

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293040** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.03.01

(22) Дата подачи заявки
2021.04.22

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛО ПРОТИВ CD73 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **202010324782.X; 202011152518.9**

(32) **2020.04.22; 2020.10.23**

(33) **CN**

(86) **PCT/CN2021/088987**

(87) **WO 2021/213466 2021.10.28**

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

(72) Изобретатель:

**Ван Чжунминь, Чжан Пэн, Ли Байюн,
Ся Юй (CN)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложено антитело против CD73 и его применение. В частности, переменная область тяжелой цепи антитела содержит HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15-17, соответственно. Кроме того, переменная область легкой цепи антитела содержит LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 18-20, соответственно.

A1

202293040

202293040

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575936EA/061

АНТИТЕЛО ПРОТИВ CD73 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области иммунологии и, в частности, к антителу против CD73 и его применению.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Экто-5'-нуклеотидаза, а именно белок CD73, представляет собой многофункциональный гликопротеин, кодируемый геном NT5E и имеющий молекулярную массу белка 70 кДа, который закрепляется на клеточной мембране гликозилфосфатидилинозитолом (GPI) (Zimmermann H. Biochem J. 1992).; 285:345-365).

CD73 широко распространен на поверхности клеток тканей человека, и в исследованиях было обнаружено, что CD73 в высокой степени экспрессируется в различных солидных опухолях, особенно в опухолевых клетках, дендритных клетках, регуляторных Т-клетках (Treg), клетках-натуральных киллерах (NK-клетках), клетках-супрессорах миелоидного происхождения (MDSC), опухолеассоциированных макрофагах (TAM) и т. п. в микроокружении опухоли. Важной особенностью микроокружения опухоли является гипоксия. Гипоксия индуцирует положительную регуляцию молекул, таких как индуцируемый гипоксией фактор-1 (HIF-1), тем самым приводя к широкой экспрессии CD73 в микроокружении опухоли (Synnestvedt K, et al. J Clin Invest. 2002; 110:993-1002). Анализ образцов клинических опухолей показывает, что высокая экспрессия CD73 является потенциальным биомаркером и тесно связана с неблагоприятным прогнозом различных типов опухолей, включая рак молочной железы, рак легкого, рак яичников, рак почки, рак желудка, рак головы и шеи и рак молочной железы.

CD73 обладает как гидролазной, так и негидролазной активностью. Ферментативная и неферментативная функции CD73 одновременно присутствуют в родственном опухолевом процессе и взаимно способствуют и поддерживают эволюцию опухоли. Все больше и больше исследований показывают, что CD73 является ключевой регуляторной молекулой для пролиферации, метастазирования и инвазии опухолевых клеток *in vitro*, а также для ангиогенеза опухоли и механизма ускользания опухоли от иммунного ответа *in vivo*, где важный механизм иммуносупрессии опосредован метаболическим сигнальным путем CD73-аденозин. CD39, расположенный выше CD73 по сигнальному пути, может катализировать АТФ с образованием аденозинмонофосфата (АМФ), сгенерированный АМФ превращается в аденозин с помощью CD73, а аденозин связывается с расположенным ниже по сигнальному пути аденозиновым рецептором (A2AR). A2AR ингибирует ряд сигнальных путей, связанных с иммунной активацией, таких как LCK, MAPK, PKC, и ингибирует иммунный эффект уничтожения Т-клеток путем активации протеинкиназы А (PKA) и киназы Csk, тем самым играя иммуносупрессивную роль для достижения ускользания от иммунного ответа (Antonioli L,

et al. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13:842-857). Доклинические исследования на животных моделях показывают, что CD73, экспрессируемый иммунными и неиммунными клетками, может способствовать ускользанию от иммунного ответа, развитию и метастазированию опухолей, при этом ингибирование функций цитотоксических Т-клеток (CTL) и NK-клеток с помощью связанных с Treg-клетками сигналов CD73-аденозина наиболее очевидно.

Для лечения солидных опухолей одним из важных аспектов преодоления лекарственной устойчивости и улучшения лечебного эффекта является ослабление ингибирующего эффекта микроокружения опухоли (ТМЕ) в отношении иммунных эффекторных клеток. ТМЕ представляет собой очень сложную систему, состоящую из различных клеток, межклеточного матрикса, ферментов, цитокинов, метаболитов и т. д., и имеет характеристики значительно низкого содержания водорода, низкого рН и высокого давления и сильно отличается от нормальных тканей. Гипоксия или обогащение АТФ, вызванное химиолучевой терапией для уничтожения опухолевых клеток, способствует каскадной реакции сигналов аденозина CD39-CD73, которая полезна для пролиферации и функции различных клеток, способствующих развитию опухоли, и не полезна для клеток, ингибирующих опухоль (Regateiro, F.S., Cobbold, S.P. & Waldmann, H. *Clin. Exp. Immunol.* 2013; 171:1-7).

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

Связь между сверхэкспрессией CD73 и подтипом опухоли, прогнозом и реакцией пациентов на лекарственные препараты показала, что CD73 может быть важным маркером для будущего лечения опухоли и выявления индивидуумов. Поэтому без изучения мишени CD73 не обойтись.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

После интенсивных исследований и творческих усилий авторы изобретения использовали системы экспрессии клеток млекопитающих для экспрессии рекомбинантного человеческого CD73 в качестве антигена для иммунизации мышей и получили гибридомные клетки путем слияния клеток селезенки мыши и клеток миеломы. Авторы изобретения получили гибридомную клеточную линию LT014 (номер сохранения: ССТСС NO: С2018137) путем скрининга большого количества образцов.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что гибридомная клеточная линия LT014 может секретировать специфическое моноклональное антитело (названное как 19F3), специфически связывающееся с CD73 человека, и моноклональное антитело может

эффективно ингибировать реакцию ферментативной активности CD73 в режиме конкуренции без субстрата, снижать продукцию аденозина, способствовать активности Т-клеток и оказывать эффект ингибирования роста опухоли. Кроме того, авторы изобретения творчески получили гуманизированные антитела против CD73 человека (названные 19F3H1L1, 19F3H2L2 и 19F3H2L3); и на основе описанных выше гуманизированных антител получили новое гуманизированное антитело с элиминированной ADCC-активностью (названное как 19F3H1L1(hG1DM), 19F3H2L2(hG1DM) и 19F3H2L3(hG1DM)) путем введения аминокислотной мутации в константную область тяжелой цепи.

Авторы изобретения также неожиданно обнаружили, что антитела по настоящему изобретению, такие как 19F3H1L1, 19F3H2L2 и 19F3H2L3, обладают активностью индукции эндоцитоза CD73, экспрессируемого клеточными мембранами, и могут снижать активность CD73, и, кроме того, подвергнутые мутации антитела, такие как 19F3H2L3(hG1DM), не связываются с FcγRIIIa, который вызывает антителоопосредованную цитотоксичность, что значительно повышает безопасность. Антитела по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения опухолей.

Один аспект настоящего изобретения относится к антителу против CD73 (например, CD73 человека) или его антигенсвязывающему фрагменту, где антитело против CD73 содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR2, содержащиеся в варибельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 10; и LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в варибельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 14,

предпочтительно, согласно системе нумерации IMGT, антитело против CD73 содержит:

HCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или больше (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью,

HCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или больше (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью,

HCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%,

85%, 86%, 87%, 88% , 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или больше (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью,

LCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% , 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или больше (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью,

LCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19, последовательности, содержащей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% , 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотная последовательность, имеющая один или больше (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью, и

LCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88% , 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или больше (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью,

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения переменная область тяжелой цепи антитела содержит или состоит из следующих последовательностей:

последовательности SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 10, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 2 , SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 10, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или больше (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 10; и

переменная область легкой цепи антитела содержит или состоит из следующих последовательностей:

последовательности SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 14, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 14, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или более (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения переменная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, а переменная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

переменная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и переменная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8;

переменная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и переменная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; или

переменная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и переменная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит константную область тяжелой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 21, то есть точечная мутация лейцина в аланин введена в положение 234 (L234A) и точечная мутация лейцина в аланин введена в положение 235 (L235A) на основе С-области гамма-1-цепи Ig и № доступа: P01857, и константную область легкой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 22, а именно С-область каппа-цепи Ig, № доступа: P01834; или константная область тяжелой цепи представляет собой С-область гамма-1-цепи Ig, № доступа: P01857, и константная область легкой цепи представляет собой С-область каппа-цепи Ig, № доступа: P01834).

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

Предпочтительно CDR также могут быть определены системой нумерации IMGT, см. Ehrenmann, Francois, Quentin Kaas and Marie-Paule Lefranc. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF. Nucleic acids research 2009; 38(suppl_1): D301-D307.

Аминокислотные последовательности областей CDR последовательностей моноклональных антител анализируют в соответствии с определением IMGT техническими средствами, хорошо известными специалистам в данной области, например, с использованием базы данных VBASE2.

Антитела 19F3, 19F3H1L1, 19F3H2L2 и 19F3H2L3, используемые в настоящем изобретении, имеют идентичные CDR.

