

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292867** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.25

(22) Дата подачи заявки
2021.04.09

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

**(54) МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА И ИХ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ФРАГМЕНТЫ
ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ИММУННОЙ КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ CD73 И ИХ
ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 10-2020-0043607; 10-2020-0144595

(32) 2020.04.09; 2020.11.02

(33) KR

(86) PCT/IB2021/052934

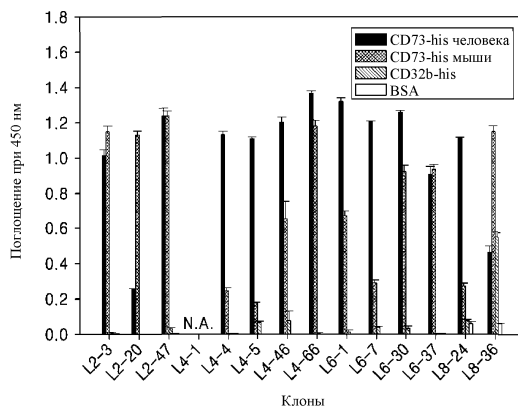
(87) WO 2021/205383 2021.10.14

(71) Заявитель:
ЭЙПРИЛБИО КО., ЛТД. (KR)

(72) Изобретатель:
Ча Сан Хун (KR)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Предложены моноклональные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты для подавления иммунной контрольной точки CD73 (кластера дифференцировки 73) и их применения, при этом антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут связываться с CD73, снижать ферментативную активность белка CD73 и подавлять метастазирование рака или рост раковой опухоли, обеспечивая таким образом возможность их применений в качестве терапевтических агентов для лечения рака.



A1

202292867

202292867

A1

**МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА И ИХ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ
ФРАГМЕНТЫ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ИММУННОЙ КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ
CD73 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Эта заявка испрашивает приоритет в соответствии с §119 раздела 35 U.S.C. (Свод законов США) в отношении заявки Кореи (KR) № 10-2020-0043607, поданной 9 апреля 2020 г., и заявки KR № 10-2020-0144595, поданной 2 ноября 2020 г., описания которых включены в данную заявку посредством ссылки во всей своей полноте.

**ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В
ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ**

[0002] Содержимое Перечня последовательностей, представленного в электронном виде в текстовом файле ASCII (Стандартный американский код обмена информацией) (с названием: 2662-0003WO01_Sequence_Listing_ST25.txt; размером: 48 кБ (килобайт); и датой создания: 8 апреля 2021 г.), поданного вместе с этой заявкой, включено в данное описание посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам (mAb) и их антигенсвязывающим фрагментам для подавления иммунной контрольной точки CD73 и к их применениям.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Традиционные способы лечения рака включают лучевую терапию, химиотерапию и лечение противораковыми лекарственными средствами, и эти способы пригодны для лечения рака путем непосредственного подавления роста раковой опухоли. Однако, раковые клетки резистентны к противораковым лекарственным средствам, и при применении противораковых лекарственных средств другие, нераковые клетки, также могут быть подвергнуты атаке, что является причиной побочных эффектов. Чтобы преодолеть эти проблемы, в качестве нового способа терапии рака была разработана иммунотерапия. Иммунотерапия не направлена на раковые клетки, а направлена на иммунные клетки и инициирует атаку иммунными клетками раковых клеток.

[0005] Среди иммунотерапевтических способов лечения внимание в последнее время привлекают методы блокирования иммунных контрольных точек. Иммунными контрольными точками являются рецепторы, которые стимулируют или подавляют иммунные ответы. Иммунные контрольные точки необходимы для регуляции иммунных ответов. Поскольку иммунные контрольные точки также работают при раке, в случае рака проявляется уклонение от иммунитета через иммунные контрольные точки. В последнее время сообщалось о большом числе исследований, в которых рак лечили, воздействуя на иммунные контрольные точки. Сначала были разработаны антитела к таким иммунным контрольным точкам, как цитотоксический Т-лимфоцитарный антиген 4 (CTLA-4) и белок 1 программируемой клеточной смерти (PD-1), и при их использовании показаны более высокие показатели выживаемости у пациентов с меланомой. Блокирование иммунных контрольных точек CTLA-4 и PD-1 было применено в ряде случаев рака, и при многих видах рака также было продемонстрировано эффективное действие. Однако, лечение с применением блокирования иммунных контрольных точек CTLA-4 и PD-1 не оказалось эффективным у некоторых пациентов. Поэтому было проведено множество исследований в отношении новых иммунных контрольных точек и установлено, что одним из механизмов уклонения от иммунитета при раке является наличие высокой концентрации иммуносупрессивного аденозина.

[0006] При этом, «кластер дифференцировки 73 (CD73)» представляет собой эктонуклеотидазу, которая катализирует дефосфорилирование 5'-нуклеотидов и участвует в превращении аденозинмонофосфата (АМФ) в аденозин. CD73 существует на клеточной мембране в форме гомодимера, прикрепленного через гликозилфосфатидилинозитольный (GPI) якорь, при этом мономер имеет молекулярную массу 65 кДа, а N-концевой и С-концевой домены соединены посредством гибкого спирального линкера. Другими словами, CD73 вовлечен в образование аденозина, сверхэкспрессируется в раковых клетках и вызывает иммуносупрессию. Соответственно, существует потребность в разработке новых блокаторов иммунных контрольных точек, ориентированных на концентрацию иммуносупрессивного аденозина.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] В данной заявке описаны моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие вариабельную область тяжелой цепи,

содержащую CDRH1 (определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи), содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10, 14 или 17, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, 5, 8, 11, 15 или 18, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12, 13, 16 или 19; и переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1 (определяющий комплементарность участок 1 легкой цепи), содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 20, 23, 26 или 29, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 21, 24, 27 или 30, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 22, 25, 28 или 31.

[0008] В некоторых воплощениях моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут включать переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 3; и переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 20, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 21, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 22; переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 4, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 5, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 6; и переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 23, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 24, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 25; переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 7, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 8, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 9; и переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 26, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 27, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 28; переменную область тяжелой цепи, содержащую

CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 11, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 12 или 13; и переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 20, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 21, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 22; переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16; и переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 20, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 21, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 22; или переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 17, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 18, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 19; и переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 29, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 30, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 31.

[0009] В некоторых воплощениях антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37 или 38; и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с SEQ ID NO: 39, 40, 41 или 42. В некоторых воплощениях антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут содержать переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную

последовательность с SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37 или 38; и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 39, 40, 41 или 42.

[0010] Также предложены моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 66, 69, 72, 75 или 78, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 67, 70, 73, 76 или 79, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 68, 71, 74, 77 или 80; и переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 81, 84, 87, 90 или 93, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 82, 85, 88, 91 или 94, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 83, 86, 89, 90 или 95.

[0011] В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут включать переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 66, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 67, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 68; и переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 81, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 82, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 83; переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 69, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 70, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 71; и переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 84, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 85, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 86; переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 72, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 73, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 74; и переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную

последовательность с SEQ ID NO: 87, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 88, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 89; переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 75, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 76, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 77; и переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 90, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 91, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 92; или переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 78, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 79, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 80; и переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 93, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 94, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 95.

[0012] Согласно другим аспектам предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, векторы экспрессии, содержащие данные нуклеиновые кислоты, и клетки, трансформированные такими векторами экспрессии.

[0013] Согласно данному изобретению предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37 или 38, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с SEQ ID NO: 39, 40, 41 или 42. Кроме того, согласно данному изобретению предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область

тяжелой цепи с SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37 или 38, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 39, 40, 41 или 42.

[0014] Предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 32, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 39, или нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 33, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 40. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 32, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 43, а нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 39, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 44. В некоторых воплощениях предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 33, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 40. Кроме того, нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 33, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 45, а нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 40, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 46.

[0015] Кроме того, предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с SEQ ID NO: 96, 98, 100, 102 или 104, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с SEQ ID NO: 97, 99, 101, 103 или 105. Кроме того, предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 96, 98, 100, 102 или 104, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 97, 99, 101, 103 или 105.

[0016] Предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область

тяжелой цепи с SEQ ID NO: 96, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 97, нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 98, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 99, нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 100, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 101, нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 102, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 103, или нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 104, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 105. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 96, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 106, а нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 97, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 107. Нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 98, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 108, а нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 99, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 109. Нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 100, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 110, а нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 101, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 111. Нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 102, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 112, а нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 103, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 113. Нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 104, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 114, а нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 105, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 115.

[0017] Кроме того, предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи, содержащие нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по

меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с SEQ ID NO: 106, 108, 110, 112 или 114, и нуклеиновые кислоты, кодирующие вариабельную область легкой цепи, содержащие нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с SEQ ID NO: 107, 109, 111, 113 или 115.

[0018] Также описаны композиции для предупреждения или лечения рака, при этом такая композиция содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данной заявке. В некоторых воплощениях композиция может дополнительно содержать блокирующий агент иммунных контрольных точек или химиотерапевтический агент.

[0019] Также описаны способы лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данной заявке. В некоторых воплощениях рак представляет собой CD73-сверхэкспрессирующий рак. В некоторых воплощениях рак представляет собой рак молочной железы, трижды негативный рак молочной железы (TNBC), рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак яичника, рак желудочно-кишечного тракта, рак мочевого пузыря, лейкоз, рак предстательной железы, злокачественную меланому, рак пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, рак легкого или рак почки.

[0020] В данном изобретении также раскрыты применения моноклональных антител и их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данной заявке, для лечения рака у субъектов, нуждающихся в этом. В данном изобретении также раскрыты моноклональные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данной заявке, для применения в лечении рака у субъектов, нуждающихся в этом. В данном изобретении также раскрыто применение моноклональных антител и их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данной заявке, для приготовления лекарственных средств для лечения рака у субъектов, нуждающихся в этом.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0021] Вышеупомянутые и другие аспекты, признаки и преимущества некоторых воплощений изобретения будут более понятны из следующего далее описания вместе с прилагаемыми графическими материалами, в которых:

[0022] ФИГ. 1 представляет собой график, показывающий CD73-связывающую способность антител к CD73, которые были отобраны с использованием биопэннинга, при этом связывание фаговых антител с CD73 исследовали путем измерения поглощения на длине волны 450 нм, и стандартное отклонение данных указано планками погрешностей;

[0023] на ФИГ. 2А показан вектор для экспрессии человеческого иммуноглобулина G1 изотипа (IgG1), полученный путем клонирования последовательностей генов вариабельной области тяжелой цепи (V_H) и вариабельной области легкой цепи (V_L) фагового антитела к CD73 в вектор pdCMV-dhfr, включающий последовательности генов константной области тяжелой цепи (C_H) и константной области легкой цепи (C_L);

[0024] на ФИГ. 2В показаны результаты электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) для человеческих антител IgG1, при этом полосы с 1 по 12 представляют L2-3, L2-47, L4-1, L4-4, L4-5, L4-46, L4-66, L6-1, L6-7, L6-30, L6-37 и L8-24, соответственно;

[0025] на ФИГ. 3А показаны результаты проведения иммуноферментного твердофазного анализа (ELISA) для анализа связывания 12 видов очищенных человеческих антител IgG1 изотипа с CD73;

[0026] на ФИГ. 3В показаны результаты проведения анализа MDA-MB-231 клеток *in vitro* с целью сравнения 12 видов очищенных человеческих антител IgG1 изотипа на основании ингибирования ферментативной активности CD73, при этом ферментативную активность CD73 определяли путем измерения фосфата, отщепленного под действием CD73, используя реагент малахитовый зеленый;

[0027] на ФИГ. 3С показаны результаты ELISA анализа способности к перекрестному связыванию с CD73 человека, обезьяны, крысы и мыши, при этом связывание антител с CD73 исследовали путем измерения поглощения при длине волны 450 нм;

[0028] на ФИГ. 4А-4D представлены графики, показывающие сравнение способностей антител APBA2-01 и APBA2-02 связываться с водорастворимым CD73, при этом на ФИГ. 4А-4D представлены результаты ELISA для CD73 человека, обезьяны, крысы и мыши, соответственно;

[0029] ФИГ. 5А представляет собой график результатов проточной цитометрии, показывающий сравнение способностей антител APBA2-01 и APBA2-02 связываться с

мембранным CD73 в экспрессирующих CD73 человека MDA-MB-231 клетках;

[0030] ФИГ. 5B представляет собой график результатов проточной цитометрии, показывающий сравнение способностей антител APBA2-01 и APBA2-02 связываться с мембранным CD73 в экспрессирующих CD73 мыши 4T1 клетках;

[0031] ФИГ. 6A представляет собой график, показывающий результаты биослойной интерферометрии для анализа конкурентного связывания антител APBA2-01 и APBA2-02 с эпитопом для антитела CPI-006;

[0032] ФИГ. 6B представляет собой график, показывающий результаты биослойной интерферометрии для анализа конкурентного связывания антител APBA2-01 и APBA2-02 с эпитопом для антитела MEDI-9447;

[0033] ФИГ. 7 представляет собой график, показывающий результаты анализа с использованием малахитового зеленого для сравнения ингибирования ферментативной активности водорастворимого CD73 под действием антител APBA2-01 и APBA2-02;

[0034] ФИГ. 8A представляет собой график, показывающий результаты анализа с использованием малахитового зеленого для сравнения ингибирования ферментативной активности мембранного CD73 под действием антител APBA2-01 и APBA2-02 в MDA-MB-231 клетках;

[0035] ФИГ. 8B представляет собой график, показывающий результаты анализа CellTiter-Glo® для сравнения ингибирования ферментативной активности мембранного CD73 под действием антител APBA2-01 и APBA2-02 в 4T1 клетках;

[0036] ФИГ. 8C представляет собой график, показывающий результаты анализа с использованием малахитового зеленого для сравнения ингибирования ферментативной активности мембранного CD73 под действием антител APBA2-01 и APBA2-02 в MDA-MB-231 клетках, при этом стандартное отклонение указано планками погрешностей, а вертикальная ось показывает относительные световые единицы (RLU);

[0037] ФИГ. 8D представляет собой график, показывающий результаты анализа CellTiter-Glo® для сравнения ингибирования ферментативной активности мембранного CD73 под действием антител APBA2-01 и APBA2-02 в 4T1 клетках, при этом стандартное отклонение указано планками погрешностей, и вертикальная ось показывает RLU;

[0038] на ФИГ. 9 показаны результаты сканирующей микроскопии для подтверждения интернализации антител APBA2-01 и APBA2-02 в клетках с мембранным CD73, при этом CD73, соответствующий сигналу от

флуоресцеинизотиоцианата (FITC), экспрессировался так, как показано белым цветом и как отмечено масштабной линейкой;

[0039] ФИГ. 10А представляет собой график, показывающий результаты оценки противораковой эффективности антител APBA2-01 и APBA2-02 путем измерения средней массы легких в мышинной модели метастатического рака молочной железы, *: $P < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA));

[0040] ФИГ. 10В представляет собой график, показывающий результаты оценки противораковой эффективности антител APBA2-01 и APBA2-02 путем измерения числа метастазирующих колоний в легких в мышинной модели метастатического рака молочной железы, *: $P < 0,05$ (однофакторный ANOVA);

[0041] ФИГ. 11А представляет собой график, показывающий результаты оценки эффективности ингибирования опухолевого роста антителами APBA2-01 и APBA2-02 mIgG (мышинный IgG) путем измерения объема опухоли в мышинной модели рака молочной железы, *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ns (незначимые значения): $P > 0,05$ (двухфакторный ANOVA);

[0042] ФИГ. 11В представляет собой график, показывающий результаты оценки эффективности ингибирования опухолевого роста антителами APBA2-01 и APBA2-02 mIgG путем сравнения ингибирующей опухолевый рост активности среди образцов антител в мышинной модели рака молочной железы;

[0043] ФИГ. 11С представляет собой график, показывающий результаты оценки эффективности ингибирования опухолевого роста антителами APBA2-01 и APBA2-02 mIgG путем измерения массы тела в мышинной модели рака молочной железы, *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ns (незначимые значения): $P > 0,05$ (двухфакторный ANOVA);

[0044] ФИГ. 12А представляет собой график, показывающий результаты анализа с использованием малахитового зеленого для сравнения ингибирования ферментативной активности мембранного CD73 антителами к CD73 в MDA-MB-231 клетках;

[0045] ФИГ. 12В представляет собой график, показывающий результаты анализа CellTiter-Glo® для сравнения ингибирования ферментативной активности CD73 антителами к CD73 в MDA-MB-231 клетках;

[0046] ФИГ. 13А представляет собой график, показывающий способности антител Muxengo 3, 4, 6, 7 и 15 связываться с мембранным белком CD73 в 4Т1 клетках;
и

[0047] ФИГ. 13В представляет собой график, показывающий способности антител

Мухенго 3, 4, 6, 7 и 15 связываться с мембранным белком CD73 в 4T1.2 клетках.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0048] В данной заявке описаны моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с кластером дифференцировки 73 (CD73).

[0049] В данной заявке также описаны нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, векторы экспрессии, содержащие данные нуклеиновые кислоты, и клетки, трансформированные такими векторами экспрессии.

[0050] В данной заявке также описаны композиции для предупреждения или лечения рака, содержащие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты.

[0051] Дополнительные аспекты будут частично изложены в описании, которое следует ниже, и частично будут очевидны из описания или могут быть изучены при практическом применении представленных воплощений изобретения.

[0052] В данной заявке описаны моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10, 14 или 17, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, 5, 8, 11, 15 или 18, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12, 13, 16 или 19; и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 20, 23, 26 или 29, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 21, 24, 27 или 30, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 22, 25, 28 или 31.

[0053] В некоторых воплощениях моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут включать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 3; и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 20, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 21, и CDRL3, содержащий аминокислотную

[illegible]

последовательность с SEQ ID NO: 29, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 30, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 31.

[0054] В некоторых воплощениях антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37 или 38; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с SEQ ID NO: 39, 40, 41 или 42. В некоторых воплощениях антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37 или 38; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 39, 40, 41 или 42.

[0055] Также предложены моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 66, 69, 72, 75 или 78, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 67, 70, 73, 76 или 79, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 68, 71, 74, 77 или 80; и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 81, 84, 87, 90 или 93, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 82, 85, 88, 91 или 94, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 83, 86, 89, 90 или 95.

[0056] В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может включать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 66, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 67, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 68; и вариабельную

[illegible]

[0057] Кроме того, константная область тяжелой цепи и константная область

легкой цепи антитела может представлять собой константную область антитела IgG, IgM, IgE, IgA, IgD типа или их комбинацию. Константная область может происходить, например, из константной области антитела IgG1.

[0058] В некоторых воплощениях антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут демонстрировать межвидовую перекрестную реактивность у индивидов. Индивид или субъект может включать позвоночных и может включать млекопитающих, земноводных, пресмыкающихся, птиц и т.д., и эти виды могут включать, например, людей (*Homo sapiens*), обезьян, крыс, мышей и так далее. Например, антитело к CD73 может ингибировать переход CD73 в его активную структуру или ингибировать ферментативную активность CD73 путем конкурентного связывания с ингибитором, который связывается с CD73. Антитело к CD73 может проявлять эндоцитарную активность путем связывания с эпитопом, подобным эпитопу для положительного контрольного антитела MEDI-9447 или CPI-006. Таким образом, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут демонстрировать межвидовую перекрестную реактивность при специфическом связывании с CD73.

[0059] Используемый в данном описании термин «эпитоп» относится к белковой детерминанте, с которой данное антитело способно связываться специфически. Как правило, эпитопы состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, например, аминокислот или боковых цепей сахаров, и обычно имеют специфические характеристики трехмерной структуры, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем, что связывание с первым, а не со вторым, утрачивается в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может состоять из, например, смежных аминокислот полипептида (линейный или непрерывный эпитоп), или эпитоп может быть образован путем, например, объединения двух или более несмежных участков полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный, прерывистый или не непрерывный эпитоп). В некоторых воплощениях эпитоп, с которым связывается антитело, может быть определен, например, посредством спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), кристаллографических исследований с применением дифракции рентгеновских лучей, анализов ELISA, обмена водород/дейтерий в сочетании с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением), анализов сканирования олигопептидов на основе массива и/или картирование результатов мутагенеза (например, картирование

результатов сайт-направленного мутагенеза). В случае рентгеноструктурной кристаллографии кристаллизация может быть выполнена с использованием любого из известных в данной области техники методов (например, Giegé R *et al.*, (1994) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 50(Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) *Eur. J. Biochem.*, 189: 1-23; Chayen NE (1997) *Structure*, 5: 1269-1274; McPherson A (1976) *J. Biol. Chem.*, 251: 6300-6303). Кристаллы комплекса антитело:антиген могут быть изучены с использованием хорошо известных методов дифракции рентгеновских лучей, и могут быть уточнены с использованием компьютерного программного обеспечения, такого как X-PLOR (Йельский университет, 1992, распространяемого компанией Molecular Simulations, Inc.; см., например, *Meth. Enzymol.* (1985), тома 114 и 115, ред. Wyckoff HW и др.; U.S. 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 49 (Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) *Meth. Enzymol.*, 276A: 361-423, ред. Carter CW; Roversi P *et al.*, (2000) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 56 (Pt 10): 1316-1323). Исследования картирования результатов мутагенеза могут быть выполнены с использованием любого метода, известного специалисту в данной области техники. См., например, Champe M *et al.*, (1995) *J. Biol. Chem.*, 270: 1388-1394 и Cunningham BC & Wells JA (1989) *Science*, 244: 1081-1085 для описания методов мутагенеза, включая методы аланин-сканирующего мутагенеза. В некоторых воплощениях эпитоп для антитела определяют, используя исследования методом аланин-сканирующего мутагенеза.

[0060] Используемый в данном описании термин «антитело» относится к гликопротеину, который инактивирует такие антигены, как вирусы, бактерии и т.д., и индуцирует внеклеточную стимуляцию против микроорганизмов, вторгающихся в организм, и, в частности, он относится к иммуноглобулину. Антитела, описанные в данной заявке, могут включать моноклональные антитела, мультиспецифические антитела, человеческие антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), одноцепочечные антитела, Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, соединенные дисульфидными связями Fv (sdFv) и антиидиотипические (анти-идиотип.) антитела, эпитоп-связывающие фрагменты антител и так далее. В частности, антитело может представлять собой моноклональное антитело и полностью человеческое антитело или химерное антитело «человек-мышь». Моноклональное антитело относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, включенные в данную

популяцию, идентичны, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными и направлены против одного антигенного эпитопа. Настоящее изобретение касается антитела к CD73, и поэтому, если не указано иное, термин «антитело», использованный в данном описании без изменения, может относиться к моноклональному антителу к CD73, которое связывается с эпитопом в CD73. Антитело в интактной форме, специфически связывающееся с CD73, а также антигенсвязывающий фрагмент молекулы антитела включены в объем настоящего изобретения. Интактное антитело имеет структуру с двумя полноразмерными легкими цепями и двумя полноразмерными тяжелыми цепями, при этом каждая легкая цепь соединена с тяжелой цепью посредством дисульфидной связи. Константная область тяжелых цепей включает типы гамма (γ), мю (μ), альфа (α), дельта (δ) и эпсилон (ϵ), при этом тип далее подразделяют на подтипы: гамма1 (γ 1), гамма2 (γ 2), гамма3 (γ 3), гамма4 (γ 4), альфа1 (α 1) и альфа2 (α 2). Константная область легких цепей включает типы каппа (κ) и лямбда (λ).

[0061] Термин «аффинность связывания» обычно относится к общей силе всех нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное и как использовано в данном описании, «аффинность связывания» относится к собственной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами связывающейся пары (например, между антителом и антигеном). Обычно аффинность молекулы X в отношении ее партнера Y может быть представлена константой диссоциации (K_D). Аффинность можно измерить и/или выразить рядом способов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, определение равновесной константы диссоциации (K_D) и равновесной константы ассоциации (K_A). K_D рассчитывают из отношения k_{off}/k_{on} , тогда как K_A рассчитывают из отношения k_{on}/k_{off} . k_{on} относится к константе скорости ассоциации, например, антитела с антигеном, а k_{off} относится к константе скорости диссоциации, например, антитела с антигеном. Значения k_{on} и k_{off} могут быть определены методами, известными специалисту средней квалификации в данной области техники, такими как BIAcore® или KinExA (анализ кинетического исключения).

[0062] Используемые в данном описании термины «иммуноспецифически связывается», «иммуноспецифически распознает», «специфически связывается» и

«специфически распознает» являются аналогичными терминами в контексте антител и относятся к молекулам, которые связываются с антигеном (например, эпитопом, иммунным комплексом или партнером по связыванию антигенсвязывающего сайта), как такое связывание понимается специалистом в данной области техники. Например, молекула, которая специфически связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами, обычно с более низкой аффинностью, как определено, например, посредством иммуноанализов, анализов BIAcore®, анализов с применением устройств KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID) или других анализов, известных в данной области. В некоторых воплощениях молекулы, которые иммуноспецифично связываются с антигеном, связываются с этим антигеном с K_A , которая превышает значение K_A , когда молекулы связываются с другим антигеном, по меньшей мере в 2, 2,5, 3, 4 или более раз в логарифмическом исчислении.

