

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043570**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.01

(21) Номер заявки
201991099

(22) Дата подачи заявки
2018.01.23

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD73 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) PCT/CN2017/072445

(32) 2017.01.24

(33) CN

(43) 2020.03.23

(86) PCT/CN2018/073746

(87) WO 2018/137598 2018.08.02

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АЙ-МАБ БИОФАРМА ЮЭС
ЛИМИТЕД (US)**

(72) Изобретатель:
**Ван Чжэнъи, Фан Лэй, Гуо Бинши,
Цзан Цзинъю (CN)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) ANTONIOLI, L. et al. "Anti-CD73 in Cancer Immunotherapy: Awakening New Opportunities" TRENDS IN CANCER, Vol. 2, No. 2, 29 February 2016 (2016-02-29), pages 95-109
ALLARD, B. et al. "Targeting CD73 and downstream adenosine receptor signaling in triple-negative breast cancer" EXPERT.OPIN.THER.TARGETS, Vol. 18, No. 8, 06 May 2014 (2014-05-06), pages 863-881
WO-A2-2016081748
WO-A2-2016081746
WO-A1-2016055609
WO-A1-2016075176
STAGG, J. et al. "Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis" PNAS, Vol. 107, No. 4, 26 January 2010 (2010-01-26), pages 1547-1552

(57) Предложены антитела против CD73 или их фрагменты. Указанные антитела или фрагменты содержат CDR1 VH согласно SEQ ID NO: 1, CDR2 VH согласно SEQ ID NO: 2, CDR3 VH согласно SEQ ID NO: 3, CDR1 VL согласно SEQ ID NO: 4, CDR2 VL согласно SEQ ID NO: 5 и CDR3 VL согласно SEQ ID NO: 6 или варианты каждого из них. В более общем случае описаны антитела или их фрагменты, обладающие специфичностью по отношению к одному или более аминокислотных остатков, выбранных из С-концевой половины белка CD73 человека, например, аминокислотным остаткам в С-концевых доменах. Аминокислоты специфических эпитопов в этих доменах включают Y345, D399, E400, R401 и R480. Кроме того, предложены способы применения указанных антител или их фрагментов для лечения и диагностики заболеваний, например, рака.

B1**043570****043570****B1**

Уровень техники

CD73 (кластер дифференцировки 73), также известный как 5'-нуклеотидаза (5'-NT) или экто-5'-нуклеотидаза, представляет собой фермент, преобразующий АМФ в аденозин. CD73 катализирует образование внеклеточного аденозина, вносящего вклад в формирование иммуносупрессивного окружения опухоли. CD73 сверхэкспрессируется в клетках стромы и опухолевых клетках различного типа, а также в клетках Treg, M2 Мф и супрессорных клетках миелоидного происхождения (MDSC).

Доклинические данные показывают, что ингибирование CD73 предотвращает аденозин-опосредованную супрессию лимфоцитов, увеличивает активность CD8+ эффекторных клеток и снижает активность как MDSC, так и Treg. В настоящее время разрабатываются несколько антител против CD73 в качестве потенциальных противораковых агентов, однако ни одно из них не одобрено для клинического применения.

Краткое описание

Настоящее изобретение обеспечивает антитело против CD73, обладающее высокой аффинностью связывания с белками CD73 человека и высокой активностью по отношению к ингибированию ферментативной активности CD73 самого по себе или на клетке. Кроме того, связывание этих антител может индуцировать интернализацию CD73 опухолевыми клетками, что приводит к дальнейшему снижению активности CD73 на поверхности клетки. Кроме того, неожиданно, одновалентные единицы, например, Fab-фрагменты этих антител обладают активностью, сопоставимой с активностью целых антител. В то же время известные антитела против CD73, например, MEDI-9447, разработанное Medimmune, не обладают такими характеристиками. Аналогично, в отличие от MEDI-9447 и 11F11, для проявления ингибирующего эффекта которых требуется высокая плотность экспрессии CD73 на поверхности клеток, антитела согласно настоящему изобретению могут достигать полного ингибирования CD73 при различных уровнях экспрессии на поверхности клетки. Считается, что эти неожиданные свойства антител согласно настоящему изобретению по меньшей мере частично обусловлены другим сайтом связывания с белком CD73. В отличие от MEDI-9447 и 11F11, связывающих N-концевые домены белка CD73, антитела согласно настоящему изобретению связываются с C-концевыми доменами и, конкретнее, с аминокислотными остатками Y345, D399, E400, R401 и R480. Свойства антител согласно настоящему изобретению делают их превосходными кандидатами для терапевтических и диагностических вариантов применения.

Таким образом, в соответствии с одним вариантом реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело или фрагмент антитела, обладающие специфичностью по отношению к белку CD73 человека и связывающиеся с одним или более аминокислотных остатков, выбранных в C-концевой области белка CD73 человека. C-концевая часть белка CD73 человека, как известно в данной области техники, содержит 238 аминокислотных остатков, начиная с остатка 337, как показано в SEQ ID NO: 61.

В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с одним или более из C-концевых доменов белка CD73 человека. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с одним из аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из или более из Y345, D399, E400, R401 и R480 белка CD73 человека. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается по меньшей мере двумя из указанных аминокислотных остатков.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело против CD73 или его фрагмент, содержащий CDR1 VH согласно SEQ ID NO: 1, CDR2 VH согласно SEQ ID NO: 2, CDR3 VH согласно SEQ ID NO: 3, CDR1 VL согласно SEQ ID NO: 4, CDR2 VL согласно SEQ ID NO: 5 и CDR3 VL согласно SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи, константную область легкой цепи, Fc-область или их комбинацию. В некоторых вариантах реализации константная область легкой цепи может представлять собой константную область каппа- или лямбда-цепи. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент относится к изотипу IgG, IgM, IgA, IgE или IgD, или, конкретнее, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело. В одном варианте реализации антитело или его фрагмент представляет собой гуманизированное антитело.

В некоторых вариантах реализации гуманизированное антитело или антитело человека или их фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из: (a) Thr в положении 30, (b) Lys в положении 44, (c) Met в положении 48, (d) Ile в положении 67 и (e) Arg в положении 71 согласно нумерации Kabat и их комбинаций. В некоторых вариантах реализации гуманизированное антитело или антитело человека или их фрагмент содержит переменную область легкой цепи, содержащую один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из: (a) Ser в положении 5, (b) Pro в положении 46, (c) Trp в положении 47, (d) Ser в положении 70 и (f) Tyr в положении 71 согласно нумерации Kabat и их комбинаций.

Примеры антител против CD73 или их фрагментов включают антитела или фрагменты антител, содержащие переменную область тяжелой цепи, содержащую одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 9-13, или пептид, обладающий по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 9-13. В некоторых вариантах реализации переменная область тяжелой цепи

содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 9. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент содержит вариabельную область легкой цепи, содержащую одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 15-20 и 22-24, или пептид, обладающий по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 15-20 и 22-24. В некоторых вариантах реализации вариabельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

Как показано в экспериментальном примере 7, в участки CDR могут содержать добавление, делецию или замену некоторых аминокислот с сохранением или даже улучшением свойств антитела против CD73. Соответственно, в некоторых вариантах реализации предложено выделенное антитело или фрагмент антитела, причем указанное антитело или фрагмент антитела обладает специфичностью к белку CD73 человека и содержит: (a) CDR1 VH (участок CDR1 вариabельной области тяжелой цепи) согласно SEQ ID NO: 1 или варианту SEQ ID NO: 1, содержащему одиночную замену, делецию или инсерцию по положению 1, 2 или 3 в SEQ ID NO: 1; (b) CDR2 VH согласно SEQ ID NO: 2 или варианту SEQ ID NO: 1, содержащему одиночную замену, делецию или инсерцию по положению 6, 7 или 8 в SEQ ID NO: 2; (c) CDR3 VH согласно SEQ ID NO: 3 или варианту SEQ ID NO: 3, содержащему одиночную замену, делецию или инсерцию по положению 7 или 8 в SEQ ID NO: 3; (d) CDR1 VL согласно SEQ ID NO: 4 или варианту SEQ ID NO: 4, содержащему одиночную замену, делецию или инсерцию по положению 3 или 4 в SEQ ID NO: 4; (e) CDR2 VL согласно SEQ ID NO: 5 и (f) CDR3 VL согласно SEQ ID NO: 6 или варианту SEQ ID NO: 6, содержащему одиночную замену, делецию или инсерцию по положению 1, 2, 3 или 4 в SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах реализации предложено выделенное антитело или его фрагмент, причем указанное антитело или фрагмент антитела обладает специфичностью по отношению к белку CD73 человека и содержит: (a) CDR1 VH согласно SEQ ID NO: 1 или варианту SEQ ID NO: 1, содержащему одиночную замену по положению 1, 2 или 3 в SEQ ID NO: 1; (b) CDR2 VH согласно SEQ ID NO: 2 или варианту SEQ ID NO: 1, содержащему одиночную замену по положению 6, 7 или 8 в SEQ ID NO: 2; (c) CDR3 VH согласно SEQ ID NO: 3 или варианту SEQ ID NO: 3, содержащему одиночную замену по положению 7 или 8 в SEQ ID NO: 3; (d) CDR1 VL согласно SEQ ID NO: 4 или варианту SEQ ID NO: 4, содержащему одиночную замену по положению 3 или 4 в SEQ ID NO: 4; (e) CDR2 VL согласно SEQ ID NO: 5 и (f) CDR3 VL согласно SEQ ID NO: 6 или варианту SEQ ID NO: 6, содержащему одиночную замену по положению 1, 2, 3 или 4 в SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах реализации вариант SEQ ID NO: 1 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 26-29. В некоторых вариантах реализации вариант SEQ ID NO: 2 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 30-36. В некоторых вариантах реализации вариант SEQ ID NO: 3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 37-41. В некоторых вариантах реализации вариант SEQ ID NO: 4 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42-45. В некоторых вариантах реализации вариант SEQ ID NO: 6 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 46-56.

Кроме того, в некоторых вариантах реализации предложена композиция, содержащая антитело или фрагмент антитела согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Кроме того, предложена выделенная клетка, содержащая один или более полинуклеотидов, кодирующих антитело или его фрагмент согласно настоящему изобретению.

В еще одном варианте реализации настоящего изобретения предложен способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий введение пациенту антитела или его фрагмента согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации рак выбран из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака ободочной и прямой кишки, рака эндометрия, рака пищевода, рака головы и шеи, рака почек, лейкоза, рака печени, рака легких, лимфомы, меланомы, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы и рака щитовидной железы. В некоторых вариантах реализации рак представляет собой солидную опухоль.

В некоторых вариантах реализации способ дополнительно включает введение пациенту второго агента для лечения рака. В некоторых вариантах реализации второй агент для лечения рака представляет собой ингибитор контрольной точки иммунного ответа. В некоторых вариантах реализации указанный ингибитор ингибирует экспрессию или активность белка-1 запрограммированной гибели клеток (PD-1), лиганда-1 белка запрограммированной гибели клеток (PD-L1), белка-4, ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA-4), белка-3 активации лимфоцитов (LAG-3) или их комбинаций. В некоторых вариантах реализации ингибитор представляет собой антитело против PD-1 или против PD-L1. В некоторых вариантах реализации ингибитор выбирают из группы, состоящей из пембролизумаба, ниволумаба, J43, RMP1-14, атезолизумаба, ипилимумаба и их комбинаций.

В одном варианте реализации предложен способ лечения рака у пациента, нуждающегося в этом, включающий: (a) обработку Т-клетки *in vitro* антителом или его фрагментом согласно настоящему изобретению; и (b) введение обработанной Т-клетки пациенту. В некоторых вариантах реализации способ, кроме того, включает выделение Т-клетки из организма индивида перед этапом (a).

В некоторых вариантах реализации Т-клетку выделяют из организма пациента. В некоторых вариантах реализации Т-клетку выделяют из организма индивида-донора, не являющегося пациентом. В не-

которых вариантах реализации Т-клетка является Т-лимфоцитом, инфильтрирующим опухоль, CD4+ Т-клеткой, CD8+ Т-клеткой или их комбинацией.

Кроме того, в еще одном варианте реализации предложен способ детектирования экспрессии CD73 в образце, включающий осуществление контакта образца с антителом или его фрагментом согласно настоящему изобретению в условиях связывания антитела или его фрагмента с CD73 и детектирование связывания, что означает экспрессию CD73 в образце. Кроме того, в одном варианте реализации предложен способ выявления пациента с раком, подходящего для лечения с применением терапевтического средства на основе антитела против CD73, включающий выделение клетки из организма пациента с раком и детектирование присутствия белка CD73 с помощью антитела или его фрагмента согласно настоящему изобретению.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показано связывание антитела 101-Му с рекомбинантным белком CD73 человека.

На фиг. 2 показано связывание антитела 101-Му с рекомбинантным белком CD73 человека на поверхности клетки рака яичников человека.

На фиг. 3 показана кинетика связывания антитела 101-Му с рекомбинантным белком CD73.

На фиг. 4 показано, что антитело 101-Му ингибирует ферментативную активность CD73.

На фиг. 5 показано, что антитело 101-Му ингибирует ферментативную активность CD73 на поверхности клетки.

На фиг. 6 показано, что 101-Му купирует АМФ-опосредованную супрессию CD4+ Т-клеток, на что указывает продукция ИФН-γ.

На фиг. 7 показана кинетика связывания гуманизированных антител.

На фиг. 8 показано, что гуманизированные антитела связываются с белками CD73 поверхности клеток.

На фиг. 9 показано, что гуманизированные антитела ингибировали ферментативную активность белков CD73.

На фиг. 10 показано, что гуманизированные антитела ингибировали ферментативную активность белков CD73 поверхности клеток.

На фиг. 11 показано, что гуманизированные антитела купируют АМФ-опосредованную супрессию CD4+ Т-клеток, на что указывает продукция ИФН-γ.

На фиг. 12 показано эффективное связывание Hu101-28 с растворимым CD73 и CD73 поверхности клеток.

На фиг. 13 показано, что связывание Hu101-28 с CD73 эффективно блокирует ферментативную активность CD73.

На фиг. 14 показано, что Hu101-28 неконкурентно ингибирует активность CD73.

На фиг. 15 показано, что связывание Hu101-28 с CD73 индуцирует интернализацию CD73.

На фиг. 16 показано, что Hu101-28 купирует АМФ-опосредованную супрессию Т-клеточного ответа.

На фиг. 17 показано, что Hu101-28 купирует супрессию Т-клеточного ответа, опосредованную CD73⁺ опухолевыми клетками.

На фиг. 18 представлены изображения окрашивания, на которых показано ингибирование фермента CD73 in vivo Hu101-28 в опухолях в модели ксенотрансплантата A375.

На фиг. 19 показано, что Hu101-28 демонстрировало эффективность в качестве монотерапии в модели ксенотрансплантата опухоли.

На фиг. 20 показано, что Hu101-28 синергически действует с антителом против PD-L1 при ингибировании роста опухоли.

На фиг. 21 показано связывание и ингибирование активности CD73 яванского макака Hu101-28.

На фиг. 22 показано, что Hu101-28 не конкурирует с MEDI-9447 за связывание с CD73.

На фиг. 23 приведен список аминокислотных остатков CD73, взаимодействующих с Hu101-28.

На фиг. 24 проиллюстрированы эпитопы Hu101-28 и MEDI-9447.

На фиг. 25 показана более высокая активность Hu101-28 по сравнению с MEDI-9447.

На фиг. 26 показано, что Hu101-28 эффективно ингибировал CD73 на клетках с различными уровнями экспрессии CD73.

Подробное описание

Определения

Следует отметить, что формы единственного числа, относящиеся к одному или более объектам (соответствующие артиклям "a" и "and" в тексте на английском языке), например, "антителу", представляют одно или более антител. Фактически, формы единственного числа, а также термины "один или более" и "по меньшей мере, один" можно использовать здесь взаимозаменяемо.

Подразумевается, что в настоящем документе термин "полипептид" охватывает как форму единственного числа "полипептид", так и форму множественного числа "полипептиды" и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин "полипептид" относится к любой цепи или цепям из двух или более аминокислот и не относится к продукту конкретной длины. Таким образом, определение "полипептида" вклю-

чает пептиды, дипептиды, олигопептиды, "белок", "цепь аминокислот" или любой другой термин, используемый по отношению к цепи или цепям из двух или более аминокислот, и термин "полипептид" можно использовать вместо любого из этих терминов или на равных основаниях с ними. Кроме того, подразумевается, что термин "полипептид" относится к продуктам постэкспрессионной модификации полипептида, включая, без ограничений, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, модификацию известными защитными/блокирующими группами, протеолитическое расщепление или модификацию аминокислотами, не встречающимися в природе. Полипептид может быть выделен из природного биологического источника или может продуцироваться с применением рекомбинантной технологии, однако он не обязательно транслирован со специализированной нуклеотидной последовательности. Он может быть получен любым способом, в том числе посредством химического синтеза.

В настоящем документе термин "выделенный" используется по отношению к клеткам, нуклеиновым кислотам, например, ДНК или РНК, относится к молекулам, отделенным от других ДНК или РНК, соответственно, присутствующих в природном источнике указанной макромолекулы. Термин "выделенный" в настоящем документе также относится к нуклеиновой кислоте или пептиду, в значительной степени не содержащему клеточного материала, вирусного материала или культуральной среды при продукции с использованием технологии рекомбинантных ДНК, или химических предшественников или других химических веществ при химическом синтезе. Кроме того, подразумевается, что термин "выделенная нуклеотидная кислота" включает фрагменты нуклеиновых кислот, которые в природных условиях не встречаются в виде фрагментов и не присутствовали бы в природном состоянии. Кроме того, термин "выделенный" (изолированный) в настоящем документе относится к клеткам или полипептидам, выделенным из других клеточных белков или тканей. Подразумевается, что выделенные полипептиды охватывают как очищенные, так и рекомбинантные полипептиды.

В настоящем документе термин "рекомбинантный" сам по себе имеет отношение к полипептидам или полинуклеотидам и подразумевает форму полипептида или полинуклеотида, не существующую в природе, неограничивающий пример которой можно создать путем объединения полинуклеотидов или полипептидов, обычно не встречающихся вместе.

Термины "гомология" или "идентичность" или "сходство" относятся к сходству последовательности двух пептидов или двух молекул нуклеиновой кислоты. Гомологию можно определить путем сравнения положений в каждой последовательности, которые можно выровнять для сравнения. Если положение в сравниваемых последовательностях занято одним и тем же основанием или аминокислотой, то молекулы являются гомологичными по этому положению. Степень гомологии между последовательностями является функцией количества совпадающих или гомологичных положений, общих у указанных последовательностей. "Неродственная" или "негомологичная" последовательность характеризуется менее чем 40% идентичностью, предпочтительно менее чем 25% идентичностью одной из последовательностей согласно настоящему изобретению.

Полинуклеотид или область полинуклеотида (или полипептид или область полипептида), характеризующийся некоторой процентной долей (например, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % или 99 %) "идентичности последовательности" по отношению к другой последовательности, означает, что при выравнивании указанная процентная доля оснований (или аминокислот) одинакова при сравнении двух указанных последовательностей. Это выравнивание и процентную гомологию или идентичность последовательности можно определить с использованием программного обеспечения, известного в данной области техники, например, описанного в Ausubel et al. eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*. Для выравнивания предпочтительно используют параметры по умолчанию. Одной из программ для выравнивания является BLAST при использовании параметров по умолчанию. В частности, программы BLASTN и BLASTP с использованием следующих параметров по умолчанию: Genetic code=standard; filter=none; strand=both; cutoff=60; expect=10; Matrix=BLOSUM62; Descriptions=50 sequences; sort by=HIGH SCORE; Databases=non-redundant, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+SwissProtein+SPupdate+PIR. Биологически эквивалентными полинуклеотидами являются полинуклеотиды, характеризующиеся вышеупомянутой конкретной процентной гомологией и кодирующие полипептиды, обладающие одинаковой или аналогичной биологической активностью.

Термин "эквивалентная нуклеиновая кислота или полинуклеотид" относится к нуклеиновой кислоте, обладающей нуклеотидной последовательностью с определенной степенью гомологии или идентичностью последовательности по отношению к нуклеотидной последовательности указанной нуклеиновой кислоты или ее комплементарной цепи. Подразумевается, что гомолог двухцепочечной нуклеиновой кислоты включает нуклеиновые кислоты, обладающие нуклеотидной последовательностью, характеризующейся определенной степенью гомологии по отношению друг к другу или к комплементарным цепям друг друга. В одном аспекте гомологи нуклеиновых кислот способны гибридизоваться с указанной нуклеиновой кислотой или ее комплементарной цепью. Аналогичным образом, "эквивалентный полипептид" относится к полипептиду, характеризующемуся определенной степенью гомологии или идентичности последовательности по отношению к аминокислотной последовательности эталонного полипептида. В некоторых аспектах идентичность последовательности составляет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99%. В некоторых аспектах эквивалентный полипептид или полинуклеотид

содержит одно, два, три, четыре или пять добавлений, делеций, замен и их комбинаций по сравнению с эталонным полипептидом или полинуклеотидом. В некоторых аспектах эквивалентная последовательность сохраняет активность (например, связывание эпитопа) или структуру (например, ионную связь) эталонной последовательности.

Реакции гибридизации можно выполнять в условиях различной "жесткости". В общем случае реакцию гибридизации низкой жесткости выполняют при температуре приблизительно 40°C в приблизительно 10×SSC или растворе эквивалентной ионной силы/температуры. Гибридизацию умеренной жесткости обычно выполняют при температуре приблизительно 50°C в приблизительно 6×SSC, а реакцию гибридизации высокой жесткости обычно выполняют при температуре 60°C в приблизительно 1×SSC. Реакции гибридизации также можно выполнять в "физиологических условиях", хорошо известных специалисту в данной области техники. Неограничивающий пример физиологических условий представляет собой температуру, ионную силу, pH и концентрацию Mg^{2+} , обычно встречающиеся в клетке.

Полинуклеотид состоит из специфической последовательности четырех нуклеиновых оснований: аденина (A); цитозина (C); гуанина (G); тимина (T); и урацила (U) вместо тимина, если полинуклеотид представляет собой РНК. Таким образом, термин "полинуклеотидная последовательность" представляет собой буквенное представление молекулы полинуклеотида. Это буквенное представление можно ввести в базы данных в компьютере, содержащем центральный процессор и используемом для приложений в области биоинформатики, например, функциональной геномики и поиска гомологии. Термин "полиморфизм" относится к одновременному существованию более чем одной формы гена или его фрагмента. Фрагмент гена, для которого существует по меньшей мере две различные формы, т.е. две различные нуклеотидные последовательности, называют "полиморфной областью гена". Полиморфная область может представлять собой одиночный нуклеотид, идентичность которого различается в различных аллелях.

Термины "полинуклеотид" и "олигонуклеотид" используются на равных основаниях и относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, как дезоксирибонуклеотидов, так и рибонуклеотидов или их аналогов. Полинуклеотиды могут обладать любой трех-мерной структурой и выполнять любую известную или неизвестную функцию. Ниже приведены не-ограничивающие примеры полинуклеотидов: ген или фрагмент гена (например, зонд, праймер, маркер EST или SAGE), экзоны, интроны, матричная РНК (мРНК), транспортная РНК, рибосомная РНК, рибозимы, кДНК, дцРНК, миРНК, микроРНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК любой последовательности, выделенная РНК любой последовательности, нуклеотидные зонды и праймеры. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, например, метилированные нуклеотиды, и аналоги нуклеотидов. При их наличии, модификации нуклеотидной структуры можно осуществить до или после сборки полинуклеотида. Последовательность нуклеотидов может прерываться ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид также может быть модифицирован после полимеризации, например, путем конъюгирования с компонентом-меткой. Этот термин также относится как к дву-, так и к одноцепочечным молекулам. Если иное не указано или не требуется, любой вариант реализации настоящего изобретения, представляющий собой полинуклеотид, охватывает как двухцепочечную форму, так и каждую из двух комплементарных одноцепочечных форм, заведомо или на основе прогноза составляющих двухцепочечную форму.

