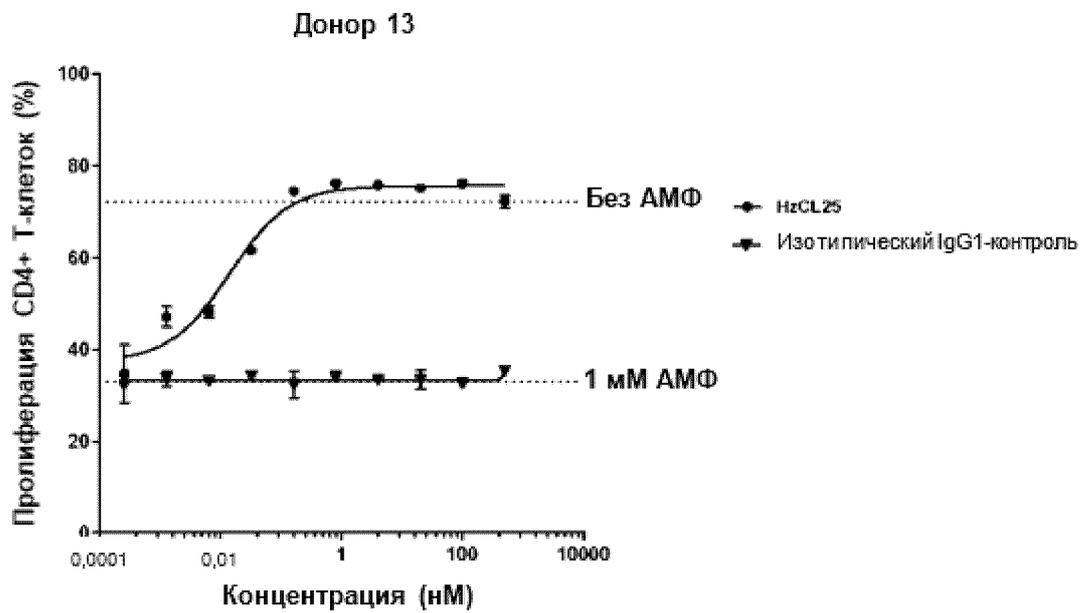
Фиг. 5К



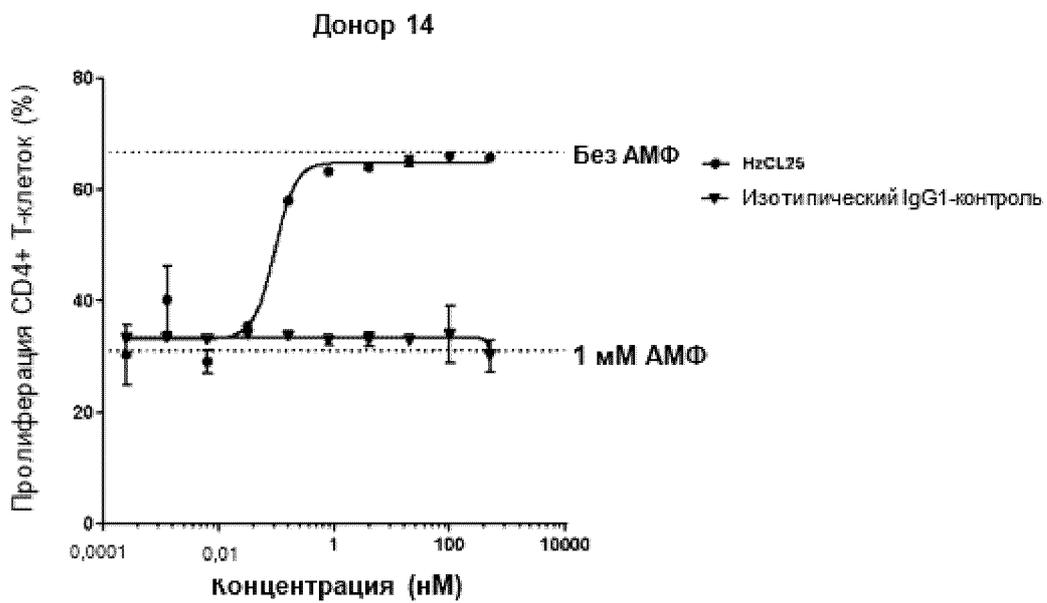
Фиг. 5L



Фиг. 5М

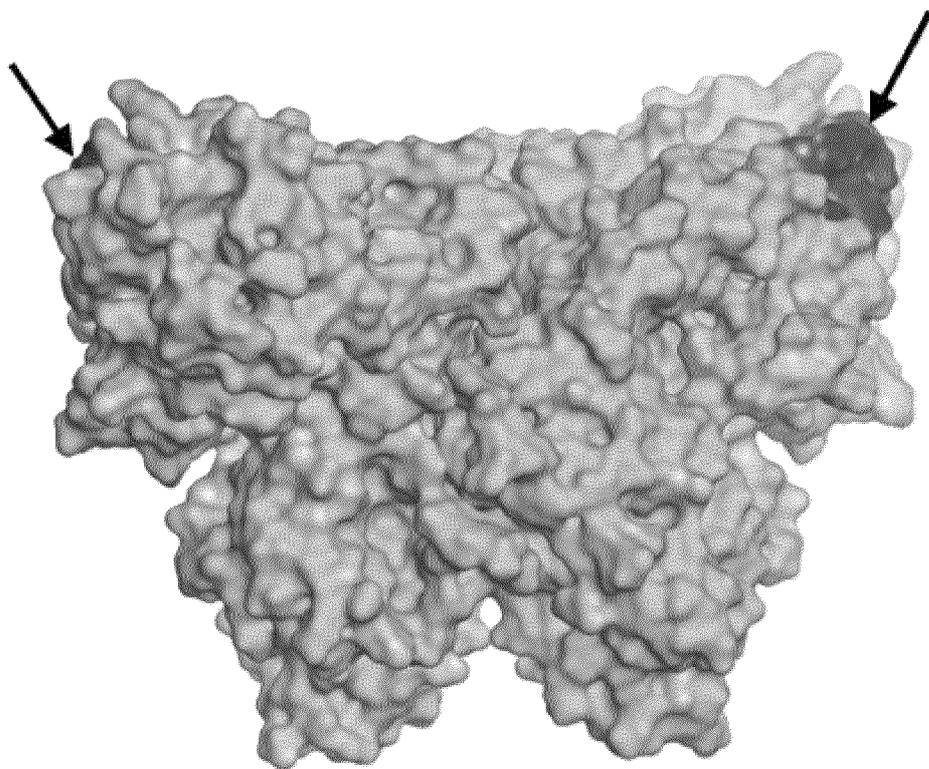


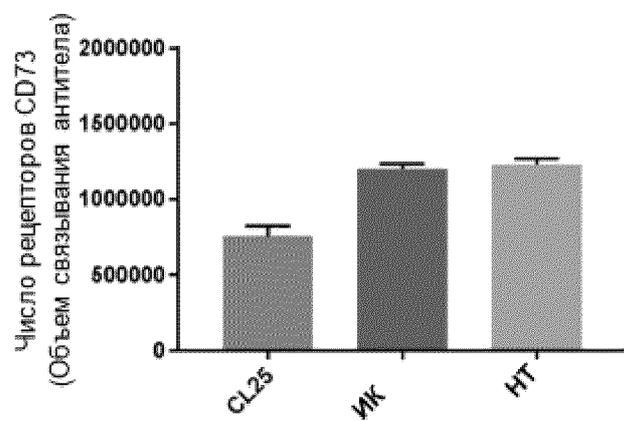
