

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042795**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.27

(21) Номер заявки
201891366

(22) Дата подачи заявки
2016.12.09

(51) Int. Cl. **G01N 33/574** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

(54) **ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD73**

(31) **62/265,357; 62/289,694; 62/346,327**

(32) **2015.12.09; 2016.02.01; 2016.06.06**

(33) **US**

(43) **2018.12.28**

(86) **PCT/US2016/065968**

(87) **WO 2017/100670 2017.06.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**КОРВУС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК.; БАЙОАТЛА, ЭлЭлСи (US)**

(72) Изобретатель:
**Гриффин Эмили Пиччоне, Миллер
Ричард А., Фрэй Герхард Йоханн, Чан
Хваи Вэнь (US)**

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

(56) **WO-A1-2015164865
US-B2-7994289
WO-A2-2014039975
WO-A1-2014130965
WO-A1-2009043933
WO-A2-2013006449
WO-A1-2015070972
WO-A1-2012022682**

MASSAIA M. et al.: Human T Cell Activation. Synergy Between CD73 (Ecto-5'-Nucleotidasaen) Signals Delivered through CD3 and CD2 Molecules. The Journal of Immunology. 15 September 1990, Vol. 145, No. 6, pages 1664-1674; abstract

TERP MG et al.: Anti-Human CD73 Monoclonal Antibody Inhibits Metastasis Formation in Human Breast Cancer by Inducing Clustering and Internalization of CD73 Expressed on the Surface of Cancer Cells. The Journal of Immunology. 16 September 2013, Vol. 191, pages 1-9; page 2, first column, fourth paragraph; DOI: 10.4049/jimmunol.1301274

WO-A1-2014153424

(57) Данное изобретение относится, среди прочего, к гуманизированным антителам 1E9, способным связывать CD73. Гуманизированные антитела можно использовать для лечения злокачественных опухолей. Кроме того, изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим гуманизированные антитела 1E9, и к способам ингибирования пролиферации клеток с использованием гуманизированных антител, представленных в настоящем описании.

B1

042795

042795 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет Предварительной патентной заявки США № 62/265357, поданной 9 декабря 2015 г., Предварительной патентной заявки США № 62/289694, поданной 1 февраля 2016 г., и Предварительной патентной заявки США № 62/346327, поданной 6 июня 2016, полное содержание которых, таким образом, приведено в качестве ссылки и для всех целей.

Ссылка на список последовательностей, таблицу или список-приложение компьютерной программы, принятый в форме текстового файла ASCII

Содержание списка последовательностей, записанного в файл 48517-508001WO_ST25.TXT, созданный 9 декабря 2016 г., 50442 байт, машинный формат IBM-PC, операционная система MS Windows, таким образом, приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

Уровень техники

Считают, что заякоренный гликозилфосфатидилинозитолом антиген CD73 является ограничивающим скорость ферментом в образовании внеклеточного аденозина (Stagg J, Smyth MJ. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*. 2010; 29:5346-58. doi: 10.1038/onc.2010.292). CD73 можно обнаружить конститутивно экспрессированным на высоких уровнях на различных типах клеток злокачественных опухолей. Считают, что образованный посредством CD73 аденозин супрессирует адаптивные противоопухолевые иммунные ответы, таким образом, стимулируя рост и метастазирование опухолей. В данной области существует необходимость основанной на антителах против CD73 терапии злокачественных опухолей, которая ингибирует каталитическую активность CD73 и предотвращает способность циркулирующих клеток опухолей к проникновению из сосудов и колонизации, таким образом, ингибируя метастазирование. Настоящее изобретение направлено на эти и другие нужды в данной области.

Сущность изобретения

В одном аспекте настоящее изобретение относится к гуманизованному антителу 1E9, содержащему вариабельную область гуманизованной легкой цепи, включая CDR L1 мыши, CDR L2 мыши или CDR L3 мыши, и вариабельную область гуманизованной тяжелой цепи, включая CDR H1 мыши, CDR H2 мыши или CDR H3 мыши.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу (например, гуманизованному антителу 1E9). Антитело содержит вариабельную область легкой цепи (например, гуманизованной легкой цепи) и вариабельную область тяжелой цепи (например, гуманизованной тяжелой цепи). Вариабельная область легкой цепи содержит:

(i) CDR L1 (например, CDR L1 мыши), как указано в SEQ ID NO: 1, CDR L2 (например, CDR L2 мыши), как указано в SEQ ID NO: 2, CDR L3 (например, CDR L3 мыши), как указано в SEQ ID NO: 3, и

(ii) валин в положении, соответствующем положению 2 по Kabat, метионин в положении, соответствующем положению 4 по Kabat, аспарагиновую кислоту или лейцин в положении, соответствующем положению 9 по Kabat, пролин или серин в положении, соответствующем положению 12 по Kabat, лизин или пролин в положении, соответствующем положению 18 по Kabat, аланин в положении, соответствующем положению 43 по Kabat, пролин или серин в положении, соответствующем положению 60 по Kabat, треонин в положении, соответствующем положению 74 по Kabat, аспарагин или серин в положении, соответствующем положению 76 по Kabat, аспарагин или серин в положении, соответствующем положению 77 по Kabat, изолейцин или лейцин в положении, соответствующем положению 78 по Kabat, серин или аланин в положении, соответствующем положению 80 по Kabat, глутамин в положении, соответствующем положению 100 по Kabat, валин в положении, соответствующем положению 104 по Kabat, глутаминовую кислоту или аланин в положении, соответствующем положению 1 по Kabat, глутамин в положении, соответствующем положению 3 по Kabat, фенилаланин или треонин в положении, соответствующем положению 10 по Kabat, глутамин в положении, соответствующем положению 11 по Kabat, аланин или лейцин в положении, соответствующем положению 13 по Kabat, треонин в положении, соответствующем положению 14 по Kabat, валин или пролин в положении, соответствующем положению 15 по Kabat, лизин в положении, соответствующем положению 16 по Kabat, глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту в положении, соответствующем положению 17 по Kabat, треонин в положении, соответствующем положению 22 по Kabat, лизин в положении, соответствующем положению 42 по Kabat, аргинин в положении, соответствующем положению 45 по Kabat, изолейцин в положении, соответствующем положению 58 по Kabat, тирозин в положении, соответствующем положению 67 по Kabat, фенилаланин в положении, соответствующем положению 73 по Kabat, тирозин в положении, соответствующем положению 85 по Kabat, или фенилаланин в положении, соответствующем положению 87 по Kabat.

Вариабельная область тяжелой цепи содержит:

(i) CDR H1 (например, CDR H1 мыши), как указано в SEQ ID NO: 4, CDRH2 (например, CDR H2 мыши), как указано в SEQ ID NO: 5, CDR H3 (например, CDR H3 мыши), как указано в SEQ ID NO: 6, и

(ii) изолейцин в положении, соответствующем положению 37 по Kabat, аланин или пролин в положении, соответствующем положению 40 по Kabat, лизин в положении, соответствующем положению 43 по Kabat, серин в положении, соответствующем положению 70 по Kabat, изолейцин или треонин в поло-

ту в положении, соответствующем положению 1 по Kabat, валин в положении, соответствующем положению 24 по Kabat, аргинин в положении, соответствующем положению 44 по Kabat, метионин в положении, соответствующем положению 48 по Kabat, лейцин в положении, соответствующем положению 80 по Kabat или глутаминовую кислоту в положении, соответствующем положению 81 по Kabat.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу (например, гуманизированному антителу 1E9), содержащему вариабельную область легкой цепи (например, гуманизированной легкой цепи) и вариабельную область тяжелой цепи (например, гуманизированной тяжелой цепи), где вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность из SEQ ID NO: 7.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу 1E9, содержащему вариабельную область гуманизированной легкой цепи и вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи, где вариабельная область гуманизированной тяжелой цепи содержит последовательность из SEQ ID NO: 7.

Один аспект настоящего описания относится к антителу IgG1 (например, гуманизированному IgG1), содержащему вариабельную область легкой цепи (например, гуманизированной легкой цепи) и вариабельную область тяжелой цепи (например, гуманизированной тяжелой цепи), где вариабельная область легкой цепи содержит CDR L1 (например, CDR L1 мыши), как указано в SEQ ID NO: 1, CDR L2 (например, CDR L2 мыши), как указано в SEQ ID NO: 2, CDR L3 (например, CDR L3 мыши), как указано в SEQ ID NO: 3, и где вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR H1 (например, CDR H1 мыши), как указано в SEQ ID NO: 4, CDR H2 (например, CDR H2 мыши), как указано в SEQ ID NO: 5, CDR H3 (например, CDR H3 мыши), как указано в SEQ ID NO: 6.

Один аспект настоящего описания относится к гуманизированному антителу IgG1, содержащему вариабельную область гуманизированной легкой цепи и вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи, где вариабельная область гуманизированной легкой цепи содержит CDR L1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 1, CDR L2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 2, CDR L3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 3, и где вариабельная область гуманизированной тяжелой цепи содержит CDR H1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 4, CDR H2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 5, и CDR H3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 6.

Один аспект настоящего описания относится к антителу IgG4 (например, гуманизированному IgG4), содержащему вариабельную область легкой цепи (например, гуманизированной легкой цепи) и вариабельную область тяжелой цепи (например, гуманизированной тяжелой цепи), где вариабельная область легкой цепи содержит CDR L1 (например, CDR L1 мыши), как указано в SEQ ID NO: 1, CDR L2 (например, CDR L2 мыши), как указано в SEQ ID NO: 2, CDR L3 (например, CDR L3 мыши), как указано в SEQ ID NO: 3, и где вариабельная область тяжелой цепи содержит CDR H1 (например, CDR H1 мыши), как указано в SEQ ID NO: 4, CDR H2 (например, CDR H2 мыши), как указано в SEQ ID NO: 5, CDR H3 (например, CDR H3 мыши), как указано в SEQ ID NO: 6.

Один аспект настоящего описания относится к гуманизированному антителу IgG4, содержащему вариабельную область гуманизированной легкой цепи и вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи, где вариабельная область гуманизированной легкой цепи содержит CDR L1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 1, CDR L2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 2, CDR L3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 3, и где вариабельная область гуманизированной тяжелой цепи содержит CDR H1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 4, CDR H2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 5, и CDR H3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 6.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей антитело 1E9 (например, гуманизированное антитело 1E9), представленное в настоящем описании, включая варианты осуществления.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей гуманизированное антитело 1E9, представленное в настоящем описании, включая варианты осуществления.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей антитело IgG1 (например, гуманизированное антитело IgG1), представленное в настоящем описании, включая варианты осуществления.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей гуманизированное антитело IgG1, представленное в настоящем описании, включая варианты осуществления.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей антитело IgG4 (например, гуманизированное антитело IgG4), представленное в настоящем описании, включая варианты осуществления.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей гуманизированное антитело IgG4, представленное в настоящем описании, включая варианты осуществления.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антитела 1E9 (например, гуманизированного антитела 1E9), представленного в настоящем описании, включая варианты его осуществления, и фармацевтически приемлемый наполнитель.

ние приведенной в контакт клетки;

(ii) антителу IgG4 (например, гуманизированному антителу IgG4) позволяют связывать антиген CD73 на приведенной в контакт клетке, таким образом, ингибируя пролиферацию клетки.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования пролиферации клетки. Способ включает:

(i) приведение клетки в контакт с гуманизированным антителом IgG4, как представлено в настоящем описании, включая варианты его осуществления, таким образом, получение приведенной в контакт клетки;

(ii) гуманизированному антителу IgG4 позволяют связывать антиген CD73 на приведенной в контакт клетке, таким образом, ингибируя пролиферацию клетки.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу против CD73. Антитело против CD73 связывает тот же самый эпитоп, что и антитело 1E9, где антитело 1E9 содержит переменную область легкой цепи (например, переменную область гуманизированной легкой цепи), включая CDR L1 (например, CDR L1 мыши), CDR L2 (например, CDR L2 мыши) или CDR L3 (например, CDR L3 мыши), и переменную область тяжелой цепи (например, переменную область гуманизированной тяжелой цепи), включая CDR H1 (например, CDR H1 мыши), CDR H2 (например, CDR H2 мыши) или CDR H3 (например, CDR H3 мыши).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу против CD73. Антитело против CD73 связывает тот же самый эпитоп, что и антитело 1E9, где антитело 1E9 содержит переменную область гуманизированной легкой цепи, включая CDR L1 мыши, CDR L2 мыши или CDR L3 мыши, и переменную область гуманизированной тяжелой цепи, включая CDR H1 мыши, CDR H2 мыши или CDR H3 мыши.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу против CD73. Антитело против CD73 связывает тот же самый эпитоп, что и антитело 1E9, где антитело 1E9 содержит переменную область легкой цепи (например, переменную область гуманизированной легкой цепи) и переменную область тяжелой цепи (например, переменную область гуманизированной тяжелой цепи). Переменная область легкой цепи содержит:

(i) CDR L1 (например, CDR L1 мыши), как указано в SEQ ID NO: 1, CDR L2 (например, CDR L2 мыши), как указано в SEQ ID NO: 2, CDR L3 (например, CDR L3 мыши), как указано в SEQ ID NO: 3, и

(ii) валин в положении, соответствующем положению 2 по Kabat, метионин в положении, соответствующем положению 4 по Kabat, аспарагиновую кислоту или лейцин в положении, соответствующем положению 9 по Kabat, пролин или серин в положении, соответствующем положению 12 по Kabat, лизин или пролин в положении, соответствующем положению 18 по Kabat, аланин в положении, соответствующем положению 43 по Kabat, пролин или серин в положении, соответствующем положению 60 по Kabat, треонин в положении, соответствующем положению 74 по Kabat, аспарагин или серин в положении, соответствующем положению 76 по Kabat, аспарагин или серин в положении, соответствующем положению 77 по Kabat, изолейцин или лейцин в положении, соответствующем положению 78 по Kabat, серин или аланин в положении, соответствующем положению 80 по Kabat, глутамин в положении, соответствующем положению 100 по Kabat, валин в положении, соответствующем положению 104 по Kabat, глутаминовую кислоту или аланин в положении, соответствующем положению 1 по Kabat, глутамин в положении, соответствующем положению 3 по Kabat, фенилаланин или треонин в положении, соответствующем положению 10 по Kabat, глутамин в положении, соответствующем положению 11 по Kabat, аланин или лейцин в положении, соответствующем положению 13 по Kabat, треонин в положении, соответствующем положению 14 по Kabat, валин или пролин в положении, соответствующем положению 15 по Kabat, лизин в положении, соответствующем положению 16 по Kabat, глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту в положении, соответствующем положению 17 по Kabat, треонин в положении, соответствующем положению 22 по Kabat, лизин в положении, соответствующем положению 42 по Kabat, аргинин в положении, соответствующем положению 45 по Kabat, изолейцин в положении, соответствующем положению 58 по Kabat, тирозин в положении, соответствующем положению 67 по Kabat, фенилаланин в положении, соответствующем положению 73 по Kabat, тирозин в положении, соответствующем положению 85 по Kabat, или фенилаланин в положении, соответствующем положению 87 по Kabat.

Переменная область гуманизированной тяжелой цепи содержит:

(i) CDR H1 (например, CDR H1 мыши), как указано в SEQ ID NO: 4, CDR H2 (например, CDR H2 мыши), как указано в SEQ ID NO: 5, CDR H3 (например, CDR H3 мыши), как указано в SEQ ID NO: 6, и

(ii) изолейцин в положении, соответствующем положению 37 по Kabat, аланин или пролин в положении, соответствующем положению 40 по Kabat, лизин в положении, соответствующем положению 43 по Kabat, серин в положении, соответствующем положению 70 по Kabat, изолейцин или треонин в положении, соответствующем положению 75 по Kabat, триптофан в положении, соответствующем положению 82 по Kabat, аргинин или лизин в положении, соответствующем положению 83 по Kabat, аланин в положении, соответствующем положению 84 по Kabat, серин в положении, соответствующем положению 85 по Kabat, валин или метионин в положении, соответствующем положению 89 по Kabat, валин в

по Kabat, или глутаминовую кислоту в положении, соответствующем положению 81 по Kabat.

Краткое описание фигур

Фиг. 1: Т-клетки человека, выделенные посредством отрицательного отбора, культивированные с указанной обработкой в течение 5 суток. Проллиферацию клеток анализируют по разведению отслеживающего красителя Cell Trace Violet.

Фиг. 2: Т-клетки человека, выделенные посредством отрицательного отбора, культивированные с указанной обработкой в течение 5 суток. Экспрессию CD25 анализируют посредством проточной цитометрии.

Фиг. 3А-3Е: Клетки MDA-MB-231, линию клеток молочной железы человека CD73, инкубировали с указанными гуманизированными антителами (CPX-002 на фиг. 3А; CPX-005 на фиг. 3В; CPX-006 на фиг. 3С; CPX-004 на фиг. 3D; CPX-003 на фиг. 3Е) в диапазоне концентраций в течение 1 ч при 37°C. Клетки промывали в не содержащем фосфата буфере и затем инкубировали с 250 мкМ АМФ в течение 20 мин при 37°C. Кондиционированную среду собирали из каждой лунки, и уровни фосфата определяли с использованием набора для детекции на основе малахитового зеленого (Sensolyte MG phosphate kit, AnaS-PEC). Абсолютные уровни фосфата определяли посредством интерполяции к стандартной кривой. Анализ проводили в условиях 3 различных pH: 7,2, 6,7 или 6,3. Клетки уравнивали в буфере соответствующего pH посредством промывки перед добавлением антитела. Остальную часть анализа проводили в буфере указанного pH.

Фиг. 4А и фиг. 4В:

Фиг. 4А: Выравнивание переменных доменов тяжелой цепи

Переменные домены 10 клонов с наилучшим ответом выравнивали с исходным клоном ВАР094-01 (LC химерного 1Е9 (SEQ ID NO: 28)). Аминокислотные остатки, идентичные исходному клону, представлены точками, показаны только различия аминокислот. Четыре уникальных переменных домена HC идентифицированы среди 10 клонов с наилучшим ответом. Последовательности перечислены (сверху вниз) на основании идентичности каркасной области 3, каркасной области 2 и каркасной области 1. CDR заключены в рамки. Последовательность, указанная для ВАР094-hum01-HC, соответствует SEQ ID NO: 42; последовательность, указанная для ВАР094-hum02-HC, соответствует SEQ ID NO: 43; последовательность, указанная для ВАР094-hum06-HC, соответствует SEQ ID NO: 47; последовательность, указанная для ВАР094-hum07-HC, соответствует SEQ ID NO: 48; последовательность, указанная для ВАР094-hum08-HC, соответствует SEQ ID NO: 49; последовательность, указанная для ВАР094-hum03-HC, соответствует SEQ ID NO: 44; последовательность, указанная для ВАР094-hum09-HC, соответствует SEQ ID NO: 50; последовательность, указанная для ВАР094-hum04-HC, соответствует SEQ ID NO: 45; последовательность, указанная для ВАР094-hum05-HC, соответствует SEQ ID NO: 46; последовательность, указанная для ВАР094-hum10-HC, соответствует SEQ ID NO: 51.

