

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293039 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.08

(51) Int. Cl. C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.04.22

(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ CD73 И ПРОТИВ PD-1 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 202010324783.4; 202110270671.X

(32) 2020.04.22; 2021.03.12

(33) CN

(86) PCT/CN2021/089059

(87) WO 2021/213475 2021.10.28

(71) Заявитель:
АКЕСО БАЙОФАРМА, ИНК (CN)

(72) Изобретатель:
Чжан Пэн, Ли Байюн, Ся Юй, Ван
Чжунминь (CN)

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

(57) Предложены биспецифическое антитело против CD73 и против PD-1, его фармацевтическая композиция и его применение.

A1

202293039

202293039

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576186EA/071

БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ CD73 И ПРОТИВ PD-1 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области лечения опухолей и молекулярной иммунологии и, в частности, к биспецифическим антителам против CD73/против PD-1, их фармацевтическим композициям и их применению.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Экто-5'-нуклеотидаза, а именно белок CD73, представляет собой многофункциональный гликопротеин, кодируемый геном NT5E и имеющий молекулярную массу 70 кДа, который закрепляется на клеточной мембране с помощью гликозилфосфатидилинозитола (GPI) (Zimmermann H., 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects., Biochem J., 1992; 285:345-365).

CD73 широко представлен на поверхности клеток тканей человека, и в исследованиях было обнаружено, что CD73 в высокой степени экспрессируется в различных солидных опухолях, особенно в опухолевых клетках, дендритных клетках, регуляторных Т-клетках (Treg), клетках-натуральных киллерах (NK-клетках), клетках-супрессорах миелоидного происхождения (MDSC), опухолеассоциированных макрофагах (TAM) и т. п. в микроокружении опухоли. Экспрессия CD73 регулируется TGF- β , EGFR, АКТ, β -катенином и другими молекулами, особенно HIF-1, который выполняет функцию фактора транскрипции и является наиболее важным. Важной особенностью микроокружения опухоли является гипоксия, которая индуцирует положительную регуляцию гипоксия-индуцируемого фактора-1 (HIF-1) и других молекул, тем самым приводя к широкой экспрессии CD73 в микроокружении опухоли (Synnestvedt K, et al. al., Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. J Clin Invest., 2002; 110:993-1002.). Анализ клинических образцов опухолей показал, что высокая экспрессия CD73 является потенциальным биомаркером и тесно связана с неблагоприятным прогнозом различных типов опухолей, включая рак молочной железы, рак легкого, рак яичников, рак почки, рак желудка, рак головы и шеи и т. п.

CD73 обладает гидролазной активностью и негидролазной активностью. Ферментативная и неферментативная функции CD73 одновременно работают в родственном процессе в опухолях и взаимно способствуют и поддерживают прогрессирование опухолей. Все больше и больше исследований показывают, что CD73 является ключевой регуляторной молекулой для пролиферации, метастазирования и инвазии опухолевых клеток *in vitro*, а также для ангиогенеза опухоли и механизма ускользания опухоли от иммунного ответа *in vivo*, где важный механизм иммуносупрессии опосредован метаболическим сигнальным путем CD73-аденозин. CD39, расположенный выше CD73 по сигнальному пути, может катализировать АТФ с образованием

аденозинмонофосфата (АМФ), сгенерированный АМФ превращается в аденозин с помощью CD73, а аденозин связывается с расположенным ниже по сигнальному пути рецептором аденозина (A2AR). A2AR ингибирует ряд сигнальных путей, связанных с иммунной активацией, таких как LCK, MAPK, PKC, и ингибирует иммунный эффект уничтожения Т-клетками путем активации протеинкиназы А (РКА) и киназы Csk, тем самым играя иммуноподавляющую роль для достижения ускользания от иммунного ответа (Antonioli L, et al., *Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine*. *Nat Rev Cancer*, 2013; 13:842-857). Доклинические исследования на животных показали, что CD73, экспрессируемый в иммунных и неиммунных клетках, может способствовать ускользанию от иммунного ответа, развитию и метастазированию опухолей, при этом ингибирование функций цитотоксических Т-клеток (CTL) и NK-клеток с помощью связанных с Treg-клетками сигналов CD73-аденозина является наиболее значимым.

Для лечения солидных опухолей важным аспектом преодоления лекарственной устойчивости и улучшения терапевтического эффекта является купирование ингибирующего эффекта микроокружения опухоли (TME) в отношении иммунных эффекторных клеток. TME представляет собой очень сложную систему, состоящую из различных клеток, межклеточного матрикса, ферментов, цитокинов, метаболитов и т. д. Она характеризуется существенно низким содержанием водорода, низким рН и высоким давлением и сильно отличается от нормальных тканей. Гипоксия или обогащение АТФ, вызванная химиолучевой терапией для уничтожения опухолевых клеток, способствует каскадной реакции сигналов аденозина CD39-CD73, которая полезна для пролиферации и функции различных опухолевых клеток, но не полезна для клеток, ингибирующих опухоль. (Regateiro, F. S., Cobbold, S. P. & Waldmann, H., *CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments*. *Clin. Exp. Immunol.*, 2013; 171:1-7).

Использование антител, нацеленных на CD73, или нокаута гена CD73 в животных моделях может эффективно блокировать рост и метастазирование опухолей. В последнее время использование моноклонального антитела против CD73, технологии малых интерферирующих РНК, специфического ингибитора APCP и т. п. позволило добиться значительного терапевтического эффекта при противоопухолевом лечении в экспериментах на животных, предоставив новый способ противоопухолевого лечения. Данные исследований *in vivo* показали, что таргетная блокада CD73 будет эффективным средством лечения пациентов с опухолями.

Связь между сверхэкспрессией CD73 и подтипом опухоли, прогнозом и реакцией у пациентов показала, что CD73 может быть важным маркером для будущего лечения опухоли и выявления больных. Поэтому изучение мишени CD73 необходимо.

Трансмембранный рецептор PD-1 (белок 1 запрограммированной клеточной смерти) является членом семейства CD28 и экспрессируется в активированных Т-клетках, В-клетках и миелоидных клетках. Рецепторы PD-1, PDL1 и PDL2 являются членами суперсемейства B7. PDL1 экспрессируется во множестве клеток, включая Т-клетки, В-клетки, эндотелиальные клетки и эпителиальные клетки, а PDL2 экспрессируется только в

антигенпрезентирующих клетках, таких как дендритные клетки и макрофаги.

PD-1 играет очень важную роль в отрицательной регуляции активации Т-клеток, а опосредованная PD-1 отрицательная регуляция Т-клеток является одним из важных механизмов ускользания опухоли от иммунного ответа. PDL-1, экспрессируемый на поверхности опухолей, может связываться с PD-1 на поверхности иммунных клеток, тем самым ингибируя уничтожение опухолевых тканей иммунными клетками через сигнальный путь PD-1/PDL-1, и опухоли с высокой экспрессией PD-L1 ассоциированы с онкологическими заболеваниями, которые трудно детектировать (Hamanishi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104:3360-5). Эффективным способом противодействия PD-1 и, таким образом, ингибирования сигнального пути PD-1/PDL-1 является инъекция антитела против PDL-1.

Из-за широкой противоопухолевой перспективы и удивительной эффективности антител против PD-1 повсеместно признано, что антитела, нацеленные на путь PD-1, приведут к прорыву в лечении различных опухолей: немелкоклеточного рака легкого, почечноклеточной карциномы, рак яичников и меланомы Homet M. B., Parisi G., et al., *Anti-PD-1 therapy in melanoma. Semin Oncol.*, 2015 Jun; 42(3):466-473), а также гематологической опухоли и анемии (Held SA, Heine A, et al., *Advances in immunotherapy of chronic myeloid leukemia CML. Curr Cancer Drug Targets*, 2013 Sep; 13(7):768-74).

Бифункциональные антитела, также известные как биспецифические антитела, представляют собой специфические препараты антител, которые одновременно воздействуют на два разных антигена и могут быть получены путем иммуносортировки и очистки или могут быть получены с помощью генной инженерии. Генная инженерия обладает гибкостью в аспектах оптимизации сайта связывания, синтетической формы, выхода и т. п., что дает определенные преимущества. В настоящее время продемонстрировано более 45 форм биспецифических антител (Müller D, Kontermann RE. *Bispecific antibodies for cancer immunotherapy: current perspectives. BioDrugs* 2010; 24:89-98). Форма IgG-ScFv, а именно форма Моррисона (Coloma MJ, Morrison SL. *Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies. Nat Biotechnol. Nature Biotechnology*, 1997; 15:159-163), продемонстрировала, что это идеальная форма бифункционального антитела благодаря его сходству с природной формой IgG и преимуществам в разработке, экспрессии и очистке антител (Miller BR, Demarest SJ, et al., *Stability engineering of scFvs for the development of bispecific and multivalent antibodies. Protein Eng Des Sel* 2010; 23:549-57; Fitzgerald J, Lugovskoy A. *Rational engineering of antibody therapeutics targeting multiple oncogene pathways. MAbs* 2011; 3:299-309).

ADCC (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность) относится к уничтожению клетки-мишени клеткой-киллером (NK-клеткой, макрофагом и т. д.), что опосредовано связыванием Fab-фрагмента антитела с эпитопом инфицированной вирусом клетки или опухолевой клетки и связыванием Fc-фрагмента антитела с Fc-рецептором (FcR) на поверхности клетки-киллера.

CDC (комплементзависимая цитотоксичность) относится к литическому эффекту в

отношении клеток-мишеней мембраноатакующего комплекса, который образуется в результате связывания антитела с соответствующим антигеном на поверхности клеточной мембраны, а затем с компонентом комплемента C1q и активации C2-C9.

Семейство IgG включает четыре члена, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, которые различаются аминокислотами в области кристаллизуемого фрагмента (Fc) константной области тяжелой цепи, что приводит к их различной аффинности для FcγR. IgG1 дикого типа может связываться с различными FcγR и вызывать эффекты ADCC и CDC. Zhang et al. (Zhang T et al, *Cancer Immunol Immunother.*, 2018; 67(7):1079-1090.) и Dahan et al. (Dahan R et al., *Cancer cell*, 2015, 28(3):285-95.) сообщили, что связывание Fc-фрагментов антител, нацеленных на иммунные контрольные точки, такие как PD-1, с Fc-рецепторами отрицательно влияет на опосредованную антителами противоопухолевую активность, возможно, потому, что повреждение иммунных клеток, индуцированное Fc-зависимой эффекторной функцией, включая антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность, является важным механизмом, ведущим к повреждению иммунных клеток.

Интерлейкин-8 (IL-8) представляет собой хемотаксический цитокин и в основном секретируется моноцитами и т. п. IL-8 играет важную роль в пролиферации нормальных клеток и опухолевых клеток, особенно в содействии развитию и прогрессированию опухолей. Исследования показали, что IL-8 может способствовать развитию опухолей; и сами опухолевые клетки также секретируют IL-8, чтобы стимулировать рост опухоли и метастазирование (Lo MC et al., *Cancer Letters*, 2013, 335(1):81-92). Таким образом, IL-8 стал важным воспалительным фактором, незаменимым в микроокружении опухоли.

Как провоспалительный фактор, IL-8 тесно связан с развитием и прогрессированием опухолей. Во время индуцированной метиларсонатом злокачественной трансформации непечечных опухолевых клеток увеличивается экспрессия гена IL-8. Сайленсинг гена IL-8 может значительно ингибировать рост трансплантированных опухолей у мышей, и, кроме того, снижение уровня IL-8 может ингибировать экспрессию матричной металлопротеиназы-9, циклина D1, проапоптотического белка Bcl-2 и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), которые связаны с ростом и метастазированием опухолей (Escudero-Lourdes C et al., *Toxicology and applied pharmacology*, 2012, 258(1):10-18). Inoue et al. обнаружили, что IL-8 может индуцировать злокачественную трансформацию неопухолевой клеточной линии мочевого пузыря (233JP) и повышать ее агрессивность, в то время как частота злокачественной трансформации клеток 233JP значительно снижается у мышей с нокаутом IL-8 (Inoue K et al., *Cancer Res*, 2000, 60(8):2290-2299). Кроме того, при раке предстательной железы IL-8 может способствовать развитию резистентного к кастрации рака предстательной железы (CRPC) у пациентов (Chen K et al., *Cancer research*, 2015, 75(10):1992-2004) и связан с лекарственной устойчивостью к лечению опухоли (Araki S et al., *Cancer Res*, 2007, 67(14):6854-6862); подавление гена IL-8 или его рецептора может вызвать остановку клеточного цикла в опухолевых клетках и ингибировать пролиферацию опухоли (Singh RK, Lokeshwar BL., *Molecul Cancer*, 2009, 8:57). Приведенные выше

исследования показали, что уровень IL-8 тесно связан с развитием и прогрессированием опухолей. Дальнейшие исследования (Mian BM et al. Clin Cancer Res, 2003, 9(8):3167-3175) показали, что IL-8 может быть новой мишенью для лечения опухолей. В модели опухоли рака мочевого пузыря использование антител против IL-8 может значительно ингибировать рост опухолей.

IL-6 в основном быстро вырабатывается макрофагами в ответ на патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP) или молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (DAMP), и играет защитную роль, удаляя инфекционные агенты и индуцируя острую фазу и иммунные ответы для лечения поврежденных тканей. Хотя IL-6 играет важную роль в инфекции, а также в устойчивости к повреждению тканей и в их репарации, высокий уровень IL-6 может активировать путь коагуляции и эндотелиальные клетки сосудов, подавляя тем самым функцию миокарда и даже вызывая «цитокиновый шторм», что приводит к тяжелым острым системным воспалительным реакциям. Цитокиновый шторм является фатальным осложнением и побочным эффектом при вирусной инфекции, иммунотерапии опухолей и т. п.

Иммуноопосредованное нежелательное явление является распространенным и опасным нежелательным явлением при противоопухолевом лечении ингибиторами иммунных контрольных точек (ICI) (Spain L et al., Cancer Treat Rev., 2016; 44:51-60). В последние годы использование ингибиторов иммунных контрольных точек привело к большим успехам в иммунотерапии опухолей, но также привело к совершенно новому профилю токсичности из-за нецелевых эффектов, среди которых тяжелые иммуноопосредованные нежелательные явления (irAE) в основных органах (включая сердце, легкие и мозг) особенно опасны для жизни (Bergqvist V, et al., Cancer Immunol Immunother., 2017; 66(5):581-592; Gomatou G et al., Respiration., 2020; 1:1-11; Joshi MN et al., Clin Endocrinol (Oxf.), 2016; 85(3):331-9; Prieux-Klotz C et al., Target Oncol., 2017; 12(3):301-308; Tajiri K et al., Jpn J Clin Oncol., 2018; 48(1):7-12). Существующие данные показали, что ICI могут индуцировать нецелевые эффекты посредством 4 механизмов, включая прямое связывание с молекулами иммунных контрольных точек, экспрессированными на поверхности нормальных клеток, и активацию гиперчувствительности комплемента; наличие гомологичных антигенов/эпитопов в нормальных тканях и опухолевых клетках; выработку аутоантител; повышение уровня провоспалительных цитокинов, таких как IL-6 и т. п. (Martins F et al., The Lancet Oncology, 20(1), e54-e64).

В настоящее время терапия против IL-6, такая как тоцилизумаб, рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело против IL-6R, используется для лечения тяжелых irAE, тяжелого или рефрактерного артрита, васкулита крупных сосудов, увеита, миокардита, пневмонии, миастении и т. п. в острой фазе (Martins F et al., The Lancet Oncology, 20(1), e54-e64).

Связывание FcγRIa на макрофагах с антителами IgG1 или IgG4 дикого типа может индуцировать макрофаги к секреции IL-8 и IL-6 (Kinder M et al., mAbs., 2015), в то время как индукция мутации в Fc-сегментах антител и устранение их связывания с FcγRIa может

эффективно ингибировать секрецию IL-8, тем самым повышая безопасность и эффективность антител.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы изобретения использовали системы экспрессии клеток млекопитающих для экспрессии рекомбинантных CD73 и PD-1 человека в качестве антигенов для иммунизации мышей и получили гибридомные клетки путем слияния клеток селезенки мыши и клеток миеломы. Авторы изобретения получили следующие гибридомные клеточные линии путем скрининга большого количества образцов:

гибридомная клеточная линия LT014 (также известная как CD73-19F3), депонированная в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) 19 июня 2018 г. под номером доступа CCTCC NO: C2018137; или

гибридомная клеточная линия LT003 (также известная PD-1-14C12), депонированная в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) 16 июня 2015 г. под номером доступа CCTCC NO: C2015105.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что:

гибридомная клеточная линия LT014 может секретировать специфическое моноклональное антитело (названное как 19F3), специфически связывающееся с CD73 человека, и моноклональное антитело может эффективно ингибировать реакцию ферментативной активности CD73 в режиме конкуренции без субстрата, снижать продукцию аденозина и способствовать активности и противоопухолевому ингибирующему эффекту Т-клеток; и

гибридомная клеточная линия LT003 может секретировать специфическое моноклональное антитело (названное 14C12), специфически связывающееся с PD-1, и моноклональное антитело может эффективно блокировать связывание PD-1 с PDL1.

Кроме того, авторы изобретения творчески получили гуманизированные антитела против CD73 (названные как 19F3H2L2, 19F3H2L3, 19F3H2L3(hG1M) и 19F3H2L3(hG1TM), соответственно) и гуманизированные антитела против PD-1 (названные как 14C12H1L1 и 14C12H1L1(hG1TM)).

Кроме того, авторы изобретения творчески объединили два типа гуманизированных антител в новые антитела путем рекомбинации белков и получили гуманизированные бифункциональные антитела (названные как P1D7V01, P1D7V03, NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4, соответственно (также обозначаемые в настоящем описании как NTPDV1(hG1TM), NTPDV2(hG1TM), NTPDV3(hG1TM) и NTPDV4(hG1TM) и в заявке на патент Китая NO. 202110270671.X)), способные связываться с CD73 и PD-1, ингибировать активность CD73 и блокировать связывание PD-1 с PDL1, и имеющие потенциал для использования при получении лекарственного средства для предотвращения и лечения солидных опухолей и гематологических опухолей.

Настоящее изобретение подробно описано ниже.

Один аспект настоящего изобретения относится к биспецифическому антителу против CD73/против PD-1, содержащему:

первую функциональную область белка, нацеленную на PD-1, и вторую функциональную область белка, нацеленную на CD73.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения в биспецифическом антителе

первая функциональная область белка содержит: HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, где аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 предпочтительно представляют собой последовательности SEQ ID NO: 45-47, соответственно, или последовательности, имеющие по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно при по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностями SEQ ID NO: 45-47, или аминокислотные последовательности, имеющие одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 45-47; и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в вариабельной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, где аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 предпочтительно представляют собой последовательности SEQ ID NO: 50-52, соответственно, или последовательности, имеющие по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностями SEQ ID NO: 50-52, или аминокислотные последовательности, имеющие одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 50-52;

вторая функциональная область белка содержит: HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, где аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 предпочтительно представляют собой последовательности SEQ ID NO: 3-5 или последовательности, имеющие по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностями SEQ ID NO: 3-5, или аминокислотные последовательности, имеющие одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 3-5; и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в вариабельной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, где аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 предпочтительно представляют собой последовательности SEQ ID NO: 8-10, соответственно, или последовательности, имеющие по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%,

предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностями SEQ ID NO: 8-10, или аминокислотные последовательности, имеющие одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 8-10.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения в биспецифическом антителе против CD73/против PD-1,

первая функциональная область белка содержит:

последовательность, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 62, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 44 или 62, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 44 или 62; и

последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, соответственно, SEQ ID NO: 49 или SEQ ID NO: 64, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 49 или 64, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 49 или 64;

и/или,

вторая функциональная область белка содержит последовательность, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 20, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 2 или 20, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 2 или 20; и

последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, соответственно, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 22, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 7 или 22, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (предпочтительно 1, 2 или

3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 7 или 22;

или

вторая функциональная область белка содержит последовательность, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 20, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 20; и

последовательность, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 24, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 24.

Один аспект настоящего изобретения относится к биспецифическому антителу против CD73/против PD-1, содержащему:

первую функциональную область белка, нацеленную на CD73, и

вторую функциональную область белка, нацеленную на PD-1.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения в биспецифическом антителе

первая функциональная область белка содержит: HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, где аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 предпочтительно представляют собой последовательности SEQ ID NO: 3-5, соответственно, или последовательности, имеющие по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностями SEQ ID NO: 3-5, или аминокислотные последовательности, имеющие одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 3-5; и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в вариабельной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, где аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 предпочтительно представляют собой последовательности SEQ ID NO: 8-10, соответственно, или последовательности, имеющие по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%,

предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностями SEQ ID NO: 8-10, или аминокислотные последовательности, имеющие одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 8-10;

вторая функциональная область белка содержит: HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, где аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 предпочтительно представляют собой последовательности SEQ ID NO: 45-47, соответственно, или последовательности, имеющие по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностями SEQ ID NO: 45-47, или аминокислотные последовательности, имеющие одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 45-47; и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в вариабельной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, где аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 предпочтительно представляют собой последовательности SEQ ID NO: 50-52, соответственно, или последовательности, имеющие по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностями SEQ ID NO: 50-52, или аминокислотные последовательности, имеющие одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 50-52.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения в биспецифическом антителе против CD73/против PD-1,

первая функциональная область белка содержит:

последовательность, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 20, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 2 или 20, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 2 или 20; и

последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, соответственно, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 24, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%,

предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательность SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 24, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 7, 22 или 24;

и/или,

вторая функциональная область белка содержит последовательность, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 62, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 62, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 62; и

последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, соответственно, SEQ ID NO: 49 или 64, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 49 или 64, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 49 или 64.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения в биспецифическом антителе против CD73/против PD-1 первая функциональная область белка и вторая функциональная область белка связаны напрямую или через линкер; предпочтительно линкер представляет собой (GGGGS) n , и n представляет собой положительное целое число, например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения первая функциональная область белка и вторая функциональная область белка в биспецифическом антителе против CD73/против PD-1 независимо представляют собой иммуноглобулин или антигенсвязывающий фрагмент, такой как полуантитело, Fab, F(ab')₂ или одноцепочечный вариабельный фрагмент, предпочтительно первая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин, а вторая функциональная область белка представляет собой антигенсвязывающий фрагмент; или первая функциональная область белка представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, а вторая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения N-конец вариабельной области тяжелой цепи антигенсвязывающего фрагмента связан непосредственно (или через

линкер) с С-концом СН1 иммуноглобулина, а N-конец вариабельной области легкой цепи антигенсвязывающего фрагмента связан непосредственно (или через линкер) с С-концом вариабельной области легкой цепи CL иммуноглобулина; или N-конец вариабельной области тяжелой цепи антигенсвязывающего фрагмента связан непосредственно (или через линкер) с С-концом вариабельной области легкой цепи CL иммуноглобулина, а N-конец вариабельной области легкой цепи антигенсвязывающего фрагмента связан непосредственно (или через линкер) с С-концом вариабельной области тяжелой цепи СН1 иммуноглобулина.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения С-конец вариабельной области тяжелой цепи антигенсвязывающего фрагмента связан непосредственно (или через линкер) с N-концом тяжелой цепи иммуноглобулина, а С-конец вариабельной области легкой цепи антигенсвязывающего фрагмента связан непосредственно (или через линкер) с N-концом легкой цепи иммуноглобулина; или С-конец вариабельной области тяжелой цепи антигенсвязывающего фрагмента связан непосредственно (или через линкер) с N-концом легкой цепи иммуноглобулина, а С-конец вариабельной области легкой цепи антигенсвязывающего фрагмента связан непосредственно (или через линкер) с N-концом тяжелой цепи иммуноглобулина.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент; предпочтительно первая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин, а вторая функциональная область белка представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент; или первая функциональная область белка представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент, а вторая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложено биспецифическое антитело, в котором количество функциональной области первого белка и функциональной области второго белка независимо равно 1, 2 или более.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения в биспецифическом антителе против CD73/против PD-1 одноцепочечный вариабельный фрагмент представляет собой молекулу, образованную путем соединения вариабельной области тяжелой цепи (V_H) антитела и вариабельной области легкой цепи антитела (V_L) через линкер; предпочтительно одноцепочечный вариабельный фрагмент может иметь общую структуру: NH_2-V_L -линкер- V_H-COOH или NH_2-V_H -линкер- V_L-COOH .

В одном варианте осуществления настоящего изобретения в биспецифическом антителе против CD73/против PD-1, когда одноцепочечный вариабельный фрагмент связан с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина (СН) (или с N-концом тяжелой цепи, С-концом СН1 вариабельной области тяжелой цепи) с помощью линкера, сначала может быть связана вариабельная область тяжелой цепи антитела (V_H) одноцепочечного вариабельного фрагмента, или сначала может быть связана вариабельная область легкой цепи антитела (V_L) одноцепочечного вариабельного фрагмента; предпочтительно одноцепочечный

вариабельный фрагмент может иметь общую структуру: C_H-линкер-V_H-линкер-V_L-COOH или C_H-линкер-V_L-линкер-V_H-COOH,

предпочтительно,

вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3-5, и вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8-10;

вариабельная область тяжелой цепи одноцепочечного вариабельного фрагмента содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 45-47, и вариабельная область легкой цепи одноцепочечного вариабельного фрагмента содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 50-52,

предпочтительно, когда одноцепочечный вариабельный фрагмент (такой как NH₂-V_L-линкер-V_H-COOH или NH₂-V_H-линкер-V_L-COOH) связан с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина через линкер, сначала может быть связана вариабельная область тяжелой цепи (V_H) одноцепочечного вариабельного фрагмента, содержащая CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 45-47, или сначала может быть связана вариабельная область легкой цепи (V_L) одноцепочечного вариабельного фрагмента, содержащая CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 50-52,

или предпочтительно,

вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 45-47, и вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 50-52; и/или,

вариабельная область тяжелой цепи одноцепочечного вариабельного фрагмента содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3-5, и вариабельная область легкой цепи одноцепочечного вариабельного фрагмента содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8-10,

причем, когда одноцепочечный вариабельный фрагмент (такой как NH₂-V_L-линкер-V_H-COOH или NH₂-V_H-линкер-V_L-COOH) связан с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина через линкер, сначала может быть связана вариабельная область тяжелой цепи антитела (V_H) одноцепочечного вариабельного фрагмента, содержащая CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3-5, или сначала может быть связана вариабельная область легкой цепи антитела (V_L) одноцепочечного вариабельного фрагмента, содержащая CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8-10,

предпочтительно,

одна молекула иммуноглобулина связана с двумя молекулами одноцепочечных вариабельных фрагментов, и более предпочтительно, чтобы эти две молекулы одноцепочечных вариабельных фрагментов были идентичными.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения в биспецифическом

антителе против CD73/против PD-1 иммуноглобулин представляет собой IgG, IgA, IgD, IgE или IgM, предпочтительно IgG, например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения в биспецифическом антителе против CD73/против PD-1 одноцепочечный вариабельный фрагмент связан с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина. Поскольку иммуноглобулин состоит из двух тяжелых цепей, две молекулы одноцепочечных вариабельных фрагментов связаны с одной молекулой иммуноглобулина. Предпочтительно, чтобы две молекулы одноцепочечных вариабельных фрагментов были идентичными.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения в биспецифическом антителе против CD73/против PD-1,

вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3-5, и вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8-10;

и/или,

вариабельная область тяжелой цепи одноцепочечного вариабельного фрагмента содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 45-47, и вариабельная область легкой цепи одноцепочечного вариабельного фрагмента содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 50-52,

предпочтительно, когда одноцепочечный вариабельный фрагмент (такой как NH₂-V_L-линкер-V_H-COOH или NH₂-V_H-линкер-V_L-COOH) связан с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина через линкер, сначала может быть связана вариабельная область тяжелой цепи антитела (V_H) одноцепочечного вариабельного фрагмента, содержащая CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 45-47, или сначала может быть связана вариабельная область легкой цепи антитела (V_L) одноцепочечного вариабельного фрагмента, содержащая CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 50-52.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения в биспецифическом антителе против CD73/против PD-1,

вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 45-47, и вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 50-52; и/или,

вариабельная область тяжелой цепи одноцепочечного вариабельного фрагмента содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3-5, и вариабельная область легкой цепи одноцепочечного вариабельного фрагмента содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8-10,

причем, когда одноцепочечный вариабельный фрагмент (такой как NH₂-V_L-линкер-V_H-COOH или NH₂-V_H-линкер-V_L-COOH) связан с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина через линкер, сначала может быть связана вариабельная область тяжелой

цепи антитела (V_H) одноцепочечного переменного фрагмента, содержащая CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3-5, или сначала может быть связана переменная область легкой цепи антитела (V_L) одноцепочечного фрагмента, содержащая CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8-10.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения в биспецифическом антителе против CD73/против PD-1,

переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 20, а переменная область легкой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность, соответственно выбранную из SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 22; или переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, а переменная область легкой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24;

и/или,

переменная область тяжелой цепи одноцепочечного переменного фрагмента имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 62, а переменная область легкой цепи одноцепочечного переменного фрагмента имеет аминокислотную последовательность, соответственно выбранную из SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 64;

причем, когда одноцепочечный переменный фрагмент связан с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина через линкер, то сначала может быть связана переменная область тяжелой цепи антитела (V_H) одноцепочечного переменного фрагмента, или сначала может быть связана переменная область легкой цепи антитела (V_L) одноцепочечного переменного фрагмента.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения в биспецифическом антителе против CD73/против PD-1,

переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 62; переменная область легкой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность, соответственно выбранную из SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 64, или переменная область тяжелой цепи одноцепочечного переменного фрагмента имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 20, переменная область легкой цепи одноцепочечного переменного фрагмента имеет аминокислотную последовательность, соответственно выбранную из SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 22, или переменная область тяжелой цепи одноцепочечного антитела имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и переменная область легкой цепи одноцепочечного переменного фрагмента имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

Другой аспект настоящего изобретения относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, способную кодировать переменную область тяжелой цепи биспецифического антитела, где

вариабельная область тяжелой цепи антитела содержит:

CDR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3-5, CDR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45-47, и CDR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50-52;

и вариабельная область тяжелой цепи биспецифического антитела специфически связывается с антигенами CD73 и PD-1 как часть биспецифического антитела, и биспецифическое антитело дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую:

CDR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8-10;

предпочтительно CDR вариабельной области легкой цепи отличаются от CDR вариабельной области тяжелой цепи.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения в биспецифическом антителе

иммуноглобулин содержит область, отличную от CDR, происходящую из вида, отличного от мыши, например, из человеческого антитела.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения константные области иммуноглобулина гуманизированы. Например, константная область тяжелой цепи представляет собой С-область гамма-1-цепи Ig, № доступа: P01857; и константная область легкой цепи представляет собой С-область каппа-цепи Ig, № доступа: P01834.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения константные области иммуноглобулина гуманизированы. Например, константная область тяжелой цепи представляет собой С-область гамма-1-цепи Ig, № доступа: P01857; и константная область легкой цепи представляет собой С-область каппа-цепи Ig, № доступа: P01834; где, в соответствии с системой нумерации EU, константная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит мутации в любых 2 или 3 из положений 234, 235 и 237, а константа аффинности биспецифического антитела для FcγRIa, FcγRIIIa и/или C1q снижена после мутаций по сравнению с ее значением до мутаций; предпочтительно константы аффинности измеряют с помощью системы Fortebio Octet.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения для биспецифического антитела в соответствии с системой нумерации EU константная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет следующие мутации в положениях 234, 235 и/или 237:

L234A и L235A;

L234A и G237A;

L235A и G237A;

или

L234A, L235A и G237A.

В настоящем изобретении буквы перед номером положения представляют аминокислоты до мутации, а буквы после номера положения представляют аминокислоты после мутации, если не указано иное.

В одном или более вариантах осуществления настоящего изобретения для биспецифического антитела в соответствии с системой нумерации EU константная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет одну или более мутаций, выбранных из:

N297A, D265A, D270A, P238D, L328E, E233D, H268D, P271G, A330R, C226S, C229S, E233P, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E, N297Q, P238S, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, T394D, G236R, G236A, L328R, A330S, P331S, H268A, E318A и K320A.

В конкретном варианте осуществления биспецифическое антитело против CD73/против PD-1 имеет структуру, представленную в виде тяжелая цепь-легкая цепь-линкер 1-scFv, и scFv выбран из 14C12H1V-линкер 2-14C12L1V, 14C12H1V-линкер 1-14C12L1V, 14C12H1V-линкер 2-14C12L1V и 14C12H1V-линкер 1-14C12L1V, в частности выбранные из группы, состоящей из:

(1) NTPDV1, тяжелая цепь которого имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, линкер 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, 14C12H1V имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, линкер 2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, и 14C12L1V имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68;

(2) NTPDV2, тяжелая цепь которого имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, линкер 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, 14C12H1V имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, линкер 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, и 14C12L1V имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68;

(3) NTPDV3, тяжелая цепь которого имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, линкер 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, 14C12H1V имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, линкер 2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, и 14C12L1V имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68; и

(4) NTPDV4, тяжелая цепь которого имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, линкер 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, 14C12H1V имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, линкер 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, и 14C12L1V имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело связывается с белком CD73 и/или белком PD-1 с K_D менее примерно 10^{-5} M, например менее примерно 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M или менее.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к вектору, содержащему

раскрытую в настоящем описании выделенную молекулу нуклеиновой кислоты.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или вектор, описанный в настоящем документе.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу получения раскрытого в настоящем описании биспецифического антитела, включающему культивирование раскрытой в настоящем описании клетки-хозяина в подходящих условиях и выделение биспецифического антитела из клеточных культур.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к конъюгату, содержащему биспецифическое антитело и конъюгированный фрагмент, где биспецифическое антитело представляет собой раскрытое в настоящем описании биспецифическое антитело, а конъюгированный фрагмент представляет собой детектируемую метку; в частности, конъюгированная часть представляет собой радиоизотоп, флуоресцентное вещество, хемилюминесцентное вещество, окрашенное вещество или фермент.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к набору, содержащему раскрытое в настоящем описании биспецифическое антитело или содержащему раскрытый в настоящем описании конъюгат; предпочтительно набор дополнительно содержит вторичное антитело, которое специфически распознает биспецифическое антитело; необязательно вторичное антитело дополнительно содержит детектируемую метку, например, радиоизотоп, флуоресцентное вещество, хемилюминесцентное вещество, окрашенное вещество или фермент.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к применению раскрытого в настоящем описании биспецифического антитела для приготовления набора для определения наличия или уровня CD73 и/или PD-1 в образце.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей раскрытое в настоящем описании биспецифическое антитело или раскрытый в настоящем описании конъюгат; необязательно, фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к применению раскрытого в настоящем описании биспецифического антитела или раскрытого в настоящем описании конъюгата для предотвращения и/или лечения опухоли или анемии или для диагностики опухоли или анемии.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к применению раскрытого в настоящем описании биспецифического антитела или раскрытого в настоящем описании конъюгата при получении лекарственного средства для предотвращения и/или лечения опухоли или анемии или при получении лекарственного средства для диагностики опухоли или анемии.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к применению раскрытого в настоящем описании биспецифического антитела или раскрытого в настоящем описании

конъюгата при получении:

лекарственного средства для детектирования уровня CD73 в образце,
 лекарственного средства для ингибирования реакции ферментативной активности CD73;

и/или

лекарственного средства для блокирования связывания PD-1 с PD-L1,
 лекарственного средства для отрицательной регуляции (например, подавления) активности или уровня PD-1,

лекарственного средства для купирования иммуносупрессии PD-1 в организме,

лекарственного средства для повышения экспрессии IL-2 в Т-лимфоцитах, или

лекарственного средства для повышения экспрессии IFN- γ в Т-лимфоцитах.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу *in vivo* или *in vitro*, включающему введение в клетку или введение пациенту эффективного количества раскрытого в настоящем описании биспецифического антитела или раскрытого в настоящем описании конъюгата.

Раскрытые в настоящем описании биспецифические антитела против CD73/против PD-1 могут ингибировать ферментативную активность CD73 на поверхности клеточной мембраны и могут индуцировать секрецию IFN γ и IL-2 для активации иммунного ответа.