Фиг. 5N



17/51

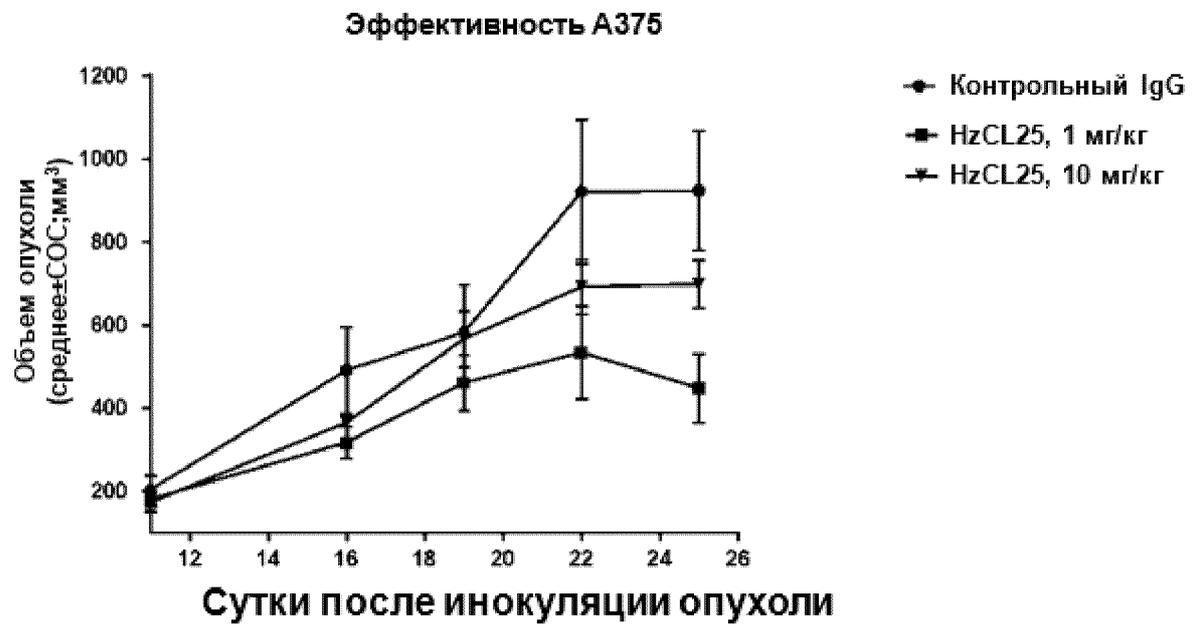
ФИГ. 6



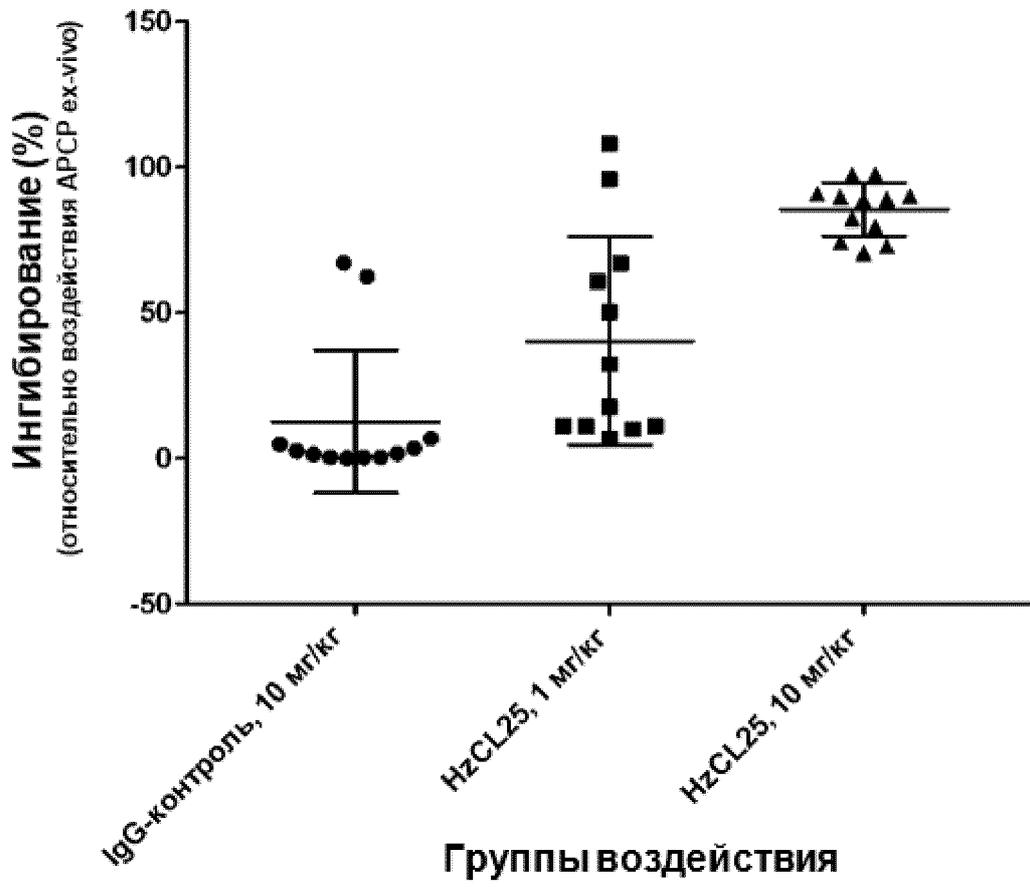
Фиг. 7**Поверхностный CD73 после 24-часовой инкубации с антителом**