[0063] В других воплощениях молекулы, которые иммуноспецифично связываются с антигеном, не вступают в перекрестную реакцию с другими белками в аналогичных условиях связывания. В некоторых воплощениях молекулы, которые иммуноспецифично связываются с антигеном, не вступают в перекрестную реакцию с другими белками. В некоторых воплощениях данного изобретения предложены моноклональные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с указанным антигеном, таким как CD73, с более высокой аффинностью, чем с другим неродственным антигеном. В некоторых воплощениях данного изобретения предложены моноклональные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с указанным антигеном, таким как CD73, с аффинностью, превышающей на 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более аффинность в случае с другим неродственным антигеном, что определено по результатам измерений с использованием, например, радиоиммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса или анализа кинетического исключения. В некоторых воплощениях степень связывания моноклональных антител и их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данной заявке, с неродственным белком составляет меньше 10%, 15% или 20% от связывания антитела с указанным антигеном, что определено по результатам измерений с использованием, например, радиоиммуноанализа.

[0064] В некоторых воплощениях данного изобретения предложены моноклональные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются

с человеческим CD73 с более высокой аффинностью, чем с антигеном других видов. В некоторых воплощениях данного изобретения предложены моноклональные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с человеческим CD73 с аффинностью, превышающей на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% или более аффинность в случае с другими видами, что определено по результатам измерений с использованием, например, радиоиммуноанализа, поверхностного плазмонного резонанса или анализа кинетического исключения.

[0065] В некоторых воплощениях антитело имеет форму Fv (например, scFv) или форму интактного антитела (IgG). Помимо этого, константная область тяжелых цепей может быть выбрана из изотипов, включающих типы гамма (γ), мю (μ), альфа (α), дельта (δ) и эпсилон (ϵ). Например, константная область бывает подтипов гамма1 (IgG1), гамма3 (IgG3) или гамма 4 (IgG4). Константная область легких цепей может быть каппа- или лямбда-типа.

[0066] Использованный в данном описании термин «тяжелая цепь (HC или CH)» относится к полноразмерной тяжелой цепи, включающей домен переменной области тяжелой цепи, VH, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую последовательность переменной области (VR), достаточную для придания специфичности антигену, и три домена константной области, CH1, CH2 и CH3, и относится к ее фрагменту. Помимо этого, термин «легкая цепь (LC или CL)» относится к полноразмерной легкой цепи, включающей домен переменной области легкой цепи, VL, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую последовательность переменной области, достаточную для придания специфичности антигену, и домен константной области CL, и относится к ее фрагменту.

[0067] «Гуманизированные» формы не принадлежащих человеку (например, мышиных) антител представляют собой химерные антитела, которые включают минимальную последовательность, происходящую из не принадлежащего человеку иммуноглобулина. По большей части гуманизированными антителами являются иммуноглобулины человека (реципиентные антитела), в которых остатки гипервариабельных участков реципиента заменены на остатки гипервариабельных участков иммуноглобулина из не относящегося к человеку вида (донорного антитела), такого как мышь, крыса, кролик или не являющийся человеком примат, обладающие желаемой специфичностью, аффинностью и функциональной активностью.

[0068] «Человеческое антитело» представляет собой молекулу, происходящую из

иммуноглобулина человека, и это означает, что все аминокислотные последовательности, составляющие антитело, включая определяющий комплементарность участок и структурную область, происходят из иммуноглобулина человека. В некоторых воплощениях настоящее изобретение относится к полностью человеческому антителу, способному минимизировать непреднамеренные иммунные ответы.

[0069] Термин «химерное антитело» включает «химерное» антитело (иммуноглобулин), а также фрагмент такого антитела, проявляющий желаемую биологическую активность, в котором тяжелая цепь и/или легкая цепь частично идентичны или гомологичны соответствующей последовательности в антителе, происходящем из конкретного вида или принадлежащем к конкретному классу либо подклассу антител, в то время как остальная(ые) цепь(и) идентична(ы) или гомологична(ы) соответствующим последовательностям в антителе, происходящем из другого вида или принадлежащем к другому классу либо подклассу антител.

[0070] Термин «вариабельная область антитела» относится к областям легкой и тяжелой цепей в молекуле антитела, включающим аминокислотные последовательности определяющего комплементарность участка (CDR, CDRH или CDRL, т.е. CDRH1, CDRH2 и CDRH3) и каркасной области (FR). VH относится к вариабельной области тяжелой цепи. VL относится к вариабельной области легкой цепи.

[0071] «Определяющий комплементарность участок» (CDR, CDRH или CDRL, т.е. CDRL1, CDRL2 и CDRL3) относится к аминокислотному остатку вариабельной области антитела, который необходим для связывания с антигеном. Каждая вариабельная область обычно имеет три CDR участка, определяемых как CDR1, CDR2 и CDR3.

[0072] Использованный в данном описании термин «каркасная область» (FR) относится к остатку вариабельной области, отличному от остатка CDR. Каждая вариабельная область обычно имеет четыре FR, идентифицированные как FR1, FR2, FR3 и FR4.

[0073] Использованный в данном описании термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к фрагменту антитела, обладающему способностью связываться с антигеном, включая Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv и так далее. Фрагмент «Fv» представляет собой фрагмент антитела, включающий сайт распознавания и связывания полноразмерного антитела. Эта область состоит из димера, в котором одна вариабельная

область тяжелой цепи и одна переменная область легкой цепи прочно соединены ковалентной связью, например, scFv. Фрагмент «Fab» включает переменную и константную области легкой цепи и переменную и первую константную области тяжелой цепи (CH1). Фрагмент F(ab')₂ антитела обычно включает пару Fab-фрагментов, которые ковалентно связаны вблизи своих карбоксильных концов «шарнирным» остатком цистеина между ними. Фрагмент антитела «одноцепочечный Fv» или «scFv» включает домены VH и VL антитела, причем эти домены присутствуют в единой полипептидной цепи. Кроме того, полипептид Fv включает полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет scFv образовывать желаемую структуру для связывания с антигеном.

[0074] Fv представляет собой минимальный сегмент антитела, имеющий только переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, и метод получения Fv фрагмента с использованием рекомбинантной ДНК описан в WO88/10649, WO88/106630, WO88/07085, WO88/07086 и WO88/09344. Переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи в двухцепочечном Fv соединены нековалентной связью, а в одноцепочечном Fv (scFv) переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи обычно соединены ковалентной связью через пептидный линкер или соединены непосредственно с С-концом, образуя тем самым структуру, такую как димер, подобный двухцепочечному Fv. Такой фрагмент антитела может быть получен с использованием гидролазы белков (например, Fab может быть получен путем расщепления целого антитела папаином, F(ab')₂ фрагмент может быть получен путем расщепления антитела пепсином), и фрагмент антитела также может быть получен посредством применения метода генетической рекомбинации.

[0075] Использованный в данном описании термин «фаговый дисплей» относится к методу, который отображает слитый белок путем слияния мутантного полипептида и по меньшей мере части оболочечного белка на поверхности фага, например, на частице нитчатого фага. Фаговый дисплей полезен для целенаправленной работы с большой библиотекой рандомизированных вариантов белков с целью быстрой и эффективной классификации последовательностей, которые связываются с антигенами-мишенями с высокой аффинностью. Проявление библиотек пептидов и белков на фаге было использовано для скрининга миллионов полипептидов с целью идентификации полипептидов со специфическими связывающими свойствами.

[0076] Применение метода фагового дисплея обеспечило мощный инструмент для

создания и скрининга новых белков, которые связываются со специфическими лигандами (например, антигенами). Применяя метод фагового дисплея, можно создать большую библиотеку вариантов белков и можно быстро классифицировать последовательности, связывающиеся с антигенами-мишенями с высокой аффинностью. Нуклеиновую кислоту, кодирующую мутантный полипептид, объединяют путем слияния с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок вирусной оболочки, например, белок гена III или белок гена VIII. Была разработана система фагового дисплея для одновалентной модели, согласно которой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок или полипептид, объединена путем слияния с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей часть белка гена III. В системе фагового дисплея для одновалентной модели продукт слияния генов экспрессируется на низком уровне, и также экспрессируется белок III гена дикого типа, тем самым поддерживая инфекционность частиц.

[0077] Демонстрация экспрессии пептидов на поверхности нитчатого фага и экспрессии функциональных фрагментов антител в периферической зоне цитоплазмы *E. coli* важна при разработке библиотек фагового дисплея для антител. Библиотеки антител или антигенсвязывающих полипептидов были получены несколькими способами, например, посредством изменения одного гена в результате вставки случайной последовательности ДНК или посредством клонирования родственной генетической линии. Библиотека может быть подвергнута скринингу на предмет экспрессии антител или антигенсвязывающих белков с желаемыми характеристиками.

[0078] Метод фагового дисплея имеет некоторые преимущества по сравнению с обычными методами получения антител с желаемыми характеристиками с использованием гибридом и рекомбинантной ДНК. Этот метод позволяет создавать большую библиотеку антител, содержащую различные последовательности, за короткое время без использования животных. Подготовка к получению гибридом или гуманизированных антител может занять несколько месяцев. Кроме того, с использованием библиотеки фаговых антител можно получать антитела к антигенам, которые токсичны или обладают низкой антигенностью, поскольку никакого иммунного ответа не требуется. Библиотека фаговых антител также может быть использована для создания и идентификации новых терапевтических антител.

[0079] Можно использовать технологию, согласно которой человеческие антитела создаются из последовательностей зародышевой линии человека или

репертуаров Ig первичных В-клеток, иммунизированных или неиммунизированных с использованием библиотеки фагового дисплея. Для получения первичных или неиммунных библиотек антигенсвязывающих фрагментов могут быть использованы различные лимфоидные ткани.

[0080] Методы идентификации и выделения высокоаффинных антител из библиотеки фагового дисплея важны для выделения новых терапевтических антител. Выделение высокоаффинных антител из библиотеки может зависеть от размера библиотеки, эффективности продуцирования в бактериальных клетках и разнообразия библиотеки. Размер библиотеки уменьшается в результате неэффективного продуцирования вследствие неправильного сворачивания антитела или антигенсвязывающего белка и присутствия стоп-кодона. Экспрессия в бактериальных клетках может быть подавлена, когда антитело или антигенсвязывающий домен свернут недолжным образом. Экспрессия может быть улучшена посредством чередования мутаций остатков на поверхности области контакта вариабельной/константной областей или выбранных остатков CDR. Последовательность каркасной области является одним из элементов, обеспечивающих соответствующее сворачивание, когда фаговые библиотеки антител создаются в бактериальных клетках.

[0081] Важно, чтобы различные библиотеки антител или антигенсвязывающих белков создавались при условии выделения высокоаффинных антител. Обнаружено, что в связывании с антигеном часто принимает участие участок CDR3. Участок CDR3 в тяжелой цепи значительно варьирует с точки зрения размера, последовательности и структурной стерической конформации, в результате чего при использовании участка CDR3 могут быть получены различные библиотеки.

[0082] Кроме того, разнообразия можно достичь путем рандомизации участков CDR вариабельных областей тяжелых и легких цепей с использованием всех 20 аминокислот в каждом положении. Использование всех 20 аминокислот приводит к увеличению вариабельности последовательностей вариантов антител и увеличению вероятности идентификации новых антител.

[0083] Антитело или фрагмент антитела по настоящему изобретению могут включать, в рамках специфического распознавания CD73, последовательность антитела к CD73, описанного в данной заявке, а также его биологических эквивалентов. Например, аминокислотная последовательность антитела может быть дополнительно модифицирована с целью дальнейшего улучшения аффинности связывания и/или других

биологических свойств антитела. Такие модификации включают, например, делецию, вставку и/или замену остатков в аминокислотной последовательности антитела. Такие изменения аминокислот осуществляются на основе относительного сходства заместителей боковых цепей аминокислот, например, гидрофобности, гидрофильности, заряда, размера и так далее. В результате анализа размера, формы и типа заместителей боковых цепей аминокислот выявлено, что каждый из остатков аргинина, лизина и гистидина является положительно заряженным; остатки аланина, глицина и серина имеют сопоставимые размеры; а остатки фенилаланина, триптофана и тирозина имеют схожую форму. Таким образом, на основании этих соображений установлено, что аргинин, лизин и гистидин; аланин, глицин и серин; и фенилаланин, триптофан и тирозин, соответственно, являются биологически функциональными эквивалентами.

[0084] При введении мутаций можно учитывать индекс гидропатии аминокислот. Каждой аминокислоте присвоен некоторый гидрофобный индекс в соответствии с ее гидрофобностью и зарядом: изолейцину (+4,5); валину (+4,2); лейцину (+3,8); фенилаланину (+2,8); цистеину/цистеину (+2,5); метионину (+1,9); аланину (+1,8); глицину (-0,4); треонину (-0,7); серину (-0,8); триптофану (-0,9); тирозину (-1,3); пролину (-1,6); гистидину (-3,2); глутаминовой кислоте (-3,5); глутамину (-3,5); аспарагиновой кислоте (-3,5); аспарагину (-3,5); лизину (-3,9); и аргинину (-4,5). Гидрофобный индекс аминокислот очень важен для предсказания основанной на взаимодействии биологической функции белков. Хорошо известно, что при замене на аминокислоту, имеющую аналогичный гидрофобный индекс, могут сохраняться аналогичные биологические активности. Когда мутация вводится с учетом гидрофобного индекса, то замена производится на аминокислоты, имеющие разницу в гидрофобных индексах, в частности, в пределах ± 2 , более конкретно в пределах ± 1 , в еще более конкретном случае в пределах $\pm 0,5$.

[0085] Вместе с тем, также хорошо известно, что замена на аминокислоты со сходными значениями гидрофильности приводит к получению белков с эквивалентной биологической активностью. Как описано в патенте США № 4554101, каждому аминокислотному остатку присвоены следующие значения гидрофильности: аргинину (+3,0); лизину (+3,0); аспарагиновой кислоте (+3,0 $\pm$ 1); глутаминовой кислоте (+3,0 $\pm$ 1); серину (+0,3); аспарагину (+0,2); глутамину (+0,2); глицину (0); треонину (-0,4); пролину (-0,5 $\pm$ 1); аланину (-0,5); гистидину (-0,5); цистеину (-1,0); метионину (-1,3); валину (-1,5); лейцину (-1,8); изолейцину (-1,8); тирозину (-2,3); фенилаланину (-2,5); и триптофану (-

3,4). Аминокислотная замена в белках, при которой не происходит полного изменения активности молекулы, известна в данной области техники (H. Neurath, R.L. Hill, *Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Данная замена чаще всего относится к таким заменам аминокислотных остатков, как например, Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu и Asp/Gly.

[0086] В некоторых воплощениях положение одного или более чем одного из CDR вдоль VH (например, CDR1, CDR2 или CDR3) и/или VL (например, CDR1, CDR2 или CDR3) области антитела, описанного в данной заявке, может варьировать в одной, двух, трех, четырех, пяти или шести положениях аминокислот при условии, что иммуноспецифическое связывание с антигеном сохраняется (например, по существу сохраняется, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%). Например, положение, определяющее CDR антитела, описанного в данной заявке, может варьироваться путем сдвига N-концевой и/или С-концевой границы CDR на одну, две, три, четыре, пять или шесть аминокислот относительно положения CDR моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данной заявке, при условии, что иммуноспецифическое связывание с антигенам(ами) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%). В других воплощениях длина одного или более чем одного CDR вдоль VH (например, CDR1, CDR2 или CDR3) и/или VL (например, CDR1, CDR2 или CDR3) области антитела, описанного в данной заявке, может варьировать (например, быть короче или длиннее) на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот, при условии, что иммуноспецифическое связывание с антигеном(ами) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%).

[0087] В некоторых воплощениях CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и/или CDRH3, описанные в данной заявке, могут быть на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот короче, чем один или более чем одним из CDR, описанных в данной заявке, при условии, что иммуноспецифическое связывание с антигеном(ами) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей

мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%). В других воплощениях CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и/или CDRH3, описанные в данной заявке, могут быть на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот длиннее, чем один или более чем одним из CDR, описанных в данной заявке, при условии, что иммуноспецифическое связывание с антигеном(ами) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%). В других воплощениях амино-конец CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и/или CDRH3, описанных в данной заявке, может быть удлинен на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одним или более чем одним из CDR, описанных в данной заявке, при условии, что иммуноспецифическое связывание с антигеном(ами) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%). В других воплощениях карбокси-конец CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и/или CDRH3, описанных в данной заявке, может быть удлинен на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одним или более чем одним из CDR, описанных в данной заявке, при условии, что иммуноспецифическое связывание с антигеном(ами) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%). В других воплощениях амино-конец CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и/или CDRH3, описанных в данной заявке, может быть укорочен на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одним или более чем одним из CDR, описанных в данной заявке, при условии, что иммуноспецифическое связывание с антигеном(ами) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%). В других воплощениях карбокси-конец CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и/или CDRH3, описанных в данной заявке, может быть укорочен на одну, две, три, четыре, пять или более аминокислот по сравнению с одним или более чем одним из CDR, описанных в данной заявке, при условии, что иммуноспецифическое связывание с антигеном(ами) сохраняется (например, по существу сохраняется, например, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по

меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%). Для подтверждения того, сохраняется ли иммуноспецифическое связывание с антигеном(ами), можно использовать любой метод, известный в данной области техники, например, анализы связывания и условия, описанные в приведенном в данной заявке разделе «Примеры».

[0088] Определение процента идентичности между двумя последовательностями (например, аминокислотными последовательностями или нуклеиновокислотными последовательностями) также можно выполнять, используя математический алгоритм. Конкретным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм из работы Karlin S and Altschul SF (1990) PNAS, 87: 2264-2268, модифицированный как в работе Karlin S and Altschul SF (1993) PNAS, 90: 5873-5877. Такой алгоритм введен в программы NBLAST и XBLAST из работы Altschul SF *et al.*, (1990) J. Mol. Biol., 215: 403. Поиски нуклеотидов с использованием средства поиска основного локального выравнивания (BLAST) могут быть выполнены с параметрами программы поиска нуклеотидов NBLAST (BLAST для нуклеотидов), установленными, например, для шкалы оценки = 100, длины слова = 12, с получением нуклеотидных последовательностей, гомологичных последовательностям молекул нуклеиновых кислот, описанных в данной заявке. Поиски белков с использованием BLAST могут быть выполнены с параметрами программы XBLAST (BLAST для белков), установленными, например, для шкалы оценки = 50, длины слова = 3, с получением аминокислотных последовательностей, гомологичных последовательности молекулы белка, описанной в данной заявке. Чтобы получить выравнивания с разрывами, с целью сравнения можно использовать Gapped BLAST, как описано в работе Altschul SF *et al.*, (1997) Nuc. Acids Res., 25: 3389-3402. Альтернативно, для выполнения итерационного поиска можно использовать алгоритм (PSI BLAST), с помощью которого обнаруживают отдаленные «родственники» между молекулами (там же). В случае применения программ BLAST, Gapped BLAST и PSI BLAST можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) (см. например, Национальный центр биотехнологической информации (NCBI) во всемирной сети, ncbi.nlm.nih.gov). Другим конкретным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм из работы Myers and Miller, 1988, CABIOS, 4: 11-17. Такой алгоритм введен в программу ALIGN (в версии 2.0), которая

представляет собой часть пакета программ GCG по выравниванию последовательностей. В случае применения программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей можно использовать таблицу весов замен остатков PAM120, штраф за длину разрыва 12 и штраф за разрыв 4.

[0089] Процент идентичности между двумя последовательностями можно определить, используя методы, аналогичные описанным выше, с разрывами или без них. При расчете процента идентичности обычно подсчитывают только точные совпадения.

[0090] Согласно другим аспектам предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, векторы экспрессии, содержащие данные нуклеиновые кислоты, и клетки, трансформированные такими векторами экспрессии.

[0091] Согласно данному изобретению предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с SEQ ID NO: 32, 33, 344, 35, 36, 37 или 38, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с SEQ ID NO: 39, 40, 41 или 42. Также согласно данному изобретению предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 32, 33, 344, 35, 36, 37 или 38, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 39, 40, 41 или 42.

[0092] В некоторых воплощениях предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 32, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 39, или нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 33, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 40. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 32, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 43, а нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область легкой цепи с SEQ ID NO:

39, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 44. В некоторых воплощениях предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 32 или SEQ ID NO: 33, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 40. Кроме того, нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 33, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 45, а нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 40, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 46.

[0093] Кроме того, предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с SEQ ID NO: 96, 98, 100, 102 или 104, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с SEQ ID NO: 97, 99, 101, 103 или 105. Кроме того, предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 96, 98, 100, 102 или 104, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 97, 99, 101, 103 или 105.

[0094] В некоторых воплощениях предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 96, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 97, нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 98, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 99, нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 100, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 101, нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 102, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 103, или нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 104, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область

область легкой цепи с SEQ ID NO: 105. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 96, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 106, а нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 97, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 107. Нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 98, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 108, а нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 99, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 109. Нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 100, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 110, а нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 101, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 111. Нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 102, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 112, а нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 103, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 113. Нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 104, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 114, а нуклеиновая кислота, кодирующая переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 105, может быть представлена последовательностью с SEQ ID NO: 115.

[0095] Кроме того, предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область тяжелой цепи, содержащие нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с SEQ ID NO: 106, 108, 110, 112 или 114, и нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи, содержащие нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с SEQ ID NO: 107, 109, 111, 113 или 115.

[0096] Моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены рекомбинантным методом посредством выделения нуклеиновой

кислоты, кодирующей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению. Нуклеиновую кислоту выделяют и встраивают в способный к репликации вектор для последующего клонирования (амплификации ДНК) или последующей экспрессии. В некоторых воплощениях одна или несколько нуклеиновых кислот, описанных в данной заявке, могут быть встроены в один вектор, или каждая из нуклеиновых кислот, описанных в данной заявке, могут быть встроены в отдельные векторы. Исходя из этого, согласно другим аспектам, настоящее изобретение относится к векторам, содержащим нуклеиновые кислоты, описанные в данной заявке.

[0097] Используемый в данном описании термин «нуклеиновая кислота» охватывает и молекулы ДНК (геномная ДНК (гДНК) и комплементарная ДНК (кДНК)), и молекулы РНК, а нуклеотид, который является основной составной единицей нуклеиновой кислоты, включает нуклеотиды природного происхождения, а также аналоги, в которых группировки сахара или основания модифицированы. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие вариабельные области тяжелой и легкой цепей по настоящему изобретению, могут быть модифицированы. Такая модификация включает добавление, делецию или неконсервативную либо консервативную замену нуклеотидов.

[0098] ДНК, кодирующую антитело, можно легко отделить или синтезировать, используя общепринятые методики (например, используя олигонуклеотидный зонд, способный специфически связываться с ДНК, кодирующей тяжелую и легкую цепи антитела). Доступен широкий круг векторов. Как правило, компоненты вектора включают, но не ограничиваются этим, один или более чем один из следующих компонентов: сигнальные последовательности, ориджины репликации, один или более маркерных генов, энхансерные элементы, промоторы и последовательности терминации транскрипции.

[0099] Используемый в данном описании термин «вектор» относится к средству для экспрессии целевых генов в клетках хозяина и включает плазмидные векторы; космидные векторы; вирусные векторы, такие как бактериофаговые векторы, аденовирусные векторы, ретровирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса и так далее. Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело в векторе, функционально связаны с промотором.

[0100] Термин «функционально связанный» означает функциональную связь между нуклеотидной последовательностью, регулирующей экспрессию (например,

промотором, сигнальной последовательностью или набором сайтов связывания регулятора транскрипции), и другой нуклеотидной последовательностью, и представляет собой регулирование посредством транскрипции и/или трансляции этой нуклеотидной последовательности.

[0101] Когда в качестве хозяина используют прокариотическую клетку, то как правило вектор включает сильный промотор, способствующий проведению транскрипции (например, *tac* промотор, *lac* промотор, *lacUV5* промотор, *lpp* промотор, *pLλ* промотор, *pRλ* промотор, *gac5* промотор, *amp* промотор, *gcsA* промотор, *SP6* промотор, *trp* промотор, *T7* промотор и т.д.), сайт связывания рибосомы для инициации трансляции и последовательность терминации транскрипции/трансляции. Помимо этого, например, когда в качестве хозяина используют эукариотическую клетку, то вектор включает промотор (например, промотор для металлотионеина, промотор гена β-актина, промотор для гемоглобина человека и промотор для креатина из мышц человека), происходящий из генома клеток млекопитающих, или промотор, происходящий из вируса животных (например, поздний промотор аденовируса, промотор вируса осповакцины 7.5K, промотор на основе обезьяньего вируса 40 (SV40), промотор цитомегаловируса (CMV), тимидинкиназный (tk) промотор вируса простого герпеса (HSV), промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промотор длинного концевой повтора (LTR) вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), промотор вируса Молони, промотор вируса Эпштейна-Барр (EBV) и промотор вируса саркомы Рауса (RSV)), и обычно имеет последовательность полиаденилирования в качестве последовательности терминации транскрипции. Возможно, что вектор может быть объединен путем слияния с другой последовательностью, чтобы облегчить очистку экспрессируемого с помощью него антитела. Последовательность, с которой будет осуществлено слияние, включает, например, глутатион-S-трансферазу (Pharmacia, USA), мальтоза-связывающий белок (NEB, USA), FLAG (IBI, USA), 6xHis (гексагистидин; Qiagen, USA) и так далее. Вектор включает гены резистентности к антибиотикам, обычно используемые в данной области техники в качестве селективируемых маркеров, и их примеры включают гены, обуславливающие резистентность к ампициллину, гентамицину, карбенициллину, хлорамфениколу, стрептомицину, канамицину, генетицину, неомицину и тетрациклину.