Вариабельные области легкой цепи и тяжелой цепи определяют связывание антигена; переменная область каждой цепи содержит три гиперпеременные области, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR) (CDR тяжелой цепи (H) включают HCDR1, HCDR2 и HCDR3, а CDR легкой цепи (L) включают LCDR1, LCDR2 и LCDR3, которые названы Kabat et al., см. Bethesda M.d., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 1991; 1-3:91-3242.

Предпочтительно CDR также могут быть определены с помощью системы нумерации IMGT, см. Ehrenmann F, Kaas Q, and Lefranc MP., IMGT/3Dstructure-DB и IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF[J]. Nucleic acids research 2009; 38(suppl_1): D301-D307.

Аминокислотные последовательности CDR моноклонального антитела в (1)-(11) ниже анализируют с помощью технических средств, хорошо известных специалистам в данной области, например, в соответствии с определением IMGT, и получают следующие результаты:

(1) 19F3

Переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, а переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7.

3 CDR переменной области тяжелой цепи имеют следующие аминокислотные последовательности:

HCDR1: GYSFTGYT (SEQ ID NO: 3),

HCDR2: INPYNAGT (SEQ ID NO: 4) и

HCDR3: ARSEYRYGGDYFDY (SEQ ID NO: 5);

3 CDR вариабельной области легкой цепи имеют следующие аминокислотные последовательности:

LCDR1: QSLNSSNQKNY (SEQ ID NO: 8),

LCDR2: FAS (SEQ ID NO: 9) и

LCDR3: QQHYDTPYT (SEQ ID NO: 10).

(2) 19F3H2L2

Вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, а вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

3 CDR вариабельной области тяжелой цепи имеют те же аминокислотные последовательности, что и 19F3.

3 CDR вариабельной области легкой цепи имеют те же аминокислотные последовательности, что и 19F3.

(3) 19F3H2L3

Вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, а вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

3 CDR вариабельной области тяжелой цепи имеют те же аминокислотные последовательности, что и 19F3.

3 CDR вариабельной области легкой цепи имеют те же аминокислотные последовательности, что и 19F3.

(4) 14C12

Вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, а вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49.

3 CDR вариабельной области тяжелой цепи имеют следующие аминокислотные последовательности:

HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 45)

HCDR2: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 46)

HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 47)

3 CDR вариабельной области легкой цепи имеют следующие аминокислотные последовательности:

LCDR1: QDINTY (SEQ ID NO: 50)

LCDR2: RAN (SEQ ID NO: 51)

LCDR3: LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 52)

(5) 14C12H1L1

Вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, а вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64.

3 CDR вариабельной области тяжелой цепи имеют те же аминокислотные последовательности, что и 14C12.

3 CDR вариабельной области легкой цепи имеют те же аминокислотные последовательности, что и 14C12.

(6) 9 CDR тяжелой цепи NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4 имеют те же аминокислотные последовательности, что и CDR областей тяжелой цепи 13F9, тяжелой цепи 14C12 и легкой цепи 14C12, соответственно, в порядке от N конца до конца C. Последовательности в порядке, описанном выше, следующие:

HCDR1: GYSFTGYT (SEQ ID NO: 3)

HCDR2: INPYNAGT (SEQ ID NO: 4)

HCDR3: ARSEYRYGGDYFDY (SEQ ID NO: 5)

HCDR4: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 45)

HCDR5: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 46)

HCDR6: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 47)

HCDR7: QDINTY (SEQ ID NO: 50)

HCDR8: RAN (SEQ ID NO: 51)

HCDR9: LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 52)

3 CDR легкой цепи имеют те же аминокислотные последовательности, что и три CDR легкой цепи 19F3, и эти последовательности являются следующими:

LCDR1: QSLNSSNQKNY (SEQ ID NO: 8)

LCDR2: FAS (SEQ ID NO: 9)

LCDR3: QQHYDTPYT (SEQ ID NO: 10).

Еще один аспект настоящего изобретения относится к гибридной клеточной линии LT014, депонированной в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) под номером под коллекции CCTCC NO: C2018137.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к гибридной клеточной линии LT003, депонированной в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) под номером под коллекции CCTCC NO: C2015105.

В настоящем изобретении, если не указано иное, используемые в настоящем описании научные и технические термины имеют значения, обычно понятные специалистам в данной области. Кроме того, используемые в настоящем описании лабораторные операции клеточных культур, молекулярной генетики, химии нуклеиновых кислот и иммунологии являются рутинными процедурами, широко используемыми в соответствующих областях. Между тем, чтобы лучше понять настоящее изобретение, ниже приведены определения и пояснения соответствующих терминов.

Используемый в настоящем описании термин EC₅₀ относится к концентрации, обеспечивающей 50% максимального эффекта, то есть к концентрации, которая может вызвать 50% максимального эффекта.

Используемый в настоящем описании термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, которая обычно состоит из двух пар полипептидных цепей (каждая пара

с одной «легкой» (L) цепью и одной «тяжелой» (H) цепью). Легкие цепи антител классифицируются как легкие цепи κ и λ . Тяжелые цепи классифицируются как μ , δ , γ , α или ϵ . Изотипы антител определяются как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. В легких цепях и тяжелых цепях переменная область и константная область связаны областью «J», состоящей примерно из 12 или более аминокислот, а тяжелая цепь дополнительно содержит область «D», состоящую примерно из 3 или более аминокислот. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (V_H) и константной области тяжелой цепи (CH). Константная область тяжелой цепи состоит из 3 доменов (CH1, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (V_L) и константной области легкой цепи (CL). Константная область легкой цепи состоит из одного домена CL. Константная область антитела может опосредовать связывание иммуноглобулинов с тканями или факторами хозяина, включая связывание различных клеток иммунной системы (например, эффекторных клеток) с первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на высоковариабельные области (называемые областями, определяющими комплементарность (CDR)), между которыми распределяются консервативные области, называемые каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из 3 CDR и 4 FR, расположенных от амино-конца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Вариабельные области (V_H и V_L) каждой пары тяжелой цепи/легкой цепи образуют сайт связывания антитела. Отнесение аминокислот к областям или доменам основано на Bethesda M.d., Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, (1987 и 1991)), или Chothia & Lesk J. Mol. Biol., 1987; 196:901-917; Chothia et al., Nature, 1989; 342:878-883, или на определении системы нумерации IMGT, см в Ehrenmann F, Kaas Q, Lefranc M P., IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF[J], Nucleic acids research, 2009; 38(suppl_1): D301-D307.

В частности, тяжелая цепь может также содержать более 3 CDR, как например, 6, 9 или 12. Например, в раскрытом в настоящем описании биспецифическом антителе тяжелая цепь может представлять собой тяжелую цепь IgG-антитела с C-концом, связанным с одним ScFv, и в этом случае тяжелая цепь содержит 9 CDR.

Термин «антитело» не ограничивается каким-либо конкретным способом получения антитела. Например, антитело включает рекомбинантное антитело, моноклональное антитело и поликлональное антитело. Антитело может представлять собой антитела разных изотипов, таких как IgG (например, подтип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM.

Используемые в настоящем описании термины «mAb» и «моноклональное антитело» относятся к антителу или фрагменту антитела, полученному из группы высокоомологичных антител, т. е. из группы идентичных молекул антител, за исключением естественных мутаций, которые могут возникнуть спонтанно. Моноклональное антитело обладает высокой специфичностью в отношении одного эпитопа

на антигене. Поликлональное антитело по сравнению с моноклональным антителом обычно содержит по меньшей мере 2 или более различных антител, которые, как правило, распознают разные эпитопы на антигене. Моноклональные антитела, как правило, могут быть получены с использованием гибридомной технологии, впервые описанной Kohler et al. (Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. *Nature*, 1975; 256(5517): 495), но также могут быть получены с использованием технологии рекомбинантной ДНК (см., например, Патент США 4816567).

Используемый в настоящем описании термин «гуманизированное антитело» относится к антителу или фрагменту антитела, полученному при замене всех или части областей CDR человеческого иммуноглобулина (рецепторного антитела) на области CDR антитела, не являющегося человеческим, (донорное антитело), где донорное антитело может представлять собой антитело, не являющееся человеческим, (например, мышиное, крысиное или кроличье), обладающее ожидаемой специфичностью, аффинностью или реактивностью. Кроме того, некоторые аминокислотные остатки в каркасных областях (FR) реципиентного антитела также могут быть заменены аминокислотными остатками соответствующих антител, не являющихся человеческими, или аминокислотными остатками других антител для дальнейшего улучшения или оптимизации характеристик антитела. Более подробно о гуманизированных антителах см., например, Jones et al., *Nature*, 1986; 321:522-525; Reichmann et al., *Nature*, 1988; 332:323-329; Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992; 2:593-596; и Clark, *Immunol. Today*, 2000; 21: 397-402. В ряде случаев антигенсвязывающие фрагменты антител представляют собой диантиател, в которых домены V_H и V_L экспрессируются на одной полипептидной цепи. Однако используемый линкер слишком короткий, чтобы можно было соединить два домена в одной цепи. Таким образом, домены вынуждены соединяться с комплементарными доменами на другой цепи, и создаются два антигенсвязывающих сайта (см., например, Holliger P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993; 90:6444-6448 и Poljak R. J. et al., *Structure*, 1994; 2:1121-1123).

Используемый в настоящем описании термин «одноцепочечный вариабельный фрагмент (ScFv)» относится к молекуле, в которой вариабельная область тяжелой цепи антитела (V_H) и вариабельная область легкой цепи антитела (V_L) связаны линкером. Домены V_L и V_H спарены с образованием моновалентной молекулы с помощью линкера, который позволяет им продуцировать одну полипептидную цепь (см., например, Bird et al., *Science*, 1988; 242:423-426 и Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988; 85:5879-5883). Такие молекулы scFv могут иметь общую структуру: NH_2 - V_L -линкер- V_H -COOH или NH_2 - V_H -линкер- V_L -COOH. Подходящий линкер предшествующего уровня техники состоит из повторяющейся аминокислотной последовательности GGGGS или ее варианта. Например, можно использовать линкер, имеющий аминокислотную последовательность (GGGGS)₄, но также можно использовать его варианты (Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993; 90: 6444-6448). Другие линкеры, которые можно использовать в настоящем изобретении, описаны Alfthan et al., *Protein Eng.*, 1995; 8:725-731, Choi et al., *Eur. J. Immunol.*, 2001; 31: 94-106, Hu et al., *Cancer Res.*, 1996; 56:3055-3061, Kipriyanov et al., *J. Mol. Biol.*, 1999; 293:41-

56 и Roovers et al., *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2001, 50(1): 51-59.

Используемый в настоящем описании термин «выделенный» относится к получению искусственными средствами из естественного состояния. Если какое-то «выделенное» вещество или компонент встречается в природе, это может быть случай, когда изменение происходит в его естественной среде, или что оно выделено из естественной среды, или и то, и другое. Например, определенный невыделенный полинуклеотид или полипептид встречается в природе у определенного живого животного, и тот же самый полинуклеотид или полипептид с высокой степенью чистоты, выделенный в таком естественном состоянии, называется выделенным полинуклеотидом или полипептидом. Термин «выделенный» не исключает наличия искусственных или синтетических веществ или других примесей, не влияющих на активность вещества.

Используемый в настоящем описании термин «вектор» относится к носителю нуклеиновой кислоты, в который может быть вставлен полинуклеотид. Когда вектор допускает экспрессию белка, кодируемого вставленным полинуклеотидом, такой вектор называют экспрессирующим вектором. Вектор может быть введен в клетку-хозяин путем трансформации, трансдукции или трансфекции, так что элементы генетического вещества, переносимые вектором, могут быть экспрессированы в клетке-хозяине. Векторы хорошо известны специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь ими: плазмиды; фагмиды; космиды; искусственные хромосомы, такие как искусственная дрожжевая хромосома (YAC), искусственная хромосома бактерий (BAC) или искусственная хромосома, полученная из P1 (PAC); фаги, такие как фаги лямбда или фаги M13; и вирусы животных. Вирусы животных, которые можно использовать в качестве векторов, включают, но не ограничиваются ими, ретровирусы (включая лентивирусы), аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса (такие как вирус простого герпеса), поксвирусы, бакуловирусы, папилломавирусы и паповавирусы (такие как SV40). Вектор может содержать множество элементов, которые контролируют экспрессию, включая, но не ограничиваясь ими, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности, элементы селекции и репортерные гены. Кроме того, вектор может дополнительно содержать сайт инициации репликации.

Используемый в настоящем описании термин «клетка-хозяин» относится к клеткам, в которые могут быть введены векторы, включая, но не ограничиваясь ими, прокариотические клетки, такие как *E. coli* или *Bacillus subtilis*, грибковые клетки, такие как дрожжевые клетки или *Aspergillus*, клетки насекомых, такие как клетки дрозофилы S2 или Sf9, или животные клетки, такие как фибробласты, клетки CHO, клетки GS, клетки COS, клетки NSO, клетки HeLa, клетки BHK, клетки HEK 293 или клетки человека.

Используемый в настоящем описании термин «специфически связывается» относится к реакции неслучайного связывания между двумя молекулами, такой как реакция между антителом и антигеном, на который оно нацелено. В некоторых вариантах осуществления антитело, которое специфически связывается с антигеном (или антитело, которое специфически связывается с антигеном), означает, что антитело связывается с

антигеном с аффинностью (K_D) менее примерно 10^{-5} М, например менее примерно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или менее.

Используемый в настоящем описании термин « K_D » относится к константе равновесия диссоциации для специфического взаимодействия антитело-антиген, которая используется для описания аффинности связывания между антителом и антигеном. Меньшая константа равновесия диссоциации указывает на более сильное связывание антитела с антигеном и более высокую аффинность между антителом и антигеном. Как правило, антитело связывается с антигеном (например, белком PD-1) с константой равновесия диссоциации (K_D) менее примерно 10^{-5} М, например менее примерно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или менее. K_D можно определить с помощью способов, известных специалистам в данной области, например, с помощью системы Fortebio.

Используемые в настоящем описании термины «моноклональное антитело» и «mAb» имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо; термины «поликлональное антитело» и «pAb» имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо. Кроме того, в настоящем описании аминокислоты обычно представлены однобуквенными и трехбуквенными сокращениями, известными в данной области техники. Например, аланин может быть представлен А или Ala.

Используемый в настоящем описании термин «фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество» относится к носителю и/или вспомогательному веществу, которые фармакологически и/или физиологически совместимы с объектом и активным ингредиентом. Такие носители и/или вспомогательные вещества хорошо известны в данной области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, под редакцией Gennaro AR, 19th Ed., Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995), включая, но не ограничиваясь ими: регуляторы pH, поверхностно-активные вещества адъюванты и усилители ионной силы. Например, регуляторы pH включают, но не ограничиваются ими, фосфатный буфер; поверхностно-активные вещества включают, но не ограничиваются ими, катионные, анионные или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как Tween-80; усилители ионной силы включают, но не ограничиваются ими, хлорид натрия.

Используемый в настоящем описании термин «эффективное количество» относится к количеству, достаточному для получения или, по меньшей мере, частичного получения желаемых эффектов. Например, профилактически эффективное количество против заболевания (например, опухоли) относится к количеству, достаточному для предотвращения, остановки или задержки начала заболевания (например, опухоли); терапевтически эффективное количество относится к количеству, достаточному для излечения или, по меньшей мере, частичной остановки заболевания и его осложнений у пациентов, страдающих этим заболеванием. Несомненно, специалисты в данной области техники могут определить такое эффективное количество. Например, количество, эффективное для терапевтических целей, будет зависеть от тяжести заболевания, подлежащего лечению, общего состояния собственной иммунной системы пациента, общего состояния пациента, такого как возраст, масса тела и пол, пути введения, и других

видов лечения, назначаемых одновременно, и т. д.

Полезные эффекты

Моноклональное антитело по настоящему изобретению (такое как 13F9H2L3) может хорошо и специфически связываться с CD73 и может эффективно ингибировать реакцию ферментативной активности CD73 в режиме конкуренции без субстрата, снижать продукцию аденозина, стимулировать активность Т-клеток и противоопухолевой ингибирующий эффект.

Описанные в настоящем описании биспецифические антитела, такие как NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4, могут хорошо и специфически связываться с PD-1 и CD73, могут эффективно блокировать связывание PD-1 с PDL1, специфически купировать иммуносупрессию PD-1 в организме, ингибировать каталитическую активность CD73, купировать ингибирование иммунных клеток аденозином, активировать Т-лимфоциты и не вызывают высвобождения цитокинов IL-8 и IL-6, демонстрируя эффективное повышение безопасности и эффективности.

Раскрытое в настоящем описании бифункциональное антитело может быть использовано для получения противоопухолевого лекарственного средства.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

ФИГ. 1 Связывание P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R, 14C12H1L1 и ниволумаба с PD-1-mFc определяли с помощью ИФА.

ФИГ. 2 Связывание P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R, 19F3 H2L3 и MEDI9447 с комплексом NT5E человека-биотин определяли с помощью ИФА.

ФИГ. 3 Активность P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R, 14C12H1L1 и ниволумаба, конкурирующих с PD-L1 человека-mFc за связывание с комплексом PD-1 человека-mFc-биотин.

ФИГ. 4. Константа аффинности P1D7V01 для PD-1-mFc.

ФИГ. 5. Константа аффинности 14C12H1L1 для PD-1-mFc.

ФИГ. 6. Константа аффинности ниволумаба для PD-1-mFc.

ФИГ. 7. Константа аффинности P1D7V01 для NT5E(1-552) человека-his.

ФИГ. 8 Константа аффинности MEDI 9447 для NT5E(1-552) человека-his.

ФИГ. 9. Активность связывания P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R и 14C12H1L1 с PD-1 на клеточной поверхности 293T-PD1 определяли с помощью FACS.

ФИГ. 10. Активность связывания P1D7V01, P1D7V03, MEDI9447 и 19F3H2L3 с CD73 на клеточной поверхности MDA-MB-231 определяли с помощью FACS.

ФИГ. 11. Ингибирование биспецифическими антителами против CD73/против PD-1 активности фермента CD73 на поверхности мембраны MDA-MB-231.

ФИГ. 12. Ингибирование биспецифическими антителами против CD73/против PD-1 активности фермента CD73 на поверхности мембраны U87-MG.

ФИГ. 13. Биологическая активность биспецифических антител против CD73/против PD-1 в отношении стимуляции секреции IFN- γ в системе смешанной реакции лимфоцитов Raji-PDL1.

ФИГ. 14. Биологическая активность биспецифических антител против CD73/против PD-1 в отношении стимуляции секреции IL-2 в системе смешанной реакции лимфоцитов Raji-PDL1.

ФИГ. 15. Биологическая активность биспецифических антител против CD73/против PD-1 в отношении стимуляции секреции IFN- γ в системе смешанной реакции лимфоцитов и DC.

ФИГ. 16. Биологическая активность биспецифических антител против CD73/против PD-1 в отношении стимуляции секреции IL-2 в системе смешанной реакции лимфоцитов и DC.

ФИГ. 17. Константа аффинности 14C12H1L1(hG1TM) для PD-1-mFc.

ФИГ. 18. Константа аффинности ниволумаба для PD-1-mFc.

ФИГ. 19. Константа аффинности NTPDV1 для PD-1-mFc.

ФИГ. 20. Константа аффинности NTPDV2 для PD-1-mFc.

ФИГ. 21. Константа аффинности NTPDV3 для PD-1-mFc.

ФИГ. 22. Константа аффинности NTPDV4 для PD-1-mFc.

ФИГ. 23. Константа аффинности 19F3H2L3(hG1M) для NT5E(1-552) человека-his.

ФИГ. 24. Константа аффинности NTPDV1 для NT5E(1-552) человека-his.

ФИГ. 25. Константа аффинности NTPDV2 для NT5E(1-552) человека-his.

ФИГ. 26. Константа аффинности NTPDV3 для NT5E(1-552) человека-his.

ФИГ. 27. Константа аффинности NTPDV4 для NT5E(1-552) человека-his.

ФИГ. 28. Ингибирование ферментативной активности CD73 на поверхности клеточной мембраны U87-MG биспецифическими антителами против CD73/против PD-1.

ФИГ. 29. Биологическую активность биспецифических антител против CD73/против PD-1 в отношении стимуляции секреции IFN- γ и IL-2 определяли с помощью реакции смешанных лимфоцитов (MLR).

ФИГ. 30. Влияние изотипического контроля, 19F3H2L3(hG1M) и различных доз NTPDV2 на объем опухоли у мышей.

ФИГ. 31. Влияние изотипического контроля, 19F3H2L3(hG1M) и различных доз NTPDV2 на массу тела мышей.

ФИГ. 32. Эффективное устранение секреции IL-8, опосредованной биспецифическими антителами против PD-1/против CD73, в макрофагах человека за счет аминокислотных мутаций Fc-сегментов в системе совместного культивирования клеток СНО-K1-PD1 и макрофагов человека.

ФИГ. 33. Эффективное устранение секреции IL-6, опосредованной биспецифическим антителом против PD-1/против CD73 в макрофагах человека за счет аминокислотных мутаций Fc-сегментов в системе совместного культивирования клеток СНО-K1-PD1 и макрофагов человека.

ФИГ. 34. Эффективное устранение секреции IL-8, опосредованной биспецифическим антителом против PD-1/против CD73, в макрофагах человека за счет аминокислотных мутаций Fc-сегментов в системе совместного культивирования клеток

U87-MG и макрофагов человека.

ФИГ. 35. Эффективное устранение секреции IL-6, опосредованной биспецифическим антителом против PD-1/против CD73, в макрофагах человека за счет аминокислотных мутаций Fc-сегментов в системе совместного культивирования клеток U87-MG и макрофагов человека.

Информация о сборе биологических материалов:

Гибридная клеточная линия LT003 (также известная PD-1-14C12), которая была депонирована в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) 16 июня 2015 г. с номером коллекции CCTCC NO: C2015105 и адресом коллекции Уханьского университета, Ухань, Китай, почтовый индекс: 430072.

Гибридная клеточная линия LT014 (также известная CD73-19F3), которая была депонирована в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) 21 июня 2018 г. с номером коллекции CCTCC NO: C2018137 и адресом коллекции Уханьского университета, Ухань, Китай, почтовый индекс: 430072.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Варианты осуществления настоящего изобретения будут подробно описаны ниже со ссылкой на примеры. Специалисты в данной области поймут, что следующие примеры предназначены только для иллюстрации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничения объема настоящего изобретения. В тех случаях, когда методы или условия не указаны, примеры были реализованы в соответствии с методами или условиями, описанными в литературе в данной области техники (например, см. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, authored by J. Sambrook et al., and translated by Peitang Huang et al., 3rd Edition, Science Press) или в соответствии с руководством по продукту. Используемые реагенты или инструменты являются обычными коммерчески доступными продуктами, если их производители не указаны. Например, клетки MDA-MB-231 и клетки U87-MG можно приобрести в ATCC.

В следующих примерах настоящего изобретения используемые мыши BALB/c были приобретены в Медицинском экспериментальном центре животных Гуандуна.

В следующих примерах настоящего изобретения использованное положительное контрольное антитело MEDI9447 (общее название: олеклумаб) было произведено компанией Zhongshan Akesobio Co. Ltd., последовательность которого идентична антителу SEQ ID NO: 21-24, описанному в патентной публикации Medimmune Limited № US20160129108A1.

В следующих примерах настоящего изобретения для той же мишени использовали коммерчески доступное антитело ниволумаб (торговое название: Opdivo), которое было приобретено у Bristol-Myers Squibb.

В следующих примерах настоящего изобретения используемая клеточная линия 293T-PD1 была сконструирована компанией Zhongshan Akesobio Co. Ltd. Клеточная линия 293T-PD1 была получена путем инфицирования вирусом клеток HEK293T с использованием лентивирусных систем 3-го поколения (см., например, A Third Generation

Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L., J Virol., 1998. 72(11):8463-8471), где используемый лентивирусный экспрессирующий вектор представлял собой pCDH-CMV-PD-1FL-Puro (PD1, Genbank ID: NM_005018; вектор pCDH-CMV-Puro, приобретенный у Youbio, кат. No. VT1480).

В следующих примерах настоящего изобретения используемая клеточная линия Raji-PDL1 была сконструирована компанией Zhongshan Akesobio Co. Ltd. Клеточную линию Raji-PDL1 получали путем инфицирования вирусом клеток Raji с использованием лентивирусных систем 3-го поколения (см., например, A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L., J Virol., 1998. 72(11):8463-8471), где используемый лентивирусный экспрессирующий вектор представлял собой plenti6.3-PDL1 (PDL1, Genbank ID: NP_054862.1; вектор plenti6.3, приобретенный у Invitrogen, кат. No. K5315-20).

В следующих примерах настоящего изобретения используемая клеточная линия CHO-K1-PD1 была сконструирована компанией Zhongshan Akesobio Co. Ltd. Клеточную линию CHO-K1-PD1 получали путем инфицирования вирусом клеток CHO-K1 с использованием лентивирусных систем 3-го поколения (см., например, A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L., J Virol., 1998. 72(11):8463-8471), где используемый лентивирусный экспрессирующий вектор представлял собой pCDH-CMV-PD-1FL-Puro (PD1, Genbank ID: NM_005018; вектор pCDH-CMV-Puro, приобретенный у Youbio, кат. No. VT1480).

Ниволумаб (торговое название: Opdivo), антитело против PD-1 подтипа IgG4, несущее мутацию S228P, использовали в качестве контрольного антитела в примерах и приобретали у Bristol-Myers Squibb.

В следующих примерах настоящего изобретения используемое изотипическое контрольное антитело, т. е. hIgG1, представляло собой антитело человека, нацеленное на лизоцим куриного яйца (HEL), а последовательность вариабельной области антитела взята из исследования, опубликованного Acierno et al., «Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies» (Acierno et al., J Mol biol., 2007; 374(1): 130-46). Во фрагменте константной области hIgG1 константная область тяжелой цепи представляет собой С-область гамма-1-цепи Ig, № доступа: P01857, а константная область легкой цепи представляет собой С-область каппа-цепи Ig, № доступа: P01834; hIgG1 был получен в лаборатории Zhongshan Akesobio Co. Ltd.

Пример 1: Получение антитела против CD73 19F3

1. Получение гибридной клеточной линии LT014

Антигеном, использованным для получения антитела против CD73, был NT5E человека-his (для NT5E, Genbank ID: NP_002517.1, положение: 1-552). Клетки селезенки иммунизированных мышей сливали с клетками миеломы мышей для получения гибридных клеток. С помощью комплекса NT5E человека-биотин (для NT5E, Genbank

ID: NP_002517.1, положение: 1-552), взятого в качестве антигена, гибридомные клетки подвергали скринингу с помощью непрямого ИФА для получения гибридомных клеток, способных секретировать антитела, которые могут специфически связываться с CD73. Клетки гибридомы, полученные скринингом ИФА, подвергали лимитирующему разведению для получения стабильной гибридомной клеточной линии. Вышеуказанная гибридомная клеточная линия была названа гибридомной клеточной линией LT014, а секретируемое из нее моноклональное антитело было названо 19F3.

Гибридомная клеточная линия LT014 (также называемая CD73-19F3) была депонирована в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) 21 июня 2018 г. с номером коллекции CCTCC NO: C2018137 и адресом коллекции Уханьского университета, Ухань, Китай, почтовый индекс: 430072.

2. Получение антитела против CD73 19F3

Клеточную линию LT014, полученную выше, культивировали в среде с определенным химическим составом (среда CD, содержащая 1% пенициллина-стрептомицина) в инкубаторе с 5% CO₂, 37 °C. Через 7 дней супернатанты собирали и очищали с помощью высокоскоростного центрифугирования, вакуумной фильтрации через микрофильтрационную мембрану и колонку HiTrap с протеином А HP для получения антитела 19F3.

Пример 2: Анализ последовательности антитела против CD73 19F3

мРНК экстрагировали из клеточной линии LT014, полученной в Примере 1, в соответствии с методом, описанным в руководстве к набору RNAPrep pure Cell/Bacteria (Tiangen, кат. No. DP430).

кДНК синтезировали в соответствии с руководством Invitrogen SuperScript® III First-Strand Synthesis System для ОТ-ПЦР и амплифицировали с помощью ПЦР.

ПЦР-амплифицированные продукты подвергали непосредственному ТА-клонированию в соответствии с инструкцией к набору для клонирования pEASY-T1 (Transgen CT101).

Продукты, клонированные с помощью ТА, секвенировали напрямую, и результаты секвенирования следующие:

Нуклеотидная последовательность (363 п.н.) варибельной области тяжелой цепи 19F3 представлена в SEQ ID NO: 1, а кодируемая аминокислотная последовательность (121 а.о.) представлена в SEQ ID NO: 2.

Согласно системе нумерации IMGT, CDR1 тяжелой цепи имеет последовательность SEQ ID NO: 3, CDR2 тяжелой цепи имеет последовательность SEQ ID NO: 4, и CDR3 тяжелой цепи имеет последовательность SEQ ID NO: 5.

Нуклеотидная последовательность (339 п.н.) варибельной области легкой цепи 19F3 представлена в SEQ ID NO: 6, а кодируемая аминокислотная последовательность (113 а.о.) представлена в SEQ ID NO: 7.

В соответствии с системой нумерации IMGT CDR1 легкой цепи имеет последовательность SEQ ID NO: 8, CDR2 легкой цепи имеет последовательность SEQ ID

NO: 9, а CDR3 легкой цепи имеет последовательность SEQ ID NO: 10.

Аминокислотные последовательности 4 каркасных областей (FR-H1 - FR-H4) тяжелой цепи 19F3 представлены в SEQ ID NO:11-SEQ ID NO:14 соответственно; аминокислотные последовательности 4 каркасных областей (FR-H1 - FR-H4) легкой цепи 19F3 представлены в SEQ ID NO: 15-SEQ ID NO: 18, соответственно.

Пример 3: Дизайн, приготовление и обнаружение гуманизированных антител против CD73 человека

1. Дизайн последовательностей легкой и тяжелой цепей гуманизированных антител 19F3H2L3 и 19F3H2L2

На основе трехмерной кристаллической структуры человеческого белка CD73 (Hage T, Reinemer P, Sebald W., Crystals of a 1:1 complex between human interleukin-4 and the extracellular domain of its receptor alpha chain., Eur J Biochem., 1998; 258(2):831-6) и последовательности мышинового антитела 19F3, полученной в Примере 2, последовательности вариабельной области антител 19F3H1L1, 19F3H2L3 и 19F3H2L3 были получены с помощью компьютерного моделирования и дизайна мутаций. Соответствующие последовательности вариабельной области тяжелой цепи представляли собой 19F3H1 и 19F3H2 соответственно, (с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 93 и SEQ ID NO: 97, соответственно), а последовательности вариабельной области легкой цепи представляли собой 19F3L1, 19F3L2 и 19F3L3, соответственно, (с аминокислотными последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 98 и SEQ ID NO: 99, соответственно). Последовательности константной области антител взяты из базы данных NCBI: константная область тяжелой цепи представляет собой С-область гамма-1-цепи Ig, № доступа: P01857; константная область легкой цепи представляет собой С-область каппа-цепи Ig, № доступа: P01834. 19F3H2L3 также известен как 19F3H2L3(hG1WT) в заявке на патент Китая № 202110270671.X, где вариабельные области легкой и тяжелой цепи 19F3H1L1, 19F3H2L2 и 19F3H2L3 могут быть дополнительно обозначены как 19F3H1V (или 19F3H1V), 19F3H2V (или 19F3H23V), 19F3L1V (или 19F3L1V), 19F3L2V (или 19F3L2V) и 19F3L3V (или 19F3L3V).

(1) Последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи гуманизированного моноклонального антитела 19F3H1L1 являются следующими:

Нуклеотидная последовательность (363 п.н.) вариабельной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 92, а кодируемая аминокислотная последовательность (121 а.о.) представлена в SEQ ID NO: 93.

Нуклеотидная последовательность (339 п.н.) вариабельной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 94, а кодируемая аминокислотная последовательность (113 а.о.) представлена в SEQ ID NO: 95.

(2) Последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи гуманизированного моноклонального антитела 19F3H2L2 являются следующими:

Нуклеотидная последовательность (363 п.н.) варибельной области тяжелой цепи 19F3H2 представлена в SEQ ID NO: 19, а кодируемая аминокислотная последовательность (121 а.о.) представлена в SEQ ID NO: 20.

Нуклеотидная последовательность (339 п.н.) варибельной области легкой цепи 19F3L3 представлена в SEQ ID NO: 21, а кодируемая аминокислотная последовательность (113 а.о.) представлена в SEQ ID NO: 22.

(3) Последовательности варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи гуманизированного моноклонального антитела 19F3H2L3 являются следующими:

Нуклеотидная последовательность (363 п.н.) варибельной области тяжелой цепи 19F3H2 представлена в SEQ ID NO: 19, а кодируемая аминокислотная последовательность (121 а.о.) представлена в SEQ ID NO: 20.

Нуклеотидная последовательность (339 п.н.) варибельной области легкой цепи 19F3L3 представлена в SEQ ID NO: 23, а кодируемая аминокислотная последовательность (113 а.о.) представлена в SEQ ID NO: 24.

2. Получение гуманизированных антител 19F3H1L1, 19F3H2L2 и 19F3H2L3

Константные области тяжелой цепи использовали С-область гамма-1-цепи Ig, № доступа: P01857; константные области легкой цепи использовали С-область каппа-цепи Ig, № доступа: P01834.

кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 19F3H1L1, 19F3H2L2 и 19F3H2L3 клонировали по отдельности в векторы pUC57simple (предоставленные GenScript) для получения pUC57simple-19F3H1, pUC57simple-19F3L1, pUC57simple-19F3H2, pUC57simple-19F3L2 и pUC57simple-19F3L3. Ссылаясь на стандартные методы, описанные в Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition), полноразмерные гены тяжелых и легких цепей, синтезированные с помощью расщепления EcoRI&HindIII, субклонировали в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 посредством расщепления ферментом рестрикции (EcoRI&HindIII) с получением экспрессирующих плазмид pcDNA3.1-19F3H1, pcDNA3.1-19F3L1, pcDNA3.1-19F3H2, pcDNA3.1-19F3L2 и pcDNA3.1-19F3L3, а гены тяжелой/легкой цепи рекомбинантных экспрессирующих плазмид дополнительно подвергали анализу последовательности. Затем сконструированные комбинации генов, содержащие соответствующие рекомбинантные плазмиды легкой и тяжелой цепей (pcDNA3.1-19F3H1/pcDNA3.1-19F3L1, pcDNA3.1-19F3H2/pcDNA3.1-19F3L2 и pcDNA3.1-19F3H2/pcDNA3.1-19F3L3) по отдельности котрансфецировали в клетки 293F, а культуральные растворы собирали и очищали. После того, как последовательности были проверены, готовили свободные от эндотоксина экспрессирующие плазмиды, которые транзитивно трансфецировали в клетки HEK293 для экспрессии антител. Культуральные растворы собирали через 7 дней и подвергали аффинной очистке на колонке с Протеином А для получения гуманизированных антител.

3. Дизайн последовательностей легкой и тяжелой цепей гуманизированных антител 19F3H2L3(hG1M) и 19F3H2L3(hG1TM)

На основе 19F3H2L3, полученного в Примере 3-1, 19F3H2L3(hG1M) получали введением точечной мутации лейцин-аланин в положении 234 (L234A) и точечной мутации лейцин-аланин в положении 235 (L235A) тяжелой цепи. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности тяжелой цепи 19F3H2L3(hG1M) представлены в SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно; константная область легкой цепи 19F3H2L3(hG1M) представляет собой С-область каппа-цепи Ig, № доступа: P01834, а нуклеотидная и аминокислотная последовательности легкой цепи 19F3H2L3(hG1M) представлены в SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28, соответственно.

На основе 19F3H2L3, полученного на стадии 1 Примера 3, 19F3H2L3(hG1TM) получали путем введения точечной мутации лейцин-аланин в положении 234 (L234A), точечной мутации лейцин-аланин в положении 235 (L235A), и точечной мутации глицин-аланин в положении 237 (G237A) в тяжелой цепи. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности тяжелой цепи представлены в SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30 соответственно; а легкая цепь идентична 19F3H2L3(hG1M).