19/51

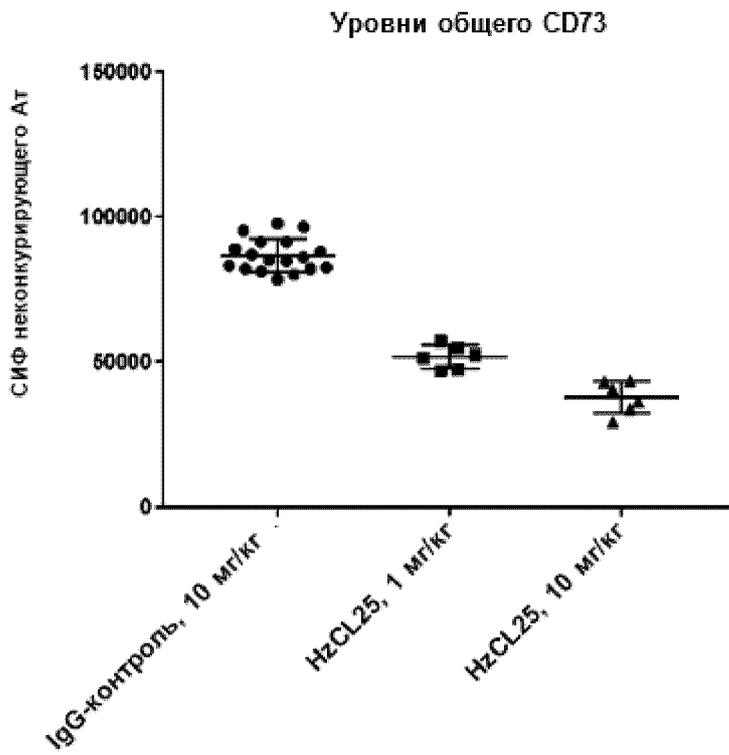
Фиг. 8



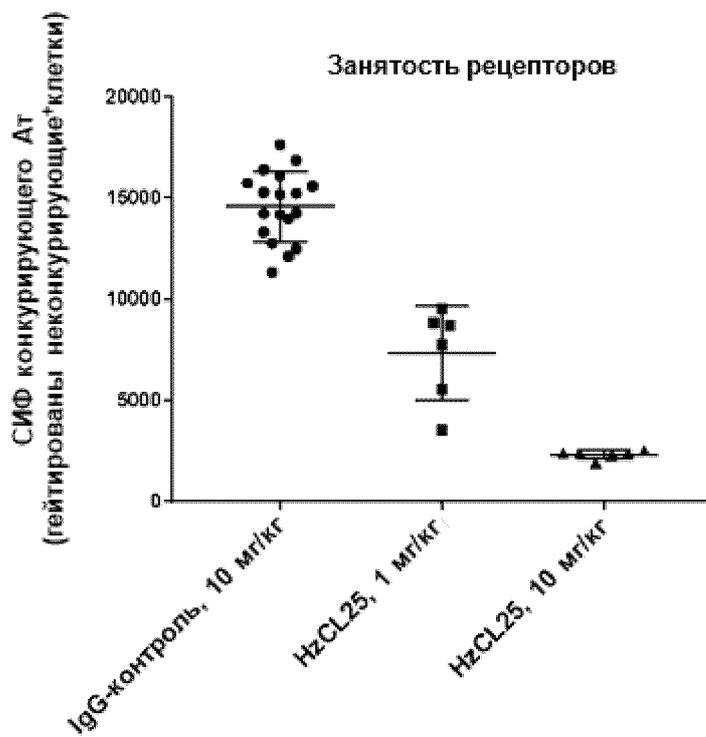
Фиг. 9



Фиг. 10А

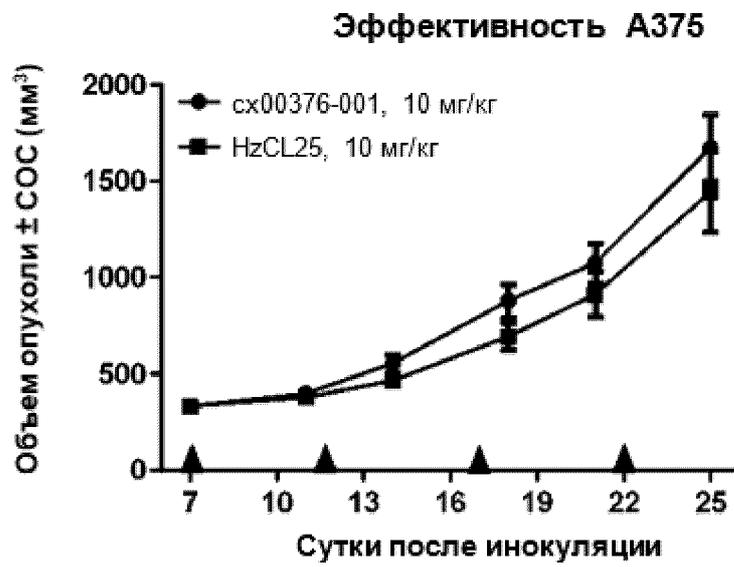


Фиг. 10В

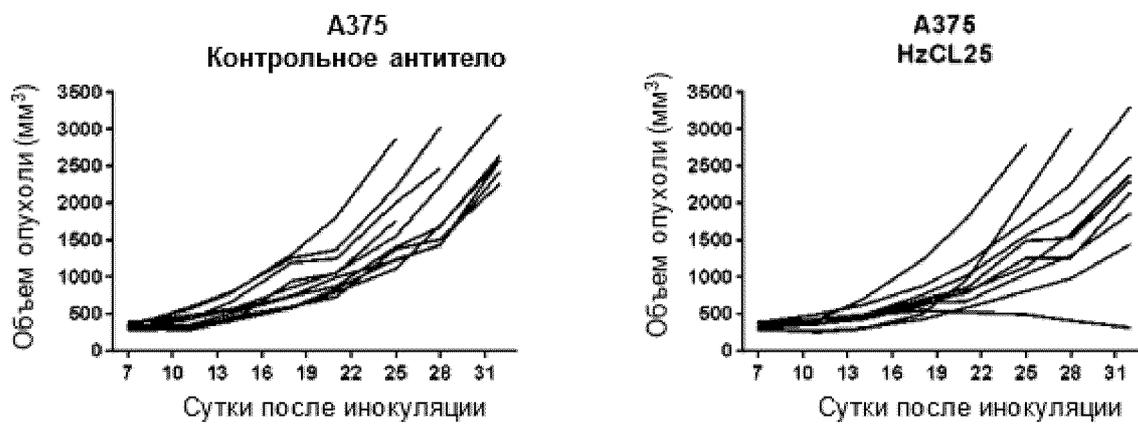


22/51

Фиг. 11А

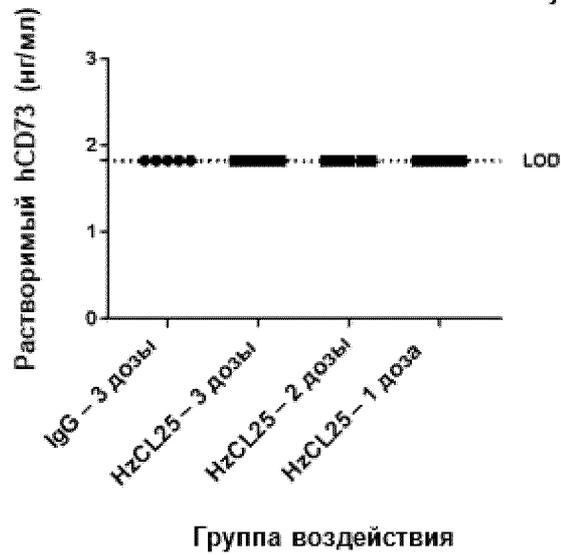


Фиг. 11В

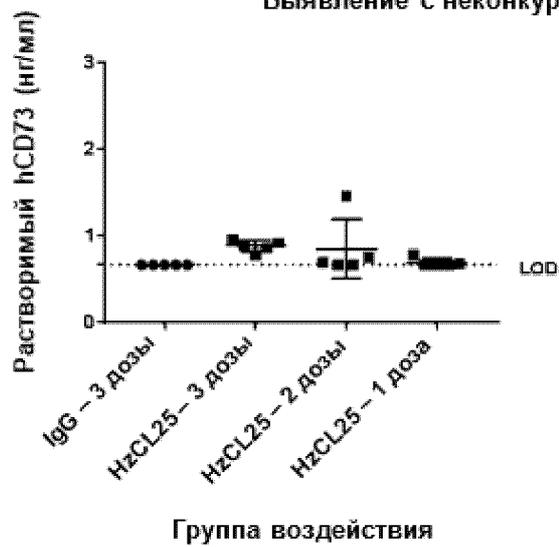


Фиг. 12

Свободный растворимый hCD73 в сыворотке крови мышей после воздействия антителами
Выявление с конкурирующим Ат

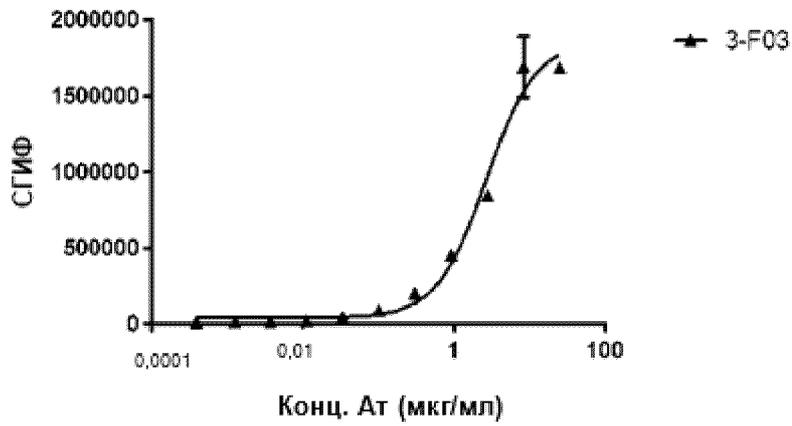


Общий растворимый hCD73 в сыворотке крови мышей после воздействия антителами
Выявление с неконкурирующим Ат