[0102] Согласно следующим аспектам настоящего изобретения предложены клетки, трансформированные вышеупомянутым вектором. Клетками, использованными

для получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данной заявке, могут быть клетки прокариот, дрожжей или высших эукариот, но ими не ограничиваются. Можно использовать прокариотические клетки хозяина, такие как *Escherichia coli*, рода *Bacillus*, такие как *Bacillus subtilis* и *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* (например, *Pseudomonas putida*), *Proteus mirabilis* и *Staphylococcus* (например, *Staphylococcus carnosus*). Однако, самый большой интерес представляют клетки животных, и примеры полезных линий клеток хозяина включают фибробласты африканской зеленой мартышки (COS-7), клетки почки новорожденного сирийского хомячка (BHK), клетки яичников китайского хомячка (CHO), CHO, субклон K1 (CHOK1), DXB-11, DG-44, CHO-DHFR, CV1, COS-7, клетки почки эмбриона человека, линия 293 (HEK293), BHK, TM4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PER.C6, SP2/0, NS-0, U2OS или HT1080, но ими не ограничиваются.

[0103] Согласно настоящему изобретению также предложены способы получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, включающие (а) культивирование клеток, содержащих векторы экспрессии; и (б) сбор антител или их антигенсвязывающих фрагментов из культивируемых клеток. Клетки можно культивировать в различных средах. В качестве культуральной среды можно использовать любую имеющуюся в продаже среду, без ограничения. Все другие необходимые добавки, хорошо известные специалистам в данной области техники, могут быть включены в соответствующих концентрациях. Условия культивирования, например, температура и pH, уже используемые для клеток хозяина, отобранных для проведения экспрессии, будут очевидны специалистам в данной области техники. Отбор антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может быть осуществлен, например, путем центрифугирования или ультрафильтрации с удалением примесей и путем очистки полученного продукта с использованием, например, аффинной хроматографии. Можно использовать и другие дополнительные методы очистки, например, анионо- или катионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию и хроматографию на гидроксипатите.

[0104] Согласно следующим другим аспектам предложены композиции для предупреждения, улучшения или лечения рака, при этом данные композиции содержат антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Такие композиции могут представлять собой фармацевтические композиции или функциональные продукты

питания оздоровительного действия. В некоторых воплощениях композиции могут дополнительно включать блокирующий агент иммунных контрольных точек или химиотерапевтический агент. Блокирующий агент иммунных контрольных точек может представлять собой, например, антитело к CTLA-4, антитело к PD-1, антитело к лиганду PD-1 (PD-L1) и т.д., а химиотерапевтический агент может представлять собой, например, химиотерапевтические лекарственные средства, ингибиторы тирозинкиназ и так далее. В некоторых воплощениях композицию можно вводить в комбинации с радиотерапевтическим агентом. Композиция по одному из аспектов может иметь повышенную противораковую активность в различных раковых опухолях, экспрессирующих CD73, и поэтому может быть использована в качестве терапевтического агента для лечения раковых заболеваний.

[0105] Например, композиция может представлять собой фармацевтическую композицию для предупреждения или лечения раковых заболеваний, при этом данная композиция содержит (а) фармацевтически эффективное количество антитела к CD73 или его антигенсвязывающего фрагмента; и (б) фармацевтически приемлемый носитель. Кроме того, настоящее изобретение относится к способу предупреждения или лечения раковых заболеваний у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту эффективного количества антитела к CD73 или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению.

[0106] Моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данной заявке, используются в данных композициях в качестве активных ингредиентов, и поэтому их общие описания будут опущены.

[0107] Как продемонстрировано в приведенных далее типичных воплощениях, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связываются с CD73 с высокой аффинностью, подавляя миграцию CD73-сверхэкспрессирующих раковых клеток, и поэтому их можно использовать для предупреждения или лечения раковых заболеваний. «Предупреждение» означает любое действие, которое ингибирует или задерживает развитие рака путем введения композиции. «Лечение» означает подавление развития рака, облегчение ракового заболевания или устранение рака.

[0108] Термин «CD73-сверхэкспрессирующий рак» относится к раку, имеющему CD73 на поверхности раковых клеток на значительно более высоком уровне по сравнению с нераковыми клетками в ткани того же типа. См., например, Hay, C.M. et al.,

OncoImmunol., 5:e1208875, 10 pages (2016) и Gao, Z-W. et al., BioMed. Res. Intl., 2014:460654, 9 pages (2014). Рак, в отношении которого применяют данную композицию, представляет собой CD73-сверхэкспрессирующий рак, например, рак молочной железы, рак толстой кишки, глиобластома, опухоль спинного мозга, рак головы и шеи, рак легкого, тимому, рак пищевода, рак печени, рак поджелудочной железы, рак желчевыводящих путей, рак почки, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак яичка, эмбрионально-клеточную опухоль, рак яичника, рак шейки матки, рак эндометрия, лимфому, острый лейкоз, хронический лейкоз, множественную миелому, саркому, злокачественную меланому, рак кожи и так далее. В некоторых воплощениях рак представляет собой рак молочной железы, трижды негативный рак молочной железы (TNBC), рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак яичника, рак желудочно-кишечного тракта, рак мочевого пузыря, лейкоз, рак предстательной железы, злокачественную меланому, рак пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, рак легкого или рак почки.

[0109] Согласно следующим аспектам предложены композиции для подавления метастазирования или инвазии раковых клеток, при этом такая композиция содержит антитело к CD73 или его антигенсвязывающий фрагмент. Кроме того, согласно настоящему изобретению предложен способ подавления метастазирования или инвазии раковых клеток у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту моноклонального антитела к CD73 или его антигенсвязывающего фрагмента.

[0110] В композиции по настоящему изобретению могут быть включены фармацевтически приемлемые носители, такие как, но не ограничиваясь этим, лактоза, декстроза, сахароза, сорбит, маннит, крахмал, гуммиарабик, фосфат кальция, альгинат, желатин, силикат кальция, микрокристаллическая целлюлоза, поливинилпирролидон, вода, сироп, метилцеллюлоза, метилгидроксibenзоат, пропил-гидроксibenзоат, тальк, стеарат магния, минеральное масло и т.д., но ими не ограничиваются. Помимо указанных компонентов композиции по настоящему изобретению могут дополнительно включать смазывающее вещество, увлажняющий агент, подсластитель, ароматизатор, эмульгирующий агент, суспендирующий агент, консервант и так далее.

[0111] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить перорально или парентерально. Парентеральное введение может быть осуществлено путем внутривенной инъекции, подкожной инъекции, внутримышечной инъекции, внутрибрюшинной инъекции, введения в эндотелий, местного введения,

интраназального введения, внутрилегочного введения, ректального введения и так далее. В некоторых воплощениях композиции можно вводить в форме внутривенной инъекции. Поскольку при пероральном введении белок или пептид подвергается расщеплению, то в случае композиции для перорального введения она должна быть приготовлена таким образом, чтобы активный лекарственный агент имел покрытие или был защищен от разложения в желудке. Кроме того, фармацевтические композиции можно вводить, используя любое устройство, которое может переносить активные вещества в целевые клетки.

[0112] Соответствующая дозировка композиций по настоящему изобретению может варьировать в зависимости от таких факторов, как способ приготовления композиций, способ введения, возраст, масса тела, пол, патологическое состояние, режим питания пациента, время введения, путь введения, скорость экскреции и аллергическая реакция. Таким образом, врач обычной квалификации может запросто определить и прописать дозировку, которая будет эффективна для желаемого лечения или предупреждения. Например, суточная дозировка фармацевтической композиции по настоящему изобретению может составлять диапазоны от 0,0001 мг/кг до 100 мг/кг, от 0,001 мг/кг до 50 мг/кг, от 0,01 мг/кг до 25 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг, от 1 мг/кг до 5 мг/кг массы тела субъекта или любые находящиеся внутри указанных диапазоны. Используемый в данном описании термин «фармацевтически эффективное количество» относится к количеству, достаточному для предотвращения или лечения рака.

[0113] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть приготовлены с использованием фармацевтически приемлемого носителя и/или эксципиента в соответствии со способом, который может быть легко осуществлен специалистом средней квалификации в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение, с получением в результате стандартной лекарственной формы или с заключением в многодозовый контейнер. При этом композиции могут быть в форме растворов, суспензий или эмульсий в масле или водных средах либо в форме экстрактов, зерен, суппозиториев, порошков, гранул, таблеток или капсул и помимо этого могут включать диспергирующие или стабилизирующие агенты.

[0114] Композиции по настоящему изобретению можно вводить в виде отдельного терапевтического агента или в комбинации с другим терапевтическим агентом и можно вводить последовательно или одновременно с существующим

терапевтическим агентом.

[0115] В случае функционального продукта питания оздоровительного действия по настоящему изобретению, предназначенного для предупреждения или улучшения состояния при раке, когда антитело или его антигенсвязывающий фрагмент используются в качестве добавки к функциональному продукту питания оздоровительного действия, он может быть добавлен как таковой или вместе с другими продуктами питания или пищевыми добавками и может быть соответствующим образом использован согласно общепринятому способу. Смешиваемое количество активных ингредиентов может быть соответствующим образом определено согласно целям применения, таким как предупреждение, поддержание общего состояния здоровья или лечение.

[0116] Препараты на основе функционального продукта питания оздоровительного действия могут включать зерна, гранулы, пилюли, таблетки, капсулы, а также любые обычные продукты питания или напитки.

[0117] Тип продукта питания особо не ограничивается, и примеры продуктов питания, к которым может быть добавлено указанное выше вещество, могут включать мясо, колбасные изделия, хлеб, шоколад, конфеты, закуски, кондитерские изделия, пиццу, рамен, другие виды лапши, жевательную резинку, молочные продукты, в том числе мороженое, различные супы, напитки, чай, питье, алкогольные напитки и витаминные комплексы и могут включать все продукты питания в обычном понимании.

[0118] В общем случае, при приготовлении продуктов питания или напитков антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть добавлены в количестве 15 частей (по массе) или меньше, в частности, 10 частей (по массе) или меньше из расчета на 100 частей (по массе) исходных веществ. Однако, при приеме внутрь в течение продолжительного периода времени в целях поддержания общего состояния здоровья и гигиены или в целях контроля за состоянием здоровья данное количество может быть ниже указанного выше диапазона. Кроме того, с точки зрения безопасности композиции нет никаких проблем, поскольку используется фракция природного продукта. Таким образом, композицию также можно использовать в количестве, соответствующем указанному выше диапазону или превышающем его.

[0119] Что касается таких функциональных продуктов питания оздоровительного действия по настоящему изобретению, как напитки, то они могут включать различные ароматизаторы или природные углеводы в качестве дополнительного компонента, как и

в обычных напитках. Вышеупомянутый природный углевод может представлять собой моносахарид, такой как глюкоза и фруктоза; дисахарид, такой как мальтоза и сахароза; полисахарид, такой как декстрин и циклодекстрин; или сахарный спирт, такой как ксилит, сорбит и эритрит, и так далее. В качестве подсластителя можно использовать природный подсластитель, такой как тауматин и экстракт стевии; синтетический подсластитель, такой как сахарин и аспартам, и так далее. Доля природного углевода может составлять от примерно 0,01 г до примерно 0,04 г; и, в частности, от примерно 0,02 г до примерно 0,03 г на 100 мл напитка по настоящему изобретению.

[0120] Помимо вышеупомянутых ингредиентов функциональный продукт питания оздоровительного действия по настоящему изобретению, предназначенный для предупреждения или улучшения состояния при раке, может включать различные питательные вещества, витамины, электролиты, ароматизаторы, красители, пектиновую кислоту и ее соли, альгиновую кислоту и ее соли, органические кислоты, защитные коллоиды, загустители, регулирующие pH агенты, стабилизаторы, консерванты, глицерин, спирт, карбонизаторы, используемые в газированных напитках. Помимо этого, композиция по настоящему изобретению для улучшения состояния при раке может включать мякоть фруктов для приготовления натурального фруктового сока, напитков из фруктового сока или напитков из овощного сока. Эти ингредиенты можно использовать по отдельности или в смеси. Доли таких добавок не ограничиваются, но обычно выбираются в диапазоне от 0,01 части (по массе) до 0,1 части (по массе) из расчета на 100 частей (по массе) функционального продукта питания оздоровительного действия по настоящему изобретению.

[0121] Согласно следующим аспектам предложена композиция для диагностики рака, при этом данная композиция содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и наборы для диагностики рака, при этом такие наборы содержат данную композицию. Настоящее изобретение также относится к способу диагностики рака посредством обработки антителом к CD73 или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению.

[0122] Рак можно диагностировать путем измерения уровня экспрессии CD73 в образце с использованием антитела к CD73 по настоящему изобретению. Уровень экспрессии может быть измерен в соответствии с общепринятым методом иммуноанализа и может быть измерен с помощью радиоиммуноанализа, радиоиммунопреципитации, иммунопреципитации, иммуногистохимического

окрашивания, иммуноферментного твердофазного анализа (ELISA), ELISA с захватом, анализа с ингибированием или конкурентного анализа, сэндвич-анализа, проточной цитометрии, иммунофлуоресцентного окрашивания или иммуноаффинной очистки с использованием антитела к CD73, но этим не ограничивается. Рак можно диагностировать путем анализа конечной интенсивности сигнала, полученного в результате описанного выше метода иммуноанализа. Другими словами, когда маркерный белок по настоящему изобретению экспрессируется в биологическом образце в высокой степени, и в результате этого сигнал в данном биологическом образце превышает сигнал в обычном биологическом образце (например, ткани желудка, крови, плазме или сыворотке крови в норме), данный биологический образец диагностируют как раковый.

[0123] Согласно следующим аспектам предложены наборы для диагностики рака, при этом данные наборы содержат композицию для диагностики рака. Наборы могут включать антитело к CD73 по настоящему изобретению, и с их использованием можно диагностировать рак, анализируя сигналы, возникающие в результате взаимодействия образца с антителом. Таким образом, сигнал может представлять собой результат действия фермента, конъюгированного с антителом, например, щелочной фосфатазы, β -галактозидазы, пероксидазы хрена, люциферазы и цитохрома P450, но этим не ограничивается. Когда в качестве фермента используют щелочную фосфатазу, то в качестве субстрата могут быть использованы субстраты, вызывающие реакцию развития окраски, такие как бромхлориндолилфосфат (BCIP), нитротетразолий синий (NBT), нафтол-AS-BI-фосфат и субстрат для усиленной хемифлуоресценции (ECF). Когда используют пероксидазу хрена, то могут быть использованы такие субстраты, как хлорнафтол, аминоэтилкарбазол, диаминобензидин, D-люциферин, люцигенин (бис-N-метилакридиния нитрат), простой бензиловый эфир резофурина, люминал, реагент амплекс красный (10-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазин), *n*-фенилендиамин-HCl и пирокатехол (HYR), тетраметилбензидин (TMB), 2,2'-азино-ди[3-этилбензтиазолина сульфонат] (ABTS), *o*-фенилендиамин (OPD) и нафтол/пиронин, глюкозооксидаза, тетранитротетразолий синий (t-NBT) и *m*-феназина метосульфат (PMS), но ими не ограничиваются.

[0124] Помимо этого, наборы могут включать метку, которая генерирует детектируемый сигнал. Примеры метки могут включать, но не ограничиваются этим, химические реагенты (например, биотин), ферменты (щелочную фосфатазу, β -

галактозидазу, пероксидазу хрена и цитохром P450), радиоактивные вещества (например, ^{14}C , ^{125}I , ^{32}P и ^{35}S), флуоресцентные вещества (например, флуоресцеин), светоизлучающие вещества, хемилюминесцентные вещества и метку для резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET). Измерение активности фермента, используемого для диагностики рака, или измерение сигнала может быть выполнено различными методами, известными в данной области техники. При таком определении может быть осуществлен качественный или количественный анализ экспрессии CD73.

[0125] Теперь будет приведено подробное описание воплощений, примеры которых иллюстрируются в прилагаемых графических материалах, при этом одинаковые номера позиций повсюду относятся к одинаковым элементам. Таким образом, воплощения настоящего изобретения могут принимать разные формы, и их не следует истолковывать в качестве ограничивающих для изображений, приведенных в данном описании. Соответственно, воплощения просто описаны ниже, со ссылкой на фигуры, для разъяснения аспектов настоящего изобретения. Используемый в данном описании термин «и/или» включает всевозможные комбинации одного или более чем одного из ассоциируемых с ними перечисленных элементов. Такие выражения, как «по меньшей мере один из», когда они предшествуют списку элементов, изменяют весь список элементов и не изменяют отдельные элементы данного списка.

ПРИМЕРЫ

[0126] Далее приведены типичные воплощения для упрощения понимания настоящего изобретения. Однако, следующие типичные воплощения приведены только для облегчения понимания настоящего изобретения, но содержание настоящего изобретения не ограничивается приведенными ниже типичными воплощениями.

[0127] Подготовительный пример 1. Отбор антител к CD73 с использованием биопэннинга

[0128] 1-1. Отбор фагового антитела, специфически связывающегося с CD73

[0129] Для отбора клонов антител, специфически связывающихся с белками CD73 человека и мыши, проводили биопэннинг с применением библиотеки фаговых антител HuDV Fab-8L. Сначала осуществляли взаимодействие рекомбинантного белка CD73 человека (Sino Biological, China) и рекомбинантного белка CD73 мыши (Sino Biological) с тозилативированными гранулами Dynabeads M-280 при 4°C в течение 48 часов, соответственно. Гранулы, связавшиеся с каждым белком CD73, обрабатывали буфером для блокирования (забуференным фосфатом физиологическим раствором (PBS),

содержащим 3% снятого молока и 0,1% твина-20), содержащим библиотеку рекомбинантных антител HuDVFab-8L (HuDVFab-L1-L6, L8, L12) (Fab, экспонированных на поверхностном белке рIII фага) и оставляли взаимодействовать при 4°C в течение 16 часов. После этого рекомбинантные фаги, неспецифически связавшиеся с белком CD73, удаляли, используя устройство KingFisher ML. Фаги, специфически связавшиеся с белком CD73, элюировали путем обработки 0,2 М глициновым буфером (pH 2,2) и затем нейтрализовали путем обработки 1 М трис-HCl буфером (pH 9,0). TG1 клетки (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden), в которые был введен ген легкой цепи из библиотеки антител, обрабатывали нейтрализованной суспензией фагов и инфицирование проводили при 37°C в течение 1 часа. Инфицированные фагами TG1 клетки рассеивали на твердой среде LB/АСТ (среде LB (Лурия-Бертани), содержащей ампициллин (50 мкг/мл), карбенициллин (10 мкг/мл) и тетрациклин (10 мкг/мл)), инкубировали при 27°C в течение 16 часов и затем неинфицированные TG1 клетки удаляли. В планшет добавляли 10 мл жидкой среды, содержащей культивированные колонии, в которой затем суспендировали и разбавляли клетки до плотности $4,8 \times 10^8$ клеток/мл. Чтобы инфицировать TG1 клетки, добавляли Ех-фаг при 37°C и выдерживали в течение 1 часа. Затем инфицированные TG1 клетки осаждали с использованием центрифуги и супернатант отбрасывали. TG1 клетки ресуспендировали в 5 мл среды 2×YT/АСТКА (среды «двукратный дрожжевой экстракт-триптон» (2×YT), содержащей ампициллин (50 мкг/мл), карбенициллин (10 мкг/мл), тетрациклин (10 мкг/мл), канамицин (50 мкг/мл), 0,001% арабинозы), и инкубировали при 27°C в течение 6 часов. Далее с использованием центрифуги получали содержащий фаги супернатант и осуществляли взаимодействие с тозилативированными гранулами Dynabeads M-280, связанными с белком CD73, при 4°C в течение примерно 20 часов. Затем проводили три цикла биопэннинга для отбора фаговых антител, специфически связавшихся с CD73. В результате были отобраны CD73-связывающие поликлональные антитела, включающие легкие цепи L2, L4, L6 и L8 из библиотеки фаговых антител HuDVFab-8L.

[0130] 1-2. Отбор моноклонального фагового антитела, специфически связывающегося с CD73

[0131] Среди отобранных, как описано в 1-1, поликлональных антител отбирали моноклональные антитела, специфически связывающиеся с CD73 и имеющие различные последовательности CDR тяжелых цепей (HCDR), путем проведения фагового иммуноферментного твердофазного анализа (фагового ELISA). Рекомбинантный белок

CD73 человека и рекомбинантный белок CD73 мыши разбавляли, используя буфер для сенсибилизации (0,1 М NaHCO₃, pH 9,6), до концентрации 2 мкг/мл, затем в лунки 96-луночного планшета для ELISA Maxisorp (Nunc, Denmark) вносили по 50 мкл раствора каждого из них и оставляли взаимодействовать при 4°C в течение 16 часов для покрытия лунок планшета белком CD73. Не связавшийся с поверхностью белок и буфер полностью удаляли, в каждую лунку вносили по 200 мкл буфера для блокирования и оставляли взаимодействовать при 37°C в течение 1 часа. Через 1 час буфер полностью удаляли, в каждую лунку добавляли по 200 мкл буфера на основе PBS, содержащего 0,1% твин-20 (PBS-T), и эту процедуру промывки повторяли три раза. Содержащий фаг супернатант разбавляли в соотношении 1/10 буфером для блокирования, в каждую лунку вносили по 50 мкл и оставляли взаимодействовать при 37°C в течение 1 ч. После этого проводили промывку методом, аналогичным описанному выше, затем обработку конъюгированным с пероксидазой хрена (HRP) антителом козы к бактериофагу M13 (GE Healthcare, Chicago, Illinois) при 37°C в течение 1 ч. Планшет промывали методом, аналогичным описанному выше, и затем в каждую лунку планшета вносили по 50 мкл субстрата TMB (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey). Далее измеряли поглощение на длине волны 450 нм, используя микропланшетный ридер модели 680 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California), чтобы отобрать 14 видов CD73-специфичных моноклональных фаговых антител.

[0132] ФИГ. 1 представляет собой график, показывающий способности антител к CD73, которые были отобраны в результате проведения биопэннинга, связываться с CD73. Как показано на ФИГ. 1, все фаговые антитела, за исключением L2-20, связывались с CD73 человека. Кроме того, фаговые антитела L2-47, L4-66, L6-1, L6-30 и L6-37 связывались с CD73 мыши со способностью связываться, соответствующей 50% или более от способности связываться с CD73 человека. Фаговое антитело L8-34 неспецифически связывалось с белком CD32b, но не с CD73. Среди 14 видов антител, имеющих разные последовательности HCDR, 12 видов фаговых антител к CD73, за исключением L2-20, имеющего слабую способность связываться с CD73 человека, и L8-34, демонстрировавшего неспецифическое связывание, использовали в последующих экспериментах.

