# (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2023.05.05

(21) Номер заявки

202092121

(22) Дата подачи заявки

2019.03.05

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01) **C07K 16/30** (2006.01) A61K 39/395 (2006.01) **G01N 33/577** (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)

## (54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD73 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/640,955; 62/721,044; 62/786,598

(32)2018.03.09; 2018.08.22; 2018.12.31

(33)US

(43) 2020.12.16

(86) PCT/US2019/020688

(87) WO 2019/173291 2019.09.12

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ФЕЙНЗ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

**(72)** Изобретатель:

Ван Минхань, Цзоу Хой, Пэй Фэнь (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

**(56)** WO-A1-2017100670

ANTONIOLI et al. "Anti-CD73 in Cancer Immunotherapy: Awakening New Opportunities", Trends in Cancer, 01 February 2016 (01.02.2016), Vol. 2, Iss. 2, Pgs. 95-109, entire document

WO-A2-2016081748 WO-A1-2016055609

GEOGHEGAN et al. "Inhibition of CD73 AMP hydrolysis by a therapeutic antibody with a dual, non-competitive mechanism of action", MAbs, 08 February 2016 (08.02.2016), Vol. 8, No. 3, Pgs. 454-467, entire document

US-A1-20160129108

В изобретении описаны антитела против СD73 и их антигенсвязывающие фрагменты. (57) В изобретении описаны также нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, композиции, содержащие антитела, и способы получения антител и применения антител для лечения или предотвращения заболеваний, таких как злокачественная опухоль.

## Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной патентной заявки США No. 62/640955, поданной 9 марта 2018 г.; предварительной заявки США No. 62/721044, поданной 22 августа 2018 г.; и предварительной заявки США No. 62/786598, поданной 31 декабря 2018 г. Полное содержание каждого описания приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

#### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам против CD73, к нуклеиновым кислотам и экспрессирующим векторам, кодирующим антитела, к рекомбинантным клеткам, содержащим векторы, и к композициям, содержащим антитела. Настоящее изобретение относится также к способам получения антител и к способам применения антител для лечения заболеваний, ассоциированных с CD73, таких как злокачественная опухоль и воспалительные заболевания и/или ассоциированные осложнения.

#### Ссылка на список последовательностей, принятый в электронной форме

Настоящая заявка содержит список последовательностей, принятый в электронной форме через EFS-Web как список последовательностей в формате ASCII с наименованием файла "689204.10WO Sequence Listing" и датой создания 24 февраля 2019 г., и имеющий размер 114 кБ. Список последовательностей, принятый через EFS-Web, составляет часть описания, и его полное содержание приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

### Уровень техники для изобретения

СD73, также известный как экто-5'-нуклеотидаза (экто-5'-NT или EC 3.1.3.5), представляет собой фосфатазу клеточной поверхности, которая катализирует дефосфорилирование внеклеточного АМФ для получения аденозина. Несмотря на то, что он представляет собой заякоренный гликофосфатидилинозитолом (GPI) белок, CD73 может также слущиваться с получением каталитически активной формы (Arias et al., J Cell Biol. 1997; 136(2):421-31). Физиологически, CD73 индуцируется гипоксией для контроля воспаления в участках повреждения (Bours et al., Pharmacol Ther 2006; 112:358-404). Патологически, часто обнаруживают сверхэкспрессию CD73 на регуляторных Т-клетках (Т-рег) и клетках опухолей (Paul et al., Trends Immunol 2012; 33:231-237). Увеличенная активность CD73 приводит к накоплению аденозина в микроокружении опухоли (TME).

Накапливаемые доказательства показывают, что активность СD73 в участках опухолей является одним из главных факторов, формирующих проопухолевое ТМЕ, которое является критическим для роста и выживаемости опухолей (Whiteside, Expert Rev. Anticancer Ther. 2017; 17(6):527-35). Внеклеточный гомеостаз АТФ-аденозина определяют по активности CD39, превращающего АТФ в АМФ, и CD73, использующего АМФ для получения аденозина. Посредством связывания рецепторов аденозина А2а и А2b, аденозин супрессирует как врожденный, так и адаптивный иммунитет посредством регуляции множества иммуноцитов, таких как макрофаги (Csoka et al., FASEB J 2012; 26:376-386), дендритные клетки (Panther et al., Blood 2003; 101:3985-3990), клетки естественные киллеры (Hausler et al., Cancer Immunol Immunother 2011; 60:1405-1418) и эффекторные Т-клетки (Hoskin et al., Int J Oncol 2008; 32:527-535). Таким образом, выдвинута гипотеза, что иммуносупрессию посредством аденозина можно уменьшать посредством ингибирования ферментной активности СD73 в ТМЕ. Действительно, исследования на животных in vivo (Jin et al., Cancer Res 2010; 70:2245-2255; Stagg et al., Cancer Res 2011; 71:2890-2900) показывают, что ингибирование ферментной активности СD73 супрессирует образование и рост опухоли, что позволяет предполагать, что CD73 является многообещающей мишенью для терапии злокачественных опухолей. Моноклональные антитела, ингибирующие ферментную активность СD73 и/или уменьшающие содержание СD73 на поверхности клеток (т.е. посредством уменьшения интернализации CD73), могут являться эффективными для лечения злокачественной опухоли отдельно, в форме монотерапии, или в комбинации с другими иммуноонкологическими лекарственными средствами и/или другими типами противораковой терапии.

### Краткое изложение сущности изобретения

В одном общем аспекте, изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают CD73.

Настоящее изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из:

- (1) SEQ ID NO: 89, 90, 91, 149, 150 и 151, соответственно;
- (2) SEQ ID NO: 41, 42, 43, 101, 102 и 103, соответственно;
- (3) SEQ ID NO: 44, 45, 46, 104, 105 и 106, соответственно;
- (4) SEQ ID NO: 47, 48, 49, 107, 108 и 109, соответственно;
- (5) SEQ ID NO: 50, 51, 52, 110, 111 и 112, соответственно;
- (6) SEQ ID NO: 53, 54, 55, 113, 114 и 115, соответственно;
- (7) SEQ ID NO: 56, 57, 58, 116, 117 и 118, соответственно;
- (8) SEQ ID NO: 59, 60, 61, 119, 120 и 121, соответственно;

```
(9) SEQ ID NO: 62, 63, 64, 122, 123 и 124, соответственно; (10) SEQ ID NO: 65, 66, 67, 125, 126 и 127, соответственно; (11) SEQ ID NO: 68, 69, 70, 128, 129 и 130, соответственно; (12) SEQ ID NO: 71, 72, 73, 131, 132 и 133, соответственно; (13) SEQ ID NO: 74, 75, 76, 134, 135 и 136, соответственно; (14) SEQ ID NO: 77, 78, 79, 137, 138 и 139, соответственно; (15) SEQ ID NO: 80, 81, 82, 140, 141 и 142, соответственно; (16) SEQ ID NO: 83, 84, 85, 143, 144 и 145, соответственно; (17) SEQ ID NO: 86, 87, 88, 146, 147 и 148, соответственно; (18) SEQ ID NO: 92, 93, 94, 152, 153 и 154, соответственно; (19) SEQ ID NO: 95, 96, 97, 155, 156 и 157, соответственно; или (20) SEQ ID NO: 98, 99, 100, 158, 159 и 160, соответственно;
```

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает CD73, предпочтительно, CD73 человека.

Настоящее изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из:

```
(1) SEO ID NO: 209, 210, 211, 269, 270 и 271, соответственно;
(2) SEQ ID NO: 161, 162, 163, 221, 222 и 223, соответственно;
(3) SEQ ID NO: 164, 165, 166, 224, 225 и 226, соответственно;
(4) SEQ ID NO: 167, 168, 169, 227, 228 и 229, соответственно;
(5) SEQ ID NO: 170, 171, 172, 230, 231 и 232, соответственно;
(6) SEQ ID NO: 173, 174, 175, 233, 234 и 235, соответственно;
(7) SEQ ID NO: 176, 177, 178, 236, 237 и 238, соответственно;
(8) SEQ ID NO: 179, 180, 181, 239, 240 и 241, соответственно;
(9) SEQ ID NO: 182, 183, 184, 242, 243 и 244, соответственно;
(10) SEQ ID NO: 185, 186, 187, 245, 246 и 247, соответственно;
(11) SEQ ID NO: 188, 189, 190, 248, 249 и 250, соответственно;
(12) SEQ ID NO: 191, 192, 193, 251, 252 и 253, соответственно;
(13) SEQ ID NO: 194, 195, 196, 254, 255 и 256, соответственно;
(14) SEQ ID NO: 197, 198, 199, 257, 258 и 259, соответственно;
(15) SEQ ID NO: 200, 201, 202, 260, 261 и 262, соответственно;
(16) SEQ ID NO: 203, 204, 205, 263, 264 и 265, соответственно;
(17) SEQ ID NO: 206, 207, 208, 266, 267 и 268, соответственно;
(18) SEQ ID NO: 212, 213, 214, 272, 273 и 274, соответственно;
(19) SEQ ID NO: 215, 216, 217, 275, 276 и 277, соответственно; или
(20) SEQ ID NO: 218, 219, 220, 278, 279 и 280, соответственно;
```

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает CD73, предпочтительно, CD73 человека.

В конкретных вариантах осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 33, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 35, 37 или 39, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 34, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36, 38 или 40.

В конкретных вариантах осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- (a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 33, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 34:
- (b) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 2;
- (c) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 4;
- (d) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 5, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 6;

- (e) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 8;
- (f) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 9, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 10;
- (g) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 12:
- (h) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 14:
- (i) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 15, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 16:
- (j) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 18:
- (k) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 19, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 20:
- (l) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 21, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 22;
- (m) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 23, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 24:
- (n) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 25, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 26;
- (о) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 27, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 28;
- (р) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 29, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 30;
- (q) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 31, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 32:
- (г) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 35, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 36:
- (s) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 37, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 38; или
- (t) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 39, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 40.

В конкретных вариантах осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует ферментную активность растворимого и/или связанного с поверхностью клеток CD73.

В конкретных вариантах осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент предотвращает димеризацию CD73.

В конкретных вариантах осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцирует интернализацию CD73.

В конкретных вариантах осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

В конкретных вариантах осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным.

В конкретных вариантах осуществления, гуманизированное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(1) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID

- NO: 286, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 293:
- (2) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 282, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 290:
- (3) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 282, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 291:
- (4) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 282, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 292:
- (5) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 283, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 290:
- (6) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 283, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 291:
- (7) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 283, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 292:
- (8) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 284, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 290:
- (9) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 284, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 291;
- (10) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 284, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 292:
- (11) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 285, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 290;
- (12) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 285, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 291;
- (13) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 285, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 292:
- (14) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 283, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 293:
- (15) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 284, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 293;
- (16) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 285, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 293;
- (17) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 286, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 290;
- (18) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 286, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 291:
- (19) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 286, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 292.
- (20) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 287, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 294;
- (21) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 288, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 294;

- (22) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 289, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 294;
- (23) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 284, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 299;
- (24) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 295, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 299:
- (25) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 296, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 299;
- (26) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 297, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 299; или
- (27) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 298, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 299.

В конкретных вариантах осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является способным активировать Т-клетки.

Настоящее изобретение относится также к выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению, описанному в настоящем описании.

Настоящее изобретение относится также к векторам, содержащим выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению.

Настоящее изобретение относится также к клеткам-хозяевам, содержащим векторы, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение относится также к способам ингибирования активности нуклеотидазы CD73 у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

Настоящее изобретение относится также к способам предотвращения димеризации CD73 у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

Настоящее изобретение относится также к способам индукции интернализации CD73 у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению.

Настоящее изобретение относится также к способам лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту фармацевтической композиции по изобретению. Злокачественная опухоль может представлять собой любую жидкую или солидную злокачественную опухоль, например, она может быть выбрана, но без ограничения, из рака легкого, рака желудка, рака ободочной кишки, печеночноклеточной карциномы, почечноклеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастазирующей меланомы, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжскинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (ММ), острого миелоидного лейкоза (АМL) и других жидких опухолей.

Настоящее изобретение относится также к способам получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающим культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продукции моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

Настоящее изобретение относится также к способам получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающим объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Настоящее изобретение относится также к способам определения уровня CD73 у субъекта. Способы включают (а) получение образца от субъекта; (b) приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению; и (c) определение уровня CD73 у субъекта. В конкретных вариантах осуществления, образец представляет собой образец ткани. Образец ткани может,

например, представлять собой образец ткани злокачественной опухоли. В конкретных вариантах осуществления, образец представляет собой образец крови.

Настоящее изобретение относится также к способам определения активности экто-5'-нуклеотидазы CD73 у субъекта, где ферментная активность может являться полностью ингибированной моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению. Способы включают (а) получение образца от субъекта; (b) приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению; и (c) определение активности экто-5'-нуклеотидазы CD73 у субъекта. В конкретных вариантах осуществления, образец представляет собой образец ткани. Образец ткани может представлять собой, например, образец ткани злокачественной опухоли. В конкретных вариантах осуществления, образец представляет собой образец крови.

#### Краткое описание чертежей

Приведенное выше краткое изложение сущности изобретения, так же как следующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения, станет лучше понятным при чтении в сочетании с прилагаемыми чертежами. Следует понимать, однако, что изобретение не ограничено точными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

На фиг. 1А и 1В показано ингибирование активности нуклеотидазы CD73 человека, иммобилизованной на планшете, посредством химерных mAb против CD73. Без антитела, реакция фермента без добавления антитела; АМРСР (аденозин-5'-(α,β-метилен)дифосфат) использовали в качестве контроля для ингибирования активности фермента.

На фиг. 2A-2E показано связывание химерных mAb против CD73 с CD73 человека в анализе ELISA. На фиг. 3 показано ингибирование активности нуклеотидазы растворимого CD73 человека посредством химерных mAb 60A9A/IgG4 и 39G8A/IgG4. Без mAb, реакция фермента без добавления антитела; без CD73, отрицательная контрольная реакция без добавления ни антитела, ни CD73.