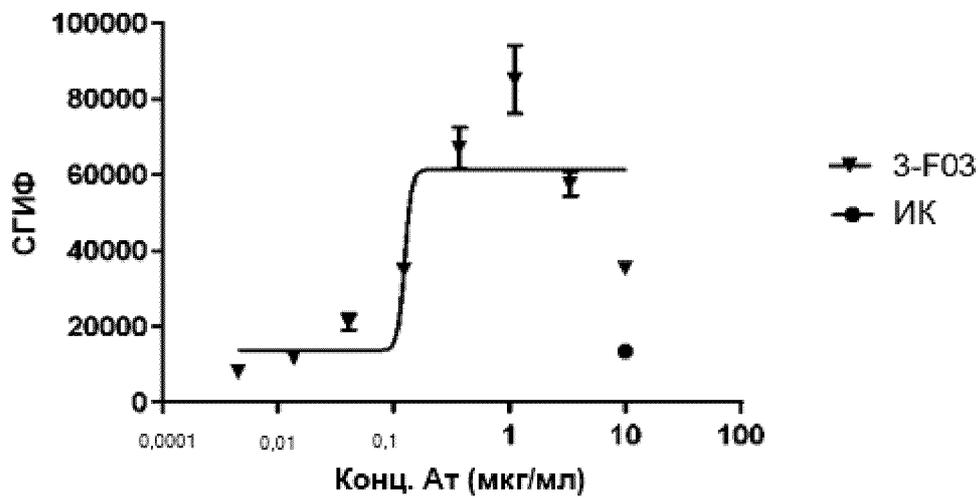
Фиг. 13А

Клеточное связывание – клетки MDA-MB-231



Фиг. 13В

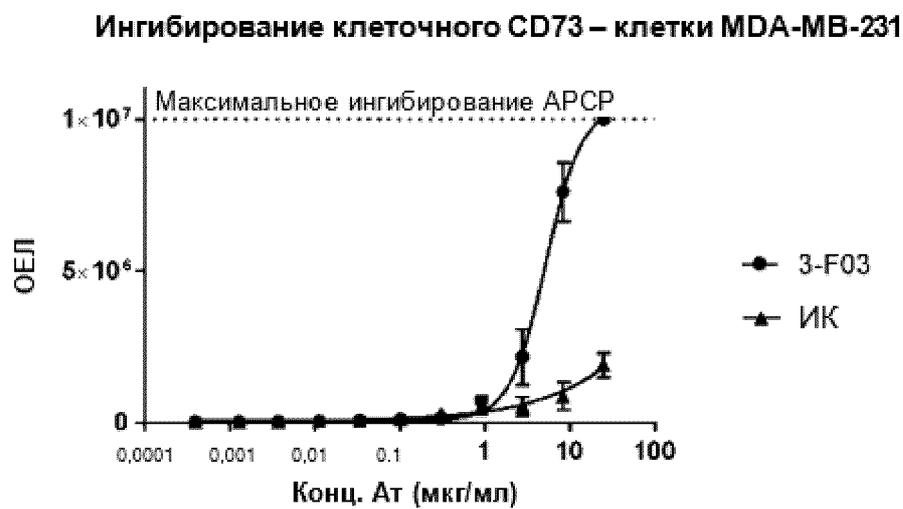
Клеточное связывание – клетки А375



Фиг. 14А

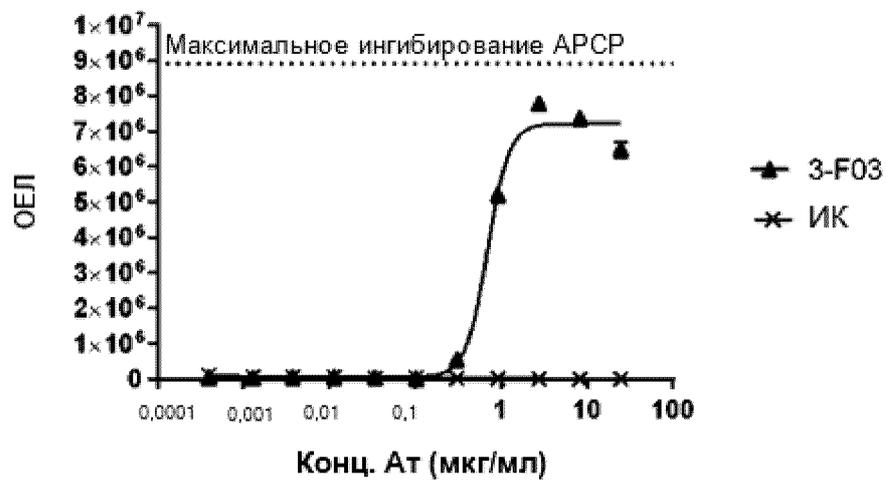


Фиг. 14В

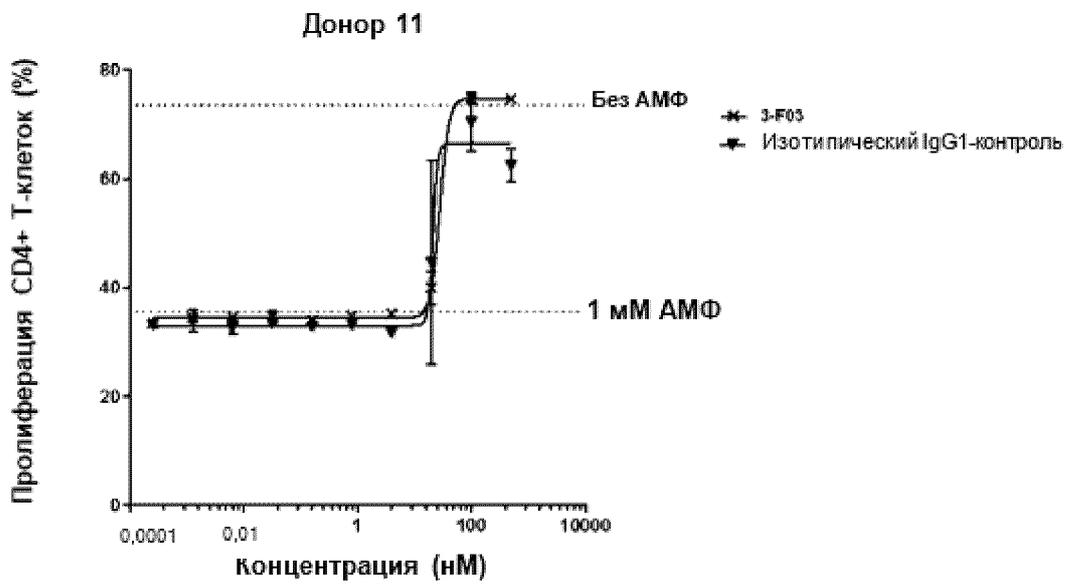


Фиг. 15

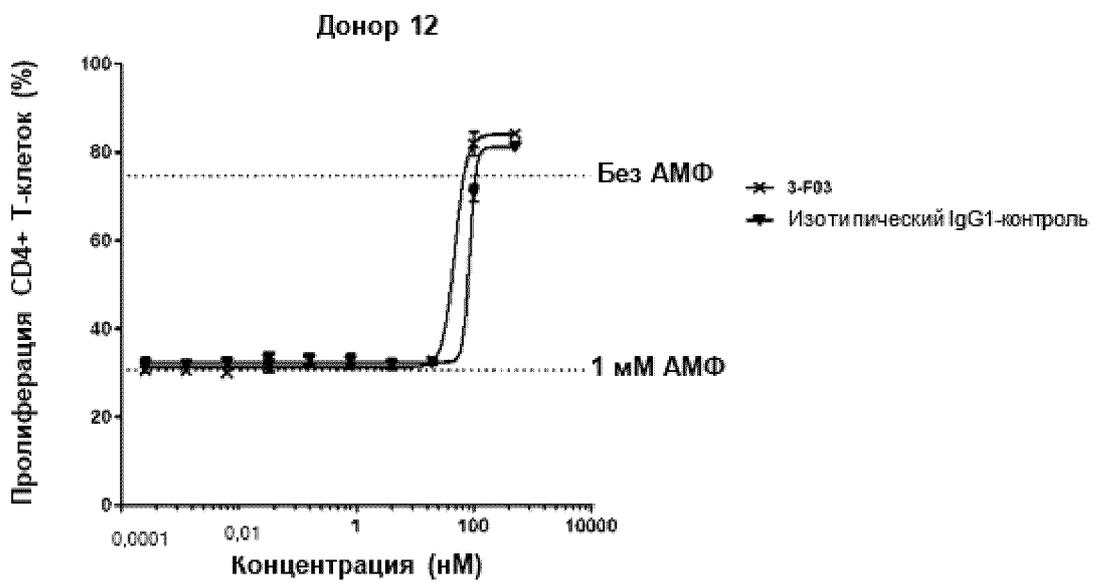
Ингибирование рекомбинантного CD73



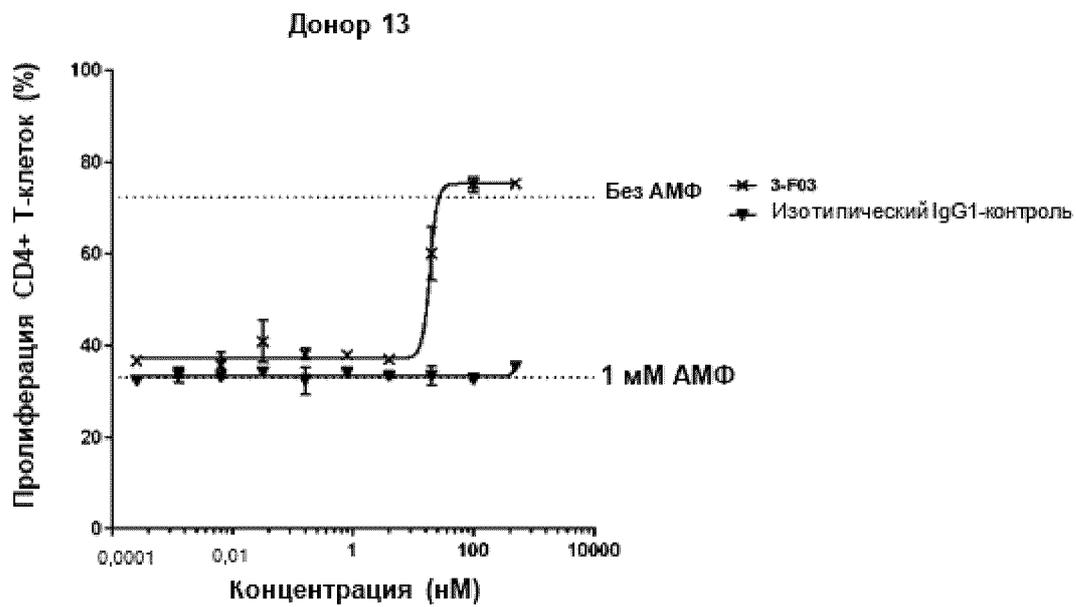
Фиг. 16А



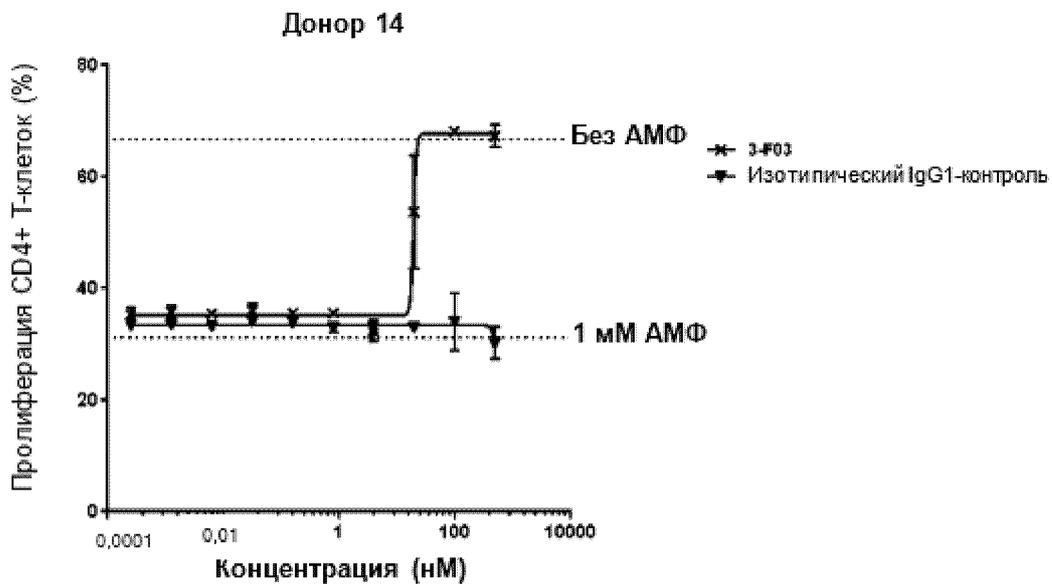
Фиг. 16В



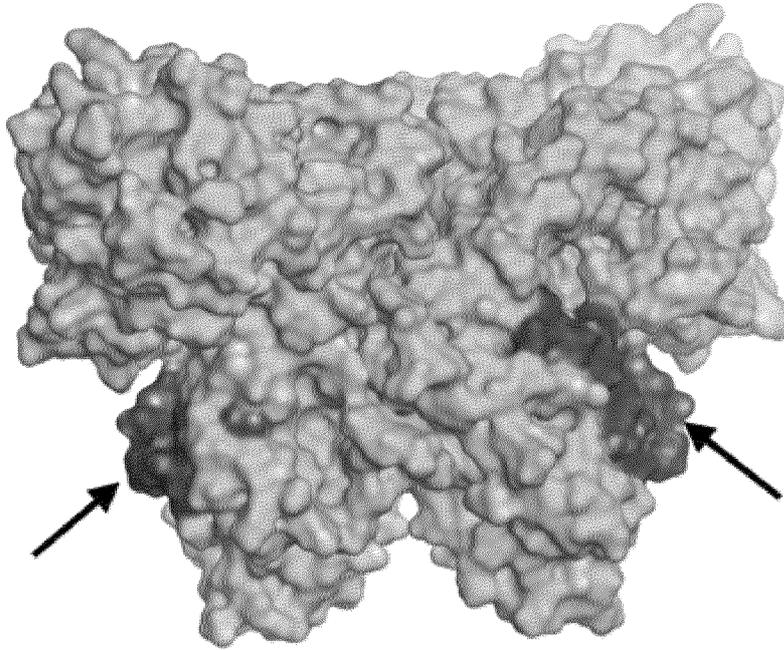
Фиг. 16С



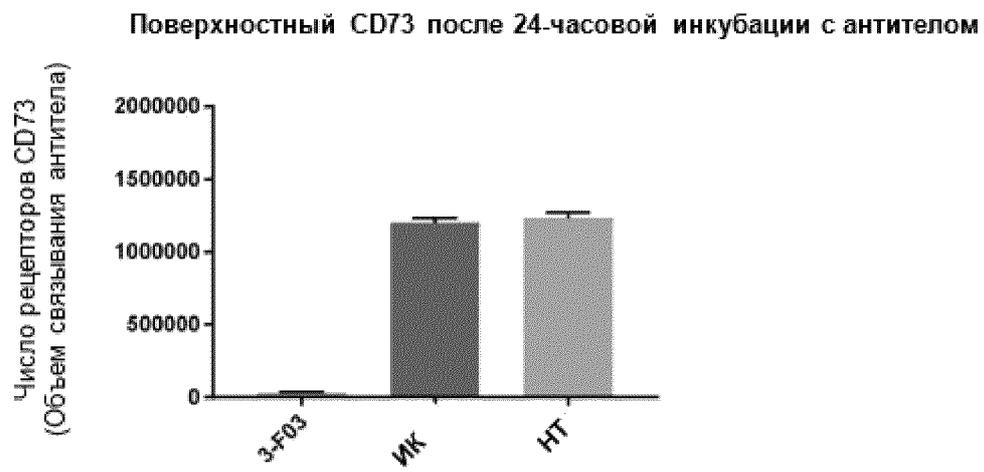
Фиг. 16D



ФИГ. 17

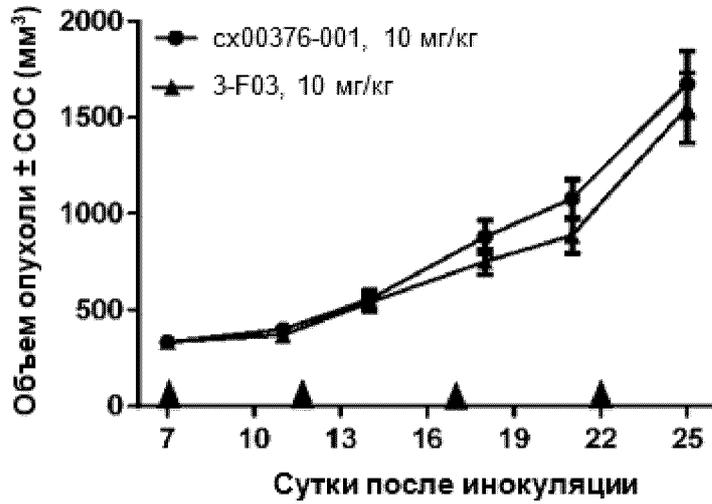


Фиг. 18

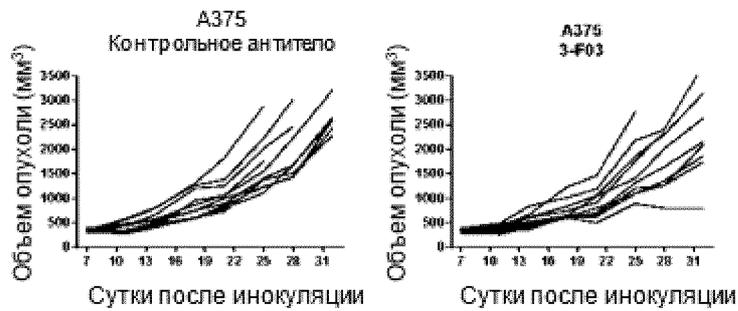


Фиг. 19А

Эффективность А375

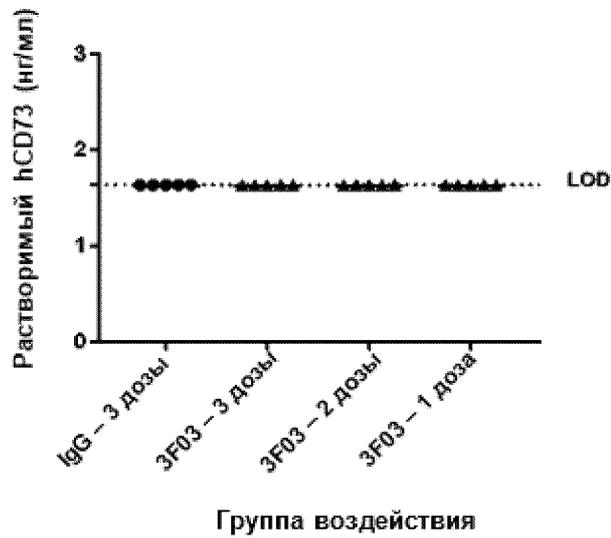


Фиг. 19В

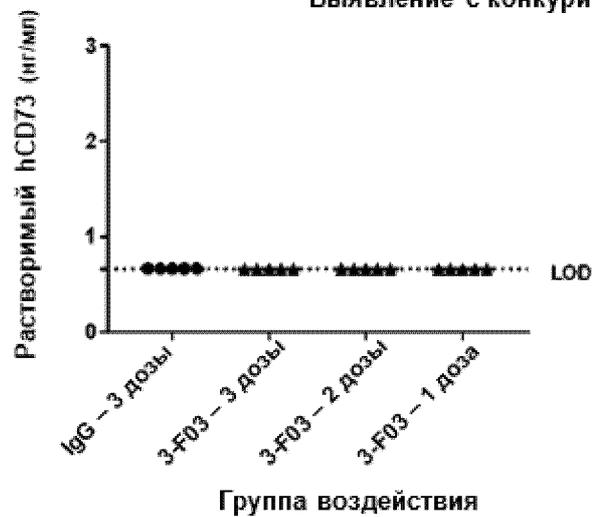


Фиг. 20

Общий растворимый hCD73 в сыворотке крови мышей после воздействия антителами
Выявление с неконкурирующим Ат



Свободный растворимый hCD73 в сыворотке крови мышей после воздействия антителами
Выявление с конкурирующим Ат



Фиг. 21А**3-F03_VH_дрожжи**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:77)

3-F03_VL_дрожжи

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:65)

3-F03_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:60)

3-F03_VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:61)

3-F03_411_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:62)

3-F03_411_VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:61)

3-F03_413_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYEGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:63)

3-F03_413_LC

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:61)

Фиг. 21В**3-F03_396_VH**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGTL
VTVSS (SEQ ID NO:77)

3-F03_396_VL

AIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ
ID NO:65)

3-F03_408_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGTL
VTVSS (SEQ ID NO:77)

3-F03_408_VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ
ID NO:61)

3-F03_402_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGSN
KYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGTLV
TVSS (SEQ ID NO:85)

3-F03_402_VL

AIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ
ID NO:65)

3-F03_384_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGTL
VTVSS (SEQ ID NO:77)

3-F03_384_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ
ID NO:64)

Фиг. 21С

3-F03_399_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:62)

