



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113874397 A

(43) 申请公布日 2021.12.31

(21) 申请号 202080037139.7

M·J·沃尔特斯 S·W·杨

(22) 申请日 2020.03.27

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(30) 优先权数据

代理人 封新琴

62/826,728 2019.03.29 US

(51) Int.Cl.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

G07K 16/28 (2006.01)

2021.11.18

C12Q 1/6886 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/025242 2020.03.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/205527 EN 2020.10.08

(71) 申请人 艾库斯生物科学有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 A·E·安德森 D·阿肖克

D·M·迪里恩佐

A·R·乌迪亚瓦尔

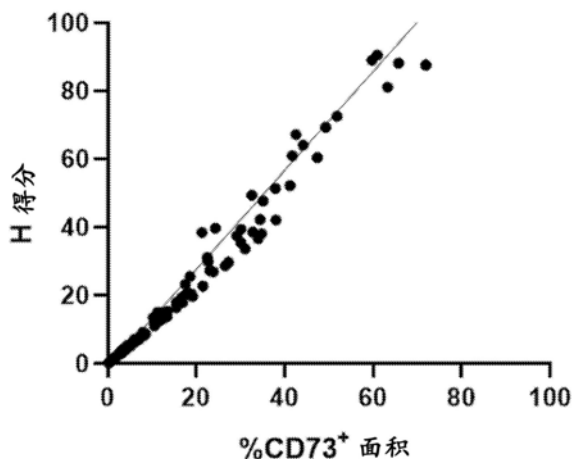
权利要求书16页 说明书33页 附图17页

(54) 发明名称

利用鉴定的腺苷指纹治疗癌症

(57) 摘要

本公开文本提供了治疗具有建立的腺苷指纹的受试者的癌症的方法。建立的腺苷指纹包括评估一种或多种腺苷机制蛋白的血液浓度、评估一种或多种腺苷机制蛋白的酶活性和/或评估腺苷机制蛋白的肿瘤表达水平。本文公开的方法包括向所述受试者施用选自靶向腺苷胞外产生的药剂和拮抗腺苷对其受体之一的激活的药剂的治疗剂。



1. 一种治疗具有建立的腺苷指纹的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用选自腺苷A2a受体 (A2aR) 和/或腺苷A2b受体 (A2bR) 拮抗剂和CD73抑制剂的的治疗剂,

其中当所述受试者的癌症具有至少一种选自以下的特征时,则向所述受试者施用CD73抑制剂

(i) 来自所述受试者的血液中的可溶性CD73浓度增加,其中所述增加是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的血液中CD73的典型浓度而言的;

(ii) 如通过AMP水解测定确定的来自所述受试者的血液中的CD73活性增加,其中所述增加是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的血液中CD73的典型AMP水解活性而言的;

(iii) 如通过针对CD73的免疫染色确定的来自所述受试者的癌症的活检展现出CD73的量增加,其中所述增加是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的活检中的CD73的典型量而言的;

(iv) 如通过mRNA水平确定的来自所述受试者的癌症的活检展现出CD73的上调,其中所述上调是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的活检中的CD73的典型量而言的;

其中当所述受试者的癌症具有至少一种选自以下的特征时,则向所述受试者施用腺苷A2a受体 (A2aR) 和/或腺苷A2b受体 (A2bR) 拮抗剂

(a) 来自受试者的血液中的可溶性TNAP浓度增加,其中所述增加是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的血液中TNAP的典型浓度而言的;

(b) 如通过AMP水解测定确定的来自所述受试者的血液中TNAP的活性增加,其中所述增加是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的血液中TNAP的典型AMP水解活性而言的;

(c) 如通过针对TNAP的免疫染色确定的来自所述受试者的癌症的活检展现出TNAP的量增加,其中所述增加是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的活检中TNAP的典型量而言的;

(d) 如通过mRNA水平确定的来自所述受试者的癌症的活检展现出TNAP的上调,其中所述上调是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的活检中TNAP的典型量而言的。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中

当所述受试者的癌症具有至少两种选自 (i) 至 (iv) 的特征时,则向所述受试者施用CD73抑制剂;

当所述受试者的癌症具有至少两种选自 (a) 至 (d) 的特征时,则向所述受试者施用腺苷A2a受体 (A2aR) 和/或腺苷A2b受体 (A2bR) 拮抗剂。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中

当所述受试者的癌症具有至少三种选自 (i) 至 (iv) 的特征时,则向所述受试者施用CD73抑制剂;

当所述受试者的癌症具有至少三种选自 (a) 至 (d) 的特征时,则向所述受试者施用腺苷A2a受体 (A2aR) 和/或腺苷A2b受体 (A2bR) 拮抗剂。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中

当所述受试者的癌症具有四种选自 (i) 至 (iv) 的特征时,则向所述受试者施用CD73抑制剂;

当所述受试者的癌症具有四种选自 (a) 至 (d) 的特征时,则向所述受试者施用腺苷A2a受体 (A2aR) 和/或腺苷A2b受体 (A2bR) 拮抗剂。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述受试者的癌症展现出选自(i)至(iv)和(a)至(d)中的每一者的至少一种、两种、三种或四种特征,仅施用腺苷A2a受体(A2aR)或腺苷A2b受体(A2bR)拮抗剂。

6. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述受试者的癌症展现出选自(i)至(iv)和(a)至(d)中的每一者的至少一种、两种、三种或四种特征,施用腺苷A2a受体(A2aR)和/或腺苷A2b受体(A2bR)拮抗剂和CD73抑制剂二者。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中在来自所述受试者的血液中的可溶性CD73浓度的增加高于1ng/mL的阈值。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中来自所述受试者的血液中的可溶性CD73浓度高于3ng/mL的阈值。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中来自所述受试者的血液中的CD73和/或TNAP活性的增加是通过AMP-Glo水解测定确定的并且高于阈值,所述CD73和/或TNAP介导的AMP水解的阈值是所述受试者的血液中的总AMP水解活性的至少10%。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述CD73和/或TNAP介导的AMP水解的阈值是所述受试者的血液中的总AMP水解活性的至少20%。

11. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中如通过免疫染色确定的CD73和/或TNAP的量的增加是高于在来自患有相同类型癌症的受试者的活检中的CD73和/或TNAP的平均量的测量值。

12. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中如通过免疫染色确定的CD73和/或TNAP的量的增加高于阈值,所述阈值是至少7%的CD73和/或TNAP染色面积。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的方法,其中如通过mRNA水平确定的来自所述受试者的活检中的CD73和/或TNAP的上调是高于来自患有相同类型癌症的受试者的活检中的CD73和/或TNAP mRNA的平均量的测量值。

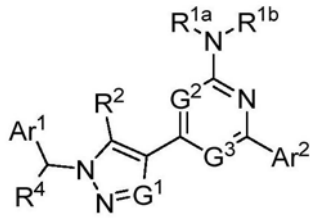
14. 根据权利要求1至13中任一项所述的方法,其中来自所述受试者的血液中的CD73和/或TNAP活性的增加是通过同位素AMP水解测定确定的并且高于阈值,所述CD73和/或TNAP介导的AMP水解的阈值是所述受试者的血液中的总AMP水解活性的至少10%。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述CD73和/或TNAP介导的AMP水解的阈值是所述受试者的血液中的总AMP水解活性的至少20%。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法,其中来自所述受试者的血液中的可溶性CD73或TNAP的浓度是通过夹心酶联免疫吸附测定(ELISA)确定的。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的方法,其中用于确定血液中的可溶性CD73浓度、血液中的TNAP浓度、血液中的CD73介导的单磷酸腺苷(AMP)水解活性和/或血液中的TNAP介导的AMP水解活性的血液是血浆或血清。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的方法,其中所述腺苷A2a受体(A2aR)和/或腺苷A2b受体(A2bR)拮抗剂具有式(I)



(I)

或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其中,

G<sup>1</sup>是N或CR<sup>3a</sup>;

G<sup>2</sup>是N或CR<sup>3b</sup>;

G<sup>3</sup>是N或CR<sup>3c</sup>;

R<sup>3a</sup>、R<sup>3b</sup>和R<sup>3c</sup>各自独立地是H或C<sub>1-3</sub>烷基;

R<sup>1a</sup>和R<sup>1b</sup>各自独立地选自

i) H

ii) 任选地被从1-3个R<sup>5</sup>取代基取代的C<sub>1-8</sub>烷基,

iii) 任选地被从1-3个R<sup>5</sup>取代基取代的-X<sup>1</sup>-O-C<sub>1-8</sub>烷基,

iv) -C(O)-R<sup>6</sup>,

v) 任选地被1-3个R<sup>7</sup>取代基取代的Y,和

vi) 任选地被1-3个R<sup>7</sup>取代基取代的-X<sup>1</sup>-Y;或

vii) R<sup>1a</sup>和R<sup>1b</sup>与它们附接的氮一起形成任选地被从1-3个R<sup>8</sup>取代基取代的5-6元杂环烷基环,其中所述杂环烷基具有0-2个选自O、N和S的另外的杂原子环顶点;

每个Y是C<sub>3-8</sub>环烷基或具有1-3个选自O、N和S的杂原子环顶点的4至6元杂环烷基;

R<sup>2</sup>和R<sup>4</sup>各自独立地是H或C<sub>1-3</sub>烷基;

Ar<sup>1</sup>是苯基或5至6元杂芳基,其各自任选地被1-3个R<sup>9</sup>取代;

Ar<sup>2</sup>是苯基或5至6元杂芳基,其各自任选地被1-3个R<sup>10</sup>取代;

其中Ar<sup>1</sup>和Ar<sup>2</sup>的所述5至6元杂芳基各自独立地具有1-3个选自O、N和S的杂原子环顶点;

每个X<sup>1</sup>是C<sub>1-6</sub>亚烷基;

每个R<sup>5</sup>独立地选自羟基、C<sub>3-8</sub>环烷基、苯基、-O-苯基、-C(O)OR<sup>a</sup>和氧代基;

每个R<sup>6</sup>是C<sub>1-8</sub>烷基或Y,其各自任选地被1-3个选自羟基、-O-苯基、苯基和-O-C<sub>1-8</sub>烷基的取代基取代;

每个R<sup>7</sup>独立地选自C<sub>1-8</sub>烷基、羟基、-O-C<sub>1-8</sub>烷基、氧代基和C(O)OR<sup>a</sup>;

每个R<sup>8</sup>独立地选自C<sub>1-8</sub>烷基、羟基和氧代基;

每个R<sup>9</sup>独立地选自C<sub>1-8</sub>烷基、-O-C<sub>1-8</sub>烷基、-X<sup>1</sup>-O-C<sub>1-8</sub>烷基、-O-X<sup>1</sup>-O-C<sub>1-8</sub>烷基、-X<sup>1</sup>-O-X<sup>1</sup>-O-C<sub>1-8</sub>烷基、-C(O)OR<sup>a</sup>、卤素、氰基、-NR<sup>b</sup>R<sup>c</sup>、Y、-X<sup>1</sup>-C<sub>3-8</sub>环烷基和-X<sup>2</sup>-Z,其中X<sup>2</sup>选自C<sub>1-6</sub>亚烷基、-C<sub>1-6</sub>亚烷基-O-、-C(O)-和-S(O)<sub>2</sub>-,Z是具有1-3个选自O、N和S的杂原子环顶点的4至6元杂环烷基,并且其中所述R<sup>9</sup>取代基中的任一个任选地被1-3个R<sup>11</sup>取代;

每个R<sup>10</sup>独立地选自C<sub>1-8</sub>烷基、卤基、氰基、-O-C<sub>1-8</sub>烷基、-X<sup>1</sup>-O-C<sub>1-8</sub>烷基、-O-X<sup>1</sup>-O-C<sub>1-8</sub>烷基、-S(O)<sub>2</sub>-C<sub>1-6</sub>烷基、-C(O)NR<sup>d</sup>R<sup>e</sup>和具有从1-3个选自O、N和S的杂原子环顶点的4-6元杂芳基,其中所述R<sup>10</sup>取代基中的每一个任选地被1-3个R<sup>12</sup>取代,或在Ar<sup>2</sup>的相邻环顶点上的两个R<sup>10</sup>任选地组合以形成任选地被1-2个卤素取代的5元杂环;

每个R<sup>11</sup>独立地选自羟基、卤基、氰基、-NR<sup>d</sup>R<sup>e</sup>、-C(O)OR<sup>a</sup>、苯基、C<sub>3-8</sub>环烷基和任选地被C

(O) OR<sup>a</sup>取代的C<sub>1-4</sub>烷基;

每个R<sup>12</sup>独立地选自卤基、氰基、羟基、-C(O)OR<sup>a</sup>; 并且

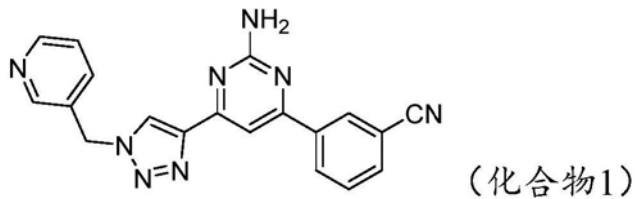
每个R<sup>a</sup>是H或C<sub>1-6</sub>烷基;

每个R<sup>b</sup>和R<sup>c</sup>独立地选自H、C<sub>1-8</sub>烷基、-S(O)<sub>2</sub>-C<sub>1-6</sub>烷基、-C(O)OR<sup>a</sup>和-X<sup>1</sup>-C(O)OR<sup>a</sup>;

每个R<sup>d</sup>和R<sup>e</sup>独立地选自H、C<sub>1-8</sub>烷基、-S(O)<sub>2</sub>-C<sub>1-6</sub>烷基; 并且

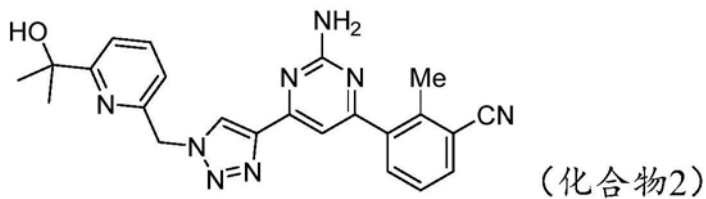
条件是当G<sup>1</sup>和G<sup>2</sup>各自是N, G<sup>3</sup>是CH, R<sup>2</sup>是CH<sub>3</sub>并且R<sup>1a</sup>和R<sup>1b</sup>各自是H时, 则Ar<sup>2</sup>不是2-噻吩基; 苯基; 2-, 3-或4-甲氧基苯基; 3-或4-卤基苯基; 2, 4-二甲氧基苯基; 2, 4-二氯苯基或2-或4-甲基苯基。

19. 根据权利要求18所述的方法, 其中所述腺苷A2a受体 (A2aR) 或腺苷A2b受体 (A2bR) 拮抗剂是化合物1



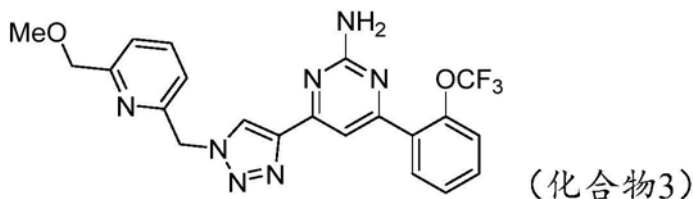
或其药学上可接受的盐。

20. 根据权利要求18所述的方法, 其中所述腺苷A2a受体 (A2aR) 或腺苷A2b受体 (A2bR) 拮抗剂是化合物2



或其药学上可接受的盐。

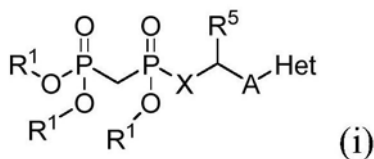
21. 根据权利要求18所述的方法, 其中所述腺苷A2a受体 (A2aR) 或腺苷A2b受体 (A2bR) 拮抗剂是化合物3



或其药学上可接受的盐。

22. 根据权利要求1至17中任一项所述的方法, 其中所述腺苷A2a受体 (A2aR) 和/或腺苷A2b受体 (A2bR) 拮抗剂选自AZD4635、Ciforadenant (CPI-444)、NIR178和PBF-1129。

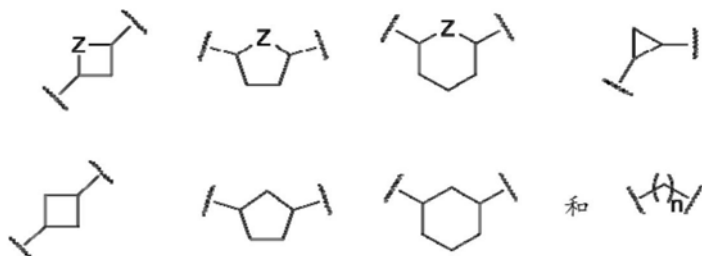
23. 根据权利要求1至17中任一项所述的方法, 其中所述CD73抑制剂具有式 (i)



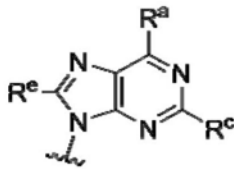
或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物, 其中,

每个R<sup>1</sup>独立地选自氢、任选经取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、任选经取代的芳基、和-C(R<sup>2</sup>R<sup>2</sup>)-O-C

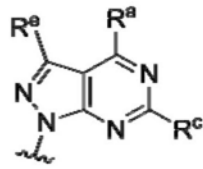
- (O) -OR<sup>3</sup>, 或者两个R<sup>1</sup>基团任选地组合以形成5至7元环;  
 每个R<sup>2</sup>独立地选自H和任选经取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基;  
 每个R<sup>3</sup>独立地选自H、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基和任选经取代的芳基;  
 R<sup>5</sup>选自H和任选经取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基;  
 X选自O、CH<sub>2</sub>和S;  
 A选自:



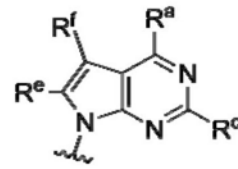
- 其各自任选地被从1至5个R<sup>6</sup>取代基取代, 并且其中下标n是从0至3的整数;  
 Z选自CH<sub>2</sub>、CHR<sup>6</sup>、NR<sup>6</sup>和O;  
 每个R<sup>6</sup>独立地选自H、CH<sub>3</sub>、OH、CN、F、任选经取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、和OC(O)-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基; 并且  
 任选地相邻环顶点上的两个R<sup>6</sup>基团连接在一起以形成具有至少一个杂原子作为环顶点的5至6元环; 并且  
 Het选自:



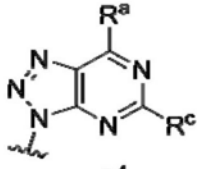
a1



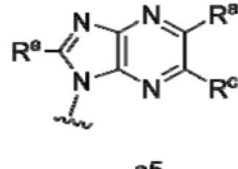
a2



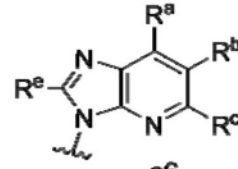
a3



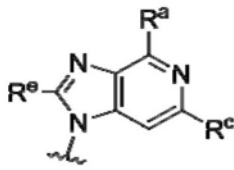
a4



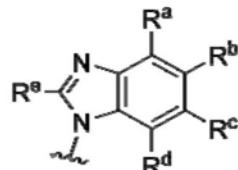
a5



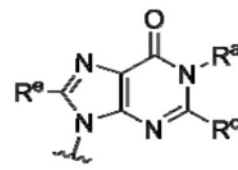
a6



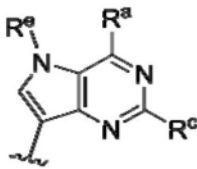
a7



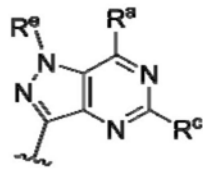
a8



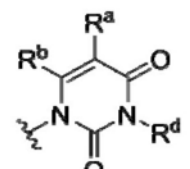
a9



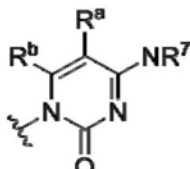
a10



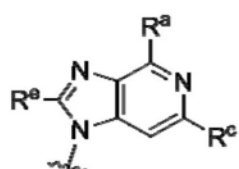
a11



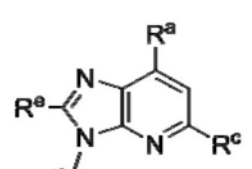
a12



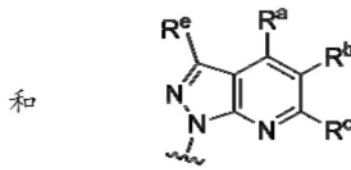
a13



a14



a15



a16

其中波浪线指示与所述化合物的其余部分附接的点,并且其中:

