



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/2896 (2021.02); C07K 16/30 (2021.02); C07K 16/40 (2021.02); A61K 39/39558 (2021.02); A61P 35/00 (2021.02)

(21)(22) Заявка: 2017105119, 09.10.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.10.2015

Дата регистрации:
21.04.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

10.10.2014 US 62/062,323;

20.02.2015 US 62/118,549;

16.03.2015 US 62/133,597;

06.07.2015 US 62/188,881

(43) Дата публикации заявки: 12.11.2018 Бюл. № 32

(45) Опубликовано: 21.04.2021 Бюл. № 12

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 10.05.2017

(86) Заявка РСТ:
EP 2015/073370 (09.10.2015)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/055609 (14.04.2016)

Адрес для переписки:
190000, Санкт-Петербург, ВОХ-1125,
"ПАТЕНТИКА"

(72) Автор(ы):

ПЕРРО Иван (FR),

ПАТУРЕЛЬ Карин (FR),

ГОТЬЕ Лоран (FR)

(73) Патентообладатель(и):

ИННЕЙТ ФАРМА (FR)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: HAUSLER SF et al. Anti-CD39 and
anti-CD73 antibodies A1 and 7G2 improve
targeted therapy in ovarian cancer by blocking
adenosine-dependent immune evasion, Am J
Transl Res, 2014 Jan 15, Vol.6, p.2, pp.129-139.
LAURA AIRAS et al. Differential Regulation
and Function of CD73, a Glycosyl-
Phosphatidylinositol-linked 70-kD Adhesion
Molecule, on (см. прод.)

(54) БЛОКАДА CD73

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к выделенному антителу, специфично связывающему CD73 человека на поверхности клетки и способному нейтрализовать его 5'-эктонуклеотидазную активность. Также раскрыта фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая

вышеуказанное антитело. Изобретение также относится к рекомбинантной клетке-хозяину, продуцирующей вышеуказанное антитело. Изобретение позволяет эффективно осуществлять лечение рака. 4 н. и 16 з.п. ф-лы, 2 табл., 9 пр., 8 ил.

(56) (продолжение):
 Lymphocytes and Endothelial Cells, J Cell Biol, 1997, Vol.136, N.2, pp.421-431. FLOCKE K. et al. Monoclonal antibodies against 5'-nucleotidase from a human pancreatic tumor cell line: their characterization and inhibitory capacity on tumor cell adhesion to fibronectin substratum, Eur J Cell Biol, 1992, Vol.58, N.1, pp.62-70. SADEJ R. et al. Ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) is coexpressed with metastasis promoting antigens in human melanoma cells, Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2006, Vol.25(9-11), pp.1119-1123. RU2345090 C2, 27.01.2009.

R U 2 7 4 6 8 0 4 C 2

R U 2 7 4 6 8 0 4 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)*C07K 16/30* (2006.01)*C07K 16/40* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 16/2896 (2021.02); *C07K 16/30* (2021.02); *C07K 16/40* (2021.02); *A61K 39/39558* (2021.02); *A61P 35/00* (2021.02)

(21)(22) Application: **2017105119, 09.10.2015**

(24) Effective date for property rights:
09.10.2015

Registration date:
21.04.2021

Priority:

(30) Convention priority:
10.10.2014 US 62/062,323;
20.02.2015 US 62/118,549;
16.03.2015 US 62/133,597;
06.07.2015 US 62/188,881

(43) Application published: **12.11.2018 Bull. № 32**(45) Date of publication: **21.04.2021 Bull. № 12**(85) Commencement of national phase: **10.05.2017**

(86) PCT application:
EP 2015/073370 (09.10.2015)

(87) PCT publication:
WO 2016/055609 (14.04.2016)

Mail address:
190000, Sankt-Peterburg, BOX-1125,
"PATENTIKA"

(72) Inventor(s):

PERRO Ivan (FR),
PATUREL Karin (FR),
GOTE Loran (FR)

(73) Proprietor(s):

INNEJT FARMA (FR)(54) **BLOCKADE CD73**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology, in particular to an isolated antibody that specifically binds human CD73 on the cell surface and is able to neutralize its 5' - ectonucleotidase activity. A pharmaceutical composition for cancer treatment

containing the above antibody is also disclosed. The invention also relates to a recombinant host cell producing the above antibody.

EFFECT: invention makes it possible to effectively treat cancer.

20 cl, 2 tbl, 9 ex, 8 dwg

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки США №№ US 62/062323, поданной 10 октября 2014 года; US 62/118549, поданной 20 февраля 2015 года; US 62/133597, поданной 16 марта 2015 года; и US 62/188881, поданной 6 июля 2015 года; полное содержание всех из которых включено в настоящее описание посредством ссылки; включая любые чертежи.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка подается вместе с перечнем последовательностей в электронном виде. Указанный перечень последовательностей предоставлен в виде файла под названием «CD73-1_ST25», созданного 8 октября 2015 года, размер которого составляет 24 КВ. Полная информация, содержащаяся в перечне последовательностей в электронном виде, включена в настоящее описание посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим соединениям (например, антителам), которые ингибируют CD73. Настоящее изобретение также относится к клеткам, продуцирующим такие соединения; способам получения таких соединений, и антителам, их фрагментам, вариантам и производным; фармацевтическим композициям, содержащим указанные соединения; способам применения указанных соединений для диагностики, лечения или предотвращения заболеваний, например, рака.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

CD73 (экто-5'-нуклеотидаза) представляет собой гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-заякоренный белок массой 70 кДа, обычно экспрессируемый на эндотелиальных клетках и субпопуляциях гемопоэтических клеток. CD73 вместе с CD39 регулирует метаболизм аденозинтрифосфата (АТФ). CD39 (NTPDase-1) превращает АТФ в АМФ с высвобождением лишь следовых количеств АДФ, в то время как CD73 катализирует превращение АМФ в аденозин.

Аденозинтрифосфат (АТФ) и его метаболиты АМФ и аденозин играют важную роль в клеточном метаболизме, передаче сигнала и иммунном гомеостазе. Высвобождение внеклеточного аденозинтрифосфата (АТФ) в ответ на гибель клеток или клеточный стресс активирует иммунные ответы. Однако его метаболит аденозин обладает иммуносупрессивной активностью. Внеклеточный аденозин накапливается в раковых тканях и составляет важный механизм ускользания опухоли от иммунного надзора. Среди других эффектов, происходящий из опухоли аденозин сильно ингибирует инфильтрацию эффекторными Т-клетками через рецепторы A2A, активирующие аденилициклазу.

Имеются сообщения об экспрессии CD73 в ряде клеток опухоли, включая лейкоз, рак мочевого пузыря, глиому, глиобластому, рак яичников, меланому, рак предстательной железы, рак щитовидной железы, рак пищевода и рак молочной железы. Экспрессия CD73 также связана с прометастатическим фенотипом при меланоме и раке молочной железы. Было показано, что терапия антителом, связывающим CD73 мыши, может ингибировать рост и метастазирование опухоли молочной железы у мышей (Stagg, et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:1547-1552). Однако антитела, как правило, не дают перекрестную реакцию с CD73 человека и мыши, что усложняет исследование антител и биологических функций CD73. Было показано, что генетическая делеция рецепторов A2A может индуцировать отторжение опухоли, зависимое от Т-клеток (Ohta, et al., (2006) Proc Natl Acad Sci USA 103.13132-13137). Нокдаун с использованием малой интерферирующей РНК (siРНК) или сверхэкспрессия CD73 на клетках опухоли может модулировать рост и метастазирование опухоли (Beavis et al (2013 Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 110:14711-716; Stagg et al. (2010), выше; Jin et al. (2010) Cancer Res. 70: 2245-55). Мыши CD73-/- защищены от трансплантируемых и спонтанных опухолей (Stagg et al. (2010) Cancer Res. 71: 2892-2900). Было показано, что у людей высокий уровень экспрессии CD73 является отрицательным прогностическим признаком трижды

5 негативного рака молочной железы (Loi et al (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110: 11091-11096).

Несмотря на давний интерес к CD73 как к мишени для терапевтического воздействия, активность, необходимая агенту для прицельного воздействия на CD73 *in vivo*, не была полностью установлена. Тогда как CD73 экспрессируется на клетках опухоли, он также

10 экспрессируется на различных клетках иммунной системы, в частности, CD4 и CD8 Т-клетках, а также В-клетках. В то время существуют данные о том, что некоторые антитела связывают CD73 человека и повышают активность или пролиферацию Т-клеток, или модифицируют миграцию клеток опухоли, остается выяснить как функционируют такие антитела, поскольку имеются сообщения о том, что такая

15 модуляция Т-клеток и CD73-опосредуемая передача костимулирующих сигналов возможны без зависимости от экто-5'-нуклеотидазной активности CD73 (Gutensohn et al. 1995 Cell Immunol. 161:213-217). Следовательно, антитела, в общем называемые ингибиторами CD73, могут не действовать путем модуляции экто-5'-нуклеотидазной активности CD73. Существуют данные о том, что одно из антител, 7G2 (изотип m!gG2,

20 Life Technologies) ингибирует CD73, однако данное антитело не связывает CD73 клеточной поверхности в проточной цитометрии или в лучшем случае - лишь с очень низкой аффинностью. Другое антитело, связывающее CD73, клон AD2 (изотип IgG1 мыши), по имеющимся сообщениям, вызывает кластеризацию и интернализацию рецепторов, но оказывает минимальное влияние на ферментативную активность.

25 Существуют данные о том, что еще один агент, 1E9 (изотип IgG3 мыши, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), способствует передаче сигнала Т-клеток независимо от ингибирования фермента. Существуют данные о том, что другое моноклональное антитело (mAb), 4G4 (изотип IgG1, Novus Biologicals), индуцирует «сбрасывание» CD73 с поверхности Т-клеток. Только один агент, хотя и дополнительно не

30 охарактеризованный, по сообщениям, обладает частичной способностью блокировать фермент в анализе с использованием рекомбинантного CD73 (Sachsenmeier et al. ((2012) J. Biomed. Screening 17:993-998), и позднее был описан как антитело, которое индуцирует внутриклеточную интернализацию (Rust et al. (2013) Mol. Cancer 12:11). Кроме того, одним из дополнительных осложняющих факторов является то, что антитела, описанные

35 в литературе, как правило, относились к изотипам мыши, способным связываться Fcγ-рецепторами, что затрудняет отделение любого потенциального блокирующего эффекта от Fc-опосредуемых эффектов. Антитела анти-CD73, связываемые Fcγ-рецепторами, могут, например, опосредовать истощение (например, за счет антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC)) CD73-экспрессирующих клеток

40 опухоли (и, возможно, CD73-экспрессирующих иммуносупрессорных клеток) и/или могут вызывать выработку провоспалительных цитокинов, а не какой-либо истинный блокирующий эффект. Следовательно, механизм действия антител остается неясным.

Таким образом, несмотря на интерес к прицельному воздействию на CD73, сохраняется необходимость определения характеристик наиболее эффективных антител

45 анти-CD73. Не существует данных об антителах, которые связывают активный центр CD73. Экспрессия CD73 на клетках различных типов, включая иммунные клетки и клетки опухоли, в комбинации с применением антител, которые либо не блокируют в действительности CD73, либо не являются «чистыми» блокаторами, создают сложное

условие для оценки активности антител, лежащей в основе. Существует потребность в разработке новых анализов и антител.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения обнаружили антитела, которые связывают эпитоп, присутствующий на CD73, экспрессируемом на поверхности клеток, включая клетки опухоли, и которые ингибируют ферментативную (экто-5'-нуклеотидазную) активность фермента CD73. Указанные антитела могут ингибировать ферментативную активность мембраносвязанного белка CD73, экспрессируемого на поверхности клеток.

Предпочтительно, данные антитела можно применять в качестве чистых блокирующих CD73 антител, например, они ингибируют ферментативную активность мембраносвязанного белка CD73, экспрессируемого на поверхности клеток, и по существу не связывают Fcγ-рецепторы и/или по существу не направляют ADCC на CD73-экспрессирующую клетку. Возможно, антитела сохраняют Fc-домен и сохраняют связывание с FcRn человека.

Возможно, в отличие от некоторых антител, способных истощать CD73-экспрессирующие клетки опухоли (которые, например, могут обеспечить полную эффективность в концентрациях, которые равны или по существу ниже концентрации, обеспечивающей насыщение рецепторов), указанные антитела можно преимущественно применять в качестве чистых блокаторов и вводить в количестве, эффективном для нейтрализации ферментативной активности CD73 в течение желаемого периода времени, например, 1 недели, 2 недель, месяца, до следующего введения антитела анти-CD73.

Возможно, антитела представляют собой чистые блокаторы и направлены на нейтрализацию ферментативной активности CD73 в окружении опухоли. Возможно, антитела содержат модифицированный Fc-домен, например, для снижения чувствительности к протеазам (например, к таким протеазам, как ММП в окружении опухоли) и/или для уменьшения связывания с Fcγ-рецепторами человека (например, CD16).

В соответствии с одним из аспектов настоящего изобретения предложены анализы, которые можно применять для идентификации истинных антител, блокирующих функцию CD73. Как показано в настоящем документе, в предшествующих анализах блокирования растворимого фермента подавляющее большинство антител, которые, как обнаружено, блокируют в виде двухвалентных антител, являются ложноположительными, тогда как одновалентные связывающие антитела могут не обладать или обладать малой блокирующей активностью, возможно из-за неспособности блокировать активный центр или действовать в качестве аллостерических ингибиторов, когда не связываются с каждым полипептидом CD73 в димере CD73. Предшествующие клеточные анализы не могли провести различие между механизмами действия, и антитела, которые, по сообщениям, снижали активность CD73, могли сочетать несколько механизмов действия, например, индукцию интернализации рецепторов, «сбрасывание» рецепторов и/или эффекты, опосредуемые Fcγ-рецепторами. Поскольку остаточная ферментативная активность CD73 может приводить к образованию аденозина в количестве, достаточном для опосредования иммуносупрессивных эффектов, высокие уровни опосредуемой антителами блокады фермента являются предпочтительными для опосредования терапевтического эффекта.

В соответствии с одним из аспектов настоящего изобретения предложены антитела, которые связывают эпитоп, присутствующий на полипептиде CD73 человека, экспрессируемом на поверхности клеток, включая клетки опухоли, и которые ингибируют ферментативную (экто-5'-нуклеотидазную) активность фермента CD73.

В соответствии с одним из аспектов настоящего изобретения предложены антитела, которые могут ингибировать ферментативную активность растворимого рекомбинантного белка CD73.

Антитела согласно настоящему изобретению не вызывают внутриклеточную интернализацию или, в более общем смысле, понижающую модуляцию CD73, экспрессируемого на клеточной поверхности, и/или не зависят, поэтому, в отношении CD73-ингибирующей активности. Антитела согласно настоящему изобретению могут обеспечивать **большую** ингибирующую активность (способность по существу нейтрализовать ферментативную активность CD73), чем антитела, которые ингибируют CD73 путем вызова интернализации CD73. В отличие от антител, которые ингибируют растворимый CD73 по другим механизмам (например, вызывая образование олигомера CD73-антитело), антитела согласно настоящему изобретению способны ингибировать ферментативную активность CD73 во всех концентрациях, в том числе в большем (например, 10-кратном) избытке антитела:фермента. Более того, в отличие от антител, которые связывают эпитоп на рекомбинантном CD73, который может быть модифицирован или отсутствовать на CD73 клеточной поверхности (например, антитело 7G2), или с аффинностью, которая является слишком низкой, чтобы обеспечить эффективность в CD73-экспрессирующих клетках, антитела согласно настоящему изобретению связываются с высокой аффинностью с эпитопом, который присутствует и/или остается интактным на CD73 клеточной поверхности, что наделяет указанные антитела способностью эффективно нейтрализовать ферментативную активность клеточного CD73. Антитела согласно настоящему изобретению ингибируют ферментативную активность CD73 в клетках, но могут также ингибировать экто-5'-нуклеотидазную активность растворимого рекомбинантного CD73 (как наблюдали в анализе в бесклеточной системе с использованием растворимого димерного полипептида CD73).

Более того, в настоящем документе описаны типичные антитела (см., например, антитела 11E1, 6E1, 3C12 и 8C7), которые, как полагают, способны выступать в качестве аллостерических ингибиторов CD73, экспрессируемого клетками, например, они ингибируют активность полипептида CD73 человека без связывания с ферментативным активным центром полипептида CD73, и/или они являются неконкурентными ингибиторами CD73, например, они ингибируют активность полипептида CD73 человека без детектируемого уменьшения связывания между полипептидом CD73 и его природным субстратом. Указанные типичные антитела утрачивают связывание с мутантами CD73, содержащими замену в остатках A99, E129, K133, E134 и A135. Ввиду связывания типичных антител с CD73 как в присутствии, так и в отсутствии APCP-ингибитора активного центра CD73, их эпитоп на CD73, по-видимому, присутствует на CD73 не только в «открытой» конформации, когда не связан с субстратом, но также в «закрытой» конформации, когда связан с субстратом (например, природным субстратом, таким как АМФ, или ингибитором или другим соединением, которое связывает активный центр, таким как аналог АМФ, аденозин-5'-(α,β -метилен)дифосфат (APCP)).

Соответственно, согласно одному из аспектов настоящего изобретения предложен аллостерический ингибитор полипептида CD73. В соответствии с одним из аспектов указанный аллостерический ингибитор представляет собой антитело. В соответствии с одним из аспектов предложено антитело, которое связывает полипептид CD73 человека, экспрессируемый на поверхности клетки, включая, но ограничиваясь ими, клетки опухоли, и которое ингибирует ферментативную (экто-5'-нуклеотидазную) активность полипептида CD73, при этом указанное антитело представляет собой

аллостерический ингибитор полипептида CD73.

Более того, в настоящем документе описаны типичные антитела, которые связываются с эпитопом на CD73, который присутствует на той же стороне, когда CD73 присутствует в виде димера CD73, например, потенциально обеспечивая двухвалентное связывание антитела с одним димером CD73, в частности, в «закрытом» положении, в котором центры связывания пространственно отдалены друг от друга. Ввиду связывания с лиганд-связанным CD73, антитела, описанные в настоящем документе, могут подходить для связывания с CD73, когда он связан с АМФ, например, в окружении опухоли, где предшествующий (upstream) АДФ и/или АМФ присутствуют на значительных уровнях до лечения. Микроокружение опухоли может характеризоваться любым соответствующим параметром, например, высокими уровнями АДФ (например, вырабатываемого погибающими клетками), поглощаемого CD39 в стромальном и клеточном инфильтрате (например, клетки TReg) с образованием высоких уровней АМФ, а также, в более общем смысле, АМФ, аденозином, присутствием или уровнями экспрессии CD39 или CD39-экспрессирующих клеток, присутствием или уровнями экспрессии CD73 или CD73-экспрессирующих клеток, присутствием или уровнями экспрессии аденозиновых рецепторов или клеток, экспрессирующих аденозиновые рецепторы. Таким образом, молекулы CD73 в окружении опухоли могут находиться в связанной с субстратом конформации, и способность связывать и ингибировать связанный с субстратом клеточный CD73 (например, клетки, экспрессирующие CD73, предварительно инкубированные с субстратом, таким как АМФ) в дополнение к несвязанному с субстратом CD73 может обеспечить **большую** способность ингибировать CD73 *in vivo*. Возможно, уровни АДФ или АМФ (и/или АТФ или аденозина) могут быть оценены в окружении опухоли до лечения. Антитела могут обладать особым преимуществом в отношении лечения индивидуума, демонстрирующего значительные уровни (например, высокие уровни по сравнению с эталоном) АДФ, АМФ, АТФ или аденозина в образце опухоли.

Соответственно, согласно одному из аспектов настоящего изобретения предложено антитело, которое связывает полипептид CD73 человека, экспрессируемый на поверхности клеток, и которое ингибируют ферментативную (экто-5'-нуклеотидазную) активность полипептида CD73, при этом указанное антитело способно двухвалентно связываться с одним димером полипептида CD73 (растворимым димером полипептида CD73 или димером полипептида CD73, экспрессируемым клеткой). Возможно, указанное антитело связывается с помощью первого антигенсвязывающего домена с первым полипептидом CD73 в димере и с помощью второго антигенсвязывающего домена со вторым полипептидом CD73. В соответствии с одним из аспектов антитело представляет собой аллостерический ингибитор полипептида CD73.

Соответственно, согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено антитело, которое связывает полипептид CD73 человека, экспрессируемый на поверхности клеток, и которое ингибируют ферментативную (экто-5'-нуклеотидазную) активность полипептида CD73, при этом указанное антитело способно связывать полипептид CD73 в связанной с субстратом конформации.

Несмотря на описанные в литературе попытки скрининга антител, ингибирующих CD73, существующие антитела не нейтрализуют клеточный CD73 или в лучшем случае вызывают понижающую модуляцию CD73. В настоящем документе представлено объяснение авторами настоящего изобретения, почему данные антитела уже не ингибируют CD73 в клетках: антитела, которые способны связывать гомодимеры CD73 двухвалентным образом и которые ингибируют рекомбинантный CD73 в растворе,

могут вызывать олигомеризацию полипептидов CD73 и антител анти-CD73 с образованием комплексов (например, структур, содержащих более двух или более антител и два или более димеров CD73), что затрудняет отличие истинного ингибитора от ложноположительного.

5 Благодаря разработке улучшенных способов анализа, проводимых с большим избытком антитела: фермента, согласно настоящему изобретению предложены антитела с двухвалентным связыванием с CD73, которые не зависят от олигомеризации. В частности, антитела анти-CD73, предложенные согласно настоящему изобретению, способны ингибировать ферментативную активность растворимого димерного полипептида CD73 человека, когда указанные антитела находятся в укладке/
10 конфигурации, в которой они не способны образовывать олигомеры, например, когда они представлены в значительном молярном избытке (например, по меньшей мере 10-кратном, 20-кратном, 100-кратном и т.д.) по отношению к димерам полипептида CD73. Антитела, которые функционируют путем вызова олигомеризации, не способны
15 ингибировать CD73, когда указанные антитела представлены в значительном молярном избытке по отношению к димерам полипептида CD73. Более того, антитела связывают эпитоп на CD73, который сохраняется, когда CD73 экспрессируется на клеточной поверхности. Путем применения данного анализа могут быть также идентифицированы антитела, которые двухвалентно связываются с одним димером CD73; такие антитела
20 могут демонстрировать улучшенное связывание CD73 и CD73-блокирующую активность *in vitro* и *vivo* в CD73-экспрессирующих клетках. Антитела, идентифицированные данными способами, затем тестировали в клеточных анализах ферментативной активности с использованием очищенного антитела, и обнаружили, что они нейтрализуют ферментативную активность клеточного CD73. Антитела, которые
25 ингибируют CD73 путем индукции интернализации или которые утрачивают значительное связывание с клеточным CD73, были менее активны и не могли нейтрализовать ферментативную активность, обеспечивая в лучшем случае лишь частичное ингибирование ферментативной активности CD73 в клетках.

Эпитоп на CD73, связываемый данными антителами, присутствует на полипептидах CD73, экспрессируемых рядом клеток, например, раковыми клетками, CD4 Т-клетками, CD8 Т-клетками, В-клетками, трансфицированными клетками, и связывается с высокой
30 аффинностью, определяемой путем проточной цитометрии. Например, антитело может характеризоваться EC_{50} , определяемой путем проточной цитометрии, составляющей не более 5 мкг/мл, возможно не более 2 мкг/мл, не более 1 мкг/мл, не более 0,5 мкг/мл,
35 не более 0,1 мкг/мл или не более 0,05 мкг/мл, для связывания с клетками, экспрессирующими полипептид CD73 на своей поверхности. В одном из вариантов реализации указанные клетки представляют собой клетки, полученные для экспрессии CD73 на своей поверхности. В одном из вариантов реализации указанные клетки представляют собой клетки, эндогенно экспрессирующие CD73 на своей поверхности,
40 например, раковые клетки, лейкозные клетки, клетки рака мочевого пузыря, клетки глиомы, клетки глиобластомы, клетки рака яичников, клетки меланомы, клетки рака предстательной железы, клетки рака щитовидной железы, клетки рака пищевода или клетки рака молочной железы.

В одном из вариантов реализации антитела, нейтрализующие CD73, могут
45 характеризоваться способностью вызывать снижение экто-5-нуклеотидазной активности CD73 клеток по меньшей мере на 60%, 75% или 80%. В одном из вариантов реализации антитела, нейтрализующие CD73, могут характеризоваться EC_{50} для ингибирования 5'-эктонуклеотидазной активности CD73, экспрессируемого клеткой, составляющей не

более 1 мкг/мл, возможно не более 0,5 мкг/мл, возможно не более 0,2 мкг/мл.

Возможно, ингибирование 5'-эктонуклеотидазной активности CD73, экспрессируемого клеткой, определяют путем оценки нейтрализации 5'-эктонуклеотидазной активности в клетках MDA-MB-231 путем количественного определения гидролиза АМФ до

5 аденозина (см., например, пример 5).

Эпитоп на CD73, связываемый нейтрализующими антителами, описанными в настоящем документе, не приводит к понижающей модуляции экспрессии CD73 на клетках (и, например, не вызывает кластеризации и интернализации комплекса антитело-CD73), в том числе при применении полноразмерных антител, которые связывают CD73

10 двухвалентным образом. Таким образом, антитело анти-CD73 остается связанным, вместе с CD73, на клеточной поверхности. Ввиду обширной экспрессии CD73 в ткани, антитела, которые не запускают понижающую модуляцию и/или интернализацию CD73, могут обеспечивать улучшенные фармакологические свойства и большие количества антител в микроокружении опухоли.

15 В одном из вариантов реализации предложено выделенное антитело, которое специфично связывает CD73 человека (например, полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 или 2) и которое нейтрализует 5'-эктонуклеотидазную активность гомодимерного полипептида CD73 человека в растворе. В одном из вариантов реализации предложено антитело, которое связывает и ингибирует

20 ферментативную активность растворимого полипептида CD73 человека, в частности, антитело, которое нейтрализует CD73-опосредуемый катаболизм АМФ до аденозина. В одном из вариантов реализации указанное антитело связывает CD73 двухвалентным образом. В одном из вариантов реализации антитело представляет собой не истощающее антитело, например, Fc-молчащее (Fc silent) антитело. В одном из вариантов реализации

25 антитело нейтрализует CD73 в растворе без зависимости от индукции олигомеров полипептида CD73:антитело анти-CD73.

В одном из вариантов реализации предложено выделенное антитело, которое специфично связывает CD73 человека на поверхности клетки и которое способно

30 нейтрализовать 5'-эктонуклеотидазную активность растворимого полипептида CD73 человека. В одном из вариантов реализации указанное антитело не индуцирует олигомеризацию растворимого CD73.

В одном из вариантов реализации предложено выделенное антитело, которое специфично связывает CD73 человека на поверхности клетки и которое способно

35 нейтрализовать 5'-эктонуклеотидазную активность клеточного CD73 (CD73, экспрессируемого клетками). В одном из вариантов реализации предложено выделенное антитело, которое специфично связывает и нейтрализует 5'-эктонуклеотидазную активность CD73 человека на поверхности клетки, и которое не интернализуется в CD73-экспрессирующие клетки после связывания с CD73. Указанное антитело не

40 вызывает мультимеризации и последующей интернализации CD73. В одном из вариантов реализации предложено антитело, которое связывает и способно ингибировать ферментативную активность рекомбинантного полипептида CD73 человека в растворе, при этом указанное антитело не интернализуется в CD73-экспрессирующие клетки. В

45 одном из вариантов реализации указанное не интернализирующееся антитело связывает CD73 двухвалентным образом. В одном из вариантов реализации антитело представляет собой не истощающее антитело, например, Fc-молчащее антитело. Антитело способно нейтрализовать 5'-эктонуклеотидазную активность димерного полипептида CD73 человека в растворе, более того без зависимости от индукции олигомеров полипептида CD73:антитела анти-CD73.

В одном из вариантов реализации предложено антитело, которое специфично двухвалентно связывается с полипептидами CD73 человека и ингибирует ферментативную активность клеточного CD73 человека (и возможно также рекомбинантного растворимого CD73 человека), при этом указанное антитело не интернализуется в CD73-экспрессирующие клетки. Предпочтительно, указанное антитело по существу не демонстрирует связывания Fcγ-рецептора (например, через Fc-домен).

В соответствии с одним из аспектов предложено выделенное антитело, которое специфично связывает CD73 человека на поверхности клетки, предварительно инкубированной совместно с АМФ, и которое способно нейтрализовать его 5'-эктонуклеотидазную активность. Возможно, нейтрализацию 5'-эктонуклеотидазной активности определяют путем оценки нейтрализации 5'-эктонуклеотидазной активности в клетках MDA-MB-231 путем количественного определения гидролиза АМФ до аденозина (см., например, пример 5).

В любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, антитело может характеризоваться способностью связывать полипептид CD73 человека, активный центр которого занят субстратом, например, АМФ, АРСР. В любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, антитело может характеризоваться способностью ингибировать 5'-эктонуклеотидазную активность клетки, экспрессирующей CD73, когда такая клетка была предварительно инкубирована совместно с АМФ. Настоящее изобретение также следует, среди прочего, из обнаружения эпитопа на CD73 человека, который позволяет осуществлять высокоэффективное прицельное воздействие для нейтрализации активности CD73 в клетках и у индивидуумов, страдающих раком. Антитела конкурируют друг с другом за связывание с CD73 (но не конкурируют с эталонными антителами, блокирующими растворимый CD73), что позволяет предположить наличие области на CD73, которая наиболее подходит для ингибирования ферментативной активности CD73 и присутствие которой сохраняется на полипептиде CD73, когда он экспрессируется на клеточной поверхности.

Предпочтительно, указанный эпитоп присутствует на каждом из CD73 человекообразного и нечелообразного примата, экспрессируемом на клеточной поверхности, а также на CD73, экспрессируемом раковыми клетками.

В соответствии с одним из аспектов предложено антитело анти-CD73, которое связывает общую антигенную детерминанту, присутствующую как на растворимом CD73, так и на CD73, экспрессируемом на клеточной поверхности.

В соответствии с одним из аспектов предложено антитело анти-CD73, которое связывает общую антигенную детерминанту, присутствующую на CD73, когда он представляет собой «открытую» конформацию (когда активный центр CD73 не занят/не связан с субстратом, например, АМФ, АРСР), и «закрытой» CD73, когда он представляет собой «закрытую» конформацию (когда активный центр CD73 занят/связан с субстратом, например, АМФ, АРСР).

В соответствии с одним из аспектов предложено антитело анти-CD73, которое связывает антигенную детерминанту в каждой полипептидной цепи CD73 в димере CD73, при этом, например, указанные антигенные детерминанты присутствуют на общей стороне димера CD73.

В соответствии с одним из аспектов предложено антитело анти-CD73, которое связывает эпитоп на CD73, содержащий один, два, три, четыре или пять остатков, выбранных из группы, состоящей из A99, E129, K133, E134 и A135 (со ссылкой на SEQ ID NO: 1).

В соответствии с одним из аспектов предложено антитело анти-CD73, которое

демонстрирует уменьшенное связывание с полипептидом CD73, содержащим мутацию в остатке, выбранном из группы, состоящей из: A99, E129, КПЗ, E134 и A135 (со ссылкой на SEQ ID NO: 1); возможно указанный мутантный полипептид CD73 содержит мутации: A99S, E129A, K133A, E134N и A135S.

5 В соответствии с одним из аспектов предложено антитело анти-CD73, которое конкурирует за связывание с эпитопом на CD73, связываемым 11E1, 8C7, 3C12 и/или 6E1 (например, которое конкурирует за связывание с эпитопом на полипептиде CD73 с антителом, содержащим определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой и легкой цепи или переменные области любого из 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1).

10 Согласно одному из аспектов любого из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, предложено антигенсвязывающее соединение, которое связывает тот же эпитоп и/или конкурирует за связывание с полипептидом CD73 с моноклональными антителами 11E1, 8C7, 3C12 и/или 6E1 (например, которое конкурирует за связывание с полипептидом CD73 с антителом, содержащим CDR

15 тяжелой и легкой цепи или переменные области любого из 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1). В одном из вариантов реализации предложено антигенсвязывающее соединение, которое связывает тот же эпитоп и/или конкурирует за связывание с полипептидом CD73 с антителом, выбранным из группы, состоящей из:

(а) антитела, содержащего соответственно область VH и VL последовательностей

20 SEQ ID NO: 3 и 4 (11E1);

(b) антитела, содержащего соответственно область VH и VL последовательностей SEQ ID NO: 21 и 22 (6E1)

(с) антитела, содержащего соответственно область VH и VL последовательностей SEQ ID NO: 28 и 29 (8C7); и

25 (d) антитела, содержащего соответственно область VH и VL последовательностей SEQ ID NO: 36 и 37(3C12).

В одном из вариантов реализации антитело анти-CD73 связывает эпитоп, содержащий один, два или три аминокислотных остатка, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков на CD73, который связывают антитела 11E1, 6E1, 3C12 или

30 8C7. В одном из вариантов реализации указанные аминокислотные остатки на CD73 выбраны из группы, состоящей из остатков, перечисленных в таблице 1.

Согласно одному из аспектов любого из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, антитело может содержать тяжелую и/или легкую цепь, содержащую одну, две или три CDR соответствующей тяжелой и/или легкой цепи

35 антитела, выбранного из группы, состоящей из антитела 11E1, 6E1, 3C12 и 8C7.

В любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, антитела анти-CD73 могут характеризоваться связыванием с полипептидами CD73 человека, экспрессируемыми на поверхности клетки (например, клетки опухоли, клетки, полученной для экспрессии CD73, например, линии клеток опухоли MDA-MB-231, или

40 рекомбинантной клетки-хозяина, полученной для экспрессии CD73, как представлено в разделе «Примеры»), при этом также возможно, что антитело связывается с высокой аффинностью, определяемой путем проточной цитометрии. Например, антитело может характеризоваться EC₅₀, определяемой путем проточной цитометрии, составляющей не более 5 мкг/мл, возможно не более 1 мкг/мл, не более 0,5 мкг/мл, не более 0,1 мкг/

45 мл или не более 0,05 мкг/мл, для связывания с клетками, которые экспрессируют полипептид CD73 на своей поверхности, например, клетками опухоли, экспрессирующими CD73, клетками, экспрессирующими полипептид CD73 на своей поверхности, лимфоцитами экспрессирующими CD73, и т.д. Возможно,

антигенсвязывающее соединение имеет EC_{50} , составляющую не более 1 мкг/мл, возможно не более 0,5 мкг/мл, не более 0,1 мкг/мл или не более 0,05 мкг/мл, для связывания с (i) клетками, экспрессирующими CD73 человека (например, полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1) на своей поверхности, и/или (ii) клетками, экспрессирующими CD73 человекообразного или нечеловекообразного примата (например, CD73 яванского макака) на своей поверхности.

Согласно одному из аспектов любого из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, антитело анти-CD73 представляет собой тетрамерное антитело, содержащее две тяжелые и две легкие цепи, при этом указанные тяжелые цепи содержат Fc-области изотипа человека и по существу не демонстрируют связывание с Fcγ-рецепторами человека (например, CD16A, CD16B, CD32A, CD32B и/или CD64).

В одном из вариантов реализации антитела вводят индивидууму, страдающему раком, в количестве и с частотой, достаточной для нейтрализации активности CD73 в микроокружении опухоли. В одном из вариантов реализации антитела вводят в количестве и с частотой, достаточной для уменьшения выработки и/или концентрации аденозина в микроокружении опухоли. В одном из вариантов реализации антитела вводят в количестве и с частотой, достаточной для увеличения выработки и/или концентрации АТФ в микроокружении опухоли. В одном из вариантов реализации антитела вводят в количестве и с частотой, достаточной для нейтрализации активности CD73, экспрессируемого клетками опухоли. В одном из вариантов реализации антитела вводят в количестве и с частотой, достаточной для нейтрализации активности CD73, экспрессируемого CD4 Т-клетками, CD8 Т-клетками и/или В-клетками.

Антитела подходят для ингибирования CD73-опосредуемого катаболизма АМФ до аденозина, например, для уменьшения концентрации аденозина в микроокружении опухоли. Таким образом, данные антитела подходят для отмены иммуносупрессивного действия CD73 и/или аденозина на Т-клетки, В-клетки и другие клетки, которые экспрессируют аденозиновые рецепторы, например, при лечении рака. В одном из вариантов реализации антитело анти-CD73 нейтрализует аденозин-опосредуемое ингибирование пролиферации, выработки цитокинов, цитотоксичности и/или активности NFκB в Т-клетках.

Поскольку CD73-опосредуемый катаболизм АМФ до аденозина является необратимым, тогда как катаболизм АТФ до АДФ и АДФ до АМФ под действием CD39 является обратимым (под действием NDK-киназы и аденилаткиназы соответственно), антитела, которые блокируют необратимый CD73-опосредуемый катаболизм, будут увеличивать пул АМФ, и таким образом их можно применять для повышения концентрации АДФ и АТФ, например, в микроокружении опухоли. Антитела могут подходить для увеличения образования АДФ из АМФ и образования АТФ из АДФ. Поскольку АТФ играет иммуноактивирующую роль, антитела анти-CD73 могут подходить для активации Т-клеток, например, при лечении рака.

Антитела подходят для ингибирования образования, количества и/или концентрации аденозина в микроокружении опухоли.

Антитела, нейтрализующие активность растворимого димера полипептида CD73 человека, могут также нейтрализовать CD73 в любой другой подходящей среде, например, в репортерной клетке, полученной для экспрессии CD73, в Т-клетке и т.д.

Предложен способ лечения индивидуума, при этом указанный способ включает введение индивидууму (например, индивидууму с заболеванием, опухолью и т.д.) терапевтически активного количества любого из антигенсвязывающих соединений анти-CD73, описанных в настоящем документе. В соответствии с одним из аспектов

предложен способ лечения индивидуума, при этом указанный способ включает, по существу состоит из или состоит из: введения индивидууму (например, индивидууму с заболеванием, опухолью и т.д.) терапевтически активного количества

антигенсвязывающего соединения согласно настоящему изобретению, которое
 5 ингибирует полипептид CD73. В одном из вариантов реализации антитело ингибирует полипептид CD73 в клеточном и возможно также неклеточном анализе, например, рекомбинантный CD73, растворимый CD73. Предпочтительно, указанное соединение представляет собой не истощающее антитело (антитело, которое не истощает клетки, с которыми оно связывается, например, Fc-молчащее антитело). Возможно, соединение
 10 связывается с CD73 двухвалентным образом. Возможно, антитело представляет собой химерное, гуманизированное антитело или антитело человека. Возможно, антитело содержит константную область тяжелой цепи изотипа IgG4.

В соответствии с одним из аспектов предложен способ снижения уровня аденозина, продуцируемого CD73-экспрессирующей клеткой (например, иммунной клеткой и/или
 15 клеткой опухоли у индивидуума), или способ нейтрализации ферментативной активности клеточного CD73, при этом указанный способ включает, по существу состоит из или состоит из: приведения указанной CD73-экспрессирующей клетки в контакт с антигенсвязывающим соединением согласно настоящему изобретению, которое ингибирует CD73. В одном из вариантов реализации указанный этап приведения CD73-
 20 экспрессирующей клетки в контакт с антигенсвязывающим соединением согласно настоящему изобретению включает введение индивидууму терапевтически активного количества антигенсвязывающего соединения, которое ингибирует CD73. В одном из вариантов реализации указанный индивидуум страдает раком.

В соответствии с одним из аспектов предложен способ снижения уровня аденозина, присутствующего в микроокружении опухоли (например, у индивидуума), при этом
 25 указанный способ включает, по существу состоит из или состоит из: введения индивидууму терапевтически активного количества антигенсвязывающего соединения, которое ингибирует полипептид CD73. В одном из вариантов реализации указанный индивидуум страдает раком.

В одном из вариантов реализации активное количество антигенсвязывающего соединения, ингибирующего полипептид CD73, представляет собой количество, эффективное для достижения и/или поддержания (например, до следующего введения антигенсвязывающего соединения) концентрации в крови, составляющей по меньшей мере EC₅₀, возможно EC₇₀, возможно по существу EC₁₀₀, для ингибирования CD73-
 35 опосредуемого катаболизма АМФ до аденозина у индивидуума. В одном из вариантов реализации активное количество антигенсвязывающего соединения, ингибирующего полипептид CD73, представляет собой количество, эффективное для достижения EC₅₀, возможно EC₇₀, возможно по существу EC₁₀₀ для ингибирования CD73-опосредуемого катаболизма АМФ до аденозина в экстраваскулярной ткани индивидуума. В одном из
 40 вариантов реализации активное количество антигенсвязывающего соединения, ингибирующего полипептид CD73, представляет собой количество, эффективное для достижения EC₅₀, возможно EC₇₀, возможно по существу EC₁₀₀ для ингибирования CD73-опосредуемого катаболизма АМФ до аденозина у индивидуума. В одном из
 45 вариантов реализации активное количество антигенсвязывающего соединения, ингибирующего полипептид CD73, составляет от 1 до 20 мг/кг массы тела. В одном из вариантов реализации активное количество вводят индивидууму каждую неделю, каждые две недели, каждый месяц или каждые два месяца.

Возможно, индивидуум представляет собой человека, страдающего раком или подверженного раку.

Антитела возможно характеризуются аффинностью связывания (K_D) в отношении полипептида CD73 человека, менее (лучше) 10^{-9} М, предпочтительно менее 10^{-10} М или предпочтительно менее 10^{-11} М, и/или связыванием CD73 человека с EC_{50} , менее (лучше связывание) 1 мкг/мл, предпочтительно при этом антитело имеет EC_{50} , составляющую не более 0,5 мкг/мл, возможно не более 0,2 мкг/мл, возможно не более 0,1 мкг/мл, для связывания с клетками (например, клетками опухоли), экспрессирующими CD73 человека на клеточной поверхности.

Антитела возможно представляют собой химерные антитела, антитела человека или гуманизированные антитела.

Антитела возможно характеризуются EC_{50} для нейтрализации ферментативной активности CD73 в CD73-экспрессирующих клетках, составляющей менее (лучше) 1 мкг/мл, возможно менее 0,5 мкг/мл.

В одном из вариантов реализации антитело представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент, сохраняющий специфичность связывания и способность нейтрализовать ферментативную активность CD73. В одном из вариантов реализации антитело представляет собой антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Например, антитело может представлять собой антитело, содержащее Fc-домен изотипа IgG4 человека, или антитело, содержащее Fc-домен любого изотипа IgG человека (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), модифицированный для уменьшения связывания между указанным Fc-доменом и Fc γ -рецептором (например, CD 16). Предпочтительно, антигенсвязывающее соединение не содержит Fc-домен, способный индуцировать антителоопосредованную клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или комплементзависимую цитотоксичность (CDC); возможно антигенсвязывающее соединение не содержит Fc-домен, способный по существу связываться с полипептидом Fc γ RIIIA (CD16) (например, содержит Fc-домен, не способный по существу связываться с полипептидом Fc γ RIIIA (CD16); не содержит Fc-домен (например, не содержит CH2- и/или CH3-домен; содержит Fc-домен изотипа IgG4). В одном из вариантов реализации Fc-домен (например, изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека) содержит модификацию (например, замену) аминокислоты по сравнению с Fc-доменом дикого типа, при этом указанная замена снижает способность Fc-домена (или антител, его содержащих) связываться с Fc γ -рецептором (например, CD 16) и/или связывать комплемент. Возможно, если присутствует Fc-домен изотипа IgG4, такой Fc-домен может содержать стабилизирующую мутацию для уменьшения образования полуантител, такую как мутация в шарнирной области, например, мутация S241P (S228P). Возможно, антигенсвязывающее соединение состоит из или содержит Fab, Fab', Fab'-SH, F (ab')₂, Fv, диатело, одноцепочечный фрагмент антитела или полиспецифическое антитело, содержащее несколько различных фрагментов антител. В одном из вариантов реализации антигенсвязывающее соединение не связано с токсичным фрагментом.

Также предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело человека или гуманизированное антитело, или фрагмент антитела, обладающий любым из вышеуказанных свойств, вектор, содержащий такую нуклеиновую кислоту, клетка, содержащая такой вектор, и способ получения антитела анти-CD73 человека, включающий культивирование такой клетки в условиях, подходящих для экспрессии антитела анти-CD73. Настоящее изобретение также относится к композициям, таким как фармацевтически приемлемые композиции, и наборам, содержащим такие белки,

нуклеиновые кислоты, векторы и/или клетки, и, как правило, один или более дополнительных ингредиентов, которые могут представлять собой активные ингредиенты или неактивные ингредиенты, которые способствуют получению, доставке, стабильности или другим характеристикам композиции (например, различные носители).

5 Настоящее изобретение также относится к различным новым и подходящим способам получения и применения таких антител, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, организмов и/или композиций, например, для модуляции CD73-опосредуемой биологической активности, например, для лечения связанных с ней заболеваний, в частности, раковых опухолей.

10 Согласно настоящему изобретению также предложены способы получения или тестирования антитела, связывающего и нейтрализующего ферментативную активность CD73, при этом указанный способ включает следующие этапы:

(a) получение множества антител, которые связывают полипептид CD73,

(b) приведение каждого из указанных антител в контакт (например, отдельно друг от друга) с растворимым полипептидом CD73 (например, в анализе в бесклеточной системе, например, в присутствии АМФ) и

(c) отбор антитела (например, из этапа (b)), нейтрализующего ферментативную активность указанного растворимого полипептида CD73. В одном из вариантов реализации антитела способны связывать CD73 двухвалентным образом, например, антитела представляют собой полноразмерные антитела IgG. Возможно, этап (b) включает приведение каждого из указанных антител в контакт с растворимым полипептидом CD73 в анализе в бесклеточной системе, при этом антитела представляют в молярном избытке антитела (по сравнению с полипептидом CD73). Возможно, полипептид CD73 представляет собой растворимый димер CD73. Возможно, этап (c) включает отбор антитела, нейтрализующего ферментативную активность указанного растворимого полипептида CD73, когда антитела представлены в молярном избытке антитела по отношению к димерам CD73 (например, по меньшей мере в 2-кратном, 5-кратном, 10-кратном или 100-кратном молярном избытке).

В одном из вариантов реализации этап получения множества антител включает иммунизацию не относящегося к человеку млекопитающего иммуногеном, содержащим полипептид CD73.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ потенцирования активности лимфоцитов (например, Т-клеток) у нуждающегося в этом субъекта или восстановления активности лимфоцитов (например, Т-клеток), или способ уменьшения аденозин-опосредуемого ингибирования лимфоцитов (например, Т-клеток), при этом указанный способ включает введение субъекту эффективного количества любой из вышеуказанных композиций. В одном из вариантов реализации субъект представляет собой пациента, страдающего раком. Например, указанный пациент может страдать солидной опухолью, например, раком толстой и прямой кишки, раком почки, раком яичников, раком легкого, раком молочной железы или злокачественной меланомой. В качестве альтернативы, пациент может страдать раком гемопоэтической системы, например, острым миелоидным лейкозом, хроническим миелоидным лейкозом, множественной миеломой или неходжкинской лимфомой.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения заболевания у индивидуума, при этом указанное лечение включает введение указанному индивидууму антитела анти-CD73, нейтрализующего ферментативную активность CD73, в течение по меньшей мере одного цикла введения, в котором антитело анти-CD73 вводят по меньшей мере один раз, возможно по меньшей мере два раза в количестве, эффективном

для достижения и/или для поддержания между двумя последовательными введениями антитела анти-CD73 концентрации в крови (сыворотке) или экстраваскулярной ткани (например, микроокружении опухоли), которая соответствует по меньшей мере ЕС₅₀ (например, ЕС₅₀ от 0,01 до 0,5 мкг/мл), возможно ЕС₇₀ или возможно ЕС₁₀₀, для
 5 нейтрализации ферментативной активности CD73 (например, ЕС₁₀₀ от 0,05 до 1 мкг/мл, от 0,1 до 1 мкг/мл). Антитело можно, например, вводить в количестве, достаточном для достижения и/или поддержания концентрации в кровообращении или в экстраваскулярной ткани (например, микроокружении опухоли), составляющей по
 10 меньшей мере примерно 0,1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл или 2 мкг/мл. Например, для достижения концентрации в экстраваскулярной ткани от 0,05 до 1 мкг/мл или от 0,1 до 1 мкг/мл, антитело анти-CD73 вводят в количествах, эффективных для достижения концентрации антитела анти-CD73 в кровообращении, составляющей от 0,5 до 10 мкг/мл или от 1 до 10 мкг/мл. Возможно, антитело анти-CD73 вводят по меньшей мере два
 15 раза и в количествах, эффективных для поддержания концентрации антитела анти-CD73, по меньшей мере вышеуказанной концентрации в течение по меньшей мере 1 недели, 2 недель, 3 недель, 4 недель между двумя последовательными введениями антитела анти-CD73 и/или на протяжении всего цикла введения.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения заболевания у индивидуума, при этом указанное лечение включает введение указанному индивидууму
 20 антитела анти-CD73, нейтрализующего ферментативную активность CD73, в течение по меньшей мере одного цикла введения, в котором антитело анти-CD73 вводят по меньшей мере один раз, возможно по меньшей мере два раза в количестве, эффективном для достижения и/или для поддержания между двумя последовательными введениями
 25 антитела анти-CD73 концентрации антитела анти-CD73 в крови или ткани, составляющей по меньшей мере 1 мкг/мл, возможно по меньшей мере 10 мкг/мл, возможно от 1 до 100 мкг/мл. Возможно, антитело анти-CD73 вводят по меньшей мере два раза и в количествах, эффективных для поддержания постоянной концентрации антитела анти-CD73 в крови или ткани, составляющей по меньшей мере 1 мкг/мл, возможно по меньшей
 30 мере 10 мкг/мл, возможно от 1 до 100 мкг/мл, в течение по меньшей мере 1 недели, 2 недель, 3 недель, 4 недель между двумя последовательными введениями антитела анти-CD73 и/или на протяжении всего цикла введения.

Данные аспекты более подробно описаны, и дополнительные аспекты, признаки и преимущества будут очевидны исходя из описания, представленного в настоящем
 35 документе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг. 1 показана способность антител анти-CD73 блокировать ферментативную активность CD73, оцененная путем измерения способности тестируемых
 40 моноклональных антител влиять на способность CD73 расщеплять АМФ на аденозин + неорганический фосфат, восстанавливающую активность люциферазы и излучение света. Результаты выражены в виде остаточной активности фермента (%). Антитела 11E1, 8C7, 6E1 и 3C12 (не показано) вызывают сильное снижение активности фермента и продолжают снижать остаточную активность фермента даже когда представлены в избытке; независимые от иммунного комплекса условия.

На фиг. 2 представлены результаты титрования антител путем твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием растворимого рекомбинантного полипептида CD73 человека.

На фиг. 3 представлены результаты титрования антител путем проточной цитометрии

с использованием рекомбинантных линий клеток-хозяев, экспрессирующих CD73 человека, яванского макака и мыши. 11E1, 8C7, 3C12 и 6E1, но не 7G2 или 1E9, связываются с рекомбинантными клетками-хозяевами, экспрессирующими CD73 человека и яванского макака (но не мыши), с превосходной аффинностью.

5 На фиг. 4 представлены результаты титрования антител путем проточной цитометрии с использованием клеток аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231 человека, эндогенно экспрессирующих CD73, 11E1, 8C7, 3C12 и 6E1, но не 7G2 или 1E9, связываются с клетками MDA-MB-231 с превосходной аффинностью.

На фиг. 5 показано, что антитела 11E1, 8C7, 3C12 и 6E1 нейтрализуют ферментативную активность клеточного CD73.

На фиг. 6 показана способность различных антител вызывать понижающую модуляцию экспрессии CD73 на клетках. Каждое из AD2, 7G2 и 1E9 вызывало понижающую модуляцию CD73, однако ни одно из антител 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1 не вызывало уменьшение CD73 клеточной поверхности.

15 На фиг. 7 показано титрование антител путем проточной цитометрии с использованием клеток, экспрессирующих мутанты CD73 человека. Антитело 3C12 связывается с CD73 дикого типа и мутантом 2, но не с мутантом 3, в то время как антитело AD2 связывается с CD73 дикого типа и мутантом 3, но не с мутантом 2.

На фиг. 8А представлена молекулярная структура димера CD73 с мутированными аминокислотами в мутанте 2 (утрата связывания AD2), показанными (белые круги) как в «открытой», так и в «закрытой» конфигурациях. На фиг. 8В представлена молекулярная структура димера CD73 с мутированными аминокислотами в мутанте 3 (утрата связывания 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1), показанными как в «открытой», так и в «закрытой» конфигурациях. Активный центр показан рамкой (пунктирные линии).

25 ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

В настоящем описании формы единственного числа могут означать один или более. В формуле изобретения при употреблении в сочетании с термином «содержащий (включающий)» формы единственного числа могут означать один или более одного.

30 В настоящем описании термин «другой» может означать по меньшей мере второй или более.

В случае употребления термина содержащий (включающий) он может быть заменен на «по существу состоящий из» или на «состоящий из».

CD73 человека, также известный как экто-5'-нуклеотидаза и как 5-штрих-рибонуклеотидфосфогидролаза, ЕС 3.1.3.5, кодируемый геном NT5E, проявляет 5'-нуклеотидазную, в частности, АМФ-, НАД- и НМН-нуклеозидазную активность. CD73 катализирует превращение при нейтральном рН пуриновых 5-штрих-моонуклеотидов в нуклеозиды, при этом предпочтительным субстратом является АМФ. Указанный фермент состоит из димера из 2 идентичных субъединиц массой 70 кДа, связанных гликозилфосфатидилинозитоловой связью с наружной стороной плазматической мембраны. Аминокислотная последовательность пребелка (мономера) CD73 человека, включая сигнальную последовательность в аминокислотах 1-26, представлена в Genbank под номером доступа NP_002517, полное содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки, и является следующей:

45

MCPRAARAPA TLLLALGAVL WPAAGAWELT ILHTNDVHSR LEQTSSESSK CVNASRCMGG
 VARLFTKVQQ IRRAPENVLL LDAGDQYQGT IWFTVYKGAE VAHFMNALRY DAMALGNHEF
 DNGVEGLIEP LLKEAKFPIL SANIKAKGPL ASQISGLYLP YKVLPVGDEV VGIVGYTSKE
 TPFLSNPGTN LVFEDEITAL QPEVDKLKTL NVNKIIALGH SGFEMDKLIA QKVRGVDVVV
 GGHSTNTFLYT GNPPSKEVPA GKYPFIVTSD DGRKVPVQA YAFGKYLGYL KIEFDERGNV
 ISSHGNPILL NSSIPEDPSI KADINKWRIK LDNYSTQELG KTIVYLDGSS QSCRFRECNM
 GNLICDAMIN NNLRHTDEMF WNHVSMCILN GGGIRSPIDE RNNGTITWEN LAAVLPFGGT
 FDLVQLKGST LKKAFEHSVH RYGQSTGEFL QVGGIHVVYD LSRKPGDRVV KLDVLC TKCR
 VPSYDPLKMD EVYKVILPNF LANGGDGFQM IKDELLRHDS GDQDINVVST YISKMKVIYP
 AVEGRIKFST GSHCHGSFSL IFLSLWAVIF VLYQ (SEQ ID NO: 1)

В контексте настоящего изобретения термин «нейтрализовать ферментативную активность CD73» относится к процессу, в котором ингибируют 5'-нуклеотидазную (5'-эктонуклеотидазную) активность CD73. Данный термин включает, в частности, ингибирование CD73-опосредуемого образования аденозина, т.е. ингибирование CD73-опосредуемого катаболизма АМФ до аденозина. Указанное ингибирование может быть измерено, например, в анализе в бесклеточной системе, позволяющем измерить способность тестируемого соединения ингибировать превращение АМФ в аденозин либо напрямую, либо опосредованно. В одном из вариантов реализации препарат антитела вызывает по меньшей мере 50% уменьшение превращения АМФ в аденозин, по меньшей мере 70% уменьшение превращения АМФ в аденозин или по меньшей мере 80% уменьшение превращения АМФ в аденозин согласно, например, анализам, описанным в настоящем документе.

При каждом упоминании на протяжении всего настоящего описания термина «лечение рака» или т.п. в отношении связывающего агента анти-CD73 (например, антитело) подразумевается: (а) способ лечения рака, при этом указанный способ включает этап введения (в течение по меньшей мере одного лечения) связывающего агента анти-CD73 (предпочтительно в фармацевтически приемлемом веществе-носителе) индивидууму, млекопитающему, особенно человеку, нуждающемуся в таком лечении, в дозе, обеспечивающей лечение рака (терапевтически эффективным количестве), предпочтительно в дозе (количестве), указанной в настоящем описании; (b) применение связывающего агента анти-CD73 для лечения рака или связывающий агент анти-CD73 для применения для указанного лечения (особенно у человека); (с) применение связывающего агента анти-CD73 для получения фармацевтического препарата для лечения рака, способ применения связывающего агента анти-CD73 для получения фармацевтического препарата для лечения рака, включающий смешивание связывающего агента анти-CD73 с фармацевтически приемлемым носителем, или фармацевтический препарат, содержащий эффективную дозу связывающего агента анти-CD73, который подходит для лечения рака; или (d) любая комбинация а), b) и с) в соответствии с объектом изобретения, патентоспособным в стране подачи настоящей заявки.

В настоящем описании термин «антитело» относится к поликлональным и моноклональным антителам. В зависимости от типа константного домена в тяжелых цепях антитела относят к одному из пяти основных классов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. Некоторые из данных классов дополнительно делят на подклассы или изоотипы, такие как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и т.п. Типичная структурная единица иммуноглобулина (антитела) содержит тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара содержит одну «легкую» (примерно 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (примерно 50-70 кДа). N-конец каждой цепи определяет переменную область примерно из 100-110 или более аминокислот, главным образом

ответственную за распознавание антигена. Термины «вариабельная область легкой цепи (V_L)» и «вариабельная область тяжелой цепи (V_H)» относятся к данным легким и тяжелым цепям соответственно. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются «альфа», «дельта», «эпсилон», «гамма» и «мю» соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. IgG представляют собой типичный класс антител, применяемых согласно настоящему изобретению, поскольку они являются наиболее распространенными антителами в физиологических условиях и поскольку их наиболее легко получить в лабораторных условиях. Возможно, антитело представляет собой моноклональное антитело. Конкретными примерами антител являются гуманизированные, химерные антитела, антитела человека или иные подходящие для человека антитела. Термин «антитела» также включает любой фрагмент или производное любого из антител, описанных в настоящем документе.

Термин «специфично связывается с» означает, что антитело может связываться в анализе конкурентного связывания предпочтительно с партнером по связыванию, например, CD73, по оценкам с применением либо рекомбинантных форм белков, эпитопов в них, либо нативных белков, присутствующих на поверхности выделенных целевых клеток. Анализы конкурентного связывания и другие способы определения специфического связывания дополнительно описаны ниже и хорошо известны в данной области техники.

Когда говорят, что антитело «конкурирует с» конкретным моноклональным антителом, это означает, что указанное антитело конкурирует с моноклональным антителом в анализе связывания с использованием либо рекомбинантных молекул CD73, либо молекул CD73, экспрессированных на поверхности. Например, если тестируемое антитело уменьшает связывание эталонного антитела с полипептидом CD73 или CD73-экспрессирующей клеткой в анализе связывания, говорят, что указанное антитело «конкурирует» соответственно с эталонным антителом.

В настоящем описании термин «аффинность» означает силу связывания антитела с эпитопом. Аффинность антитела представлена константой диссоциации K_d , определяемой как $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$, где $[Ab-Ag]$ представляет собой молярную концентрацию комплекса антитело-антиген, $[Ab]$ представляет собой молярную концентрацию несвязанного антитела, и $[Ag]$ представляет собой молярную концентрацию несвязанного антигена. Константу аффинности K_a определяют как $1/K_d$. Способы определения аффинности моноклональных антител можно найти в Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988), Coligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993) и Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601 (1983); полное содержание данных источников включено в настоящее описание посредством ссылки. Одним из стандартных способов определения аффинности моноклональных антител, хорошо известных в данной области техники, является использование скрининга на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (например, путем анализа с помощью аналитического устройства SPR BIAcore™).

В контексте настоящего изобретения термин «детерминанта» означает сайт взаимодействия или связывания на полипептиде.

Термин «эпитоп» относится к антигенной детерминанте и представляет собой участок или область на антигене, с которой связывается антитело. Белковый эпитоп может содержать аминокислотные остатки, напрямую вовлеченные в связывание, а также

аминокислотные остатки, которые эффективно блокирует специфическое антигенсвязывающее антитело или пептид, т.е. аминокислотные остатки в пределах «отпечатка» (области узнавания) антитела. Он представляет собой простейшую форму или наименьший структурный участок на сложной молекуле антигена, который может соединяться, например, с антителом или рецептором. Эпитопы могут быть линейными или конформационными/структурными. Термин «линейный эпитоп» определяется как эпитоп, состоящий из аминокислотных остатков, которые являются смежными в линейной последовательности аминокислот (первичная структура). Термин «конформационный или структурный эпитоп» определяется как эпитоп, состоящий из аминокислотных остатков, не все из которых являются смежными и таким образом представляют отделенные части линейной последовательности аминокислот, которые приближаются друг к другу при фолдинге (укладке) молекулы (вторичная, третичная и/или четвертичная структуры). Конформационный эпитоп зависит от 3-мерной структуры. Таким образом, термин «конформационный» и термин «структурный» зачастую являются взаимозаменяемыми.

Термин «истощать» или «истощению» применительно к CD73-экспрессирующим клеткам означает процесс, способ или соединение, которое приводит к уничтожению, устранению, лизису или индукции такого уничтожения, устранения или лизиса для отрицательного влияния на количество таких CD73-экспрессирующих клеток, присутствующих в образце или у субъекта.

Взаимозаменяемые термины «интернализация» и «внутриклеточная интернализация» относятся к молекулярным, биохимическим и клеточным явлениям, связанным с процессом транслокации молекулы с внеклеточной поверхности клетки во внутриклеточную поверхность клетки. Процессы, ответственные за внутриклеточную интернализацию молекул, хорошо известны и могут включать, среди прочего, интернализацию внеклеточных молекул (таких как гормоны, антитела и малые органические молекулы); мембраноассоциированных молекул (таких как рецепторы клеточной поверхности); и комплексов мембраноассоциированных молекул, связанных с внеклеточными молекулами (например, лиганд, связанный с трансмембранным рецептором, или антитело, связанное с мембраноассоциированной молекулой). Таким образом, «индукция и/или увеличение интернализации» включает явления, при которых инициируется внутриклеточная интернализация, и/или повышается скорость и/или степень внутриклеточной интернализации.

В настоящем описании термин «агент» означает химическое соединение, смесь химических соединений, биологическую макромолекулу или экстракт, полученный из биологических материалов. Термин «терапевтический агент» относится к агенту, обладающему биологической активностью.

Для целей настоящего изобретения термин «гуманизированное антитело» или «антитело человека» относится к антителу, в котором константная и переменная каркасная область одного или более иммуноглобулинов человека подвергнута слиянию со связывающей областью, например, CDR, иммуноглобулина животного. Такие антитела получают таким образом, чтобы они сохраняли специфичность связывания антитела нечеловеческого происхождения, из которого получены связывающие области, но чтобы избежать иммунного ответа на антитело нечеловеческого происхождения. Такие антитела могут быть получены от трансгенных мышей или других животных, которые были «созданы с использованием методов геной инженерии» для выработки специфических антител человека в ответ на антигенную стимуляцию (см., например, Green et al. (1994) Nature Genet 7:13; Lonberg et al. (1994) Nature 368:856; Taylor et al. (1994)

Int Immun 6:579, полное описание которых включено в настоящий документ посредством ссылки). Антитело полностью человеческого происхождения также может быть сконструировано способами генной или хромосомной трансфекции, а также с помощью технологии фагового отображения, все из которых известны в данной области техники (см., например, McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-553). Антитела человека могут быть также получены с помощью *in vitro* активированных В-клеток (см., например, патенты США №5567610 и 5229275, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки).

«Химерное антитело» представляет собой молекулу антитела, в которой (a) константная область или ее часть изменена, замещена или заменена так, что антигенсвязывающий сайт (вариабельная область) связан с константной областью другого или измененного класса, эффекторной функции и/или вида, или совершенно другой молекулой, которая придает новые свойства указанному химерному антителу, например, ферментом, токсином, гормоном, фактором роста, лекарственным средством и т.д.; или (b) вариабельная область или ее часть изменена, замещена или заменена вариабельной областью, обладающей другой или измененной специфичностью к антигену.

В настоящем описании термин «гипервариабельная область» относится к аминокислотным остаткам антитела, ответственным за связывание антигена.

Гипервариабельная область, как правило, содержит аминокислотные остатки из «определяющей комплементарности области» или «CDR» (например, остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и остатки 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи; Kabat et al. 1991) и/или остатки из «гипервариабельной петли» (например, остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и остатки 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи; Chothia and Lesk, J. Mol. Biol 1987;196:901-917), или схожей системы определения незаменимых аминокислот, ответственных за связывание антигена. Как правило, нумерацию аминокислотных остатков в данной области осуществляют способом, описанным в Kabat et al., выше. В настоящем описании такие фразы, как «положение по Kabat», «нумерация остатков в вариабельном домене как у Кэбота» и «согласно Kabat» относятся к данной системе нумерации для вариабельных доменов тяжелой цепи или вариабельных доменов легкой цепи. При использовании системы нумерации Kabat фактическая линейная аминокислотная последовательность пептида может содержать меньшее количество аминокислот или дополнительные аминокислоты, что соответствует укорочению или встраиванию в каркасную область (FR) или CDR вариабельного домена. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может содержать встраивание одной аминокислоты (остаток 52a согласно Kabat) после остатка 52 в CDR H2, и встроенные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т.д. согласно Kabat) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерация остатков по Kabat может быть определена для конкретного антитела путем выравнивания в областях гомологии последовательности указанного антитела со «стандартной» последовательностью с нумерацией по Kabat.

В настоящем описании термин остатки «каркасной области» или «FR» означает область вариабельного домена антитела без областей, определяемых как CDR. Каждая каркасная область вариабельного домена антитела может быть дополнительно подразделена на смежные области, отделенные CDR (FR1, FR2, FR3 и FR4).

Термины «Fc-домен», «Fc-часть» и «Fc-область» относятся к С-концевому фрагменту тяжелой цепи антитела, например, от примерно аминокислоты (АК) 230 до примерно

АК 450 γ (гамма) тяжелой цепи человека или его соответствующей последовательности в других типах тяжелых цепей антитела (например, α , δ , ϵ и μ для антител человека), или его встречающемуся в природе аллотипу. Если не указано иное, на протяжении всего настоящего описания для иммуноглобулинов используется общепринятая нумерация аминокислот Kabat (см. Kabat et al. (1991) Sequences of Protein of Immunological Interest, 5th ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD).