3-F03_399_VL

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:65)

3-F03_414_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:85)

3-F03_414_VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:61)

3-F03_390_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:85)

3-F03_390_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:64)

3-F03_398_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYEGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:86)

3-F03_398_VL

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:65)

Фиг. 21D**3-F03_387_VH**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGTL
VTVSS (SEQ ID NO:62)

3-F03_387_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQS
GVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGRLEIK (SEQ
ID NO:64)

3-F03_386_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYEGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGTL
VTVSS (SEQ ID NO:86)

3-F03_386_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQS
GVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGRLEIK (SEQ
ID NO:64)

3-F03_401_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYEGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGTL
VTVSS (SEQ ID NO:63)

3-F03_401_VL

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQS
GVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGRLEIK (SEQ
ID NO:65)

3-F03_410_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYEGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGTL
VTVSS (SEQ ID NO:86)

3-F03_410_VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSG
VPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGRLEIK (SEQ
ID NO:61)

37/51

Фиг. 21Е

3-F03_389_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYEGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGTL
VTVSS (SEQ ID NO:63)

3-F03_389_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQ
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTTRLEIK (SEQ
ID NO:64)

3-F03_392_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYEGSN
KYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGTLV
TVSS (SEQ ID NO:87)

3-F03_392_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQ
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTTRLEIK (SEQ
ID NO:64)

3-F03_404_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYEGSN
KYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGTLV
TVSS (SEQ ID NO:87)

3-F03_404_VL

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQ
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTTRLEIK (SEQ
ID NO:65)

3-F03_419_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYEGSN
KYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGTLV
TVSS (SEQ ID NO:88)

3-F03_419_VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTTRLEIK (SEQ
ID NO:61)

Фиг. 21F**3-F03_416_VH**

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYEGSN
KYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGLV
TVSS (SEQ ID NO:87)

3-F03_416_VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSG
VPSRFRSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ
ID NO:61)

3-F03_407_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYEGSN
KYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGLV
TVSS (SEQ ID NO:88)

3-F03_407_VL

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQS
GVPSRFRSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ
ID NO:65)

3-F03_395_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYEGSN
KYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGLV
TVSS (SEQ ID NO:88)

3-F03_395_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQS
GVPSRFRSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ
ID NO:64)

3-F03_388_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYSGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGLV
TVSS (SEQ ID NO:69)

3-F03_388_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQS
GVPSRFRSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ
ID NO:64)

Фиг. 21G**3-F03_397_VH**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYSGS
NKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:68)

3-F03_397_VL

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:65)

3-F03_385_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYSGS
NKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:68)

3-F03_385_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:64)

3-F03_400_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYSGS
NKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:69)

3-F03_400_VL

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:65)

3-F03_409_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYSGS
NKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:69)

3-F03_409_VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:61)

Фиг. 21H**3-F03_403_VH**

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYSGSN
KYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGLV
TVSS (SEQ ID NO:32)

3-F03_403_VL

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQ
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGLTRLEIK (SEQ
ID NO:65)

3-F03_415_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYSGSN
KYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGLV
TVSS (SEQ ID NO:32)

3-F03_415_VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQ
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGLTRLEIK (SEQ
ID NO:61)

3-F03_391_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYSGSN
KYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGLV
TVSS (SEQ ID NO:32)

3-F03_391_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQ
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGLTRLEIK (SEQ
ID NO:64)

3-F03_406_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYSGSN
KYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGLV
TVSS (SEQ ID NO:67)

3-F03_406_VL

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQ
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGLTRLEIK (SEQ
ID NO:65)

Фиг. 211

3-F03_412_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYSGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMN SLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:69)

3-F03_412_VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:61)

3-F03_394_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYSGSN
KYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMN SLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:67)

3-F03_394_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:64)

3-F03_418_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYSGSN
KYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMN SLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:67)

3-F03_418_VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:61)

3_F03_417_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGSN
KYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMN SLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:60)

3_F03_417_VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:61)

42/51

Фиг. 21J

3_F03_393_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGSN
KYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMN SLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGLV
TVSS (SEQ ID NO:60)

3_F03_393_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQ
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGRLEIK (SEQ
ID NO:64)

3_F03_405_VH

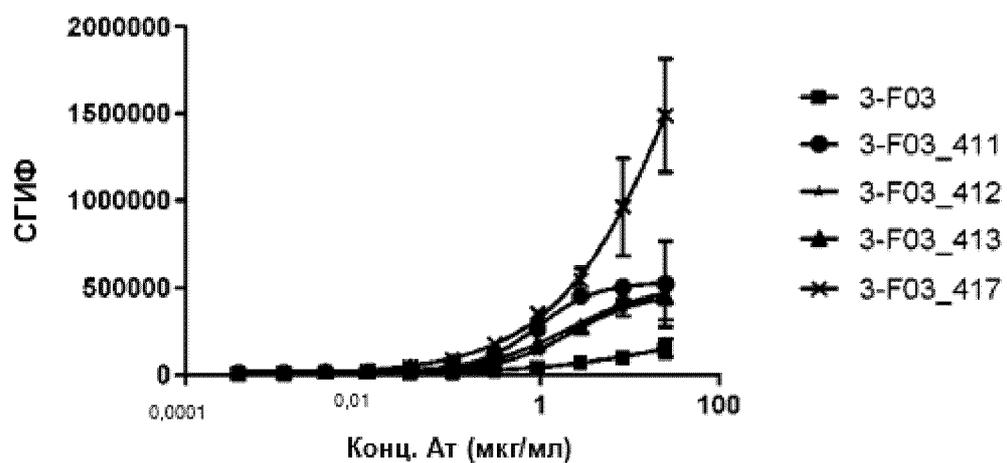
VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGSN
KYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMN SLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGLV
TVSS (SEQ ID NO:60)

3_F03_405_VL

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQ
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGRLEIK (SEQ
ID NO:65)

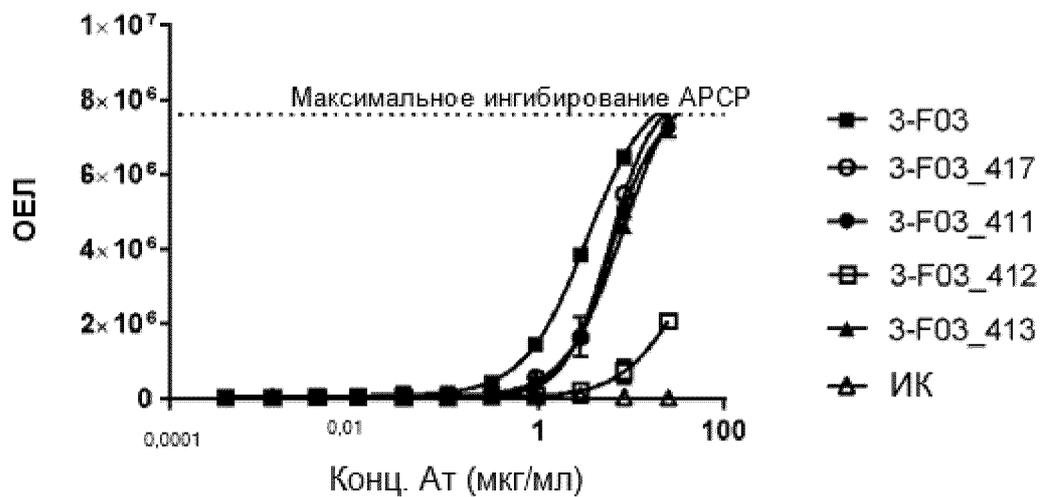
Фиг. 22

Клеточное связывание – клетки MDA-MB-231



Фиг. 23

Ингибирование клеточного CD73 – клетки MDA-MB-231



CH1-шарнир-CH2-CH3 тяжелой цепи IgG1 человека, с мутацией N297A

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO:73)

CH1-шарнир-CH2-CH3 тяжелой цепи IgG1 человека, с мутацией N297A с С-концевым лизином

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO:75)

Константная область легкой цепи каппа человека

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ
ID NO:74)