Аминокислотные последовательности 3 областей CDR варибельной области тяжелой цепи следующие:

HCDR1: GYSFTGYT (SEQ ID NO: 15),

HCDR2: INPYNAGT (SEQ ID NO: 16) и

HCDR3: ARSEYRYGGDYFDY (SEQ ID NO: 17);

аминокислотные последовательности 3 областей CDR варибельной области легкой цепи следующие:

LCDR1: QSLLNSSNQKNY (SEQ ID NO: 18),

LCDR2: FAS (SEQ ID NO: 19) и

LCDR3: QQHYDTPYT (SEQ ID NO: 20).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой моноклональное антитело.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело представляет собой гуманизованное антитело, химерное антитело или полиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающий фрагмент выбран из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, Fab/c, фрагмента определяющей комплементарность области, одноцепочечного антитела (например, scFv), гуманизованного антитела, химерного антитела и биспецифического антитела.

Другой аспект настоящего изобретения относится к выделенному полипептиду, выбранному из группы, состоящей из:

(1) выделенного полипептида, содержащего последовательности SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17, где полипептид специфически связывается с CD73 как часть антитела против CD73, и антитело дополнительно содержит последовательности SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20;

(2) выделенного полипептида, содержащего последовательности SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, где полипептид специфически связывается с CD73 как часть антитела против CD73, и антитело дополнительно содержит последовательности SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17;

(3) выделенного полипептида, содержащего последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 10, последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную

последовательность, имеющую одну или больше (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью, где полипептид специфически связывается с CD73 как часть антитела против CD73, и антитело дополнительно соответственно содержит последовательность SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 12, последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94% , 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или больше (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью;

(4) выделенного полипептида, содержащего последовательность SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 12, последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84% , 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или больше (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью, где полипептид специфически связывается с CD73 как часть антитела против CD73, и антитело дополнительно соответственно содержит последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 10, последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94% , 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или больше (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью;

(5) выделенного полипептида, содержащего последовательность SEQ ID NO: 10, последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84% , 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или больше (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью, где полипептид специфически связывается с CD73 как часть антитела против CD73, и антитело дополнительно соответственно содержит последовательность SEQ ID NO: 14, последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94% , 95%,

96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или больше (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью;

(б) выделенного полипептида, содержащего последовательность SEQ ID NO: 14, последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или больше (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью, где полипептид специфически связывается с CD73 как часть антитела против CD73, и антитело дополнительно соответственно содержит последовательность SEQ ID NO: 10, последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или больше (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью.

Другой аспект настоящего изобретения относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или выделенному полипептиду в соответствии с любым из аспектов настоящего изобретения.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к вектору, содержащему раскрытую в настоящем описании выделенную молекулу нуклеиновой кислоты.

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

Еще один аспект настоящего изобретения относится к конъюгату, содержащему антитело и конъюгированный фрагмент, где антитело представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из аспектов настоящего изобретения, а конъюгированный фрагмент представляет собой метку для очистки (например, His-метку), детектируемую метку; предпочтительно конъюгированный фрагмент представляет собой радиоизотоп, флуоресцентное вещество, хемилюминесцентное вещество, окрашенное вещество, полиэтиленгликоль или фермент.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к слитому белку или полиспецифичному антителу (предпочтительно биспецифическому антителу), содержащему антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из аспектов настоящего изобретения.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к набору, включающему антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из аспектов

настоящего изобретения, конъюгат, слитый белок или полиспецифическое антитело по настоящему изобретению; предпочтительно набор дополнительно содержит вторичное антитело, специфически распознающее антитело; необязательно вторичное антитело дополнительно содержит детектируемую метку, такую как радиоизотоп, флуоресцентное вещество, хемилюминесцентное вещество, окрашенное вещество или фермент.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к применению антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с любым из аспектов настоящего изобретения, конъюгата, слитого белка или полиспецифического антитела по настоящему изобретению при приготовлении набора, используемого для детектирования присутствия или уровня CD73 в образце.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из аспектов настоящего изобретения, конъюгат, слитый белок или полиспецифическое антитело по настоящему изобретению; необязательно, фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество. Предпочтительно фармацевтическая композиция находится в форме, подходящей для введения путем подкожной инъекции, внутрикожной инъекции, внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции или инъекции в очаг поражения.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к применению антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с любым из аспектов настоящего изобретения, конъюгата, слитого белка или полиспецифического антитела по настоящему изобретению при получении лекарственных средств для лечения и/или предотвращения опухоли (такой как солидная опухоль, предпочтительно немелкоклеточный рак легкого, рак предстательной железы (включая метастатический резистентный к кастрации рак предстательной железы (mCRPC)), трижды негативный рак молочной железы, рак яичников, колоректальный рак (включая колоректальный рак с микросателлитной стабильностью (MSS)), рак желудка, меланома, рак головы и шеи, почечно-клеточная карцинома или аденокарцинома протоков поджелудочной железы) или при получении лекарственного средства для диагностики опухоли.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к гибридной клеточной линии LT014, которая была депонирована в Китайском центре коллекции типовых культур (СТССС) под номером коллекции ССТСС NO: C2018137.

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

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

Используемый в настоящем описании термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, которая обычно состоит из двух пар полипептидных цепей (каждая пара с одной «легкой» (L) цепью и одной «тяжелой» (H) цепью). Легкие цепи антител классифицируются как легкие цепи κ и λ . Тяжелые цепи классифицируются как μ , δ , γ , α или ϵ . Изотипы антител определяются как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. В легких цепях и тяжелых цепях переменная область и константная область связаны областью «J», состоящей примерно из 12 или больше аминокислот, а тяжелая цепь также содержит область «D», состоящую примерно из 3 или больше аминокислот. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (CH). Константная область тяжелой цепи состоит из 3 доменов (CH1, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Константная область антитела может опосредовать связывание иммуноглобулинов с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на высоковариабельные области (называемые областями, определяющими комплементарность (CDR)), между которыми распределяются консервативные области, называемые каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из 3 CDR и 4 FR, расположенных от amino-конца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области (VH и VL) каждой пары тяжелой цепи/легкой цепи образуют антигенсвязывающие сайты, соответственно. Отнесение аминокислот к областям или доменам основано на Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, M.d. (1987 и 1991)), или Chothia & Lesk J. Mol. Biol., 1987; 196:901-917; Chothia et al. Nature 1989; 342:878-883 или на определении системы нумерации IMGT, см. определение у Ehrenmann, Francois, Quentin Kaas and Marie-Paule Lefranc. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF. Nucleic acids research 2009; 38(suppl_1): D301-D307. Термин «антитело» не ограничивается каким-либо конкретным способом получения антитела. Например, антитело включает, в частности, рекомбинантное антитело, моноклональное антитело и поликлональное антитело. Антитело может относиться к разным изотипам, как например, IgG (например, подтип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM.

Используемые в настоящем описании термины «mAb» и «моноклональное антитело» относятся к антителу или фрагменту антитела, полученному из группы высокомолекулярных антител, т. е. из группы идентичных молекул антител, за исключением естественных мутаций, которые могут возникнуть спонтанно.

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

Используемый в настоящем описании термин «гуманизованное антитело» относится к антителу или фрагменту антитела, полученному при замене всех или части областей CDR человеческого иммуноглобулина (рецепторного антитела) на области CDR антитела, не являющегося человеческим, (донорное антитело), где донорное антитело может представлять собой не являющееся человеческим (например, мышиное, крысиное или кроличье) антитело, обладающее ожидаемой специфичностью, аффинностью или реактивностью. Кроме того, некоторые аминокислотные остатки в каркасных областях (FR) рецепторного антитела также могут быть заменены аминокислотными остатками соответствующих антител, не являющихся человеческими, или аминокислотными остатками других антител для дальнейшего улучшения или оптимизации характеристик антитела. Более подробно о гуманизованных антителах см., например, Jones et al., *Nature* 1986; 321:522-525; Reichmann et al., *Nature* 1988; 332:323-329; Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992; 2:593-596; и Clark M. Antibody humanization: a case of the «Emperor's new clothes»? [J]. *Immunol. Today*, 2000; 21(8): 397-402.

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

Используемый в настоящем описании термин «вектор» относится к носителю нуклеиновой кислоты, в который может быть вставлен полинуклеотид. Когда вектор обеспечивает экспрессию белка, кодируемого вставленным полинуклеотидом, такой вектор называют экспрессирующим вектором. Вектор может быть введен в клетку-хозяин путем трансформации, трансдукции или трансфекции, так что элементы генетического вещества, переносимые вектором, могут быть экспрессированы в клетке-хозяине. Векторы хорошо известны специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь ими:

плазмиды; фагмиды; космиды; искусственные хромосомы, такие как искусственная дрожжевая хромосома (YAC), искусственная хромосома бактерий (BAC) или искусственная хромосома, полученная из P1 (PAC); фаги, такие как фаги лямбда или фаги M13; и вирусы животных. Вирусы животных, которые можно использовать в качестве векторов, включают, но не ограничиваются ими, ретровирусы (включая лентивирусы), аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса (такие как вирус простого герпеса), поксвирусы, бакуловирусы, папилломавирусы и паповавирусы (такие как SV40). Вектор может содержать множество элементов, которые контролируют экспрессию, включая, но не ограничиваясь этим, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности, элементы селекции и репортерные гены. Кроме того, вектор может дополнительно содержать сайт инициации репликации.