Термины «выделенный», «очищенный» или «биологически чистый» относятся к веществу, которое по существу или в общем не содержит компонентов, которые обычно сопровождают его, как обнаруживают, в нативном состоянии. Чистоту и гомогенность, как правило, определяют с использованием методик аналитической химии, таких как электрофорез в полиакриламидном геле или высокоэффективная жидкостная хроматография. Белок, который является преобладающим видом, присутствующим в препарате, является по существу очищенным.

В настоящем описании термины «полипептид», «пептид» и «белок» являются взаимозаменяемыми и относятся к полимеру из аминокислотных остатков. Указанные термины относятся к аминокислотным полимерам, в которых один или более аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический миметик соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также к встречающимся в природе аминокислотным полимерам и не встречающимся в природе аминокислотным полимерам.

Термин «рекомбинантный» при употреблении, например, в отношении клетки или нуклеиновой кислоты, белка или вектора, означает, что указанная клетка, нуклеиновая кислота, белок или вектор были модифицированы путем введения гетерологичной нуклеиновой кислоты или белка, или изменения нативной нуклеиновой кислоты или белка, или что клетка получена из клетки, модифицированной таким образом. Таким образом, например, рекомбинантные клетки экспрессируют гены, которые не встречаются в нативной (нерекомбинантной) форме клетки, или экспрессируют нативные гены, которые иным образом аномально экспрессируются, недостаточно экспрессируются или совсем не экспрессируются.

В контексте настоящего изобретения термин антитело, которое «связывает» полипептид или эпитоп, означает антитело, которое связывает указанную детерминанту со специфичностью и/или аффинностью.

Термин «идентичность» или «идентичный» при употреблении в отношении последовательностей двух или более полипептидов относится к степени родства последовательностей между полипептидами, определяемой числом совпадений между цепочками из двух или более аминокислотных остатков. «Идентичность» измеряет процент идентичных совпадений между меньшими из двух или более последовательностей с выравниваниями с гэпами (если они есть), предусмотренными конкретной математической моделью или компьютерной программой (т.е.

«алгоритмами»). Идентичность родственных полипептидов может быть легко рассчитана известными способами. Такие способы включают, но не ограничиваются ими, способы, описанные в Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; и Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988).

Способы определения идентичности разработаны таким образом, чтобы обеспечить наибольшее совпадение между тестируемыми последовательностями. Способы определения идентичности описаны в общедоступных компьютерных программах. Способы определения идентичности между двумя последовательностями на основе компьютерных программ включают пакет программ GCG, включая GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res. 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, Университет Висконсина, Мэдисон, Висконсин), BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)). Программа BLASTX представлена в свободном доступе у Национального центра биотехнологической информации (NCBI) и в других источниках (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al, выше). Хорошо известный алгоритм Смита (Smith) и Уотермана (Waterman) можно также использовать для определения идентичности.

Получение антител

Агент анти-CD73, который можно применять для лечения раковых опухолей, связывает внеклеточную часть полипептида CD73 человека и нейтрализует ферментативную активность CD73, экспрессируемого на поверхности клетки, например, клетки опухоли. В одном из вариантов реализации указанный агент ингибирует 5'-эктонуклеотидазную активность CD73. В одном из вариантов реализации антитело ингибирует CD73-опосредуемое образование аденозина. В одном из вариантов реализации антитело ингибирует CD73-опосредуемый катаболизм АМФ до аденозина. В одном из вариантов реализации антитело ингибирует аденозин-опосредуемое ингибирование активности лимфоцитов (например, Т-клеток). В одном из вариантов реализации антитело связывает и/или ингибирует активный центр фермента на CD73. В соответствии с одним из аспектов агент представляет собой антитело, выбранное из полноразмерного антитела, фрагмента антитела и синтетической или полусинтетической молекулы, полученной из антитела.

В соответствии с одним из аспектов агент представляет собой антитело, выбранное из антитела полностью человеческого происхождения, гуманизированного антитела и химерного антитела.

В соответствии с одним из аспектов агент представляет собой фрагмент антитела, содержащий константный домен, выбранный из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

В соответствии с одним из аспектов агент представляет собой фрагмент антитела, выбранный из Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, Fab'-SH-фрагмента, F(ab)2-фрагмента, F(ab')2-фрагмента, Fv-фрагмента, тяжелой цепи Ig (Ig ламы или верблюда),

V_{HH}-фрагмента, однодоменного FV и одноцепочечного фрагмента антитела.

В соответствии с одним из аспектов агент представляет собой синтетическую или полусинтетическую молекулу, полученную из антитела, выбранную из scFV, dsFV, миниантитела, диатела, триатела, каппа-тела, IgNAR и полиспецифического антитела.

Таким образом, настоящее изобретение относится к антителам или другим антигенсвязывающим агентам, связывающимся с CD73.

В соответствии с одним из аспектов антитело находится по меньшей мере в частично очищенной форме.

В соответствии с одним из аспектов антитело находится по существу в выделенной форме.

Антитела могут быть получены различными способами, известными в данной области техники. Как правило, их получают путем иммунизации не относящегося к человеку животного, предпочтительно мыши, иммуногеном, содержащим полипептид CD73, предпочтительно полипептид CD73 человека. Указанный полипептид CD73 может

содержать полномерную последовательность полипептида CD73 человека или его фрагмент, или производное, как правило, иммуногенный фрагмент, т.е. часть полипептида, содержащую эпитоп, расположенный на поверхности клеток, экспрессирующих полипептид CD73. Такие фрагменты, как правило, содержат по меньшей мере примерно 7 следующих друг за другом аминокислот зрелой полипептидной последовательности, более предпочтительно по меньшей мере примерно 10 следующих друг за другом аминокислот указанной последовательности. Фрагменты, как правило, по существу получают из внеклеточного домена рецептора. В одном из вариантов реализации иммуноген содержит полипептид CD73 человека дикого типа в липидной мембране, как правило, на поверхности клетки. В конкретном варианте реализации иммуноген содержит интактные клетки, в частности интактные клетки человека, возможно обработанные или лизированные. В другом варианте реализации полипептид представляет собой рекомбинантный полипептид CD73.

Этап иммунизации не относящегося к человеку млекопитающего антигеном можно осуществлять любым способом, хорошо известным в данной области техники для стимуляции выработки антител у мыши (см., например, E. Harlow and D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988), полное содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки). Иммуноген суспендируют или растворяют в буфере, возможно совместно с адъювантом, таким как полный или неполный адъювант Фрейнда. Способы определения количества иммуногена, типов буферов и количества адъюванта хорошо известны специалисту в данной области техники и не являются никоим образом ограничивающими. Данные параметры могут быть разными для различных иммуногенов, но их можно легко определить.

Подобным образом, место и частота иммунизации, достаточная для стимуляции выработки антител, также хорошо известны в данной области техники. Согласно типичному протоколу иммунизации животным, не относящимся к человеку, интраперитонеально вводят антиген путем инъекции в 1 день и еще раз примерно через неделю. За этим следуют вторичные инъекции антигена примерно в 20 день, возможно совместно с адъювантом, таким как неполный адъювант Фрейнда. Вторичные инъекции осуществляют внутривенно и их можно повторять в течение нескольких последовательных дней. За этим следует бустер-инъекция в 40 день либо внутривенно, либо интраперитонеально, как правило, без адъюванта. Данный протокол приводит к выработке В-клеток, продуцирующих антигенспецифические антитела, через примерно 40 дней. Другие протоколы можно также использовать, если они приводят к выработке В-клеток, экспрессирующих антитело, направленное на антиген, применяемый для иммунизации.

Для получения поликлональных антител получают сыворотку от иммунизированного животного, не относящегося к человеку, и выделяют присутствующие в ней антитела хорошо известными способами. Указанная сыворотка может быть аффинно очищена с использованием любого из иммуногенов, указанных выше, связанных с твердым носителем, для получения антител, которые реагируют с полипептидами CD73.

В альтернативном варианте реализации лимфоциты от не иммунизированного млекопитающего, не относящегося к человеку, выделяют, выращивают *in vitro*, а затем подвергают действию иммуногена в культуре клеток. Затем лимфоциты собирают и осуществляют этап слияния, описанный ниже.

Для моноклональных антител следующий этап представляет собой выделение спленоцитов из иммунизированного млекопитающего, не относящегося к человеку, и

последующее слияние данных спленоцитов с иммортализованной клеткой для получения гибридомы, продуцирующей антитела. Выделение спленоцитов из млекопитающего, не относящегося к человеку, хорошо известно в данной области техники и, как правило, включает извлечение селезенки у анестезированного млекопитающего, не относящегося к человеку, разрезание ее на мелкие куски и выдавливание спленоцитов из капсулы селезенки через нейлоновую сетку клеточного фильтра в соответствующий буфер для получения суспензии отдельных клеток. Клетки промывают, центрифугируют и ресуспендируют в буфере, который лизирует любые эритроциты. Раствор снова центрифугируют и оставшиеся лимфоциты в осадке окончательно ресуспендируют в свежем буфере.

Когда выделены и присутствуют в суспензии отдельных клеток, лимфоциты можно подвергать слиянию с иммортализованной линией клеток. Она, как правило, представляет собой линию клеток миеломы мыши, хотя в данной области техники известно множество других иммортализованных линий клеток, подходящих для формирования гибридом. Линии миеломы мыши включают, но не ограничиваются ими, линии, полученные из опухолей мышцей MOPC-21 и MPC-11, от Salk Institute Cell Distribution Center, Сан-Диего, США, клетки X63 Ag8653 и SP-2 от Американской коллекции типовых культур, Роквилл, Мэриленд, США. Слияние осуществляют с использованием полиэтиленгликоля или т.п. Затем полученные гибридомы выращивают в селективных средах, содержащих одно или более веществ, ингибирующих рост или выживание неслитых родительских клеток миеломы. Например, если родительские клетки миеломы не содержат фермента гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза (HGPRT или HPRT), культуральная среда для гибридом, как правило, будет содержать гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), вещества, которые предотвращают рост HGPRT-дефицитных клеток.

Гибридомы, как правило, выращивают на питающем слое макрофагов. Указанные макрофаги предпочтительно получают от животных из одного помета с не относящимся к человеку млекопитающим, используемым для выделения спленоцитов, и их, как правило, примиряют неполным адьювантом Фрейнда или подобным за несколько дней до высева гибридом. Способы слияния описаны в Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice," pp. 59-103 (Academic Press, 1986), содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки.

Клетки оставляют расти в селективных средах в течение времени, достаточного для образования колонии и выработки антител. Время обычно составляет от примерно 7 до примерно 14 дней.

Затем колонии гибридом анализируют на предмет выработки антител, которые специфично связываются с генными продуктами, представляющими собой полипептид CD73. Указанный анализ, как правило, представляет собой колориметрический анализ типа ELISA, хотя можно использовать любой анализ, который может быть адаптирован для лунок, в которых выращивают гибридомы. Другие анализы включают радиоиммуноанализы или сортировку клеток с активацией флуоресценции. Лунки, положительные по выработке желаемых антител, исследуют для определения того, присутствует одна или более различных колоний. Если присутствует более одной колонии, клетки могут быть повторно клонированы и выращены для того, чтобы убедиться, что только одна клетка дала начало колонии, вырабатывающей желаемое антитело. Как правило, антитела будут также тестировать для определения способности связываться с полипептидами CD73, например, CD73-экспрессирующими клетками.

Гибридомы, для которых подтверждена выработка моноклонального антитела,

можно выращивать в больших количествах в соответствующей среде, такой как DMEM или RPMI-1640. В качестве альтернативы клетки гибридомы можно выращивать *in vivo* в виде асцитных опухолей у животного.

После выращивания, достаточного для выработки желаемого моноклонального антитела, питательные среды, содержащие моноклональное антитело (или асцитную жидкость), отделяют от клеток и моноклональное антитело, присутствующее в них, очищают. Очистку, как правило, осуществляют путем гель-электрофореза, диализа, хроматографии с использованием белка А или белка G-Сефарозы, или антитела к Ig мыши, связанного с твердым носителем, таким как агарозные или сефарозные гранулы (все способы описаны, например, в *Antibody Purification Handbook*, Biosciences, publication No. 18-1037-46, Edition AC, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки). Связанное антитело, как правило, элюируют из колонок с белком А/белком G путем использования буферов с низким pH (глициновых или ацетатных буферов с pH 3,0 или ниже) с немедленной нейтрализацией антителосодержащих фракций. Данные фракции объединяют в пул, подвергают диализу и концентрируют при необходимости.

Положительные лунки с одной очевидной колонией, как правило, повторно клонируют и повторно анализируют, чтобы обеспечить детектирование и выработку только одного моноклонального антитела.

Антитела могут быть также получены путем отбора из комбинаторных библиотек иммуноглобулинов, как описано, например, в (Ward et al. *Nature*, 341 (1989) p. 544, полное содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки).

Идентификация одного или более антител, которые связываются с CD73, в частности по существу или в основном с тем же эпитопом, что и моноклональное антитело 11E1, 8C7 или 6E1, может быть легко проведена с использованием любого из различных иммунологических скрининг-анализов, позволяющих оценить конкуренцию антител. Многие такие анализы рутинно применяются на практике и хорошо известны в данной области техники (см., например, патент США №5660827, выданный 26 августа 1997 года, содержание которого специально включено в настоящее описание посредством ссылки). Очевидно, что в действительности определение эпитопа, с которым связывается антитело, описанное в настоящем документе, не является никоим образом необходимым для идентификации антитела, которое связывается с тем же или по существу с тем же эпитопом, что и моноклональное антитело, описанное в настоящем документе.

Например, когда тестируемые антитела для исследования получают от различных животных-источников или они даже относятся к разному изотипу Ig, можно использовать простой конкурентный анализ, в котором контрольные (11E1, 8C7 или 6E1, например) и тестируемые антитела смешивают (или предварительно адсорбируют) и вносят в образец, содержащий полипептиды CD73. Протоколы на основе вестерн-блоттинга и использования анализа BIACORE подходят для применения в таких конкурентных исследованиях.

В некоторых вариантах реализации предварительно смешивают контрольные антитела (11E1, 8C7, 3C12 или 6E1, например) с различными количествами тестируемых антител (например, примерно 1:10 или примерно 1:100) в течение определенного периода времени перед внесением в образец антигена CD73. В других вариантах реализации контроль и различные количества тестируемых антител могут быть просто смешаны во время воздействия на образец антигена CD73. Если можно отличить связанные антитела от свободных антител (например, путем использования способов отделения или промывки для удаления несвязанных антител) и 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1 от

тестируемых антител (например, путем применения видоспецифических или изотипспецифических вторичных антител, или путем специфического мечения 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1 детектируемой меткой), можно определить, уменьшают ли тестируемые антитела связывание 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1 с антигенами, что указывает на то, что тестируемое антитело распознает по существу тот же эпитоп, что и 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1. Связывание (меченых) контрольных антител в отсутствие полностью нерелевантного антитела может служить в качестве верхнего контрольного значения. Нижнее контрольное значение может быть получено путем инкубации меченых (11E1, 8C7, 3C12 или 6E1) антител с немечеными антителами точно такого же типа (11E1, 8C7, 3C12 или 6E1), при этом будет происходить конкуренция и уменьшение связывания меченых антител. В тестовом анализе значительное снижение реактивности меченых антител в присутствии тестируемого антитела указывает на тестируемое антитело, распознающее по существу тот же эпитоп, т.е. антитело, которое «дает перекрестную реакцию» или конкурирует с меченым (11E1, 8C7, 3C12 или 6E1) антителом. Считается, что любое тестируемое антитело, которое уменьшает связывание 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1 с антигенами CD73 по меньшей мере примерно на 50%, например, по меньшей мере примерно на 60% или более предпочтительно по меньшей мере примерно на 80% или 90% (например, примерно 65-100%) в любом соотношении 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1: тестируемое антитело от примерно 1:10 до примерно 1:100, представляет собой антитело, которое связывается по существу с тем же эпитопом или детерминантой, что и 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1. Предпочтительно, такое тестируемое антитело будет уменьшать связывание 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1 с антигеном CD73 по меньшей мере примерно на 90% (например, примерно 95%).

Конкуренцию можно также оценить, например, путем тестирования методом проточной цитометрии. В таком тестировании клетки, несущие данный полипептид CD73, можно инкубировать сначала совместно с 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1, например, а затем совместно с тестируемым антителом, меченым флуорохромом или биотином. Говорят, что антитело конкурирует с 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1, если связывание, полученное после предварительной инкубации совместно с насыщающим количеством 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1, составляет примерно 80%, предпочтительно примерно 50%, примерно 40% или меньше (например, примерно 30%, 20% или 10%) от связывания (измеренного с помощью флуоресценции), полученного антителом без предварительной инкубации совместно с 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1. В качестве альтернативы, говорят, что антитело конкурирует с 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1, если связывание, полученное в случае меченого антитела 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1 (флуорохромом или биотином) на клетках, предварительно инкубированных совместно с насыщающим количеством тестируемого антитела, составляет примерно 80%, предпочтительно примерно 50%, примерно 40% или меньше (например, примерно 30%, 20% или 10%) от связывания, полученного без предварительной инкубации совместно с тестируемым антителом.

Можно также использовать простой конкурентный анализ, в котором тестируемое антитело предварительно адсорбируют и наносят в насыщающей концентрации на поверхность, на которой иммобилизован антиген CD73. Указанная поверхность в простом конкурентном анализе предпочтительно представляет собой чип BIACORE (или другие носители, подходящие для анализа методом поверхностного плазмонного резонанса). Затем контрольное антитело (например, 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1) приводят в контакт с указанной поверхностью в CD73-насыщающей концентрации и измеряют связывание контрольного антитела с CD73 и поверхностью. Данное связывание контрольного антитела сравнивают со связыванием контрольного антитела с CD73-

содержащей поверхностью в отсутствии тестируемого антитела. В тестовом анализе значительное уменьшение связывания CD73-содержащей поверхности контрольным антителом в присутствии тестируемого антитела указывает на то, что данное тестируемое антитело распознает по существу тот же эпитоп, что и контрольное антитело, так что тестируемое антитело «дает перекрестную реакцию» с контрольным антителом. Можно считать, что любое тестируемое антитело, которое уменьшает связывание контрольного (такого как 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1) антитела с антигеном CD73 по меньшей мере примерно на 30% или более, предпочтительно примерно на 40%, представляет собой антитело, которое связывается по существу с тем же эпитопом или детерминантой, что и контроль (например, 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1).

Предпочтительно, такое тестируемое антитело будет уменьшать связывание контрольного антитела (например, 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1) с антигеном CD73 по меньшей мере примерно на 50% (например, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70% или более). Очевидно, что порядок контрольных и тестируемых антител может быть обратным: то есть контрольное антитело можно сначала связывать с поверхностью и после этого тестируемое антитело приводят в контакт с поверхностью в конкурентном анализе. Предпочтительно, антитело, обладающее более высокой аффинностью к антигену CD73, сначала связывают с поверхностью, т.к. ожидают, что уменьшение связывания, наблюдаемое для второго антитела (при условии, что указанные антитела являются перекрестно реагирующими), будет большей величины. Дополнительные примеры таких анализов приведены, например, в Saunal (1995) J. Immunol. Methods 183: 33-41, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки.

Антитела будут связываться с CD73-экспрессирующими клетками от индивидуума или индивидуумов с заболеванием, характеризующимся экспрессией CD73-положительных клеток, т.е. индивидуума, который является кандидатом для лечения одним из способов, описанных в настоящем документе, с применением антитела анти-CD73. Соответственно, после получения антитела, которое специфично распознает CD73 на клетках, его можно тестировать для определения способности связываться с CD73-положительными клетками (например, раковыми клетками). В частности, перед лечением пациента одним из антител согласно настоящему изобретению можно тестировать способность антитела связывать злокачественные клетки, взятые у указанного пациента, например, в образце крови или взятой путем биопсии ткани опухоли, для максимального повышения вероятности того, что терапия будет оказывать полезный эффект у пациента.

В одном из вариантов реализации антитела валидизируют в иммуноанализе для тестирования способности связываться с CD73-экспрессирующими клетками, например, злокачественными клетками. Например, берут образец крови или делают биопсию опухоли и собирают клетки опухоли. Затем оценивают способность конкретного антитела связываться с клетками с использованием стандартных способов, хорошо известных специалисту в данной области техники. Антитела могут связываться, например, со значительной долей (например, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или более) клеток, которые, как известно, экспрессируют CD73, например, клеток опухоли от значительного процента индивидуумов или пациентов (например, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% или более). Антитела можно применять в диагностических целях для определения присутствия или уровня злокачественных клеток у пациента, например, в качестве биомаркера для оценки того, подходит ли пациент для лечения агентом анти-CD73, или для применения в способах лечения, описанных в настоящем документе. Для

оценки связывания антител с клетками антитела можно подвергать либо прямому, либо опосредованному мечению. В случае опосредованного мечения, как правило, добавляют вторичное меченое антитело.

5 Определение того, связывается ли антитело в пределах эпитопной области, можно осуществлять способами, известными специалисту в данной области техники. В качестве
одного из примеров таких способов картирования/характеристики эпитопная область
для антитела анти-CD73 может быть определена с помощью техники «отпечатка» (foot-
printing) эпитопа с применением химической модификации доступных аминов/
карбоксилов в белке CD73. Одним из конкретных примеров такой техники отпечатка
10 является применение HXMS (водородно-дейтериевый обмен, детектируемый путем
масс-спектрометрии), когда происходит водородно/дейтериевый обмен амидных
протонов белка рецептора и лиганда, связывание и обратный обмен, при этом амидные
группы остова, участвующие в связывании белка, защищены от обратного обмена и,
следовательно, будут оставаться дейтерированными. Соответствующие области могут
15 быть идентифицированы на данном этапе путем пепсинового протеолиза, быстрого
разделения на микроколоне методом высокоэффективной жидкостной хроматографии
и/или масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением. См., например, Ehring H,
Analytical Biochemistry, Vol. 267 (2) pp. 252-259 (1999) Engen, J.R. and Smith, D.L. (2001)
Anal. Chem. 73, 256A-265A. Другим примером подходящей методики идентификации
20 эпитопа является картирование эпитопов методом ядерно-магнитного резонанса (ЯМР),
в котором, как правило, сравнивают положение сигналов в двумерных ЯМР-спектрах
свободного антигена и антигена в комплексе с антигенсвязывающим пептидом, таким
как антитело. Антиген, как правило, подвергают селективному изотопному мечению
15N, в результате чего в ЯМР-спектре наблюдают только сигналы, соответствующие
25 антигену, и отсутствие сигналов от антигенсвязывающего пептида. Сигналы антигена,
исходящие от аминокислот, вовлеченных во взаимодействие с антигенсвязывающим
пептидом, как правило, будут сдвигать положение в спектре комплекса по сравнению
со спектром свободного антигена, и таким образом могут быть идентифицированы
аминокислоты, вовлеченные в связывание. См., например, Ernst Schering Res Found
30 Workshop.2004; (44): 149-67; Huang et al., Journal of Molecular Biology, Vol. 281 (1) pp. 61-
67 (1998); и Saito and Patterson, Methods. 1996 Jun; 9(3): 516-24.

Картирование/получение характеристик эпитопа также можно осуществлять с
применением методов масс-спектрометрии. См., например, Downard, J Mass Spectrom.
2000 Apr; 35 (4): 493-503 и Kiselar and Downard, Anal Chem. 1999 May 1; 71 (9): 1792-1801.
35 Методики расщепления протеазами также могут подходить в контексте картирования
и идентификации эпитопов. Области/последовательности, соответствующие антигенной
детерминанте, могут быть определены путем расщепления протеазами, например, путем
применения трипсина в отношении к CD73 примерно 1:50 или расщепления в течение
ночи при pH 7-8 с последующим анализом методом масс-спектрометрии (МС) для
40 идентификации пептида. Затем пептиды, защищенные от расщепления трипсином
связывающим анти-CD73, могут быть идентифицированы путем сравнения образцов,
подвергнутых расщеплению трипсином, и образцов, инкубированных совместно с
антителом, а затем подвергнутых расщеплению, например, трипсином (с выявлением
таким образом отпечатка для указанного связывающего агента). Другие ферменты,
45 такие как химотрипсин, пепсин и т.д., также или в качестве альтернативы можно
применять в подобных способах получения характеристик эпитопа. Более того,
ферментативное расщепление может обеспечивать быстрый способ анализа того,
находится ли потенциальная последовательность антигенной детерминанты в области

полипептида CD73, которая не доступна на поверхности и, соответственно, наиболее вероятно не имеет отношения с точки зрения иммуногенности/антигенности.

Сайт-направленный мутагенез представляет собой еще одну методику, подходящую для определения связывающегося эпитопа. Например, в «сканировании аланином»
 5 каждый остаток в сегменте белка заменяют остатком аланина, и измеряют «последствия» для аффинности связывания. Если мутация приводит к значительному снижению аффинности связывания, он наиболее вероятно вовлечен в связывание. Моноклональные антитела, специфичные в отношении структурных эпитопов (т.е. антитела, которые не связывают белок, не подвергнутый фолдингу), можно применять для подтверждения
 10 того, что замена аланином не влияет на общий фолдинг белка. См., например, Clackson and Wells, Science 1995; 267:383-386; и Wells, Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93:1-6.

Электронную микроскопию можно также использовать для «отпечатка» эпитопа. Например, Wang et al, Nature 1992; 355:275-278 использовали координированное применение криоэлектронной микроскопии, восстановления трехмерного изображения
 15 и рентгеновской кристаллографии для определения физического отпечатка Fab-фрагмента на капсидной поверхности нативного мозаичного вируса коровьего гороха.

Другие формы анализа «без меток» для оценки эпитопа включают поверхностный плазмонный резонанс (SPR, BIACORE) и рефлектометрическую интерференционную спектроскопию (RifS). См., например, Fagerstam et al., Journal Of Molecular Recognition
 20 1990; 3:208-14; Nice et al., J. Chroma-togr. 1993; 646:159-168; Leipert et al., Angew. Chem. Int. Ed. 1998; 37:3308-3311; Kroger et al., Biosensors and Bioelectronics 2002; 17:937-944.

Следует также отметить, что антитело, связывающее тот же или по существу тот же эпитоп, что и антитело, можно идентифицировать в одном или более типичных конкурентных анализах, описанных в настоящем документе.

После иммунизации и выработки антител у позвоночного или в клетке можно осуществлять конкретные этапы отбора для выделения заявленных антител. В этом отношении конкретный вариант реализации настоящего изобретения также относится к способам получения таких антител, включающим: (а) иммунизацию не относящегося к человеку млекопитающего иммуногеном, содержащим полипептид CD73; и (b)
 30 получение антител от указанного иммунизированного животного; и (с) отбор антител из этапа (b), которые способны связывать CD73.

Как правило, антитело анти-CD73, предложенное согласно настоящему изобретению, обладает аффинностью к полипептиду CD73 (например, в виде гомодимера CD73) в диапазоне от примерно 10^4 до примерно 10^{11} M^{-1} (например, от примерно 10^8 до
 35 примерно 10^{10} M^{-1}). Например, в соответствии с конкретным аспектом настоящего изобретения предложено антитело анти-CD73, имеющее среднюю константу диссоциации (K_D) меньше 1×10^{-9} М в отношении CD73, определяемую, например, путем скрининга на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (например, путем анализа с
 40 использованием аналитического устройства SPR BIAcore™). В соответствии с более конкретным типичным аспектом настоящего изобретения предложены антитела анти-CD73, имеющие K_D , составляющую от примерно 1×10^{-8} М до примерно 1×10^{-10} М или от примерно 1×10^{-9} М до примерно 1×10^{-11} М, для CD73.

Антитела могут характеризоваться, например, средней K_D не более чем примерно (т.е. лучшей аффинностью, чем) на 100, 60, 10, 5 или 1 наномолярном, предпочтительно субнаномолярном уровне или возможно не более чем примерно на 500, 200, 100 или 10 пикомолярном уровне. K_D может быть определена, например, путем иммобилизации

полученных рекомбинантным способом белков CD73 человека на поверхности чипа с последующим нанесением тестируемого антитела в растворе. В одном из вариантов реализации указанный способ также включает этап (d), позволяющий отобрать антитела из этапа (b), которые способны конкурировать за связывание с CD73 с антителом 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1.

Согласно одному из аспектов любого из вариантов реализации антитела, полученные в соответствии со способами согласно настоящему изобретению, представляют собой моноклональные антитела. В соответствии с другим аспектом не относящееся к человеку животное, используемое для получения антител в соответствии со способами согласно настоящему изобретению, представляет собой млекопитающее, такое как грызун, бык, свинья, домашняя птица, лошадь, кролик, коза или овца.

ДНК, кодирующую антитело, которое связывает эпитоп, присутствующий на полипептидах CD73, выделяют из гибридомы и вводят в соответствующий вектор экспрессии для трансфекции соответствующему хозяину. Затем хозяина используют для рекомбинантного получения антитела или его вариантов, таких как гуманизированный вариант данного моноклонального антитела, активные фрагменты антитела, химерные антитела, содержащие антигенраспознающую часть антитела, или варианты, содержащие детектируемый фрагмент.

ДНК, кодирующая моноклональные антитела согласно настоящему изобретению, например, антитело 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1, может быть легко выделена и секвенирована с использованием традиционных методик (например, путем использования олигонуклеотидных зондов, способных специфично связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антител мыши). В соответствии с одним из аспектов предложена нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь или легкую цепь антитела анти-CD73 согласно любому из вариантов реализации настоящего изобретения. После выделения ДНК может быть введена в векторы экспрессии, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки COS обезьяны, клетки яичника китайского хомяка (СНО) или клетки миеломы, которые в иных случаях не вырабатывают белок иммуноглобулин, с получением синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. Как описано в иных местах настоящего документа, такие последовательности ДНК могут быть модифицированы для любой из большого числа целей, например, для гуманизации антител, получения фрагментов или производных, или для модификации последовательности антитела, например, в антигенсвязывающем сайте для оптимизации специфичности связывания антитела. В одном из вариантов реализации предложена выделенная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела (например, 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1), а также рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая (например, в геноме) такую нуклеиновую кислоту. Рекомбинантная экспрессия ДНК, кодирующей антитело, в бактериях хорошо известна в данной области техники (см., например, Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5, pp. 256 (1993); и Pluckthun, *Immunol.* 130, p. 151 (1992)).

Может быть установлено, что антитела согласно настоящему изобретению представляют собой антитела, отличные от любого одного или более из: антител 7G2 (Life Technologies Corp.), антитела 4G4 (Abeam, ссылочный номер продукта aB81720), антитела AD2 (Biolegend Corp, ссылочный номер продукта 344004), антитела 1E9 (Santa Cruz Biotechnology Corp., продукт sc-32299), антитела 067-213, описанного в US 2014/0235833, антитела анти-CD73, упоминаемого в Sachsenmeier et al. (2012) *J. Biomed. Screening* 17:993-998 и/или в Rust et al. (2013) *Mol. Cancer* 12:11, или антитела MEDI9447

(Medimmune Corp, Гейтерсберг, Мэриленд), упоминаемого в Huang et al. (2015) AACR Annual meeting; Abstract 1538, или производных указанных антител, например, которые содержат антигенсвязывающую область или CDR тяжелой и/или легкой цепи, полностью или частично. В других вариантах реализации вышеупомянутые антитела могут быть, в зависимости от природы антитела, модифицированы для того, чтобы обладать характеристиками антител согласно настоящему изобретению.

После идентификации антител, способных связывать CD73 и/или обладающих другими желаемыми свойствами, их будут также, как правило, оценивать с использованием стандартных способов, в том числе тех, которые описаны в настоящем документе, для определения способности связываться с другими полипептидами, включая неродственные полипептиды. В идеальном варианте антитела только связываются со значительной аффинностью с CD73, и не связываются на значительном уровне с неродственными полипептидами или другими полипептидами семейства 5'-нуклеотидаз. Однако очевидно, что пока аффинность к CD73 по существу выше (например, 10х, 100х, 500х, 1000х, 10000х или более), чем к другим неродственным полипептидам, антитела подходят для применения в способах согласно настоящему изобретению.

В одном из вариантов реализации антитела анти-CD73 могут быть получены так, чтобы они не демонстрировали значительного специфического связывания с Fcγ-рецепторами человека, например, любым одним или более из CD16A, CD16B, CD32A, CD32B и/или CD64. Такие антитела могут содержать константные области различных тяжелых цепей, которые, как известно, не связывают Fcγ-рецепторы. Одним из таких примеров является константная область IgG4 человека дикого типа (IgG4 демонстрирует минимальное связывание с Fcγ-рецептором). Константная область IgG4 человека может дополнительно содержать стабилизирующую замену S228P (S241P) для сохранения способности к двухвалентному связыванию *in vivo* путем предотвращения обмена Fab-фрагментами. В качестве альтернативы, можно использовать фрагменты антител, которые не содержат (или содержат части) константных областей, такие как F(ab')₂-фрагменты, для того, чтобы избежать связывания с Fc-рецептором. Связывание с Fc-рецептором может быть оценено в соответствии со способами, известными в данной области техники, включая, например, тестирование связывания антитела с белком-Fc-рецептором в анализе BIAcore. Кроме того, можно использовать в целом любой изотип антитела IgG, в котором Fc-часть модифицирована (например, путем введения 1, 2, 3, 4, 5 или более замен аминокислот) для минимизирования или исключения связывания с Fc-рецепторами (см., например, WO 03/101485, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки). Анализы, такие как анализы на основе клеток, для оценки связывания с Fc-рецептором хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в WO 03/101485.