На фиг. 4А-4D показано связывание с CD73 человека и ингибирование активности нуклеотидазы CD73 человека гуманизированным mAb 60A9-H5L4/IgG4. На фиг. 4А показано связывание гуманизированного mAb 60A9-H5L4/IgG4 с CD73 человека в анализе ELISA; химерное mAb 60A9A/IgG4 использовали в качестве контроля. На фиг. 4В показано ингибирование активности нуклеотидазы растворимого CD73 человека посредством гуманизированного mAb 60A9-H5L4/IgG4. Без mAb, реакция фермента без добавления mAb; Без CD73, реакция фермента без добавления CD73. На фиг. 4С показано ингибирование активности нуклеотидазы CD73 человека, экспрессированной на поверхности клеток A375, посредством гуманизированного mAb 60A9-H5L4/IgG4; химерное mAb 60A9A/IgG4 использовали в качестве контроля. Без mAb, реакция фермента без добавления mAb; без АМФ, реакция фермента без добавления клеток. На фиг. 4D показано ингибирование активности нуклеотидазы CD73 человека, экспрессированного на поверхности клеток A375 посредством гуманизированных mAb 60A9-H3L5/IgG4, 60A9-H5L5/IgG4, 60A9-H6L5/IgG4, 60A9-H7L5/IgG4, 60A9-H8L5/IgG4 и 60A9-H9L5/IgG4; химерное mAb 60A9A/IgG4 использовали в качестве контроля. Без mAb, реакция фермента без добавления mAb; без AMФ, реакция фермента без добавления AMФ; без клеток, реакция фермента без добавления клеток.

На фиг. 5 показано ингибирование активности нуклеотидазы CD73 в образцах сыворотки пациента посредством гуманизированного mAb против CD73 60A9-H5L4/IgG4. Без mAb, реакция фермента без добавления антитела; фон анализа, реакция фермента с добавлением 100 мкМ АМФ и 100 мкМ АТФ; срѕ, импульсов/секунду.

На фиг. 6 показана активация пролиферации Т-клетки посредством гуманизированного mAb против CD73 60A9-H5L4/IgG4.

#### Подробное описание изобретения

Различные публикации, статьи и патенты процитированы или описаны в разделе уровень техники и на протяжении описания; полное содержание каждой из этих ссылок приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий или т.п., которое включено в настоящее описание, приведено с целью предоставления контекста по изобретению. Такое обсуждение не является признанием того, что любой или все из этих объектов составляют часть предшествующего уровня техники, применительно к любым описанным или заявленным изобретениям.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, которое является общепринятым для специалиста в области, к которой относится настоящее изобретение. В ином случае, конкретные термины, используемые в настоящем описании, имеют значения, как указано в описании.

Следует отметить, что, как используют в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают объекты ссылки множественного числа, если контекст явно не требует иного.

Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящем описании, следует понимать, как модифицированные во всех случаях термином "приблизительно". Таким образом, числовое значение, как правило, включает  $\pm 10\%$  от указанного

значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает 0,9 мг/мл - 1,1 мг/мл. Подобным образом, диапазон концентраций 1%-10% (мас./об.) включает 0,9% (мас./об.) - 11% (мас./об.). В рамках изобретения, использование числового значения явно включает все возможные поддиапазоны, все индивидуальные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дроби значений, если контекст явно не указывает на иное.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий сериям элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в сериях. Специалисту в данной области известно, или он является способным определить с использованием не более, чем общепринятых экспериментов, множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем описании. Такие эквиваленты предназначены для включения в изобретение.

В рамках изобретения, термины "содержит", "содержащий", "включает", "включая", "имеет", "имеетощий", "содержит" или "содержащий", или любые другие их варианты, понимают как подразумевающие включение указанного целого или группы целых, но не как исключение любого другого целого или группы целых, и они предназначены, чтобы является неисключительными или неограничивающими. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, которые включают список элементов, не обязательно ограничены только этими элементами, но могут включать другие элементы, явно не перечисленные или не присущие таким композиции, смеси, процессу, способу, изделию или устройству. Кроме того, если явно не указано обратное, "или" относится к включительному или, а не к исключительному или. Например, условие А или В удовлетворено посредством любого из следующего: А является истинным (или присутствует) и В является ложным (или не присутствует), А является ложным (или не присутствует) и В является истинным (или присутствует), и А и В оба являются истинными (или присутствуют).

В рамках изобретения, соединительный термин "и/или" между множеством перечисленных элементов понимают как включающий как индивидуальные, так и объединеные варианты. Например, когда два элемента соединены посредством "и/или", первый вариант относится к применимости первого элемента в отсутствие второго. Второй вариант относится к применимости второго элемента в отсутствие первого. Третий вариант относится к применимости первого и второго элементов совместно. Любой из этих вариантов понимают как включенный в значение, и таким образом, удовлетворяющий требованию термина "и/или", в рамках изобретения. Одновременную применимость более одного из вариантов также понимают как включенную в значение, и таким образом, удовлетворяющую требованию термина "и/или".

В рамках изобретения, термин "состоит из" или его варианты, такие как "состоят из" или "состоящий из", как используют на протяжении описания и формулы изобретения, указывает на включение любого из указанного целого или группы целых, однако на то, что никакие дополнительные целое или группа целых не могут быть добавлены к указанному способу, структуре или композиции.

В рамках изобретения, термин "в основном "состоит из" или варианты, такие как "в основном состоят из" или "в основном состоящий из", как используют на протяжении описания и формулы изобретения, указывает на включение любого из указанного целого или группы целых, и необязательное включение любого из указанного целого или группы целых, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанного способа, структуры или композиции, см. М.Р.Е.Р. § 2111.03.

В рамках изобретения, "субъект" обозначает любое животное, предпочтительно, млекопитающее, наиболее предпочтительно, человека. Термин "млекопитающее", в рамках изобретения, включает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, но без ограничения, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, человека и т.д., более предпочтительно, человека.

Термины "справа", "слева", "ниже" и "выше" обозначают направления на чертежах, на которые сделана ссылка.

Следует также понимать, что термины "приблизительно", "около", "как правило", "по существу" и подобные термины, используемые в настоящем описании, применительно к измерению или характеристике компонента предпочтительного изобретения, указывают на то, что описанное измерение/характеристика не является точной границей или параметром, и не исключают незначительных отклонений от них, которые являются функционально одинаковыми или сходными, как понятно специалисту в данной области. Как минимум, такие ссылки, включающие числовой параметр, включают отклонения, которые, с использованием математических и промышленных принципов, принятых в данной области (например, округления, ошибок измерения или других систематических ошибок, технологических допусков и т.д.), не изменяют наименьшую значащую цифру.

Термины "идентичный" или процент "идентичности", в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей (например, антитела против CD73 и кодирующие их полинуклеотиды, полипептиды CD73 и кодирующие их полинуклеотиды CD73), относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют указанный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, как измерено с использова-

нием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей, или посредством визуальной проверки.

Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность служит в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей, тестируемые и эталонные последовательности вводят в компьютер, назначают координаты подпоследовательности, при необходимости, и назначают параметры алгоритма программы сравнения последовательностей. Затем алгоритм сравнения последовательностей рассчитывает процентную идентичность последовательностей для тестируемой последовательности(последовательностей), относительно эталонной последовательности, на основании назначенных параметров программы.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, посредством алгоритма локальной гомологии Смита и Уотермана, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), посредством алгоритма выравнивания областей гомологии Нидлмана и Вунша, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), посредством способа поиска сходства Пирсона и Липмана, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), 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 визуальной проверки (см., в общем, Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

Примерами алгоритмов, пригодных для определения процентной идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описанные в Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 и Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, соответственно. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST является публично доступным через Национальный центр биотехнологической информации. 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. Т 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 затем расширяют в обоих направлениях вдоль каждой последовательности, пока кумулятивный показатель выравнивания может увеличиваться.

Кумулятивные показатели рассчитывают с использованием, для нуклеотидных последовательностей, параметров М (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, изза 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, М=5, N=-4 и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей, в программе BLASTP используют по умолчанию длину слова (W) 3 и ожидание (E) 10, и оценочную матрицу BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).

В дополнение к расчету процента идентичности последовательностей, алгоритм BLAST осуществляет также статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). 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 0,1, более предпочтительно, менее приблизительно 0,01 и наиболее предпочтительно, менее приблизительно 0,001.

Дополнительным 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, кодированного 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 гибридизуются друг с другом в строгих условиях.

В рамках изобретения, термины "ингибировать", "ингибирующий" и "ингибирование", означают уменьшение активности, ответа, состояния, заболевания или другого биологического параметра. Это может включать, но без ограничения, полное прекращение активности, ответа, состояния или заболевания. Это может также включать, например, 10% уменьшение активности, ответа, состояния или заболевания, по сравнению с природным или контрольным уровнем. Таким образом, уменьшение может составлять 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% или любой уровень уменьшения между ними, по сравнению с природными или контрольными уровнями. В качестве неограничивающего примера, антитело по изобретению может ингибировать активность нуклеотидазы белка CD73. Активность белка CD73 можно уменьшать или прекращать, по сравнению с активностью природного белка CD73. В качестве другого неограничивающего примера, антитело по изобретению может ингибировать или предотвращать димеризацию белка CD73 у субъекта. Димеризацию CD73 можно уменьшать или прекращать, по сравнению с димеризацией природного CD73.

Антитела.

Изобретение, в общем, относится к выделенным антителам против CD73, нуклеиновым кислотам и экспрессирующим векторам, кодирующим антитела, к рекомбинантным клеткам, содержащим векторы, и к композициям, содержащим антитела. Изобретение также, в общем, относится к способам получения антител и способам применения антител для лечения заболеваний, включая злокачественную опухоль. Антитела по изобретению обладают одним или несколькими желательными функциональными свойствами, включая, но без ограничения, высоко аффинное связывание с CD73, высокую специфичность для CD73, способность ингибировать активность нуклеотидазы CD73, способность предотвращать димеризацию CD73, способность индуцировать интернализацию CD73 в клетки, что приводит к уменьшению содержания CD73 на поверхности клетки, и способность ингибировать рост опухоли у нуждающихся в этом субъектов и в моделях на животных, при введении отдельно или в комбинации с другими видами противораковой терапии.

В общем аспекте, изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают CD73.

В рамках изобретения, термин "антитело" используют в широком смысле, и он включает молекулы иммуноглобулина или антитела, включая человеческие, гуманизированные, композитные и химерные антитела и фрагменты антител, которые являются моноклональными или поликлональными. Как правило, антитела представляют собой белковые или пептидные цепи, имеющие специфичность связывания для специфического антигена. Структуры антител хорошо известны. Иммуноглобулины можно приписать к пяти главным классам (т.е. IgA, IgD, IgE, IgG и IgM), в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG далее подклассифицируют как изотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Соответственно, антитела по изобретению могут принадлежать к любому из пяти главных классов или соответствующих подклассов. Предпочтительно, антитела по изобретению представляют собой IgGl, IgG2, IgG3 или IgG4. Легкие цепи антител из видов позвоночных можно приписать к одному из двух явно отличающихся типов, а именно каппа и лямбда, на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. Соответственно, антитела по изобретению могут содержать константный домен легкой цепи каппа или лямбда. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антитела по изобретению включают константные области тяжелой и/или легкой цепи из крысиных или человеческих антител. В дополнение к тяжелым и легким константным доменам, антитела содержит антигенсвязывающую область, состоящую из вариабельной области легкой цепи и вариабельной области тяжелой цепи, каждая из которых содержит три домена (т.е. определяющие комплементарность области 1-3; CDR1, CDR2 и CDR3). Домены вариабельной области легкой цепи, альтернативно обозначены как LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и домены вариабельной области тяжелой цепи альтернативно обозначены как HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

В рамках изобретения, термин "выделенное антитело" относится к антителу, которое является в основном свободным от других антител, имеющих другую антигенную специфичность (например, выделенное антитело, которое специфически связывает CD73, является в основном свободным от антител, которые не связывают CD73). Кроме того, выделенное антитело является в основном свободным от другого клеточного материала и/или химических веществ.

В рамках изобретения, термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела по изобретению можно получать посредством способа гибридомы, технологии фагового дисплея, технологии клонирования генов из отдельных лимфоцитов или способов рекомбинантной ДНК. Например, моноклональные антитела можно получать посредством гибридомы, включающей В-клетку, полученную из трансгенного не относящегося к человеку животного, такого как трансгенная мышь или крыса, имеющего геном, содержащий человеческий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи.

В рамках изобретения, термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к фрагменту антитела, например, такому как диатело, Fab, Fab',  $F(ab')_2$ , фрагмент Fv, стабилизированный дисульфидным мости-

ком фрагмент Fv (dsFv), (dsFv) $_2$ , биспецифический dsFv (dsFv-dsFv), стабилизированное дисульфидным мостиком диатело (ds диатело), одноцепочечная молекула антитела (scFv), однодоменное антитело (sdab), димер scFv (двухвалентное диатело), мультиспецифическое антитело, образованное из части антитела, содержащей одну или несколько CDR, камелизированное однодоменное антитело, наноантитело, доменное антитело, двухвалентное доменное антитело, или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не содержит полную структуру антитела. Антигенсвязывающий фрагмент является способным связываться с тем же самым антигеном, с которым связывается исходное антитело или фрагмент исходного антитела. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, константную область легкой цепи и фрагмент Fd тяжелой цепи. В соответствии с другими конкретными вариантами осуществления, антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab и F(ab').

В рамках изобретения, термин "одноцепочечное антитело" относится к общепринятому в данной области одноцепочечному антителу, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, соединенные коротким пептидом из от приблизительно 15 до приблизительно 20 аминокислот. В рамках изобретения, термин "однодоменное антитело" относится к общепринятому в данной области однодоменному антителу, которое содержит вариабельную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, или которое содержит только вариабельную область тяжелой цепи.

В рамках изобретения, термин "человеческое антитело" относится к антителу, продуцируемому человеком, или к антителу, имеющему аминокислотную последовательность, соответствующую антителу, продуцируемому человеком, полученному с использованием любого способа, известного в данной области. Это определение человеческого антитела включает интактные или полноразмерные антитела, их фрагменты и/или антитела, содержащие по меньшей мере один полипептид человеческой тяжелой и/или легкой цепи.