$R^a$ 选自H、 $\text{NH}_2$ 、 $\text{NHR}^7$ 、 $\text{NHC(O)R}^7$ 、 $\text{NR}^7\text{R}^7$ 、 $\text{R}^7$ 、OH、 $\text{SR}^7$ 和 $\text{OR}^7$ ;

$R^b$ 选自H、卤素、 $\text{NH}_2$ 、 $\text{NHR}^7$ 、 $\text{NR}^7\text{R}^7$ 、 $\text{R}^7$ 、OH和 $\text{OR}^7$ ;

$R^c$ 和 $R^d$ 独立地选自H、卤素、卤代烷基、 $\text{NH}_2$ 、 $\text{NHR}^7$ 、 $\text{NR}^7\text{R}^7$ 、 $\text{R}^7$ 、OH、 $\text{OR}^7$ 、 $\text{SR}^7$ 、 $\text{SO}_2\text{R}^7$ 、 $-\text{X}^1-\text{NH}_2$ 、 $-\text{X}^1-\text{NHR}^7$ 、 $-\text{X}^1-\text{NR}^7\text{R}^7$ 、 $-\text{X}^1-\text{OH}$ 、 $-\text{X}^1-\text{OR}^7$ 、 $-\text{X}^1-\text{SR}^7$ 和 $-\text{X}^1-\text{SO}_2\text{R}^7$ ;

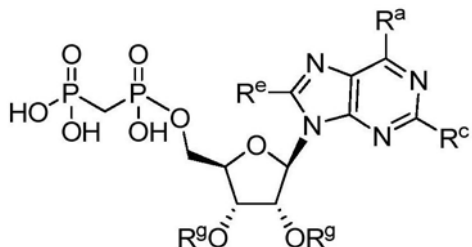
$R^e$ 和 $R^f$ 独立地选自H、卤素和任选经取代的 $\text{C}_1-\text{C}_6$ 烷基;

每个 $\text{X}^1$ 是 $\text{C}_1-\text{C}_4$ 亚烷基;并且

每个 $\text{R}^7$ 独立地选自任选经取代的 $\text{C}_1-\text{C}_{10}$ 烷基、任选经取代的 $\text{C}_2-\text{C}_{10}$ 烯基、任选经取代的

C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>炔基、任选经取代的C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>环烷基、任选经取代的C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>环烷基C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基、任选经取代的4-7元环杂烷基、任选经取代的4-7元环杂烷基C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基、任选经取代的芳基、任选经取代的芳基C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基、任选经取代的芳基C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>烯基、任选经取代的芳基C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>炔基、任选经取代的杂芳基、任选经取代的杂芳基C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基、任选经取代的杂芳基C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烯基、任选经取代的杂芳基C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>炔基,并且任选地,与氮原子附接的两个R<sup>7</sup>基团连接在一起以形成任选地与芳环稠合的4至7元杂环;

其中条件是所述化合物不是以下这些化合物:其中X、A和Het的组合导致



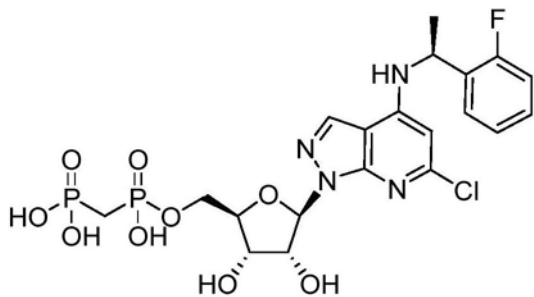
其中R<sup>8</sup>是H或所述两个R<sup>8</sup>基团组合以形成缩丙酮;并且

(1) R<sup>c</sup>和R<sup>e</sup>是氢并且R<sup>a</sup>是-OEt、-OCH<sub>2</sub>Ph、-SCH<sub>2</sub>Ph、-NH<sub>2</sub>、甲基氨基、乙基氨基、二甲基氨基、二乙基氨基、N-甲基-N-乙基氨基、苄基氨基、苄基氨基、2-苄基乙基氨基、N-苄基-N-乙基氨基、二苄基氨基、4-氨基苄基氨基、4-氯苄基氨基、4-硝基苄基氨基、或4-氨基磺酰基苄基氨基;或

(2) R<sup>c</sup>是氢,R<sup>a</sup>是-NH<sub>2</sub>,并且R<sup>e</sup>是溴、氯、氨基甲基、或硫代乙基;或

(3) R<sup>c</sup>是氢,R<sup>a</sup>是苄基氨基,并且R<sup>e</sup>是溴。

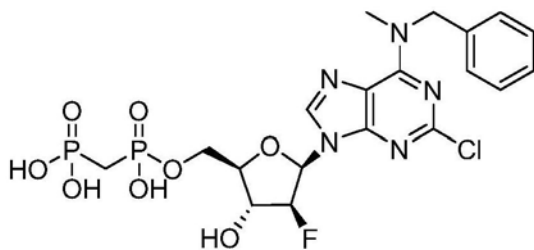
24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述CD73抑制剂是化合物A



(化合物A)

或其药学上可接受的盐。

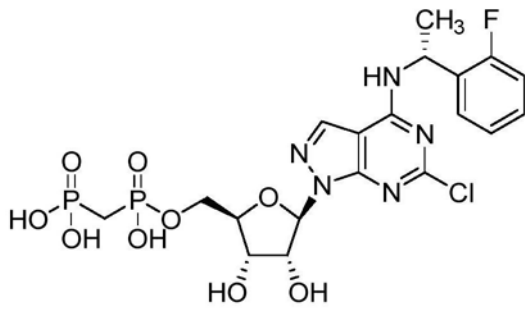
25. 根据权利要求23所述的方法,其中所述CD73抑制剂是化合物B



(化合物B)

或其药学上可接受的盐。

26. 根据权利要求23所述的方法,其中所述CD73抑制剂是化合物C



(化合物C)

或其药学上可接受的盐。

27. 根据权利要求1至17中任一项所述的方法,其中所述CD73抑制剂选自奥来鲁单抗(MEDI-9447)、CPI-006、NZV930/SRF373、BMS-986179和TJ4309。

28. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法,所述方法进一步包括当来自所述受试者的癌症的活检指示所述癌症是PD-L1阳性时,向所述受试者施用PD1抑制剂和/或PD-L1抑制剂。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述PD1和/或PD-L1抑制剂选自派姆单抗、纳武单抗、MEDI-0680、BGB-108、GB-226、PDR-001、mDX-400、SHR-1210、IBI-308、PF-06801591、阿特珠单抗、度伐鲁单抗、阿维鲁单抗、BMS-936559、KD-033、CA-327、CA-170、ALN-PDL、TSR-042和STI-1014。

30. 根据权利要求28所述的方法,其中所述PD1和/或PD-L1抑制剂选自派姆单抗、纳武单抗、阿特珠单抗、度伐鲁单抗和阿维鲁单抗。

31. 根据权利要求1至30中任一项所述的方法,所述方法进一步包括当所述受试者具有如通过全外显子组测序(WES)确定的小于2.0的肿瘤突变负荷(TMB)时,向所述受试者施用化学治疗剂。

32. 根据权利要求31中任一项所述的方法,其中所述化学治疗剂包含基于铂或基于蒽环的化学治疗剂。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中所述化学治疗剂选自顺铂、卡铂、奥沙利铂和多柔比星。

34. 根据权利要求1至33中任一项所述的方法,其中所述癌症是前列腺癌、结肠癌、直肠癌、胰腺癌、宫颈癌、胃癌、子宫内膜癌、脑癌、肝癌、膀胱癌、卵巢癌、睾丸癌、头癌、颈癌、皮肤癌(包括黑素瘤和基底癌)、间皮内衬癌、白血细胞(包括淋巴瘤和白血病)、食管癌、乳腺癌(包括三阴性乳腺癌)、肌肉癌、结缔组织癌、肺癌(包括小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、肾上腺癌、甲状腺癌、肾癌或骨癌;或是恶性胶质瘤、间皮瘤、肾细胞癌、胃癌、肉瘤(包括卡波西肉瘤)、绒毛膜癌、皮肤基底细胞癌或睾丸精原细胞瘤。

35. 一种治疗具有建立的腺苷指纹的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用靶向腺苷的胞外产生和/或拮抗腺苷对其受体之一的激活的治疗剂,

其中所述受试者的癌症具有至少一种选自以下的特征

(i) 来自所述受试者的血液中一种或多种腺苷机制蛋白的浓度增加,其中所述增加是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的血液所述一种或多种腺苷机制蛋白的典型浓度而言的;

(ii) 如通过AMP水解测定确定的来自所述受试者的血液中CD73或TNAP的活性增加,其

中所述增加是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的血液中CD73和/或TNAP的典型AMP水解活性而言的；

(iii) 如通过一种或多种腺苷机制蛋白的免疫染色确定的来自所述受试者的癌症的活检展现出所述一种或多种腺苷机制蛋白的量增加,其中所述增加是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的活检中所述一种或多种腺苷机制蛋白的典型量而言的;和

(iv) 如通过mRNA水平确定的来自所述受试者的癌症的活检展现出一种或多种腺苷机制蛋白的上调,其中所述上调是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的活检中所述一种或多种腺苷机制蛋白的典型量而言的。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中所述癌症具有选自(i)至(iv)的至少两种特征。

37. 根据权利要求35所述的方法,其中所述癌症具有选自(i)至(iv)的至少三种特征。

38. 根据权利要求35所述的方法,其中所述癌症具有选自(i)至(iv)的至少四种特征。

39. 根据权利要求35至38中任一项所述的方法,其中在特征(i)至(iv)中任一种中的所述一种或多种腺苷机制蛋白是CD73或TNAP。

40. 根据权利要求35至39中任一项所述的方法,其中来自所述受试者的血液中一种或多种腺苷机制蛋白的浓度的增加是高于来自患有相同类型癌症的受试者的血液中所述一种或多种腺苷机制蛋白中的任一种的平均浓度的测量值。

41. 根据权利要求35至40中任一项所述的方法,其中来自所述受试者的血液中的CD73和/或TNAP活性的增加是通过AMP-Glo水解测定确定的并且高于阈值,所述CD73和/或TNAP介导的AMP水解的阈值是所述受试者的血液中的总AMP水解活性的至少10%。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中所述CD73和/或TNAP介导的AMP水解的阈值是所述受试者的血液中的总AMP水解活性的至少20%。

43. 根据权利要求35至42中任一项所述的方法,其中如通过免疫染色确定的一种或多种腺苷机制蛋白的量的增加是高于来自患有相同类型癌症的受试者的活检中所述一种或多种腺苷机制蛋白中的任一种的平均量的测量值。

44. 根据权利要求35至43中任一项所述的方法,其中如通过mRNA水平确定的来自所述受试者的活检中一种或多种腺苷机制蛋白的上调是高于来自患有相同类型癌症的受试者的活检中所述一种或多种腺苷机制蛋白的平均量的测量值。

45. 根据权利要求35至44中任一项所述的方法,其中来自所述受试者的血液中的CD73和/或TNAP活性的增加是通过同位素AMP水解测定确定的并且高于阈值,所述CD73和/或TNAP介导的AMP水解的阈值是所述受试者的血液中的总AMP水解活性的至少10%。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中所述CD73和/或TNAP介导的AMP水解的阈值是所述受试者的血液中的总AMP水解活性的至少20%。

47. 根据权利要求35至46中任一项所述的方法,其中所述受试者的血液中更多种腺苷机制蛋白的浓度是通过夹心酶联免疫吸附测定(ELISA)确定的。

48. 根据权利要求35至47中任一项所述的方法,其中用于确定一种或多种腺苷机制蛋白的浓度、血液中所述CD73介导的单磷酸腺苷(AMP)水解活性和/或血液中所述TNAP介导的AMP水解活性的所述血液是血浆或血清。

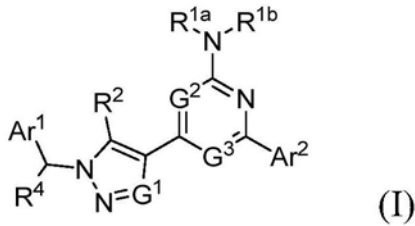
49. 根据权利要求35至48中任一项所述的方法,其中靶向腺苷胞外产生的所述药剂选自组织非特异性碱性磷酸酶(TNAP)抑制剂、CD73抑制剂、膜外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶

1 (ENPP1) 抑制剂、CD38抑制剂和CD39抑制剂。

50. 根据权利要求35至48中任一项所述的方法,其中所述拮抗腺苷对其受体之一的激活的药剂是腺苷A1受体 (A1R) 拮抗剂、腺苷A2a受体 (A2aR) 和/或腺苷A2b受体 (A2bR) 拮抗剂、或腺苷A3受体拮抗剂 (A3R)。

51. 根据权利要求35至48中任一项所述的方法,其中所述拮抗腺苷对其受体之一的激活的药剂是腺苷A2a受体 (A2aR) 和/或腺苷A2b受体 (A2bR) 拮抗剂。

52. 根据权利要求51所述的方法,其中所述腺苷A2a受体 (A2aR) 和/或腺苷A2b受体 (A2bR) 拮抗剂具有式 (I)



或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其中,

G<sup>1</sup>是N或CR<sup>3a</sup>;

G<sup>2</sup>是N或CR<sup>3b</sup>;

G<sup>3</sup>是N或CR<sup>3c</sup>;

R<sup>3a</sup>、R<sup>3b</sup>和R<sup>3c</sup>各自独立地是H或C<sub>1-3</sub>烷基;

R<sup>1a</sup>和R<sup>1b</sup>各自独立地选自

i) H

ii) 任选地被从1-3个R<sup>5</sup>取代基取代的C<sub>1-8</sub>烷基,

iii) 任选地被从1-3个R<sup>5</sup>取代基取代的-X<sup>1</sup>-O-C<sub>1-8</sub>烷基,

iv) -C(O)-R<sup>6</sup>,

v) 任选地被1-3个R<sup>7</sup>取代基取代的Y,和

vi) 任选地被1-3个R<sup>7</sup>取代基取代的-X<sup>1</sup>-Y;或

vii) R<sup>1a</sup>和R<sup>1b</sup>与它们附接的氮一起形成任选地被从1-3个R<sup>8</sup>取代基取代的5-6元杂环烷基环,其中所述杂环烷基具有0-2个选自O、N和S的另外的杂原子环顶点;

每个Y是C<sub>3-8</sub>环烷基或具有1-3个选自O、N和S的杂原子环顶点的4至6元杂环烷基;

R<sup>2</sup>和R<sup>4</sup>各自独立地是H或C<sub>1-3</sub>烷基;

Ar<sup>1</sup>是苯基或5至6元杂芳基,其各自任选地被1-3个R<sup>9</sup>取代;

Ar<sup>2</sup>是苯基或5至6元杂芳基,其各自任选地被1-3个R<sup>10</sup>取代;

其中Ar<sup>1</sup>和Ar<sup>2</sup>的所述5至6元杂芳基各自独立地具有1-3个选自O、N和S的杂原子环顶点;

每个X<sup>1</sup>是C<sub>1-6</sub>亚烷基;

每个R<sup>5</sup>独立地选自羟基、C<sub>3-8</sub>环烷基、苯基、-O-苯基、-C(O)OR<sup>a</sup>和氧代基;

每个R<sup>6</sup>是C<sub>1-8</sub>烷基或Y,其各自任选地被1-3个选自羟基、-O-苯基、苯基和-O-C<sub>1-8</sub>烷基的取代基取代;

每个R<sup>7</sup>独立地选自C<sub>1-8</sub>烷基、羟基、-O-C<sub>1-8</sub>烷基、氧代基和C(O)OR<sup>a</sup>;

每个R<sup>8</sup>独立地选自C<sub>1-8</sub>烷基、羟基和氧代基;

每个R<sup>9</sup>独立地选自C<sub>1-8</sub>烷基、-O-C<sub>1-8</sub>烷基、-X<sup>1</sup>-O-C<sub>1-8</sub>烷基、-O-X<sup>1</sup>-O-C<sub>1-8</sub>烷基、-X<sup>1</sup>-O-X<sup>1</sup>-

$O-C_{1-8}$ 烷基、 $-C(O)OR^a$ 、卤素、氰基、 $-NR^bR^c$ 、 $Y$ 、 $-X^1-C_{3-8}$ 环烷基和 $-X^2-Z$ ，其中 $X^2$ 选自 $C_{1-6}$ 亚烷基、 $-C_{1-6}$ 亚烷基- $O$ -、 $-C(O)-$ 和 $-S(O)_2-$ ， $Z$ 是具有1-3个选自 $O$ 、 $N$ 和 $S$ 的杂原子环顶点的4至6元杂环烷基，并且其中所述 $R^9$ 取代基中的任一个任选地被1-3个 $R^{11}$ 取代；

每个 $R^{10}$ 独立地选自 $C_{1-8}$ 烷基、卤基、氰基、 $-O-C_{1-8}$ 烷基、 $-X^1-O-C_{1-8}$ 烷基、 $-O-X^1-O-C_{1-8}$ 烷基、 $-S(O)_2-C_{1-6}$ 烷基、 $-C(O)NR^dR^e$ 和具有从1-3个选自 $O$ 、 $N$ 和 $S$ 的杂原子环顶点的4-6元杂芳基，其中所述 $R^{10}$ 取代基中的每一个任选地被1-3个 $R^{12}$ 取代，或在 $Ar^2$ 的相邻环顶点上的两个 $R^{10}$ 任选地组合以形成任选地被1-2个卤素取代的5元杂环；

每个 $R^{11}$ 独立地选自羟基、卤基、氰基、 $-NR^dR^e$ 、 $-C(O)OR^a$ 、苯基、 $C_{3-8}$ 环烷基和任选地被 $C(O)OR^a$ 取代的 $C_{1-4}$ 烷基；

每个 $R^{12}$ 独立地选自卤基、氰基、羟基、 $-C(O)OR^a$ ；并且

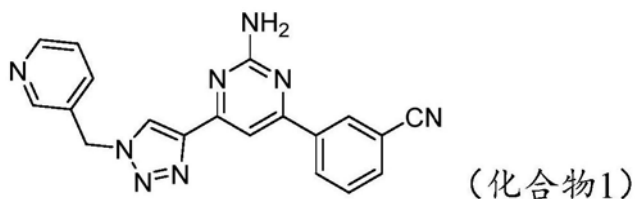
每个 $R^a$ 是 $H$ 或 $C_{1-6}$ 烷基；

每个 $R^b$ 和 $R^c$ 独立地选自 $H$ 、 $C_{1-8}$ 烷基、 $-S(O)_2-C_{1-6}$ 烷基、 $-C(O)OR^a$ 和 $-X^1-C(O)OR^a$ ；

