

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391222** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.06.20

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.10.22

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

(31) **202011152518.9**

(72) Изобретатель:

(32) **2020.10.23**

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

(33) **CN**

(86) **PCT/CN2021/125564**

(74) Представитель:

(87) **WO 2022/083723 2022.04.28**

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

**АКЕСО БАЙОФАРМА, ИНК; АКЕСО
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (CN)**

(57) Антитело против CD73 и его применение. Варибельная область тяжелой цепи антитела содержит HCDR1-HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15-17; и варибельная область легкой цепи антитела содержит LCDR1-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 18-20.

A1

202391222

202391222

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577685EA/019

АНТИТЕЛО ПРОТИВ CD73 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

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

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

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

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

CD73 обладает как гидролазной, так и негидролазной активностью. Ферментативная и неферментативная функции CD73 одновременно работают в родственном процессе в опухолях и взаимно способствуют и поддерживают прогрессирование опухолей. Все больше и больше исследований показывают, что CD73 является ключевой регуляторной молекулой для пролиферации, метастазирования и инвазии опухолевых клеток *in vitro*, а также для ангиогенеза опухоли и механизма ускользания опухоли от иммунного ответа *in vivo*, где важный механизм иммуносупрессии опосредован метаболическим сигнальным путем CD73-аденозин. CD39, расположенный выше CD73 по сигнальному пути, может катализировать АТФ с образованием аденозинмонофосфата (АМФ), сгенерированный АМФ превращается в аденозин с помощью CD73, а аденозин связывается с расположенным ниже по сигнальному пути рецептором аденозина (A2AR). A2AR ингибирует ряд сигнальных путей, связанных с иммунной активацией, таких как LCK, MAPK, и PKC, и ингибирует иммунный эффект уничтожения Т-клеток путем активации протеинкиназы А (PKA) и киназы Csk, тем самым играя иммуноподавляющую роль (Antonioni L, et al. Nat Rev Cancer. 2013; 13:842-857).

Трансмембранный рецептор PD-1 (белок 1 запрограммированной клеточной

смерти) является членом семейства CD28 и экспрессируется в активированных Т-клетках, В-клетках и миелоидных клетках. Оба лиганда PD-1, PDL1 (лиганд 1 запрограммированной клеточной смерти 1, или PDL-1) и PDL2 (лиганд 2 запрограммированной клеточной смерти 1, или PDL-2), являются членами суперсемейства B7. PDL1 экспрессируется во множестве клеток, включая Т-клетки, В-клетки, эндотелиальные клетки и эпителиальные клетки, а PDL2 экспрессируется только в антигенпрезентирующих клетках, таких как дендритные клетки и макрофаги.

Сигнальный путь PD-1/PDL1 играет важную роль в регуляции иммунной толерантности, микробной инфекции и ускользании опухоли от иммунитета. PD-1 в основном экспрессируется в иммунных клетках, таких как Т-клетки, а лиганд PDL1 для PD-1 в высокой степени экспрессируется во множестве опухолевых тканей человека. Блокирование сигнального пути PD-1/PDL1 может активировать ингибированные Т-клетки, которые, таким образом, атакуют опухолевые клетки. Блокирование передачи сигналов PD-1/PDL1 может способствовать пролиферации Т-клеток, специфичных к опухолевому антигену, активировать процесс уничтожения опухолевых клеток и дополнительно ингибировать локальный рост опухоли (Julie R et al., 2012, *N Engl J Med.*, 366:2455- 2465). Кроме того, опухоли с высокой экспрессией PDL1 связаны с злокачественными новообразованиями, которые трудно детектировать (Hamanishi et al., 2007, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104:3360-5). Эффективным методом является введение антитела против PD-1 для модуляции экспрессии PD-1. Из-за широких противоопухолевых перспектив и удивительной эффективности антител PD-1 в отрасли широко признано, что антитела, нацеленные на путь PD-1, приведут к прорывам для различных опухолей, таких как немелкоклеточный рак легкого, почечно-клеточная карцинома, рак яичников, меланома (Homet M.B., Parisi G., et al., 2015, *SeminOncol.*, 42(3):466-473), лейкоз и анемия (Held SA, Heine A, et al., 2013, *Curr Cancer Drug Targets.*, 13(7):768-74).

Молекулы антигена 4, ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA4) и CD28, очень похожи в аспектах структуры генов, расположения хромосом, гомологии последовательностей и экспрессии генов. Обе молекулы являются рецепторами костимулирующей молекулы B7 и в основном экспрессируются на поверхности активированных Т-клеток. Связывание CTLA4 с B7 ингибирует активацию Т-клеток мыши и человека и играет отрицательную регулируемую роль в активации Т-клеток.

Антитела CTLA4 (или моноклональные антитела против CTLA4) или лиганды CTLA4 могут препятствовать связыванию CTLA4 с его естественными лигандами, тем самым блокируя передачу отрицательных регуляторных сигналов CTLA4 к Т-клеткам и повышая реактивность Т-клеток к различным антигенам. В этом отношении исследования *in vivo* и *in vitro* по существу согласуются. В настоящее время моноклональные антитела CTLA4 проходят клинические испытания или одобрены для лечения рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака, рака желудочно-кишечного тракта, рака печени, злокачественной меланомы и т. д. (Grosso JF., Jure-Kunkel MN., 2013, *Cancer*

Immun., 13:5).

CTLA4 и антитела CTLA4 являются важными факторами, влияющими на функции Т-клеток, и играют определенную роль, вмешиваясь в иммунную среду в организме. Исследования *in vitro* и *in vivo* продемонстрировали, что антитела CTLA4 могут специфически ослаблять иммуносупрессию CTLA4, активировать Т-клетки и индуцировать образование ИЛ-2 и перспективны для широкого применения в генной терапии таких заболеваний, как опухоли и паразитарные инфекции. Антитела CTLA4 могут оказывать специфическое терапевтическое действие на заболевания и демонстрировать замечательную эффективность, а также могут использоваться для дополнения традиционных лекарственных средств и для изучения новых средств генной терапии.

ADCC (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность) относится к уничтожению клетки-мишени клеткой-киллером (NK-клеткой, макрофагом и т. д.), что опосредовано связыванием Fab-фрагмента антитела с эпитопом инфицированной вирусом клетки или опухолевой клетки и связыванием Fc-фрагмента антитела с Fc-рецептором (FcR) на поверхности клетки-киллера.

CDC (комплементзависимая цитотоксичность) означает, что специфическое связывание антитела с соответствующим антигеном на поверхности клеточной мембраны образует комплекс и активирует систему комплемента, которая дополнительно формирует MAC на поверхности клетки-мишени, что приводит к последующему лизису клетки-мишени. Компоненты комплемента могут вызывать лизис различных бактерий и других патогенных организмов и являются важным защитным механизмом от инфекций патогенных организмов.

Рецепторы Fc принадлежат к семейству иммуноглобулинов, которые экспрессируются на поверхности специфических иммунных клеток для распознавания Fc-фрагментов антител и опосредования иммунных ответов. После того, как Fab-область распознает антиген, Fc-область антитела связывается с рецептором Fc на иммунной клетке (например, клетке-киллере), чтобы инициировать ответную функцию иммунной клетки, такую как фагоцитоз и ADCC. В зависимости от типа антитела, распознаваемого рецептором Fc, и типа клеток экспрессии обнаружено, что Fc γ RIIIa тесно связан с эффектом ADCC. Fc γ RIIIa является наиболее преобладающей молекулой, опосредующей ADCC (Hogarth PM, Pietersz GA., 2012, NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY, 11(4):311-331).

Семейство IgG включает четыре члена, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, которые различаются аминокислотами в области кристаллизуемого фрагмента (Fc) константной области тяжелой цепи, что приводит к их различной аффинности для Fc γ R. IgG1 является наиболее распространенным подтипом у человека, а также наиболее распространенным подтипом, используемым в лечении моноклональными антителами. IgG1 способен связывать различные Fc γ R и способен индуцировать эффекты ADCC и CDC. Присутствие ADCC и/или CDC в антителах может вызвать нежелательное направленное повреждение

тканей, вызывая фармакологические побочные эффекты.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что гибридная клеточная линия LT014 может секретировать специфическое моноклональное антитело (названное как 19F3), специфически связывающееся с CD73 человека, и моноклональное антитело может эффективно ингибировать реакцию ферментативной активности CD73 в режиме конкуренции без субстрата, снижать продукцию аденозина, способствовать активности Т-клеток и оказывать эффект ингибирования роста опухоли.