Термин "кодировать" по отношению к полинуклеотидам относится к полинуклеотиду, о котором говорят, что он "кодирует" полипептид, если в нативной форме или в результате манипуляции с применением способов, хорошо известных специалистам в данной области техники, его можно транскрибировать и/или транслировать с получением мРНК для полипептида и/или ее фрагмента. Антисмысловая цепь представляет собой комплементарную цепь такой нуклеиновой кислоты, и из нее можно получить кодирующую последовательность.

В настоящем документе термин "антитело" или "антигенсвязывающий полипептид" относится к полипептиду или полипептидному комплексу, специфически распознающему антиген и связывающемуся с ним. Антитело может представлять собой целое антитело и любой антигенсвязывающий фрагмент или одиночную цепь антитела. Таким образом, термин "антитело" включает любой белок или пептид, содержащий молекулу, содержащую по меньшей мере фрагмент молекулы иммуноглобулина, обладающий биологической активностью связывания с антигеном. Примеры таких фрагментов включают участок, определяющий комплементарность (CDR) тяжелой или легкой цепи или их лиганд-связывающий фрагмент, вариабельную область тяжелой или легкой цепи, константную область тяжелой или легкой цепи, каркасный участок (FR) или любой их фрагмент, или по меньшей мере один фрагмент связывающего белка, но не ограничиваются ими.

Термины "фрагмент антитела" или "антигенсвязывающий фрагмент" в настоящем документе представляют собой фрагмент антитела, например, $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab , Fv , $scFv$ и т.п. Независимо от структуры, фрагмент антитела связывается с тем же антигеном, который распознает интактное антитело. Термин "фрагмент антитела" включает аптамеры, шпигельмеры и диатела. Термин "фрагмент антитела" также включает любой синтетический белок или белок, полученный с помощью генной инженерии, действующий аналогично антителу, путем связывания со специфическим антигеном с образованием комплекса.

Термин "одноцепочечный вариабельный фрагмент" или "scFv" относится к гибриднему белку вариабельных областей тяжелой (V_H) и легкой цепей (V_L) иммуноглобулинов. В некоторых аспектах эти области соединены коротким пептидным линкером, содержащим от десяти до приблизительно 25 аминокислот. Этот линкер обычно богат глицином (в целях гибкости), а также серином или треонином (в целях растворимости), и может соединять N-конец V_H с C-концом V_L или наоборот. Этот белок сохраняет специфичность исходного иммуноглобулина, несмотря на удаление константных областей и внедрение линкера. Молекулы scFv известны в данной области и описаны, например, в патенте США 5892019.

Термин "антитело" охватывает различные классы полипептидов, которые могут различаться с биохимической точки зрения. Специалисты в данной области техники поймут, что тяжелые цепи делятся на гамма-, мю-, альфа-, дельта- или эpsilon-цепи ($\gamma, \mu, \alpha, \delta, \epsilon$), внутри которых существуют подклассы (например, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Это является природой данной цепи, которая определяет "класс" антитела, например, IgG, IgM, IgA, IgG или IgE, соответственно. Подклассы (изотипы) иммуноглобулинов например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgG₅ и т.д. хорошо изучены и известно, что они характеризуются функциональной специализацией. Квалифицированный специалист легко различает модифицированные версии каждого из этих классов и изотипов в свете настоящего изобретения и, соответственно, входят в рамки настоящего изобретения. Все классы иммуноглобулинов в явном виде входят в рамки настоящего изобретения, и последующее обсуждение будет в целом посвящено классу IgG молекул иммуноглобулинов. По отношению к IgG, стандартная молекула иммуноглобулина содержит два идентичных полипептида легкой цепи с молекулярной массой приблизительно 23000 дальтон, и два идентичных полипептида тяжелой цепи с молекулярной массой приблизительно 53000-70000. Указанные четыре цепи обычно соединены дисульфидными связями в "Y"-конфигурацию, где легкие цепи сгруппированы с тяжелыми цепями, начиная с горловины указанной "Y"-конфигурации и далее на протяжении вариабельной области.

Антитела, антигенсвязывающие полипептиды, их варианты или производные согласно настоящему изобретению включают поликлональные, моноклональные, мультиспецифические, гуманизированные, приматизированные или химерные антитела или антитела человека, одноцепочечные антитела, эпитопсвязывающие фрагменты, например, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fv, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, Fv с дисульфидными связями (sdFv), фрагменты, содержащие VK- или VH-домен, фрагменты, продуцированные библиотекой экспрессии Fab, и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id антитела к антителам LIGHT, описанным в настоящем документе), но не ограничиваются ими. Иммуноглобулины или молекулы антител согласно настоящему изобретению могут относиться к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассу молекул иммуноглобулинов.

Легкие цепи классифицируются как каппа или лямбда (K, λ). Тяжелая цепь каждого класса может связываться с каппа- или лямбда-легкой цепью. В общем случае легкая и тяжелая цепи ковалентно связаны друг с другом, и "хвостовые" фрагменты двух тяжелых цепей соединены друг с другом посредством ковалентных дисульфидных связей или нековалентных связей, если иммуноглобулины получают с помощью гибридом, В-клеток или рекомбинантных клеток-хозяев. В тяжелой цепи аминокислотная последовательность идет от N-концевой области на раздвоенных концах Y-конфигурации до C-концевой области в нижней части каждой цепи.

Как легкая, так и тяжелая цепь делятся на области, обладающие структурной и функциональной гомологией. Термины "константный" и "вариабельный" используются в функциональном значении. В связи с этим следует принимать во внимание, что вариабельные домены фрагментов как легкой (VK) и тяжелой (VH) цепи определяют распознавание антигена и специфичность. И наоборот, константные домены легкой цепи (СК) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) придают антителу важных биологических свойства, например, секрецию, способность проходить через плацентарный барьер, связывание с Fc-рецептором, связывание с комплементом и т.п. Согласно принятой нумерации, номера доменов константной области увеличиваются по мере того, как они становятся более дистальными от антигенсвязывающего сайта или N-концевой области антитела. N-концевой фрагмент представляет собой вариабельную область, а C-концевой фрагмент представляет собой константную область; CH3- и СК-домены фактически составляют C-конец тяжелой и легкой цепи, соответственно.

Как указано выше, вариабельная область позволяет антителу специфически распознавать и специфически связывать эпитопы антигенов. Т.е. VK-домен и VH-домен или набор участков, определяющих комплементарность (CDR) антитела совместно образуют вариабельную область, которая определяет трехмерный антигенсвязывающий сайт. Эта четвертичная структура антитела образует антигенсвязывающий сайт, присутствующий на конце каждого плеча Y-образной структуры. Конкретнее, антигенсвязывающий сайт определяют три CDR на каждой из VH- и VK-цепи (т.е. CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3). В некоторых случаях, например, в некоторых молекулах иммуноглобулинов, полученных из видов семейства верблюдовых или сконструированных на основе иммуноглобулинов верблюдовых, полная молекула иммуноглобулина может состоять только из тяжелых цепей и не содержать легких цепей. См., например, Hamers-Casterman et al, Nature 363:446-448 (1993).

В природных антителах шесть "участков, определяющих комплементарность" или "CDR", присут-

ствующих в каждом антигенсвязывающем домене, представляют собой короткие несмежные последовательности аминокислот, специфически расположенные с образованием антигенсвязывающего домена антитела, поскольку антитело предусматривает образование трехмерной конфигурации в водной среде. Остальные аминокислоты в антигенсвязывающих доменах, называемые "каркасными" участками, демонстрируют меньшую межмолекулярную изменчивость. Каркасные участки большей частью принимают конформацию β -листа, а CDR образуют петли, которые соединяются с Р-листом и в некоторых случаях входят в состав его структуры. Таким образом, каркасные участки действуют как каркас, обеспечивающий размещение CDR в нужной ориентации путем нековалентного взаимодействия между цепями. Антигенсвязывающий домен, образованный размещенными CDR, определяет поверхность, комплементарную эпитопу иммунологически реактивного антигена. Комплементарная поверхность стимулирует нековалентное связывание антитела с его эпитопом. Аминокислоты, составляющие CDR и каркасные участки, соответственно, легко может выявить специалист в данной области техники для любой заданной вариативной области тяжелой или легкой цепи, поскольку они точно определены (см. "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., et al, U.S. Department of Health and Human Services, (1983); и Chothia and Lesk, J. Mol. Biol, 196:901-917(1987)).

Если существуют два определения термина, используемые и/или принятые в данной области техники, подразумевается, что определение данного термина, используемое в настоящем документе, включает все такие значения, если обратное не указано явным образом. Конкретным примером является использование термина "участок, определяющий комплементарность" ("CDR" для описания несмежных антигенсвязывающих сайтов в пределах вариативной области полипептидов тяжелых и легких цепей. Данная конкретная область описана в работах Kabat et al, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) и Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылок. Определения CDR по Kabat и Chothia включают перекрывающиеся при сравнении друг с другом наборы аминокислотных остатков. Тем не менее, подразумевается, что применение любого определения по отношению к CDR антитела или его вариантов находится в рамках указанного термина в соответствии с его определением и использованием в настоящем документе. Соответствующие аминокислотные остатки, составляющие CDR согласно определению по каждой из вышеприведенных ссылок, приведены ниже в таблице для сравнения. Точные номера остатков, составляющих конкретный CDR, меняются в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области техники могут в рабочем порядке определить, какие остатки составляют конкретный CDR с учетом аминокислотной последовательности вариативной области антитела.

	Kabat	Chothia
CDR-H1	31-35	26-32
CDR-H2	50-65	52-58
CDR-H3	95-102	95-102
CDR-L1	24-34	26-32
CDR-L2	50-56	50-52
CDR-L3	89-97	91-96

Kabat et al. также задали систему нумерации для последовательностей вариативных доменов, применимую к любому антителу. Специалист в данной области техники может однозначно присвоить эту систему "нумерации Kabat" любой последовательности вариативного домена, безотносительно к экспериментальным данным, кроме самой последовательности. В настоящем документе "нумерация Kabat" относится к системе нумерации, заданной в работе Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983).

В дополнение к вышеуказанной таблице, система нумерации Kabat описывает участки CDR следующим образом: CDR-H1 начинается приблизительно в положении аминокислоты 31 (т.е. приблизительно через 9 остатков после первого остатка цистеина), содержит приблизительно 5-7 аминокислот и заканчивается на следующем остатке триптофана. CDR-H2 начинается на пятнадцатом остатке после конца CDR-H1, содержит приблизительно 16-19 аминокислот и заканчивается на следующем остатке аргинина или лизина. CDR-H3 начинается приблизительно на тридцать третьем аминокислотном остатке после конца CDR-H2; содержит 3-25 аминокислот и заканчивается последовательностью W-G-X-G, где X - любая аминокислота. CDR-L1 начинается приблизительно в положении остатка 24 (т.е. после остатка цистеина); содержит приблизительно 10-17 аминокислот и заканчивается на следующем остатке триптофана. CDR-L2 начинается приблизительно на шестнадцатом остатке после конца CDR-L1 и содержит приблизительно 7 остатков. CDR-L3 начинается приблизительно на тридцать остатке после конца CDR-L2 (т.е. после остатка цистеина), содержит приблизительно 7-11 остатков и заканчивается последовательностью F или W-G-X-G, где X - любая аминокислота.

Антитела, описанные в настоящем документе, можно получить из организма любых животных, в том числе птиц и млекопитающих. Антитела предпочтительно представляют собой антитела человека, мыши, осла, кролика, козы, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или курицы. В еще одном варианте реализации вариативная область может иметь происхождение из хрящевых рыб (например, акул).

В настоящем документе термин "константная область тяжелой цепи" содержит аминокислотные последовательности, происходящие из тяжелой цепи иммуноглобулина. Полипептид, содержащий константную область тяжелой цепи, содержит по меньшей мере один из: СН1-домена, шарнирного (например, областей верхнего, среднего и/или нижнего шарнира) домена, СН2-домена, СН3-домена или их варианта или фрагмента. Например, антигенсвязывающий полипептид для применения в настоящем изобретении может содержать полипептидную цепь, содержащую СН1-домен; полипептидную цепь, содержащую СН1-домен, по меньшей мере фрагмент шарнирного домена, и СН2-домен; полипептидную цепь, содержащую СН1-домен и СН3-домен; полипептидную цепь, содержащую СН1-домен, по меньшей мере фрагмент шарнирного домена, и СН3-домен, или полипептидную цепь, содержащую СН1-домен, по меньшей мере фрагмент шарнирного домена, СН2-домен и СН3-домен. В еще одном варианте реализации полипептид согласно настоящему изобретению содержит полипептидную цепь, содержащую СН3-домен. Кроме того, в антителе для применения в настоящем изобретении может отсутствовать по меньшей мере фрагмент СН2-домена (например, СН2-домен может полностью или частично отсутствовать). Как указано выше, специалист в данной области техники поймёт, что константную область тяжелой цепи можно модифицировать таким образом, что ее аминокислотная последовательность будет отличаться от природной молекулы иммуноглобулина.

Константная область тяжелой цепи антитела, описанного в настоящем документе, может происходить из различных молекул иммуноглобулинов. Например, константная область тяжелой цепи полипептида может содержать СН1-домен, происходящий из молекулы IgG1, и шарнирную область, происходящую из молекулы IgG3. В еще одном примере константная область тяжелой цепи полипептида может содержать шарнирную область, частично происходящую из молекулы IgG1, и частично происходящую из молекулы IgG3. В еще одном примере фрагмент тяжелой цепи может содержать химерный шарнир, происходящий частично из молекулы IgG1, и частично от молекулы IgG4.

В настоящем документе термин "константная область легкой цепи" содержит аминокислотные последовательности, происходящие из легкой цепи антитела. Константная область легкой цепи предпочтительно содержит по меньшей мере один из константного каппа-домена или константного лямбда-домена.

"Пара легкая цепь - тяжелая цепь" относится к совокупности легкой цепи и тяжелой цепи, которые могут образовывать димер за счет дисульфидной связи между CL-доменом легкой цепи и СН1-доменом тяжелой цепи.

Как было указано ранее, субъединичная структура и трехмерная конфигурация константных областей различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. В настоящем документе термин "VN-домен" включает N-концевой вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, а термин "СН1-домен" включает первый (наиболее близкий к N-концу) домен константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. СН1-домен расположен рядом с VN-доменом и со стороны N-конца от шарнирной области тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина.

В настоящем документе термин "СН2-домен" включает фрагмент молекулы тяжелой цепи, который распространяется, например, от приблизительно 244 остатка до 360 остатка антитела согласно общепринятым схемам нумерации (остатки 244-360, система нумерации Kabat; и остатки 231-340, система нумерации EC; см. Kabat et al, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983). СН2-домен уникален тем, что он не сопряжен с другим доменом непосредственно. Вместо этого между двумя СН2-доменами интактной нативной молекулы IgG находятся две N-связанные разветвленные углеводные цепи. Кроме того, хорошо документировано, что СН3-домен распространяется от СН2-домена до С-конца молекулы IgG и содержит приблизительно 108 остатков.

В настоящем документе термин "шарнирная область" включает фрагмент молекулы тяжелой цепи, соединяющий СН1-домен с СН2-доменом. Эта шарнирная область содержит приблизительно 25 остатков и является гибкой, что позволяет двум N-концевым антигенсвязывающим областям двигаться независимо. Шарнирные области можно разделить на три отдельные домена: верхний, средний и нижний шарнирные домены (Roux et al., J. Immunol 161:4083 (1998)).

В настоящем документе термин "дисульфидная связь" включает ковалентную связь, образованную между двумя атомами серы. Аминокислота цистеин содержит тиоловую группу, которая может образовывать дисульфидную связь или мостик со второй тиоловой группой. В большинстве природных молекул IgG области СН1 и СК соединены дисульфидной связью, а две тяжелые цепи соединены двумя дисульфидными связями по положениям, соответствующим 239 и 242 остаткам согласно системе нумерации Kabat (положениям 226 или 229 согласно системе нумерации EC).

В настоящем документе термин "химерное антитело" означает любое антитело, в котором иммунореактивная область или сайт получены или происходят из первого вида животного, а константная область (которая может быть интактной, частичной или модифицированной в соответствии с настоящим изобретением) получена из антитела другого вида животного. В некоторых вариантах реализации область или сайт связывания мишени имеет нечеловеческое происхождение (например, получен из организма мыши или примата), а константная область получена из антитела человека.

В настоящем документе "процент гуманизации" рассчитывают, определяя количество различающихся аминокислот в каркасном участке (т.е. различий в участках, не относящихся к CDR) между гума-

низированным доменом и эмбриональным доменом, вычитая это количество из общего количества аминокислот, а затем деля его на общее количество аминокислот и умножая на 100.

Слова "специфически связывается" или "обладает специфичностью к" в общем случае означают, что антитело связывается с эпитопом посредством своего антигенсвязывающего домена и что указанное связывание предусматривает некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпитопом. Согласно указанному определению, говорят, что антитело "специфически связывается" с эпитопом, если оно связывается с указанным эпитопом через свой антигенсвязывающий домен легче, чем в случае связывания со случайным, неспецифическим эпитопом. Термин "специфичность" используется в настоящем документе для оценки относительной аффинности, с которым определенное антитело связывается с определенным эпитопом. Например, можно считать, что антитело "А" обладает более высокой специфичностью к данному эпитопу, чем антитело "В", или можно сказать, что антитело "А" связывается с эпитопом "С" с более высокой специфичностью, чем с родственным эпитопом "D".

В настоящем документе термины "лечить" и "лечение" относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическому или предохранительным мерам, причем их целью является предотвращение или замедление (ослабление) нежелательного физиологического изменения или нарушения, например, прогрессирования рака. Благоприятные или желательные клинические результаты включают, без ограничения, смягчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизированное (т.е. не ухудшающееся) состояние заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или временное ослабление болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), как обнаружимые (детектируемые), так и необнаружимые (недетектируемые). Термин "лечение" также может означать увеличение продолжительности жизни по сравнению с ожидаемой продолжительностью жизни при отсутствии лечения. Лица, нуждающиеся в лечении, включают лиц, которые уже страдают состоянием или нарушением, а также лиц, склонных к состояниям или нарушениям, или лиц, у которых это состояние или нарушение следует предотвратить.

Термин "субъект" или "индивид" или "животное" или "пациент" или "млекопитающее" обозначает любого субъекта, в частности, субъекта-млекопитающее, для которого диагностика, прогнозирование или терапия являются желательными. Субъекты-млекопитающие включают людей, домашних животных, сельскохозяйственных животных и животных, содержащихся в зоопарках, используемых в спортивных целях или комнатных животных, например, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупный рогатый скот, коров и т.д.

В настоящем документе такие фразы, как "пациенту, нуждающемуся в лечении" или "субъект, нуждающийся в лечении" включают субъектов, например, субъектов-млекопитающих, для которых введение антитела или композиции согласно настоящему изобретению может быть благоприятным, например, для детектирования, диагностической процедуры и/или лечения.

Антитела против CD73

В настоящем изобретении предложены антитела против CD73 с высокой аффинностью и ингибиторной активностью по отношению к белку CD73 человека. Указанные антитела могут эффективно связываться как со свободным CD73, так и с CD73 на поверхности клеток. Связывание с белком CD73 на поверхности клетки может вызвать интернализацию; это приводит к снижению экспрессии белка CD73 на поверхности клетки, что снижает уровень внеклеточного аденозина и ослабляет иммуносупрессивное окружение опухоли. Кроме того, поскольку эти антитела не конкурируют с субстратом АМФ за связывание с активным центром CD73, а действуют аллостерически или посредством других неконкурентных механизмов, эти антитела не мешают связыванию CD73 с этими эндогенными субстратами АМФ, что ограничивает потенциальные нежелательные эффекты этих антител.

Кроме того, как продемонстрировано в экспериментальных примерах, эти антитела обладают некоторыми уникальными свойствами, не наблюдаемыми у известных антител против CD73, например, MEDI-9447 производства Medimmune. Как показано в примере 12, хотя MEDI-9447 и 11F11 связываются с N-концевыми доменами белка CD73, целевые аминокислоты настоящих антител (например, Y345, D399, E400, R401 и R480) находятся в С-концевых доменах.

Фермент CD73 состоит из димера двух идентичных субъединиц массой 70 кДа, связанных гликозилфосфатидилинозитной связью с внешней стороной плазматической мембраны. Кристаллические структуры димерного CD73 человека позволяют выявить интенсивный конформационный переход между открытой и закрытой формами фермента, который необходим для надлежащего функционирования фермента. Поверхность контакта при димеризации образована С-концевыми доменами. Если С-концевые домены вовлечены в другие виды связывания, предполагается, что димеризация и/или конформационный переход может блокироваться в результате ингибирования активности CD73. В отличие от этого, связывание с антителом по N-концевым доменом может не приводить к таким эффектам.

Таким образом, предполагается, что если антитела согласно настоящему изобретению связывают белок CD73 по его С-концевым доменам, они могут блокировать димеризацию белка и эффективно ингибировать его активность. Таким образом, антитела согласно настоящему изобретению более предпочтительны по сравнению с ранее известными антителами против CD73, которые связываются с N-концевыми доменами.

Таким образом, в соответствии с одним вариантом реализации настоящего изобретения предложено выделенное антитело или фрагмент антитела, обладающие специфичностью по отношению к белку CD73 человека и связывающиеся с одним или более аминокислотных остатков, выбранных в С-концевой области белка CD73 человека. С-концевая часть белка CD73 человека, как известно в данной области техники, содержит 238 аминокислотных остатков, начиная с остатка 337, как показано в SEQ ID NO: 61 в таблице ниже.

Таблица А

Последовательность CD73	
Название	Последовательность (SEQ ID NO: 61; С-концевой фрагмент выделен подчеркнутым полужирным шрифтом)
Белок CD73 человека	MCFRAAPAPATLLALLGAVLWPAAGAWELTILHTNDVHSRLQTSSEDSKCVNASRCMGGVARLFTKVQQ IRRAEPNVLLLDAGDQYQGTIWFTVYKGAEVAFHFMNALRYDAMALGNHEFDNGVEGLIEPLLKEAKFPIL SANIKAKGPLASQISGLYLPYKVLVPGDEVVGIVGYTSKETPFLSNPGTNLVEFEDEITALQPEVDKLT NVNKIIALGHSGFEMDKLIAQKVRGVDVVGGHNTFLYTGNPFSKEVPAGKYFFIVTSDDGRKVPVQA YAFGKYLGLKIEFDERGNVIS SHGNPI LLNSSIPEDPSIKADINKWRIKLDNYST<u>QELGKTIVYLDGSS</u> <u>QSCRFRECNMGNLICDAMINNLRHTDEMFVNVHSMCI LGGGGIRSPIDERNNGTITWENLAAVLPFGGT</u> <u>FDLVQLKGSTLKKAFEHSHVRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDLSRKPGDRVVKLDVLC TKCRVPSYDPLKMD</u> <u>EVYKVI LPNFLANGGDGFQMIKDELLRHDSGDQD INVSTYI SKMKVI YPAVEGRIFSTGSHCHGSFSL</u> <u>IFLSLWAVIFVLYQ</u>

В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с одним или более из С-концевых доменов белка CD73 человека. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с одним из аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из или более из Y345, D399, E400, R401 и R480 белка CD73 человека. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается по меньшей мере двумя из указанных аминокислотных остатков.