每个 $R^d$ 和 $R^e$ 独立地选自 $H$ 、 $C_{1-8}$ 烷基、 $-S(O)_2-C_{1-6}$ 烷基；并且

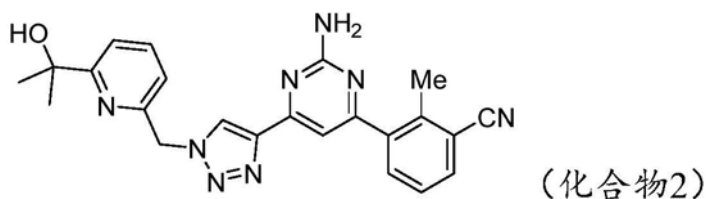
条件是当 $G^1$ 和 $G^2$ 各自是 $N$ ， $G^3$ 是 $CH$ ， $R^2$ 是 $CH_3$ 并且 $R^{1a}$ 和 $R^{1b}$ 各自是 $H$ 时，则 $Ar^2$ 不是2-噻吩基；苯基；2-、3-或4-甲氧基苯基；3-或4-卤基苯基；2,4-二甲氧基苯基；2,4-二氯苯基或2-或4-甲基苯基。

53. 根据权利要求51所述的方法，其中所述腺苷A2a受体(A2aR)或腺苷A2b受体(A2bR)拮抗剂是化合物1



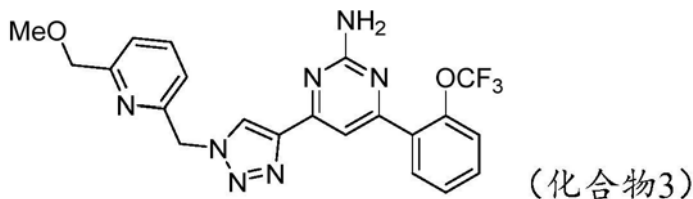
或其药学上可接受的盐。

54. 根据权利要求51所述的方法，其中所述腺苷A2a受体(A2aR)或腺苷A2b受体(A2bR)拮抗剂是化合物2



或其药学上可接受的盐。

55. 根据权利要求51所述的方法，其中所述腺苷A2a受体(A2aR)或腺苷A2b受体(A2bR)拮抗剂是化合物3



或其药学上可接受的盐。

56. 根据权利要求51所述的方法，其中所述腺苷A2a受体(A2aR)和/或腺苷A2b受体

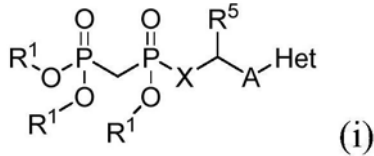
(A2bR) 拮抗剂选自AZD4635、Ciforadenant (CPI-444)、NIR178和PBF-1129。

57. 根据权利要求50所述的方法, 其中所述拮抗腺苷对其受体之一的激活的药剂是A1R拮抗剂。

58. 根据权利要求50所述的方法, 其中所述拮抗腺苷对其受体之一的激活的药剂是A3R拮抗剂。

59. 根据权利要求49所述的方法, 其中所述靶向腺苷胞外产生的药剂是CD73抑制剂。

60. 根据权利要求59所述的方法, 其中所述CD73抑制剂具有式(i)



或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物, 其中,

每个R<sup>1</sup>独立地选自氢、任选经取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、任选经取代的芳基、和-C(R<sup>2</sup>R<sup>2</sup>)-O-C(OR<sup>3</sup>), 或者两个R<sup>1</sup>基团任选地组合以形成5至7元环;

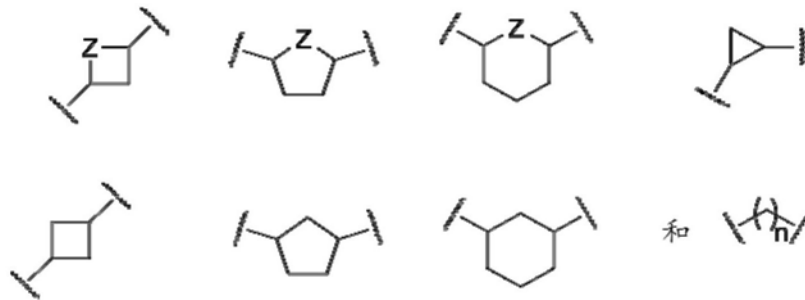
每个R<sup>2</sup>独立地选自H和任选经取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基;

每个R<sup>3</sup>独立地选自H、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基和任选经取代的芳基;

R<sup>5</sup>选自H和任选经取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基;

X选自O、CH<sub>2</sub>和S;

A选自:

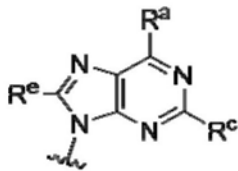


其各自任选地被从1至5个R<sup>6</sup>取代基取代, 并且其中下标n是从0至3的整数;

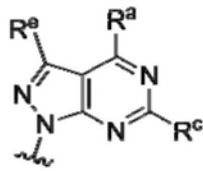
Z选自CH<sub>2</sub>、CHR<sup>6</sup>、NR<sup>6</sup>和O;

每个R<sup>6</sup>独立地选自H、CH<sub>3</sub>、OH、CN、F、任选经取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、和OC(O)-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基; 并且任选地相邻环顶点上的两个R<sup>6</sup>基团连接在一起以形成具有至少一个杂原子作为环顶点的5至6元环; 并且

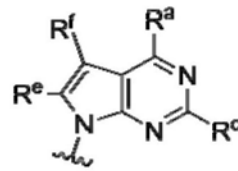
Het选自:



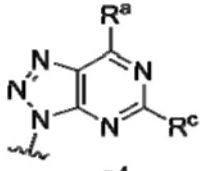
a1



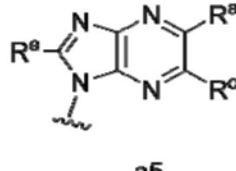
a2



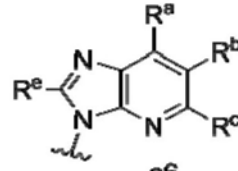
a3



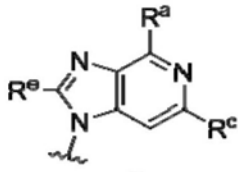
a4



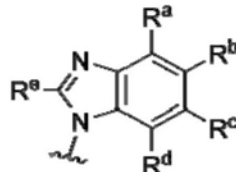
a5



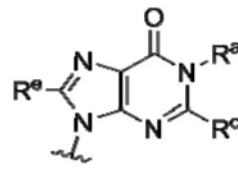
a6



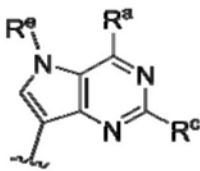
a7



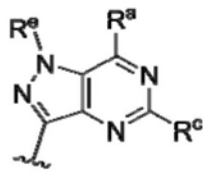
a8



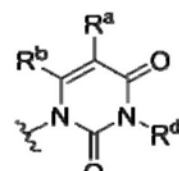
a9



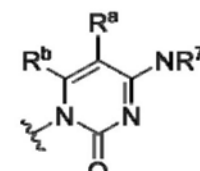
a10



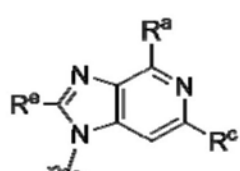
a11



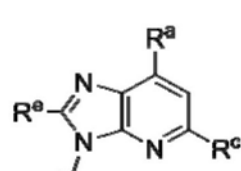
a12



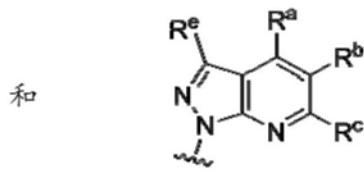
a13



a14



a15



a16

其中波浪线指示与所述化合物的其余部分附接的点,并且其中:

$R^a$ 选自H、 $\text{NH}_2$ 、 $\text{NHR}^7$ 、 $\text{NHC(O)R}^7$ 、 $\text{NR}^7\text{R}^7$ 、 $\text{R}^7$ 、OH、 $\text{SR}^7$ 和 $\text{OR}^7$ ;

$R^b$ 选自H、卤素、 $\text{NH}_2$ 、 $\text{NHR}^7$ 、 $\text{NR}^7\text{R}^7$ 、 $\text{R}^7$ 、OH和 $\text{OR}^7$ ;

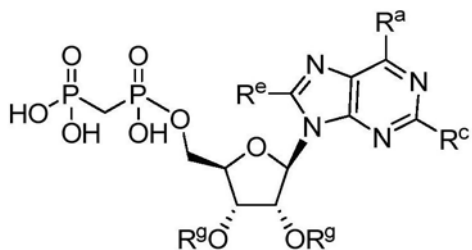
$R^c$ 和 $R^d$ 独立地选自H、卤素、卤代烷基、 $\text{NH}_2$ 、 $\text{NHR}^7$ 、 $\text{NR}^7\text{R}^7$ 、 $\text{R}^7$ 、OH、 $\text{OR}^7$ 、 $\text{SR}^7$ 、 $\text{SO}_2\text{R}^7$ 、 $-\text{X}^1-\text{NH}_2$ 、 $-\text{X}^1-\text{NHR}^7$ 、 $-\text{X}^1-\text{NR}^7\text{R}^7$ 、 $-\text{X}^1-\text{OH}$ 、 $-\text{X}^1-\text{OR}^7$ 、 $-\text{X}^1-\text{SR}^7$ 和 $-\text{X}^1-\text{SO}_2\text{R}^7$ ;

$R^e$ 和 $R^f$ 独立地选自H、卤素和任选经取代的 $\text{C}_1-\text{C}_6$ 烷基;

每个 $\text{X}^1$ 是 $\text{C}_1-\text{C}_4$ 亚烷基;并且

每个 $R^7$ 独立地选自任选经取代的 $C_1-C_{10}$ 烷基、任选经取代的 $C_2-C_{10}$ 烯基、任选经取代的 $C_2-C_{10}$ 炔基、任选经取代的 $C_3-C_7$ 环烷基、任选经取代的 $C_3-C_7$ 环烷基- $C_1-C_4$ 烷基、任选经取代的4-7元环杂烷基、任选经取代的4-7元环杂烷基- $C_1-C_4$ 烷基、任选经取代的芳基、任选经取代的芳基- $C_1-C_4$ 烷基、任选经取代的芳基- $C_2-C_4$ 烯基、任选经取代的芳基- $C_2-C_4$ 炔基、任选经取代的杂芳基、任选经取代的杂芳基- $C_1-C_4$ 烷基、任选经取代的杂芳基- $C_1-C_4$ 烯基、任选经取代的杂芳基- $C_2-C_4$ 炔基,并且任选地,与氮原子附接的两个 $R^7$ 基团连接在一起以形成任选地与芳环稠合的4至7元杂环;

其中条件是所述化合物不是以下这些化合物:其中X、A和Het的组合导致



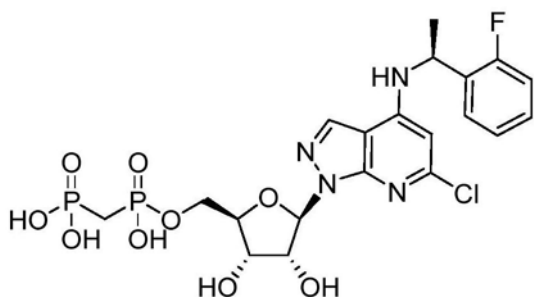
其中 $R^8$ 是H或所述两个 $R^8$ 基团组合以形成缩丙酮;并且

(1)  $R^c$ 和 $R^e$ 是氢并且 $R^a$ 是 $-OEt$ 、 $-OCH_2Ph$ 、 $-SCH_2Ph$ 、 $-NH_2$ 、甲基氨基、乙基氨基、二甲基氨基、二乙基氨基、N-甲基-N-乙基氨基、苄基氨基、苄基氨基、2-苄基乙基氨基、N-苄基-N-乙基氨基、二苄基氨基、4-氨基苄基氨基、4-氯苄基氨基、4-硝基苄基氨基、或4-氨基酰基苄基氨基;或

(2)  $R^c$ 是氢, $R^a$ 是 $-NH_2$ ,并且 $R^e$ 是溴、氯、氨基甲基、或硫代乙基;或

(3)  $R^c$ 是氢, $R^a$ 是苄基氨基,并且 $R^e$ 是溴。

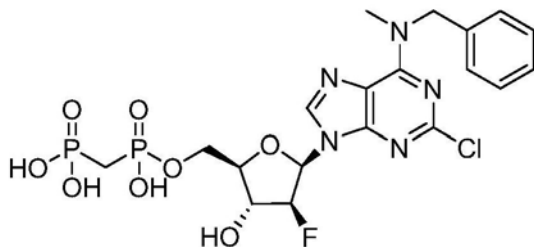
61. 根据权利要求59所述的方法,其中所述CD73抑制剂是化合物A



(化合物A)

或其药学上可接受的盐。

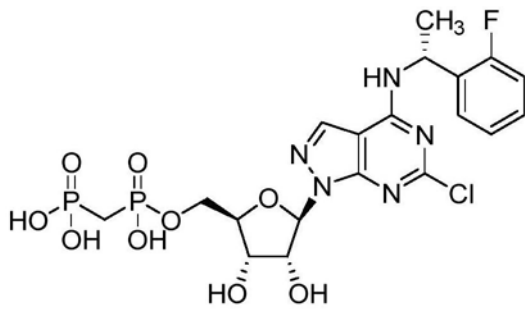
62. 根据权利要求59所述的方法,其中所述CD73抑制剂是化合物B



(化合物B)

或其药学上可接受的盐。

63. 根据权利要求59所述的方法,其中所述CD73抑制剂是化合物C



(化合物C)

或其药学上可接受的盐。

64. 根据权利要求59所述的方法,其中所述CD73抑制剂选自奥来鲁单抗(MEDI-9447)、CPI-006、NZV930/SRF373、BMS-986179和TJ4309。

65. 根据权利要求49所述的方法,其中所述靶向腺苷胞外产生的药剂是TNAP抑制剂。

66. 根据权利要求49所述的方法,其中所述靶向腺苷胞外产生的药剂是ENPP1抑制剂。

67. 根据权利要求49所述的方法,其中所述靶向腺苷胞外产生的药剂是CD38抑制剂。

68. 根据权利要求49所述的方法,其中所述靶向腺苷胞外产生的药剂是CD39抑制剂。

69. 根据权利要求35至68中任一项所述的方法,所述方法进一步包括当来自所述受试者的癌症的活检指示所述癌症是PD-L1阳性时,向所述受试者施用PD1抑制剂和/或PD-L1抑制剂。

70. 根据权利要求69所述的方法,其中所述PD1和/或PD-L1抑制剂选自派姆单抗、纳武单抗、MEDI-0680、BGB-108、GB-226、PDR-001、mDX-400、SHR-1210、IBI-308、PF-06801591、阿特殊单抗、度伐鲁单抗、阿维鲁单抗、BMS-936559、KD-033、CA-327、CA-170、ALN-PDL、TSR-042和STI-1014。

71. 根据权利要求69所述的方法,其中所述PD1和/或PD-L1抑制剂选自派姆单抗、纳武单抗、阿特殊单抗、度伐鲁单抗和阿维鲁单抗。

72. 根据权利要求35至71中任一项所述的方法,所述方法进一步包括当通过WES确定的TMB小于2.0时,向所述受试者施用化学治疗剂。

73. 根据权利要求72中任一项所述的方法,其中所述化学治疗剂包含基于铂或基于蒽环的化学治疗剂。

74. 根据权利要求73所述的方法,其中所述化学治疗剂选自顺铂、卡铂、奥沙利铂和多柔比星。

75. 根据权利要求35至74中任一项所述的方法,其中所述癌症是前列腺癌、结肠癌、直肠癌、胰腺癌、宫颈癌、胃癌、子宫内膜癌、脑癌、肝癌、膀胱癌、卵巢癌、睾丸癌、头癌、颈癌、皮肤癌(包括黑素瘤和基底癌)、间皮内衬癌、白血细胞(包括淋巴瘤和白血病)、食管癌、乳腺癌(包括三阴性乳腺癌)、肌肉癌、结缔组织癌、肺癌(包括小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、肾上腺癌、甲状腺癌、肾癌或骨癌;或是恶性胶质瘤、间皮瘤、肾细胞癌、胃癌、肉瘤(包括卡波西肉瘤)、绒毛膜癌、皮肤基底细胞癌或睾丸精原细胞瘤。

76. 一种治疗被鉴定为患有改变一种或多种腺苷机制蛋白的表达和/或活性的癌症的受试者的方法,所述方法包括向所述有需要的受试者施用靶向腺苷胞外产生的药剂和/或拮抗腺苷对其受体之一的激活的药剂。

77. 根据权利要求76所述的方法,其中一种或多种腺苷机制蛋白选自组织非特异性碱

性磷酸酶 (TNAP)、CD73、膜外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶1 (ENPP1)、CD38、CD39、腺苷A1受体 (A1R)、腺苷A2a受体 (A2aR)、腺苷A2b受体 (A2bR) 和腺苷A3受体 (A3R)。

78. 根据权利要求1至77中任一项所述的方法,其中所述受试者是人受试者。

## 利用鉴定的腺苷指纹治疗癌症

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2019年3月29日提交的美国临时申请号62/826,728的优先权权益,将所述临时申请的内容出于所有目的通过引用并入本文。

关于在联邦政府资助的研究与开发下完成的发明的权利的声明

[0002] 不适用

对光盘上提交的“序列表”、表格或计算机程序列表附录的引用

[0003] 不适用

### 发明内容

[0004] 在一些方面,本文提供了治疗具有建立的腺苷指纹的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用靶向腺苷的胞外产生和/或拮抗腺苷对其受体之一的激活的治疗剂,

其中所述受试者的癌症具有至少一种选自以下的特征

(i) 来自所述受试者的血液中一种或多种腺苷机制蛋白的浓度增加,其中所述增加是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的血液所述一种或多种腺苷机制蛋白的典型浓度而言的;

(ii) 如通过AMP水解测定确定的来自所述受试者的血液中CD73或TNAP的活性增加,其中所述增加是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的血液中CD73和/或TNAP的典型AMP水解活性而言的;

(iii) 如通过一种或多种腺苷机制蛋白的免疫染色确定的来自所述受试者的癌症的活检展现出所述一种或多种腺苷机制蛋白的量增加,其中所述增加是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的活检中所述一种或多种腺苷机制蛋白的典型量而言的;和

(iv) 如通过mRNA水平确定的来自所述受试者的癌症的活检展现出一种或多种腺苷机制蛋白的上调,其中所述上调是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的活检中所述一种或多种腺苷机制蛋白的典型量而言的。

[0005] 在一些方面,本文提供了用于检测血液中可溶性CD73浓度和确定样品中CD73介导的和/或TNAP介导的单磷酸腺苷(AMP)水解活性的试剂盒和方法。

[0006] 从以下具体实施方式和附图,本发明的其他方面、特征和优点对于本领域技术人员将变得清楚。

### 附图说明

[0007] 图1示出了概括CD73 ELISA测定的原理的示意图。

[0008] 图2A-C定量外周血中可溶性CD73的稳健测定。(A)绘制了来自健康供体的血浆与血清中的可溶性CD73浓度的图,示出了强相关性;(B)绘制了鉴定测定的定量范围的平行性评估的图;(C)绘制了健康受试者和患有癌症的受试者的可溶性CD73水平的图,显示通常癌症患者的可溶性CD73水平升高。

[0009] 图3A-C使用AMP-Glo™确定血清中的AMP水解。(A)示出了总结测定原理的示意图；(B)绘制了在不同条件下(+/-CD73抑制剂和/或TNAP抑制剂)健康志愿者血清中的AMP水解的图；(C)绘制了健康志愿者和癌症患者血清的CD73蛋白浓度与AMP水解活性之间的相关性的图。

[0010] 图4A-B针对CD73和TNAP的人肿瘤的TCGA分析。绘制了在癌症基因组图谱样品中从RNAseq表达的CD73(小图A)和TNAP(小图B)的图。数字指示log2计数/百万样品的比率。根据样品的CD73/TNAP比率将样品排序,其中左侧肿瘤CD73表达较高并且右侧肿瘤TNAP较高。