Кроме того, авторы изобретения творчески подготовили гуманизированные антитела против CD73 человека (обозначенные как 19F3H1L1(hG1DM), 19F3H2L2(hG1DM), 19F3H2L3 и 19F3H2L3(hG1DM)), и, кроме того, антитела против CD73 содержат аминокислотные мутации для устранения эффектов ADCC и CDC, избегая нежелательной токсичности, опосредованной антителами.

Авторы изобретения также неожиданно обнаружили, что комбинация антитела по настоящему изобретению и биспецифического антитела против PD-1/CTLA-4 обладает фармакологическим эффектом эффективного ингибирования пролиферации опухолевых клеток, который превосходит соответствующий индивидуальный эффект биспецифического антитела против PD-1/CTLA-4 или антитела против CD73.

Другой аспект настоящего изобретения дополнительно относится к антителу, где антитело против CD73 содержит:

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 варибельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 10; и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 варибельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 14;

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

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

HCDR2, содержащую или состоящую из аминокислотной последовательности SEQ

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

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

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

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

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

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

SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 10, последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%,

предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 10, или аминокислотной последовательности, имеющей одну или более (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 10; и

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

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

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения константная область тяжелой цепи антитела представляет собой С-область гамма-1-цепи Ig, № доступа: P01857; константная область легкой цепи представляет собой С-область каппа-цепи Ig, № доступа: P01834.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения константная область тяжелой цепи антитела представляет собой С-область гамма-1-цепи Ig, № доступа: P01857, имеющую точечную мутацию лейцина в аланин в положении 234 (L234A) и точечную мутацию лейцина в аланин в положении 235 (L235A); константная область легкой цепи представляет собой С-область каппа-цепи Ig, № доступа: P01834, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

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

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

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

Антитела 19F3, 19F3H1L1(hG1DM), 19F3H2L2(hG1DM) и 19F3H2L3(hG1DM), используемые в настоящем изобретении, имеют одинаковые CDR:

3 CDR вариабельной области тяжелой цепи имеют следующие аминокислотные последовательности:

HCDR1: GYSFTGYT (SEQ ID NO: 15),
 HCDR2: INPYNAGT (SEQ ID NO: 16) и
 HCDR3: ARSEYRYGGDYFDY (SEQ ID NO: 17);

3 CDR вариабельной области легкой цепи имеют следующие аминокислотные последовательности:

LCDR1: QSLNSSNQKNY (SEQ ID NO: 18),
 LCDR2: FAS (SEQ ID NO: 19) и
 LCDR3: QQHYDTPYT (SEQ ID NO: 20).

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

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

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

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

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

последовательности SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20;

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

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

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

(5) выделенного полипептида, содержащего последовательность SEQ ID NO: 10,

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

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

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

Еще один аспект настоящего изобретения относится к вектору, содержащему выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению или вектор по настоящему изобретению.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к конъюгату, содержащему антитело и конъюгированный фрагмент, где антитело представляет собой антитело или

его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из вариантов осуществления настоящего изобретения, а конъюгированный фрагмент представляет собой метку для очистки (например, His-метку), детектируемую метку; предпочтительно конъюгированный фрагмент представляет собой радиоизотоп, флуоресцентное вещество, хемилюминесцентное вещество, окрашенное вещество, полиэтиленгликоль или фермент.

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

Еще один аспект настоящего изобретения относится к набору, включающему антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с любым из вариантов осуществления настоящего изобретения, конъюгат, слитый белок или полиспецифическое антитело по настоящему изобретению; предпочтительно набор дополнительно содержит второе антитело, специфически распознающее антитело; необязательно второе антитело дополнительно содержит детектируемую метку, такую как радиоизотоп, флуоресцентное вещество, хемилюминесцентное вещество, окрашенное вещество или фермент.

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

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

Еще один аспект настоящего изобретения относится к применению антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, конъюгата, слитого белка или полиспецифического антитела по настоящему изобретению при получении лекарственного средства для лечения и/или предотвращения опухоли (такой как солидная опухоль, предпочтительно немелкоклеточный рак легкого, рак предстательной железы (включая метастатический кастрационно-резистентный рак предстательной железы (mCRPC)), трижды негативный рак молочной железы, рак яичников, колоректальный рак (включая тип с микросателлитной стабильностью (MSS) и с дисфункцией системы репарации неспаренных оснований/с высоким уровнем микросателлитной нестабильности

(dMMR/MSI-высокая)), рак желудка (включая тип с микросателлитной стабильностью (MSS) и с дисфункцией системы репарации неспаренных оснований/с высоким уровнем микросателлитной нестабильности (dMMR/MSI-высокая)), меланома, рак головы и шеи, почечно-клеточная карцинома или аденокарцинома протоков поджелудочной железы), или при получении лекарственного средства для диагностики опухоли.

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

Еще один аспект настоящего изобретения относится к набору, включающему (1) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, конъюгат, описанный в настоящем документе, или слитый белок, или полиспецифическое антитело, описанное в настоящем документе, и (2) биспецифическое антитело против PD-1/CTLA-4 и, необязательно, инструкцию по применению.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу лечения и/или предотвращения опухоли, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества лекарственного средства А и терапевтически эффективного количества лекарственного средства В, где лекарственное средство А содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанное в настоящем документе, конъюгат, описанный в настоящем документе, или слитый белок, или полиспецифическое антитело, описанное в настоящем документе, и лекарственное средство В содержит биспецифическое антитело против PD-1/CTLA-4; предпочтительно, лекарственное средство А и лекарственное средство В вводят либо одновременно, либо последовательно, при этом последовательное введение заключается в том, что сначала вводят лекарственное средство А или сначала вводят лекарственное средство В.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело против PD-1/CTLA-4 содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 35, и аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

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

Используемый в настоящем описании термин EC50 относится к концентрации, обеспечивающей 50% максимального эффекта, то есть к концентрации, которая может вызвать 50% максимального эффекта.

Используемый в настоящем описании термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, которая обычно состоит из двух пар полипептидных цепей (каждая пара с одной «легкой» (L) цепью и одной «тяжелой» (H) цепью). Легкие цепи антител

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

Используемые в настоящем описании термины «mAb» и «моноклональное антитело» относятся к антителу или фрагменту антитела, полученному из группы высокомолекулярных антител, т. е. из группы идентичных молекул антител, за исключением естественных мутаций, которые могут возникнуть спонтанно. Моноклональное антитело обладает высокой специфичностью в отношении одного эпитопа на антигене. Поликлональное антитело по сравнению с моноклональным антителом обычно содержит по меньшей мере 2 или более различных антител, которые, как правило, распознают разные эпитопы на антигене. Моноклональные антитела, как правило, могут быть получены с использованием гибридомной технологии, впервые описанной Kohler et al. (Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting

antibody of predefined specificity [J]. *Nature*, 1975; 256(5517): 495), но также могут быть получены с использованием технологии рекомбинантной ДНК (см., например, Патент США 4816567).

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

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

Используемый в настоящем описании термин «вектор» относится к носителю нуклеиновой кислоты, в который может быть вставлен полинуклеотид. Когда вектор допускает экспрессию белка, кодируемого вставленным полинуклеотидом, такой вектор называют экспрессирующим вектором. Вектор может быть введен в клетку-хозяин путем трансформации, трансдукции или трансфекции, так что элементы генетического вещества, переносимые вектором, могут быть экспрессированы в клетке-хозяине. Векторы хорошо известны специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь ими: плазмиды; фагмиды; космиды; искусственные хромосомы, такие как искусственная дрожжевая хромосома (YAC), искусственная хромосома бактерий (BAC) или искусственная хромосома, полученная из P1 (PAC); фаги, такие как фаги лямбда или фаги M13; и вирусы животных. Вирусы животных, которые можно использовать в качестве векторов, включают, но не ограничиваются ими, ретровирусы (включая лентивирусы), аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса (такие как вирус простого герпеса),

поксвирусы, бакуловирусы, папилломавирусы и паповавирусы (такие как SV40). Вектор может содержать множество элементов, которые контролируют экспрессию, включая, но не ограничиваясь ими, промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности, элементы селекции и репортерные гены. Кроме того, вектор может дополнительно содержать сайт инициации репликации.

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

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

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

используемые в настоящем описании термины «моноклональное антитело» и «mAb» имеют одинаковое значение и могут использоваться взаимозаменяемо; термины «поликлональное антитело» и «pAb» имеют одинаковое значение и используются взаимозаменяемо; термины «полипептид» и «белок» имеют одинаковое значение и используются взаимозаменяемо. Кроме того, в настоящем описании аминокислоты обычно представлены однобуквенными и трехбуквенными сокращениями, известными в данной области техники. Например, аланин может быть представлен A или Ala.