В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с по меньшей мере Y345 и D399. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с по меньшей мере Y345 и E400. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с по меньшей мере Y345 и R401. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с по меньшей мере Y345 и R480. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с по меньшей мере D399 и E400. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с по меньшей мере D399 и R401. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с по меньшей мере D399 и R480. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с по меньшей мере E400 и R401. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с по меньшей мере E400 и R480. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с по меньшей мере R401 и R480.

В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с по меньшей мере Y345, D399 и E400. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с по меньшей мере Y345, D399 и R401. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с по меньшей мере Y345, D399 и R480. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с по меньшей мере Y345, E400 и R401. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с по меньшей мере Y345, E400 и R480. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с по меньшей мере Y345, R401 и R480. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с по меньшей мере D399, E400 и R401. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с по меньшей мере D399, E400 и R480. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с по меньшей мере E400, R401 и R480.

В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с по меньшей мере Y345, D399, E400 и R401. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с по меньшей мере Y345, D399, E400 и R480. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с по меньшей мере Y345, D399, R401 и R480. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с по меньшей мере Y345, E400, R401 и R480. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с по меньшей мере D399, E400, R401 и R480. В некоторых вариантах реализации антитело или его фрагмент связывается с каждым из остатков Y345, D399, E400, R401 и R480.

В соответствии с одним вариантом реализации настоящего изобретения предложено антитело, содержащее переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи с участками CDR, заданными в SEQ ID NO: 1-6.

Таблица 1

Последовательности участков CDR

Название	Последовательности	SEQ ID NO:
VH CDR1	<u>SGYYWN</u>	1
VH CDR2	<u>YINYGG</u> SNGYNP <u>SLKS</u>	2
VH CDR3	<u>DYDAYYEALDD</u>	3
VL CDR1	<u>RASSRV</u> NMYH	4
VL CDR2	<u>ATSNLAS</u>	5
VL CDR3	<u>QQWSSNPPT</u>	6

Как продемонстрировано в экспериментальных примерах, антитела мыши, человека или гуманизированные антитела, содержащие эти участки CDR, обладают мощной CD73-связывающей и ингибиторной активностью. Дальнейшее компьютерное моделирование показало, что некоторые остатки в пределах CDR можно модифицировать с сохранением или улучшением свойств антител. Такие остатки называют "горячими точками"; они выделены подчеркиванием в таблице 1. В некоторых вариантах реализации антитело против CD73 согласно настоящему изобретению содержит CDR VH и VL, перечисленные в табл. 1, с одной, двумя или тремя дополнительными модификациями. Такие модификации могут представлять собой добавления, делеции или замены аминокислот.

В некоторых вариантах реализации модификация представляет собой замену в не более чем одном положении горячей точки в каждом из CDR. В некоторых вариантах реализации модификация представляет собой замену в одном, двух или трех таких положениях горячей точки. В одном варианте реализации модификация представляет собой замену в одном из положений горячей точки. В некоторых вариантах реализации такие замены являются консервативными заменами.

"Консервативная аминокислотная замена" является заменой, при которой аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком, содержащим аналогичную боковую цепь. В данной области техники определены семейства аминокислотных остатков, содержащих сходные боковые цепи, в том числе основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Так, аминокислотный остаток, не являющийся незаменимой аминокислотой, в составе полипептида иммуноглобулина предпочтительно замещают другим аминокислотным остатком из того же семейства боковой цепи. В еще одном варианте реализации цепь аминокислот можно заменить структурно аналогичной цепью, отличающейся порядком и/или составом членов семейства боковой цепи.

Неограничивающие примеры консервативных аминокислотных замен приведены ниже в таблице, где балльный показатель сходства, равный 0 или выше, указывает на консервативную замену между двумя аминокислотами.

Таблица 2

Матрица сходства аминокислот

	C	G	P	S	A	T	D	E	N	Q	H	K	R	V	M	I	L	F	Y	W
W	-8	-7	-6	-2	-6	-5	-7	-7	-4	-5	-3	-3	2	-6	-4	-5	-2	0	0	17
Y	0	-5	-5	-3	-3	-3	-4	-4	-2	-4	0	-4	-5	-2	-2	-1	-1	7	10	
F	-4	-5	-5	-3	-4	-3	-6	-5	-4	-5	-2	-5	-4	-1	0	1	2	9		
L	-6	-4	-3	-3	-2	-2	-4	-3	-3	-2	-2	-3	-3	2	4	2	6			
I	-2	-3	-2	-1	-1	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4	2	5				
M	-5	-3	-2	-2	-1	-1	-3	-2	0	-1	-2	0	0	2	6					
V	-2	-1	-1	-1	0	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4						
R	-4	-3	0	0	-2	-1	-1	-1	0	1	2	3	6							
K	-5	-2	-1	0	-1	0	0	0	1	1	0	5								
H	-3	-2	0	-1	-1	-1	1	1	2	3	6									
Q	-5	-1	0	-1	0	-1	2	2	1	4										
N	-4	0	-1	1	0	0	2	1	2											
E	-5	0	-1	0	0	0	3	4												
D	-5	1	-1	0	0	0	4													
T	-2	0	0	1	1	3														
A	-2	1	1	1	2															
S	0	1	1	1																
P	-3	-1	6																	
G	-3	5																		
C	12																			

Таблица 3

Консервативные аминокислотные замены

Для аминокислоты	Замена
Аланин	D-Ala, Gly, Aib, β -Ala, L-Cys, D-Cys
Аргинин	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn D-Orn
Аспарагин	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu Gln, D-Gln
Аспарагиновая кислота	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Цистеин	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr, L-Ser, D-Ser
Глутамин	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Глутаминовая кислота	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Глицин	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala
Изолейцин	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Лейцин	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
Лизин	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
Метионин	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Фенилаланин	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
Пролин	D-Pro
Серин	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, L-Cys, D-Cys
Треонин	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
Тирозин	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
Валин	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

Конкретные примеры CDR с подходящими заменами представлены в SEQ ID NO: 26-56 примера 7. Таким образом, в некоторых вариантах реализации антитело согласно настоящему изобретению содержит CDR1 VH согласно SEQ ID NO: 1 или любой из 26-29. В некоторых вариантах реализации антитело согласно настоящему изобретению содержит CDR2 VH согласно SEQ ID NO: 2 или любой из 30-36. В некоторых вариантах реализации антитело согласно настоящему изобретению содержит CDR3 VH согласно SEQ ID NO: 1 или любой из 37-41. В некоторых вариантах реализации антитело согласно настоящему изобретению содержит CDR1 VL согласно SEQ ID NO: 4 или любой из 42-45. В некоторых вариантах реализации антитело согласно настоящему изобретению содержит CDR2 VL согласно SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах реализации антитело согласно настоящему изобретению содержит CDR3 VL согласно SEQ ID NO: 6 или любой из 46-56.

В некоторых вариантах реализации антитело или фрагмент антитела содержит не более одной, не более двух или не более трех из вышеуказанных замен. В некоторых вариантах реализации антитело или фрагмент антитела содержит CDR1 VH согласно SEQ ID NO: 1 или любой из SEQ ID NO: 26-29, CDR2 VH согласно SEQ ID NO: 2, CDR3 VH согласно SEQ ID NO: 3, CDR1 VL согласно SEQ ID NO: 4, CDR2 VL согласно SEQ ID NO: 5 и CDR3 VL согласно SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах реализации антитело или фрагмент антитела содержит CDR1 VH согласно SEQ ID NO: 1, CDR2 VH согласно SEQ ID NO: 2 или любой из SEQ ID NO: 30-36, CDR3 VH согласно SEQ ID NO: 3, CDR1 VL согласно SEQ ID NO: 4, CDR2 VL согласно SEQ ID NO: 5 и CDR3 VL согласно SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах реализации антитело или фрагмент антитела содержит CDR1 VH согласно SEQ ID NO: 1, CDR2 VH согласно SEQ ID NO: 2, CDR3 VH согласно SEQ ID NO: 3 или любой из SEQ ID NO: 37-41, CDR1 VL согласно SEQ ID NO: 4, CDR2 VL согласно SEQ ID NO: 5 и CDR3 VL согласно SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах реализации антитело или фрагмент антитела содержит CDR1 VH согласно SEQ ID NO: 1, CDR2 VH согласно SEQ ID NO: 2, CDR3 VH согласно SEQ ID NO: 3, CDR1 VL согласно SEQ ID NO: 4 или любой из SEQ ID NO: 42-45, CDR2 VL согласно SEQ ID NO: 5 и CDR3 VL согласно SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах реализации антитело или фрагмент антитела содержит CDR1 VH согласно

SEQ ID NO: 1, CDR2 VH согласно SEQ ID NO: 2, CDR3 VH согласно SEQ ID NO: 3, CDR1 VL согласно SEQ ID NO: 4, CDR2 VL согласно SEQ ID NO: 5 и CDR3 VL согласно SEQ ID NO: 6 или любой из SEQ ID NO: 46-56.

Неограничивающие примеры VH представлены в SEQ ID NO: 7 и 9-13, среди которых SEQ ID NO: 10 представляет собой VH мыши, а SEQ ID NO: 7, 9 и 11-13 -гуманизированные последовательности. Кроме того, среди гуманизированных VH SEQ ID NO: 7, 9 и 12-13 содержат одну или более обратную мутацию к версии мыши. Аналогичным образом, неограничивающие примеры VL (VK) представлены в SEQ ID NO: 8, 15-20 и 22-24. SEQ ID NO: 15 представляет собой последовательность мыши, SEQ ID NO: 16 и 22 -исходно модифицированные гуманизированные последовательности, показанные в примерах. SEQ ID NO: 8, 17-20 и 22-24 представляют собой гуманизированные VL с обратными мутациями.

Показано, что обратные мутации полезны для сохранения некоторых характеристик антител против CD73. Соответственно, в некоторых вариантах реализации антитела против CD73 согласно настоящему изобретению, в частности, антитела человека или гуманизированные антитела, содержат одну или более обратных мутаций. В некоторых вариантах реализации обратная мутация в VH (т.е. включенная аминокислота в указанном положении) представляет собой одну или более мутаций, выбранных из (a) Thr в положении 30, (b) Lys в положении 44, (c) Met в положении 48, (d) Ile в положении 67 и (e) Arg в положении 71 согласно нумерации Kabat и их комбинаций. В некоторых вариантах реализации обратная мутация в VL представляет собой одну или более мутаций, выбранных из (a) Ser в положении 5, (b) Pro в положении 46, (c) Trp в положении 47, (d) Ser в положении 70 и (f) Tyr в положении 71 согласно нумерации Kabat и их комбинаций.

В некоторых вариантах реализации антитело против CD73 согласно настоящему изобретению содержит VH согласно SEQ ID NO: 7 или любой из 9-13, VL согласно SEQ ID NO: 8 или любой из 15-20 и 22-24, или их соответствующие биологические эквиваленты. Биологический эквивалент VH или VL представляет собой последовательность, содержащую заданные аминокислоты и обладающую 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% общей идентичностью последовательности. Биологический эквивалент SEQ ID NO: 7, таким образом, может представлять собой VH, обладающую 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% общей идентичностью последовательности по отношению к SEQ ID NO: 7, но сохраняющую CDR (SEQ ID NO: 1-6 или их варианты), и, необязательно, сохраняющую одну или более или все обратные мутации.

В одном варианте реализации VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, а VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В одном варианте реализации VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, а VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

Кроме того, специалист в данной области техники поймет, что антитела, описанные в настоящем документе, можно модифицировать таким образом, что их аминокислотная последовательность будет отличаться от природного связывающего полипептида, из которого они получены. Например, полипептид или аминокислотная последовательность, происходящие из указанного белка, могут быть сходны, например, могут обладать определенной процентной идентичностью по отношению к исходной последовательности, например, могут быть на 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичны исходной последовательности.

В некоторых вариантах реализации антитело содержит аминокислотную последовательность или одну или более групп, в норме не ассоциированных с антителом. Типичные модификации подробно описаны ниже. Например, антитело согласно настоящему изобретению может содержать последовательность гибкого линкера или может быть модифицировано путем добавления функциональной группы (например, ПЭГ, лекарственного вещества, токсина или метки).

Антитела, их варианты или производные согласно настоящему изобретению включают производные, модифицированные, например, путем ковалентного присоединения к антителу молекулы любого типа, так что ковалентное присоединение не препятствует связыванию антитела с эпитопом. В качестве примера (но не в целях ограничения), антитела можно модифицировать, например, путем гликозилирования, ацетилирования, ПЭГилирования, фосфорилирования, амидирования, модификации известными защитными/блокирующими группами, протеолитического расщепления, присоединения к клеточному лиганду или другому белку и т.д. Любую из многочисленных химических модификаций можно выполнить с помощью известных методик, включая специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т.д., но не ограничиваясь ими. Кроме того, антитела могут содержать одну или более неклассических аминокислот.

В некоторых вариантах реализации антитела могут быть конъюгированы с терапевтическими агентами, пролекарствами, пептидами, белками, ферментами, вирусами, липидами, модификаторами биологического ответа, фармацевтическими агентами или ПЭГ.

Антитела могут быть конъюгированы или объединять с терапевтическим агентом, который может включать детектируемые метки, например, радиоактивные метки, иммуномодулятор, гормон, фермент, олигонуклеотид, фотоактивный терапевтический или диагностический агент, цитотоксический агент, который может представлять собой лекарственное вещество или токсин, контрастный агент для УЗИ, нерадиоактивную метку, их комбинацию и другие подобные агенты, известные в данной области техники.

Антитела могут быть мечены детектируемой меткой путем их присоединения к хемилюминесцентному соединению. Затем присутствие антигенсвязывающего полипептида, меченого хемилюминесцентной меткой, определяют путем детектирования наличия люминесценции, возникающей в ходе химической реакции. Примеры особенно полезных хемилюминесцентных соединений-меток представляют собой люминол, изолюминол, сложный эфир акридиния, имидазол, соль и оксалатный эфир акридиния.

Кроме того, антитела можно метить атомами металла, способными к флуоресценции, например, ^{152}Eu , или других металлов семейства лантаноидов. Эти металлы можно присоединить к антителу с использованием групп, образующих хелаты с металлами, например, диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТПА) или этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Методики конъюгирования различных групп к антителу хорошо известны, см., например, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623- 53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), Academic Press pp. 303-16 (1985), и Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* (52:119-58 (1982)).

Полинуклеотиды, кодирующие антитела, и способы получения антител

В настоящем изобретении также предложены выделенные полинуклеотиды или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела, их варианты и производные согласно настоящему изобретению. Примеры полинуклеотидов включают SEQ ID NO: 57-60. Полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут кодировать целые вариабельные области тяжелой и легкой цепи антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов и производных на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотидов. Кроме того, полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут кодировать фрагменты вариабельных областей тяжелой и легкой цепи антигенсвязывающих полипептидов, их вариантов и производных на одной и той же молекуле полинуклеотида или на отдельных молекулах полинуклеотидов.

Способы получения антител хорошо известны в данной области техники и описаны в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации как вариабельные, так и константные области антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению имеют полностью человеческое происхождение. Полностью человеческие антитела можно получить, используя методики, описанные в данной области техники и в настоящем документе. Например, полностью человеческие антитела против специфического антигена можно получить путем введения антигена в организм трансгенного животного, модифицированного с целью продукции таких антител в ответ на антигенную стимуляцию, причем эндогенные локусы указанного животного отключены. Типичные методики, которые можно применять для получения таких антител описаны в патентах США 6150584; 6458592; 6420140, полностью включенных в настоящий документ посредством ссылок.

В некоторых вариантах реализации полученные антитела не вызывают вредоносного иммунного ответа у животного, подвергаемого лечению, например, у человека. В одном варианте реализации антигенсвязывающие полипептиды, их варианты или производные согласно настоящему изобретению модифицируют для снижения их иммуногенности с использованием методик, признанных в данной области техники. Например, антитела можно гуманизировать, приматизировать, деиммунизировать или получить химерные антитела. Антитела этих типов происходят из антитела животного, не являющегося человеком, обычно от антитела мыши или примата, и сохраняют антигенсвязывающие свойства исходного антитела, однако являются менее иммуногенными для людей. Этого можно достичь различными способами, включая (а) полную трансплантацию вариабельных доменов нечеловеческого происхождения на константные области антитела человека с получением химерных антител; (b) трансплантацию по меньшей мере фрагмента одного или более участков, определяющих комплементарность (CDR), нечеловеческого происхождения на каркасные и константные области антитела человека с сохранением или без сохранения важнейших каркасных остатков; или (с) полную трансплантацию вариабельных доменов нечеловеческого происхождения, но с их маскировкой за счет секции, подобной последовательности антитела человека, посредством замены поверхностных остатков. Такие способы описаны в работах Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57:6851-6855 (1984); Morrison et al., *Adv. Immunol.* 44:65-92 (1988); Verhoeyen et al., *Science* 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.* 25:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.* 31:169-217 (1994), и патентах США № 5585089, 5693761, 5693762 и 6190370, все из которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылок.

Для снижения иммуногенности антитела также можно использовать деиммунизацию. В настоящем документе термин "деиммунизация" включает изменение антитела путем модификации Т-клеточных эпитопов (см., например, публикации международных патентных заявок № WO/9852976 A1 и WO/0034317 A2). Например, анализируют последовательности вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи исходного антитела и составляют "карту" Т-клеточных эпитопов человека каждой V-области

с указанием местоположения эпитопов по отношению к участкам, определяющим комплементарность (CDR), и другим ключевым остаткам в пределах последовательности. Отдельные Т-клеточные эпитопы из карты Т-клеточных эпитопов анализируют с целью выявления альтернативных аминокислотных замен низкого риска с точки зрения изменения активности окончательного антитела. Конструируют диапазон альтернативных последовательностей варьируемых областей тяжелой цепи и легкой цепи, содержащих комбинации аминокислотных замен, а затем эти последовательности встраивают в ряд связывающих полипептидов. Обычно получают от 12 до 24 вариантных антител и тестируют их на предмет связывание и/или функции. Затем клонируют полные гены тяжелой и легкой цепей, содержащие модифицированные варьируемые области и константные области человека, в экспрессирующих векторах, и полученные плазмиды внедряют в линии клеток для продукции полного антитела. Затем антитела сравнивают посредством соответствующих биохимических и биологических анализов и выявляют оптимальный вариант.

Специфичность связывания антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению можно определить посредством анализов *in vitro*, например, иммунопреципитации, радиоиммуноанализа (RIA) или твердофазного иммуноферментного анализа (твердофазного ИФА).

В качестве альтернативы, методики, описанные для продукции одноцепочечных единиц (патент США № 4694778; Bird, Science 242:423-442 (1988); Huston et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55:5879- 5883 (1988); и Ward et al, Nature 334:544-554 (1989)), можно приспособить для продукции одноцепочечных единиц согласно настоящему изобретению. Одноцепочечные единицы образуются при присоединении фрагментов тяжелой и легкой цепи Fv-области через аминокислотный мостик, что приводит к получению одноцепочечного гибридного пептида. Кроме того, можно использовать методики сборки функциональных Fv-фрагментов в *E. coli* (Skerra et al., Science 242: 1038-1041 (1988)).

Примеры методик, которые можно использовать для продукции одноцепочечных Fv (scFv) и антител, включают методики, описанные в патентах США № 4946778 и 5258498; Huston et al., Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Shu et al., Proc. Natl. Sci. USA 90:1995-1999 (1993); и Skerra et al, Science 240:1038-1040 (1988). Для некоторых вариантов применения, включая применение антител *in vivo* в организме человека и анализы детектирования *in vitro*, может быть предпочтительным использование химерных или гуманизированных антител или антител человека. Химерное антитело представляет собой молекулу, в которой различные фрагменты антитела происходят из различных видов животных, например, антитела, содержащие варьируемую область, происходящую из моноклонального антитела мыши, и константную область иммуноглобулина человека. В данной области техники известны способы получения химерных антител. См., например, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al, BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al, J. Immunol. Methods 125:191-202 (1989); патенты США № 5807715, 4816567 и 4816397, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылок.

Гуманизированные антитела представляют собой молекулы антител, происходящие из антител видов животных, не являющихся человеком, связывающих желательный антиген, и содержащие один или более участков, определяющих комплементарность (CDR), антитела животного, не являющегося человеком, и каркасные области из молекулы иммуноглобулина человека. Часто каркасные остатки в человеческих каркасных участках можно заменить соответствующим остатком из антитела-донора CDR с целью модификации, предпочтительно улучшения связывания с антигеном. Эти каркасные замены выявляют способами, хорошо известными в данной области техники, например, путем моделирования взаимодействий CDR и каркасных остатков для выявления каркасных остатков, важных для связывания с антигеном, и сравнения последовательностей с целью выявления необычных каркасных остатков в определенных положениях. (См., например, Queen et al, патент США № 5585089; Riechmann et al, Nature 332:323 (1988), полностью включенные в настоящий документ посредством ссылок). Антитела можно гуманизировать с использованием различных методик, известных в данной области техники, включая, например, трансплантацию CDR (EP 239400; публикацию PCT WO 91/09967; патенты США № 5225539, 5530101 и 5585089), облицовку или изменение поверхности (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al, Proc. Natl. Sci. USA 91:969-973 (1994)), и перекомбинирование цепей (патент США № 5565332), полностью включенный в настоящий документ посредством ссылки).

Полностью человеческие антитела в особенности желательны для терапевтического лечения пациентов-людей. Антитела человека можно получить с помощью различных способов, известных в данной области техники, включая способы фагового дисплея с использованием библиотек антител, полученных из последовательностей иммуноглобулинов человека. См. также патенты США № 4444887 и 4716111, и публикации PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 и WO 91/10741; каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Антитела человека также можно получать с использованием трансгенных мышей, неспособных экспрессировать функциональные эндогенные иммуноглобулины, но способных экспрессировать гены иммуноглобулина человека. Например, комплексы генов тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина человека можно внедрить в эмбриональные стволовые клетки мыши случайным образом или посредством гомологичной рекомбинации. В качестве альтернативы, варьируемую область, константную область и D-область человека можно внедрить в эмбриональные стволовые клетки мыши в дополнение к генам

тяжелой и легкой цепи человека. Гены тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина мыши можно сделать нефункциональными по отдельности или одновременно путем внедрения локусов иммуноглобулина человека путем гомологичной рекомбинации. В частности, гомозиготная делеция JH-области предотвращает эндогенную продукцию антител. Модифицированные эмбриональные стволовые клетки размножают и вводят путем микроинъекции в бластоцисты, получая химерных мышей. Затем химерных мышей скрещивают, получая гомозиготное потомство, экспрессирующее антитела человека. Трансгенных мышей иммунизируют выбранным антигеном обычным образом, например, используя полноразмерный желательный полипептид-мишень или его фрагмент. Моноклональные антитела против антигена можно получить из иммунизированных трансгенных мышей с использованием обычной гибридомной технологии. Трансгены иммуноглобулинов человека, которые несут трансгенные мыши, реаранжируются во время дифференцировки В-клеток и в дальнейшем подвергаются переключению класса и соматическим мутациям. Таким образом, использование указанной методики позволяет продуцировать терапевтически пригодные антитела IgG, IgA, IgM и IgE. Обзор этой технологии продукции антител человека см. в Lonberg and Huszar *Int. Rev. Immunol.* 73:65-93 (1995). Подробное обсуждение этой технологии продукции антител человека и моноклональных антител человека и протоколов продукции таких антител см., например, в публикациях PCTWO 98/24893; WO 96/34096; WO 96/33735; патентах США № 5413923, 5625126, 5633425, 5569825, 5661016, 5545806, 5814318 и 5939598, полностью включенных в настоящий документ посредством ссылок. Кроме того, к производству антител человека против выбранного антигена с использованием технологии, аналогичной вышеописанной, можно привлекать такие компании, как Abgenix, Inc. (Фримонт, штат Калифорния, США) и GenPharm (Сан-Хосе, штат Калифорния, США).