Фиг. 4В: Выравнивание переменных доменов легкой цепи

Переменные домены клонов с наилучшим ответом выравнивали с исходным клоном ВАР094-01 (LC химерного 1Е9 (SEQ ID NO: 29)). Аминокислотные остатки, идентичные исходному клону, представлены точками, показаны только различия аминокислот. 5 уникальных переменных доменов LC идентифицированы среди 10 клонов с наилучшим ответом. Последовательности перечислены (сверху вниз) на основании идентичности каркасной области 3, каркасной области 2 и каркасной области 1. CDR заключены в рамки. Последовательность, указанная для ВАР094-hum02-LC, соответствует SEQ ID NO: 32; последовательность, указанная для ВАР094-hum03-LC, соответствует SEQ ID NO: 33; последовательность, указанная для ВАР094-hum04-LC, соответствует SEQ ID NO: 34; последовательность, указанная для ВАР094-hum01-LC, соответствует SEQ ID NO: 31; последовательность, указанная для ВАР094-hum07-LC, соответствует SEQ ID NO: 37; последовательность, указанная для ВАР094-hum08-LC, соответствует SEQ ID NO: 38; последовательность, указанная для ВАР094-hum09-LC, соответствует SEQ ID NO: 39; последовательность, указанная для ВАР094-hum10-LC, соответствует SEQ ID NO: 40; последовательность, указанная для ВАР094-hum05-LC, соответствует SEQ ID NO: 35; последовательность, указанная для ВАР094-hum06-LC, соответствует SEQ ID NO: 36.

Фиг. 5: ELISA на основе клеток для отобранных 10 гуманизированных вариантов с наилучшим ответом

Клетки CHO рассеивали в 6-луночные планшеты, трансфицировали с использованием ВАР094-01 (т.е. химерного антитела 1Е9, содержащего переменную легкую цепь из SEQ ID NO: 30 и переменную тяжелую цепь из SEQ ID NO: 41), отобранных гуманизированных вариантов или только вектора, и культивировали при 37°C в DMEM с 10% эмбриональной бычьей сывороткой. Супернатанты собирали через 48 ч после трансфекции. Концентрацию антител в супернатанте определяли посредством способа количественного ELISA, где неизвестные значения интерполировали до стандартной кривой. Супернатанты разводили до 50 нг/мл в среде для роста (DMEM с 10% сывороткой). 100 мкл разведенного супернатанта добавляли в лунки 96-луночного планшета, содержащие клетки MDA-MB231 (3×10^4 MDA-MB231 клеток/лунку рассеивали за сутки до этого) и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Антитело против IgG человека (H+L), конъюгированное с HRP (Promega #W4031), использовали в качестве вторичного антитела для детекции. Реакции останавливали через 6 мин после добавления ТМВ

в лунки и считывали немедленно.

Фиг. 6: CPX-006 ослабляет зависимую от АМФ-супрессию IFN-гамма. Мононуклеарные клетки периферической крови человека инкубировали с 1 мкг/мл антител против CD3 и антител против CD28 для стимуляции пролиферации Т-клеток. 1 mM АМФ добавляли в культуры в качестве субстрата для клеточного CD73 для превращения в иммуносупрессивный аденозин. Культуры инкубировали также с антителом против CD73 (CPX-006) или контролем для изотипа в диапазоне концентраций. После 4 суток в культуре, уровни интерферона-гамма (IFN-гамма) измеряли в среде после культивирования клеток посредством AlphaLISA. Сигнал флуоресценции является пропорциональным количествам присутствующего IFN-гамма. CPX-006 ослаблял зависимую от АМФ супрессию активности Т-клеток, как измерено по секреции IFN-гамма.

Фиг. 7: CPX-006 ослабляет зависимую от АМФ супрессию пролиферации Т-клеток. Мононуклеарные клетки периферической крови человека метили с использованием красителя Cell Trace Violet и инкубировали с 1 мкг/мл антитела против CD3 и антитела против CD28 для стимуляции пролиферации Т-клеток. 1 mM АМФ добавляли в культуры в качестве субстрата для клеточного CD73 для превращения в иммуносупрессивный аденозин. Культуры инкубировали также с антителом против CD73 (CPX-006) или контролем для изотипа в диапазоне концентраций. После 4 суток в культуре, клетки окрашивали с использованием меченого флуорофором антитела против CD3 и анализировали посредством проточной цитометрии. Пролиферацию CD3⁺ Т-клеток отбирали как события, подвергнувшиеся разведению красителя Cell Trace Violet. CPX-006 ослаблял зависимую от АМФ супрессию пролиферацию Т-клеток.

Подробное описание

Определения

В то время как различные варианты осуществления и аспекты по настоящему изобретению показаны и описаны в настоящем описании, специалистам в данной области очевидно, что такие варианты осуществления и аспекты представлены только в качестве примера. Многочисленные варианты, изменения и замены в настоящее время станут очевидными специалистам в данной области без отклонения от изобретения. Следует понимать, что различные альтернативы вариантам осуществления изобретения, описанным в настоящем описании, можно использовать в осуществлении изобретения на практике.

Заголовки разделов, используемые в настоящем описании, предназначены только для организационных целей, и их не следует рассматривать, как ограничивающие описанный объект изобретения. Полное содержание всех документов, или частей документов, процитированных в заявке, включая, без ограничения, патенты, патентные заявки, статьи, книги, руководства и монографии, таким образом, явным образом приведено в качестве ссылки для всех целей.

Антитела представляют собой большие, комплексные молекулы (молекулярная масса ~150000 или приблизительно 1320 аминокислот) со сложной внутренней структурой. Природная молекула антитела содержит две идентичные пары полипептидных цепей, где каждая пара имеет одну легкую цепь и одну тяжелую цепь. Каждая легкая цепь и тяжелая цепь, в свою очередь, состоит из двух областей: вариательной ("V") области, вовлеченной в связывание антигена-мишени, и константной ("C") области, взаимодействующей с другими компонентами иммунной системы. Вариательные области легкой и тяжелой цепи сближаются в 3-мерном пространстве с формированием вариательной области, которая связывает антиген (например, рецептор на поверхности клетки). Внутри каждой вариательной области легкой или тяжелой цепи существуют три коротких фрагмента (длиной в среднем 10 аминокислот), называемых определяющими комплементарность областями ("CDR"). Шесть CDR в вариательном домене антитела (три из легкой цепи и три из тяжелой цепи) сворачиваются вместе в 3-мерном пространстве с формированием фактического участка связывания антитела, который стыкуется с антигеном-мишенью. Положение и длина CDR точно определена в Kabat, E. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1983, 1987. Часть вариательной области, не содержащуюся в CDR, называют каркасной областью ("FR"), которая формирует окружение для CDR.

Термины "CDR L1", "CDR L2" и "CDR L3", как представлено в настоящем описании, относятся к определяющим комплементарность областям (CDR) 1, 2 и 3 из вариательной легкой (L) цепи антитела. Подобным образом, термины "CDR H1", "CDR H2" и "CDR H3", как представлено в настоящем описании, относятся к определяющим комплементарность областям (CDR) 1, 2 и 3 вариательной тяжелой (H) цепи антитела.

Термин "антитело" используют в соответствии с его общеизвестным в данной области значением. Антитела существуют, например, в форме интактных иммуноглобулинов или в форме ряда хорошо охарактеризованных фрагментов, полученных посредством расщепления с использованием различных пептидаз. Таким образом, например, пепсин расщепляет антитело ниже дисульфидных связей в шарнирной области с получением F(ab)₂, димера Fab, который сам представляет собой легкую цепь, соединенную с V_H-C_{H1} посредством дисульфидной связи. F(ab)₂ можно восстанавливать в мягких условиях для разрыва дисульфидной связи в шарнирной области, таким образом, превращая димер F(ab)₂ в мономер Fab'. Мономер Fab' по существу представляет собой Fab с частью шарнирной области (см. Fundamental Immunology (Paul ed., 3rd ed. 1993)). В то время как различные фрагменты антител определяют в отношении расщепления интактного антитела, специалисту в данной области понятно, что такие фрагменты можно синте-

зировать *de novo* либо химически, либо с использованием способа рекомбинантной ДНК. Таким образом, термин антитело, как применяют в настоящем описании, также включает фрагменты антител, либо полученные посредством модификации полноразмерных антител, либо синтезированные *de novo* с использованием способов рекомбинантной ДНК (например, одноцепочечное Fv), либо идентифицированные с использованием библиотек фагового дисплея (см., например, McCafferty et al., Nature 348: 552-554 (1990)).

Для получения моноклональных или поликлональных антител можно использовать любой способ, известный в данной области (см., например, Kohler & Milstein, Nature 256:495-497 (1975); Kozbor et al., Immunology Today 4:72 (1983); Cole et al., pp. 77-96 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (1985)). "Моноклональные" антитела (mAb) относятся к антителам, происходящим из одного клона. Способы получения одноцепочечных антител (Патент США № 4946778) можно адаптировать для получения антитела против полипептидов по этому изобретению. А также трансгенных мышей или другие организмы, такие как другие млекопитающие, можно использовать для экспрессии гуманизированных антител. Альтернативно, технологию фагового дисплея можно использовать для идентификации антител и гетеромерных фрагментов Fab, которые специфически связываются с выбранными антигенами (см., например, McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); Marks et al., Biotechnology 10:779-783 (1992)).

Эпитоп mAb представляет собой область в антигене, с которым связывается mAb. Два антитела связываются с одним и тем же или перекрывающимся эпитопом, если каждое конкурентным образом ингибирует (блокирует) связывание другого с антигеном. То есть 1×, 5×, 10×, 20× или 100× избыток одного антитела ингибирует связывание другого по меньшей мере на 30%, но предпочтительно на 50, 75, 90 или даже 99%, как измерено посредством анализа конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 50:1495, 1990). Альтернативно, два антитела имеют одинаковый эпитоп, если в основном все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или исключают связывание одного антитела, уменьшают или исключают связывание другого. Два антитела имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые аминокислотные мутации, которые уменьшают или исключают связывание одного антитела, уменьшают или исключают связывание другого.

"Лиганд" относится к агенту, например полипептиду или другой молекуле, способной связываться с рецептором.

"Метка" или "поддающаяся детекции группа" представляет собой композицию, поддающуюся детекции посредством спектроскопических, фотохимических, биохимических, иммунохимических, химических или других физических способов. Например, метки, которые можно использовать, включают 32P, флуоресцентные красители, электроноплотные реагенты, ферменты (например, как обычно используют в ELISA), биотин, дигоксигенин или гаптены и белки, или другие вещества, которые можно сделать поддающимися детекции, например, посредством включения радиоактивной метки в пептид или антитело, специфически реакционноспособные по отношению к пептиду-мишени. Можно использовать любой пригодный способ, известный в данной области, для конъюгации антитела с меткой, например, с использованием способов, описанных в Hermanson, Bioconjugate Techniques 1996, Academic Press, Inc., San Diego.

"Приведение в контакт" используют в соответствии с его простым обычным значением, и оно обозначает процесс, позволяющий по меньшей мере двум отдельным молекулам (например, химическим соединениям, включая биомолекулы или клетки) становиться достаточно близкими для реакции, взаимодействия или физического контакта. Следует понимать, однако, что полученный продукт реакции может образовываться непосредственно в результате реакции между добавленными реагентами или из промежуточного соединения из одного или нескольких из добавленных реагентов, которые могут образовываться в реакционной смеси.

Термин "приведение в контакт" может включать обеспечение возможности для реакции, взаимодействия или физического контакта двух веществ, где два вещества могут представлять собой, например, домен биотина, как описано в настоящем описании, и связывающий биотин домен. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт включает, например, обеспечение возможности для гуманизированного антитела, как описано в настоящем описании, взаимодействия с антигеном CD73.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используют в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков, где полимер может в некоторых вариантах осуществления являться конъюгированным с группой, которая не состоит из аминокислот. Термины применяют к аминокислотным полимерам, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляет собой искусственный химический миметик соответствующей природной аминокислоты, так же как к полимерам природных аминокислот и к полимерам неприродных аминокислот. "Слитый белок" относится к химерному белку, кодирующему две или более отдельных белковых последовательностей, рекомбинантным образом экспрессируемых в форме одной группы.

Термин "пептидил" и "пептидильная группа" обозначают моновалентный пептид.

Термин "аминокислота" относится к природным и синтетическим аминокислотам, так же как к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют сходным образом с природными аминокислотами. Природные аминокислоты представляют собой аминокислоты, кодируемые генетиче-

ским кодом, так же как аминокислоты, модифицированные позднее, например гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат и O-фосфосерин. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, имеющим такую же основную химическую структуру, что и природная аминокислота, т.е., α -атом углерода, связанный с водородом, карбоксильную группу, аминогруппу и группу R, например гомосерин, норлейцин, метионин сульфоксид, метионин метилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные группы R (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют такую же основную химическую структуру, что и природная аминокислота. Миметики аминокислот относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, отличную от общей химической структуры аминокислоты, но которые функционируют сходным образом с природными аминокислотами. Термины "неприродная аминокислота" и "природная аминокислота" относятся к аналогам аминокислот, синтетическим аминокислотам и миметикам аминокислот, не обнаруженным в природе.

Аминокислоты можно обозначать в настоящем описании с помощью общеизвестных трехбуквенных символов или однобуквенных символов, рекомендованных Комиссией Биохимической Номенклатуры IUPAC-IUB. Нуклеотиды, подобным образом, можно обозначать с помощью общепринятых однобуквенных кодов.

"Консервативно модифицированные варианты" применимы как к аминокислотным последовательностям, так и к последовательностям нуклеиновой кислоты. Применительно к конкретным последовательностям нуклеиновой кислоты "консервативно модифицированные варианты" относятся к нуклеиновым кислотам, кодирующим идентичные или в основном идентичные аминокислотные последовательности. Из-за вырожденности генетического кода несколько последовательностей нуклеиновой кислоты могут кодировать любой данный белок. Например, кодоны GCA, GCC, GCG и GCU все кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, где аланин определен кодоном, кодон можно изменять до любого из описанных соответствующих кодонов, без изменения кодируемого полипептида. Такие варианты нуклеиновой кислоты представляют собой "молчащие варианты", которые представляют собой один вид консервативно модифицированных вариантов. Каждая последовательность нуклеиновой кислоты в настоящем описании, которая кодирует полипептид, также описывает каждый возможный молчащий вариант нуклеиновой кислоты. Специалисту в данной области известно, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) можно модифицировать с получением функционально идентичной молекулы. Соответственно каждый молчащий вариант нуклеиновой кислоты, который кодирует полипептид, подразумевается в каждой описанной последовательности.

Применительно к аминокислотным последовательностям, специалисту в данной области известно, что индивидуальные замены, делеции или добавления в последовательности нуклеиновой кислоты, пептида, полипептида или белка, которые изменяют, добавляют или делетируют одну аминокислоту или небольшой процент аминокислот в кодируемой последовательности, представляют собой "консервативно модифицированный вариант", когда изменение приводит к замене аминокислоты на химически сходную аминокислоту. Таблицы консервативных замен, представляющие функционально сходные аминокислоты, хорошо известны в данной области. Такие консервативно модифицированные варианты дополняют и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели по изобретению.

Каждая из следующих восьми групп содержит аминокислоты, являющиеся консервативными заменами друг для друга:

- 1) аланин (A), глицин (G);
- 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E);
- 3) аспарагин (N), глутамин (Q);
- 4) аргинин (R), лизин (K);
- 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V);
- 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W);
- 7) серин (S), треонин (T) и
- 8) цистеин (C), метионин (M) (см., например, Creighton, Proteins (1984)).

"Процент идентичности последовательности" определяют посредством сравнения двух оптимально выровненных последовательностей на протяжении окна сравнения, где часть полинуклеотидной или полипептидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т.е., пропуски) по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавлений или делеций) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент рассчитывают посредством определения количества положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты или идентичный аминокислотный остаток встречается в обоих последовательностях, для получения количества совпадающих положений, деления количества совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножения результата на 100 для получения процента идентичности последовательности.

Термины "идентичный" или процент "идентичности", в контексте двух или более последовательно-

стей нуклеиновой кислоты или полипептида, относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют указанный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (т.е., 60% идентичности, необязательно 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичности на протяжении указанной области, например, всей полипептидной последовательности по изобретению или индивидуальных доменов полипептидов по изобретению), при сравнении и выравнивании для максимального соответствия на протяжении окна сравнения или указанной области, как измерено с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или посредством выравнивания вручную и визуальной проверки. Такие последовательности затем называют "в основном идентичными". Это определение относится также к последовательности, комплементарной тестируемой последовательности. Необязательно, идентичность присутствует на протяжении области, имеющей длину по меньшей мере приблизительно 50 нуклеотидов, или более предпочтительно на протяжении области, имеющей длину 100-500 или 1000, или более нуклеотидов. Настоящее изобретение относится к полипептидам, в основном идентичным любой из SEQ ID NO: 30-51.

Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность действует в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей тестируемые и эталонную последовательности вводят в компьютер, назначают координаты подпоследовательности, при необходимости, и назначают параметры программы алгоритма для последовательностей. Можно использовать параметры программы по умолчанию или можно назначать альтернативные параметры. Затем алгоритм сравнения последовательностей рассчитывает процент идентичности последовательности для тестируемых последовательностей относительно эталонной последовательности, на основании параметров программы.

"Окно сравнения", как применяют в настоящем описании, включает ссылку на фрагмент из любого одного из количеств непрерывных положений, выбранных из группы, состоящей, например, из полноразмерной последовательности или от 20 до 600, от приблизительно 50 до приблизительно 200 или от приблизительно 100 до приблизительно 150 аминокислот или нуклеотидов, в котором последовательность можно сравнивать с эталонной последовательностью из такого же количества непрерывных положений после оптимального выравнивания двух последовательностей. Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, посредством алгоритма локальной гомологии Смита и Уотермана (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482с, посредством алгоритма выравнивания областей гомологии Нидлмана и Вунша (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, посредством способа поиска сходства Пирсона и Липмана (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, посредством компьютеризированных осуществлений этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), или посредством выравнивания вручную и визуальной проверки (см., например, Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 supplement)).

Одним из примеров алгоритма, пригодного для определения процентной идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описанные в Altschul et al. (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, и Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 соответственно. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST является публично доступным через Национальный центр биотехнологической информации (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Этот алгоритм включает сначала идентификацию пар последовательностей с высоким показателем сходства (HSP) посредством идентификации коротких слов длиной W в запрашиваемой последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому показателю T при выравнивании со словом такой же длины в последовательности из базы данных. T обозначает пороговую оценку сходства соседних слов (Altschul et al., выше). Эти исходные попадания в соседнее слово действуют в качестве затравок для инициации поисков с целью найти более длинные HSP, содержащие их. Попадания в слова расширяют в обоих направлениях вдоль каждой последовательности, пока кумулятивный показатель выравнивания может увеличиваться. Кумулятивные показатели рассчитывают с использованием, для нуклеотидных последовательностей, параметров M (показатель вознаграждения за пару совпадающих остатков; всегда >0) и N (показатель штрафа за несовпадающие остатки; всегда <0). Для аминокислотных последовательностей оценочную матрицу используют для расчета кумулятивного показателя. Расширение попадания в слова в каждом направлении прекращают, когда кумулятивный показатель выравнивания уменьшается на значение X от его максимально достигнутого значения; кумулятивный показатель стремится к нулю или ниже из-за накопления одного или нескольких отрицательно оцениваемых выравниваний остатков; или достигнут конец какой-либо из последовательностей. Параметры алгоритма BLAST W , T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) используют по умолчанию длину слова (W) 11, ожидание (E) 10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей, в программе BLASTP используют по умолчанию длину слова 3 и ожидание (E) 10, и оценочную матрицу BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915), выравнивания (B) 50, ожидание (E) 10,

M=5, N=-4 и сравнение обеих цепей.

Алгоритм BLAST осуществляет также статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787). Одним из измерений сходства, предоставленных алгоритмом BLAST, является наименьшая сумма вероятностей (P(N)), которая указывает на вероятность, с которой совпадение двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей может происходить случайно. Например, нуклеиновую кислоту считают сходной с эталонной последовательностью, если наименьшая сумма вероятностей при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее приблизительно 0,2, более предпочтительно, менее приблизительно 0,01 и наиболее предпочтительно менее приблизительно 0,001.