Используемый в настоящем описании термин «фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество» относится к носителю и/или вспомогательному веществу, которые фармакологически и/или физиологически совместимы с объектом и активным ингредиентом. Такие носители и/или вспомогательные вещества хорошо известны в данной области (см., например,

Remington's Pharmaceutical Sciences, под редакцией Gennaro AR, 19th Ed., Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995), включая, но не ограничиваясь ими: регуляторы pH, поверхностно-активные вещества, адъюванты и усилители ионной силы. Например, регуляторы pH включают, но не ограничиваются ими, фосфатный буфер; поверхностно-активные вещества включают, но не ограничиваются ими, катионные, анионные или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как Tween-80; усилители ионной силы включают, но не ограничиваются ими, хлорид натрия.

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

Полезные эффекты настоящего изобретения:

Моноклональное антитело по настоящему изобретению может специфически связываться с CD73 и может эффективно ингибировать реакцию ферментативной активности CD73 в режиме конкуренции без субстрата, снижать выработку аденозина и стимулировать активность Т-клеток и ингибирующее действие на опухоль. Между тем, комбинация антитела по настоящему изобретению и биспецифического антитела против PD-1/CTLA-4 обладает фармакологическим эффектом эффективного ингибирования пролиферации опухолевых клеток, который превосходит соответствующий индивидуальный эффект биспецифического антитела против PD-1/CTLA-4 или антитела против CD73.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На ФИГ. 1 показана аппроксимирующая кривая данных динамики аффинности связывания 19F3H2L3(hG1DM) с C1q.

На ФИГ. 2 показана аппроксимирующая кривая данных динамики аффинности связывания MEDI9447 с C1q.

На ФИГ. 3 показана аппроксимирующая кривая данных динамики аффинности связывания IgG1-антитела дикого типа с C1q.

На ФИГ. 4 показана аппроксимирующая кривая данных динамики аффинности связывания 19F3H2L3(hG1DM) с FcγRIIIa.

На ФИГ. 5 показана аппроксимирующая кривая данных динамики аффинности связывания MEDI9447 с FcγRIIIa.

На ФИГ. 6 показана аппроксимирующая кривая данных динамики аффинности связывания IgG1-антитела дикого типа с FcγRIIIa.

На ФИГ. 7 показана масса опухоли каждой группы мышей на 23-й день после распределения по группам. ** P < 0,01.

На ФИГ. 8 показаны скорости изменения массы тела каждой группы животных в ходе эксперимента по сравнению с днем 0.

На ФИГ. 9 показано антитело против CD73, эффективно ингибирующее ферментативную активность CD73.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Варианты осуществления настоящего изобретения будут подробно описаны ниже со ссылкой на примеры. Специалисты в данной области поймут, что следующие примеры предназначены только для иллюстрации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничения объема настоящего изобретения. Примеры, в которых конкретные технологии или условия не указаны, выполняются в соответствии с технологиями или условиями, описанными в публикациях в данной области техники (например, см. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, authored by J. Sambrook et al., and translated by Huang Peitang et al., third edition, Science Press) или в соответствии с инструкцией к продукту. Используемые реагенты или инструменты являются обычными коммерчески доступными продуктами, если их производители не указаны.

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

В следующих примерах настоящего изобретения использованное антитело положительного контроля MEDI9447 (олеклумаб) было произведено AkesoBiorpharma, Inc., последовательность которого была идентична последовательности антител, описанной в Международных непатентованных названиях фармацевтических веществ (INN), опубликованных в открытом доступе MedImmune Limited на сайте ВОЗ (Всемирная организация здравоохранения (2016). «International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances (INN). Proposed INN: List 116» (PDF). WHO Drug Information. 30(4), P661-662).

В следующих примерах настоящего изобретения в качестве константной области тяжелой цепи антитела положительного контроля и контрольного антитела IgG1 дикого типа использовали С-область гамма-1-цепи Ig, № доступа: P01857; константная область легкой цепи представляла собой С-область каппа-цепи Ig, № доступа: P01834.

В следующих примерах настоящего изобретения используемый C1q был приобретен у Fitzgerald, кат. № A16050201;

в следующих примерах настоящего изобретения используемый FcγRIIIa-bio был приобретен у Sino Biological, кат. № LC09JA0407;

в следующих примерах настоящего изобретения используемый специфический ингибитор CD73 (5'-нуклеаза) APCP (альфа, бета-метиленаденозин-5'-дифосфат, 5'-α, β-метиленаденозиндифосфат) был получен от Sigma, кат. № M3763-10MG.

В следующих примерах настоящего изобретения последовательность антитела изотипического контроля, человеческого IgG против лизоцима куриного яйца (т. е. антитела против HEL или IgG человека, сокращенно hIgG, или изотипического контроля) была получена из последовательности варибельной области Fab F10.6.6 в исследовании

Acierno et al. под названием «Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies» (Acierno et al., J Mol Biol., 2007; 374(1):130-146).

Пример 1: Получение антитела против CD73 19F3

1. Получение гибридной клеточной линии LT014

Антигеном, использованным для получения антитела против CD73, был человеческий NT5E-His (для NT5E, GenbankID: NP_002517.1, положение: 1-552, приготовлен AkesoBiorpharma, Inc.). Клетки селезенки иммунизированных мышей сливали с клетками миеломы мышей для получения гибридных клеток. Гибридные клетки подвергали скринингу с помощью непрямого ИФА с использованием человеческого NT5E-биотин (для NT5E, GenbankID: NP_002517.1, положение: 1-552, приготовлен AkesoBiorpharma, Inc.) в качестве антигена, и были получены гибридные клетки, способные секретировать антитело, специфически связывающееся с CD73. Гибридные клетки, полученные скринингом, подвергали лимитирующему разведению для получения стабильной гибридной клеточной линии. Гибридная клеточная линия была обозначена LT014, а секретированное из нее моноклональное антитело было обозначено как 19F3.

Гибридная клеточная линия LT014 (также называемая CD73-19F3) была депонирована в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) 21 июня 2018 г. под CCTCC NO. C2018137, адрес депозитария: Уханьский университет, Ухань, Китай, почтовый индекс: 430072.

2. Получение антитела против CD73, 19F3

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

Пример 2: Анализ последовательности антитела против CD73, 19F3

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

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

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

Продукты, клонированные с помощью ТА, секвенировали напрямую, и результаты секвенирования антитела против CD73, 19F3, следующие:

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

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 2 длиной 121 а.о.;

где последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи представлены в SEQ ID NO: 15, 16 и 17, соответственно.

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

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

где последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи представлены в SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно.

Пример 3. Дизайн и получение легких и тяжелых цепей гуманизированных антител против CD73 человека

Последовательности варибельной области 19F3H1L1(hG1DM), 19F3H2L2(hG1DM) и 19F3H2L3(hG1DM) были получены путем компьютерного моделирования моделей антител в соответствии с мутациями дизайна модели на основе последовательностей антитела 19F3, полученных в примере 2, и на основе трехмерной кристаллической структуры белка CD73 человека (Hage T, Reinemer P, Sebald W., Crystals of a 1:1 complex between human interleukin-4 and the extracellular domain of its receptor alpha chain. Eur J Biochem. 1998; 258(2):831-6);

Сконструированные последовательности варибельных областей гуманизированных антител следующие:

(1) Последовательности варибельных областей тяжелой и легкой цепи гуманизированного моноклонального антитела 19F3H1L1(hG1DM)

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

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 6 длиной 121 а.о., а последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи представлены в SEQ ID NO: 15, 16 и 17, соответственно.

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

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 8 длиной 113 а.о., а последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи представлены в SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно.

(2) Последовательности варибельных областей тяжелой и легкой цепи гуманизированного моноклонального антитела 19F3H2L2(hG1DM)

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

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 10 длиной 121 а.о., а последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи представлены в SEQ ID NO: 15, 16 и 17, соответственно.

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

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 12 длиной 113 а.о., а последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи представлены в SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно.

(3) Последовательности варибельных областей тяжелой и легкой цепи гуманизированного моноклонального антитела 19F3H2L3(hG1DM)

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

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 10 длиной 121 а.о., а последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи представлены в SEQ ID NO: 15, 16 и 17, соответственно.

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

Кодируемая аминокислотная последовательность представлена в SEQ ID NO: 14 длиной 113 а.о., а последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи представлены в SEQ ID NO: 18, 19 и 20, соответственно.