[0011] 图5A-F使用免疫染色检测和定量在人肿瘤中的CD73。(A-D)示出了针对人FFPE肿瘤样品上的CD73免疫染色(棕色)的代表性图像。展示的肿瘤是非小细胞肺癌(NSCLC)(A、B)、三阴性乳腺癌(TNBC)(C)和结直肠癌(CRC)(D);图E示出了在所列癌症中CD73染色面积占总肿瘤面积的百分比的定量;并且图F绘制了H得分与染色面积百分比之间的相关性的图。

[0012] 图6A-E使用免疫染色检测和定量在人肿瘤中的TNAP。(A-D)示出了针对人FFPE肿瘤样品上的TNAP免疫染色(棕色)的代表性图像。展示的肿瘤是卵巢癌(A)、非小细胞肺癌(NSCLC)(B)、乳腺癌(C)和结直肠癌(CRC)(D);图E示出了在所列癌症中TNAP染色面积占总肿瘤面积的百分比的定量。

[0013] 图7A-C在人血浆中CD73介导的<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-AMP的去磷酸化为<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-腺苷的抑制。(A-C)示出了在化合物A的某些测试浓度下的剩余活性百分比的代表图。所示出的数据点和图用于计算志愿者1(图A)、志愿者2(图B)和志愿者3(图C)的IC<sub>50</sub>。

## 具体实施方式

### I. 通用

[0014] 本公开文本涉及这样的发现,即,受试者的癌症的腺苷指纹的评估和确定提供了用于更有效治疗癌症的方法。特别地,癌症的腺苷指纹的确定提供了一种用于鉴定将对特定的治疗方案具有更有利的反应的受试者的手段。

### II. 定义


[0015] 除非另有指示,否则以下术语旨在具有以下所阐述的含义。在整个说明书中的其他地方定义其他术语。

[0016] 除非另有说明,否则术语“烷基”本身或作为另一个取代基的一部分,意指直链或支链烃基,具有指定的碳原子数(即,C<sub>1-8</sub>意指一至八个碳)。烷基可以包含任何数量的碳,诸如C<sub>1-2</sub>、C<sub>1-3</sub>、C<sub>1-4</sub>、C<sub>1-5</sub>、C<sub>1-6</sub>、C<sub>1-7</sub>、C<sub>1-8</sub>、C<sub>1-9</sub>、C<sub>1-10</sub>、C<sub>2-3</sub>、C<sub>2-4</sub>、C<sub>2-5</sub>、C<sub>2-6</sub>、C<sub>3-4</sub>、C<sub>3-5</sub>、C<sub>3-6</sub>、C<sub>4-5</sub>、C<sub>4-6</sub>和C<sub>5-6</sub>。烷基的例子包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、正戊基、正己基、正庚基、正辛基等。

[0017] 术语“亚烷基”是指具有所指示数目的碳原子并且连接至少两个其他基团的直链或支链饱和脂族基团,即二价烃基。与亚烷基连接的两个部分可以与亚烷基的相同原子或不同原子连接。例如,直链亚烷基可以是-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-的二价基团,其中n是1、2、3、4、5或6。代表性亚烷基包括但不限于亚甲基、亚乙基、亚丙基、亚丁基、异亚丁基、仲亚丁基、亚戊基和亚己基。亚烷基(本申请中通常称为X<sup>1</sup>或X<sup>2</sup>基团)可以是经取代的或未经取代的。当包含X<sup>1</sup>或X<sup>2</sup>的基团是未经取代的时,应理解任选的取代基可以在所述部分的亚烷基部分上。

[0018] 术语“环烷基”是指具有指示数目的环原子(例如,  $C_{3-6}$  环烷基)并且是完全饱和的或在环顶点之间具有不多于一个双键的烃环。“环烷基”还意在指双环和多环烃环,例如像双环[2.2.1]庚烷、双环[2.2.2]辛烷等。在一些实施方案中,本公开文本的环烷基化合物是单环  $C_{3-6}$  环烷基部分。

[0019] 术语“杂环烷基”是指具有指示数目的环顶点(或成员)并且具有一至五个选自N、O和S的杂原子(所述杂原子替换一至五个碳顶点,并且其中所述氮和硫原子是任选被氧化的,并且一个或多个氮原子是任选季铵化的)的环烷基环。环杂烷基可以是单环、双环或多环系统。环杂烷基的非限制性例子包括吡咯烷、咪唑烷、吡啶烷、丁内酰胺、戊内酰胺、咪唑烷酮、乙内酰脲、二噁烷、邻苯二甲酰亚胺、哌啶、1,4-二噁烷、吗啉、硫代吗啉、硫代吗啉-S-氧化物、硫代吗啉-S,S-氧化物、哌嗪、吡喃、吡啶酮、3-吡咯啉、噻喃、吡喃酮、四氢呋喃、四氢噻吩、奎宁环等。环杂烷基可以通过碳或杂原子与分子的其余部分附接。

[0020] 如本文所用,在本文所描绘的任何化学结构中,与单键、双键或三键相交的波浪线“”表示单键、双键或三键与分子的其余部分附接的点。此外,延伸至环(例如,苯环)的中心的键意在指示在任何可用环顶点处的附接。本领域技术人员应理解,如显示为被附接到环的多个取代基将占据环顶点,这提供稳定的化合物并且是以其他方式空间相容的。对于二价组分,描述意在包括取向(正向或反向)。例如,基团“-C(O)NH-”意在包括以任一取向的连接:-C(O)NH-或-NHC(O)-,并且类似地,“-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-”意在包括-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-和-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-二者。

[0021] 术语“卤基”或“卤素”本身或作为另一个取代基的部分,除非另有说明,否则意指氟、氯、溴或碘原子。另外,诸如“卤代烷基”的术语意在包括单卤代烷基和多卤代烷基。例如,术语“ $C_{1-4}$  卤代烷基”意在包括三氟甲基、2,2,2-三氟乙基、4-氯丁基、3-溴丙基等。

[0022] 除非另有说明,否则术语“芳基”意指多不饱和的、典型地为芳族的烃基,其可以是单环或稠合在一起或共价连接的多环(最多三个环)。芳基的非限制性例子包括苯基、萘基和联苯基。

[0023] 术语“杂芳基”是指芳基(或环),其含有一至五个选自N、O和S的杂原子,其中氮和硫原子任选地被氧化,并且一个或多个氮原子任选地被季铵化。杂芳基可以通过杂原子与分子的其余部分附接。杂芳基的非限制性例子包括吡啶基、哒嗪基、吡嗪基、嘧啶基、三嗪基、喹啉基、喹喔啉基、喹唑啉基、噌啉基、酞嗪基、苯并三嗪基、嘌呤基、苯并咪唑基、苯并吡唑基、苯并三唑基、苯并异噁唑基、异苯并呋喃基、异吲哚基、吲哚基、苯并三嗪基、噻吩并吡啶基、噻吩并嘧啶基、吡唑嘧啶基、咪唑并吡啶、苯并噻唑基(benzothiazolyl)、苯并呋喃基、苯并噻吩基、吲哚基、喹啉基、异喹啉基、异噻唑基、吡唑基、吲唑基、蝶啶基、咪唑基、三唑基、四唑基、噁唑基、异噁唑基、噻二唑基、吡咯基、噻唑基、呋喃基、噻吩基等。杂芳基环的取代基可以选自以下所述的可接受的取代基。

[0024] 在一些实施方案中,上述术语(例如,“烷基”、“芳基”和“杂芳基”)将是任选经取代的。以下提供了每种类型基团的选定的取代基。

[0025] 用于烷基(包括通常称为亚烷基、烯基和炔基的那些基团)的任选取代基可以是选自以下的多种基团:卤素、-OR'、-NR'R''、-SR'、-SiR'R''R'''、-OC(O)R'、-C(O)R'、-CO<sub>2</sub>R'、-CONR'R''、-OC(O)NR'R''、-NR'C(O)R'、-NR'-C(O)NR'R''、-NR'C(O)<sub>2</sub>R'、-NH-C(NH<sub>2</sub>)=NH、-NR'C(NH<sub>2</sub>)=NH、-NH-C(NH<sub>2</sub>)=NR'、-S(O)R'、-S(O)<sub>2</sub>R'、-S(O)<sub>2</sub>NR'R''、-NR'S(O)<sub>2</sub>R''、-CN(氰基)、-

$\text{NO}_2$ 、芳基、芳基氧基、氧代基、环烷基和杂环烷基,数量范围为从零至  $(2m'+1)$ ,其中  $m'$  是在此类基团中的碳原子总数。 $R'$ 、 $R''$  和  $R'''$  各自独立地是氢、未经取代的  $\text{C}_{1-8}$  烷基、未经取代的芳基、用1-3个卤素取代的芳基、 $\text{C}_{1-8}$  烷氧基或  $\text{C}_{1-8}$  硫代烷氧基、或未经取代的芳基- $\text{C}_{1-4}$  烷基。当  $R'$  和  $R''$  与相同的氮原子附接时,它们可以与所述氮原子组合形成3、4、5、6或7元环。例如,  $-\text{NR}'\text{R}''$  意在包括1-吡咯烷基和4-吗啉基。

[0026] 用于环烷基和杂环烷基的任选取代基可以是选自以下的多种基团:任选地用  $\text{C}(\text{O})\text{OR}'$  取代的烷基、卤素、 $-\text{OR}'$ 、 $-\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{SR}'$ 、 $-\text{SiR}'\text{R}''\text{R}'''$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}'$ 、 $-\text{CONR}'\text{R}''$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{NR}'-\text{C}(\text{O})\text{NR}''\text{R}'''$ 、 $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$ 、 $-\text{NR}'\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NR}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NR}'\text{S}(\text{O})_2\text{R}''$ 、 $-\text{CN}$ (氰基)、 $-\text{NO}_2$ 、芳基、芳基氧基和氧代基。 $R'$ 、 $R''$  和  $R'''$  各自独立地是氢、未经取代的  $\text{C}_{1-8}$  烷基、未经取代的芳基、用1-3个卤素取代的芳基、 $\text{C}_{1-8}$  烷氧基或  $\text{C}_{1-8}$  硫代烷氧基、或未经取代的芳基- $\text{C}_{1-4}$  烷基。

[0027] 类似地,用于芳基和杂芳基的任选取代基是多样的并且通常选自以下: $-\text{卤素}$ 、 $-\text{OR}'$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{SR}'$ 、 $-\text{R}'$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}'$ 、 $-\text{CONR}'\text{R}''$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{NR}'-\text{C}(\text{O})\text{NR}''\text{R}'''$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$ 、 $-\text{NR}'\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$ 、 $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NR}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NR}'\text{S}(\text{O})_2\text{R}''$ 、 $-\text{N}_3$ 、全氟( $\text{C}_1-\text{C}_4$ )烷氧基和全氟( $\text{C}_1-\text{C}_4$ )烷基,数量范围为从零至芳族环系统上开放化合价的总数;并且其中  $R'$ 、 $R''$  和  $R'''$  独立地选自氢、 $\text{C}_{1-8}$  烷基、 $\text{C}_{1-8}$  卤代烷基、 $\text{C}_{3-6}$  环烷基、 $\text{C}_{2-8}$  烯基和  $\text{C}_{2-8}$  炔基。其他合适的取代基包括通过从1-6个碳原子的亚烷基链与环原子附接的上述芳基取代基中的任一个。

[0028] 芳基或杂芳基环的相邻原子上的取代基中的两个可以任选地被式  $-\text{T}-\text{C}(\text{O})-(\text{CH}_2)_q-\text{U}-$  的取代基取代,其中  $\text{T}$  和  $\text{U}$  独立地为  $-\text{NH}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-$  或单键,并且  $q$  是从0至2的整数。可替代地,芳基环或杂芳基环的相邻原子上的取代基中的两个可以任选地被式  $-\text{A}-(\text{CR}^f\text{R}^g)_r-\text{B}-$  的取代基取代,其中  $\text{A}$  和  $\text{B}$  独立地是  $-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}(\text{O})-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'-$  或单键,并且  $r$  是从1至3的整数,并且  $\text{R}^f$  和  $\text{R}^g$  各自独立地是  $\text{H}$  或卤素。如此形成的新环的单键之一可以任选地被双键替代。可替代地,芳基环或杂芳基环的相邻原子上的取代基中的两个可以任选地被式  $-(\text{CH}_2)_s-\text{X}-(\text{CH}_2)_t-$  的取代基替代,其中  $s$  和  $t$  独立地是从0至3的整数,并且  $\text{X}$  是  $-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}'-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}(\text{O})-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-$  或  $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'-$ 。 $-\text{NR}'-$  和  $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'-$  中的取代基  $\text{R}'$  选自氢或未经取代的  $\text{C}_{1-6}$  烷基。

[0029] 如本文所用,术语“杂原子”意在包括氧(O)、氮(N)、硫(S)和硅(Si)。

[0030] 术语“药学上可接受的盐”意在包括用相对无毒的酸或碱(取决于在本文所述的化合物上所发现的特定取代基)制备的活性化合物的盐。当本发明的化合物含有相对酸性的官能团时,可以通过使此类化合物的中性形式与足量的所希望的碱(纯净的或在合适的惰性溶剂中)接触来获得碱加成盐。源自药学上可接受的无机碱的盐的例子包括铝盐、铵盐、钙盐、铜盐、铁盐、亚铁盐、锂盐、镁盐、锰盐、二价锰盐、钾盐、钠盐、锌盐等。源自药学上可接受的有机碱的盐包括伯胺、仲胺和叔胺(包括经取代的胺、环状胺、天然存在的胺等,诸如精氨酸、甜菜碱、咖啡因、胆碱、 $\text{N,N}'$ -二苄基乙二胺、二乙胺、2-二乙基氨基乙醇、2-二甲氨基乙醇、乙醇胺、乙二胺、 $\text{N}$ -乙基吗啉、 $\text{N}$ -乙基哌啶、葡糖胺(glucamine)、葡萄糖胺(glucosamine)、组氨酸、海巴明(hydrabamine)、异丙胺、赖氨酸、甲葡糖胺(methylglucamine)、吗啉、哌嗪、哌啶、聚胺树脂、普鲁卡因、嘌呤、可可碱、三乙胺、三甲胺、

三丙胺、氨丁三醇等)的盐。当本发明的化合物含有相对碱性的官能团时,可以通过使此类化合物的中性形式与足量的所希望的酸(纯净的或在合适的惰性溶剂中)接触来获得酸加成盐。药学上可接受的酸加成盐的例子包括源自像以下的无机酸的那些:盐酸、氢溴酸、硝酸、碳酸、一氢碳酸、磷酸、一氢磷酸、二氢磷酸、硫酸、一氢硫酸、氢碘酸或亚磷酸等;以及源自像以下的相对无毒的有机酸的盐:乙酸、丙酸、异丁酸、丙二酸、苯甲酸、丁二酸、辛二酸、反丁烯二酸、扁桃酸、邻苯二甲酸、苯磺酸、对甲苯磺酸、柠檬酸、酒石酸、甲磺酸等。还包括氨基酸的盐(诸如精氨酸盐等)和有机酸(像葡糖醛酸或半乳糖醛酸等)的盐(参见例如, Berge, S.M. 等人, "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 1977, 66, 1-19)。本发明的某些特定化合物含有碱性和酸性两种官能团,所述官能团允许化合物转化为碱加成盐或酸加成盐。

[0031] 化合物的中性形式可以通过以下方式再生:使盐与碱或酸接触并且以常规方式分离母体化合物。化合物的母体形式在某些物理特性(诸如在极性溶剂中的溶解度)方面与各种盐形式不同,但是在其他方面出于本发明的目的,盐与化合物的母体形式等同。除盐形式之外,本发明还提供了呈前药形式的化合物。本文所述的化合物的前药是在生理条件下容易经历化学变化以提供本发明的化合物的那些化合物。另外,前药可以在离体环境中通过化学或生物化学方法转化为本发明的化合物。例如,当置于具有合适的酶或化学试剂的透皮贴剂储库中时,前药可以缓慢地转化为本发明的化合物。在本文其他地方更详细地描述了前药。

[0032] 除盐形式之外,本发明还提供了呈前药形式的化合物。本文所述的化合物的前药是在生理条件下容易经历化学变化以提供本发明的化合物的那些化合物。另外,前药可以在离体环境中通过化学或生物化学方法转化为本发明的化合物。例如,当置于具有合适的酶或化学试剂的透皮贴剂储库中时,前药可以缓慢地转化为本发明的化合物。

[0033] 本发明的某些化合物可以以非溶剂化形式以及溶剂化形式(包括水合形式)存在。通常,溶剂化形式与非溶剂化形式等同,并且旨在包括在本发明的范围内。本发明的某些化合物可以以多种结晶或无定形形式存在。通常,所有物理形式对于本发明所考虑的用途是等同的,并且旨在落入本发明的范围内。

[0034] 本发明的某些化合物具有不对称碳原子(光学中心)或双键;外消旋体、非对映异构体、几何异构体、区域异构体和单独的异构体(例如,单独的对映异构体)均旨在包括在本发明的范围内。当显示立体化学描绘时,意在指代存在异构体之一并且基本上不含其他异构体的化合物。“基本上不含”另一种异构体指示这两种异构体的比率为至少80/20,更优选地90/10或95/5或更高。在一些实施方案中,异构体之一将以至少99%的量存在。

[0035] 本发明的化合物还可以在构成此类化合物的原子中的一个或多个处含有非天然比例的原子同位素。同位素的非天然比例可以被定义为在从自然界中发现的量至由100%所讨论原子组成的量的范围内。例如,化合物可以掺入放射性同位素,例如像氘( $^3\text{H}$ )、碘-125 ( $^{125}\text{I}$ ) 或碳-14 ( $^{14}\text{C}$ );或非放射性同位素,诸如氘( $^2\text{H}$ )或碳-13 ( $^{13}\text{C}$ )。此类同位素变化可以为在本申请内其他地方描述的那些提供另外的效用。例如,本发明的化合物的同位素变体可以具有另外的效用,包括但不限于作为诊断试剂和/或成像试剂,或作为细胞毒性治疗剂/放射毒性治疗剂。另外,本发明的化合物的同位素变体可以具有改变的药代动力学和药效学特征,这可以有助于在治疗过程中增强安全性、耐受性或功效。本发明的化合物的所有

同位素变体(无论是否具有放射性)均旨在包括在本发明的范围内。

[0036] 术语“患者”或“受试者”可互换地用于指代人或非人动物(例如,哺乳动物)。

[0037] 术语“施用(administration)”、“施用(administer)”等当它们应用于例如受试者、细胞、组织、器官或生物流体时是指例如A2aR/A2bR的抑制剂(或本文所述的另一种抑制剂或拮抗剂)或包含其的药物组合物与上述受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。在细胞的背景下,施用包括试剂与上述细胞的接触(例如,体外或离体),以及试剂与流体的接触,其中所述流体与上述细胞接触。

[0038] 术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”等是指在已经诊断出、观察到等疾病、障碍或病症或其症状之后启动的一连串动作(诸如施用A2aR/A2bR的抑制剂或本文所述的另一种抑制剂或拮抗剂),以暂时或永久消除、减少、压制、减轻或改善困扰受试者的疾病、障碍或病症的潜在原因中的至少一种,或与困扰受试者的疾病、障碍、病症相关的症状中的至少一种。因此,治疗包括抑制(例如,阻止疾病、障碍或病症或与其相关的临床症状的发展或进一步发展)活动性疾病。

[0039] 如本文所用的术语“需要治疗”是指由医生或其他照料者所做出的这样的判断,即受试者需要治疗或将从治疗中受益。此判断是基于医生或照料者的专业知识领域中的各种因素做出的。

[0040] 术语“预防(prevent)”、“预防(preventing)”、“预防(prevention)”等是指通常在易患特定疾病、障碍或病症的受试者的背景下,以这样的方式(例如,在疾病、障碍、病症或其症状发作之前)启动的一连串动作(诸如施用A2aR/A2bR抑制剂或本文所述的另一种抑制剂或拮抗剂),以临时或永久预防、压制、抑制或降低受试者患上疾病、障碍、病症等的风险(如通过例如没有临床症状所确定的)或延迟其发作。在某些情况下,所述术语还指代减缓疾病、障碍或病症的进展或抑制其进展到有害或在其他方面不期望的状态。