[0133] Подготовительный пример 2. Получение и отбор антитела к CD73 IgG1 человека

[0134] 2-1. Приготовление вектора, экспрессирующего антитело к CD73 IgG1

человека

[0135] Двенадцать (12) видов фаговых антител к CD73, отобранных в подготовительном примере 1, были клонированы для получения антител IgG1 человека. Конкретно, последовательности генов V_L (вариабельной области легкой цепи) и V_H (вариабельной области тяжелой цепи) фаговых антител, отобранных в подготовительном примере 1, клонировали в вектор экспрессии pdCMV-dhfr (предоставленный профессором Нюо Jeong Hong из Канвонского государственного университета), включающий последовательности генов C_L (константной области легкой цепи) и CH1-CH2-CH3 (константной области тяжелой цепи, константной области легкой цепи) иммуноглобулина человека G1 (IgG1) изотипа, с получением в результате этого интактной формы IgG1 (ФИГ. 2А). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием ДНК-полимеразы Pyrobest™ (Takara, Japan) и термоциклера T100. Чтобы клонировать каждую последовательность легкой цепи фагового антитела, отобранного в подготовительном примере 1, проводили ПЦР с использованием SEQ ID NO: 47 и SEQ ID NO: 48 из приведенной далее Таблицы 1 в условиях 94°C в течение 30 с, 58°C в течение 30 с и 72°C в течение 20 с для амплификации лидерной последовательности каждой легкой цепи. Каждый из генов последовательностей V_L амплифицировали с генов V_L фаговых антител, отобранных в подготовительном примере 1, проводя ПЦР с использованием SEQ ID NO: 49 и SEQ ID NO: 50. Два вида амплифицированных продуктов ПЦР объединяли, применяя сборочную ПЦР в условиях 94°C в течение 30 с, 58°C в течение 30 с и 72°C в течение 60 с. После этого продукт ПЦР и вектор pdCMV-dhfr обрабатывали ферментами рестрикции HindIII и BsiWI (Takara) при 37°C и 55°C, соответственно, и приводили их во взаимодействие друг с другом. Фрагмент, содержащий лидерную последовательность и V_L -ген, и вектор pdCMV-dhfr, обработанные указанными ферментами рестрикции двух видов, лигировали с использованием ДНК лигазы T4 и применяли для трансфекции CaCl₂-обработанных компетентных клеток методом теплового шока. Далее, чтобы клонировать последовательности тяжелой цепи фаговых антител, отобранных в подготовительном примере 1, лидерные последовательности тяжелых цепей, включающие последовательность для EcoRI, амплифицировали посредством ПЦР, используя SEQ ID NO: 51 и SEQ ID NO: 52. Каждый из генов последовательностей V_H , включающих последовательность для ApaI, амплифицировали посредством ПЦР, используя SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 54. Два вида амплифицированных продуктов ПЦР объединяли

(лидерная последовательность- V_H), применяя сборочную ПЦР, и обрабатывали ферментами рестрикции *EcoRI* и *ApaI*. Фрагмент, содержащий лидерную последовательность и V_H -ген, обработанный ферментами рестрикции, клонировали в вектор *pdCMV-dhfr*, в который были встроены ген легкой цепи (V_L - C_L) и ген $CH1$ - $CH2$ - $CH3$, способом, аналогичным описанному выше, для получения вектора, экспрессирующего IgG1 человека.

[0136] Вместе с тем, в *Cosmogenetech Co. Ltd.* были синтезированы гены тяжелой цепи и легкой цепи (WO 2018/013611, WO 2016/075099) антител CPI-006 (*Corvus Pharmaceuticals, Burlingame, CA*) и MEDI-9447 (*MedImmune, Gaithersburg, MD*), используемых в качестве положительных контролей, и клонированы в вектор *pdCMV-dhfr* способом, аналогичным описанному выше, с применением *HindIII* (*Takara*) и *XbaI* (*Takara*) в качестве ферментов рестрикции для легкой цепи и *EcoRI* (*Takara*) и *NotI* (*Takara*) в качестве ферментов рестрикции для тяжелой цепи.

Таблица 1

Конструкция	SEQ ID NO:	Олигонуклеотидная последовательность (5'-3')
IgG1 человека (легкая цепь)	47	gatcaacaagcttgccaccatggagacccacagccag
	48	cccctccaccccgtcagccacag
	49	ctgagcgggggtggaggggacatccagatgacccagctctccatcttccctgtct
	50	ccaccgtacgtttgattccagcttggtccctggccgaaggt
IgG1 человека (тяжелая цепь)	51	gatcaacgaattcgccaccatggagtggctcctgggtc
	52	ggaaagcactccggtggtcacgctgag
	53	gcgtgaccaccggagtgccttcccaggtgcagctggtgcagctctgg
	54	cagtggggcccttggtggaggctgaggagacggtgaccagggtgccttg

[0137] 2-2. Получение и очистка антитела к CD73 IgG1 изотипа человека

[0138] Чтобы получить такие отобранные 12 видов антител к CD73 IgG1 человека, вектором *pdCMV-dhfr*, клонированным, как описано в 2-1, трансфицировали клетки *ExpiCHO-S™* (*Gibco*). Конкретно, клетки *ExpiCHO-S™* инкубировали, используя среду для экспрессии *ExpiCHO-S™* (*Gibco, ThermoFisher Scientific*), в инкубаторе со встряхиванием в условиях 37°C, 140 об./мин, влажности 80% и 5% CO₂. Вектором, в который были встроены отобранные гены антител 12 видов, трансфицировали клетки *ExpiCHO-S™*, которые повторно культивировали по меньшей мере три раза, используя набор для трансфекции *CHO ExpiFectamine™* и не содержащую сыворотки среду (*SFM*) *OptiPRO™* (1x) (*Gibco*). Далее клетки инкубировали в течение 20 часов в инкубаторе со встряхиванием в тех же условиях, что и выше. После инкубирования клетки обрабатывали реагентом *ExpiFectamine™ CHO* в качестве подпитки и усилителя трансфекции и инкубировали в течение 7 суток в тех же условиях, что и выше.

Культуральную среду извлекали и центрифугировали при 4000 об./мин и 4°C в течение 15 минут, получая супернатант, содержащий белковый образец. Супернатант фильтровали через фильтровальную бумагу (0,2 мкм) для удаления примесей. После этого образец антитела, полученный из СНО клеток, очищали аффинной хроматографией. Конкретно, для связывания образца антитела в культуральной среде со смолой проводили взаимодействие смолы CaptureSelect IgG-CH1 Affinity Matrix с культуральной средой, из которой были удалены примеси, при 4°C в течение 6 часов. После проведения взаимодействия смолу промывали забуференным трисом физиологическим раствором (TBS; pH 7,4) в количестве 10 объемов колонки (CV) и для элюирования образца антитела применяли 100 mM цитратный буфер (pH 3,0), который в элюате нейтрализовали до слабокислотной среды (от pH 6,0 до pH 6,5) путем добавления 1 М трис-HCl буфера (pH 9,0). Нейтрализованный буфер в элюате фильтровали через фильтровальную бумагу (0,2 мкм) для удаления примесей и количественный анализ белков проводили при длине волны в ультрафиолетовой (УФ) области, составляющей 280 нм.

[0139] 2-3. Анализ размеров белков, представляющих собой антитела к CD73 IgG1 изотипа человека

[0140] Размеры представляющих собой антитела белков, полученных и очищенных, как описано в 2-2, анализировали с использованием SDS-PAGE. Сначала, белки, представляющие собой антитела, разбавляли 2-меркаптоэтанол-содержащим буфером для образцов с додецилсульфатом лития (LDS) Pierce™ и «невосстанавливающим» буфером (4x; Thermo Fisher Scientific) и затем нагревали в течение 5 минут. После этого в каждую из лунок готового градиентного геля (от 4% до 15%) для белков Mini-PROTEAN® TGX™ (Bio-Rad) загружали по 1 мкг каждого из образцов белков и в течение 40 минут проводили электрофорез, используя источник питания PowerPac™ Basic при 140 В. Подвергнутый электрофорезу гель обрабатывали раствором бриллиантового голубого R 250 для окрашивания белков (ELPISBIO, Korea) в течение 60 минут и затем обрабатывали буфером для отмывания красителя (30% метанола, 10% уксусной кислоты) для визуализации белковых зон.

[0141] На ФИГ. 2В показаны результаты SDS-PAGE для антител IgG1 человека. Как показано на ФИГ. 2В, тяжелая цепь и легкая цепь очищенных 12 видов антител имели размер 50 кДа и 25 кДа, соответственно, и все белковые зоны наблюдались в положениях, соответствующих теоретически предсказанным размерам.

[0142] 2-3. Исследование CD73-связывающей способности антитела к CD73 IgG1 изотипа человека

[0143] Для сравнения CD73-связывающей способности среди 12 видов антител к CD73 IgG1 человека, полученных и очищенных, как описано в 2-2, проводили эксперименты с применением ELISA. Рекомбинантный белок CD73 человека разбавляли в карбонатном буфере для сенсibilизации до концентрации 1 мкг/мл, затем его по 100 мкл вносили в каждую лунку 96-луночного планшета для ELISA Maxisorp и оставляли для образования покрытия при 4°C на 16 часов. Не связавшиеся с поверхностью белки и буфер полностью удаляли и в каждую лунку вносили по 300 мкл буфера на основе PBS (pH 7,4), содержащего 3% бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 0,1% твина-20, и затем оставляли взаимодействовать при комнатной температуре в течение 2 часов для блокирования. Через 2 часа оставшийся буфер удаляли, в каждую лунку вносили по 300 мкл буфера на основе PBS-T и выполняли промывку, повторяя процесс удаления три раза. Готовили разведения серии антител к CD73 IgG1 изотипа, используя буфер на основе PBS, в концентрации 100 нМ, добавляли в лунки и осуществляли взаимодействие при 37°C в течение 1 часа. После промывки добавляли конъюгированное с HRP ослиное антитело к Fc IgG человека (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Baltimore Pike) и осуществляли взаимодействие при 37°C в течение 1 часа. Выполняли ту же процедуру промывки, что и в описанном выше способе, в каждую лунку вносили по 100 мкл субстрата TMB и оставляли взаимодействовать в течение 7 минут. Измеряли поглощение на длине волны 450 нм, используя модель 680 микропланшетного ридера. Аналогичным описанному выше образом измеряли поглощение в случае образцов для отрицательного контроля (ритуксимаба) и положительного контроля (CPI-006, MEDI-9447).

[0144] На ФИГ. 3А приведен график, показывающий способность связываться с CD73 человека для 12 видов очищенных антител к CD73 IgG1 человека. Как показано на ФИГ. 3А, среди 12 видов очищенных антител 9 таких видов и два положительных контроля исключительно сильно связывались с CD73 человека по сравнению с BSA, а остальные 3 вида антител (L4-46, L6-7 и L6-37) относительно слабо связывались с ним. Кроме того, антитело, использованное в качестве отрицательного контроля (ритуксимаб, IgG1), не связывалось с CD73 человека.

[0145] 2-4. Исследование ферментативной активности мембранного белка CD73

[0146] Чтобы сравнить ингибирующие активности 12 видов антител к CD73 IgG1 человека, полученных и очищенных, как описано в 2-2, в отношении ферментативной

активности мембранного CD73, проводили анализ с использованием малахитового зеленого для MDA-MB-231 клеток, экспрессирующих мембранный CD73 на клеточной поверхности (Корейский банк клеточных линий Кореи). MDA-MB-231 клетки вносили с плотностью $2,0 \times 10^4$ клеток/лунка в 96-луночный планшет с лунками с плоским дном и инкубировали в инкубаторе в условиях 37°C и 5% CO₂ в течение 20 часов. После инкубирования дважды осуществляли промывку, используя буфер для анализа, и 12 видов образцов антител к CD73 IgG1 человека разбавляли буфером для анализа до концентрации 500 нМ, добавляли в каждую лунку и оставляли взаимодействовать при 37°C в течение 1 часа. После этого в каждую лунку добавляли 250 мкМ АМФ и осуществляли взаимодействие при 37°C в течение 20 минут. По 40 мкл супернатанта без клеток вносили в новый 96-луночный планшет. Чтобы измерить ферментативную активность CD73, детектировали фосфат, вошедший в состав супернатанта, применяя набор для определения фосфата с использованием малахитового зеленого, и измеряли поглощение на длине волны 620 нм, применяя спектрофотометр для микропланшетов Epoch. Аналогичным описанному выше образом измеряли поглощение в случае образцов для отрицательного контроля (ритуксимаба) и положительного контроля (CPI-006, MEDI-9447).

[0147] На ФИГ. 3В показаны результаты исследования того, ингибируют ли 12 видов очищенных антител к CD73 IgG1 изотипа человека ферментативную активность CD73. Как показано на ФИГ. 3В, среди 12 видов антител к CD73 IgG1 изотипа человека 5 видов антител (L2-3, L4-4, L4-5, L4-66 и L6-1) демонстрировали ингибирование ферментативной активности CD73 на 50% или больше по сравнению с отрицательным контролем, и из них антитело L6-1 демонстрировало ингибирование ферментативной активности CD73 на 90% или больше, что указывает на высокую ингибирующую активность, аналогичную таковой у CPI-006 (91%). Остальные 4 вида антител (L2-3, L4-4, L4-5 и L4-66) демонстрировали ингибирование ферментативной активности CD73 на 63%, 61%, 58% и 50%, соответственно, что указывает на ингибирующую активность, аналогичную таковой у MEDI-9447 (34%) или превышающей ее.

[0148] 2-5. Исследование способности к перекрестному связыванию с CD73 у антитела к CD73 IgG1 изотипа человека

[0149] Чтобы сравнить способность к перекрестному связыванию с белками CD73 человека, обезьяны, крысы и мыши (Sino Biological) среди 5 видов антител к CD73 IgG1 человека (L2-3, L4-4, L4-5, L4-66, L6-1), которые демонстрировали ингибирующую

активность в отношении ферментативной активности CD73, аналогичную таковой или превышающую таковую в случае положительного контроля, как описано в 2-3, проводили эксперименты с использованием ELISA способом, аналогичным описанному в 2-3.

[0150] На ФИГ. 3С показаны результаты анализа способности к перекрестному связыванию с CD73 человека, обезьяны, крысы и мыши. На ФИГ. 3С все антитела из антител L4-66 и L6-1 и антитела MEDI-9447 взаимодействовали с CD73 человека, обезьяны, крысы и мыши, но антитела L2-3 и L4-5 и антитело CPI-006 взаимодействовали только с CD73 человека и обезьяны, а антитело L4-4 взаимодействовало только с CD73 человека, обезьяны и крысы. Таким образом, они демонстрировали отличающиеся друг от друга картины связывания. На основании этих результатов были отобраны два вида антител (L4-66 и L6-1), демонстрирующих перекрестное связывание с CD73 человека и мыши, аналогичное таковому у антитела MED-I9447, и обозначены как APBA2-01 и APBA2-02, соответственно.

[0151] Подготовительный пример 3. Получение антител APBA2-01 и APBA2-02

[0152] 3-1. Получение моноклональных антител APBA2-01 и APBA2-02

[0153] Получали стабильный пул клеток, экспрессирующих моноклональные антитела IgG APBA2-01 и APBA2-02, отобранные, как описано в подготовительном примере 2-5. Сначала гены легкой цепи и тяжелой цепи моноклональных антител APBA2-01 и APBA2-02 клонировали в векторы pD2539 и pD2535nt (Horizon Discovery, United Kingdom), соответственно. Гены V_L и V_H антител APBA2-01 и APBA2-02 и C_L и C_H антител человека IgG изотипа синтезировали в виде кодон-оптимизированных последовательностей для клеток яичника китайского хомячка (CHO). Синтезированный ген легкой цепи антитела APBA2-01 обрабатывали ферментами рестрикции Bbs1 (Thermo Fisher Scientific) и BsrG1 (Thermo Fisher Scientific) и лигировали с вектором pD2539, обработанным этими же ферментами рестрикции. Синтезированный ген V_H антитела APBA2-01 амплифицировали посредством ПЦР, используя SEQ ID NO: 51 из Таблицы 1 и SEQ ID NO: 55 из Таблицы 2, а ген C_H IgG человека амплифицировали посредством ПЦР, используя SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 57 из приведенной далее Таблицы 2. Эти два амплифицированных ПЦР продукта объединяли друг с другом, применяя сборочную ПЦР. Объединенный ген тяжелой цепи и вектор pD2535nt обрабатывали ферментом рестрикции Bbs1 и приводили во взаимодействие.

Синтезированный ген V_L антитела APBA2-02 амплифицировали посредством ПЦР, используя SEQ ID NO: 47 из Таблицы 1 и SEQ ID NO: 58 из Таблицы 2, а ген C_L IgG человека амплифицировали посредством ПЦР, используя SEQ ID NO: 59 и SEQ ID NO: 60 из приведенной далее Таблицы 2. Ген V_H антитела APBA2-02 амплифицировали посредством ПЦР, используя SEQ ID NO: 51 из Таблицы 1 и SEQ ID NO: 61 из Таблицы 2, а ген C_H IgG человека амплифицировали посредством ПЦР, используя SEQ ID NO: 57 и SEQ ID NO: 62 из приведенной далее Таблицы 2. Эти два амплифицированных ПЦР продукта объединяли, применяя сборочную ПЦР. После этого проводили клонирование аналогичным описанному выше образом.

Таблица 2

Конструкция	SEQ ID NO	Олигонуклеотидная последовательность (5'-3')
APBA2-01 (тяжелая цепь IgG1 человека (hIgG1))	55	gctagacacggtcaccagggtg
	56	caccctggtgaccgtgtctagcgcatcaacaaaaggctcctcagttttccc
	57	aggaagacgcttttagaggcgccgctcactttcctgggtgaaag
APBA2-02 (легкая цепь hIgG1)	58	ctaggagcggccacggctccgcttgatctccagcttggtgccctg
	59	cggaccgtggccgctcctag
	60	ccactctagagaagacgcttttagatcaacactc
APBA2-02 (тяжелая цепь hIgG1)	61	ggagctcacggtcaccagggtgccctg
	62	gtgaccgtgagctccgcatcaacaaaaggctcctcagttttccc
APBA2-01 (тяжелая цепь mIgG1)	63	caccctggtgaccgtgtctagcgctaagactacccaccatcagctatccc
	64	atcggcgccgccaagacgcttttagatca
APBA2-01 (тяжелая цепь mIgG2a)	65	caccctggtgaccgtgtctagcgctaaaactaccgcacctagcgtgtatcct

[0154] 3-2. Получение химерных антител APBA2-01 и APBA2-02

[0155] Антитела APBA2-01 и APBA2-02 получали в виде последовательностей химерных антител «человек-мышь» IgG1 и IgG2a, имеющих последовательности генов V_L и V_H антитела человека и последовательность C_L и последовательность C_H мышинного антитела, соответственно. Синтезированные генные фрагменты химерного антитела (человеческая V_L)-(мышинная C_L) из APBA2-01 и APBA2-02 клонировали в вектор pD2539 способом, аналогичным описанному в 3-1, соответственно. Синтезированные гены C_H мышинных IgG1 и IgG2a амплифицировали посредством ПЦР, используя SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64 и SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, соответственно. После этого продукт объединяли с геном V_H антитела APBA2-01, применяя сборочную ПЦР, способом, аналогичным описанному в 3-1. Генные фрагменты V_H мышинного IgG1 и мышинного IgG2a объединенного гена антитела APBA2-01 и синтезированного гена

антитела APBA2-02 клонировали в вектор pD2535nt способом, аналогичным описанному выше.

[0156] 3-3. Получение стабильных пулов белков, представляющих собой антитела APBA2-01 и APBA2-02

[0157] Получали стабильные пулы для продуцирования представляющих собой антитела белков из подготовительных примеров 3-1 и 3-2. Сначала клетки линии CHO K1 с нокаутом гена глутаминсинтетазы (GS null) (Horizon Discovery) вносили в среду, приготовленную путем добавления 4 мМ L-глутамина (Gibco) к химически определенной (CD) среде FortiCHO (Thermo Fisher Scientific) и инкубировали в инкубаторе со встряхиванием в условиях 37°C, 125 об./мин, влажности 80% и 5% CO₂. Векторами, в которые были встроены гены легкой цепи и тяжелой цепи APBA2-01 и APBA2-02, соответственно, совместно трансфицировали культивируемые клетки в соотношении (pD2539(легкая цепь):pD2535nt(тяжелая цепь)), равном 1:3, используя реагент Freestyle™ MAX (Invitrogen), и плазмидный вектор применяли в общем количестве 37,6 мкг, затем инкубировали в течение 48 часов в тех же описанных выше условиях. После этого, культивированные клетки переносили в коническую пробирку емкостью 50 мл (Nunc) и центрифугировали, а затем клеточный осадок после центрифугирования ресуспендировали в CD среде FortiCHO без L-глутамина и обрабатывали 50 мкМ метионинсульфоксимином (MSX, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) для проведения первичного отбора в течение 48 часов. После этого клетки обрабатывали пуромицином (10 мкг/мл; Gibco) для проведения вторичного отбора в течение 48 часов. После этого осажденные клетки суспендировали в среде без L-глутамина с плотностью $0,5 \times 10^6$ клеток/мл и затем подвергали дополнительной процедуре отбора путем обработки MSX и пуромицином в течение 3 недель. В связи с этим среду периодически заменяли, чтобы плотность клеток поддерживалась на уровне $2,0 \times 10^6$ клеток/мл или меньше, и клетки культивировали до тех пор, пока жизнеспособность клеток не становилась 90% или больше, чтобы получить стабильный пул исходных клеток. Плотность и жизнеспособность клеток измеряли, используя автоматизированный счетчик клеток COUNTESS II.

[0158] 3-4. Получение и очистка белков, представляющих собой химерные антитела APBA2-01 и APBA2-02

[0159] Белки, представляющие собой химерные антитела «человек-мышь» APBA2-01 и APBA2-02 получали из стабильных пулов, приготовленных, как описано в

3-3. Сначала клетки суспендировали в CD среде FortiCHO с плотностью $0,2 \times 10^6$ клеток/мл и инкубировали в инкубаторе со встряхиванием в условиях 37°C , 125 об./мин, влажности 80% и 5% CO_2 . После инкубирования, когда плотность клеток достигала $2,0 \times 10^6$ клеток/мл, клетки переносили в инкубатор со встряхиванием в условия 32°C , 125 об./мин, влажности 80% и 5% CO_2 , и образование образцов антител происходило в течение 7 суток. После этого путем центрифугирования получали супернатант, содержащий образец антитела, и фильтровали через фильтровальную бумагу (0,2 мкм) для удаления примесей. Затем образец антитела, продуцированного CHO клетками, очищали, используя три стадии хроматографии (аффинную хроматографию, очистку посредством катионного обмена и очистку посредством анионного обмена). Первой проводили аффинную хроматографию, используя смолу MabSelect SuRe LX. Смолу промывали забуференным трисом физиологическим раствором (TBS) в количестве 10 CV и супернатант, содержащий образец антитела, наносили на смолу при скорости потока 20 мл/мин. Наносили 5 CV буфера на основе TBS и 5 CV буфера на основе TBS, содержащего 3% D-маннита, при скорости потока 25 мл/мин для удаления веществ, неспецифически связавшихся со смолой. Для элюирования со смолы образца антитела, специфически связавшегося со смолой, наносили 50 mM цитрат (pH 3,5) и содержащий 3% D-маннита буфер при скорости потока 20 мл/мин. Затем буфер, содержащий элюированный образец белка, нейтрализовали путем обработки 1 M трис-HCl буфером при pH 8,0 и фильтровали через фильтровальную бумагу (0,2 мкм) для удаления примесей. Далее проводили очистку путем катионного обмена, используя мультимодальную хроматографическую смолу Capto adhere ImpRes, уравновешенную буфером, содержащим 50 mM трис, 200 mM цитрат, при pH 7,0. Образец антитела, полученный в результате аффинной хроматографии, разбавляли дистиллированной водой в соотношении 1/4. После этого осуществляли связывание образца антитела со смолой при скорости потока 5 мл/мин и промывали 5 CV буфера, содержащего 50 mM трис, 200 mM цитрат и 1 M NaCl, при pH 7,0. Затем осуществляли промывку, используя 50 mM трис и 200 mM цитрат при pH 7,0 в количестве 5 CV, при скорости потока 25 мл/мин для удаления веществ, неспецифически связавшихся со смолой. Далее буфер, содержащий 50 mM трис и 200 mM цитрат при pH 3,0, наносили последовательно в процентном отношении 20%-30%-40%-50%-70%-100%, чтобы элюировать образец антитела, специфически связавшегося со смолой. Элюаты собирали на каждой стадии и фильтровали через фильтровальную бумагу (0,2 мкм) для удаления примесей. В конце И

наконец, проводили очистку путем анионного обмена, используя сильную анионообменную смолу POROS™ 50 HQ. Сначала на смолу наносили буфер, содержащий 2 М NaCl, при скорости потока 3 мл/мин для промывки смолы и уравнивали путем нанесения 5 CV буфера на основе 20 мМ фосфата натрия при pH 6,5. Для связывания со смолой образцов антител, полученных путем очистки катионным обменом, образец подвергали диализу, используя 20 мМ буфер на основе фосфата натрия при pH 6,0 для подведения pH и концентрации соли. После диализа на смолу наносили образец при скорости потока 5 мл/мин и буфер, содержащий собранные белки, фильтровали через фильтровальную бумагу (0,2 мкм) для удаления примесей. Проводили количественное определение и анализ содержания белков.

[0160] Пример 1. Сравнение способности связываться с белком CD73

[0161] 1-1. Способность связываться с водорастворимым белком CD73

[0162] Способность антител APBA2-01 и APBA2-02, полученных и очищенных, как описано в подготовительном примере 3, связываться с водорастворимым белком CD73 исследовали в экспериментах с использованием ELISA. Эксперименты проводили способом, аналогичным описанному в 2-3, за исключением того, что антитела добавляли после серийного разведения от 1500 нг/мл до 0,019 нг/мл. Такие же процедуры также выполняли в случае положительных контролей (MEDI-9447 и CPI-006) и отрицательного контроля (ритуксимаба).