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

Константные области легкой цепи 19F3H1L1(hG1DM), 19F3H2L2(hG1DM) и 19F3H2L3(hG1DM) представляли собой С-область каппа-цепи Ig, № доступа: P01834.

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

кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 19F3H1L1(hG1DM), кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 19F3H2L2(hG1DM) и кДНК тяжелой цепи и кДНК легкой цепи 19F3H2L3(hG1DM) были клонированы в pUC57simple (предоставлено Genscript) для получения векторов pUC57simple-19F3H1(hG1DM), pUC57simple-19F3L1, pUC57simple-19F3H2(hG1DM), pUC57simple-19F3L2 и pUC57simple-19F3L3. Ссылаясь на стандартные методы, описанные в Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition), полноразмерные гены тяжелых и легких цепей, синтезированные с помощью расщепления EcoRI&HindIII, субклонировали в экспрессирующий вектор pcDNA3.1 посредством расщепления ферментом рестрикции (EcoRI&HindIII) с получением экспрессирующих плазмид pcDNA3.1-19F3H1, pcDNA3.1-19F3L1, pcDNA3.1-19F3H2, pcDNA3.1-19F3L2 и pcDNA3.1-19F3L3, а гены тяжелой/легкой цепи рекомбинантных экспрессирующих плазмид дополнительно секвенировали. Затем сконструированные комбинации генов, содержащие соответствующие рекомбинантные плазмиды легкой и тяжелой цепей (pcDNA3.1-19F3H1(hG1DM)/pcDNA3.1-19F3L1, pcDNA3.1-19F3H2(hG1DM)/pcDNA3.1-

19F3L2, и pcDNA3.1-19F3H2(hG1DM)/pcDNA3.1-19F3L3) по отдельности котрансфецировали в клетки 293F, а культуральные растворы собирали и очищали. После того, как последовательности были проверены, готовили свободные от эндотоксина экспрессирующие плазмиды, которые транзиторно трансфецировали в клетки HEK293 для экспрессии антител. Через 7 дней культивирования культуральные растворы собирали и подвергали аффинной очистке на колонке с Протеином А для получения гуманизированных антител.

Пример 4: Анализ Динамики Аффинности антител против CD73 с C1q и FcγRIIIa

(1) Анализ динамики аффинности антител против CD73 с C1q

Буфером для разведения образца был PBS (0,02% Tween-20, 0,1% BSA, pH 7,4). 50 мкг/мл антитела иммобилизовали на сенсоре FAB2G при высоте иммобилизации примерно 2 нм, и сенсоры уравнивали в буфере в течение 60 с. Антителу, иммобилизованному на сенсоре, давали связаться с антигеном C1q в концентрациях 0,63-10 нМ (двухкратные серийные разведения) в течение 60 с, и антиген-антитело диссоциировали в буфере в течение 60 с. Сенсор регенерировали 4 раза в 10 мМ глицина, pH 1,7, каждый раз по 5 с. Скорость встряхивания планшета для образцов составляла 1000 об/мин, температура детектирования составляла 30 °С, а частота детектирования составляла 0,6 Гц. Данные анализировали с помощью модели подбора 1:1 для получения констант аффинности. Для сбора данных использовали программное обеспечение Fortebio Data Acquisition 7.0, а для анализа данных программное обеспечение Fortebio Data Analysis 7.0.

Согласно результатам, показанным в Таблице 1 и на ФИГ. 1-3, ни 19F3H2L3(hG1DM), ни MEDI9447 не обладали активностью связывания с C1q.

ID образца	KD (M)	kon (1/Mc)	Стандартная ошибка (kon)	Kdis (1/c)	Стандартная ошибка (kdis)
19F3H2L3(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
MEDI9447	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
IgG1-антитело дикого типа	1,37E-09	5,53E+06	4,27E+05	7,58E-03	4,84E-04

$KD = kdis / kon$

(2) Анализ динамики аффинности антител против CD73 с FcγRIIIa

Буфером для разведения образца был PBS (0,02% Tween-20, 0,1% BSA, pH 7,4). 0,5 мкг/мл FcγRIIIa (от Sino Biological) иммобилизовали на сенсоре SA в течение 120 с, и сенсор уравнивали в буфере в течение 60 с. Иммобилизованному на сенсоре CD16a давали возможность связываться с антителами в концентрациях 31,3-500 нМ (двухкратные серийные разведения) в течение 60 с, и антитело-антиген диссоциировали в буфере в течение 60 с. Сенсор регенерировали 10 мМ NaOH. Температура детектирования составляла 30 °С, а частота - 0,6 Гц. Данные анализировали с помощью модели подбора 1:1 для получения констант аффинности.

Согласно результатам, показанным в Таблице 2 и на ФИГ. 4-6, 19F3H2L3(hG1DM) не связывался с FcγRIIIa, тогда как MEDI9447 обладал активностью связывания с FcγRIIIa.

ID образца	KD (M)	kon (1/Mc)	Стандартная ошибка (kon)	kdis (1/c)	Стандартная ошибка (kdis)
19F3H2L3(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
MEDI9447	1,41E-07	2,43E+05	4,36E+04	3,42E-02	2,08E-03
IgG1-антитело дикого типа	1,25E-07	1,76E+05	2,22E+04	2,20E-02	1,11E-03

$$KD = kdis / kon$$

Пример 5: Комбинация антитела против CD73 и биспецифического антитела против CTLA-4/PD-1 эффективно блокирует рост опухолевых клеток

В этом исследовании изучали фармакологическую активность комбинации антитела против CD73 (т. е. 19F3H2L3(hG1DM)) и биспецифического антитела против PD-1/CTLA-4 BiAb004 (hG1TM) (аминокислотная последовательность тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 35, аминокислотная последовательность легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 36, а аминокислотные последовательности CDR легкой и тяжелой цепей представлены в SEQ ID NO: 23 - SEQ ID NO: 34) в ингибировании роста опухоли.

Согласно результатам, показанным на ФИГ. 7, комбинация антитела против CD73 и биспецифического антитела против PD-1/CTLA-4 продемонстрировала более превосходный ингибирующий опухоль эффект, чем индивидуально антитело против CD73 и биспецифическое антитело против PD-1/CTLA-4, и не оказывала существенного влияния на массу тела мышей (ФИГ. 8).

Таблица 3 Дизайн исследования

N (количество мышей в каждой группе)	Группа введения	Доза введения (мг/кг)	Время начала введения	Частота фактического введения
8	Антитело изотипического контроля	30	На 5 день после начала инокуляции, Д0	В1W × 3,5, 7 раз в целом, Внутривентрикулярная инъекция
8	Антитело против CD73	30		
8	Антитело против PD-1/CTLA-4	0,2		
8	Антитело против PD-1/CTLA-4	0,2		
	Антитело против CD73	30		

Клетки рака толстой кишки мыши MC38-hPDL1/hCD73 (предоставленные Gempharmatech Co., Ltd.) размораживали с числом пассажей Pn+3. Собирали клетки MC38-hPDL1/hCD73 в логарифмической фазе роста и удаляли культуральный раствор. Клетки дважды промывали PBS, а затем инокулировали в правую переднюю конечность мышей C57BL/6-hPD1/hPDL1/hCD73 (предоставлено Gempharmatech Co., Ltd.) (99,1% жизнеспособности клеток MC38-hPDL1/hCD73 до перенесения опухоли и 96,4% жизнеспособности клеток после перенесения опухоли) в количестве $2 \times 10^6 / 100$ мкл/мышь. На 5-й день после инокуляции, когда средний объем опухоли достиг 86,02 мм³, 32 мыши были рандомизированы на 4 группы по 8 животных в зависимости от объема опухоли. День распределения по группам был определен как день 0, и введение начинали в день 0 в соответствии с Таблицей 3.

После инокуляции клеток еженедельно рутинно контролировали влияние опухолей на нормальное поведение животных. Введение проводили в День 0, День 3, День 7, День 10, День 14, День 17 и День 22. Наблюдали за размером опухоли, и мышей взвешивали в День 0, День 3, День 6, День 10, День 13, День 17, День 20 и День 23. После завершения эксперимента на 23-й день собирали и взвешивали опухолевые ткани из каждой группы животных. Экспериментальные результаты, такие как скорость изменения массы тела мыши, массы опухоли и т. д., выражали как среднее \pm стандартная ошибка (среднее \pm SEM). Т-критерий независимой выборки использовали для определения наличия существенных различий между различными терапевтическими группами и контрольной группой, при этом считали, что $P < 0,05$ указывает на значимое различие. Данные наносили на график с помощью Graphpad или Excel.