Аминокислотные последовательности 4 каркасных областей (FR-H1-FR-H4) 19F3H2 представлены в SEQ ID NO:31-SEQ ID NO:34, соответственно;

аминокислотные последовательности 4 каркасных областей (FR-H1-FR-H4) легкой цепи 19F3L2 представлены в SEQ ID NO: 35-SEQ ID NO: 38, соответственно; и

аминокислотные последовательности 4 каркасных областей (FR-H1-FR-H4) легкой цепи 19F3L3 представлены в SEQ ID NO: 39-SEQ ID NO: 42, соответственно.

Получение гуманизированного антитела 19F3H2L3(hG1M)

кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 19F3H2L3(hG1M) клонировали по отдельности в вектор pUC57simple (предоставленный Genscript) с получением pUC57simple-19F3H2(hG1M) и pUC57simple-19F3L3, соответственно. Ссылаясь на стандартные методы, описанные в Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition), полноразмерные гены тяжелых и легких цепей, синтезированные с помощью расщепления EcoRI&HindIII, субклонировали в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 посредством расщепления ферментом рестрикции (EcoRI&HindIII) с получением экспрессирующих плазмид pcDNA3.1-19F3H2(hG1M) и pcDNA3.1-19F3L3, и гены тяжелой/легкой цепи рекомбинантных экспрессирующих плазмид дополнительно подвергали секвенированию. Затем сконструированную комбинацию генов, содержащую соответствующие рекомбинантные плазмиды легкой и тяжелой цепей pcDNA3.1-19F3H2(hG1M)/pcDNA3.1-19F3L3, котрансфецировали в клетки 293F, и культуральные растворы собирали и очищали. После того, как последовательности были проверены, готовили свободные от эндотоксина экспрессирующие плазмиды, которые транзитивно трансфецировали в клетки HEK293 для экспрессии антител. Культуральные растворы собирали через 7 дней и подвергали аффинной очистке на колонке с Протеином А для получения гуманизированного антитела 19F3H2L3(hG1M).

Пример 4: Получение антитела 14C12 против PD-1.

1. Получение гибридомной клеточной линии LT003

Используя слитый белок PD-1-mFc (PD-1 GenBank: NM-005018, mFc SEQ ID NO: 89) в качестве антигена, клетки селезенки иммунизированных мышей BALB/c (приобретенных в Центре животных медицинской лаборатории Гуандун) и мышинные миеломные клетки сливали в гибридомные клетки, и ссылались на установленные методы (например, Stewart, S.J., «Monoclonal Antibody Production», in Basic Methods in Antibody Production and Characterization, Eds. G.C. Howard and D.R. Bethell, Boca Raton: CRC Press, 2000).

На планшет наносили PD-1-hFc в виде покрытия (PD-1, Genbank ID: NM_005018, hFc представляет собой фрагмент очистки IgG Fc человека, в частности, C-область гамма-1-цепи Ig, Genbank ID: P01857, положения 114-330) для непрямого ИФА. Путем скрининга получали гибридомные клетки, секретирующие новые антитела, специфически связывающиеся с PD-1.

Гибридомные клеточные линии, способные секретировать моноклональное антитело, конкурирующее с лигандом PD-L1-hFc (PD-L1 Genbank ID: NP_054862.1) за связывание с PD-1, подвергали скринингу с помощью конкурентного ИФА, и получали стабильную гибридную клеточную линию путем лимитирующего разведения. Стабильную клеточную линию LT003 (PD-1-14C12) получали путем лимитирующего разведения, а секретируемое моноклональное антитело было названо 14C12.

Гибридную клеточную линию LT003 (также называемую PD-1-14C12) депонировали в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) 16 июня 2015 г. с номером коллекции CCTCC NO: C2015105 и адресом коллекции Уханьского университета, Ухань, Китай, почтовый индекс: 430072.

2. Получение антитела 14C12 против PD-1

Клетки LT003, полученные выше, культивировали в среде IMDM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки с низким содержанием IgG (среда IMDM, содержащая 1% пенициллина-стрептомицина, культивировали в клеточном инкубаторе с 5% CO₂, 37°C). Через 7 дней супернатант клеточной культуры собирали и очищали с получением антитела 14C12.

Пример 5: Анализ последовательности антитела 14C12 против PD-1

мРНК экстрагировали из гибридной клеточной линии LT003, полученной в Примере 1, в соответствии с методом, описанным в руководстве к набору RNAPrep pure Cell/Bacteria (Tiangen, кат. No. DP430).

кДНК синтезировали в соответствии с руководством Invitrogen SuperScript® III First-Strand Synthesis System для ОТ-ПЦР и амплифицировали с помощью ПЦР.

ПЦР-амплифицированные продукты подвергали непосредственному ТА-клонированию в соответствии с инструкцией к набору для клонирования pEASY-T1 (Transgen CT101).

Продукты, клонированные с помощью ТА, секвенировали напрямую, и результаты секвенирования следующие:

Нуклеотидная последовательность (354 п.н.) варибельной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 43, а кодируемая аминокислотная последовательность (118 а.о.)

представлена в SEQ ID NO: 44.

В соответствии с системой нумерации IMGT CDR1 тяжелой цепи имеет последовательность SEQ ID NO: 45, CDR2 тяжелой цепи имеет последовательность SEQ ID NO: 46, и CDR3 тяжелой цепи имеет последовательность SEQ ID NO: 47.

Нуклеотидная последовательность (321 п.н.) варибельной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 48, а кодируемая аминокислотная последовательность (107 а.о.) представлена в SEQ ID NO: 49.

В соответствии с системой нумерации IMGT CDR1 легкой цепи имеет последовательность SEQ ID NO: 50, CDR2 легкой цепи имеет последовательность SEQ ID NO: 51, а CDR3 легкой цепи имеет последовательность SEQ ID NO: 52.

Аминокислотные последовательности 4 каркасных областей (FR-H1 - FR-H4) тяжелой цепи 14C12 представлены в SEQ ID NO: 53-SEQ ID NO: 56, соответственно; аминокислотные последовательности 4 каркасных областей (FR-H1-FR-H4) легкой цепи 14C12 представлены в SEQ ID NO: 57-SEQ ID NO: 60, соответственно.

Пример 6: Дизайн и получение гуманизированных антител против PD-1 14C12H1L1 и 14C12H1L1(hG1TM)

1. Дизайн гуманизированного антитела против PD-1 14C12H1L1

Последовательности легкой и тяжелой цепей гуманизированного антитела 14C12H1L1 были сконструированы в соответствии с трехмерной кристаллической структурой белка PD-1 (Shinohara T, et al., Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). Genomics 1995, 23 (3): 704-6) и последовательностью антитела 14C12, полученной в Примере 5 путем компьютерного моделирования модели антитела и конструирования мутаций в соответствии с моделью для получения последовательностей варибельной области антитела 14C12H1L1.

Сконструированные последовательности варибельной области являются следующими.

Нуклеотидная последовательность (354 п.н.) варибельной области тяжелой цепи 14C12H1 гуманизированного моноклонального антитела 14C12H1L1 представлена в SEQ ID NO: 61, а кодируемая аминокислотная последовательность (118 а.о.) представлена в SEQ ID NO: 62.

Нуклеотидная последовательность (321 п.н.) варибельной области легкой цепи 14C12L1 гуманизированного моноклонального антитела 14C12H1L1 представлена в SEQ ID NO: 63, а кодируемая аминокислотная последовательность (107 а.о.) представлена в SEQ ID NO: 64.

Константная область антитела 14C12H1L1 взята из базы данных NCBI (константная область тяжелой цепи представляет собой С-область гамма-1-цепи Ig, № доступа: P01857; константная область легкой цепи представляет собой С-область каппа-цепи Ig, № доступа: P01834). Нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность тяжелой цепи 14C12H1L1 представлены в SEQ ID NO: 65 и 66, соответственно, а нуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность легкой цепи

14C12H1L1 представлены в SEQ ID NO: 67 и 68, соответственно. 14C12H1L1 также известно как 14C12H1L1(hG1WT) в настоящем описании и в заявке на патент Китая № 202110270671.X, где переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи 14C12H1L1 также известны как 14C12H1V (или 14C12H1V) и 14C12L1V (или 14C12L1V) в настоящем описании и в заявке на патент Китая № 202110270671.X.

2. Дизайн последовательностей легкой и тяжелой цепей гуманизированного антитела 14C12H1L1(hG1TM)

На основе 14C12H1L1, полученного на стадии 1 Примера 6, 14C12H1L1(hG1TM) получали путем введения точечной мутации лейцин-аланин в положении 234 (L234A), точечной мутации лейцин-аланин в положении 235 (L235A) и точечной мутации глицин-аланин в положении 237 (G237A) в тяжелой цепи. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности тяжелой цепи 14C12H1L1(hG1TM) представлены в SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 70, соответственно; а легкая цепь идентична 14C12H1L1.

Аминокислотные последовательности 4 каркасных областей (FR-H1 - FR-H4) 14C12H1 представлены в SEQ ID NO:71-SEQ ID NO:74, соответственно;

аминокислотные последовательности 4 каркасных областей (FR-H1 - FR-H4) легкой цепи 14C12L1 представлены в SEQ ID NO:75-SEQ ID NO:78, соответственно.

3. Получение гуманизированных антител 14C12H1L1 и 14C12H1L1(hG1TM)

кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 14C12H1L1(hG1TM) и 14C12H1L1 отдельно клонировали в векторы pUC57simple (предоставленные GenScript) для получения pUC57simple-14C12H1, pUC57simple-14C12L1 и pUC57simple-14C12H1(hG1TM). Ссылаясь на стандартные методы, описанные в Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition), полноразмерные гены тяжелых и легких цепей, синтезированные с помощью расщепления EcoRI&HindIII, субклонировали в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 посредством расщепления ферментом рестрикции (EcoRI&HindIII) с получением экспрессирующих плазмид pcDNA3.1-14C12H1, pcDNA3.1-14C12L1 и pcDNA3.1-14C12H1(hG1TM), а гены тяжелой/легкой цепи рекомбинантных экспрессирующих плазмид дополнительно подвергали секвенированию. Затем сконструированные комбинации генов, содержащие соответствующие рекомбинантные плазмиды легкой и тяжелой цепей (pcDNA3.1-14C12H1(hG1TM)/pcDNA3.1-14C12L1 и pcDNA3.1-14C12H1/pcDNA3.1-14C12L1), отдельно котрансфецировали в клетки 293F, а культуральные растворы собирали и очищали. После того, как последовательности были проверены, готовили свободные от эндотоксина экспрессирующие плазмиды, которые транзитивно трансфецировали в клетки HEK293 для экспрессии антител. Культуральные растворы собирали через 7 дней и подвергали аффинной очистке на колонке с Протеином А для получения гуманизированных антител.

Пример 7: Дизайн последовательности и экспрессия бифункциональных антител против PD-1/против CD73

1. Дизайн последовательности

Структура бифункционального антитела, описанного в настоящем документе,

представляет собой форму Моррисона (IgG-scFv), т. е. каждый из С-концов двух тяжелых цепей антитела IgG связан с фрагментом scFv другого антитела, и конструкция основного состава тяжелой и легкой цепи показана в Таблице 1 ниже. Таблица 1 Таблица 1. Дизайн состава тяжелых и легких цепей P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R, P1D7V07 и P1D7V08. **Error! Reference source not found.1**

Биспецифическое антитело No.	Тяжелая цепь			Легкая цепь
	IgG фрагмент	Линкер	scFv фрагмент	
P1D7V01	14C12H1	Линкер1	19F3H2 _V -Линкер1-19F3L3 _V	14C12L1
P1D7V02R	14C12H1	Линкер1	19F3L3 _V -Линкер1-19F3H2 _V	14C12L1
P1D7V03	14C12H1	Линкер2	19F3H2 _V -Линкер1-19F3L3 _V	14C12L1
P1D7V04R	14C12H1	Линкер2	19F3L3 _V -Линкер1-19F3H2 _V	14C12L1
P1D7V07	19F3H2	Линкер1	14C12H1 _V -Линкер1-14C12L1 _V	19F3L3
P1D7V08	19F3H2	Линкер2	14C12H1 _V -Линкер1-14C12L1 _V	19F3L3

В Таблице 1 выше:

(1) Метка «V» в правом нижнем углу относится к варибельной области соответствующей тяжелой цепи или варибельной области соответствующей легкой цепи. Для тех, у которых нет метки «V», соответствующая тяжелая или легкая цепь представляет собой полноразмерную последовательность, содержащую константную область. Соответствующие последовательности, описанные в приведенных выше примерах, относятся к аминокислотным последовательностям этих варибельных областей или к полноразмерным и кодирующим их нуклеотидным последовательностям.

(2) Аминокислотная последовательность линкера 1 представляет собой (GGGGS)₄ (нуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 80, а аминокислотная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 79), и аминокислотная последовательность линкера 2 представляет собой (GGGGS)₃ (нуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 82, а аминокислотная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 81).

2. Экспрессия и очистка антител

Последовательность кДНК тяжелой цепи и последовательность кДНК легкой цепи P1D7V01 клонировали в вектор pUC57simple (предоставленный Genscript) с получением плазмид pUC57simple-VP101H и pUC57simple-VP101L, соответственно.

Плазмиды pUC57simple-VP101H и pUC57simple-VP101L расщепляли ферментами (HindIII и EcoRI), тяжелые и легкие цепи, выделенные электрофорезом, субклонировали в вектор pcDNA3.1, а рекомбинантные плазмиды экстрагировали для котрансфекции клеток 293F. Через 7 дней культивирования культуральную среду отделяли центрифугированием на высокой скорости, супернатант концентрировали и загружали в колонку HiTrap MabSelect SuRe. Белок элюировали в одну стадию элюирующим буфером. Целевой образец выделяли, а буфер заменяли на PBS.

Очищенные антитела P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R, P1D7V07 и P1D7V08

получали в соответствии с указанными выше способами экспрессии и очистки для P1D7V01.

Пример 8: Анализ активности связывания биспецифических антител против CD73/против PD-1 с антигенами с помощью ИФА

1. Активность связывания P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 и P1D7V04R с антигеном PD-1-mFc, определяемая с помощью ИФА. В частности, метод заключается в следующем.

На микропланшет наносили покрытие в виде PD-1-mFc в концентрации 0,5 мкг/мл и инкубировали при 4°C в течение ночи. Затем микропланшет, покрытый антигенами, однократно промывали PBST, а затем блокировали раствором PBS, содержащим 1% BSA в качестве блокирующего раствора, при 37°C в течение 2 часов. После блокировки микропланшет промывали 3 раза PBST. Добавляли антитела, серийно разведенные раствором PBST (градиенты разведения для антител показаны в Таблице 2). Микропланшет, содержащий тестируемые антитела, инкубировали при 37°C в течение 30 мин, затем 3 раза промывали PBST. После промывания добавляли рабочий раствор вторичных антител в виде HRP-меченных козьих антител против человеческого IgG (H+L) (Jackson, кат. № 109-035-088), разбавленный в соотношении 1:5000, а затем микропланшет инкубировали при 37°C в течение 30 мин. После инкубации планшет промывали 4 раза PBST, добавляли TMB (Neogen, 308177) в темноте для хромогенеза в течение 5 мин, затем добавляли стоп-раствор для прекращения хромогенной реакции. Микропланшет немедленно помещали в микропланшет-ридер, и считывали значение оптической плотности каждой лунки микроплшета при 450 нм. Данные анализировали и обрабатывали программой SoftMax Pro 6.2.1.

Результаты показаны в Таблице 2 и на ФИГ. 1. Из фигуры видно, что P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 и P1D7V04R могут эффективно связываться с антигеном PD-1-mFc дозозависимым образом. Интенсивность поглощения каждой дозы показана в Таблице 2. При количественном анализе поглощения связанных антител значения эффективности связывания EC50 антител P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R, 14C12H1L1 и ниволумаба (в качестве контроля), полученные из эмпирической кривой, составили 0,078 нМ, 0,078 нМ, 0,075 нМ, 0,089 нМ, 0,033 нМ и 0,051 нМ, соответственно.

Приведенные выше экспериментальные результаты показали, что в тех же экспериментальных условиях связывающая активность P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 и P1D7V04R с PD-1-mFc сравнима с активностью эталонных препаратов 14C12H1L1 и ниволумаба для той же мишени, что позволяет предположить, что P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R обладают активностью эффективного связывания с PD-1-mFc.

Таблица 2. Связывание P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R, 14C12H1L1 и ниволумаба с PD-1-mFc, определенное с помощью ИФА

Концентрация разведения антител (мкг/мл)	Антигенное покрытие PD-1-mFc 0.5 мкг/мл											
	P1D7V01		P1D7V02R		P1D7V03		P1D7V04R		14C12H1L1		Ниволумаб	
1	2,345	2,300	2,169	2,323	2,406	2,292	2,225	2,393	2,441	2,609	2,386	2,473

1:3	2,461	2,295	2,114	2,361	2,288	2,303	2,199	2,302	2,414	2,548	2,441	2,600
1:9	2,279	2,085	2,063	2,094	2,135	2,178	2,075	2,043	2,461	2,525	2,519	2,572
1:27	1,838	1,765	1,701	1,696	1,777	1,764	1,659	1,659	2,236	2,295	2,196	2,219
1:81	1,153	1,097	1,089	1,120	1,149	1,154	1,062	1,131	1,858	1,954	1,711	1,712
1:243	0,629	0,684	0,570	0,582	0,675	0,686	0,584	0,592	1,251	1,318	0,980	0,965
1:729	0,361	0,364	0,334	0,349	0,360	0,370	0,340	0,341	0,683	0,709	0,521	0,498
0	0,201	0,198	0,187	0,210	0,197	0,197	0,213	0,257	0,208	0,199	0,196	0,190
Вторичное антитело	Козье антитело против человеческого IgG (H+L), HRP (1:5000)											
EC50(нМ)	0.078	0.078	0.075	0.089	0.033	0.051						

2. Активность связывания P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 и P1D7V04R с антигеном NT5E человека-биотин, определенная с помощью ИФА

На микропланшет наносили покрытие в виде стрептавидина в концентрации 2 мкг/мл, а затем инкубировали при 4°C в течение ночи. После инкубации микропланшет, покрытый стрептавидином, один раз промывали PBST и блокировали раствором PBS, содержащим 1% BSA в качестве блокирующего раствора для микропланшета, при 37°C в течение 2 часов. После блокировки микропланшет промывали 3 раза PBST. Затем добавляли 0,5 мкг/мл антигена в виде NT5E человека-биотин и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Затем планшет промывали 3 раза PBST. Серийно разбавленные раствором PBST антитела (градиенты разведения антител показаны в Таблице 3) добавляли в лунки микропланшета. Микропланшет, содержащий тестируемые антитела, инкубировали при 37°C в течение 30 мин, затем 3 раза промывали PBST. После промывания добавляли рабочий раствор вторичных антител в виде HRP-меченных козьих антител против человеческого IgG (H+L) (Jackson, кат. № 109-035-088), разбавленный в соотношении 1:5000, и микропланшет инкубировали при 37°C в течение 30 мин. После инкубации планшет промывали 4 раза PBST, добавляли TMB (Neogen, 308177) в темноте для хромогенеза в течение 5 мин, затем добавляли стоп-раствор для прекращения хромогенной реакции. Микропланшет немедленно помещали в микропланшет-ридер, и считывали значение оптической плотности каждой лунки микропланшета при 450 нм. Данные анализировали и обрабатывали программой SoftMax Pro 6.2.1.

Результаты показаны в Таблице 3 и на ФИГ. 2. Из фигуры видно, что P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 и P1D7V04R могут эффективно связываться с антигеном NT5E человека-биотин дозозависимым образом. Интенсивность поглощения каждой дозы показана в Таблице 3. При количественном анализе поглощения связанных антител значения эффективности связывания EC50 антител P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R, 19F3H2L3 и MEDI9447 (в качестве контрольного антитела), полученные с помощью эмпирической кривой, составляли 0,063 нМ, 0,230 нМ, 0,068 нМ, 0,439 нМ, 0,045 нМ и 0,042 нМ, соответственно.

Приведенные выше экспериментальные результаты показали, что в тех же экспериментальных условиях активность связывания биспецифических антител P1D7V01,

P1D7V02R, P1D7V03 и P1D7V04R с комплексом NT5E человека-биотин сравнима с активностью эталонных препаратов 19F3H2L3 и MEDI9447 для той же мишени, что позволяет предположить, что P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 и P1D7V04R обладают активностью эффективного связывания с комплексом NT5E человека-биотин.

Таблица 3 Связывание P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R, 19F3H2L3 и MEDI9447 с комплексом NT5E человека-биотин, определенное с помощью ИФА

Концентрация разведения антител (мкг/мл)	Антигенное покрытие: SA (2 мкг/мл)											
	NT5E человека-биотин (0.5 мкг/мл)											
	P1D7V01		P1D7V02R		P1D7V03		P1D7V04R		19F3 H2L3		MEDI9447	
0,333	2,465	2,254	2,125	2,024	2,245	2,311	1,992	1,864	2,345	2,413	2,460	2,570
1:3	2,310	2,207	1,718	1,680	2,202	2,194	1,385	1,397	2,366	2,376	2,434	2,528
1:9	1,899	1,856	1,090	1,086	1,834	1,782	0,886	0,898	2,164	2,120	2,219	2,345
1:27	1,276	1,239	0,556	0,554	1,199	1,132	0,464	0,465	1,681	1,631	1,729	1,810
1:81	0,704	0,654	0,289	0,279	0,610	0,601	0,235	0,230	1,048	0,978	1,091	1,166
1:243	0,363	0,333	0,183	0,178	0,308	0,302	0,155	0,156	0,548	0,504	0,547	0,587
1:729	0,199	0,197	0,138	0,141	0,183	0,184	0,130	0,122	0,283	0,278	0,288	0,305
0	0,135	0,119	0,115	0,117	0,116	0,119	0,115	0,111	0,120	0,126	0,121	0,121
Вторичное антитело	Козье антитело против человеческого IgG (H+L), HRP (1:5000)											
EC50(нМ)	0,063		0,230		0,068		0,439		0,045		0,042	

Пример 9. Активность биспецифических антител против CD73/против PD-1, дополненных PD-L1 человека-mFc, в отношении связывания с комплексом PD-1 человека-mFc-биотин, определенная с помощью конкурентного ИФА

На микропланшет наносили покрытие в виде PD-L1 человека-mFc (PD-L1 Genbank ID: NP_054862.1, mFc SEQ ID NO: 143) в концентрации 2 мкг/мл и инкубировали при 4°C в течение ночи. После инкубации микропланшет блокировали раствором PBS, содержащим 1% BSA, при 37°C в течение 2 часов. После блокировки планшет трижды промывали и сушили. Антитело серийно разбавляли до 7 концентраций в соотношении градиента 1:3 на планшете для разведения с начальной концентрацией 10 мкг/мл и устанавливали пустой контроль. Затем добавляли равный объем 0,3 мкг/мл раствора PD-1 человека-mFc-биотин, хорошо перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Затем смесь после реакции добавляли в микропланшет с покрытием, и микропланшет инкубировали при 37°C в течение 30 мин. После инкубации планшет трижды промывали PBST и сушили. Добавляли рабочий раствор SA-HRP (KPL, 14-30-00) и планшет инкубировали при 37°C в течение 30 мин. После инкубации планшет промывали четыре

раза и вытирали насухо. Затем добавляли ТМВ (Neogen, 308177) в темноте для хромогенеза в течение 5 мин и добавляли стоп-раствор для прекращения хромогенной реакции. Затем микропланшет немедленно помещали в микропланшет-ридер и значение оптической плотности каждой лунки в микропланшете считывали при 450 нм. Данные анализировали и обрабатывали программой SoftMax Pro 6.2.1.

Результаты показаны на ФИГ. 3. Значения OD для всех дозировок показаны в Таблице 4. Путем количественного анализа интенсивности поглощения связанного антитела моделировали кривую, чтобы получить эффективность связывания EC₅₀ антитела (Таблица 4).

Результаты показали, что P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R, 14C12H1L1 и ниволумаб (в качестве контроля) могут эффективно блокировать связывание антигена PD-1 человека-mFc-биотин с его рецептором PD-L1 человека-mFc дозозависимым образом. Значения EC₅₀ P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R, 14C12H1L1 и ниволумаба для блокирования связывания PD-1 человека-mFc-биотин с его лигандом PD-L1 человека-mFc составляли 1,115 нМ, 1,329 нМ, 1,154 нМ, 1,33 нМ, 1,459 нМ и 1,698 нМ, соответственно.

Таблица 4 Активность P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R, 14C12H1L1 и ниволумаба, конкурирующих с PD-L1 человека-mFc за связывание с PD-1-человека-mFc-биотин

Разведение антитела (мкг/мл)	Антигенное покрытие: PD-L1 человека-mFc 2 мкг/мл											
	P1D7V01		P1D7V02R		P1D7V03		P1D7V04R		14C12H1L1		Ниволумаб	
5	0,049	0,047	0,047	0,048	0,048	0,048	0,048	0,051	0,046	0,047	0,057	0,057
1:3	0,050	0,050	0,051	0,051	0,052	0,050	0,052	0,054	0,048	0,050	0,075	0,076
1:9	0,070	0,065	0,097	0,104	0,067	0,068	0,105	0,107	0,053	0,055	0,107	0,100
1:27	1,056	1,109	1,253	1,216	1,109	1,121	1,187	1,158	0,817	0,849	1,014	0,875
1:81	1,460	1,505	1,414	1,372	1,453	1,491	1,424	1,337	1,263	1,299	1,235	1,152
1:243	1,474	1,551	1,503	1,505	1,449	1,447	1,442	1,382	1,316	1,383	1,387	1,207
1:729	1,499	1,604	1,501	1,493	1,569	1,452	1,436	1,424	1,336	1,403	1,347	1,284
0	1,399	1,283	1,467	1,456	1,288	1,252	1,343	1,342	1,302	1,391	1,265	1,156
PD-1 человека-mFc-биотин: 0,3 мкг/мл												
Вторичное антитело	SA-HRP(1:4000)											
EC50(нМ)	1,115		1,329		1,154		1,339		1,459		1,698	

Пример 10. Кинетические параметры связывания биспецифических антител против CD73/против PD-1 с антигеном PD-1 человека-mFc, определенные с помощью системы Fortebio

Буфер для разбавления образца представлял собой PBST, 0,1% BSA, pH 7,4. Антитело иммобилизовали на сенсоре АНС в концентрации 5 мкг/мл с высотой иммобилизации примерно 0,4 нм. Сенсор уравнивали в буфере в течение 60 с и через 120 с определяли связывание иммобилизованного на сенсоре антитела с антигеном PD-1-mFc в концентрациях 0,6-50 нМ (трехкратное разведение). Белок диссоциировал в буфере

в течение 180 с. Температура детектирования составляла 37 °С, частота детектирования составляла 0,3 Гц, а скорость встряхивания планшета для образцов составляла 1000 об/мин. Данные анализировали с помощью модели подбора 1:1 для получения констант аффинности.

Результаты определения констант аффинности гуманизированных антител P1D7V01, 14C12H1L1 и ниволумаба (в качестве контрольного антитела) для PD-1 человека-mFc приведены в Таблице 5, а результаты детектирования показаны на ФИГ. 4, ФИГ. 5 и ФИГ. 6. Константы аффинности гуманизированных антител P1D7V01, 14C12H1L1 и ниволумаба для PD-1 человека-mFc составляли 1,76E-10 М, 1,64E-10 М и 2,32E-10 М, соответственно. Приведенные выше экспериментальные результаты показывают, что связывающая способность P1D7V01 сравнима со связывающей способностью 14C12H1L1 и ниволумаба, что позволяет предположить, что гуманизированное антитело P1D7V01 обладает более сильной связывающей способностью с PD-1 человека-mFc.

Таблица 5. Определение констант аффинности P1D7V01, 14C12H1L1 и ниволумаба для PD-1-mFc

Тестируемые антитела	K_D (М)	Kon (1/мс)	SE (kon)	Kdis (1/с)	S E (kdis)	Rmax (нМ)
P1D7V01	1,76E-10	4,19E+05	1,52E+04	7,37E-05	3,12E-05	0,13-0,17
14C12H1L1	1,64E-10	4,55E+05	1,61E+04	7,47E-05	2,98E-05	0,24-0,28
Ниволумаб	2,32E-10	5,85E+05	2,03E+04	1,36E-04	3,47E-05	0,02-0,14

K_D - константа аффинности; $K_D = k_{dis}/k_{on}$

Пример 11: Кинетические параметры связывания биспецифических антител против CD73/против PD-1 с антигеном NT5E(1-552)человека-his, определенные с помощью системы Fortebio

Буфер для разбавления образца представлял собой PBST, pH 7,4. Антитело иммобилизовали на сенсоре с Протеином А в концентрации 5 мкг/мл со временем иммобилизации примерно 15 с. Сенсор уравнивали в буфере в течение 120 с и определяли связывание иммобилизованного на сенсоре антитела с антигеном NT5E(1-552)человека-his в концентрациях 3,125-200 нМ (двукратное разведение) в течение 120 с. Белок диссоциировал в буфере в течение 600 с. Сенсор обновляли 10 мМ раствором Gly, pH 1,5. Температура детектирования составляла 37 °С, частота детектирования составляла 0,6 Гц, а скорость встряхивания планшета для образцов составляла 1000 об/мин. Данные анализировали с помощью модели подбора 1:1 для получения констант аффинности.

Результаты определения констант аффинности гуманизированных антител P1D7V01 и MEDI9447 (в качестве контрольного антитела) для NT5E(1-552) человека-his приведены в Таблице 6, а результаты детектирования показаны на ФИГ. 7 и ФИГ. 8. Константы аффинности гуманизированных антител P1D7V01 и MEDI9447 к NT5E(1-552) человека-his составляют 2,29E-10 М и 1,04E-10 М, соответственно.

Приведенные выше экспериментальные результаты показали, что связывающая способность P1D7V01 сравнима со связывающей способностью MEDI9447, что позволяет предположить, что гуманизированное антитело P1D7V01 обладает более сильной связывающей способностью с NT5E(1-552) человека-his.

Таблица 6. Константы аффинности P1D7V01 и MEDI9447 для NT5E(1-552)-his

Тестируемые антитела	KD (M)	Kon (1/мс)	S E (kon)	Kdis (1/с)	S E (kdis)	Rmax (нМ)
P1D7V01	2,29E-10	1,81E+05	2,30E+03	4,13E-05	4,54E-06	0,47-0,57
MEDI 9447	1,04E-10	2,34E+05	3,20E+03	2,44E-05	5,02E-06	0,59-0,82

K_D - константа аффинности; $K_D = k_{dis}/k_{on}$

Пример 12. Связывающая активность биспецифических антител против CD73/против PD-1, определенная с помощью FACS

1. Связывающая активность биспецифического антитела против CD73/против PD-1 в отношении PD-1 на поверхности мембраны 293T-PD1, определенная с помощью FACS

Клетки 293T-PD1 в логарифмической фазе роста собирали и переносили в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл в количестве 3×10^5 клеток/пробирку. Добавляли 500 мкл PBSA и смесь центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин для удаления супернатанта. Добавляли 100 мкл антител, разведенных PBSA (в конечных концентрациях 100 нМ, 33,33 нМ, 11,11 нМ, 3,7 нМ, 1,23 нМ, 0,41 нМ, 0,14 нМ и 0,05 нМ, соответственно). Систему осторожно и однородно перемешивали, а затем инкубировали на льду в течение 1 часа. Затем добавляли 500 мкл PBSA и смесь центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин для удаления супернатанта. 500-кратно разбавленное FITC-меченое вторичное козье антитело против человеческого IgG (Jackson, кат. № 109-095-098) добавляли, ресуспендируя и хорошо перемешивая, и смесь инкубировали на льду в темноте в течение 0,5 часа. Добавляли 500 мкл PBSA и смесь центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин для удаления супернатанта. Наконец, 200 мкл PBSA добавляли для ресуспендирования клеточных осадков, и смесь переносили в проточную трубку для детектирования FACSCalibur.

Экспериментальные результаты показаны в Таблице 7 и на ФИГ. 9, и P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 и P1D7V04R могут специфически связываться с PD-1 на поверхности мембраны 293T-PD1 дозозависимым образом, и по сравнению с одноцелевым контрольным антителом против PD1 14C12H1L1 они могут связываться сильнее, чем 14C12H1L1.

В тех же экспериментальных условиях значения EC_{50} связывания P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 и P1D7V04R с 293T-PD1 составило 1 нМ, 1,075 нМ, 1,377 нМ и 1,57 нМ, соответственно, а значение EC_{50} связывания 14C12H1L1 с 293T-PD1 составило 2,111 нМ.

Приведенные выше экспериментальные результаты показали, что в одинаковых экспериментальных условиях все P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R и 293T-PD1

обладают связывающей активностью, превышающей таковую одноцелевого контрольного антитела 14C12H1L1 против PD1, что позволяет предположить, что P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 и P1D7V04R обладают активностью эффективного связывания с PD-1 на поверхности мембраны 293T-PD1.

Таблица 7. Активность связывания P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03, P1D7V04R и 14C12H1L1 с PD-1 на клеточной поверхности 293T-PD1 определяли с помощью FACS.

Концентрация (нМ)	0,05	0,14	0,41	1,23	3,70	11,11	33,33	100,00	EC₅₀
14C12H1L1	35,69	57,70	129,42	437,62	974,97	1384,91	1174,75	1500,20	2,111
P1D7V01	26,65	58,65	150,57	307,19	530,77	577,76	479,34	531,15	1,000
P1D7V02R	23,44	42,98	108,44	217,56	404,33	426,06	405,29	301,40	1,075
P1D7V03	24,05	49,21	118,03	289,08	384,62	459,40	808,38	343,48	1,377
P1D7V04R	24,79	52,43	112,56	288,79	466,72	1284,73	400,33	360,79	1,57,0

2. Активность связывания биспецифического антитела против CD73/против PD-1 с CD73 на поверхности мембраны MDA-MB-231, определенная с помощью FACS

Клетки MDA-MB-231 в логарифмической фазе расщепляли обычным трипсином и переносили в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл при 3×10^5 клеток/на пробирку. Добавляли 500 мкл PBSA и смесь центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин для удаления супернатанта. Добавляли 100 мкл антител, разведенных PBSA (в конечных концентрациях 100 нМ, 33,33 нМ, 11,11 нМ, 3,7 нМ, 1,23 нМ, 0,41 нМ, 0,14 нМ и 0,05 нМ, соответственно). Систему осторожно и однородно перемешивали, а затем инкубировали на льду в течение 1 часа. Затем добавляли 500 мкл PBSA и смесь центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин для удаления супернатанта. 500-кратно разбавленное FITC-меченое вторичное козье антитело против человеческого IgG (Jackson, кат. № 109-095-098) добавляли, ресуспендируя и хорошо перемешивая, и смесь инкубировали на льду в темноте в течение 0,5 часа. Добавляли 500 мкл PBSA и смесь центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин для удаления супернатанта. Наконец, 200 мкл PBSA добавляли для ресуспендирования клеточных осадков, и смесь переносили в проточную трубку для детектирования FACSCalibur.

Экспериментальные результаты представлены в Таблице 8 и на ФИГ. 10. Активность связывания P1D7V01 и P1D7V03 с CD73 на поверхности мембраны MDA-MB-231 была выше, чем активность 19F3H2L3, где P1D7V01 превосходило эталонный препарат MEDI9447 для той же мишени. В тех же экспериментальных условиях значения EC₅₀ связывания P1D7V01 и P1D7V03 с CD73 на поверхности мембраны MDA-MB-231 составляли 1,384 нМ и 2,009 нМ, соответственно, а значения EC₅₀ связывания MEDI9447 и 19F3H2L3 с CD73 на поверхности мембраны MDA-MB-231 составляли 1,589 нМ и 2,773 нМ, соответственно.

Приведенные выше экспериментальные результаты показали, что P1D7V01, P1D7V03, 19F3H2L3 и эталонный препарат MEDI9447 для одной и той же мишени могут

специфически связываться с CD73 на поверхности мембраны MDA-MB-231 дозозависимым образом. Связывающая активность P1D7V01 и P1D7V03 была выше, чем у 19F3H2L3, где P1D7V01 превосходило эталонный препарат MEDI9447 для той же мишени. Было высказано предположение, что P1D7V01 и P1D7V03 обладают активностью эффективного связывания с CD73 на поверхности мембраны MDA-MB-231.