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

Используемый в настоящем описании термин «специфическое связывание» относится к реакции неслучайного связывания между двумя молекулами, такой как реакция между антителом и антигеном, на который оно нацелено. В некоторых вариантах осуществления антитело, специфически связывающееся с антигеном (или антитело, специфичное к антигену), означает, что антитело связывается с антигеном с аффинностью (K_D) меньше чем примерно 10^{-5} М, например, меньше чем примерно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или меньше.

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

Используемые в настоящем описании термины «моноклональное антитело» и «mAb» имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо; термины «поликлональное антитело» и «pAb» имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо; термины «полипептид» и «белок» имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо. Кроме того, в настоящем описании аминокислоты

обычно представлены однобуквенными и трехбуквенными аббревиатурами, известными в данной области техники. Например, аланин может быть представлен А или Ala.

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

Используемый в настоящем описании термин «эффективное количество» относится к количеству, достаточному для получения или, по меньшей мере, частичного получения желаемых эффектов. Например, профилактически эффективное количество против заболевания (например, опухоли) относится к количеству, достаточному для предотвращения, остановки или задержки начала заболевания (например, опухоли); терапевтически эффективное количество относится к количеству, достаточному для излечения или, по меньшей мере, частичной остановки заболевания и его осложнений у пациентов, страдающих этим заболеванием.

Полезные эффекты настоящего изобретения:

моноклональное антитело по настоящему изобретению может специфически связываться с CD73 и может эффективно ингибировать реакцию ферментативной активности CD73 в режиме конкуренции без субстрата, снижать выработку аденозина и стимулировать активность Т-клеток и ингибирующее действие на опухоль.

Примечания по депонированию биологических материалов:

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

ФИГ. 1 Результаты определения констант аффинности 19F3H2L3 для HNT5E(1-552)-his. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,125 нМ, соответственно.

ФИГ. 2 Результаты определения констант аффинности 19F3H2L2 для HNT5E(1-552)-his. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,125 нМ, соответственно.

ФИГ. 3 Результаты определения констант аффинности MEDI9447 для HNT5E(1-

552)-his. Концентрации антител для пар кривых сверху вниз составляют 200 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,125 нМ, соответственно.

ФИГ. 4. Активность связывания 19F3H2L3 с CD73 на поверхности клеток MDA-MB-231 определяли с помощью FACS.

ФИГ. 5. Результаты определения ферментативной активности антитела против CD73, добавленного к клеткам MDA-MB-231.

ФИГ. 6. Результаты определения ферментативной активности антитела против CD73, добавленного к клеткам U87-MG.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

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

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

В следующих примерах настоящего изобретения используемое положительное контрольное антитело MEDI9447 (олеклумаб) было произведено компанией Akeso Biopharma Co. Ltd., последовательность которого такая же, как у антитела SEQ ID NO: 21-24, описанного в опубликованном патенте MedImmune Limited с номером публикации: US20160129108A1.

В следующих примерах настоящего изобретения использованный AD2 был приобретен у Biologend (кат. No. 344002).

Пример 1. Получение антитела против CD73 19F3

1. Получение гибридной клеточной линии LT014

Антигеном, использованным для получения антитела против CD73, был человеческий NT5E-His (для NT5E, GenbankID: NP_002517.1, положение: 1-552). Клетки селезенки иммунизированных мышей брали для слияния с клетками миеломы мышей для получения гибридных клеток. Гибридные клетки подвергали скринингу с помощью непрямого ИФА с использованием комплекса человеческий NT5E-биотин (для NT5E, GenbankID: NP_002517.1, положение: 1-552) в качестве антигена, и были получены гибридные клетки, способные секретировать антитело, специфически связывающееся с CD73. Гибридные клетки, полученные в результате скрининга, подвергали лимитирующему разведению для получения стабильной гибридной клеточной линии.

Гибридная клеточная линия была названа гибридной клеточной линией LT014, а секретированное из нее моноклональное антитело было названо 19F3.

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

2. Получение антитела против CD73 19F3

Клеточную линию LT014, полученную выше, культивировали в среде с определенным химическим составом (среда CD, содержащая 1% пенициллина-стрептомицина) в инкубаторе для клеток с 5% CO₂ при 37 °С. Через 7 дней собирали супернатант клеточной культуры, подвергали высокоскоростному центрифугированию и вакуумной фильтрации через микрофильтрационную мембрану и очищали с использованием колонки HiTrap Protein A HP с получением антитела 19F3.

Пример 2. Анализ последовательности антитела против CD73 19F3

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

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

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

Продукт, полученный в результате ТА-клонирования антитела 19F3 против CD73 на клеточной линии LT014, был непосредственно секвенирован. Результаты секвенирования следующие.

Нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 1 и имеет длину 363 п.н.

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 2 и имеет длину 121 а.о.;

где последовательность CDR1 тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 15, последовательность CDR2 тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 16, а последовательность CDR3 тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 17.

Нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 3 и имеет длину 339 п.н.

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 4 и имеет длину 113 а.о.;

где последовательность CDR1 легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 18, последовательность CDR2 легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 19, а последовательность CDR3 легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 20.

Пример 3. Дизайн и получение легких и тяжелых цепей гуманизированных антител

против CD73 человека

1. Дизайн легких и тяжелых цепей гуманизированных антител против CD73 человека, 19F3H1L1, 19F3H2L2 и 19F3H2L3

На основе трехмерной кристаллической структуры человеческого белка CD73 (Hage T, Reinemer P, Sebald W., Crystals of a 1:1 Complex Between Human Interleukin-4 and the Extracellular Domain of its Receptor Alpha Chain, Eur. J. Biochem., 1998; 258(2):831-6.) и последовательности антитела 19F3, полученной в Примере 2, последовательности вариабельной области антител 19F3H1L1, 19F3H2L2 и 19F3H2L3 были получены с помощью компьютерного моделирования и дизайна мутаций (последовательности константной области антител из базы данных NCBI: константная область тяжелой цепи представляет собой С-область гамма-1-цепи Ig, № ДОСТУПА: P01857; константная область легкой цепи представляет собой С-область каппа-цепи Ig, № ДОСТУПА: P01834).

Сконструированные последовательности вариабельных областей следующие:

(1) Последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепи гуманизированного моноклонального антитела 19F3H1L1

Нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 5 и имеет длину 363 п.н.

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 6 и имеет длину 121 а.о., где последовательность CDR1 тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 15, последовательность CDR2 тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 16, а последовательность CDR3 тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 17.

Нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 7 и имеет длину 339 п.н.

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 8 и имеет длину 113 а.о., где последовательность CDR1 легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 18, последовательность CDR2 легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 19, а последовательность CDR3 легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 20.

(2) Последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепи гуманизированного моноклонального антитела 19F3H2L2.

Нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 9 и имеет длину 363 п.н.

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 10 и имеет длину 121 а.о., где последовательность CDR1 тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 15, последовательность CDR2 тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 16, а последовательность CDR3 тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 17.

Нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 11 и имеет длину 339 п.н.

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 12 и имеет длину 113 а.о., где последовательность CDR1 легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 18, последовательность CDR2 легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 19, а

последовательность CDR3 легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 20.

(3) Последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи гуманизированного моноклонального антитела 19F3H2L3.

Нуклеотидная последовательность переменной области тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 9 и имеет длину 363 п.н.

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 10 и имеет длину 121 а.о., где последовательность CDR1 тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 15, последовательность CDR2 тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 16, а последовательность CDR3 тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 17.

Нуклеотидная последовательность переменной области легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 13 и имеет длину 339 п.н.

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 14 и имеет длину 113 а.о., где последовательность CDR1 легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 18, последовательность CDR2 легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 19, а последовательность CDR3 легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 20.

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

Все константные области тяжелой цепи представляли собой С-область гамма-1-цепи Ig, № ДОСТУПА: P01857; и все константные области легкой цепи представляли собой С-область каппа-цепи Ig, № ДОСТУПА: P01834.

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

3. Получение гуманизированных антител 19F3H1L1(hG1DM), 19F3H2L2(hG1DM) и 19F3H2L3(hG1DM)

Константные области легкой цепи антител 19F3H1L1(hG1DM), 19F3H2L2(hG1DM) и 19F3H2L3(hG1DM) представляют собой С-область каппа-цепи Ig, № ДОСТУПА: P01834, см. SEQ ID NO: 22.

На основе С-области гамма-1-цепи Ig, № доступа: P01857, были получены гуманизированные антитела путем введения точечной мутации лейцин-аланин в положении 234 (L234A) и точечной мутации лейцин-аланин в положении 235 (L235A) в константной области тяжелой цепи, см. SEQ ID NO: 21, и были обозначены как 19F3H1L1(hG1DM), 19F3H2L2(hG1DM) и 19F3H2L3(hG1DM), соответственно.

кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 19F3H1L1(hG1DM), кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 19F3H2L2(hG1DM) и кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 19F3H2L3(hG1DM) были соответственно клонированы в pUC57simple (предоставлено Genscript) для получения векторов pUC57simple-19F3H1(hG1DM), pUC57simple-19F3L1, pUC57simple-19F3H2(hG1DM), pUC57simple-19F3L2 и pUC57simple-19F3L3, соответственно. Ссылаясь на стандартные методы, описанные в Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition), полноразмерные гены тяжелых и легких цепей, синтезированные с помощью расщепления EcoRI&HindIII, субклонировали в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 с помощью фермента рестрикции (EcoRI&HindIII) посредством расщепления с получением экспрессирующих плазмид pcDNA3.1-19F3H1(hG1DM), pcDNA3.1-19F3L1, pcDNA3.1-19F3H2(hG1DM), pcDNA3.1-19F3L2 и pcDNA3.1-19F3L3, а также гены тяжелой/легкой цепи рекомбинантной экспрессирующей плазмиды далее подвергали секвенированию. Затем сконструированные комбинации генов, содержащие соответствующие рекомбинантные плазмиды легкой и тяжелой цепей (pcDNA3.1-19F3H1(hG1DM)/pcDNA3.1-19F3L1, pcDNA3.1-19F3H2(hG1DM)/pcDNA3.1-19F3L2 и pcDNA3.1-19F3H2(hG1DM)/pcDNA3.1-19F3L3) соответственно котрансфецировали в клетки 293F, а культуральные растворы собирали и очищали. После того, как последовательности были проверены, готовили свободные от эндотоксина экспрессирующие плазмиды, которые транзиторно трансфецировали в клетки НЕК293 для экспрессии антител. Культуральные растворы собирали через 7 дней и подвергали аффинной очистке на колонке с Протеином А для получения гуманизированных антител.

Пример 4. Определение активности связывания антитела против CD73 с антигеном человеческий NT5E-биотин методом ИФА

Экспериментальные стадии: микропланшет покрывали стрептавидином в концентрации 2 мкг/мл, затем микропланшет инкубировали при 4°C в течение 12 часов. Покрытый антигеном микропланшет один раз промывали PBST после инкубации, а затем блокировали раствором PBST, содержащим 1% BSA в качестве блокирующего раствора для микропланшета, в течение 2 часов. После блокировки микропланшет промывали 3 раза PBST. Затем добавляли 0,5 мкг/мл антигена человеческий NT5E-биотин и планшет промывали 3 раза PBST после инкубации при 37°C в течение 30 минут. Серийно

разведенные раствором PBST антитела добавляли в лунки микропланшета. Градиенты разведения антител показаны в Таблице 1. Микропланшет, содержащий тестируемые антитела, инкубировали при 37°C в течение 30 минут, а затем 3 раза промывали PBST. После того, как планшет был промыт, добавляли рабочий раствор вторичного антитела HRP-меченого козьего антитела против человеческого IgG (H+L) (Jackson, кат. № 109-035-088), разведенный в соотношении 1:5000, или HRP-меченого козьего антитела против мышинового IgG (H+L) (Jackson, кат. № 115-035-062), разведенный в соотношении 1:5000, и затем планшет инкубировали при 37°C в течение 30 минут. После инкубации планшет 4 раза промывали PBST, добавляли TMB (Neogen, 308177) в темноте для проявления окраски в течение 5 мин, затем добавляли стоп-раствор для прекращения хромогенной реакции. Микропланшет немедленно помещали в устройство для считывания микропланшетов, и значение оптической плотности каждой лунки микропланшета считывали при длине волны 450 нм. Данные анализировали с помощью SoftMax Pro 6.2.1.

Значения OD доз для детектирования связывания антитела против CD73 с антигеном человеческий NT5E-биотин показаны в Таблице 1. EC₅₀ связывания антитела рассчитывали путем подгонки кривой, используя концентрацию антитела по оси абсцисс и значение поглощения по оси ординат, и результаты показаны в Таблице 1 ниже.

Экспериментальные результаты показывают, что антитела 19F3 H1L1, 19F3 H2L2 и 19F3 H2L3 и мышинное антитело 19F3 могут эффективно связываться с комплексом человеческий NT5E-биотин, и эффективность связывания носит дозозависимый характер. В основном в тех же экспериментальных условиях EC₅₀ связывания 19F3 H1L1 с комплексом человеческий NT5E-биотин составляла 0,049 нМ, EC₅₀ связывания 19F3 H2L2 с комплексом человеческий NT5E-биотин составляла 0,064 нМ, EC₅₀ связывания 19F3 H2L3 с комплексом человеческий NT5E-биотин составляла 0,061 нМ, EC₅₀ препарата положительного контроля MEDI9447 для той же мишени, связывающейся с комплексом человеческий NT5E-биотин, составляла 0,048 нМ, а EC₅₀ мышинового антитела 19F3, связывающегося с комплексом человеческий NT5E-биотин, составляла 0,018 нМ.

Приведенные выше экспериментальные результаты показывают, что активность связывания 19F3 H1L1, 19F3 H2L2, 19F3 H2L3 и мышинового антитела 19F3 с комплексом человеческий NT5E-биотин, соответственно, сравнима с активностью препарата положительного контроля MEDI9447 для той же мишени в тех же экспериментальных условиях, что указывает на то, что 19F3 H1L1, 19F3 H2L2 и 19F3 H2L3 выполняют функцию эффективного связывания с CD73.

Таблица 1 Результаты определения активности связывания 19F3H1L1, 19F3H2L2, 19F3H2L3 и мышинового антитела 19F3 с HNT5E-биотин

Разведение антитела (мкг/мл)	Антигенное покрытие: SA (2 мкг/мл)									
	Человеческий NT5E-биотин (0,5 мкг/мл)									
	19F3 H1L1		19F3 H2L2		19F3 H2L3		MEDI9447		19F3	
0.333	2,648	2,640	2,598	2,688	2,623	2,588	2,548	2,527	2,706	2,743
1:3	2,601	2,697	2,578	2,618	2,581	2,582	2,573	2,604	2,736	2,763

1:9	2,407	2,332	2,163	2,330	2,186	2,257	2,268	2,284	2,566	2,641
1:27	1,821	1,820	1,579	1,680	1,626	1,649	1,774	1,742	2,330	2,361
1:81	1,044	1,035	0,870	0,933	0,918	0,931	1,058	1,030	1,693	1,769
1:243	0,525	0,516	0,434	0,454	0,450	0,457	0,536	0,528	1,001	1,000
1:729	0,260	0,273	0,239	0,247	0,241	0,252	0,272	0,275	0,446	0,470
0	0,125	0,123	0,119	0,123	0,120	0,123	0,121	0,116	0,060	0,062
Вторичное антитело	HRP-меченное козьё антитело против человеческого IgG (H+L) (1:5000)								HRP-меченное козьё антитело против мышиноного IgG (H+L) (1:5000)	
EC ₅₀ (нМ)	0,049	0,064	0,061	0,048	0,018					

Пример 5. Кинетические параметры связывания гуманизированных антител 19F3H2L3, 19F3H2L2 и MEDI9447 с антигеном человека HNT5E (1-552)-His, определенные с использованием прибора Fortebio Molecular Interaction

Буфер для разбавления образца представлял собой PBST, pH 7,4. 5 мкг/мл антитела иммобилизовали на сенсоре с Протеином А в течение 15 с. Сенсор уравнивали в буфере в течение 120 с. Связывание иммобилизованного антитела на сенсоре с антигеном человеческий NT5E(1-552)-his в концентрациях 3,125-200 нМ (двукратное разведение) определяли в течение 120 с. Антиген-антитело диссоциировали в буфере в течение 600 с. Сенсор обновляли 10 мМ раствором глицина (pH 1,5). Температура детектирования составляла 37 °С, частота детектирования составляла 0,6 Гц, а скорость встряхивания планшета для образцов составляла 1000 об/мин. Данные анализировали путем модели подбора 1:1 для получения констант аффинности.

Результаты измерения констант аффинности гуманизированных антител 19F3H2L3, 19F3H2L2 и MEDI9447 (в качестве контрольных антител) и человеческого CD73 представлены в Таблице 2, а результаты детектирования показаны на ФИГ. 1-3.

Как показано в Таблице 2 и на ФИГ. 1-3 константы аффинности гуманизированных антител 19F3H2L3, 19F3H2L2 и MEDI9447 и человеческого CD73 составляли 1,04E-10 М, 2,36E-10 М, 2,59E-10 М и 1,04E-10 М последовательно.

Приведенные выше экспериментальные результаты показывают, что связывающая способность 19F3H2L3 и 19F3H2L2 с HNT5E(1-552)-his сравнима, что указывает на то, что гуманизированные антитела 19F3H2L3 и 19F3H2L2 обладают сильной связывающей способностью с CD73 человека.