В одном из вариантов реализации антитело может содержать одну или более специфических мутаций в Fc-области, которые приводят к получению «Fc-молчащих» антител, демонстрирующих минимальное взаимодействие с эффекторными клетками. Молчащие эффекторные функции могут быть получены посредством мутации в Fc-области антител, и они описаны в данной области техники: мутация N297A, мутации LALA (Strohl, W., 2009, Curr. Opin. Biotechnol. vol. 20(6):685-691); и D265A (Baudino et al., 2008, J. Immunol. 181: 6664-69), см. также Heusser et al., WO 2012/065950, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки. В одном из вариантов реализации антитело содержит одну, две, три или более замен аминокислот в шарнирной области. В одном из вариантов реализации антитело представляет собой IgG1 или IgG2 и содержит одну, две или три замены в остатках 233-236, возможно 233-238 (нумерация

ЕС). В одном из вариантов реализации антитело представляет собой IgG4 и содержит одну, две или три замены в остатках 327, 330 и/или 331 (нумерация ЕС). Примерами Fc-молчащих антител IgG1 является LALA-мутант, содержащий мутацию L234A и L235A в аминокислотной последовательности Fc IgG1. Другим примером Fc-молчащей мутации является мутация в остатке D265 или в D265 и P329, например, используемая в антителе IgG1, такая как мутация DAP A (D265A, P329A) (US 6737056). Другое молчащее антитело IgG1 содержит мутацию в остатке N297 (например, мутацию N297A, N297S), приводящую к получению агликозилированных/негликозилированных антител. Другие молчащие мутации включают: замены в остатках L234 и G237 (L234A/G237A); замены в остатках S228, L235 и R409 (S228P/L235E/R409K,T,M,L); замены в остатках H268, V309, A330 и A331 (H268Q/V309L/A330S/A331S); замены в остатках C220, C226, C229 и P238 (C220S/C226S/C229S/P238S); замены в остатках C226, C229, E233, L234 и L235 (C226S/C229S/E233P/L234V/L235A); замены в остатках K322, L235 и L235 (K322A/L234A/L235A); замены в остатках L234, L235 и P331 (L234F/L235E/P331S); замены в остатках 234, 235 и 297; замены в остатках E318, K320 и K322 (L235E/E318A/K320A/K322A); замены в остатках (V234A, G237A, P238S); замены в остатках 243 и 264; замены в остатках 297 и 299; замены, при которых остатки 233, 234, 235, 237 и 238, определяемые системой нумерации ЕС, содержат последовательность, выбранную из PAAAP, PAAAS и SAAAS (см. WO 2011/066501).

Fc-молчащие антитела обуславливают отсутствие или низкую активность ADCC, что означает, что Fc-молчащее антитело проявляет активность ADCC, которая меньше 50% специфического лизиса клеток. Предпочтительно, антитело по существу не обладает активностью ADCC, например, Fc-молчащее антитело проявляет активность ADCC (специфический лизис клеток), которая меньше 5% или меньше 1%. Fc-молчащие антитела могут также обуславливать отсутствие FcγR-опосредуемого перекрестного сшивания CD73 на поверхности CD73-экспрессии.

В одном из вариантов реализации антитело содержит замену в константной области тяжелой цепи в любом одном, двух, трех, четырех, пяти или более остатках, выбранных из группы, состоящей из: 220, 226, 229, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 243, 264, 268, 297, 298, 299, 309, 310, 318, 320, 322, 327, 330, 331 и 409 (нумерация остатков в константной области тяжелой цепи приведена в соответствии с нумерацией ЕС согласно Kabat). В одном из вариантов реализации антитело содержит замену в остатках 234, 235 и 322. В одном из вариантов реализации антитело содержит замену в остатках 234, 235 и 331.

В одном из вариантов реализации Fc-молчащее антитело содержит Fc-домен, содержащий замену аминокислоты в остатках 234, 235 и 331, например, мутацию «ТМ», включающую замены L234F, L235E и P331S. В одном из вариантов реализации антитело содержит Fc-домен, содержащий замену аминокислоты в остатках 234, 235 и 322 или в остатках 234, 235 и 331, описанную в публикации патента США № US 2015/0125444, при которой остаток 234 представляет собой F (фенилаланин); остаток 235 представляет собой аланин (A), аспарагин (N), фенилаланин (F), глутамин (Q) или валин (V); остаток 322 представляет собой аланин (A), аспарагиновую кислоту (D), глутаминовую кислоту (E), гистидин (H), аспарагин (N) или глутамин (Q); и остаток 331 представляет собой аланин (A) или глицин (G). Аминокислотные остатки указаны в соответствии с нумерацией ЕС согласно Kabat.

В одном из вариантов реализации антитело содержит Fc-домен, содержащий замену аминокислоты, которая увеличивает связывание с полипептидами FcRn человека, для увеличения времени полужизни антитела *in vivo*. Типичные мутации описаны в Strohl, W., 2009, Curr. Opin. Biotechnol. vol. 20(6):685-691, содержание которого включено в

настоящее описание посредством ссылки. Примерами замен, используемых в антителах изотипа IgG1 человека, являются замены в остатках M252, S254 и T256; замены в остатках T250 и M428; замены в остатке N434; замены в остатках H433 и N434; замены в остатках T307, E380 и N434; замены в остатках T307, E380 и N434; замены в остатках M252, S254, T256, H433, N434 и 436; замены в остатке 1253; замены в остатках P257, N434, D376 и N434.

В одном из вариантов реализации антитело содержит Fc-домен, содержащий замену аминокислоты, обеспечивающую пониженную чувствительность к расщеплению протеазами. Матричные металлопротеиназы (ММР) представляют наиболее известное семейство протеиназ, связанных с онкогенезом. Тогда как раковые клетки могут экспрессировать ММР, большую часть внеклеточных ММР обеспечивают различные типы стромальных клеток, которые инфильтрируют опухоль, и каждый из которых продуцирует конкретный набор протеиназ и ингибиторов протеиназ, которые высвобождаются во внеклеточное пространство и, в частности, изменяют среду вокруг опухоли. ММР, присутствующие в микроокружении опухоли, могут расщеплять антитела в шарнирной области и могут таким образом приводить к инактивации терапевтических антител, предназначенных для функционирования в месте опухоли.

В одном из вариантов реализации Fc-домен, содержащий замену аминокислоты, обладает пониженной чувствительностью к расщеплению любой одной, двумя, тремя или более (или всеми) протеазами, выбранными из группы, состоящей из: GluV8, IdeS, желатиназы А (ММР2), желатиназы В (ММР-9), матричной металлопротеиназы-7 (ММР-7), стромелизина (ММР-3) и эластазы макрофагов (ММР-12). В одном из вариантов реализации пониженная чувствительность антитела к расщеплению включает Fc-домен, содержащий замену аминокислоты в остатках E233-L234 и/или L235. В одном из вариантов реализации антитело содержит Fc-домен, содержащий замену аминокислоты в остатках E233, L234, L235 и G236. В одном из вариантов реализации антитело содержит Fc-домен, содержащий замену аминокислоты в одном или более остатках 233-238, например такую, при которой последовательность E233-L234-L235-G236 заменяют на P233-V234-A235 (G236 подвергают делеции). См., например, WO 99/58572 и WO 2012087746, содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

Антигенсвязывающее соединение можно оценивать на любой желаемой стадии на предмет способности ингибировать ферментативную активность CD73, в частности, блокировать 5'-нуклеотидазную активность CD73 и снижать выработку аденозина CD73-экспрессирующей клеткой, и в свою очередь восстанавливать активность и/или ослаблять аденозин-опосредуемое ингибирование лимфоцитов.

Способность антитела ингибировать ферментативную активность CD73 можно тестировать в анализе в бесклеточной системе с использованием рекомбинантного растворимого CD73 человека (в виде димеров) и АМФ, в котором превращение АМФ в аденозин (и/или его ингибирование) детектируют напрямую (например, путем измерения субстратов и продуктов, т.е. АМФ, аденозина и/или фосфата) или опосредованно. В одном из примеров АМФ и/или аденозин детектируют путем ВЭЖХ до и после инкубации тестируемого соединения совместно с рекомбинантным CD73. Рекомбинантный CD73 доступен, например, от R&D Systems (Миннеаполис, Миннесота).

Ингибирующую активность (т.е. потенциал повышения цитотоксичности) антитела можно также оценивать любым из ряда других способов. Например, в непрямом анализе используют реагент на основе люциферазы (например, систему CellTiter-Glo® от Promega) для детектирования исчезновения АМФ. В указанном анализе реакцию люциферазы ингибирует АМФ. Добавление фермента CD73 в реакционную смесь приводит к распаду

АМФ и ослабляет ингибирование, производя детектируемый сигнал (см. пример 2 в настоящем документе).

Анализы с использованием растворимого CD73 будут включать тестирование в условиях, когда антитела представлены в значительном молярном избытке (например, 10-кратном, 20-кратном, 50-кратном, 100-кратном и т.д.) по отношению к димерам полипептида CD73. При представлении в молярном избытке по отношению к ферменту антитела анти-CD73 будут больше не способны образовывать мультимерные комплексы антител и димеров CD73; затем могут быть отобраны антитела, которые сохраняют ингибирование ферментативной активности CD73.

Способность антитела ингибировать 5'-эктонуклеотидазную ферментативную активность CD73 можно в качестве альтернативы или в дополнение также тестировать в клеточном анализе (с использованием клеток, экспрессирующих CD73).

Предпочтительно, антитела можно тестировать или подвергать скринингу сначала в анализе в бесклеточной системе для идентификации антител, которые блокируют активность фермента, для уменьшения вероятности отбора антител, ингибирующих CD73 путем вызова интернализации CD73, а затем тестировать в виде очищенного антитела в клеточных анализах. Клеточные анализы можно осуществлять, как показано в разделе «Примеры» в настоящем документе. Например, линию CD73-экспрессирующих клеток (например, линию клеток MDA-MB-231) высевают в 96-луночные планшеты с плоским дном в присутствии антител анти-CD73 и инкубируют. К клеткам добавляют АМФ и инкубируют при 4°C (для того, чтобы избежать понижающей модуляции CD73). Затем планшеты центрифугируют и надосадочную жидкость переносят в 96-луночный культуральный планшет с плоским дном. Затем количественно определяют свободный фосфат, образуемый в результате гидролиза АМФ до аденозина. Уменьшение гидролиза АМФ до аденозина в присутствии антитела указывает на то, что данное антитело ингибирует клеточный CD73.

В одном из вариантов реализации препарат антитела вызывает по меньшей мере 50% снижение ферментативной активности полипептида CD73, предпочтительно по меньшей мере 60%, 70% или 80% снижение ферментативной активности полипептида CD73 (например, растворимого гомодимерного полипептида CD73; CD73, экспрессируемого клетками).

Активность антитела может быть также измерена в непрямом анализе на предмет способности модулировать активность лимфоцитов, например, ослаблять аденозин-опосредуемое ингибирование активности лимфоцитов или вызывать активацию активности лимфоцитов. Это можно исследовать, например, с использованием анализа высвобождения цитокинов. В другом примере антитело можно оценить в непрямом анализе на предмет способности модулировать пролиферацию лимфоцитов.

Антитело можно тестировать для определения способности интернализировать или индуцировать понижающую модуляцию CD73, например, как путем интернализации, так и индукции «сбрасывания» CD73 с клеточной поверхности. То, интернализирует ли антитело анти-CD73 после связывания CD73 на клетке млекопитающего, или подвергается ли полипептид CD73 внутриклеточной интернализации (например, после связывания антителом), может быть определено посредством различных анализов, в том числе тех, которые описаны в примерах экспериментов в настоящем документе (например, примере 7). В других примерах для тестирования интернализации *in vivo* тестируемое антитело подвергают мечению и вводят животному, у которого, как известно, CD73 экспрессируется на поверхности некоторых клеток. Антитело может быть мечено радиоактивным изотопом или мечено флуоресцентными частицами или

частицами золота, например. Животные, подходящие для данного анализа, включают
 млекопитающее, такое как мышь линии nude с трансплантатом или ксенотрансплантатом
 CD73-экспрессирующей опухоли человека, или мышь, которой были введены клетки,
 трансфицированные CD73 человека, или трансгенная мышь, экспрессирующая трансген
 5 CD73 человека. Соответствующие контроли включают животных, которые не получали
 тестируемое антитело или которые получали неродственное антитело, и животных,
 которые получали антитело к другому антигену на представляющих интерес клетках,
 при этом указанное антитело, как известно, подвергается интернализации после
 связывания с антигеном. Антитело можно вводить животному, например, путем
 10 внутривенной инъекции. С подходящими временными интервалами могут быть получены
 срезы тканей животного с использованием известных способов или как описано в
 примерах экспериментов ниже, и их можно анализировать путем световой микроскопии
 или электронной микроскопии на предмет интернализации, а также локализации
 интернализованного антитела в клетке. Для определения интернализации *in vitro*
 15 клетки можно инкубировать в чашках для тканевой культуры в присутствии или
 отсутствии соответствующих антител, добавляемых в культуральные среды, и
 обрабатывать для микроскопического анализа в желаемые моменты времени.
 Присутствие интернализованного меченого антитела в клетках можно
 непосредственно визуализировать путем микроскопии или путем автордиографии в
 20 случае использования антитела, меченого радиоактивным изотопом. В случае
 микроскопии можно оценивать колокализацию с известным полипептидом или другим
 клеточным компонентом; например, колокализация с эндосомальным/лизосомальным
 маркером LAMP-1 (CD107a) может предоставить информацию о субклеточной
 локализации интернализованного антитела. В качестве альтернативы, в количественном
 25 биохимическом анализе популяцию клеток, содержащую CD73-экспрессирующие клетки,
 приводят в контакт *in vitro* или *in vivo* с меченым радиоактивным изотопом тестируемым
 антителом, и клетки (в случае приведения в контакт *in vivo* клетки затем выделяют
 после подходящего количества времени) обрабатывают протеазой или подвергают
 промывке кислотой с удалением не интернализованного антитела на клеточной
 30 поверхности. Клетки измельчают и число устойчивых к протеазе радиоактивных
 импульсов в минуту (ерш), связанных с каждой партией клеток, измеряют путем
 пропускания гомогената через сцинтилляционный счетчик. На основе известной
 специфической активности меченого радиоактивным изотопом антитела количество
 интернализованных молекул антител на клетку может быть выведено из
 35 сцинтилляционного подсчета измельченных клеток. Клетки «приводят в контакт» с
 антителом *in vitro* предпочтительно в форме раствора, например, путем добавления
 клеток в среды для культивирования клеток в чашке или колбе для культивирования
 и тщательного смешивания антитела с данными средами с обеспечением равномерного
 воздействия антитела на клетки.

40 Эпитопы для антител

В соответствии с одним из аспектов антитела связывают общую антигенную
 детерминанту, присутствующую как на растворимом CD73, так и на CD73,
 экспрессируемом на клеточной поверхности.

В соответствии с одним из аспектов антитела связывают по существу тот же эпитоп,
 45 что и антитело 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1. В одном из вариантов реализации антитела
 связываются с эпитопом CD73, который по меньшей мере частично совпадает или
 содержит по меньшей мере один остаток в эпитопе, связываемом антителом 11E1, 8C7,
 3C12 или 6E1. Остатки, связываемые антителом, могут быть определены как

присутствующие на поверхности полипептида CD73, например, в полипептиде CD73, экспрессируемом на поверхности клетки. Аминокислотные остатки на CD73, связываемые антителом, могут быть выбраны, например, из группы, состоящей из остатков, перечисленных в таблице 1.

5 Связывание антитела анти-CD73 с клетками, трансфицированными мутантами CD73, можно измерять и сравнивать со способностью антитела анти-CD73 связывать полипептид CD73 дикого типа (например, SEQ ID NO: 1 или 2). Уменьшение связывания между антителом анти-CD73 и мутантным полипептидом CD73 (например, мутантом CD73 из таблицы 1) означает, что происходит снижение аффинности связывания
10 (например, измеряемой известными способами, такими как FACS-тестирование клеток, экспрессирующих конкретный мутант, или путем тестирования связывания с мутантными полипептидами в *Biacore*) и/или снижение общей связывающей способности антитела анти-CD73 (например, подтверждаемое снижением *B_{max}* на графике зависимости концентрации антитела анти-CD73 от концентрации полипептида). Значительное
15 уменьшение связывания указывает на то, что мутированный остаток непосредственно вовлечен в связывание с антителом анти-CD73 или располагается очень близко к связывающему белку, когда антитело анти-CD73 связывается с CD73.

В некоторых вариантах реализации значительное уменьшение связывания означает, что аффинность связывания и/или способность к связыванию между антителом анти-
20 CD73 и мутантным полипептидом CD73 снижена более чем на 40%, более чем на 50%, более чем на 55%, более чем на 60%, более чем на 65%, более чем на 70%, более чем на 75%, более чем на 80%, более чем на 85%, более чем на 90% или более чем на 95% относительно связывания между указанным антителом и полипептидом CD73 дикого типа. В некоторых вариантах реализации связывание уменьшено до уровня ниже
25 пределов детектирования. В некоторых вариантах реализации значительное уменьшение связывания подтверждают, когда связывание антитела анти-CD73 с мутантным полипептидом CD73 составляет менее 50% (например, менее 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15% или 10%) от связывания, наблюдаемого между антителом анти-CD73 и полипептидом CD73 дикого типа.

30 В некоторых вариантах реализации предложены антитела анти-CD73, демонстрирующие значительно меньшее связывание в отношении мутантного полипептида CD73, в котором остаток в сегменте, содержащем аминокислотный остаток, связываемый антителом 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1, заменен на другую аминокислоту. В одном из вариантов реализации указанный мутант представляет собой мутант,
35 выбранный из мутантов 1-15 из таблицы 1, например, мутант 3 или мутант, содержащий одну или более замен аминокислот в таком мутанте 3, по сравнению со связыванием полипептида CD73 дикого типа (например, полипептида SEQ ID NO: 1).

Возможно, антитело, утрачивающее связывание с одним или более мутантами из мутантов 1-15, не демонстрирует значительно меньшее связывание в отношении одного
40 или более других мутантных полипептидов CD73 из таблицы 1, например, одного или более (или всех) мутантов 2, 5, 6 или 7.

В соответствии с одним из аспектов антитела анти-CD73 обладают уменьшенным связыванием с полипептидом CD73, содержащим мутацию в остатке, выбранном из группы, состоящей из: A99, E129, K133, E134 и A135 (со ссылкой на SEQ ID NO: 1);
45 возможно, мутантный полипептид CD73 содержит мутации: A99S, E129A, K133A, E134N и A135S.

Возможно, в соответствии с одним из аспектов антитела анти-CD73 не обладают уменьшенным связыванием с полипептидом CD73, содержащим мутацию в остатке,

выбранном из группы, состоящей из: Q70, R73, A74, A107 и R109 (со ссылкой на SEQ ID NO: 1); возможно, мутантный полипептид CD73 содержит мутации: A99S, Q70S, R73A, A74E, A107I и R109G.

В соответствии с одним из аспектов антитела анти-CD73 связывают эпитоп на CD73, содержащий один, два, три, четыре или пять остатков, выбранных из группы, состоящей из A99, E129, K133, E134 и A135 (со ссылкой на SEQ ID NO: 1).

Возможно, в соответствии с одним из аспектов антитела анти-CD73 не связывают эпитоп на CD73, содержащий один, два, три, четыре или пять остатков, выбранных из группы, состоящей из Q70, R73, A74, A107 и R109 (со ссылкой на SEQ ID NO: 1).

Последовательности CDR антител

Антитело 11E1

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела 11E1 включена в перечень как SEQ ID NO: 3, аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи включена в перечень как SEQ ID NO: 4. В конкретном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело, которое связывает по существу тот же эпитоп или детерминанту, что и моноклональные антитела 11E1; возможно указанное антитело содержит гипервариабельную область антитела 11E1. В любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, антитело 11E1 может характеризоваться аминокислотными последовательностями и/или кодирующими его последовательностями нуклеиновой кислоты. В одном из вариантов реализации моноклональное антитело содержит Fab- или F(ab')₂-часть 11E1. Также предложено моноклональное антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи 11E1. Согласно одному из вариантов реализации моноклональное антитело содержит три CDR вариабельной области тяжелой цепи 11E1. Также предложено моноклональное антитело, дополнительно содержащее вариабельную область вариабельной легкой цепи 11E1 или одну, две или три из CDR вариабельной области легкой цепи 11E1. Возможно, любая одна или более из указанных CDR легкой или тяжелой цепи могут содержать одну, две, три, четыре или пять, или более модификаций аминокислот (например, замен, встраиваний или делеций). Возможно, предложено антитело, в котором любые из вариабельных областей легкой и/или тяжелой цепи, содержащих часть или всю антигенсвязывающую область антитела 11E1, подвергнуты слиянию с константной областью иммуноглобулина типа IgG человека, возможно константной областью человека, возможно изотипом IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, возможно дополнительно содержащее замену аминокислоты для снижения эффекторной функции (связывания с Fcγ-рецепторами человека).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложено антитело, при этом указанное антитело содержит: HCDR1-область 11E1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в таблице А, или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, при этом возможно одна или более из данных аминокислот могут быть заменены другой аминокислотой; HCDR2-область 11E1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в таблице А, или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, при этом возможно одна или более из данных аминокислот могут быть заменены другой аминокислотой; HCDR3-область 11E1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в таблице А, или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, при этом возможно одна или более из данных аминокислот могут быть заменены другой аминокислотой; LCDR1-область 11E1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в

таблице А, или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, при этом возможно одна или более из данных аминокислот могут быть заменены другой аминокислотой; LCDR2-область 11E1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в таблице А, или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, при этом возможно одна или более из данных аминокислот могут быть заменены другой аминокислотой; LCDR3-область 11E1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в таблице А, или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, при этом возможно одна или более из данных аминокислот могут быть делетированы или заменены другой аминокислотой. Возможно, может быть указано, что все (или каждая независимо) последовательности HCDR1, 2, 3 и LCDR1, 2, 3 соответствуют системе нумерации Kabat (как показано в таблице А для каждой CDR), соответствуют системе нумерации Chotia (как показано в таблице А для каждой CDR), соответствуют системе нумерации IMGT (как показано в таблице А для каждой CDR) или любой другой подходящей системе нумерации.

Антитело 6E1

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела 6E1 включена в перечень как SEQ ID NO: 21, аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи включена в перечень как SEQ ID NO: 22. В конкретном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело, которое связывает по существу тот же эпитоп или детерминанту, что и моноклональные антитела 6E1; возможно указанное антитело содержит гипервариабельную область антитела 6E1. В любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, антитело 6E1 может характеризоваться аминокислотными последовательностями и/или кодирующими его последовательностями нуклеиновой кислоты. В одном из вариантов реализации моноклональное антитело содержит Fab- или F(ab')₂-часть 6E1. Также предложено моноклональное антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи 6E1. Согласно одному из вариантов реализации моноклональное антитело содержит три CDR вариабельной области тяжелой цепи 6E1. Также предложено моноклональное антитело, дополнительно содержащее вариабельную область вариабельной легкой цепи 6E1 или одну, две или три из CDR вариабельной области легкой цепи 6E1. Возможно, любая одна или более из указанных CDR легкой или тяжелой цепи могут содержать одну, две, три, четыре или пять, или более модификаций аминокислот (например, замен, встраиваний или делеций). Возможно, предложено антитело, в котором любые из вариабельных областей легкой и/или тяжелой цепи, содержащих часть или всю антигенсвязывающую область антитела 6E1, подвергнуты слиянию с константной областью иммуноглобулина типа IgG человека, возможно константной областью человека, возможно изотипом IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, возможно дополнительно содержащее замену аминокислоты для снижения эффекторной функции (связывания с Fcγ-рецепторами человека).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложено антитело, при этом указанное антитело содержит: HCDR1-область 6E1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в таблице А, или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, при этом возможно одна или более из данных аминокислот могут быть заменены другой аминокислотой; HCDR2-область 6E1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в таблице А, или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, при этом возможно одна или более из данных аминокислот могут быть

заменены другой аминокислотой; HCDR3-область 6E1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в таблице А, или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, при этом возможно одна или более из данных аминокислот могут быть заменены другой аминокислотой; LCDR1-область 6E1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в таблице А, или последовательность по меньшей мере из 4,5,6,7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, при этом возможно одна или более из данных аминокислот могут быть заменены другой аминокислотой; LCDR2-область 6E1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в таблице А, или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, при этом возможно одна или более из данных аминокислот могут быть заменены другой аминокислотой; LCDR3-область 6E1, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в таблице А, или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, при этом возможно одна или более из данных аминокислот могут быть делетированы или заменены другой аминокислотой. Возможно, может быть указано, что все (или каждая независимо) последовательности HCDR1, 2, 3 и LCDR1, 2, 3 соответствуют системе нумерации Kabat (как показано в таблице А для каждой CDR), соответствуют системе нумерации Chotia (как показано в таблице А для каждой CDR), соответствуют системе нумерации IMGT (как показано в таблице А для каждой CDR) или любой другой подходящей системе нумерации.

Антитело 3C12

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела 3C12 включена в перечень как SEQ ID NO: 36, аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи включена в перечень как SEQ ID NO: 37. В конкретном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело, которое связывает по существу тот же эпитоп или детерминанту, что и моноклональные антитела 3C12; возможно указанное антитело содержит гипервариабельную область антитела 3C12. В любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, антитело 3C12 может характеризоваться аминокислотными последовательностями и/или кодирующими его последовательностями нуклеиновой кислоты. В одном из вариантов реализации моноклональное антитело содержит Fab- или F(ab')₂-часть 3C12. Также предложено моноклональное антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи 3C12. Согласно одному из вариантов реализации моноклональное антитело содержит три CDR вариабельной области тяжелой цепи 3C12. Также предложено моноклональное антитело, дополнительно содержащее вариабельную область вариабельной легкой цепи 3C12 или одну, две или три из CDR вариабельной области легкой цепи 3C12. Возможно, любая одна или более из указанных CDR легкой или тяжелой цепи могут содержать одну, две, три, четыре или пять, или более модификаций аминокислот (например, замен, встраиваний или делеций). Возможно, предложено антитело, в котором любые из вариабельных областей легкой и/или тяжелой цепи, содержащих часть или всю антигенсвязывающую область антитела 3C12, подвергнуты слиянию с константной областью иммуноглобулина типа IgG человека, возможно константной областью человека, возможно изотипом IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, возможно дополнительно содержащее замену аминокислоты для снижения эффекторной функции (связывания с Fcγ-рецепторами человека).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложено антитело, при этом указанное антитело содержит: HCDR1-область 3C12, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в таблице А, или последовательность

по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, при этом возможно одна или более из данных аминокислот могут быть заменены другой аминокислотой; HCDR2-область 3C12, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в таблице А, или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, при этом возможно одна или более из данных аминокислот могут быть заменены другой аминокислотой; HCDR3-область 3C12, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в таблице А, или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, при этом возможно одна или более из данных аминокислот могут быть заменены другой аминокислотой; LCDR1-область 3C12, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в таблице А, или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, при этом возможно одна или более из данных аминокислот могут быть заменены другой аминокислотой; LCDR2-область 3C12, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в таблице А, или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, при этом возможно одна или более из данных аминокислот могут быть заменены другой аминокислотой; LCDR3-область 3C12, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в таблице А, или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, при этом возможно одна или более из данных аминокислот могут быть делегированы или заменены другой аминокислотой. Возможно, может быть указано, что все (или каждая независимо) последовательности HCDR1, 2, 3 и LCDR1, 2, 3 соответствуют системе нумерации Kabat (как показано в таблице А для каждой CDR), соответствуют системе нумерации Chotia (как показано в таблице А для каждой CDR), соответствуют системе нумерации IMGT (как показано в таблице А для каждой CDR) или любой другой подходящей системе нумерации.

Антитело 8C7

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи антитела 8C7 включена в перечень как SEQ ID NO: 28, аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи включена в перечень как SEQ ID NO: 29. В конкретном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело, которое связывает по существу тот же эпитоп или детерминанту, что и моноклональные антитела 8C7; возможно указанное антитело содержит гипервариабельную область антитела 8C7. В любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, антитело 8C7 может характеризоваться аминокислотными последовательностями и/или кодирующими его последовательностями нуклеиновой кислоты. В одном из вариантов реализации моноклональное антитело содержит Fab- или F(ab')₂-часть 8C7. Также предложено моноклональное антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи 8C7. Согласно одному из вариантов реализации моноклональное антитело содержит три CDR вариабельной области тяжелой цепи 8C7. Также предложено моноклональное антитело, дополнительно содержащее вариабельную область вариабельной легкой цепи 8C7 или одну, две или три из CDR вариабельной области легкой цепи 8C7. Возможно, любая одна или более из указанных CDR легкой или тяжелой цепи могут содержать одну, две, три, четыре или пять, или более модификаций аминокислот (например, замен, встраиваний или делений). Возможно, предложено антитело, в котором любые из вариабельных областей легкой и/или тяжелой цепи, содержащих часть или всю антигенсвязывающую область антитела 8C7, подвергнуты слиянию с константной областью иммуноглобулина типа IgG человека, возможно константной областью человека, возможно изотипом IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека,

возможно дополнительно содержащее замену аминокислоты для снижения эффекторной функции (связывания с Fcγ-рецепторами человека).

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложено антитело, при этом указанное антитело содержит: HCDR1-область 8C7, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в таблице А, или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, при этом возможно одна или более из данных аминокислот могут быть заменены другой аминокислотой; HCDR2-область 8C7, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в таблице А, или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, при этом возможно одна или более из данных аминокислот могут быть заменены другой аминокислотой; HCDR3-область 8C7, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в таблице А, или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, при этом возможно одна или более из данных аминокислот могут быть заменены другой аминокислотой; LCDR1-область 8C7, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в таблице А, или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, при этом возможно одна или более из данных аминокислот могут быть заменены другой аминокислотой; LCDR2-область 8C7, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в таблице А, или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, при этом возможно одна или более из данных аминокислот могут быть заменены другой аминокислотой; LCDR3-область 8C7, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в таблице А, или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, при этом возможно одна или более из данных аминокислот могут быть заменены другой аминокислотой. Возможно, может быть указано, что все (или каждая независимо) последовательности HCDR1, 2, 3 и LCDR1, 2, 3 соответствуют системе нумерации Kabat (как показано в таблице А для каждой CDR), соответствуют системе нумерации Chotia (как показано в таблице А для каждой CDR), соответствуют системе нумерации IMGT (как показано в таблице А для каждой CDR) или любой другой подходящей системе нумерации.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложено антитело, которое связывает CD73 человека, содержащее:

(а) гипервариабельные области вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 3, 21, 28 или 36, в которых возможно одна, две, три или более аминокислот заменены другой аминокислотой; и (b) гипервариабельные области вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 3, 22, 29 или 37, в которых возможно одна, две, три или более аминокислот заменены другой аминокислотой.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предложено антитело, которое связывает CD73 человека, содержащее:

(а) аминокислотную последовательность CDR 1 тяжелой цепи, представленную в любой из SEQ ID NO: 5-7 или 30-32, при этом возможно одна, две, три или более аминокислот в CDR могут быть заменены другой аминокислотой;

(b) аминокислотную последовательность CDR 2 тяжелой цепи, представленную в любой из SEQ ID NO: 8-10, 23, 24 или 33, при этом возможно одна, две, три или более аминокислот в CDR могут быть заменены другой аминокислотой;

(с) аминокислотную последовательность CDR 3 тяжелой цепи, представленную в любой из SEQ ID NO: 11-13, 25 или 27, при этом возможно одна, две, три или более аминокислот в CDR могут быть заменены другой аминокислотой;

(d) аминокислотную последовательность CDR 1 легкой цепи, представленную в любой из SEQ ID NO: 14, 15, 16, 34 или 35, при этом возможно одна, две, три или более аминокислот в CDR могут быть заменены другой аминокислотой;

5 (e) аминокислотную последовательность CDR 2 легкой цепи, представленную в любой из SEQ ID NO: 17 или 18, при этом возможно одна, две, три или более аминокислот в CDR могут быть заменены другой аминокислотой; и/или

(f) аминокислотную последовательность CDR 3 легкой цепи, представленную в любой из SEQ ID NO: 19 или 20, при этом возможно одна, две, три или более аминокислот в CDR могут быть заменены другой аминокислотой.

10 В соответствии с другим аспектом любого из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, любая из CDR 1, 2 и 3 тяжелой и легкой цепей 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1 может характеризоваться последовательностью по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ее смежных аминокислот, и/или как содержащая аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% или
15 95% идентичностью последовательности с конкретной CDR или набором CDR, перечисленных в соответствующей SEQ ID NO.

В соответствии с одним из аспектов любого из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, любое антитело может содержать тяжелую и/или легкую цепь, содержащую последовательности CDR1, 2 и/или 3 согласно соответствующей формуле,
20 выбранной из соответствующих формул (I)-(V). В любом варианте реализации, описанном в настоящем документе, конкретная HCDR1-3 или LCDR-1-3 может быть определена как содержащая последовательность соответствующих формул (I)-(VI). В одном из предпочтительных вариантов реализации антитело содержит легкую цепь, содержащую три LCDR, и тяжелую цепь, содержащую три HCDR.