[0163] На ФИГ. 4А-4D приведены графики, показывающие способность связываться с CD73 человека, обезьяны, крысы и мыши, соответственно, для антител APBA2-01 и APBA2-02. Как показано, способность, по своей силе, связываться с белком CD73 человека (ФИГ. 4А) располагалась в таком порядке MEDI-9447 > APBA2-01 > APBA2-02 > CPI-006, и способность, по своей силе, связываться с белком CD73 обезьяны (ФИГ. 4В) располагалась в таком порядке MEDI-9447 = APBA2-01 > CPI-006 > APBA2-02. Кроме того, способность, по своей силе, связываться с белком CD73 крысы (ФИГ. 4С) располагалась MEDI-9447 > APBA2-02 > APBA2-01, а способность, по своей силе, связываться с белком CD73 мыши (ФИГ. 4D) располагалась в таком порядке MEDI-9447 > APBA2-01 > APBA2-02. Другими словами, в случае APBA2-01 продемонстрирована вторая по величине способность связываться с белками CD73 (человека, обезьяны и мыши) после MEDI-9447, а в случае APBA2-02 продемонстрирована относительно низкая способность связываться с CD73 по сравнению с MEDI-9447 и APBA2-01, но продемонстрирована способность связываться, аналогичная таковой у CPI-006.

[0164] 1-2. Способность связываться с мембранным белком CD73

[0165] Имелась ли у антител APBA2-01 и APBA2-02, полученных и очищенных, как описано в подготовительном примере 3, способность связываться с мембранным белком CD73, исследовали проточной цитометрией. Сначала, сверхэкспрессирующую CD73 человека клеточную линию рака молочной железы MDA-MB-231 (Корейский банк клеточных линий) и сверхэкспрессирующую CD73 мыши клеточную линию рака молочной железы 4T1 (Американская коллекция типовых культур (ATCC)) вносили в среду 1640 от Мемориального института Розуэлла Парка (RPMI) (Thermo Fisher Scientific), дополненную 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS) (Gibco) и 1% пенициллина-стрептомицина (Gibco), соответственно, после чего инкубировали в инкубаторе с увлажнением в условиях 37°C и 5% CO₂. Число и жизнеспособность клеток измеряли, используя автоматизированный анализатор клеток Vi-Cell. Клетки MDA-MB-231 и клетки 4T1 вносили с плотностью $2,0 \times 10^5$ клеток в стерильную микропробирку, соответственно, и дважды промывали буфером MACS (PBS, содержащим 0,5% BSA и 2 mM этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA)). После этого антитела APBA2-01 и APBA2-02 разбавляли буфером MACS до концентрации 40 нМ, ими обрабатывали клетки MDA-MB-231 и 4T1, соответственно, и оставляли взаимодействовать при 4°C в течение 1 часа. Через 1 час клетки три раза промывали буфером MACS, к ним добавляли конъюгированное с FITC козье антитело к Fc IgG человека (Invitrogen) и оставляли взаимодействовать при 4°C в течение 30 минут. MDA-MB-231 и 4T1 клетки промывали способом, аналогичным описанному выше, фиксировали, обрабатывая 1%-ным формальдегидом, и затем проводили проточную цитометрию, используя устройство FACSVerse от BD. Положительные контроли (CPI-006 и MEDI-9447) и отрицательный контроль (ритуксимаб) также анализировали способом, аналогичным описанному выше.

[0166] На ФИГ. 5А приведен график, показывающий сравнение способностей антител APBA2-01 и APBA2-02 связываться с мембранным белком CD73 в MDA-MB-231 клетках, а на ФИГ. 5В приведен график, показывающий сравнение их связывающих способностей в 4T1 клетках. Как показано на ФИГ. 5А и 5В, способность, по своей силе, связываться с антигеном располагалась в таком порядке MEDI-9447 > APBA2-01 > APBA2-02 > CPI-006 в MDA-MB-231 и 4T1 клетках. Кроме того, в случаях MEDI-9447 и антител APBA2-01 и APBA2-02 продемонстрирована сильная связывающая способность по сравнению с отрицательным контролем (ритуксимабом). Однако, в случае положительного контрольного антитела CPI-006 продемонстрирована слабая

связывающая способность по сравнению с MEDI-9447 и антителами APBA2-01 и APBA2-02.

[0167] Пример 2. Сравнительный анализ эпитопов

[0168] Эпитопы CD73 для антител APBA2-01 и APBA2-02, полученных и очищенных, как описано в подготовительном примере 3, и положительных контролей (CPI-006 и MEDI-9447) анализировали и сравнивали посредством биослойной интерферометрии (BLI). Сначала захватывающий антитела к Fc IgG человека (АНС) чип увлажняли в стерильной дистиллированной воде в течение 15 минут и подвергали предварительной обработке, повторяя три раза по 20 секунд взаимодействие с буфером на основе PBS, дополненным 0,1% BSA, при pH 7,4 (0,1%-ным PBA) и 10 mM глициновым буфером при pH 1,7, соответственно. Далее антитела CPI-006 и MEDI-9447 в качестве положительных контролей разбавляли 0,1%-ным PBA-буфером до концентрации 200 нМ и наносили на АНС чип в течение 600 секунд, соответственно. Образец рекомбинантного белка CD73 человека, разбавленный 0,1%-ным PBA-буфером до концентрации 20 мМ, приводили во взаимодействие и связывали с чипом в течение 900 секунд. И наконец, образцы APBA2-01 и APBA2-02 разбавляли 0,1%-ным PBA-буфером до концентрации 20 нМ и в течение 900 секунд проводили взаимодействие с CPI-006, с которым связывался рекомбинантный белок CD73 человека. Все экспериментальные процедуры проводили при 30°C со встряхиванием при 1000 об./мин и результаты экспериментов анализировали, используя программное обеспечение для анализа данных ForteBio Data analysis 8.

[0169] На ФИГ. 6А показаны результаты анализа конкурентного связывания антител APBA2-01 и APBA2-02 с эпитопом для CPI-006, а на ФИГ. 6В показаны результаты анализа их конкурентного связывания с эпитопом для MEDI-9447. Как показано на ФИГ. 6А, антитела, совместно распознающие эпитоп для CPI-006, обнаружены не были. При этом, как показано на ФИГ. 6В, положительные контроли (MEDI-9447 и CPI-006) и антитело APBA2-01 не связывались с белком CD73 человека, но с ним связывалось антитело APBA2-02.

[0170] Эти результаты означают, что антитело APBA2-01 обладает способностью конкурентно связываться с эпитопом, аналогичным эпитопу для антитела MEDI-9447, поскольку антитело APBA2-01 не способно связываться с белком человека CD73, с которым связывалось антитело MEDI-9447. При этом антитело CPI-006 было не способно связываться с белком CD73 человека, с которым связывалось антитело MEDI-

9447, в отличие от результатов, представленных на ФИГ. 6А. Другими словами, CPI-006 связывается с эпитопом на С-конце CD73, с которым связывается АМФ, и, таким образом, конкурирует с АМФ за ингибирование ферментативной активности CD73. Напротив, MEDI-9447 связывается с N-концевым доменом CD73, который представляет собой гомодимер, и, таким образом, предотвращает переход CD73 в активную структуру, чтобы осуществить ингибирование ферментативной активности CD73. Поэтому, ожидается, что антитело APBA2-01, демонстрирующее аналогичную с MEDI-9447 картину ингибирования активности, будет предотвращать переход CD73 в активную структуру, и ожидается, что антитело APBA2-02, демонстрирующее аналогичную с CPI-006 картину ингибирования активности, будет конкурентно ингибировать связывание АМФ с CD73.

[0171] Пример 3. Оценка *in vitro* способности ингибировать ферментативную активность CD73

[0172] 3-1. Оценка способности ингибировать активность водорастворимого CD73

[0173] Чтобы исследовать, ингибируют ли антитела APBA2-01 и APBA2-02, полученные и очищенные, как описано в подготовительном примере 3, ферментативную активность водорастворимого белка CD73, проводили анализ с использованием малахитового зеленого, позволяющий выполнить количественное определение содержания фосфата. Сначала рекомбинантный белок CD73 человека разбавляли буфером для анализа (25 мМ трис, 5 мМ MgCl₂, pH 7,5) до концентрации 2 нМ и затем выполняли серийные разведения от 50 нМ до 0,7813 нМ образцов антител APBA2-01 и APBA2-02 буфером для анализа, соответственно. Взаимодействие разбавленного белка CD73 и каждого из образцов антител проводили при 37°C в течение 1 часа. После этого добавляли АМФ в конечной концентрации 400 мкМ и взаимодействие осуществляли при 37°C в течение 20 минут. Затем в течение 20 минут обеспечивали протекание реакции, применяя набор для определения фосфата с использованием малахитового зеленого, и измеряли поглощение при 620 нм с помощью спектрофотометра для микропланшетов Epoch. Аналогичным описанному выше образом также измеряли поглощение в случае положительных контролей (CPI-006 и MEDI-9447) и отрицательного контроля (IgG1 изотипа человека) (BIO X Cell, West Lebanon, New Hampshire).

[0174] На ФИГ. 7 показаны результаты анализа с использованием малахитового зеленого для оценки ингибирования ферментативной активности водорастворимого

CD73 антителами APBA2-01 и APBA2-02. Как показано на ФИГ. 7, способность антител к CD73 ингибировать ферментативную активность водорастворимого CD73 располагалась в таком порядке CPI-006 > APBA2-01 > APBA2-02 > MEDI-9447.

[0175] 3-2. Оценка способности ингибировать активность мембранного CD73

[0176] Чтобы исследовать, ингибируют ли антитела APBA2-01 и APBA2-02, полученные, как описано в подготовительном примере 3, ферментативную активность мембранного белка CD73, выполняли количественное определение содержания фосфата (в анализе с использованием малахитового зеленого) и измерение окисления люциферина (в анализе CellTiter-Glo®), соответственно.

[0177] Ферментативную активность CD73 анализировали с использованием малахитового зеленого. Сначала для измерения ферментативной активности CD73 проводили анализ способом, аналогичным описанному в подготовительном примере 2-4, за исключением того, что MDA-MB-231 клетки и 4T1 клетки вносили с плотностью 2×10^4 клеток/лунка и $1,0 \times 10^4$ клеток/лунка, соответственно, а антитела APBA2-01 и APBA2-02 использовали после серийного разведения в концентрациях от 400 мМ до 0,0244 мМ. Аналогичным описанному выше образом также измеряли поглощение для образцов отрицательного контроля (ритуксимаба) и положительного контроля (CPI-006 и MEDI-9447).

[0178] Далее ферментативную активность CD73 определяли в анализе CellTiter-Glo®. Сначала в 96-луночный планшет с лунками с плоским дном (от SPL) вносили MDA-MB-231 клетки и 4T1 клетки с плотностью $2,0 \times 10^4$ клеток/лунка и $1,0 \times 10^4$ клеток/лунка и инкубировали в инкубаторе в условиях 37°C и 5% CO₂ в течение 20 часов. После инкубирования супернатант удаляли и клетки промывали средой RPMI-1640, не содержащей FBS. Затем, используя среду, выполняли серийные разведения образцов антител APBA2-01 и APBA2-02 с получением концентраций от 500 нМ до 0,0305 нМ, каждую лунку обрабатывали этой смесью и оставляли взаимодействовать при 37°C в течение 30 минут. По окончании взаимодействия добавляли АМФ до концентрации 400 мкМ и оставляли взаимодействовать при 37°C в течение 3 часов. Затем супернатант приводили во взаимодействие с 200 мкМ АТФ в новом 96-луночном белом планшете, обрабатывали реагентом CellTiter-Glo® и измеряли сигнал люминесценции, используя считывающее оборудование Synergy M1 в соответствии со стандартным методом, предлагаемым производителем. Аналогичным описанному выше образом также измеряли сигнал люминесценции для образцов отрицательного контроля (ритуксимаба)

и положительного контроля (CPI-006 и MEDI-9447).

[0179] На ФИГ. 8А показаны результаты анализа с использованием малахитового зеленого на предмет ингибирования ферментативной активности мембранного CD73 антителами к CD73 в MDA-MB-231 клетках, а на ФИГ. 8С показаны результаты анализа CellTiter-Glo® для такого же ингибирования. Как показано на ФИГ. 8А, способность ингибировать активность мембранного CD73 располагалась в таком порядке: APBA2-02 > CPI-006 > MEDI-9447 > APBA2-01 в MDA-MB-231 клетках и, как показано на ФИГ. 8С, активность была измерена в таком порядке: MEDI-9447 = APBA2-01 > CPI-006 > APBA2-02.

[0180] На ФИГ. 8В показаны результаты анализа с использованием малахитового зеленого на предмет ингибирования ферментативной активности мембранного CD73 антителами к CD73 в 4Т1 клетках, а на ФИГ. 8D показаны результаты анализа CellTiter-Glo® для такого же ингибирования. Как показано на ФИГ. 8В, способность ингибировать была измерена в таком порядке: APBA2-02 > MEDI-9447 > APBA2-01 в 4Т1 клетках, и, как показано на ФИГ. 8D, способность ингибировать была измерена в таком порядке: MEDI-9447 > APBA2-01 > APBA2-02. В зависимости от метода измерения наблюдались различия в результатах измерения способности ингибировать.

[0181] Другими словами, в случае антитела APBA2-02 была показана относительно самая высокая ингибирующая активность по результатам анализа с использованием малахитового зеленого (ФИГ. 8А и 8В), но была показана самая низкая ингибирующая активность по результатам анализа CellTiter-Glo® (ФИГ. 8С и 8D). Кроме того, в случае антител APBA2-01 и MEDI-9447 было показано только примерно 50% ингибирования активности CD73 в MDA-MB-231 клетках (ФИГ. 8А), но показано 90% ингибирования или больше в 4Т1 клетках (ФИГ. 8В). При этом антитело CPI-006 не проявляло никакой перекрестной реактивности с мышинным CD73 и, таким образом, не демонстрировало никакого действия в 4Т1 клетках (ФИГ. 8В и 8D).

[0182] Пример 4. Интернализация антитела к CD73 в клетках, экспрессирующих мембранный CD73

[0183] С использованием иммунофлуоресцентной микроскопии исследовали, будут ли антитела APBA2-01 и APBA2-02, полученные и очищенные, как описано в подготовительном примере 3, интернализированы в клетках в результате связывания с мембранным CD73 на поверхности клеток. Сначала в 12-луночный планшет (от SPL) помещали стерильное покрывное стекло (Paul Marienfeld, Germany) и в каждую лунку

вносили MDA-MB-231 клетки ($1,0 \times 10^5$), затем инкубировали в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ в течение 24 часов. После этого культуральную среду удаляли и содержимое каждой лунки обрабатывали антителами APBA2-01 и APBA2-02 в среде в концентрации 10 мкг/мл, соответственно, и оставляли взаимодействовать при 37°C в течение 20 минут, 40 минут, 60 минут и 120 минут. Аналогичным описанному выше образом также проводили взаимодействие в случае положительных контролей. Далее культуральную среду, в которой взаимодействие завершилось, соответственно удаляли. Прикрепившиеся клетки три раза промывали буфером на основе PBS и фиксировали при 37°C в течение 15 минут путем добавления 1 мл 4%-ного формальдегида. Аналогичным описанному выше образом осуществляли промывку, в каждую лунку вносили по 1 мл 0,05%-ного тритона-X100 и оставляли взаимодействовать при комнатной температуре в течение 15 минут, чтобы вызвать образование отверстий в клетках. Затем клетки промывали и блокировали при комнатной температуре в течение 50 минут, добавляя к ним 2%-ный РВА буфер. После промывки добавляли конъюгированное с FITC антитело к Fc иммуноглобулина человека и оставляли взаимодействовать при комнатной температуре в течение 50 минут. Аналогичным описанному выше образом осуществляли промывку и покровные стекла, на которых фиксировали клетки, помещали на предметные стекла вместе с заливочной средой VECTASHIELD HardSet Antifade, содержащей 4',6-диамидино-2-фенилиндол (DAPI). После этого фиксированные клетки анализировали, используя сверхчувствительную конфокальную лазерную сканирующую микроскопию высокого разрешения.

[0184] На ФИГ. 9 приведены изображения, показывающие интернализацию антител APBA2-01 и APBA2-02 в клетках, содержащих мембранный CD73, исследованные с использованием сверхчувствительной конфокальной лазерной сканирующей микроскопии высокого разрешения (SR-CLSM). Как показано на ФИГ. 9, сигналы от CD73 вокруг мембраны MDA-MB-231 клеток наблюдали через 20 минут после обработки MDA-MB-231 клеток антителами APBA2-01 или APBA2-02 либо MEDI-9447, а их интернализацию в CD73-содержащих клетках наблюдали через 40 минут после обработки. Тем не менее, интернализацию CPI-006 в клетках не наблюдали.

[0185] Пример 5. Оценка эффективности в модели *in vivo*

[0186] 5-1. Исследование противоракового эффекта в мышинной модели метастатического рака молочной железы

[0187] Противораковые эффективности антител APBA2-01 и APBA2-02,

полученных и очищенных, как в подготовительном примере 3, исследовали в мышинных моделях метастатического рака молочной железы. Рак легкого индуцировали путем введения клеток линии рака молочной железы 4T1 ($5,0 \times 10^5$) в хвостовую вену самкам мышей BALB/c в возрасте 6 недель. Через 3 суток внутрибрюшинно вводили антитела APBA2-01 и APBA2-02 в дозе 20 мг/кг (4 раза с интервалами в 3 суток), соответственно. Кроме того, такую же дозу тем же способом вводили группам с положительным контролем (MEDI-9447 hIgG1) и отрицательным контролем (изотипическим контрольным IgG), соответственно. Массу тела мышей измеряли после каждого введения лекарственного средства. По завершении эксперимента у каждой мыши иссекали легкое и селезенку и измеряли их массы. Иссеченные легкие окрашивали раствором Боуина и определяли количество колоний. Статистический анализ выполняли, используя программу GraphPad Prism в версии 5.0. Анализ массы тела и размера опухоли выполняли, используя однофакторный ANOVA, и значение $p < 0,05$ считалось значимым.

[0188] На ФИГ. 10А показан график результатов измерения средней массы легких в мышинной модели метастатического рака молочной железы. Как показано на ФИГ. 10А, в случае положительного контрольного и антитела APBA2-01 не было продемонстрировано никаких изменений в массе легкого мыши по сравнению с отрицательным контролем и APBA2-02, для которых продемонстрировано снижение массы легкого мыши на 10,85%.

[0189] ФИГ. 10В представляет собой график измерения числа метастатических колоний в легких в мышинных моделях метастатического рака молочной железы. Как показано на ФИГ. 10В, в случае групп с введением положительного контроля, APBA2-01 и APBA2-02 было показано снижение на 0,04%, 13% и 16% количества метастатических колоний в легком, соответственно, по сравнению с отрицательным контролем, но результат не имел статистической значимости.

[0190] При этом, что касается масс тела и масс селезенки мышей, то никаких значительных изменений в группах, которым вводили APBA2-01, APBA2-02 или положительный контроль, по сравнению с отрицательным контролем не наблюдали.

[0191] 5-2. Исследование ингибирования роста раковой опухоли в мышинной модели рака молочной железы

[0192] Ингибирующие эффекты в отношении роста раковой опухоли, присущие антителам APBA2-01 и APBA2-02, полученным и очищенным, как описано в

подготовительном примере 3, исследовали в мышинных моделях рака молочной железы. Чтобы индуцировать рак молочной железы, в жировую ткань молочной железы вводили клетки линии рака молочной железы 4T1 ($5,0 \times 10^5$). Через 3 суток антитела APBA2-01 и APBA2-02 смешивали с TBS-буфером при pH 7,4, соответственно, и вводили внутривенно мышам в общей дозе 20 мг/кг (6 раз с интервалами в 2 суток). Кроме того, такую же дозу тем же способом вводили группам с положительными контролями (MEDI-9447 мышинного IgG1 изотипа, IgG2a изотипа) и отрицательными контролями (изотипическими контролями мышинными IgG1, IgG2a) (Bio X Cell). Размер раковой опухоли молочной железы измеряли с интервалами в 2 суток, используя штангенциркуль. Через шесть суток после окончания последнего введения антител легкие мышей иссекали и наблюдали метастазирование раковых клеток.

[0193] ФИГ. 11А показан график исследования эффективности ингибирования опухолевого роста антителами APBA2-01 изотипов mIgG1 и mIgG2a и APBA2-02 изотипов mIgG1 и mIgG2a путем измерения объема опухоли в мышинной модели рака молочной железы, а на ФИГ. 11В показан график исследования эффективности ингибирования опухолевого роста путем сравнения ингибирующих опухолевый рост активностей.

[0194] Как показано на ФИГ. 11А и 11В, в случае антитела APBA2-01 продемонстрировано ингибирование роста раковой опухоли молочной железы примерно на 17%, независимо от эффекторной функции Fc антитела, по сравнению с отрицательным контролем. Что касается антитела APBA2-02, то в случае mIgG2a, обладающего эффекторной функцией Fc, продемонстрировано ингибирование роста раковой опухоли молочной железы на 33%, а в случае mIgG1, не обладающего эффекторной функцией Fc, продемонстрировано ингибирование роста раковой опухоли молочной железы на 18%. При этом, что касается положительного контроля, то в случае mIgG2a, обладающего эффекторной функцией Fc, продемонстрировано ингибирование на 23%, а в случае mIgG1, не обладающего эффекторной функцией Fc, продемонстрировано ингибирование на 35%.

[0195] На ФИГ. 11С приведен график, показывающий массы тела в мышинных моделях рака молочной железы. Как показано на ФИГ. 11С, в ходе эксперимента не наблюдали никаких изменений в массах тела у мышей. Кроме того, не обнаруживали никакого метастазирования раковых клеток в легкие.

[0196] Пример 6. Оценка эффективности в клеточной модели *in vitro*

[0197] 6-1. Получение моноклонального антитела

[0198] Был сделан запрос в компанию Muxengo (USA) на проведение отбора антител, специфически связывающихся с белком CD73. Чтобы отобрать клоны для антител-кандидатов, была использована принадлежащая Muxengo библиотека наивных scFv человека и проведен биопэннинг. Отобранные клоны экспрессировали антитела в виде IgG4 изотипа, и из Muxengo были доставлены соответствующие культуральные среды. Для выделения и очистки каждого белка, представляющего собой антитело IgG4, каждую из полученных культуральных сред подвергали аффинной хроматографии с использованием смолы CaptureSelect IgG-CH1 Affinity Matrix, и эксперименты проводили аналогичным описанному в подготовительном примере 2-2 образом.

[0199] 6-2. Исследование ферментативной активности мембранного белка CD73

[0200] Ингибирующую активность семи видов антител к CD73 IgG1 человека, полученных, как описано в примере 6-1, в отношении ферментативной активности мембранного CD73 изучали тем же методом, что и в примере 3-2. Одновременно, в качестве положительных контролей использовали CPI-006 и MEDI-9947.

[0201] На ФИГ. 12А показаны результаты анализа с использованием малахитового зеленого для оценки ингибирующей активности антител к CD73 в отношении ферментативной активности мембранного CD73 в MDA-MB-231 клетках, а на ФИГ. 12В показаны результаты анализа CellTiter-Glo® для такого же ингибирования. Как показано на ФИГ. 12А и 12В было подтверждено, что среди 7 видов антител 5 антител (№№ 3, 4, 6, 7 и 15) обладали значительно высокой ингибирующей активностью в отношении ферментативной активности CD73 по сравнению с отрицательным контролем.

[0202] Пример 7. Исследование способности связываться с мембранным белком CD73

[0203] Чтобы исследовать межвидовую перекрестную реактивность антител к CD73 (антител 3, 4, 6, 7 и 15 от Muxengo), отобранных в примере 6, для проведения тестов по связыванию антител использовали мышинные клеточные линии, экспрессирующие CD73 на клеточной мембране (4T1 (ATCC, CRL-2539) и 4T1.2 (ATCC, CRL-3406)). Сначала 4T1 клетки культивировали в среде RPMI-1640 (Gibco, № по каталогу A10491-01), дополненной 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS) (Gibco, № по каталогу 16000-044), а 4T1.2 клетки культивировали в среде AlphaMEM (минимальной поддерживающей среде в альфа-модификации; Corning Fisher Sci, 10-022-

CV), дополненной 10% FBS. После этого, используя смесь трипсин-EDTA (Gibco, № по каталогу 25200-056), проводили отделение прикрепившихся клеток в планшете для культивирования и затем по $2,0 \times 10^5$ клеток из них вносили в пробирки емкостью 1,5 мл. После этого клетки осаждали, используя центрифугу, и затем удаляли супернатант. Клетки суспендировали в 100 мкл раствора образца антитела, который разбавляли до концентрации 100 нМ в буфере MACS (PBS-буфере по Дульбекко (DPBS; Gibco), дополненном 0,5% бычьего сывороточного альбумина (Sigma), 2 мМ EDTA (Intron Bio)), и оставляли взаимодействовать при 4°C в течение 1 часа. Затем добавляли 800 мкл буфера MACS и проводили центрифугирование для удаления супернатанта. Для суспендирования клеток добавляли 50 мкл раствора вторичного конъюгированного с FITC антитела козы к Fc IgG человека (Novex, A18830), разбавленного в соотношении 1:500 в буфере MACS. Взаимодействие осуществляли при 4°C в течение 1 часа, затем добавляли 500 мкл буфера MACS и проводили центрифугирование для удаления супернатанта. После этого клетки суспендировали и фиксировали, используя 200 мкл 0,4%-ного параформальдегида (T&I, разбавленного в PBS), и полученные образцы анализировали с применением проточного цитометра (BD, FACSVerse).