Таблица 2. Определение констант аффинности 19F3H2L3, 19F3H2L2 и HNT5E(1-552)-his

Тестируемые антитела	KD (М)	kon(1/мс)	S E (kon)	kdis(1/с)	S E(kdis)	Rmax(нм)
19F3 H2L3	2,36E-10	4,82E+05	7,74E+03	1,14E-04	5,87E-06	0,34-0,41

19F3 H2L2	2,59E-10	4,80E+05	6,44E+03	1,24E-04	4,86E-06	0,35-0,39
MEDI9447	1,04E-10	2,34E+05	3,20E+03	2,44E-05	5,02E-06	0,59-0,82

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

Пример 6. Связывающая способность антитела 19F3H2L3, определенная с помощью FACS

Клетки MDA-MB-231 в логарифмической фазе гидролизировали обычным трипсином, центрифугировали и ресуспендировали в PBSA. Клетки помещали в центрифужные пробирки объемом 1,5 мл (по 0,3 млн клеток в каждой пробирке) и центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин для удаления супернатанта. Добавляли 100 мкл антител к CD73, разведенных PBSA, с конечными концентрациями 100 нМ, 33,33 нМ, 11,11 нМ, 3,7 нМ, 1,23 нМ, 0,41 нМ, 0,14 нМ и 0,05 нМ, соответственно. Систему осторожно и однородно перемешивали, а затем инкубировали на льду в течение 1 часа. Затем добавляли 500 мкл PBSA и смесь центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин для удаления супернатанта. 500х разбавленное FITC-меченое вторичное козье антитело против человеческого IgG (Jackson, кат. № 109-095-098) добавляли к ресуспендированному клеточному осадку и смесь инкубировали на льду в темноте в течение 0,5 ч. Добавляли 500 мкл PBSA и смесь центрифугировали при 5600 об/мин в течение 5 мин для удаления супернатанта. Наконец, для ресуспендирования клеточных осадков добавляли 200 мкл PBSA, и смесь переносили в проточную трубку для обнаружения с помощью проточного цитометра (BD FACSCalibur™).

Результаты показаны в Таблице 3 и на ФИГ. 4, способность связывания 19F3H2L3 с CD73, эндогенно экспрессируемым в MDA-MB-231, сравнима со способностью препарата положительного контроля MEDI9447 для той же мишени, и связывание носит дозозависимый характер. В тех же экспериментальных условиях EC₅₀ связывания 19F3H2L3 с CD73, эндогенно экспрессируемым в MDA-MB-231, составляет 3,423 нМ, а EC₅₀ связывания MEDI9447 с CD73, эндогенно экспрессируемым в MDA-MB-231, составляет 1,433 нМ.

Приведенные выше экспериментальные результаты показывают, что активность связывания 19F3H2L3 с CD73, эндогенно экспрессируемым в MDA-MB-231, сравнима с активностью препарата положительного контроля MEDI9447 для той же мишени в тех же экспериментальных условиях, что указывает на то, что 19F3H2L3 обладает функцией эффективного связывания с CD73.

Таблица 3 Связывающая способность 19F3H2L3 с CD73 на поверхности клеток MDA-MB-231, определенная с помощью FACS

Поглощение (нМ)	0,05	0,14	0,41	1,23	3,70	11,11	33,33	100,00	EC ₅₀
MEDI9447	28,38	43,18	90,96	266,72	454,45	518,94	545,63	580,76	1,433
19F3H2L3	20,04	31,49	61,09	135,31	264,86	407,09	485,32	480,42	3,423

Пример 7. Определение ингибирующей активности антитела против CD73 в отношении ферментативной активности CD73, эндогенно экспрессируемого в клетках

1. Определение ингибирующей активности антитела против CD73 в отношении активности фермента CD73, эндогенно экспрессируемого в клетках MDA-MB-231.

Экспериментальные процедуры были следующими. Клетки MDA-MB-231 в логарифмической фазе в хорошем состоянии брали, ресуспендировали в бессывороточном культуральном растворе RPMI-1640 и затем подсчитывали. Клетки MDA-MB-231 высевали в 96-луночный планшет в количестве 3×10^4 клеток/100 мкл/лунку. Антитело разводили бессывороточным культуральным раствором RPMI-1640 в исходной концентрации 200 мкг/мл (серийное 2,5-кратное разведение). Антитело добавляли в 96-луночный планшет в количестве 50 мкл/лунку, и планшет инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Через 1 час в каждую лунку добавляли 50 мкл 600 мкМ AMP, разбавленного RPMI-1640. Через 3 часа отбирали 25 мкл супернатанта клеточной культуры и переносили в новый 96-луночный планшет, и в каждую лунку добавляли по 25 мкл 100 мкМ АТФ. Добавляли 50 мкл CTG (CellTiter-Glo® One Solution Assay, promega, кат. No. G8461) раствора для проявления цвета в каждую лунку, и данные считывали с помощью тестера для микропланшетов с несколькими метками (PerkinElmer 2140-0020).

Экспериментальные результаты: как показано на ФИГ. 5, как 19F3H2L3, так и препарат положительного контроля MEDI9447 для одной и той же мишени показали дозозависимое ингибирование активности CD73, эндогенно экспрессируемого в MDA-MB-231, превращающего AMP в аденозин А посредством ферментативного катализа, тем самым снижая продуцируемую среднюю интенсивность флуоресценции RLU, продуцируемую дозозависимым образом.

Приведенные выше экспериментальные результаты показывают, что добавленный АМФ может подвергаться ферментативному катализу CD73, эндогенно экспрессируемого на клеточной поверхности с помощью MDA-MB-231, а затем превращаться в аденозин А в условиях отсутствия обработки антителом к CD73, так что ингибирование активности люциферазы ослабевает. Однако после добавления антитела, поскольку CD73 связывался с антителом, его ферментативная активность снижалась, так что AMP не мог превращаться в аденозин. Предполагается, что антитело против CD73 эффективно ингибирует реакцию ферментативной активности CD73 в режиме конкуренции без субстрата и снижает продукцию аденозина.

2. Определение активности фермента путем добавления антитела против CD73 к клеткам U87-MG.

Экспериментальные процедуры были следующими. Брали клетки U87-MG в логарифмической фазе в хорошем состоянии, ресуспендировали в бессывороточном культуральном растворе RPMI-1640 и затем подсчитывали. Клетки U87-MG высевали в 96-луночный планшет в количестве 3×10^4 клеток/100 мкл/лунку. Антитело разводили бессывороточным культуральным раствором RPMI-1640 в исходной концентрации 200 мкг/мл (серийное 2,5-кратное разведение). Антитело добавляли в 96-луночный планшет в количестве 50 мкл/лунку, и планшет инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Через 1 час в каждую лунку добавляли 50 мкл 600 мкМ AMP, разбавленного RPMI-1640. Через 3 часа

отбирали 25 мкл супернатанта клеточной культуры и переносили в новый 96-луночный планшет, и в каждую лунку добавляли по 25 мкл 100 мкМ АТФ. Добавляли 50 мкл СТГ (CellTiter-Glo® One Solution Assay, promega, кат. No. G8461) раствора для проявления цвета в каждую лунку, и данные считывали с помощью тестера для микропланшетов с несколькими метками (PerkinElmer 2140-0020).

Экспериментальные результаты: как показано на ФИГ. 6, как 19F3H2L3, так и препарат положительного контроля MEDI9447 для одной и той же мишени показали дозозависимое ингибирование активности CD73, эндогенно экспрессируемого в MDA-MB-231, превращающего АМФ в аденозин посредством ферментативного катализа, тем самым снижая продуцируемую среднюю интенсивность флуоресценции RLU, продуцируемую в дозозависимым образом.

Приведенные выше экспериментальные результаты показывают, что добавленный АМФ может подвергаться ферментативному катализу CD73, эндогенно экспрессируемого на клеточной поверхности с помощью U87-MG, а затем превращаться в аденозин в условиях отсутствия обработки антителом к CD73, так что ингибирование активности люциферазы ослабевает. Однако после добавления антитела, поскольку CD73 связывался с антителом, его ферментативная активность снижалась, так что АМФ не мог превращаться в аденозин. Предполагается, что антитело против CD73 эффективно ингибирует реакцию ферментативной активности CD73 в режиме конкуренции без субстрата и снижает продукцию аденозина.

Пример 8. Определение динамической аффинности антител против CD73 и FcγRIIIa, опосредующих антителозависимые цитотоксические эффекты

Буфером для разведения образца был PBS (0,02% Tween-20, 0,1% BSA, pH 7,4). 0,5 мкг/мл FcγRIIIa (от Sino Biological, также известный как CD16a) иммобилизовали на сенсоре SA в течение 120 с. Сенсор уравнивали в буфере в течение 60 с и в течение 60 с определяли связывание иммобилизованного CD16a на сенсоре с антителами в концентрациях 31,3-500 нМ (серийное двукратное разведение). Комплекс антиген-антитело диссоциировал в буфере в течение 60 с. Сенсор обновляли 10 мМ NaOH. Температура детектирования составляла 30 °С, а частота - 0,6 Гц. Данные анализировали путем модели подбора 1:1 для получения констант аффинности.