Указанием на то, что две последовательности нуклеиновой кислоты или два полипептида являются в основном идентичными, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, обладает иммунологической перекрестной реакционной способностью по отношению к антителам, образованным против полипептида, кодируемого второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид, как правило, является в основном идентичным второму полипептиду, например, когда два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим указанием на то, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются в основном идентичными, является то, что эти две молекулы или комплементарные им молекулы гибридизуются друг с другом в строгих условиях, как описано ниже. Другим указанием на то, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются в основном идентичными, является то, что одинаковые праймеры можно использовать для амплификации последовательностей.

Аминокислотный остаток в антителе "соответствует" данному остатку, когда он занимает то же важное структурное положение внутри антитела, что и данный остаток. Например, выбранный остаток в сравниваемом антителе соответствует положению 48 (в соответствии с системой нумерации Kabat, как описано в настоящем описании) в антителе, представленном в настоящем описании, когда выбранный остаток вступает в такую же важную взаимосвязь с положением 48 по Kabat, как оценено с использованием применимых в данной области способов. Например, сравниваемое антитело можно выравнивать для максимальной гомологии последовательности с антителом, представленным в настоящем описании, и положение в выровненном сравниваемом антителе, которое выравнивается с положением 48 по Kabat, можно определять как соответствующее ему. Альтернативно, вместо выравнивания (или в дополнение к выравниванию) первичной последовательности, как описано выше, можно использовать также трехмерное структурное выравнивание, например, где структуру сравниваемого антитела выравнивают для максимального соответствия с антителом, представленным в настоящем описании, и сравнивают общие структуры. В этом случае аминокислоту, занимающую то же важное положение, что и положение 48 по Kabat, в структурной модели, можно назвать соответствующей.

Термин "выделенный" применительно к белку означает, что белок является в основном свободным от других клеточных компонентов, с которыми он ассоциирован в своем природном состоянии. Он находится предпочтительно в гомогенном состоянии, хотя он может либо являться сухим, либо находиться в водном растворе. Чистоту и гомогенность, как правило, определяют с использованием способов аналитической химии, таких как электрофорез в полиакриламидном геле или высокоэффективная жидкостная хроматография. Белок, который является преобладающей молекулой в препарате, является в основном очищенным. Термин "очищенный" обозначает, что для белка получают по существу одну полосу в электрофоретическом геле. В частности, это означает, что белок является по меньшей мере на 85% чистым, более предпочтительно по меньшей мере на 95% чистым и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99% чистым.

Фраза "специфически (или избирательно) связывается" с антителом или является "специфически (или избирательно) иммунореактивным", применительно к белку или пептиду, относится к реакции связывания, определяющей присутствие белка в гетерогенной популяции белков и других биологических веществ. Таким образом, в указанных условиях иммуноанализа, указанные антитела связываются с конкретным белком по меньшей мере в два раза сильнее фонового связывания, и по существу не связываются в значительном количестве с другими белками, присутствующими в образце. Как правило, при специфической или избирательной реакции получают сигнал, по меньшей мере в два раза превышающий сигнал фона или шума, и более конкретно, более чем в 10-100 раз превышающий фон.

"Клетка", как применяют в настоящем описании, относится к клетке, выполняющей метаболическую или другую функцию, достаточную для сохранения или репликации ее геномной ДНК. Клетку можно идентифицировать хорошо известными в данной области способами, включая, например, присутствие интактной мембраны, окрашивание конкретным красителем, способность производить потомство или, в случае гаметы, способность объединения с второй гаметой для производства жизнеспособного потомства. Клетки могут включать прокариотические и эукариотические клетки. Прокариотические клетки включают, но без ограничения, бактерии. Эукариотические клетки включают, но без ограничения, клетки дрожжей и клетки, происходящие из растений и животных, например, клетки млекопитающих, насекомых (например, spodoptera) и человека.

Как определено в настоящем описании, термин "ингибирование", "ингибировать", "ингибирующий" и т.п. применительно к взаимодействию белок-ингибитор (например, гуманизированное антитело 1E9-CD73) означает отрицательное влияние (например, уменьшающее) на активность или функцию белка (например, уменьшение каталитической активности CD73) по сравнению с активностью или функцией белка в отсутствие ингибитора (например, гуманизированного антитела 1E9). В некоторых вариантах осуществления ингибирование относится к уменьшению заболевания или симптомов заболевания. Таким образом, ингибирование включает, по меньшей мере отчасти, частично или полностью, блокирование стимуляции, уменьшение, предотвращение или задержку активации, или инактивацию, десенсибилизацию или понижающую регуляцию передачи сигналов, или ферментативной активности или количества белка. Подобным образом "ингибитор" представляет собой соединение или белок, ингибирующие активность CD73, например, посредством связывания, частичного или полного блокирования, уменьшения, предотвращения, задержки, инактивации, десенсибилизации или понижающей регуляции ферментативной активности (например, каталитической активности CD73).

Средства по изобретению часто вводят в форме фармацевтических композиций, содержащих активное лекарственное средство, и множество других фармацевтически приемлемых компонентов (См. Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980)).

Предпочтительная форма зависит от намеченного способа введения и терапевтического применения. Композиции могут включать также, в зависимости от желательного состава, фармацевтически приемлемые, нетоксичные носители или разбавители, определенные в качестве связующих, общепринятых для составления фармацевтических композиций для введения животным или человеку. Разбавитель выбирают таким образом, чтобы он не влиял на биологическую активность комбинации. Примерами таких разбавителей являются дистиллированная вода, физиологический фосфатно-солевой буфер, растворы Рингера, раствор декстрозы и раствор Хенка. Кроме того, фармацевтическая композиция или состав могут также включать другие носители, адъюванты или нетоксичные, не терапевтические, неиммуногенные стабилизаторы и т.п.

Композиции можно вводить для терапевтического или профилактического лечения. При терапевтических применениях, композиции вводят пациенту, страдающему заболеванием (например, злокачественной опухолью) в "терапевтически эффективной дозе". Количество, эффективные для этого применения, могут зависеть от тяжести заболевания и общего состояния здоровья пациента. Однократное или множественные введения композиций можно проводить в зависимости от дозы и частоты, как необходимо, и как переносит пациент. "Пациент" или "субъект" для целей по настоящему изобретению включает как человека, так и других животных, в частности млекопитающих. Таким образом, способы можно использовать как для терапии человека, так и для ветеринарных применений. В предпочтительном варианте осуществления, пациент представляет собой млекопитающее, предпочтительно, примата, и в наиболее предпочтительном варианте осуществления, пациент представляет собой человека.

Составы, подходящие для перорального введения, могут состоять из:

- (a) жидких составов, таких как эффективное количество упакованной нуклеиновой кислоты, суспендированной в разбавителях, таких как вода, солевой раствор или PEG 400;
- (b) капсул, саше или таблеток, где каждое содержит предопределенное количество активного ингредиента, в форме жидкостей, твердых веществ, гранул или желатина;
- (c) суспензий в подходящей жидкости и
- (d) пригодных эмульсий.

Формы таблеток могут включать одно или несколько из лактозы, сахарозы, маннита, сорбита, фосфатов кальция, кукурузного крахмала, картофельного крахмала, микрокристаллической целлюлозы, желатина, коллоидного диоксида кремния, талька, стеарата магния, стеариновой кислоты и других наполнителей, красителей, заполнителей, связующих веществ, разбавителей, забуферивающих средств, увлажняющих средств, консервантов, придающих вкус средств, красителей, дезинтегрирующих средств и фармацевтически совместимых носителей. Формы пастилок могут содержать активный ингредиент в придающем вкус средстве, например, сахарозе, так же как пастилки, содержащие активный ингредиент в инертной основе, такой как желатин и глицерин или эмульсии сахарозы и гуммиарабика, гели и т.п., содержащие, в дополнение к активному ингредиенту, носители, известные в данной области.

Фармацевтические композиции могут также включать крупные, медленно подвергающиеся метаболизму макромолекулы, такие как белки, полисахариды, такие как хитозан, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты и сополимеры (такие как функционализированная латексом сефароза (TM), агароза, целлюлоза, и т.п.), полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот и жидкие агрегаты (такие как масляные капли или липосомы). Кроме того, эти носители могут функционировать в качестве иммуностимулирующих средств (т.е., адъюванты).

Композиции, представленные в настоящем описании, отдельно или в комбинации с другими подходящими компонентами, можно получать в форме аэрозольных составов (т.е., их можно "распылять") для введения посредством ингаляции. Аэрозольные составы можно помещать в подходящие пропелленты под давлением, такие как дихлордифторметан, пропан, азот и т.п.

Подходящие составы для ректального введения включают, например, суппозитории, состоящие из

упакованной нуклеиновой кислоты с основой для суппозиториев. Подходящие основы для суппозиториев включают природные или синтетические триглицериды или парафиновые углеводороды. Кроме того, можно также использовать желатиновые ректальные капсулы, состоящие из комбинации выбранного соединения с основой, включая, например, жидкие триглицериды, полиэтиленгликоли и парафиновые углеводороды.

Составы, подходящие для парентерального введения, например, посредством таких способов, как внутрисуставной (в суставы), внутривенный, внутримышечный, внутриопухолевый, внутрикожный, внутрибрюшинный и подкожный, включают водные и неводные, изотонические стерильные растворы для инъекции, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатики и растворенные вещества, придающие составу изотоничность с кровью намеченного реципиента, и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие средства, солубилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты. В практическом осуществлении этого изобретения композиции можно вводить, например, посредством внутривенной инфузии, перорально, местно, внутрибрюшинно, внутрипузырно или интратекально. Парентеральное введение, пероральное введение, и внутривенное введение являются предпочтительными способами введения. Составы соединений можно предоставлять в герметично закрытых контейнерах для единичной дозы или множественных доз, таких как ампулы и флаконы.

Растворы и суспензии для инъекций можно получать из стерильных порошков, гранул и таблеток описанного ранее вида. Клетки, трансдуцированные нуклеиновыми кислотами для терапии *ex vivo*, можно также вводить внутривенно или парентерально, как описано выше.

Фармацевтический состав, предпочтительно, находится в единичной дозированной форме. В такой форме препарат разделен на единичные дозы, содержащие подходящие количества активного компонента. Единичная дозированная форма может представлять собой упакованный препарат, где упаковка содержит дискретные количества препарата, например, упакованные таблетки, капсулы и порошки во флаконах или ампулах. А также, единичная дозированная форма может представлять собой собственно капсулу, таблетку, саше или пастилку, или может представлять собой подходящее количество любых из этих упакованных форм. Композиция может, если желательна, содержать также другие совместимые лекарственные средства.

Комбинированное введение подразумевает совместное введение, с использованием отдельных составов или одного фармацевтического состава, и последовательное введение в любом порядке, где предпочтительно существует период времени, когда оба (или все) действующие вещества одновременно проявляют свою биологическую активность.

Эффективные дозы композиций, представленных в настоящем описании, меняются в зависимости от множества различных факторов, включая способы введения, участок-мишень, физиологическое состояние пациента, то, является ли пациент человеком или животным, другие вводимые лекарственные средства и то, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Однако специалист в данной области может немедленно определить подходящие и/или эквивалентные дозы, ознакомившись для руководства с дозами одобренных композиций для лечения и предотвращения злокачественных опухолей.

Термины "заболевание" или "состояние" относятся к состоянию или общему состоянию здоровья пациента или субъекта, которого можно лечить с использованием соединения, фармацевтической композиции или способа, представленных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой злокачественную опухоль (например, рак легкого, рак яичника, остеосаркому, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак печени, рак почки, рак кожи (например, карциному из клеток Меркеля), рак яичка, лейкоз, лимфому, рак головы и шеи, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, меланому, рак молочной железы, нейробластому). Заболевание может представлять собой аутоиммунное, воспалительное, злокачественное, инфекционное, метаболическое, связанное с развитием, сердечно-сосудистое заболевание, заболевание печени, кишечное, эндокринное, неврологическое или другое заболевание.

Как применяют в настоящем описании, термин "злокачественная опухоль" относится ко всем типам злокачественных опухолей, неоплазии или злокачественных опухолей, обнаруженных у млекопитающих, включая лейкозы, лимфомы, меланомы, нейроэндокринные опухоли, карциномы и саркомы. Иллюстративные злокачественные опухоли, которые можно лечить с использованием соединения, фармацевтической композиции или способа, представленных в настоящем описании, включают лимфому, саркому, рак мочевого пузыря, злокачественную опухоль кости, опухоль мозга, рак шейки матки, рак ободочной кишки, рак пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, рак почки, миелому, рак щитовидной железы, лейкоз, рак предстательной железы, рак молочной железы (например, трижды отрицательный, положительный по ER, отрицательный по ER, устойчивый к химиотерапии, устойчивый к герцептину, положительный по HER2, устойчивый к доксорубину, устойчивый к тамоксифену, карциному протоков, лобулярную карциному, первичную, метастазирующую), рак яичника, рак поджелудочной железы, рак печени (например, печеночноклеточную карциному), рак легкого (например, немелкоклеточную карциному легкого, плоскоклеточную карциному легкого, аденокарциному, крупноклеточную карциному легкого, мелкоклеточную карциному легкого, карциноид, саркому), мультиформную глиобластому, глиому, меланому, рак

предстательной железы, устойчивый к кастрации рак предстательной железы, рак молочной железы, трижды отрицательный рак молочной железы, глиобластома, рак яичника, рак легкого, плоскоклеточную карциному (например, головы, шеи или пищевода), колоректальный рак, лейкоз, острый миелоидный лейкоз, лимфому, В-клеточную лимфому или множественную миелому. Дополнительные примеры включают злокачественную опухоль щитовидной железы, эндокринной системы, головного мозга, молочной железы, шейки матки, ободочной кишки, головы и шеи, пищевода, печени, почки, легкого, мелкоклеточную злокачественную опухоль легкого, меланому, мезотелиому, злокачественную опухоль яичника, саркому, злокачественную опухоль желудка, матку или медуллобластома, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, нейробластома, глиому, мультиформную глиобластома, рак яичника, рабдомиосаркому, первичный тромбоцитоз, первичную макроглобулинемию, первичные опухоли головного мозга, злокачественную опухоль, злокачественную инсулиному поджелудочной железы, злокачественный карциноид, рак мочевого пузыря, предзлокачественные поражения кожи, рак яичка, лимфомы, рак щитовидной железы, нейробластома, рак пищевода, злокачественную опухоль мочевого тракта, злокачественную гиперкальцемию, рак эндометрия, злокачественную опухоль коры надпочечников, неоплазии эндокринной или экзокринной части поджелудочной железы, медуллярный рак щитовидной железы, медуллярная карцинома щитовидной железы, меланомы, колоректальный рак, папиллярный рак щитовидной железы, печеночно-клеточную карциному, болезнь Педжета сосков, филоидные опухоли, лобулярную карциному, карциному протоков, злокачественную опухоль звездчатых клеток поджелудочной железы, злокачественную опухоль звездчатых клеток печени или рак предстательной железы.

Термин "лейкоз" в широком смысле относится к прогрессирующим, злокачественным заболеваниям кроветворных органов и в общем характеризуется нарушенной пролиферацией и развитием лейкоцитов и их предшественников в крови и костном мозге. Лейкоз в общем клинически классифицируют на основании:

- (1) продолжительности и характера заболевания - острого или хронического;
- (2) типа затрагиваемых клеток; миелоидный (миелогенный), лимфоидный (лимфогенный) или моноцитарный; и
- (3) увеличения или отсутствия увеличения аномальных клеток или нелейкемический (сублейкемический).

Иллюстративные лейкозы, которые можно лечить с использованием соединения, фармацевтической композиции или способа, представленных в настоящем описании, включают, например, острый нелейкемический лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый гранулоцитарный лейкоз, хронический гранулоцитарный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз, Т-клеточный лейкоз взрослых, нелейкемический лейкоз, лейкоцитемический лейкоз, базофильный лейкоз, лейкоз бластных клеток, бычий лейкоз, хронический миелоцитарный лейкоз, поражение кожи при лейкозе, эмбриональный лейкоз, эозинофильный лейкоз, лейкоз Гросса, волосатоклеточный лейкоз, гемобластный лейкоз, гемоцитобластный лейкоз, гистиоцитарный лейкоз, лейкоз стволовых клеток, острый моноцитарный лейкоз, лейкопенический лейкоз, лимфолейкоз, лимфобластный лейкоз, лимфоцитарный лейкоз, лимфогенный лейкоз, лимфоидный лейкоз, лейкоз с клетками лимфосаркомы, лейкоз тучных клеток, мегакариоцитарный лейкоз, микромиелобластный лейкоз, моноцитарный лейкоз, миелобластный лейкоз, миелоцитарный лейкоз, миелоидный гранулоцитарный лейкоз, миеломоноцитарный лейкоз, лейкоз Негели, лейкоз плазматических клеток, множественную миелому, плазмацитарный лейкоз, промиелоцитарный лейкоз, лейкоз с клетками Ридера, лейкоз Шиллинга, лейкоз стволовых клеток, сублейкемический лейкоз, или лейкоз с недифференцированными клетками.

Термин "саркома" в общем относится к опухоли, которая состоит из вещества, подобного эмбриональной соединительной ткани, и в общем состоит из расположенных с высокой плотностью клеток, погруженных в волокнистое или гомогенное вещество. Саркомы, которые можно лечить с использованием соединения, фармацевтической композиции или способа, представленных в настоящем описании, включают хондросаркому, фибросаркому, лимфосаркому, меланосаркому, миксосаркому, остеосаркому, саркому Абемети, жировую саркому, липосаркому, альвеолярную саркому мягких тканей, амелобластосаркому, ботриоидную саркому, хлоромасаркому, хориокарциному, эмбриональную саркому, саркому Вильмса, эндометриальную саркому, стромальную саркому, саркому Юинга, фасциальную саркому, фибробластную саркому, гигантоклеточную саркому, гранулоцитарную саркому, саркому Ходжкина, идиопатическую множественную пигментную геморрагическую саркому, иммунобластную саркому В-клеток, лимфому, иммунобластную саркому Т-клеток, саркому Дженсена, саркому Капоши, саркому клеток Купфера, ангиосаркому, лейкосаркому, злокачественную мезенхимальную саркому, паростальную саркому, ретикулоцитарную саркому, саркому Рауса, серокистозную саркому, синовиальную саркому или телангиэктатическую саркому.

Термин "меланомы" принят для обозначения опухоли, возникающей из меланоцитарной системы кожи и других органов. Меланомы, которые можно лечить с использованием соединения, фармацевтической композиции или способа, представленных в настоящем описании, включают, например, акральную лентигозную меланому, амеланотическую меланому, доброкачественную ювенильную меланому, ме-

ланому Клодмана, меланому S91, меланому Хардинга-Пасси, ювенильную меланому, лентигозную злокачественную меланому, злокачественную меланому, узловую меланому, подногтевую меланому или поверхностно распространенную меланому.