25 В одном из вариантов реализации HCDR1 содержит аминокислотную последовательность формулы (I):

$S - Y - N - M - X_{aa1}$ (SEQ ID NO: 38),

где X_{aa1} может представлять собой консервативную или неконсервативную замену
30 любой из указанных аминокислот или делецию, или встраивание, возможно где X_{aa1} представляет собой Y (Tyr) или N (Asn).

В одном из вариантов реализации HCDR2 содержит аминокислотную последовательность формулы (IIa):

35 $Y - I - D - P - Y - N - G - G - X_{aa2} - S - Y - N - X_{aa3} - X_{aa4} - F - K - G$ (SEQ ID NO: 39),
или ее подпоследовательность, например, аминокислотную последовательность формулы (IIb):

$Y - I - D - P - Y - N - G - G - X_{aa2}$ (SEQ ID NO: 40),

40 где X_{aa2} может представлять собой консервативную или неконсервативную замену любой из указанных аминокислот или делецию, или встраивание, возможно где X_{aa2} представляет собой S (Ser) или T (Thr); где X_{aa3} может представлять собой консервативную или неконсервативную замену любой из указанных аминокислот или делецию, или встраивание, возможно где X_{aa3} представляет собой Q (Gln) или L (Leu);
45 где X_{aa4} может представлять собой консервативную или неконсервативную замену любой из указанных аминокислот или делецию, или встраивание, возможно где X_{aa4} представляет собой K (Lys) или T (Thr).

В одном из вариантов реализации HCDR3 содержит аминокислотную

последовательность формулы (III):

$G - Y - X_{aa5} - N - Y - K - A - W - F - A - Y$ (SEQ ID NO: 41),

где X_{aa5} может представлять собой консервативную или неконсервативную замену любой из указанных аминокислот или делецию, или встраивание, возможно где X_{aa5} представляет собой G (Gly) или N (Asn).

В одном из вариантов реализации LCDR1 содержит аминокислотную последовательность формулы (IV):

$K - A - S - Q - S - V - X_{aa6} - N - D - V - A$ (SEQ ID NO: 42),

где X_{aa6} может представлять собой консервативную или неконсервативную замену любой из указанных аминокислот или делецию, или встраивание, возможно где X_{aa6} представляет собой T (Thr) или S (Ser).

В одном из вариантов реализации LCDR2 содержит аминокислотную последовательность формулы (V):

$Y - A - S - X_{aa7} - R - Y - T$ (SEQ ID NO: 43),

где X_{aa7} может представлять собой консервативную или неконсервативную замену любой из указанных аминокислот или делецию, или встраивание, возможно где X_{aa7} представляет собой T (Thr) или N (Asn).

В одном из вариантов реализации LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или 20.

В одном из вариантов реализации антитело может содержать тяжелую цепь, содержащую:

a CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38; и/или

b CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39 (или 40); и/или

c CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

В одном из вариантов реализации антитело может содержать легкую цепь, содержащую:

a CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 42; и/или

b CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43; и/или

c CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или 20.

В любом из антител, например, 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1, указанные последовательности вариабельной области и CDR могут содержать модификации последовательности, например, замену (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более модификаций последовательности). В одном из вариантов реализации CDR 1, 2 и/или 3 тяжелой и легкой цепей содержат одну, две, три или более замен аминокислот, при этом замененный остаток представляет собой остаток, присутствующий в последовательности человеческого происхождения. В одном из вариантов реализации указанная замена представляет собой консервативную модификацию. Термин «консервативная модификация последовательности» относится к модификации аминокислоты, которая не влияет или не изменяет в значительной степени характеристики связывания антитела, содержащего указанную аминокислотную последовательность. Такие консервативные

модификации включают замены, присоединения и делеции аминокислот. Модификации могут быть введены в антитело стандартными способами, известными в данной области техники, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредуемый мутагенез.

Консервативные замены аминокислот представляют собой, как правило, те замены, при которых аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь со схожими физико-химическими свойствами. Указанные последовательности вариабельной области и CDR могут содержать одно, два, три, четыре или более встраиваний, делеций или замен аминокислот. Когда производят замены, предпочтительные замены будут представлять собой консервативные модификации. Семейства аминокислотных остатков, имеющих схожие боковые цепи, были определены в данной области техники. Данные семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или более аминокислотных остатков в CDR-областях антитела могут быть заменены другими аминокислотными остатками из того же семейства боковых цепей, и измененное антитело может быть подвергнуто тестированию на предмет сохранения функции (т.е. свойств, описанных в настоящем документе) с использованием анализов, описанных в настоящем документе.

Последовательности CDR согласно системам определения IMGT, Kabat и Chothia суммированы в таблице А ниже. Последовательности вариабельных областей антител приведены в таблице В ниже (если присутствуют лидерные последовательности, может быть указано, что любая цепь антитела начинается в положении аминокислоты сразу же после окончания лидерной последовательности), и каждые CDR подчеркнуты. В любом варианте реализации, описанном в настоящем документе, последовательность VL или VH может быть определена или пронумерована таким образом, чтобы содержать или не содержать сигнальный пептид или любую его часть.

Таблица А

mAb	Определение CDR	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID	Последовательность	SEQ ID	Последовательность	SEQ ID	Последовательность

1E11	Kabat	5	SYNMY	8	YIDPYNGGTSYNQKFKG	11	GYGNYKAWFAY
	Chotia	6	GYAFTSY	9	PYNG	12	YGNKYAWFA
	IMGT	7	GYAFTSYN	10	IDPYNGGT	13	ARGYGNKYAW FAY
6E1	Kabat	5	SYNMY	23	YIDPYNGGSSYNQKFKG	25	GYNNKYAWFAY
	Chotia	6	GYAFTSY	9	PYNG	26	YNNKYAWFA
	IMGT	7	GYAFTSYN	24	IDPYNGGS	27	ARGYNNKYAW FAY
8C7	Kabat	30	SYNMN	33	YIDPYNGGSSYNLTFKG	11	GYGNYKAWFAY
	Chotia	31	GYAFASY	9	PYNG	12	YGNKYAWFA
	IMGT	32	GYAFASYN	24	IDPYNGGS	13	ARGYGNKYAWFA Y
3C12	Kabat	30	SYNMN	33	YIDPYNGGSSYNLTFKG	11	GYGNYKAWFAY
	Chotia	31	GYAFASY	9	PYNG	12	YGNKYAWFA
	IMGT	32	GYAFASYN	24	IDPYNGGS	13	ARGYGNKYAWFA Y
mAb	Опреде- ление CDR	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		SEQ ID	Последователь- ность	SEQ ID	Последовательность	SEQ ID	Последовательность
1E11	Kabat	14	KASQSVTNDVA	17	YASNRYT	19	QQDYSSLT
	Chotia	15	SQSVTND	18	YAS	20	DYSSL
	IMGT	16	QSVTND	18	YAS	19	QQDYSSLT
6E1	Kabat	14	KASQSVTNDVA	17	YASNRYT	19	QQDYSSLT
	Chotia	15	SQSVTND	18	YAS	20	DYSSL
	IMGT	16	QSVTND	18	YAS	19	QQDYSSLT
8C7	Kabat	44	KASQSVSNDVA	17	YASTRYT	19	QQDYSSLT
	Chotia	34	SQSVSND	18	YAS	20	DYSSL
	IMGT	35	QSVSND	18	YAS	19	QQDYSSLT
3C12	Kabat	38	KASQSVSNDVA	17	YASTRYT	19	QQDYSSLT
	Chotia	34	SQSVSND	18	YAS	20	DYSSL
	IMGT	35	QSVSND	18	YAS	19	QQDYSSLT

Таблица В

SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
------------------	-----------------------------------

5	11E1 VH	3	EIQLQQSGPELVKPGASVKVSCKASGYAFTSYNMYWVKQSHGKSL EWIGYIDPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNSLTSEDS AVYYCARGYGNYKAWFAYWGQGTLVTVSA
	11E1 VL	4	DAVMTQTPKFLVLSAGDRVITITCKASQSVTNDVAWYQQKPGQSPK LLIYYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQD YSSLTFGAGTKLELK
10	6E1 VH	21	EFQLQQSGPELVKPGASVKVSCKASGYAFTSYNMYWVKQSHGKR LEWIGYIDPYNGGSSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNNLTSED SAVYYCARGYNKYKAWFAYWGQGTLVTVSA
15	6E1 VL	22	SIVMTQTPKFLVLSAGDRVITITCKASQSVTNDVAWYQQKPGQSPKL LIYYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFTISTMVAEDLAVYFCQQDY SSLTFGAGTKLELK
20	8C7 VH	28	EVQLQQSGPELVKPGASVKVSCKASGYAFASYNMNWVKQSHGKS LDWIGYIDPYNGGSSYNLTFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNSLTSED SAVYYCARGYGNYKAWFAYWGQGTLVTVSAASTKGP
25	8C7 VL	29	SIVMTPTPKFLVLSAGDRVITITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKL LIYYASTRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQDYS SLTFGAGTKLELKRTVAAP
30	3C12 VH	36	QIQLQQSGPELVKPGASVKVSCKASGYAFASYNMNWVKQSHGKSL DWIGYIDPYNGGSSYNLTFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNSLTSEDS AVYYCARGYGNYKAWFAYWGQGTLVTVSAASTKGP
	3C12 VL	37	DVVMTQTPKFLVLSAGDRVITITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPK LLIYYASTRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQD YSSLTFGAGTKLELKRTVAAP

35 Фрагменты и производные антител (которые включены в термин «антитело» или «антитела» в настоящей заявке, если не указано иное или если это не противоречит явным образом контексту) могут быть получены способами, хорошо известными в данной области техники. «Фрагменты» содержат часть интактного антитела, как правило, антигенсвязывающий центр или вариабельную область. Примеры фрагментов антител включают Fab-, Fab'-, Fab'-SH-, F(ab')₂- и Fv-фрагменты; диатела; любой фрагмент
 40 антитела, который представляет собой полипептид, имеющий первичную структуру, состоящую из одной непрерывной последовательности смежных аминокислотных остатков (называемый в настоящем описании «одноцепочечным фрагментом антитела» или «одноцепочечным полипептидом»), включая без ограничения (1) одноцепочечные молекулы Fv, (2) одноцепочечные полипептиды, содержащие только один вариабельный
 45 домен легкой цепи или его фрагмент, содержащий три CDR вариабельного домена легкой цепи, без связанной тяжелой цепи и (3) одноцепочечные полипептиды, содержащие только одну вариабельную область тяжелой цепи или ее фрагмент, содержащий три CDR вариабельной области тяжелой цепи, без связанной легкой цепи; и

полиспецифические (например, биспецифические) антитела, полученные из фрагментов антител. Среди прочего включены: нанотело, доменное антитело, однодоменное антитело или «dAb».

В некоторых вариантах реализации ДНК гибридомы, продуцирующей антитело, может быть модифицирована перед встраиванием в вектор экспрессии, например, путем замены кодирующей последовательностью для константных доменов тяжелой и легкой цепей человека вместо гомологичных последовательностей, не относящихся к человеку (например, Morrison et al., PNAS pp. 6851 (1984)), или путем ковалентного связывания со всей кодирующей иммуноглобулин последовательностью или частью кодирующей последовательности для полипептида, не представляющего собой иммуноглобулин. Таким образом получают «химерные» или «гибридные» антитела, обладающие специфичностью связывания исходного антитела. Как правило, такие полипептиды, не представляющие собой иммуноглобулин, заменяют константные домены антитела.

Возможно, антитело является гуманизированным. «Гуманизированные» формы антител представляют собой специфические химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие подпоследовательности антител), которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина мыши. В большинстве случаев гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в которых остатки из определяющей комплементарность области (CDR) реципиента заменены остатками из CDR исходного антитела (донорское антитело) с сохранением при этом желаемой специфичности, аффинности и способности исходного антитела.

В некоторых случаях остатки каркасной области Fv иммуноглобулина человека могут быть заменены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Более того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, не встречающиеся ни в реципиентном антителе, ни в вводимых CDR или каркасных последовательностях. Данные модификации осуществляют для дополнительного улучшения и оптимизации эффективности антитела. В целом, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или по существу все области CDR соответствуют CDR исходного антитела, и все или по существу все каркасные (FR) области представляют собой каркасные области консенсусной последовательности иммуноглобулина человека. В оптимальном варианте гуманизированное антитело также будет содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Дополнительные сведения см. в Jones et al., Nature, 321, pp.522 (1986); Reichmann et al., Nature, 332, pp. 323 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2, pp. 593 (1992); Verhoeven et Science, 239, pp. 1534; и патенте США №4816567, полное содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки). Способы гуманизации антител хорошо известны в данной области техники.

Выбор переменных доменов человека, как легкой, так и тяжелой цепи, для применения для получения гуманизированных антител имеет очень важное значение для снижения антигенности. Согласно так называемому способу «наибольшего соответствия» последовательность переменного домена антитела подвергают скринингу против целой библиотеки известных последовательностей переменных доменов человека. Затем последовательность человека, которая наиболее близка к такой последовательности у мыши, принимают в качестве каркасной области (FR) человека для гуманизированного антитела (Sims et al., J. Immunol. 151, pp. 2296 (1993);

Chothia and Lesk, J. Mol. 196, 1987, pp. 901). В другом способе используют конкретную каркасную область из консенсусной последовательности всех антител человека конкретной подгруппы легкой или тяжелой цепей. Одинаковую каркасную область можно использовать для нескольких различных гуманизированных антител Carter et al., PNAS 89, pp. 4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151, p. 2623 (1993)).

Также важное значение имеет гуманизация антител с сохранением высокой аффинности к CD73 и других подходящих биологических свойств. Для достижения этой цели в соответствии с одним из способов гуманизированные антитела получают способом анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с использованием трехмерных моделей исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов общедоступны и известны специалисту в данной области техники. Доступны компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают вероятные трехмерные структуры отобранных потенциальных последовательностей иммуноглобулинов. Изучение данных отображений позволяет анализировать вероятную роль остатков в функционировании потенциальной последовательности иммуноглобулина, т.е. анализировать остатки, которые влияют на способность потенциального иммуноглобулина связывать антиген. Таким путем остатки FR можно отбирать и комбинировать из консенсусных и вводимых последовательностей так, чтобы получить желаемую характеристику антитела, такую как повышенная аффинность в отношении целевого антигена (антигенов). В целом, остатки CDR непосредственно и в наиболее значительной степени вовлечены во влияние на связывание антигена.

Другой способ получения «гуманизированных» моноклональных антител заключается в использовании XenoMouse (Abgenix, Фримонт, Калифорния) в качестве мыши, используемой для иммунизации. XenoMouse представляет собой мышь-хозяина, у которой гены иммуноглобулина были заменены функциональными генами иммуноглобулина человека. Таким образом, антитела, вырабатываемые данной мышью или в гибридомах, полученных из В-клеток данной мыши, уже являются гуманизированными. XenoMouse описана в патенте США №6162963, полное содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки.

Антитела человека могут быть также получены в соответствии с различными другими методиками, например, путем использования для иммунизации других трансгенных животных, которые были созданы с использованием методов генной инженерии для экспрессии спектра антител человека (Jakobovitz et al., Nature 362 (1993) 255), или путем отбора спектров антител с использованием способов фагового отображения. Такие методики известны специалисту в данной области техники и могут быть осуществлены с использованием моноклональных антител, описанных в настоящей заявке, в качестве исходных.

Составы антител

Антитело анти-CD73 может быть включено в фармацевтический состав в концентрации от 1 мг/мл до 500 мг/мл, при этом указанный состав имеет рН от 2,0 до 10,0. Указанный состав может дополнительно содержать буферную систему, консервант (консерванты), изотонический агент (агенты), хелатирующий агент (агенты), стабилизаторы и поверхностно-активные вещества. В одном из вариантов реализации фармацевтический состав представляет собой водный состав, т.е. состав, содержащий воду. Такой состав представляет собой, как правило, раствор или суспензию. В другом варианте реализации фармацевтический состав представляет собой водный раствор. Термин «водный состав» определяется как состав, содержащий по меньшей мере 50

масс. % воды. Подобным образом, термин «водный раствор» определяется как раствор, содержащий по меньшей мере 50 масс. % воды, и термин «водная суспензия» определяется как суспензия, содержащая по меньшей мере 50 масс. % воды.

В другом варианте реализации фармацевтический состав представляет собой высушенный методом сублимации состав, к которому врач или пациент добавляет растворители и/или разбавители перед применением.

В другом варианте реализации фармацевтический состав представляет собой высушенный состав (например, высушенный методом сублимации или высушенный распылением), готовый к применению без какого-либо предварительного растворения.

В соответствии с другим аспектом фармацевтический состав содержит водный раствор такого антитела и буфер, при этом антитело присутствует в концентрации от 1 мг/мл или выше, и при этом указанный состав имеет pH от примерно 2,0 до примерно 10,0.

В другом варианте реализации pH состава находится в диапазоне, выбранном из перечня, состоящего из: от примерно 2,0 до примерно 10,0, от примерно 3,0 до примерно 9,0, от примерно 4,0 до примерно 8,5, от примерно 5,0 до примерно 8,0 и от примерно 5,5 до примерно 7,5.

В другом варианте реализации буфер выбран из группы, состоящей из ацетата натрия, карбоната натрия, цитрата, глицилглицина, гистидина, глицина, лизина, аргинина, дигидрофосфата натрия, гидрофосфата натрия, фосфата натрия и трис(гидроксиметил)аминометана, бисина, трицина, яблочной кислоты, сукцината, малеиновой кислоты, фумаровой кислоты, винной кислоты, аспарагиновой кислоты или их смесей. Каждый из данных конкретных буферов составляет альтернативный вариант реализации.

В другом варианте реализации состав дополнительно содержит фармацевтически приемлемый консервант. В другом варианте реализации состав дополнительно содержит изотонический агент. В другом варианте реализации состав также содержит хелатирующий агент. В другом варианте реализации состав дополнительно содержит стабилизатор. В другом варианте реализации состав дополнительно содержит поверхностно-активное вещество. Для удобства приведена ссылка на Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995.

Возможно присутствие других ингредиентов в пептидном фармацевтическом составе. Такие дополнительные ингредиенты могут включать смачивающие агенты, эмульгаторы, антиоксиданты, наполнители, модификаторы тоничности, хелатирующие агенты, ионы металлов, масляные наполнители, белки (например, сывороточный альбумин человека, желатин или белки) и цвиттер-ион (например, аминокислоту, такую как бетаин, таурин, аргинин, глицин, лизин и гистидин). Такие дополнительные ингредиенты, конечно, не должны отрицательно влиять на общую стабильность фармацевтического состава.

Фармацевтические композиции, содержащие антитело, могут быть введены пациенту, нуждающемуся в таком лечении, в нескольких участках, например, в топических участках, например, участках кожи и слизистой, в участках, обходящих абсорбцию, например, введение в артерию, в вену, в сердце, и в участках, предполагающих абсорбцию, например, введение в кожу, под кожу, в мышцу или в брюшную полость. Введение фармацевтических композиций пациентам, нуждающимся в таком лечении, можно осуществлять несколькими путями введения, например, подкожным, внутримышечным, интраперитонеальным, внутривенным, лингвальным, сублингвальным, трансбуккальным, в рот, пероральным, в желудок и кишечник, назальным, пульмональным, например, через бронхиолы и альвеолы или их комбинацию, эпидермальным, дермальным, трансдермальным, вагинальным, ректальным, глазным, например, через конъюнктиву, уретральным и парентеральным.

Подходящие составы антител могут быть также определены путем изучения опыта с другими уже разработанными терапевтическими моноклональными антителами.

Было продемонстрировано, что некоторые моноклональные антитела эффективны в клинических ситуациях, такие как Ритуксан (Ритуксимаб), Герцептин (Трастузумаб), Ксолар (Омализумаб), Бексар (Тозитумомаб), Кэмпас (Алемтузумаб), Зевалин, Онколим (Oncolum), и схожие составы можно применять совместно с антителами. Например, моноклональное антитело может быть представлено в концентрации 10 мг/мл либо в 100 мг (10 мл), либо в 500 мг (50 мл) флаконах для однократного применения в форме для внутривенного введения в 9,0 мг/мл хлорида натрия, 7,35 мг/мл дигидрата цитрата натрия, 0,7 мг/мл полисорбата 80 и стерильной воде для инъекций. pH доводят до 6,5. В другом варианте реализации антитело представляют в составе, содержащем примерно 20 mM Na-цитрат, примерно 150 mM NaCl, при pH примерно 6,0.

Диагностика и лечение злокачественных опухолей

Также предложены способы лечения индивидуума, в частности пациента, представляющего собой человека, с применением антитела анти-CD73, описанного в настоящем документе. В одном из вариантов реализации настоящего изобретения предложено применение антитела, описанного в настоящем документе, для получения фармацевтической композиции для введения пациенту, представляющему собой человека. Как правило, указанный пациент страдает раком или подвержен риску возникновения рака.

Например, в соответствии с одним из аспектов предложен способ восстановления или потенцирования активности лимфоцитов у нуждающегося в этом пациента, включающий этап введения нейтрализующего антитела анти-CD73 указанному пациенту. Указанное антитело может представлять собой, например, антитело анти-CD73 человека или гуманизированное антитело анти-CD73, при этом указанное антитело снижает или подавляет 5'-нуклеотидазную активность CD73 человека. В одном из вариантов реализации указанный способ направлен на повышение активности лимфоцитов (например, Т-клеток) у пациентов, страдающих заболеванием, при котором повышение активности лимфоцитов оказывает полезный эффект или которое вызвано или характеризуется иммуносупрессией, иммуносупрессивными клетками или, например, аденозином, вырабатываемым CD4 Т-клетками, CD8 Т-клетками, В-клетками. Данные способы будут особенно подходить, например, пациентам с солидной опухолью, при которой подозревают, что микроокружение опухоли (и CD73-опосредуемая выработка в нем аденозина) может вносить вклад в отсутствие распознавания иммунной системой (ускользание от иммунологического надзора). Опухоль может, например, характеризоваться CD73-экспрессирующими иммунными клетками, например, CD4 Т-клетками, CD8 Т-клетками, В-клетками.

В частности, способы и композиции применяют для лечения различных раковых опухолей и других пролиферативных заболеваний. Поскольку данные способы действуют путем уменьшения количества аденозина, ингибирующего противоопухолевую активность лимфоцитов, и в дополнение к этому возможно путем увеличения количества АТФ, который может повышать противоопухолевую активность лимфоцитов, они применимы к очень широкому спектру раковых опухолей, включая в частности солидные опухоли, при которых аденозин в микроокружении опухоли может играть значительную роль в подавлении противоопухолевого иммунного ответа. В одном из вариантов реализации пациент, представляющий собой человека, которого лечат антителом анти-CD73, страдает раком печени, раком кости, раком поджелудочной железы, раком кожи, раком головы или шеи, раком молочной железы, раком легкого,

немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), кастрационно-резистентным раком
 предстательной железы (КРРПЖ), меланомой, раком матки, раком толстой кишки,
 раком прямой кишки, раком анальной области, раком желудка, раком яичка, раком
 матки, карциномой фаллопиевых труб, карциномой эндометрия, карциномой шейки
 5 матки, карциномой влагалища, карциномой вульвы, неходжкинской лимфомой, раком
 пищевода, раком тонкой кишки, раком эндокринной системы, раком щитовидной
 железы, раком паращитовидной железы, раком надпочечников, саркомой мягкой ткани,
 раком уретры, раком полового члена, солидными опухолями детского возраста,
 10 лимфоцитарной лимфомой, раком мочевого пузыря, раком почки или мочеточника,
 карциномой почечной лоханки, новообразованием центральной нервной системы
 (ЦНС), первичной лимфомой ЦНС, ангиогенезом опухоли, опухолью оси позвоночника,
 глиомой ствола головного мозга, аденомой гипофиза, саркомой Калоши,
 эпидермоидным раком, плоскоклеточным раком, раковыми опухолями,
 индуцированными окружающей средой, включая индуцированные асбестом,
 15 гематологическими злокачественными опухолями, в том числе, например,
 множественной миеломой, В-клеточной лимфомой, лимфомой Ходжкина/первичной
 медиастинальной В-клеточной лимфомой, неходжкинской лимфомой, острой миелоидной
 лимфомой, хроническим миелогенным лейкозом, хроническим лимфоидным лейкозом,
 фолликулярной лимфомой, диффузной В-крупноклеточной лимфомой, лимфомой
 20 Беркитта, иммунобластной крупноклеточной лимфомой, В-лимфобластной лимфомой
 из клеток-предшественников, лимфомой из клеток мантийной зоны, острым
 лимфобластным лейкозом, грибовидным микозом, анапластической крупноклеточной
 лимфомой, Т-клеточной лимфомой и Т-лимфобластной лимфомой из клеток-
 предшественников, и любыми комбинациями указанных раковых опухолей. Настоящее
 25 изобретение также применимо к лечению метастатических раковых опухолей. Пациентов
 можно тестировать или отбирать по одному или более из вышеописанных клинических
 признаков до, во время или после лечения.

В одном из вариантов реализации антитело анти-CD73 вводят в количестве,
 эффективном для достижения и/или поддержания у индивидуума (например, в течение
 30 1, 2, 3, 4 недель и/или до следующего введения антигенсвязывающего соединения)
 концентрации в крови, составляющей по меньшей мере EC_{50} , возможно EC_{70} , возможно
 по существу EC_{100} , для нейтрализации ферментативной активности CD73. В одном из
 вариантов реализации активное количество антитела анти-CD73 представляет собой
 35 количество, эффективное для достижения EC_{50} , возможно EC_{70} , возможно по существу
 EC_{100} для нейтрализации ферментативной активности CD73 в экстравазкулярной ткани
 индивидуума. В одном из вариантов реализации активное количество антитела анти-
 CD73 представляет собой количество, эффективное для достижения (или поддержания)
 у индивидуума EC_{50} , возможно EC_{70} , возможно по существу EC_{100} для ингибирования
 40 или нейтрализации ферментативной активности CD73.

Возможно, в одном из вариантов реализации в отличие от некоторых антител,
 которые направлены на истощение CD73-экспрессирующих клеток опухоли за счет
 ADCC (которые, например, могут обеспечить полную эффективность в концентрациях,
 которые равны или по существу ниже концентрации, обеспечивающей насыщение
 45 рецепторов), антитело анти-CD73 представляет собой чистый блокатор (отсутствие
 значительной активности, опосредуемой $Fc\gamma$ -рецепторами) и его вводят в количестве,
 эффективном для нейтрализации ферментативной активности CD73 в течение желаемого
 периода времени, например, 1 недели, 2 недель, месяца, до следующего введения антитела

анти-CD73.

В одном из вариантов реализации антитело анти-CD73 вводят в количестве, эффективном для достижения и/или поддержания (например, в течение 1, 2, 3, 4 недель и/или до следующего введения антитела анти-CD73) у индивидуума концентрации в крови, составляющей по меньшей мере EC_{50} , возможно EC_{70} , возможно по существу EC_{100} , для ингибирования CD73-опосредуемого катаболизма АМФ до аденозина (например, определяемого путем оценки нейтрализации 5'-эктонуклеотидазной активности в клетках MDA-MB-231 путем количественного определения гидролиза АМФ до аденозина, см. пример 5). В одном из вариантов реализации количество антитела анти-CD73 представляет собой количество, эффективное для достижения (или поддержания) EC_{50} , возможно EC_{70} , возможно по существу EC_{100} для ингибирования CD73-опосредуемого катаболизма АМФ до аденозина в экстраваскулярной ткани индивидуума.

В одном из вариантов реализации предложен способ лечения или предотвращения рака у индивидуума, при этом указанный способ включает введение индивидууму, страдающему заболеванием, антитела анти-CD73 в количестве, которое позволяет достичь или поддерживает в течение конкретного периода времени концентрацию в кровообращении, возможно в представляющей интерес экстраваскулярной ткани (например, опухоли или микроокружении опухоли), которая выше концентрации, необходимой для 50%, 70% или полного (например, 90%) насыщения рецепторов CD73-экспрессирующих клеток в кровообращении (например, по оценке в моноклеарных клетках периферической крови (РВМС)). Возможно, достигаемая концентрация по меньшей мере на 20%, 50% или 100% выше концентрации, необходимой для указанного насыщения рецепторов.

В одном из вариантов реализации предложен способ лечения или предотвращения рака у индивидуума, при этом указанный способ включает введение указанному индивидууму антитела анти-CD73 в количестве, которое позволяет достичь или поддерживает в течение конкретного периода времени концентрацию в кровообращении, возможно в представляющей интерес экстраваскулярной ткани (например, опухоли или микроокружении опухоли), которая выше EC_{50} , возможно EC_{70} или возможно EC_{100} для связывания с CD73-экспрессирующими клетками (например, по оценке путем титрования антитела анти-CD73 на CD73-экспрессирующих клетках, например, клетках MDA-MB-231, как в примере 4). Возможно, достигаемая концентрация по меньшей мере на 20%, 50% или 100% выше EC_{50} , возможно EC_{70} или возможно EC_{100} для связывания с CD73-экспрессирующими клетками.

В любом варианте реализации антитело может, например, демонстрировать EC_{50} , возможно EC_{70} или возможно EC_{100} для связывания с CD73-экспрессирующими клетками в РВМС человека, составляющую 0,5-100 нг/мл, возможно 1-100 нг/мл, возможно 30-100 нг/мл, например, примерно 30-90 нг/мл (например, по оценке путем титрования антитела анти-CD73 на CD73-экспрессирующих клетках, например, клетках MDA-MB-231, как в примере 4). Например, EC_{50} может составлять примерно 30, 37, 39, 43, 57, 58, 61, 62, 90, 95, 143 нг/мл.

EC_{50} для нейтрализации ферментативной активности CD73 антителом анти-CD73 может составлять, например, от примерно 0,01 мкг/мл до 1 мкг/мл, возможно от 0,1 мкг/мл до 10 мкг/мл, возможно от 0,1 мкг/мл до 1 мкг/мл. Например, EC_{50} может составлять примерно 0,1 мкг/мл, примерно 0,2 мкг/мл или примерно 0,3 мкг/мл. Таким

образом, количество данного антитела анти-CD73, например, вводят для достижения и/или поддержания концентрации в крови, составляющей по меньшей мере 0,1 мкг/мл, возможно по меньшей мере 0,2 мкг/мл, возможно по меньшей мере 1 мкг/мл или возможно по меньшей мере 2 мкг/мл.

5 Когда прицельно воздействуют на ткани за пределами сосудистой сети (окружение опухоли, например, при лечении солидных опухолей), полагают, что, как правило, требуется приблизительно в 10 раз более высокая доза по сравнению с дозой, обеспечивающей соответствующую концентрацию в кровообращении. Ожидают, что
10 концентрации в кровообращении (крови), составляющей примерно 1 мкг/мл, 2 мкг/мл, 10 мкг/мл или 20 мкг/мл, позволяет достичь (и/или поддерживает) концентрации в экстравазкулярной ткани (например, ткани опухоли), составляющей примерно 0,1 мкг/мл, 0,2 мкг/мл, 1 мкг/мл, 2 мкг/мл соответственно.

В одном из вариантов реализации антитело анти-CD73 вводят, например, в количестве
15 для достижения и/или поддержания концентрации в ткани (например, окружении опухоли), составляющей по меньшей мере 0,1 мкг/мл, возможно по меньшей мере 0,2 мкг/мл, возможно по меньшей мере 1 мкг/мл или возможно по меньшей мере 2 мкг/мл. Указанное антитело можно, например, вводить в количестве для достижения и/или
20 поддержания концентрации в крови, составляющей по меньшей мере примерно 1 мкг/мл, 2 мкг/мл, 10 мкг/мл или 20 мкг/мл, например, 1-100 мкг/мл, 10-100 мкг/мл, 1-50 мкг/мл, 1-20 мкг/мл или 1-10 мкг/мл. Вводимое количество можно регулировать для обеспечения поддержания желаемой концентрации на протяжении конкретного периода времени после введения (например, 1, 2, 3, 4 недель и т.д.).

В некоторых вариантах реализации вводят количество антитела анти-CD73 для
25 получения концентрации в крови (сыворотке) или экстравазкулярной ткани (например, окружении опухоли), которая соответствует по меньшей мере ЕС₇₀ или ЕС₁₀₀ для нейтрализации ферментативной активности CD73. Указанное антитело можно, например, вводить в количестве для достижения и/или поддержания концентрации в крови или
30 экстравазкулярной ткани (например, окружении опухоли), составляющей по меньшей мере примерно 1 мкг/мл, 2 мкг/мл, 10 мкг/мл или 20 мкг/мл.

ЕС₅₀, ЕС₇₀ или ЕС₁₀₀ можно оценить, например, в клеточном анализе на предмет
нейтрализации ферментативной активности CD73, как показано в разделе «Примеры» в настоящем описании (например, нейтрализации 5'-эктонуклеотидазной активности в
35 клетках MDA-MB-231 путем количественного определения гидролиза АМФ до аденозина, см. пример 5). «ЕС₅₀» применительно к нейтрализации ферментативной активности CD73 относится к эффективной концентрации антитела анти-CD73, обеспечивающей 50% от максимального ответа или эффекта в отношении нейтрализации ферментативной активности. «ЕС₇₀» применительно к нейтрализации ферментативной
40 активности CD73 относится к эффективной концентрации антитела анти-CD73, обеспечивающей 70% от максимального ответа или эффекта. «ЕС₁₀₀» применительно к нейтрализации ферментативной активности CD73 относится к эффективной концентрации антитела анти-CD73, обеспечивающей по существу максимальный ответ или эффект в отношении такой нейтрализации ферментативной активности.