Полностью человеческие антитела, распознающие выбранный эпитоп, также можно получить с помощью методики, называемой "направленным отбором". В данном подходе выбранное моноклональное антитело животного, не являющегося человеком, например, антитело мыши, используют для управления отбором полностью человеческого антитела, распознающего тот же эпитоп. (Jespers et al., *Bio/Technology* 72:899-903 (1988). См. также патент США № 5565332, полностью включенный в настоящий документ посредством ссылки.)

В еще одном варианте реализации ДНК, кодирующую желательные моноклональные антитела, легко выделить и секвенировать с помощью стандартных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антител мыши). Предпочтительным источником такой ДНК служат выделенные и субклонированные клетки гибридомы. После выделения ДНК можно поместить в экспрессирующие векторы, которые затем трансфицируют в прокариотические или эукариотические клетки-хозяева, например, клетки *E. coli*, клетки COS обезьяны, клетки яичника китайского хомяка (СНО) или клетки миеломы, которые в других условиях не продуцируют иммуноглобулинов. Конкретнее, выделенную ДНК (которая может быть синтетической, как описано в настоящем документе) можно использовать для клонирования последовательностей константных и переменных областей для производства антител, как описано в Newman et al., патенте США № 5658570, поданного 25 января 1995 г., включенном в настоящий документ посредством ссылки. По существу это предусматривает выделение РНК из выбранных клеток, преобразование ее в кДНК и амплификацию посредством ПЦР с использованием Ig-специфических праймеров. Подходящие праймеры для этой цели также описаны в патенте США № 5658570. В подробном обсуждении, приведенном ниже, трансформированные клетки, экспрессирующие желательное антитело, можно выращивать в относительно больших количествах для обеспечения клинических и коммерческих поставок иммуноглобулинов.

Кроме того, при использовании обычной технологии рекомбинантных ДНК один или более CDR антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению можно вставить в каркасные области, например, в каркасные области человека для гуманизации антитела животного, не являющегося человеком. Каркасные области могут быть природными или консенсусными каркасными областями и, предпочтительно, каркасными областями человека (список каркасных областей человека см., например, в Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 278:457-479 (1998)). Полинуклеотид, полученный путем объединения каркасных участков и CDR, предпочтительно кодирует антитело, специфически связывающееся с по меньшей мере одним эпитопом желательного полипептида, например, LIGHT. Предпочтительно одну или более аминокислотных замен можно сделать в каркасных участках, и эти аминокислотные замены предпочтительно улучшают связывание антитела с его антигеном. Кроме того, такие способы можно применять для получения аминокислотных замен или делеций одного или более остатков цистеина в переменной области, участвующей в образовании внутрицепочечной дисульфидной связи, для получения молекул антител без одной или более внутрицепочечных дисульфидных связей. Другие изменения полинуклеотидов входят в состав настоящего изобретения и известны специалистам в данной области техники.

Кроме того, можно применять методики, разработанные для продукции "химерных антител" (Morgenson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*:851-855 (1984); Neuberger et al., *Nature* 372:604-608 (1984); Takeda et al., *Nature* 314:452-454 (1985)) путем сплайсинга генов молекулы антитела мыши, обладающей соответствующей антигенной специфичностью, вместе с генами молекулы антитела человека, обладающей соответствующей биологической активностью. В настоящем документе химерное антитело представляет со-

бой молекулу, в которой различные фрагменты происходят из антител различных видов животных, например, молекулу, содержащую переменную область, происходящую из моноклонального антитела мыши, и константную область иммуноглобулина человека.

Еще одно высокоэффективное средство получения рекомбинантных антител описано в работе Newman, *Biotechnology* 10: 1455-1460 (1992). Конкретно, эта методика позволяет получать приматизированные антитела, содержащие переменные домены обезьяны и константные последовательности человека. Этот источник полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Кроме того, эта методика также описана в часто цитируемых патентах США № 5658570, 5693780 и 5756096, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки.

В качестве альтернативы, линии клеток, продуцирующие антитело, можно отбирать и культивировать с использованием методик, хорошо известных специалистам. Такие методики описаны в различных лабораторных руководствах и первичных публикациях. В связи с этим методики, подходящие для применения в настоящем изобретении, описаны в монографии *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991), полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки вместе с дополнительными материалами.

Кроме того, специалистам в данной области техники известны стандартные методики, которые можно использовать для внедрения мутаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело согласно настоящему изобретению, включая сайт-специфический мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез, которые приводят к получению аминокислотных замен, но не ограничиваются ими. Варианты (включая производные) предпочтительно кодируют менее 50 аминокислотных замен, менее 40 аминокислотных замен, менее 30 аминокислотных замен, менее 25 аминокислотных замен, менее 20 аминокислотных замен, менее 15 аминокислотных замен, менее 10 аминокислотных замен, менее 5 аминокислотных замен, менее 4 аминокислотных замен, менее 3 аминокислотных замен или менее 2 аминокислотных замен по сравнению с эталонной переменной областью тяжелой цепи, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, переменной областью легкой цепи, CDR-L1, CDR-L2 или CDR-L3. В качестве альтернативы можно внедрить случайные мутации на протяжении всей кодирующей последовательности или ее части, например, путем насыщающего мутагенеза, и выполнить скрининг биологической активности среди полученных мутантов с целью выявления мутантов, сохраняющих активность.

Способы лечения

Как описано в настоящем документе, антитела, варианты или производные согласно настоящему изобретению можно применять в различных способах лечения и диагностики.

Настоящее изобретение дополнительно относится к терапевтическим способам на основе антител, включающим введение антител согласно настоящему изобретению пациенту, например, животному, млекопитающему и человеку для лечения одного или более нарушений или состояний, описанных в настоящем документе. Терапевтические соединения согласно настоящему изобретению включают антитела согласно настоящему изобретению (включая их варианты и производные, описанные в настоящем документе) и нуклеиновые кислоты или полинуклеотиды, кодирующие антитела согласно настоящему изобретению (включая их варианты и производные, описанные в настоящем документе), но не ограничиваются ими.

Кроме того, антитела согласно настоящему изобретению можно использовать для лечения или подавления рака. Как представлено выше, CD73 может сверхэкспрессироваться в опухолевых клетках. CD73, имеющий опухолевое происхождение, может функционировать как эктофермент, продуцирующий внеклеточный аденозин, который стимулирует рост опухоли за счет ограничения противоопухолевого Т-клеточного иммунитета посредством сигнального пути рецептора аденозина. Результаты, полученные с использованием низкомолекулярных ингибиторов или моноклональных антител, мишенью которых является CD73 в моделях опухолей у мышей, указывают, что терапевтическое средство, мишенью которого является CD73, представляет собой важную альтернативу и реалистичный подход к эффективному контролю опухолевого роста. В частности, он способствует действию терапевтических средств на основе Т-клеток, усиливая механизмы адаптивного иммунного ответа, что может усиливать действие Т-лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, и приводит к улучшению выживаемости у пациентов с раком.

Соответственно, в некоторых вариантах реализации предложены способы лечения рака у пациента, нуждающегося в этом. В одном варианте реализации способ предусматривает введение пациенту эффективного количества антитела согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одна из раковых клеток (например, клеток стромы) у пациента сверхэкспрессирует CD73.

Неограничивающие примеры рака включают рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак ободочной и прямой кишки, рак эндометрия, рак пищевода, рак головы и шеи, рак почек, лейкоз, рак печени, рак легких, лимфому, меланому, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы и рак щитовидной железы.

Клеточные терапевтические средства, и, конкретнее, терапевтические средства на основе Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR) также предложены в настоящем изобретении. Можно использовать подходящую Т-клетку, которая вступает в контакт с антителом против CD73 согласно настоящему изобретению (или, в качестве альтернативы, сконструированную с целью экспрессии антитела против

CD73 согласно настоящему изобретению). После такого контакта или конструирования Т-клетку можно ввести пациенту с раком, нуждающемуся в лечении. У пациента с раком может быть рак любого типа, описанного в настоящем документе. Т-клетка может представлять собой, например, Т-лимфоцит, инфильтрирующий опухоль, CD4+ Т-клетку, CD8+ Т-клетку или их комбинацию, без ограничений.

В некоторых вариантах реализации пациент с раком самостоятельно выделял(а) Т-клетку из своего организма. В некоторых вариантах реализации Т-клетка предоставлена донором или банком клеток. При выделении Т-клетки из организма пациента с раком можно минимизировать нежелательные иммунные реакции.

Дополнительные заболевания или состояния, ассоциированные с повышенной выживаемостью клеток, которые можно лечить, предотвращать, диагностировать и/или прогнозировать с использованием антител или их вариантов и производных согласно настоящему изобретению включают прогрессирующее и/или метастазирование злокачественных новообразований и связанных с ними нарушений, например, лейкоза (в том числе острых лейкозов (например, острого лимфобластного лейкоза, острого миелоцитарного лейкоза (включая миелобластный, промиелоцитарный, миеломоноцитарный, моноцитарный лейкоз и эритролейкоз) и хронических лейкозов (например, хронического миелоцитарного (гранулоцитарного) лейкоза и хронического лимфоцитарного (лейкоза)), истинной полицитемии, лимфом (например, болезни Ходжкина и неходжкинских лимфом), множественной миеломы, макроглобулинемии Вальденстрема, болезни тяжелых цепей и плотных опухолей, включая, в числе прочего, саркомы и карциномы, например, фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому, хордому, ангиосаркому, эндотелиосаркому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, мезотелиому, саркому Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, карциному толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, плоскоклеточную карциному, базальноклеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желёз, карциному слюнных желез, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарциному, медуллярный рак, бронхогенную карциному, почечноклеточную карциному, гепатому, карциному жёлчного протока, хориокарциному, семиному, эмбриональную карциному, опухоль Вильма, рак шейки матки, опухоль яичек, карциному легких, мелкоклеточную карциному легких, карциному мочевого пузыря, эпителиальную карциному, глиому, астроцитому, медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластому, невриному слухового нерва, олигодендроглиому, менангиому, меланому, нейробластому и ретинобластому, но не ограничиваются ими.

Конкретная дозировка и схема лечения любого конкретного пациента зависит от различных факторов, в том числе конкретных используемых антител, их вариантов и производных, возраста, массы тела, общего состояния здоровья, пола и питания пациента, а также времени введения, скорости выведения, комбинации лекарственных средств и тяжести конкретного заболевания, подвергаемого лечению. Экспертная оценка таких факторов медицинскими работниками входит в обычные навыки специалиста в данной области техники. Количество также зависит от индивидуальных особенностей пациента, подвергаемого лечению, пути введения, типа состава, характеристик используемого соединения, тяжести заболевания и желательного эффекта. Используемое количество можно определить с помощью фармакологических и фармакокинетических принципов, хорошо известных в данной области техники.

Способы введения антител, их вариантов включают интрадермальное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное, подкожное, интраназальное, эпидуральное и пероральное введение, но не ограничиваются ими. Антигенсвязывающие полипептиды или их композиции можно вводить любым удобным путем, например, путем вливания или болюсной инъекции, путем всасывания через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (например, слизистую полости рта, слизистую заднего прохода или кишечника и т.д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Таким образом, фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие полипептиды согласно настоящему изобретению, можно вводить перорально, ректально, парентерально, интрацистернально, интравагинально, внутрибрюшинно, наружно (в виде порошков, мазей, капель или трансдермального пластыря), буккально или в виде перорального или назального аэрозоля.

Термин "парентеральный" в настоящем документе относится к режимам введения, включающим внутривенную, внутримышечную, внутрибрюшинную, внутригрудинную, подкожную и внутрисуставную инъекцию и вливание.

Введение может быть системным или местным. Кроме того, может быть желательным введение антител согласно настоящему изобретению в центральную нервную систему любым подходящим путем, включая внутривентрикулярную или интратекальную инъекцию; внутривентрикулярную инъекцию можно облегчить с помощью внутривентрикулярного катетера, например, присоединенного к резервуару, например, резервуару Оммаи. Кроме того, можно использовать пульмональное введение, например, с помощью ингалятора или распылителя и состава с агентом, способствующим образованию аэрозоля.

Может быть желательным местное введение антигенсвязывающих полипептидов или композиций согласно настоящему изобретению в область, нуждающуюся в лечении; этого можно достичь, например (но не в целях ограничения), путем местного вливания во время хирургической операции, наружного нанесения, например, в сочетании с раневой повязкой после хирургической операции, путем инъекции,

посредством катетера, суппозитория или имплантата, причем указанный имплантат представляет собой пористый, непористый или желеобразный материал, в том числе мембраны, например, сиалястиковые мембраны или волокна. При введении белка, в том числе антитела согласно настоящему изобретению, следует следить за тем, чтобы использовать материалы, не абсорбирующие белок.

В еще одном варианте реализации антигенсвязывающий полипептид или композицию можно доставлять в везикулах, в частности, в липосомах (см. Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Treat et al, in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; см. главным образом там же).

В еще одном варианте реализации антигенсвязывающий полипептид или композицию можно доставлять в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте реализации можно использовать насос (см. Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et al, 1980, Surgery 88:507; Saudek et al, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). В еще одном варианте реализации можно использовать полимерные материалы (см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; см. также Levy et al, 1985, Science 228:190; During et al, 1989, Ann. Neurol 25:351; Howard et al, 1989, J. Neurosurg. 71:105). В еще одном варианте реализации вблизи мишени терапевтического средства, например, головного мозга, можно поместить систему с контролируемым высвобождением, так что требуется вводить только часть системной дозы (см., например, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer (1990, Science 249:1527-1533).

В конкретном варианте реализации, где композиция согласно настоящему изобретению содержит нуклеиновую кислоту или полинуклеотид, кодирующий белок, нуклеиновую кислоту можно вводить *in vivo* в целях стимуляции экспрессии кодируемого белка путем конструирования его в составе соответствующего вектора для экспрессии нуклеиновых кислот и введения таким образом, что он становится внутриклеточным, например, с использованием ретровирусного вектора (см. патент США № 4980286) или путем прямой инъекции или с использованием бомбардировки микрочастицами (например, посредством генной пушки; Biolistic, Dupont), или покрытия липидами или рецепторами клеточной поверхности или трансфицирующими агентами, или путем введения его в связи с гомеобокс-подобным пептидом, заведомо проникающим в ядро (см., например, Joliot et al, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868) и т.д. В качестве альтернативы, нуклеиновую кислоту можно ввести внутрь клетки и внедрить в ДНК клетки-хозяина для экспрессии путем гомологичной рекомбинации.

Количество антител согласно настоящему изобретению, которое может быть эффективным в лечении, подавлении и профилактике воспалительного, иммунного или злокачественного заболевания, нарушения или состояния, можно определить с помощью стандартных клинических методик. Кроме того, можно, необязательно, применять анализы *in vitro*, облегчающие определение оптимального диапазона дозы. Точная доза, применяемая в составе, также зависит от пути введения и тяжести заболевания, нарушения или состояния, и ее следует выбирать согласно оценке практикующего специалиста и с учетом обстоятельств каждого пациента. Эффективные дозы можно экстраполировать на основе кривых доза-ответ, полученных *in vitro* или в тест-системах на основе животных моделей.

В качестве общего предложения, дозировка антигенсвязывающих полипептидов согласно настоящему изобретению, вводимая пациенту, обычно составляет от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг массы тела пациента, от 0,1 мг/кг до 20 мг/кг массы тела пациента или от 1 мг/кг до 10 мг/кг массы тела пациента. Обычно антитела человека обладают более длительным временем полужизни в организме человека по сравнению с антителами других видов из-за иммунного ответа на чужеродные полипептиды. Таким образом, часто можно использовать более низкие дозировки и менее частое введение. Кроме того, дозировку и частоту введения антител согласно настоящему изобретению можно уменьшить за счет усиления поглощения и проникновения антител в ткани (например, в головной мозг) посредством модификаций, например, липидирования.

Способы лечения инфекционного или злокачественного заболевания, состояния или нарушения, включающие введение антитела, его варианта или производного согласно настоящему изобретению обычно тестируют *in vitro*, а затем *in vivo* в соответствующей модели животного на предмет желательной терапевтической или профилактической активности перед применением на людях. Подходящие животные модели, в том числе трансгенные животные, хорошо известны специалистам в данной области техники. Например, анализы *in vitro* для демонстрации терапевтического эффекта антигенсвязывающего полипептида, описанного в настоящем документе, включают действие антигенсвязывающего полипептида на линию клеток или образец ткани пациента. Действие антигенсвязывающего полипептида на линию клеток и/или образец ткани можно определить с использованием методик, известных специалистам в данной области техники, например, анализов, описанных в других частях настоящего документа. В соответствии с настоящим изобретением анализы *in vitro*, которые можно применять для определения того, показано ли введение специфического антигенсвязывающего полипептида, включают анализы в культуре клеток *in vitro*, в которых образец ткани пациента выращивают в культуре, подвергают дейст-

вию или иным образом обрабатывают соединением и наблюдают действие такого соединения на образец ткани.

Известны различные системы доставки, которые можно применять для введения антитела согласно настоящему изобретению или полинуклеотида, кодирующего антитело согласно настоящему изобретению, например, инкапсулирование в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать соединение, рецептор-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), конструирование нуклеиновой кислоты в составе ретровирусного или другого вектора и т.д.

В дополнительном варианте реализации композиции согласно настоящему изобретению вводят в комбинации с противоопухолевым агентом, противовирусным агентом, антибактериальным агентом или антибиотиком или противогрибковыми агентами. Любой из этих агентов, известных в данной области техники, можно вводить в композициях согласно настоящему изобретению.

В еще одном варианте реализации композиции согласно настоящему изобретению вводят в комбинации с химиотерапевтическим агентом. Химиотерапевтические агенты, которые можно вводить с композициями согласно настоящему изобретению, включают производные антибиотиков (например, доксорубицин, блеомицин, даунорубицин и дактиномицин); антиэстрогены (например, тамоксифен); антиметаболиты (например, фторурацил, 5-FU, метотрексат, флоксуридин, интерферон альфа-2b, глутаминовую кислоту, пликамицин, меркаптопурин и 6-тиогуанин); цитотоксические агенты (например, кармустин, BCNU, ломустин, CCNU, арабинозид цитозина, циклофосфамид, эстрамустин, гидроксимочевину, прокарбазин, митомицин, бусульфан, цисплатин и сульфат винкристина); гормоны (например, медроксипрогестерон, натрий-фосфат эстрамустина, этинилэстрадиол, эстрадиол, ацетат мегестрола, метилтестостерон, дифосфат диэтилстильбэстрола, хлортрианизен и тестолактон); производные азотистого иприта (например, мефален, хлорамбуцил, мехлорэтамин (азотистый иприт) и тиотефу); стероиды и комбинации (например, натрий-фосфат бетаметазона); и прочие агенты (например, дикарбазин, аспарагиназу, митотан, сульфат винкристина, сульфат винбластин и этопозид), но не ограничиваются ими.

В дополнительном варианте реализации композиции согласно настоящему изобретению вводят в комбинации с цитокинами. Цитокины, которые можно вводить с композициями согласно настоящему изобретению, включают ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-15, антитело против CD40, CD40L и ФНО- α , но не ограничиваются ими.

В дополнительных вариантах реализации композиции согласно настоящему изобретению вводят в комбинации с другими терапевтическими или профилактическими схемами, например, лучевой терапией.

Комбинированные терапевтические средства

Кроме того, в настоящем изобретении предложены комбинированные терапевтические средства, включающие применение одного или более антител против CD73 согласно настоящему изобретению вместе со вторым противораковым (химиотерапевтическим) агентом. Химиотерапевтические агенты можно подразделять согласно их механизму действия, например, на следующие группы:

антиметаболиты/противораковые агенты, например, аналоги пиримидина флоксуридин, капецитабин и цитарабин;

аналоги пурина, антагонисты фолата и родственные ингибиторы;

аантипролиферативные/антимитотические агенты, включая природные продукты, например, алкалоиды барвинка (винбластин, винкристин), и агенты, разрушающие микротрубочки, например, таксан (паклитаксел, доцетаксел), винбластин, нокодазол, эпотилоны, винорелбин (NAVELBINE®) и эписподофиллотоксины (этопозид, тенипозид);

агенты, повреждающие ДНК, например, актиномицин, амсакрин, бусульфан, карбоплатин, хлорамбуцил, цисплатин, циклофосфамид, (CYTOXAN®), дактиномицин, даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин, ифосфамид, мелфалан, мерхлорэтамин, митомицин, митоксантрон, нитрозомочевину, прокарбазин, таксол, таксотер, тенипозид, этопозид и триэтилентioфосфорамида;

антибиотики, например, дактиномицин, даунорубицин, доксорубицин, идарубицин, антрациклины, митоксантрон, блеомицины, пликамицин (митрамицин) и митомицин;

ферменты, например, L-аспарагиназу, системно метаболизирующую L-аспарагин и лишаящую его клетки, неспособные синтезировать собственный аспарагин;

антитромбоцитарные агенты;

антипролиферативные/антимитотические алкилирующие агенты, например, производные азотистого иприта, циклофосфамид и аналоги (мелфалан, хлорамбуцил, гексаметилмеламин и тиотефу), алкилпроизводные нитрозомочевин (кармустин) и аналоги, стрептозоцин и триазены (дакарбазин);

антипролиферативные/антимитотические антиметаболиты, например, аналоги фолиевой кислоты (метотрексат);

координационные комплексы платины (цисплатин, оксалиплатин и карбоплатин), прокарбазин, гидроксимочевину, митотан и аминоклутетимид;

гормоны, аналоги гормонов (эстроген, тамоксифен, гозерелин, бикалутамид и нилутамид) и ингибиторы ароматазы (летрозол и анастрозол);

антикоагулянты, например, гепарин, синтетические соли гепарина и другие ингибиторы тромбина; фибринолитики, например, активатор плазминогена тканевого типа, стрептокиназу, урокиназу, аспирин, дипиридамол, тиклопидин и клопидогрель;

антимиграционные агенты;

антисекреторные агенты (брефелдин);

иммунодепрессанты - такролимус, сиролимус, азатиоприн и микофенолат;

соединения (TNP-470, генистеин) и ингибиторы факторов роста (ингибиторы фактора роста эндотелия сосудов и ингибиторы фактора роста фибробластов);

блокаторы рецептора ангиотензина, доноры оксида азота;

антисмысловые олигонуклеотиды;

антитела, например, трастузумаб и ритуксимаб;

ингибиторы клеточного цикла и индукторы дифференцировки, например, третиноин;

ингибиторы, ингибиторы топоизомеразы (доксорубицин, даунорубицин, дактиномицин, энипозид, эпирубицин, этопозид, идарубицин, иринотекан, митоксантрон, топотекан и иринотекан) и кортикостероиды (кортизон, дексаметазон, гидрокортизон, метилпреднизолон, преднизон и преднизолон);

ингибиторы киназ сигнальных путей факторов роста;

индукторы дисфункции;

токсины, например, холерный токсин, рицин, экзотоксин *Pseudomonas*, аденилатциклазный токсин *Bordetella pertussis*, дифтерийный токсин и активаторы каспазы;

и хроматин.