Термин "карцинома" относится к злокачественному новому росту эпителиальных клеток, имеющих тенденцию инфильтрировать окружающие ткани и давать начало метастазам. Иллюстративные карциномы, которые можно лечить с использованием соединения, фармацевтической композиции или способа, представленных в настоящем описании, включают, например, медуллярную карциному щитовидной железы, семейную медуллярную карциному щитовидной железы, ацинарную карциному, ацинозную карциному, аденокистообразную карциному, аденоидную кистозную карциному, аденоматозную карциному, карциному коры надпочечников, альвеолярную карциному, альвеолярноклеточную карциному, карциному базальных клеток, базальноклеточную карциному, базалоидную карциному, базально-плоскоклеточную карциному, бронхоальвеолярную карциному, бронхиолярную карциному, бронхогенную карциному, мозговидную карциному, холангиоклеточную карциному, хориокарциному, коллоидную карциному, угревидную карциному, карциному туловища, решетчатовидную карциному, карциному со склероподобным уплотнением, кожную карциному, цилиндрическую карциному, карциному цилиндрических клеток, карциному протоков, твердую карциному, эмбриональную карциному, энцефалоидную карциному, эпидермоидную карциному, эпителиальную аденоидную карциному, экзофитную карциному, карциному из язвы, фиброзную карциному, желатиноподобную карциному, карциному из гигантских клеток, гигантоклеточную карциному, железистую карциному, гранулезоклеточную карциному, карциному матрикса волоса, гематоидную карциному, печеночноклеточную карциному, карциному из клеток Гюртле, гиалиновую карциному, гипернефроидную карциному, эмбриональную карциному новорожденных, карциному *in situ*, интраэпидермальную карциному, интраэпителиальную карциному, карциному Кромпечера, карциному из клеток Кульчицкого, крупноклеточную карциному, лентиккулярную карциному, чечевицеобразную карциному, липоматозную карциному, лобулярную карциному, лимфоэпителиальную карциному, карциному медуллярных клеток, медуллярную карциному, меланотическую карциному, мягкую карциному, муциновую карциному, слизиобразующую карциному, мукоцеллюлярную карциному, мукоэпидермоидную карциному, мукозную карциному, слизистую карциному, миксоматозную карциному, носоглоточную карциному, овсяноклеточную карциному, оссифицирующую карциному, остеоидную карциному, папиллярную карциному, перипортальную карциному, преинвазивную карциному, карциному шиповатых эпидермоцитов, мацерированную карциному, почечно-клеточную карциному почки, резервноклеточную карциному, саркомоподобную карциному, карциному слизистой оболочки носа, скirroзную карциному, карциному мошонки, карциному перстневидных клеток, простую карциному, мелкоклеточную карциному, соланоидную карциному, шаровидноклеточную карциному, веретеноклеточную карциному, губчатую карциному, сквамозную карциному, плоскоклеточную карциному, волокнистую карциному, телангиэктатическую карциному, карциному из гладких мышечных волокон и сосудистой ткани, переходноклеточную карциному, шишковатую карциному, тубулярную карциному, туберозную карциному, веррукозную карциному или ворсинчатую карциному.

Как применяют в настоящем описании, термины "метастаз", "метастазирующий" и "метастазирующая злокачественная опухоль" можно использовать взаимозаменяемо, и они относятся к распространению пролиферативного заболевания или нарушения, например, злокачественной опухоли, от одного органа или другого несмежного органа или части тела. Злокачественная опухоль возникает в исходном участке, например, молочной железе, и этот участок обозначают как первичную опухоль, например, первичный рак молочной железы. Некоторые злокачественные клетки в первичной опухоли или исходном участке приобретают способность проникать и инфильтрировать окружающую нормальную ткань в локальном участке и/или способность проникать в стенки лимфатической системы или сосудистой системы, циркулируя по системе и достигая других участков и тканей организма. Вторую поддающуюся клинической детекции опухоль, образованную из злокачественных клеток первичной опухоли, обозначают как метастазирующую или вторичную опухоль. Когда злокачественные клетки метастазируют, предполагают, что метастазирующая опухоль и ее клетки аналогичны исходной опухоли. Таким образом, если рак легкого метастазирует в молочную железу, вторичная опухоль в участке молочной железы состоит из аномальных легочных клеток, а не из аномальных клеток молочной железы. Вторичную опухоль в молочной железе обозначают как метастазирующий рак легкого. Таким образом, фраза метастазирующая злокачественная опухоль относится к заболеванию, при котором субъект имеет или имел первичную опухоль и имеет одну или несколько вторичных опухолей. Фразы неметастазирующая злокачественная опухоль или субъекты с злокачественной опухолью, которая не является метастазирующей, относятся к заболеваниям, при которых субъекты имеют первичную опухоль, но не имеют ни одной или нескольких вторичных опухолей. Например, метастазирующий рак легкого относится к заболеванию у субъекта с первичной опухолью легкого или с первичной опухолью легкого в анамнезе и с одной или несколькими вторичными опухолями во второй локализации или множестве локализаций, например, в молочной железе.

Термин "ассоциированный" или "ассоциированный с" в контексте вещества или активности или функции вещества, ассоциированных с заболеванием (например, диабетом, злокачественной опухолью

(например, раком предстательной железы, раком почки, метастазирующей злокачественной опухолью, меланомой, устойчивым к кастрации раком предстательной железы, раком молочной железы, трижды отрицательным раком молочной железы, глиобластомой, раком яичника, раком легкого, плоскоклеточной карциномой (например, головы, шеи или пищевода), колоректальным раком, лейкозом, острым миелоидным лейкозом, лимфомой, В-клеточной лимфомой или множественной миеломой), означает, что заболевание (например, рак легкого, рак яичника, остеосаркома, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак печени, рак почки, рак кожи (например, карцинома из клеток Меркеля), рак яичка, лейкоз, лимфома, рак головы и шеи, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, меланома, рак молочной железы, нейробластома) вызвано (полностью или частично), или симптом заболевания вызван (полностью или частично) веществом или активностью или функцией вещества.

Гуманизированные антитела

Гуманизированное антитело представляет собой генетически модифицированное антитело, в котором по меньшей мере одна CDR (или ее функциональный фрагмент) из антитела мыши ("донорного антитела", которое также может происходить из крысы, хомяка или другого не относящегося к человеку вида), привита в человеческое антитело ("акцепторное антитело"). Человеческое антитело представляет собой неприродное (например, не существующее в природе или не продуцированное естественным образом у человека) антитело, которое не вызывает иммунный ответ у человека, не вызывает значительный иммунный ответ у человека, или вызывает иммунный ответ, который меньше иммунного ответа, вызванного у мышей. В некоторых вариантах осуществления, привито более одной CDR мыши (например, привиты все шесть CDR мыши). Последовательность акцепторного антитела может представлять собой, например, последовательность зрелого человеческого антитела (или ее фрагмент), консенсусную последовательность из последовательностей человеческого антитела (или ее фрагмент), или последовательность зародышевой области (или ее фрагмент). Таким образом, гуманизированное антитело может представлять собой антитело, имеющее одну или несколько CDR из донорного антитела и каркас варибельной области (FR). FR может формировать часть константной области и/или варибельной области в человеческом антителе. Кроме того, для сохранения высокой аффинности связывания, аминокислоты в человеческой акцепторной последовательности можно заменять на соответствующие аминокислоты из донорной последовательности, например, где:

(1) аминокислота находится в CDR;

(2) аминокислота находится в человеческой каркасной области (например, аминокислота находится непосредственно по соседству с одной из CDR).

См., патент США № 5530101 и 5585089, содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки, где приведены подробные инструкции для конструирования гуманизированных антител. Хотя гуманизированные антитела часто включают все шесть CDR (например, как определено по Kabat, но часто включая также гиперварибельную петлю H1, как определено по Chothia) из мышиного антитела, их можно также получать с меньшим количеством мышиных CDR и/или с менее, чем полной последовательностью мышиной CDR (например, функциональным фрагментом CDR) (например, Pascalis et al., *J. Immunol.* 169:3076, 2002; Vajdos et al., *Journal of Molecular Biology*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; Tamura et al., *Journal of Immunology*, 164:1432-1441, 2000).

Как правило, гуманизированное антитело, как представлено в настоящем описании, может содержать:

(i) легкую цепь, содержащую по меньшей мере одну CDR (часто три CDR) из мышиного антитела (также обозначенные в настоящем описании как мышиные CDR) и человеческий каркас варибельной области; и

(ii) тяжелую цепь, содержащую по меньшей мере одну CDR (часто три CDR) из мышиного антитела и человеческий каркас варибельной области (FR).

Каждый из каркасов варибельной области легкой и тяжелой цепи (FR) может представлять собой последовательность каркаса варибельной области зрелого человеческого антитела (или ее фрагмент), зародышевую последовательность каркаса варибельной области (в сочетании с J-областью) (или ее фрагмент) или консенсусную последовательность из последовательностей каркаса варибельной области человеческого антитела (или ее фрагмент). В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело содержит легкую цепь, как описано в (i), тяжелую цепь, как описано в (ii), вместе с человеческой константной областью легкой цепи и константной областью тяжелой цепи.

Химерное антитело представляет собой антитело, в котором варибельную область антитела мыши (или другого грызуна) скомбинировано с константной областью человеческого антитела; их конструирование способами генной инженерии хорошо известно. Такие антитела сохраняют специфичность связывания мышиного антитела, в то же время являясь приблизительно на две трети человеческим. Доля не относящихся к человеку последовательностей, присутствующих в мышиных, химерных и гуманизированных антителах, позволяет предполагать, что иммуногенность химерных антител является промежуточной между мышиными и гуманизированными антителами. Другие типы генетически модифицированных антител, которые могут иметь уменьшенную иммуногенность по сравнению с мышиными антителами, включают человеческие антитела, полученные с использованием способов фагового дисплея

(Dower et al., WO 91/17271; McCafferty et al., WO 92/001047; Winter, WO 92/20791 и Winter, FEBS Lett. 23:92, 1998, содержание каждого из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки) или с использованием трансгенных животных (Lonberg et al., WO 93/12227; Kucherlapati WO 91/10741, содержание каждого из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки).

Другие способы разработки гуманизированных антител также можно использовать для достижения тех же результатов, что и со способами из Патентов США № 5530101 и 5585089, описанными выше, например, "супергуманизацию" (см. Tan et al., J. Immunol. 169: 1119, 2002 и Патент США № 6881557) или со способом из Studnicak et al., Protein Eng. 7:805, 1994. Кроме того, другие способы получения генетически модифицированных mAb с уменьшенной иммуногенностью включают "структурную перестройку", "гиперхимеризацию" и облицовку/изменение поверхности, как описано, например, в Vaswami et al., Annals of Allergy, Asthma and Immunology 81:105, 1998; Roguska et al., Protein Eng. 9:895, 1996 и в Патентах США № 6072035 и 5639641.

"Белок CD73" или "антиген CD73", как обозначено в настоящем описании, включает любую из рекомбинантных или природных форм кластера дифференцировки 73 (CD73), известного также как 5'-нуклеотидаза (5'-NT) или экто-5'-нуклеотидаза, или ее варианты или гомологи, сохраняющие нуклеотидазную активность CD73 (например, в пределах по меньшей мере 50, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% активности по сравнению с CD73). В некоторых аспектах варианты или гомологи имеют по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности аминокислотной последовательности на протяжении полной последовательности или части последовательности (например, части из 50, 100, 150 или 200 непрерывных аминокислот) по сравнению с природным белком CD73. В некоторых вариантах осуществления, белок CD73 является в основном идентичным белку, идентифицированному под номером ссылки в UniProt 21589, или варианту или гомологу, имеющему значительную идентичность с ним. В некоторых вариантах осуществления, белок CD73 является в основном идентичным белку, идентифицированному под номером ссылки в UniProt Q61503 или варианту или гомологу, имеющему значительную идентичность с ним.

Гуманизированные антитела 1E9

Настоящее изобретение относится, среди прочего, к гуманизированным антителам 1E9, содержащим вариабельную область гуманизированной легкой цепи и вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи. Гуманизированные антитела 1E9, как представлено в настоящем описании, являются способными связывать белок CD73 и содержат по меньшей мере одну CDR или ее функциональный фрагмент из мышинового моноклонального антитела 1E9 (Thomson LF et al., Tissue Antigens 2008, Volume 35, Issue 1: Production and characterization of monoclonal antibodies to the glycosyl phosphatidylinositol-anchored lymphocyte differentiation antigen ecto-5'-nucleotidase (CD73)).

Функциональный фрагмент CDR представляет собой часть полной аминокислотной последовательности CDR, который является способным связываться с антигеном (например, CD73). Таким образом, функциональный фрагмент CDR, как правило, включает аминокислотные остатки, необходимые для связывания CDR с антигеном (например, CD73). "Мышинная CDR" представляет собой полную аминокислотную последовательность CDR или ее функциональный фрагмент, происходящие из мышинового антитела, способного связывать CD73. Таким образом, функциональный фрагмент мышинной CDR, как правило, включает аминокислотные остатки, необходимые для связывания CDR с CD73. Когда гуманизованное антитело 1E9 включает по меньшей мере одну мышиную CDR, по меньшей мере одна мышинная CDR или ее функциональный фрагмент происходит из донорного антитела. В некоторых вариантах осуществления донорное антитело представляет собой мышинное антитело 1E9. Специалисту в данной области сразу понятно, что гуманизованное антитело 1E9, содержащее по меньшей мере одну мышиную CDR, представляет собой гуманизованное антитело по меньшей мере с одной мышинной CDR, происходящей из донорного антитела 1E9 и дополнительными CDR, происходящими из акцепторного антитела (например, где легкая цепь включает всего три CDR, и тяжелая цепь включает всего три CDR).

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область гуманизированной легкой цепи и вариабельная область гуманизированной тяжелой цепи включают в совокупности одну мышиную CDR или функциональный фрагмент мышинной CDR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления вариабельная область гуманизированной легкой цепи и вариабельная область гуманизированной тяжелой цепи включают в совокупности шесть CDR, где по меньшей мере одна из шести CDR представляет собой мышиную CDR. Когда вариабельная область гуманизированной легкой цепи и вариабельная область гуманизированной тяжелой цепи включают в совокупности одну мышиную CDR, вариабельная область гуманизированной легкой цепи или вариабельная область гуманизированной тяжелой цепи содержит одну мышиную CDR. Например, гуманизованное антитело может включать CDR L3, происходящую из донорного антитела (например, мышинового, также обозначенную в настоящем описании как CDR L3 мыши) и CDR L1, CDR L2, CDR H1, CDR H2 и CDR H3, происходящие из акцепторного антитела (т.е. человеческого).

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область гуманизированной легкой цепи и вариабельная область гуманизированной тяжелой цепи включают в совокупности две мышинные CDR. Когда вариабельная область гуманизированной легкой цепи и вариабельная область гуманизированной тя-

желой цепи включают в совокупности две мышинные CDR, каждая из вариательной области гуманизированной легкой цепи и вариательной области гуманизированной тяжелой цепи содержит одну мышиную CDR (i), вариательная область гуманизированной легкой цепи содержит две мышинные CDR (ii), или вариательная область гуманизированной тяжелой цепи содержит две мышинные CDR (iii). Например, гуманизированное антитело может включать CDR L3 и CDR H3, происходящие из донорного антитела (также обозначенные в настоящем описании как CDR L3 мыши и CDR H3 мыши, соответственно), и CDR L1, CDR L2, CDR H1 и CDR H2, происходящие из акцепторного антитела (т.е. человеческого).

В некоторых вариантах осуществления вариательная область гуманизированной легкой цепи и вариательная область гуманизированной тяжелой цепи включают в совокупности три мышинные CDR. Когда вариательная область гуманизированной легкой цепи и вариательная область гуманизированной тяжелой цепи включают в совокупности три мышинные CDR, вариательная область гуманизированной легкой цепи может содержать одну мышиную CDR, и вариательная область гуманизированной тяжелой цепи может содержать две мышинные CDR (i), вариательная область гуманизированной легкой цепи содержит две мышинные CDR, и вариательная область гуманизированной тяжелой цепи содержит одну мышиную CDR (ii), вариательная область гуманизированной легкой цепи содержит три мышинные CDR (iii), или вариательная область гуманизированной тяжелой цепи содержит три мышинные CDR (iv). Например, гуманизированное антитело может включать CDR L3, CDR H3 и CDR L2, происходящие из донорного антитела (например, мышинового, также обозначенные в настоящем описании как CDR L3, CDR H3 мыши и CDR L2 мыши, соответственно) и CDR L1, CDR H1 и CDR H2, происходящие из акцепторного антитела (т.е. человеческого).

В некоторых вариантах осуществления вариательная область гуманизированной легкой цепи и вариательная область гуманизированной тяжелой цепи включают в совокупности четыре мышинные CDR. Когда вариательная область гуманизированной легкой цепи и вариательная область гуманизированной тяжелой цепи включают в совокупности четыре мышинные CDR, вариательная область гуманизированной легкой цепи содержит одну мышиную CDR, и вариательная область гуманизированной тяжелой цепи содержит три мышинные CDR (i), вариательная область гуманизированной легкой цепи содержит три мышинные CDR, и вариательная область гуманизированной тяжелой цепи содержит одну мышиную CDR (ii), или вариательная область гуманизированной легкой цепи содержит две мышинные CDR и вариательная область гуманизированной тяжелой цепи содержит две мышинные CDR (iii). Например, гуманизированное антитело может включать CDR L3, CDR H3, CDR L2 и CDR L1, происходящие из донорного антитела (например, мышинового, также обозначенные в настоящем описании как CDR L3 мыши, CDR H3 мыши, CDR L2 мыши и CDR L1 мыши соответственно) и CDR H1 и CDR H2, происходящие из акцепторного антитела (т.е. человеческого).

В некоторых вариантах осуществления каждая из вариательной области гуманизированной легкой цепи и вариательной области гуманизированной тяжелой цепи включает по меньшей мере одну мышиную CDR. Когда каждая из вариательной области гуманизированной легкой цепи и вариательной области гуманизированной тяжелой цепи включает по меньшей мере одну мышиную CDR, вариательная область гуманизированной легкой цепи содержит по меньшей мере одну мышиную CDR и вариательная область гуманизированной тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну мышиную CDR. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления вариательная область гуманизированной легкой цепи содержит CDR L1 мыши, и гуманизированная тяжелая цепь содержит CDR H1 мыши. В некоторых вариантах осуществления CDR L1 мыши включает аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 1 и CDR H1 мыши включает аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления CDR L1 мыши представляет собой аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 1 и CDR H1 мыши представляет собой аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления вариательная область гуманизированной легкой цепи содержит CDR L2 мыши и вариательная область гуманизированной тяжелой цепи содержит CDR H2 мыши. В некоторых вариантах осуществления CDR L2 мыши включает аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 2 и CDR H2 мыши включает аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления CDR L2 мыши представляет собой аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 2 и CDR H2 мыши представляет собой аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления вариательная область гуманизированной легкой цепи содержит CDR L3 мыши и вариательная область гуманизированной тяжелой цепи содержит CDR H3 мыши. В некоторых вариантах осуществления CDR L3 мыши включает аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 3 и CDR H3 мыши включает аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления CDR L3 представляет собой аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 3 и CDR H3 мыши представляет собой аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления присутствие CDR L3 мыши и CDR H3 мыши может являться достаточным для связывания гуманизированного антитела с CD73. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело не включает CDR L1 мыши, CDR L2 мыши, CDR H1 или CDR H2 мыши. Когда гуманизированное антитело не включает CDR L1 мыши, CDR L2 мыши, CDR H1 мыши или CDR H2 мыши, гуманизированное антитело включает CDR L1, CDR L2, CDR H1 или CDR

H2, происходящие из акцепторного антитела (т.е. человеческого). Таким образом, гуманизированное антитело, которое не включает CDR L1 мыши, CDR L2 мыши, CDR H1 мыши или CDR H2 мыши, не включает CDR L1, CDR L2, CDR H1 или CDR H2 из донорного антитела (например, мыши, крысы, кролика), но включает CDR L1, CDR L2, CDR H1 или CDR H2 из акцепторного антитела (т.е. человека). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления варибельная область гуманизированной легкой цепи не включает CDR L1 мыши или CDR L2 мыши, и варибельная область гуманизированной тяжелой цепи не включает CDR H1 мыши или CDR H2 мыши. В некоторых вариантах осуществления варибельная область гуманизированной легкой цепи не включает CDR L1 мыши и CDR L2 мыши и варибельная область гуманизированной тяжелой цепи не включает CDR H1 мыши и CDR H2 мыши.