Пример 6. Детектирование ингибирования антителом против CD73 ферментативной активности CD73, эндогенно экспрессируемого в клетках

Экспериментальные процедуры были следующими. Брали клетки MDA-MB-231 (от ATCC, HTB-26) в логарифмической фазе в хорошем состоянии, ресуспендировали в бессывороточном культуральном растворе RPMI-1640 и затем подсчитывали. Клетки MDA-MB-231 высевали в 96-луночный планшет в количестве 3×10^4 клеток/100 мкл/на лунку. Антитело разводили бессывороточным культуральным раствором RPMI-1640 в исходной концентрации 200 мкг/мл (серийное 2,5-кратное разведение). Антитело добавляли в 96-луночный планшет в количестве 50 мкл/на лунку, и планшет инкубировали при 37 °C в течение 1 часа. Через 1 час в каждую лунку добавляли 50 мкл 600 мкМ AMP, разбавленного RPMI-1640. Через 3 ч отбирали 25 мкл супернатанта клеточной культуры и переносили в новый 96-луночный планшет, в каждую лунку добавляли по 25 мкл 100 мкМ АТФ. Добавляли 50 мкл СТГ (CellTiter-Glo® One Solution Assay, promega, кат. G8461) раствора для проявления цвета в каждую лунку, и данные считывали с помощью тестера для микропланшетов с несколькими метками (PerkinElmer 2140-0020). Антитело изотипического контроля и CD73-специфический ингибитор APCP использовали в качестве отрицательного и положительного контроля, соответственно.

Экспериментальные результаты были следующими: как показано на ФИГ. 9, 19F3, 19F3H2L3(hG1DM), 19F3H2L3(hG1DM) и 19F3H2L3(hG1DM), все показали дозозависимое ингибирование активности эндогенно-экспрессируемого фермента CD73, катализирующего АМР до аденозина А в MDA-MB-231, таким образом, было получено дозозависимое уменьшение полученной средней интенсивности флуоресценции, RLU.

Приведенные выше экспериментальные результаты показали, что добавленный АМР может катализироваться ферментом CD73, эндогенно экспрессируемым на клеточной поверхности клетками MDA-MB-231, а затем превращаться в аденозин в условиях отсутствия обработки антителом против CD73, так что ингибирование активности люциферазы было ослаблено. Однако после добавления антитела, поскольку CD73 связывался с антителом, его ферментативная активность снижалась, так что АМР не мог превращаться в аденозин. Предполагается, что антитело против CD73 эффективно ингибирует реакцию ферментативной активности CD73 в режиме конкуренции без субстрата и снижает продукцию аденозина.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 19F3: (SEQ ID NO: 1)

GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGACCAGAGCTGGTGAAGCCTGGCGCCTCCA
TGCGGATGTCTTGTAAGGCCTCTGGCTACAGCTTCACCGGCTATAACAATGAACTGGG
TGAAGCAGTCTCACGGCAAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCTTACAAT
GCCGGCACCCAGCTATAACCAGAAGTTTAAGGGCAAGGCCACCCTGACAGTGGACAA
GAGCTCCTCTACCGCCTACATGGAGCTGCTGTCCCTGACATCTGAGGATAGCGCCGT
GТАCTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGATATGGCGGGCGACTACTTTGATTATTGGGG
CCAGGGCACCACTGACAGTGAGCTCC

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи 19F3:
(SEQ ID NO: 2)

EVQLQQSGPELVKPGASMRMSCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINP
YNAGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARSEYRYGGDYFDY
WGQGTTLTVSS

Нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи 19F3: (SEQ ID NO: 3)

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAAGCTCCCTGGCAATGAGCGTGGGACAGA
AGGTGACAATGTCTTGTAAGTCTAGCCAGAGCCTGCTGAACTCCTCTAATCAGAAGA
ACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCCAAGCTGCTGGTGTACT
TTGCCAGCACCCAGGGAGTCCGGAGTGCCTGACAGATTTCATCGGCTCCGGCTCTGGCA
CAGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCGTGCAGGCAGAGGACCTGGCAGATTATTTCT
GCCAGCAGCACTACGACACCCCTTATACATTTGGCGGGCGGCACCAAGCTGGAGATC
AAG

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи 19F3:
(SEQ ID NO: 4)

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLL
 VYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYDTPYTFGGGTKLEIK

Нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи
 19F3H1L1(hG1DM): (SEQ ID NO: 5)

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCT
 ATGAAGATGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGCTATAACAATGAACTG
 GGTGAAGCAGGCCACGGCCAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCTTACA
ATGCCGGCACCTCTTATAACCAGAAGTTTCAGGGCAAGGCCACCCTGACAGTGGAC
 AAGTCCACCTCTACAGCCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGC
 CGTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGATATGGCGGGCGACTACTTTGATTATTG
 GGGCCAGGGCACCACTGACCGTGTCTAGC

Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи
 19F3H1L1(hG1DM): (SEQ ID NO: 6)

QVQLQSGAEVVKPGASMKMSCKASGYSFTGYTMNWVKQAHGQNLEWIGLIN
PYNAGTSYNQKFQGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSEYRYGGDYFDY
 WGQGTTLTVSS

Нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи
 19F3H1L1(hG1DM): (SEQ ID NO: 7)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCAATGTCTGTGGGAGAGA
 GGGTGACAATGTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAACTCCTCTAATCAGAAGA
ACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTAAGCTGCTGGTGTACT
TTGCCTCTACCAGGGAGAGCGGAGTGCCAGACAGATTCTCTGGCAGCGGCTCCGGC
 ACAGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCGTGCAGGCAGAGGACCTGGCAGATTATTTTC
 TGCCAGCAGCACTACGATACCCCCTATACATTTGGCGGGCGGCACCAAGCTGGAGAT
 CAAG

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи
 19F3H1L1(hG1DM): (SEQ ID NO: 8)

DIVMTQSPSSLAMSVGERVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQAPKLL
 VYFASTRESGVPDRFSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYDTPYTFGGGTKLEIK

Нуклеотидные последовательности вариабельных областей тяжелой цепи
 19F3H2L2(hG1DM) и 19F3H2L3(hG1DM): (SEQ ID NO: 9)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTG
 TGAAGGTGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGCTATAACAATGAACTGG
 GTGAGGCAGGCACCAGGACAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCTTACAA
TGCCGGCACCTCTTATAACCAGAAGTTTCAGGGCAAGGTGACCCTGACAGTGGACA
 AGTCCACCTCTACAGCCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGCC
 GTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGATATGGCGGGCGACTACTTTGATTATTGG
 GGCCAGGGCACCACTGACCGTGTCTAGC

Аминокислотные последовательности вариабельных областей тяжелой цепи
 19F3H2L2(hG1DM) и 19F3H2L3(hG1DM): (SEQ ID NO: 10)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQONLEWIGLINP
YNAGTSYNQKFQGKVTTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCCARSEYRYGGDYFDY
 WGQGTTLTVSS

Нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи 19F3H2L2(hG1DM): (SEQ ID NO: 11)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCCGTGTCTGTGGGAGAGC
 GGGTGACAATCTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAACTCCTCTAATCAGAAGA
ACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACT
TCGCCTCTACCAGGGAGAGCGGAGTGCCAGACAGATTCTCTGGCAGCGGCTCCGGC
 ACAGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCGTGCAGGCAGAGGACGTGGCAGATTACTA
TTGCCAGCAGCACTACGATACCCCCTATACATTTGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGAT
 CAAG

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи 19F3H2L2(hG1DM): (SEQ ID NO: 12)

DIVMTQSPSSLAIVSGERVTISCKSSQSLLNSSNQKNYLLAWYQQKPGQAPKLLIY
FASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVADYYCQQHYDTPYTFGGGTKLEIK

Нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи 19F3H2L3(hG1DM): (SEQ ID NO: 13)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCCGTGTCTGTGGGAGAGC
 GGGTGACAATCTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAACTCCTCTAATCAGAAGA
 ACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACT
 TCGCCTCTACCAGGGAGAGCGGAGTGCCAGACAGATTCTCTGGCAGCGGCTCCGGC
 ACAGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGGCAGAGGACGTGGCCGTGTAATAT
 TGCCAGCAGCACTACGATACCCCCTATACATTTGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGAT
 CAAG

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи 19F3H2L3(hG1DM): (SEQ ID NO: 14)

DIVMTQSPSSLAIVSGERVTISCKSSQSLLNSSNQKNYLLAWYQQKPGQAPKLLIY
FASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYDTPYTFGGGTKLEIK

CDR 19F3 и 19F3H1L1(hG1DM), 19F3H2L2(hG1DM), и 19F3H2L3(hG1DM)

HCDR1: GYSFTGYT (SEQ ID NO: 15)

HCDR2: INPYNAGT (SEQ ID NO: 16)

HCDR3: ARSEYRYGGDYFDY (SEQ ID NO: 17)

LCDR1: QSLLNSSNQKNY (SEQ ID NO: 18)

LCDR2: FAS (SEQ ID NO: 19)

LCDR3: QQHYDTPYT (SEQ ID NO: 20)

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

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAP

EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 21)

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

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
 NO: 22)

Аминокислотные последовательности 9 CDR, ассоциированных с вариабельной
 областью тяжелой цепи BiAb004(hG1TM), представлены ниже:

HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 23)
 HCDR2: ISGGGRYT (SEQ ID NO:24)
 HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 25)
 HCDR4: GYSFTGYT (SEQ ID NO: 26)
 HCDR5: INPYNIT (SEQ ID NO: 27)
 HCDR6: ARLDYRSY (SEQ ID NO: 28)
 HCDR7: TGAVTTSNF (SEQ ID NO: 29)
 HCDR8: GTN (SEQ ID NO: 30)
 HCDR9: ALWYSNHWV (SEQ ID NO:31)

Аминокислотные последовательности 3 CDR, ассоциированных с вариабельной
 областью легкой цепи BiAb004(hG1TM), представлены ниже:

LCDR1: QDINTY (SEQ ID NO: 32)
 LCDR2: RAN (SEQ ID NO: 33)
 LCDR3: LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 34)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи (713 а.о., сайты мутаций
 подчеркнуты) BiAb004(hG1TM)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISG
 GGRTYTYYPDSVKGRFTISRDNKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPC
 PAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSG
 GGGSQVQLVESGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQCLEWIGLINP
 YNNITNYAQKFQGRVTFVDTSTISAYMELSRLRSDDTGVYFCARLDYRSYWGQGTLV
 TVSAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGQAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNFP
 NWVQQKPGQAPRSLIGGTNNKASWTPARFSGSLLGGKAALTISGAQPEDEAEYYCALW
 YSNHWVFGCGTKLTVLR(SEQ ID NO: 35)

Аминокислотная последовательность легкой цепи (214 а.о.) BiAb004(hG1TM)

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLV
SGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO: 36)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

HCDR1, HCDR2 и HCDR3 варибельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 10; и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 варибельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 14;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8;

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

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

4. Антитело против CD73 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или 2, где константная область тяжелой цепи антитела представляет собой C-область гамма-1-цепи Ig, № доступа: P01857; константная область легкой цепи представляет собой C-область каппа-цепи Ig, № доступа: P01834.

5. Антитело против CD73 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или 2, где антитело представляет собой моноклональное антитело, гуманизованное антитело, химерное антитело или полиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело).

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

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

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

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

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

95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с этой последовательностью, или аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) консервативных аминокислотных мутаций (предпочтительно замен, вставок или делеций) по сравнению с этой последовательностью;

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

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

(6) выделенного полипептида, содержащего последовательность SEQ ID NO: 14, последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% или 90%, предпочтительно по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

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

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

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

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

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

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

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

14. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6, конъюгат по п. 11 или слитый белок или полиспецифическое антитело по п. 12, где, необязательно, фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество; предпочтительно фармацевтическая композиция находится в форме, подходящей для введения путем подкожной инъекции, внутрикожной инъекции,

внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции или инъекции в очаг поражения.

15. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-6, конъюгата по п. 11, слитого белка или полиспецифического антитела по п. 12 при получении лекарственного средства для лечения и/или предотвращения опухоли (такой как солидная опухоль, предпочтительно немелкоклеточный рак легкого, рак предстательной железы (включая метастатический кастрационно-резистентный рак предстательной железы (mCRPC)), трижды негативный рак молочной железы, рак яичников, колоректальный рак (включая тип с микросателлитной стабильностью (MSS) и с дисфункцией системы репарации неспаренных оснований/с высоким уровнем микросателлитной нестабильности (dMMR/MSI-высокая)), рак желудка (включая тип с микросателлитной стабильностью (MSS) и с дисфункцией системы репарации неспаренных оснований/с высоким уровнем микросателлитной нестабильности (dMMR/MSI-высокая)), меланома, рак головы и шеи, почечно-клеточная карцинома или аденокарцинома протоков поджелудочной железы), или при получении лекарственного средства для диагностики опухоли.

16. Гибридная клеточная линия, выбранная из:

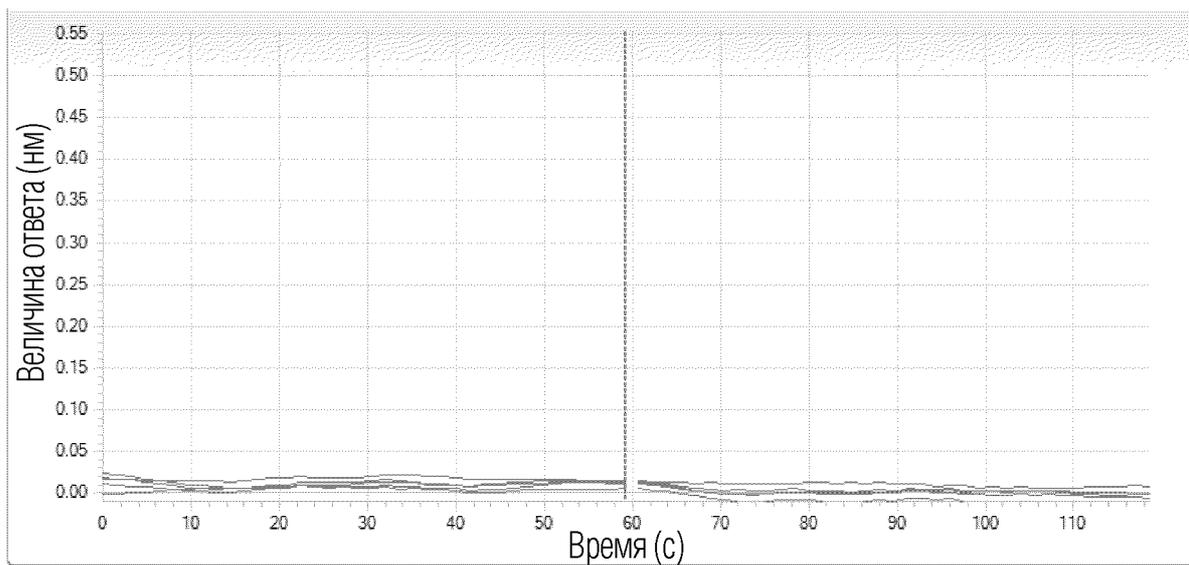
LT014, депонированной в Китайском центре коллекции типовых культур (CCTCC) под номером CCTCC NO. C2018137.

17. Набор, содержащий (1) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6, конъюгат по п. 11, слитый белок или полиспецифическое антитело по п. 12, и (2) биспецифическое антитело против PD-1/CTLA-4 и необязательно инструкции по применению; предпочтительно биспецифическое антитело против PD-1/CTLA-4 содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 35 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 36.