45 В некоторых вариантах реализации, в частности для лечения солидных опухолей, предполагают, что достигаемая концентрация приводит к концентрации в тканях (за пределами сосудистой сети, например, в опухоли или окружении опухоли), которая соответствует по меньшей мере ЕС₅₀ для нейтрализации ферментативной активности,

возможно примерно или по меньшей мере примерно ЕС₁₀₀.

В одном из вариантов реализации количество антитела анти-CD73 составляет от 1 до 20 мг/кг массы тела. В одном из вариантов реализации указанное количество вводят индивидууму каждую неделю, каждые две недели, каждый месяц или каждые два месяца.

В одном из вариантов реализации предложен способ лечения представляющего собой человека индивидуума, страдающего раком, включающий введение указанному индивидууму эффективного количества антитела анти-CD73 согласно настоящему изобретению в течение по меньшей мере одного цикла введения (возможно по меньшей мере 2, 3, 4 или более циклов введения), при этом указанный цикл представляет собой период, составляющий восемь недель или меньше, при этом для каждого из указанного по меньшей мере одного цикла одну, две, три или четыре дозы антитела анти-CD73 вводят в дозе 1-20 мг/кг массы тела. В одном из вариантов реализации антитело анти-CD73 вводят путем внутривенной инфузии.

Подходящие лечебные протоколы для лечения человека включают, например, введение пациенту количества, описанного в настоящем документе, антитела анти-CD73, при этом способ включает по меньшей мере один цикл введения, в котором вводят по меньшей мере одну дозу антитела анти-CD73. Возможно, вводят по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 доз антитела анти-CD73. В одном из вариантов реализации цикл введения составляет от 2 недель до 8 недель.

В одном из вариантов реализации предложен способ лечения или предотвращения заболевания (например, рака, солидной опухоли, гематологической опухоли) у индивидуума, при этом указанный способ включает введение индивидууму, страдающему заболеванием (например, раком, солидной опухолью), антитела анти-CD73, которое нейтрализует ферментативную активность CD73, в течение по меньшей мере одного цикла введения, при этом указанный цикл введения включает по меньшей мере первое и второе (и возможно 3-е, 4-е, 5-е, 6-е, 7-е и/или 8-е или дальнейшее) введение антитела анти-CD73, при этом антитело анти-CD73 вводят в количестве, эффективном для достижения или для поддержания между двумя последовательными введениями концентрации антитела анти-CD73 в крови (сыворотке), составляющей по меньшей мере 0,1 мкг/мл, возможно по меньшей мере 0,2 мкг/мл, возможно по меньшей мере 1 мкг/мл или возможно по меньшей мере 2 мкг/мл (например, для лечения гематологической опухоли), или возможно по меньшей мере примерно 1 мкг/мл, 2 мкг/мл, 10 мкг/мл или 20 мкг/мл, например, 1-100 мкг/мл, 1-50 мкг/мл, 1-20 мкг/мл или 1-10 мкг/мл (например, для лечения солидной опухоли, для лечения гематологической опухоли). В одном из вариантов реализации поддерживают указанную постоянную концентрацию в крови, при этом концентрация в крови по существу не падает ниже указанной концентрации в крови на протяжении конкретного периода времени (например, между двумя введениями антитела, в течение нескольких недель, 1 недели, 2 недель, 3 недель, 4 недель), т.е. хотя концентрация в крови может варьироваться в течение конкретного периода времени, указанная поддерживаемая концентрация в крови представляет собой минимальную концентрацию. В одном из вариантов реализации терапевтически активное количество антитела анти-CD73 представляет собой количество указанного антитела, способное обеспечить (по меньшей мере) концентрацию ЕС₅₀, возможно концентрацию ЕС₇₀, возможно концентрацию ЕС₁₀₀ в крови и/или в ткани для нейтрализации ферментативной активности CD73 в течение периода, составляющего по меньшей мере примерно 1 неделю, примерно 2 недели или примерно один месяц, после введения антитела.

До или во время курса лечения антителом анти-CD73 согласно настоящему

изобретению присутствие или уровни, или CD73-экспрессирующие клетки, уровни аденозина, АДФ и/или АМФ можно оценивать внутри и/или рядом с опухолью пациента для оценки того, подходит ли указанный пациент для лечения (например, для предсказания вероятности ответа пациентом на лечение). Увеличение присутствия или

5 уровней, или CD73-экспрессирующих клеток, уровней аденозина, АДФ и/или АМФ может указывать на то, что индивидуум подходит для лечения (например, вероятно, на него будет оказан полезный эффект) антителом анти-CD73 согласно настоящему изобретению (включая, но не ограничиваясь им, антитело, ингибирующее CD73, связанный с субстратом).

10 До или во время курса лечения антителом анти-CD73 согласно настоящему изобретению уровни аденозина, АДФ и/или АМФ можно также оценивать внутри и/или рядом с опухолью пациента для оценки того, оказывает ли лечение антителом анти-CD73 полезный эффект для указанного пациента. Снижение уровней аденозина, АДФ и/или АМФ после введения (или дозирования антитела) по сравнению с уровнями до

15 лечения (или дозирования антитела) может указывать на то, что лечение антителом анти-CD73 согласно настоящему изобретению (включая, но не ограничиваясь им, антитело, ингибирующее CD73, связанный с субстратом) оказывает полезный эффект для индивидуума. Возможно, в случае, если лечение антителом анти-CD73 оказывает полезный эффект для пациента, способы могут дополнительно включать введение

20 указанному пациенту дополнительной дозы антитела анти-CD73 (например, продолжение лечения).

В одном из вариантов реализации оценка уровней аденозина, АДФ и/или АМФ внутри и/или рядом с опухолью пациента включает получение от указанного пациента биологического образца ткани человека, выбранной из группы, состоящей из ткани от

25 страдающего раком пациента, например, раковой ткани, ткани, близкой к раковой опухоли или на периферии раковой опухоли, ткани, прилегающей к раковой опухоли, прилегающей неопухолевой ткани или здоровой прилегающей ткани, и детектирование уровней аденозина, АДФ и/или АМФ в указанной ткани. Уровни у пациента могут представлять собой сравнение уровня с эталонным уровнем, например,

30 соответствующим здоровому индивидууму.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения предложен способ лечения или предотвращения рака у нуждающегося в этом индивидуума, при этом указанный способ включает:

а) детектирование CD73-экспрессирующих клеток (или аденозина, АДФ и/или АМФ)

35 в окружении опухоли, возможно внутри опухоли и/или в прилегающей ткани, и

б) при определении, что окружение опухоли содержит CD73-экспрессирующие клетки (или аденозин, АДФ и/или АМФ), возможно на уровне, повышенном по сравнению с эталонным уровнем, введение указанному индивидууму антитела анти-CD73. Возможно, детектирование CD73-экспрессирующих клеток (или аденозина, АДФ и/или АМФ) в

40 окружении опухоли включает получение от индивидуума биологического образца, содержащего раковую ткань и/или ткань, близкую к раковой опухоли или на периферии раковой опухоли (например, ткань, прилегающую к раковой опухоли, прилегающую неопухолевую ткань или здоровую прилегающую ткань), и детектирование уровней CD73-экспрессирующих клеток (или аденозина, АДФ и/или АМФ). CD73-

45 экспрессирующие клетки могут включать, например, клетки опухоли, CD4 Т-клетки, CD8 Т-клетки, В-клетки.

Пациента, страдающего раком, можно лечить антителом анти-CD73 с или без предварительного этапа детектирования для оценки экспрессии CD73 на клетках в

микроокружении опухоли (например, на клетках опухоли, CD4 Т-клетках, CD8 Т-клетках, В-клетках). Возможно, способы лечения могут включать этап детектирования нуклеиновой кислоты или полипептида CD73 в биологическом образце опухоли от индивидуума (например, в раковой ткани, ткани, близкой к раковой опухоли или на периферии раковой опухоли, ткани, прилегающей к раковой опухоли, прилегающей неопухолевой ткани или здоровой прилегающей ткани). Определение того, что биологический образец содержит клетки, экспрессирующие CD73 (например, в значительной степени экспрессирующие; экспрессирующие CD73 на высоком уровне, высокая интенсивность окрашивания антителом анти-CD73 по сравнению с эталоном), указывает на то, что у пациента рак, лечение которого агентом, ингибирующим CD73, может оказать значительный полезный эффект. В одном из вариантов реализации способ включает определение уровня экспрессии нуклеиновой кислоты или полипептида CD73 в биологическом образце и сравнение указанного уровня с эталонным уровнем, соответствующим здоровому индивидууму. Определение того, что биологический образец содержит клетки, экспрессирующие нуклеиновую кислоту или полипептид CD73 на уровне, который повышен по сравнению с эталонным уровнем, указывает на то, что у пациента рак, который можно лечить антителом анти-CD73 согласно настоящему изобретению. Возможно, детектирование полипептида CD73 в биологическом образце включает детектирование полипептида CD73, экспрессируемого на поверхности злокачественной клетки, CD4 Т-клетки, CD8 Т-клетки, В-клетки. В одном из вариантов реализации определение того, что биологический образец содержит клетки, которые в значительной степени экспрессируют нуклеиновую кислоту или полипептид CD73, указывает на то, что у пациента рак, который можно лечить антителом анти-CD73 согласно настоящему изобретению. Термин «в значительной степени экспрессируемый» применительно к полипептиду CD73 означает, что указанный полипептид CD73 экспрессируется в значительном количестве клеток, взятых у конкретного пациента. В то время как определение термина «в значительной степени экспрессируемый» не связано точным процентным значением, в некоторых примерах рецептор, про которого говорят, что он «в значительной степени экспрессируется», будет присутствовать по меньшей мере на 10%, 20% 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или более клеток опухоли, взятых у пациента.

Определение того, страдает ли индивидуум раком, характеризующимся клетками, которые экспрессируют полипептид CD73, может, например, включать получение биологического образца (например, путем проведения биопсии) от индивидуума, содержащего клетки из окружения раковой опухоли (например, опухоли или ткани, прилегающей к опухоли), приведение указанных клеток в контакт с антителом, которое связывает полипептид CD73, и детектирование, экспрессируют ли указанные клетки CD73 на своей поверхности. Возможно, определение того, если ли у индивидуума клетки, экспрессирующие CD73, включает проведение иммуногистохимического анализа.

В одном из вариантов реализации настоящего изобретения предложен способ лечения или предотвращения рака у нуждающегося в этом индивидуума, при этом указанный способ включает:

- а) определение CD73-полипептидного статуса клеток в окружении опухоли, возможно внутри опухоли и/или в прилегающей ткани, и
- б) при определении, что окружение опухоли содержит клетки, экспрессирующие полипептид CD73, возможно на уровне, повышенном по сравнению с эталонным уровнем, введение указанному индивидууму антитела анти-CD73. В одном из вариантов реализации указанные клетки представляют собой клетки опухоли. В другом варианте

реализации клетки в окружении опухоли, внутри опухоли и/или в прилегающей ткани представляют собой незлокачественные иммунные клетки, например, Т-клетки.

Возможно, определение CD73-полипептидного статуса в окружении опухоли включает получение от индивидуума биологического образца, содержащего раковую ткань и/или ткань, близкую к раковой опухоли или на периферии раковой опухоли (например, ткань, прилегающую к раковой опухоли, прилегающую неопухолевую ткань или здоровую прилегающую ткань), приведение указанных клеток в контакт с антителом, которое связывает полипептид CD73, и детектирование клеток, экспрессирующих CD73.

Композиции антител можно применять в виде монотерапии или комбинированного лечения совместно с одним или более другими терапевтическими агентами, в том числе агентами, обычно применяемыми для конкретной терапевтической цели, с которой вводят антитело. Дополнительный терапевтический агент, как правило, будут вводить в количествах и в соответствии со схемами лечения, обычно используемыми для данного агента в монотерапии конкретного вылечиваемого заболевания или состояния. Такие терапевтические агенты включают, но не ограничиваются ими, противораковые агенты и химиотерапевтические агенты.

В одном из вариантов реализации второй или дополнительный второй терапевтический агент представляет собой антитело или другой содержащий Fc-домен белок, способный индуцировать ADCC в отношении клетки, с которой он связан, например, через CD16, экспрессируемый природной клеткой-киллером (NK). Как правило, такое антитело или другой белок будет содержать домен, который связывается с представляющим интерес антигеном, например, антигеном, присутствующим на клетке опухоли (опухолевым антигеном), и Fc-домен или его часть, и будет демонстрировать связывание с указанным антигеном через антигенсвязывающий домен и с Fcγ-рецепторами (например, CD 16) через Fc-домен. В одном из вариантов реализации его ADCC-активность будет опосредована по меньшей мере частично CD 16. В одном из вариантов реализации дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело, содержащее природный или модифицированный Fc-домен человека, например, Fc-домен из антитела IgG1 или IgG3 человека. Термин «антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность» или «ADCC» является термином, хорошо известным в данной области техники, и относится к опосредуемой клетками реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы (FcR), распознают связанное антитело на целевой клетке и затем вызывают лизис указанной целевой клетки. Неспецифические цитотоксические клетки, которые опосредуют ADCC, включают природные клетки-киллеры (NK), макрофаги, моноциты, нейтрофилы и эозинофилы. Термин «ADCC-индуцирующее антитело» относится к антителу, демонстрирующему ADCC, измеряемую путем анализа (анализов), известного специалисту в данной области техники. Такая активность, как правило, характеризуется связыванием Fc-области с различными FcR. Не являясь связанными рамками какого-либо конкретного механизма, для специалиста в данной области техники очевидно, что способность антитела демонстрировать ADCC может быть обусловлена, например, его подклассом (таким как IgG1 или IgG3), мутациями, введенными в Fc-область, или обусловлена модификациями углеводных профилей в Fc-области указанного антитела.

В одном из вариантов реализации второй или дополнительный второй терапевтический агент представляет собой агент (например, антитело), который ингибирует CTLA-4 или ось PD-1 (т.е. ингибирует PD-1 или PD-L1). Антитела, которые связывают CTLA-4, PD1 или PD-L1, можно применять, например, в типичных дозах и/или с частотой, с которой такие агенты применяют в виде монотерапии, например, как

описано ниже.

PD-1 является ингибирующим членом C028-семейства рецепторов, также включающего CD28, CTLA-4, ICOS и BTLA. PD-1 экспрессируется на активированных В-клетках, Т-клетках и миелоидных клетках (Okazaki et al. (2002) Curr. Opin. Immunol. 14: 391779-82; Bennett et al. (2003) J Immunol 170:711-8). Были идентифицированы два лиганда для PD-1: PD-L1 и PD-L2, которые, как было показано, понижающе регулируют активацию Т-клеток после связывания с PD-1 (Freeman et al. (2000) J Exp Med 192:1027-34; Latchman et al. (2001) Nat Immunol 2:261-8; Carter et al. (2002) Eur J Immunol 32:634-43). PD-L1 в избытке присутствует в различных раковых опухолях человека (Dong et al. (2002) Nat. Med. 8:787-9). Взаимодействие между PD-1 и PD-L1 приводит к уменьшению количества лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, снижению пролиферации Т-клеток, опосредуемой рецепторами, и ускользанию раковых клеток от иммунологического надзора. Иммуносупрессия может быть «отменена» путем ингибирования локального взаимодействия PD-1 с PD-L1, и данный эффект является аддитивным, когда также блокируется взаимодействие PD-1 с PD-L2. Блокада PD-1 может предпочтительно включать применение антитела, предотвращающего PD-L1-индуцируемую передачу сигнала PD-1, например, путем блокирования взаимодействия с его природным лигандом PD-L1. В соответствии с одним из аспектов указанное антитело связывает PD-1 (антитело анти-PD-1); такое антитело может блокировать взаимодействие между PD-1 и PD-L1 и/или между PD-1 и PD-L2. В соответствии с другим аспектом антитело связывает PD-L1 (антитело анти-PD-L1) и блокирует взаимодействие между PD-1 и PD-L1.

В настоящее время существуют по меньшей мере шесть агентов, блокирующих путь PD-1/PD-L1, которые присутствуют на рынке или подвергаются клинической оценке; любые из данных агентов могут подходить для применения в комбинации с антителами анти-CD73 согласно настоящему изобретению. Один из агентов представляет собой BMS-936558 (Ниволумаб/ONO)-4538, Bristol-Myers Squibb; ранее MDX-1106). Ниволумаб (торговое название Опдиво®) представляет собой одобренное FDA моноклональное IgG4-антитело анти-PD-L1 полностью человеческого происхождения, которое ингибирует связывание лиганда PD-L1 как с PD-1, так и с CD80, и описано как антитело 5C4 в WO 2006/121168, полное содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки. Для пациентов с меланомой наиболее значительный OR наблюдали в дозе 3 мг/кг, в то время как для других типов рака - в дозе 10 мг/кг. Ниволумаб обычно дозируют на уровне 10 мг/кг каждые 3 недели до прогрессирования рака.

МК-3475 (моноклональное IgG4-антитело анти-PD1 человека от Merck), также называемое ламбролизумабом или пембролизумабом (торговое название Кейтруда®), было одобрено FDA для лечения меланомы и проходит тестирование в случае других раковых опухолей. Пембролизумаб тестировали на уровне 2 мг/кг или 10 мг/кг каждые 2 или 3 недели до прогрессирования заболевания. ДНК-конструкции, кодирующие переменные области тяжелой и легкой цепей гуманизированных антител h409AII, были сданы для патентного депонирования в Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection Patent Depository, 10801 University Blvd., Манассас, Виргиния). Плазмиду, содержащую ДНК, кодирующую тяжелую цепь h409A-I 1, сдали 9 июня 2008 года и идентифицировали как 081469_SPD-H, и плазмиду, содержащую ДНК, кодирующую легкую цепь h409AI 1, сдали 9 июня 2008 года и идентифицировали как 0801470_SPD-L-I 1.

MPDL3280A/RG7446 (анти-PD-L1 от Roche/Genentech) представляет собой моноклональное антитело анти-PD-L1 человека, содержащее генно-инженерный Fc-домен, предназначенный для оптимизации эффективности и безопасности за счет

минимизации связывания FcγR и последующей антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Дозы MPDL3280A ≤1,10,15 и 25 мг/кг вводили каждые 3 недели на протяжении до 1 года. В исследовании 3 фазы MPDL3280A вводили в количестве 1200 мг путем внутривенной инфузии каждые три недели при НМРЛ.

AMP-224 (Amplimmune и GSK) представляет собой иммуноадгезин, содержащий внеклеточный домен PD-L2, слитый с Fc-доменом.

Пидлизумаб (pidlizumab) (CT-011; CureTech) (гуманизированное моноклональное IgG1-антитело анти-PD1 от CureTech/Teva), Пидлизумаб (CT-011; CureTech) (см., например, WO 2009/101611). Тридцать пациентов с ритуксимаб-чувствительной рецидивной фолликулярной лимфомой (FL) лечили 3 мг/кг CT-011 внутривенно каждые 4 недели на протяжении 4 инфузий в комбинации с ритуксимабом, дозируемым на уровне 375 мг/м² каждую неделю в течение 4 недель, начиная через 2 недели после первой инфузии CT-011.

Другие известные антитела к PD-1 и другие ингибиторы PD-1 включают AMP-224 (слитый белок B7-DC/IgG1, лицензия принадлежит GSK), AMP-514, описанный в WO 2012/145493, антитело MEDI-4736 (анти-PD-L1, разработанное AstraZeneca/Medimmune), описанное в WO 2011/066389 и US 2013/034559, антитело YW243.55.S70 (анти-PD-L1), описанное в WO 2010/077634, MDX-1105, также известное как BMS-936559, представляет собой антитело анти-PD-L1, разработанное Bristol-Myers Squibb, описанное в WO 2007/005874, и антитела и ингибиторы, описанные в WO 2006/121168, WO 2009/014708, WO 2009/114335 и WO 2013/019906, содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки. Другие примеры антител анти-PD1 описаны в WO 2015/085847 Shanghai Hengrui Pharmaceutical Co. Ltd.), например, антитела, содержащие CDR1, 2 и 3 переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и/или SEQ ID NO: 8 соответственно, и CDR1, 2 и 3 переменного домена тяжелой цепи антитела SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 соответственно, при этом SEQ ID NO представляют собой нумерацию в соответствии с WO 2015/085847, содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки. Также можно применять антитела, которые конкурируют с любым из данных антител за связывание с PD-1 или PD-L1.

CTLA-4 (ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами белок 4), также известный как CD152, является еще одним ингибирующим членом CD28-семейства рецепторов и экспрессируется на Т-клетках. Антитела, которые связывают и ингибируют CTLA-4, известны в данной области техники. В одном из примеров указанное антитело представляет собой ипилимумаб (торговое название Ервой®, Bristol-Myers Squibb), IgG-антитело человека. Типичная схема введения для антитела Ервой представляет собой 3 мг/кг внутривенно в течение 90 минут каждые три недели. В одном из примеров антитело, применяемое в комбинации с антителами анти-CD73 согласно настоящему изобретению, представляет собой антитело, которое конкурирует с ипилимумабом за связывание с CTLA-4.

В способах лечения CD73-связывающее соединение и второй терапевтический агент можно вводить по отдельности, совместно или последовательно, или в коктейле. В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающее соединение вводят перед введением второго терапевтического агента. Например, CD73-связывающее соединение можно вводить приблизительно за 0-30 дней до введения второго терапевтического агента. В некоторых вариантах реализации CD73-связывающее соединение вводят за примерно 30 минут-примерно 2 недели, примерно 30 минут-примерно 1 неделю, примерно 1 час-примерно 2 часа, примерно 2 часа-примерно 4 часа, примерно 4 часа-примерно 6 часов, примерно 6 часов-примерно 8 часов, примерно 8 часов-примерно 1

день или примерно 1-5 дней до введения второго терапевтического агента. В некоторых вариантах реализации CD73-связывающее соединение вводят одновременно с введением терапевтических агентов. В некоторых вариантах реализации CD73-связывающее соединение вводят после введения второго терапевтического агента. Например, CD73-связывающее соединение можно вводить приблизительно через 0-30 дней после введения второго терапевтического агента. В некоторых вариантах реализации CD73-связывающее соединение вводят через примерно 30 минут-примерно 2 недели, примерно 30 минут-примерно 1 неделю, примерно 1 час-примерно 2 часа, примерно 2 часа-примерно 4 часа, примерно 4 часа-примерно 6 часов, примерно 6 часов-примерно 8 часов, примерно 8 часов-примерно 1 день или примерно 1-5 дней после введения второго терапевтического агента.

Примеры

Пример 1: получение новых антител анти-huCD73

Для получения антител к CD73 человека мышей Balb/c иммунизировали рекомбинантным белком внеклеточного домена рекомбинантного CD73-His человека (клонированным и полученным в Innate Pharma, как описано ниже). Мыши получали одну первичную иммунизацию эмульсией 50 мкг белка CD73 и полного адъюванта Фрейнда интраперитонеально, вторую иммунизацию эмульсией 50 мкг белка CD73 и неполного адъюванта Фрейнда интраперитонеально и, наконец, буст-иммунизацию 10 мкг белка CD73 внутривенно. Через три дня после буст-иммунизации иммунные клетки селезенки подвергали слиянию с иммортализованными В-клетками X63.Ag8.653 и культивировали в присутствии облученных клеток селезенки. Гибридомы высевали в полутвердую среду, содержащую метилцеллюлозу, и растущие клоны собирали с использованием аппарата clonепix 2 (Molecular Devices).

Первичный скрининг: надосадочную жидкость (SN) растущих клонов тестировали в первичном скрининге путем проточной цитометрии с использованием родительских и huCD73-, суноCD73- или моCD73-экспрессирующих рекомбинантных линий клеток-хозяев. HuCD73- и суноCD73-экспрессирующие рекомбинантные клетки-хозяева окрашивали 0,35 мкМ и 0,035 мкМ CFSE соответственно. Для скрининга путем проточной цитометрии все клетки смешивали в одинаковом количестве и присутствие реагирующих антител в надосадочных жидкостях обнаруживали посредством поликлонального антитела (pAb) козы к Ig мыши, меченного PE. Обнаруживали, что 47 антител связывали CD73 как человека, так и яванского макака. Все антитела, которые связывали huCD73 и суноCD73, получали в виде химерных IgG1-антител человека с мутацией N297Q (нумерация ЕС Kabat) в тяжелой цепи, обуславливающей отсутствие N-связанного гликозилирования и по существу отсутствие связывания с Fcγ-рецепторами.

Вторичный скрининг: данный информативный скрининг (см. пример 2) осуществляли с использованием рекомбинантного белка CD73 для оценки блокирующих ферментативную активность CD73 свойств 47 отобранных антител. 35/47 антител, по-видимому, полностью или частично блокировали активность CD73.

Клонирование, получение и очистка рекомбинантного huCD73

Молекулярная биология

Белок huCD73 клонировали из кДНК M1APACA-2 с использованием следующих праймеров: TACGACTCACAAGCTTGCCGCCACCATGTGTCCCCGAGCCGCGCG (SEQ ID NO: 45) (прямой) и CCGCCCCGACTCTAGAtcaGTGATGGTGTGATGGTGcttgatccgaccttcaactg (SEQ ID NO: 46) (обратный). Затем очищенный продукт ПЦР клонировали в вектор экспрессии с

использованием системы клонирования InFusion. К С-концевой части белка присоединяли 6хHis-метку для этапа очистки.

Аминокислотная последовательность клонированного huCD73:

5 M C P R A A R A P A T L L L A L G A V L W P A A G A W E L T I L H T N D V H S
 R L E Q T S E D S S K C V N A S R C M G G V A R L F T K V Q Q I R R A E P N V L L L D
 A G D Q Y Q G T I W F T V Y K G A E V A H F M N A L R Y D A M A L G N H E F D N G
 V E G L I E P L L K E A K F P I L S A N I K A K G P L A S Q I S G L Y L P Y K V L P V G D
 10 E V V G I V G Y T S K E T P F L S N P G T N L V F E D E I T A L Q P E V D K L K T L N V
 N K I I A L G H S G F E M D K L I A Q K V R G V D V V V G G H S N T F L Y T G N P P S
 K E V P A G K Y P F I V T S D D G R K V P V V Q A Y A F G K Y L G Y L K I E F D E R G
 N V I S S H G N P I L L N S S I P E D P S I K A D I N K W R I K L D N Y S T Q E L G K T I
 15 V Y L D G S S Q S C R F R E C N M G N L I C D A M I N N N L R H T D E M F W N H V S
 M C I L N G G G I R S P I D E R N N G T I T W E N L A A V L P F G G T F D L V Q L K G S
 T L K K A F E H S V H R Y G Q S T G E F L Q V G G I H V V Y D L S R K P G D R V V K L
 D V L C T K C R V P S Y D P L K M D E V Y K V I L P N F L A N G G D G F Q M I K D E L
 20 L R H D S G D Q D I N V V S T Y I S K M K V I Y P A V E G R I K H H H H H H (SEQ ID
 NO: 2)

Экспрессия и очистка белков huCD73

После подтверждения клонированной последовательности клетки подвергали
 25 нуклеофекции, и затем полученный пул субклонировали с получением клона клеток,
 продуцирующего белок huCD73. Надосадочную жидкость клона huCD73,
 культивированного в роллерной установке, собирали и очищали с использованием
 колонки Ni-NTA, и элюировали с использованием 250 мМ имидазола. Затем очищенные
 белки загружали на колонку S200 для эксклюзионной хроматографии. Очищенный
 30 белок, соответствующий димеру, получали в буфере 20 мМ Трис, pH 7,5, 120 мМ NaCl
 и 4 мМ CaCl₂ для анализов активности фермента, наряду с добавлением в буферную
 смесь 20% глицерина.

Пример 2: Оценка блокады растворимого CD73

Способность антител анти-CD73 блокировать ферментативную активность CD73
 35 оценивали, как описано в Sachsenmeier et al. (J Biomol Screening, 2012). Вкратце, 500 нг/
 мл рекомбинантного CD73-His человека инкубировали в белых 96-луночных
 плоскодонных микропланшетах в присутствии диапазона доз анти-CD73 или антител
 изотипического контроля. Планшеты инкубировали в течение 1 часа при 37°C. 12,5
 мкМ АТФ и 125 мкМ АМФ добавляли в каждую лунку и планшеты инкубировали при
 40 37°C в течение дополнительных 30 минут. Содержащий люциферазу/люциферин Cell
 Titer Glo (Promega) добавляли в лунки, планшеты инкубировали в течение 5 минут при
 комнатной температуре в темноте и излучаемый свет измеряли с использованием
 устройства Enspire (Perkin Elmer).

Известно, что избыток АМФ блокирует АТФ-зависимую активность люциферазы.
 45 Добавление CD73, который расщепляет АМФ на аденозин + неорганический фосфат,
 восстанавливает активность люциферазы и излучение света. Таким образом, антитела,
 блокирующие ферментативную активность CD73, будут уменьшать излучение света.

Процент ингибирования фермента оценивают, как описано ниже:

- Условия:

- АТФ+АМФ: максимальное ингибирование люциферазы (100%)
- АТФ+АМФ+CD73: отсутствие ингибирования люциферазы (0%)

- Формула:

$$\text{Остаточная активность CD73: } \frac{(\text{CD73+Ab+АТФ+АМФ})-(\text{АТФ+АМФ})}{(\text{CD73+АТФ+АМФ})-(\text{АТФ+АМФ})} * 100$$

Обнаруживали, что все 35 антител, полученные в примере 1, а также эталонные моноклональные антитела 7G2, 4G4 и 1E9 ингибировали активность CD73 при использовании данных условий эксперимента.

С учетом неоднозначных результатов, сообщаемых для эталонных антител, авторы настоящего изобретения рассматривали, может ли блокада CD73 являться следствием перекрестного связывания димеров CD73 двухвалентными антителами, а не истинной блокады центра фермента. То есть, антитела могут вызывать образование олигомерных комплексов димеров CD73, поскольку двухвалентно связывающиеся моноклональные антитела могут связываться с двумя различными гомодимерами CD73, в свою очередь приводя к более крупным белковым комплексам. Затем авторы настоящего изобретения исследовали данную возможность путем проведения блокирующих анализов в высоких соотношениях антитело:димеры CD73. В данных условиях моноклональные антитела присутствуют в большом избытке, и может происходить индукция образования олигомерных комплексов, что позволяет наблюдать истинную функциональную блокаду CD73. В данных условиях практически все антитела, в том числе эталонные моноклональные антитела 4G4 и 1E9, не ингибировали ферментативную активность CD73.

Антитела 11E1, 8C7, 3C12 и 6E1 функционально блокировали CD73 во всех тестируемых концентрациях. Типичные результаты представлены на фиг. 1 для моноклональных антител 11E1, 8C7 и 6E1. Затем обнаруживали, что другое антитело (результаты не представлены) обладает низкой аффинностью к CD73, экспрессируемому на поверхности клеток, таким образом возможно представляющему эпитоп, который не подходит для связывания с высокой аффинностью с CD73 клеточной поверхности. Также тестировали доступные эталонные антитела анти-CD73, описанные в последних публикациях: 7G2, 4G4 и 1E9 оценивали на предмет блокады CD73. Результаты (см. фиг. 1) показали, что 7G2 блокировало CD73, тогда как 4G4 и 1E9 не блокировали активность CD73, поскольку остаточная ферментативная активность возвращалась примерно к начальному уровню или отрицательному контролю. Также тестировали антитело AD2 и обнаруживали, что оно не блокировало активность CD73 в любой концентрации. 4G4 и 1E9, таким образом, представляют класс антител, которые неспецифично ингибируют CD73 в данном анализе, возможно, путем вызова олигомеризации в растворе. Таким образом, антитела 7G2, 11E1, 8C7, 3C12 и 6E1 функционально блокировали CD73 в данном анализе. Значения EC₅₀ для блокады CD73 представлены в таблице ниже.

Ab	EC50 (мкг/мл)
1E11	0,41
6E1	0,33
8C7	1,29
3C12	0,41

Пример 3: титрование антител с использованием рекомбинантного белка CD73 путем ELISA

Антитела, которые функционально блокировали растворимый рекомбинантный CD73, более полно характеризовали на предмет связывания с растворимым рекомбинантным CD73 человека.

5 мкг/мл рекомбинантного белка CD73 человека (IPH, изоформа Е6) наносили на планшеты ELISA MaxiSorp (Nunc) в ФБР в течение ночи при 4°C. Планшеты промывали 5 раз в промывочном буфере (ФБР, 0,05% Твин20) и неспецифические сайты насыщали путем добавления 200 мкл/лунка буфера StartingBlock TBS (Thermo Ficher). Диапазон доз антител анти-CD73 инкубировали в течение 2 часов при 37°C. Планшеты промывали 5 раз в промывочном буфере и HRP-сопряженное вторичное антитело козы к Fc-фрагменту IgG человека или мыши (Bethyl, 1/50000) добавляли в течение 1 часа при комнатной температуре для детектирования связанных антител анти-CD73. Планшеты промывали 5 раз в промывочном буфере, и связанное вторичное антитело обнаруживали путем добавления ТМВ (субстрат HRP) и инкубации планшетов в течение от 5 до 10 минут при комнатной температуре в темноте. Ферментативную реакцию останавливали путем добавления 1М HCl и оптическую плотность (O.D.) измеряли при 450 нм. Оптическую плотность в зависимости от концентрации антитела анти-CD73 наносили на графики и рассчитывали EC₅₀ с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

Результаты представлены на фиг. 2. Все антитела 11E1, 8C7, 6E1 и 7G2 связывали растворимый рекомбинантный CD73. Значения EC₅₀ для связывания представлены в таблице ниже.