Дополнительные примеры химиотерапевтических агентов включают:

алкилирующие агенты, например, тиотепу и циклофосфамид (CYTOXAN®);

алкилсульфонаты, например, бусульфан, импросульфан и пипосульфан;

азиридины, например, бензодопу, карбоквон, метуредопу и уредопу;

этиленимины и метиламеламины, в том числе алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилмеламин;

ацетогенины, особенно буллатацин и буллатацинон;

камптотецин, включая синтетический аналог топотекан;

бриостатин;

каллистатин;

СС-1065, включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин;

криптофицины, в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8;

доластатин;

дуокармицин, включая синтетические аналоги KW-2189 и CBI-TMI;

элеутеробин;

панкратастатин;

саркодиктин;

спонгистатин;

производные азотистого иприта, например, хлорамбуцил, хлорнафазин, циклофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид оксида мехлорэтаммина, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид и урациловый иприт;

производные нитрозомочевины, например, кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин;

антибиотики, например, ендиинозные антибиотики (например, калихемицин, особенно калихемицин гамма-II и калихемицин фи-I1), динемидин, в том числе динемидин А, бисфосфонаты, например, клодронат, эсперамидин, неокарциностафин-хромофор и родственные хромопротеиновые эндиинозные антибиотики-хромофоры, аклаиномицины, актиномицин, антрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая морфолиндоксорубицин, цианморфолиндоксорубицин, 2-пирролиндоксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзрубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, например, митомицин С, микофеноловую кислоту, ногамицин, оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пуромидин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностафин, зорубицин;

антиметаболиты, например, метотрексат и 5-фторурацил (5-FU);

аналоги фолиевой кислоты, например, демоптерин, метотрексат, птероптерин и триметотрексат;

аналоги пурина, например, флударабин, 6-меркаптопурин, тиаминприн, тиогуанин;

аналоги пиримидина, например, анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин и флоксуридин;

андрогены, например, калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан и тестостерон;

антиадреналовые агенты, например, аминоклутетимид, митотан и трилостан;

компенсаторы фолиевой кислоты, например, фолиевую кислоту;

трихотецены, в особенности токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангвидин; таксоиды, например, паклитаксел (TAXOL®) и доцетаксел (TAXOTERE®); аналоги платины, например цисплатин и карбоплатин; ацеглатон; альдофосфамидгликозид; аминоклевулиновую кислоту; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатрексат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элформитин; эллиптиния ацетат; эпотилон; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лейковорин; лонидамин; майтанзиноиды, например, майтанзин, и анзамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; фторпиримидин; фолиниевую кислоту; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; полисахарид-К (PSK); разоксан; ризоксин; сизофуран; спирогерманий; тенуазониевую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ага-С"); циклофосфамид; тиотепу; хлорамбуцил; гемцитабин (GEMZAR®); 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; винбластин; платину; эпопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин (NAVELBINE®); новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; кселоду; ибандронат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; диформетилорнитин (DFMO); ретиноиды, например, ретиноевую кислоту; капецитабин; FOLFIRI (фторурацил, лейковорин и иринотекан); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанных соединений.

Кроме того, определение "химиотерапевтического агента" включает антагонисты гормонов, например, антиэстрогены и селективные модуляторы рецепторов эстрогенов (SERM), ингибиторы ароматазы, антиандрогены и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанных соединений, регулирующие или ингибирующие действие гормонов на опухоли.

Примеры антиэстрогенов и SERM включают, например, тамоксифен (в том числе NOLVADEX™), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (FARESTON®).

Ингибиторы ароматазы регулируют продукцию эстрогенов в надпочечниках. Примеры включают 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, ацетат мегестрола (MEGACE®), экземестан, форместан, фадрозол, ворозол (RIVISOR®), летрозол (FEMARA®) и анастрозол (ARIMIDEX®).

Примеры антиандрогенов включают флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин.

Примеры химиотерапевтических агентов также включают антиангиогенные агенты, в том числе ретиноевую кислоту и ее производные, 2-метоксиэстрадиол, ANGIOSTATIN®, ENDOSTATIN®, сурамин, скваламин, тканевый ингибитор металлопротеиназы-1, тканевый ингибитор металлопротеиназы-2, ингибитор-1 активатора плазминогена, ингибитор-2 активатора плазминогена, хрящевой ингибитор, паклитаксел (наб-паклитаксел), тромбоцитарный фактор 4, сульфат протамина (клупеин), сульфатированные производные хитина (полученные из панцирей краба-стригуна), сульфатированный полисахаридно-пептидогликановый комплекс (sp-pg), ставроспорин, модуляторы метаболизма матрикса, в том числе аналоги пролина ((1-азетидин-2-карбоновую кислоту (LACA)), цис-гидроксипролин, d,l-3,4-дегидропролин, тиапролин, α,α'-дипиридил, бета-аминопропионитрила фумарат, 4-пропил-5-(4-пиридинил)-2(3h)-оксазолон, метотрексат, митоксантрон, гепарин, интерфероны, 2 макроглобулин сыворотки, ингибитор металлопротеиназы-3 курицы (ChLMP-3), химостатин, тетрадекасульфат бета-циклодекстрина, эпонемицин, фумагиллин, тиомалат золота-натрия, d-пеницилламин, бета-1-антиколлагеназу сыворотки, альфа-2-антиплазмин, бисантрен, лобензарит динатрия, динатриевая соль n-2-карбоксифенил-4-хлорантраниловой кислоты или "ССА", талидомид, ангиостатический стероид, карбоксиаминоимидазол и ингибиторы металлопротеиназ, например, ВВ-94, но не ограничиваются ими. Другие антиангиогенные агенты включают антитела, предпочтительно моноклональные антитела против ангиогенных факторов роста: бета-ФРФ, альфа-ФРФ, ФРФ-5, изоформ ФРЭС, ФРЭС-С, ФРГ/ФР и Ang-1/Ang-2.

Примеры химиотерапевтических агентов также включают противofiброзные агенты, в том числе такие соединения, как бета-аминопропионитрил (BAPN), а также соединения, описанные в патенте США № 4965288 (Palfreyman, et al), который относится к ингибиторам лизилоксидазы и их применению для лечения заболеваний и состояний, ассоциированных с патологическим накоплением коллагена, и в патенте США № 4997854 (Kagan et al), который относится к соединениям, ингибирующим LOX, для лечения различных патологических фиброзных состояний, включенных в настоящий документ посредством ссылки, но не ограничиваются ими. Другие типичные ингибиторы описаны в патенте США № 4943593 (Palfreyman et al), который относится к таким соединениям, как 2-изобутил-3-фтор-, хлор- или бромаллиламин, патентах США № 5021456 (Palfreyman et al), 5059714 (Palfreyman et al), 5120764 (McCarthy et al), 5182297 (Palfreyman et al), 5252608 (Palfreyman et al), которые относятся к 2-(1-нафтилоксиметил)-3-фтораллиламину, и публикации патента США № 2004/0248871 (Farjanel et al), которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Типичные антифиброзные агенты также включают первичные амины, реагирующие с карбонильной группой активного центра лизилоксидаз, и, конкретнее, амины, которые после связывания с карбониль-

Pharmaceutical), US 2011/0287011 (Oncomed Pharmaceuticals), WO 2013/027802 (Chugai Pharmaceutical) и WO 2013/034933 (Imperial Innovations), но не ограничиваются ими.

Примеры ингибиторов HDAC включают пращиностат и панобиностат, но не ограничиваются ими.

Ингибиторы JAK включают JAK1, JAK2 и/или JAK3. Примеры ингибиторов JAK включают филго-тиниб, руксолитиниб, федратиниб, тофацитиниб, барицитиниб, леставертиниб, пакритиниб, XL019, AZD1480, INCB039110, LY2784544, BMS911543 и NS018, но не ограничиваются ими.

Ингибиторы LOXL включают ингибиторы LOXL1, LOXL2, LOXL3, LOXL4 и/или LOXL5. Примеры ингибиторов LOXL включают антитела, описанные в WO 2009/017833 (Arresto Biosciences), но не ограничиваются ими.

Примеры ингибиторов LOXL2 включают ингибиторы, описанные в WO 2009/017833 (Arresto Biosciences), WO 2009/035791 (Arresto Biosciences) и WO 2011/097513 (Gilead Biologies), но не ограничиваются ими.

Ингибиторы MMP включают ингибиторы MMP с 1 по 10. Примеры ингибиторов MMP9 включают маримастат (BB-2516), ципемастат (Ro 32-3555) и ингибиторы, описанные в WO 2012/027721 (Gilead Sciences), но не ограничиваются ими.

Ингибиторы PI3K включают ингибиторы PI3K γ , PI3K δ , PI3K β , PI3K α и/или общий ингибитор PI3K. Примеры ингибиторов PI3K включают вортманнин, BKM120, CH5132799, XL756 и GDC-0980, но не ограничиваются ими.

Примеры ингибиторов PI3K γ включают ZSTK474, AS252424, LY294002 и TG100115, но не ограничиваются ими.

Примеры ингибиторов PI3K δ включают PI3KII, TGR-1202, AMG-319, GSK2269557, X-339, X-414, RP5090, KAR4141, XL499, OXY111A, IPI-145, IPI-443 и соединения, описанные в WO 2005/113556 (ICOS), WO 2013/052699 (Gilead Calistoga), WO 2013/116562 (Gilead Calistoga), WO 2014/100765 (Gilead Calistoga), WO 2014/100767 (Gilead Calistoga) и WO 2014/201409 (Gilead Sciences), но не ограничиваются ими.

Примеры ингибиторов PI3K β включают GSK2636771, BAY 10824391 и TGX221, но не ограничиваются ими.

Примеры ингибиторов PI3K α включают бупарлисиб, BAY 80-6946, BYL719, PX-866, RG7604, MLN1117, WX-037, AEZA-129 и PA799, но не ограничиваются ими.

Примеры общих ингибиторов PI3K включают LY294002, BEZ235, XL147 (SAR245408) и GDC-0941, но не ограничиваются ими.

Примеры ингибиторов SYK включают таматиниб (R406), фостаматиниб (R788), PRT062607, BAY-61-3606, NVP-QAB 205 AA, R112, R343 и соединения, описанные в патенте США № 8450321 (Gilead Connecticut), но не ограничиваются ими.

Мишенью TKI могут являться рецепторы эпидермального фактора роста (EGFR) и рецепторы фактора роста фибробластов (ФРФ), тромбоцитарного фактора роста (ТФР) и фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС). Примеры TKI, мишенью которых является EGFR, включают гефитиниб и эрлотиниб, но не ограничиваются ими. Сунитиниб является неограничивающим примером TKI, мишенью которого являются рецепторы ФРФ, ТФР и ФРЭС.

Комбинации с ингибитором контрольной точки иммунного ответа

В некоторых вариантах реализации антитела против CD73 согласно настоящему изобретению можно применять вместе с ингибитором контрольной точки иммунного ответа. Контрольные точки иммунного ответа представляют собой молекулы иммунной системы, которые включают (костимулирующие молекулы) или выключают сигнал. Многие виды рака защищаются от иммунной системы, ингибируя сигнал Т-клеток. Ингибитор контрольной точки иммунного ответа может помочь остановить такой защитный механизм клеток. Мишенью ингибитора контрольной точки иммунного ответа может являться любая или любые из следующих молекул контрольных точек - PD-1, PD-L1, CTLA-4, LAG-3 (также известного как CD223), CD28, CD122, 4-1BB (также известного как CD137) или BTLA (также известного как CD272).

Белок-1 запрограммированной гибели Т-клеток (PD-1) представляет собой трансмембранный белок, находящийся на поверхности Т-клеток, который при связывании с лигандом-1 белка запрограммированной гибели Т-клеток (PD-L1) на опухолевых клетках приводит к супрессии активности Т-клеток и снижение цитотоксичности, опосредованной Т-клетками. Таким образом, PD-1 и PD-L1 являются ингибиторами иммунной системы или "выключателями" контрольной точки иммунного ответа. Типичные ингибиторы PD-1 включают, без ограничений, ниволумаб (Opdivo) (BMS-936558), пембролизумаб (Keytruda), пидилизумаб, AMP-224, MEDI0680 (AMP-514), PDR001, MPDL3280A, MEDI4736, BMS-936559 и MSB0010718C.

Лиганд-1 белка запрограммированной гибели клеток (PD-L1), также известный как кластер дифференцировки 274 (CD274) или гомолог-1 В7 (B7-H1) представляет собой белок, который у людей кодирует ген CD274. Неограничивающие примеры ингибиторов PD-L1 включают атезолизумаб (Tecentriq), дурвалумаб (MEDI4736), авелумаб (MSB0010718C), MPDL3280A, BMS935559 (MDX-1105) и AMP-224.

CTLA-4 представляет собой белковый рецептор, подавляющий иммунную систему. Неограничи-

вающие примеры ингибиторов CTLA-4 включают ипилимумаб (Yervoy) (также известный как BMS-734016, MDX-010, MDX-101) и тремелимуаb (ранее известный как тицилимуаb, CP-675206).

Ген 3 активации лимфоцитов (LAG-3) является рецептором контрольной точки иммунного ответа на поверхности клеток, подавляющим иммунный ответ за счет действия на Treg, а также прямого влияния на CD8+ Т-клетки. Ингибиторы LAG-3 включают, без ограничений, LAG525 и/или BMS-986016.

CD28 конститутивно экспрессируется на почти всех CD4+ Т-клетках и приблизительно на половине всех CD8 Т-клеток и стимулирует размножение Т-клеток. Неограничивающие примеры ингибиторов CD28 включают TGN1412.

CD122 усиливает пролиферацию эффекторных CD8+ Т-клеток. Неограничивающие примеры включают NKTR-214.

4-1BB (также известный как CD137) вовлечен в пролиферацию Т-клеток. Известно, что CD37-опосредованный сигнальный путь также защищает Т-клетки и, в частности, CD8+ Т-клетки от гибели клеток, индуцированной активацией. PF-05082566, урелумаб (BMS-663513) и липокалин являются примерами ингибиторов CD137.

При использовании любого из вышеуказанных терапевтических средств антитело против CD73 можно вводить одновременно или отдельно от другого противоракового агента. При раздельном введении антитело против CD73 можно вводить до или после другого противоракового агента.

Способы диагностики

Сверхэкспрессия CD73 наблюдается в некоторых образцах опухолей, и пациенты с клетками, сверхэкспрессирующими CD73, с большой вероятностью будут реагировать на терапевтические средства на основе антител против CD73 согласно настоящему изобретению. Соответственно, антитела согласно настоящему изобретению также можно использовать в диагностических или прогностических целях.

Образец, который предпочтительно содержит клетку, можно получить из организма пациента, который может быть пациентом с раком или пациентом, для которого желательно выполнить диагностику. Клетка может представлять собой клетку опухолевой ткани или блока опухоли, образца крови, образца мочи или любого образца из организма пациента. При необязательной подготовке образца образец можно инкубировать с антителом согласно настоящему изобретению в условиях, позволяющих антителу взаимодействовать с белком CD73, потенциально присутствующим в образце. Для детектирования наличия белка CD73 в образце можно применять такие способы, как твердофазный ИФА, полностью использующие преимущества антитела против CD73.

Наличие белка CD73 в образце (необязательно в определенном количестве или концентрации) можно использовать для диагностики рака, в качестве указания на то, что пациент подходит для лечения с применением антитела, или в качестве указания на то, что пациент реагировал (или не реагировал) на лечение рака. Для прогностического способа детектирование выполняют один, два или большее количество раз на определенных стадиях после инициации лечения рака для указания на ход лечения.

Композиции

В настоящем изобретении также предложены фармацевтические композиции. Такая композиция содержит эффективное количество антитела и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах реализации композиция дополнительно содержит второй противораковый агент (например, ингибитор контрольной точки иммунного ответа).

В конкретном варианте реализации термин "фармацевтически приемлемый" обозначает одобренный нормативно-правовым агентством федерального правительства или правительства штата или приведенный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и, конкретнее, у человека. Кроме того, "фармацевтически приемлемый носитель" в общем случае представляет собой нетоксичный твердый, полужидкий или жидкий наполнитель, разбавитель, материал для инкапсуляции или вспомогательный состав любого типа.

Термин "носитель" относится к разбавителю, адьюванту, вспомогательному веществу или среденосителю, с которым вводят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, например, воду и масла, включая масла нефти, растительного, животного или синтетического происхождения, например, арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Вода является предпочтительным носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. При необходимости композиция также может содержать небольшие количества увлажнителей или эмульгаторов или pH-буферных агентов, например, ацетатов, цитратов или фосфатов. Кроме того, предусмотрено применение антибактериальных агентов, например, бензилового спирта или метилпарабенов; антиоксидантов, например, аскорбиновой кислоты или бисульфита натрия; хелатообразующие агенты, например, этилендиаминтетрауксусную кислоту; и агенты для регуляции тоничности, например, хлорид натрия или декстрозу. Эти композиции могут иметь вид растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, со-

ставов с замедленным высвобождением и т.п. Композицию можно составить в виде суппозитория с использованием традиционных связующих веществ и носителей, например, триглицеридов. Составы для перорального применения могут содержать стандартные носители, например, маннит, лактозу, крахмал, стеарат магния, сахарин-натрий, целлюлозу, карбонат магния и т.д. фармацевтической степени чистоты. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны Е. W. Martin в Remington's Pharmaceutical Sciences, включенном в настоящий документ посредством ссылки. Такая композиция может содержать терапевтически эффективное количество антигенсвязывающего полипептида, предпочтительно в очищенной форме, вместе с подходящим количеством носителя для получения формы для надлежащего введения пациенту. Состав должен соответствовать способу введения. Исходный препарат можно поместить в ампулы, одноразовые шприцы или флаконы для многократного приема из стекла или пластика.

В одном варианте реализации композицию составляют в соответствии с обычными процедурами в виде фармацевтической композиции, приспособленной для внутривенного введения людям. Обычно композиции для внутривенного введения представляют собой растворы в стерильном изотоническом водном буфере. При необходимости композиция также может содержать солубилизирующий агент и местный анестетик, например, лигнокаин, для ослабления боли в области инъекции. В общем случае ингредиенты вводят раздельно или в смеси друг с другом в составе лекарственной формы, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметичном контейнере, например, ампуле или саше с указанием количества активного агента. Если композиция предназначена для введения посредством вливания, ее можно разлить в бутылку для вливания, содержащую стерильную воду или физиологический раствор фармацевтической степени чистоты. Если композицию вводят посредством инъекции, можно предоставить ампулу со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором для смешивания ингредиентов перед введением.

Соединения согласно настоящему изобретению можно составить в нейтральной форме или форме соли. Фармацевтически приемлемые соли включают соли, образованные анионами, например, соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.д., и соли, образованные катионами, например, гидроксидами натрия, калия, аммония, кальция, железа (III), изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламинэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

Примеры

Пример 1. Клонирование антитела мыши 101-Mu.

В данном примере описан процесс получения моноклонального антитела мыши против CD73 человека с использованием гибридомной технологии. Белок CD73 человека получали с использованием рекомбинантной линии клеток CHO K1, экспрессирующих CD73 (CD73-CHO K1). Для получения моноклональных антител мыши против CD73 человека 6-8 недельных самок мышей BALB/c вначале иммунизировали $1,5 \times 10^7$ клеток CD73-CHO K1. На 14 и 33 день после первой иммунизации иммунизированных мышей повторно иммунизировали $1,5 \times 10^7$ клеток CD73-CHO K1. Для отбора мышей, продуцирующих антитела, связывающиеся с белком CD73, сыворотку иммунизированных мышей анализировали с помощью твердофазного ИФА. Вкратце, титрационные микропланшеты покрывали белком CD73 человека в концентрации 1 мкг/мл в PBS в объеме 100 мкл/лунку при комнатной температуре (КТ) в течение ночи, а затем блокировали 100 мкл/лунку 5% БСА. В каждую лунку вносили разведения плазмы иммунизированных мышей и инкубировали в течение 1-2 часов при КТ. Планшеты промывали PBS/Tween и затем инкубировали с антителом против IgG мыши, конъюгированным с пероксидазой хрена (ПХ) в течение 1 часа при КТ. После промывки планшеты проявляли субстратом ABTS и анализировали на спектрофотометре при ОП, равной 405 нм. Мышей с достаточными титрами IgG против CD73 вторично иммунизировали 50 мкг белка CD73-Fc человека на 54 день после иммунизации. Полученных мышей использовали для слияния клеток. Супернатанты гибридом тестировали на предмет наличия IgG против CD73 посредством твердофазного ИФА. Выявили восемь различных клонов гибридом, среди которых 101-Mu выбрали для дальнейшего анализа. Последовательность VH 101-MU показана в табл.6 как SEQ ID NO: 10, а последовательность VL - в таблице 7 как SEQ ID NO: 15. Соответствующие последовательности ДНК показаны в табл. 10 как SEQ ID NO: 57 и 58.

Пример 2. Связывание 101-Mu с CD73.

В данном примере протестировали связывание мАт мыши 101-Mu против CD73 человека с рекомбинантным белком CD73 человека (1 мкг/мл в 100 мкл) самим по себе или на поверхности клеток в зависимости от дозы в ходе твердофазного ИФА.

Титрационные микропланшеты покрыли рекомбинантным белком CD73 человека (Novoprotein) в концентрации 1 мкг/мл в PBS в течение 2 ч при комнатной температуре (КТ). После покрытия антигеном лунки блокировали PBS/0,05% Tween (PBST) с 1% БСА в течение 1 ч при КТ. После промывки лунок PBST в лунки добавляли различные концентрации антител против CD73 и инкубировали в течение 1 ч при КТ. Для детектирования связывания антител добавляли вторичные антитела против Fc мыши, конъюгированные с ПХ (Jackson Immuno Research), а затем добавляли флуорогенные субстраты (Roche). Между всеми этапами инкубирования лунки планшета трижды промывали PBST. Флуоресценцию измеряли на планшет-ридере TECAN Spectrafluor.

мАт1 человека против CD73 использовали в качестве положительного контроля. мАт1 получали в соответствии с последовательностью, описанной в US2016/0194407. Результаты для сравнения представлены на фиг. 1, где показано, что EC50 для 101-Му составляет 0,08 нМ, а EC50 для мАт1 составляет 0,03 нМ.

На фиг. 2 показаны результаты анализа связывания с использованием линии клеток рака яичников человека (клеток SK-OV-3), эндогенно экспрессирующих CD73 человека на поверхности. После инкубирования с указанными антителами клетки окрашивали различными концентрациями контрольного IgG, антитела мыши против CD73 (101-Му) и эталонного антитела (мАт1) при 4°C в течение 30 мин. Затем клетки трижды промывали PBS с последующим инкубированием с APC-меченым специфическим антителом против Fc мыши (Invitrogen) при 4°C в течение 30 мин. Связывание измеряли с использованием FACSCanto (Becton-Dickinson). Как и на фиг. 1, на этих фигурах показано, что 101-Му обладало эквивалентной аффинностью связывания с CD73 по сравнению с мАт1 (EC50 для 101-Му составляла 0,54 нМ; EC50 для мАт1 составляла 0,30 нМ).

На фиг. 3 приведены графики кинетики связывания 101-Му и мАт1 с рекомбинантным CD73 человека (рекомбинантный CD73 человека использовали в качестве анализируемого соединения в последовательных концентрациях (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 нМ)). Анализ кинетики связывания антитела с антигеном выполняли с использованием системы Biacore T200 посредством подхода на основе захвата антигена человека. IgG против Fc мыши иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 согласно инструкциям производителя. Тестируемое антитело вводили и захватывали иммобилизованным IgG против Fc человека. Затем по отдельности вводили последовательные концентрации антигена и регистрировали профиль связывания для каждой концентрации анализируемого антигена, соответственно. Систему анализа регенерировали путем инъекции 10 мМ глицин-HCl, pH 1,5 на 30 секунд. Подвижный буфер представлял собой HBS-EP+ (10 мМ HEPES, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА и 0,05% P20). Температура анализа составляла 25°C, время ассоциации и диссоциации было равно 180 и 600 секунд, соответственно. Данные Biacore аппроксимировали с помощью программного обеспечения Biacore T200 evaluation 1.0 в соответствии с моделью связывания 1:1 с целью расчета констант скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d), а также константы равновесия (KD). В дополнение к фиг. 3 некоторые сводные данные представлены ниже в таблице.