[0041] 如本文所用的术语“需要预防”是指由医生或其他照料者所做出的这样的判断,即受试者需要预防性护理或将从预防性护理中受益。此判断是基于医生或照料者的专业知识领域中的各种因素做出的。

[0042] 短语“治疗有效量”是指将药剂单独地或作为药物组合物的一部分并且以单一剂量或作为一系列剂量的一部分以能够当施用于受试者时对疾病、障碍或病症的任何症状、方面或特征具有任何可检测的积极影响的量施用于受试者。通过测量相关的生理效应可以确定治疗有效量,并且它可以结合给药方案和受试者的病症的诊断分析等进行调整。举例来说,在施用后的特定时间的A2aR/A2bR抑制剂(或例如,本文所述的另一种抑制剂或拮抗剂)的血清水平的测量可以指示是否已经使用了治疗有效量。

[0043] 短语“以足以实现改变的量”意指在施用特定疗法之前(例如,基线水平)和之后测量的指标的水平之间存在可检测的差异。指标包括任何客观参数(例如,血清浓度)或主观参数(例如,受试者的幸福感)。

[0044] 术语“小分子”是指具有小于约10kDa、小于约2kDa或小于约1kDa的分子量的化合物。小分子包括但不限于无机分子、有机分子、含无机组分的有机分子、包含放射性原子的分子和合成分子。在治疗上,与大分子相比,小分子可以更易透过细胞、更不易降解并且更不太可能引发免疫反应。

[0045] 术语“配体”是指例如可以充当受体的激动剂或拮抗剂的肽、多肽、膜相关或膜结

合分子或其复合物。配体包括天然配体和合成配体,例如细胞因子、细胞因子变体、类似物、突变蛋白和源自抗体的结合组合物以及小分子。所述术语还包括既不是激动剂也不是拮抗剂但可以与受体结合而不显著影响其生物学特性(例如,信号传导或粘附)的药剂。此外,所述术语包括已经通过例如化学方法或重组方法改变为膜结合配体的可溶性形式的膜结合配体。配体或受体可以是完全细胞内的,也就是说,它可以在胞质溶胶、细胞核或一些其他细胞内区室中驻留。配体和受体的复合物被称为“配体-受体复合物”。

[0046] 术语“抑制剂”和“拮抗剂”,或“激活剂”和“激动剂”分别是指抑制性分子或例如用于例如配体、受体、辅因子、基因、细胞、组织或器官的激活的激活性分子。抑制剂是降低、阻断、防止、延迟激活,失活、脱敏或下调例如基因、蛋白质、配体、受体或细胞的分子。激活剂是增加、激活、促进、增强激活,敏化或上调例如基因、蛋白质、配体、受体或细胞的分子。抑制剂也可以被定义为降低、阻断或失活组成型活性的分子。“激动剂”是与靶标相互作用以引起或促进靶标激活增加的分子。“拮抗剂”是对抗激动剂的一种或多种动作的分子。拮抗剂防止、降低、抑制或中和激动剂的活性,并且即使没有鉴定的激动剂,拮抗剂也可以预防、抑制或降低靶标(例如,靶受体)的组成型活性。

[0047] 术语“调节(modulate)”、“调节(modulation)”等是指分子(例如,激活剂或抑制剂)直接或间接增加或降低本文所述的腺苷相关蛋白的功能或活性的能力。调节剂可以单独起作用,或者它可以使用辅因子,例如蛋白质、金属离子或小分子。调节剂的例子包括小分子化合物和其他生物有机分子。小分子化合物的许多文库(例如,组合文库)是可商购获得的,并且可以用作鉴定调节剂的起点。熟练技术人员能够开发这样的一种或多种测定(例如,生物化学测定或基于细胞的测定),在所述测定中可以筛选此类化合物文库以鉴定具有所希望特性的一种或多种化合物;此后,熟练药物化学家能够通过例如合成和评价其类似物和衍生物来优化此类一种或多种化合物。合成和/或分子建模研究也可以用于鉴定激活剂。

[0048] 分子的“活性”可以描述或指代分子与配体或受体的结合;催化活性;刺激基因表达或细胞信号传导、分化或成熟的能力;抗原活性;调节其他分子的活性;等等。术语“增殖活性”包括促进(即为其所需)例如正常细胞分裂以及癌症、肿瘤、发育不良、细胞转化、转移和血管生成或者与其特别相关的活性。

[0049] 如本文所用,“相当的”、“相当的活性”、“与……相当的活性”、“相当的效果”、“与……相当的效果”等是可以定量地和/或定性地查看的相对项。术语的含义常取决于使用它们的上下文。举例来说,从定性的角度,可以将均激活受体的两种药剂视为具有相当的效果,但是如果一种药剂只能达到另一种药剂的活性的20%(如在本领域接受的测定(例如,剂量-反应测定)或在本领域接受的动物模型中所确定的),则从定量的角度,可以将这两种药剂视为缺乏相当的效果。当将一种结果与另一种结果(例如,一种结果与参考标准)进行比较时,“相当的”经常(尽管并不总是)意指一种结果偏离参考标准小于35%、小于30%、小于25%、小于20%、小于15%、小于10%、小于7%、小于5%、小于4%、小于3%、小于2%或小于1%。在具体的实施方案中,如果一种结果偏离参考标准小于15%、小于10%或小于5%,则这种结果与参考标准是相当的。举例来说,但并非限制,活性或效果可以指代功效、稳定性、溶解度或免疫原性。

[0050] “基本上纯的”指示组分占组合物总含量的大于约50%,典型地总多肽含量的大于

约60%。更典型地，“基本上纯的”是指这样的组合物，在所述组合物中总组合物的至少75%、至少85%、至少90%或更多是感兴趣的组分。在一些情况下，多肽将占组合物总含量的大于约90%或大于约95%。

[0051] 当提及配体/受体、抗体/抗原或其他结合对时，术语“特异性结合”或“选择性结合”指示决定在蛋白质和其他生物制品的异质群体中蛋白质的存在的结合反应。因此，在所指定的条件下，指定的配体与特定的受体结合，并且不以显著量与样品中存在的其他蛋白质结合。所考虑的方法的抗体或源自抗体的抗原结合位点的结合组合物与其抗原或所述抗原的变体或突变蛋白结合，其中亲和力是任何其他抗体或源自其的结合组合物的亲和力的至少两倍、至少十倍、至少20倍或至少100倍。在一个具体的实施方案中，抗体将具有大于约 $10^9$ 升/mol的亲和力，如通过例如Scatchard分析 (Munsen等人1980Analyt.Biochem.107:220-239) 所确定的。

[0052] 术语“反应” (例如，细胞、组织、器官或生物体的) 包括生物区室内的生物化学或生理行为 (例如，浓度、密度、粘附或迁移)、基因表达率或分化状态的变化，其中所述变化与激活、刺激或治疗相关，或与诸如遗传编程的内部机制相关。在某些背景下，术语“激活”、“刺激”等是指如通过内部机制以及通过外部或环境因素调节的细胞激活；而术语“抑制”、“下调”等是指相反的效果。

[0053] 术语“腺苷机制蛋白”或“腺苷机制mRNA”或“腺苷机制基因”分别是指参与腺苷胞外产生或参与腺苷介导的信号传导通路的蛋白质、mRNA或编码DNA。示例性蛋白质和相应的mRNA包括但不限于腺苷A2a受体 (A2aR)、腺苷A2b受体 (A2bR)、腺苷A1受体 (A1R)、CD26、腺苷脱氨酶 (ADA)、组织非特异性碱性磷酸酶 (TNAP)、CD73、膜外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶1 (ENPP1)、CD38和/或CD39。

[0054] 术语“靶向腺苷胞外产生的药剂”是指参与腺苷胞外产生的一种或多种蛋白质的调节剂。示例性调节剂包括小分子化合物、抗体和干扰RNA。参与腺苷胞外产生的蛋白质包括但不限于组织非特异性碱性磷酸酶 (TNAP)、CD73、膜外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶1 (ENPP1)、CD38和/或CD39。因此，已知靶向这些蛋白质的调节剂与本公开文本相关。

[0055] 术语“拮抗腺苷对其受体之一的激活的药剂”是指减少或完全防止腺苷与腺苷受体蛋白 (通常是整体膜蛋白) 结合的拮抗剂。被腺苷激活的蛋白质受体包括但不限于腺苷A1受体 (A1R)、腺苷A2a受体 (A2aR) 和/或腺苷A2b受体 (A2bR)。因此，已知靶向这些受体的拮抗剂与本公开文本相关。

### III. 实施方案的详细描述

[0056] 本文公开了建立受试者的癌症的腺苷指纹的方法，作为用于鉴定将对特定治疗方案具有更有利的反应的受试者的手段。在本文中进一步描述了在受试者中建立腺苷指纹，但是通常包括确定以下一项或多项：受试者的血液中的一种或多种腺苷机制蛋白的表达水平、来自受试者的肿瘤的活检的一种或多种腺苷机制蛋白的表达水平 (或mRNA水平)、受试者的血液或肿瘤中特定腺苷机制蛋白的活性。

[0057] 因此，本文还提供了治疗具有建立的腺苷指纹的受试者的癌症的方法，所述方法包括向所述受试者施用靶向腺苷的胞外产生和/或拮抗腺苷对其受体之一的激活的治疗剂，

其中所述受试者的癌症具有至少一种选自以下的特征

(i) 来自所述受试者的血液中一种或多种腺苷机制蛋白的浓度增加,其中所述增加是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的血液中所述一种或多种腺苷机制蛋白的典型浓度而言的;

(ii) 如通过AMP水解测定确定的来自所述受试者的血液中CD73或TNAP的活性增加,其中所述增加是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的血液中CD73和/或TNAP的典型AMP水解活性而言的;

(iii) 如通过一种或多种腺苷机制蛋白的免疫染色确定的来自所述受试者的癌症的活检展现出所述一种或多种腺苷机制蛋白的量增加,其中所述增加是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的活检中所述一种或多种腺苷机制蛋白的典型量而言的;和

(iv) 如通过mRNA水平确定的来自所述受试者的癌症的活检展现出一种或多种腺苷机制蛋白的上调,其中所述上调是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的活检中所述一种或多种腺苷机制蛋白的典型量而言的。

#### 腺苷机制蛋白

[0058] 肿瘤微环境中的胞外腺苷已显示在各种肿瘤模型中具有免疫抑制作用。因此,参与胞外腺苷产生和/或腺苷信号传导的蛋白质(腺苷机制蛋白)可能是阻断、降低或抑制腺苷的免疫抑制作用的候选物。腺苷机制蛋白包括但不限于腺苷A2a受体(A2aR)、腺苷A2b受体(A2bR)、腺苷A1受体(A1R)、CD26、腺苷脱氨酶(ADA)、组织非特异性碱性磷酸酶(TNAP)、CD73、膜外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶1(ENPP1)、CD38和/或CD39。

[0059] 向医务人员提供关于腺苷机制蛋白的表达水平和/或活性水平的信息的诊断测试提供了一种用于鉴定将对特定治疗方案具有更有利的反应的受试者的手段。如下所述,评估癌症的腺苷指纹提供了关于腺苷机制蛋白的有价值的信息。

#### 癌症的腺苷指纹

[0060] 癌症的腺苷指纹可以用于为针对患有癌症的受试者鉴定和选择合适疗法的决策提供信息。腺苷指纹可以包括评估一种或多种腺苷机制蛋白的表达水平和/或活性。表达水平可以是癌症样品中mRNA的量、癌症样品中表达的蛋白质的量、患有癌症的受试者的血液中表达的蛋白质的量或这些评估中的每一种的组合。评估活性通常采用酶测定,其使用来自癌症的血液样品或评估腺苷机制蛋白的催化活性的样品。

[0061] 评估腺苷机制蛋白的血液浓度。一种或多种腺苷机制蛋白的血液浓度的确定提供了关于在患有癌症的受试者中表达的相关蛋白质的量的信息。存在多种已知的用于确定血液样品中分析物的浓度的方法。一个这种例子是夹心ELISA测定。实施例1提供了确定受试者的血液样品中可溶性CD73的量的描述。多种其他类似或相关的方法可以用于确定一种或多种另外的腺苷机制蛋白的浓度。

[0062] 在一些实施方案中,当评估受试者的腺苷指纹时,一种或多种腺苷机制蛋白的浓度的增加被认为是相关的。所述增加是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的血液中的一种或多种腺苷机制蛋白的典型浓度确定的。在一些实施方案中,给定的腺苷机制蛋白的典型浓度是来自患有相同类型癌症的受试者的血液中的阈值。在一些实施方案中,给定的腺苷机制蛋白的典型浓度是来自患有相同类型癌症的受试者的血液中的一种或多种腺苷机制蛋白的平均浓度。在一些实施方案中,所述增加是相对于在诊断为患有癌症之前的受试者中的一种或多种腺苷机制蛋白的浓度的。

[0063] 在一些实施方案中,当评估腺苷指纹时,可溶性CD73浓度被认为是相关阈值。例如,在一些实施方案中,来自受试者的血液中约1ng/mL的可溶性CD73浓度被认为是相关阈值。在一些实施方案中,所述阈值是3ng/mL。在一些实施方案中,所述阈值是8ng/mL。

[0064] 在一些实施方案中,通过测量相对于参考标准水平的相对增加来确定在确定腺苷指纹的上下文中腺苷机制蛋白的升高水平。参考标准水平可以是患有相同类型癌症的受试者中给定的蛋白质的阈值或平均水平。例如,在一些实施方案中,当存在相对于参考标准水平至少1%的增加时,来自患有癌症的受试者的血液中的可溶性CD73浓度被认为是相关的。在一些实施方案中,相对于参考标准水平的约2、3、4、5、10、15、20、25或更多百分比的增加被认为是相关的。

[0065] 使用AMP水解测定评估腺苷机制蛋白的酶活性。一种或多种腺苷机制蛋白的酶活性的确定提供了关于在患有癌症的受试者中表达的相关蛋白质的活性的信息。这些确定可以从取自患有癌症的受试者的血液样品中进行。存在多种已知的用于确定血液样品中蛋白质的活性的方法。在本公开文本中用于测量CD73或TNAP的活性的一个特别相关的测定是在本申请的实施例2中描述的AMP-Glo水解测定。

[0066] 由CD73、TNAP或另一种蛋白质介导的AMP水解的量可以以多种不同的方式报告。在一些实施方案中,将样品中CD73和/或TNAP介导的水解报告为样品中总AMP水解活性的百分比。在确定腺苷指纹的上下文中,AMP水解测定的结果可以指示用一种或多种靶向腺苷胞外产生的药剂或拮抗腺苷对其受体之一的激活的药剂进行治疗是适当的。

[0067] 在一些实施方案中,当经由AMP水解测定评估受试者的腺苷指纹时,CD73和/或TNAP活性的增加被认为是相关的。所述增加是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的血液中CD73和/或TNAP的典型AMP水解活性确定的。在一些实施方案中,CD73和/或TNAP的典型AMP水解活性是患有相同类型癌症的受试者的阈值。在一些实施方案中,CD73和/或TNAP的典型AMP水解活性是来自患有相同类型癌症的受试者的血液中的一种或多种腺苷机制蛋白的平均AMP水解活性。在一些实施方案中,所述增加是相对于在诊断为患有癌症之前的受试者的血液中的CD73和/或TNAP的AMP水解活性的。

[0068] 在一些实施方案中,当经由AMP-Glo水解测定评估受试者的腺苷指纹时,通过腺苷机制蛋白的AMP介导的水解的阈值水平被认为是相关的。在一些实施方案中,此类结果包括在以下的情况下的值:受试者血液中总AMP水解活性的至少10%是由CD73或TNAP介导的;受试者血液中总AMP水解活性的至少20%是由CD73或TNAP介导的;或受试者血液中总AMP水解活性的至少50%是由CD73或TNAP介导的。

[0069] 在一些实施方案中,使用本申请的实施例7中描述的同位素AMP水解测定来完成腺苷机制蛋白的酶活性的评估。

[0070] 在一些实施方案中,当经由同位素AMP水解测定评估受试者的腺苷指纹时,CD73和/或TNAP的同位素AMP水解活性的增加被认为是相关的。所述增加是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的血液中CD73和/或TNAP的典型同位素AMP水解活性确定的。在一些实施方案中,CD73和/或TNAP的典型同位素AMP水解活性是高于患有相同类型癌症的受试者的阈值的增加。在一些实施方案中,CD73和/或TNAP的典型同位素AMP水解活性是来自患有相同类型癌症的受试者的血液中的一种或多种腺苷机制蛋白的平均同位素AMP水解活性。在一些实施方案中,所述增加是相对于在诊断为患有癌症之前的受试者的血液中的CD73和/或

TNAP的同位素AMP水解活性的。

[0071] 在一些实施方案中,当经由同位素AMP水解测定评估受试者的腺苷指纹时,通过腺苷机制蛋白的AMP介导的水解的阈值水平被认为是相关的。在一些实施方案中,此类结果包括在以下的情况下的值:受试者血液中总AMP水解活性的至少10%是由CD73或TNAP介导的;受试者血液中总AMP水解活性的至少20%是由CD73或TNAP介导的;或受试者血液中总AMP水解活性的至少50%是由CD73或TNAP介导的。

[0072] 使用免疫染色评估肿瘤中腺苷机制蛋白的表达水平。免疫染色是一种完善的技术,其用于鉴定特定蛋白质的存在并且用于定量所述蛋白质的相对量。存在多种方法可用于标记所述蛋白质以进行可视化和定量。典型地,免疫染色包括获得来自患有癌症的受试者的肿瘤的活检,并且应用与感兴趣的靶标结合的标记的抗体。实施例3中描述了用于确定CD73和TNAP的量的示例性方法。本领域技术人员应认识到,可以使用与实施例3中描述的技术或基于本领域已知方法类似的技术来评估其他腺苷机制蛋白。

[0073] 在一些实施方案中,当经由免疫染色评估受试者的腺苷指纹时,腺苷机制蛋白的增加被认为是相关的。所述增加是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的活检中这种腺苷机制蛋白的典型量确定的。在一些实施方案中,给定的腺苷机制蛋白的典型量是来自患有相同类型癌症的受试者的活检中的阈值。在一些实施方案中,给定的腺苷机制蛋白的典型量是来自患有相同类型癌症的受试者的活检中的此类腺苷机制蛋白的平均量。在一些实施方案中,所述增加是相对于在诊断为患有癌症之前的受试者的相同组织中腺苷机制蛋白的量。

[0074] 在一些实施方案中,当经由免疫染色评估受试者的腺苷指纹时,感兴趣的分析物的染色面积百分比被认为是相关阈值。例如,在一些实施方案中,1%的染色面积被认为是相关阈值。在一些实施方案中,7%、10%、20%或更大的染色面积被认为是相关阈值。

[0075] 通过测量mRNA水平评估腺苷机制蛋白。许多鉴定和定量生物样品中相对mRNA水平的方法是本领域已知的,所述方法中的每一种均适用于评估腺苷机制mRNA水平。如本文所考虑的,在一些实施方案中,来自受试者的肿瘤活检进行测量mRNA水平的方法。实施例4中描述了用于确定腺苷机制蛋白的mRNA水平的示例性方法。

[0076] 在一些实施方案中,当经由测量mRNA水平评估受试者的腺苷指纹时,腺苷机制mRNA的上调被认为是相关的。上调是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的活检中腺苷机制mRNA的典型量确定的。在一些实施方案中,给定的腺苷机制mRNA的典型量是来自患有相同类型癌症的受试者的活检中的阈值。在一些实施方案中,给定的腺苷机制mRNA的典型量是来自患有相同类型癌症的受试者的活检中的此类腺苷机制mRNA的平均量。在一些实施方案中,所述增加是相对于在诊断为患有癌症之前的受试者的相同组织中腺苷机制mRNA的量。