Антитело	EC ₅₀ (мкг/мл)
11E1	0,012
6E1	0,014
8C7	0,009
3C12	0,014
7G2	0,037

Пример 4: титрование путем проточной цитометрии

Экспрессирующие CD73 человека, яванского макака и мыши рекомбинантные линии клеток-хозяев или аденокарциному молочной железы MDA-MB-231 человека, эндогенно экспрессирующую CD73, использовали для оценки способности антител анти-CD73 связывать CD73 человека и давать перекрестную реакцию на CD73 яванского макака и/или мыши. Клетки MDA-MB-231 доступны из ATCC (номер HTB-26). 10⁵ клеток, ресуспендированных в ФБР/0,2% BSA/0,02% NaN₃ (под названием «окрашивающий буфер»), распределяли в круглодонные 96-луночные микропланшеты. В планшеты добавляли диапазон доз антител анти-CD73 и клетки инкубировали в течение 45 минут при 4°C. Клетки промывали три раза в окрашивающем буфере путем вращения планшетов при 400 g в течение 3 минут при 4°C. PE-сопряженные вторичные антитела козы к Fc-фрагменту IgG мыши или человека (Beckman Coulter), разведенные в окрашивающем буфере, добавляли к клеткам и планшеты инкубировали в течение еще 30 минут при 4°C. Клетки промывали три раза, как описано выше, и анализировали на проточном цитометре Assuery C6, оснащенном планшет-ридером HTFC.

Срединное значение флуоресценции в зависимости от концентрации антитела наносили на графики и рассчитывали EC₅₀ с использованием программы GraphPad Prism.

Результаты представлены на фиг. 3 для новых моноклональных антител 11E1, 8C7, 3C12 и 6E1, а также для эталонных моноклональных антител 7G2 и 1E9.

Моноклональные антитела 11E1, 8C7, 3C12 и 6E1 связывались с рекомбинантными клетками-хозяевами, экспрессирующими CD73 человека или яванского макака (но не мыши), с превосходной аффинностью. Однако моноклональные антитела 7G2 и 1E9 демонстрировали плохое связывание с клетками, экспрессирующими CD73 человека или яванского макака.

Эксперименты повторяли с использованием клеток аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231 человека, эндогенно экспрессирующих CD73. Моноклональные антитела 11E1, 8C7, 3C12 и 6E1 снова связывались с превосходной аффинностью, в то время как моноклональные антитела 7G2 и 1E9 демонстрировали плохое связывание. Результаты для клеток MDA-MB-231 представлены на фиг. 4.

Возможно, что 7G2 и 1E9 связываются с эпитопом на CD73, который по-разному представлен в рекомбинантном CD73 и CD73 на поверхности CD73-экспрессирующих клеток, включая, в частности, клетки опухоли человека, которые эндогенно экспрессируют CD73, что приводит к mAb, которые хорошо связываются с рекомбинантным CD73 (например, используемым для иммунизации), но не с CD73 клеточной поверхности. С другой стороны, присутствие эпитопов, связываемых 11E1, 8C7, 3C12 и 6E1, сохраняется на CD73 клеточной поверхности.

Затем эксперименты повторяли с использованием клеток аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231 человека, эндогенно экспрессирующих CD73. Клетки предварительно инкубировали при 37°C в течение 30 минут в присутствии или в отсутствии 200 мкМ аденозин-5'-(α,β -метилен)дифосфата (APCP) с последующим добавлением антител. APCP представляет собой аналог АДФ и необратимо связывается с активным центром CD73. При связывании APCP, CD73 меняет конформацию с «открытой» конформации на «закрытую» конформацию. Моноклональные антитела 11E1, 8C7, 3C12 и 6E1 связывали клетки MDA-MB-231 с хорошей аффинностью как в присутствии, так и в отсутствии APCP. В присутствии APCP EC50 была аналогична EC50, наблюдаемой в отсутствии APCP. Плато для максимального связывания 11E1, 8C7, 3C12 и 6E1 было выше в отсутствии APCP, чем в присутствии APCP, тогда как для AD2 имело место обратное. Значения EC50 представлены в таблице ниже.

Антитело	EC50 (нг/мл)	
	Среда	APCP
11E1	61,11	37,5
3C12	57,22	43,11
6E1	58,39	39,48
8C7	90,29	143,4
AD2	62,89	95,92

Пример 5: блокада активности клеточного CD73

Часть А: блокада в клетках опухоли MDA-MB-231

Оценивали способность антител анти-CD73 нейтрализовать 5'-эктонуклеотидазную ферментативную активность CD73, экспрессируемого клеточной поверхностью. Линию клеток опухоли MDA-MB-231 использовали в качестве эталонной линии клеток опухоли, экспрессирующей CD73.

Все реагенты, используемые в эксперименте, подробно описанном ниже, разводили в TBS pH 7,5 (20 mM Трис pH 7,5, 150 mM NaCl). Линию клеток MDA-MB-231 выделяли в ФБР-EDTA и дважды промывали в TBS pH 7,5. От 0,5 до 1×10^5 клеток высевали в плоскодонные 96-луночные планшеты в присутствии диапазона доз антител анти-CD73 и инкубировали в течение 2 часов при 4°C. К клеткам добавляли 200 mM АМФ в течение 30-минутного периода инкубации при 4°C (для того, чтобы избежать понижающей модуляции CD73). Затем планшеты центрифугировали и 50 мкл надосадочной жидкости переносили в плоскодонный 96-луночный культуральный планшет. Свободный фосфат, полученный в результате гидролиза АМФ до аденозина, количественно определяли с использованием набора Malachite Green Phosphate Detection Kit (R&D Systems), а затем TDS, предоставленного изготовителем. Концентрацию фосфата в зависимости от концентрации антитела анти-CD73 наносили на графики и рассчитывали EC₅₀ с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

Результаты представлены на фиг. 5. Антитела 1E11, 8C7, 3C12 и 6E1 нейтрализовали ферментативную активность клеточного CD73 со значениями EC₅₀, представленными в таблице ниже.

Ab	EC ₅₀ (мкг/мл)
1E11	0,195
6E1	0,209
8C7	0,319
3C12	0,210

Каждое антитело обеспечивало снижение ферментативной активности более чем на 75% или более чем на 80%. Антитело 7G2 в соответствии с плохим связыванием с клеточным CD73 (см. пример 4) не нейтрализовало ферментативную активность клеточного CD73. Антитело 7G2 в соответствии с ограниченной способностью связывать CD73 клеточной поверхности не нейтрализовало ферментативную активность CD73 в любой концентрации, и только вызывало небольшое частичное ингибирование в самых высоких тестируемых концентрациях.

В каждом случае для не интернализирующихся антител 1E11, 6E1, 8C7 и 3C12 значения EC₅₀, необходимые для нейтрализации ферментативной активности клеточного CD73 в клетке MDA-MB-231, были в несколько раз выше, чем значения EC₅₀, необходимые для связывания с CD73 клеточной поверхности в клетках MDA-MB-231.

Часть В: Блокада в клетках опухоли MDA-MB-231, H292 и A375

Способность антител анти-CD73 нейтрализовать 5'-эктонуклеотидазную ферментативную активность CD73, экспрессируемого клеточной поверхностью, оценивали с использованием того же анализа, что описан выше, в этот раз в нескольких экспериментах с использованием трех линий клеток опухоли, экспрессирующих CD73, параллельно: линии опухолевых клеток аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231, линии клеток рака легкого H292 (см., например, номер CRL-1848 в ATCC) и линии клеток рака меланомы A375 (см., например, номер CRL-1619 в ATCC). Эффективные концентрации, необходимые для нейтрализации (EC, например, EC₅₀, EC₇₀, EC₁₀₀), приведенные в таблице ниже, рассчитывали в виде среднего значения для повторных экспериментов с использованием трех разных типов клеток, экспрессирующих CD73.

Антитело	1E11	3C12	6E1	8C7
N=	8	8	8	2
EC ₅₀ (мкг/мл)	0,10	0,14	0,13	0,21
EC ₇₀ (мкг/мл)	0,15	0,18	0,19	0,46
EC ₁₀₀ (мкг/мл)	0,52	0,30	0,68	0,72

Пример 6: конкурентное исследование путем проточной цитометрии

Экспрессирующую CD73 человека рекомбинантную линию клеток-хозяев использовали для оценки конкуренции между кандидатами согласно настоящему изобретению и другими коммерческими антителами анти-CD73. 10⁵ клеток, ресуспендированных в окрашивающем буфере, распределяли в круглодонные 96-луночные микропланшеты. Фиксированную дозу тестируемых антител (1 мкг/мл) добавляли к клеткам в присутствии или в отсутствии диапазона доз эталонных антител мыши к CD73 человека. Клетки инкубировали в течение 45 минут при 4°C, затем промывали три раза, как описано выше. РЕ-сопряженные или вторичные антитела козы к Fc-фрагменту IgG человека (Beckman Coulter), разведенные в окрашивающем буфере, добавляли к клеткам, и планшеты инкубировали в течение еще 30 минут при 4°C. Клетки промывали три раза и анализировали на проточном цитометре Assigu С6, оснащенный планшет-ридером HTFC.

Строили график зависимости срединного значения флуоресценции от концентрации антител. Для исследования эпитопов для CD73-нейтрализующих антител способность известных антител блокировать связывание новых антител с CD73 клеточной мембраны оценивали как конкуренцию между антителами. Эталонное антитело 7G2, которое, как показано в примере 2, обладает способностью нейтрализовать CD73 без зависимости от индукции олигомеризации, но которое не связывает или не нейтрализует CD73 в клеточных анализах, тестировали совместно с новыми антителами-кандидатами. Ни одно из антител 11E1, 8C7, 3C12, 6E1 не конкурировало с 7G2 за связывание с CD73, что демонстрирует, что 7G2 связывается с участком на CD73, отличным от такого участка для новых антител.

Пример 7: понижающая регуляция CD73

Линию клеток аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231 человека, эндогенно экспрессирующую CD73, использовали для оценки способности антител анти-CD73 понижать экспрессию CD73. 10⁵ клеток, ресуспендированных в окрашивающем буфере, распределяли в плоскодонные 96-луночные микропланшеты. К клеткам добавляли 10 мкг/мл антител анти-CD73 и планшеты инкубировали при 4°C или 37°C в течение определенного времени. В T=10 минут, 30 минут, 1 час, 2 часа, 3 часа и 4 часа клетки выделяли с использованием PSB/2 mM EDTA, промывали три раза в окрашивающем буфере, как описано ранее, и инкубировали при 4°C до конца периода времени. К клеткам добавляли 10 мкг/мл сопряженного с AlexaFLuor 647 неконкурирующего антитела анти-CD73, и планшеты инкубировали в течение 30 минут при 4°C. Клетки промывали три раза и анализировали на проточном цитометре Assigu С6, оснащенный планшет-ридером HTFC.

Процент экспрессии в зависимости от времени инкубации наносили на графики.

Антитела оценивали на предмет способности вызывать понижающую модуляцию экспрессии CD73 на клетках и сравнивали с эталонными моноклональными антителами AD2, 7G2 и 1E9. Каждое из AD2, 7G2 и 1E9 вызывало понижающую модуляцию CD73, что позволяет предположить, что данные моноклональные антитела могут вызывать

кластеризацию и интернализацию CD73. AD2 вызывало уменьшение рецептора на клеточной поверхности более чем на 20%, в то время как каждое 7G2 и 1E9 вызывало уменьшение более чем на 50%. Ни одно из антител 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1 не вызывало уменьшения количества CD73 на клеточной поверхности. Результаты представлены на фиг. 6.

Пример 8: картирование эпитопов

Для определения эпитопов для антител анти-CD73 авторы настоящего изобретения получали мутанты CD73, определяемые по заменам аминокислот, доступных на поверхности молекулы CD73. Мутанты трансфицировали в клетки Нек-293Т, как показано в таблице ниже. Целевые мутации аминокислот в таблице 1 ниже показаны с использованием нумерации SEQ ID NO: 1.

Таблица 1

Мутант	Замены						
1	E46A	S49A	V52A	N53A	R56L	M58V	
2	Q70S	R73A	A74E	A107I	R109G		
3	A99S	E129A	K133A	E134N	A135S		
4	K145A	K147A	S152H	S155A	Y161S	E203A	K206A
5	P165S	D168G	N211A	E296A	R297A		
6	K179A	E196A	I197S	T198A	E224A	M225S	Q231A
7	K262A	F265S	I266A	K274Q	I292A	S302A	H304Y
8	P318A	S319A	K321A	N325A	K326Q		
9	Y345A	D347A	S349A	S352A	D399A	R401A	
10	D460A	L461S	S462A	R463A	G466W	D467N	K471A
11	D473A	K478A	R480A	S483A	D485A	K488E	E491K
12	N503A	Q509A	K512S	D513A			
13	R354A	R395A	Q444A	T446A			
14	D332A	N333A	T336A	E409A			
15	H375A	E378A	R517A	S520A	D522A		

Получение мутантов

Мутанты CD73 получали путем ПЦР. Амплифицированные последовательности анализировали на агарозном геле и очищали с использованием набора PCR Clean-Up Gel Extraction kit Macherey Nagel (номер 740609). Затем очищенные продукты ПЦР, полученные для каждого мутанта, лигировали в вектор экспрессии с помощью системы InFusion ClonTech. Векторы, содержащие мутированные последовательности, получали как Miniprep и секвенировали. После секвенирования векторы, содержащие мутированные последовательности, получали как Midiprep с использованием Plasmid Midiprep System PureYield™ Promega. Клетки НЕК293Т выращивали в среде DMEM (Invitrogen), трансфицировали векторами с использованием Липофектамина 2000 (Invitrogen) и инкубировали при 37°C в CO2-инкубаторе в течение 24 часов перед

тестированием для определения экспрессии трансгена.

Анализ связывания анти-CD73 с трансфицированными клетками НЕК293Т путем проточной цитометрии

Антитела анти-CD73 тестировали путем проточной цитометрии для определения связывания с каждым мутантом. Первый эксперимент проводили для определения антител, утрачивающих связывание с одним или несколькими мутантами в одной концентрации. Для подтверждения утраты связывания осуществляли титрование антител для антител, на связывание которых мутации CD73, по-видимому, оказывали отрицательное влияние (1 - 0,1 - 0,01 - 0,001 мкг/мл). Антитела 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1 утрачивали связывание с CD73-мутантом 3, но не с каким-либо другим мутантом. Мутант 3 содержит замены аминокислот в остатках A99, E129, K133, E134 и A135, что указывает на то, что один или более, или все указанные остатки в мутанте имеют важное значение для корового эпитопа данных антител. Антитело AD2, которое вызывает кластеризацию и интернализацию CD73, не утрачивало связывания с мутантом 3; вместо этого AD2 утрачивало связывание с мутантом 2, содержащим замены в остатках Q70, R73, A74, A107 и R109. Типичные результаты для антитела 3C12 и AD2 представлены на фиг. 7. Антитело 7G2 утрачивало связывание с мутантами 5, 6 и 7 (но не с мутантами 2 или 3).

При связывании лигандами в активном центре, представленными необратимо связывающимся аналогом АДФ, APCP, CD73 меняет конформацию с «открытой» конформации на «закрытую» конформацию. Как показано в примере 4, моноклональные антитела 11E1, 8C7, 3C12 и 6E1 связывали клеточный CD73 как в присутствии, так и в отсутствии APCP, что указывает на то, что присутствие эпитопа для данных антител сохраняется на CD73, когда активный центр занят. На фиг. 8А представлена молекулярная структура димера CD73 с мутированными аминокислотами в мутанте 2 (утрата связывания AD2), показанными (белые круги) как в «открытой», так и в «закрытой» конфигурациях. На фиг. 8 В представлена молекулярная структура димера CD73 с мутированными аминокислотами в мутанте 3 (утрата связывания 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1), показанными как в «открытой», так и в «закрытой» конфигурациях. Активный центр показан рамкой (пунктирные линии). Интересно, что на фиг. 8 В можно видеть, что когда CD73 принимает димерную форму, аминокислоты, мутированные в мутанте 3, находятся на общей стороне димера CD73, например, на или примерно на плоскости (другие эпитопы других мутантов - нет). Наконец, из сравнения аминокислот в мутанте 3 можно видеть, что данные остатки относительно отдалены от активного центра фермента (показано на фиг. 8В), что соответствует механизму действия, включающему аллостерическое ингибирование CD73.

Пример 9: аффинность связывания CD73 по данным поверхностного плазменного резонанса (SPR)

Общая методика и реагенты Biacore T100.

Измерения SPR осуществляли на устройстве Biacore T100 (Biacore GE Healthcare) при 25°C. Во всех экспериментах на Biacore HBS-EP+ (Biacore GE Healthcare) и 10 mM NaOH служили в качестве подвижного буфера и буфера регенерации соответственно. Сенсограммы анализировали с помощью программного обеспечения Biacore T100 Evaluation. Белок-А приобретали у GE Healthcare. Растворимые димерные белки CD73 человека были клонированы, получены и очищены в Innate Pharma. Иммобилизация белка-А

Белок-А иммобилизовали путем ковалентного связывания с карбоксильными группами в декстрановом слое на сенсорном чипе CM5. Поверхность чипа активировали

EDC/NHS (N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид и N-гидроксисукцинимид (Biacore GE Healthcare)). Белок-A разводили до 10 мкг/мл в буфере связывания (10 мМ ацетат, pH 5,6) и вводили до достижения соответствующего уровня иммобилизации (т.е. 2000 RU). Дезактивацию оставшихся активированных групп

осуществляли с использованием 100 мМ этаноламина, pH 8 (Biacore GE Healthcare).

Исследование аффинности

Исследование аффинности осуществляли в соответствии со стандартным протоколом изучения кинетики связывания (Capture-Kinetic), рекомендованным производителем (программа изучения кинетики Biacore GE Healthcare). Серийные разведения рекомбинантных растворимых димерных белков CD73 человека в диапазоне от 1,23 до 300 нМ последовательно вводили на захваченные антитела анти-CD73 и оставляли диссоциировать в течение 10 минут перед регенерацией. Все наборы сенсограмм подбирали с использованием кинетической модели связывания 1:1. Двухвалентная аффинность и кинетические константы скорости ассоциации и диссоциации представлены в таблице 2 ниже.

Таблица 2

Антитело CD73	KD (нМ)
1E11	0,822
3C12	0,682
6E1	0,819

Содержание всех источников, включая публикации, заявки на патент и патенты, указанных в настоящем описании, полностью включено в настоящее описание посредством ссылки так же, как если бы полное содержание каждого источника было специально включено отдельно (в максимальной степени, разрешенной законом) независимо от какого-либо включения конкретных документов, отдельно приведенного в иных местах настоящего описания.

Употребление терминов в единственном числе и подобных обозначений следует рассматривать как включающее как единственное, так и множественное число, если в настоящем описании не указано иное или если это не противоречит явным образом контексту.

Если не указано иное, все точные значения, приведенные в настоящем описании, представляют соответствующие приблизительные значения (например, можно считать, что все точные типичные значения, приведенные в отношении конкретного фактора или измерения, также предусматривают соответствующее приблизительное измерение, модифицированное термином «примерно» при необходимости).

Приведенное в настоящем документе описание любого аспекта или варианта реализации настоящего изобретения с использованием терминов, таких как «содержащий», «имеющий», «включающий» или «закрывающий» в отношении элемента или элементов, обеспечивает схожий аспект или вариант реализации настоящего изобретения, который «состоит из», «по существу состоит из» или «по существу содержит» данный конкретный элемент или элементы, если не указано иное или если это не противоречит явным образом контексту (например, следует понимать, что композиция, описанная в настоящем документе как содержащая конкретный элемент, также описывает композицию, состоящую из данного элемента, если иное не указано или если это не противоречит явным образом контексту).

Использование всех примеров или выражений, употребляемых при приведении примеров (например, «такой как»), в настоящем описании предназначено только для более подробного пояснения настоящего изобретения и не ограничивает объем настоящего изобретения, если в формуле изобретения не указано иное. Никакие выражения в настоящем описании не следует рассматривать как указывающие на какой-либо элемент, не входящий в формулу изобретения, как на существенный для реализации изобретения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> INNATE PHARMA
 10 <120> БЛОКАДА CD73
 <130> CD73-1
 <150> US 62/062,323
 <151> 2014-10-10
 <150> US 62/118,549
 15 <151> 2015-02-20
 <150> US 62/133,597
 <151> 2015-03-16
 <150> US 62/188,881
 <151> 2015-07-06
 20 <160> 46
 <170> PatentIn версии 3.5
 <210> 1
 <211> 574
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Met Cys Pro Arg Ala Ala Arg Ala Pro Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Gly Ala Val Leu Trp Pro Ala Ala Gly Ala Trp Glu Leu Thr Ile Leu
 20 25 30
 30 His Thr Asn Asp Val His Ser Arg Leu Glu Gln Thr Ser Glu Asp Ser
 35 40 45
 Ser Lys Cys Val Asn Ala Ser Arg Cys Met Gly Gly Val Ala Arg Leu
 50 55 60
 35 Phe Thr Lys Val Gln Gln Ile Arg Arg Ala Glu Pro Asn Val Leu Leu
 65 70 75 80
 Leu Asp Ala Gly Asp Gln Tyr Gln Gly Thr Ile Trp Phe Thr Val Tyr
 85 90 95
 Lys Gly Ala Glu Val Ala His Phe Met Asn Ala Leu Arg Tyr Asp Ala
 40 100 105 110
 Met Ala Leu Gly Asn His Glu Phe Asp Asn Gly Val Glu Gly Leu Ile
 115 120 125
 Glu Pro Leu Leu Lys Glu Ala Lys Phe Pro Ile Leu Ser Ala Asn Ile
 130 135 140
 45 Lys Ala Lys Gly Pro Leu Ala Ser Gln Ile Ser Gly Leu Tyr Leu Pro
 145 150 155 160
 Tyr Lys Val Leu Pro Val Gly Asp Glu Val Val Gly Ile Val Gly Tyr
 165 170 175

RU 2746804 C2

	Thr	Ser	Lys	Glu	Thr	Pro	Phe	Leu	Ser	Asn	Pro	Gly	Thr	Asn	Leu	Val
				180					185					190		
	Phe	Glu	Asp	Glu	Ile	Thr	Ala	Leu	Gln	Pro	Glu	Val	Asp	Lys	Leu	Lys
			195					200					205			
5	Thr	Leu	Asn	Val	Asn	Lys	Ile	Ile	Ala	Leu	Gly	His	Ser	Gly	Phe	Glu
		210					215					220				
	Met	Asp	Lys	Leu	Ile	Ala	Gln	Lys	Val	Arg	Gly	Val	Asp	Val	Val	Val
	225					230					235					240
	Gly	Gly	His	Ser	Asn	Thr	Phe	Leu	Tyr	Thr	Gly	Asn	Pro	Pro	Ser	Lys
10					245					250					255	
	Glu	Val	Pro	Ala	Gly	Lys	Tyr	Pro	Phe	Ile	Val	Thr	Ser	Asp	Asp	Gly
				260					265					270		
	Arg	Lys	Val	Pro	Val	Val	Gln	Ala	Tyr	Ala	Phe	Gly	Lys	Tyr	Leu	Gly
			275					280					285			
15	Tyr	Leu	Lys	Ile	Glu	Phe	Asp	Glu	Arg	Gly	Asn	Val	Ile	Ser	Ser	His
		290					295					300				
	Gly	Asn	Pro	Ile	Leu	Leu	Asn	Ser	Ser	Ile	Pro	Glu	Asp	Pro	Ser	Ile
	305					310					315					320
	Lys	Ala	Asp	Ile	Asn	Lys	Trp	Arg	Ile	Lys	Leu	Asp	Asn	Tyr	Ser	Thr
20					325					330					335	
	Gln	Glu	Leu	Gly	Lys	Thr	Ile	Val	Tyr	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Gln	Ser
				340					345					350		
	Cys	Arg	Phe	Arg	Glu	Cys	Asn	Met	Gly	Asn	Leu	Ile	Cys	Asp	Ala	Met
			355					360					365			
25	Ile	Asn	Asn	Asn	Leu	Arg	His	Thr	Asp	Glu	Met	Phe	Trp	Asn	His	Val
		370					375					380				
	Ser	Met	Cys	Ile	Leu	Asn	Gly	Gly	Gly	Ile	Arg	Ser	Pro	Ile	Asp	Glu
	385					390					395					400
	Arg	Asn	Asn	Gly	Thr	Ile	Thr	Trp	Glu	Asn	Leu	Ala	Ala	Val	Leu	Pro
30					405					410					415	
	Phe	Gly	Gly	Thr	Phe	Asp	Leu	Val	Gln	Leu	Lys	Gly	Ser	Thr	Leu	Lys
				420					425					430		
	Lys	Ala	Phe	Glu	His	Ser	Val	His	Arg	Tyr	Gly	Gln	Ser	Thr	Gly	Glu
		435						440					445			
35	Phe	Leu	Gln	Val	Gly	Gly	Ile	His	Val	Val	Tyr	Asp	Leu	Ser	Arg	Lys
		450					455					460				
	Pro	Gly	Asp	Arg	Val	Val	Lys	Leu	Asp	Val	Leu	Cys	Thr	Lys	Cys	Arg
	465					470					475					480
	Val	Pro	Ser	Tyr	Asp	Pro	Leu	Lys	Met	Asp	Glu	Val	Tyr	Lys	Val	Ile
40					485					490					495	
	Leu	Pro	Asn	Phe	Leu	Ala	Asn	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Gln	Met	Ile	Lys
				500					505					510		
	Asp	Glu	Leu	Leu	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Asp	Gln	Asp	Ile	Asn	Val	Val
			515						520				525			
45	Ser	Thr	Tyr	Ile	Ser	Lys	Met	Lys	Val	Ile	Tyr	Pro	Ala	Val	Glu	Gly
		530					535					540				
	Arg	Ile	Lys	Phe	Ser	Thr	Gly	Ser	His	Cys	His	Gly	Ser	Phe	Ser	Leu
	545					550					555					560

```

Ile Phe Leu Ser Leu Trp Ala Val Ile Phe Val Leu Tyr Gln
      565                      570

<210> 2
<211> 553
5 <212> PRT
   <213> Homo sapiens
   <400> 2

Met Cys Pro Arg Ala Ala Arg Ala Pro Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu
1      5      10      15
10 Gly Ala Val Leu Trp Pro Ala Ala Gly Ala Trp Glu Leu Thr Ile Leu
   20      25      30
   His Thr Asn Asp Val His Ser Arg Leu Glu Gln Thr Ser Glu Asp Ser
   35      40      45
   Ser Lys Cys Val Asn Ala Ser Arg Cys Met Gly Gly Val Ala Arg Leu
15      50      55      60
   Phe Thr Lys Val Gln Gln Ile Arg Arg Ala Glu Pro Asn Val Leu Leu
   65      70      75      80
   Leu Asp Ala Gly Asp Gln Tyr Gln Gly Thr Ile Trp Phe Thr Val Tyr
   85      90      95
20 Lys Gly Ala Glu Val Ala His Phe Met Asn Ala Leu Arg Tyr Asp Ala
   100     105     110
   Met Ala Leu Gly Asn His Glu Phe Asp Asn Gly Val Glu Gly Leu Ile
   115     120     125
   Glu Pro Leu Leu Lys Glu Ala Lys Phe Pro Ile Leu Ser Ala Asn Ile
25      130     135     140
   Lys Ala Lys Gly Pro Leu Ala Ser Gln Ile Ser Gly Leu Tyr Leu Pro
   145     150     155     160
   Tyr Lys Val Leu Pro Val Gly Asp Glu Val Val Gly Ile Val Gly Tyr
   165     170     175
30 Thr Ser Lys Glu Thr Pro Phe Leu Ser Asn Pro Gly Thr Asn Leu Val
   180     185     190
   Phe Glu Asp Glu Ile Thr Ala Leu Gln Pro Glu Val Asp Lys Leu Lys
   195     200     205
   Thr Leu Asn Val Asn Lys Ile Ile Ala Leu Gly His Ser Gly Phe Glu
35      210     215     220
   Met Asp Lys Leu Ile Ala Gln Lys Val Arg Gly Val Asp Val Val Val
   225     230     235     240
   Gly Gly His Ser Asn Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Asn Pro Pro Ser Lys
   245     250     255
40 Glu Val Pro Ala Gly Lys Tyr Pro Phe Ile Val Thr Ser Asp Asp Gly
   260     265     270
   Arg Lys Val Pro Val Val Gln Ala Tyr Ala Phe Gly Lys Tyr Leu Gly
   275     280     285
   Tyr Leu Lys Ile Glu Phe Asp Glu Arg Gly Asn Val Ile Ser Ser His
45      290     295     300
   Gly Asn Pro Ile Leu Leu Asn Ser Ser Ile Pro Glu Asp Pro Ser Ile
   305     310     315     320
   Lys Ala Asp Ile Asn Lys Trp Arg Ile Lys Leu Asp Asn Tyr Ser Thr

```

RU 2 746 804 C2

					325					330					335	
	Gln	Glu	Leu	Gly	Lys	Thr	Ile	Val	Tyr	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Gln	Ser
				340					345					350		
5	Cys	Arg	Phe	Arg	Glu	Cys	Asn	Met	Gly	Asn	Leu	Ile	Cys	Asp	Ala	Met
			355					360					365			
	Ile	Asn	Asn	Asn	Leu	Arg	His	Thr	Asp	Glu	Met	Phe	Trp	Asn	His	Val
		370					375					380				
	Ser	Met	Cys	Ile	Leu	Asn	Gly	Gly	Gly	Ile	Arg	Ser	Pro	Ile	Asp	Glu
	385					390					395					400
10	Arg	Asn	Asn	Gly	Thr	Ile	Thr	Trp	Glu	Asn	Leu	Ala	Ala	Val	Leu	Pro
				405						410					415	
	Phe	Gly	Gly	Thr	Phe	Asp	Leu	Val	Gln	Leu	Lys	Gly	Ser	Thr	Leu	Lys
				420					425					430		
	Lys	Ala	Phe	Glu	His	Ser	Val	His	Arg	Tyr	Gly	Gln	Ser	Thr	Gly	Glu
15			435					440					445			
	Phe	Leu	Gln	Val	Gly	Gly	Ile	His	Val	Val	Tyr	Asp	Leu	Ser	Arg	Lys
		450					455					460				
	Pro	Gly	Asp	Arg	Val	Val	Lys	Leu	Asp	Val	Leu	Cys	Thr	Lys	Cys	Arg
	465					470					475					480
20	Val	Pro	Ser	Tyr	Asp	Pro	Leu	Lys	Met	Asp	Glu	Val	Tyr	Lys	Val	Ile
				485						490					495	
	Leu	Pro	Asn	Phe	Leu	Ala	Asn	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Gln	Met	Ile	Lys
			500						505					510		
	Asp	Glu	Leu	Leu	Arg	His	Asp	Ser	Gly	Asp	Gln	Asp	Ile	Asn	Val	Val
25			515					520					525			
	Ser	Thr	Tyr	Ile	Ser	Lys	Met	Lys	Val	Ile	Tyr	Pro	Ala	Val	Glu	Gly
		530					535					540				
	Arg	Ile	Lys	His	His	His	His	His	His							
	545					550										
30	<210>	3														
	<211>	120														
	<212>	PRT														
	<213>	mus musculus														
	<400>	3														
35	Glu	Ile	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
	1			5					10					15		
	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30			
	Asn	Met	Tyr	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile
40			35					40					45			
	Gly	Tyr	Ile	Asp	Pro	Tyr	Asn	Gly	Gly	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe
		50					55					60				
	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70										

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120
<210> 4
<211> 106
5 <212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 4
Asp Ala Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
1 5 10 15
10 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
15 50 55 60
Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr
85 90 95
20 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105
<210> 5
<211> 5
<212> PRT
25 <213> Mus musculus
<400> 5
Ser Tyr Asn Met Tyr
1 5
<210> 6
30 <211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 6
Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr
35 1 5
<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus
40 <400> 7
Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr Asn
1 5
<210> 8
<211> 17
45 <212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 8
Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

	1	5	10	15
	Gly			
	<210>	9		
	<211>	4		
5	<212>	PRT		
	<213>	Mus musculus		
	<400>	9		
	Pro Tyr Asn Gly			
	1			
10	<210>	10		
	<211>	8		
	<212>	PRT		
	<213>	Mus musculus		
	<400>	10		
15	Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr			
	1	5		
	<210>	11		
	<211>	11		
	<212>	PRT		
20	<213>	Mus musculus		
	<400>	11		
	Gly Tyr Gly Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr			
	1	5	10	
	<210>	12		
25	<211>	9		
	<212>	PRT		
	<213>	Mus musculus		
	<400>	12		
	Tyr Gly Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala			
30	1	5		
	<210>	13		
	<211>	13		
	<212>	PRT		
	<213>	Mus musculus		
35	<400>	13		
	Ala Arg Gly Tyr Gly Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr			
	1	5	10	
	<210>	14		
	<211>	11		
40	<212>	PRT		
	<213>	Mus musculus		
	<400>	14		
	Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp Val Ala			
	1	5	10	
45	<210>	15		
	<211>	7		
	<212>	PRT		
	<213>	Mus musculus		