Образец	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	KD (М)
101-Му	8,13E+04	3,42E-05	4,21E-10
мАт1	2,08E+05	2,73E-05	1,31E-10

Пример 3. Ингибирование ферментативной активности CD73 за счет 101-Му.

В данном примере тестировали способность антитела 101-Му ингибировать ферментативную активность CD73.

Рекомбинантный белок CD73 человека (0,3 мкг/мл) инкубировали в 96-луночных плоскодонных микропланшетах в присутствии различных доз антитела против CD73 или изотипических контрольных Ат. Планшеты инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Затем в каждую лунку добавляли АТФ (100 мкМ) и АМФ (100 мкМ) и инкубировали в течение еще 30 мин при 37°C. В лунки добавляли CellTiter-Glo, содержащий люциферазу (Promega), и измеряли ингибирование излучения света с помощью люцинометра (Molecular Device).

Известно, что избыток АМФ блокирует АТФ-зависимую активность люциферазы. Добавление CD73, который катализирует продукцию аденозина и неорганического фосфата из АМФ, восстанавливало люциферазную активность и излучение света. Таким образом, антитело, блокирующее ферментативную активность CD73, может снижать излучение света. Процентную ферментативную активность оценивали согласно описанию, приведенному ниже: Остаточную активность CD73 рассчитывали следующим образом: $(CD73+Ат+АТФ+АМФ)-(АТФ+АМФ)/(CD73+АТФ+АМФ)-(АТФ+АМФ)*100$. График результатов приведен на фиг. 4, на котором показано, что в отличие от отрицательного контрольного IgG, 101-Му ингибировало ферментативную активность CD73 в зависимости от дозы ($IC_{50}=3,89$ нМ).

CD73-экспрессирующие клетки SK-OV-3 высевали на 96-луночный планшет в количестве 1×10^5 клеток на лунку в присутствии различных доз Ат против CD73 или изотипических контрольных Ат. Планшеты инкубировали в течение 15 мин при 37°C. В каждую лунку добавляли АМФ (100 мкМ) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Супернатанты собирали в новый 96-луночный планшет и добавляли АТФ до конечной концентрации 100 мкМ. Добавляли реагент CellTiter-Glo (Promega) в соотношении 1:1 и определяли ферментативную активность клеточного CD73, измеряя излучение света на люцинометре (Molecular Device). Процентную ферментативную активность оценивали согласно описанию, приведенному ниже: Остаточную активность CD73 рассчитывали следующим образом: $(Клетки\ SK-OV-3+Ат+АТФ+АМФ)-(АТФ+АМФ)/(клетки\ SK-OV-3+АТФ+АМФ)-(АТФ+АМФ)*100$. График результатов приведен на фиг. 5, на котором показано, что в отличие от отрицательного контрольного IgG, 101-Му ингибировало ферментативную активность CD73 в зависимости от дозы ($IC_{50}=4,62$ нМ).

Пример 4. Устранение АМФ-опосредованной супрессии CD4+ Т-клеток за счет 101-Му.

В данном примере тестировали способность антитела устранять АМФ-опосредованную супрессию CD4+ Т-клеток.

CD4+ Т-клетки человека очищали от МПК посредством положительного отбора с использованием микрогранул с CD4 человека (Miltenyi Biotech). Выделенные CD4+ Т-клетки стимулировали с использованием заранее иммобилизованного антитела против CD3 (2 мкг/мл) и растворимого антитела против CD28 (1 мкг/мл) в присутствии или в отсутствие АМФ (500 мкМ). Последовательные разведения антител против CD73 и контрольных IgG добавляли в каждую лунку, культивировали в течение 72 ч, и супернатант анализировали на предмет наличия ИФН- γ посредством твердофазного ИФА. Как показано на фиг. 6, 101-Mu увеличивало продукцию ИФН- γ CD4+ клетками в зависимости от дозы, в то время как контроль не оказывал значимого влияния.

Пример 5. Гуманизация 101-Mu.

В вышеприведенных примерах показано, что антитело 101-Mu является мощным ингибитором ферментативной активности CD73 и может полностью устранять иммунодепрессивное влияние аденозина на активацию Т-клеток. Соответственно, это антитело выбрали в качестве основы для гуманизации.

Гены вариабельной области 101-Mu использовали для создания гуманизированного МАт. VH и VK 101-MU сравнивали с доступной базой данных последовательностей генов Ig человека с целью выявления максимально совпадающих эмбриональных последовательностей генов Ig человека. Ближайшие совпадения среди последовательностей человека для легкой цепи представляли собой гены A10/Jk4 (конструкция 1) и L6/Jk4 (конструкция 2), а для тяжелой цепи - ген VH4-B/JH6. Затем сконструировали последовательности гуманизированных вариабельных доменов, где CDR1 (SEQ ID NO.4), 2 (SEQ ID NO.5) и 3 (SEQ ID NO.6) легкой цепи 101-MU трансплантировали на каркасные последовательности соответствующих генов легкой цепи, а последовательности CDR1 (SEQ ID NO.1), 2 (SEQ ID NO.2) и 3 (SEQ ID NO.3) VH 101-MU трансплантировали на каркасные последовательности соответствующего гена VH.

Затем генерировали 3D-модель с целью определения наличия положений в каркасных участках, где замена аминокислоты мыши на аминокислоту человека могла влиять на связывание и/или конформацию CDR. Выявленные полезные обратные мутации, а также пептидные последовательности, содержащие такие мутации, показаны ниже в таблицах (выделены подчеркиванием).

Таблица 3

Обратные мутации VH и последовательности VH с обратными мутациями

Конструкция VH: VH4-b/JH6	
Конструкт	Мутация
VH 101-Mu	Химера
VH.1 101-Mu	Трансплантированные CDR
VH.1a 101-Mu	V71R
VH.1b 101-Mu	V71R, <u>V67I</u>
VH.1c 101-Mu	V71R, <u>V67I</u> , I48M
VH.1d 101-Mu	V71R, <u>V67I</u> , I48M, S30T, <u>G44K</u>

Таблица 4

Обратные мутации VK и последовательности VK с обратными мутациями (конструкция 1)

Конструкция 1 VK: A10/Jk4	
Конструкт	Мутация
Vk 101-Mu	Химера
Vk.1 101-Mu	Трансплантированные CDR
Vk.1a 101-Mu	F71Y, <u>D70S</u>
Vk.1b 101-Mu	F71Y, <u>D70S</u> , <u>K49S</u>
Vk.1c 101-Mu	F71Y, <u>D70S</u> , <u>K49S</u> , <u>L46P</u> , <u>L47W</u>
Vk.1d 101-Mu	F71Y, <u>D70S</u> , <u>K49S</u> , <u>L46P</u> , <u>L47W</u> , <u>T5S</u>

Таблица 5

Обратные мутации VK и последовательности VK с обратными мутациями (конструкция 1)

Конструкция 2 VK: L6/Jk4	
Конструкт	Мутация
VK.2 101-Mu	Трансплантированные CDR
VK.2a 101-Mu	F71Y, <u>D70S</u>
VK.2b 101-Mu	F71Y, <u>D70S</u> , <u>K49S</u> , I58V
VK.2c 101-Mu	F71Y, <u>D70S</u> , <u>K49S</u> , <u>L46P</u> , <u>L47W</u> , <u>T5S</u> , A43S, I58V

Таблица 6

Гуманизированные VH и гуманизированные VH с обратными мутациями

Название (SEQ ID NO:)	Последовательности
№ по Kabat	1 2 3 4
VH 101-Mu (10)	1234567890123456789012345678901A234567890123456789
VH.1 101-Mu (11)	DVQLQESGPGPLVKPSQSLSLTCSVTGYSIT SGYYWN WIRQPPGNKLEWMG
VH.1A 101-Mu (9)	EVQLQESGPGPLVKPSETLSLTCAVSGYSIS SGYYWN WIRQPPGKLEWIG
VH.1B 101-Mu (12)	EVQLQESGPGPLVKPSETLSLTCAVSGYSIS SGYYWN WIRQPPGKLEWIG
VH.1C 101-Mu (13)	EVQLQESGPGPLVKPSETLSLTCAVSGYSIS SGYYWN WIRQPPGKLEWMG
VH.1D 101-Mu (7)	EVQLQESGPGPLVKPSETLSLTCAVSGYSIT SGYYWN WIRQPPGK LEWMG
VH4-B/JH6 (14)	QVQLQESGPGPLVKPSETLSLTCAVSGYSIS SGYYWG WIRQPPGKLEWIG
№ по Kabat	5 6 7 8 9
VH 101-Mu	012345678901234567890123456789012ABC34567890123456 YINYGGSNGYNPSLKS RISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCARDY
VH.1 101-Mu	YINYGGSNGYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDY
VH.1A 101-Mu	YINYGGSNGYNPSLKS RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDY
VH.1B 101-Mu	YINYGGSNGYNPSLKS RTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDY
VH.1C 101-Mu	YINYGGSNGYNPSLKS RTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDY
VH.1D 101-Mu	YINYGGSNGYNPSLKS RTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDY
VH4-B/JH6	SIYHSGSTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR--
№ по Kabat	0 1
VH 101-Mu	7890ABC1234567890123
VH.1 101-Mu	DAYYEALDDWGQGT SVTVSS
VH.1A 101-Mu	DAYYEALDDWGQGT TVTVSS
VH.1B 101-Mu	DAYYEALDDWGQGT TVTVSS
VH.1C 101-Mu	DAYYEALDDWGQGT TVTVSS
VH.1D 101-Mu	DAYYEALDDWGQGT TVTVSS
VH4-B/JH6	-----WGQGT TVTVSS

Полужирный шрифт: участки CDR; подчеркнутый шрифт: обратные мутации

Таблица 7

Гуманизированные VK и гуманизированные VK с обратными мутациями (конструкция 1)

Название (SEQ ID NO:)	Последовательности
№ по Kabat	1 2 3 4 5
VK 101-Mu (15)	123456789012345678901234567890123456789012345678901
VK.1 101-Mu (16)	QIVLSQSPAILASASPGEKVTMT CRASSRVN - YMH WYQQKPGSSPKPWIS AT
VK.1A 101-Mu (17)	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTIT CRASSRVN - YMH WYQQKPDQSPKLLIK AT
VK.1B 101-Mu (18)	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTIT CRASSRVN - YMH WYQQKPDQSPKLLIS AT
VK.1C 101-Mu (19)	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTIT CRASSRVN - YMH WYQQKPDQSPKPWIS AT
VK.1D 101-Mu (20)	EIVLSQSPDFQSVTPKEKVTIT CRASSRVN - YMH WYQQKPDQSPKPWIS AT
A10/JK4 (21)	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTIT CRASQSI GSSSLHWYQQKPDQSPKLLIK YA
№ по Kabat	6 7 8 9 0
Vk 101-Mu	234567890123456789012345678901234567890123456789012
VK.1 101-Mu	SNLAS GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEDAATYYC QQWSSNPPT FGGGT
VK.1A 101-Mu	SNLAS GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYC QQWSSNPPT FGGGT
VK.1B 101-Mu	SNLAS GVPSRFSGSGSGTSYTLTINSLEAEDAATYYC QQWSSNPPT FGGGT
VK.1C 101-Mu	SNLAS GVPSRFSGSGSGTSYTLTINSLEAEDAATYYC QQWSSNPPT FGGGT
VK.1D 101-Mu	SNLAS GVPSRFSGSGSGTSYTLTINSLEAEDAATYYC QQWSSNPPT FGGGT
A10/JK4	SQSFS GVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYC-----FGGGT
№ по Kabat	34567
Vk 101-Mu	KLEIK
VK.1 101-Mu	KVEIK
VK.1A 101-Mu	KVEIK
VK.1B 101-Mu	KVEIK
VK.1C 101-Mu	KVEIK
VK.1D 101-Mu	KVEIK
A10/JK4	KVEIK

Полужирный шрифт: участки CDR; подчеркнутый шрифт: обратные мутации

Таблица 8

Гуманизированные VK и гуманизированные VK с
обратными мутациями (конструкция 2)

Название (SEQ ID NO:)	Последовательности
№ по Kabat	1 2 3 4 5
VK 101-Mu (15)	12345678901234567890123456789012345678901
VK.2 101-Mu (22)	QIVLSQSPAILSPGSGSVTMT CRASSRVN -YMHWYQQKPGSSPKPWIS AT
VK.2A 101-Mu (23)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASSRVN -YMHWYQQKPGQAPRLLIY AT
VK.2B 101-Mu (24)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASSRVN -YMHWYQQKPGQAPRLLI SAT
VK.2C 101-Mu (8)	EIVLSQSPATLSLSPGERATLS CRASSRVN -YMHWYQQKPGQSPRPWIS AT
L6/JK4 (25)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLS CRASQSVSSYLAWY QQKPGQAPRLLIY DA
№ по Kabat	6 7 8 9 0
Vk 101-Mu	23456789012345678901234567890123456789012
VK.2 101-Mu	SNLAS GVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEDAATYYC QQWSSNPPT FGGGT
VK.2A 101-Mu	SNLAS GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYC QQWSSNPPT FGGGT
VK.2B 101-Mu	SNLAS GIPARFSGSGSGTSYTLTISSELEPEDFAVYYC QQWSSNPPT FGGGT
VK.2C 101-Mu	SNLAS GVPARFSGSGSGTSYTLTISSELEPEDFAVYYC QQWSSNPPT FGGGT
L6/JK4	SNRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYC-----FGGGT
№ по Kabat	
Vk 101-Mu	34567
VK.2 101-Mu	KLEIK
VK.2A 101-Mu	KVEIK
VK.2B 101-Mu	KVEIK
VK.2C 101-Mu	KVEIK
L6/JK4	KVEIK

Полужирный шрифт: участки CDR; подчеркнутый шрифт: обратные мутации

Гены гуманизированных VH и VK продуцировали синтетически и соответственно клонировали в векторы, содержащие гамма 1-й каппа-константные домены человека. Сопряжение VH и VK человека позволило создать ряд гуманизированных антител, перечисленных ниже в таблице.

Таблица 9

Гуманизированные антитела

	VK.1a 101-Mu	VK.1b 101-Mu	VK.1c 101-Mu	VK.1d 101-Mu	VK.2a 101-Mu	VK.2b 101-Mu	VK.2c 101-Mu	VK 101-Mu
VH.1a 101-Mu	Hu101-1	Hu101-2	Hu101-3	Hu101-4	Hu101-17	Hu101-21	Hu101-25	
VH.1b 101-Mu	Hu101-5	Hu101-6	Hu101-7	Hu101-8	Hu101-18	Hu101-22	Hu101-26	
VH.1c 101-Mu	Hu101-9	Hu101-10	Hu101-11	Hu101-12	Hu101-19	Hu101-23	Hu101-27	
VH.1d 101-Mu	Hu101-13	Hu101-14	Hu101-15	Hu101-16	Hu101-20	Hu101-24	Hu101-28	
VH 101-Mu								101-Mu химера

В табл. 10 показаны несколько примеров нуклеотидных последовательностей, кодирующих области VH и VL антител 101-MU и Hu101-28.

Нуклеотидные последовательности

Название	SEQ ID NO:	Последовательность
VH 101-Mu	57	GATGTACAGTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTCGTGAAACCTTCTCAGTC TCTGTCTCTCACCTGCTGTCTGCTACTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATT ACTGGAACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAATGGATGGGC TACATAAACTACGGCGGTAGCAATGGGTACAACCCATCTCTCAAAAGTCG GATCTCCATCACTCGGGACACATCTAAGAACCAGTTTTTCTGAAAGCTGA ATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCTACATATTACTGTGCAAGAGACTAT GATGGTTACTACGAAGCTCTGGACGACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCAC CGTCTCCTCA
VL 101-Mu	58	CAAAATGTTCTCTCCAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGA GAAGGTCACAATGACTTGCAGGGCCAGCTCACGTGTAAATTACATGCACT GGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACCTGGATTCTGCCACA TCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG GACCTCTTACTCTCTCAAAATTAGCAGAGTAGAGACTGAAGATGCTGCCA CTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACCCACGTTCCGAGGGGGG ACCAAGCTGGAAATAAAA
VH Hu101-28	59	GAGGTACAGTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTCGTGAAACCTTCTGAGAC TCTGTCTCTCACCTGCGCTGTCTCTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATT ACTGGAACTGGATCCGGCAGCTCCAGGAAAGAAGCTGGAATGGATGGGC TACATCAACTACGGCGGTAGCAATGGGTACAACCCATCTCTCAAAAGTCG GATCACCATCTCTAGGGACACATCTAAGAACCAGTTTTTCTGAAAGCTGA GTTCTGTGACTGCTGCCGACACAGCTGTGTATTACTGTGCAAGAGACTAT GATGCTTACTACGAAGCTCTGGACGACTGGGGTCAAGGAACACAGTCAC CGTCTCCTCA
VL Hu101-28	60	GAAATGTTCTCTCCAGTCTCCAGCAACCTGTCTCTGTCTCCAGGGGA GAGGGCCCACTGTCTTGCAGGGCCAGCTCACGTGTAAATTACATGCACT GGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGTCCCCAGACCTGGATTCTGCCACA TCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGG GACCTTTACTCTCTCAAAATTAGCAGCTGGAGCCAGAAGATTTGCGCG TGTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACCCACGTTCCGAGGGGGG ACCAAGGTGGAAATCAAA

Пример 6. Тестирование гуманизированных антител.

В данном примере тестировали гуманизированные антитела на предмет их аффинности связывания и ингибиторной активности. Процедуры тестирования аналогичны описанным в примерах 1-4, результаты представлены на фиг. 7-11.

Для анализа связывания использовали систему Biacore T200 с использованием подхода на основе захвата антитела человека. IgG против Fc человека иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 согласно инструкциям производителя. Тестируемое антитело вводили и захватывали иммобилизованным IgG против Fc человека. Затем по отдельности вводили последовательные концентрации антигена и регистрировали профиль связывания для каждой концентрации анализируемого антигена, соответственно. Систему анализа регенерировали путем инъекции 10 mM глицин-HCl, pH 1,5 на 30 секунд. Подвижный буфер представлял собой HBS-EP+ (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА и 0,05% P20). Температура анализа составляла 25°C, время ассоциации и диссоциации было равно 180 и 600 секунд, соответственно. Данные Biacore аппроксимировали с помощью программного обеспечения Biacore T200 evaluation 1.0 в соответствии с моделью связывания 1:1 с целью расчета констант скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d), а также константы равновесия (KD).

Среди всех протестированных антител Hu101-25 и Hu101-28 демонстрировали максимальная аффинность связывания (см. фиг. 7 и таблицу, приведенную ниже); их использовали для дальнейшего анализа.

Образец	k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	KD (M)
Hu101-25	7,37E+04	5,51E-05	7,47E-10
Hu101-28	5,89E+05	3,47E-05	5,90E-10

Клетки линии рака яичников человека (клетки SK-OV-3), эндогенно экспрессирующие на поверхности CD73 человека, окрашивали различными концентрациями контрольного IgG, химерного антитела против CD73 (101-Mu-химерное, или 101-Chi) и гуманизированных антител против CD73 (Hu101-25 и Hu101-28) при °C в течение 30 мин. Затем клетки трижды промывали PBS с последующим инкубированием с APC-меченым специфическим антителом против Fc человека (Invitrogen) при 4°C в течение 30 мин. Связывание измеряли с использованием FACSCanto (Becton-Dickinson), результаты представлены на фиг. 8 (см. также таблицу, приведенную ниже).

101-химерное	EC50 = 1,35 нМ
Hu101-25	EC50 = 2,38 нМ
Hu101-28	EC50 = 1,35 нМ

Рекомбинантный белок CD73 человека (0,3 мкг/мл) инкубировали в 96-луночных плоскодонных микропланшетах в присутствии различных доз антитела против CD73 или изотипических контрольных Ат. Планшеты инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Затем в каждую лунку добавляли АТФ (100 мкМ) и АМФ (100 мкМ) и инкубировали в течение еще 30 мин при 37°C. В лунки добавляли CellTiter-Glo, содержащий люциферазу (Promega), и измеряли ингибирование излучения света с помощью люцинометра

(Molecular Device). Известно, что избыток АМФ блокирует АТФ-зависимую активность люциферазы.

Добавление CD73, который катализирует продукцию аденозина и неорганического фосфата из АМФ, восстанавливало люциферазную активность и излучение света. Таким образом, антитело, блокирующее ферментативную активность CD73, может снижать излучение света. Процентную ферментативную активность оценивали согласно описанию, приведенному ниже: Остаточная активность CD73: $(CD73+At+ATP+AMP)-(ATP+AMP)/(CD73+ATP+AMP)-(ATP+AMP)*100$.

На фиг. 9 показано, что все три протестированных антитела демонстрировали сильную ингибиторную активность (см. также таблицу, приведенную ниже).

	IC50 (нМ)	Макс. ингибирование (%)
101-химерное	4,25	98%
Hu101-25	4,72	99%
Hu101-28	9,35	98%

На фиг. 10 показаны результаты тестирования ингибирования ферментативной активности CD73 гуманизированными антителами. CD73-экспрессирующие клетки SK-OV-3 высевали на 96-луночный планшет в количестве 1×10^5 клеток на лунку в присутствии различных доз АТ против CD73 или изотипических контрольных АТ. Планшеты инкубировали в течение 15 мин при 37°C. В каждую лунку добавляли АМФ (100 мкМ) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Супернатанты собирали в новый 96-луночный планшет и добавляли АТФ до конечной концентрации 100 мкМ. Добавляли реагент CellTiter-Glo (Promega) в соотношении 1:1 и определяли ферментативную активность клеточного CD73, измеряя излучение света на люцинометре (Molecular Device). Процентную ферментативную активность оценивали согласно описанию, приведенному ниже: Остаточная активность CD73: $(\text{Клетки SK-OV-3}+At+ATP+AMP)-(ATP+AMP)/(\text{клетки SK-OV-3}+ATP+AMP)-(ATP+AMP)*100$. Результаты показаны на фиг. 10 и ниже в таблице и демонстрируют мощное ингибирующее действие этих антител.

	IC50 (нМ)	Макс. ингибирование (%)
101-химерное	1,82	100%
Hu101-25	2,98	100%
Hu101-28	2,52	100%

Для тестирования способности антител устранять АМФ-опосредованную супрессию CD4+ Т-клеток CD4+ Т-клетки человека очищали от МПК посредством положительного отбора с использованием микрогранул с CD4 человека (Miltenyi Biotec). Выделенные CD4+ Т-клетки стимулировали с использованием заранее иммобилизованного антитела против CD3 (2 мкг/мл) и растворимого антитела против CD28 (1 мкг/мл) в присутствии или в отсутствие АМФ (500 мкМ). Последовательные разведения антител против CD73 и контрольных IgG добавляли в каждую лунку, культивировали в течение 72 ч, и супернатант анализировали на предмет наличия ИФН-γ посредством твердофазного ИФА. Как показано на фиг. 11, все три протестированных антитела устраняли АМФ-опосредованную супрессию CD4+ Т-клеток в зависимости от дозы.

Пример 7. Компьютерное моделирование дальнейших изменений и оптимизации гуманизированных антител.

Считалось, что некоторые аминокислотные остатки в CDR-участках или каркасных участках можно изменить с целью дальнейшего улучшения или сохранения активности и/или стабильности антител. Варианты тестировали с использованием компьютерного инструмента (VectorNTI, доступного на сайте www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalo/), по отношению к их структурным, конформационным и функциональным свойствам, и перспективные последовательности (в пределах CDR-участков) перечислены ниже в таблицах.