Фиг. 25А**Последовательность ДНК тяжелой цепи HzCL25**

GAAGTGCAGCTCGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGAGAGTCCCTGAAGATC
AGCTGCAAGGGTCCGGCTATAACATTCACCTCCTACGGGCTCAGCTGGGTCAGACAGATG
CCGGGAAAGGGTCTTGAGTGGATGGGAGAGATCTACCCGGGCTCCGGCAACACCTACTAC
AACGAAAAGTTCAAGGGCCAGGTCACCATTTCCGCCGACAAGTCAATCTCCACCGCTTAC
CTCCAATGGTCGAGCCTGAAGGCATCGGATACCGCGATGTACTACTGCGCCCGCTACGAC
TACCTGGGCTCGTCATACGGCTTCGATTACTGGGGGGCGGGAACTACCGTGA CTGTGTCC
TCCGCCTCCACTAAGGGACCCTCAGTGTTCCCCCTTGCCCCGAGCTCCAAGAGCACTTCG
GGCGGAACCGCTGCCCTGGGTTGCCTCGTGAAGGATTACTTCCCCGAGCCTGTGACCGTG
TCCTGGAACTCCGGGGCCTTGACCAGCGGAGTCCACACCTTCCCCGGCCGTGCTGCAATCA
TCCGGTCTGTACAGTCTGTCTCCGTGGTCACGGTGCCCTCGTCTCACTGGGGACTCAG
ACTTACATCTGTAACGTGAACCATAAGCCATCGAACACCAAAGTCGACAAACGGGTGGAA
CCTAAGTCATGCGACAAGACCCACACGTGCCACCTTGCCCCGCCCCCGAGCTCCTGGGG
GGGCCGAGCGTGTTCCTCTTCCCGCCGAAACCGAAGGACACCCTGATGATCTCGAGGACT
CCTGAAGTCACTTGCCTGGTCTGGACGTGTGCGACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTC AAT
TGGTACGTGGACGGAGTGAAGTGCACAACGCTAAGACCAAACCCCGCGAGGAGCAGTAC
GCAAGCACCTACCGCGTGTGTCAGCGTGTCAACCGTGTGCATCAGGATTGGCTGAATGGA
AAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCACCAATTGAAAAGACCATC
TCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAGCCCCAAGTCTACACTCTGCCGCCGTGAGAGAA
GAAATGACCAAGAACCAAGTGTCCCTGACTTGTCTGGTCAAGGGCTTCTATCCTTCGGAC
ATCGCGGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCGGAGAACAATTACAAGACTACGCCACCC
GTGCTGGACTCTGACGGCTCCTTTTTCTGTATTCCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCCGC
TGGCAACAGGGAAACGTGTTCAAGTGTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCACTAC
ACCCAGAAGTCCCTGAGCTTGTCCCCTGGT (SEQ ID NO:89)

Последовательность ДНК легкой цепи HzCL25

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCGGATTCACTCGCGGTGTCTTTGGGGGAGAGGGCAACC
ATTAAGTCAAGGCCTCACAGGATGTGTCCACTGCTGTGCGCTGGTACCAGCAGAAGCCT
GGGCAGCCGCCCAAGCTGCTGATCTACTCGGCCTCCTACCGCTATTCCGGAGTCCCCGAC
CGGTTCTCCGGCTCGGGTTCCGGAACTGATTTACCCCTGACAATTTTCGTGCTGCAAGCC
GAGGACGTGGCCGTGTA CTACTGCCAACAGCATTACAACACTCCTTACACTTTTGGTGGC
GGAAC TAAGCTCGAGATCAAGCGGACGGTGGCAGCTCCGTCAAGTGTTCATCTTCCCTCCA
TCGGACGAACAGCTGAAGTCCGGCACCGCGTCCGTGCTGTGTCTGTTGAACA ACTTCTAC
CCGCGGGAAGCCAAGGTCCAGTGGAAAGTCGACAACGCGCTGCAGTCCGGAAATAGCCAG
GAAAGCGTGACCGAACAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGAGCTCAACCTTGACC
CTGAGCAAGGCCGACTATGAGAAGCACAAAGTGTACGCCCTGCGAAGTGACCCACCAAGGC
CTGAGCAGCCCAGTGACCAAGTCTTCAACCGCGGGGAGTGT (SEQ ID NO:90)

Фиг. 25В**Последовательность ДНК тяжелой цепи 3-F03_411**

GAAGTGCAGTTGGTGGAGAGCGGGGGCGGACTGGTGCAGCCGGGGGGCTCGCTGCG
GCTGTCCTGCGCCGCGTCCGGTTTTCACTTTTTCGAGCTACGACATGCACTGGGTCC
GCCAAGCACCCGGGGAAGGGTCTGGAATGGGTGGCCGTGATGTCGTACGACGGCTCC
AACAAGTACTACGCCGACTCCGTGAAGGGACGGTTCACCATCTCCCGCGACAACAG
CAAGAACGCCCTTTACCTCCAAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTAT
ACTACTGCGCGACCCGAGATCGCCGCCAAGGGGGACTACTGGGGTCAAGGCACTCTG
GTCACCGTGTCTCCGCTCCACTAAGGGACCCCTCAGTGTTCCCCCTTGCCCCGAG
CTCCAAGAGCACTTCGGGCGGAACCGCTGCCCTGGGTTCCTCGTGAAGGATTACT
TCCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAACCTCCGGGGCCTTGACCAGCGGAGTCCAC
ACCTTCCCGGCCGTGCTGCAATCATCCGGTCTGTACAGTCTGTCTCCGTGGTCA
GGTGCCCTCGTCTCACTGGGGACTCAGACTTACATCTGTAACGTGAACCATAAGC
CATCGAACACCAAAGTCGACAAACGGGTGGAACCTAAGTCATGCGACAAGACCCAC
ACGTGCCACCTTGCCCCGCCCCGAGTCTTGGGGGGCCGAGCGTGTCTCTCTT
CCCGCCGAAACCGAAGGACACCCTGATGATCTCGAGGACTCCTGAAGTCACTTGCG
TGGTCGTGGACGTGTCGCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAATTGGTACGTGGAC
GGAGTCGAAGTGCACAACGCTAAGACCAAACCCCGCGAGGAGCAGTACGCAAGCAC
CTACCGCGTTGTCAGCGTGCTCACCGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAATGGAAAGG
AGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCACCAATTGAAAAGACCATC
TCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAGCCCCAAGTCTACACTCTGCCGCCGTGAG
AGAAGAAATGACCAAGAACCAAGTGTCCCTGACTTGTCTGGTCAAGGGCTTCTATC
CTTCGGACATCGCGGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCGGAGAACAATTACAAG
ACTACGCCACCCGTGCTGGACTCTGACGGCTCCTTTTTCTGTATTCCAAGCTCAC
CGTGGACAAGAGCCGCTGGCAACAGGGAAACGTGTTTCAGCTGCTCCGTGATGCACG
AAGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCTTGTCCCCTGGT (SEQ
ID NO:91)

Фиг. 25С

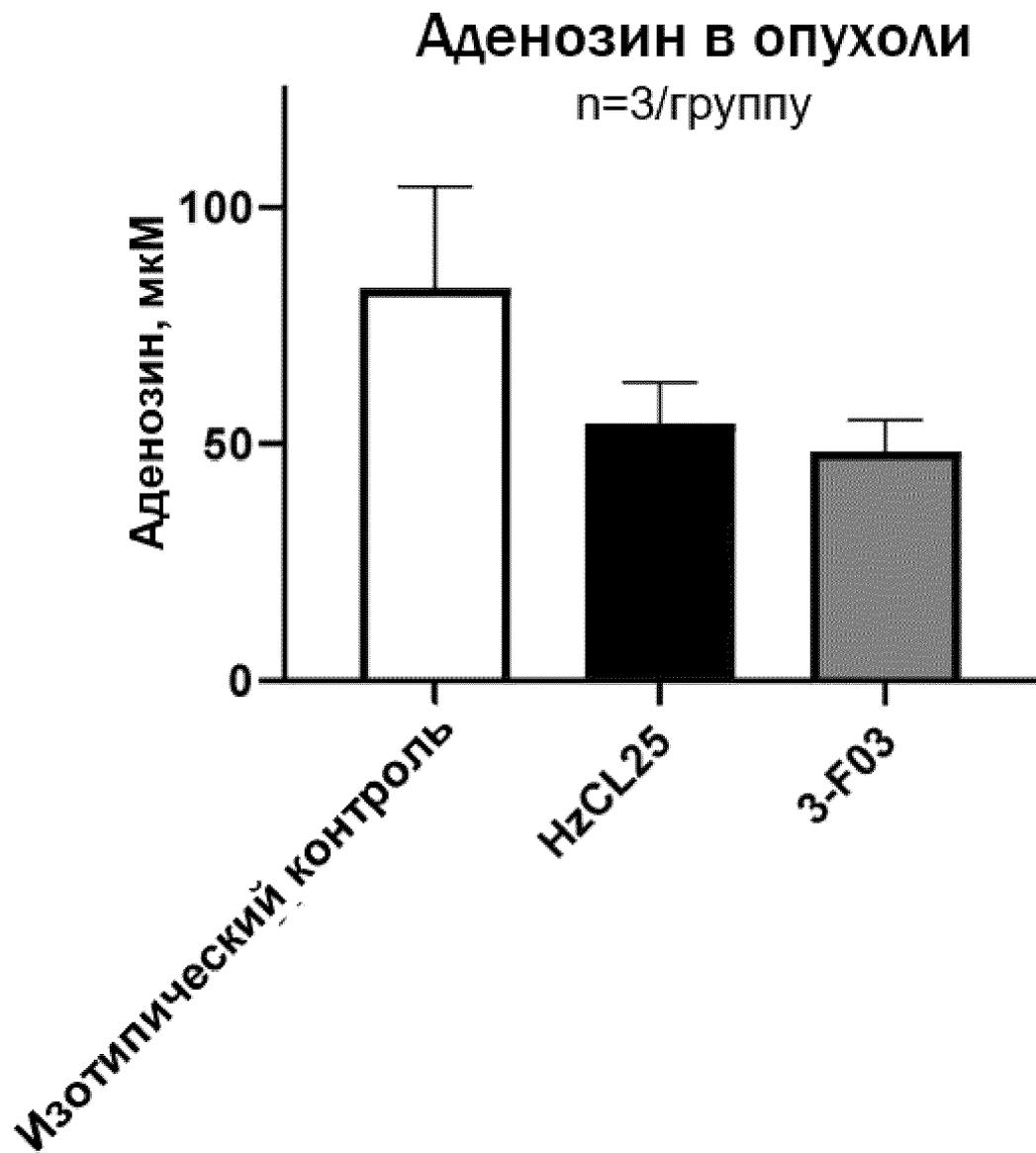
Последовательность ДНК легкой цепи 3-F03_411 и 3-F03_413