Как показано в Таблице 4, 19F3H2L3(hG1DM) не связывался с FcγRIIIa, в то время как MEDI9447 обладал связывающей активностью с FcγRIIIa, что указывает на то, что 19F3H2L3(hG1DM) имел более низкий риск вызывать антителозависимые цитотоксические эффекты в клетках, экспрессирующих CD73, тогда как MEDI9447 имел риск вызывать антителозависимые цитотоксические эффекты.

CD73 широко экспрессируется в эндотелии сосудов и нормальных тканях и связывается с FcγRIIIa, опосредуя антителозависимые цитотоксические эффекты, приводящие к повреждению эндотелиальных клеток сосудов и нормальных тканей, что оказывает значительное влияние на безопасность препаратов антител.

Таблица 4 Определение динамической аффинности антител против CD73 и

FcγRIIIa, опосредующих антителозависимые цитотоксические эффекты

	K_D (M)	kon (1/мс)	Стандартная ошибка (kon)	Kdis (1/с)	Стандартная ошибка (kdis)
19F3H2L3(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
MEDI9447	1.41E-07	2.43E+05	4.36E+04	3.42E-02	2.08E-03
IgG1-антитело дикого типа	1.25E-07	1.76E+05	2.22E+04	2.20E-02	1.11E-03

$$K_D = kdis / kon$$

Список последовательностей

Нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи 19F3 с подчеркнутыми последовательностями CDR: (SEQ ID NO: 1)

GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGACCAGAGCTGGTGAAGCCTGGCGCCTCCA
TGCGGATGTCTTGTAAAGGCCTCTGGCTACAGCTTCACCGGCTATAACAATGAACTGGG
TGAAGCAGTCTCACGGCAAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCTTACAAT
GCCGGCACCAGCTATAACCAGAAGTTTAAGGGCAAGGCCACCCTGACAGTGGACAA
GAGCTCCTTACCGCCTACATGGAGCTGCTGTCCCTGACATCTGAGGATAGCGCCGT
GТАCTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGATATGGCGGCGACTACTTTGATTATTGGGG
CCAGGGCACCACTGACAGTGAGCTCC

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи 19F3 с подчеркнутыми последовательностями CDR: (SEQ ID NO: 2)

EVQLQQSGPELVKPGASMRMSCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINP
YNAGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARSEYRYGGDYFDY
WGQGTTLTVSS

Нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи 19F3 с подчеркнутыми последовательностями CDR: (SEQ ID NO: 3)

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAAGCTCCCTGGCAATGAGCGTGGGACAGA
AGGTGACAATGTCTTGTAAAGTCTAGCCAGAGCCTGCTGAACTCCTCTAATCAGAAGA
ACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCCAAGCTGCTGGTGTACT
TTGCCAGCACCCAGGGAGTCCGGAGTGCTGACAGATTCATCGGCTCCGGCTCTGGCA
CAGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCGTGCAGGCAGAGGACCTGGCAGATTATTTCT
GCCAGCAGCACTACGACACCCCTTATACATTTGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATC
AAG

Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи 19F3 с подчеркнутыми последовательностями CDR: (SEQ ID NO: 4)

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNNSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLL
VYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFLTISVQAEDLADYFCQQHYDTPYTFGGGTKLEIK

Нуклеотидная последовательность варибельной области тяжелой цепи 19F3H1L1 с подчеркнутыми последовательностями CDR: (SEQ ID NO: 5)

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCT
 ATGAAGATGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGCTATAACAATGAACTG
 GGTGAAGCAGGCCACGGCCAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCTTACA
ATGCCGGCACCTCTTATAACCAGAAGTTTCAGGGCAAGGCCACCCTGACAGTGGAC
 AAGTCCACCTCTACAGCCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGC
 CGTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGATATGGCGGGCGACTACTTTGATTATTG
 GGGCCAGGGCACCACTGACCGTGTCTAGC

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи 19F3H1L1 с подчеркнутыми последовательностями CDR: (SEQ ID NO: 6)

QVQLQSGAEVVKPGASMKMSCKASGYSFTGYTMNWVKQAHGQNLEWIGLIN
PYNAGTSYNQKFQGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCARSEYRYGGDYFDY
 WGQGTTLTVSS

Нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи 19F3H1L1 с подчеркнутыми последовательностями CDR: (SEQ ID NO: 7)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCAAGCTCCCTGGCAATGTCTGTGGGAGAGA
 GGGTGACAATGTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAACTCCTCTAATCAGAAGA
ACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTAAGCTGCTGGTGTACT
TTGCCTCTACCAGGGAGAGCGGAGTGCCAGACAGATTCTCTGGCAGCGGCTCCGGC
 ACAGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCGTGCAGGCAGAGGACCTGGCAGATTATTTCC
 TGCCAGCAGCACTACGATACCCCTATACATTTGGCGGGCGGCACCAAGCTGGAGAT
 CAAG

Аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи 19F3H1L1 с подчеркнутыми последовательностями CDR: (SEQ ID NO: 8)

DIVMTQSPSSLAMSVGERVTMSCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQAPKLL
 VYFASTRESGVPDRFSGSGSGTDFLTISVQAEDLADYFCQOHYDTPYTFGGGTKLEIK

Нуклеотидная последовательность варибельных областей тяжелой цепи 19F3H2L2 и 19F3H2L3 с подчеркнутыми последовательностями CDR: (SEQ ID NO: 9)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTG
 TGAAGGTGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGCTATAACAATGAACTGG
 GTGAGGCAGGCACCAGGACAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCTTACAA
TGCCGGCACCTCTTATAACCAGAAGTTTCAGGGCAAGGTGACCCTGACAGTGGACA
 AGTCCACCTCTACAGCCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGCC
 GTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGATATGGCGGGCGACTACTTTGATTATTGG
 GGCCAGGGCACCACTGACCGTGTCTAGC

Аминокислотная последовательность варибельных областей тяжелой цепи 19F3H2L2 и 19F3H2L3 с подчеркнутыми последовательностями CDR: (SEQ ID NO: 10)

QVQLVQSGAEVVKPGASVVKVSKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQNLEWIGLINP
YNAGTSYNQKFQGKVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCARSEYRYGGDYFDY
 WGQGTTLTVSS

Нуклеотидная последовательность варибельной области легкой цепи 19F3H2L2 с

подчеркнутыми последовательностями CDR: (SEQ ID NO: 11)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCCGTGTCTGTGGGAGAGC
GGGTGACAATCTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAACTCCTCTAATCAGAAGA
ACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACT
TCGCCTCTACCAGGGAGAGCGGAGTGCCAGACAGATTCTCTGGCAGCGGCTCCGGC
ACAGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCGTGCAGGCAGAGGACGTGGCAGATTACTA
TTGCCAGCAGCACTACGATACCCCCTATACATTTGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGAT
CAAG

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи 19F3H2L2 с подчеркнутыми последовательностями CDR: (SEQ ID NO: 12)

DIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLIY
FASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVADYYCQQHYDTPYTFGGGTKLEIK

Нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи 19F3H2L3: (SEQ ID NO: 13)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCCGTGTCTGTGGGAGAGC
GGGTGACAATCTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAACTCCTCTAATCAGAAGA
ACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACT
TCGCCTCTACCAGGGAGAGCGGAGTGCCAGACAGATTCTCTGGCAGCGGCTCCGGC
ACAGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGGCAGAGGACGTGGCCGTGTACTAT
TGCCAGCAGCACTACGATACCCCCTATACATTTGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGAT
CAAG

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи 19F3H2L3 с подчеркнутыми последовательностями CDR: (SEQ ID NO: 14)

DIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLIY
FASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYDTPYTFGGGTKLEIK

CDR-области 19F3, 19F3H1L1, 19F3H2L2 and 19F3H2L3

HCDR1: GYSFTGYT (SEQ ID NO: 15)

HCDR2: INPYNAGT (SEQ ID NO: 16)

HCDR3: ARSEYRYGGDYFDY (SEQ ID NO: 17)

LCDR1: QSLNSSNQKNY (SEQ ID NO: 18)

LCDR2: FAS (SEQ ID NO: 19)

LCDR3: QQHYDTPYT (SEQ ID NO: 20)

Последовательность константных областей тяжелой цепи (330 а.о., сайты мутаций подчеркнуты жирным шрифтом) 19F3H1L1(hG1DM), 19F3H2L2(hG1DM) и 19F3H2L3(hG1DM):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS~~G~~VHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS

KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 21)

Последовательность константных областей легкой цепи (107 а.о.)
19F3H1L1(hG1DM), 19F3H2L2(hG1DM) и 19F3H2L3(hG1DM):

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO: 22)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против CD73 (например, CD73 человека) или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело против CD73 содержит:

HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в вариабельной области тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 10; и

LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в вариабельной области легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 14;

предпочтительно, согласно системе нумерации IMGT,

антитело против CD73 содержит:

HCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или больше (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью,

HCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или больше (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью,

HCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или больше (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью,

LCDR1, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или больше (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью,

LCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или больше (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью, и

LCDR3, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 20, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или больше (предпочтительно 1, 2 или 3) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью,

2. Антитело против CD73 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где переменная область тяжелой цепи антитела содержит или состоит из следующих последовательностей:

SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 10, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 10, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или больше (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 10; и

переменная область легкой цепи антитела содержит или состоит из следующих последовательностей:

SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 14, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 14, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или больше (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 14.