Таблица. 8. Активность связывания P1D7V01, P1D7V03, MEDI9447 и 19F3H2L3 с CD73 на клеточной поверхности MDA-MB-231, определенная с помощью FACS

Концентрация (нМ)	0,05	0,14	0,41	1,23	3,70	11,11	33,33	100,00	EC50
MEDI9447	32,59	64,38	157,75	388,51	697,80	829,29	930,26	878,04	1,589
19F3H2L3	25,95	45,13	102,56	189,07	466,87	658,72	843,09	639,57	2,773
P1D7V01	23,37	38,02	76,84	271,72	571,56	560,81	525,91	705,50	1,384
P1D7V03	16,96	44,05	106,39	233,32	457,61	525,37	576,19	677,66	2,009

Пример 13: Детектирование ингибирования биспецифическим антителом против CD73/против PD-1 ферментной активности CD73 на поверхности клеточной мембраны

1. Детектирование ингибирования биспецифическим антителом против CD73/против PD-1 активности фермента CD73 на поверхности мембраны MDA-MB-231

Экспериментальные процедуры были следующими. Клетки MDA-MB-231 в логарифмической фазе в хорошем состоянии брали, ресуспендировали в бессывороточном культуральном растворе RPMI-1640 и затем подсчитывали. Клетки MDA-MB-231 высевали в 96-луночный планшет в количестве 2×10^4 клеток/100 мкл/лунку. Антитело разводили бессывороточным культуральным раствором RPMI-1640 (серийное 2,5-кратное разведение). Антитело добавляли в 96-луночный планшет в количестве 50 мкл/лунку, и планшет инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Через 1 час в каждую лунку добавляли 50 мкл 1200 мкМ RPMI-1640, разбавленного АМФ (TCL, кат. No. A0157). Через 3 часа отбирали 25 мкл супернатанта клеточной культуры и переносили в новый 96-луночный планшет, а также добавляли в каждую лунку 25 мкл 100 мкМ АТФ (TCL, кат. No. A0158). 50 мкл CTG (CellTiterGlo, promega, кат. No. G8641) хромогенный раствор добавляли в каждую лунку для хромогенеза и относительную интенсивность флуоресценции RLU считывали с помощью тестера для микропланшетов с несколькими метками (PerkinElmer 2140-0020).

Экспериментальные результаты показаны на ФИГ. 11. Количество АМФ в P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 и P1D7V04R сравнимо с таковым в положительном контроле MEDI9447 в зависимости от концентрации.

Приведенные выше экспериментальные результаты показали, что добавленный АМФ может быть преобразован в аденозин А без антител за счет ферментативной активности CD73 на клеточной поверхности MDA-MB-231, и что после добавления антител катализируемая ферментом активность снижалась из-за связывания антител P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 и P1D7V04R с CD73, так что АМФ не превращался в аденозин А. Было высказано предположение, что антитела эффективно ингибируют реакцию ферментативной активности в бессубстратном конкурентном режиме и снижают

продукцию аденозин.

2. Детектирование ингибирования биспецифическим антителом против CD73/против PD-1 активности фермента CD73 на поверхности мембраны U87-MG

Брали клетки U87-MG в логарифмической фазе в хорошем состоянии, ресуспендировали в бессывороточном культуральном растворе RPMI-1640 и затем подсчитывали. Клетки U87-MG высевали в 96-луночный планшет в количестве 2×10^4 клеток/100 мкл/лунку. Антитело разводили бессывороточным культуральным раствором RPMI-1640 (серийное 2,5-кратное разведение). Антитело добавляли в 96-луночный планшет в количестве 50 мкл/лунку, и планшет инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Через 1 ч в каждую лунку добавляли по 50 мкл 1200 мкМ RPMI-1640, разбавленного АМР. Через 3 ч отбирали 25 мкл супернатанта клеточной культуры и переносили в новый 96-луночный планшет, в каждую лунку добавляли по 25 мкл 100 мкМ АТФ. 50 мкл хромогенного раствора CTG (CellTiterGlo) добавляли в каждую лунку для хромогенеза, и определяли относительную интенсивность флуоресценции RLU с помощью тестера микропланшетов с несколькими метками (PerkinElmer 2140-0020).

Экспериментальные результаты показаны на ФИГ. 12. Количество АМФ в P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 и P1D7V04R сравнимо с таковым в положительном контроле MEDI9447 в зависимости от концентрации.

Приведенные выше экспериментальные результаты показали, что добавленный АМФ может быть преобразован в аденозин А без антител за счет ферментативной активности CD73 на клеточной поверхности U87-MG, и что после добавления антитела ферментативно-катализируемая функция снижалась из-за связывание антител P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 и P1D7V04R с CD73, так что АМФ не превращался в аденозин А. Было высказано предположение, что антитела эффективно ингибируют реакцию его ферментативной активности в бессубстратном конкурентном режиме и снижают продукцию аденозина.

Пример 14: Биологическая активность биспецифических антител против CD73/против PD-1 в отношении стимуляции секреции IFN- γ и IL-2, определенная с помощью смешанной реакции лимфоцитов(MLR).

1. Биологическая активность биспецифических антител против CD73/против PD-1 в отношении стимуляции секреции IFN- γ в системе смешанной реакции лимфоцитов Raji-PDL1

Клетки Raji-PDL1 субкультивировали стандартным способом. PBMC оттаивали, инкубировали с 10 мл полной среды 1640 и стимулировали 0,5 мкг/мл SEB (Dianotech, кат. No. S010201) в течение двух дней. Клетки Raji-PDL1 обрабатывали 25 мкг/мл MMC (Sigma, Cat. No. M4287) и помещали в инкубатор при 37°C на 1 час. PBMC (мононуклеарные клетки периферической крови), стимулированные SEB в течение 2 дней, и клетки Raji-PDL1, обработанные MMC в течение 1 ч, собирали, дважды промывали PBS, ресуспендировали в полной среде и подсчитывали. Клетки по отдельности добавляли в U-образный 96-луночный планшет в количестве 100000 клеток/лунку. Антитела добавляли согласно плану

исследования и культивировали в инкубаторе в течение 3 дней. Через 3 дня супернатант клеточной культуры собирали и определяли на IFN- γ с помощью ИФА.

Как показано на ФИГ. 13, смешанная культура PBMC человека и клеток Raji-PDL1 значительно стимулировала секрецию IFN- γ из PBMC, а добавление антител к системе смешанной культуры значительно индуцировало секрецию IFN- γ в PBMC. С точки зрения уровня стимуляции активности секреции IFN- γ , антитела P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 и P1D7V04R обладают активностью, сравнимой с активностью исходного одноцелевого антитела PD-1 14C12H1L1.

2. Биологическая активность биспецифических антител против CD73/против PD-1 в отношении стимуляции секреции IL-2 в системе смешанной реакции лимфоцитов Raji-PDL1.

Клетки Raji-PDL1 субкультивировали стандартным способом. PBMC оттаивали, инкубировали с 10 мл полной среды 1640 и стимулировали SEB (0,5 мкг/мл) в течение двух дней. Клетки Raji-PDL1 обрабатывали 25 мкг/мл MMC и помещали в инкубатор при 37°C на 1 час. PBMC (моноклеарные клетки периферической крови), стимулированные SEB в течение 2 дней, и клетки Raji-PDL1, обработанные MMC в течение 1 ч, собирали, дважды промывали PBS, ресуспендировали в полной среде и подсчитывали. Клетки по отдельности добавляли в U-образный 96-луночный планшет в количестве 100000 клеток/луночку. Антитела добавляли в соответствии с планом исследования и культивировали в течение 3 дней. Супернатант клеточной культуры собирали и определяли на IL-2 с помощью ИФА.

Как показано на ФИГ. 14, смешанная культура PBMC человека и клеток Raji-PDL1 оказывала определенный стимулирующий эффект в отношении секреции IL-2 в PBMC, а одновременное добавление антител к системе смешанной культуры значительно индуцировало секрецию IL-2 в PBMC в значительной степени дозозависимым образом. Что касается уровня активности, стимулирующей секрецию IL-2, бифункциональные антитела P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 и P1D7V04R имеют активность при низких концентрациях, несколько меньшую, чем активность исходного одноцелевого антитела 14C12H1L1 против PD-1, а активность при средних-высоких концентрациях сравнима с концентрациями исходного одноцелевого антитела PD-1 14C12H1L1. По сравнению с целевым препаратом положительного контроля PD1 ниволумабом, P1D7V01, P1D7V02R, P1D7V03 и P1D7V04R обладают лучшим стимулирующим потенциалом секреции IL-2 при трех различных уровнях концентрации антител.

3. Детектирование биологической активности биспецифического антитела против CD73/против PD-1, стимулирующей DC-смешанную реакционную систему лимфоцитов к секреции IFN- γ

PBMC из нормальной периферической крови человека выделяли, ресуспендировали в полной среде и высеивали в чашку для культивирования. Чашку для культивирования помещали в инкубатор на ночь для культивирования. Суспендированные PBMC собирали и удаляли. Адгезивные клетки на дне чашки промывали буфером PBS и затем подвергали индукции созревания DC. В каждую чашку с GM-CSF и IL-4 добавляли по 10 мл полной

среды RPMI1640, содержащей GM-CSF и IL-4, в концентрации 1000 ЕД/мл. Чашки культивировали в инкубаторе при 37°C, 5% диоксида углерода в течение трех дней. Затем половину среды заменяли, добавляли по 1000 ЕД/мл GM-CSF и IL-4 каждого, и чашки помещали в инкубатор при 37°C, 5% диоксида углерода для непрерывного культивирования в течение трех дней. Через трое суток снова меняли половину объема среды, добавляли по 1000 ЕД/мл GM-CSF и IL-4 и 100 ЕД/мл TNF- α , и чашки культивировали еще двое суток. PBMC от других доноров были свежевыделенными, и их высевали в 96-луночный планшет в количестве 100000 клеток/лунку после подсчета клеток. DC, индуцированные к созреванию, собирали и один раз промывали полной средой. Клетки подсчитывали и высевали в 96-луночный планшет, содержащий PBMC в количестве 10000 клеток/лунку. Антитела добавляли в соответствии с планом исследования. Систему хорошо перемешивали и культивировали в инкубаторе при 37°C, 5% диоксида углерода в течение 5 дней для совместного культивирования. Через 5 дней супернатант клеточной культуры собирали и количественно определяли IFN- γ с помощью ИФА.

Результаты показаны на ФИГ. 15. По сравнению с индивидуальной культурой DC или PBMC, смешанная культура DC и PBMC значительно стимулировала секрецию IFN- γ ; и по сравнению с изотипическим контролем уровень секреции IFN- γ был дополнительно значительно улучшен за счет добавления биспецифического антитела против CD73/против PD-1 на основе смешанной культуры DC и PBMC.

Биологическая активность биспецифических антител против CD73/против PD-1 в отношении стимуляции секреции IL-2 в системе смешанной реакции лимфоцитов и DC

PBMC из нормальной периферической крови человека выделяли, ресуспендировали в полной среде и высевали в чашку для культивирования. Чашку для культивирования помещали в инкубатор на ночь для культивирования. Суспендированные PBMC собирали и удаляли. Адгезивные клетки на дне чашки промывали буфером PBS и затем подвергали индукции созревания DC. 10 мл полной среды RPMI1640, содержащей GM-CSF и IL-4, добавляли в каждую чашку с GM-CSF и IL-4 каждый в концентрации 2000 ЕД/мл. Чашки культивировали в инкубаторе при 37°C, 5% диоксида углерода в течение трех дней. Затем половину среды меняли, добавляли 50 нг/мл IFN- γ и 100 нг/мл LPS и культивировали чашки еще двое суток. PBMC от других доноров размораживали и высевали в 96-луночный планшет в количестве 100000 клеток/лунку после подсчета клеток. DC, индуцированные к созреванию, собирали и один раз промывали полной средой. Клетки подсчитывали и высевали в 96-луночный планшет, содержащий PBMC в количестве 10000 клеток/лунку. Антитела добавляли в соответствии с планом исследования. Систему хорошо перемешивали и культивировали в инкубаторе при 37°C, 5% диоксида углерода в течение 5 дней для совместного культивирования. Через 5 дней супернатант клеточной культуры собирали и количественно определяли IL-2 с помощью ИФА. Результаты показаны на ФИГ. 16. По сравнению с индивидуальной культурой DC или PBMC, смешанная культура DC и PBMC значительно стимулировала секрецию IL-2; и по сравнению с изотипическим контролем уровень секреции IL-2 был значительно улучшен за счет добавления

биспецифического антитела против CD73/против PD-1 на основе смешанной культуры ДК и PBMC.

Пример 15: Получение биспецифических антител против PD-1/против CD73 NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4

Структурные модели биспецифических антител NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4 представлены в формате Моррисона (IgG-scFv), т. е. С-концы двух тяжелых цепей одного антитела IgG отдельно связаны с фрагментом scFv другого антитела через линкеры. Компоненты конструкции тяжелой и легкой цепи показаны в Таблице 9 ниже.

NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4 известны как NTPDV1(hG1TM), NTPDV2(hG1TM), NTPDV3(hG1TM) и NTPDV4(hG1TM) в настоящем описании и в заявке на патент Китая № 202110270671.X, поскольку в константные области их фрагментов иммуноглобулина ввели аминокислотные мутации для устранения их связывающей активности с FcγR.

Таблица 9. Дизайн последовательности NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4

	Тяжелая цепь			Легкая цепь
	Фрагмент иммуноглобулина	Линкер	Фрагмент scFv	
NTPDV1	19F3H2 (hG1TM)	Линкер1	14C12H1 _v -Линкер 2-14C12L1 _v	19F3L3
NTPDV2			14C12H1 _v -Линкер 1-14C12L1 _v	
NTPDV3			14C12H1 _v -Линкер 2-14C12L1 _v	19F3L2
NTPDV4			14C12H1 _v -Линкер1-14C12L1 _v	

В Таблице 9 выше:

Метка «V» в правом нижнем углу относится к вариательной области соответствующей тяжелой цепи или вариательной области соответствующей легкой цепи. Для тех, у которых нет метки «V», соответствующая тяжелая или легкая цепь представляет собой полноразмерную последовательность, содержащую константную область. Соответствующие последовательности, описанные в приведенных выше примерах, относятся к аминокислотным последовательностям этих вариательных областей или к полноразмерным и кодирующим их нуклеотидным последовательностям.

Аминокислотная последовательность линкера 1 состоит из 4 повторов (GGGGS), т.е. (GGGGS)₄ или (G₄S)₄ (нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 80 и аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 79).

Аминокислотная последовательность линкера 2 состоит из 3 повторов (GGGGS), т.е. (GGGGS)₄ или (G₄S)₃ (нуклеотидная последовательность SEQ ID NO: 82 и аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 81).

Последовательности 3 CDR легких цепей 19F3L2 и 19F3L3 части иммуноглобулина в NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4 идентичны последовательностям CDR легкой цепи 19F3.

3 последовательности CDR 19F3H2(hG1TM) фрагмента иммуноглобулина в

NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4 идентичны последовательностям CDR тяжелой цепи 19F3.

Последовательности CDR 14C12H1V-линкер2-14C12L1V и 14C12H1V-линкер1-14C12L1V фрагмента scFv в NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4 идентичны CDR тяжелой цепи и CDR легкой цепи 14C12.

Аминокислотные последовательности тяжелых цепей NTPDV2 и NTPDV4 идентичны и обозначены как NTPDH2/4 (SEQ ID NO: 83), а нуклеотидная последовательность тяжелых цепей NTPDV2 или NTPDV4 представляет собой SEQ ID NO: 84.

Аминокислотные последовательности тяжелых цепей NTPDV1 и NTPDV3 идентичны и обозначены как NTPDH1/3 (SEQ ID NO: 85), а нуклеотидная последовательность тяжелых цепей NTPDV1 или NTPDV3 представляет собой SEQ ID NO: 86.

Последовательности 3 CDR 19F3L3 и 19F3L2 фрагмента иммуноглобулина в NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4 идентичны трем CDR легкой цепи антитела 19F3.

Аминокислотная последовательность легкой цепи 19F3L3 фрагмента иммуноглобулина в NTPDV1 или NTPDV2 идентична последовательности легкой цепи (SEQ ID NO: 28) антитела 19F3H2L3(G1M), и нуклеотидная последовательность легкой цепи 19F3L3 фрагмента иммуноглобулина в NTPDV1 или NTPDV2 представляет собой SEQ ID NO: 27. Аминокислотная последовательность легкой цепи 19F3L2 фрагмента иммуноглобулина в NTPDV3 или NTPDV4 представляет собой SEQ ID NO: 96, а нуклеотидная последовательность легкой цепи 19F3L2 фрагмента иммуноглобулина в NTPDV3 или NTPDV4 представляет собой SEQ ID NO: 100.

(1) NTPDV1, тяжелая цепь которого имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, линкер 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, 14C12H1V имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, линкер 2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, и 14C12L1V имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68;

(2) NTPDV2, тяжелая цепь которого имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, линкер 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, 14C12H1V имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, линкер 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, и 14C12L1V имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68;

(3) NTPDV3, тяжелая цепь которого имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, линкер 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, 14C12H1V имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, линкер 2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, и 14C12L1V имеет аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 68; и

(4) NTPDV4, тяжелая цепь которого имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, линкер 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, 14C12H1V имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, линкер 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, и 14C12L1V имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

Экспрессия и очистка антител

Последовательности кДНК тяжелой цепи NTPDV1 и NTPDV3, последовательности кДНК тяжелой цепи NTPDV2 и NTPDV4 и последовательности их кДНК легкой цепи были отдельно клонированы в вектор pUC57simple (предоставленный Genscript) для получения плазмид pUC57simple-NTPDH2/4, pUC57simple-NTPDH1/3, pUC57simple-19F3L3 и pUC57simple-19F3L2, соответственно.

Плазмиду pUC57simple-NTPDH2/4 и плазмиду pUC57simple-19F3L3, плазмиду pUC57simple-NTPDH2/4 и плазмиду pUC57simple-19F3L2, плазмиду pUC57simple-NTPDH1/3 и плазмиду pUC57simple-19F3L3, а также плазмиду pUC57simple-NTPDH1/3 и плазмиду pUC57simple-19F3L2 расщепляли (HindIII и EcoRI). Восстановленные тяжелые и легкие цепи отдельно субклонировали в вектор pcDNA3.1 с получением плазмид pcDNA3.1-NTPDH2/4 и pcDNA3.1-19F3L3, плазмид pcDNA3.1-NTPDH2/4 и pcDNA3.1-19F3L2, плазмид pcDNA3.1-NTPDH1/3 и pcDNA3.1-19F3L3, а также плазмид pcDNA3.1-NTPDH1/3 и pcDNA3.1-19F3L2. Рекомбинантные плазмиды экстрагировали и котрансфицировали в клетки 293F. Через 7 дней культивирования культуральную среду отделяли центрифугированием на высокой скорости, супернатант концентрировали и загружали в колонку HiTrap MabSelect SuRe. Белок элюировали в одну стадию элюирующим буфером. Целевой образец выделяли, а буфер заменяли на PBS.

Очищенные антитела NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4 получали в соответствии со способами экспрессии и очистки, упомянутыми в приведенных выше примерах получения.

Пример 16: Анализ связывающей активности биспецифических антител против CD73/против PD-1 с антигенами с помощью ИФА

1. Активность связывания NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4 с антигеном PD-1-mFc, определенная с помощью ИФА

На микропланшет наносили покрытие в виде PD-1-mFc (0,5 мкг/мл) и инкубировали при 4°C в течение ночи. Затем микропланшет, покрытый антигенами, однократно промывали PBST, а затем блокировали раствором PBS, содержащим 1% BSA в качестве блокирующего раствора, при 37°C в течение 2 часов. После блокировки микропланшет промывали 3 раза PBST. Добавляли антитела, серийно разведенные раствором PBST (градиенты разведения для антител показаны в Таблице 2). Микропланшет, содержащий тестируемые антитела, инкубировали при 37°C в течение 30 мин, затем 3 раза промывали PBST. После промывания добавляли рабочий раствор вторичных антител в виде HRP-

меченных козьих антител против человеческого IgG Fc (Jackson, кат. № 109-035-098), разбавленный в соотношении 1:5000, и микропланшет инкубировали при 37°C в течение 30 мин. После инкубации планшет промывали 4 раза PBST, добавляли TMB (Neogen, 308177) в темноте для хромогенеза в течение 8 мин, затем добавляли стоп-раствор для прекращения хромогенной реакции. Микропланшет немедленно помещали в микропланшет-ридер, и считывали значение оптической плотности каждой лунки микропланшета при 450 нм. Данные анализировали и обрабатывали программой SoftMax Pro 6.2.1.

Результаты представлены в Таблице 10. Можно видеть, что NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4 могут эффективно связываться с антигеном PD-1-mFc дозозависимым образом. Интенсивность поглощения каждой дозы показана в таблице 10. При количественном анализе поглощения связанных антител значения эффективности связывания EC_{50} антител NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4 и 14C12H1L1(hG1TM) (в качестве контроля), полученные с помощью эмпирической кривой, составили 0,101 нМ, 0,119 нМ, 0,110 нМ, 0,123 нМ и 0,031 нМ, соответственно.

Приведенные выше экспериментальные результаты показали, что в тех же экспериментальных условиях активность связывания NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4 с PD-1-mFc сравнима с активностью эталонных препаратов 14C12H1L1(hG1TM) для той же мишени, что свидетельствует о том, что NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4 обладают активностью эффективного связывания с PD-1-mFc.

Таблица 10. Связывание NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4 и 14C12H1L1(hG1TM) с PD-1-mFc, определенное с помощью ИФА

Концентрация разведения антител (нМ)	Антигенное покрытие PD-1-mFc 0,5 мкг/мл									
	NTPDV1		NTPDV2		NTPDV3		NTPDV4		14C12H1L1 (hG1TM)	
5	2,222	2,231	2,249	2,249	2,204	2,171	2,244	2,289	2,399	2,524
1:3	2,206	2,195	2,160	2,223	2,211	2,167	2,222	2,209	2,361	2,441
1:9	2,039	2,027	1,922	2,013	2,010	1,971	1,920	1,944	2,273	2,401
1:27	1,514	1,530	1,425	1,446	1,489	1,414	1,417	1,464	2,071	2,091
1:81	0,880	0,844	0,804	0,802	0,829	0,807	0,794	0,804	1,644	1,691
1:243	0,400	0,396	0,363	0,369	0,386	0,381	0,373	0,379	1,006	1,059
1:729	0,183	0,184	0,176	0,174	0,175	0,174	0,170	0,178	0,503	0,531
0	0,053	0,056	0,055	0,056	0,056	0,056	0,054	0,059	0,057	0,059
Вторичное антитело	HRP-меченное козье антитело против человеческого IgG Fc (1:5000)									
EC_{50} (нМ)	0,101		0,119		0,110		0,123		0,031	

2. Активность связывания NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4 с антигеном NT5E человека-биотин определяли с помощью ИФА

На микропланшет наносили покрытие в виде стрептавидина SA (2 $\mu\text{g/mL}$), а затем инкубировали при 4°C в течение ночи. После инкубации микропланшет, покрытый стрептавидином, один раз промывали PBST и блокировали раствором PBS, содержащим 1% BSA в качестве блокирующего раствора для микропланшета, при 37°C в течение 2 часов. После блокировки микропланшет промывали 3 раза PBST. Затем добавляли 0,5 мкг/мл антигена в виде NT5E человека-биотин и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Затем планшет промывали 3 раза PBST. Серийно разбавленные раствором PBST антитела (градиенты разведения антител показаны в таблице 11) добавляли в лунки микропланшета. Микропланшет, содержащий тестируемые антитела, инкубировали при 37°C в течение 30 мин, затем 3 раза промывали PBST. После промывания добавляли рабочий раствор вторичных антител в виде HRP-меченных козых антител против человеческого IgG Fc (Jackson, кат. № 109-035-098), разбавленный в соотношении 1:5000, и микропланшет инкубировали при 37°C в течение 30 мин. После инкубации планшет промывали 4 раза PBST, добавляли TMB (Neogen, 308177) в темноте для хромогенеза в течение 7 мин, затем добавляли стоп-раствор для прекращения хромогенной реакции. Микропланшет немедленно помещали в микропланшет-ридер, и считывали значение оптической плотности каждой лунки микропланшета при 450 нм. Данные анализировали и обрабатывали программой SoftMax Pro 6.2.1.

Результаты представлены в Таблице 11. Можно видеть, что NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4 и 19F3H2L3(hG1M) могут эффективно связываться с антигеном NT5E человека-биотин дозозависимым образом (интенсивность поглощения каждой дозы показана в таблице 11). При количественном анализе поглощения связанных антител значения эффективности связывания EC_{50} антител NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4 и 19F3H2L3(hG1M) (в качестве контрольного антитела), полученные с помощью эмпирической кривой, составили 0,079 нМ, 0,082 нМ, 0,084 нМ, 0,077 нМ и 0,029 нМ, соответственно.

Приведенные выше экспериментальные результаты показали, что в тех же экспериментальных условиях активность связывания биспецифических антител NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4 с комплексом NT5E человека-биотин сравнима с активностью эталонного препарата 19F3H2L3(hG1M) для той же мишени, что позволяет предположить, что NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4 обладают активностью эффективного связывания с комплексом NT5E человека-биотин.

Таблица 11. Связывание NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4 и 19F3H2L3(hG1M) с NT5E человека-биотин, определенное с помощью ИФА

Концентрация разведения антител (нМ)	Антигенное покрытие SA: 2 мкг/мл									
	NT5E человека-биотин (0,5 мкг/мл)									
	NTPDV1		NTPDV2		NTPDV3		NTPDV4		19F3H2L3 (hG1M)	
5	2,286	2,300	2,322	2,333	2,364	2,286	2,298	2,291	2,371	2,383

1:3	2,412	2,347	2,450	2,409	2,381	2,412	2,427	2,421	2,420	2,506
1:9	2,227	2,177	2,226	2,238	2,230	2,081	2,186	2,222	2,322	2,345
1:27	1,795	1,729	1,744	1,746	1,768	1,698	1,734	1,759	2,125	2,162
1:81	1,071	1,070	1,103	1,058	1,068	1,025	1,095	1,125	1,649	1,752
1:243	0,528	0,527	0,540	0,551	0,552	0,534	0,552	0,611	1,067	1,143
1:729	0,273	0,274	0,271	0,275	0,279	0,267	0,275	0,309	0,542	0,601
0	0,092	0,092	0,090	0,087	0,092	0,090	0,092	0,095	0,112	0,206
Вторичное антитело	HRP-меченное козье антитело против человеческого IgG Fc (1:5000)									
EC ₅₀ (нМ)	0,079		0,082		0,084		0,077		0,029	

Пример 17. Активность биспецифических антител против CD73/против PD-1, дополненных PD-L1 человека-mFc, в отношении связывания с PD-1 человека-mFc-биотин, определенная с помощью конкурентного ИФА

На микропланшет наносили покрытие в виде PD-L1 человека-mFc (PD-L1 Genbank ID: NP_054862.1, mFc SEQ ID NO: 89) в концентрации 2 мкг/мл и инкубировали при 4°C в течение ночи. После инкубации микропланшет блокировали раствором PBS, содержащим 1% BSA, при 37°C в течение 2 часов. После блокировки планшет один раз промывали и сушили. Антитело серийно разбавляли до 7 концентраций в соотношении градиента 1:3 на планшете для разведения с начальной концентрацией 10 мкг/мл и устанавливали пустой контроль. Затем добавляли равный объем 0,3 мкг/мл раствора PD-1 человека-mFc-биотин, хорошо перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем смесь после реакции добавляли в микропланшет с покрытием, и микропланшет инкубировали при 37°C в течение 30 мин. После инкубации планшет трижды промывали PBST и сушили. Добавляли рабочий раствор SA-HRP (KPL, 14-30-00) и планшет инкубировали при 37°C в течение 30 мин. После инкубации планшет промывали четыре раза и вытирали насухо. Затем добавляли TMB (Neogen, 308177) в темноте для хромогенеза в течение 5 мин и добавляли стоп-раствор для прекращения хромогенной реакции. Затем микропланшет немедленно помещали в микропланшет-ридер и значение оптической плотности каждой лунки в микропланшете считывали при 450 нм. Данные анализировали и обрабатывали программой SoftMax Pro 6.2.1.

Значения OD для всех дозировок показаны в таблице 12. Путем количественного анализа интенсивности поглощения связанного антитела моделировали кривую, чтобы получить эффективность связывания EC₅₀ антитела (таблица 12).

Результаты показали, что NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4 и 14C12H1L1(hG1TM) (в качестве контроля) могут эффективно блокировать связывание антигена PD-1 человека-mFc-биотина с его рецептором PD-L1 человека-mFc дозозависимым образом. Значения EC₅₀ для NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4 и 14C12H1L1(hG1TM) для блокирования связывания PD-1 человека-mFc-биотин с его лигандом PD-L1 человека-mFc составили 2,249 нМ, 2,253 нМ, 2,332 нМ, 2,398 нМ, 2,216 нМ и 2,231 нМ, соответственно.

Таблица 12. Активность NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4 и 14C12H1L1(hG1TM), конкурирующих с PD-L1 человека-mFc за связывание с PD-1 человека-mFc-биотин

Разведение антитела (нМ)	Антигенное покрытие: PD-L1 человека-mFc 2 мкг/мл									
	NTPDV1		NTPDV2		NTPDV3		NTPDV4		14C12H1L1 (hG1TM)	
50	0,086	0,082	0,084	0,081	0,077	0,087	0,076	0,076	0,081	0,077
1:3	0,083	0,083	0,083	0,084	0,083	0,085	0,084	0,090	0,087	0,082
1:9	0,202	0,195	0,204	0,204	0,195	0,183	0,189	0,214	0,120	0,119
1:27	0,604	0,616	0,564	0,593	0,628	0,598	0,521	0,584	0,576	0,634
1:81	0,837	0,821	0,790	0,809	0,816	0,884	0,782	0,768	0,797	0,871
1:243	0,946	0,938	0,822	0,929	0,895	0,851	0,926	0,891	0,880	0,934
1:729	0,956	0,938	0,884	0,878	0,928	0,923	0,854	0,902	0,901	0,964
0	1,012	0,952	0,891	0,966	0,918	0,983	0,919	0,966	0,904	0,954
PD-1 человека-mFc-биотин: 0,3 мкг/мл										
Вторичное антитело SA-HRP (1:4000)										
EC ₅₀ (нМ)	2,253		2,332		2,398		2,216		2,231	

Пример 18. Кинетические параметры связывания биспецифических антител против CD73/против PD-1 с антигеном PD-1 человека-mFc, определенные с помощью системы Fortebio

Буфером для разведения образца был PBS (0,02% Tween-20, 0,1% BSA, pH 7,4). PD1-mFc иммобилизовали на сенсоре АМС в концентрации 5 мкг/мл с высотой иммобилизации примерно 0,1 нМ (время 60 с). Сенсор уравнивали в буфере в течение 60 с и в течение 120 с определяли связывание иммобилизованного на сенсоре PD1-mFc с антителами в концентрациях 0,62-50 нМ (трехкратное разведение). Белок диссоциировал в буфере в течение 300 с. Температура детектирования составляла 37 °С, частота детектирования составляла 0,3 Гц, а скорость встряхивания планшета для образцов составляла 1000 об/мин. Данные анализировали с помощью модели подбора 1:1 для получения констант аффинности.

Результаты определения констант аффинности гуманизированных антител NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4 и ниволумаба (в качестве контрольного антитела) к PD-1 человека-mFc показаны в Таблице 13, а результаты детектирования показаны на ФИГ. 19, 20, 21, 22 и 18. Константы аффинности гуманизированных антител NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4 и ниволумаба к PD-1 человека-mFc составляли 1,40E-10 М, 7,39E-11 М, 1,25E-10 М, 1,13E-11 М и 2,26E-10 М, соответственно. Приведенные выше экспериментальные результаты показали, что связывающая способность NTPDV1, NTPDV3 и ниволумаба сопоставима, а связывающая способность NTPDV2 и NTPDV4 превосходит таковую ниволумаба, что свидетельствует о том, что гуманизированные

антитела NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4 обладают более сильной связывающей способностью в отношении PD-1 человека-mFc.

Таблица 13. Константы аффинности 14C12H1L1(hG1TM), NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3, NTPDV4 и ниволумаба к PD-1-mFc

Тестируемые антитела	KD (M)	Kon (1/мс)	S E (kon)	Kdis (1/с)	S E (kdis)	Rmax (нМ)
14C12H1L1(hG1TM)	4,45E-11	1,18E+06	5,74E+04	5,23E-05	4,47E-05	0,38-0,57
Ниволумаб	2,26E-10	1,52E+06	7,79E+04	3,43E-04	4,66E-05	0,25-0,37
NTPDV1	1,40E-10	6,09E+05	2,01E+04	8,55E-05	3,18E-05	0,38-0,52
NTPDV2	7,39E-11	6,83E+05	2,47E+04	5,05E-05	3,50E-05	0,40-0,55
NTPDV3	1,25E-10	6,68E+05	2,52E+04	8,35E-05	3,44E-05	0,38-0,50
NTPDV4	1,13E-11	5,35E+05	1,59E+04	6,03E-06	2,77E-05	0,35-0,47

K_D - константа аффинности; $K_D = k_{dis}/k_{on}$

Пример 19: Кинетические параметры связывания биспецифических антител против CD73/против PD-1 с антигеном NT5E (1-552) человека-his, определенные с помощью системы Fortebio.

Буфером для разведения образца был PBS (0,02% Tween-20, 0,1% BSA, pH 7,4). HNT5E(1-552)-his иммобилизовали на сенсоре HIS1K в концентрации 5 мкг/мл с высотой иммобилизации примерно 0,4 нМ (время 50 с). Сенсор уравнивали в буфере в течение 60 с и в течение 100 с определяли связывание иммобилизованного HNT5E(1-552)-his на сенсоре с антителами в концентрациях 0,31-25 нМ (трехкратное разведение). Белок диссоциировал в буфере в течение 180 с. Температура детектирования составляла 37 °C, частота детектирования составляла 0,3 Гц, а скорость встряхивания планшета для образцов составляла 1000 об/мин. Данные анализировали с помощью модели подбора 1:1 для получения констант аффинности.

Результаты определения констант аффинности гуманизированных антител 19F3H2L3(hG1M) (в качестве контрольного антитела), NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4 для NT5E(1-552) человека-his представлены в Таблице 14, а результаты детектирования показаны на ФИГ. 24-27. Константы аффинности гуманизированных антител NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4 к NT5E(1-552) человека-his составляли 3,29E-11 M, 2,88E-11 M, 7,92E-11 M и 5,77E-11 M, соответственно.

Приведенные выше экспериментальные результаты показали, что способность связывания 19F3H2L3(hG1M), NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4 сопоставима, что свидетельствует о том, что гуманизированные антитела NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4 обладают более сильной связывающей способностью в отношении NT5E(1-552) человека-his.

Таблица 14. Константы аффинности 19F3H2L3(hG1M), NTPDV1, NTPDV2, NTPDV3 и NTPDV4 для NT5E(1-552) человека-his

Тестируемые антитела	K_D (M)	kon (1/мс)	S E (kon)	kdis (1/с)	S E (kdis)	Rmax (нМ)
----------------------	-----------	------------	-----------	------------	------------	-----------

19F3H2L3 (hG1M)	4,05 E-11	1,16 E+06	6,50 E+04	4,68 E-05	8,96 E-05	0,36- 0,77
NTPDV1	3,29 E-11	1,16 E+06	3,27 E+04	3,80 E-05	4,63 E-05	0,49- 0,61
NTPDV2	2,88 E-11	1,27 E+06	3,84 E+04	3,66 E-05	4,88 E-05	0,63- 0,71
NTPDV3	7,92 E-11	1,28 E+06	4,08 E+04	1,02 E-04	5,29 E-05	0,55- 0,65
NTPDV4	5,77 E-11	1,23 E+06	3,82 E+04	7,09 E-05	4,95 E-05	0,52- 0,63

K_D - константа аффинности; $K_D = k_{dis}/k_{on}$

Пример 20: Детектирование ингибирования биспецифическим антителом против CD73/против PD-1 ферментативной активности CD73 на поверхности клеточной мембраны U87-MG.