В рамках изобретения, термин "гуманизированное антитело" относится к не относящемуся к человеку антителу, модифицированному для увеличения гомологии последовательности с последовательностью человеческого антитела, таким образом, чтобы антигенсвязывающие свойства антитела сохранялись, но его антигенность в организме человека уменьшалась.

В рамках изобретения, термин "химерное антитело" относится к антителу, где аминокислотная последовательность молекулы иммуноглобулина происходит из двух или более видов. Вариабельная область как легкой, так и тяжелой цепей, часто соответствует вариабельной области антитела, происходящего из одного вида млекопитающего (например, мыши, крысы, кролика и т.д.), имеющего желательную специфичность, аффинность и емкость, в то время как константные области соответствуют последовательностям антитела, происходящим из другого вида животного (например, человека), чтобы исключить вызов иммунного ответа у этого вида.

В рамках изобретения, термин "мультиспецифическое антитело" относится к антителу, содержащему множество последовательностей вариабельного домена иммуноглобулина, где последовательность первого вариабельного домена иммуноглобулина из множества имеет специфичность связывания для первого эпитопа, и последовательность второго вариабельного домена иммуноглобулина из множества имеет специфичность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы перекрываются или в основном перекрываются. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на различных антигенах, например, на различных белках (или на различных субъединицах мультимерного белка). В одном варианте осуществления, мультиспецифическое антитело содержит третий, четвертый или пятый вариабельный домен иммуноглобулина. В одном варианте осуществления, мультиспецифическое антитела, молекулу триспецифического антитела, или молекулу тетраспецифического антитела.

В рамках изобретения, термин "биспецифическое антитело" относится к мультиспецифическому антителу, связывающему не более двух эпитопов или двух антигенов. Биспецифическое антитело характеризуется последовательностью первого вариабельного домена иммуноглобулина, имеющего специфичность связывания для первого эпитопа, и последовательностью второго вариабельного домена иммуноглобулина, имеющего специфичность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы перекрываются или в основном перекрываются. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на различных антигенах, например, на различных белках (или на различных субъединицах мультимерного белка). В одном варианте осуществления, биспецифическое антитело содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, имеющие специфичность связывания для первого эпитопа, и последовательность вариабельного домена тяжелой цепи и последовательность вариабельного домена легкой цепи, имеющие специфичность связывания для первого эпитопа, и последовательность вариабельного домена легкой цепи, имеющие специфичность связывания для первого эпитопа, и последовательность вариабельного домена легкой цепи, имеющие специфичность связывания для первого эпитопа, и последовательность вариабельного домена легкой цепи, имеющие специфичность связывания для первого эпитопа, и последовательность вариабельного домена легкой цепи, имеющие специфичность связывания для первого эпитопа, и последовательность вариабельного домена легкой цепи, имеющие специфичность связывания для первого эпитопа, и последовательность вариабельного домена легкой цепи, имеющие специфичность связывания для первого эпитопа.

ность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления, биспецифическое антитело содержит полуантитело или его фрагмент, имеющие специфичность связывания для первого эпитопа, и полуантитело или его фрагмент, имеющие специфичность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления, биспецифическое антитело содержит scFv или его фрагмент, имеющие специфичность связывания для первого эпитопа, и scFv или его фрагмент, имеющие специфичность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления, первый эпитоп локализован на CD73, и второй эпитоп локализован на PD-1, PD-L1, TIM-3, LAG-3, CD47, CD3, апелине, клаудине 18.2, DLL3, рецепторе фолата альфа (FR $\alpha$ ), TIP-1, CTLA-4, EGFR, HER-2, CD19, CD20, CD33 и/или других опухолеассоциированных иммуносупрессорах или поверхностных антигенах.

В рамках изобретения, термин "CD73" относится к экто-5'-нуклеотидазе (экто-5'-NT или EC 3.1.3.5), фосфатазе клеточной поверхности, которая катализирует дефосфорилирование внеклеточного АМФ для получения аденозина. Физиологически, СD73 индуцируется гипоксией для контроля воспаления в участках повреждения (Bours et al., Pharmacol Ther 2006; 112:358-404). Патологически, часто обнаруживают сверхэкспрессию CD73 на регуляторных Т-клетках (T-per) и клетках опухолей (Paul et al., Trends Immunol 2012; 33:231-237). Увеличенная активность CD73 приводит к накоплению аденозина в микроокружении опухоли (ТМЕ). Посредством связывания рецепторов аденозина A2a и A2b, аденозин супрессирует как врожденный, так и адаптивный иммунитет посредством регуляции множества иммуноцитов, таких как макрофаги (Csoka et al., FASEB J 2012; 26:376-386), дендритные клетки (Panther et al., Blood 2003; 101:3985-3990), клетки естественные киллеры (Hausler et al., Cancer Immunol Immunother 2011; 60:1405-1418) и эффекторные Т-клетки (Hoskin et al., Int J Oncol 2008; 32:527-535). Таким образом, выдвинута гипотеза, что иммуносупрессию посредством аденозина можно уменьшать посредством ингибирования ферментной активности CD73 в ТМЕ. Действительно, исследования на животных in vivo (Jin et al., Cancer Res 2010; 70:2245-2255; Stagg et al., Cancer Res 2011; 71:2890-2900) показывают, что ингибирование ферментной активности CD73 супрессирует образование и рост опухоли, что позволяет предполагать, что CD73 является многообещающей мишенью для терапии злокачественных опухолей. Термин "CD73 человека" относится к СD73, происходящему из человека. Иллюстративная аминокислотная последовательность CD73 человека представлена под No. доступа в GenBank P21589.1 (SEQ ID NO: 281).

В рамках изобретения, антитело, которое "специфически связывает CD73", относится к антителу, которое связывает CD73, предпочтительно, CD73 человека, с KD  $1\times10^{-7}$  M или менее, предпочтительно,  $1\times10^{-8}$  M или менее, более предпочтительно,  $5\times10^{-9}$  M или менее,  $1\times10^{-9}$  M или менее,  $5\times10^{-10}$  M или менее,  $5\times10^{-10}$  M или менее, или  $1\times10^{-10}$  M или менее. Термин "KD" относится к константе диссоциации, которая получена из отношения Kd к Ka (т.е. Kd/Ka) и выражена как молярная концентрация (M). Значения KD для антитела можно определять с использованием принятых в данной области способов, в свете настоящего описания. Например, KD антитела можно определять с использованием поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием системы биосенсора, например, системы Віасоге®, или с использованием технологии интерферометрии биослоя, например, системы Octet RED96.

Чем меньше значение KD антитела, тем выше аффинность, с которой антитело связывается с антигеном-мишенью.

В соответствии с конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из:

```
(1) SEQ ID NO: 89, 90, 91, 149, 150 и 151, соответственно;
(2) SEQ ID NO: 41, 42, 43, 101, 102 и 103, соответственно;
(3) SEO ID NO: 44, 45, 46, 104, 105 и 106, соответственно;
(4) SEO ID NO: 47, 48, 49, 107, 108 и 109, соответственно;
(5) SEQ ID NO: 50, 51, 52, 110, 111 и 112, соответственно;
(6) SEO ID NO: 53, 54, 55, 113, 114 и 115, соответственно;
(7) SEQ ID NO: 56, 57, 58, 116, 117 и 118, соответственно;
(8) SEQ ID NO: 59, 60, 61, 119, 120 и 121, соответственно;
(9) SEQ ID NO: 62, 63, 64, 122, 123 и 124, соответственно;
(10) SEQ ID NO: 65, 66, 67, 125, 126 и 127, соответственно;
(11) SEQ ID NO: 68, 69, 70, 128, 129 и 130, соответственно;
(12) SEQ ID NO: 71, 72, 73, 131, 132 и 133, соответственно;
(13) SEQ ID NO: 74, 75, 76, 134, 135 и 136, соответственно;
(14) SEQ ID NO: 77, 78, 79, 137, 138 и 139, соответственно;
(15) SEQ ID NO: 80, 81, 82, 140, 141 и 142, соответственно;
(16) SEQ ID NO: 83, 84, 85, 143, 144 и 145, соответственно;
(17) SEQ ID NO: 86, 87, 88, 146, 147 и 148, соответственно;
(18) SEQ ID NO: 92, 93, 94, 152, 153 и 154, соответственно;
(19) SEQ ID NO: 95, 96, 97, 155, 156 и 157, соответственно; или
```

(20) SEQ ID NO: 98, 99, 100, 158, 159 и 160, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает CD73, предпочтительно, CD73 человека.

В соответствии с конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из:

```
(1) SEQ ID NO: 209, 210, 211, 269, 270 и 271, соответственно;
(2) SEQ ID NO: 161, 162, 163, 221, 222 и 223, соответственно;
(3) SEQ ID NO: 164, 165, 166, 224, 225 и 226, соответственно;
(4) SEQ ID NO: 167, 168, 169, 227, 228 и 229, соответственно;
(5) SEQ ID NO: 170, 171, 172, 230, 231 и 232, соответственно;
(6) SEQ ID NO: 173, 174, 175, 233, 234 и 235, соответственно;
(7) SEQ ID NO: 176, 177, 178, 236, 237 и 238, соответственно;
(8) SEQ ID NO: 179, 180, 181, 239, 240 и 241, соответственно;
(9) SEQ ID NO: 182, 183, 184, 242, 243 и 244, соответственно;
(10) SEQ ID NO: 185, 186, 187, 245, 246 и 247, соответственно;
(11) SEO ID NO: 188, 189, 190, 248, 249 и 250, соответственно;
(12) SEO ID NO: 191, 192, 193, 251, 252 и 253, соответственно;
(13) SEQ ID NO: 194, 195, 196, 254, 255 и 256, соответственно;
(14) SEQ ID NO: 197, 198, 199, 257, 258 и 259, соответственно;
(15) SEQ ID NO: 200, 201, 202, 260, 261 и 262, соответственно;
(16) SEQ ID NO: 203, 204, 205, 263, 264 и 265, соответственно;
(17) SEQ ID NO: 206, 207, 208, 266, 267 и 268, соответственно;
(18) SEQ ID NO: 212, 213, 214, 272, 273 и 274, соответственно;
(19) SEQ ID NO: 215, 216, 217, 275, 276 и 277, соответственно; или
(20) SEQ ID NO: 218, 219, 220, 278, 279 и 280, соответственно;
```

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает CD73, предпочтительно, CD73 человека.

В соответствии с другим конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную одной из SEQ ID NO: 33, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 35, 37 или 39, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную одной из SEQ ID NO: 34, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36, 38 или 40. В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 33, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 35, 37 или 39, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 34, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36, 38 или 40, соответственно.

В соответствии с другим конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по изобретению, содержащему:

- (1) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 33, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 34;
- (2) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 2:
- (3) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 4;
- (4) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 5, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 6;
- (5) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 8;

- (6) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 9, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 10;
- (7) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 12:
- (8) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 14:
- (9) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 15, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 16:
- (10) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 18;
- (11) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 19, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 20:
- (12) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 21, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 22;
- (13) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 23, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 24;
- (14) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 25, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 26:
- (15) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 27, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 28;
- (16) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 29, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 30;
- (17) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 31, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 32:
- (18) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 35, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 36:
- (19) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 37, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 38; или
- (20) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 39, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 40.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 41, 42, 43, 101, 102 и 103, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 1, и а вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 2. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент сотргізеs вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 1; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 2.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 44, 45, 46, 104, 105 и 106, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвя-

зывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 4. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 3; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 4.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 47, 48, 49, 107, 108 и 109, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 5, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 6. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 5; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 5; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 6.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 50, 51, 52, 110, 111 и 112, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 8. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 7; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 8.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 53, 54, 55, 113, 114 и 115, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 9, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 10. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 9; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 10.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 56, 57, 58, 116, 117 и 118, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 12. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 11; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 12.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и

LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 59, 60, 61, 119, 120 и 121, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 14. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 13; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 14.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 62, 63, 64, 122, 123 и 124, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 15, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 16. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 15; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 16.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 65, 66, 67, 125, 126 и 127, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 18. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 17; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 18.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 68, 69, 70, 128, 129 и 130, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 19, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 20. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 19; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 20.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 71, 72, 73, 131, 132 и 133, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 21, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 22. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 21; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 22.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 74, 75, 76, 134, 135 и 136, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 23, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 24. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 23; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 24.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 77, 78, 79, 137, 138 и 139, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 25, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 26. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 25; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 26.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 80, 81, 82, 140, 141 и 142, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 27, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 28. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 27; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 28.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 83, 84, 85, 143, 144 и 145, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 29, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 30. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 29; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 30.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 86, 87, 88, 146, 147 и 148, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 31, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 32. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязываю-

щий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 31; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 32.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 89, 90, 91, 149, 150 и 151, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 33, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 34. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 33; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 34.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 92, 93, 94, 152, 153 и 154, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 35, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 36. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент сотргізез вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 35; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 36.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 95, 96, 97, 155, 156 и 157, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 37, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 38. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 37; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 38.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 98, 99, 100, 158, 159 и 160, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 39, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 40. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 39; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 40.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 161, 162, 163, 221, 222 и 223, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 1, и вариабельную об-

ласть легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 2. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 1; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 2.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 164, 165, 166, 224, 225 и 226, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 4. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 3; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 4.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 167, 168, 169, 227, 228 и 229, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 5, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 6. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 5; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 6.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 170, 171, 172, 230, 231 и 232, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 8. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 7; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 8.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 173, 174, 175, 233, 234 и 235, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 9, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 10. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 9; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 10.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 176, 177, 178, 236, 237 и 238, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антиген-

связывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 12. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 11; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 12.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 179, 180, 181, 239, 240 и 241, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 14. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 13; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 14.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 182, 183, 184, 242, 243 и 244, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 15, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 16. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 15; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 16.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 185, 186, 187, 245, 246 и 247, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 18. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 17; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 18.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 188, 189, 190, 248, 249 и 250, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 19, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 20. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 19; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 20.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и

LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 191, 192, 193, 251, 252 и 253, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 21, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 22. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 21; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 22.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 194, 195, 196, 254, 255 и 256, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 23, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 24. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 23; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 24.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 197, 198, 199, 257, 258 и 259, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 25, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 26. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 25; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 26.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 200, 201, 202, 260, 261 и 262, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 27, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 28. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 27; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 28.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 203, 204, 205, 263, 264 и 265, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 29, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 30. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 29; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 30.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 206, 207, 208, 266, 267 и 268, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 31, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 32. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 31; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 32.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 209, 210, 211, 269, 270 и 271, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 33, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 34. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 33; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 34.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 212, 213, 214, 272, 273 и 274, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 35, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 36. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 35; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 36.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 215, 216, 217, 275, 276 и 277, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 37, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 38. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 37; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 38.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 218, 219, 220, 278, 279 и 280, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 39, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 40. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой

цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 39; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 40.