В некоторых вариантах осуществления варибельная область гуманизированной легкой цепи содержит CDR L2 мыши и CDR L3 мыши и варибельная область гуманизированной тяжелой цепи содержит CDR H2 мыши и CDR H3 мыши. В некоторых вариантах осуществления варибельная область гуманизированной легкой цепи содержит CDR L1 мыши, CDR L2 мыши и CDR L3 мыши и варибельная область гуманизированной тяжелой цепи содержит CDR H1 мыши, CDR H2 мыши и CDR H3 мыши. В некоторых вариантах осуществления варибельная область гуманизированной легкой цепи содержит CDR L1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 1, CDR L2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 2, и CDR L3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 3, и варибельная область гуманизированной тяжелой цепи содержит CDR H1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 4, CDR H2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 5, и CDR H3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 6.

Положение CDR и FR можно определять по системе нумерации Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)). Подобным образом, положения, занятые индивидуальными остатками в легкой или тяжелой цепи антитела, можно определять по системе нумерации Kabat. Таким образом, локализацию остатков, необходимых для связывания, в гуманизированной легкой цепи и в гуманизированной тяжелой цепи гуманизированного антитела можно определять по положению остатка в соответствии с системой нумерации Kabat, как хорошо известно в данной области. Как описано выше, гуманизированное антитело может представлять собой антитело, имеющее CDR из донорного антитела (например, мышиного) и каркас варибельной области (FR) из человеческого антитела. Считают, что каркасные области (FR) удерживают CDR на месте в гуманизированном антителе. Начиная с аминоконца, эти области обозначены FR L1, FR L2, FR L3 и FR L4 для легкой цепи и FR H1, FR H2, FR H3 и FR H4, для тяжелой цепи, соответственно. Парадоксально, настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам, включающим один или несколько остатков внутри каркасных областей, которые являются важными для связывания гуманизированного антитела с эпитопом. Остаток каркасной области, вовлеченный в связывание (или важный для связывания) эпитопа (например, связывание CD73) обозначен в настоящем описании как связывающий остаток каркасной области. Связывающие остатки каркасной области могут находиться в каркасной области варибельной области гуманизированной легкой цепи (т.е. FR L1, FR L2, FR L3, FR L4) или они могут находиться в каркасной области варибельной области гуманизированной тяжелой цепи (т.е. FR H1, FR H2, FR H3, FR H4). Связывающий остаток каркасной области, находящийся в области FR L3 гуманизированной легкой цепи, обозначен в настоящем описании как связывающий остаток каркасной области FR L3. Таким образом, связывающий остаток каркасной области, находящийся в области FR H3 гуманизированной тяжелой цепи, обозначен в настоящем описании как связывающий остаток каркасной области FR H3.

В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело содержит по меньшей мере один связывающий остаток каркасной области. В некоторых вариантах осуществления, варибельная область гуманизированной легкой цепи содержит по меньшей мере один связывающий остаток каркасной области. В некоторых вариантах осуществления варибельная область гуманизированной легкой цепи содержит один или несколько связывающих остатков каркасной области FR L1, FR L2, FR L3 или FR L4. В некоторых вариантах осуществления варибельная область гуманизированной легкой цепи содержит один или несколько связывающих остатков каркасной области FR L1. В некоторых вариантах осуществления варибельная область гуманизированной легкой цепи содержит один или несколько связывающих остатков каркасной области FR L2. В некоторых вариантах осуществления варибельная область гуманизированной легкой цепи содержит один или несколько связывающих остатков каркасной области FR L3. В некоторых вариантах осуществления варибельная область гуманизированной легкой цепи содержит один или несколько связывающих остатков каркасной области FR L4. В некоторых вариантах осуществления варибельная область гуманизированной тяжелой цепи содержит один или несколько связывающих остатков каркасной области FR H1, FR H2, FR H3 или FR H4. В некоторых вариантах осуществления варибельная область гуманизированной тяжелой цепи содержит один или несколько связывающих остатков каркасной области FR H1. В некоторых вариантах осуществления варибельная область гуманизированной тяжелой цепи содержит один или несколько связывающих остатков каркасной области FR H2. В некоторых вариантах осуществления варибельная область гуманизированной тяжелой цепи содержит один или несколько связывающих остатков каркасной области FR H3. В некоторых вариантах осуществления варибельная область гуманизированной тяжелой цепи содержит

один или несколько связывающих остатков каркасной области FR H4.

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область гуманизированной легкой цепи содержит по меньшей мере один связывающий остаток каркасной области (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 или более остатков), и вариабельная область гуманизированной тяжелой цепи содержит по меньшей мере один связывающий остаток каркасной области (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 или более остатков). Положение связывающего остатка каркасной области в гуманизованном антителе можно определять по системе нумерации Kabat, подобно положениям остатков CDR.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к гуманизованному антителу 1E9, содержащему вариабельную область гуманизированной легкой цепи, включая CDR L1 мыши, CDR L2 мыши или CDR L3 мыши, и вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи, включая CDR H1 мыши, CDR H2 мыши или CDR H3 мыши. Вариабельная область гуманизированной легкой цепи может включать CDR L1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 1, CDR L2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 2, или CDR L3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 3. Вариабельная область гуманизированной легкой цепи может включать CDR L1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 1, CDR L2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 2, и CDR L3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 3. Вариабельная область гуманизированной тяжелой цепи может включать CDR H1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 4, CDR H2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 5, или CDR H3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 6. Вариабельная область гуманизированной тяжелой цепи может включать CDR H1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 4, CDR H2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 5, и CDR H3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область гуманизированной легкой цепи содержит CDR L1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область гуманизированной легкой цепи содержит CDR L2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область гуманизированной легкой цепи содержит CDR L3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область гуманизированной тяжелой цепи содержит CDR H1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область гуманизированной тяжелой цепи содержит CDR H2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область гуманизированной легкой цепи содержит CDR H3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 6. В дополнительных вариантах осуществления вариабельная область гуманизированной легкой цепи содержит по меньшей мере один связывающий остаток каркасной области. В других дополнительных вариантах осуществления вариабельная область гуманизированной тяжелой цепи содержит по меньшей мере один связывающий остаток каркасной области.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к гуманизованному антителу 1E9. Антитело 1E9 включает вариабельную область гуманизированной легкой цепи и вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи. Вариабельная область гуманизированной легкой цепи содержит:

(i) CDR L1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 1, CDR L2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 2, CDR L3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 3, и

(ii) валин в положении, соответствующем положению 2 по Kabat, метионин в положении, соответствующем положению 4 по Kabat, аспарагиновую кислоту или лейцин в положении, соответствующем положению 9 по Kabat, пролин или серин в положении, соответствующем положению 12 по Kabat, лизин или пролин в положении, соответствующем положению 18 по Kabat, аланин в положении, соответствующем положению 43 по Kabat, пролин или серин в положении, соответствующем положению 60 по Kabat, треонин в положении, соответствующем положению 74 по Kabat, аспарагин или серин в положении, соответствующем положению 76 по Kabat, аспарагин или серин в положении, соответствующем положению 77 по Kabat, изолейцин или лейцин в положении, соответствующем положению 78 по Kabat, серин или аланин в положении, соответствующем положению 80 по Kabat, глутамин в положении, соответствующем положению 100 по Kabat, валин в положении, соответствующем положению 104 по Kabat, глутаминовую кислоту или аланин в положении, соответствующем положению 1 по Kabat, глутамин в положении, соответствующем положению 3 по Kabat, фенилаланин или треонин в положении, соответствующем положению 10 по Kabat, глутамин в положении, соответствующем положению 11 по Kabat, аланин или лейцин в положении, соответствующем положению 13 по Kabat, треонин в положении, соответствующем положению 14 по Kabat, валин или пролин в положении, соответствующем положению 15 по Kabat, лизин в положении, соответствующем положению 16 по Kabat, глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту в положении, соответствующем положению 17 по Kabat, треонин в положении, соответствующем положению 22 по Kabat, лизин в положении, соответствующем положению 42 по Kabat, аргинин в положении, соответствующем положению 45 по Kabat, изолейцин в положении, соответствующем положению 58 по Kabat, тирозин в положении, соответствующем положению 67 по Kabat, фенилаланин в положении, соответствующем положению 73 по Kabat, тирозин в положении, соответствующем положению 85 по Kabat, или фенилаланин в положении, соответствующем положению 87 по Kabat.

Кроме того, настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам 1E9, способным связывать CD73 и включающим переменную область гуманизированной легкой цепи и переменную область гуманизированной тяжелой цепи, включая последовательность из SEQ ID NO: 7. Таким образом, другой аспект относится к гуманизированному антителу 1E9, включающему переменную область гуманизированной легкой цепи и переменную область гуманизированной тяжелой цепи, где переменная область гуманизированной тяжелой цепи содержит последовательность из SEQ ID NO: 7.

Гуманизированные антитела 1E9, как представлено в настоящем описании, могут представлять собой фрагменты Fab'. Когда гуманизированные антитела 1E9 представляют собой фрагменты Fab', гуманизированные антитела 1E9 включают гуманизированную тяжелую цепь (например, включающую константную и переменную область) и гуманизированную легкую цепь (например, включающую константную и переменную область). В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело 1E9 представляет собой фрагмент Fab'. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело 1E9 включает человеческую константную область. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело 1E9 представляет собой IgG. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело 1E9 представляет собой IgG1. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело 1E9 представляет собой IgG4. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело 1E9 представляет собой IgA. В других вариантах осуществления гуманизированное антитело представляет собой IgM.

В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело 1E9 представляет собой одноцепочечное антитело. Одноцепочечное антитело включает переменную легкую цепь и переменную тяжелую цепь. Специалисту в данной области сразу понятно, что одноцепочечное антитело включает одну легкую цепь и одну тяжелую цепь, в отличие от иммуноглобулинового антитела, включающего две идентичных пары полипептидных цепей, где каждая пара имеет одну легкую цепь и одну тяжелую цепь. Каждая легкая цепь и тяжелая цепь, в свою очередь, состоит из двух областей: переменной ("V") области (т.е. переменной легкой цепи и переменной тяжелой цепи), вовлеченных в связывание антигенами, и константной ("C") области, взаимодействующей с другими компонентами иммунной системы. Переменная легкая цепь и переменная тяжелая цепь в одноцепочечном антителе могут быть связаны через линкерный пептид. Примеры линкерных пептидов из одноцепочечных антител описаны в Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S. M., Lee, T., Pope, S. H., Riordan, G. S. и Whitlow, M. (1988). Описаны способы получения антител scFv. См., Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989); Ward et al., Nature 341:544-546 (1989); и Vaughan et al., Nature Biotech. 14:309-314 (1996). Кратко, выделяют мРНК из В-клеток от иммунизированного животного и получают кДНК. кДНК амплифицируют с использованием праймеров, специфических для переменных областей тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов. Продукты ПЦР очищают, и последовательности нуклеиновой кислоты соединяют. Если линкерный пептид является желатиновым, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие пептид, вставляют между последовательностями нуклеиновой кислоты для тяжелой и легкой цепи. Нуклеиновую кислоту, кодирующую scFv, вставляют в вектор и экспрессируют в подходящей клетке-хозяине.

Способность антитела связывать специфический эпитоп (например, CD73) можно описывать посредством равновесной константы диссоциации (K_D). Равновесная константа диссоциации (K_D), как определено в настоящем описании, представляет собой отношение скорости диссоциации (K_{off}) и скорости связывания (K_{on}) гуманизированного антитела 1E9 с белком CD73. Ее описывают следующей формулой:

$$K_D = K_{off} / K_{on}$$

В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело является способным связывать антиген CD73 с равновесной константой диссоциации (K_D) от приблизительно 0,5 до приблизительно 25 нМ. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело является способным связывать антиген CD73 с равновесной константой диссоциации (K_D) от приблизительно 1 до приблизительно 25 нМ. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело является способным связывать антиген CD73 с равновесной константой диссоциации (K_D) от приблизительно 1,5 до приблизительно 25 нМ. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело является способным связывать антиген CD73 с равновесной константой диссоциации (K_D) от приблизительно 2 до приблизительно 25 нМ. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело является способным связывать антиген CD73 с равновесной константой диссоциации (K_D) от приблизительно 2,5 до приблизительно 25 нМ. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело является способным связывать антиген CD73 с равновесной константой диссоциации (K_D) от приблизительно 3 до приблизительно 25 нМ. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело является способным связывать антиген CD73 с равновесной константой диссоциации (K_D) от приблизительно 3,5 до приблизительно 25 нМ. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело является способным связывать антиген CD73 с равновесной константой диссоциации (K_D) от приблизительно 4 до приблизительно 25 нМ. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело является способным связывать антиген CD73 с равновесной константой диссоциации (K_D) в этом абзаце при pH ниже 7,5. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело является способным связывать антиген CD73 с

вариабельная область гуманизированной тяжелой цепи содержит глутамин в положении, соответствующем положению 1 по Kabat, серин в положении, соответствующем положению 17 по Kabat, метионин или валин в положении, соответствующем положению 20 по Kabat, аланин в положении, соответствующем положению 24 по Kabat, валин в положении, соответствующем положению 37 по Kabat, аргинин или аланин в положении, соответствующем положению 40 по Kabat, пролин в положении, соответствующем положению 41 по Kabat, глутамин в положении, соответствующем положению 43 по Kabat, глицин в положении, соответствующем положению 44 по Kabat, треонин в положении, соответствующем положению 70 по Kabat, треонин в положении, соответствующем положению 75 по Kabat, метионин в положении, соответствующем положению 80 по Kabat, треонин или аргинин в положении, соответствующем положению 83 по Kabat, серин в положении, соответствующем положению 84 по Kabat, глутаминовую кислоту в положении, соответствующем положению 85 по Kabat, или валин в положении, соответствующем положению 89 по Kabat.

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область гуманизированной легкой цепи содержит изолейцин в положении, соответствующем положению 2 по Kabat, лейцин в положении, соответствующем положению 4 по Kabat, серин или треонин в положении, соответствующем положению 10 по Kabat, лейцин в положении, соответствующем положению 11 по Kabat, треонин в положении, соответствующем положению 20 по Kabat или глутамин в положении, соответствующем положению 42 по Kabat; и вариабельная область гуманизированной тяжелой цепи содержит глутамин в положении, соответствующем положению 1 по Kabat, серин в положении, соответствующем положению 17 по Kabat, метионин или валин в положении, соответствующем положению 20 по Kabat, аланин в положении, соответствующем положению 24 по Kabat, валин в положении, соответствующем положению 37 по Kabat, аргинин или аланин в положении, соответствующем положению 40 по Kabat, пролин в положении, соответствующем положению 41 по Kabat, глутамин в положении, соответствующем положению 43 по Kabat, глицин в положении, соответствующем положению 44 по Kabat, треонин в положении, соответствующем положению 70 по Kabat, треонин в положении, соответствующем положению 75 по Kabat, метионин в положении, соответствующем положению 80 по Kabat, треонин или аргинин в положении, соответствующем положению 83 по Kabat, серин в положении, соответствующем положению 84 по Kabat, глутаминовую кислоту в положении, соответствующем положению 85 по Kabat, и валин в положении, соответствующем положению 89 по Kabat.

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область гуманизированной легкой цепи содержит серин или аланин в положении, соответствующем положению 9 по Kabat, серин в положении, соответствующем положению 14 по Kabat, глицин в положении, соответствующем положению 16 по Kabat и аргинин в положении, соответствующем положению 18 по Kabat; и вариабельная область гуманизированной тяжелой цепи содержит валин или глутаминовую кислоту в положении, соответствующем положению 12 по Kabat.

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область гуманизированной легкой цепи содержит серин или аланин в положении, соответствующем положению 9 по Kabat, серин в положении, соответствующем положению 14 по Kabat, глицин в положении, соответствующем положению 16 по Kabat, или аргинин в положении, соответствующем положению 18 по Kabat; и вариабельная область гуманизированной тяжелой цепи содержит валин или глутаминовую кислоту в положении, соответствующем положению 12 по Kabat.

В некоторых вариантах осуществления pH составляет от приблизительно 6,0 до приблизительно 7,0. В некоторых вариантах осуществления pH составляет приблизительно 6,7. В некоторых вариантах осуществления pH составляет приблизительно 6,3. В некоторых вариантах осуществления антитело ингибирует каталитическую активность указанного антигена CD73. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область гуманизированной легкой цепи, включая последовательность из SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи, включая последовательность из SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления антиген CD73 формирует часть клетки. В некоторых вариантах осуществления антиген CD73 является связанным с твердой подложкой.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу против CD73. Антитело против CD73 связывает тот же самый эпитоп, что и антитело 1E9, где антитело 1E9 содержит вариабельную область гуманизированной легкой цепи, включая CDR L1 мыши, CDR L2 мыши или CDR L3 мыши, и вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи, включая CDR H1 мыши, CDR H2 мыши или CDR H3 мыши.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу против CD73. Антитело против CD73 связывает тот же самый эпитоп, что и антитело 1E9, где антитело 1E9 включает вариабельную область гуманизированной легкой цепи и вариабельную область гуманизированной тяжелой цепи. Вариабельная область гуманизированной легкой цепи содержит:

(i) CDR L1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 1, CDR L2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 2, CDR L3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 3, и

(ii) валин в положении, соответствующем положению 2 по Kabat, метионин в положении, соответ-

соответствующем положении 73 по Kabat, треонин в положении, соответствующем положению 75 по Kabat, глутаминовую кислоту в положении, соответствующем положению 81 по Kabat, аргинин в положении, соответствующем положению 83 по Kabat, треонин в положении, соответствующем положению 87 по Kabat, или валин в положении, соответствующем положению 89 по Kabat.

В некоторых вариантах осуществления варибельная область гуманизированной тяжелой цепи содержит валин в положении, соответствующем положению 5 по Kabat, серин в положении, соответствующем положению 7 по Kabat, валин в положении, соответствующем положению 11 по Kabat, глутаминовую кислоту в положении, соответствующем положению 12 по Kabat, валин в положении, соответствующем положению 20 по Kabat, аргинин в положении, соответствующем положению 38 по Kabat, аланин в положении, соответствующем положению 40 по Kabat, метионин в положении, соответствующем положению 48 по Kabat, аргинин в положении, соответствующем положению 66 по Kabat, валин в положении, соответствующем положению 67 по Kabat, изолейцин в положении, соответствующем положению 69 по Kabat, аланин в положении, соответствующем положению 71 по Kabat, лизин в положении, соответствующем положению 73 по Kabat, треонин в положении, соответствующем положению 75 по Kabat, глутаминовую кислоту в положении, соответствующем положению 81 по Kabat, аргинин в положении, соответствующем положению 83 по Kabat, треонин в положении, соответствующем положению 87 по Kabat, и валин в положении, соответствующем положению 89 по Kabat.

В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело IgG1 дополнительно содержит глутамин в положении, соответствующем положению 297 по Kabat. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело IgG1, представленное в настоящем описании, включая варианты его осуществления, является связанным с антигеном CD73. В некоторых вариантах осуществления антиген CD73 формирует часть клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой злокачественную клетку.

Композиции нуклеиновой кислоты

В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей гуманизированное антитело 1E9, представленное в настоящем описании, включая варианты его осуществления. Гуманизированное антитело 1E9, кодируемое выделенной нуклеиновой кислотой, подробно описано на протяжении этого описания (включая описание выше и раздел примеры). Таким образом, гуманизированное антитело, кодируемое выделенной нуклеиновой кислотой, включает все из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании. Например, нуклеиновая кислота может кодировать по меньшей мере одну CDR, специфические остатки, вовлеченные в связывание эпитопа, или связывающие остатки каркасной области. Например, нуклеиновая кислота может кодировать гуманизированную легкую цепь, включая валин в положении, соответствующем положению 2 по Kabat.