[0077] 因此,在一些实施方案中,本公开文本提供了用于治疗具有建立的腺苷指纹的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用选自腺苷A2a受体(A2aR)和/或腺苷A2b受体(A2bR)拮抗剂和CD73抑制剂的治疗剂,

其中当所述受试者的癌症具有至少一种选自以下的特征时,则向所述受试者施用CD73抑制剂

(i) 来自所述受试者的血液中的可溶性CD73浓度增加,其中所述增加是相对于来

自患有相同类型癌症的受试者的血液中CD73的典型浓度而言的；

(ii) 如通过AMP水解测定确定的来自所述受试者的血液中的CD73活性增加，其中所述增加是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的血液中CD73的典型AMP水解活性而言的；

(iii) 如通过针对CD73的免疫染色确定的来自所述受试者的癌症的活检展现出CD73的量增加，其中所述增加是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的活检中的CD73的典型量而言的；以及

(iv) 如通过mRNA水平确定的来自所述受试者的癌症的活检展现出CD73的上调，其中所述上调是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的活检中的CD73的典型量而言的；

其中当所述受试者的癌症具有至少一种选自以下的特征时，则向所述受试者施用腺苷A2a受体 (A2aR) 和/或腺苷A2b受体 (A2bR) 拮抗剂

(a) 来自受试者的血液中的可溶性TNAP浓度增加，其中所述增加是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的血液中TNAP的典型浓度而言的；

(b) 如通过AMP水解测定确定的来自所述受试者的血液中TNAP的活性增加，其中所述增加是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的血液中TNAP的典型AMP水解活性而言的；

(c) 如通过针对TNAP的免疫染色确定的来自所述受试者的癌症的活检展现出TNAP的量增加，其中所述增加是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的活检中TNAP的典型量而言的；

(d) 如通过mRNA水平确定的来自所述受试者的癌症的活检展现出TNAP的上调，其中所述上调是相对于来自患有相同类型癌症的受试者的活检中TNAP的典型量而言的。

[0078] 在一些实施方案中，当受试者的癌症具有选自(i)至(iv)的至少两种、三种或四种特征时，则向所述受试者施用CD73抑制剂；或当受试者的癌症具有选自(a)至(d)的至少两种、三种或四种特征时，则向所述受试者施用腺苷A2a受体 (A2aR) 或腺苷A2b受体 (A2bR) 拮抗剂。

[0079] 在一些实施方案中，当受试者的癌症展现出选自(i)至(iv)和(a)至(d)的至少一种、两种、三种或四种特征时，则仅向所述受试者施用腺苷A2a受体 (A2aR) 或腺苷A2b受体 (A2bR) 拮抗剂。

[0080] 在一些实施方案中，当受试者的癌症展现出选自(i)至(iv)和(a)至(d)中的每一种的至少一种、两种、三种或四种特征时，则向所述受试者施用腺苷A2a受体 (A2aR) 和/或腺苷A2b受体 (A2bR) 拮抗剂和CD73抑制剂二者。

[0081] 本文所述的一种或多种特征的评估有助于鉴定将更有利地响应于选定的治疗剂的受试者。这些药剂包括靶向腺苷胞外产生的药剂以及拮抗腺苷对其受体之一的激活的药剂。

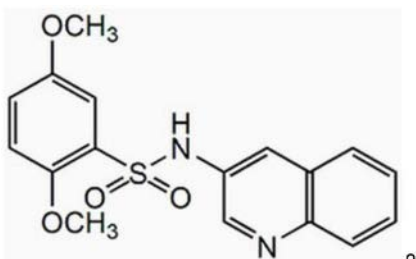
#### 靶向腺苷胞外产生的药剂

[0082] 已知许多蛋白质参与体内腺苷的胞外产生。例如，导致胞外腺苷产生的主导途径是CD39 (其将ATP水解为ADP，然后水解为AMP) 和CD73 (其将AMP水解为腺苷) 对ATP的连续去磷酸化。TNAP也有助于从AMP产生腺苷。导致胞外腺苷产生的可替代机制是NAD<sup>+</sup>通过CD38水解为ADPR以及ADPR通过ENPP1水解为AMP。ENPP1也可以水解NAD<sup>+</sup>以产生AMP。因此，参

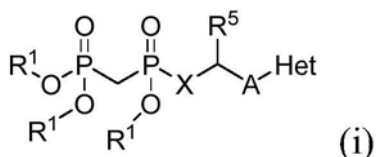
与腺苷胞外产生的蛋白质包括但不限于组织非特异性碱性磷酸酶 (TNAP)、CD73、膜外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶1 (ENPP1)、CD38和/或CD39。

[0083] 如本文所考虑的,本公开文本提供了使用一种或多种靶向腺苷胞外产生的药剂治疗具有建立的腺苷指纹的受试者的癌症的方法。

[0084] 组织非特异性碱性磷酸酶 (TNAP) 抑制剂。几种TNAP抑制剂是本领域已知的。在一些实施方案中,可用于所述方法的TNAP抑制剂是W0/2013/126608、W0/2006/039480或W0/2002/092020中公开的药剂,将其各自的内容出于所有目的通过引用特此并入。在一些实施方案中,所述TNAP抑制剂具有式:



[0085] CD 73抑制剂。在一些实施方案中,可用于所述方法的CD73抑制剂是式 (i) 的化合物



或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其中,

每个R<sup>1</sup>独立地选自氢、任选经取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、任选经取代的芳基、和-C(R<sup>2</sup>R<sup>2</sup>)-O-C(O)-OR<sup>3</sup>,或者两个R<sup>1</sup>基团任选地组合以形成5至7元环;

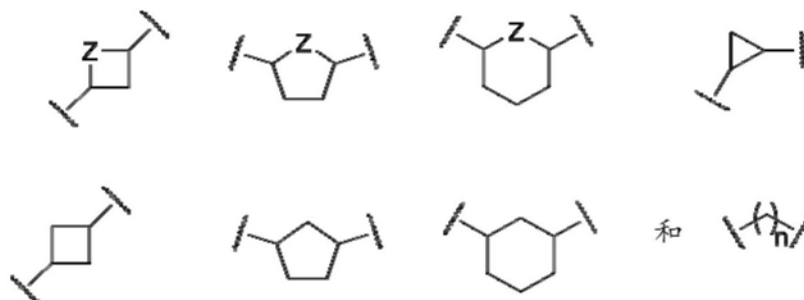
每个R<sup>2</sup>独立地选自H和任选经取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基;

每个R<sup>3</sup>独立地选自H、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基和任选经取代的芳基;

R<sup>5</sup>选自H和任选经取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基;

X选自O、CH<sub>2</sub>和S;

A选自:

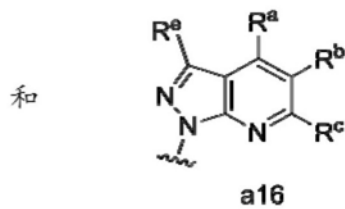
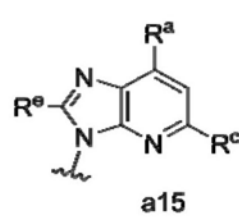
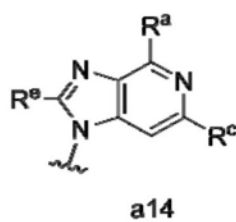
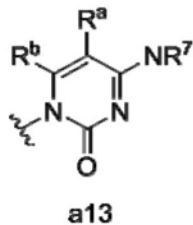
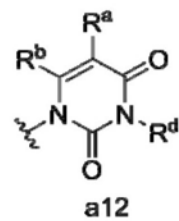
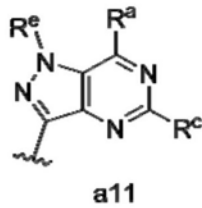
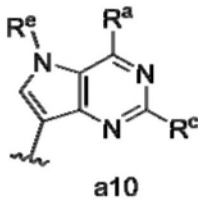
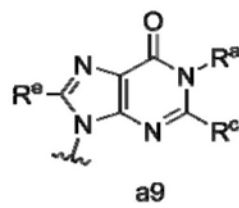
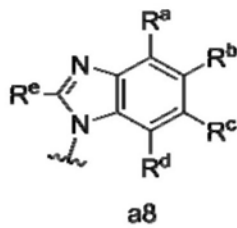
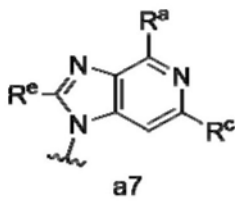
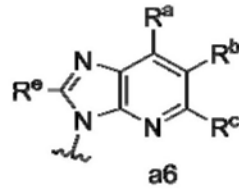
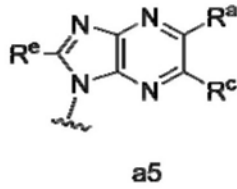
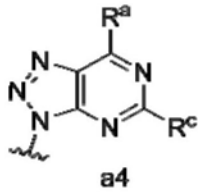
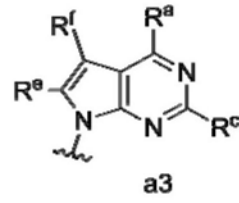
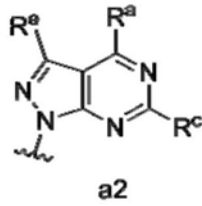
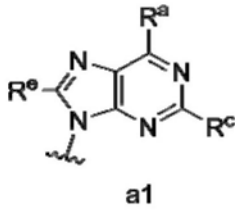


其各自任选地被从1至5个R<sup>6</sup>取代基取代,并且其中下标n是从0至3的整数;

Z选自CH<sub>2</sub>、CHR<sup>6</sup>、NR<sup>6</sup>和O;

每个R<sup>6</sup>独立地选自H、CH<sub>3</sub>、OH、CN、F、任选经取代的C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、和OC(O)-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基;并且任选地相邻环顶点上的两个R<sup>6</sup>基团连接在一起以形成具有至少一个杂原子作为环顶点的5至6元环;并且

Het选自：



其中波浪线指示与所述化合物的其余部分附接的点,并且其中:

$R^a$ 选自H、 $NH_2$ 、 $NHR^7$ 、 $NHC(O)R^7$ 、 $NR^7R^7$ 、 $R^7$ 、OH、 $SR^7$ 和 $OR^7$ ;

$R^b$ 选自H、卤素、 $NH_2$ 、 $NHR^7$ 、 $NR^7R^7$ 、 $R^7$ 、OH和 $OR^7$ ;

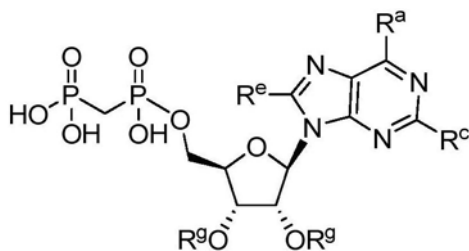
$R^c$ 和 $R^d$ 独立地选自H、卤素、卤代烷基、 $NH_2$ 、 $NHR^7$ 、 $NR^7R^7$ 、 $R^7$ 、OH、 $OR^7$ 、 $SR^7$ 、 $SO_2R^7$ 、 $-X^1-NH_2$ 、 $-X^1-NHR^7$ 、 $-X^1-NR^7R^7$ 、 $-X^1-OH$ 、 $-X^1-OR^7$ 、 $-X^1-SR^7$ 和 $-X^1-SO_2R^7$ ;

$R^e$ 和 $R^f$ 独立地选自H、卤素和任选经取代的 $C_1-C_6$ 烷基;

每个 $X^1$ 是 $C_1-C_4$ 亚烷基;并且

每个 $R^7$ 独立地选自任选经取代的 $C_1-C_{10}$ 烷基、任选经取代的 $C_2-C_{10}$ 烯基、任选经取代的 $C_2-C_{10}$ 炔基、任选经取代的 $C_3-C_7$ 环烷基、任选经取代的 $C_3-C_7$ 环烷基 $C_1-C_4$ 烷基、任选经取代的4-7元环杂烷基、任选经取代的4-7元环杂烷基 $C_1-C_4$ 烷基、任选经取代的芳基、任选经取代的芳基 $C_1-C_4$ 烷基、任选经取代的芳基 $C_2-C_4$ 烯基、任选经取代的芳基 $C_2-C_4$ 炔基、任选经取代的杂芳基、任选经取代的杂芳基 $C_1-C_4$ 烷基、任选经取代的杂芳基 $C_1-C_4$ 烯基、任选经取代的杂芳基 $C_2-C_4$ 炔基,并且任选地,与氮原子附接的两个 $R^7$ 基团连接在一起以形成任选地与芳环稠合的4至7元杂环;

其中条件是所述化合物不是以下这些化合物:其中X、A和Het的组合导致



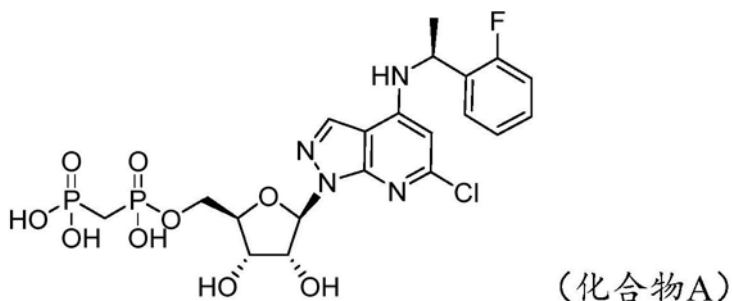
其中 $R^g$ 是H或所述两个 $R^g$ 基团组合以形成缩丙酮;并且

(1)  $R^c$ 和 $R^e$ 是氢并且 $R^a$ 是 $-OEt$ 、 $-OCH_2Ph$ 、 $-SCH_2Ph$ 、 $-NH_2$ 、甲基氨基、乙基氨基、二甲基氨基、二乙基氨基、N-甲基-N-乙基氨基、苄基氨基、苄基氨基、2-苄基乙基氨基、N-苄基-N-乙基氨基、二苄基氨基、4-氨基苄基氨基、4-氯苄基氨基、4-硝基苄基氨基、或4-氨基磺酰基苄基氨基;或

(2)  $R^c$ 是氢, $R^a$ 是 $-NH_2$ ,并且 $R^e$ 是溴、氯、氨基甲基、或硫代乙基;或

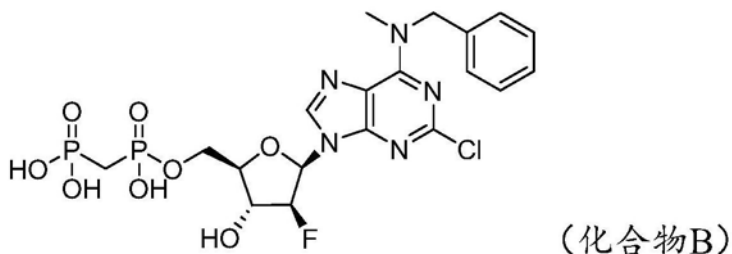
(3)  $R^c$ 是氢, $R^a$ 是苄基氨基,并且 $R^e$ 是溴。

[0086] 在一些实施方案中,所述CD73抑制剂是化合物A



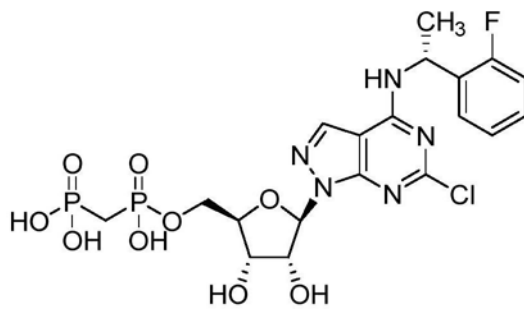
或其药学上可接受的盐。

[0087] 在一些实施方案中,所述CD73抑制剂是化合物B



或其药学上可接受的盐。

[0088] 在一些实施方案中,所述CD73抑制剂是化合物C



(化合物C)

或其药学上可接受的盐。

[0089] 在一些实施方案中,所述CD73抑制剂是描述于美国专利公开案2017/0267710(参见,在2017年6月6日提交的美国申请序列号15/400,748)中的分子,将其内容出于所有目的通过引用特此并入。

[0090] 在一些实施方案中,所述CD73抑制剂是公开于WO 2015/164573、WO 2017/120508、WO 2018/183635、WO 2018/094148、WO 2018/119284、WO 2018/183635、WO 2018/208727、WO 2018/208980、WO 2017/098421、WO 2017/153952中的药剂,将每个的内容出于所有目的通过引用特此并入。

[0091] 在一些实施方案中,所述CD73抑制剂是奥来鲁单抗(Oleclumab)(MEDI-9447)、CPI-006、NZV930/SRF373、BMS-986179或TJ4309。

[0092] 膜外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶1(ENPP1)抑制剂。在一些实施方案中,可用于所述方法的膜外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶1(ENPP1)抑制剂是MV-626。

[0093] 在一些实施方案中,可用于所述方法的ENPP1抑制剂是公开于W02019/023635中的药剂,将其内容出于所有目的通过引用特此并入。

[0094] CD 38抑制剂。在一些实施方案中,可用于所述方法的CD38抑制剂是达雷木单抗(Daratumumab)或艾萨妥昔单抗(isatuximab)。

[0095] 在一些实施方案中,所述CD38抑制剂是公开于W0/2019/034753、US 2018/0298106、W0 2019/034752中的药剂,将其各自的内容出于所有目的通过引用特此并入。

[0096] CD 39抑制剂。CD39也称为膜外核苷三磷酸二磷酸水解酶-1。在一些实施方案中,可用于所述方法的CD39抑制剂是IPH5201、SRF617或TTX-030。

[0097] 在一些实施方案中,所述CD39抑制剂是公开于W0 2012/085132、W0 2017/089334、W0 2009/095478、W0 2011/154453和W0 2018/224685中的药剂,将其各自的内容出于所有目的通过引用特此并入。

[0098] 本公开文本包括上述任一种的药学上可接受的盐或衍生物。

拮抗腺苷对其受体之一的激活的药剂

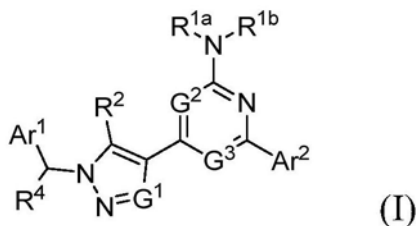
[0099] 体内存在被细胞外腺苷激活的许多受体。也就是说,腺苷的结合启动了酶活性和/或传播了细胞信号。经由以下四种G偶联腺苷受体发生被腺苷激活:A<sub>1</sub>、A<sub>2a</sub>、A<sub>2b</sub>和A<sub>3</sub>。腺苷大部分通过A<sub>2a</sub>受体(主要在T细胞上表达)和A<sub>2b</sub>受体(在髓系细胞上表达)进行信号传导,这是当腺苷刺激时导致的T细胞激活受损。虽然了解较少,但据报道,A<sub>1</sub>受体参与癌症(诸如乳腺癌、结肠癌和胃癌)的发病机制,并且据报道A<sub>3</sub>受体参与结直肠癌和乳腺癌的发病机制。在肿瘤微环境中腺苷对这些受体中的一种或多种的过度激活可能导致免疫抑制效应。因此,可以阻断或以其他方式防止腺苷与这些受体结合的拮抗剂可用于治疗癌症。相关受

体包括但不限于腺苷A1受体 (A1R)、腺苷A2a受体 (A2aR) 和/或腺苷A2b受体和腺苷A3受体 (A3R)。

[0100] 如本文所考虑的,本公开文本提供了使用一种或多种拮抗腺苷对其受体之一的激活的药剂来治疗具有建立的腺苷指纹的受试者的癌症的方法。

[0101] 腺苷A1受体 (A1R) 拮抗剂。在一些实施方案中,可用于所述方法的A1R拮抗剂是FK352、KW-3902 (Rolofylline)、SLV320、BG9719 (CVT-124) 或BG9928 (Adentri)。