В соответствии с другим конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по изобретению, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует ферментную активность растворимого и/или связанного с поверхностью клеток CD73. CD73 представляет собой заякоренный гликофосфатидилинозитолом (GPI) белок на поверхности клеток; он может также слущиваться с получением каталитически активной формы в растворе (Arias et al., J Cell Biol. 1997; 136(2):421-31). В настоящем описании, CD73 поверхности клеток относится к CD73 на поверхности клеток, заякоренному посредством GPI; растворимый CD73 относится к тому, который слущивается с поверхности клеток и является каталитически активным в растворе.

В соответствии с другим конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по изобретению, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент предотвращает димеризацию CD73. В рамках изобретения, "димеризация" относится к формированию димера CD73 из двух субъединиц. Предотвращение димеризации CD73 относится к блокированию или ингибированию формирования димера CD73.

В соответствии с другим конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по изобретению, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцирует интернализацю CD73. В рамках изобретения, "интернализация CD73" относится к продвижению белка CD73 от поверхности клетки к внутренним областям клетки.

В соответствии с другим конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по изобретению, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является способным активировать Т-клетки посредством ингибирования активности нуклеотидазы CD73 и таким образом, уменьшения уровня аденозина.

В соответствии с другим конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по изобретению, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

В соответствии с другим конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по изобретению, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным.

В соответствии с другим конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному гуманизированному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, где выделенное гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- (1) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 286, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 293;
- (2) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 282, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 290:
- (3) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 282, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 291:
- (4) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 282, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 292;
- (5) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 283, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 290;
- (6) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 283, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 291;
- (7) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 283, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 292:
- (8) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 284, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 290:
- (9) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 284, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 291;
- (10) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 284, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 292;

- (11) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 285, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 290:
- (12) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 285, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 291;
- (13) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 285, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 292:
- (14) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 283, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 293;
- (15) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 284, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 293;
- (16) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 285, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 293.
- (17) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 286, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 290:
- (18) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 286, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 291;
- (19) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 286, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 292:
- (20) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 287, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 294;
- (21) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 288, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 294;
- (22) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 289, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 294;
- (23) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 284, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO:  $299^{\circ}$
- (24) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 295, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 299:
- (25) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 296, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 299;
- (26) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 297, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 299; или
- (27) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 298, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 299.

В другом общем аспекте, изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Специалисту в данной области понятно, что кодирующую последовательность белка можно изменять (например, заменять, делетировать, вставлять и т.д.) без изменения аминокислотной последовательности белка. Соответственно, специалисту в данной области понятно, что последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению, можно изменять без изменения аминокислотных последовательностей белков.

В другом общем аспекте, изобретение относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Можно использовать любой вектор, известный специалисту в данной области в свете настоящего описания, такой как плазмида, космида, фаговый вектор или вирусный вектор. В некоторых вариантах

осуществления, вектор представляет собой рекомбинантный экспрессирующий вектор, такой как плазмида. Вектор может включать любой элемент для осуществления общепринятой функции экспрессирующего вектора, например, промотор, элемент для связывания рибосомы, терминатор, энхансер, селективный маркер и точку начала репликации. Промотор может представлять собой конститутивный, индуцируемый или репрессируемый промотор. Ряд экспрессирующих векторов, способных к доставке нуклеиновых кислот в клетку, известны в данной области и могут быть использованы в настоящем описании для продукции антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клетке. Общепринятые способы клонирования или искусственный синтез генов можно использовать для получения рекомбинантного экспрессирующего вектора в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

В другом общем аспекте, изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Любую клетку-хозяина, известную специалисту в данной области в свете настоящего описания, можно использовать для рекомбинантной экспрессии антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению. В некоторых вариантах осуществления, клетки-хозяева представляют собой клетки Е. coli TG1 или BL21 (для экспрессии, например, scFv или Fab антитела), клетки CHO-DG44 или CHO-K1, или HEK293 (для экспрессии, например, полноразмерного антитела IgG). В соответствии с конкретными вариантами осуществления, рекомбинантным экспрессирующим вектором трансформируют клетки-хозяева общепринятыми способами, такими как химическая трансфекция, тепловой шок или электропорация, где он стабильно интегрирует в геном клетки-хозяина, таким образом, чтобы рекомбинантная нуклеиновая кислота эффективно экспрессировалась.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающему культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продукции моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры клеток (например, из супернатанта). Экспрессированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно собирать из клеток и очищать в соответствии с общепринятыми способами, известными в данной области, и как описано в настоящем описании.

Фармацевтические композиции.

В другом общем аспекте, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Термин "фармацевтическая композиция", в рамках изобретения обозначает продукт, содержащий антитело по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Антитела по изобретению и содержащие их композиции также можно использовать в изготовлении лекарственного средства для терапевтических применений, упомянутых в настоящем описании.

В рамках изобретения, термин "носитель" относится к любому расширителю, разбавителю, наполнителю, соли, буферу, стабилизатору, солюбилизатору, маслу, липиду, содержащей липид везикуле, микросфере, липосомной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области для использования в фармацевтических составах. Понятно, что характеристики носителя, наполнителя или разбавителя могут зависеть от способа введения для конкретного применения. В рамках изобретения, термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к нетоксичному материалу, который не создает помех для эффективности композиции по изобретению или для биологической активности композиции по изобретению. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, в свете настоящего описания, любой фармацевтически приемлемый носитель, пригодный для использования в фармацевтической композиции антитела, можно использовать по изобретению.

Получение состава фармацевтически активных ингредиентов с фармацевтически приемлемыми носителями известно в данной области, например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (например, 21st edition (2005), и любые более поздние издания). Неограничивающие примеры дополнительных ингредиентов включают: буферы, разбавители, растворители, регулирующие тоничность средства, консерванты, стабилизаторы и хелатирующие агенты. Один или несколько фармацевтически приемлемых носителей можно использовать в составлении фармацевтических композиций по изобретению.

В одном варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция представляет собой жидкий состав. Предпочтительным примером жидкого состава является водный состав, т.е. состав, содержащий воду. Жидкий состав может содержать раствор, суспензию, эмульсию, микроэмульсию, гель и т.п. Водный состав, как правило, содержит по меньшей мере 50% мас./мас., воды или по меньшей мере 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, или по меньшей мере 95% мас./мас., воды.

В одном варианте осуществления, фармацевтическую композицию можно составлять в инъецируемой форме, которую можно инъецировать, например, посредством устройства для инъекции (например, шприца или инфузионного насоса). Инъекцию можно вводить, например, подкожно, внутримышечно, внутрибрюшинно, в стекловидное тело или внутривенно.

В другом варианте осуществления, фармацевтическая композиция представляет собой твердый состав, например, лиофилизированную или высушенную распылением композицию, которую можно ис-

пользовать как есть, или в которую терапевт или пациент добавляет растворители и/или разбавители перед использованием. Твердые лекарственные формы могут включать таблетки, такие как прессованные таблетки, и/или покрытые таблетки, и капсулы (например, твердые или мягкие желатиновые капсулы). Фармацевтическая композиция может также находиться в форме, например, саше, драже, порошков, гранул, пастилок или порошков для разведения.

Лекарственные формы могут иметь немедленное высвобождение, в этом случае, они могут содержать водорастворимый или диспергируемый носитель, или они могут иметь отсроченное высвобождение, замедленное высвобождение или модифицированное высвобождение, в этом случае, они могут содержать нерастворимые в воде полимеры, которые регулируют скорость растворения лекарственной формы в желудочно-кишечном тракте или под кожей.

В других вариантах осуществления, фармацевтическую композицию можно доставлять интраназально, интрабуккально или подъязычно.

рН в водном составе может составлять между рН 3 и рН 10. В одном варианте осуществления изобретения, рН состава составляет от приблизительно 7,0 до приблизительно 9,5. В другом варианте осуществления изобретения, рН состава составляет от приблизительно 3,0 до приблизительно 7,0.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит буфер. Неограничивающие примеры буферов включают: аргинин, аспарагиновую кислоту, бицин, цитрат, гидрофосфат динатрия, фумаровую кислоту, глицин, глицилглицин, гистидин, лизин, малеиновую кислоту, яблочную кислоту, ацетат натрия, карбонат натрия, дигидрофосфат натрия, фосфат натрия, сукцинат, виннокаменную кислоту, трицин и трис(гидроксиметил)аминометан, и их смеси. Буфер может быть представлен индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,01 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, например, от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных буферов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит консервант. Неограничивающие примеры консервантов включают: хлорид бензэтония, бензойную кислоту, бензиловый спирт, бронопол, бутил-4-гидроксибензоат, хлорбутанол, хлоркрезол, хлоргексидин, хлорфенезин, о-крезол, м-крезол, п-крезол, этил-4-гидроксибензоат, имидомочевину, метил-4-гидроксибензоат, фенол, 2-феноксиэтанол, 2-фенилэтанол, пропил-4-гидроксибензоат, дегидроацетат натрия, тиомеросал и их смеси. Консервант может быть представлен индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,01 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, например, от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных консервантов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит изотоническое средство. Неограничивающие примеры изотонических средств включают соль (такую как хлорид натрия), аминокислоту (такую как глицин, гистидин, аргинин, лизин, изолейцин, аспарагиновая кислота, триптофан и треонин), альдит (такой как глицерин, 1,2-пропандиол пропиленгликоль), 1,3-пропандиол и 1,3-бутандиол), полиэтиленгликоль (например, PEG400) и их смеси. Другой пример изотонического средства включает сахар. Неограничивающие примеры сахаров могут представлять собой моно-, ди- или полисахариды, или водорастворимые глюканы, включая, например, фруктозу, глюкозу, маннозу, сорбозу, ксилозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, трегалозу, декстран, пуллулан, декстрин, циклодекстрин, альфа и бета-НРСD, растворимый крахмал, гидроксиэтилкрахмал и карбоксиметилцеллюлозу натрия. Другим примером изотонического средства является сахарный спирт, где термин "сахарный спирт" определяют как С(4-8)углеводород, имеющий по меньшей мере одну -ОН-группу. Неограничивающие примеры сахарных спиртов включают маннит, сорбит, инозитол, галактит, дульцит, ксилит и арабит. Изотоническое средство может быть представлено индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,01 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, например, от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждое из этих конкретных изотонических средств, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит хелатирующий агент. Неограничивающие примеры хелатирующих агентов включают лимонную кислоту, аспарагиновую кислоту, соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и их смеси. Хелатирующий агент может быть представлен индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,01 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, например, от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных хелатирующих агентов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит стабилизатор. Неограничивающие примеры стабилизаторов включают один или несколько ингибиторов агрегации, один или несколько ингибиторов окисления, одно или несколько поверхностно-активных веществ, и/или один или несколько ингибиторов протеаз.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит стабилизатор, где указанный стабилизатор представляет собой карбокси-/гидроксицеллюлозу и ее производные

(такие как HPC, HPC-SL, HPC-L и HPMC), циклодекстрины, 2-метилтиоэтанол, полиэтиленгликоль (такие как PEG 3350), поливиниловый спирт (PVA), поливинилпирролидон, соли (такие как хлорид натрия), содержащие серу вещества, такие как монотиоглицерин) или тиогликолевая кислота. Стабилизатор может быть представлен индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,01 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, например, от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных стабилизаторов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В следующих вариантах осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит одно или несколько поверхностно-активных веществ, предпочтительно, поверхностно-активное вещество, по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество или два различных поверхностно-активных вещества. Термин "поверхностно-активное вещество" относится к любым молекулам или ионам, состоящим из водорастворимой (гидрофильной) части и жирорастворимой (липофильной) части. Поверхностно-активное вещество может, например, быть выбрано из группы, состоящей из анионных поверхностно-активных веществ, катионных поверхностно-активных веществ, неионных поверхностно-активных веществ и/или цвиттерионных поверхностно-активных веществ. Поверхностно-активное вещество может быть представлено индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждое из этих конкретных поверхностно-активных веществ, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В следующем варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит один или несколько ингибиторов протеаз, например, таких как ЭДТА и/или соль бензамидина и соляной кислоты (HCl). Ингибитор протеазы может быть представлен индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных ингибиторов протеаз, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающему объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Способы применения.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу ингибирования активности нуклеотидазы CD73 у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающего CD73, или фармацевтической композиции по изобретению.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу предотвращения димеризации CD73 у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающего CD73, или фармацевтической композиции по изобретению.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу индукции интернализации CD73 у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающего CD73, или фармацевтической композиции по изобретению. Интернализация CD73 в клетке приводит к уменьшению содержания CD73 на клеточной поверхности. Уровни CD73 на клеточной поверхности можно измерять способами, известными в данной области, например, способами иммуногистохимии.