Таблица 11

CDR VH и VL и их варианты, подходящие для включения
в гуманизированные антитела

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VH CDR1	<u>S</u> GYYWN	1
Вариант	TGYWN	26
Вариант	CGYYWN	27
Вариант	SAYYWN	28
Вариант	SPYYWN	29

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VH CDR2	YINYGGSNGY NPSLKS	2
Вариант	YINYGASNGY NPSLKS	30
Вариант	YINYGPSNGY NPSLKS	31
Вариант	YINYGGTNGY NPSLKS	32
Вариант	YINYGGCNGY NPSLKS	33
Вариант	YINYGGSNGY NPSLKS	34
Вариант	YINYGGSNGY NPSLKS	35
Вариант	YINYGGSNGY NPSLKS	36

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VH CDR3	DYDAYYEALD D	3
Вариант	DYDAYYDALD D	37
Вариант	DYDAYYQALD D	38
Вариант	DYDAYYNALD D	39
Вариант	DYDAYYGLD D	40
Вариант	DYDAYYCLD D	41

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VL CDR1	RASSRVNYM H	4
Вариант	RATSRVNYM H	42
Вариант	RACSRVNYM H	43
Вариант	RASTRVNYM H	44
Вариант	RASCRVNYM H	45

Название	Последовательность	SEQ ID NO:
VL CDR3	QQWSSNPPT	6
Вариант	NQWSSNPPT	46
Вариант	DQWSSNPPT	47
Вариант	EQWSSNPPT	48
Вариант	QNWSSNPPT	49
Вариант	QDWSSNPPT	50
Вариант	QEWSSNPPT	51
Вариант	QQYSSNPPT	52
Вариант	QQWTSNPPT	53
Вариант	QQWCNPPT	54
Вариант	QQWSTNPPT	55
Вариант	QQWSCNPPT	56

Подчеркнута (шрифт): остатки при мутациях в "горячих точках" и их замены
Пример 8. Hu101-28 представляет собой антитело против CD73 с двойным механизмом действия.

В данном примере показано, что Hu101-28 обладает двойным механизмом действия. Оно не только блокирует ферментативную активность CD73 неконкурентным образом, но и индуцирует интернализацию CD73 клеточной поверхности.

Связывание белков CD73 тестировали с использованием растворимого CD73 и CD73 клеточной поверхности, результаты показаны на фиг. 12. На левой панели использовали 100 мкл раствора, содержащего рекомбинантный CD73 человека (2 мкг/мл), в анализе связывания на основе твердофазного ИФА, и на диаграмме показано связывание Hu101-28. На правой панели клетки линии карциномы яичников человека (SK-OV-3) окрашивали различными концентрациями Hu101-28 и анализировали поверхностное связывание с помощью проточной цитометрии. Как показано, EC_{50} в тестах составляла 88,7 пМ и 0,67 нМ, соответственно, что подчеркивает высокую аффинность антитела.

Затем тестировали способность Hu101-28 блокировать активность CD73. Рекомбинантный CD73 человека (0,3 мкг/мл) инкубировали с Hu101-28 в течение 15 мин. Затем добавляли АТФ (100 мМ) и АМФ (100 мМ) еще на 30 мин. Добавляли CellTiter-Glo (Promega) и измеряли ингибирование излучения света с помощью люминометра. Как показано на фиг. 13, левой панели, IC_{50} в растворе составляла 2,84 нМ. По отношению к CD73, находившемуся на клетках, клетки SK-OV-3 или MDA-MB-231 (1×10^5 клеток) инкубировали с Hu101-28 в течение 15 мин, а затем последовательно добавляли АМФ (100 мМ) и АТФ (100 мМ) с последующим инкубированием в течение 1 ч. Добавляли CellTiter-Glo (Promega) и измеряли ингибирование излучения света с помощью люминометра. Как показано на фиг. 13, правой панели, IC_{50} составляла 2,52 нМ и 8,21 нМ для SK-OV-3 и MDA-MB-231, соответственно.

Дальнейшие эксперименты показали, что Hu101-28 не конкурировало с субстратом АМФ за связывание с активным центром, но действовало аллостерически или за счет других неконкурентных механизмов, что более предпочтительно с точки зрения избегания необходимости конкурировать с множественными эндогенными субстратами АМФ. Как показано на фиг. 14, увеличение концентрации субстрата АМФ не предотвращало гидролиз за счет Hu101-28, что указывало на действие Hu101-28 как неконкурентного ингибитора. В противоположность этому, ингибиторную активность АДФ можно преодолеть, увеличив концентрацию субстрата для устранения связывания АДФ с активным центром.

Интересные и неожиданные данные показаны на фиг. 15. Интернализацию CD73 после связывания с Hu101-28 демонстрировали, измеряя уровень CD73 на клеточной поверхности проточной цитометрией или жизнеспособность клеток MDA-MB-231 после связывания Hu309 в присутствии вторичного антитела, конъюгированного с токсином. По сравнению с IgG, который не изменял уровень CD73 на поверхности клетки, Hu101-28 приводило к более чем половинному снижению уровня CD73 на поверхности клетки в течение 6 ч (левая панель), и даже еще более выраженному уничтожению клеток (правая панель).

Таким образом, вышеописанные эксперименты продемонстрировали, что Hu101-28 обладает двойным механизмом действия (МоА): неконкурентно блокирует ферментативную активность CD73 и индуцирует интернализацию CD73 клеточной поверхности.

Пример 9. Hu101-28 полностью устраняет супрессию $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеточного ответа, опосредованную АМФ или опухолевыми клетками.

В данном примере показано, что Hu101-28 полностью устраняет супрессию $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеточного ответа, опосредованную АМФ или опухолевыми клетками.

$CD4^+$ или $CD8^+$ Т-клетки человека метили CFSE и стимулировали антителами против CD3/CD28 в присутствии или в отсутствие АМФ. Hu101-28 добавляли в культуру на 72 ч. Супернатант культуры анализировали на предмет продукции ИФН- γ с помощью твердофазного ИФА. На фиг. 16, левой панели, Hu101-28 увеличивало продукцию ИФН-гамма в $CD4^+$ клетках в зависимости от дозы. Аналогичным образом, как показано на правой панели, Hu101-28 увеличивало продукцию ИФН-гамма в $CD8^+$ клетках в зависимости от дозы.

Для тестирования влияния Hu101-28 на супрессию Т-клеточного ответа, опосредованную опухолевыми клетками, CD73-экспрессирующие клетки SK-OV-3 обрабатывали митомином С и совместно культивировали с очищенными $CD4^+$ или $CD8^+$ Т-клетками в присутствии антител против CD3/CD28. Hu101-28 добавляли в культуру на 72 ч, супернатант культуры анализировали на предмет продукции ИФН-гамма с помощью твердофазного ИФА. Как показано на фиг. 17, левой панели, Hu101-28 увеличивало продукцию ИФН-гамма в $CD4^+$ клетках в зависимости от дозы. Аналогичным образом, как показано на правой панели, Hu101-28 увеличивало продукцию ИФН-гамма в $CD8^+$ клетках в зависимости от дозы.

Пример 10. Hu101-28 подавляет рост опухоли.

В данном примере продемонстрировано, что Hu101-28 эффективно подавляло активность опухолевого CD73, что приводило к ингибированию роста опухоли при монотерапии или комбинированной терапии.

Ферментативную активность CD73 *in vivo* измеряли ферментативным гистохимическим способом в опухолях модели ксенотрансплантата A375, результаты окрашивания показаны на фиг. 18. Коричневое окрашивание указывает на присутствие активного CD73, в то время как отсутствие коричневого окрашивания указывало на ингибирование ферментативной активности CD73 антителом. Выполняли сбор опухолей модели ксенотрансплантата A375, обработанных Hu101-28 или контрольным IgG, результаты по-

казали, что активность CD73 в срезах опухоли значительно снижалась при обработке Hu101-28 по сравнению с группой контрольного IgG.

Эффективность применения Hu101-28 в качестве монотерапии также оценивали в модели ксенотрансплантата опухоли. Клетки меланомы A375 и МПК человека трансплантировали NSG мышам с иммунодефицитом. В день трансплантации мышам с опухолями вводили различные дозы Hu101-28 или контрольного IgG путем внутрибрюшинной инъекции раз в два дня. Как показано на фиг. 19, Hu101-28 устойчиво подавляло рост опухоли в зависимости от дозы.

Выполнили оценку комбинаторного влияния Hu101-28 и антитела против PD-L1. Клетки HCC827 трансплантировали NSG мышам. Когда объем опухоли достигал 100-150 мм³, мышам с опухолями вводили свежeweделенные МПК человека посредством инъекции в хвостовую вену, а затем лечили животных контрольным IgG, только антителом против PD-L1, только Hu101-28 и антителом против PD-L1 в комбинации с Hu101-28 в указанных дозах раз в два дня, начиная со дня трансплантации МПК. На фиг. 20 показан синергический эффект Hu101-28 и антитела против PD-L1.

Пример 11. Hu101-28 перекрестно реагирует с CD73 яванского макака.

В данном примере показано, что гуманизированное антитело Hu101-28 перекрестно реагировало с CD73 яванского макака и обладало приемлемым профилем ФК и безопасности в поисковом клиническом исследовании.

На фиг. 21 показано связывание и ингибирование активности CD73 яванского макака за счет Hu101-28. Hu101-28 обладало сопоставимой эффективностью связывания и ингибирования активности CD73 яванского макака по сравнению с CD73 человека в биохимическом анализе *in vitro* при отсутствии связывания Hu101-28 с CD73 грызунов. Эти результаты поддерживают использование яванского макака в качестве модели для неклинического исследования при оценке токсичности, ФК и ТК Hu101-28.

Пример 12. Hu101-28 связывается с С-концевыми доменами CD73.

В данном примере показано, что одно из гуманизированных антител, Hu101-28, связывалось с С-концевыми доменами белка CD73, в отличие от известных антител против CD-73, связывающихся с N-концевыми доменами.

Оценку эпитопов антител против CD73 выполняли с помощью конкурентного твердофазного ИФА. Белок CD73 ECD и Hu101-28 заранее инкубировали, а затем добавляли с биотинилированным MEDI-9447 (Medimmune), детектируемым антителом со стрептавидином-ПХ. Результаты показали, что добавление биотинилированного R9447 не вызывало конкуренции со связыванием Hu101-28, что указывало на расположение обоих антител в неперекрывающихся эпитопах (фиг. 22). В качестве контроля, добавление биотинилированного MEDI-9447 могло приводить к конкуренции за связывание с самим собой.

Для выявления эпитопа Hu101-28 получили библиотеку клонов вариантов CD73 с мутациями единственной аминокислоты. Связывание Fab Hu101-28 с каждым вариантом в библиотеке определяли в двух повторностях с помощью высокопроизводительной проточной цитометрии. Для каждого варианта CD73 строили график среднего значения связывания в зависимости от экспрессии CD73 (представленного по реакционной способности контроля) и выявляли на диаграмме критические остатки. Критические остатки для связывания CD73 - Fab (выделены красным) выявляли как остатки, мутации в которых давали отрицательный результат по отношению к тесту связывания Fab, но положительный по отношению к контрольным мАт. Средние значения (и диапазоны) реакционной способности к связыванию перечислены для критических остатков, указанных на экранах, и показаны на фиг. 23. Hu309 связывалось с С-концевой областью CD73 по эпитопу Y345, D399, E400, R401 и R480 (визуализировано на фиг. 24, верхняя левая панель), в то время как MEDI-9447 связывалось с N-концевой областью (см. сравнение на фиг. 24).

Считалось, что уникальные связывающие свойства Hu101-28 обуславливают его превосходный профиль ингибирования CD73 по сравнению с известными антителами. Это продемонстрировано на фиг. 25. На верхнем сравнении показано, что Hu101-28 демонстрировало полное ингибирование активности CD73 без "эффекта высокой дозы", в то время как MEDI-9447 в высоких дозах демонстрировало значительный "эффект высокой дозы". На нижней сравнительной панели Fab Hu101-28 демонстрировал эффективность ингибирования активности CD73, сопоставимую с полным IgG, в то время как Fab MEDI-9447 не ингибировал растворимый CD73.

Это указывает на то, что для ингибирования CD73 требуется связывание по обоим сайтам связывания на полном антителе MEDI-9447, в то время как для Hu101-28 достаточно одновалентного связывания. Предложили гипотезу, что MEDI-9447 связывалось с двумя различными димерами CD73 для проявления ингибиторной активности, а для Hu101-28 такое требование отсутствует. Для проверки этой гипотезы протестировали ингибиторное влияние Hu101-28 с использованием клеток с различными уровнями экспрессии CD73. Как показано на фиг. 26, Hu101-28 могло достигать полного ингибирования активности CD73 на клетках, экспрессирующих на поверхности различные уровни CD73, в том числе клетках с низким уровнем экспрессии, где расстояние между молекулами CD73, вероятно, будет значительным.

Рамки настоящего изобретения не ограничиваются конкретными описанными вариантами реализации, которые следует рассматривать как одиночную иллюстрацию отдельных аспектов настоящего изобретения, и любые функционально эквивалентные композиции и способы входят в рамки настоящего изобретения. Для специалиста очевидно, что в способы и композиции согласно настоящему изобретению

можно внести различные модификации и изменения, не выходя за рамки сущности изобретения. Таким образом, подразумевается, что настоящее изобретение включает модификации и изменения данного изобретения при условии, что они соответствуют сущности прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов.

Все публикации и патентные заявки, упомянутые в настоящем документе, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы было специально указано, что каждая отдельная публикация или патентная заявка включены в настоящий документ посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, причем указанное антитело или его фрагмент обладает специфичностью по отношению к белку CD73 человека и содержит CDR1 VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, CDR3 VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; CDR1 VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; CDR2 VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, дополнительно содержащее константную область тяжелой цепи, константную область легкой цепи, Fc-область или их комбинацию.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, характеризующееся тем, что константная область легкой цепи представляет собой константную область каппа- или лямбда-цепи.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, характеризующееся тем, что антитело или его фрагмент относится к изотипу IgG, IgM, IgA, IgE или IgD.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.4, характеризующееся тем, что изотип представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, характеризующееся тем, что антитело или его фрагмент представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, характеризующееся тем, что антитело или его фрагмент представляет собой гуманизированное антитело.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из:

- (a) Thr в положении 30,
- (b) Lys в положении 44,
- (c) Met в положении 48,
- (d) Ile в положении 67 и
- (e) Arg в положении 71, в соответствии с нумерацией Kabat, и их комбинаций.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.6, содержащее вариабельную область легкой цепи, содержащую один или более аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из:

- (a) Ser в положении 5,
- (b) Pro в положении 46,
- (c) Trp в положении 47,
- (d) Ser в положении 49,
- (e) Ser в положении 70,
- (f) Tyr в положении 71, в соответствии с нумерацией Kabat, и их комбинаций.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 9-13, или пептид, обладающий по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и 9-13.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, характеризующееся тем, что вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 9.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-11, содержащее вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 15-20 и 22-24, или пептид, обладающий по меньшей мере 90% идентичностью с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 15-20 и 22-24.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, характеризующееся тем, что вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

14. Биспецифическое антитело, содержащее антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-13 и второе антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

16. Выделенная клетка, содержащая один или более полинуклеотидов, кодирующих антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-14.

17. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-14 для изготовления терапевтического средства для лечения рака, причем рак выбран из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака ободочной и прямой кишки, рака эндометрия, рака пищевода, рака головы и шеи, рака почек, лейкоза, рака печени, рака легких, лимфомы, меланомы, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы и рака щитовидной железы.

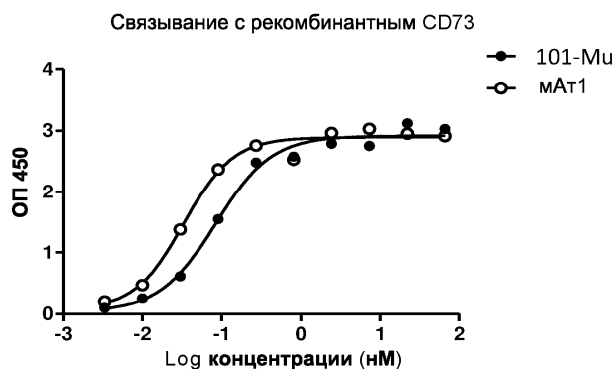
18. Применение по п.17, в котором пациента дополнительно лечат вторым агентом для лечения рака.

19. Применение по п.18, характеризующееся тем, что указанный второй агент для лечения рака является ингибитором контрольной точки иммунного ответа.

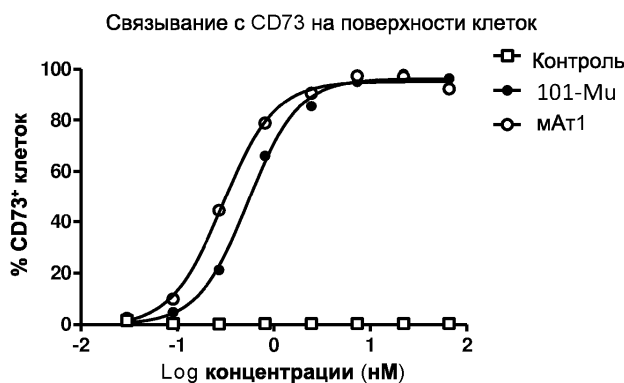
20. Применение по п.19, характеризующееся тем, что указанный ингибитор подавляет экспрессию или активность белка-1 запрограммированной гибели клеток (PD-1), лиганда-1 белка запрограммированной гибели клеток (PD-L1), белка-4, ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA-4), белка-3 активации лимфоцитов (LAG-3) или их комбинаций.

21. Применение по п.20, характеризующееся тем, что ингибитор представляет собой антитело против PD-1 или против PD-L1.

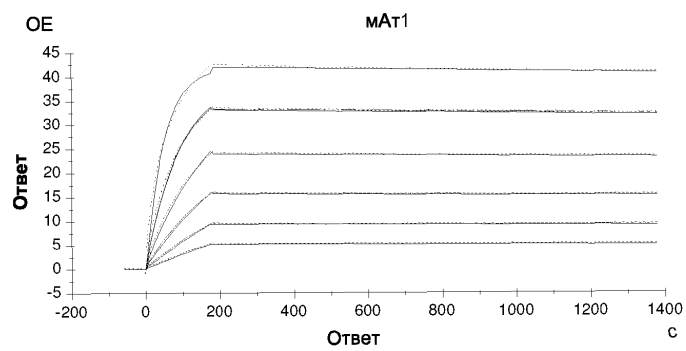
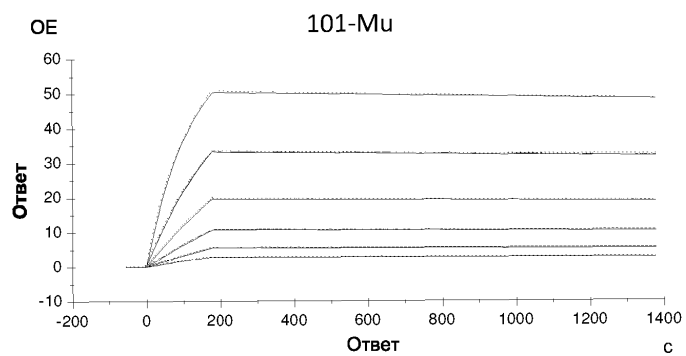
22. Применение по п.21, характеризующееся тем, что ингибитор выбран из группы, состоящей из пембролизумаба, ниволумаба, J43, RMP1-14, атезолизумаба, ипилимумаба и их комбинаций.