<400> 15
 Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp
 1 5
 <210> 16
 5 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 16
 Gln Ser Val Thr Asn Asp
 10 1 5
 <210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 15 <400> 17
 Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5
 <210> 18
 <211> 3
 20 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 18
 Tyr Ala Ser
 1
 25 <210> 19
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 19
 30 Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr
 1 5
 <210> 20
 <211> 5
 <212> PRT
 35 <213> Mus musculus
 <400> 20
 Asp Tyr Ser Ser Leu
 1 5
 <210> 21
 40 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 21
 Glu Phe Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 45 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile

RU 2 746 804 C2

35 40 45
 Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 5 65 70 75 80
 Met His Leu Asn Asn Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Asn Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 10 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120
 <210> 22
 <211> 106
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus
 <400> 22
 Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp
 20 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 25 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Met Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 30 100 105
 <210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 35 <400> 23
 Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 24
 40 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 24
 Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Ser
 45 1 5
 <210> 25
 <211> 11
 <212> PRT

<213> Mus musculus
 <400> 25
 Gly Tyr Asn Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10
 5 <210> 26
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 26
 10 Tyr Asn Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala
 1 5
 <210> 27
 <211> 13
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus
 <400> 27
 Ala Arg Gly Tyr Asn Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10
 <210> 28
 20 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 28
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 25 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ala Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Asp Trp Ile
 35 40 45
 30 Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Leu Thr Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 35 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Gly Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 40 <210> 29
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 29
 45 Ser Ile Val Met Thr Pro Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
 20 25 30

RU 2746 804 C2

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Ala Ser Thr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60
5 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr
85 90 95
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
10 100 105 110
<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus
15 <400> 30
Ser Tyr Asn Met Asn
1 5
<210> 31
<211> 7
20 <212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 31
Gly Tyr Ala Phe Ala Ser Tyr
1 5
25 <210> 32
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 32
30 Gly Tyr Ala Phe Ala Ser Tyr Asn
1 5
<210> 33
<211> 17
<212> PRT
35 <213> Mus musculus
<400> 33
Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Leu Thr Phe Lys
1 5 10 15
Gly
40 <210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 34
45 Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
1 5
<210> 35
<211> 6

```

<212>  PRT
<213>  Mus musculus
<400>  35
Gln Ser Val Ser Asn Asp
5  1          5
<210>  36
<211>  126
<212>  PRT
<213>  Mus musculus
10 <400>  36
Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ala Ser Tyr
20          25          30
15 Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Asp Trp Ile
35          40          45
Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Leu Thr Phe
50          55          60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
20 65          70          75          80
Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Arg Gly Tyr Gly Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100          105          110
25 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115          120          125
<210>  37
<211>  112
<212>  PRT
30 <213>  Mus musculus
<400>  37
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
1          5          10          15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
35 20          25          30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35          40          45
Tyr Tyr Ala Ser Thr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50          55          60
40 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala
65          70          75          80
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr
85          90          95
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
45 100          105          110
<210>  38
<211>  5
<212>  PRT

```

<213> Mus musculus
 <220>
 <221> X
 <222> (5)..(5)
 5 <223> X представляет собой любую аминокислоту
 <400> 38
 Ser Tyr Asn Met Xaa
 1 5
 <210> 39
 10 <211> 17
 <212> PRT
 <213> mus musculus
 <220>
 <221> X
 15 <222> (9)..(9)
 <223> X представляет собой любую аминокислоту
 <220>
 <221> X
 <222> (13)..(13)
 20 <223> X представляет собой любую аминокислоту
 <220>
 <221> X
 <222> (14)..(14)
 <223> X представляет собой любую аминокислоту
 25 <400> 39
 Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Xaa Ser Tyr Asn Xaa Xaa Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 40
 30 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> X
 35 <222> (9)..(9)
 <223> X представляет собой любую аминокислоту
 <400> 40
 Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Xaa
 1 5
 40 <210> 41
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 45 <221> X
 <222> (3)..(3)
 <223> X представляет собой любую аминокислоту
 <400> 41

Gly Tyr Xaa Ala Ala Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10
<210> 42
<211> 11
5 <212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> X
<222> (7)..(7)
10 <223> X представляет собой любую аминокислоту
<400> 42
Lys Ala Ser Gln Ser Val Xaa Asn Asp Val Ala
1 5 10
<210> 43
15 <211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus
<220>
<221> X
20 <222> (4)..(4)
<223> X представляет собой любую аминокислоту
<400> 43
Tyr Ala Ser Xaa Arg Tyr Thr
1 5
25 <210> 44
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 44
30 Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala
1 5 10
<210> 45
<211> 45
<212> ДНК
35 <213> Homo sapiens
<400> 45
tacgactcac aagcttgccg ccaccatgtg tccccgagcc gcgcg 45
<210> 46
<211> 57
40 <212> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 46
ccgccccgac tctagatcag tgatgggtgat gatgggtgctt gatccgacct tcaactg 57

(57) Формула изобретения

1. Выделенное антитело, которое специфично связывает CD73 человека на поверхности клетки и которое способно нейтрализовать его 5'-эктонуклеотидазную активность, причем указанное антитело содержит вариабельную легкую цепь

иммуноглобулина (VL) и переменную тяжелую цепь иммуноглобулина (VH), каждая из которых содержит участки CDR и каркасные участки, причем указанное антитело выбрано из группы, состоящей из:

5 (a) моноклонального антитела, содержащего (i) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR 1, 2 и 3 переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 3, и (ii) переменную область легкой цепи, содержащую CDR 1, 2 и 3 переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 4;

10 (b) моноклонального антитела, содержащего (i) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR 1, 2 и 3 переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 21, и (ii) переменную область легкой цепи, содержащую CDR 1, 2 и 3 переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 22;

15 (c) моноклонального антитела, содержащего (i) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR 1, 2 и 3 переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 28, и (ii) переменную область легкой цепи, содержащую CDR 1, 2 и 3 переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 29; и

(d) моноклонального антитела, содержащего (i) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR 1, 2 и 3 переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 36, и (ii) переменную область легкой цепи, содержащую CDR 1, 2 и 3 переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 37;

20 причем нумерация участков CDR представлена согласно нумерации по Kabat, и при этом указанное антитело обладает уменьшенным связыванием с мутантным полипептидом CD73, содержащим мутацию в остатках A99S, E129A, K133A, E134N и A135S со ссылкой на SEQ ID NO: 1, в каждом случае относительно связывания указанного антитела и полипептида CD73 дикого типа, содержащего аминокислотную
25 последовательность SEQ ID NO: 1.

2. Выделенное антитело по п.1, отличающееся тем, что указанное антитело связывает димер полипептида CD73 двухвалентным образом.

3. Выделенное антитело по п.1, отличающееся тем, что указанное антитело по существу не индуцирует интернализацию комплекса антитело-CD73.

30 4. Выделенное антитело по п.1, отличающееся тем, что указанное антитело по существу не демонстрирует связывания через Fc-домен с полипептидом CD16 человека.

5. Выделенное антитело по п.1, отличающееся тем, что указанное антитело действует как аллостерический ингибитор полипептида CD73 человека, экспрессируемого клеткой.

35 6. Выделенное антитело по п.1, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой полноразмерное антитело.

7. Выделенное антитело по п.1, отличающееся тем, что указанное антитело способно вызывать снижение 5'-эксонуклеотидазной активности CD73, экспрессируемого клеткой, по меньшей мере на 80%.

40 8. Выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело способно нейтрализовать 5'-эксонуклеотидазную активность растворимого полипептида CD73 человека.

9. Выделенное антитело по любому из пп.1-7, отличающееся тем, что указанное антитело характеризуется EC₅₀ для нейтрализации 5'-эксонуклеотидазной активности клеточного CD73, составляющей не более 1 мкг/мл, при этом нейтрализацию ферментативной активности CD73 определяют путем оценки нейтрализации 5'-эксонуклеотидазной активности в клетках MDA-MB-231 путем количественного определения гидролиза аденозинмонофосфата (АМФ) до аденозина.

10. Выделенное антитело по любому из пп.1-7, отличающееся тем, что указанное

антитело связывается с полипептидом CD73, который связан с субстратом, при этом необязательно указанный субстрат представляет собой аденозин-5'-(α,β -метилен) дифосфат (АРСР) или аденозинмонофосфат (АМФ).

11. Выделенное антитело по любому из пп.1-7, отличающееся тем, что указанное антитело способно нейтрализовать 5'-эктонуклеотидазную активность растворимого димерного полипептида CD73 человека, когда антитело представлено в 10-кратном молярном избытке по отношению к димеру полипептида CD73.

12. Выделенное антитело по любому из пп.1-7, отличающееся тем, что указанное антитело характеризуется EC_{50} , определяемой путем проточной цитометрии, составляющей не более 5 мкг/мл, необязательно не более 3 мкг/мл, не более 2 мкг/мл, не более 1 мкг/мл или не более 0,5 мкг/мл, для связывания с клетками, полученными для экспрессии на своей поверхности полипептида CD73, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

13. Выделенное антитело по любому из пп.1-7, отличающееся тем, что указанное антитело способно вызывать снижение 5'-эктонуклеотидазной активности полипептида CD73 человека в растворе более чем на 50%, необязательно более чем на 70%, необязательно более чем на 80%.

14. Антитело по любому из пп.1-7, отличающееся тем, что указанное антитело связывает общую антигенную детерминанту, присутствующую на CD73, когда его активный центр не занят/не связан с субстратом, и когда активный центр CD73 занят/связан с субстратом.

15. Антитело по любому из пп.1-7, отличающееся тем, что указанное антитело связывает антигенную детерминанту в каждой полипептидной цепи CD73 в димере CD73, при этом указанные антигенные детерминанты присутствуют на общей стороне димера CD73.

16. Антитело, подходящее для применения в качестве лекарственного средства для лечения рака, выбранное из группы, состоящей из:

(a) моноклонального антитела, содержащего (i) тяжелую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 3, и (ii) легкую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 4;

(b) моноклонального антитела, содержащего (i) тяжелую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 21, и (ii) легкую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 22;

(c) моноклонального антитела, содержащего (i) тяжелую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 28, и (ii) легкую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 29; и

(d) моноклонального антитела, содержащего (i) тяжелую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 36, и (ii) легкую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 37, причем нумерация участков CDR представлена согласно нумерации по Kabat.

17. Антитело по п.16, отличающееся тем, что указанное антитело связывается с эпитопом, содержащим 1, 2, 3, 4 или 5 остатков, выбранных из группы, состоящей из A99, E129, K133, E134 и A135 со ссылкой на SEQ ID NO: 1.

18. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая эффективное количество антитела по любому из пп.1-7 и фармацевтически приемлемый носитель.

19. Рекомбинантная клетка-хозяин, продуцирующая антитело по любому из пп. 1-7.

20. Антитело по любому из пп. 1-7, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой IgG1 и содержит одну, две или три замены в остатках 234, 235 и 331

или 234, 235 и 322 (нумерация ЕС).

5

10

15

20

25

30

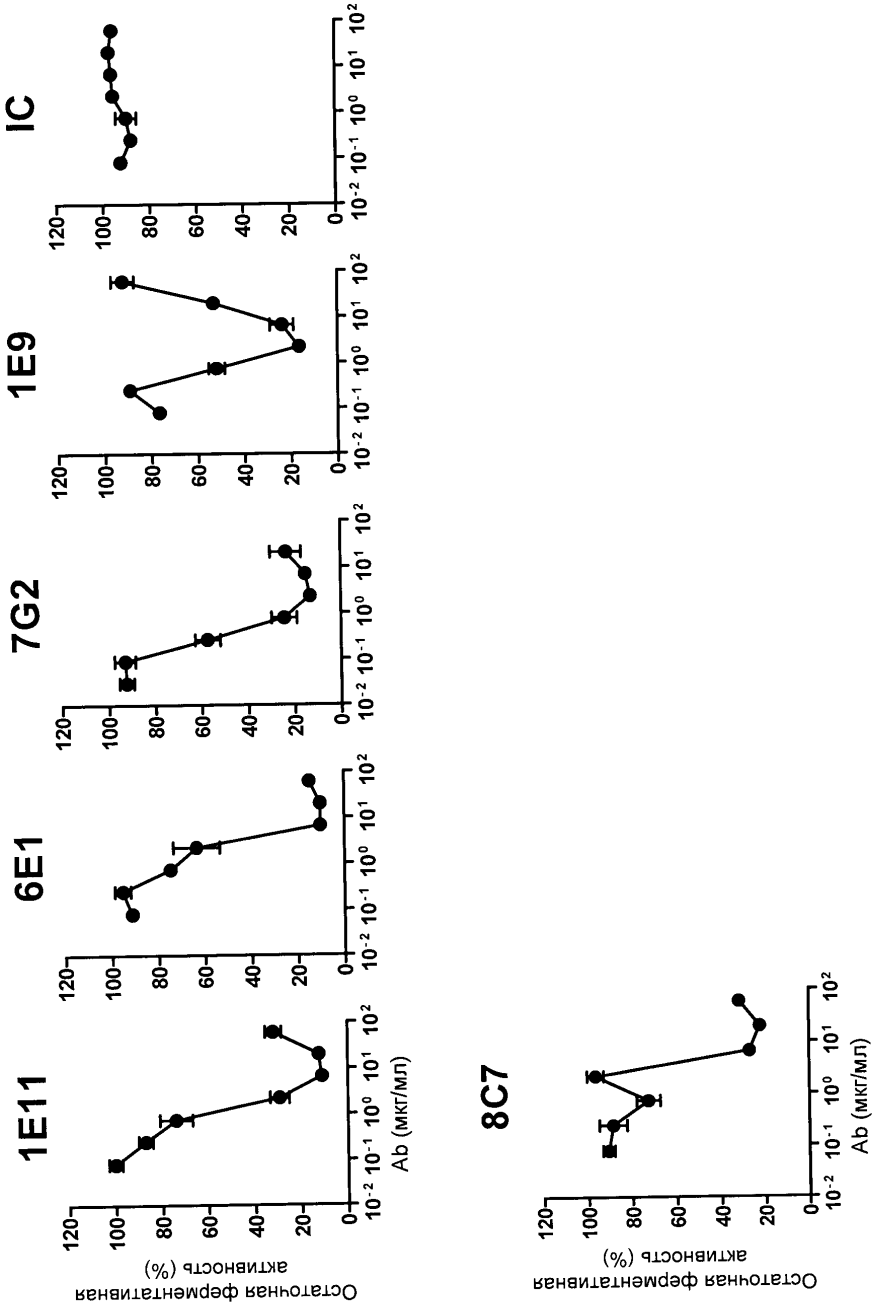
35

40

45

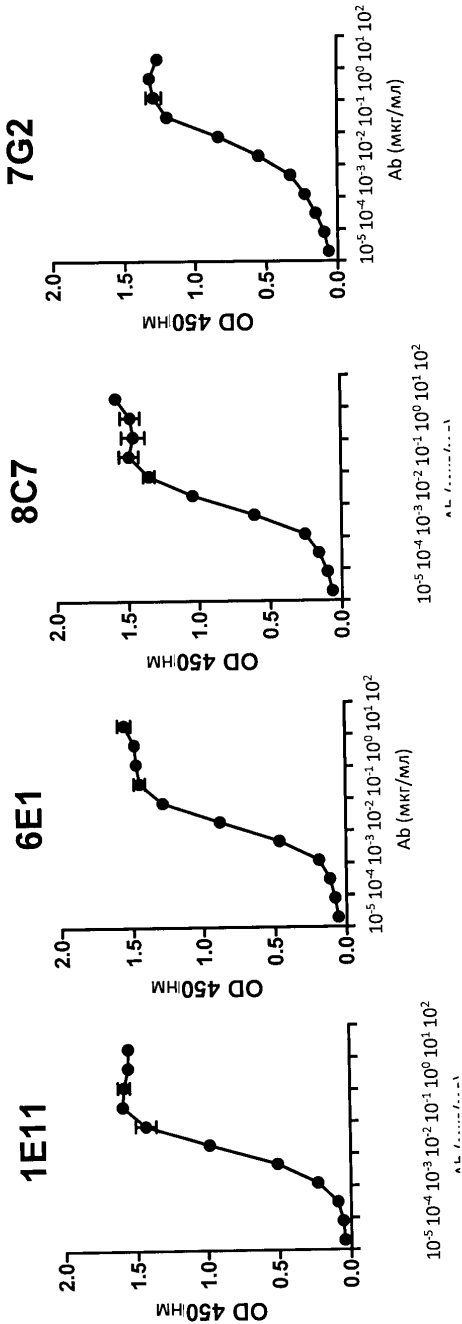
1

Фигура 1

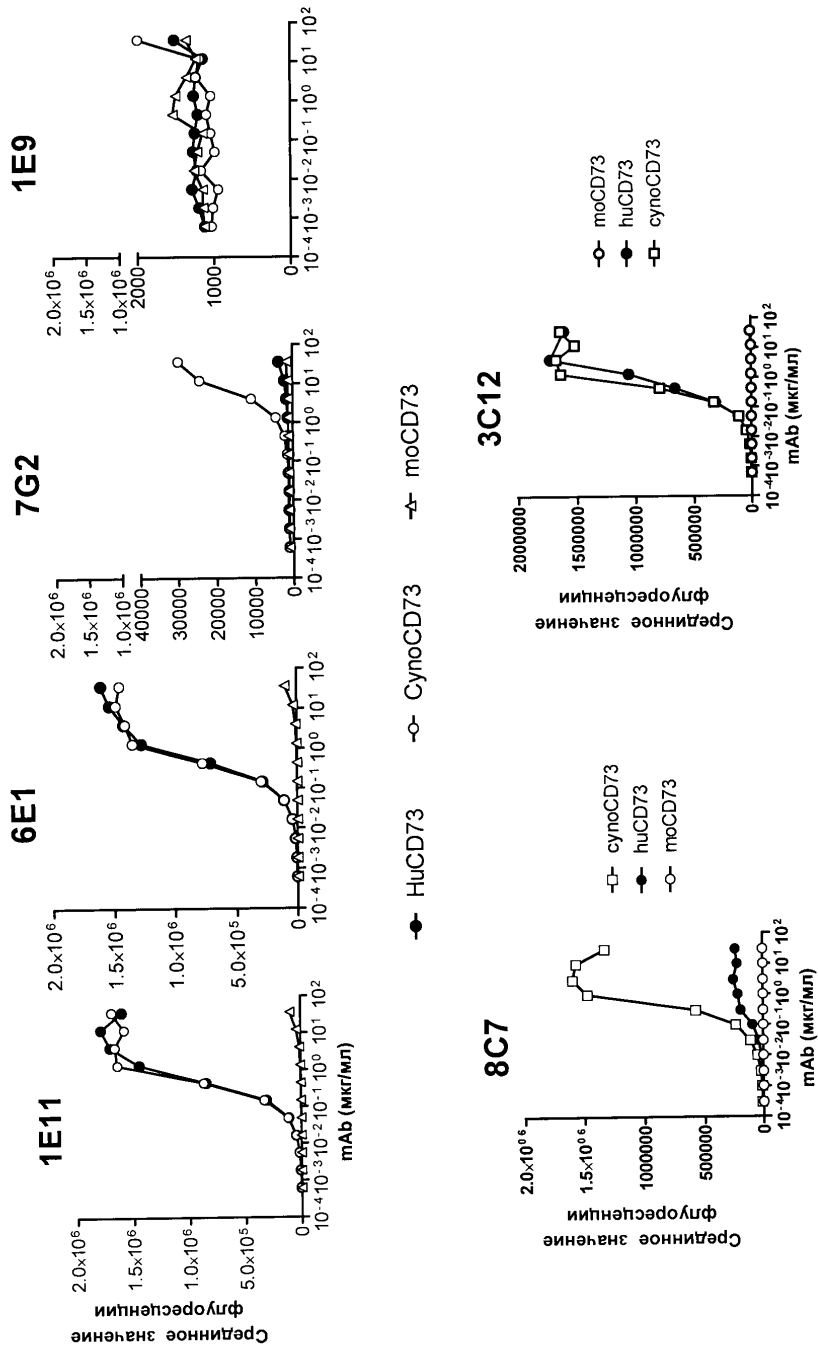


2

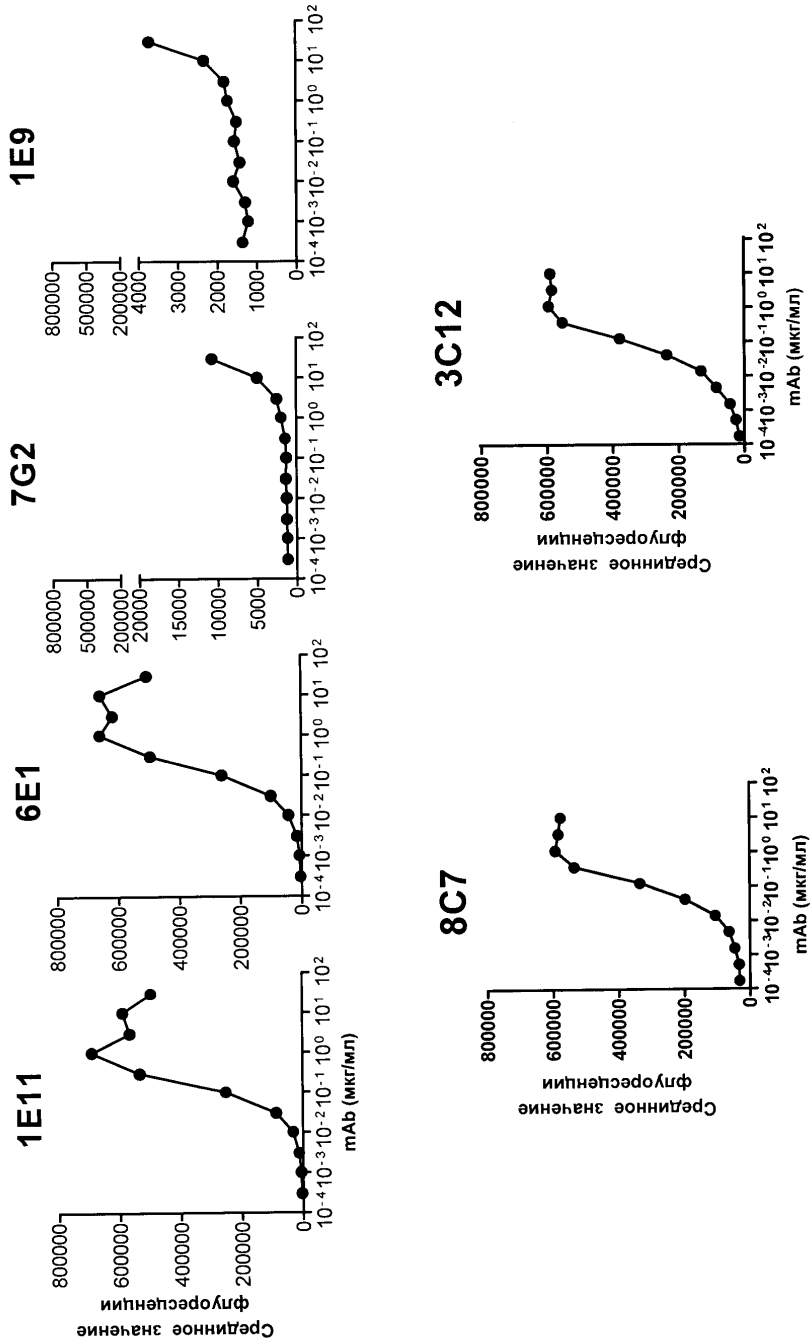
Фигура 2



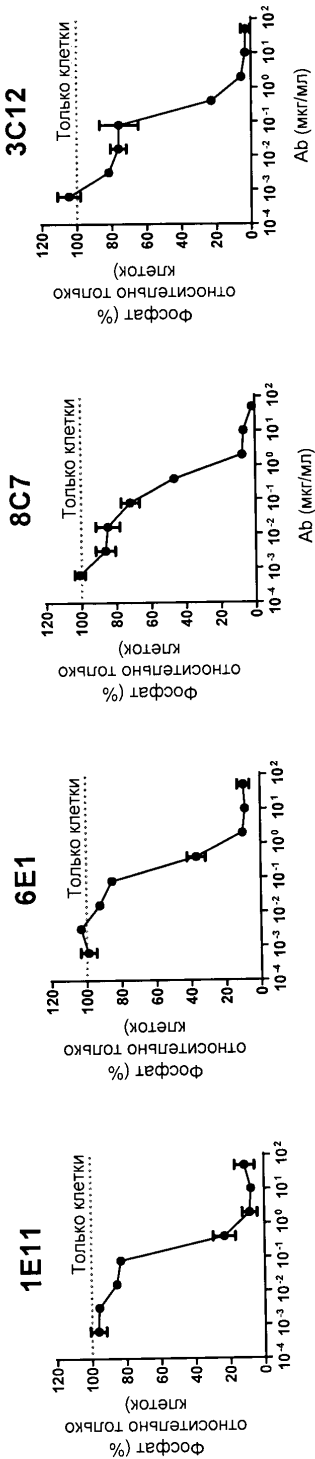
Фигура 3



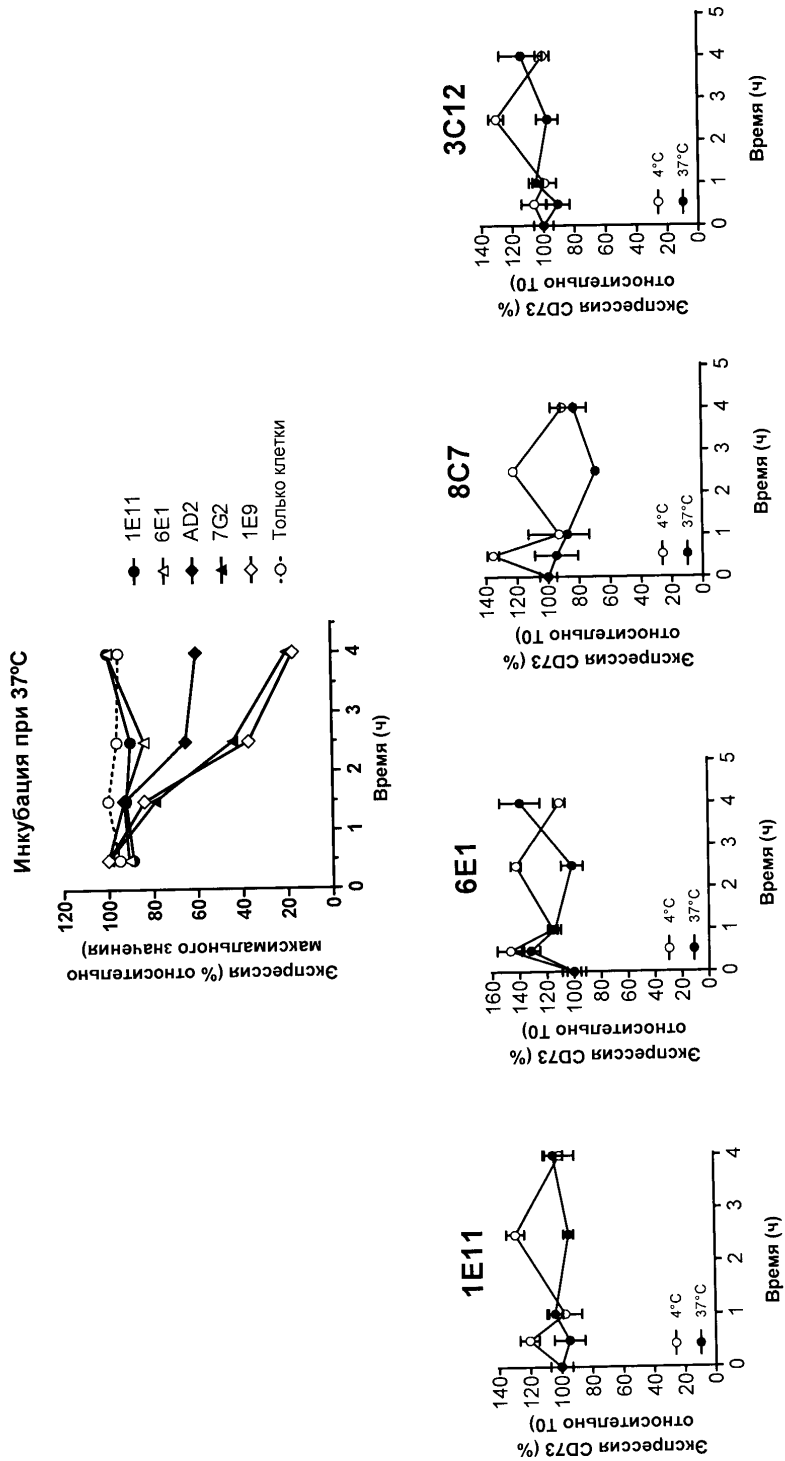
Фигура 4



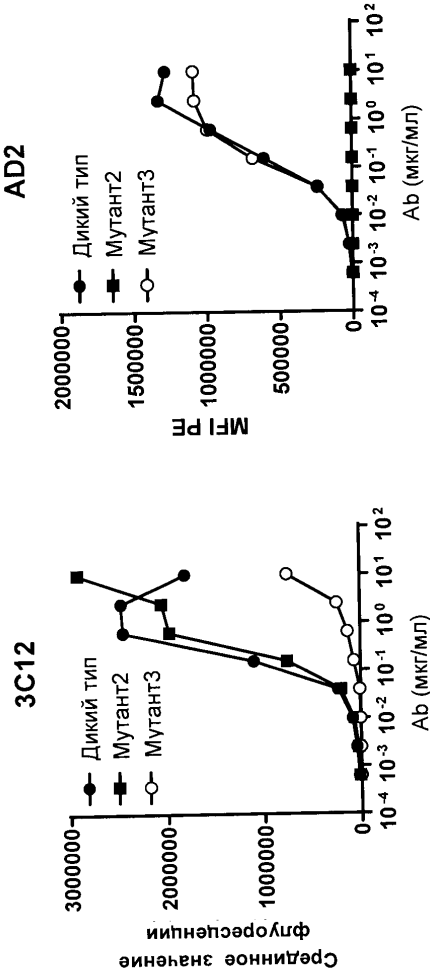
Фигура 5



Фигура 6

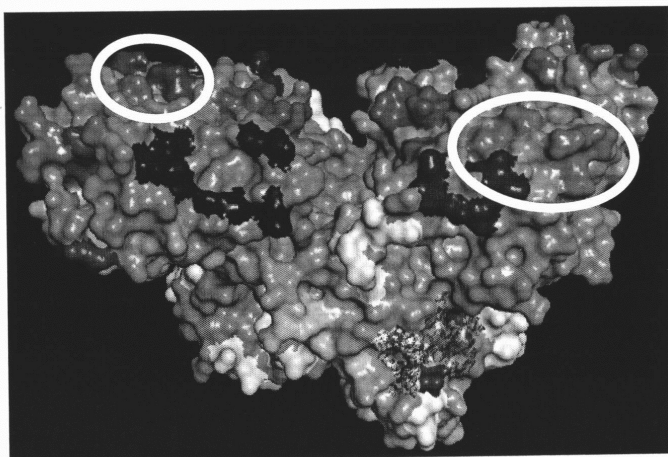


Фигура 7

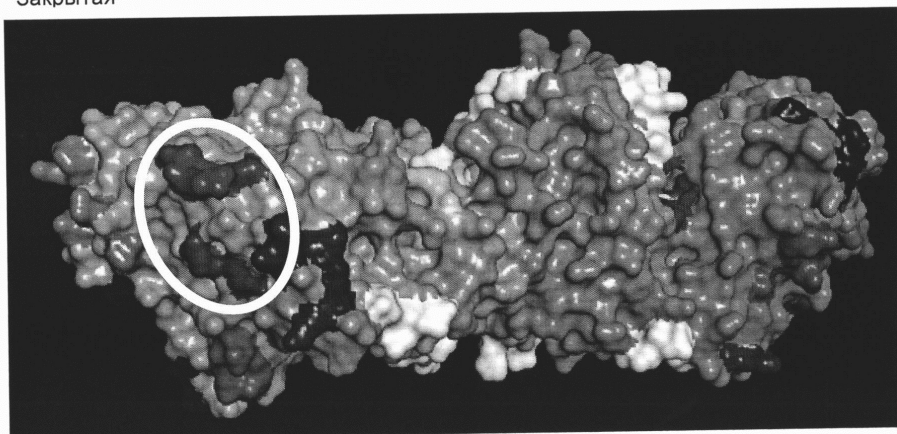


Фигура 8А

Открытая

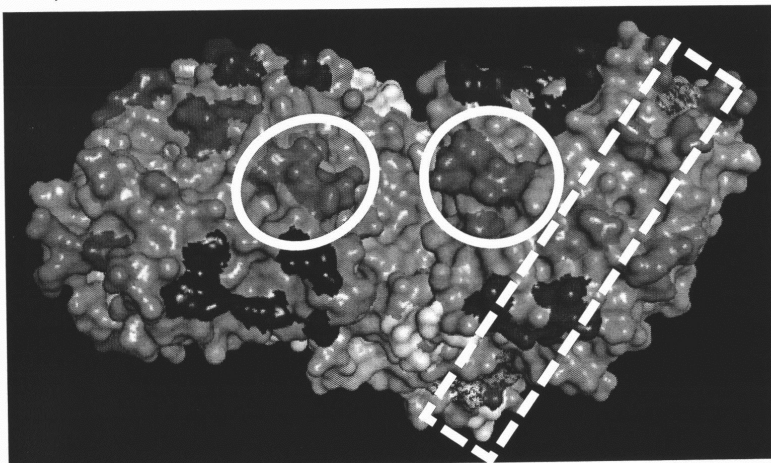


Закрытая



Фигура 8В

Открытая



Закрытая