Функциональную активность антител и их антигенсвязывающих фрагментов, связывающих CD73, можно характеризовать посредством способов, известных в данной области, и как описано в настоящем описании. Клетки, экспрессирующие CD73, можно предварительно инкубировать с антителом, с последующим измерением активности нуклеотидазы CD73 на клеточной поверхности в присутствии антитела. Способы характеризации антител и их антигенсвязывающих фрагментов, связывающих CD73, включают, но без ограничения, анализы аффинности и специфичности, включая анализы Biacore, ELISA и ОстеteRed; функциональную активность mAb против CD73 можно также оценивать в анализе активности нуклеотидазы. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, способы характеризации антител и их антигенсвязывающих фрагментов, связывающих CD73, включают способы, описанные ниже.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающего CD73, или фармацевтической композиции по изобретению. Злокачественная опухоль может, например, быть выбрана, но без ограничения, из рака легкого, рака желудка, рака ободочной кишки, печеночноклеточной карциномы, почечноклеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастазирующей меланомы, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей и неходжскинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CML), множественной миеломы (ММ), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу лечения воспалительного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающего CD73, или фармацевтической композиции по изобретению.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество антитела против CD73 или его антигенсвязывающего фрагмента. В рамках изобретения, термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству активного ингредиента или компонента, вызывающему желательный биологический или медицинский ответ у субъекта. Терапевтически эффективное количество можно определять эмпирически и общепринятым образом, применительно к поставленной цели.

В рамках изобретения, применительно к антителам против CD73 или их антигенсвязывающим фрагментам, терапевтически эффективное количество обозначает количество антитела против CD73 или его антигенсвязывающего фрагмента, модулирующее ответ уменьшения опухоли у нуждающегося в этом субъекта. Также, в рамках изобретения, применительно к антителам против CD73 или их антигенсвязывающим фрагментам, терапевтически эффективное количество обозначает количество антитела против CD73 или его антигенсвязывающего фрагмента, которое приводит к лечению заболевания, нарушения или состояния; предотвращает или замедляет прогрессирование заболевания, нарушения или уменьшает или полностью облегчает симптомы, ассоциированные с заболеванием, нарушением или состоянием

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, представляет собой злокачественную опухоль, предпочтительно, злокачественную опухоль, выбранную из группы, состоящей из рака легкого, рака желудка, рака ободочной кишки, печеночноклеточной карциномы, почечноклеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастазирующей меланомы, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжскинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей. В соответствии с другими конкретными вариантами осуществления, заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, представляет собой воспалительное заболевание.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, терапевтически эффективное количество относится к количеству лекарственного средства, которое является достаточным для достижения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (і) уменьшение или облегчение тяжести заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (ii) уменьшение длительности заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (iii) предотвращение прогрессирования заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (iv) вызов регрессии заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (v) предотвращение развития или начала заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (vi) предотвращение рецидива заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (vii) уменьшение случаев госпитализации субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, или ассоциированный с ним симптом; (viii) уменьшение длительности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, или ассоциированный с ним симптом; (іх) увеличение выживаемости субъекта с заболеванием, нарушением или состоянием, подлежащим лечению, или ассоциированным с ним симптомом; (xi) ингибирование или уменьшение заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома у субъекта; и/или (xii) усиление или улучшение профилактического или терапевтического эффекта(эффектов) другой терапии.

Терапевтически эффективное количество или дозу можно менять, в соответствии с различными факторами, такими как заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, способы введения, участок-мишень, физиологическое состояние субъекта (включая, например, возраст, массу тела, общее состояние здоровья), является ли субъект человеком или животным, другие вводимые лекарственные средства, и то, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Дозы для лечения оптимально титруют для оптимизации безопасности и эффективности.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, композиции, описанные в настоящем описании, составляют, чтобы они являлись пригодными для намеченного способа введения субъекту. Например, композиции, описанные в настоящем описании, можно составлять, чтобы они являлись пригодными для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения.

В рамках изобретения, термины "лечить", "лечение" и "обработка" все предназначены для обозначения облегчения или обращения по меньшей мере одного поддающегося измерению физического параметра, относящегося к злокачественной опухоли и/или воспалительному заболеванию, нарушению или состоянию, который, необязательно, является различимым у субъекта, но может являться различимым у

субъекта. Термины "лечить", "лечение" и "обработка", могут также относится к вызову регрессии, предотвращению прогрессирования или по меньшей мере замедлению прогрессирования заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления, "лечить", "лечение" и "обработка" относятся к облегчению, предотвращению развития или начала, или уменьшению длительности одного или нескольких симптомов, ассоциированных с заболеванием, нарушением или состоянием, таким как опухоль или более предпочтительно, злокачественная опухоль. В конкретном варианте осуществления, "лечить", "лечение" и "обработка" относятся к предотвращению заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления, "лечение" и "обработка" относятся к увеличению выживаемости субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние. В конкретном варианте осуществления, "лечить", "лечение" и "обработка" относятся к прекращению заболевания, нарушения или состояния у субъекта.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, композицию по изобретению используют для лечения злокачественной опухоли и/или воспалительного заболевания, нарушения или состояния. Для терапии злокачественной опухоли, ее можно использовать в комбинации с другим лечением, включая, но без ограничения, химиотерапию, mAb против CD20, mAb против TIM-3, mAb против LAG-3, mAb против CD47, mAb против апелина, mAb против клаудина 18.2, mAb против DLL3, mAb против FRα (рецептора фолата альфа), mAb против TIP-1, mAb против CTLA-4, антитело против PD-L1, антитело против PD-1, терапию PD-1/PD-L1, другие иммуноонкологические лекарственные средства, антиангиогенное средство, радиотерапию, конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), направленную терапию или другие противораковые лекарственные средства. Антитела против CD73 можно использовать для конструирования биспецифических антител с партнерами - mAb против PD-1, PD-L1, LAG3, TIM-3, CTLA-4, EGFR, HER-2, CD19, CD20, CD33, CD47, CD3, апелина, клаудина 18.2, DLL3, TIP-1, рецептора фолата альфа (FRα) и/или других антигенов поверхности опухолей, для лечения злокачественных опухолей/опухолей, экспрессирующих как CD73, так и специфический опухолеассоциированный антиген.

В рамках изобретения, термин "в комбинации", в контексте введения двух или более терапевтических средств субъекту, относится к использованию более одного терапевтического средства. Использование термина "в комбинации" не ограничивает порядок, в котором терапевтические средства вводят субъекту. Например, первое терапевтическое средство (например, композицию, описанную в настоящем описании) можно вводить до (например, за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель до), одновременно или после (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часа, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель после) введения второго терапевтического средства субъекту.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу определения уровня CD73 у субъекта. Способы включают (а) получение образца от субъекта; (b) приведение образца в контакт с моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению; и (c) определение уровня CD73 у субъекта.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу определения активности экто-5'нуклеотидазы CD73 у субъекта, где ферментную активность можно полностью ингибировать посредством моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению. Способы включают (а) получение образца от субъекта; (b) приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению; и (c) определение активности экто-5'-нуклеотидазы CD73 у субъекта.

В рамках изобретения, "образец" относится к биологическому образцу, выделенному от субъекта, и может включать, но без ограничения, цельную кровь, сыворотку, плазму, клетки крови, эндотелиальные клетки, биоптаты ткани (например, ткани злокачественной опухоли), лимфатическую жидкость, асцитную жидкость, интерстициальную жидкость, костный мозг, спинномозговую жидкость, слюну, слизь, мокроту, пот, мочу или любой другой продукт секреции, экскреции, или другие физиологические жидкости. "Образец крови" относится к цельной крови или любой ее фракции, включая клетки крови, сыворотку и плазму

В конкретных вариантах осуществления, уровень CD73 у субъекта можно определять с использованием анализов, выбранных, но без ограничения, из анализа Вестерн-блоттинга, анализа ELISA и/или иммуногистохимии (IHC). Относительные уровни белка можно определять с использованием анализа Вестерн-блоттинга и IHC, и абсолютные уровни белка можно определять с использованием анализа ELISA. При определении относительных уровней CD73, уровни CD73 можно определять в сравнении между по меньшей мере двумя образцами, например, между образцами от одного и того же субъекта в различных временных точках, между образцами из различных тканей одного и того же субъекта и/или между образцами от различных субъектов. Альтернативно, при определении абсолютных уровней CD73, например, посредством анализа ELISA, абсолютный уровень CD73 в образце можно определять посредством полу-

чения стандарта для анализа ELISA до тестирования образца. Специалисту в данной области понятно, какие аналитические способы использовать для определения уровня CD73 в образце от субъекта с использованием антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению.

В конкретных вариантах осуществления, активность экто-5'-нуклеотидазы CD73 у субъекта можно определять с использованием анализов, известных в данной области, например, см. Geoghegan et al., MAbs 8:454-67 (2016) и Hay et al., Опсоіттипою Аug. 5(8):e1208875 (2016). Специалисту в данной области понятно, какие аналитические способы использовать для определения активности экто-5'-нуклеотидазы CD73 в образце от субъекта.

Использование способов определения уровня CD73 или уровня активности экто-5'-нуклеотидазы CD73 в образце от субъекта может приводить к диагностике аномальных (увеличенных, уменьшенных или недостаточных) уровней и/или активности CD73 при заболевании и к принятию соответствующих терапевтических решений. Такое заболевание может быть выбрано, но без ограничения, из злокачественной опухоли и/или воспалительного заболевания. Кроме того, посредством мониторирования уровней и/или активности CD73 у субъекта, риск развития заболевания, как указано выше, можно определять на основании знаний об уровне и/или активности CD73 при конкретном заболевании и/или в ходе прогрессирования конкретного заболевания.

#### Варианты осуществления

Изобретение относится также к следующим неограничивающим вариантам осуществления.

Вариант осуществления 1 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из:

```
a. SEQ ID NO: 89, 90, 91, 149, 150 и 151, соответственно;
b. SEQ ID NO: 41, 42, 43, 101, 102 и 103, соответственно;
с. SEQ ID NO: 44, 45, 46, 104, 105 и 106, соответственно;
d. SEQ ID NO: 47, 48, 49, 107, 108 и 109, соответственно;
e. SEQ ID NO: 50, 51, 52, 110, 111 и 112, соответственно;
f. SEQ ID NO: 53, 54, 55, 113, 114 и 115, соответственно;
g. SEQ ID NO: 56, 57, 58, 116, 117 и 118, соответственно;
h. SEQ ID NO: 59, 60, 61, 119, 120 и 121, соответственно;
i. SEQ ID NO: 62, 63, 64, 122, 123 и 124, соответственно;
j. SEQ ID NO: 65, 66, 67, 125, 126 и 127, соответственно;
k. SEQ ID NO: 68, 69, 70, 128, 129 и 130, соответственно;
1. SEQ ID NO: 71, 72, 73, 131, 132 и 133, соответственно;
m. SEQ ID NO: 74, 75, 76, 134, 135 и 136, соответственно;
n. SEQ ID NO: 77, 78, 79, 137, 138 и 139, соответственно;
o. SEQ ID NO: 80, 81, 82, 140, 141 и 142, соответственно;
р. SEQ ID NO: 83, 84, 85, 143, 144 и 145, соответственно;
q. SEQ ID NO: 86, 87, 88, 146, 147 и 148, соответственно;
r. SEO ID NO: 92, 93, 94, 152, 153 и 154, соответственно;
s. SEQ ID NO: 95, 96, 97, 155, 156 и 157, соответственно; или
t. SEQ ID NO: 98, 99, 100, 158, 159 и 160, соответственно;
```

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает CD73, предпочтительно, CD73 человека.

Вариант осуществления 2 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из:

```
а. SEQ ID NO: 209, 210, 211, 269, 270 и 271, соответственно; b. SEQ ID NO: 161, 162, 163, 221, 222 и 223, соответственно; c. SEQ ID NO: 164, 165, 166, 224, 225 и 226, соответственно; d. SEQ ID NO: 167, 168, 169, 227, 228 и 229, соответственно; e. SEQ ID NO: 170, 171, 172, 230, 231 и 232, соответственно; f. SEQ ID NO: 173, 174, 175, 233, 234 и 235, соответственно; g. SEQ ID NO: 176, 177, 178, 236, 237 и 238, соответственно; h. SEQ ID NO: 179, 180, 181, 239, 240 и 241, соответственно; i SEQ ID NO: 182, 183, 184, 242, 243 и 244, соответственно; j. SEQ ID NO: 185, 186, 187, 245, 246 и 247, соответственно; k. SEQ ID NO: 188, 189, 190, 248, 249 и 250, соответственно; l. SEQ ID NO: 191, 192, 193, 251, 252 и 253, соответственно; m. SEQ ID NO: 194, 195, 196, 254, 255 и 256, соответственно; n. SEQ ID NO: 197, 198, 199, 257, 258 и 259, соответственно;
```

- o. SEO ID NO: 200, 201, 202, 260, 261 и 262, соответственно;
- р. SEQ ID NO: 203, 204, 205, 263, 264 и 265, соответственно;
- q. SEQ ID NO: 206, 207, 208, 266, 267 и 268, соответственно;
- r. SEQ ID NO: 212, 213, 214, 272, 273 и 274, соответственно;
- s. SEQ ID NO: 215, 216, 217, 275, 276 и 277, соответственно; или
- t. SEQ ID NO: 218, 219, 220, 278, 279 и 280, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает CD73, предпочтительно, CD73 человека.

Вариант осуществления 3 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент из варианта осуществления 1 или 2, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 33, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 35, 37 или 39, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: <math>34, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36, 38 или 40.

Вариант осуществления 4 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-3, содержащие:

- (a) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 33, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 34;
- (b) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 2;
- (c) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 4;
- (d) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 5, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 6;
- (e) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 8;
- (f) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 9, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 10:
- (g) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 12:
- (h) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 14:
- (i) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 15, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 16;
- (j) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 18;
- (k) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 19, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 20:
- (l) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 21, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 22:
- (m) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 23, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 24;
- (n) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 25, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 26:
- (о) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 27, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 28;
  - (р) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID

- NO: 29, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 30:
- (q) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 31, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 32;
- (r) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 35, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 36:
- (s) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 37, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 38; или
- (t) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 39, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 40.

Вариант осуществления 5 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-4, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует ферментную активность растворимого и/или связанного с поверхностью клеток CD73.

Вариант осуществления 6 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-4, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент предотвращает димеризацию CD73.

Вариант осуществления 7 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-4, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцирует интернализацию CD73.