В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность из SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность из SEQ ID NO: 8 и последовательность из SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность из SEQ ID NO: 9 и последовательность из SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность из SEQ ID NO: 10 и последовательность из SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность из SEQ ID NO: 11 и последовательность из SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность из SEQ ID NO: 12 и последовательность из SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность из SEQ ID NO: 13 и последовательность из SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность из SEQ ID NO: 14 и последовательность из SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность из SEQ ID NO: 15 и последовательность из SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность из SEQ ID NO: 16 и последовательность из SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит последовательность из SEQ ID NO: 17 и последовательность из SEQ ID NO: 27.

В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота включает оптимизированную по кодонному составу последовательность. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота включает SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота включает SEQ ID NO: 52. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота включает SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота представляет собой SEQ ID NO: 52 или SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота представляет собой SEQ ID NO: 52. В некоторых вари-

антах осуществления выделенная нуклеиновая кислота представляет собой SEQ ID NO: 54.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей гуманизованное антитело IgG1, представленное в настоящем описании, включая варианты осуществления. Гуманизованное антитело IgG1, кодируемое выделенной нуклеиновой кислотой, подробно описано на протяжении этого описания (включая описание выше и раздел примеры). Таким образом, гуманизованное антитело, кодируемое выделенной нуклеиновой кислотой, включает все из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании. Например, нуклеиновая кислота может кодировать по меньшей мере одну CDR, специфические остатки, вовлеченные в связывание эпитопа, или связывающие остатки каркасной области. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, нуклеиновая кислота кодирует CDR L1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 1, CDR L2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 2, CDR L3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует CDR H1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 4, CDR H2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 5, и CDR H3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует CDR L1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 1, CDR L2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 2, CDR L3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 3, CDR H1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 4, CDR H2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 5, или CDR H3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует CDR L1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 1, CDR L2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 2, CDR L3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 3, CDR H1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 4, CDR H2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 5, и CDR H3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 6.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей гуманизованное антитело IgG4, представленное в настоящем описании, включая варианты осуществления. Гуманизованное антитело IgG4, кодируемое выделенной нуклеиновой кислотой, подробно описано на протяжении этого описания (включая описание выше и раздел примеры). Таким образом, гуманизованное антитело, кодируемое выделенной нуклеиновой кислотой, включает все из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании. Например, нуклеиновая кислота может кодировать по меньшей мере одну CDR, специфические остатки, вовлеченные в связывание эпитопа, или связывающие остатки каркасной области. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует CDR L1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 1, CDR L2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 2, CDR L3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует CDR H1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 4, CDR H2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 5, и CDR H3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует CDR L1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 1, CDR L2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 2, CDR L3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 3, CDR H1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 4, CDR H2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 5, или CDR H3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует CDR L1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 1, CDR L2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 2, CDR L3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 3, CDR H1 мыши, как указано в SEQ ID NO: 4, CDR H2 мыши, как указано в SEQ ID NO: 5, и CDR H3 мыши, как указано в SEQ ID NO: 6.

Фармацевтические композиции

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество гуманизованного антитела 1E9, представленного в настоящем описании, включая варианты его осуществления, и фармацевтически приемлемый наполнитель.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество гуманизованного антитела IgG1, представленного в настоящем описании, включая варианты его осуществления, и фармацевтически приемлемый наполнитель.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество гуманизованного антитела IgG4, представленного в настоящем описании, включая варианты его осуществления, и фармацевтически приемлемый наполнитель.

Терапевтически эффективное количество, как представлено в настоящем описании, относится к количеству, эффективному для достижения намеченной для него цели. Фактическое количество, эффективное для конкретного применения, может зависеть, среди прочего, от состояния, подвергаемого лечению. При введении в способах лечения заболевания фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, могут содержать количество активного гуманизованного антитела, эффективного для достижения желательного результата, например, модуляции активности молекулы-мишени (например, CD73), и/или уменьшения, исключения или задержки симптомов прогрессирования заболевания (например, злокачественной опухоли). Определение терапевтически эффективного количества гуманизованного антитела, представленного в настоящем описании, полностью находится в компетенции специалистов в данной области, особенно в свете подробного описания в настоящей заявке.

Приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях и включают буферы, такие как фосфат, цитрат или ацетат, при pH, как правило, 5,0-8,0, наиболее часто 6,0-7,0; соли, такие как хлорид натрия, хлорид калия и т.д., для получения изотоничности; антиоксиданты, консерванты, низкомолекулярные полипептиды, белки, гидро-

фильные полимеры, такие как полисорбат 80, аминокислоты, такие как глицин, углеводы, хелатирующие агенты, сахара и другие стандартные ингредиенты, известные специалистам в данной области (Remington's Pharmaceutical Science 16th edition, Osol, A. Ed. 1980). mAb, как правило, присутствуют в концентрации 0,1-100 мг/мл, например, 1-10 мг/мл или 10-50 мг/мл, например, 5, 10, 20, 30, 40, 50 или 60 мг/мл.

Фармацевтическую композицию, содержащую гуманизованное антитело, как описано в настоящем описании, можно вводить множеством способов, известных в данной области. Путь и/или способ введения меняют в зависимости от желательных результатов. В некоторых вариантах осуществления введение представляет собой внутривенное, внутримышечное, внутривнутрибрюшинное или подкожное введение, или введение поблизости от участка-мишени. Фармацевтически приемлемые наполнители могут являться пригодными для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидурального введения (например, посредством инъекции или инфузии).

Фармацевтические композиции гуманизованного антитела можно получать в соответствии со способами, хорошо известными и общепринятыми в данной области (См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000; и Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978). Фармацевтические композиции предпочтительно изготавливают в условиях GMP. Как правило, терапевтически эффективную дозу или эффективную дозу гуманизованного антитела используют в фармацевтических композициях по изобретению. Представленные гуманизованные антитела можно составлять в фармацевтически приемлемые лекарственные формы посредством общепринятых способов, известных специалистам в данной области. Режимы дозирования корректируют для обеспечения оптимального желательного ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить однократный болюс, можно вводить несколько дробных доз с течением времени, или дозу можно пропорционально увеличивать или уменьшать, как показано по требованиям терапевтической ситуации. Может обеспечивать преимущества получения составов гуманизованных антител в комбинации с другими лекарственными средствами или агентами. Может обеспечивать преимущества получения составов парентеральных композиций в единичных дозированных формах для простоты введения и равномерности дозирования. Единичная дозированная форма, как применяют в настоящем описании, относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве единичных доз для субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит предопределенное количество гуманизованного антитела, рассчитанное для оказания желательного терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим наполнителем.

Фактические уровни доз активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению можно менять так, чтобы получать количество активного ингредиента, которое является эффективным для достижения желательного терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, не являясь токсичным для пациента. Выбранный уровень дозы зависит от множества фармакокинетических факторов, включая активность конкретных композиций, используемых по настоящему изобретению, способ введения, время введения, скорость выведения конкретного используемого антитела, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраст, пол, массу, состояние, общее состояние здоровья и предшествующий анамнез пациента, подвергаемого лечению, и подобных факторов.

Терапевт или ветеринар может начинать дозирование гуманизованных антител по изобретению, используемых в фармацевтической композиции, на уровнях ниже необходимых для достижения желательного терапевтического эффекта, и постепенно повышать дозу, пока не будет достигнут желательный эффект. Как правило, эффективные дозы композиций по настоящему изобретению меняются в зависимости от множества различных факторов, включая конкретное заболевание или состояние, подлежащее лечению, способы введения, участок-мишень, физиологическое состояние пациента, то, является ли пациент человеком или животным, других вводимых лекарственных средств, и то, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Дозы для лечения необходимо титровать для оптимизации безопасности и эффективности. Для введения антитела доза лежит в диапазоне от приблизительно 0,0001 до 100 мг/кг и более обычно от 0,01 до 5 мг/кг массы тела хозяина. Например, дозы могут составлять 1 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела, или лежать в диапазоне 1-10 мг/кг. Иллюстративный режим лечения предусматривает введение один раз в каждые две недели или один раз в месяц, или один раз в каждые 3-6 месяцев.

Гуманизованное антитело, представленное в настоящем описании, можно вводить во многих случаях. Интервалы между однократными дозами могут быть недельными, месячными или годовыми. Интервалы могут быть также неравномерными, как показано по измерению уровней гуманизованного антитела в крови пациента. В некоторых способах дозу регулируют так, чтобы достигнуть концентрации антитела в плазме 1-1000 мкг/мл и в некоторых способах 25-300 мкг/мл. Альтернативно, антитело можно вводить в форме состава с замедленным высвобождением, в этом случае необходимо менее частое введение. Дозу и частоту меняют в зависимости от времени полужизни антитела в организме пациента. Как правило, для гуманизованных антител показано более длительное время полужизни, чем для химер-

ных антител и не относящихся к человеку антител. Дозу и частоту введения можно менять в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. При профилактических применениях вводят относительно низкую дозу через относительно нечастые интервалы в течение длительного периода времени. Некоторых пациентов продолжают подвергать лечению в течение всей оставшейся жизни. При терапевтических применениях иногда необходима относительно высокая доза через относительно короткие интервалы до тех пор, пока прогрессирование заболевания не уменьшится или не прекратится, и, предпочтительно, пока у пациента не проявится частичное или полное облечение симптомов заболевания. После этого, пациента можно лечить в профилактическом режиме.

Способы

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества гуманизованного антитела 1E9, представленного в настоящем описании, включая варианты его осуществления, таким образом, лечения злокачественной опухоли у субъекта. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой лимфоидную злокачественную опухоль.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества гуманизованного антитела IgG1, представленного в настоящем описании, включая варианты его осуществления, таким образом, лечения злокачественной опухоли у субъекта. В некоторых вариантах осуществления злокачественная опухоль представляет собой лимфоидную злокачественную опухоль.

Способы ингибирования

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования пролиферации клетки. Способ включает:

(i) приведение клетки в контакт с гуманизованным антителом IgG1, как представлено в настоящем описании, включая варианты его осуществления, таким образом, получение приведенной в контакт клетки;

(ii) гуманизованному антителу IgG1 позволяют связывать антиген CD73 на приведенной в контакт клетке, таким образом, ингибируя пролиферацию клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой лимфоидную клетку. В некоторых вариантах осуществления лимфоидная клетка представляет собой Т-клетку.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования пролиферации клетки. Способ включает:

(i) приведение клетки в контакт с гуманизованным антителом IgG4, как представлено в настоящем описании, включая варианты его осуществления, таким образом, получение приведенной в контакт клетки;

(ii) гуманизованному антителу IgG4 позволяют связывать антиген CD73 на приведенной в контакт клетке, таким образом, ингибируя пролиферацию клетки.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой лимфоидную клетку. В некоторых вариантах осуществления лимфоидная клетка представляет собой Т-клетку.

Способы детекции

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу детекции гуманизованного антитела 1E9, связанного с антигеном CD73.

Способ включает:

(i) приведение гуманизованного антитела 1E9 в контакт с антигеном CD73 при pH менее приблизительно 7,5 и

(ii) детекцию связывания гуманизованного антитела 1E9 с антигеном CD73.

В некоторых вариантах осуществления pH составляет от приблизительно 6,0 до приблизительно 7,0. В некоторых вариантах осуществления pH составляет приблизительно 6,7. В некоторых вариантах осуществления pH составляет приблизительно 6,3. В некоторых вариантах осуществления детекция связывания со стадии (ii) включает детекцию ингибирования каталитической активности CD73. В некоторых вариантах осуществления антиген CD73 формирует часть клетки. В некоторых вариантах осуществления антиген CD73 является связанным с твердой подложкой. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело 1E9 включает поддающуюся детекции группу.

Способы активации Т-клеток

Настоящее изобретение относится к способам активации иммуносупрессированной (не активированной, не пролиферирующей) Т-клетки в окружении злокачественной опухоли. Таким образом, один аспект относится к способу активации иммуносупрессированной Т-клетки.

Способ включает:

(i) приведение Т-клетки в контакт с гуманизованным антителом 1E9, как представлено в настоящем описании, включая варианты его осуществления, таким образом, получая приведенную в контакт Т-клетку;

(ii) гуманизованному антителу 1E9 позволяют связывать антиген CD73 на приведенной в контакт Т-клетке, таким образом активируя иммуносупрессированную Т-клетку.

В некоторых вариантах осуществления Т-клетка находится в окружении злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-гамма приведенной в контакт Т-клеткой увеличена по сравнению с отсутствием антитела. В некоторых вариантах осуществления пролиферация приведенной в контакт Т-клетки увеличена по сравнению с отсутствием антитела. "Иммуносупрессированная Т-клетка", как представлено в настоящем описании, представляет собой Т-клетку, находящуюся в окружении злокачественной опухоли (в непосредственной близости и/или в физиологическом контакте с злокачественной клеткой или солидной опухолью), которая не пролиферирует или не секретирует поддающиеся детекции количества цитокинов или не экспрессирует поверхностные маркеры клетки, характерные для активированных Т-клеток (например, IFN-гамма, CD25, CD38).

Способы комбинированного лечения

Способы лечения, представленного в настоящем описании, включая варианты его осуществления, могут включать введение второго лекарственного средства. Таким образом, способы лечения, как представлено в настоящем описании, включают введение гуманизованного антитела 1E9, как представлено в настоящем описании, или гуманизованного IgG1 или антитела IgG4 как представлено в настоящем описании, в комбинации с вторым лекарственным средством. Второе лекарственное средство может представлять собой любую композицию, которую можно использовать для лечения или предотвращения злокачественной опухоли.

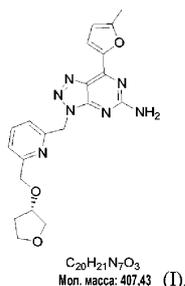
В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества гуманизованного антитела 1E9, представленного в настоящем описании, включая варианты его осуществления, и эффективное количество второго лекарственного средства, таким образом, лечение злокачественной опухоли у субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества гуманизованного антитела IgG1, представленного в настоящем описании, включая варианты его осуществления, и эффективного количества второго лекарственного средства, таким образом, лечение злокачественной опухоли у субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества гуманизованного антитела IgG4, представленного в настоящем описании, включая варианты его осуществления, и эффективного количества второго лекарственного средства, таким образом, лечение злокачественной опухоли у субъекта.

Второе лекарственное средство, которое можно использовать для способов, представленных в настоящем описании, может представлять собой соединение, лекарственное средство, антагонист, ингибитор или модулятор, имеющие антинеопластические свойства или способность ингибировать рост или пролиферацию клеток. В некоторых вариантах осуществления второе лекарственное средство представляет собой химиотерапевтическое средство. "Химиотерапевтическое средство" или "химиотерапевтический агент" используют в соответствии с его простым обычным значением, и оно относится к химической композиции или соединению, имеющим антинеопластические свойства или способность ингибировать рост или пролиферацию клеток. В некоторых вариантах осуществления второе лекарственное средство представляет собой радиотерапию. В некоторых вариантах осуществления второе лекарственное средство представляет собой средство, одобренное FDA или сходным регулирующим органом государства, отличного от США, для лечения злокачественной опухоли.

В некоторых вариантах осуществления второе лекарственное средство представляет собой некоторое соединение. В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой антагонист рецептора пуринов. В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой антагонист рецептора A_{2A} аденозина или антагонист рецептора A_{2B} аденозина. В некоторых вариантах осуществления соединение is an A_{2A} аденозин рецептор антагонист. В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой антагонист рецептора A_{2B} аденозина. В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой любое из соединений, описанных в патентах США 9120807, 8450328 или 8354415, содержание которых, таким образом, приведено в качестве ссылки и для всех целей. В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой соединение тиенопиримидина. В некоторых вариантах осуществления соединение имеет структуру формулы:



Термин "рецептор A_{2A} аденозина", как представлено в настоящем описании, включает любую из рекомбинантных или природных форм рецептора A_{2A} аденозина (ADORA2A) или их вариантов или гомологов, сохраняющих активность белка ADORA2A (например, в пределах по меньшей мере 50, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% активности по сравнению с ADORA2A). В некоторых аспектах варианты или гомологи имеют по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность аминокислотной последовательности на протяжении полной последовательности или части последовательности (например, части из 50, 100, 150 или 200 непрерывных аминокислот) по сравнению с природным полипептидом ADORA2A. В некоторых вариантах осуществления ADORA2A представляет собой белок, как идентифицировано по ссылке на последовательность в NCBI GI:5921992, его гомолог или функциональный фрагмент.

Термин "рецептор A_{2B} аденозина", как представлено в настоящем описании, включает любую из рекомбинантных или природных форм рецептора A_{2B} аденозина (ADORA2B) или их вариантов или гомологов, сохраняющих активность белка ADORA2B (например, в пределах по меньшей мере 50, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% активности по сравнению с ADORA2B). В некоторых аспектах варианты или гомологи имеют по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность аминокислотной последовательности на протяжении полной последовательности или части последовательности (например, части из 50, 100, 150 или 200 непрерывных аминокислот) по сравнению с природным полипептидом ADORA2B. В некоторых вариантах осуществления, ADORA2B представляет собой белок, как идентифицировано по ссылке на последовательность в NCBI GI:4501951, его гомолог или функциональный фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство представляет собой второе гуманизованное антитело. В некоторых вариантах осуществления второе гуманизованное антитело представляет собой антитело, способное связывать лиганд 1 белка программируемой клеточной смерти (PD-L1). В некоторых вариантах осуществления второе гуманизованное антитело представляет собой атезолизумаб. В некоторых вариантах осуществления второе гуманизованное антитело представляет собой антитело, способное связывать белок программируемой клеточной смерти 1 (PD-1). В некоторых вариантах осуществления второе гуманизованное антитело представляет собой антитело, способное связывать CTLA-4.

Термин "атезолизумаб" или "MPDL3280A" относится к полностью гуманизованному, сконструированному моноклональному антителу изотипа IgG1 против лиганда 1 белка программируемой клеточной смерти (PD-L1). В общепринятом смысле, атезолизумаб относится к регистрационному номеру CAS 1380723-44-3.

Термин "PDL-1", как представлено в настоящем описании, включает любую из рекомбинантных или природных форм лиганда 1 белка программируемой клеточной смерти (PD-L1) или их вариантов или гомологов, сохраняющих активность белка PDL-1 (например, в пределах по меньшей мере 50, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% активности по сравнению с PDL-1). В некоторых аспектах варианты или гомологи имеют по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность аминокислотной последовательности на протяжении полной последовательности или части последовательности (например, части из 50, 100, 150 или 200 непрерывных аминокислот) по сравнению с природным полипептидом PDL-1. В некоторых вариантах осуществления PDL-1 представляет собой белок, как идентифицировано по ссылке на последовательность в NCBI GI:390979639, его гомолог или функциональный фрагмент.

Термин "PD-1", как представлено в настоящем описании, включает любую из рекомбинантных или природных форм белка программируемой клеточной смерти 1 (PD-1) или их вариантов или гомологов, сохраняющих активность белка PD-1 (например, в пределах по меньшей мере 50, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% активности по сравнению с PD-1). В некоторых аспектах варианты или гомологи имеют по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность аминокислотной последовательности на протяжении полной последовательности или части последовательности (например, части из 50, 100, 150 или 200 непрерывных аминокислот) по сравнению с природным полипептидом PD-1. В некоторых вариантах осуществления PD-1 представляет собой белок, как идентифицировано по ссылке на последовательность в NCBI GI:167857792, его гомолог или функциональный фрагмент.