[0102] 腺苷A2a受体 (A2aR) 和/或腺苷A2b受体 (A2bR) 拮抗剂。在一些实施方案中,可用于所述方法的腺苷A2a受体 (A2aR) 和/或腺苷A2b受体 (A2bR) 拮抗剂是式 (I) 的化合物



或其药学上可接受的盐、水合物或溶剂化物,其中,

G<sup>1</sup>是N或CR<sup>3a</sup>;

G<sup>2</sup>是N或CR<sup>3b</sup>;

G<sup>3</sup>是N或CR<sup>3c</sup>;

R<sup>3a</sup>、R<sup>3b</sup>和R<sup>3c</sup>各自独立地是H或C<sub>1-3</sub>烷基;

R<sup>1a</sup>和R<sup>1b</sup>各自独立地选自

i) H

ii) 任选地被从1-3个R<sup>5</sup>取代基取代的C<sub>1-8</sub>烷基,

iii) 任选地被从1-3个R<sup>5</sup>取代基取代的-X<sup>1</sup>-O-C<sub>1-8</sub>烷基,

iv) -C(O)-R<sup>6</sup>,

v) 任选地被1-3个R<sup>7</sup>取代基取代的Y,和

vi) 任选地被1-3个R<sup>7</sup>取代基取代的-X<sup>1</sup>-Y;或

vii) R<sup>1a</sup>和R<sup>1b</sup>与它们附接的氮一起形成任选地被从1-3个R<sup>8</sup>取代基取代的5-6元杂环烷基环,其中所述杂环烷基具有0-2个选自O、N和S的另外的杂原子环顶点;

每个Y是C<sub>3-8</sub>环烷基或具有1-3个选自O、N和S的杂原子环顶点的4至6元杂环烷基;

R<sup>2</sup>和R<sup>4</sup>各自独立地是H或C<sub>1-3</sub>烷基;

Ar<sup>1</sup>是苯基或5至6元杂芳基,其各自任选地被1-3个R<sup>9</sup>取代;

Ar<sup>2</sup>是苯基或5至6元杂芳基,其各自任选地被1-3个R<sup>10</sup>取代;

其中Ar<sup>1</sup>和Ar<sup>2</sup>的所述5至6元杂芳基各自独立地具有1-3个选自O、N和S的杂原子环顶点;

每个X<sup>1</sup>是C<sub>1-6</sub>亚烷基;

每个R<sup>5</sup>独立地选自羟基、C<sub>3-8</sub>环烷基、苯基、-O-苯基、-C(O)OR<sup>a</sup>和氧代基;

每个R<sup>6</sup>是C<sub>1-8</sub>烷基或Y,其各自任选地被1-3个选自羟基、-O-苯基、苯基和-O-C<sub>1-8</sub>烷基的取代基取代;

每个R<sup>7</sup>独立地选自C<sub>1-8</sub>烷基、羟基、-O-C<sub>1-8</sub>烷基、氧代基和C(O)OR<sup>a</sup>;

每个R<sup>8</sup>独立地选自C<sub>1-8</sub>烷基、羟基和氧代基;

每个 $R^9$ 独立地选自 $C_{1-8}$ 烷基、 $-O-C_{1-8}$ 烷基、 $-X^1-O-C_{1-8}$ 烷基、 $-O-X^1-O-C_{1-8}$ 烷基、 $-X^1-O-X^1-O-C_{1-8}$ 烷基、 $-C(O)OR^a$ 、卤素、氰基、 $-NR^bR^c$ 、 $Y$ 、 $-X^1-C_{3-8}$ 环烷基和 $-X^2-Z$ ，其中 $X^2$ 选自 $C_{1-6}$ 亚烷基、 $-C_{1-6}$ 亚烷基- $O$ -、 $-C(O)$ -和 $-S(O)_2$ -， $Z$ 是具有1-3个选自 $O$ 、 $N$ 和 $S$ 的杂原子环顶点的4至6元杂环烷基，并且其中所述 $R^9$ 取代基中的任一个任选地被1-3个 $R^{11}$ 取代；

每个 $R^{10}$ 独立地选自 $C_{1-8}$ 烷基、卤基、氰基、 $-O-C_{1-8}$ 烷基、 $-X^1-O-C_{1-8}$ 烷基、 $-O-X^1-O-C_{1-8}$ 烷基、 $-S(O)_2-C_{1-6}$ 烷基、 $-C(O)NR^dR^e$ 和具有从1-3个选自 $O$ 、 $N$ 和 $S$ 的杂原子环顶点的4-6元杂芳基，其中所述 $R^{10}$ 取代基中的每一个任选地被1-3个 $R^{12}$ 取代，或在 $Ar^2$ 的相邻环顶点上的两个 $R^{10}$ 任选地组合以形成任选地被1-2个卤素取代的5元杂环；

每个 $R^{11}$ 独立地选自羟基、卤基、氰基、 $-NR^dR^e$ 、 $-C(O)OR^a$ 、苯基、 $C_{3-8}$ 环烷基和任选地被 $C(O)OR^a$ 取代的 $C_{1-4}$ 烷基；

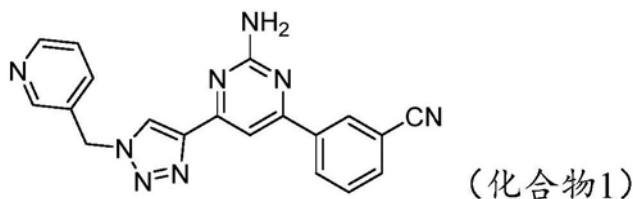
每个 $R^{12}$ 独立地选自卤基、氰基、羟基、 $-C(O)OR^a$ ；并且

每个 $R^a$ 是 $H$ 或 $C_{1-6}$ 烷基；

每个 $R^b$ 和 $R^c$ 独立地选自 $H$ 、 $C_{1-8}$ 烷基、 $-S(O)_2-C_{1-6}$ 烷基、 $-C(O)OR^a$ 和 $-X^1-C(O)OR^a$ ；

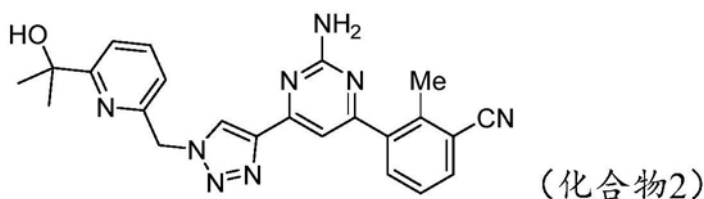
每个 $R^d$ 和 $R^e$ 独立地选自 $H$ 、 $C_{1-8}$ 烷基、 $-S(O)_2-C_{1-6}$ 烷基；并且条件是当 $G^1$ 和 $G^2$ 各自是 $N$ ， $G^3$ 是 $CH$ ， $R^2$ 是 $CH_3$ 并且 $R^{1a}$ 和 $R^{1b}$ 各自是 $H$ 时，则 $Ar^2$ 不是2-噻吩基；苯基；2-、3-或4-甲氧基苯基；3-或4-卤基苯基；2,4-二甲氧基苯基；2,4-二氯苯基或2-或4-甲基苯基。

[0103] 在一些实施方案中，所述腺苷A2a受体 (A2aR) 或腺苷A2b受体 (A2bR) 拮抗剂是化合物1



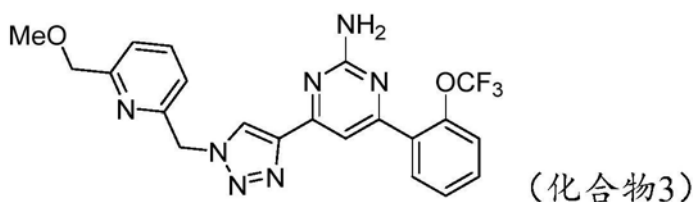
或其药学上可接受的盐。

[0104] 在一些实施方案中，所述腺苷A2a受体 (A2aR) 或腺苷A2b受体 (A2bR) 拮抗剂是化合物2



或其药学上可接受的盐。

[0105] 在一些实施方案中，所述腺苷A2a受体 (A2aR) 或腺苷A2b受体 (A2bR) 拮抗剂是化合物3



或其药学上可接受的盐。

[0106] 在一些实施方案中,所述腺苷A2a受体(A2aR)和/或腺苷A2b受体(A2bR)拮抗剂是描述于美国专利公开案2018/0215730(还参见2018年6月19日提交的美国申请号15/875,106,将其内容出于所有目的通过引用特此并入)中的分子。

[0107] 在一些实施方案中,所述A2a受体(A2aR)和/或腺苷A2b受体(A2bR)拮抗剂是AZD4635、ciforadenant(CPI-444)、NIR178或PBF-1129。

[0108] 腺苷A3受体(A3R)拮抗剂。在一些实施方案中,可用于所述方法的A3R拮抗剂是描述于W02007/063539A1、US2003/0078232中的分子,将其各自的内容出于所有目的通过引用特此并入。

#### 癌症类型

[0109] 本领域技术人员应认识到本文所述的治疗方法不依赖于肿瘤起源而是依赖于肿瘤的腺苷指纹的评估。因此,本公开文本提供了不限于特定类型癌症的方法。因此,本公开文本可用于治疗多种不同的癌症类型,包括但不限于前列腺癌、结直肠癌、胰腺癌、宫颈癌、胃癌、子宫内膜癌、脑癌、肝癌、膀胱癌、卵巢癌、睾丸癌、头癌、颈癌、皮肤癌(包括黑素瘤和基底癌)、间皮内衬癌、白血细胞癌(包括淋巴瘤和白血病)、食管癌、乳腺癌(包括三阴性乳腺癌)、肌肉癌、结缔组织癌、肺癌(包括小细胞肺癌和非小细胞肺癌)、肾上腺癌、甲状腺癌、肾癌或骨癌;恶性胶质瘤、间皮瘤、肾细胞癌、胃癌、肉瘤(包括卡波西肉瘤)、绒毛膜癌、皮肤嗜碱性粒细胞癌和睾丸精原细胞瘤。

[0110] 在本公开文本的一些实施方案中,所述癌症是黑素瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、白血病、脑肿瘤、淋巴瘤、肉瘤、卵巢癌、头颈癌、宫颈癌或卡波西肉瘤。

[0111] 在本公开文本的一些实施方案中,所述癌症是甲状腺癌、肾上腺癌、间皮内衬癌、胆管癌、胰腺癌、脑癌、肾癌、食管癌、直肠癌、结肠癌、胃癌、头癌、颈癌、皮肤癌、睾丸癌、卵巢癌、肺癌、子宫内膜癌、眼癌、前列腺癌、乳腺癌或肝癌;或是恶性胶质瘤、间皮瘤或肉瘤。

[0112] 在本公开文本的一些实施方案中,所述癌症是睾丸癌、卵巢癌、肺癌、子宫内膜癌或肾上腺癌。

[0113] 在本公开文本的一些实施方案中,所述癌症是眼癌、前列腺癌、乳腺癌、肾癌、肝癌或肺癌。

[0114] 在一些实施方案中,本公开文本提供了用于用靶向腺苷胞外产生的药剂和/或拮抗腺苷对其受体之一的激活的药剂和至少一种另外的治疗剂(其例子在本文的其他地方示出)治疗被鉴定为患有特定类型的癌症的受试者的方法。

#### 组合疗法

[0115] 本公开文本考虑了本文所述的治疗剂(单独的或一种或多种活性治疗剂组合)的用途。另外的活性治疗剂可以是小化学分子;大分子,诸如蛋白质、抗体、肽体、肽、DNA、RNA或此类大分子的片段;或细胞疗法或基因疗法。在此类组合疗法中,各种活性剂通常具有不同的、互补的作用机制。通过允许一种或多种药剂的剂量减少,从而减少或消除与一种或多种药剂相关的副作用,此类组合疗法可以是特别有利的。此外,此类组合疗法可以对潜在的疾病、障碍或病症具有协同治疗或预防作用。

[0116] 如本文所用,“组合”意在包括可以分开施用(例如,分开配制用于分开施用(例如,如可以在试剂盒中提供的那样))的疗法以及可以在单一配制品(即,“共同配制品”)中一起施用的疗法。



治疗剂。在一些实施方案中,当TMB小于2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9或10时,进一步向受试者施用化学治疗剂。

[0122] 化学治疗剂的例子包括但不限于烷化剂类,诸如噻替派和环磷酰胺;烷基磺酸盐类,诸如白消安、英丙舒凡和派泊舒凡;氮丙啶类,诸如苯佐替派(benzodopa)、卡波醌、美妥替派和乌瑞替派;乙烯亚胺类和甲基蜜胺类,包括六甲蜜胺、曲他胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲蜜胺;氮芥类,诸如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀、异环磷酰胺、氮芥(mechlorethamine)、盐酸氧化氮芥、美法仑、新恩比兴、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲磷胺、乌拉莫司汀;硝基脲类,诸如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀;抗生素类,诸如阿克拉霉素、放线菌素(actinomycin)、安曲霉素、偶氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素(cactinomycin)、卡奇霉素、卡柔比星、洋红霉素、嗜癌霉素、色霉素、更生霉素、道诺霉素、地托比星、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素、霉酚酸、诺拉霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星、链黑菌素、链脲佐菌素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢物类,诸如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物类,诸如二甲叶酸、甲氨蝶呤、喋罗呤、三甲曲沙;嘌呤类似物类,诸如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物类,诸如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、脱氧氟尿苷、伊诺他滨、氟尿苷、5-FU;雄激素类,诸如卡普睾酮、屈他雄酮丙酸酯、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺素类,诸如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂,诸如亚叶酸;醋酐内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;安吡啶;阿莫司汀(bestrabucil);比生群;伊达曲沙(edatraxate);地磷酰胺;地美可辛;亚丝醌;依氟鸟氨酸;依利醋铵;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明;米托胍脲;米托蒽醌;莫派达醇;硝基可润;喷司他丁;蛋氨酸;吡柔比星;鬼臼酸;2-乙酰肼;丙卡巴肼;雷佐生;西索菲兰;锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2"-三氯三乙胺;乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;派泊溴烷;加胞嘧啶(gacytosine);阿拉伯糖苷(Ara-C);环磷酰胺;噻替派;紫杉烷类,例如紫杉醇和多烯紫杉醇;苯丁酸氮芥;吉西他滨;6-巯基嘌呤;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;铂和铂配合物类,诸如顺铂、卡铂和奥沙利铂;长春碱;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;丝裂霉素C;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;诺维苯;诺消灵(novantrone);替尼泊苷;道诺霉素;氨基蝶呤;希罗达;伊班膦酸盐;CPT11;拓扑异构酶抑制剂类;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);视黄酸;埃斯佩拉霉素类(esperamicins);卡培他滨;葱环类;和上述任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0123] 化学治疗剂还包括用于调节或抑制对肿瘤的激素作用的抗激素剂,诸如抗雌激素,包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、抑制芳香酶的4(5)-咪唑、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、凯奥昔芬(keoxifene)、奥那司酮和托瑞米芬;和抗雄激素,诸如氟他米特、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林;和上述任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。在某些实施方案中,组合疗法包括包含一种或多种化学治疗剂的化学疗法方案。在某些实施方案中,组合疗法包括施用激素或相关激素剂。

[0124] 可以与本文所述的治疗剂组合使用的另外的治疗模式包括放射疗法、针对肿瘤抗原的单克隆抗体、单克隆抗体和毒素的复合物、T细胞佐剂、骨髓移植或抗原呈递细胞(例

如,树突细胞疗法),包括用于刺激此类抗原呈递细胞的TLR激动剂。

[0125] 在某些实施方案中,本公开文本考虑了本文所述的治疗剂与过继细胞疗法组合的用途,所述过继细胞疗法是一种新的并且有前途的形式的个性化免疫疗法,在所述免疫疗法中向癌症患者施用具有抗肿瘤活性的免疫细胞。正在使用工程化以表达例如嵌合抗原受体(CAR)或T细胞受体(TCR)的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)和T细胞来探索过继细胞疗法。过继细胞疗法通常涉及从个体收集T细胞,基因修饰它们以靶向特定的抗原或增强它们的抗肿瘤作用,使它们扩增至足够的数量,并且将经基因修饰的T细胞输注到癌症患者体内。可以从随后被再灌注扩增的细胞的患者(例如,自体)收集或可以从供体患者(例如,同种异体)收集T细胞。

[0126] 在某些实施方案中,本公开文本考虑了本文所述的化合物与基于RNA干扰的疗法组合以沉默基因表达的用途。RNAi开始于将较长的双链RNA切割为小干扰RNA(siRNA)。将siRNA的一条链掺入称为RNA诱导的沉默复合物(RISC)的核糖核蛋白复合物中,然后使用所述核糖核蛋白复合物来鉴定与经掺入的siRNA链至少部分互补的mRNA分子。RISC可以与mRNA结合或切割mRNA,这二者均抑制翻译。

[0127] 本公开文本考虑了本文所述的治疗剂的抑制剂与免疫检查点抑制剂组合的用途。

[0128] 所有癌症所特有的巨大数量的遗传改变和表观遗传改变提供了一组多样化的抗原,免疫系统可以使用它们来区分肿瘤细胞与其正常对应物。在T细胞的情况下,通过T细胞受体(TCR)的抗原识别启动的反应的最终幅度(例如,细胞因子产生或增殖的水平)和质量(例如,所产生的免疫反应的类型,诸如细胞因子产生的模式)受共刺激性信号与抑制性信号(免疫检查点)之间的平衡的调节。在正常生理条件下,免疫检查点对于预防自身免疫(即,维持自身耐受性)以及对于当免疫系统对病原体感染作出反应时保护组织免受损害至关重要。免疫检查点蛋白的表达可以被肿瘤异常调节,作为重要的免疫抵抗机制。

[0129] T细胞一直是治疗性操纵内源性抗肿瘤免疫的主要努力焦点,因为i)它们具有在所有细胞区室中选择性识别源自蛋白质的肽的能力;ii)它们具有直接识别和杀死表达抗原的细胞(通过CD8+效应T细胞;也称为细胞毒性T淋巴细胞(CTL))的能力;以及iii)它们具有通过整合适应性和先天性效应机制的CD4+辅助T细胞协调不同的免疫反应的能力。

[0130] 在临床环境中,免疫检查点的阻断-其导致抗原特异性T细胞反应的放大-已经被证明是人类癌症治疗中的一种有前途的方法。

[0131] T细胞介导的免疫包括多个连续步骤,其中的每个步骤均通过平衡刺激性信号与抑制性信号进行调节以优化反应。虽然在免疫反应中几乎所有的抑制性信号最终均调节细胞内信号传导途径,但许多抑制性信号是通过膜受体启动的,所述膜受体的配体是膜结合的或可溶性的(细胞因子)。虽然相对于正常组织,调节T细胞激活的共刺激性和抑制性受体和配体在癌症中经常不过度表达,但调节组织中的T细胞效应功能的抑制性配体和受体通常在肿瘤细胞上或在与肿瘤微环境相关的非转化细胞上过度表达。可溶性和膜结合受体-配体免疫检查点的功能可以使用激动剂抗体(用于共刺激性途径)或拮抗剂抗体(用于抑制性途径)进行调节。因此,与当前批准用于癌症疗法的大多数抗体相比,阻断免疫检查点的抗体不直接靶向肿瘤细胞,而是靶向淋巴细胞受体或其配体以增强内源性抗肿瘤活性。[参见Pardoll, (2012年4月)Nature Rev.Cancer 12:252-64]。

[0132] 作为阻断的候选物的免疫检查点(配体和受体)(其中的一些在各种类型的肿瘤细

胞中选择性上调)的例子包括PD1(程序性细胞死亡蛋白1);PD-L1(PD1配体);BTLA(B和T淋巴细胞活化因子);CTLA4(细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4);TIM3(T细胞膜蛋白3);LAG3(淋巴细胞活化基因3);TIGIT(具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体);和杀伤抑制性受体,基于其结构特征可以将它们分为两类:i)杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)和ii)C型凝集素受体(II型跨膜受体家族的成员)。在文献中已经描述了其他不太明确的免疫检查点,包括受体(例如,2B4(也称为CD244)受体)和配体(例如,某些B7家族抑制性配体,诸如B7-H3(也称为CD276)和B7-H4(也称为B7-S1、B7x和VCTN1))二者。[参见Pardoll, (2012年4月)Nature Rev.Cancer 12:252-64]。