AATCACTTGCCGGGCCAGCCAGGGAATTTCCAACCTACCTCGCCTGGTACCAGCAGA
AGCCCCGAAAGGCACCGAAGCTGCTGATCTACGCCGCGTCCACTCTGCAATCCGGA
GTGCCCTTCTCGGTTCTCGGGCTCGGGAAGCGGCACCGACTTTACCCCTGACCATTAG
CAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCAACCTACTACTGTGAGCAGTCCTACTCAACCC
CTCACTTCGGACAGGGTACTAGACTCGAGATCAAGAGGACTGTGGCCGCGCCGTCG
GTGTTCACTTCCCACCCTCGGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCAGCGTGGT
CTGCCCTGCTGAACAACCTTCTATCCGCGCGAAGCCAAGGTCCAGTGGAAAGTGGATA
ATGCGCTGCAGAGCGGGAACCTCCAAGAGTCCGTGACGGAACAGGACTCCAAAGAC
TCCACCTACTCACTGTCATCCACCCTGACCCTGTCAAAGGCCGACTACGAGAAGCA
TAAGGTCTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAAGGGCTGAGCTCGCCCGTGACCAAGT
CCTTCAACCGGGGCGAATGC (SEQ ID NO:92)

Последовательность ДНК тяжелой цепи 3-F03_413

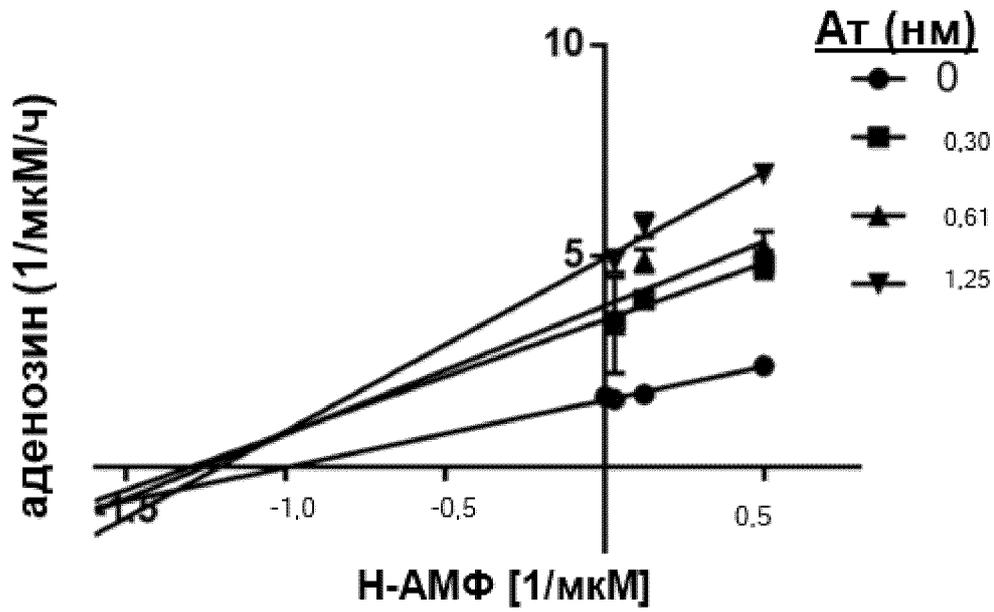
GAAGTGCAGTTGGTGGAGAGCGGGGGCGGACTGGTGCAGCCGGGGGGCTCGCTGCG
GCTGTCCTGCGCCGCGTCCGGTTTCACTTTTTTCGAGCTACGACATGCACTGGGTCC
GCCAAGCACCCGGGAAGGGTCTGGAATGGGTGGCCGTGATGTCGTACGAAGGCTCC
AACAAGTACTACGCCGACTCCGTGAAGGGACGGTTCACCATCTCCCGCGACAACAG
CAAGAACGCCCTTTACCTCCAAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTAT
ACTACTGCGCGACCGAGATCGCCGCCAAGGGGGACTACTGGGGTCAAGGCACTCTG
GTCACCGTGTCTTCCGCTCCACTAAGGGACCCTCAGTGTTCCTCCCTTGCCCCGAG
CTCCAAGAGCACTTCGGGCGGAACCGCTGCCCTGGGTTCCTCGTGAAGGATTACT
TCCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAACTCCGGGGCCTTGACCAGCGGAGTCCAC
ACCTTCCCGGCCGTGCTGCAATCATCCGGTCTGTACAGTCTGTCTTCCGTGGTCC
GGTGCCCTCGTCTTCACTGGGGACTCAGACTTACATCTGTAACGTGAACCATAAGC
CATCGAACACCAAAGTCGACAAACGGGTGGAACCTAAGTCATGCGACAAGACCCAC
ACGTGCCACCTTGCCCCGCCCCGAGCTCCTGGGGGGCCGAGCGTGTTCCTCTT
CCCGCCGAAACCGAAGGACACCCTGATGATCTCGAGGACTCCTGAAGTCACTTGCG
TGGTCGTGGACGTGTCGCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTC AATTGGTACGTGGAC
GGAGTCGAAGTGCACAACGCTAAGACCAAACCCCGCGAGGAGCAGTACGCAAGCAC
CTACCGCGTTGTCAGCGTGCTCACCGTGTGTCATCAGGATTGGCTGAATGGAAAGG
AGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCACCAATTGAAAAGACCATC
TCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAGCCCCAAGTCTACTACTCTGCCGCGTTCGAG
AGAAGAAATGACCAAGAACCAAGTGTCCCTGACTTGTCTGGTCAAGGGCTTCTATC
CTTCGGACATCGCGGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCGGAGAACAATTACAAG
ACTACGCCACCCGTGCTGGACTCTGACGGCTCCTTTTTCTGTATTCCAAGCTCAC
CGTGGACAAGAGCCGCTGGCAACAGGGAAACGTGTTCAAGTGTCTCCGTGATGCACG
AAGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCTTGTCCCCTGGT (SEQ
ID NO:93)

Фиг. 26

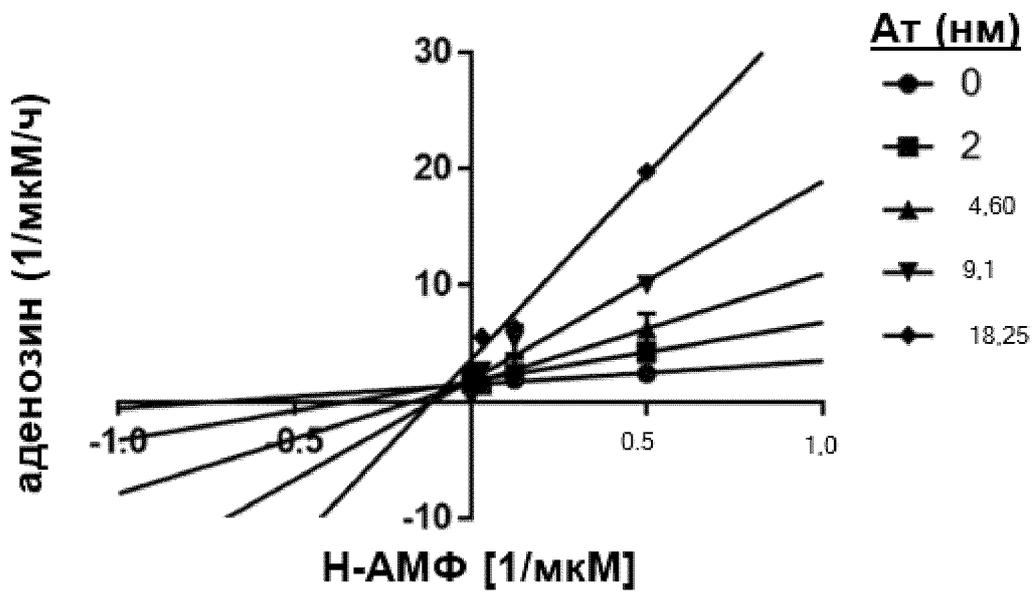


50/51

Фиг. 27



Фиг. 28



51/51

ФИГ. 29