[0204] На ФИГ. 13А приведен график, показывающий способность антител 3, 4, 6, 7 и 15 от Мухенго связываться с мембранным белком CD73 в 4Т1 клетках. На ФИГ. 13В приведен график, показывающий способность антител 3, 4, 6, 7 и 15 от Мухенго связываться с мембранным белком CD73 в 4Т1.2 клетках.

[0205] Как показано на ФИГ. 13А и 13В, среди пяти антител (№№ 3, 4, 6, 7 и 15) одно антитело (№ 15) прочно связывалось с мембранным CD73 мыши по сравнению с отрицательным контролем и демонстрировало способность связываться с антигеном на том же уровне, что и антитело APBA2-02. Однако четыре антитела (№№ 3, 4, 6, 7) не связывались с мембранным CD73 мыши. Другими словами, ожидается, что антитело 15 от Мухенго будет обладать свойствами, аналогичными свойствам APBA2-02, поскольку оно проявляет антигенсвязывающую способность на том же уровне, что и антитело APBA2-02. Таким образом, антитело 15 от Мухенго может специфически связываться с CD73, проявляя при этом межвидовую перекрестную реактивность.

[0206] Обобщая вышеизложенное, отметим, что моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данной заявке, могут связываться с CD73, снижать ферментативную активность белка CD73 и ингибировать метастазирование рака или разрастание раковой опухоли, что обеспечивает возможность их применений в

качестве терапевтических агентов для лечения рака. Кроме того, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты демонстрируют межвидовую перекрестную реактивность, и их можно использовать в доклинических исследованиях на животных, что позволяет сэкономить время и средства, необходимые для тестирования побочных эффектов, токсичности и/или стабильности иммунотерапевтических агентов.

[0207] Следует понимать, что приведенные в данной заявке воплощения нужно рассматривать только в описательном смысле, а не в целях ограничения. Описания признаков или аспектов в каждом воплощении обычно следует рассматривать как доступные для других аналогичных признаков или аспектов в других воплощениях. Хотя одно или несколько воплощений описаны со ссылкой на фигуры, специалистам средней квалификации в данной области техники будет понятно, что в них могут быть внесены различные изменения по форме и в деталях без отклонения от сущности и объема данного изобретения, которое определено приведенной далее формулой изобретения.

[0208] Широта и объем настоящего изобретения не должны ограничиваться каким-либо из описанных выше типичных воплощений, но должны определяться только в соответствии с приведенной далее формулой изобретения и ее эквивалентами.

[0209] Все различные аспекты, воплощения и возможные варианты, описанные в данной заявке, могут быть объединены во всевозможных вариациях.

[0210] Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в этом описании, включены в данное описание посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, каждый отдельный патент или каждая отдельная патентная заявка были конкретно и отдельно указаны как включенные посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющий комплементарность домен 1 тяжелой цепи (CDRH1), содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1, 4, 7, 10, 14 или 17, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, 5, 8, 11, 15 или 18, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12, 13, 16 или 19; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую определяющий комплементарность домен 1 легкой цепи (CDRL1), содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 20, 23, 26 или 29, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 21, 24, 27 или 30, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 22, 25, 28 или 31.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащие: вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 3; и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 20, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 21, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 22;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 4, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 5, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 6; и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 23, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 24, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 25;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 7, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 8, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 9; и вариабельную область легкой

цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 26, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 27, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 28;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 10, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 11, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 12 или 13; и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 20, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 21, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 22;

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16; и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 20, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 21, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 22; или

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 17, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 18, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 19; и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 29, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 30, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 31.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащие: вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность с SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37 или 38; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность с SEQ ID NO: 39, 40, 41 или 42.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащие: вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 32, 33, 34, 35, 36, 37 или 38; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 39, 40, 41

или 42.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащие:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 1, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 2, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 3; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 20, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 21, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 22.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащие:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 4, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 5, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 6; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 23, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 24, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 25.

7. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие: вариабельную область тяжелой цепи, содержащую определяющий комплементарность домен 1 тяжелой цепи (CDRH1), содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 66, 69, 72, 75 или 78, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 67, 70, 73, 76 или 79, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 68, 71, 74, 77 или 80; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 81, 84, 87, 90 или 93, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 82, 85, 88, 91 и 94, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 83, 86, 89, 90 и 95.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 7, содержащие вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 66, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 67, и CDRH3, содержащий

аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 68; и переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 81, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 82, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 83;

переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 69, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 70, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 71; и переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 84, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 85, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 86;

переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 72, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 73, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 74; и переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 87, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 88, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 89;

переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 75, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 76, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 77; и переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 90, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 91, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 92; или

переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 78, CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 79, и CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 80; и переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 93, CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 94, и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 95.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-8, где антитело представляет собой человеческое антитело или химерное антитело.

10. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-9.

11. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 10.

12. Клетка, трансформированная вектором экспрессии по п. 11.

13. Композиция для предупреждения или лечения рака, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п.п. 1-9.

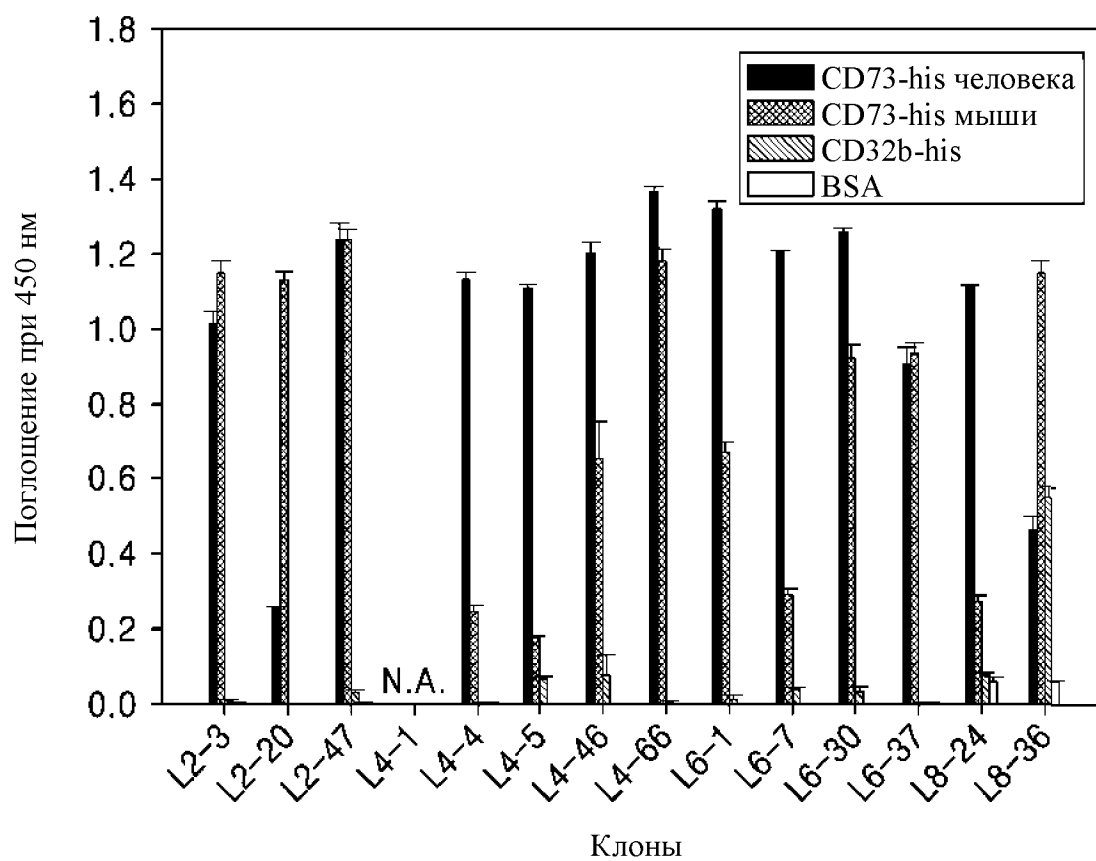
14. Композиция по п. 13, дополнительно содержащая блокирующий агент иммунной контрольной точки или химиотерапевтический агент.

15. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из п.п. 1-9.

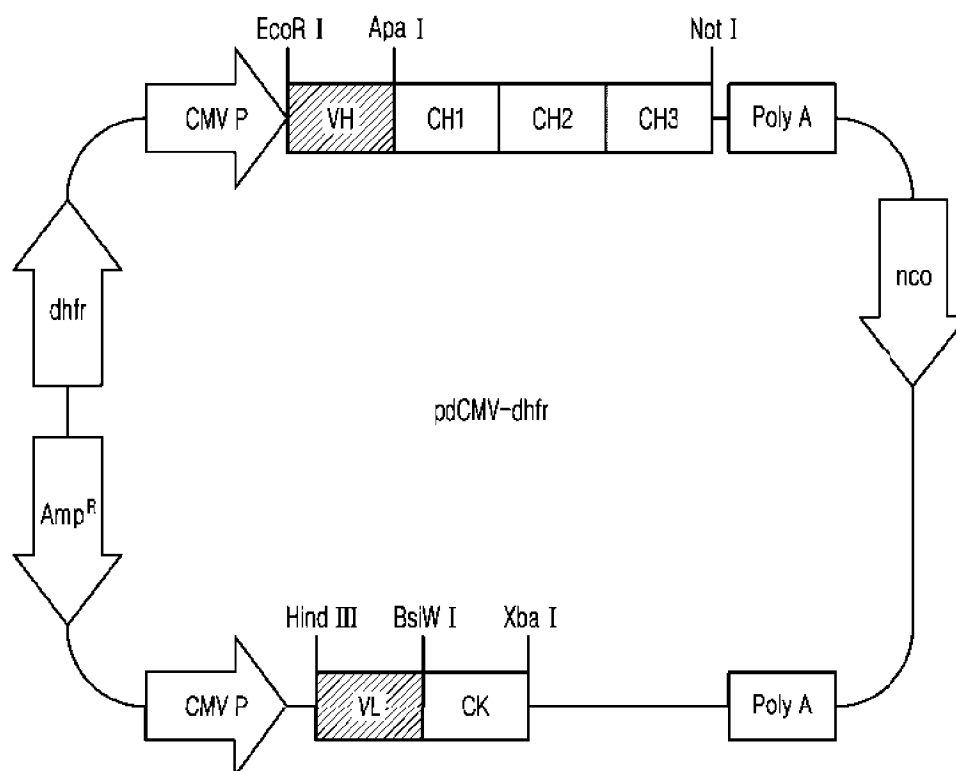
16. Способ по п. 15, где рак представляет собой рак, сверхэкспрессирующий CD73 (кластер дифференцировки 73).

17. Способ по п. 15 или 16, где рак представляет собой рак молочной железы, трижды негативный рак молочной железы (TNBC), рак поджелудочной железы, колоректальный рак, рак яичника, рак желудочно-кишечного тракта, рак мочевого пузыря, лейкоз, рак предстательной железы, злокачественную меланому, рак пищевода, рак желудка, рак головы и шеи, рак легкого или рак почки.