Брали клетки U87-MG в логарифмической фазе в хорошем состоянии, ресуспендировали в бессывороточном культуральном растворе RPMI-1640 и затем подсчитывали. Клетки U87-MG высевали в 96-луночный планшет в количестве $2,5 \times 10^4$ клеток/60 мкл/лунку. Антитело разбавляли в соответствии с планом исследования бессывороточным культуральным раствором RPMI-1640. Антитело добавляли в 96-луночный планшет в количестве 60 мкл/лунку, и планшет инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Через 1 ч в каждую лунку добавляли 60 мкл 600 мкМ RPMI-1640, разбавленного AMP. Через 3 ч отбирали 100 мкл супернатанта клеточной культуры и переносили в новый 96-луночный планшет, в каждую лунку добавляли по 40 мкл хромогенного раствора CTG (CellTiterGlo) и помещали планшет в темноту при комнатной температуре на 5 мин. Через 5 мин в каждую лунку добавляли по 10 мкл 300 мкМ АТФ для хромогенеза. Относительную интенсивность флуоресценции RLU считывали с помощью тестера для микропланшетов с несколькими метками (PerkinElmer 2140-0020).

Экспериментальные результаты представлены в Таблице 15 и на ФИГ. 28, количество АМФ в NTPDV2 сравнимо с количеством АМФ в положительном контроле MEDI9447.

Приведенные выше экспериментальные результаты показали, что добавленный АМФ может быть преобразован в аденозин А без антител за счет ферментативной активности CD73 на клеточной поверхности U87-MG, и что после добавления антитела ферментативно-катализируемая функция снижалась из-за связывание антитела NTPDV2 с CD73, так что АМФ не превращался в аденозин А. Было высказано предположение, что антитела эффективно ингибируют реакцию его ферментативной активности в бессубстратном конкурентном режиме и снижают продукцию аденозина.

Таблица 15. Детектирование ингибирования биспецифическим антителом против

CD73/против PD-1 ферментной активности CD73 на поверхности клеточной мембраны U87-MG

Название антитела	MEDI9447	19F3H2L3(h G1M)	NTPDV2
IC₅₀ (нМ)	0,1189	0,3647	0,5551

Пример 21: Биологическая активность биспецифических антител против CD73/против PD-1 в отношении стимуляции секреции IFN- γ и IL-2, определяемая с помощью смешанной реакции лимфоцитов (MLR)

1. Биологическая активность биспецифических антител против CD73/против PD-1 в отношении стимуляции секреции IFN- γ в системе смешанной реакции лимфоцитов Raji-PDL1

Клетки Raji-PDL1 субкультивировали стандартным способом. PBMC оттаивали, инкубировали с 10 мл полной среды 1640 и стимулировали 0,5 мкг/мл SEB (Dianotech, кат. No. S010201) в течение двух дней. Клетки Raji-PDL1 обрабатывали 25 мкг/мл MMC (митомицин C, Stressmarq, каталог: SIH-246, кат. No. SM286474) и помещали в инкубатор при 37°C на 1 час. PBMC (моноклеарные клетки периферической крови), стимулированные SEB в течение 2 дней, и клетки Raji-PDL1, обработанные MMC в течение 1 ч, собирали, дважды промывали PBS, ресуспендировали в полной среде и подсчитывали. Клетки по отдельности добавляли в U-образный 96-луночный планшет в количестве 1×10^5 клеток/лунку. Антитела добавляли согласно плану исследования и культивировали в инкубаторе в течение 3 дней. Через 3 дня супернатант клеточной культуры собирали и определяли на IFN- γ с помощью ИФА.

Как показано на ФИГ. 29, смешанная культура PBMC человека и клеток Raji-PDL1 значительно стимулировала секрецию IFN- γ из PBMC, а добавление антител к системе смешанной культуры значительно индуцировало секрецию IFN- γ в PBMC. Что касается уровня стимуляции активности секреции IFN- γ , антитело NTPDV2 обладает активностью, сравнимой с активностью исходного одноцелевого антитела PD-1 14C12H1L1.

2. Биологическая активность биспецифических антител против CD73/против PD-1 в отношении стимуляции секреции IL-2 в системе смешанной реакции лимфоцитов Raji-PDL1.

Клетки Raji-PDL1 субкультивировали стандартным способом. PBMC оттаивали, инкубировали с 10 мл полной среды 1640 и стимулировали SEB (0,5 мкг/мл) в течение двух дней. Клетки Raji-PDL1 обрабатывали 25 мкг/мл MMC и помещали в инкубатор при 37°C на 1 час. PBMC (моноклеарные клетки периферической крови), стимулированные SEB в течение 2 дней, и клетки Raji-PDL1, обработанные MMC в течение 1 ч, собирали, дважды промывали PBS, ресуспендировали в полной среде и подсчитывали. Клетки по отдельности добавляли в U-образный 96-луночный планшет в количестве 1×10^5 клеток/лунку. Антитела добавляли в соответствии с планом исследования и культивировали в течение 3 дней. Супернатант клеточной культуры собирали и определяли на IL-2 с помощью ИФА.

Как показано на ФИГ. 29, смешанная культура PBMC человека и клеток Raji-PDL1 оказывала определенный стимулирующий эффект на секрецию IL-2 из PBMC, а одновременное добавление антител к смешанной культуральной системе значительно индуцировало секрецию IL-2 в PBMC в значительной степени дозозависимым образом. Что касается уровня стимулирования активности секреции IL-2, бифункциональное антитело NTPDV2 имеет активность при низкой концентрации, сравнимую с активностью исходного одноцелевого антитела 14C12H1L1 к PD-1, а активность при средне-высокой концентрации несколько ниже, чем у исходного одноцелевого антитела против PD-1 14C12H1L1.

Пример 22: Эксперимент по ингибированию роста опухоли *in vivo* биспецифическим антителом против CD73/против PD-1

Чтобы определить противоопухолевую активность *in vivo* биспецифического антитела против CD73/против PD-1, сначала клетки MC38-hPDL1/hCD73 (от GemPharmatech Co., Ltd.) подкожно инокулировали самкам C57BL6-hPD1hPDL1hCD73 тройных трансгенных мышей в возрасте 5-7 недель (от GemPharmatech Co., Ltd.). Моделирование и конкретные методы введения показаны в Таблице 16. После введения измеряли длину и ширину опухолей каждой группы и рассчитывали объем опухоли.

Таблица 16. План исследования

Группа распределения	n	Опухолевый ксенотрансплантат	Условие введения
Изотипический контроль	8	MC38-hPDL1/hCD73, 1 миллион клеток/мышь, s.c.	Антитело изотипического контроля hIgG, 10 мг/кг Два раза в неделю, в течение трех недель
19F3H2L3 (hG1M)	8		19F3H2L3(hG1M)m 10 мг/кг Два раза в неделю, в течение трех недель
NTPDV2	8		NTPDV2, 13,3 мг/кг Два раза в неделю, в течение трех недель
NTPDV2	8		NTPDV2, 1,33 мг/кг Два раза в неделю, в течение трех недель

Экспериментальные результаты показаны на ФИГ. 30 и ФИГ. 31. Результаты показали, что по сравнению с контрольными антителами изотипа hIgG и 19F3H2L3(hG1M) NTPDV2 в различных дозах может эффективно ингибировать рост опухолей у мышей, а NTPDV2 в высокой дозе превосходит NTPDV2 в низкой дозе в ингибировании опухолей. Кроме того, NTPDV2 не влиял на массу тела мышей с опухолью.

Экспериментальный пример 23. Эффективное устранение секреции IL-8 и IL-6, опосредованной биспецифическим антителом против PD-1/против CD73, биспецифическим ингибитором контрольной точки, в макрофагах человека посредством аминокислотных мутаций Fc-сегментов

HPMM были получены путем индукции PBMC. PBMC, использованные в этом исследовании, были выделены и приготовлены в компании Zhongshan Akesobio Co. Ltd., с

информированного согласия донора.

Раствор для выделения лимфоцитов Ficoll-Paque PLUS (GE, кат. № 17-1440-03); RPMI 1640 (Gibco, кат. № 22400-105); Клетки CHO-K1-PD1 (сконструированы Zhongshan Akesobio Co. Ltd.); клетки U87-MG (клетки от ATCC, приобретенные у Beijing Zhongyuan Ltd.); FBS (фетальная бычья сыворотка, Excell bio, кат. No. FSP 500); человеческий белок IFN- γ (Sinobio, кат. №11725-ХНАС-100); LPS (липополисахарид) (Sigma, кат. No. L4391); 96-луночный планшет для культивирования клеток (Corning).

РВМС здорового человека выделяли в соответствии с инструкциями по инсоляционному раствору реагента Ficoll-PaqueTM Plus и ресуспендировали в среде 1640, содержащей 2% FBS. Планшет инкубировали в инкубаторе для клеток с 5% CO₂ при 37 °C. Через 2 часа супернатант удаляли, а прикрепленные клетки дважды промывали PBS и добавляли полную среду 1640 (содержащую 10% FBS) и 100 нг/мл М-CSF человека в течение 7 дней индукции. На 3-й и 5-й день среду заменяли и добавляли М-CSF для индукции НРММ. На 7-й день после индукции НРММ клетки собирали, доводили до концентрации 0,1 млн клеток/мл с помощью полной среды и помещали в 96-луночный планшет. Добавляли рекомбинантный человеческий IFN- γ (50 нг/мл) и инкубировали в инкубаторе в течение 24 часов. Через 24 часа собирали клетки CHO-K1-PD1, экспрессирующие PD-1 человека, или клетки U87-MG, конститутивно экспрессирующие CD73 человека, в логарифмической фазе. Клетки ресуспендировали и затем доводили до концентрации 0,3 млн клеток/мл с помощью полной среды. Антитело разводили полной средой до рабочих концентраций 25 нМ, 2,5 нМ и 0,25 нМ. Антитело изотипического контроля и пустой контроль конструировали одновременно. Супернатант в 96-луночном планшете удаляли, добавляли клеточную суспензию CHO-K1-PD1 или U87-MG и антитела (конечный объем 200 мкл). Систему хорошо перемешивали и инкубировали в инкубаторе в течение 24 часов. Смесь центрифугировали при 500×g в течение 5 мин, собирали супернатант и определяли количества секрети IL-8 и IL-6 с помощью набора Dakewe. LPS использовали в качестве положительного контроля и доводили до концентрации 100 нг/мл с помощью полной среды в эксперименте.

В этом примере совместное культивирование клеток CHO-K1-PD1 и U87-MG в качестве клеток-мишеней с НРММ индуцировало активацию НРММ, и после того, как активированная НРММ была связана с клетками-мишенями с помощью Fab антитела, Fc-фрагмент антитела взаимодействовал с Fc γ R на НРММ, вызывая секрецию цитокина НРММ.

3. Результаты экспериментов

Результаты представлены на ФИГ. 32-35.

Результаты показали, что по сравнению с антителом против PD-1 подтипа IgG1 дикого типа или антителом против CD73 биспецифическое антитело против PD-1/против CD73, несущее мутацию Fc-фрагмента, способно эффективно устранять секрецию IL-6 и/или IL-8 в иммунных клетках.

Предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения подробно

описаны выше, но настоящее изобретение не ограничивается этими вариантами осуществления. Специалисты в данной области техники могут осуществить различные эквивалентные модификации или замены, не нарушая сущности настоящего изобретения. Эти эквивалентные модификации или замены входят в объем, определяемый формулой настоящей заявки.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи 19F3:

GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGACCAGAGCTGGTGAAGCCTGGCGCCTCCA
TGC GGATGTCTTGTAAGGCCTCTGGCTACAGCTTCACCGGCTATACAATGAACTG
GGTGAAGCAGTCTCACGGCAAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCTTACA
ATGCCGGCACCAGCTATAACCAGAAAGTTTAAGGGCAAGGCCACCCTGACAGTGGA
CAAGAGCTCCTCTACCGCCTACATGGAGCTGCTGTCCCTGACATCTGAGGATAGCGC
CGTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGATATGGCGGCGACTACTTTGATTA
TTGGGGCCAGGGCACCACACTGACAGTGAGCTCC

(SEQ ID NO: 1, последовательности CDR подчеркнуты)

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи 19F3:

EVQLQQSGPELVKPGASMRMSCKASGYSFTGYTMNWKQSHGKNLEWIGLIN
PYNAGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARSEYRYGGDYFD
YWGQGTTLTVSS

(SEQ ID NO: 2, последовательности CDR подчеркнуты)

HCDR1 19F3: GYSFTGYT

(SEQ ID NO: 3)

HCDR2 19F3: INPYNAGT

(SEQ ID NO: 4)

HCDR3 19F3: ARSEYRYGGDYFDY

(SEQ ID NO: 5)

Нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи 19F3:

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAAGCTCCCTGGCAATGAGCGTGGGACAGA
AGGTGACAATGTCTTGTAAGTCTAGCCCAGAGCCTGCTGAACTCCTCTAATCAGAA
GAACTACCCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCCAAGCTGCTGGTGT
ACTTTTGCCAGCACCAGGGAGTCCGGAGTGCCTGACAGATTCATCGGCTCCGGCTCT
GGCACAGACTTCACCCTGACAATCAGTCCGTGCAGGCAGAGGACCTGGCAGATTA
TTTCTGCCCAGCAGCACTACGACACCCCTTATACATTTGGCGGCGGCACCAAGCTG
GAGATCAAG

(SEQ ID NO: 6, последовательности CDR подчеркнуты)

Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи 19F3:

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLL
VYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFLTISVQAEDLADYFCQQHYDTPYTFGGGTKLEIK

(SEQ ID NO: 7, последовательности CDR подчеркнуты)

Аминокислотная последовательность LCDR1 **19F3**: QSLNSSNQKNY
(SEQ ID NO: 8)

Аминокислотная последовательность LCDR2 **19F3**: FAS
(SEQ ID NO: 9)

Аминокислотная последовательность LCDR3 **19F3**: QQHYDTPYT
(SEQ ID NO: 10)

Аминокислотные последовательности **каркасных областей тяжелой цепи 19F3**:

FR-H1: EVQLQQSGPELVKPGASMRMSCKAS (SEQ ID NO: 11)

FR-H2: MNWVKQSHGKNLEWIGL (SEQ ID NO: 12)

FR-H3: SYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYC (SEQ ID NO: 13)

FR-H4: WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 14)

Аминокислотные последовательности **каркасных областей легкой цепи 19F3**:

FR-L1: DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSS (SEQ ID NO: 15)

FR-L2: LAWYQQKPGQSPKLLVY (SEQ ID NO: 16)

FR-L3: TRESGVPDRFIGSGSGTDFLTISVQAEDLADYFC (SEQ ID NO: 17)

FR-L4: FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)

Нуклеотидная последовательность 19F3H2: (SEQ ID NO: 19, последовательности CDR подчеркнуты)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTG
TGAAGGTGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGCTATACAATGAACTG
GGTGAGGCAGGCACCAAGGACAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCTTAC
AATGCCGGCACCTCTTATAACCAGAAGTTTCAGGGCAAGGTGACCCTGACAGTGGA
CAAGTCCACCTCTACAGCCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAG
CCGTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGATATGGCGGCGACTACTTTGATT
ATTGGGGGCCAGGGCACCACTGACCGTGTCTAGC

Аминокислотная последовательность 19F3H2: (SEQ ID NO: 20, последовательности CDR подчеркнуты)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQNLEWIGLIN
PYNAGTSYNQKFQGVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSEYRYGGDYFD
YWGQGTTLTVSS

Нуклеотидная последовательность 19F3L2: (SEQ ID NO: 21, последовательности CDR подчеркнуты)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCCGTGTCTGTGGGAGAGC
GGGTGACAATCTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAACTCCTCTAATCAGAA
GAACTACCCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTAAGCTGCTGATCT
ACTTTCGCCTCTACCAGGGAGAGCGGAGTGCCAGACAGATTCTCTGGCAGCGGCTCC
GGCACAGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCGTGCAGGCAGAGGACGTGGCAGATTA
CTATTGCCAGCAGCACTACGATACCCCCTATACATTTGGCGGCGGCACCAAGCTG
GAGATCAAG

Аминокислотная последовательность 19F3L2: (SEQ ID NO: 22,

последовательности CDR подчеркнуты)

DIVMTQSPSSSLAVSVGERVTISCKSSQSLLNSSNQKNYLLAWYQQKPGQAPKLLIY
FASTTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVADYYCQQHYDTPYTFGGGTKLEIK

Нуклеотидная последовательность 19F3L3: (SEQ ID NO: 23, последовательности CDR подчеркнуты)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCCGTGTCTGTGGGAGAGC
GGGTGACAATCTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAACTCCTCTAATCAGAA
GAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAAGCCCGGCCAGGCCCTAAGCTGCTGATCT
ACTTTCGCCTCTACCAGGGAGAGCGGAGTGCCAGACAGATTCTCTGGCAGCGGCTCC
GGCACAGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGGCAGAGGACGTGGCCGTGTA
CTATTGCCAGCAGCACTACGATACCCCTATACATTTGGCGGCGGCACCAAGCTG
GAGATCAAG

Аминокислотная последовательность 19F3L3: (SEQ ID NO: 24, последовательности CDR подчеркнуты)

DIVMTQSPSSSLAVSVGERVTISCKSSQSLLNSSNQKNYLLAWYQQKPGQAPKLLIY
FASTTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYDTPYTFGGGTKLEIK

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 19F3H2L3(G1M) (SEQ ID NO: 25, без подчеркивания вариабельных последовательностей)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTG
TGAAGGTGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGCTATACAATGAACTGG
GTGAGGCAGGCACCAGGACAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCTTACAA
TGCCGGCACCTCTTATAACCAGAAGTTTCAGGGCAAGGTGACCCTGACAGTGGACA
AGTCCACCTCTACAGCCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGCC
GTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGATATGGCGGCGACTACTTTGATTATTGG
GGCCAGGGCACCACTGACCGTGTCTAGCGCCTCCACAAAG ggG ccC agc gtg ttt cct
ctc gcc ccc tcc tcc aaa a

gcaccagcggaggaaccgctgctctcggatgtctggtgaaggactacttcctgaaccgctaccgctgagctggaatagcggc
gctctgacaagcggagctccatacttcctgctgtgctgcaaagcagcggactctattccctgtccagcgtcgtcacagtgccagcagcag
cctgggcacccagacctacatctgtaacgtcaaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagaaagtggagcccaaatcctgcgaca
agacacacacctgtccccctgtcctgctcccgaaGCTGCTggaggccctagcgtcttctcttctcccaaaccaaggacacct
catgatcagcagaaccctgaagtcacctgtgtcgtcgtggtgagccatgaggaccccgaggtgaaattcaactggtatgtcgatggc
gtcgaggtgcacaacgccaacaaagccagggaggaacagtacaactccacctacagggtggtgtccgtgctgacagtctccacca
ggactggctgaacggaaggagtacaagtgcaaggtgtccaacaaggctctccctgccccattgagaagaccatcagcaaggccaaag
gccaaccagggagccccaggtctatactgcctccctccagggacgaactaccaagaaccaggtgtccctgacctgcctggtcaag
ggcttttatccagcgacatcgccgtcgagtgaggagccaacggacagcccgagaataactacaagaccacctctctgctcgtactccg
acggctccttctctgtacagcaagctgacctggacaaaagcaggtggcagcagggaaacgtgttctcctgcagcgtgatgcacgaag
ccctccacaaccactacaccagaaaagcctgtccctgagccccggcaaatga

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи 19F3H2L3(G1M) (SEQ ID NO: 26, без подчеркивания вариабельных последовательностей)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQNLEWIGLINP

YNAGTSYNQKFQGKVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCARSEYRYGGDYFDY
WGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Нуклеотидная последовательность легкой цепи 19F3H2L3(G1M) (SEQ ID NO: 27, без подчеркивания переменных последовательностей)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCCGTGTCTGTGGGAGAGC
GGGTGACAATCTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAACTCCTCTAATCAGAAGA
ACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACT
TCGCTCTACCAGGGAGAGCGGAGTGCCAGACAGATTCTCTGGCAGCGGCTCCGGC
ACAGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGGCAGAGGACGTGGCCGTGTACTAT
TGCCAGCAGCACTACGATACCCCTATACATTTGGCGGGCGGCACCAAGCTGGAGAT
CAAGCGTACGGTGGCAGCCCCATCTGTCTTCATTTTTCCCCCTAGTGACGAGCAGCT
GAAATCCGGAACAGCCTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCTCGCGAAGC
CAAGGTGCAGTGGAAGTCGATAACGCTCTGCAGAGTGGCAATTCACAGGAGAGCG
TGACTGAACAGGACTCCAAGGATTCTACCTATAGTCTGAGCTCCACTCTGACCCTGT
CCAAAGCAGATTACGAAAAGCACAAAGTGTATGCCTGTGAGGTCACCCACCAGGGG
CTGAGTTCTCCAGTCACCAAATCCTTCAACAGAGGCGAATGT

Аминокислотная последовательность легкой цепи 19F3H2L3(G1M) (SEQ ID NO: 28, без подчеркивания переменных последовательностей)

DIVMTQSPSSLAIVSGERVTISCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLIY
FASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYDTPYTFGGGTKLEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 19F3H2L3(hG1TM) (SEQ ID NO: 29, без подчеркивания переменных последовательностей)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTG
TGAAGGTGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGCTATACAATGAACTGG
GTGAGGCAGGCACCAGGACAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCTTACAA
TGCCGGCACCTCTTATAACCAGAAGTTTCAGGGCAAGGTGACCCTGACAGTGGACA
AGTCCACCTCTACAGCCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGCC
GTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGATATGGCGGCGACTACTTTGATTATTGG
GGCCAGGGCACCACACTGACCGTGTCTAGCGCCTCCACAAAG ggG ccC agc gtg ttt cct
ctc gcc ccc tcc tcc aaa a

gcaccagcggaggaaccgctgctctcggatgtctggtgaaggactacttcctgaacccgtcaccgtgagctggaatagcggc
gctctgacaagcggagtccataattccctgctgtgctgcaaagcagcggactattccctgtccagcgtgtcacagtgccagcagcag
cctgggcacccagacctacatctgtaacgtcaaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagaaagtgaggcccaaatcctgcgaca

agacacacacctgtccccctgtcctgtcccgaaGCTGCTggaGCCcctagcgttctcttctcccaaacccaaggacacc
ctcatgatcagcagaacccctgaagtcacctgtgtcgtcgtggtgatgcagccatgaggacccccgaggtgaaattcaactggtatgtcgtatgg
cgtcgaggtgcacaacgcaaaaaccaagcccagggagggaacagtacaactccacctacaggggtggtgtccgtgctgacagtctctccacc
aggactggctgaacggcaaggagtacaagtgaagggtgtccaacaaggctctccctgccccattgagaagaccatcagcaaggccaaa
ggccaacccagggagccccaggtctatactgctccctccagggacgaactcaccaagaaccaggtgtccctgacctgctgtggtcaa
gggcttttatcccagcgacatcgccgtcgagtgggagtccaacggacagcccagagaataactacaagaccacccctctgtcctcgactcc
gacggctccttctctgtacagcaagctgacctggacaaaaagcaggtggcagcagggaaacgtgttctctgcagcgtgatgcacgaa
gccccccacaaccactacaccagaaaaagcctgtccctgagccccggcaaatga

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи 19F3H2L3(hG1TM): (SEQ ID NO: 30)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYSTGYTMNWVRQAPGQNLEWIGLINP
 YNAGTSYNQKFQGKVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARSEYRYGGDYFDY
 WGQGTTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
 TCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
 SKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Аминокислотные последовательности каркасных областей 19F3H2:

FR-H1: QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS (SEQ ID NO: 31)

FR-H2: MNWVRQAPGQNLEWIGL (SEQ ID NO: 32)

FR-H3: SYNQKFQGKVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYC (SEQ ID NO: 33)

FR-H4: QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS (SEQ ID NO: 34)

Аминокислотные последовательности каркасных областей 19F3L2:

FR-L1: DIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSS (SEQ ID NO: 35)

FR-L2: LAWYQQKPGQAPKLLIY (SEQ ID NO: 36)

FR-L3: TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVADYYC (SEQ ID NO: 37)

FR-L4: FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 38)

Аминокислотные последовательности каркасных областей 19F3L3:

FR-L1: DIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSS (SEQ ID NO: 39)

FR-L2: LAWYQQKPGQAPKLLIY (SEQ ID NO: 40)

FR-L3: TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC (SEQ ID NO: 41)

FR-L4: FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 42)

Нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи 14C12:
 (SEQ ID NO: 43)

GAGGTCAAACCTGGTGGAGAGCGGCGGGCTGGTGAAGCCCGGCGGGTCA
 CTGAAACTGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCATGG
 GTGAGGCAGACCCCTGAGAAGCGCCTGGAATGGGTCGCTACTATCAGCGGAGGCGG
 GCGATACACCTACTATCCTGACTCTGTCAAAGGGAGATTACAATAGTCGGGATAA
 CGCCAGAAATACTCTGTATCTGCAGATGTCTAGTCTGCGGTCCGAGGATACAGCTCT

GTACTATTGTGCAAACCGGTACGGCGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGACAGGGCA
CCCTGGTGACAGTCTCTGCC

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи 14C12: (SEQ ID NO: 44)

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVATISGG
GRYTYYPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDALYYCANRYGEAWFAYWGQG
TLVTVSA

Аминокислотная последовательность HCDR1 **14C12:** GFAFSSYD
(SEQ ID NO: 45)

Аминокислотная последовательность HCDR2 **14C12:** ISGGGRYT
(SEQ ID NO: 46)

Аминокислотная последовательность HCDR3 **14C12:** ANRYGEAWFAY
(SEQ ID NO: 47)

Нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи 14C12:
(SEQ ID NO: 48)

GACATTAAGATGACACAGTCCCCTTCCTCAATGTACGCTAGCCTGGGCGAGC
GAGTGACCTTCACATGCAAAGCATCCCAGGACATCAACACATACCTGTCTTGTTTC
AGCAGAAGCCAGGCAAAAGCCCCAAGACCCTGATCTACCGGGCCAATAGACTGGTG
GACGGGGTCCCCAGCAGATTCTCCGGATCTGGCAGTGGGCAGGATTACTCCCTGACC
ATCAGCTCCCTGGAGTATGAAGACATGGGCATCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAG
TTCCCTCTGACCTTTGGAGCAGGCACAAAAGTGGAACTGAAG

Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи 14C12: (SEQ ID NO: 49)

DIKMTQSPSSMYASLGERVTFTCKASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV
DGVPSRFSGSGSGQDYSLTISLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK

Аминокислотная последовательность LCDR1 **14C12:** QDINTY (SEQ ID NO: 50)

Аминокислотная последовательность LCDR2 **14C12:** RAN (SEQ ID NO: 51)

Аминокислотная последовательность LCDR3 **14C12:** LQYDEFPLT (SEQ ID NO:
52)

Аминокислотная последовательность каркасных областей тяжелой цепи 14C12:

FR-H1: EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAS (SEQ ID NO: 53)

FR-H2: MSWVRQTPEKRLEWVAT (SEQ ID NO: 54)

FR-H3: YYPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDALYYC (SEQ ID NO: 55)

FR-H4: WGQGTTLVTVSA (SEQ ID NO: 56)

Аминокислотная последовательность каркасных областей легкой цепи 14C12:

HR-L1: DIKMTQSPSSMYASLGERVTFTCKAS (SEQ ID NO: 57)

HR-L2: LSWFQQKPGKSPKTLIY (SEQ ID NO: 58)

HR-L3: RLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISLEYEDMGIYYC (SEQ ID NO: 59)

HR-L4: FGAGTKLELK (SEQ ID NO: 60)

Нуклеотидная последовательность 14C12H1: (SEQ ID NO: 61)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGGTCA
 CTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGG
 GTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTACTATCTCAGGAGGCGG
 GAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATA
 ACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCA
 CTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGA
 ACCCTGGTGACAGTCTCTAGT

Аминокислотная последовательность 14C12H1: (SEQ ID NO: 62)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISG
 GGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQ
 GTLVTVSS

Нуклеотидная последовательность 14C12L1: (SEQ ID NO: 63)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGACA
 GGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTTC
 AGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGACTGGTG
 TCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACACTCTGAC
 CATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGA
 GTTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAAACCTGGAGCTGAAG

Аминокислотная последовательность 14C12L1: (SEQ ID NO: 64)

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV
 SGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 14C12H1L1 (SEQ ID NO: 65)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGGTCA
 CTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGG
 GTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTACTATCTCAGGAGGCGG
 GAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATA
 ACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCA
 CTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGA
 ACCCTGGTGACAGTCTCTAGTGCCAGCACCAAAGGACCTAGCGTGTTTCCTCTCGCC
 CCCTCCTCCAAAAGCACCGAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGA
 CTA CTTCCTGAACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGT
 CCATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAGCGTCGT
 CACAGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTCAACCACA
 AGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACA
 CACACCTGTCCCCCTGTCTGCTCCCGAACTCCTCGGAGGCCCTAGCGTCTTCCTCT
 TTCCTCCCAAACCCAAGGACACCTCATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTCACCTGTG
 TCGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTCGATG
 GCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCCACC
 TACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGA

GTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCCATTGAGAAGACCATCA
GCAAGGCCAAAGGCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGG
GACGAACCTACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCC
AGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAACTACAAGAC
CACCCCTCCTGTCTCTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG
GACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAAGC
CCTCCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи 14C12H1L1: (SEQ ID NO: 66)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISG
GGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Нуклеотидная последовательность легкой цепи 14C12H1L1 (SEQ ID NO: 67)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGACA
GGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTTC
AGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGACTGGTG
TCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACACTCTGAC
CATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGA
GTTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGGACAAAACCTGGAGCTGAAGCGAACTGTGGCCG
CTCCCTCCGTCTTCATTTTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAATCAGGCACAGCCA
GCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCTAGAGAGGCAAAAGTGCAGTGGAAG
GTCGATAACGCCCTGCAGTCCGGCAACAGCCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTC
AAAAGATAGCACCTATTCCTGTCTAGTACACTGACTCTGTCCAAGGCTGATTACGA
GAAGCACAAAGTGTATGCATGCGAAGTGACACATCAGGGACTGTCAAGCCCCGTGA
CTAAGTCTTTTAACCGGGGCGAATGT

Аминокислотная последовательность легкой цепи 14C12H1L1: (SEQ ID NO: 68)

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV
SGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 14C12H1L1(G1TM) (SEQ ID NO: 69)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGGTCA
CTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTGCGCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGG
GTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTACTATCTCAGGAGGCGG

GAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATA
 ACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCA
 CTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCGAGGA
 ACCCTGGTGACAGTCTCTAGTGCCAGCACCAAAGGGCCCAGCGTGTTTCCTCTCGCC
 CCCTCCTCCAAAAGCACCAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGA
 CTA CTTCCTGAACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGT
 CCATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAGCGTCGT
 CACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTCAACCACA
 AGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACA
 CACACCTGTCCCCCCTGTCTGCTCCCGAAGCTGCTGGAGCCCCTAGCGTCTTCCTCT
 TTCCTCCCAAACCCAAGGACACCTCATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTCACCTGTG
 TCGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTCGATG
 GCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAACAGTACA ACTCCACC
 TACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGA
 GTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCCATGAGAAGACCATCA
 GCAAGGCCAAAGGCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACTGCCTCCCTCCAGG
 GACGA ACTCACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCC
 AGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAACTACAAGAC
 CACCCCTCCTGTCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTG
 GACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAAGC
 CCTCCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA

**Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи
 14C12H1L1(G1TM): (SEQ ID NO: 70)**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISG
 GGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
 PAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**Аминокислотные последовательности каркасных областей тяжелой цепи
 14C12H1:**

FR-H1: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 71)

FR-H2: MSWVRQAPGKGLDWVAT (SEQ ID NO: 72)

FR-H3: YYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYC (SEQ ID NO: 73)

FR-H4: WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 74)

**Аминокислотные последовательности каркасных областей легкой цепи
 14C12L1:**

FR-L1: DIQMTQSPSSMSASVGDRVTF TCRAS (SEQ ID NO: 75)

FR-L2: LSWFQQKPGKSPKTLIY (SEQ ID NO: 76)

FR-L3: RLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYC (SEQ ID NO: 77)

FR-L4: FGAGTKLELK (SEQ ID NO: 78)

Аминокислотная последовательность Линкера1:
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 79)

Нуклеотидная последовательность Линкера1: (SEQ ID NO: 80)

GGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGAGGCGGCTCTGGCGGC
 GGCGGCAGC

Аминокислотная последовательность Линкера2: GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 81)

Нуклеотидная последовательность Линкера2: (SEQ ID NO: 82)
 GGCGGCGGCGGCTCCGGAGGAGGCGGCTCTGGCGGCGGCGGCAGC

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи NTPDV2 и NTPDV4 (SEQ ID NO: 83): где области CDR 19F3H2(hG1TM) в иммуноглобулиновой части выделены жирным подчеркиванием, области CDR 14C12H1V-Линкер1-14C12L1V в части scFv выделены жирным подчеркиванием, мутированные аминокислоты в области тяжелой цепи выделены жирным курсивом, а линкерные области выделены жирным шрифтом:

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS**GYSFTGYTMN**WVRQAPGQNLEWIGL**IN**
PYNAGTSYNQKFQGVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC**ARSEYRYGGDYFD**
YWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
 SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKVEPKSCDKTH
 TCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGS
 GGGGSGGGGSEVOLVESSGGGLVOPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVROAPGKGLDWVA
TISGGGRYTYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLOMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWG
OGTLTVYSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIOMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASODIN
TYLSWFQOKPGKSPKTLIY**RANRLV**SGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLOYD
EFPLTFGAGTKLELKR

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи NTPDV2 и NTPDV4: (SEQ ID NO: 84)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTG
 TGAAGGTGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGCTATACAATGAACTGG
 GTGAGGCAGGCACCAGGACAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCTTACAA
 TGCCGGCACCTCTTATAACCAGAAGTTTCAGGGCAAGGTGACCCTGACAGTGGACA
 AGTCCACCTCTACAGCCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGCC
 GTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGATATGGCGGCGACTACTTTGATTATTGG
 GGCCAGGGCACCACTGACCGTGTCTAGCgcctccacaaaggggccagcgtgttctctcgccccctct
 ccaaaagcaccagcggaggaaccgctgctctcgatgtctggtgaaggactacttcctgaaccgctaccgtgagctggaatagcggcg

ctctgacaagcggagtgccatacttccctgctgtgctgcaaagcagcggactctattccctgtccagcgtcgtcacagtgccagcagcagc
ctgggacccagacctacatctgtaacgtcaaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagaaagtgagcccaaatcctgcgacaa
gacacacacctgtccccctgtctgtctccgaaGCTGCTggagCcctagcgttcttcttcttctcccaaacccaaggacacctc
atgatcagcagaacccctgaagtcacctgtgtcgtcgtggatgtcagccatgaggaccccaggtgaaattcaactggatgtcgatggcgt
cgaggtgcacaacgcaaaaaccaagcccaggagggaacagtacaactccacctacaggggtggtgtccgtgctgacagtctccaccag
gactggctgaacggcaaggagtacaagtgaaggtgtccaacaaggctctccctgccccattgagaagaccatcagcaaggccaaagg
ccaaccaggaggagccccaggtctatactgctccctccaggaggaactcaccaagaaccaggtgtccctgacctgctgtgtaagg
gcttttatccagcgacatcgccgtcgagtgggagtgcaacggacagcccagagaataactacaagaccacctctgtctcgtactccga
cggctccttctctgtacagcaaaactgacctcgataaatctaggtggcagcagggcaacgtgttcttcttctcgtgatgcatgaagcactg
cacaaccattataccagaagtctctgagcctgtccccggcaagGGCGGCGGCGGCTCTGGAGGAGGAGGCA
GCGGCGGAGGAGGCTCCGGAGGCGGCGGCTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGA
GGAGGACTGGTGCAGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCAGCAAGCGGATT
CGCCTTTAGCTCCTACGACATGAGCTGGGTGCGGCAGGCACCTGGCAAGgggCTGGAT
TGGGTGGCAACCATCAGCGGAGGCGGCAGATACACATACTATCCCGACTCCGTGAA
GGGCAGGTTACCATCTCCCGCGATAACTCTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAA
CAGCCTGAGGGCCGAGGACACAGCCCTGTACTATTGCGCCAACCGCTACGGCGAGG
CCTGGTTTGCCTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTGTCTAGCGGCGGCGGCG
GCAGCGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGAGGCGGCTCTGGCGGCGGCGGCAGCGATATC
CAGATGACCCAGTCCCCCTCCTCTATGTCTGCCAGCGTGGGCGACCGGGTGACCTTC
ACATGTAGAGCCTCCCAGGATATCAACACCTACCTGTCTTGGTTTCAGCAGAAGCCC
GGCAAGAGCCCTAAGACACTGATCTATCGGGCCAATAGACTGGTGAGCGGAGTGCC
TTCCCGGTTCTCCGGCTCTGGCAGCGGACAGGACTATACCCTGACAATCAGCTCCCT
GCAGCCAGAGGATATGGCCACATACTATTGCCTGCAGTATGACGAGTTCCCCCTGAC
CTTCGGGgctGGCACTAAGCTGGAGCTGAAAAGA