Вариант осуществления 8 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-7, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

Вариант осуществления 9 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-8, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным.

Вариант осуществления 10 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-9, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- (1) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 286, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 293;
- (2) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 282, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 290;
- (3) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 282, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 291;
- (4) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 282, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 292;
- (5) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 283, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 290;
- (6) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 283, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 291;
- (7) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 283, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 292;
- (8) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 284, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 290;
- (9) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 284, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 291:
- (10) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 284, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID

- NO: 292:
- (11) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 285, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID

NO: 290;

- (12) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 285, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 291;
- (13) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 285, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 292:
- (14) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 283, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 293:
- (15) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 284, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 293:
- (16) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 285, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 293:
- (17) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 286, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 290;
- (18) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 286, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 291;
- (19) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 286, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 292;
- (20) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 287, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 294
- (21) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 288, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 294;
- (22) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 289, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 294
- (23) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 284, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 299;
- (24) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 295, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 299:
- (25) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 296, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 299;
- (26) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 297, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 299; или
- (27) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 298, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 299.

Вариант осуществления 11 представляет собой выделенное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-10, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является способным активировать Т-клетки.

Вариант осуществления 12 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-11.

Вариант осуществления 13 представляет собой вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту из варианта осуществления 12.

Вариант осуществления 14 представляет собой клетку-хозяина, содержащую вектор из варианта осуществления 13.

Вариант осуществления 15 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую вы-

деленное моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-11 и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 16 представляет собой способ ингибирования активности нуклеотидазы CD73 у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции из варианта осуществления 15.

Вариант осуществления 17 представляет собой способ предотвращения димеризации CD73 у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

Вариант осуществления 18 представляет собой способ индукции интернализации CD73 у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.15.

Вариант осуществления 19 представляет собой способ лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции из варианта осуществления 15.

Вариант осуществления 20 представляет собой способ получения моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента из любого из вариантов осуществления 1-11, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продукции моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

Вариант осуществления 21 представляет собой способ получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-11, включающий объединение моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Вариант осуществления 22 представляет собой способ определения уровня CD73 у субъекта, включающий:

- а. получение образца от субъекта;
- b. приведение образца в контакт с выделенным моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом из любого из вариантов осуществления 1-11; и
  - с. определение уровня СD73 у субъекта.

Вариант осуществления 23 представляет собой способ из варианта осуществления 22, где образец представляет собой образец ткани.

Вариант осуществления 24 представляет собой способ из варианта осуществления 23, где образец ткани представляет собой образец ткани злокачественной опухоли.

Вариант осуществления 25 представляет собой способ из варианта осуществления 22, где образец представляет собой образец крови.

Вариант осуществления 26 представляет собой способ определения активности экто-5'нуклеотидазы CD73 у субъекта, включающий:

- а. получение образца от субъекта;
- b. приведение образца в контакт с выделенным моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом из любого из вариантов осуществления 1-11; и
  - с. определение активности экто-5'-нуклеотидазы СD73 у субъекта.

Вариант осуществления 27 представляет собой способ из варианта осуществления 26, где образец представляет собой образец ткани.

Вариант осуществления 28 представляет собой способ из варианта осуществления 27, где образец ткани представляет собой образец ткани злокачественной опухоли.

Вариант осуществления 29 представляет собой способ из варианта осуществления 26, где образец представляет собой образец крови.

#### Примеры

Пример 1. Идентификация моноклональных антител против CD73.

Мышей иммунизировали смесью слитых белков CD73 человека (huCD73-HIS; содержащего остатки 27-547) и CD73 мыши (mCD73-HIS; содержащего остатки 29-549), оба с меткой HIS на С-конце. Титр в плазме определяли посредством ELISA. После эвтаназии, селезенки и лимфатические узлы собирали для получения гибридом. Гибридомы выращивали в 384-луночных культуральных планшетах, и супернатанты из индивидуальных лунок подвергали скринингу посредством ELISA с использованием huCD73-HIS и активированной флуоресценцией сортировки клеток (FACS) с использованием клеток MDA-MB-231. Положительные клоны далее анализировали посредством анализа активности нуклеотидазы с использованием CD73, иммобилизованного на планшете. Наилучшие положительные клоны, для которых показано ингибирование активности нуклеотидазы, выделяли и секвенировали.

Последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепи для моноклональных антител против CD73 представлены в табл. 1 и 2, и области CDR для моноклональных антител против CD73 представлены в табл. 3-6.

Таблица 1 Последовательности вариабельных областей тяжелой цепи для mAb против CD73

Клоны mAb	VH	ID
	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTFGMGVTWIRQPSGKGLE	
37C7A	WLAHIWWDDDMYYNPALKSRLTISKDTSKNQVFLKIANVDTADTA	1
	TYYCARSPITTVVADYWGQGSTLTVSS	
	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHGL	
38C16A	EWIGEILPGSGSTNYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSA	3
	VYYCARGDYFGSSYRGPYWGQGTLVTVSA	
	QVQLQQPGAELVMPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQG	
39G8A	LEWIGEIDPSGGYTNYNQKFKGKSTLTVDKSSSTAYMQLSRLTSEDS	5
	AVYYCARNYYYGSSGTMDYWGQGTSVTVSS	
12E0 1	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSNYWIEWVKQRPGHGL	7
43E8A	EWIGEILPGNVITNYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSA	ľ
	VYYCARRGDDGYLYAMDYWGQGTSVTVSS	
	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYMHWVKQKPGQGL	
46J3A	EWIGEIYPGSGNTYYNEKFKGKATLTADRSSSTVYMLLSSLTSEDSA	9
_	VYFCARYWDYYGSTYGYFDVWGAGTTVTVSS	
	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYNMHWVKQSHGKS	
46O19A	LEWIGYINPNNGGTSYNQKFKGKATLTVNKSSSTAYMELRSLTSED	11
	SAVYYCARDYFWYFDVWGTGTTVTVSS	
	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVHWVRQSPGKGLE	
47H24A	WLGVIWSGGSTDYNAAFISRLSISKDNSKSQVFFKMNSLQANDTAIY	13
	YCASQYVAYWGQGTLVTVST	
	QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQG	
49O5A	LEWIGNINPSNGGTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDS	15
	AVYYCARSKSNYGYYAMDYWGQGTSVTVSS	
	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKSSGYTFTSYWMHWVKQRPGQG	
50B10A	LEWIGEINPSNGRTNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDS	17
	AVYYCARSEGRVYYDYFYAMDYWGQGTSVTVSS	
	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWVKQRPGQGL	
50H17A	EWIGVINPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDS	19
	AVYFCARDYYWYFDVWGTGTTVTVSS	
	ELARPWASVKISCQAFYTFSRRMHFAIRDTNYWMQWVKQRPGQGL	
50E16A	EWIGAIYPGNGDTSYNQKFKVKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDS	21
	AVYYCATYYSNYGGAMDYWGQGTSVTVSS	
	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSMHWVKQAPGKGLK	
50F1A	WMGWINTETGEPTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTA	23
	TYFCARDIFWAMDYWGQGTSVTVSS	
	QAYLQQSGAELVRPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPRQG	
54I14A	LEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSED	25
	SAVYFCARYDYDAMDYWGQGTSVTVSS	
	EIQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNWVKQSHGKSLE	
52K11A	WIGNINPYYGSTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLNSLTSKDSA	27
	VYYCAGSSYVDYAMDYWGQGTSVTVSS	
	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQG	
53H21A	LEWIGYIIPYNDGTKYNEKFEGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSA	29
	VYYCARWGNWDYFDYWGQGTTLTVSS	

	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKAPGYTFTSYWINWVKQRPGQGL	
53I12A	EWIGNIYAGSSSSNYNEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSDDSA	31
	VYYCARSGHGYDGFAYWGQGTLVTVSA	
	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGKG	
60A9A	LEWIGQIYPGDGDTYYSGKFKGKATLTAAKSSSTAYMQLSSLTSED	33
	SAVYFCAREAIYYGNYVFTYWGQGTLVTVSA	
	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFTNYLIEWIKQRPGQGLE	
39J9A	WIGLINPGSGGTNYIEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAV	35
	YFCARRGDYYGNPFDYWGQGTTLTVSS	
	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVRQRPGQG	
49H8A	LEWIGEIDPSDNYTHYNQKFKGEATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDS	37
	AVYYCARGYYGYSPSWFAYWGQGTLVTVSA	
	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYYMHWVKQSHVKSL	
51B10A	EWIGRINPYSGATNSNQNFKDKASLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSA	39
	VYYCARSYYGAMDYWGQGTSVTVSS	

VH: вариабельная область тяжелой цепи.

Таблица 2 Последовательности вариабельных областей легкой цепи для mAb против CD73

mAb	VL	ID
	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNLVHSYGNTYLHWYLQKPG	
37C7A	QSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCS	2
	QNTHVPWTFGGGTKLEIQ	
	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGRTYLNWLLQRPGQ	
38C16A	SPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCW	4
	QGTHFPHTFGGGTKLEIK	
	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQK	
39G8A	PGQSPKLLVYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYF	6
	CQQHYSTPYTFGGGTKLEIK	
	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQP	
43E8A	PKLLIYAASNQGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQ	8
	SKEVPFTFGSGTKLEIK	
	DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKNISKYLAWYQEIPGKTYNLLI	
46J3A	YSGSTLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQQHNEYPF	10
	TFGSGTKLEIK	
46O19A	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQEKP	12

## 043284

	GQPPKVLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYY	
	CQNDYSYPLTFGAGTKLELK	
	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSRLTWLQQEPDGTIKRLI	
47H24A	YATSSLDSGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDFVDYFCLQYASSPF	14
	TFGSGTKLEIK	
	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCEASDHIDNWLAWYQQKPGNAPRL	
49O5A	LISGATSLETGVPSRFSGSGSGKDYTLSITSLQTEDVATYYCQQYWS	16
	SPFTFGSGTKLEIK	
	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLL	
50B10A	IYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLP	18
	WTFGGGTKLEIK	
	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKP	
50H17A	GQPPKVLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYY	20
	CQNDYSYPLTFGAGTKLELK	
	DIVMTQFHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPK	
50E16A	LLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYS	22
	SYPYTFGGGTKLEIK	
	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKP	
50F1A	GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYY	24
	CQNDYSYPLTFGAGTKLELK	
	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYFAWYQQKQGKSPQLL	
54I14A	VYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQHHYGT	26
	PFTFGSGTKLEIK	
	DIVMTQAAISNPVTLGTSASISCSSNKSLLHSNDITYLYWYLQRPGQS	
52K11A	PQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQ	28
	MLERPWTFGGGTKLEIK	
	QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPW	
53H21A	IYLTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSN	30
	PWTFGGGTKLEIK	
	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLL	
53I12A	IYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSKLPR	32
	TFGGGTKLEIK	
	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQK	34
60A9A	PGQSPKLLVYFASTRDSGVPDRFIGGGSGTDFTLTISSVQAEDLADYF	34
	CQQHYSTPLTFGAGTKLELK	
	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQKQGKSPQLL	
39J9A	IYNADTLEDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINSMQPEDTATYFCKQAYD	36
	VPLTFGAGTKLELK	
	QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMYWYQQKPRSSPKPW	
49H8A	IYLTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSN	
	PPTFGSGTKLEIK	
	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTL	
51B10A	IYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEF	40
JIDIOA	PLTFGAGTKLELK	
VI		

VL: вариабельная область легкой цепи.

Таблица 3 Области CDR 1-3 тяжелой цепи для mAb против CD73

mAb	HC CDR1	ID	HC CDR2	ID	HC CDR3	ID
37C7A	GFSLSTFGMG	41	IWWDDDM	42	ARSPITTVVADY	43
38C16A	GYTFSSYW	44	ILPGSGST	45	ARGDYFGSSYRGPY	46
39G8A	GYTFTSYW	47	IDPSGGYT	48	ARNYYYGSSGTMDY	49
43E8A	GYTFSNYW	50	ILPGNVIT	51	ARRGDDGYLYAMDY	52
46J3A	GYTFTDYY	53	IYPGSGNT	54	ARYWDYYGSTYGYFDV	55
46O19A	GYTFTDYN	56	INPNNGGT	57	ARDYFWYFDV	58
47H24A	GFSLTSYG	59	IWSGGST	60	ASQYVAY	61
49O5A	GYTFTSYW	62	INPSNGGT	63	ARSKSNYGYYAMDY	64
50B10A	GYTFTSYW	65	INPSNGRT	66	ARSEGRVYYDYFYAMDY	67
50H17A	GYAFTNYL	68	INPGSGGT	69	ARDYYWYFDV	70
50E16A	AIRDTNYW	71	IYPGNGDT	72	ATYYSNYGGAMDY	73
50F1A	GYTFTDYS	74	INTETGEP	75	ARDIFWAMDY	76
54I14A	GYTFTSYN	77	IYPGNGDT	78	ARYDYDAMDY	79
52K11A	GYSFTGYN	80	INPYYGST	81	AGSSYVDYAMDY	82
53H21A	GYTFTSYV	83	IIPYNDGT	84	ARWGNWDYFDY	85
53I12A	GYTFTSYW	86	IYAGSSSS	87	ARSGHGYDGFAY	88
60A9A	GYAFSSYW	89	IYPGDGDT	90	AREAIYYGNYVFTY	91
39J9A	GYAFTNYL	92	INPGSGGT	93	ARRGDYYGNPFDY	94
49H8A	GYTFTNYW	95	IDPSDNYT	96	ARGYYGYSPSWFAY	97
51B10A	GYSFTGYY	98	INPYSGAT	99	ARSYYGAMDY	100

HC: тяжелая цепь; CDR: определяющая комплементарность область; ID: SEQ ID NO;

НС CDR для mAb против CD73 определяли с использованием способа IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212).