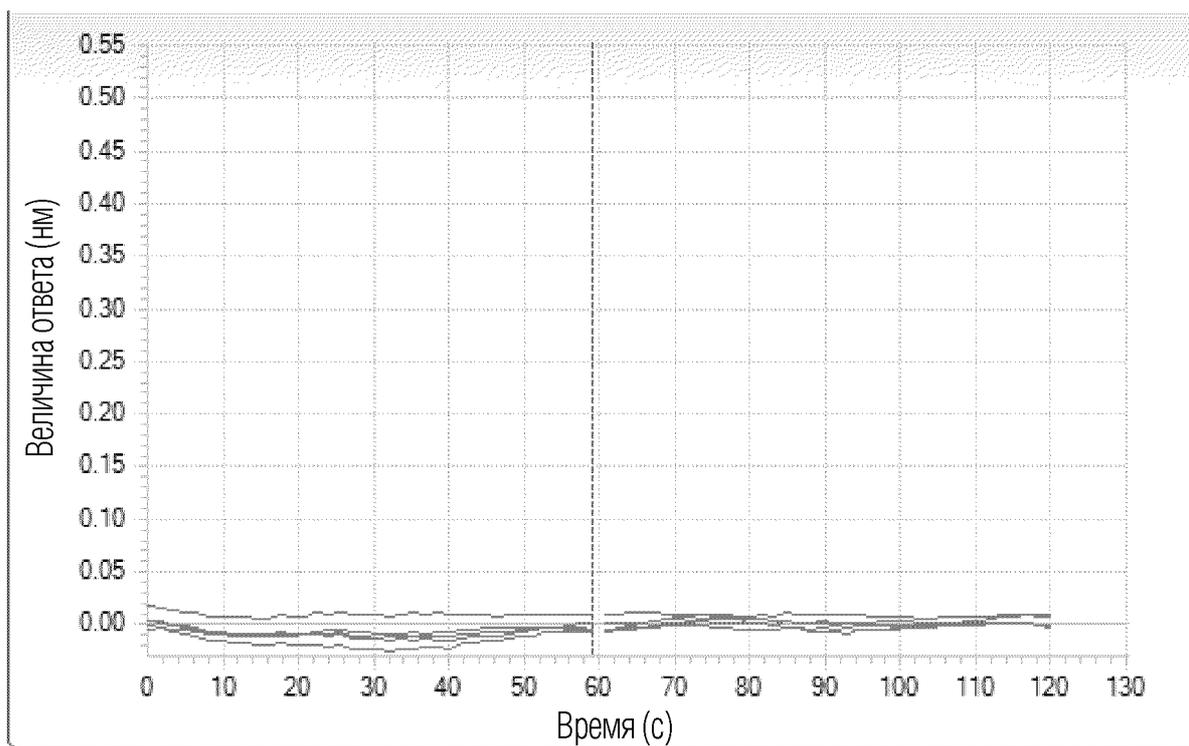
18. Способ лечения и/или предотвращения опухоли, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества лекарственного средства А и терапевтически эффективного количества лекарственного средства В, где лекарственное средство А содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из 1-6, конъюгат по п. 11, или слитый белок или полиспецифическое антитело по п. 12, и лекарственное средство В содержит биспецифическое антитело против PD-1/CTLA-4; предпочтительно, лекарственное средство А и лекарственное средство В вводят либо одновременно, либо последовательно, где последовательное введение заключается в том, что сначала вводят лекарственное средство А или сначала вводят лекарственное средство В; предпочтительно биспецифическое антитело против PD-1/CTLA-4 содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 35 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 36.