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи NTPDV1 и NTPDV3 (SEQ ID NO: 85): где области CDR 19F3H2(hG1TM) в иммуноглобулиновой части выделены жирным подчеркиванием, области CDR 14C12H1V-Линкер2-14C12L1V в части scFv выделены жирным подчеркиванием, мутированные аминокислоты в области тяжелой цепи выделены жирным курсивом, а линкерные области выделены жирным шрифтом:

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQNLEWIGLIN
PYNAGTSYNQKFQGVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSEYRYGGDYFD
YWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTSVNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
TCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGS
GGGGSGGGGSEVOLVESGGGLVOPGGSRLSCAASGFAFSSYDMSWVROAPGKGLDWVA
TISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDNSKNNLYLOMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWG
QGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIOMTQSPSSMSASVGDRTFTCRASODINTYLSWF

QOKPGKSPKTLIYRANRLVSGVPSRFESGSGSGODYTLTISSLOPEDMATYYCLOYDEFPLTF
GAGTKLELKR

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи NTPDV1 и NTPDV3: (SEQ ID NO: 86)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTG
TGAAGGTGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGCTATACAATGAACTGG
GTGAGGCAGGCACCAGGACAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCTTACAA
TGCCGGCACCTCTTATAACCAGAAGTTTCAGGGCAAGGTGACCCTGACAGTGGACA
AGTCCACCTCTACAGCCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGCC
GTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGATATGGCGGCGACTACTTTGATTATTGG
GGCCAGGGCACCACTGACCGTGTCTAGCGCCTCCACAAaggggccagcgtgttctctcgccc
cctctccaaaagcaccagcggaggaaccgctgctctcgatgtctggtgaaggactactccctgaaccgctaccgtgagctggaatag
cggcgctctgacaagcggagtccatacttccctgctgtgctgcaaagcagcggactctattccctgtccagcgtcgtcacagtgccagca
gcagcctgggcaccagacctacatctgtaacgtcaaccacaagccctccaaaccaaggtggacaagaaagtgaggcccaaatctgc
gacaagacacacactgtccccctgtctgtctcccgaaGCTGCTggagCccctagcgttctcttcttctcccaaacccaaggaca
ccctcatgatcagcagaaccCCTGAAGTCACCTGTGTCTGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCC
CGAGGTGAAATTCAACTGGTATGTTCGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCA
AGCCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTC
CTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGC
TCTCCCTGCCCCATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAACCCAGGGAGC
CCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGGGACGAACCTACCAAGAACCAGGTGTCCC
TGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCCAGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCA
ACGGACAGCCCGAGAATAACTACAAGACCACCCCTCCTGTCCTCGACTCCGACGGC
TCCTTCTTCCTGTACAGCAAACTGACCGTCGATAAATCTAGGTGGCAGCAGGGCAAC
GTGTTCTCTTGTTCCTGTATGCATGAAGCACTGCACAACCATTATACCCAGAAGTCT
CTGAGCCTGTCCCCCGGCAAGGGCGGCGGCGGCTCTGGAGGAGGAGGCAGCGGCGG
AGGAGGCTCCGGAGGCGGCGGCTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGAC
TGGTGCAGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCAGCAAGCGGATTCGCCTTTA
GCTCCTACGACATGAGCTGGGTGCGGCAGGCACCTGGCAAGGGTCTGGATTGGGTG
GCAACCATCAGCGGAGGCGGCAGATACATACTATCCCGACTCCGTGAAGGGCAG
GTTCACCATCTCCCGCGATAACTCTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCT
GAGGGCCGAGGACACAGCCCTGTACTATTGCGCCAACCGCTACGGCGAGGCCTGGT
TTGCCTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTGTCTAGCGGCGGCGGCGGCTCC
GGAGGAGGCGGCTCTGGCGGCGGCGGCAGCGATATCCAGATGACCCAGTCCCCCTC
CTCTATGTCTGCCAGCGTGGGCGACCGGGTGACCTTCACATGTAGAGCCTCCCAGGA
TATCAACACCTACCTGTCTTGGTTTCAGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCTAAGACACT
GATCTATCGGGCCAATAGACTGGTGAGCGGAGTGCCTTCCCGGTTCTCCGGCTCTGG
CAGCGGACAGGACTATACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGCCAGAGGATATGGCCA
CATACTATTGCCTGCAGTATGACGAGTTCCCCCTGACCTTCGGGGCTGGCACTAAGC
TGGAGCTGAAAAGATGATAAGAATTC

Аминокислотная последовательность **NT5E(1-552)-his** (SEQ ID NO: 87)

MCPRAARAPATLLLALGAVLWPAAGAWELTILHTNDVHSRLEQTSSEDSSKCVN
ASRCMGGVARLFTKVQQIRRAEPNVLLLDAGDQYQGTIWFTVYKGAEV AHFMNALRY
DAMALGNHEFDNGVEGLIEPLLKEAKFPILSANIKAKGPLASQISGLYLPYKVLPVGDEV
VGIVGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEITALQPEVDKLKTLNVNKIIALGHSGFEMDKLIAQ
KVRGVDVVVGHSNTFLYTGNPPSKEVPAGKYPFIVTSDDGRKVPVVQAYAFGKYLGY
LKIEFDERGNVISSHGPNILLNSSIPEDPSIKADINKWRIKLDNYSTQELGKTIVYLDGSSQ
SCRFRECNMGNLICDAMINNNLRHTDEMFWNHVSMCILNNGGGIRSPIDERNNGTITWEN
LAAVLFPFGGTFDLVQLKGSTLKKAFEHSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDLSRKPGDR
VVKLDVLCTKCRVPSYDPLKMDEVYKVILPNFLANGGDGFQMIKDELLRHDSGDQDIN
VVSTYISKMKVIYPAVEGRIKFSTGSHHHHHH

Нуклеотидная последовательность **NT5E(1-552)-his** (SEQ ID NO: 88)

ATGTGTCTAGAGCCGCCAGAGCTCCAGCTACACTGCTGCTGGCTCTGGGAG
CAGTCCTCTGGCCAGCAGCAGGAGCTTGGGAACTGACCATCCTGCACACCAACGAC
GTGCACAGCAGGCTGGAACAGACCAGCGAGGACAGCAGCAAGTGCGTGAACGCCA
GTCGCTGTATGGGAGGAGTGGCAAGGCTGTTACCAAGGTGCAGCAGATCCGGAGA
GCCGAACCTAACGTGCTGCTGCTGGACGCCGGAGATCAGTATCAGGGAACCATCTG
GTTACCGTGTACAAGGGCGCCGAAGTGGCCCACTTCATGAACGCTCTGCGCTACGA
CGCTATGGCCCTGGGCAATCACGAGTTCGATAACGGCGTGGAGGGACTGATCGAGC
CTCTGCTGAAGGAGGCCAAGTTCCCCATCCTGAGCGCCAACATCAAGGCCAAGGGA
CCTCTGGCTAGCCAGATTAGCGGCCTGTACCTGCCTTACAAGGTGCTGCCCCTGGGA
GACGAAGTGGTGGGAATCGTGGGCTACACCAGCAAGGAGACCCCTTTCCTGAGCAA
CCCAGGCACCAACCTGGTGTTCGAGGACGAGATCACCGCTCTGCAGCCAGAGGTGG
ACAAGCTGAAGACCCTGAACGTGAACAAGATCATCGCCCTGGGACACAGCGGCTTC
GAGATGGACAAGCTGATCGCCCAGAAAGTGCGAGGAGTGGACGTGGTCTGTTGGGCG
GACACAGCAACACCTTCCTGTACACCGGCAACCCTCCTTCTAAGGAAGTGCCAGCCG
GCAAGTACCCCTTCATCGTGACCAGCGACGACGGAAGAAAGGTGCCAGTGGTGCAG
GCTTACGCCTTCGGCAAGTACCTGGGCTACCTGAAGATCGAGTTCGACGAGCGGGG
CAACGTGATCTCTAGCCACGGCAACCCCATCCTGCTGAACAGCAGCATCCCAGAGG
ACCCAGCATCAAGGCCGACATCAACAAGTGGCGGATCAAGCTGGACAACCTACAGC
ACCCAGGAGCTGGGAAAGACCATCGTGTACCTGGACGGCAGCTCTCAGTCTTGCCG
GTTCCGCGAGTGCAACATGGGCAACCTGATTTGCGACGCCATGATCAACAACAACC
TGCGGCACACCGACGAGATGTTTTGGAACCACGTCAGCATGTGCATCCTGAACGGC
GGAGGCATCAGAAGCCCTATTGACGAGCGGAACAACGGCACCATCACTTGGGAGAA
CCTGGCAGCAGTGCTGCCTTTTGGCGGAACATTCGACCTGGTGCAGCTGAAGGGCA
GCACACTGAAGAAGGCCTTCGAGCACAGCGTGACAGATACGGCCAGAGCACAGGC
GAGTTCCTGCAGGTGCGAGGAATCCACGTGGTGTACGACCTGAGCAGGAAGCCAGG
AGACAGAGTGGTGAAGCTGGACGTGCTCTGCACCAAGTGTCGGGTGCCAAGCTACG
ACCCCTGAAGATGGACGAGGTGTACAAGGTCATCCTGCCCAACTTCCTGGCTAACG
GAGGAGACGGCTTCCAGATGATCAAGGACGAGCTGCTGAGGCACGACAGCGGAGA

CCAGGACATCAACGTCGTGTCCACCTACATCAGCAAGATGAAGGTCATCTACCCCGC
CGTGGAAGGCAGGATCAAGTTCAGCACCGGCTCTCACCACCACCATCACCAC

Аминокислотная последовательность **mFc:** (SEQ ID NO: 89)
PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW
FVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTI
SKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNT
EPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

Аминокислотная последовательность 19F3H1V-Линкер-19F3L2V: (SEQ ID NO: 90)
QVQLQQSGAEVVKPGASMKMSCKASGYSFTGYTMNWVKQAHGQNLEWIGLIN
PYNAGTSYNQKFQGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSEYRYGGDYFDY
WGQGTTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSLAIVSVGERVTISCKSSQSLNNS
NQKNYLAWYQQKPGQAPKLLIYFASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVADY
YCQQHYDTPYTFGGGKLEIK

Нуклеотидная последовательность 19F3H1V-Линкер2-19F3L2V: (SEQ ID NO: 91)
CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCT
ATGAAGATGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGCTATACAATGAACTG
GGTGAAGCAGGCCCACGGCCAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCTTACA
ATGCCGGCACCTCTTATAACCAGAAGTTTCAGGGCAAGGCCACCCTGACAGTGGAC
AAGTCCACCTCTACAGCCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGC
CGTGTA CTATTGCGCCCCGGTCCGAGTACAGATATGGCGGCGACTACTTTGATTATTG
GGGCCAGGGCACCACTGACCGTGTCTAGC
GGCCTGTACGGCCTGTACGGCCTGTACGGCCTGTACAGCGAGAGGGGCCTGTACGG
CCTGTACGGCCTGTACGGCCTGTACAGCGAGAGGGGCCTGTACGGCCTGTACGGCCT
GTACGGCCTGTACAGCGAGAGGGACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGG
CCGTGTCTGTGGGAGAGCGGGTGACAATCTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGA
ACTCCTCTAATCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCC
CCTAAGCTGCTGATCTACTTCGCCTCTACCAGGGAGAGCGGAGTGCCAGACAGATTC
TCTGGCAGCGGCTCCGGCACAGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCGTGCAGGCAGA
GGACGTGGCAGATTACTATTGCCAGCAGCACTACGATACCCCCTATACATTTGGCGG
CGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

Нуклеотидная последовательность **19F3H1:** (SEQ ID NO: 92)
CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCT
ATGAAGATGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGCTATACAATGAACTG
GGTGAAGCAGGCCCACGGCCAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCTTACA
ATGCCGGCACCTCTTATAACCAGAAGTTTCAGGGCAAGGCCACCCTGACAGTGGAC
AAGTCCACCTCTACAGCCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGC
CGTGTA CTATTGCGCCCCGGTCCGAGTACAGATATGGCGGCGACTACTTTGATTATTG
GGGCCAGGGCACCACTGACCGTGTCTAGC

Аминокислотная последовательность **19F3H1:** (SEQ ID NO: 93)
QVQLQQSGAEVVKPGASMKMSCKASGYSFTGYTMNWVKQAHGQNLEWIGLINPYNA

GTSYNQKFQGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSEYRYGGDYFDYWGQ
GTTLTVSS

Нуклеотидная последовательность 19F3L1: (SEQ ID NO: 94)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCAATGTCTGTGGGAGAGA
GGGTGACAATGTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAACTCCTCTAATCAGAAGA
ACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTAAGCTGCTGGTGTACT
TTGCCTCTACCAGGGAGAGCGGAGTGCCAGACAGATTCTCTGGCAGCGGCTCCGGC
ACAGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCGTGCAGGCAGAGGACCTGGCAGATTATTTTC
TGCCAGCAGCACTACGATACCCCTATACATTTGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGAT
CAAG

Аминокислотная последовательность 19F3L1: (SEQ ID NO: 95)

DIVMTQSPSSLAMSVGERVTMSCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQAPKLL
VYFASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDLADYFCQQHYDTPYTFGGGKLEIK

Аминокислотная последовательность легкой цепи 19F3L2 (полноразмерная) (SEQ ID NO: 96, без подчеркивания переменных последовательностей)

DIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLIY
FASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVADYYCQQHYDTPYTFGGGKLEIKRT
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи 19F3H2, последовательности CDR подчеркнуты: (SEQ ID NO: 97)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQNLWIGLINP
YNAGTSYNQKFQGKVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSEYRYGGDYFDY
WGQGTTTLTVSS

Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи 19F3L2, последовательности CDR подчеркнуты: (SEQ ID NO: 98)

DIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLIY
FASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVADYYCQQHYDTPYTFGGGKLEIK

Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи 19F3L3, последовательности CDR подчеркнуты: (SEQ ID NO: 99)

DIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLIY
FASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYDTPYTFGGGKLEIK

Нуклеотидная последовательность легкой цепи 19F3L2 (полноразмерная) (SEQ ID NO: 100)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCCGTGTCTGTGGGAGAGC
GGGTGACAATCTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAACTCCTCTAATCAGAAGA
ACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACT
TCGCCTCTACCAGGGAGAGCGGAGTGCCAGACAGATTCTCTGGCAGCGGCTCCGGC
ACAGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCGTGCAGGCAGAGGACGTGGCAGATTACTA
TTGCCAGCAGCACTACGATACCCCTATACATTTGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGAT

CAAGCGTACGGTGGCAGCCCCATCTGTCTTCATTTTTCCCCCTAGTGACGAGCAGCT
GAAATCCGGAACAGCCTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCTCGCGAAGC
CAAGGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCTCTGCAGAGTGGCAATTCACAGGAGAGCG
TGACTGAACAGGACTCCAAGGATTCTACCTATAGTCTGAGCTCCACTCTGACCCTGT
CCAAAGCAGATTACGAAAAGCACAAAGTGTATGCCTGTGAGGTCACCCACCAGGGG
CTGAGTTCTCCAGTCACCAAATCCTTCAACAGAGGCGAATGT

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическое антитело против CD73/против PD-1, содержащее:

первую функциональную область белка, нацеленную на PD-1, и

вторую функциональную область белка, нацеленную на CD73,

где

первая функциональная область белка содержит: HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, где предпочтительно аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой последовательности SEQ ID NO: 45-47, соответственно, или последовательности, имеющие по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностями SEQ ID NO: 45-47, или аминокислотные последовательности, имеющие одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 45-47; и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в вариабельной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 49, где предпочтительно аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой последовательности SEQ ID NO: 50-52, соответственно, или последовательности, имеющие по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностями SEQ ID NO: 50-52, или аминокислотные последовательности, имеющие одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 50-52;

или вторая функциональная область белка содержит: HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, где предпочтительно аминокислотные последовательности HCDR1, HCDR2 и HCDR3 представляют собой последовательности SEQ ID NO: 3-5, соответственно, или последовательности, имеющие по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностями SEQ ID NO: 3-5, или аминокислотные последовательности, имеющие одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 3-5; и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в вариабельной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, где предпочтительно аминокислотные последовательности LCDR1, LCDR2 и LCDR3 представляют собой

последовательности SEQ ID NO: 8-10, соответственно, или последовательности, имеющие по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностями SEQ ID NO: 8-10, или аминокислотные последовательности, имеющие одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 8-10.

2. Биспецифическое антитело против CD73/против PD-1 по п. 1, где:

первая функциональная область белка содержит:

последовательность, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 62, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 44 или 62, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 44 или 62; и

последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, соответственно, SEQ ID NO: 49 или SEQ ID NO: 64, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 49 или 64, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 49 или 64;

и/или,

вторая функциональная область белка содержит последовательность, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 20, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 2 или 20, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 2 или 20;

и

последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, соответственно, SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 22, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 7 или 22, или

аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 7 или 22;

или

вторая функциональная область белка содержит последовательность, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 20, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 20; и

последовательность, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 24, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 24.

3. Биспецифическое антитело против CD73/против PD-1 по п. 1 или 2, где количества первой функциональной области белка и второй функциональной области белка независимо составляют 1, 2 или более.

4. Биспецифическое антитело против CD73/против PD-1 по любому из пп. 1-3, где первая функциональная область белка и вторая функциональная область белка связаны непосредственно или через линкер; предпочтительно линкер представляет собой (GGGGS) $_n$, и n представляет собой положительное целое число, например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

5. Биспецифическое антитело против CD73/против PD-1 по любому из пп. 1-4, где первая функциональная область белка и вторая функциональная область белка независимо представляют собой иммуноглобулин или антигенсвязывающий фрагмент, такой как полуантитело, Fab, F(ab') $_2$ или одноцепочечный вариабельный фрагмент, предпочтительно, первая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин, а вторая функциональная область белка представляет собой антигенсвязывающий фрагмент; или первая функциональная область белка представляет собой антигенсвязывающий фрагмент, а вторая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин.

6. Биспецифическое антитело против CD73/против PD-1 по любому из пп. 1-5, где: N-конец вариабельной области тяжелой цепи антигенсвязывающего фрагмента связан непосредственно (или через линкер) с С-концом CH1 иммуноглобулина, а N-конец вариабельной области легкой цепи антигенсвязывающего фрагмента связан непосредственно (или через линкер) с С-концом вариабельной области легкой цепи CL

иммуноглобулина; или N-конец вариабельной области тяжелой цепи антигенсвязывающего фрагмента связан непосредственно (или через линкер) с С-концом вариабельной области легкой цепи CL иммуноглобулина, а N-конец вариабельной области легкой цепи антигенсвязывающего фрагмента связан непосредственно (или через линкер) с С-концом вариабельной области тяжелой цепи CH1 иммуноглобулина, или

С-конец вариабельной области тяжелой цепи антигенсвязывающего фрагмента связан непосредственно (или через линкер) с N-концом тяжелой цепи иммуноглобулина, а С-конец вариабельной области легкой цепи антигенсвязывающий фрагмент связан непосредственно (или через линкер) с N-концом легкой цепи иммуноглобулина; или С-конец вариабельной области тяжелой цепи антигенсвязывающего фрагмента связан непосредственно (или через линкер) с N-концом легкой цепи иммуноглобулина, а С-конец вариабельной области легкой цепи антигенсвязывающего фрагмента связан непосредственно (или через линкер) с N-концом тяжелой цепи иммуноглобулина.

7. Биспецифическое антитело против CD73/против PD-1 по любому из пп. 1-6, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент; предпочтительно первая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин, а вторая функциональная область белка представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент; или первая функциональная область белка представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент, а вторая функциональная область белка представляет собой иммуноглобулин.

8. Биспецифическое антитело против CD73/против PD-1 по п. 7, где одноцепочечный вариабельный фрагмент представляет собой молекулу, образованную путем соединения вариабельной области тяжелой цепи антитела (V_H) и вариабельной области легкой цепи антитела (V_L) через линкер; предпочтительно одноцепочечный вариабельный фрагмент имеет следующую структуру: NH_2-V_L -линкер- V_H-COOH или NH_2-V_H -линкер- V_L-COOH .

9. Биспецифическое антитело против CD73/против PD-1 по п. 7 или 8, где: когда одноцепочечный вариабельный фрагмент связан с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина (C_H) (или с N-концом тяжелой цепи, С-концом вариабельной области тяжелой цепи CH1) через линкер, то сначала связывается вариабельная область тяжелой цепи антитела (V_H) одноцепочечного вариабельного фрагмента, или сначала связывается вариабельная область легкой цепи антитела (V_L) одноцепочечного вариабельного фрагмента; предпочтительно одноцепочечный вариабельный фрагмент может иметь следующую структуру: линкер- V_H -линкер- V_L-COOH или линкер- V_L -линкер- V_H-COOH ,
предпочтительно,

вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3-5, и вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8-10;

вариабельная область тяжелой цепи одноцепочечного вариабельного фрагмента

содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 45-47, и переменная область легкой цепи одноцепочечного переменного фрагмента содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 50-52,

предпочтительно, когда одноцепочечный переменный фрагмент (такой как $\text{NH}_2\text{-V}_\text{L}$ -линкер- V_H -COOH или $\text{NH}_2\text{-V}_\text{H}$ -линкер- V_L -COOH) связан с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина через линкер, сначала может быть связана переменная область тяжелой цепи антитела (V_H) одноцепочечного переменного фрагмента, содержащая CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 45-47, или сначала может быть связана переменная область легкой цепи антитела (V_L) одноцепочечного переменного фрагмента, содержащая CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 50-52,

или предпочтительно,

переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 45-47, и переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 50-52; и/или,

переменная область тяжелой цепи одноцепочечного переменного фрагмента содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3-5, и переменная область легкой цепи одноцепочечного переменного фрагмента содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8-10,

причем, когда одноцепочечный переменный фрагмент (такой как $\text{NH}_2\text{-V}_\text{L}$ -линкер- V_H -COOH или $\text{NH}_2\text{-V}_\text{H}$ -линкер- V_L -COOH) связан с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина через линкер, сначала может быть связана переменная область тяжелой цепи антитела (V_H) одноцепочечного переменного фрагмента, содержащая CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3-5, или сначала может быть связана переменная область легкой цепи антитела (V_L) одноцепочечного переменного фрагмента, содержащая CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8-10,

предпочтительно,

одна молекула иммуноглобулина связана с двумя молекулами одноцепочечных переменных фрагментов, и более предпочтительно, чтобы эти две молекулы одноцепочечных переменных фрагментов были идентичными.

10. Биспецифическое антитело против CD73/против PD-1 по п. 1 или 2, где иммуноглобулин представляет собой IgG, IgA, IgD, IgE или IgM, предпочтительно IgG, например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

11. Биспецифическое антитело против CD73/против PD-1 по п. 1 или 2, где: одноцепочечный переменный фрагмент связан с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина, предпочтительно одна молекула иммуноглобулина связана с двумя молекулами одноцепочечных переменных фрагментов, и более предпочтительно, две молекулы одноцепочечных переменных фрагментов идентичны.

12. Биспецифическое антитело против CD73/против PD-1 по п. 1 или 2, где переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 45-47, и переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 50-52;

и/или,

переменная область тяжелой цепи одноцепочечного переменного фрагмента содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3-5, и переменная область легкой цепи одноцепочечного переменного фрагмента содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8-10,

предпочтительно, когда одноцепочечный переменный фрагмент связан с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина через линкер, то сначала может быть связана переменная область тяжелой цепи антитела (V_H) одноцепочечного переменного фрагмента, содержащая CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3-5, или сначала может быть связана переменная область легкой цепи антитела (V_L) одноцепочечного фрагмента, содержащая CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8-10.

13. Биспецифическое антитело против CD73/против PD-1 по п. 1 или 2, где:

переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3-5, и переменная область легкой цепи иммуноглобулина содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8-10; и/или,

переменная область тяжелой цепи одноцепочечного переменного фрагмента содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 45-47, и переменная область легкой цепи одноцепочечного переменного фрагмента содержит CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 50-52,

причем, когда одноцепочечный переменный фрагмент связан с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина через линкер, сначала может быть связана переменная область тяжелой цепи антитела (V_H) одноцепочечного переменного фрагмента, содержащая CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 45-47, или сначала может быть связана переменная область легкой цепи антитела (V_L) одноцепочечного переменного фрагмента, содержащая CDR, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 50-52.

14. Биспецифическое антитело против CD73/против PD-1 по п. 1 или 2, где переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 62, и переменная область легкой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность, соответственно выбранную из SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 64;

и/или,

переменная область тяжелой цепи одноцепочечного переменного фрагмента

имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 20, и переменная область легкой цепи одноцепочечного переменного фрагмента имеет аминокислотную последовательность, соответственно выбранную из SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 22; или переменная область тяжелой цепи одноцепочечного переменного фрагмента имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и переменная область легкой цепи одноцепочечного переменного фрагмента имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24;

причем, когда одноцепочечный переменный фрагмент связан с С-концом тяжелой цепи иммуноглобулина через линкер, то сначала может быть связана переменная область тяжелой цепи антитела (V_H) одноцепочечного переменного фрагмента, или сначала может быть связана переменная область легкой цепи антитела (V_L) одноцепочечного переменного фрагмента.

15. Биспецифическое антитело против CD73/против PD-1 по п. 1 или 2, где: переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 20, и переменная область легкой цепи иммуноглобулина имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 22; или переменная область тяжелой цепи одноцепочечного переменного фрагмента имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и переменная область легкой цепи одноцепочечного переменного фрагмента имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24;

и/или,

переменная область тяжелой цепи одноцепочечного переменного фрагмента имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 62, и переменная область легкой цепи одноцепочечного переменного фрагмента имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 64,

причем, когда одноцепочечный переменный фрагмент связан с С-концом тяжелой цепи через линкер, то сначала может быть связана переменная область тяжелой цепи антитела (V_H) одноцепочечного переменного фрагмента, или сначала может быть связана переменная область легкой цепи антитела (V_L).

16. Биспецифическое антитело против CD73/против PD-1 по любому из пп. 5-14, где: иммуноглобулин содержит область, отличную от CDR, и область, отличная от CDR, происходит из видов, отличных от мыши, как например, из человеческого антитела; более предпочтительно константная область иммуноглобулина является гуманизированной; например, константная область тяжелой цепи представляет собой С-область гамма-1-цепи Ig, № доступа: P01857; и константная область легкой цепи представляет собой С-область каппа-цепи Ig, № доступа: P01834, или

константная область тяжелой цепи иммуноглобулина мутирует в любых 2 или 3 из положений 234, 235 и 237 на основе С-области гамма-1-цепи Ig, № доступа: P01857, и после мутации биспецифическое антитело имеет пониженную константу аффинности для FcγRIa, FcγRIIIa и/или C1q по сравнению с таковой до мутации;

более предпочтительно, в соответствии с системой нумерации EU, константная область тяжелой цепи содержит следующие мутации в положениях 234, 235 и/или 237 на основе С-области гамма-1-цепи Ig, № доступа: P01857:

L234A и L235A;

L234A и G237A;

L235A и G237A;

или

L234A, L235A и G237A,

еще более предпочтительно константная область тяжелой цепи иммуноглобулина также содержит одну или более мутаций, выбранных из следующих мутаций:

N297A, D265A, D270A, P238D, L328E, E233D, H268D, P271G, A330R, C226S, C229S, E233P, P331S, S267E, L328F, A330L, M252Y, S254T, T256E, N297Q, P238S, P238A, A327Q, A327G, P329A, K322A, T394D, G236R, G236A, L328R, A330S, P331S, H268A, E318A и K320A,

предпочтительно, биспецифическое антитело против CD73/против PD-1 имеет структуру, представленную в виде тяжелая цепь-легкая цепь-линкер 1-scFv, и scFv выбран из 14C12H1V-линкер 2-14C12L1V, 14C12H1V-линкер 1-14C12L1V, 14C12H1V-линкер 2-14C12L1V и 14C12H1V-линкер 1-14C12L1V, в частности, выбранную из группы, состоящей из:

(1) NTPDV1, тяжелая цепь которого имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, линкер 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, 14C12H1V имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, линкер 2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, и 14C12L1V имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68;

(2) NTPDV2, тяжелая цепь которого имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, линкер 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, 14C12H1V имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, линкер 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, и 14C12L1V имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68;

(3) NTPDV3, тяжелая цепь которого имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, линкер 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, 14C12H1V имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, линкер 2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 81, и 14C12L1V имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68; и

(4) NTPDV4, тяжелая цепь которого имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, легкая цепь имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, линкер 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, 14C12H1V имеет

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 66, линкер 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 79, и 14C12L1V имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68.

17. Биспецифическое антитело против CD73/против PD-1 по любому из пп. 1-16, где: биспецифическое антитело против CD73/против PD-1 связывается с белком CD73 и/или белком PD-1 с K_D менее примерно 10^{-5} М, например, менее примерно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М или менее.

18. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, способную кодировать вариабельную область тяжелой цепи биспецифического антитела, где

вариабельная область тяжелой цепи антитела содержит:

CDR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3-5, CDR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45-47, и CDR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50-52;

или

CDR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45-47, CDR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3-5, и CDR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8-10;

и вариабельная область тяжелой цепи биспецифического антитела специфически связывается с антигенами CD73 и PD-1 как часть биспецифического антитела, и биспецифическое антитело дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую:

CDR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8-10;

или CDR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50-52,

предпочтительно CDR вариабельной области легкой цепи отличаются от CDR вариабельной области тяжелой цепи.

19. Вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 18.

20. Клетка-хозяин, содержащая выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 18 или вектор по п. 19.

21. Способ получения биспецифического антитела против CD73/против PD-1 по любому из пп. 1-17, включающий: культивирование клетки-хозяина по п. 20 в подходящих условиях и выделение биспецифического антитела из клеточных культур.

22. Конъюгат, содержащий биспецифическое антитело против CD73/против PD-1 по любому из пп. 1-17 и конъюгированный фрагмент, где конъюгированный фрагмент представляет собой детектируемую метку; в частности, конъюгированный фрагмент представляет собой радиоизотоп, флуоресцентное вещество, хемилюминесцентное вещество, окрашенное вещество или фермент.

23. Набор, содержащий биспецифическое антитело против CD73/против PD-1 по любому из пп. 1-17 или конъюгат по п. 22, где: предпочтительно, набор дополнительно содержит вторичное антитело, которое специфически распознает биспецифическое

антитело; необязательно вторичное антитело дополнительно содержит детектируемую метку, например, радиоизотоп, флуоресцентное вещество, хемилюминесцентное вещество, окрашенное вещество или фермент.

24. Применение биспецифического антитела против CD73/против PD-1 по любому из пп. 1-17 при приготовлении набора для детектирования присутствия или уровня CD73 и/или PD-1 в образце.

25. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическое антитело против CD73/против PD-1 по любому из пп. 1-17 или конъюгат по п. 22, где: необязательно фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество.

26. Применение биспецифического антитела против CD73/против PD-1 по любому из пп. 1-17 или конъюгата по п. 22 для предотвращения и/или лечения опухоли или анемии, или для диагностики опухоли или анемии.

27. Применение биспецифического антитела против CD73/против PD-1 по любому из пп. 1-17 или конъюгата по п. 22 при получении лекарственного средства для предотвращения и/или лечения опухоли или анемии, или при получении лекарственного средства для диагностики опухоли или анемии.

28. Применение биспецифического антитела против CD73/против PD-1 по любому из пп. 1-17 или конъюгата по п. 22 при получении следующих лекарственных средств:

лекарственного средства для детектирования уровня CD73 в образце,

лекарственного средства для ингибирования реакции ферментативной активности CD73;

и/или

лекарственного средства для блокирования связывания PD-1 с PD-L1,

лекарственного средства для отрицательной регуляции (например, подавления) активности или уровня PD-1,

лекарственного средства для купирования иммуносупрессии PD-1 в организме,

лекарственного средства для повышения экспрессии IL-2 в Т-лимфоцитах, или

лекарственного средства для повышения экспрессии IFN- γ в Т-лимфоцитах.

29. Способ *in vivo* или *in vitro*, включающий: введение в клетку или введение пациенту эффективного количества биспецифического антитела против CD73/против PD-1 по любому из пп. 1-17 или конъюгата по п. 22.

30. Гибридная клеточная линия, выбранная из:

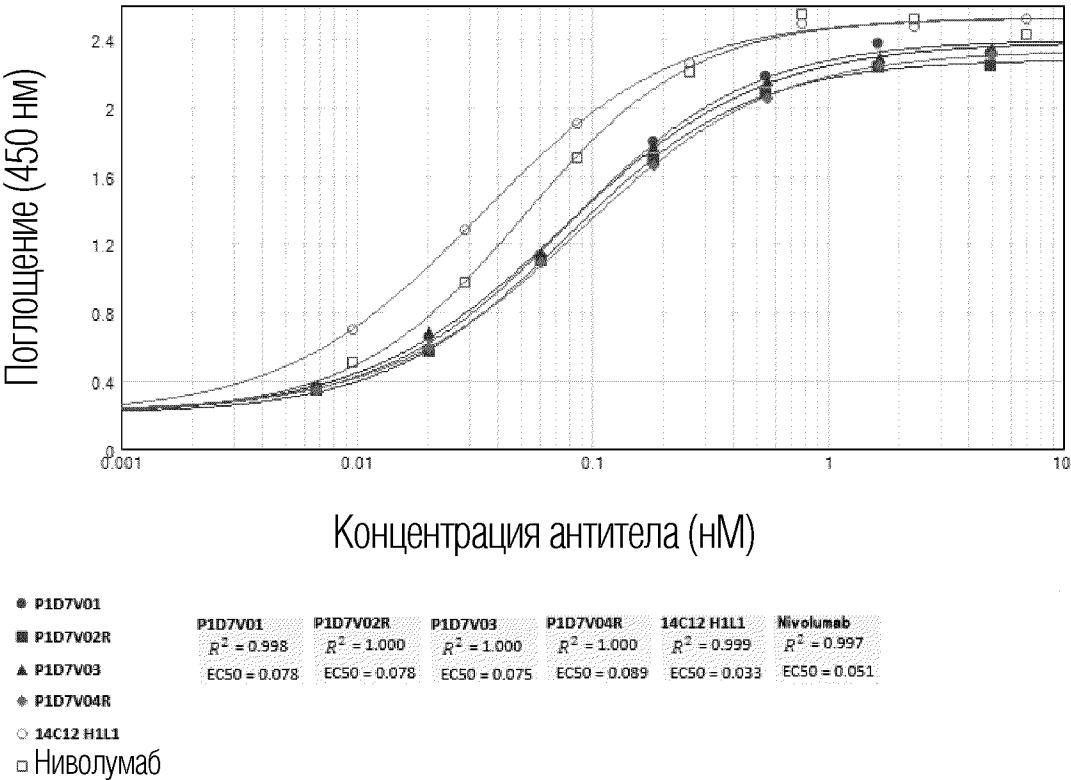
гибридной клеточной линии LT014 (также известной CD73-19F3), депонированной в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) 19 июня 2018 г. под номером доступа CCTCC NO: C2018137; или

гибридной клеточной линии LT003 (также известной PD-1-14C12), депонированной в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) 16 июня 2015 г. под номером доступа CCTCC NO: C2015105.