Термин "CTLA-4" или "белок CTLA-4", как представлено в настоящем описании, включает любую из рекомбинантных или природных форм ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами белка 4 (CTLA-4) или их вариантов или гомологов, сохраняющих активность белка CTLA-4 (например, в пре-

делах по меньшей мере 50, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% активности по сравнению с CTLA-4). В некоторых аспектах варианты или гомологи имеют по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность аминокислотной последовательности на протяжении полной последовательности или части последовательности (например, части из 50, 100, 150 или 200 непрерывных аминокислот) по сравнению с природным полипептидом CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления CTLA-4 представляет собой белок, как идентифицировано по ссылке на последовательность в NCBI GI:83700231, его гомолог или функциональный фрагмент.

В представленных способах лечения можно использовать дополнительные лекарственные средства, подходящие для заболевания (например, злокачественной опухоли), подвергаемого лечению. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, представленные способы лечения дополнительно включают введение второго лекарственного средства субъекту. Подходящие дополнительные лекарственные средства включают, но без ограничения, анальгетики, анестетики, аналептики, кортикостероиды, антихолинергические средства, антихолинэстеразы, противосудорожные средства, антинеопластические средства, аллостерические ингибиторы, анаболические стероиды, противоревматические средства, психотерапевтические средства, нейробиологические средства, противовоспалительные средства, противогельминтные средства, антибиотики, антикоагулянты, противогрибковые средства, антигистамины, антимукаринные средства, антимикобактериальные средства, антипротозойные средства, противовирусные средства, дофаминергические средства, гематологические средства, иммунологические средства, мускариновые средства, ингибиторы протеаз, витамины, факторы роста и гормоны. Выбор средства и дозировки может легко определить специалист в данной области, на основании данного заболевания, подвергаемого лечению.

Комбинации средств или композиций можно вводить либо одновременно (например, в форме смеси), отдельно, но одновременно (например, посредством отдельных внутривенных линий), либо последовательно (например, одно средство вводят первым с последующим введением второго средства). Таким образом, термин комбинация используют для обозначения совместного, одновременного или последовательного введения двух или более средств или композиций. Курс лечения лучше определять на индивидуальной основе в зависимости от конкретных характеристик субъекта и типа выбранного лечения. Лечение, такому как описанное в настоящем описании, можно подвергать субъекта ежедневно, два раза в сутки, раз в две недели, раз в месяц или на любой другой приемлемой основе, которая является терапевтически эффективной. Лечение можно проводить отдельно или в комбинации с любым другим лечением, описанным в настоящем описании или известным в данной области. Дополнительное лечение можно проводить одновременно с первым лечением, в другое время или по совершенно другому терапевтическому расписанию (например, первое лечение можно проводить ежедневно, в то время как дополнительное лечение можно проводить еженедельно).

В соответствии со способами, представленными в настоящем описании, субъекту вводят эффективное количество одного или нескольких из лекарственных средств, представленных в настоящем описании (т.е. гуманизированного антитела 1E9 или гуманизированного IgG1, или антитела IgG4, например, в комбинации с соединением или вторым гуманизированным антителом). Термины эффективное количество и эффективная доза используют взаимозаменяемо. Термин эффективное количество определяют как любое количество, необходимое для получения желательного физиологического ответа (например, уменьшения воспаления).

Эффективные количества и расписания для введения средства может определять эмпирически специалист в данной области. Диапазоны дозирования для введения являются достаточно широкими для оказания желательного эффекта, при котором один или несколько симптомов заболевания или нарушения подвержены влиянию (например, уменьшению или замедлению). Доза не должна быть настолько большой, чтобы вызывать значительные неблагоприятные побочные эффекты, такие как нежелательные перекрестные реакции, анафилактические реакции и т.п. В общем, дозу можно менять в зависимости от возраста, состояния, пола, типа заболевания, степени заболевания или нарушения, способа введения или того, включены ли в режим другие лекарственные средства, и ее может определять специалист в данной области. Дозу может корректировать индивидуальный терапевт в случае каких-либо противопоказаний. Дозы можно менять и можно вводить за одно или несколько введений доз ежедневно, в течение одних или нескольких суток. В литературе можно обнаружить руководство для соответствующего дозирования данных классов фармацевтических продуктов. Например, для данного параметра для эффективное количества могут показывать увеличение или уменьшение по меньшей мере на 5, 10, 15, 20, 25, 40, 50, 60, 75, 80, 90 или по меньшей мере на 100%. Эффективность можно также выражать как "кратность" увеличения или уменьшения. Например, терапевтически эффективное количество может оказывать по меньшей мере 1,2-кратный, 1,5-кратный, 2-кратный, 5-кратный или больший эффект по сравнению с контролем. Точная доза и состав могут зависеть от цели лечения, и их может устанавливать специалист в данной области с использованием известных способов (см., например, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, Gennaro, Editor (2003), и Pickar, *Dosage Calculations* (1999)).

Примеры

Пример 1.

Переключение антитела против CD73 (1E9) на изотип IgG1 человека прекращает непосредственные эффекты на активацию Т-клеток, наблюдаемые для изотипа IgG3 мыши.

Антитело, полученное из линии клеток, полученной из гибридомы 1E9, имеет изотип mIgG3. Показано, что это антитело проявляет синергизм с PMA для активации пролиферации Т-клеток, секреции IL-2 и повышающей регуляции экспрессии рецептора IL-2 (PMID: 2550543). Считают, что этот эффект осуществляется по механизму прямой передачи сигналов, поскольку 1E9 опосредует эти эффекты на клетках, экспрессирующих каталитически неактивный CD73 или CD73, присоединенный к мембране клеток через трансмембранную область, в отличие от механизма GPI-заякоривания, используемого эндогенно (PMID: 9113412, 7697732, 8027539). Заявители переместили вариабельные области из 1E9 в каркас человеческого IgG1, получая химерное антитело 1E9. Химерное 1E9 не опосредует активацию пролиферации Т-клеток или рецептора IL-2 (экспрессию CD25). Таким образом, заявители открыли, что переключение изотипа может изменить опосредованные антителом эффекты на передачу сигналов CD73.

Клеточный анализ для оценки каталитической активности CD73

CD73 экспрессируется на клеточной поверхности и представляет собой эктонуклеотидазу, гидролизующую АМФ до аденозина и фосфата. Для оценки каталитической активности CD73 и способности антител против CD73 от заявителей ингибировать эту активность, заявители использовали клеточный анализ. Клетки, эндогенно экспрессирующие CD73, инкубировали с антителами против CD73 или с контрольным для изотипа антителом в диапазоне концентраций при 37°C перед добавлением АМФ. Клетки инкубировали с АМФ при 37°C в течение 20 мин. Уровни фосфата в среде измеряли с использованием коммерчески доступного реагента (Sensolyte MG phosphate assay kit, AnaSpec), и они являлись прямо пропорциональными активности CD73. Этот анализ являлся адаптированным из литературы, и ранее был описан для использования при измерении активности CD73 (PMID: 21506751). Насколько известно заявителям, этот анализ всегда проводили при физиологическом pH приблизительно 7,2. Неожиданно заявители смогли показать, что если анализ проводили при более низком pH для скрининга по активности против CD73, способность блокировать активность CD73 при более низком pH сохранялась. Сильная активность при немного кислом pH может являться желательным свойством для терапевтического антитела, подлежащего использованию по показаниям солидной опухоли, поскольку известно, что микроокружение солидной опухоли является немного кислым. Заявители обнаружили, что некоторые антитела (CPX-002, CPX-005, CPX-006) сохраняют активность блокирования активности CD73 при более низком pH (6,3 или 6,7), в то время как другие антитела (CPX-003, CPX-004) теряют активность при более низком pH.

Измерения аффинности

Заявители получили измерения аффинности для 5 гуманизированных антител-кандидатов против CD73 (CPX-003, CPX-004, CPX-005, CPX-006, CPX-007), так же как для химерного антитела (CPX-002), для измерения связывания этих антител с CD73. Результаты этих измерений аффинности обобщены в таблице.

Таблица. Измерения аффинности гуманизированных и химерных антител против CD73

Антитело	KD
CPX-002	9,4 нМ
CPX-003	19,5 нМ
CPX-004	17,8 нМ
CPX-005	6,9 нМ
CPX-006	7,1 нМ
CPX-007	15,9 нМ

Специфическая цепь, ассоциированная с наиболее высокой аффинностью для CD73 и наилучшей активностью при низком pH

Два гуманизированных антитела (CPX-005, CPX-006) имеют более высокую аффинность для CD73 и улучшенную активность для ингибирования активности CD73 по сравнению с другими кандидатами. В этих двух антителах используют одинаковую тяжелую цепь, и они отличаются только легкой цепью. Таким образом, эта конкретная тяжелая цепь может быть важной для достижения высокой аффинности и сильного ингибирования активности CD73. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область гуманизированной тяжелой цепи включает последовательность из SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область гуманизированной тяжелой цепи представляет собой последовательность из SEQ ID NO: 7.

Пример 2. Гуманизация клона ВАР094-01

Заявители закончили конструирование библиотеки для гуманизации клона ВАР094-01 (химерного 1Е9). Двухцепочечные фрагменты ДНК, кодирующие последовательности CDR легкой цепи и тяжелой цепи ВАР094-01 (SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29 соответственно), комбинировали с пулами человеческих каркасных областей. Затем полноразмерные переменные домены клонировали в экспрессирующий вектор для млекопитающих. Переменные домены легкой цепи клонировали в одной рамке с сигналом секреции и константным доменом каппа человека. Переменные домены тяжелой цепи клонировали в одной рамке с лидерной последовательностью и константным доменом IgG1 человека. Качество библиотеки (разнообразие синтезированных переменных доменов) подтверждали посредством секвенирования (данные не представлены).

Скрининг гуманизированных вариантов

Получали массивы гуманизированных клонов в 96-луночных планшетах. Каждый планшет также содержит две лунки положительного контроля (ВАР094-01, т.е., химерное 1Е9) и отрицательного контроля (только вектор). Плазмидную ДНК подготавливали для каждого планшета и трансфицировали клетки CHO-S в 96-луночном формате. Супернатант собирали через 48 ч после трансфекции. Концентрацию IgG определяли с использованием способа ELISA для количественной оценки IgG человека. Связывание гуманизированных клонов с CD73, экспрессировали на поверхности клеток MDA-MB-231 определяли с использованием ELISA на основе клеток. Из клонов с наилучшим ответом из первичного скрининга повторно получали массив, повторно проводили трансфекцию и повторно проводили скрининг посредством ELISA на основе клеток (фиг. 5).

Анализ последовательности гуманизированных вариантов с наилучшим ответом

Переменные домены легкой цепи и тяжелой цепи отобранных гуманизированных вариантов клонов с наилучшим ответом секвенировали и выравнивали с исходными мышиными последовательностями клона ВАР094-01 (1Е9). Анализ последовательности показывает, что существует четыре различных тяжелых цепи и 5 различных легких цепей в 10 клонах с наилучшим ответом (фиг. 4А и 4В). Каждый клон с наилучшим ответом имеет уникальную комбинацию гуманизированной легкой и тяжелой цепи.

Формальный список последовательностей

```

SEQ ID NO:1: RASKNVSTSGYSYMH
SEQ ID NO:2: LASNLES
SEQ ID NO:3: QHSRELPFT
SEQ ID NO:4: GYTFTSYWIT
SEQ ID NO:5: PGSGNTNYNEKFKT
SEQ ID NO:6: EGGLTTEDYALDY
SEQ ID NO:7:
QVQLVQSGAEVEKPGASVKVCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIYPGSGNTN
YNEKFKTRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAKEGGLTTEDYALDYWGQGLTLTV
      ВАР094-hum01-LC      SEQ      ID      NO:8:
GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGATCACCATCA
CTTGCCAGGCCAGCAAAAATGTCAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGTATCAGCAGAA
ACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATCTTGCATCCAACCTAGAATCTGGGATCCCACCT
CGGTTTCAGTGGCAGCGGGTATGGAACAGATTTTACCCTCACAATTAATAACATAGAATCTGAGG
ATGTGTCATATTACTTCTGTCCAGCAGTAGGGAGCTTCCATTACGTTCCGCCAAGGGACCAA
GGTGGAAATCAAA
      ВАР094-hum02-LC      SEQ      ID      NO:9:

```

GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAGAAAGTCACCATCA
CCTGCAGGGCCAGCAAAAATGTCAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACCTGGTATCAGCAGAA
ACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATCTTGCATCCAACCTAGAATCTGGGATCCCACCT
CGATTTCAGTGGCAGCGGGTATGGAACAGATTTTACCCTCACAATTAATAACATAGAATCTGAGG
ATGCTGCATATTACTTCTGTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCCATTACGTTTCGGCCAAGGGACCAA
GGTGGAAATCAAA

BAP094-hum03-LC, CPX-003 SEQ ID NO:10:

GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAGAAAGTCACCATCA
CCTGCAGGGCCAGCAAAAATGTCAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACCTGGTATCAGCAGAA
ACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATCTTGCATCCAACCTAGAATCTGGGATCCCACCT
CGATTTCAGTGGCAGCGGGTATGGAACAGATTTTACCCTCACAATTAATAACATAGAATCTGAGG
ATGCTGCATATTACTTCTGTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCCATTACGTTTCGGCCAAGGGACCAA
GGTGGAAATCAAA

BAP094-hum04-LC SEQ ID NO:11:

GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGACTTTCAGTCTGTGACTCCAAAGGAGAAAGTCACCATCA
CCTGCAGGGCCAGCAAAAATGTCAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACCTGGTATCAGCAGAA
ACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATCTTGCATCCAACCTAGAATCTGGGATCCCACCT
CGATTTCAGTGGCAGCGGGTATGGAACAGATTTTACCCTCACAATTAATAACATAGAATCTGAGG
ATGCTGCATATTACTTCTGTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCCATTACGTTTCGGCCAAGGGACCAA
GGTGGAAATCAAA

BAP094-hum05-LC, CPX-004 SEQ ID NO:12:

GATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCTGGACAGCCGGCCTCCATCT
CCTGCAGGGCCAGCAAAAATGTCAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACCTGGTACCAGCAGAA
ACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATCTTGCATCCAACCTAGAATCTGGGATCCCACCT
CGATTTCAGTGGCAGCGGGTATGGAACAGATTTTACCCTCACAATTAATAACATAGAATCTGAGG
ATGCTGCATATTACTTCTGTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCCATTACGTTTCGGCCAAGGGACCAA
GGTGGAAATCAAA

BAP094-hum06-LC, CPX-005 SEQ ID NO:13:

GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA
CTTGCAGGGCCAGCAAAAATGTCAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACCTGGTACCAGCAGAA
ACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATCTTGCATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCCTCG
AGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTTACCCTTACCATCAGTAGCCTGGAAGCTGAAG
ATGCTGCAACATATTACTTCTGTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCCATTACGTTTCGGCCAAGGGACCAA
GGTGGAAATCAAA

BAP094-hum07-LC, CPX-006, CPX-007 SEQ ID NO:14:

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGGCCACCCCTCT

CCTGCAGGGCCAGCAAAAATGTCAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGTACCAGCAGAA
 ACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATCTTGCATCCAACCTAGAATCTGGGATCCCACCT
 CGATTCACTGGCAGCGGGTATGGAACAGATTTTACCCTCACAATTAATAACATAGAATCTGAGG
 ATGCTGCATATTACTTCTGTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCCATTACGTTTCGGCCAAGGGACCAA
 GGTGGAATCAAA

BAP094-hum08-LC SEQ ID NO:15:

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT
 CCTGCAGGGCCAGCAAAAATGTCAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGTACCAGCAGAA
 ACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATCTTGCATCCAACCTAGAATCTGGGATCCCACCT
 CGATTCACTGGCAGCGGGTATGGAACAGATTTTACCCTCACAATTAATAACATAGAATCTGAGG
 ATGCTGCATATTACTTCTGTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCCATTACGTTTCGGCCAAGGGACCAA
 GGTGGAATCAAA

BAP094-hum09-LC SEQ ID NO:16:

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT
 CCTGCAGGGCCAGCAAAAATGTCAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGTACCAGCAGAA
 ACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATCTTGCATCCAACCTAGAATCTGGGATCCCACCT
 CGATTCACTGGCAGCGGGTATGGAACAGATTTTACCCTCACAATTAATAACATAGAATCTGAGG
 ATGCTGCATATTACTTCTGTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCCATTACGTTTCGGCCAAGGGACCAA
 GGTGGAATCAAA

BAP094-hum10-LC SEQ ID NO:17:

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT
 CCTGCAGGGCCAGCAAAAATGTCAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGTACCAGCAGAA
 ACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATCTTGCATCCAACCTAGAATCTGGGATCCCACCT
 CGATTCACTGGCAGCGGGTATGGAACAGATTTTACCCTCACAATTAATAACATAGAATCTGAGG
 ATGCTGCATATTACTTCTGTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCCATTACGTTTCGGCCAAGGGACCAA
 GGTGGAATCAAA

BAP094-hum01-HC SEQ ID NO:18:

CAGGTTCACTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGGAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGTCTCCT
 GCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATAACCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACA
 AGGGCTTGAGTGGATGGTGATATTTATCCTGGTAGTGGTAATACTAATACTACAATGAGAAGTTC
 AAGACCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCC
 TGAGATCTGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCAAAAGAGGGAGGTCTTACTACGGAGGATTA
 TGCTTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACGCTGGTCACCCTCAGCTCA

BAP094-hum02-HC SEQ ID NO:19:

CAGGTTCACTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGGAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGTCTCCT
 GCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATAACCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACA

AGGGCTTGAGTGGATGGGTGATATTTATCCTGGTAGTGGTAATACTAACTACAATGAGAAGTTC
 AAGACCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCC
 TGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAAAGAGGGAGGTCTTACTACGGAGGATTA
 TGCTTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACGCTGGTCACCGTCAGCTCA

BAP094-hum03-HC, CPX-003, CPX-007 SEQ ID NO:20:

CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCT
 GCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATAACCTGGGTGCGACAGGCTCGTGGACA
 ACGCCTTGAGTGGATAGGTGATATTTATCCTGGTAGTGGTAATACTAACTACAATGAGAAGTTC
 AAGACCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCC
 TGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAAAGAGGGAGGTCTTACTACGGAGGATTA
 TGCTTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACGCTGGTCACCGTCAGCTCA

BAP094-hum04-HC SEQ ID NO:21:

GAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTACAGTGAAAATCTCCT
 GCAAGGTTTCTGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATAACCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAA
 GGGGCTGGAGTGGATTGGTGATATTTATCCTGGTAGTGGTAATACTAACTACAATGAGAAGTTC
 AAGACCAGAGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCC
 TGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCAAAAGAGGGAGGTCTTACTACGGAGGATTA
 TGCTTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACGCTGGTCACCGTCAGCTCA

BAP094-hum05-HC, CPX-004 SEQ ID NO:22:

GAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTACAGTGAAAATCTCCT
 GCAAGGTTTCTGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATAACCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAA
 GGGGCTGGAGTGGATTGGTGATATTTATCCTGGTAGTGGTAATACTAACTACAATGAGAAGTTC
 AAGACCAGAGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCC
 TGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCAAAAGAGGGAGGTCTTACTACGGAGGATTA
 TGCTTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACGCTGGTCACCGTCAGCTCA

BAP094-hum06-HC, CPX-005, CPX-006 SEQ ID NO:23:

CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGGAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCT
 GCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATAACCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACA
 AGGGCTTGAGTGGATGGGTGATATTTATCCTGGTAGTGGTAATACTAACTACAATGAGAAGTTC
 AAGACCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCC
 TGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAAAGAGGGAGGTCTTACTACGGAGGATTA
 TGCTTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACGCTGGTCACCGTCAGCTCA

BAP094-hum07-HC SEQ ID NO:24:

CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGGAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCT
 GCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATAACCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACA
 AGGGCTTGAGTGGATGGGTGATATTTATCCTGGTAGTGGTAATACTAACTACAATGAGAAGTTC

AAGACCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCC
 TGAGATCTGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCAAAAGAGGGAGGTCTTACTACGGAGGATTA
 TGCTTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACGCTGGTCACCGTCAGCTCA

BAPO94-hum08-HC SEQ ID NO:25:

GAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTACAGTAAAATCTCCT
 GCAAGGTTTCTGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATAACCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACA
 AGGCTTGAGTGGATGGGTGATATTTATCCTGGTAGTGGTAATACTAATACTACAATGAGAAGTTC
 AAGACCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCC
 TGAGATCTGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCAAAAGAGGGAGGTCTTACTACGGAGGATTA
 TGCTTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACGCTGGTCACCGTCAGCTCA

BAPO94-hum09-HC SEQ ID NO:26:

CAGGTTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTCAGTGAAGGTCTCCT
 GCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATAACCTGGGTGCGACAGGCTCGTGGACA
 ACGCTTGAGTGGATAGGTGATATTTATCCTGGTAGTGGTAATACTAATACTACAATGAGAAGTTC
 AAGACCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCC
 TGAGATCTGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCAAAAGAGGGAGGTCTTACTACGGAGGATTA
 TGCTTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACGCTGGTCACCGTCAGCTCA

BAPO94-hum10-HC SEQ ID NO:27:

GAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTACAGTAAAATCTCCT
 GCAAGGTTTCTGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATAACCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAA
 GGGCTGGAGTGGATTGGTGATATTTATCCTGGTAGTGGTAATACTAATACTACAATGAGAAGTTC
 AAGACCAGAGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCC
 TGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCAAAAGAGGGAGGTCTTACTACGGAGGATTA
 TGCTTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACGCTGGTCACCGTCAGCTCA

BAPO94-01-LC CPX-002 (химерный) SEQ ID NO:28:

GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCTTAGCTGTATCTTGGGGCAGAGGGCCACCATCT
 CATGCAGGGCCAGCAAAAATGTAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAA
 ACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATCTTGCATCCAACTAGAATCTGGGGTCCCTACC
 AGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGG
 ATGCTGCAACCTATTACTGTGACACAGTAGGGAGCTTCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAA
 GTTGGAAATAAAA

BAPO94-01-HC CPX-002 (химерный) SEQ ID NO:29:

CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTCAGTGAAGATGTCT
 GCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACCAGCTACTGGATAACCTGGGTGAAGCAGAGGCCCTGGACA
 AGGCTTGAGTGGATTGGAGATATTTATCCTGGTAGTGGTAATACTAATACTACAATGAGAAGTTC
 AAGACCAAGGCCACACTGACTGTAGACACATCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCC

TGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAAAAGAGGAGGTCTTACTACGGAGGATTA
TGCTTTGGACTACTGGGGCCAGGGAACGCTGGTCACCGTCAGCTCA

BAP094-01-LC SEQ ID NO:30:
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKNVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPT
RFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPFTFGSGTKLEIK

BAP094-hum01-LC SEQ ID NO:31:
AIQLTQSPSSLSASVGDVITTCRASKNVSTSGYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGIPP
RFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYFCQHSRELPFTFGQGTKVEIK

BAP094-hum02-LC SEQ ID NO:32:
EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASKNVSTSGYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGIPP
RFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYFCQHSRELPFTFGQGTKVEIK

BAP094-hum03-LC SEQ ID NO:33:
EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASKNVSTSGYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGIPP
RFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYFCQHSRELPFTFGQGTKVEI

BAP094-hum04-LC SEQ ID NO:34:
EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASKNVSTSGYSYMHWYQQKPGKAPKLLIYLASNLESGIPP
RFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYFCQHSRELPFTFGQGTKVEIK

BAP094-hum05-LC SEQ ID NO:35:
DVVMTQSPPLSPVTLGQPASISCRASKNVSTSGYSYMHWYQQKPGQAPRLLIYLASNLESGIPP
RFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYFCQHSRELPFTFGQGTKVEIK

BAP094-hum06-LC SEQ ID NO:36:
AIQLTQSPSSLSASVGDVITTCRASKNVSTSGYSYMHWYQQKPGQAPRLLIYLASNLESGVPS
RFSGSGSGTDFFTISSLEAEDAATYYCQHSRELPFTFGQGTKVEIK

BAP094-hum07-LC SEQ ID NO:37:
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKNVSTSGYSYMHWYQQKPGQAPRLLIYLASNLESGIPP
RFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYFCQHSRELPFTFGQGTKVEIK

BAP094-hum08-LC SEQ ID NO:38:
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKNVSTSGYSYMHWYQQKPGQAPRLLIYLASNLESGIPP
RFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYFCQHSRELPFTFGQGTKVEIK

BAP094-hum09-LC SEQ ID NO:39:
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKNVSTSGYSYMHWYQQKPGQAPRLLIYLASNLESGIPP
RFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYFCQHSRELPFTFGQGTKVEIK

BAP094-hum10-LC SEQ ID NO:40:
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKNVSTSGYSYMHWYQQKPGQAPRLLIYLASNLESGIPP
RFSGSGYGTDFTLTINNIESEDAAYFCQHSRELPFTFGQGTKVEIK

BAP094-01-HC SEQ ID NO:41:

QVQLVQPGAEVVKPGASVKVMSCKASGYTFTSYWITWVKQRPGGLEWIGDIYPGSGNTNYNEKF
KTKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAKEGGLTTEDYALDYWGQGLVTVSS

BAP094-hum01-HC SEQ ID NO: 42:

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMDIYPGSGNTNYNEKF
KTRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAKEGGLTTEDYALDYWGQGLVTVSS

BAP094-hum02-HC SEQ ID NO: 43:

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMDIYPGSGNTNYNEKF
KTRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAKEGGLTTEDYALDYWGQGLVTVSS

BAP094-hum03-HC SEQ ID NO: 44:

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCCKASGYTFTSYWITWVRQARGQRLEWIGDIYPGSGNTNYNEKF
KTRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAKEGGLTTEDYALDYWGQGLVTVSS

BAP094-hum04-HC SEQ ID NO: 45:

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTSYWITWIRQPPGKGLEWIGDIYPGSGNTNYNEKF
KTRVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCAKEGGLTTEDYALDYWGQGLVTVSS

BAP094-hum05-HC SEQ ID NO: 46:

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTSYWITWIRQPPGKGLEWIGDIYPGSGNTNYNEKF
KTRVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCAKEGGLTTEDYALDYWGQGLVTVSS

BAP094-hum06-HC SEQ ID NO: 47:

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMDIYPGSGNTNYNEKF
KTRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAKEGGLTTEDYALDYWGQGLVTVSS

BAP094-hum07-HC SEQ ID NO: 48:

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCCKASGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMDIYPGSGNTNYNEKF
KTRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAKEGGLTTEDYALDYWGQGLVTVSS

BAP094-hum08-HC SEQ ID NO: 49:

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTSYWITWVRQAPGQGLEWMDIYPGSGNTNYNEKF
KTRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAKEGGLTTEDYALDYWGQGLVTVSS

BAP094-hum09-HC SEQ ID NO: 50:

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCCKASGYTFTSYWITWVRQARGQRLEWIGDIYPGSGNTNYNEKF
KTRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAKEGGLTTEDYALDYWGQGLVTVSS

BAP094-hum10-HC SEQ ID NO: 51:

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTSYWITWIRQPPGKGLEWIGDIYPGSGNTNYNEKF
KTRVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCAKEGGLTTEDYALDYWGQGLVTVSS

CPX-006_HC (оптимизированный по кодонному составу)

SEQ ID NO: 52:

AAGCTT GCCGCCACCATGGAATGGTCCCTGGGTGTTCCCTGTTCCCTGTCGGTGACCAC
CGCGGTGCAC TCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAGGTGGAAAAGCCTGGCGCCTCT

GTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTTACCAGCTACTGGATCACCTGGGTGCGAC
 AGGCTCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATGGGCGACATCTACCTGGCTCCGGCAACACCAACTA
 CAACGAGAAGTTCAAGACCCCGGTGACCATCACCGCCGACAAGTCCACCTCCACCGCTACATG
 GAACTGCTCCTCCGTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCTAAAGAGGGCGGCTGA
 CCACCGAGGACTACGCCCTGGATTATTTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACCGTGTCTCTGCTTC
 TACCAAGGGCCCTCCGTGTCCCTCTGGCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGCGGCACAGCC
 GCTCTGGGTGCTCGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAACTCTGGCG
 CCCTGACCAGCGAGTGCACACCTTCCCTGCTGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTC
 CTCCGTCTGACTGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAC
 AAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCAAGTCTGCGACAAGACCCACACCT
 GTCCCCCTTGCTGCCCCGAACTGCTGGGCGGACCCCTGTGTCTTCTGTTCCCCCAAAGCC
 CAAGGACACCCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCAC
 GAGGACCCGAAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCA
 AGCCTAGAGAGGAACAGTACCAGTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCA
 GGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCTCTGCCTGCCCCATC
 GAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCCCCTA
 GCAGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGCTTCTACCCCTC
 CGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCT
 GTGCTGGACTCCGACGGCTCATTTCTTCTGTACTCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGC
 AGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCAGCGTATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAA
 GTCCCTGTCCCTGAGCCCCGCAAGTGAATTC

CPX-006_HC (оптимизированный по кодонному составу)

SEQ ID NO: 53:

MEWSWVFLFFLSVTTGVHS

QVQLVQSGAEVEKPGASVKVSKASGYFTFSYWITWVRQAPGQGLEWMGDIYPGSGNTN
 YNEKFKTRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAKEGGLTTEDYALDYWGQGLTVTVSSA
 STKGPSVFLPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHSTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
 PKDTLMISSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLH
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNNHYTQ
 KSLSLSPGK

CPX-006_LC (оптимизированный по кодонному составу)

SEQ ID NO: 54:

AAGCTTGGCCACCATGTCCGTGCCTACCCAGGTGCTGGGACTGCTGTGCTGTGGCT
 GACCGATGCCAGATGCGAGATCGTGTGACCCAGTCCCTGCCACCTGTCACTGTCTCCAGGC
 GAGAGACCACCCCTGAGCTGCCGGGCTCCAAGAAGTGTCCACCTCCGGCTACTCTACATGC
 ACTGGTATCAGCAGAAGCCCGCCAGGCCCCAGACTGCTGATCTACCTGGCCTCCAACCTGGA
 ATCCGGCATCCCCCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTACGGCACCGACTTCACCCCTGACCATCAAC
 AACATCGAGTCCGAGGACCGCCCTACTACTTCTGCCAGCACTCCAGAGAGCTGCCCTCACCT
 TTGGCCAGGGCACCAGGTGGAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTCCC
 ACCTTCCGACGAGCAGTGAAGTCCGGCACCGCTTCTGTGCTGTGCCTGCTGAACAACTTCTAC
 CCCCAGGAGGCAAGGTGCAAGTGGAAAGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAAT
 CCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTTACCCTGACCCTGTCCAA
 GGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCC
 GTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGTGATGAATTC

CPX-006_LC (оптимизированный по кодонному составу)

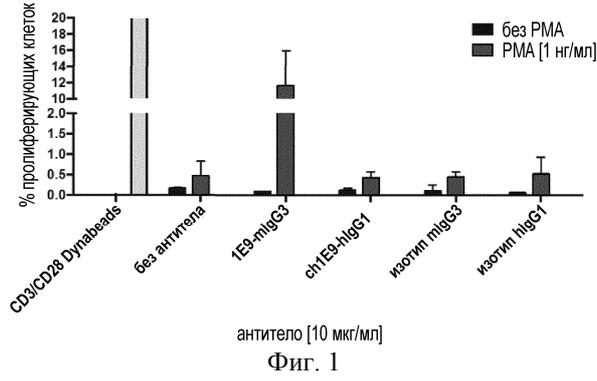
SEQ ID NO: 55:

MSVPTQVLGLLLLLWLDARC

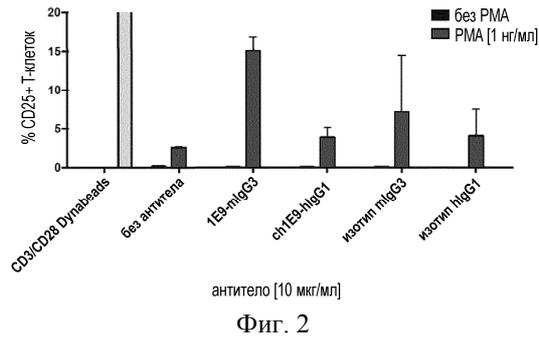
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKNVSTSGYSYMHYQQKPGQAPRLLIYLASNLE
 SGIPPRFSGSGYGTDFLTLINIESEDAAYFCQHSRELPTFTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFP
 PSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSK
 ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

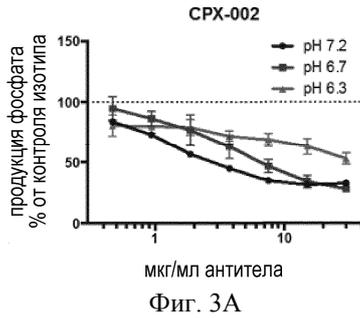
1. Гуманизированное анти-CD73 антитело, содержащее переменную область гуманизированной легкой цепи и переменную область гуманизированной тяжелой цепи, где указанная переменная область гуманизированной легкой цепи содержит SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 37 и где указанная переменная область гуманизированной тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 7.
2. Гуманизированное анти-CD37 антитело по п.1, где указанное антитело представляет собой IgG4.
3. Гуманизированное анти-CD73 антитело по п.1, где указанное антитело способно связывать антиген CD73 с равновесной константой диссоциации (K_D) от приблизительно 0,5 до приблизительно 25 нМ.
4. Гуманизированное анти-CD73 антитело по п.1, где указанное антитело является способным связывать антиген CD73 при pH от приблизительно 6,0 до приблизительно 7,0.
5. Гуманизированное анти-CD73 антитело по п.1, связанное с антигеном CD73.
6. Гуманизированное анти-CD73 антитело по п.5, где указанный антиген CD73 формирует часть клетки.
7. Гуманизированное анти-CD73 антитело по п.6, где указанная клетка представляет собой злокачественную клетку.
8. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество гуманизированного анти-CD73 антитела по п.1 и фармацевтически приемлемый наполнитель.
9. Способ лечения злокачественной опухоли у пациента, где указанный способ включает введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества гуманизированного анти-CD73 антитела по п.1, таким образом проводя лечение злокачественной опухоли у указанного пациента.
10. Гуманизированное анти-CD37 антитело IgG1, содержащее переменную область гуманизированной легкой цепи и переменную область гуманизированной тяжелой цепи, где указанная переменная область гуманизированной легкой цепи содержит CDR L1 мыши с последовательностью SEQ ID NO: 1, CDR L2 мыши с последовательностью SEQ ID NO: 2, CDR L3 мыши с последовательностью SEQ ID NO: 3 и где указанная переменная область гуманизированной тяжелой цепи содержит CDR H1 мыши с последовательностью SEQ ID NO: 4, CDR H2 мыши с последовательностью SEQ ID NO: 5 и CDR H3 мыши с последовательностью SEQ ID NO: 6.
11. Гуманизированное анти-CD37 антитело IgG1 по п.10, где указанная переменная область гуманизированной легкой цепи дополнительно содержит валин в положении, соответствующем положению 2 по Kabat, метионин в положении, соответствующем положению 4 по Kabat, лейцин в положении, соответствующем положению 9 по Kabat, пролин в положении, соответствующем положению 12 по Kabat, и пролин в положении, соответствующем положению 18 по Kabat.
12. Гуманизированное анти-CD37 антитело IgG1 по п.10, где указанная переменная область гуманизированной тяжелой цепи дополнительно содержит изолейцин в положении, соответствующем положению 37 по Kabat, пролин в положении, соответствующем положению 40 по Kabat, лизин в положении, соответствующем положению 43 по Kabat, серин в положении, соответствующем положению 70 по Kabat, изолейцин в положении, соответствующем положению 75 по Kabat, триптофан в положении, соответствующем положению 82 по Kabat, лизин в положении, соответствующем положению 83 по Kabat, аланин в положении, соответствующем положению 84 по Kabat, серин в положении, соответствующем положению 85 по Kabat, и метионин в положении, соответствующем положению 89 по Kabat.
13. Гуманизированное анти-CD37 антитело IgG1 по п.10, связанное с антигеном CD73.
14. Гуманизированное анти-CD37 антитело IgG1 по п.13, где указанный антиген CD73 формирует часть клетки.
15. Гуманизированное анти-CD37 антитело IgG1 по п.14, где указанная клетка представляет собой злокачественную клетку.
16. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая гуманизированное анти-CD37 антитело IgG1 по п.10.
17. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество гуманизированного анти-CD37 антитела IgG1 по п.10 и фармацевтически приемлемый наполнитель.
18. Способ лечения злокачественной опухоли у пациента, где указанный способ включает введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества гуманизированного анти-CD37 антитела IgG1 по п.10, таким образом проводя лечение злокачественной опухоли у указанного пациента.



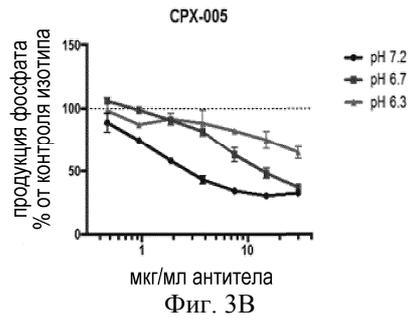
Фиг. 1



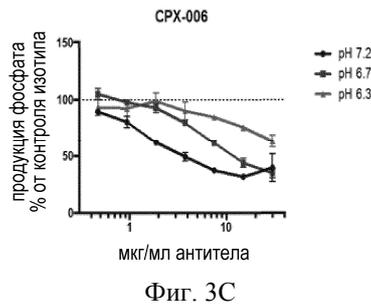
Фиг. 2



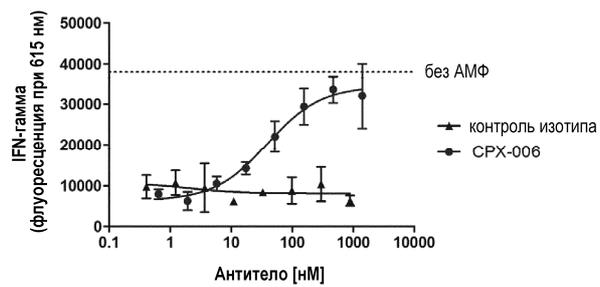
Фиг. 3А



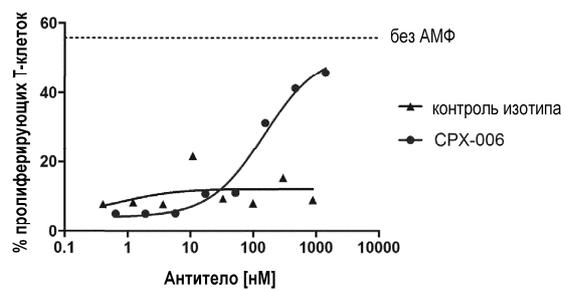
Фиг. 3В



Фиг. 3С



Фиг. 6



Фиг. 7