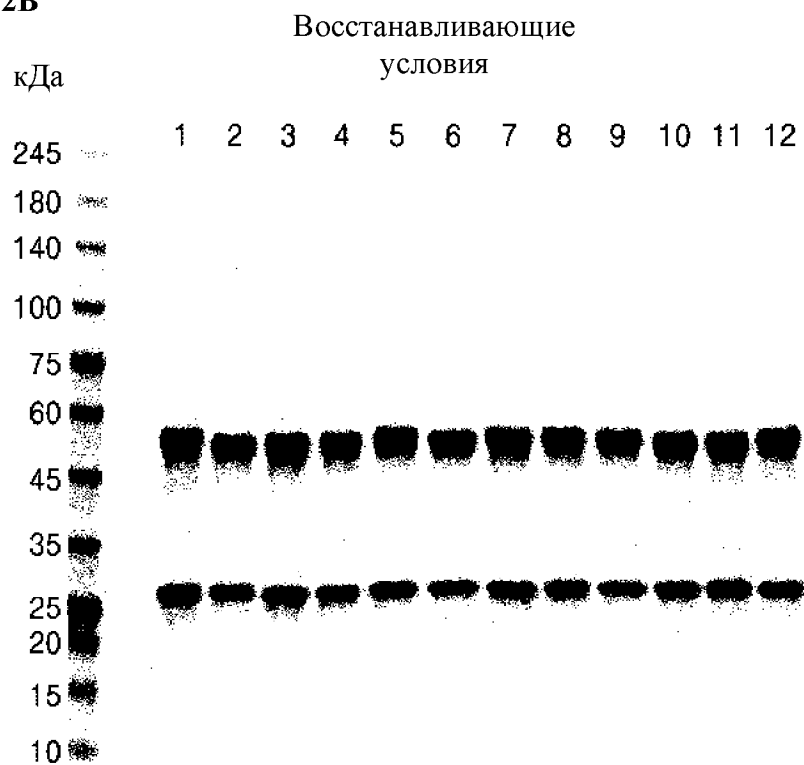
ФИГ. 1



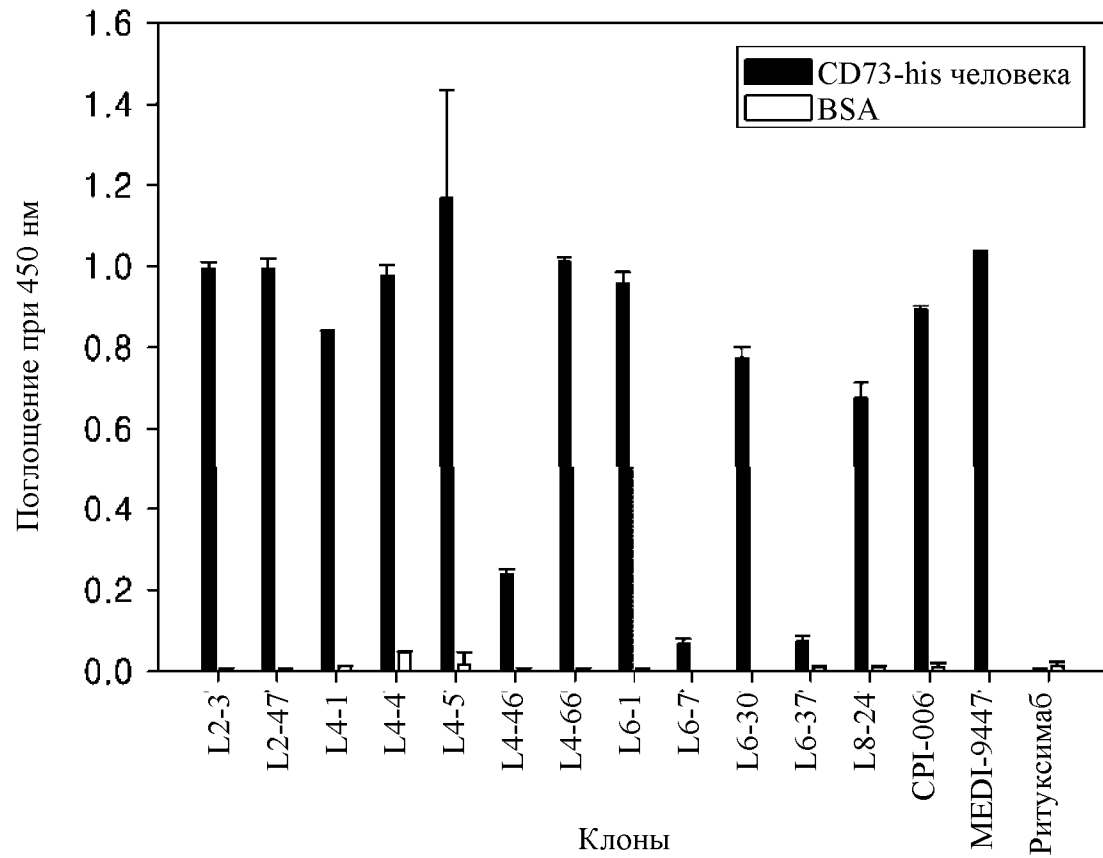
ФИГ. 2А

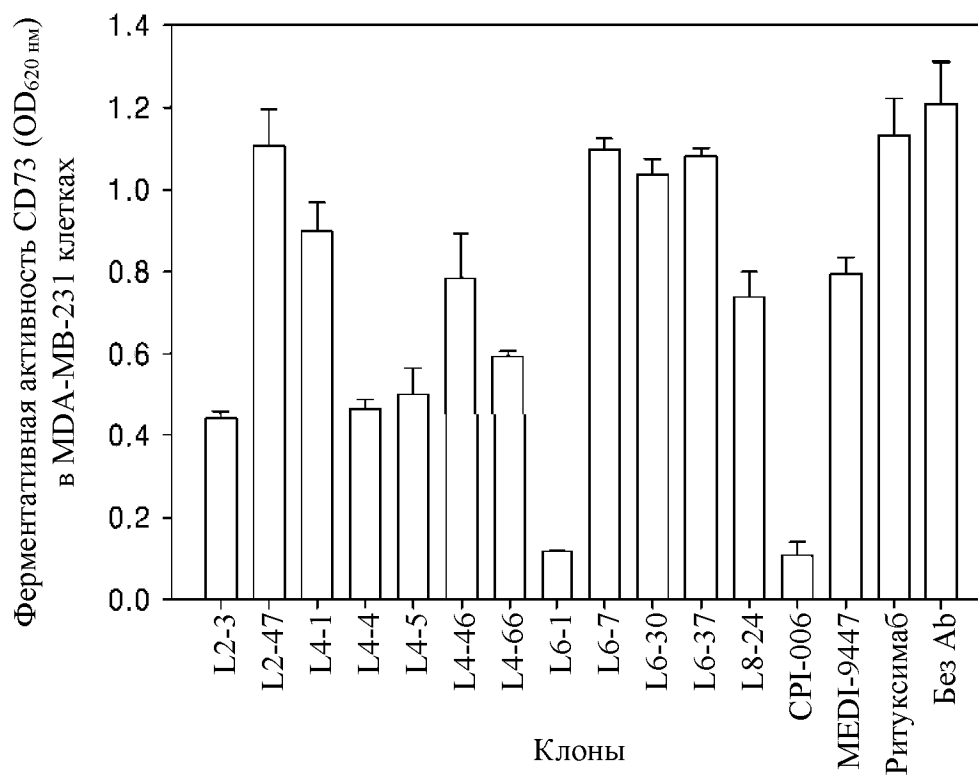


ФИГ. 2В

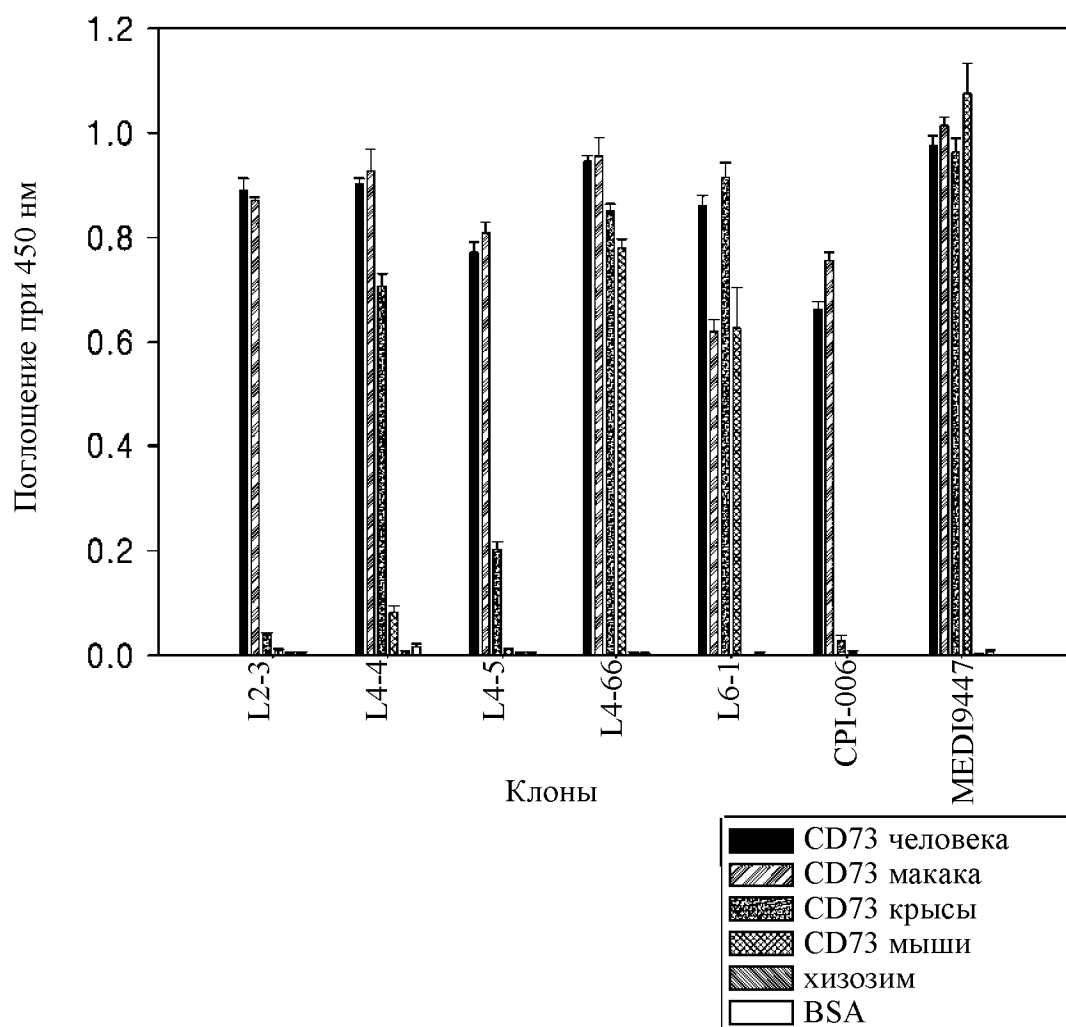


ФИГ. 3А

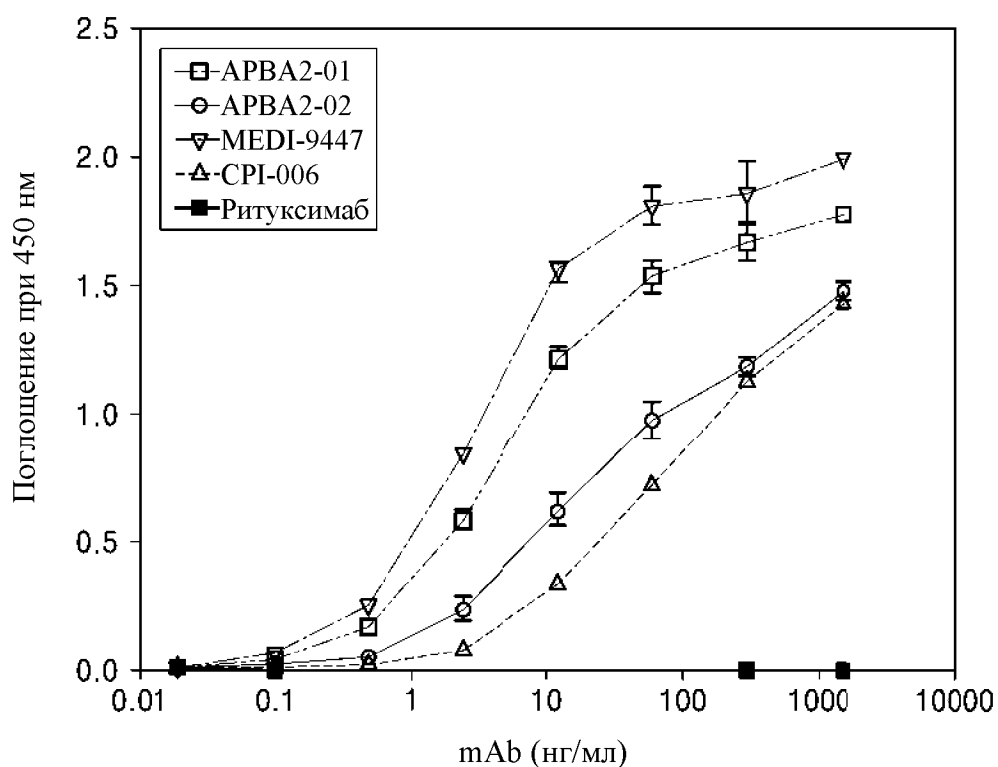


ФИГ. 3В

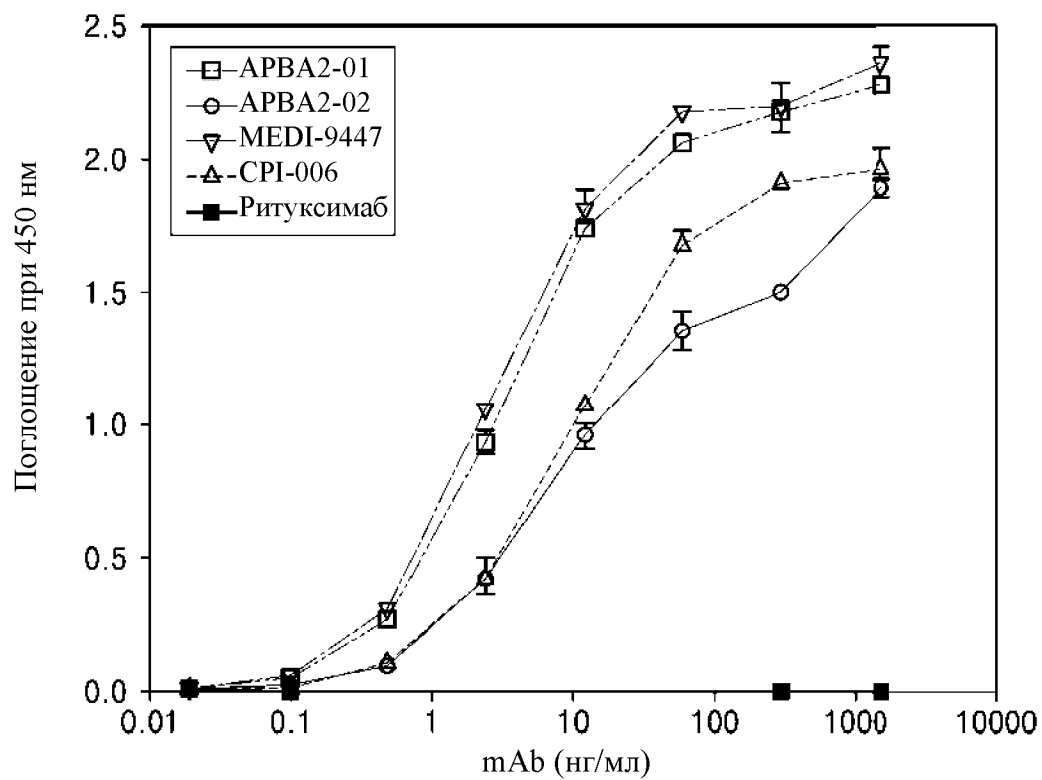
ФИГ. 3С



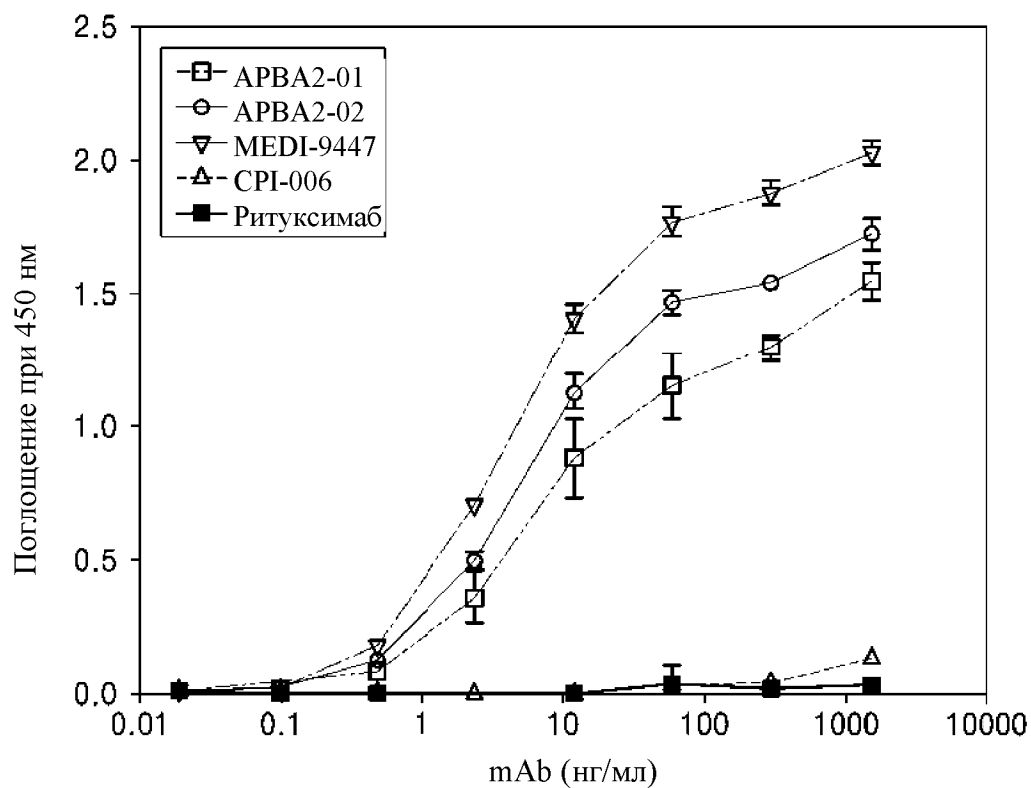
ФИГ. 4А



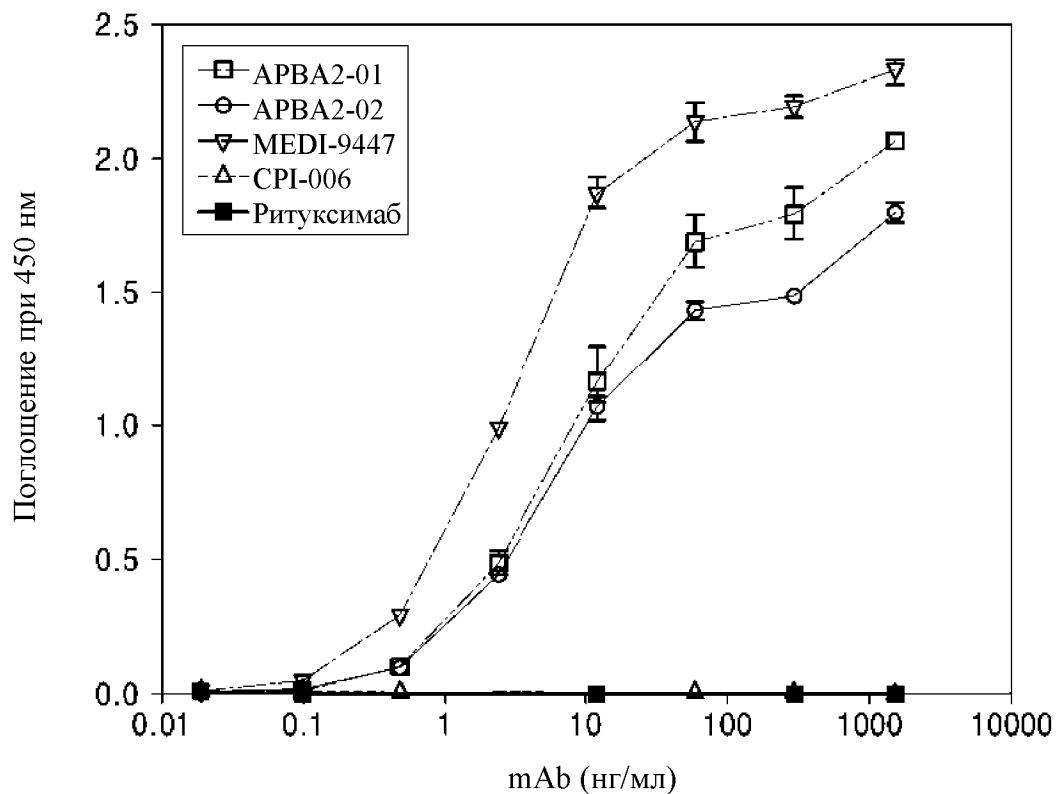
ФИГ. 4В



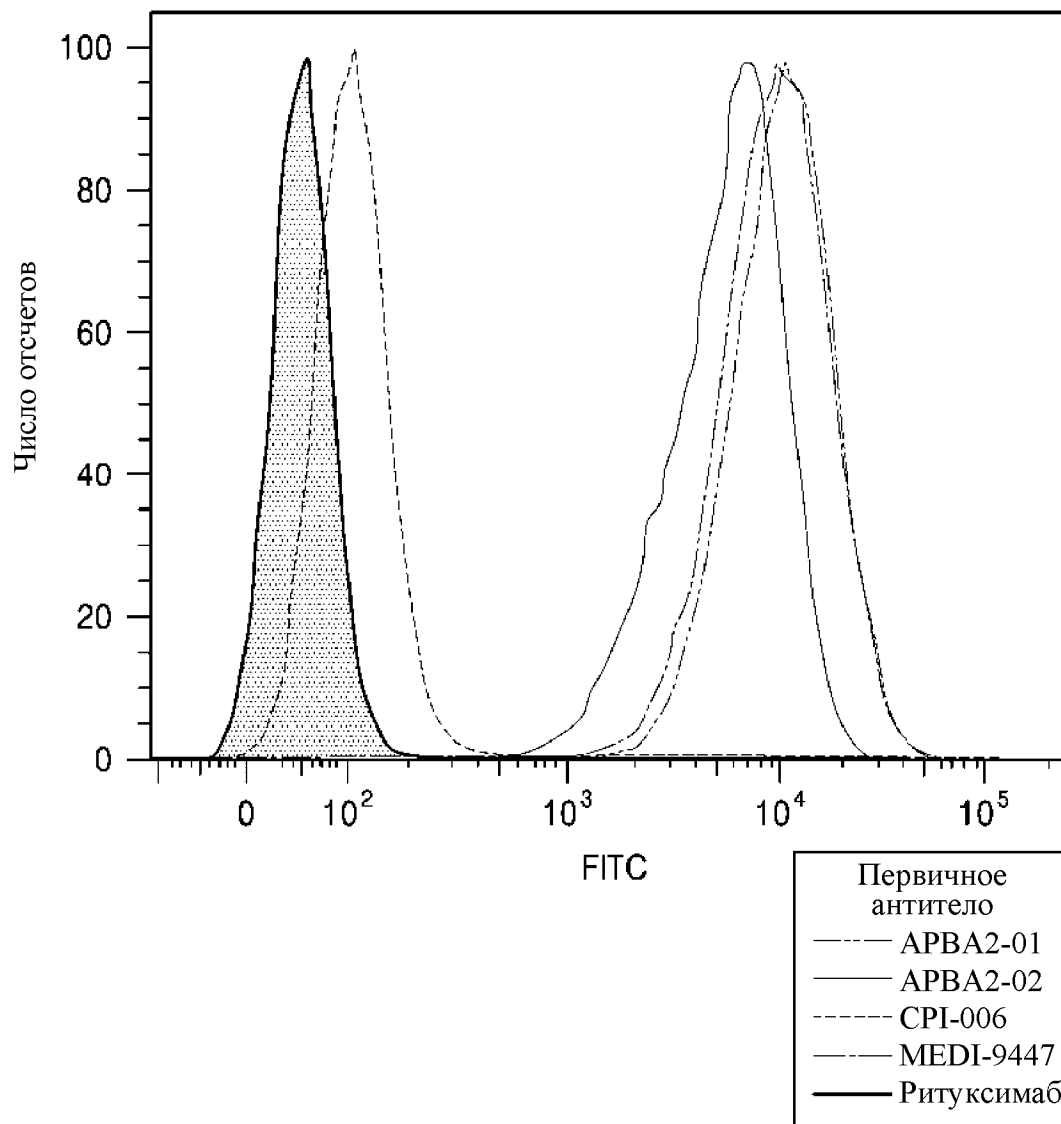
ФИГ. 4С



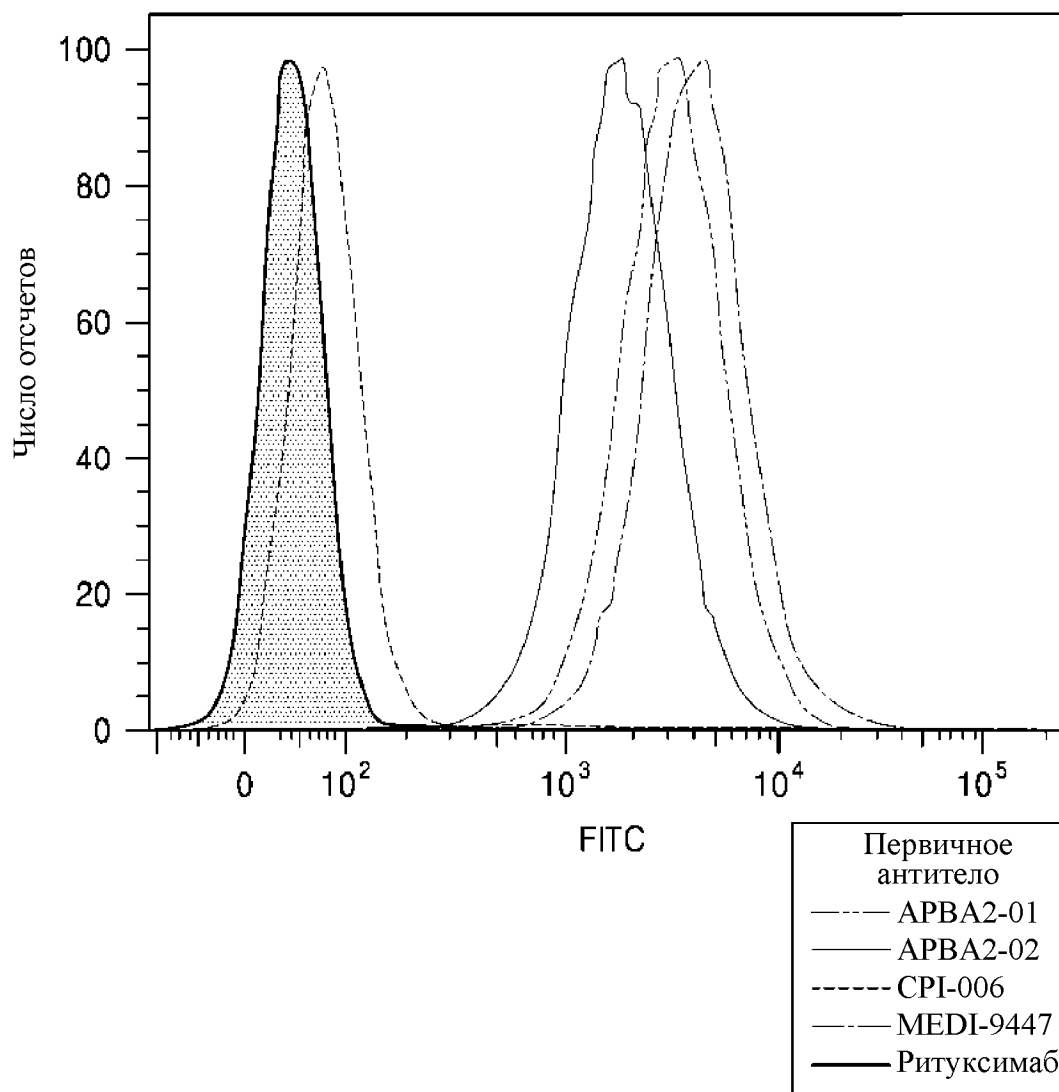
ФИГ. 4D

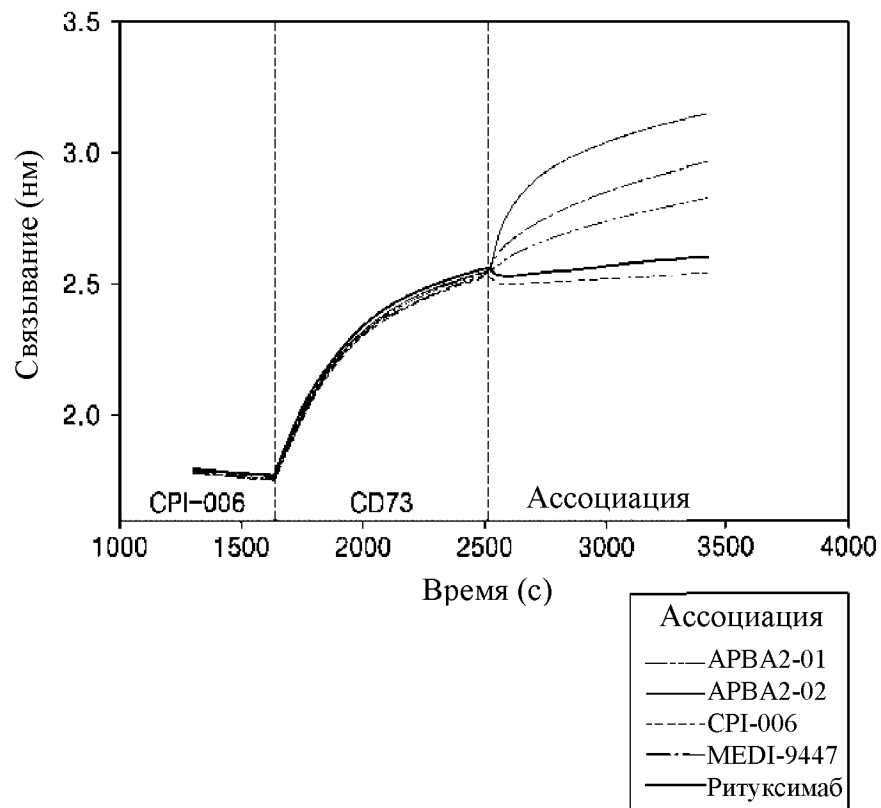


ФИГ. 5А

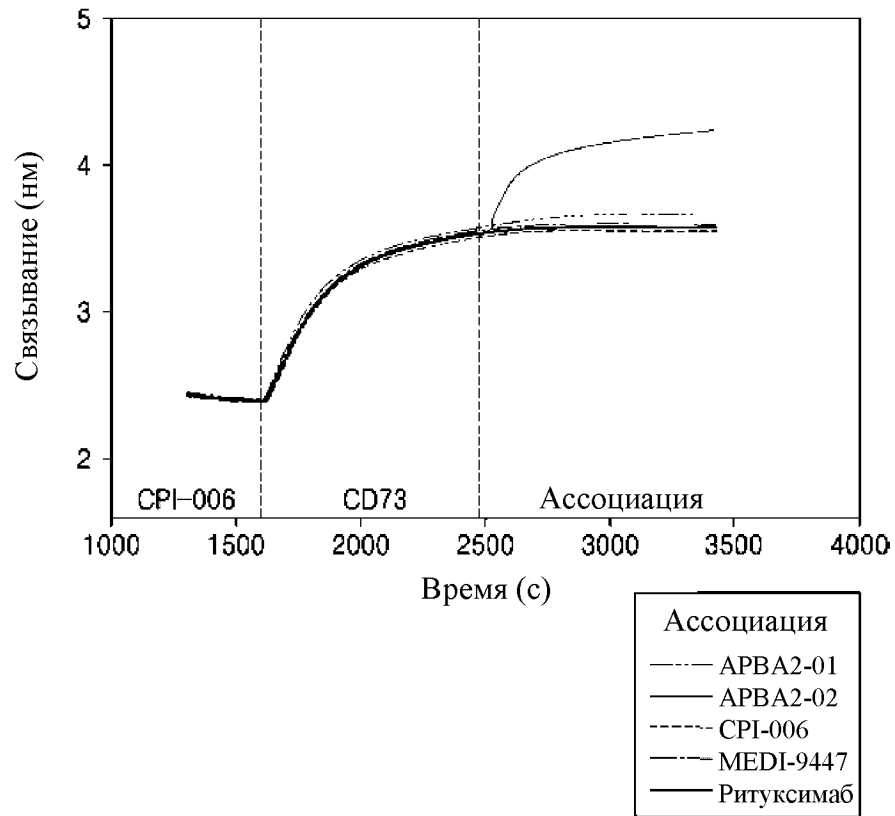


ФИГ. 5В

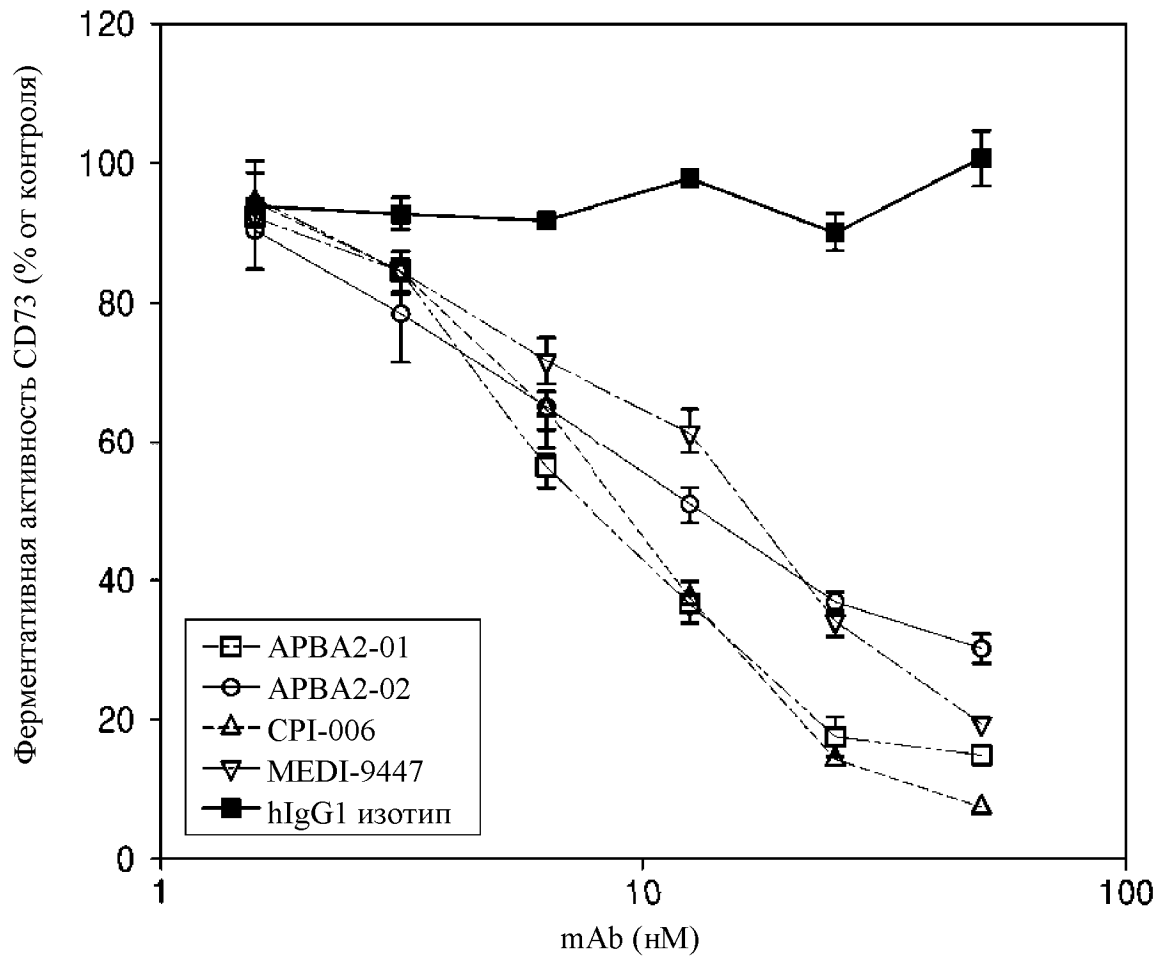


ФИГ. 6А

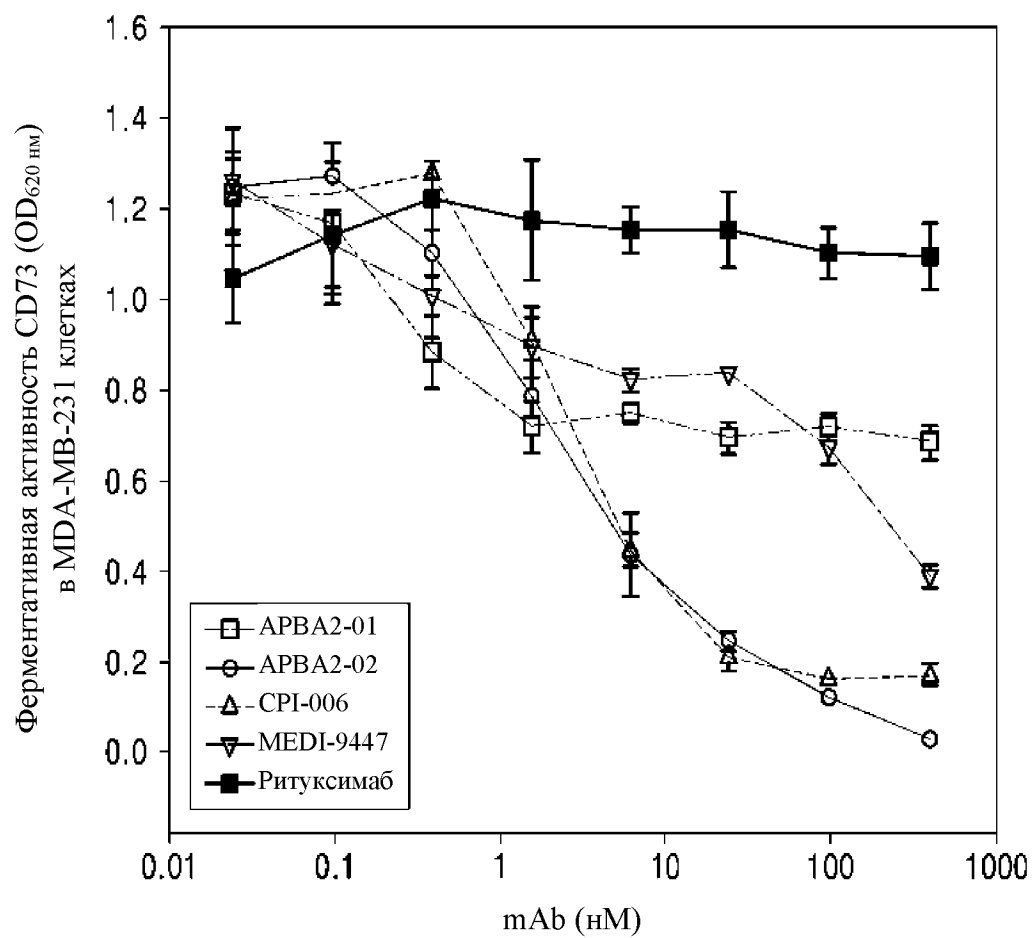
ФИГ. 6В