Фиг. 1

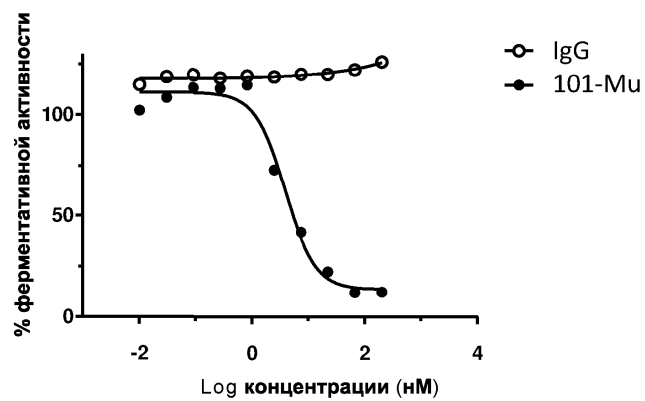


Фиг. 2

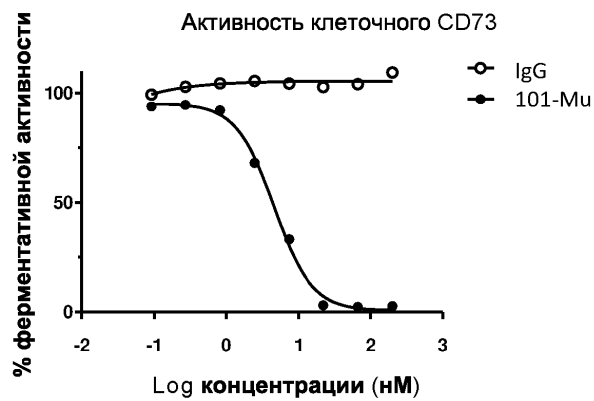


Фиг. 3

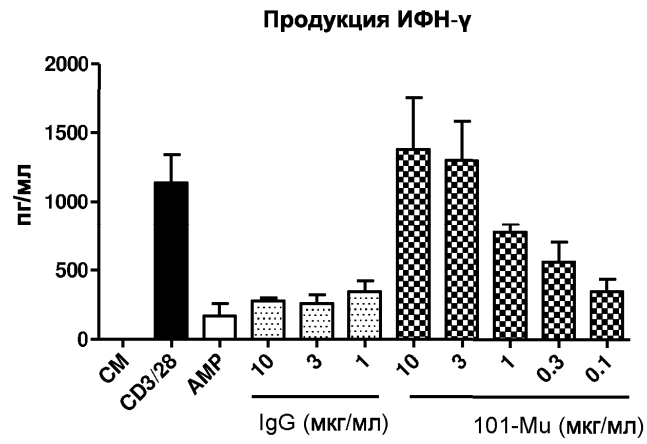
Связывание с рекомбинантным CD73



Фиг. 4

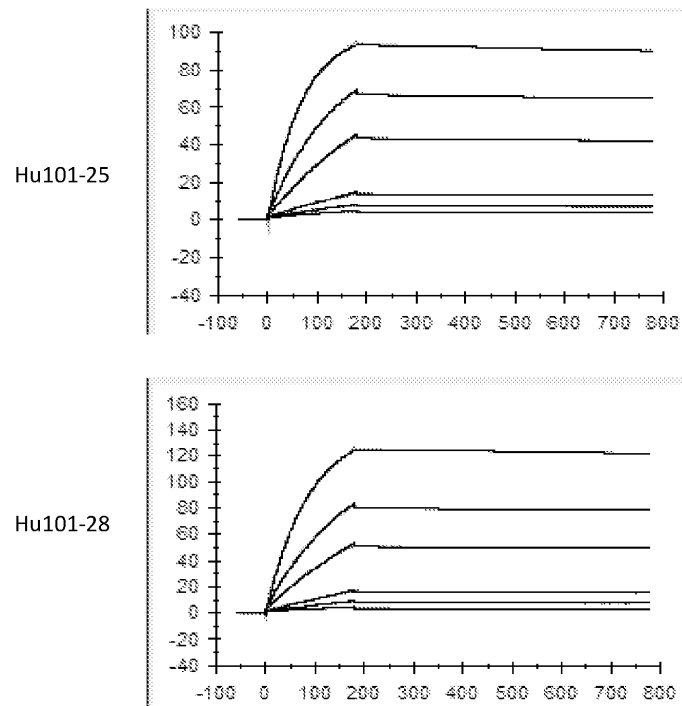


Фиг. 5



Фиг. 6

Связывание с рекомбинантным CD73 согласно ППР



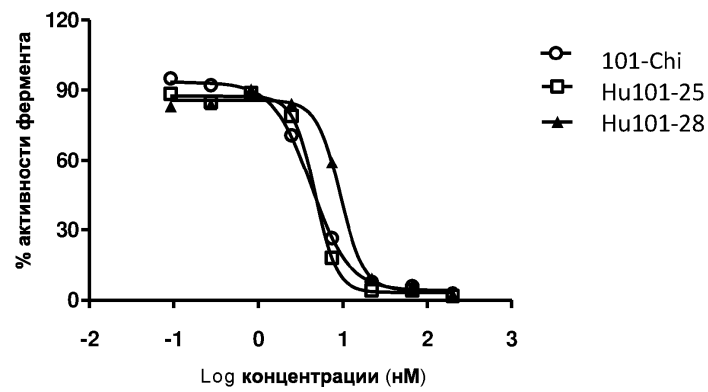
Фиг. 7

Связывание с CD73 на поверхности клеток



Фиг. 8

Активность рекомбинантного CD73



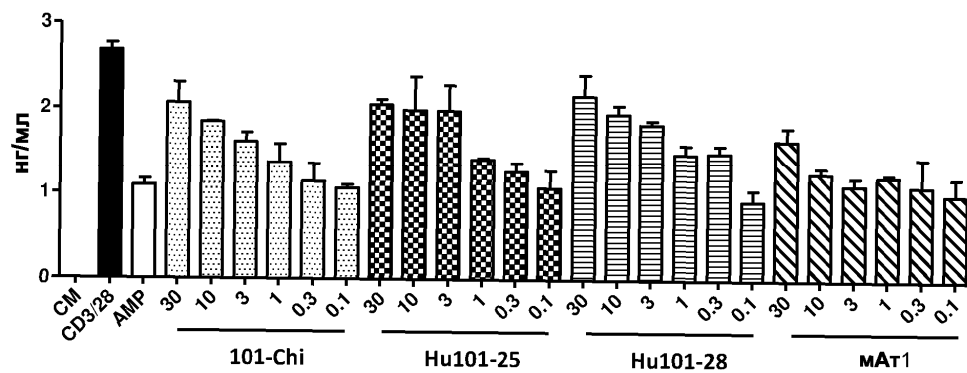
Фиг. 9

Активность клеточного CD73



Фиг. 10

Продукция ИФН-γ

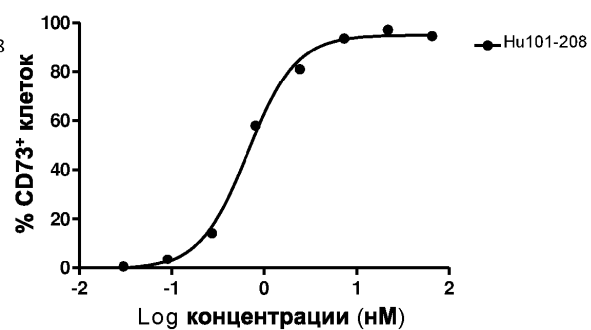


Фиг. 11

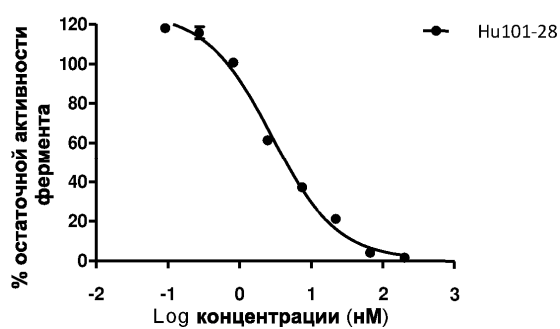
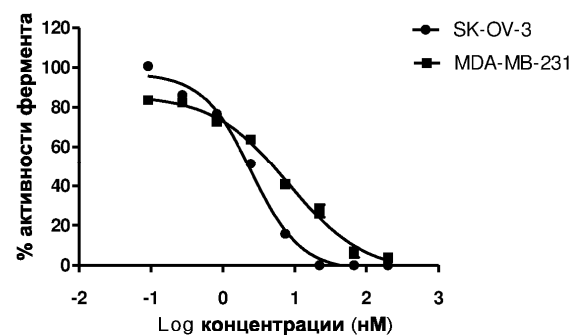
Связывание Hu101-28 с растворимым CD73

Hu101-28 $EC_{50} = 88,7 \text{ пМ}$

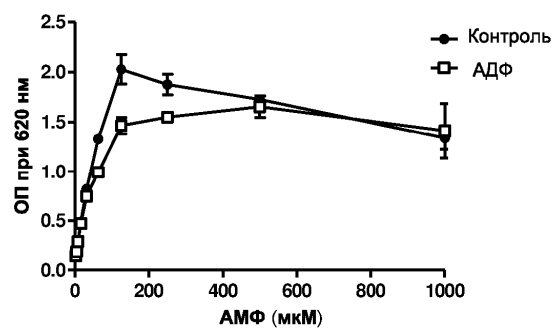
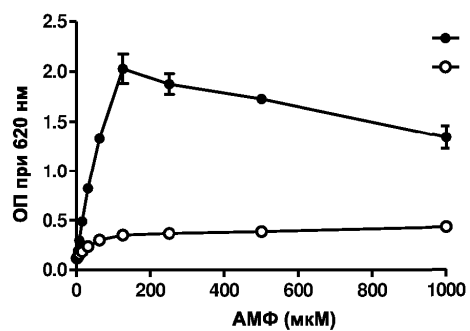
Связывание Hu101-28 с клетками SK-OV-3

Hu101-28 $EC_{50} = 0,67 \text{ нМ}$

Фиг. 12

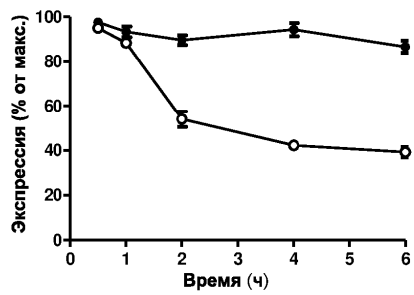
Hu101-28 $EC_{50} = 2,84 \text{ нМ}$ Hu101-28 (SK-OV-3) $EC_{50} = 2,52 \text{ нМ}$ Hu101-28 (MDA-MB-231)
 $EC_{50} = 8,21 \text{ нМ}$

Фиг. 13

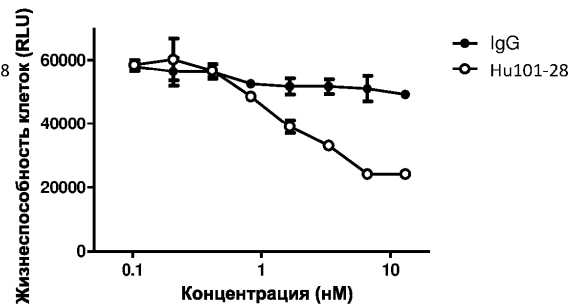


Фиг. 14

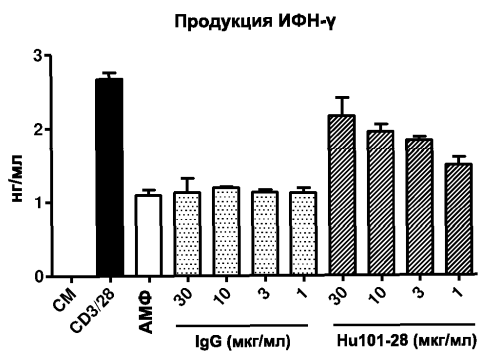
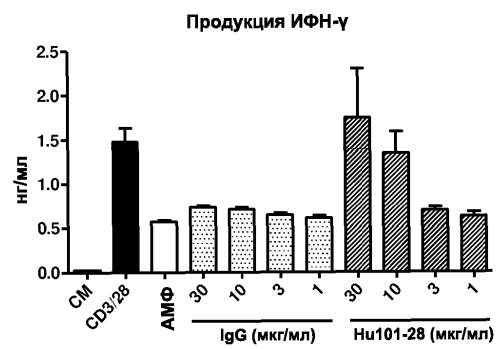
Окрашивание CD73 на поверхности клеток



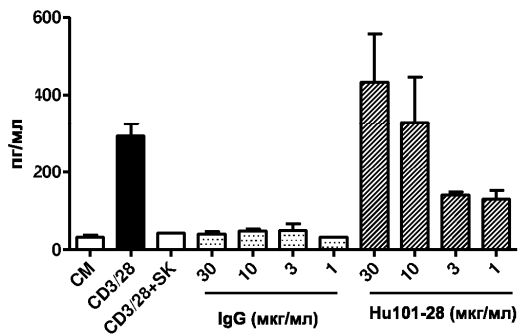
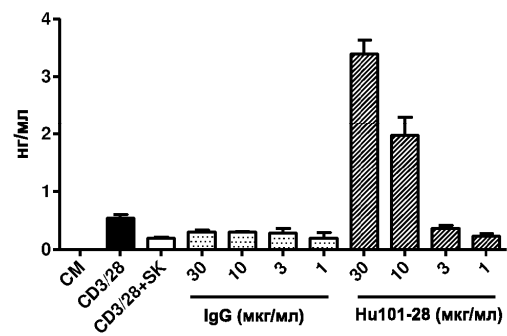
Жизнеспособность клеток после интернализации CD73



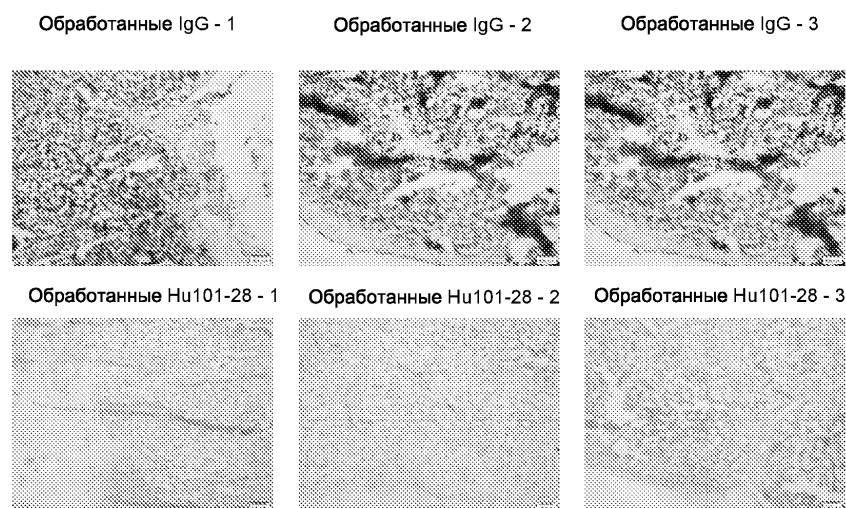
Фиг. 15

CD4⁺ Т-клеточный ответCD8⁺ Т-клеточный ответ

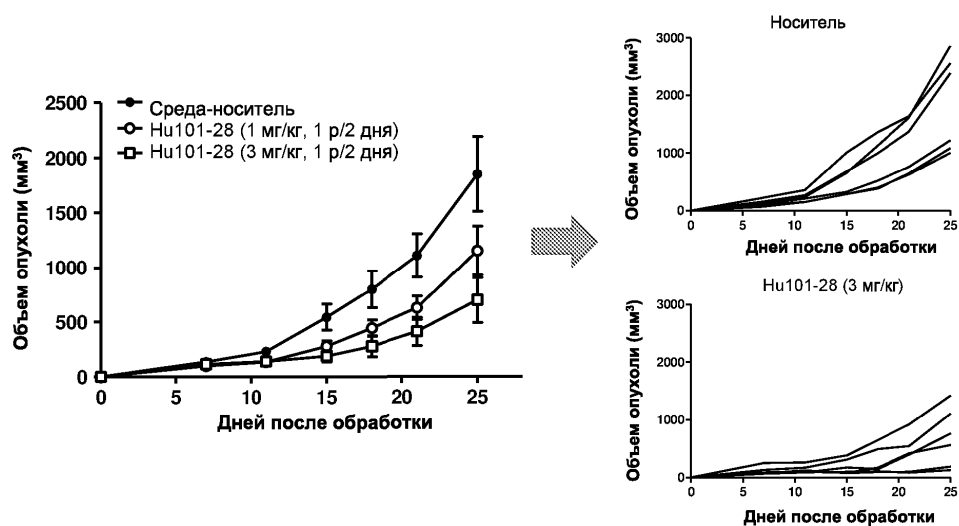
Фиг. 16

Совместная культура CD4⁺ Т-клеток/SK-OV-3
Продукция ИФН-γСовместная культура CD8⁺ Т-клеток/SK-OV-3
Продукция ИФН-γ

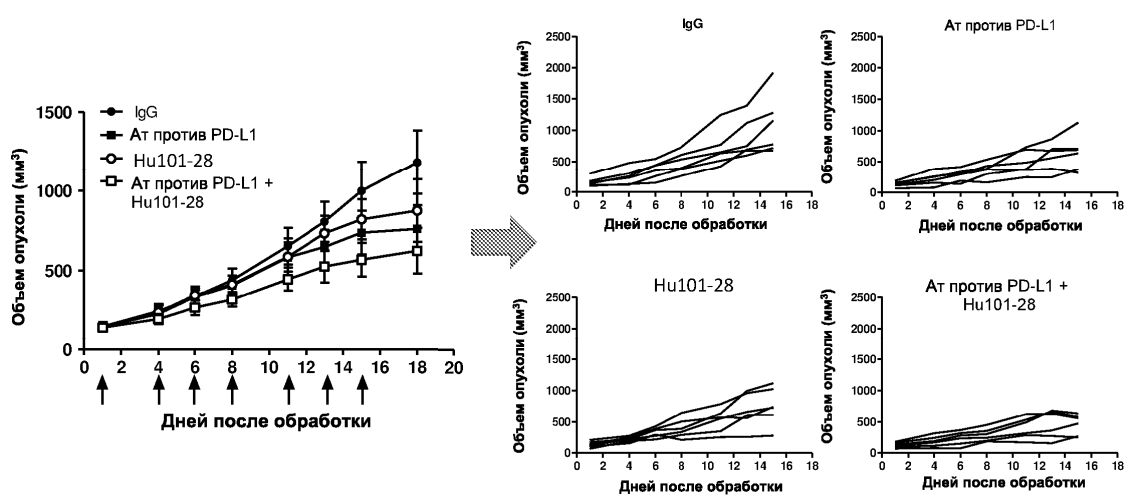
Фиг. 17



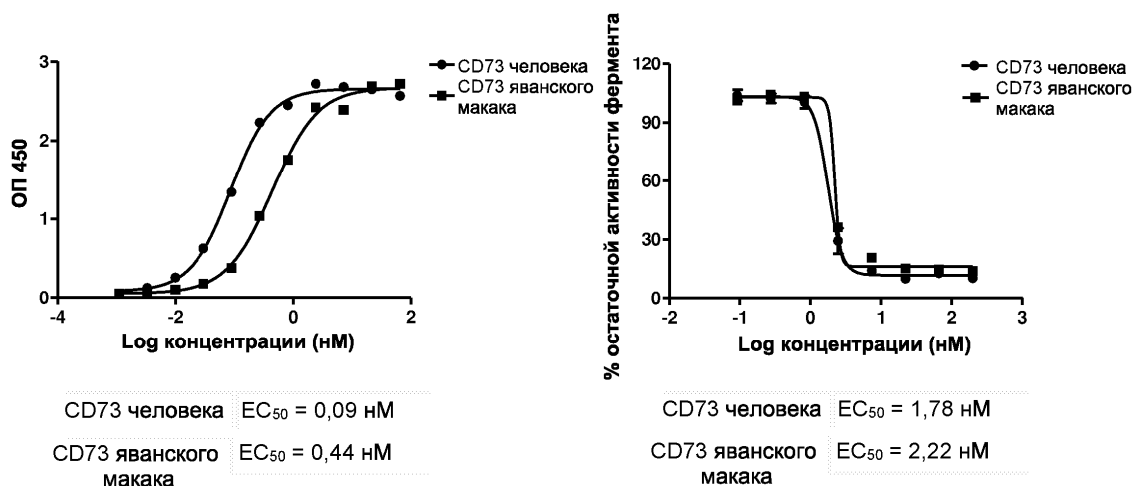
Фиг. 18



Фиг. 19

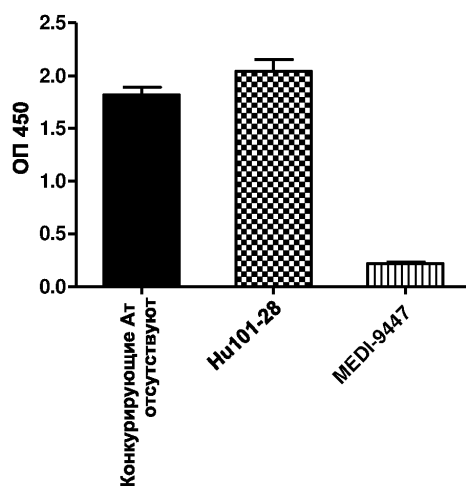


Фиг. 20



Фиг. 21

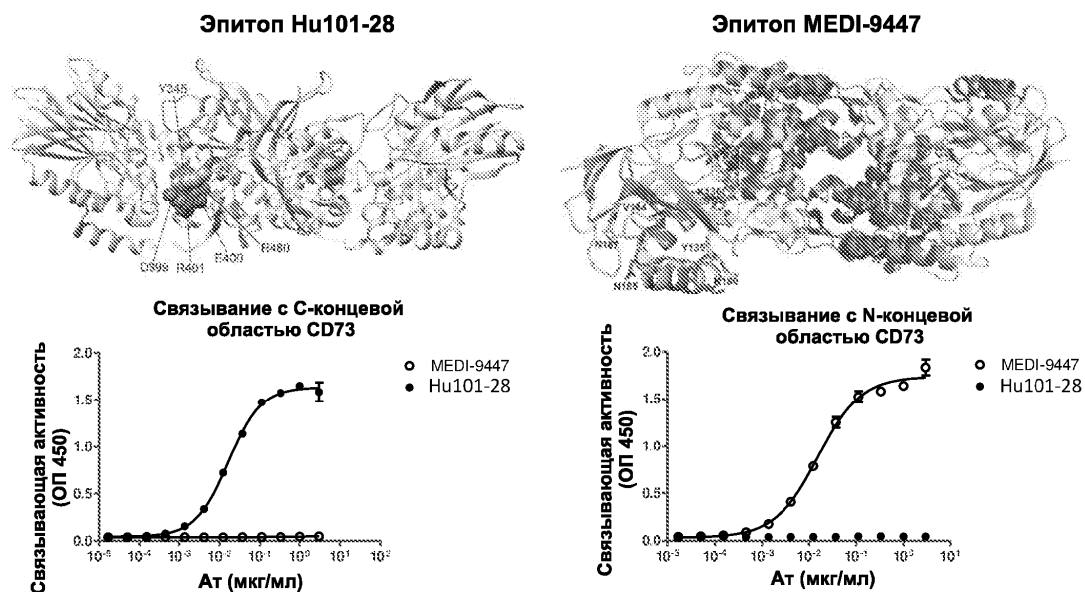
Конкуренция с MEDI-9447



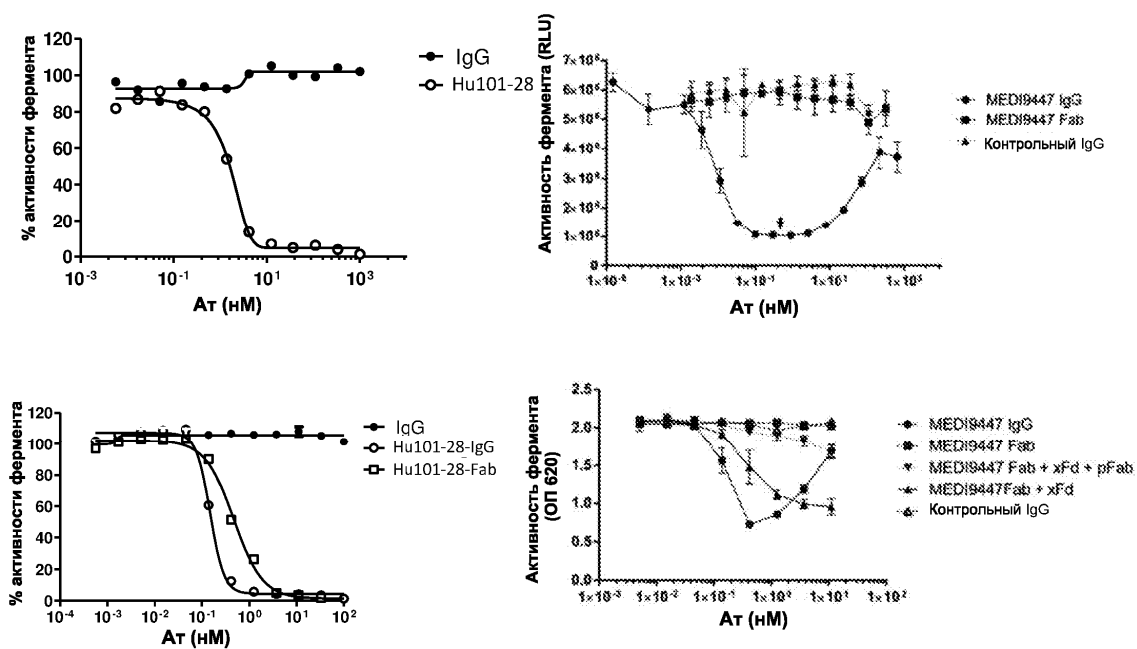
Фиг. 22

Реакционная способность связывания (% ДТ)			
Мутация	Hu101-28 Fab HS	мАт 4G4	мАт 7G2
Y345A	2.7 (0)	103.9 (16)	112.7 (25)
D399A	1.8 (0)	90.4 (16)	114.2 (19)
E400A	3.6 (1)	85.4 (10)	118.6 (12)
R401A	1.1 (0)	101.7 (14)	98.9 (24)
R480A	-0.9 (0)	83.2 (18)	65.2 (7)

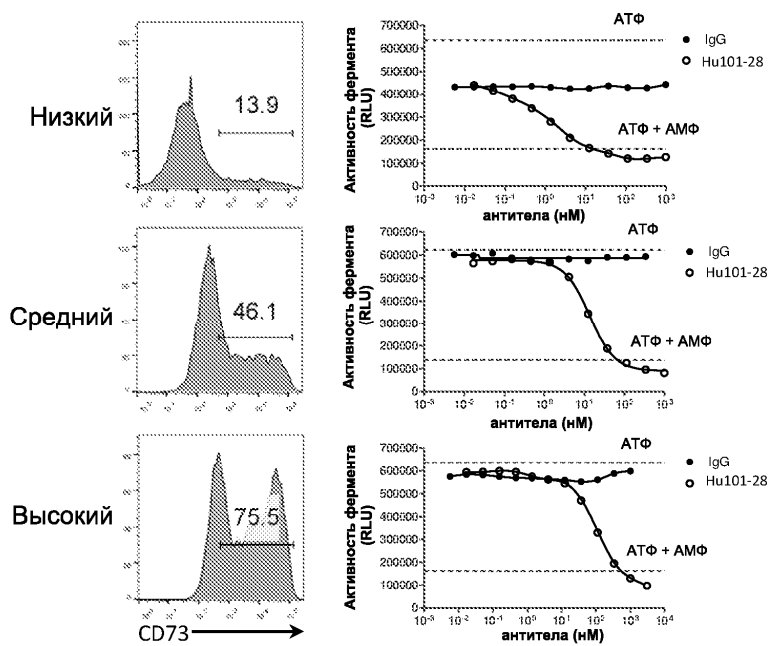
Фиг. 23



Фиг. 24



Фиг. 25



Фиг. 26



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2