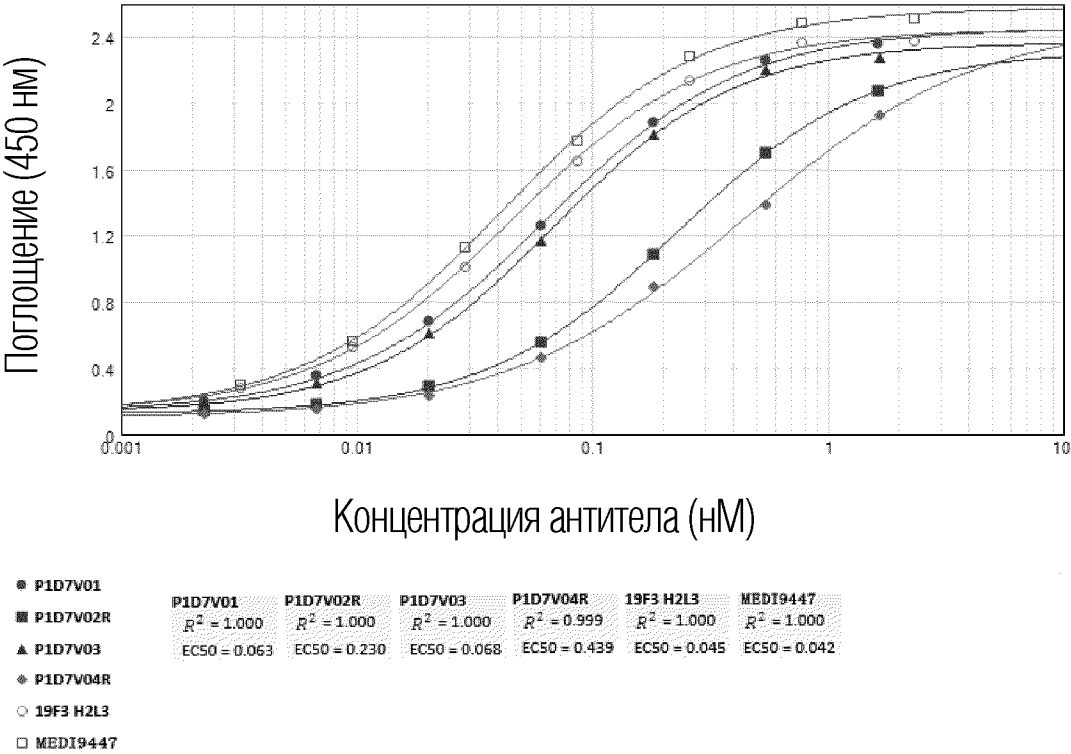
31. Моноклональное антитело против CD73, где антитело представляет собой

19F3H2L3(hG1TM) и имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 30 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 28.

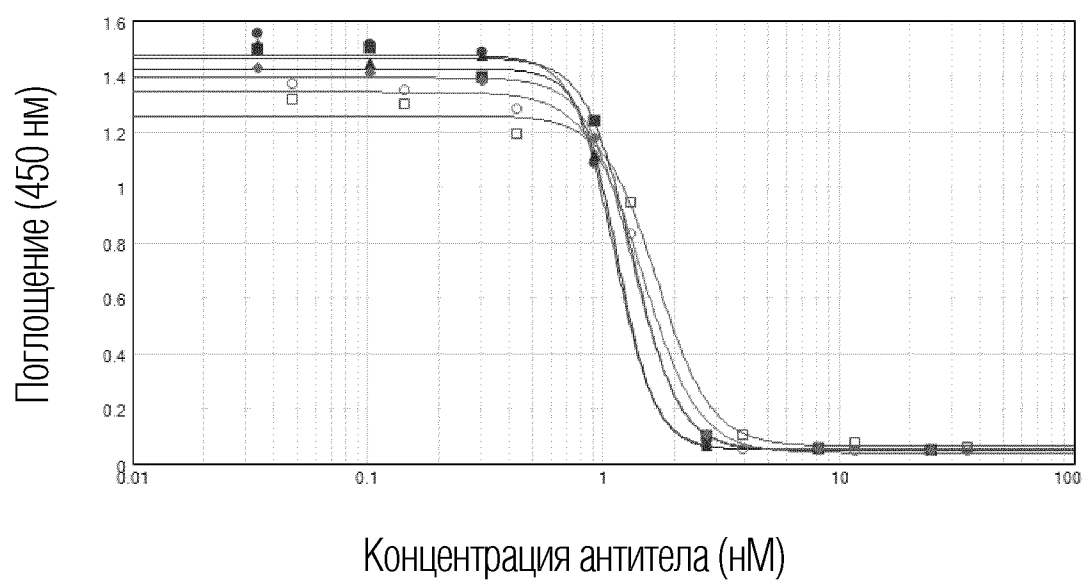
По доверенности



ФИГ. 1



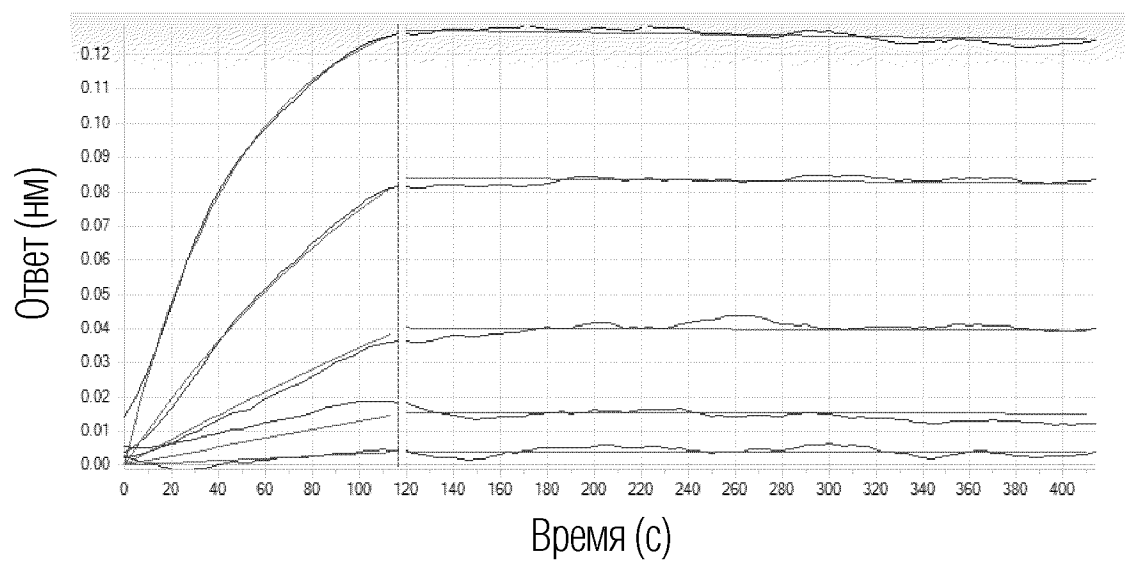
ФИГ. 2



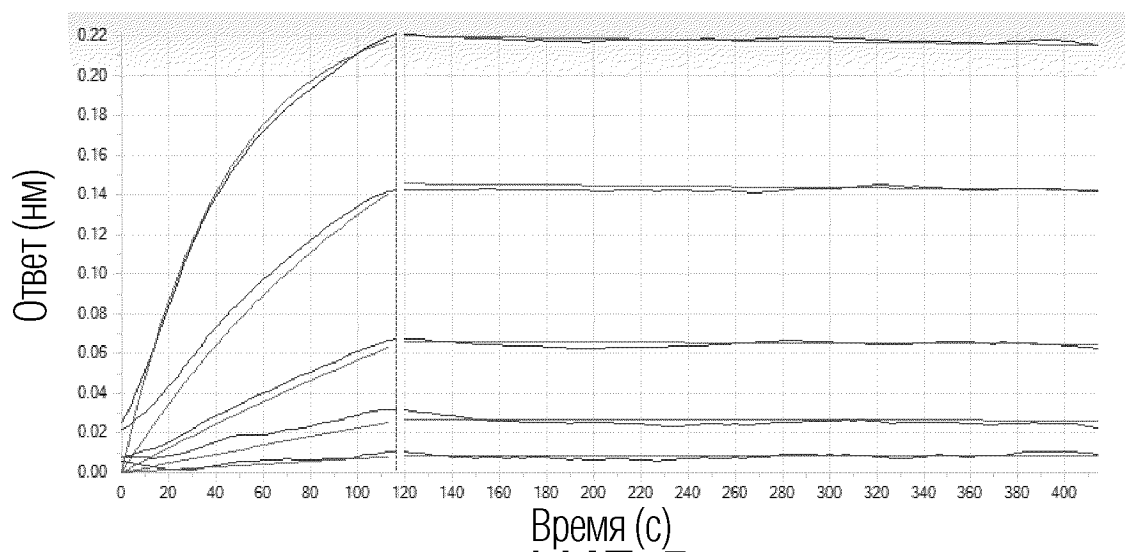
- P1D7V01
- P1D7V02R
- ▲ P1D7V03
- ◆ P1D7V04R
- 14C12 H111
- Ниволумаб

P1D7V01	P1D7V02R	P1D7V03	P1D7V04R	14C12 H111	Nivolumab
$R^2 = 0.993$	$R^2 = 0.998$	$R^2 = 0.990$	$R^2 = 0.999$	$R^2 = 0.999$	$R^2 = 0.996$
EC50 = 1.115	EC50 = 1.329	EC50 = 1.154	EC50 = 1.339	EC50 = 1.459	EC50 = 1.698