3. Антитело против CD73 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или 2, где переменная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и переменная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

переменная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и переменная область легкой цепи антитела

содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8;

вариабельная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и вариабельная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; или

вариабельная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и вариабельная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

4. Антитело против CD73 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или 2, где антитело содержит константную область тяжелой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 21, и константную область легкой цепи, имеющую последовательность SEQ ID NO: 22; или константная область тяжелой цепи представляет собой С-область гамма-1-цепи Ig, № ДОСТУПА: P01857, и константная область легкой цепи представляет собой С-область каппа-цепи Ig, № ДОСТУПА: P01834).

5. Антитело против CD73 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или 2, где антитело представляет собой моноклональное антитело (предпочтительно аминокислотная последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 35, и аминокислотная последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 36), гуманизированное антитело, химерное антитело и полиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело).

6. Антитело против CD73 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или 2, где антигенсвязывающий фрагмент выбран из Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, Fab/c, фрагмента определяющей комплементарность области, одноцепочечного антитела (например, scFv), гуманизированного антитела, химерного антитела и биспецифического антитела.

7. Выделенный полипептид, выбранный из группы, состоящей из:

(1) выделенного полипептида, содержащего последовательности SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17, где полипептид специфически связывается с CD73 как часть антитела против CD73, и антитело дополнительно содержит последовательности SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20;

(2) выделенного полипептида, содержащего последовательности SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, где полипептид специфически связывается с CD73 как часть антитела против CD73, и антитело дополнительно содержит последовательности SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17;

(3) выделенного полипептида, содержащего последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 10, последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или больше (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью, где полипептид специфически связывается с CD73 как часть антитела против CD73, и антитело дополнительно

соответственно содержит последовательность SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 12, последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или больше (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью;

(4) выделенного полипептида, содержащего последовательность SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 12, последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или больше (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью, где полипептид специфически связывается с CD73 как часть антитела против CD73, и антитело дополнительно соответственно содержит последовательность SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 10, последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или больше (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью;

(5) выделенного полипептида, содержащего последовательность SEQ ID NO: 10, последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или больше (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью, где полипептид специфически связывается с CD73 как часть антитела против CD73, и антитело дополнительно соответственно содержит последовательность SEQ ID NO: 14, последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или больше (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью;

(6) выделенного полипептида, содержащего последовательность SEQ ID NO: 14, последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или больше (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью, где полипептид специфически связывается с CD73 как часть антитела против CD73, и антитело дополнительно соответственно содержит последовательность SEQ ID NO: 10, последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или больше (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью.

8. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6 или выделенный полипептид по п. 7.

9. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 8.

10. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 8 или вектор по п. 9.

11. Конъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6 и конъюгированный фрагмент, который представляет собой очищающую метку (например, His-метку), детектируемую метку; предпочтительно конъюгированный фрагмент представляет собой радиоизотоп, флуоресцентное вещество, хемилюминесцентное вещество, окрашенное вещество, полиэтиленгликоль или фермент.

12. Слитый белок или полиспецифическое антитело (предпочтительно биспецифическое антитело), содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6.

13. Набор, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6, конъюгат по п. 11 или слитый белок или полиспецифическое антитело по п. 12, где, предпочтительно, набор дополнительно содержит вторичное антитело, специфически распознающее антитело, необязательно, вторичное антитело дополнительно содержит детектируемую метку, такую как радиоизотоп, флуоресцентное вещество, хемилюминесцентное вещество, окрашенное вещество или фермент; и предпочтительно набор используют для детектирования присутствия или уровня CD73 в образце.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6, конъюгат по п. 11 или слитый белок или полиспецифическое антитело по п. 12, где, необязательно, фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель и/или

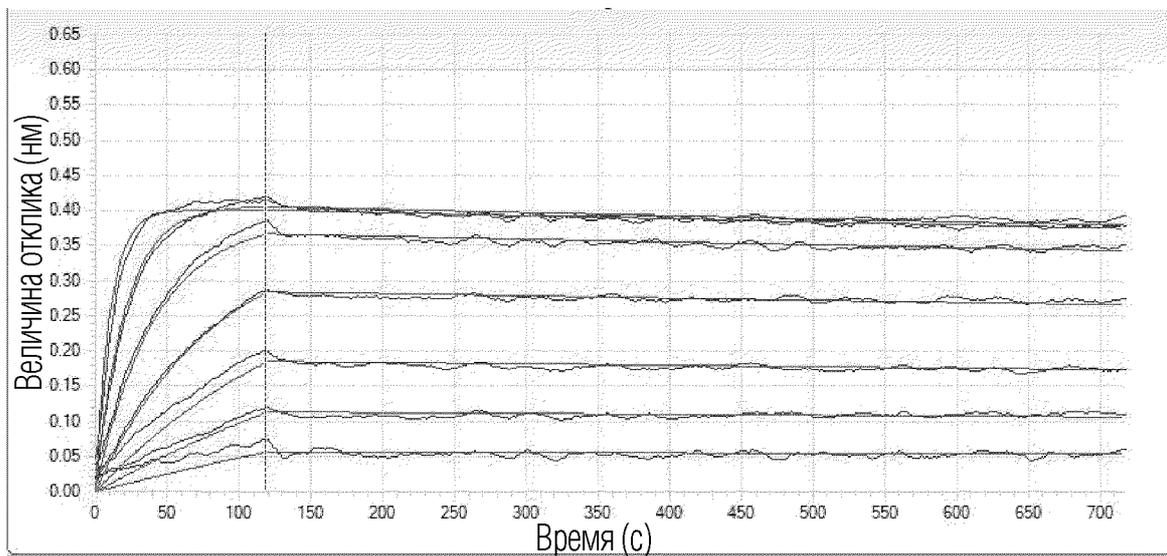
вспомогательное вещество, предпочтительно фармацевтическая композиция находится в форме, подходящей для введения путем подкожной инъекции, внутрикожной инъекции, внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции или инъекции в очаг поражения.

15. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-6, конъюгата по п. 11 или слитого белка или полиспецифического антитела по п. 12 при получении лекарственных средств для лечения и/или предотвращения опухоли (такой как солидная опухоль, предпочтительно немелкоклеточный рак легкого, рак предстательной железы (включая метастатический резистентный к кастрации рак предстательной железы (mCRPC)), трижды негативный рак молочной железы, рак яичников, колоректальный рак (включая колоректальный рак с микросателлитной стабильностью (MSS)), рак желудка, меланому, рак головы и шеи, почечно-клеточную карциному или аденокарциному протоков поджелудочной железы) или при получении лекарственного средства для диагностики опухоли.

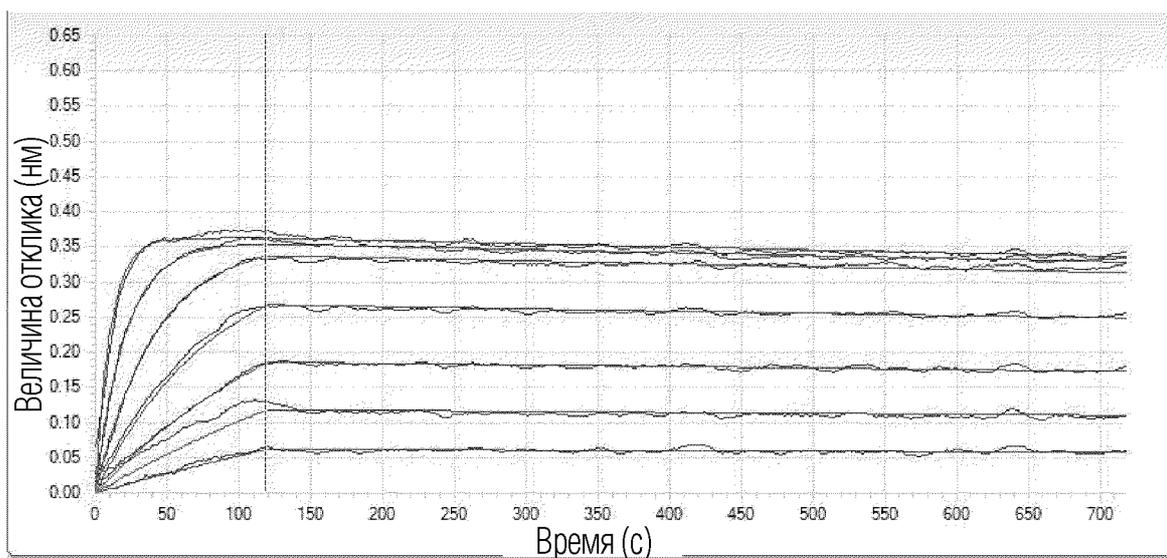
16. Гибридная клеточная линия, выбранная из:

LT014, депонированной в Китайском центре коллекции типовых культур (СТССС) под номером коллекции ССТСС NO: С2018137.