Таблица 4 Области CDR 1-3 легкой цепи для mAb против CD73

mAb	LC CDR1	ID	LC CDR2	ID	LC CDR3	ID
37C7A	ONLVHSYGNTY	101	KVS	102	SONTHVPWT	103
	<u></u>			_		
38C16A	QSLLDSDGRTY	104	LVS	105	WQGTHFPHT	106
39G8A	QSLLNSSNQKNY	107	FAS	108	QQHYSTPYT	109
43E8A	ESVDNYGISF	110	AAS	111	QQSKEVPFT	112
46J3A	KNISKY	113	SGS	114	QQHNEYPFT	115
46O19A	QSLLNSGNQKNY	116	WAS	117	QNDYSYPLT	118
47H24A	QDIGSR	119	ATS	120	LQYASSPFT	121
49O5A	DHIDNW	122	GAT	123	QQYWSSPFT	124
50B10A	QDISNY	125	YTS	126	QQGNTLPWT	127
50H17A	QSLLNSGNQKNY	128	WAS	129	QNDYSYPLT	130
50E16A	QDVGTAVA	131	WAS	132	QQYSSYPYT	133
50F1A	QSLLNSGNQKNY	134	WAS	135	QNDYSYPLT	136
54I14A	ENIYSY	137	NAK	138	QHHYGTPFT	139
52K11A	KSLLHSNDITY	140	RMS	141	AQMLERPWT	142
53H21A	SSVSY	143	LTS	144	QQWSSNPWT	145
53I12A	QGISNY	146	YTS	147	QQYSKLPRT	148
60A9A	QSLLNSSNQKNY	149	FAS	150	QQHYSTPLT	151
39J9A	ENIYYS	152	NAD	153	KQAYDVPLT	154
49H8A	SSVSY	155	LTS	156	QQWSSNPPT	157
51B10A	QDINSY	158	RAN	159	LQYDEFPLT	160

СС: легкая цепь; СDR: определяющая комплементарность область LC CDR для mAb против CD73 определяли с использованием способа IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212).

Таблица 5 Области CDR 1-3 тяжелой цепи для mAb против CD73

mAb	HC CDR1	ID	HC CDR2	ID	HC CDR3	ID
37C7A	GFSLSTFGMG VT	161	HIWWDDDMYYNPA LKS	162	ARSPITTVVADY	163
38C16A	GYTFSSYWIE	164	EILPGSGSTNYNEKF KG	165	ARGDYFGSSYRGPY	166
39G8A	GYTFTSYWMH	167	EIDPSGGYTNYNQKF KG	168	ARNYYYGSSGTMDY	169
43E8A	GYTFSNYWIE	170	EILPGNVITNYNEKFK G	171	ARRGDDGYLYAMDY	172
46J3A	GYTFTDYYMH	173	EIYPGSGNTYYNEKF KG	174	ARYWDYYGSTYGYF DV	175
46O19A	GYTFTDYNMH	176	YINPNNGGTSYNQKF KG	177	ARDYFWYFDV	178
47H24A	GFSLTSYGVH	179	VIWSGGSTDYNAAFI SR	180	ASQYVAY	181
49O5A	GYTFTSYWMH	182	NINPSNGGTNYNEKF KS	183	ARSKSNYGYYAMDY	184
50B10A	GYTFTSYWMH	185	EINPSNGRTNYNEKF KS	186	ARSEGRVYYDYFYA MDY	187
50H17A	GYAFTNYLIE	188	VINPGSGGTNYNEKF KG	189	ARDYYWYFDV	190
50E16A	AIRDTNYWMQ	191	AIYPGNGDTSYNQKF KV	192	ATYYSNYGGAMDY	193
50F1A	GYTFTDYSMH	194	WINTETGEPTYADDF KG	195	ARDIFWAMDY	196
54I14A	GYTFTSYNMH	197	AIYPGNGDTSYNQKF KG	198	ARYDYDAMDY	199
52K11A	GYSFTGYNMN	200	NINPYYGSTSYNQKF KG	201	AGSSYVDYAMDY	202
53H21A	GYTFTSYVMH	203	YIIPYNDGTKYNEKF EG	204	ARWGNWDYFDY	205
53I12A	GYTFTSYWIN	206	NIYAGSSSSNYNEKF KS	207	ARSGHGYDGFAY	208
50A9A	GYAFSSYWMN	209	QIYPGDGDTYYSGKF KG		AREAIYYGNYVFTY	211
39J9A	GYAFTNYLIE	212	LINPGSGGTNYIEKFK G	213	ARRGDYYGNPFDY	214
49H8A	GYTFTNYWM Q	215	EIDPSDNYTHYNQKF KG	216	ARGYYGYSPSWFAY	217
51B10A	GYSFTGYYMH	218	RINPYSGATNSNQNF KD	219	ARSYYGAMDY	220

НС: тяжелая цепь;

CDR: определяющая комплементарность область;

HC CDR для mAb против CD73 определяли с использованием комбинации способов IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212) и Kabat (Elvin A. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th ed. (1991)).

Таблица 6 Области CDR 1-3 легкой цепи для mAb против CD73

mAb	LC CDR1	ID	LC CDR2	ID	LC CDR3	ID
37C7A	RSSQNLVHSYGNTYLH	221	KVSNRFS	222	SQNTHVPWT	223
38C16A	KSSQSLLDSDGRTYLN	224	LVSKLDS	225	WQGTHFPHT	226
39G8A	KSSQSLLNSSNQKNYLA	227	FASTRES	228	QQHYSTPYT	229
43E8A	RASESVDNYGISFMN	230	AASNQGS	231	QQSKEVPFT	232
46J3A	RASKNISKYLA	233	SGSTLQS	234	QQHNEYPFT	235
46O19A	KSSQSLLNSGNQKNYLT	236	WASTRES	237	QNDYSYPLT	238
47H24A	RASQDIGSRLT	239	ATSSLDS	240	LQYASSPFT	241
49O5A	EASDHIDNWLA	242	GATSLET	243	QQYWSSPFT	244
50B10A	RASQDISNYLN	245	YTSRLHS	246	QQGNTLPWT	247
50H17A	KSSQSLLNSGNQKNYLT	248	WASTRES	249	QNDYSYPLT	250
50E16A	KASQDVGTAVA	251	WASTRHT	252	QQYSSYPYT	253
50F1A	KSSQSLLNSGNQKNYLT	254	WASTRES	255	QNDYSYPLT	256
54I14A	RASENIYSYFA	257	NAKTLAE	258	QHHYGTPFT	259
52K11A	SSNKSLLHSNDITYLY	260	RMSNLAS	261	AQMLERPWT	262
53H21A	SASSSVSYMY	263	LTSNLAS	264	QQWSSNPWT	265
53I12A	SASQGISNYLN	266	YTSSLHS	267	QQYSKLPRT	268
60A9A	KSSQSLLNSSNQKNYLA	269	FASTRDS	270	QQHYSTPLT	271
39J9A	RASENIYYSLA	272	NADTLED	273	KQAYDVPLT	274
49H8A	SASSSVSYMY	275	LTSNLAS	276	QQWSSNPPT	277
51B10A	KASQDINSYLS	278	RANRLVD	279	LQYDEFPLT	280

LC: легкая цепь;

CDR: определяющая комплементарность область;

LC CDR для mAb против CD73 определяли с использованием комбинации способов IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212) и Kabat (Elvin A. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th ed. (1991)).

Пример 2. Продукция и очистка mAb из культуральных сред от трансфицированных клеток 293E. Для получения рекомбинантных химерных mAb против CD73, экспрессирующими векторами, содержащими мышиные вариабельные области (VH и VL), слитые с константными областями тяжелой цепи IgG1 с мутациями LALA (L234A/L235A) и легкой цепи каппа человека, соответственно, временно трансфицировали клетки 293E. Рекомбинантные антитела, продуцированные в суспензии клеток 293E, очищали с использованием аффинной хроматографии с белком A.

Пример 3. Ингибирование активности нуклеотидазы иммобилизованного CD73 посредством очищенных химерных mAb против CD73.

Меченным HIS CD73 человека (huCD73-HIS, 60 мкл/лунку при 0,15 мкг/мл) в буфере для анализа (25 мМ Трис-HCl, pH7,5 и 5 мМ MgCl<sub>2</sub>) покрывали покрытые никелем планшеты (ThermoFisher Scientific, кат.#: 15242) при 4°С в течение ночи. После промывки, химерные mAb против CD73 добавляли и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Ферментную реакцию, измеряющую активность нуклеотидазы CD73, инициировали посредством добавления 100 мкМ АМФ в планшет. Реакцию продолжали в течение 20 мин при 37°С. Свободный фосфат детектировали и оценивали количественно посредством набора для детекции фосфата с малахитовым зеленым (R&D Systems, кат.#: DY996). Ингибирование активности нуклеотидазы иммобилизованного CD73 посредством химерных mAb против CD73 показано на фиг. 1А и 1В. Без антитела, реакция фермента без ингибитора; АМРСР (аденозин-5'-(α,β-метилен)дифосфат) использовали в качестве контроля для ингибирования активности фермента.

Пример 4. Анализ ELISA связывания с использованием химерных mAb.

Меченным HIS CD73 человека (huCD73-HIS, 50 мкл/лунку при 5 мкг/мл (85 нМ)) (BPS Bioscience, кат.#: 71184) в карбонатном буфере для покрытия покрывали планшет для ELISA при 4°C в течение ночи. После промывки буфером TBST (буфером TBS с 0,05% Tween 20), планшет для ELISA блокировали посредством 5% BSA в TBST при комнатной температуре в течение 1 часа и промывали снова. Химерные антитела против CD73 добавляли, перемешивали и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшет промывали, и связывание антитела против CD73 с иммобилизованным huCD73-HIS детектировали посредством добавления антитела против IgG человека, конъюгированного с пероксидазой хрена (анти-hIgG-HRP) (ThermoFisher Scientific, кат.#: H10007), и инкубации в течение 1 часа. Планшет промывали, и ELISA проявляли с использованием раствора для одностадийной детекции (ThermoFisher Scientific, кат.#: 34029) и измеряли как оптическую плотность при 450 нм. Результаты связывания mAb против CD73 с CD73 показаны на фиг. 2A-2E.

Пример 5. Ингибирование активности нуклеотидазы растворимого CD73 посредством mAb против CD73.

Этот анализ проводили с использованием рекомбинантного CD73 человека в растворе, а не иммобилизованного на планшете. Меченный HIS CD73 человека (huCD73-HIS) (BPS Bioscience, кат.#: 71184) при конечной концентрации 0,5 нМ и различных концентрациях антител против CD73 инкубировали в буфере для анализа (25 мМ Трис-HCl, pH7,5, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 140 мМ NaCl и 0,1% BSA) в течение 20 минут при 37°C. Ферментную реакцию инициировали посредством добавления АМФ (Sigma Aldrich, кат.#: A2252) до конечной концентрации 400 мкМ. После инкубации планшета при 37°C в течение 20 мин, концентрацию неорганического фосфата определяли посредством набора для детекции фосфата с малахитовым зеленым (R&D Systems, кат.#: DY996). Два химерных mAb против CD73 60A9A/IgG4 и 39G8A/IgG4 получали посредством слияния областей VH и VL мышиных mAb 60A9A и 39G8A с константными областями тяжелой цепи IgG4 и легкой цепи каппа человека, соответственно. Химерные антитела экспрессировали в клетках CHO и очищали с использованием аффинной хроматографии с белком A, и тестировали в этом анализе. Результаты ингибирования активности нуклеотидазы растворимого CD73 посредством 60A9A/IgG4 и 39G8A/IgG4 показаны на фиг. 3.

Пример 6. Гуманизация mAb против CD73.

Мышиные mAb против CD73 60A9A и 39G8A гуманизировали для уменьшения потенциала иммуногенности при использовании у пациентов-людей. Последовательности вариабельных областей тяжелых и легких цепей (VH и VL) сравнивали с последовательностями человеческого антитела в базе данных Protein Data Bank (PDB) и строили модели гомологии. CDR как в тяжелых, так и в легких цепях мышиных mAb прививали в человеческие каркасы, имеющие наивысшую возможность поддержания надлежащей структуры, вероятно, необходимой для связывания антигена. Последовательности гуманизированных областей VH и VL показаны в табл. 7 и

Гуманизированные области VH и VL сливали с константными областями тяжелой цепи IgG1 с мутациями LALA (L234A/L235A) и легкой цепи каппа человека, соответственно. Конструкции, соответствующие последовательностям mAb, использовали для временной трансфекции в клетках 293E, и гуманизированные mAb очищали с использованием хроматографии с белком A. Гуманизированные mAb тестировали в анализе активности фермента с использованием растворимого CD73 человека. В этом анализе, 0,4 нМ huCD73 инкубировали с mAb в течение 1 час на льду до инициации ферментной реакции посредством добавления АМФ до конечной концентрации 100 мкМ. Значения IC50 для гуманизированных mAb показаны в табл. 9.

Гуманизированное mAb 60A9-H5L4 в остове IgG4/каппа человека (60A9-H5L4/IgG4) анализировали в анализе ELISA связывания; химерный вариант IgG4 60A9A (60A9A/IgG4) использовали в качестве контроля. Результаты ELISA связывания показаны на фиг. 4A. 60A9-H5L4/IgG4 анализировали также по его способности ингибировать активность нуклеотидазы растворимого CD73 в условиях примера 5. Результаты показаны на фиг. 4B.