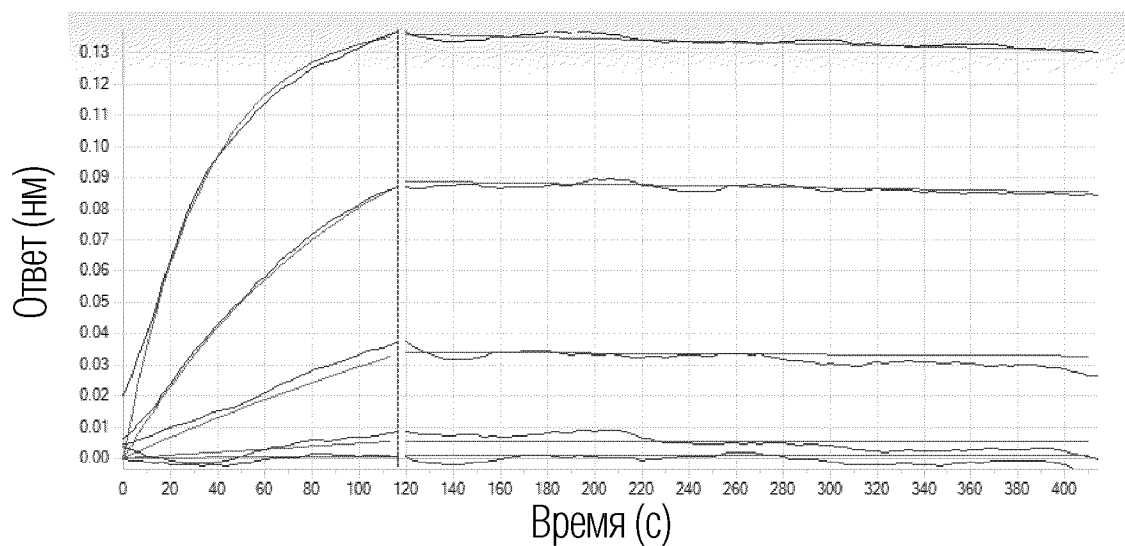
ФИГ. 3



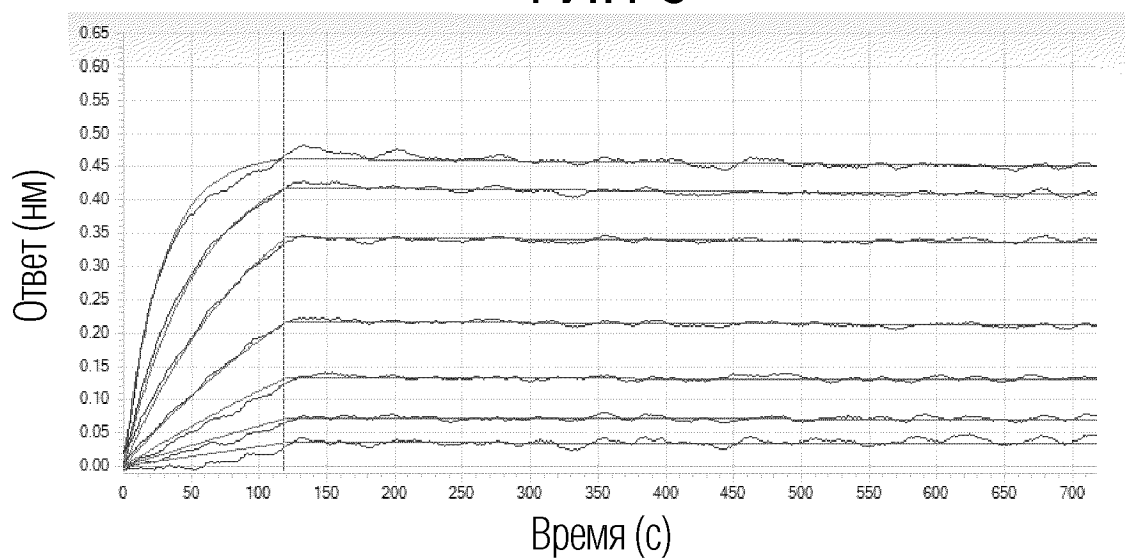
ФИГ. 4



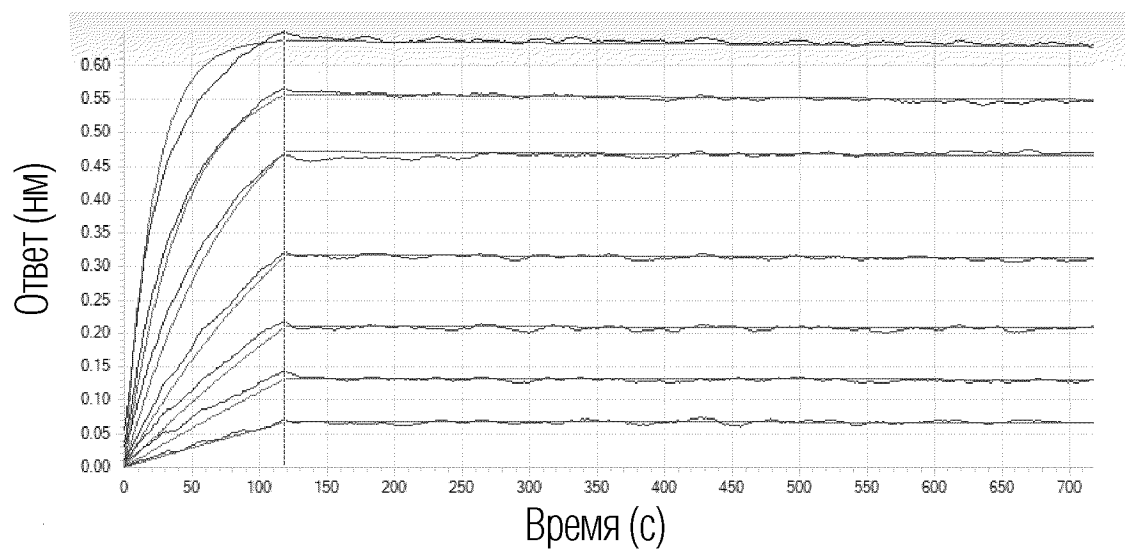
Время (с)
ФИГ. 5



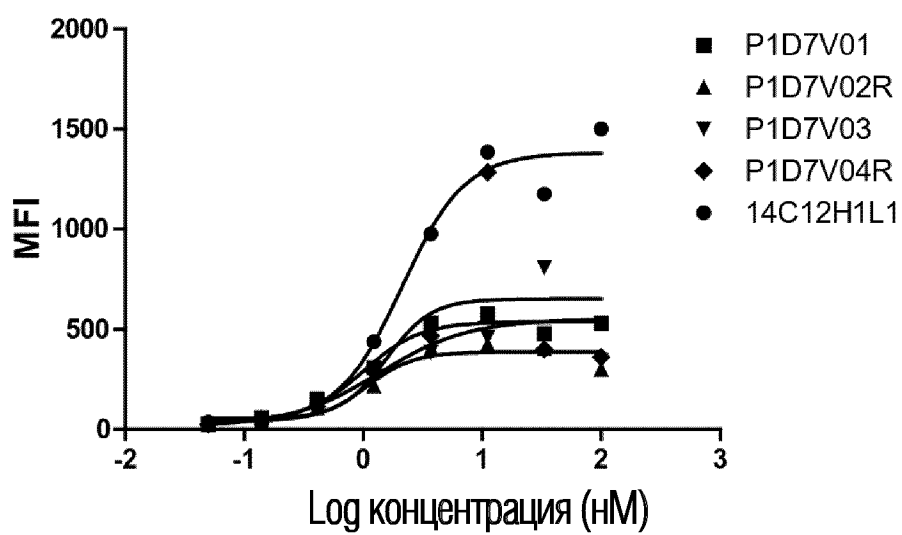
Время (с)
ФИГ. 6



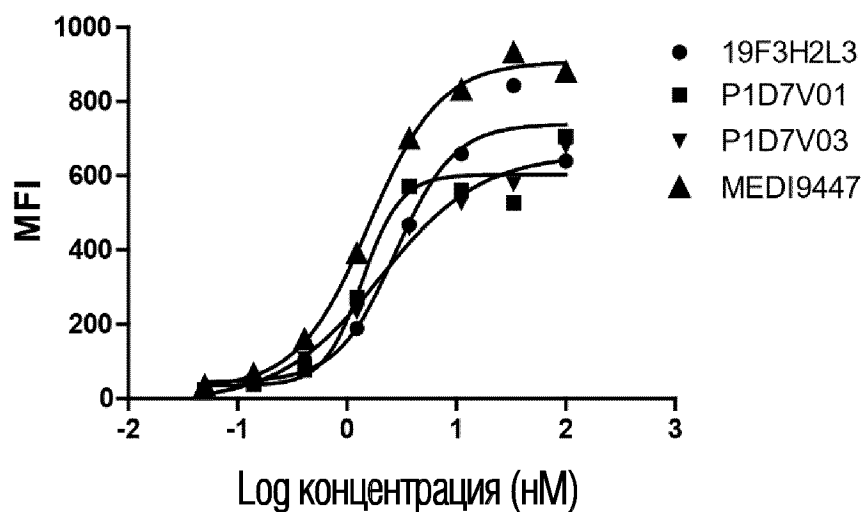
Время (с)
ФИГ. 7



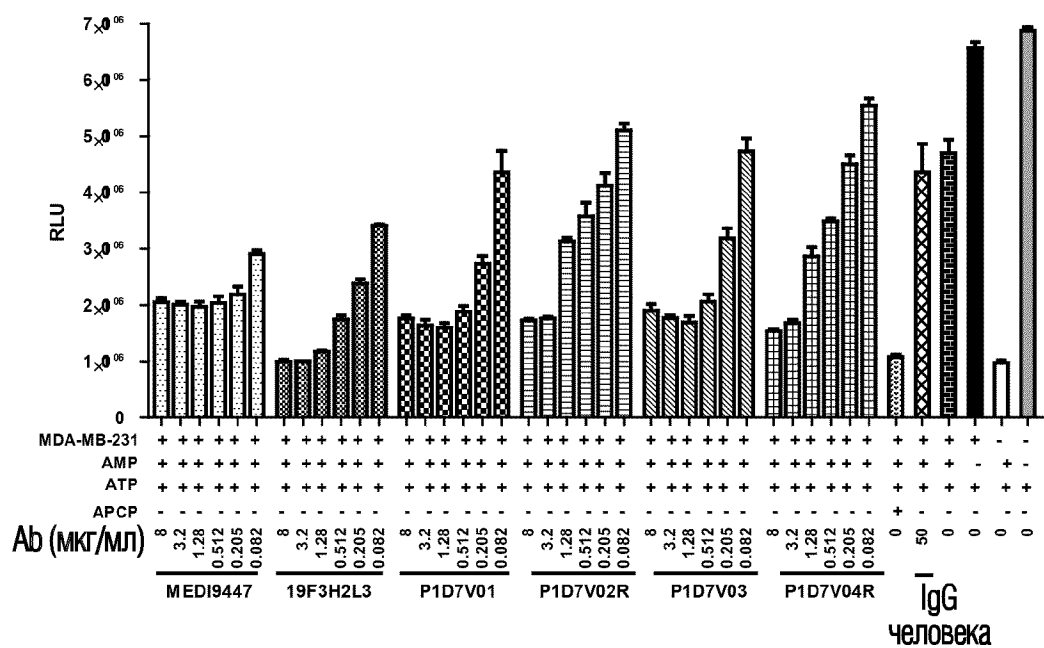
ФИГ. 8



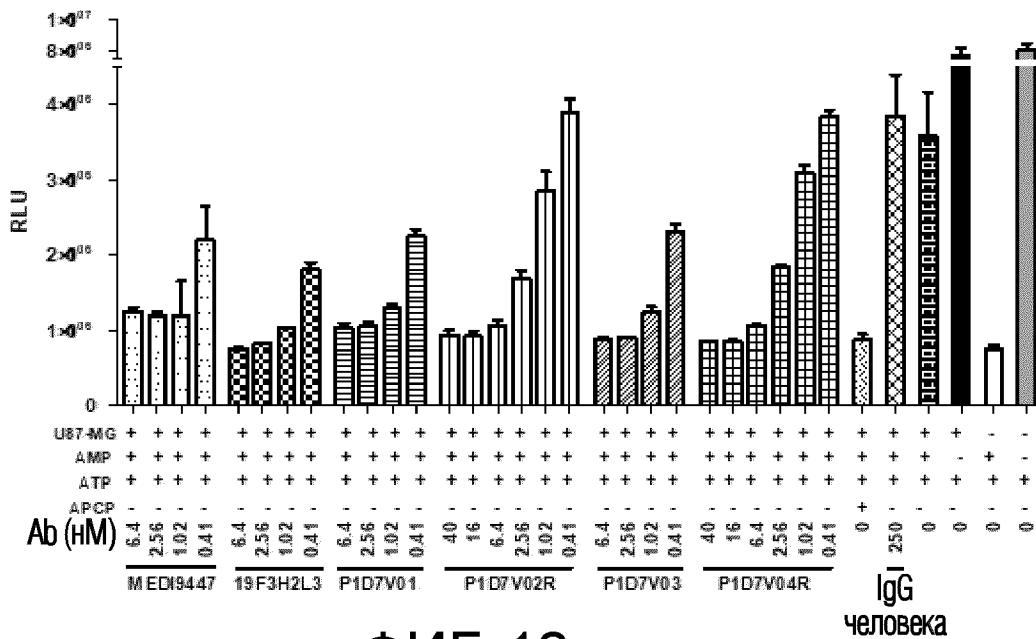
ФИГ. 9



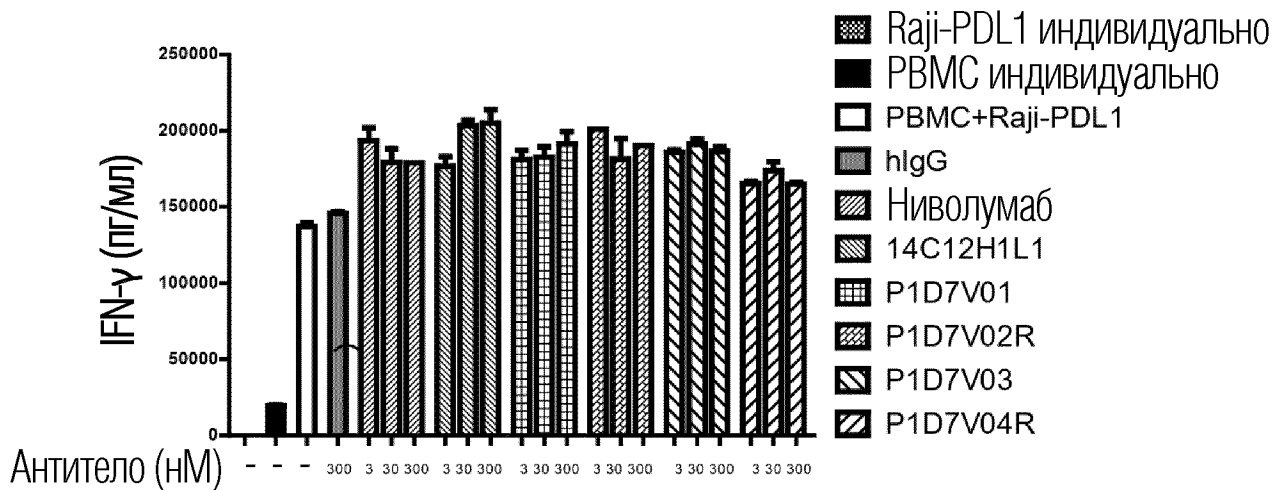
ФИГ. 10



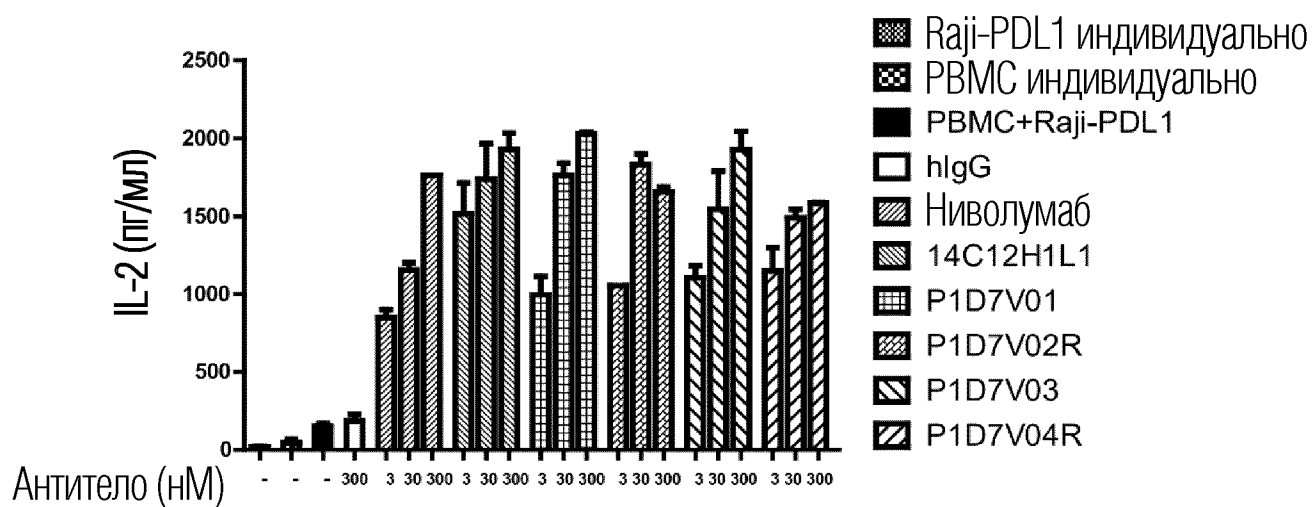
ФИГ. 11



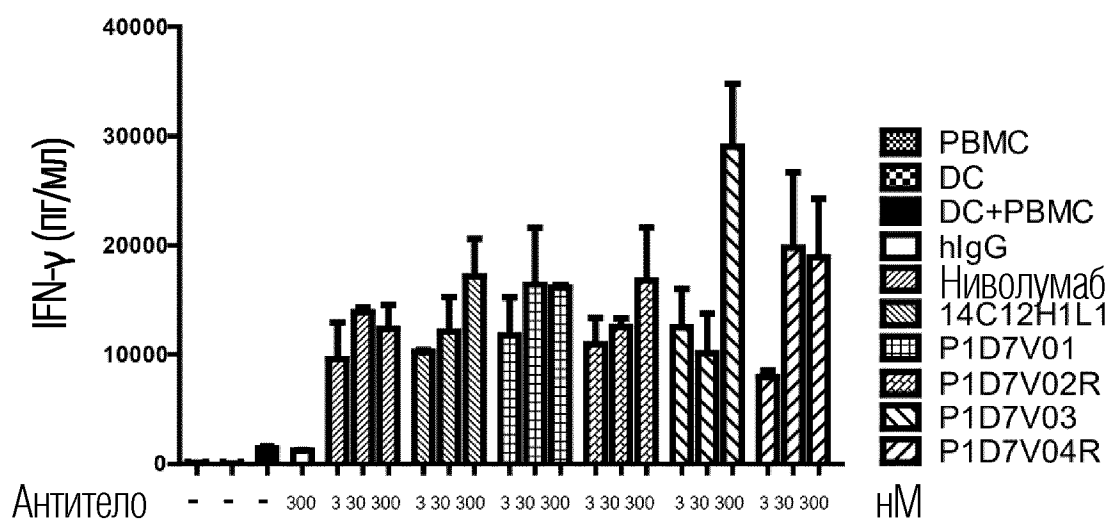
ФИГ. 12



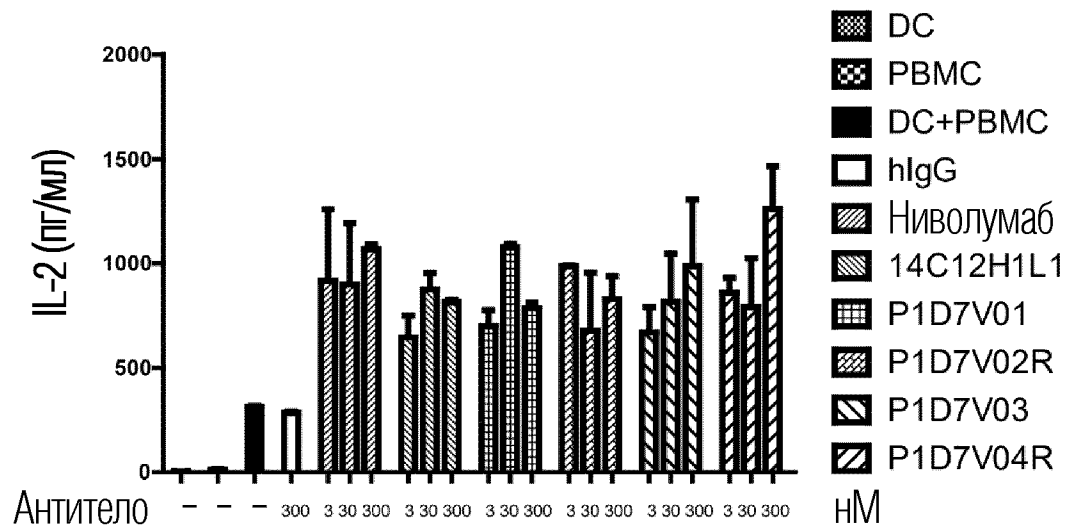
ФИГ. 13



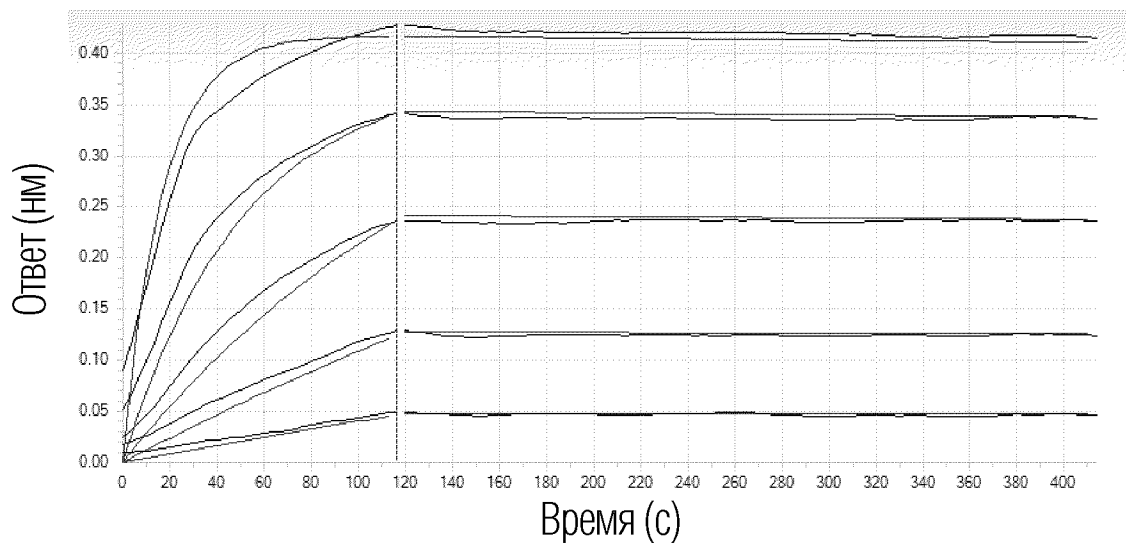
ФИГ. 14



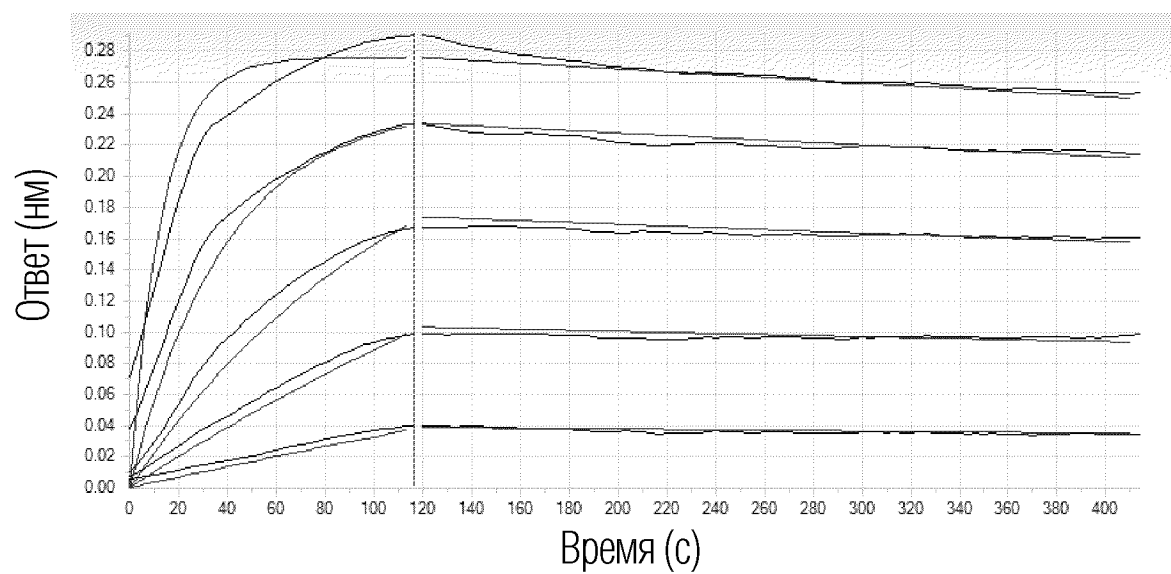
ФИГ. 15



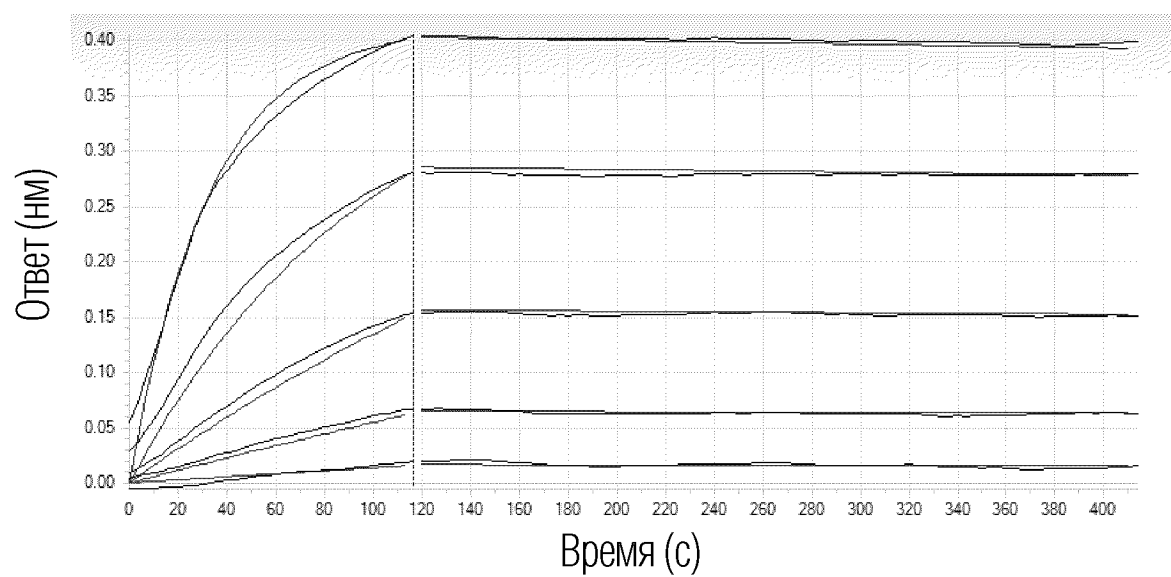
ФИГ. 16



ФИГ. 17

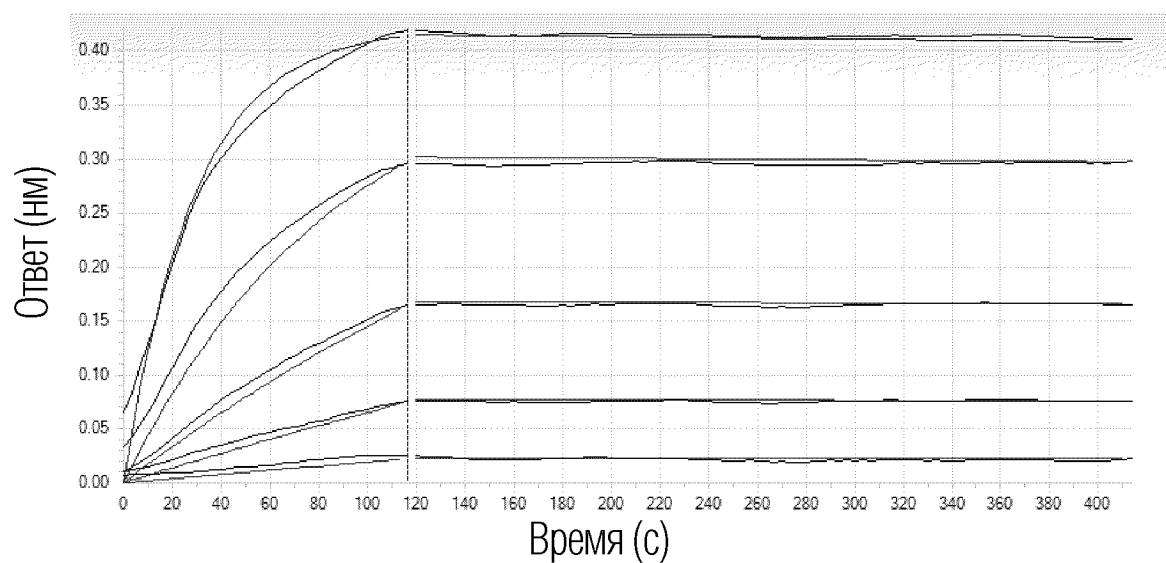


ФИГ. 18

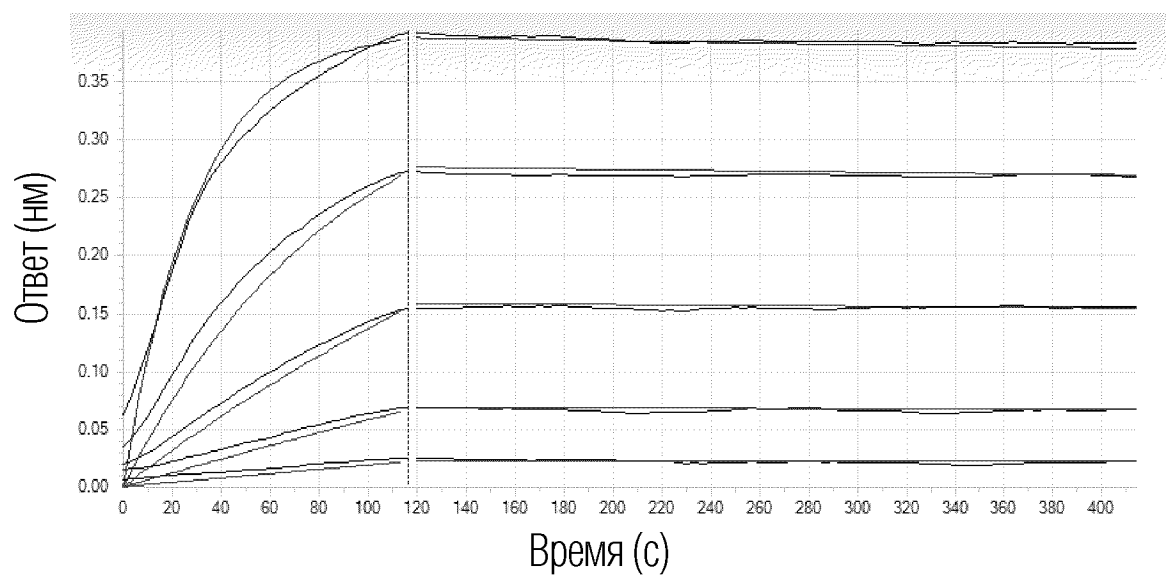


ФИГ. 19

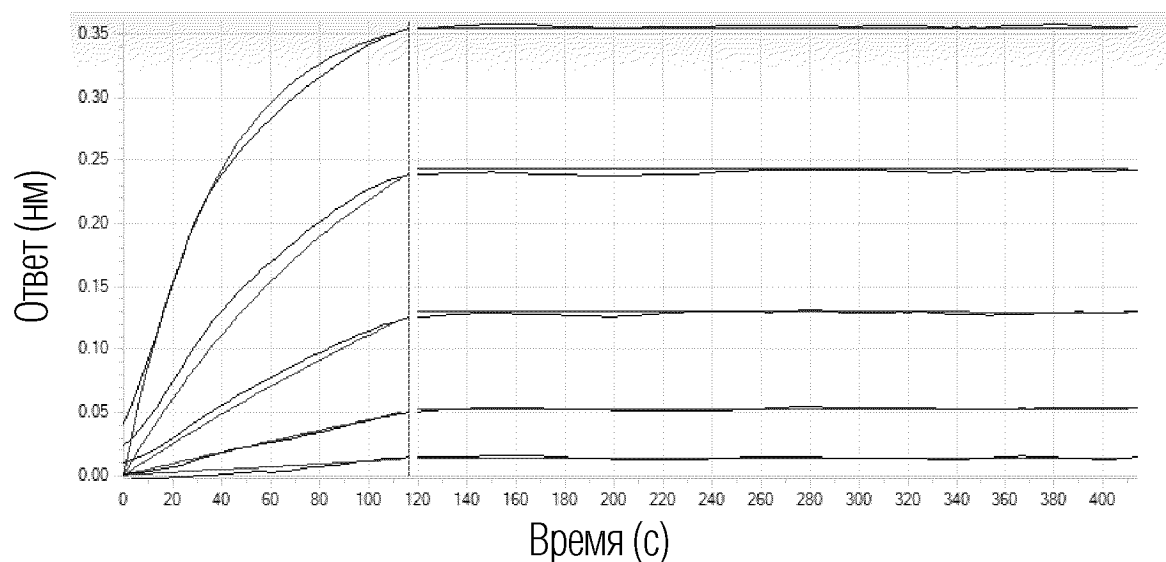
10/18



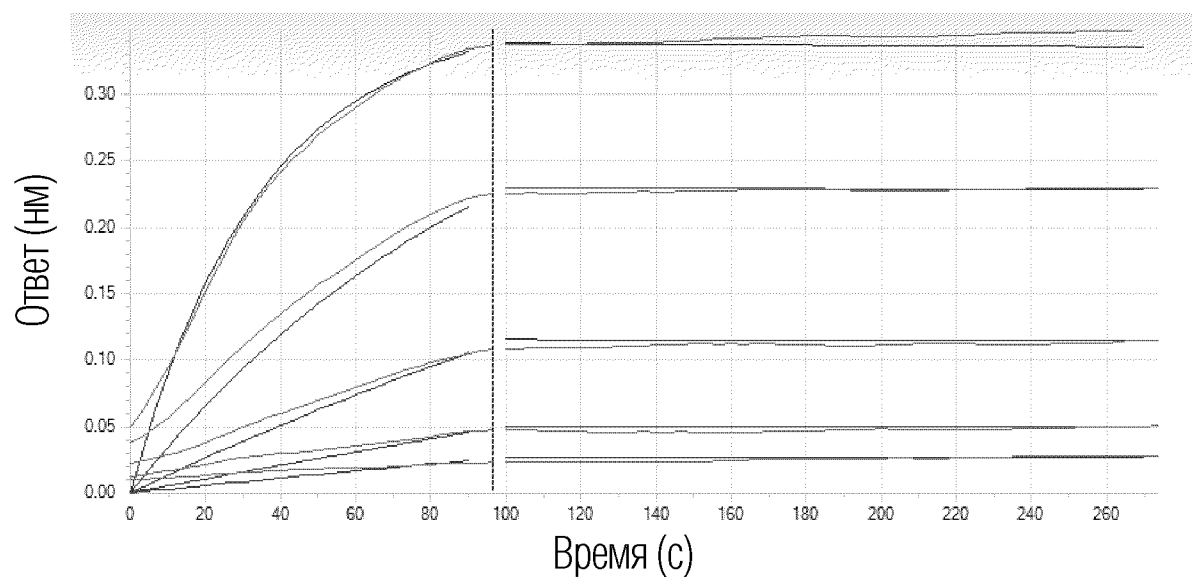
ФИГ. 20



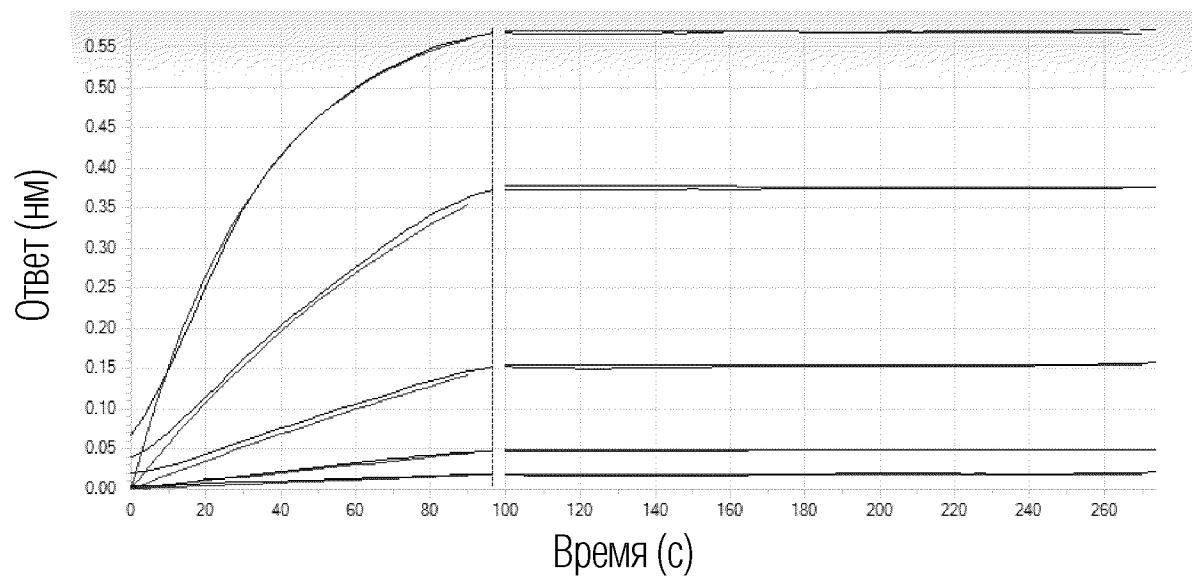
ФИГ. 21



ФИГ. 22

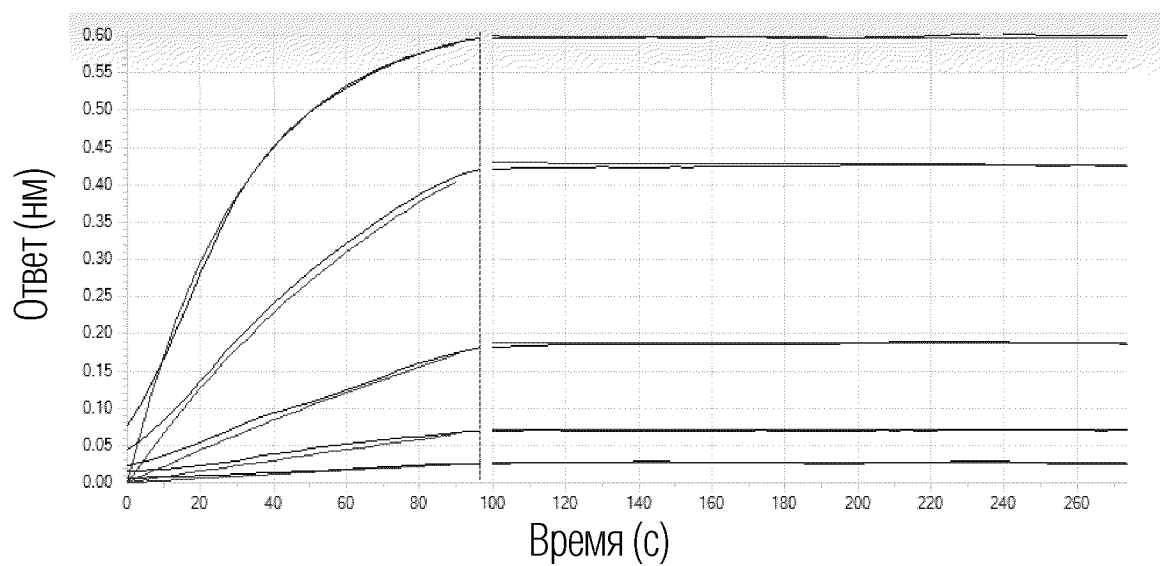


ФИГ. 23

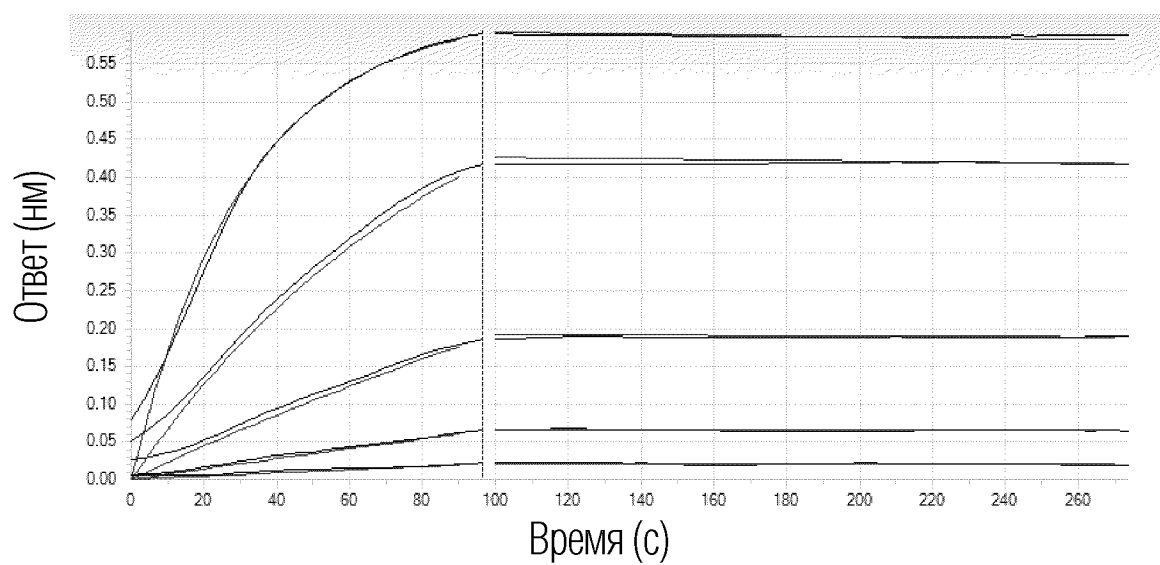


ФИГ. 24

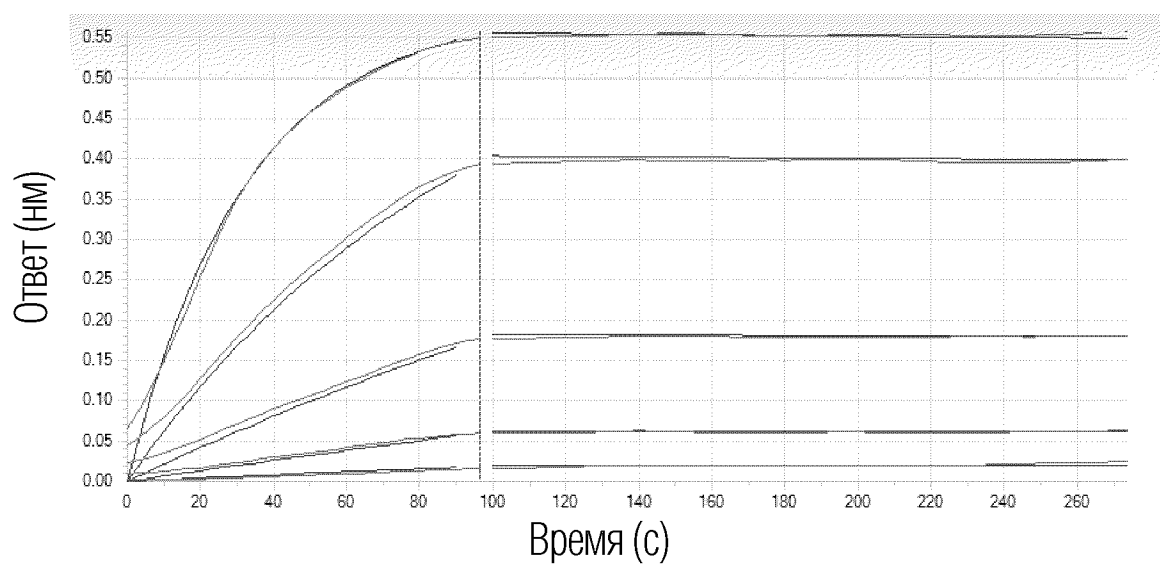
12/18



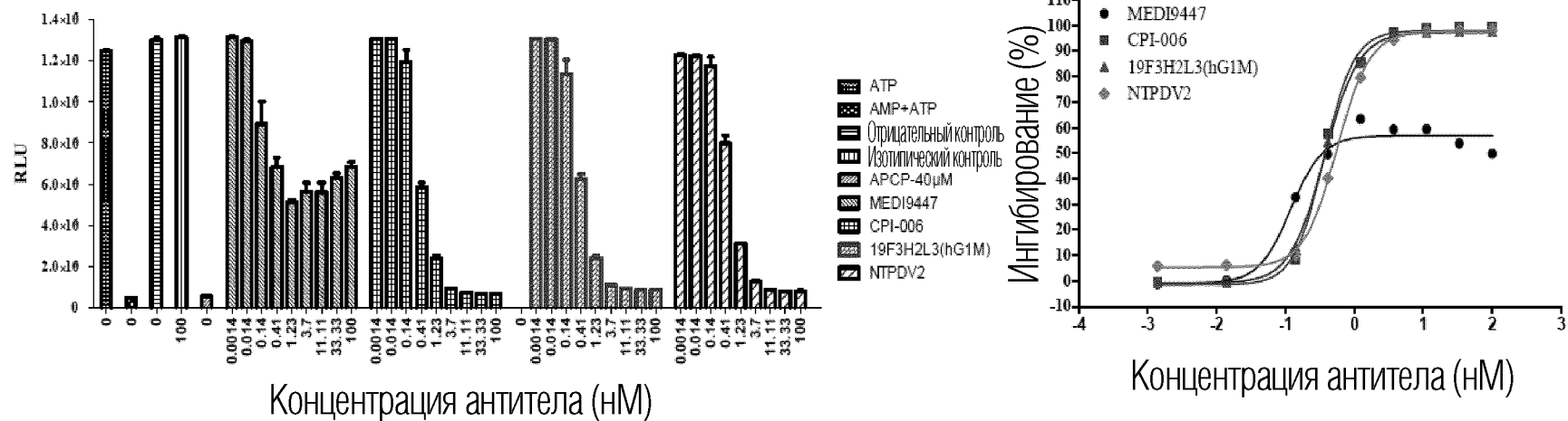
ФИГ. 25



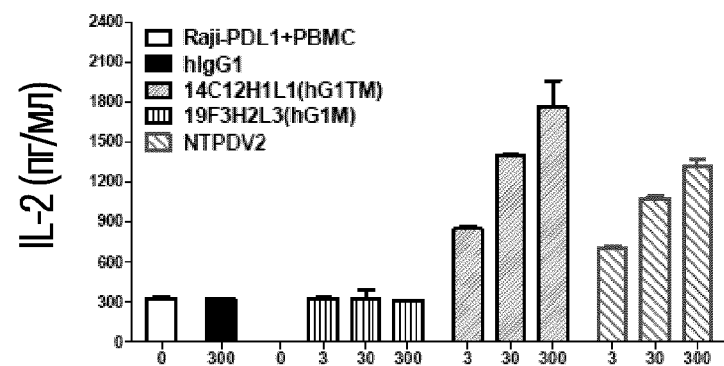
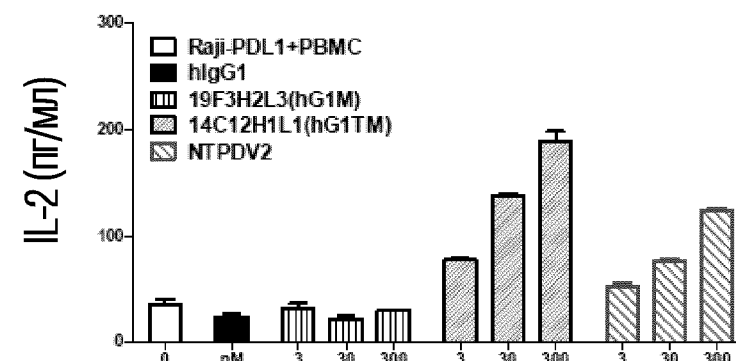
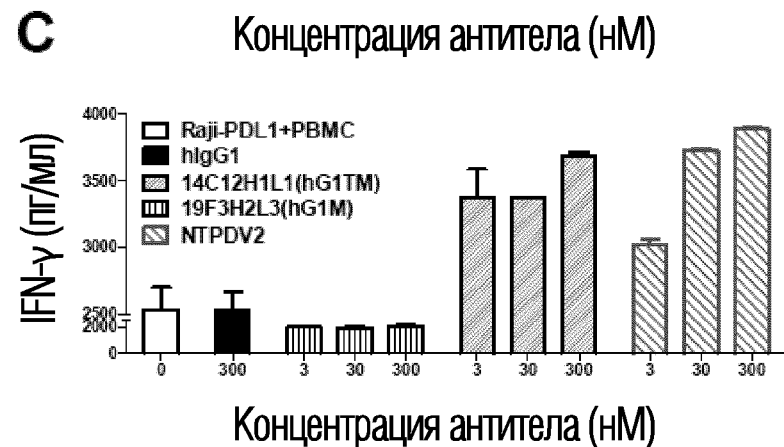
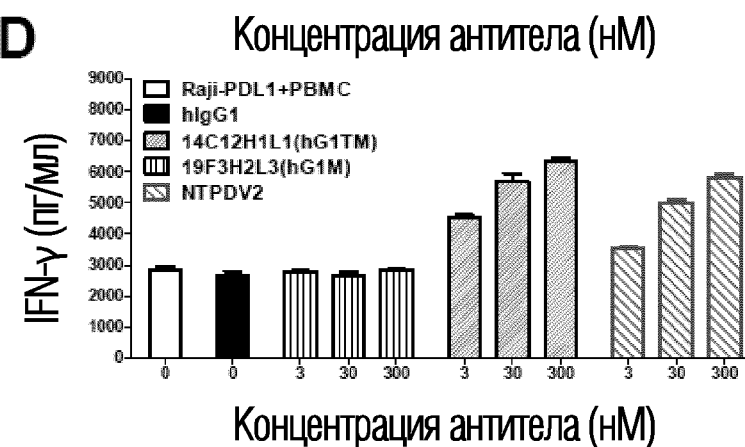
ФИГ. 26



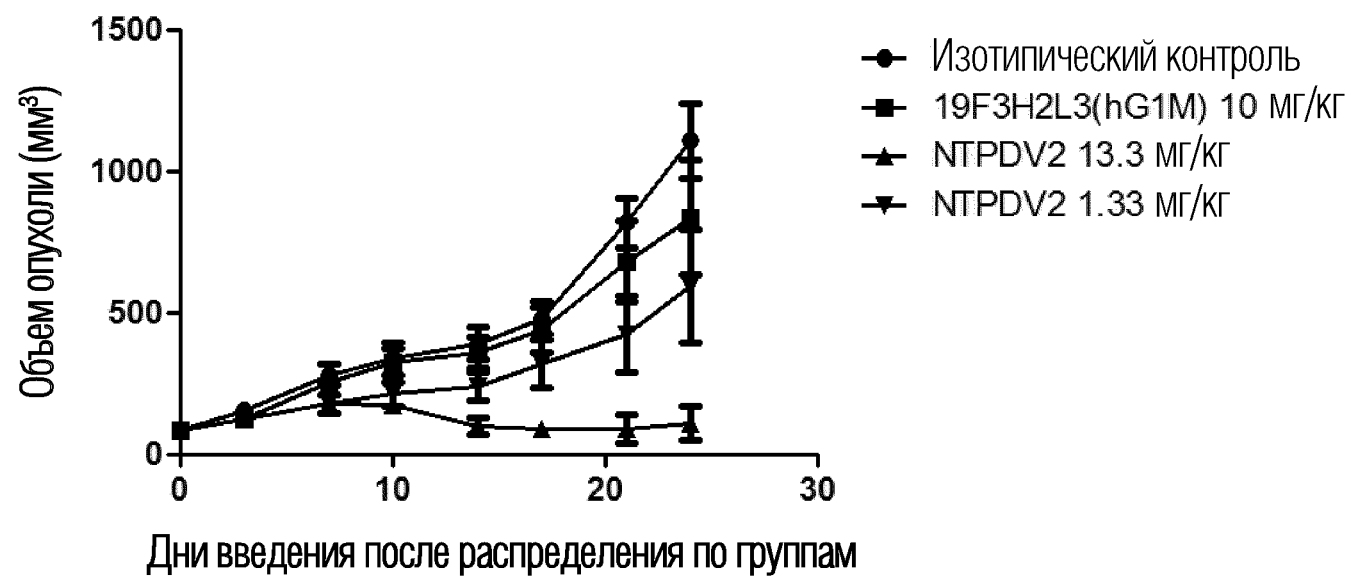
ФИГ. 27



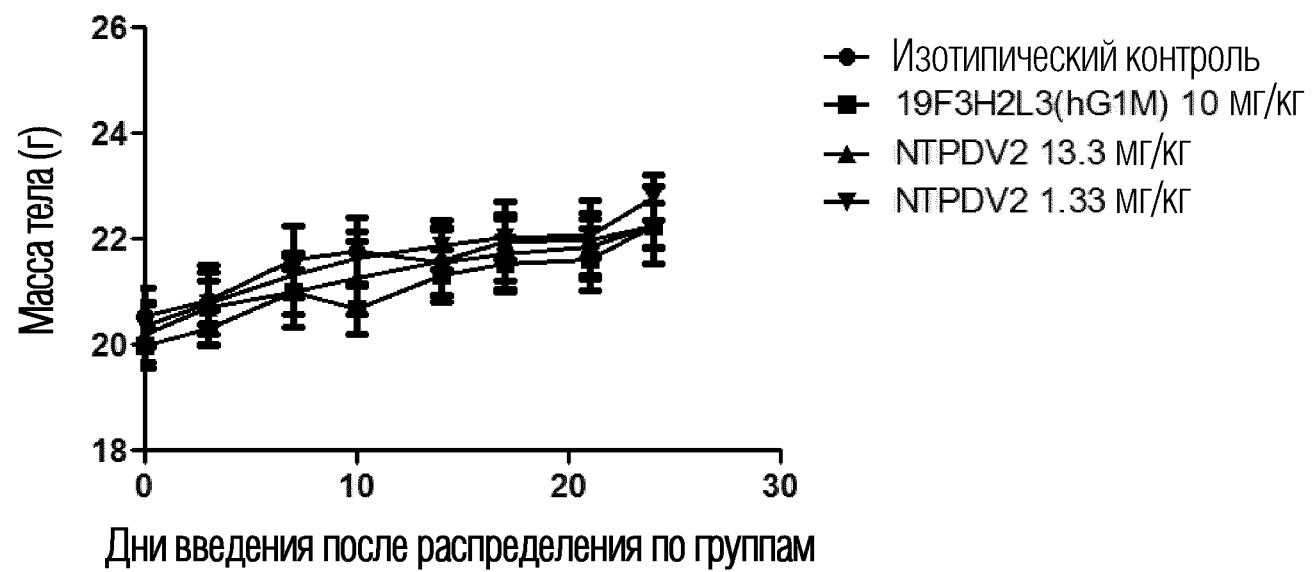
ФИГ. 28

A**B****C****D**

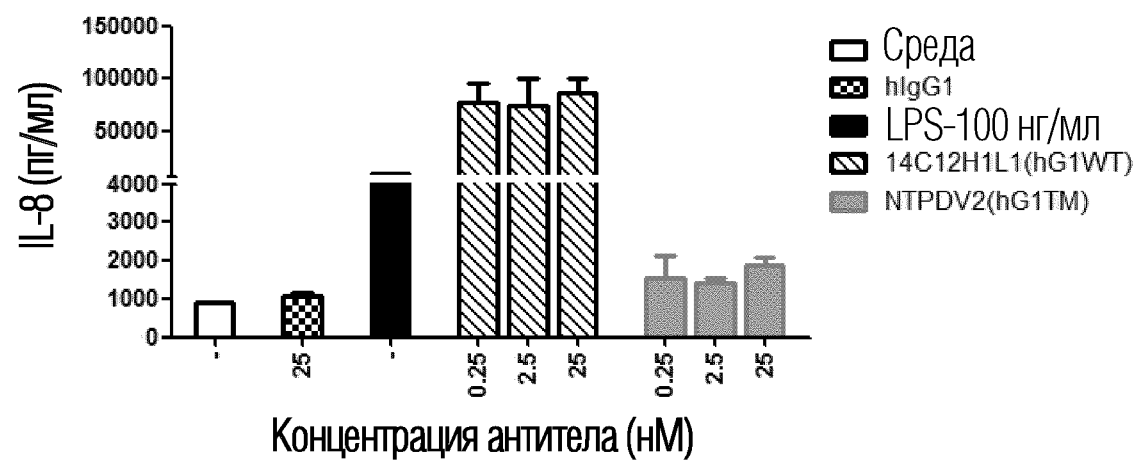
ФИГ. 29



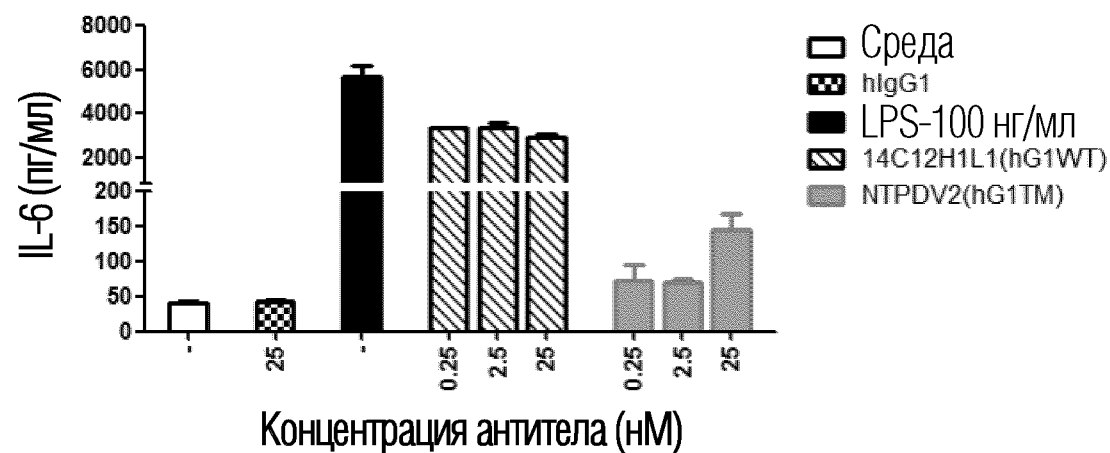
ФИГ. 30



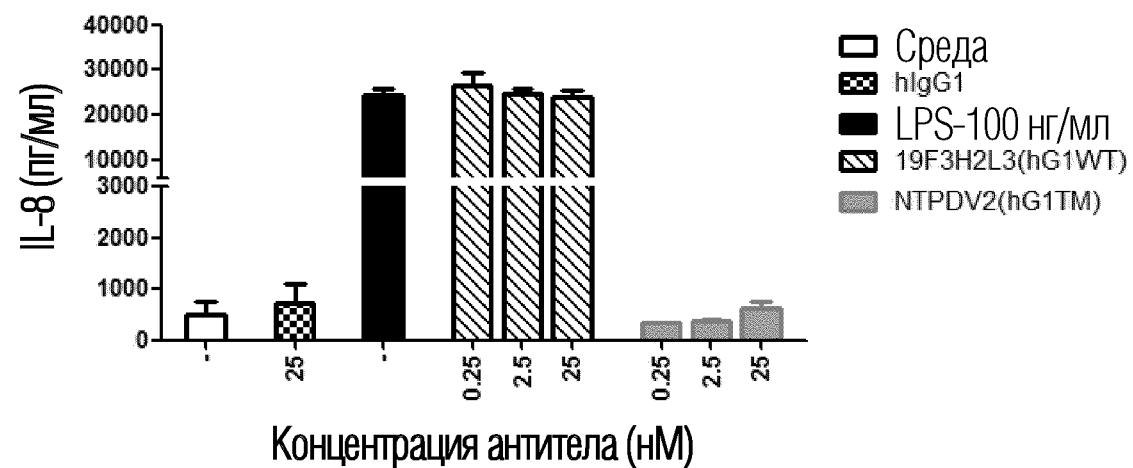
ФИГ. 31



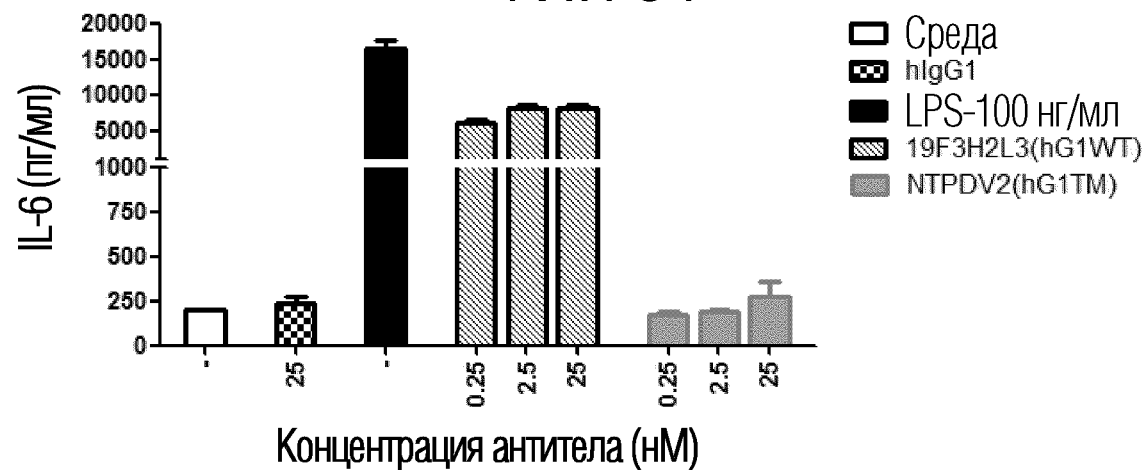
ФИГ. 32



ФИГ. 33



ФИГ. 34



ФИГ. 35