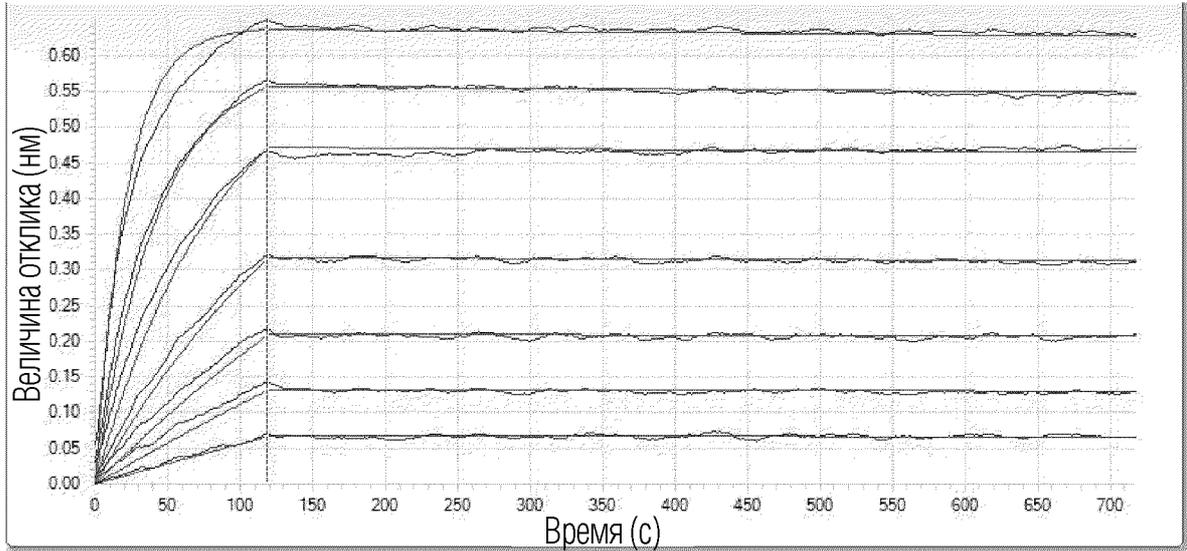
По доверенности



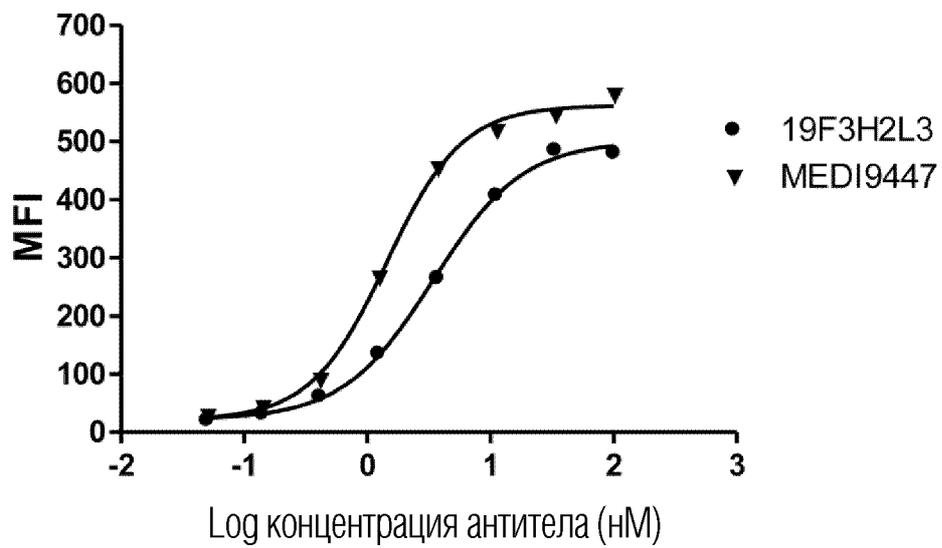
ФИГ. 1



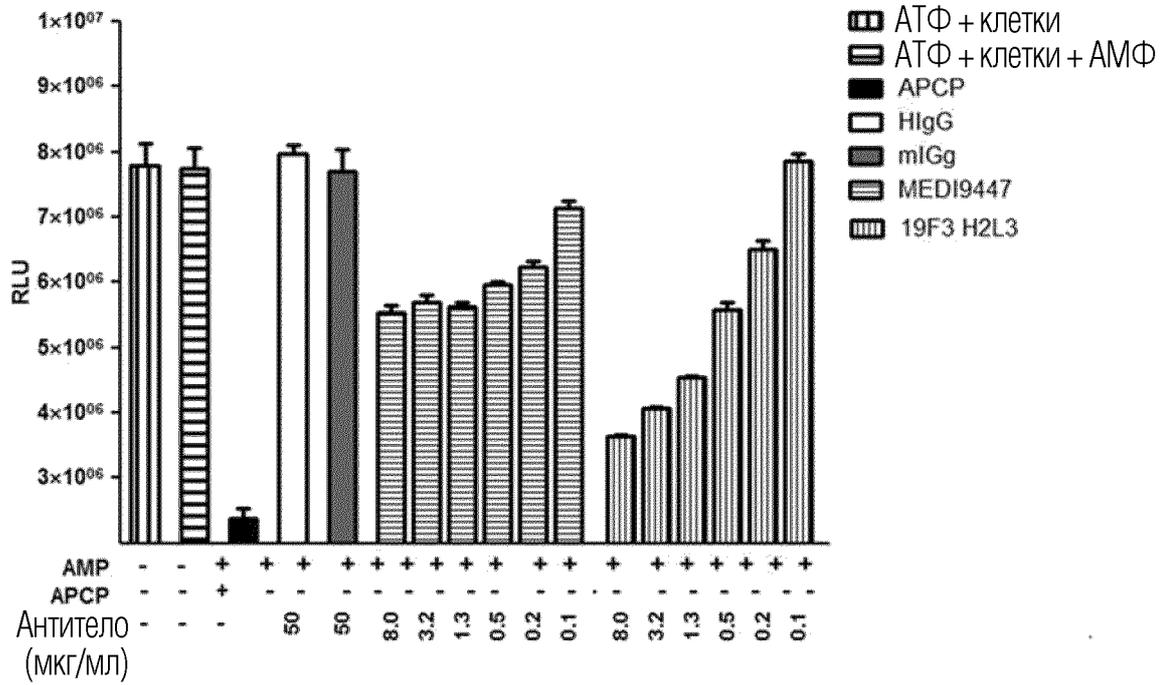
ФИГ. 2



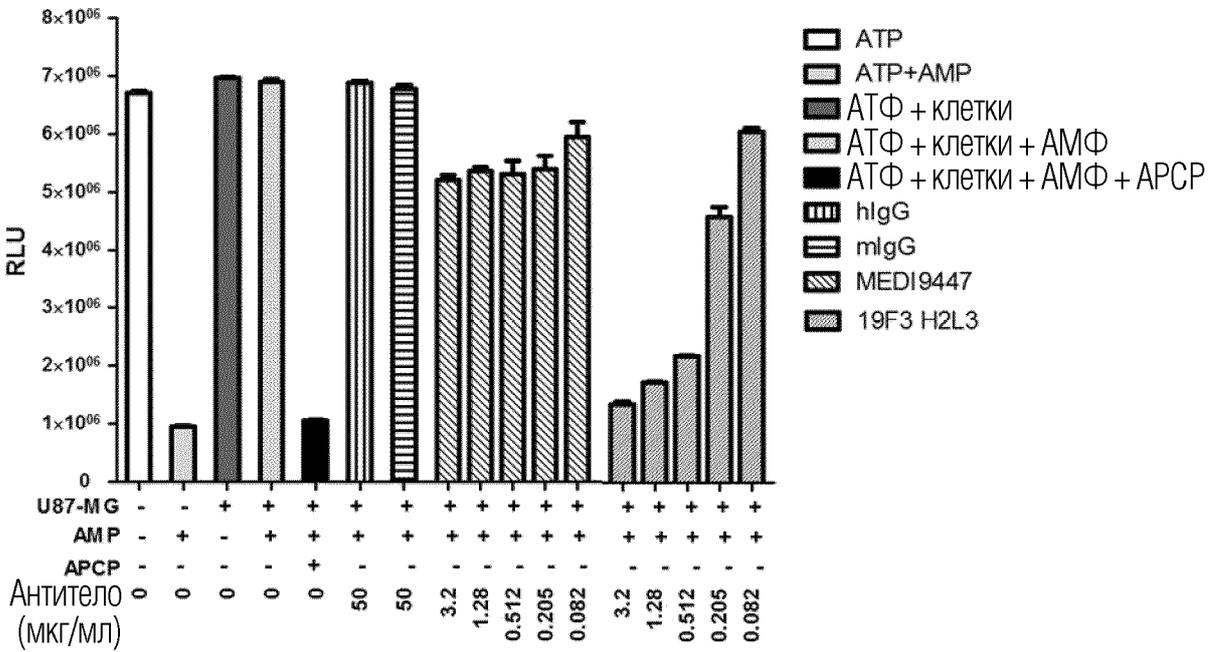
ФИГ. 3



ФИГ. 4



ФИГ. 5



ФИГ. 6