Таблица 7 Последовательности гуманизированных вариабельных областей тяжелой цепи для mAb против CD73

VH	Последовательность	ID
	EVQLVESGGGLVQPGQSLKLSCKASGYAFSSYWMNWVRQAPGKGLE	
50A9-H1	WMGQIYPGDGDTYYNPSVKGRFTISADTSKNTAYLQLNNLRAEDTAVY	282
	YCAREAIYYGNYVFTYWGQGTLVTVSS	
60A9-H2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCKASGYAFSSYWMNWVRQAPGKGLEW	283
	VGQIYPGDGDTYYNPSVKGRFTISADTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY	
	CAREAIYYGNYVFTYWGQGTLVTVSS	
	EVQLVESGGGLVQPGQSLKLSCKASGYAFSSYWMNWVRQAPGKGLE	
60A9-H3	WIGQIYPGDGDTYYNPSVKGRATLSADKSKNTAYLQLNNLRAEDTAVY	284
	YCAREAIYYGNYVFTYWGQGTLVTVSS	
	EVQLVESGGGLVQPGQSLKLSCKASGYAFSSYWMNWVRQAPGKGLE	
60A9-H4	WIGQIYPGDGDTYYSGSVKGRATLSADKSKNTAYLQLNNLRAEDTAVY	285
	YCAREAIYYGNYVFTYWGQGTLVTVSS	
	EVQLVESGGGLVQPGQSLKLSCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGKGLE	
60A9-H5	WIGQIYPGDGDTYYSGKFKGRATLSADKSKNTAYLQLNNLRAEDTAVY	286
	YCAREAIYYGNYVFTYWGQGTLVTVSS	
	QVQLVQSGAEVKRPGSSVTVSCKASGYAFSSYWMNWVRQAPGRGLEW	
60A9-H6	IGQIYPGDGDTYYAPRFQGRATLTADKSTSTAYLELNSLRPEDTAVYFCA	295
	REAIYYGNYVFTYWGQGTLVTVSS	
	QVQLVQSGAEVKKPGSSVTVSCKASGYAFSSYWMNWVRQAPGRGLEW	
60A9-H7	IGQIYPGDGDTYYAPKFQGRATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCA	296
	REAIYYGNYVFTYWGQGTLVTVSS	
	QVQLVQSGAEVKKPGSSVTVSCKASGYAFSSYWMNWVRQAPGRGLEW	
60A9-H8	IGQIYPGDGDTYYSGKFQGRATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCA	297
	REAIYYGNYVFTYWGQGTLVTVSS	
	QVQLVQSGAEVKRPGSSVTVSCKASGYAFSSYWMNWVRQAPGRGLEW	
60A9-H9	IGQIYPGDGDTYYSGKFKGRATLSADKSKNTAYLQLNNLRAEDTAVYYC	298
	AREAIYYGNYVFTYWGQGTLVTVSS	
	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLE	
39G8-H1	WIGEIDPSGGYTNYAQKFQGRSTLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYY	287
	CARNYYYGSSGTMDYWGQGTLVTVSS	
	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLE	
39G8-H2	WIGEIDPSGGYTNYAQKFQGRSTLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYY	288
	CARNYYYGSSGTMDYWGQGTLVTVSS	
	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLE	
39G8-H3	WIGEIDPSGGYTNYNQKFQGRSTLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYY	289
	CARNYYYGSSGTMDYWGQGTLVTVSS	

Таблица 8 Последовательности гуманизированных вариабельных областей легкой цепи для mAb против CD73

VL	Последовательность	ID
	DIQMTQSPSLLSASLGDRVTITCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQS	
60A9-L1	PKLLIYFASTRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCQQHYST	290
	PLTFGGGTKLEIK	
	DIVMTQSPSSLSASLGDRVTITCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQS	
60A9-L2	PKLLIYFASTRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCQQHYST	291
	PLTFGGGTKLEIK	
	DIQMTQSPSLLSASLGDRVTITCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQS	
60A9-L3	PKLLVYFASTRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCQQHYS	292
	TPLTFGGGTKLEIK	
	DIVMTQSPSLLSASLGDRVTISCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQS	
60A9-L4	PKLLVYFASTRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFATYFCQQHYS	293
	TPLTFGAGTKLEIK	
	EIVMTQSPGTQSLSPGERATLSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQRPGQA	
60A9-L5	PRLLVYFASTRDSGVADRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYFCQQHYST	299
	PLTFGQGTKVEVK	
39G8-L3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQ	294
	PPKLLVYFASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLOAEDVAVYFCOOHY	
	STPYTFGGGTKVEIK	

Таблица 9 Значения  $IC_{50}$  для гуманизированных mAb в ферментном анализе huCD73 в растворе

_ T - F		
Наименование	IC50 (нM)	
60A9-H1L1	3,34	
60A9-H1L2	6,17	
60A9-H1L3	4,96	
60A9-H2L1	4,13	
60A9-H2L2	11,20	
60A9-H2L3	4,57	
60A9-H3L1	2,94	
60A9-H3L2	4,97	
60A9-H3L3	2,09	
60A9-H4L1	3,10	
60A9-H4L2	4,97	
60A9-H4L3	2,74	

Наименование 60A9-H1L1 относится к mAb, сконструированному с использованием VH 60A9-H1 и VL 60A9-L1. Для всех других гуманизированных mAb принято такое же правило наименования.

Пример 7. Ингибирование активности нуклеотидазы CD73 клеточной поверхности посредством mAb против CD73.

Клетки А375 собирали с использованием PBS-ЭДТА (2 мМ ЭДТА в PBS) и промывали дважды в буфере PBS, дополненном 0,1% BSA. 100000 клеток рассевали в присутствии различных концентраций антител против CD73 и инкубировали в течение 20 мин при 37°C. Затем добавляли АМФ до конечной концентрации 125 мкМ (Sigma Aldrich, кат.#: A2252) в конечном объеме 60 мкл, и реакционную смесь поддерживали при 37°C в течение 60 мин. Затем планшеты центрифугировали, и 40 мкл супернатанта переносили в новый планшет. АТФ (Sigma Aldrich, кат.#: A9187) добавляли для получения конечной концентрации 100 мкМ в конечном объеме 50 мкл, и смесь инкубировали при 37°C в течение 15 мин. Реагент CellTiter-Glo® 2.0 (Promega, кат.#: G9242) добавляли в соотношении 1:1 для определения уровня АМФ в смеси, и ферментную активность в данной реакции рассчитывали на основании концентрации АМФ в конце реакции. Результаты для ингибирования активности CD73 гуманизированными mAb против CD73 (в остове IgG1 LALA/каппа человека) в анализе на основе клеток показаны в табл. 10.

Гуманизированные mAb против CD73 60A9-H5L4/IgG4, 60A9-H3L5/IgG4, 60A9-H5L5/IgG4, 60A9-H5L5/IgG4, 60A9-H5L5/IgG4, 60A9-H5L5/IgG4, 60A9-H5L5/IgG4, 60A9-H5L5/IgG4, 60A9-H5L5/IgG4 и 60A9-H9L5/IgG4 также тестировали в анализе на основе клеток с использованием способа детекции фосфата. В этом анализе, 50000 клеток A375 промывали и рассевали в буфере для анализа (25 мМ Трис-HCl, pH7,5, 5 мМ MgCl $_2$ , 140 мМ NaCl и 0,1% BSA), и реакция фермента с конечной концентрацией АМФ 400 мкМ продолжалась 20 мин при 37°С. Свободный фосфат, полученный посредством гидролиза АМФ, количественно оценивали с использованием набора для детекции фосфата с малахитовым зеленым (R&D Systems, кат.#: DY996). Результаты анализа показаны на фиг. 4С и 4D.

Таблица 10 Значения  $IC_{50}$  для гуманизированных mAb в анализе на основе клеток активности CD73

Наименование	IC50 (нM)	
60A9-H2L4	46,03	
60A9-H3L4	133,67	
60A9-H3L3	65,65	
60A9-H4L4	134,67	
60A9-H5L1	61,02	
60A9-H5L2	57,31	
60A9-H5L3	36,41	
60A9-H5L4	30,12	
39G8-H1L3	49,62	
39G8-H2L3	66,33	
39G8-H3L3	56,12	

Пример 8. Ингибирование активности нуклеотидазы CD73 в образцах сыворотки пациентов посредством mAb против CD73.

Образцы сыворотки от пациентов с колоректальным раком использовали для оценки ингибирующей активности гуманизированного mAb против CD73 60A9-H5L4/IgG4. 20 мкл сыворотки и 10 мкл mAb против CD73 в буфере PBS, дополненном 0,1% BSA, инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Добавляли 10 мкл 500 мкМ АМФ (Sigma Aldrich, кат.#: A2252), и реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Затем АТФ (Sigma Aldrich, кат.#: A9187) добавляли до конечной концентрации 100 мкМ. 25 мкл реакционной смеси переносили в белый 96-луночный планшет с половинным объемом лунок. Реагент CellTiter-Glo® 2.0 (Promega, кат.#: G9242) добавляли к смеси в соотношении 1:1, и остаточный уровень АМФ определяли посредством измерения ее ингибирующего эффекта на детекцию АТФ. Образцы, содержащие 100 мкМ АМФ и 100 мкМ АТФ, использовали для определения фона анализа, и образцы, содержащие только 100 мкМ АТФ, использовали в качестве положительного контроля.

Ингибирование активности нуклеотидазы CD73 в образцах сыворотки пациента посредством гуманизированного mAb против CD73 60A9-H5L4/IgG4 анализировали при 1000 нМ. Результаты показаны на фиг. 5.

Пример 9. Активация пролиферации Т-клеток посредством гуманизированного mAb против CD73 60A9-H5L4/IgG4.

Первичные CD4+ Т-клетки человека выделяли из замороженных мононуклеарных клеток периферической крови с использованием набора для выделения CD4+ Т-клеток (Miltenyi Biotec, кат.#: 130-096-533). Выделенные CD4+ Т-клетки при плотности 1000000 клеток на мл в DPBS метили с использованием набора для анализа пролиферации клеток CellTrace™ CFSE (Invitrogen, кат.#: C34554) при 37°C в течение 30 мин. Клетки промывали три раза с использованием холодного DPBS и ресуспендировали в средах AIM V (Gibco, кат.#: 12055083). 100000 клеток на лунку предварительно инкубировали с различными концентрациями 60A9-H5L4/IgG4 в течение 1 час при 37°C. Т-клетки активировали посредством добавления реагентов для активации Т-клеток, комбинации бусин Dynabeads с активатором Т-клеток человека CD3/CD28 (Gibco, кат.#: 11131D) в соотношении бусин и клеток 1:1, и IL-2 человека до конечной концентрации 60 МЕ/мл. Затем, АМФ (Sigma Aldrich, кат.#: A2252) добавляли до конечной концентрации 100 мкМ. После 72 часов инкубации при 37°C, клетки окрашивали с использованием антитела против

СD4 человека с PE/Cy7 (BioLegend, кат.#: 357409). Сигналы как PE/Cy7, так и CFSE, анализировали в проточном цитометре Attune NxT. Для окна анализа, CFSE CD4+ клетки в отсутствие реагентов для активации Т-клеток не подвергались делению клеток, и таким образом, использованы для определения исходных значений, в то время как активированные CFSE CD4+ клетки (обработанные реагентами для активации Т-клеток) в отсутствие АМФ подвергались неингибированному делению клеток, и таким образом, использованы для определения максимальной пролиферации. Эффект 60A9-H5L4/IgG4 на активацию пролиферации Т-клеток показан на фиг. 6. Клетки, обработанные АМФ, подвергались супрессии, как ожидали, предположительно, из-за продукции аденозина посредством CD73 клеточной поверхности, и добавление mAb против CD73 60A9-H5L4/IgG4 при 75 нМ активировало клетки, позволяя предполагать, что mAb имеет функциональную активность для активации Т-клеток.

Специалисту в данной области понятно, что изменения можно вносить в варианты осуществления, описанные выше, без отклонения от их широкого изобретательского замысла. Понятно, таким образом, что это изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, но предназначено для включения модификаций в пределах содержания и объема настоящего изобретения, как определено посредством настоящего описания.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 89, 90, 91, 149, 150 и 151, соответственно, или SEQ ID NO: 209, 210, 211, 269, 270 и 271, соответственно, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает CD73.
- 2. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, содержащее

вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 286, 33, 282, 283, 284, 285, 295, 296, 297 или 298, или

вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 293, 34, 290, 291, 292, или 299.

- 3. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, содержащее:
- а) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 286 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 293;
- b) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 33 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 34;
- с) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 282 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 290;
- d) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 282 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 291;
- е) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 282 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 292;
- f) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 283 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 290;
- g) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 283 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 291;
- h) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 283 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 292;
- i) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 284 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 290;
- j) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 284 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 291;
- k) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 284 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 292;
- l) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 285 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 290;
- m) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 285 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 291;
- n) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 285 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 292;
- о) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 283 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 293;

- р) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 284 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 293;
- q) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 285 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 293;
- r) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 286 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 290;
- s) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 286 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 291;
- t) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 286 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 292
- u) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 284 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 299;
- v) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 295 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 299;
- w) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 296 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 299;
- х) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 297 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 299 или
- у) вариабельную область тяжелой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 298 и вариабельную область легкой цепи с полипептидной последовательностью SEQ ID NO: 299.
- 4. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует ферментную активность растворимого и/или связанного с поверхностью клеток CD73, предотвращает димеризацию CD73, индуцирует интернализацию CD73 и/или является способным активировать Т-клетки.
- 5. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным или человеческим, или гуманизированным.
- 6. Биспецифическое антитело, которое отличается тем, что содержит моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5.
- 7. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5.
  - 8. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая биспецифическое антитело по п.б.
  - 9. Вектор экспрессии, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п.7 или 8.
  - 10. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.9.
- 11. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5 или биспецифическое антитело по п.6 и фармацевтически приемлемый носитель.
- 12. Способ ингибирования активности нуклеотидазы CD73, предотвращения димеризации CD73, индукции интернализации CD73 или лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п.11.
- 13. Способ получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-5, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в условиях для продукции моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.
- 14. Способ получения биспецифического антитела по п.6, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическое антитело в условиях для продукции биспецифического антитела, и выделение биспецифического антитела из клетки или культуры.
- 15. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, или биспецифическое антитело по п.6, включающий объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или биспецифического антитела с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.
  - 16. Способ определения уровня СD73 у субъекта, отличающийся тем, что включает:
  - а) получение образца от субъекта и
- b) приведение образца в контакт с выделенным моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-5.
  - 17. Способ активности экто-5'-нуклеотидазы СD73 у субъекта, отличающийся тем, что включает:
  - а) получение образца от субъекта и
- b) приведение образца в контакт с выделенным моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-5.
  - 18. Способ по п.16 или 17, где образец представляет собой образец ткани или образец крови.

- 19. Способ по п.18, где образец ткани, необязательно, представляет собой образец ткани злокачественной опухоли.
- 20. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где CD73 представляет собой CD73 человека.