По доверенности

1/4

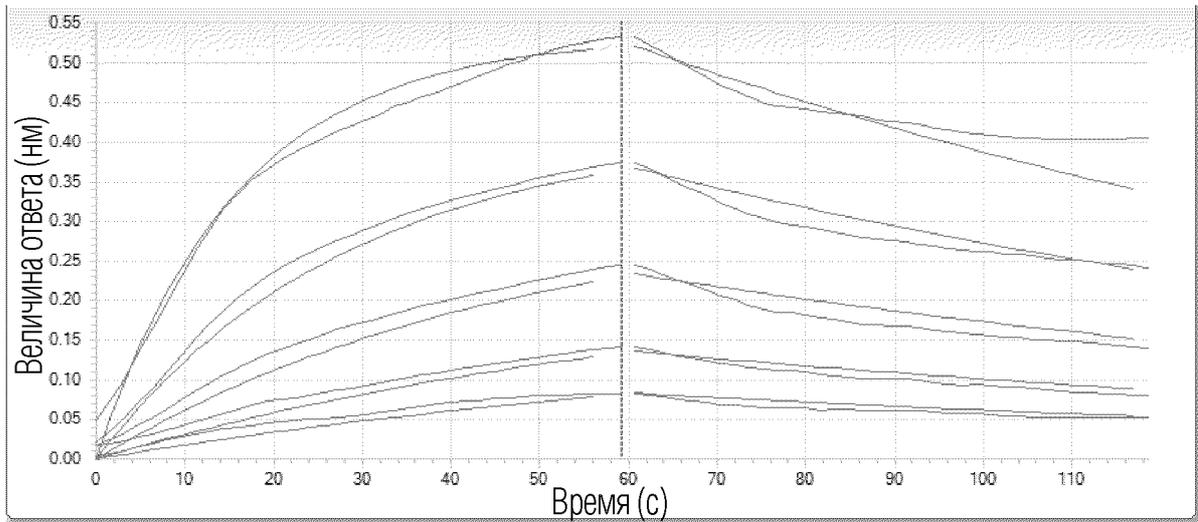


ФИГ. 1

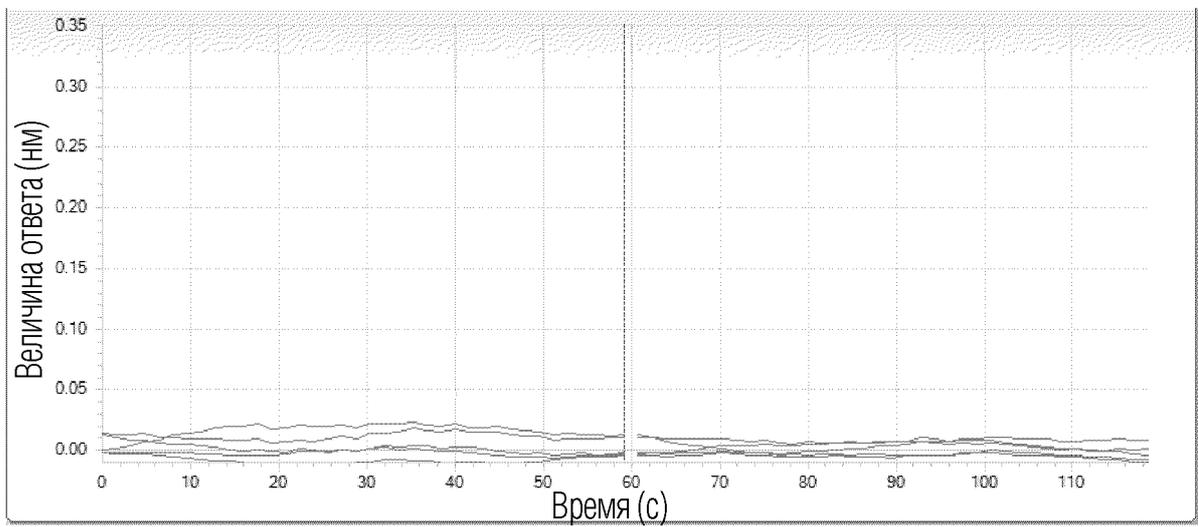


ФИГ. 2

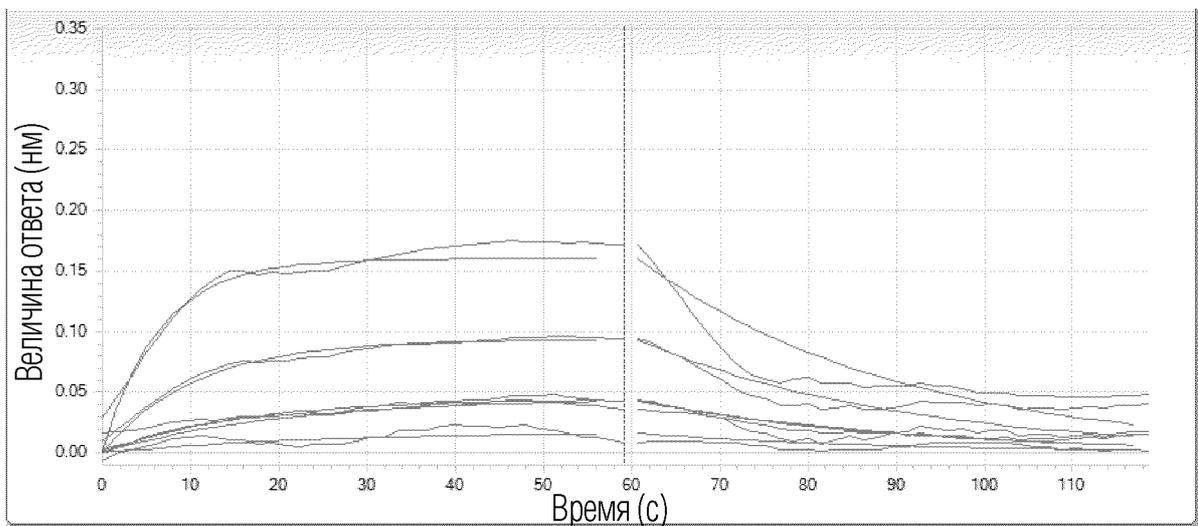
2/4



ФИГ. 3

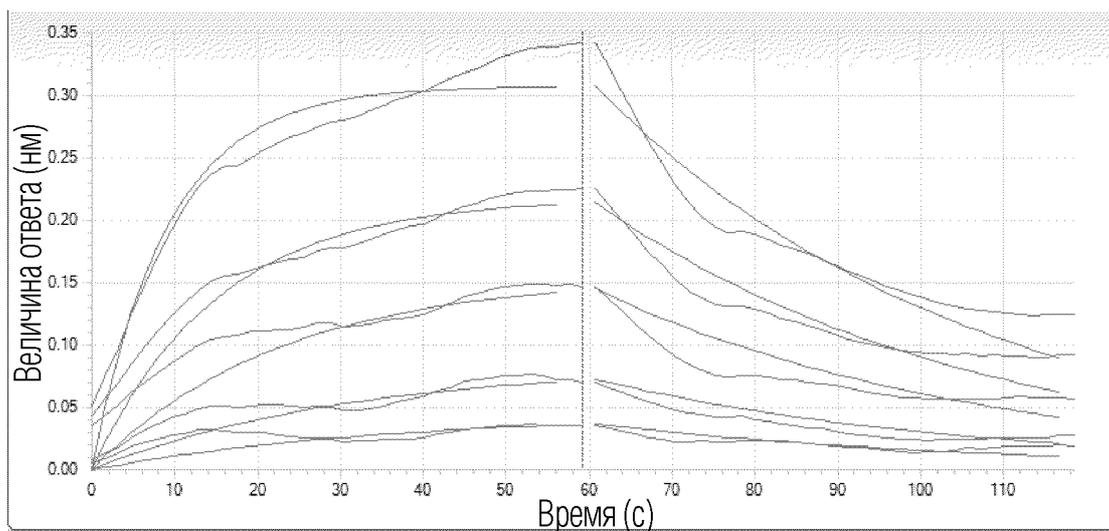


ФИГ. 4

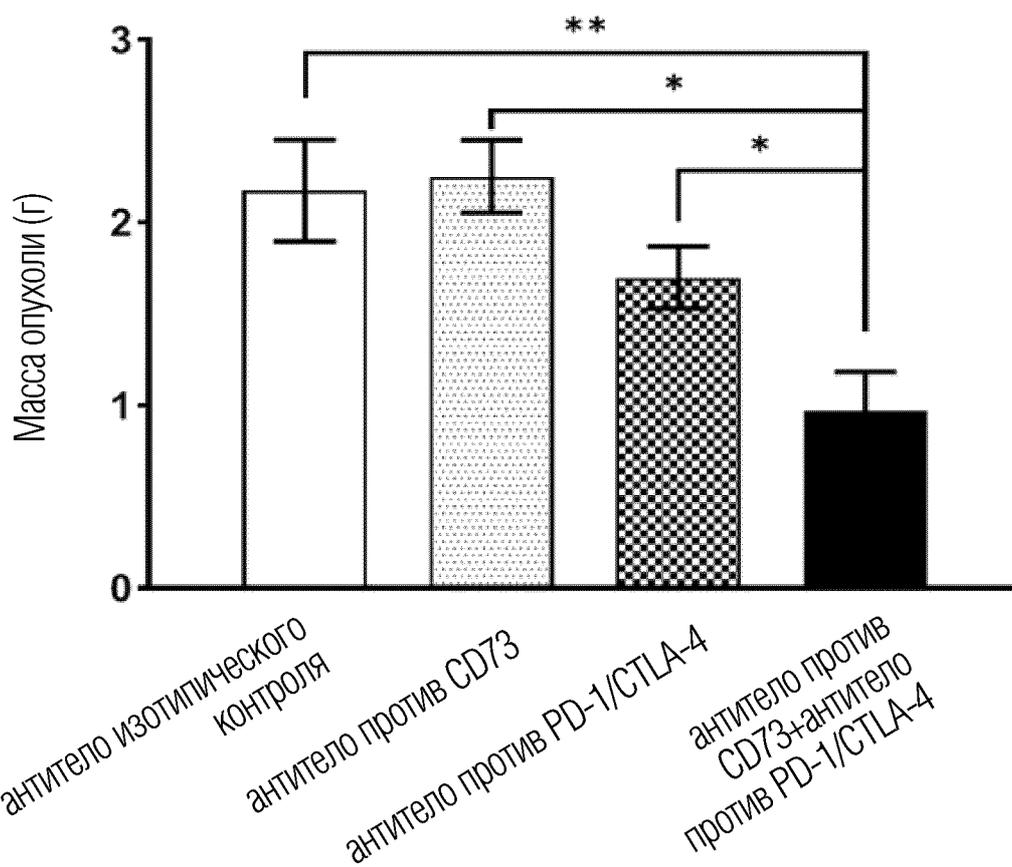


ФИГ. 5

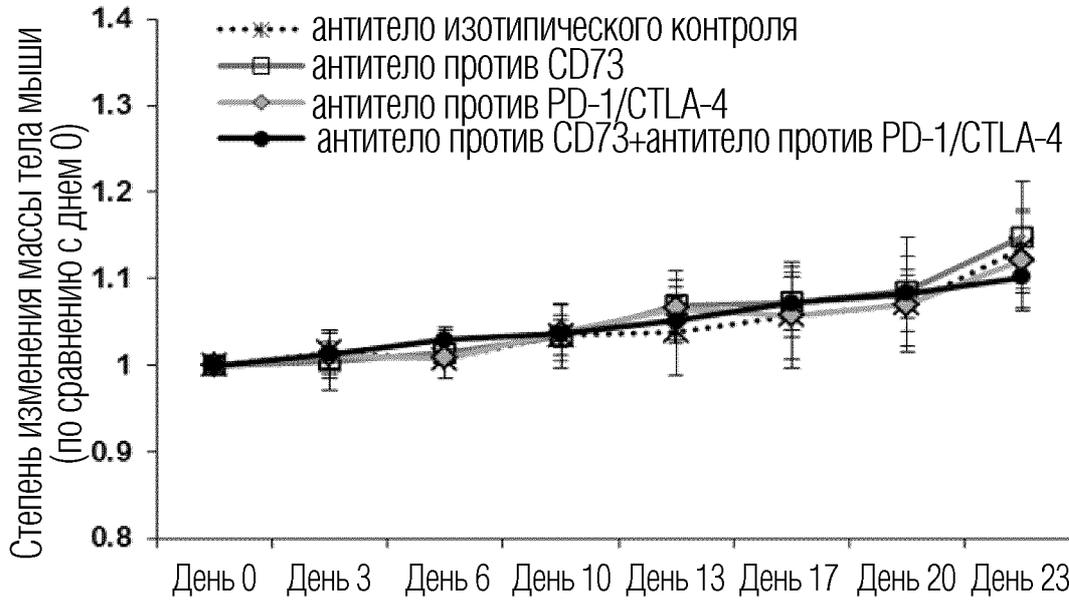
3/4



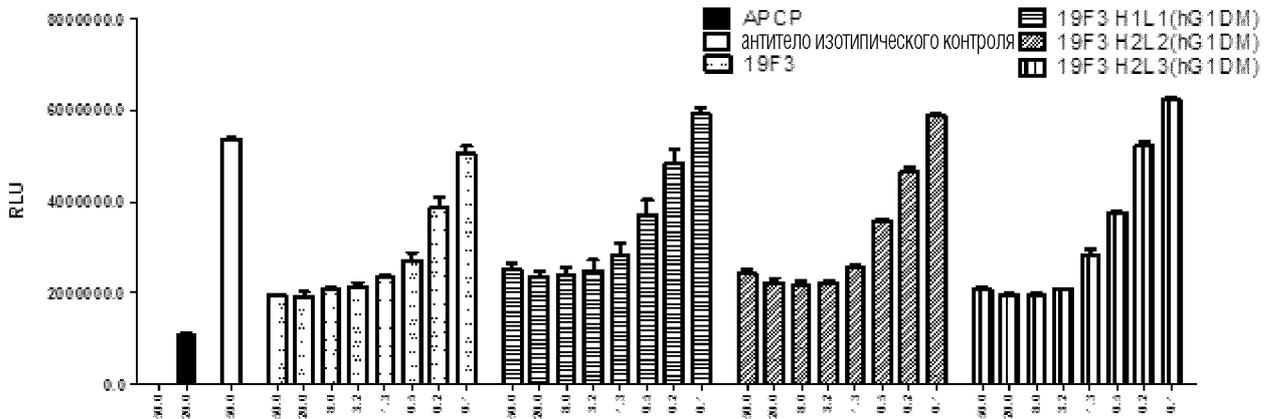
ФИГ. 6



ФИГ. 7



ФИГ. 8



ФИГ. 9