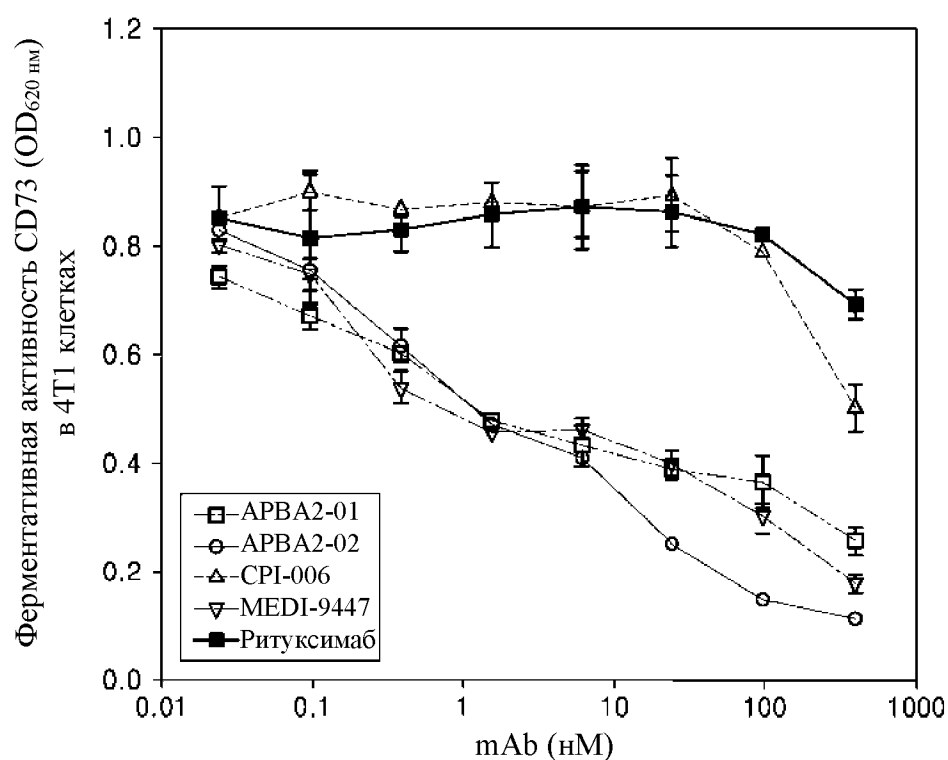
ФИГ. 7



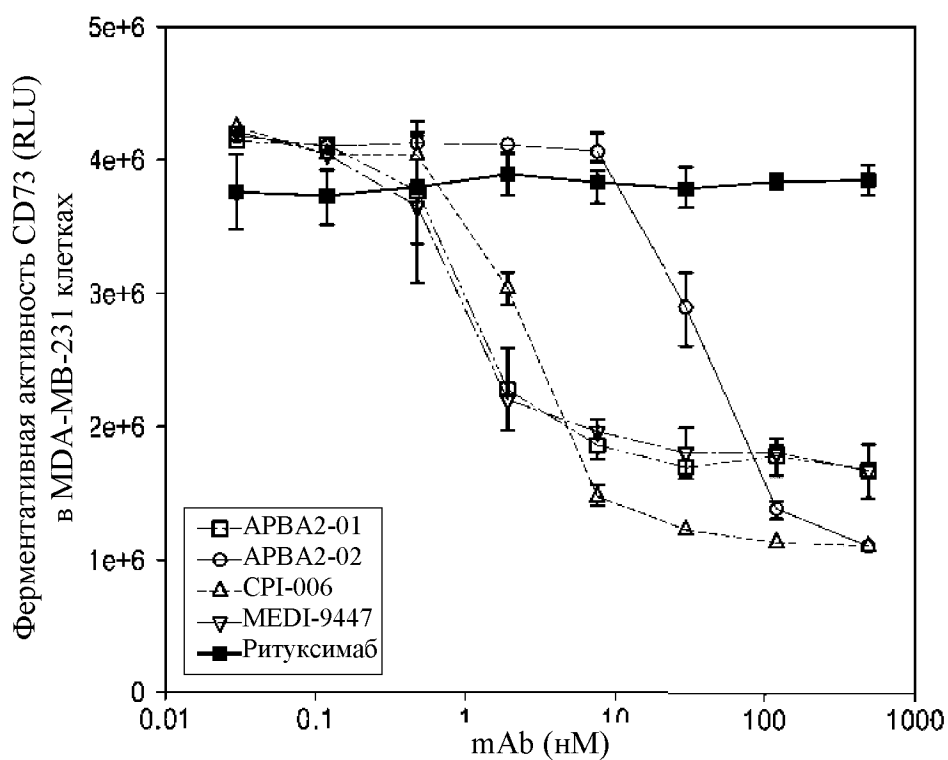
ФИГ. 8А



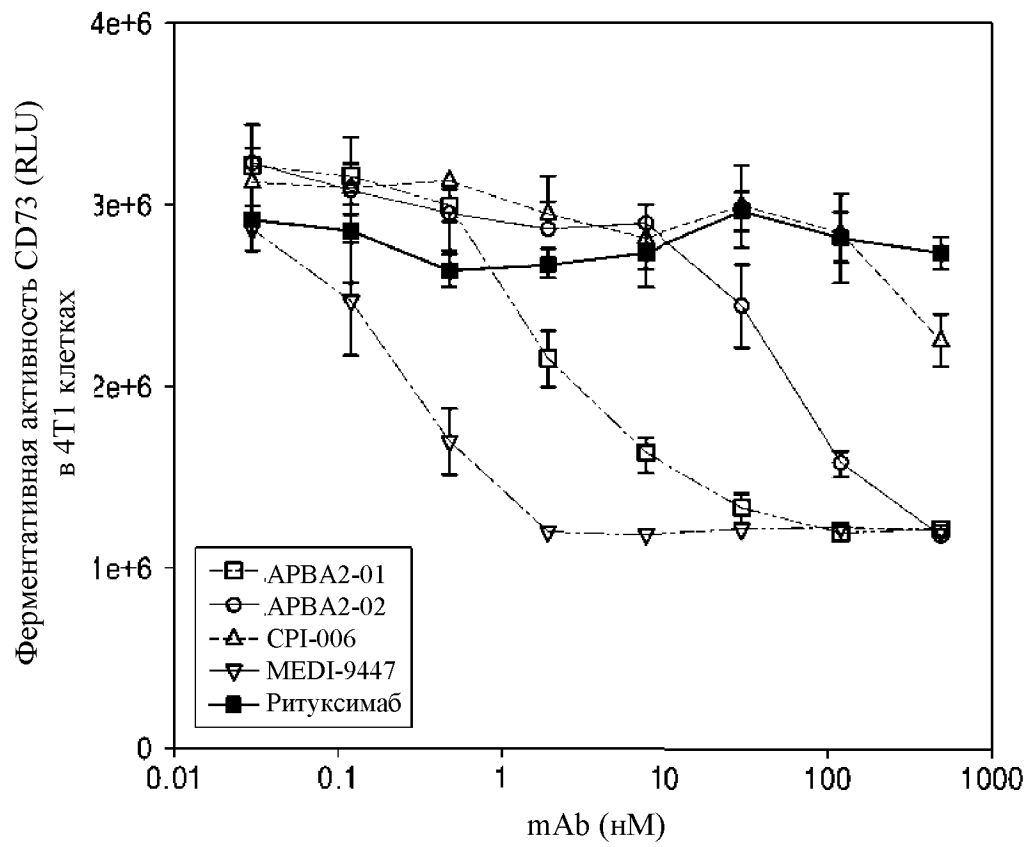
ФИГ. 8В



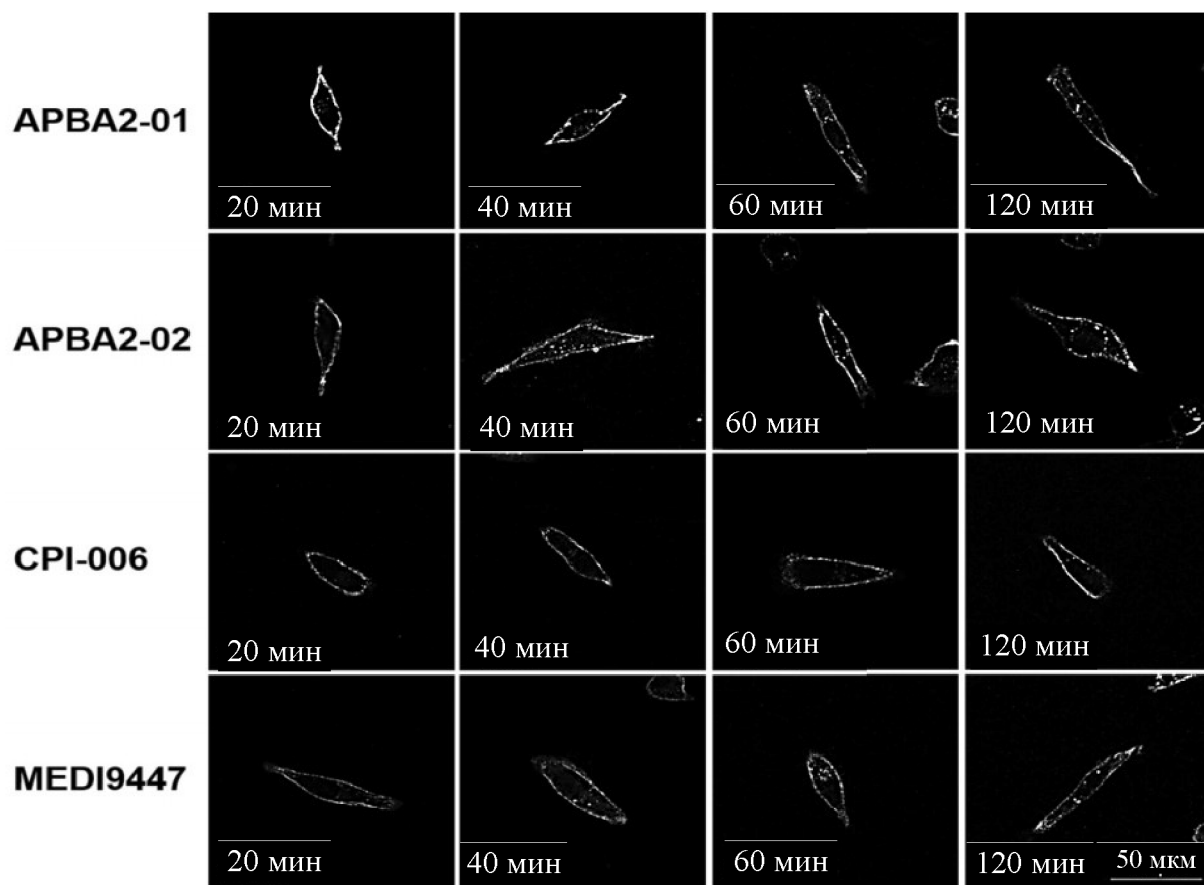
ФИГ. 8С

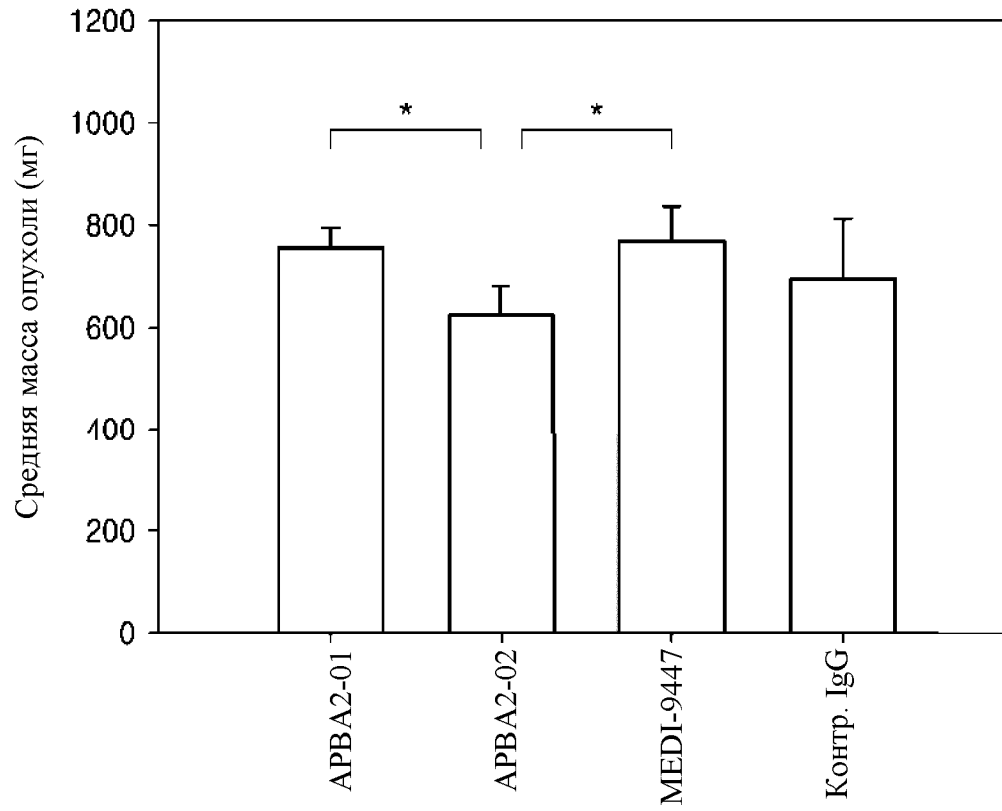


ФИГ. 8D

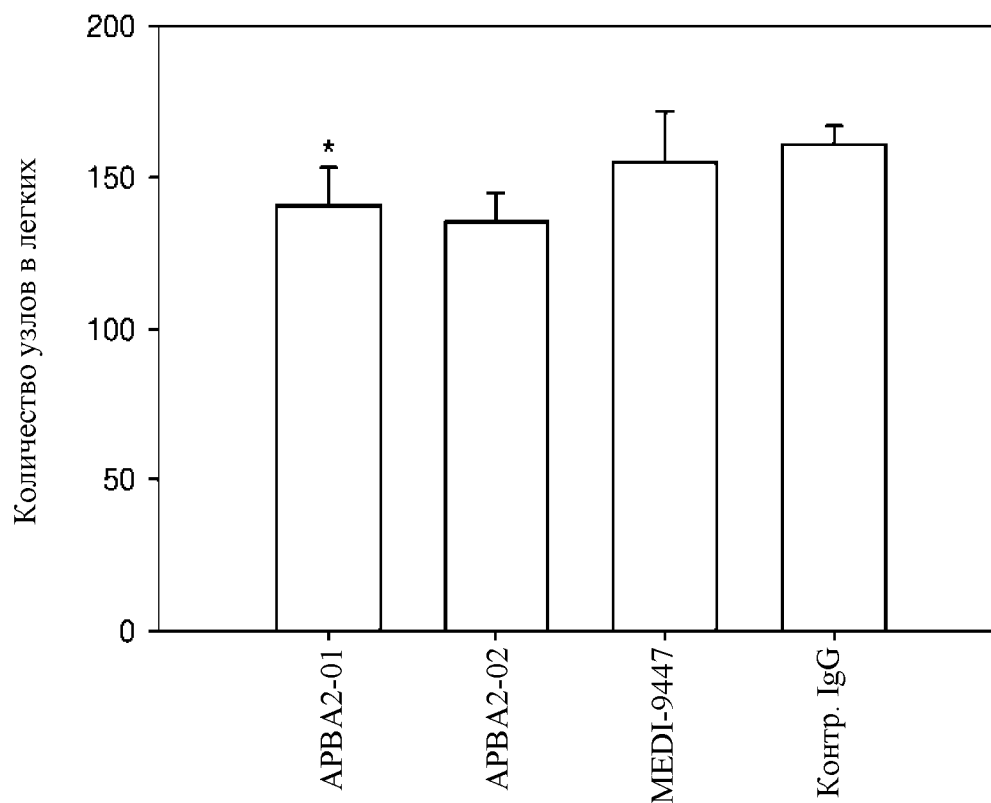


ФИГ. 9

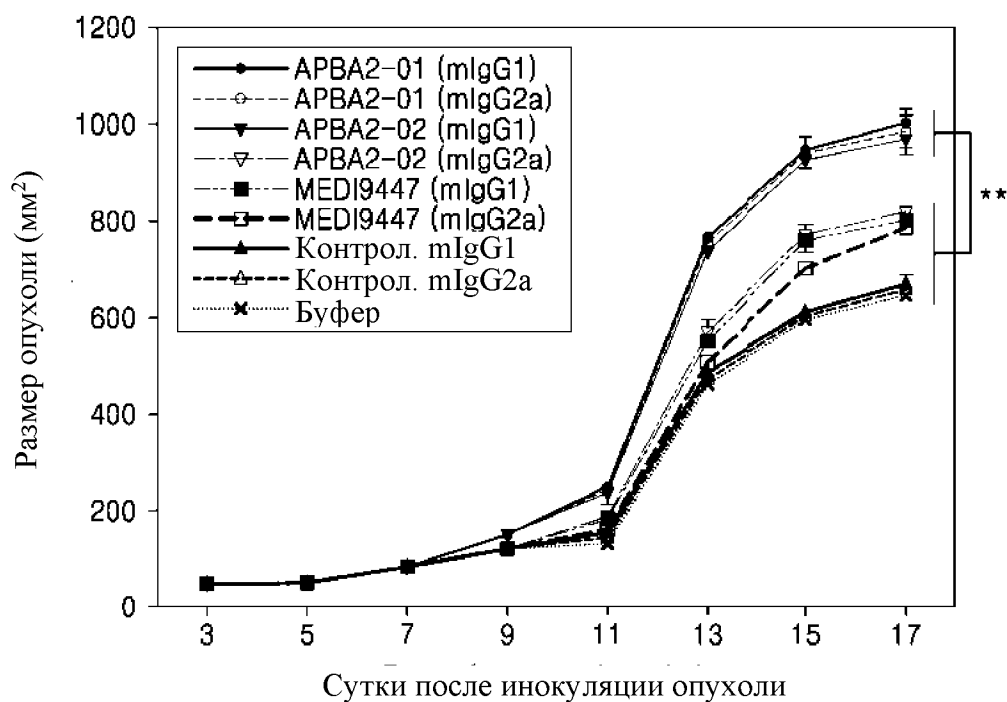


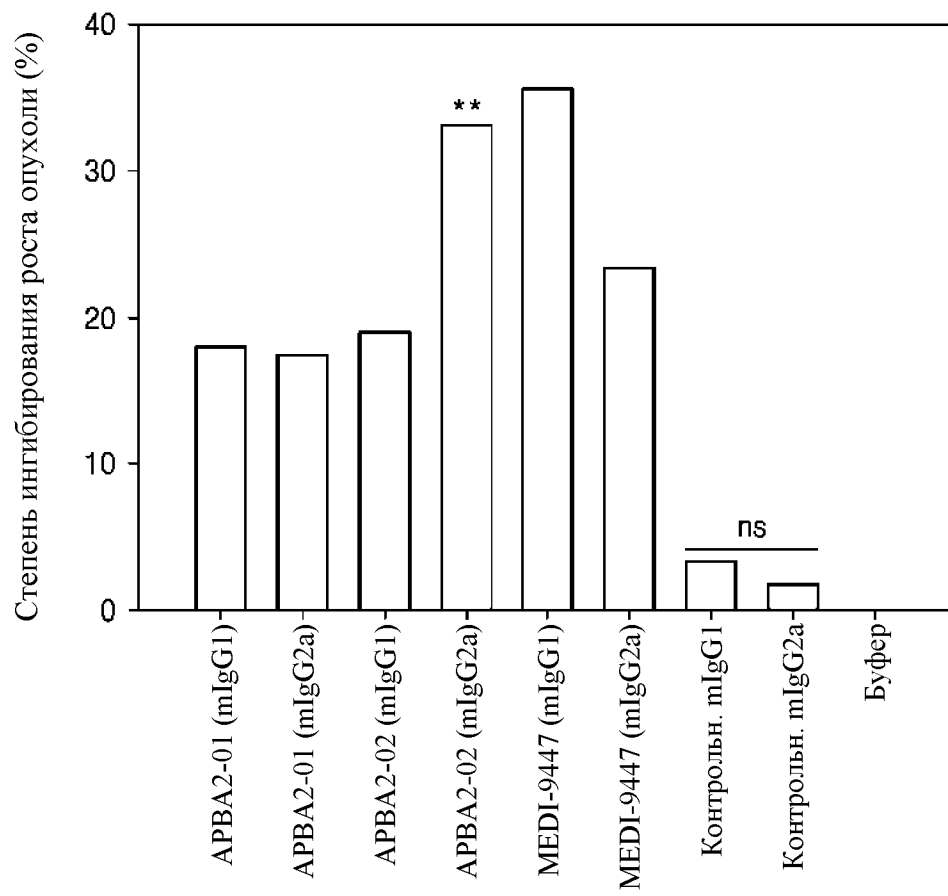
ФИГ. 10А

ФИГ. 10В



ФИГ. 11А



ФИГ. 11В

Масса тела (мг)

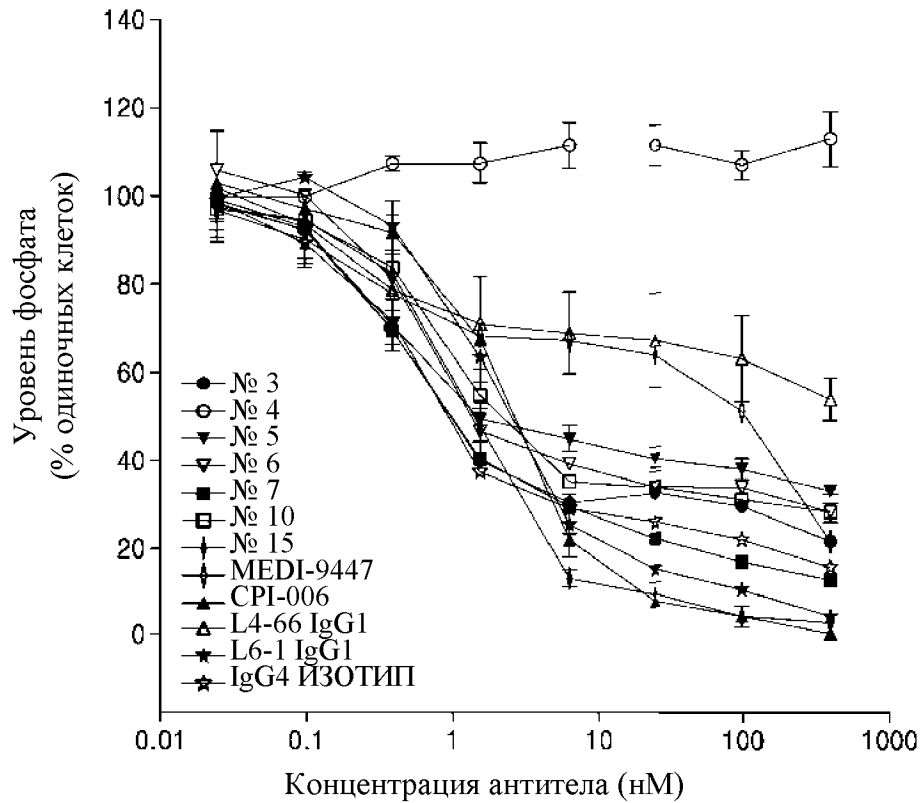
Сутки после инокуляции опухоли

ns

Legend:

- APBA2-01 (mIgG1)
- APBA2-01 (mIgG2a)
- APBA2-02 (mIgG1)
- APBA2-02 (mIgG2a)
- MEDI9447 (mIgG1)
- MEDI9447 (mIgG2a)
- Контрольн. mIgG1
- Контрольн. mIgG2a
- Буфер

ФИГ. 12А



ФИГ. 12В