[0133] 本公开文本考虑了本文所述的治疗剂与上述免疫检查点受体和配体以及尚未描述的免疫检查点受体和配体的抑制剂组合的用途。某些免疫检查点调节剂是当前可用的,包括PD1和PD-L1抗体纳武单抗(Bristol-Myers Squibb)、派姆单抗(Merck)、西米普利单抗(cemiplimab)(Sanofi和Regeneron)、阿特珠单抗(Roche)、度伐鲁单抗(durvalumab)(AstraZeneca)和阿维鲁单抗(avelumab)(Merck),而其他正在开发中。

[0134] 在一些实施方案中,本文所述的治疗方法包括当来自受试者的癌症的活检指示所述癌症是PD-L1阳性时,施用PD1抑制剂和PD-L1抑制剂。用于确定PD-L1状态的方法是本领域已知的,并且当前申请的实施例6参考了FDA批准的用于确定PD-L1状态的产品。在一些实施方案中,当至少1%的来自癌症的细胞表达PD-L1时,受试者被认为是PD-L1阳性。在一些实施方案中,当至少10%的来自癌症的细胞表达PD-L1时,受试者被认为是PD-L1阳性。在一些实施方案中,当至少50%的来自癌症的细胞表达PD-L1时,受试者被认为是PD-L1阳性。可以进行类似的测定以确定受试者肿瘤中其他免疫检查点的状态。

[0135] 在本发明的一方面,本文所述的治疗剂与免疫肿瘤剂组合,所述免疫肿瘤剂是T细胞上的(i)刺激性(包括共刺激性)受体的激动剂或(ii)抑制性(包括共抑制性)信号的拮抗剂,这二者均导致放大抗原特异性T细胞反应。某些刺激性分子和抑制性分子是免疫球蛋白超家族(IgSF)的成员。与共刺激性受体或共抑制性受体结合的膜结合配体的一个重要家族是B7家族,其包括B7-1、B7-2、B7-H1(PD-L1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H2(ICOS-L)、B7-H3、B7-H4、B7-H5(VISTA)和B7-H6。与共刺激性受体或共抑制性受体结合的膜结合配体的另一个家族是与同源TNF受体家族成员结合的分子的TNF家族,其包括CD40和CD40L、OX-40、OX-40L、CD70、CD27L、CD30、CD30L、4-1BBL、CD137(4-1BB)、TRAIL/Apo2-L、TRAILR1/DR4、TRAILR2/DR5、TRAILR3、TRAILR4、OPG、RANK、RANKL、TWEAKR/Fn14、TWEAK、BAFFR、EDAR、XEDAR、TACI、APRIL、BCMA、LT13R、LIGHT、DcR3、HVEM、VEGI/TL1A、TRAMP/DR3、EDAR、EDA1、XEDAR、EDA2、TNFR1、淋巴毒素a/TNF13、TNFR2、TNFa、LT13R、淋巴毒素a 1132、FAS、FASL、RELT、DR6、TROY、NGFR。

[0136] 在另一方面,所述免疫肿瘤剂是抑制T细胞激活的细胞因子(例如,IL-6、IL-10、TGF-B、VEGF和其他免疫抑制细胞因子)或刺激T细胞激活以刺激免疫反应的细胞因子。

[0137] 在一方面,T细胞反应可以通过本文所述的治疗剂与以下中的一种或多种的组合来刺激:(i)抑制T细胞激活的蛋白质的拮抗剂(例如,免疫检查点抑制剂),所述蛋白质是诸如CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、TIM-3、半乳凝素9、CEACAM-1、BTLA、CD69、半乳凝素-1、TIGIT、CD113、GPR56、VISTA、2B4、CD48、GARP、PD1H、LAIR1、TIM-1和TIM-4;和/或(ii)刺激T细胞激活的蛋白质的激动剂,所述蛋白质是诸如B7-1、B7-2、CD28、4-1BB(CD137)、4-1BBL、

ICOS、ICOS-L、OX40、OX40L、GITR、GITRL、CD70、CD27、CD40、DR3和CD2。可以与本文所述的治疗剂组合用于治疗癌症的其他药剂包括NK细胞上的抑制性受体的拮抗剂或NK细胞上的激活性受体的激动剂。例如，本文的化合物可以与KIR的拮抗剂（诸如利瑞鲁单抗（lirilumab））组合。

[0138] 用于组合疗法的又其他药剂包括抑制或耗尽巨噬细胞或单核细胞的药剂，包括但不限于CSF-1R拮抗剂，诸如CSF-1R拮抗剂抗体，包括RG7155 (W011/70024、W011/107553、W011/131407、W013/87699、W013/119716、W013/132044) 或FPA-008 (W011/140249；W013169264；W014/036357)。

[0139] 在另一方面，所公开的靶向本文所述的蛋白质/受体的药剂可以与一种或多种连接阳性共刺激性受体的激动剂、通过抑制性受体减弱信号传导的阻断剂、拮抗剂以及一种或多种全身性地增加抗肿瘤T细胞的频率的药剂、克服肿瘤微环境内的不同免疫抑制途径（例如，阻断抑制性受体接合（例如，PD-L1/PD-1相互作用）、耗尽或抑制Treg（例如，使用抗CD25单克隆抗体（例如，达克珠单抗）或通过离体抗CD25珠耗尽）或逆转/防止T细胞无能或衰竭）的药剂和在肿瘤部位触发先天性免疫激活和/或炎症的药剂一起使用。

[0140] 在一方面，所述免疫肿瘤剂是CTLA-4拮抗剂，诸如拮抗性CTLA-4抗体。合适的CTLA-4抗体包括例如耶尔沃伊（YERVOY）（伊匹单抗）或曲美目单抗（tremelimumab）。

[0141] 在另一方面，所述免疫肿瘤剂是PD-1拮抗剂，诸如拮抗性PD-1抗体。合适的PD-1抗体包括例如欧狄沃（OPDIVO）（纳武单抗）、KEYTRUDA（KEYTRUDA）（派姆单抗）、MEDI-0680（AMP-514；W02012/145493）、BGB-108、GB-226、PDR-001、mDX-400、SHR-1210、IBI-308、PF-06801591。所述免疫肿瘤剂还可以包括匹地利珠单抗（pidilizumab）（CT-011），尽管其对PD-1结合的特异性受到质疑。另一种靶向PD-1受体的方法是由PD-L2（B7-DC）的胞外结构域与IgG1的Fc部分融合构成的重组蛋白，称为AMP-224。

[0142] 在另一方面，所述免疫肿瘤剂是PD-L1拮抗剂，诸如拮抗性PD-L1抗体。合适的PD-L1抗体包括例如MPDL3280A（RG7446；W02010/077634）、度伐鲁单抗（MEDI4736）、阿特珠单抗、阿维鲁单抗、BMS-936559（W02007/005874）、MSB0010718C（W02013/79174）、KD-033、CA-327、CA-170、ALN-PDL、TSR-042和STI-1014。

[0143] 在另一方面，所述免疫肿瘤剂是LAG-3拮抗剂，诸如拮抗性LAG-3抗体。合适的LAG3抗体包括例如BMS-986016（W010/19570、W014/08218）、或IMP-731或IMP-321（W008/132601、W009/44273）。

[0144] 在另一方面，所述免疫肿瘤剂是CD137（4-1BB）激动剂，诸如激动性CD137抗体。合适的CD137抗体包括例如乌瑞鲁单抗（urelumab）和PF-05082566（W012/32433）。

[0145] 在另一方面，所述免疫肿瘤剂是GITR激动剂，诸如激动性GITR抗体。合适的GITR抗体包括例如BMS-986153、BMS-986156、TRX-518（W006/105021、W009/009116）和MK-4166（W011/028683）。

[0146] 在另一方面，所述免疫肿瘤剂是OX40激动剂，诸如激动性OX40抗体。合适的OX40抗体包括例如MEDI-6383或MEDI-6469。

[0147] 在另一方面，所述免疫肿瘤剂是OX40L拮抗剂，诸如拮抗性OX40抗体。合适的OX40L拮抗剂包括例如RG-7888（W006/029879）。

[0148] 在另一方面，所述免疫肿瘤剂是CD40激动剂，诸如激动性CD40抗体。在又一个实

施方案中,所述免疫肿瘤剂是CD40拮抗剂,诸如拮抗性CD40抗体。合适的CD40抗体包括例如鲁卡木单抗(lucatumumab)或达西珠单抗(dacetuzumab)。

[0149] 在另一方面,所述免疫肿瘤剂是CD27激动剂,诸如激动性CD27抗体。合适的CD27抗体包括例如伐立鲁单抗(varlilumab)。

[0150] 在另一方面,所述免疫肿瘤剂是MGA271(针对B7H3)(W011/109400)。

#### 给药

[0151] 本公开文本的靶向腺苷胞外产生的药剂和/或拮抗腺苷对其受体之一的激活的药剂可以以一定量向受试者施用,所述量取决于例如施用目标(例如,所希望的消退程度);施用所述配制品的受试者的年龄、体重、性别和健康 and 身体状况;施用途径;和疾病、障碍、病症的性质或其症状。给药方案还可以考虑与将施用的一种或多种药剂相关的任何不良反应的存在、性质和程度。有效的剂量量和剂量方案可以容易地根据例如安全性和剂量递增试验、体内研究(例如,动物模型)和熟练技术人员已知的其他方法来确定。

[0152] 通常,给药参数规定剂量量小于可能对受试者具有不可逆转的毒性的量(最大耐受剂量(MTD))且不小于对受试者产生可测量效果所需的量。考虑到施用途径和其他因素,通过例如与ADME相关的药代动力学和药效学参数来确定此类量。

[0153] 有效剂量(ED)是在服用药剂的受试者的一些部分中产生治疗反应和所希望的效果的所述药剂的剂量或量。药剂的“中值有效剂量”或ED50是药剂的在施用它的群体的50%中产生治疗反应或所需效果的剂量或量。尽管ED50通常用作药剂效果的合理期望的量度,但考虑到所有相关因素,它不一定是临床医生可能认为适当的剂量。因此,在一些情况下,有效量大于所计算的ED50,在其他情况下,有效量小于所计算的ED50,并且在仍其他情况下,有效量与所计算的ED50相同。

[0154] 此外,本文所述的靶向治疗剂的药剂的有效剂量可以是这样的量,当以一个或多个剂量向受试者施用时,相对于健康受试者其产生所需的结果。例如,对于经历特定障碍的受试者,有效剂量可以是使该障碍的诊断参数、量度、标记物等改善至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或大于90%的剂量,其中100%被定义为正常受试者所展现出的诊断参数、量度、标记物等。

[0155] 在某些实施方案中,本文所述的治疗剂可以以约0.01mg/kg至约50mg/kg或约1mg/kg至约25mg/kg受试者体重/天的剂量水平施用(例如,口服),每天一次或多次,以获得所希望的治疗效果。

[0156] 对于口服药剂的施用,组合物可以以片剂、胶囊剂等的形式提供,所述片剂、胶囊剂等含有从1.0至1000毫克的活性成分,特别是1.0、3.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、50.0、75.0、100.0、150.0、200.0、250.0、300.0、400.0、500.0、600.0、750.0、800.0、900.0和1000.0毫克的活性成分。

[0157] 除了口服给药外,本文所述的某些药剂的合适的施用途径还包括肠胃外(例如,肌肉内、静脉内、皮下(例如,注射或植入)、腹膜内、脑池内、关节内、腹膜内、脑内(脑实质内)和脑室内)和眼内。通常皮下或肌肉内施用的贮库型注射剂也可以用于在限定的时间段内释放本文所述的药剂。

[0158] 在某些实施方案中,所希望的药剂(本文所述的治疗剂)的剂量被包含在“单位剂

型”中。短语“单位剂型”是指物理上离散的单位,每个单位含有足以产生所希望的效果的预定量的本文所述的治疗剂,单独地或与一种或多种另外的药剂组合。应认识到,单位剂型的参数将取决于特定药剂和待达到的效果。

#### 试剂盒和检测方法

[0159] 本公开文本还考虑了包含本文所述的治疗剂及其药物组合物的试剂盒。所述试剂盒通常呈容纳各种组分的物理结构的形式,如下文所述,并且可以用于例如实践上述方法。

[0160] 试剂盒可以包括一种或多种本文公开的化合物(在例如无菌容器中提供),所述化合物可以呈适用于向受试者施用的药物组合物的形式。本文所述的化合物可以以随时可用的形式(例如,片剂或胶囊剂)或以需要例如在施用前重构或稀释的形式(例如,散剂)提供。当本文所述的化合物呈需要由使用者重构或稀释的形式时,所述试剂盒还可以包括与本文所述的化合物一起包装或与其分开包装的稀释剂(例如,无菌水)、缓冲剂、药学上可接受的赋形剂等。当考虑组合疗法时,所述试剂盒可以分开含有几种药剂,或者它们可以已经在试剂盒中组合。可以将试剂盒的每种组分封装在单独的容器内,并且所有各个容器可以在单个包装内。可以针对恰当地维持容纳在其中的组分所必需的条件(例如,冷藏或冷冻)设计本发明的试剂盒。

[0161] 试剂盒可以含有标签或包装插页,所述标签或包装插页包括在其中的组分的标识信息和针对它们的使用的说明书(例如,一种或多种活性成分的给药参数、临床药理学,包括作用机制、药代动力学和药效学、不良反应、禁忌症等)。标签或插页可以包括制造商信息,诸如批号和有效期。标签或包装插页可以例如整合到容纳组分的物理结构中、分开包含在物理结构内或贴到试剂盒的组分(例如,安瓿、管或小瓶)上。

[0162] 标签或插页可以另外包括或并入计算机可读介质中,所述计算机可读介质是诸如磁盘(例如,硬盘、卡、内存磁盘)、光盘(诸如CD-ROM/RAM或DVD-ROM/RAM、DVD)、MP3、磁带或电存储介质(诸如RAM和ROM)或这些的混合体(诸如磁/光存储介质、闪存介质或存储型卡)。在一些实施方案中,实际说明书不存在于试剂盒中,而是提供了例如经由互联网从远程源获得说明书的手段。

[0163] 可溶性CD73试剂盒和检测方法。在某些方面,本文还提供了用于确定样品中可溶性CD73(sCD73)的试剂盒。所述试剂盒包括sCD73捕获抗体和标记的sCD73检测抗体。在一些实施方案中,所述捕获抗体是7G2,Thermo Scientific#41-0200。在一些实施方案中,所述标记的sCD73检测抗体是AD2克隆,BioLegend#344017。

[0164] 在一些实施方案中,所述标记的sCD73检测抗体是生物素化的抗体,并且所述试剂盒进一步包含链霉亲和素-辣根过氧化物酶和辣根过氧化物酶底物,所述底物在通过辣根过氧化物酶进行酶转化后是可检测的。在一些实施方案中,所述辣根过氧化物酶底物是3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)或2,2'-连氨基-二-[3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸](ABTS)。

[0165] 在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含包被缓冲液、洗涤缓冲液和封闭缓冲液中的一种或多种。在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含封闭缓冲液。在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含包被缓冲液。在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含洗涤缓冲液。在一些实施方案中,所述包被缓冲液包含约0.2M NaHCO<sub>3</sub>缓冲液,pH 9.6。在一些实施方案中,所述洗涤缓冲液包含在PBS中的约0.1% Tween20。在一些实施方案中,所述封闭缓冲液包含在PBS中的约0.02% Tween20+1% 牛血清白蛋白+10μg/ml 牛IgG+10μg/ml 小鼠

IgG。

[0166] 在进一步的方面,本文还提供了用于测量样品中可溶性CD73 (sCD73) 的量的方法。所述方法包括,

- a) 使样品与固定化的抗CD73抗体接触以形成捕获的sCD73,
- b) 使捕获的sCD73与标记的抗CD73抗体接触以形成夹心的sCD73,其中与固定化的抗CD73抗体相比,所述标记的抗CD73抗体与sCD73的不同部分结合;
- c) 使夹心的sCD73与成像溶液接触以产生可检测的信号
- d) 测量所述可检测的信号。

[0167] 在一些实施方案中,所述捕获抗体是7G2,Thermo Scientific#41-0200。在一些实施方案中,所述标记的sCD73检测抗体是AD2克隆,BioLegend#344017。

[0168] 步骤a) 包括在固定化的抗CD73抗体与样品中的sCD73之间形成捕获sCD73复合物的孵育时间。这可以是几分钟、约一小时、2、3、4、5、6、7或8或更多个小时、或过夜的任何时间。更长的时间也是允许的。与步骤a) 一样,步骤b) 包括可以从几分钟、约一小时、2、3、4、5、6、7或8或更多个小时、或过夜的范围内的孵育时间。在一些实施方案中,步骤b) 的孵育时间是约一小时。与步骤a) 和b) 一样,步骤c) 也包括可以从几分钟、约一小时、2、3、4、5、6、7或8或更多个小时、或过夜的范围内的孵育时间。在一些实施方案中,步骤c) 的孵育时间是约一小时。

[0169] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括在步骤a)、步骤b) 和步骤c) 之后用洗涤缓冲液进行的一个或多个洗涤步骤。洗涤典型地在所希望的孵育时间后进行。在一些实施方案中,所述洗涤缓冲液包含在PBS中的约0.1% Tween20。

[0170] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括封闭缓冲液。在一些实施方案中,在步骤a) 之前将所述封闭缓冲液包括在样品中。在一些实施方案中,所述封闭缓冲液也包括在步骤b) 中的标记的抗CD73抗体。在一些实施方案中,所述封闭缓冲液也包括在步骤c) 中的成像溶液。在一些实施方案中,所述封闭缓冲液包含在PBS中的约0.02% Tween20+1% 牛血清白蛋白+10 $\mu$ g/ml 牛IgG+10 $\mu$ g/ml 小鼠IgG。

[0171] 存在多种可用于ELISA测定的成像溶液。标记的抗CD73抗体的标签的身份将确定适当的成像溶液。典型地,成像溶液包括荧光或化学发光的试剂或底物。例如,当标记的抗CD73抗体的标签是生物素时,成像溶液通常包含亲和素或链霉亲和素,所述亲和素或链霉亲和素与荧光团缀合或与可以组合以形成可检测信号或将底物酶促转换为可检测信号的另外的试剂缀合。在一些实施方案中,亲和素或生物素与辣根过氧化物酶缀合。当通过辣根过氧化物酶 (HRP) 转化形成信号的用于HRP的适当底物包括3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 或2,2'-连氨基-二-[3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸] (ABTS)。

[0172] 在一些实施方案中,所述样品是血液。在一些实施方案中,所述样品是从血液样品中分离的血清。在一些实施方案中,所述样品是从血液样品中分离的血浆。

[0173] 本领域技术人员应认识到可以使用类似的夹心ELISA方法测量不同的腺苷机制蛋白的水平。

[0174] 可溶性单磷酸腺苷 (AMP) 水解活性试剂盒和检测方法。在另外的方面,本文还提供了用于确定样品中CD73介导的和/或TNAP介导的单磷酸腺苷 (AMP) 水解活性的试剂盒。在一些实施方案中,用于确定样品中CD73介导的单磷酸腺苷 (AMP) 水解活性的试剂盒包含CD73

抑制剂和AMP-Glo™。在一些实施方案中,用于确定样品中TNAP介导的单磷酸腺苷(AMP)水解活性的试剂盒包含TNAP抑制剂和AMP-Glo™。

[0175] 在一些实施方案中,本文所述的试剂盒进一步包含腺苷脱氨酶抑制剂、SAH脱水酶(dehydrolase)抑制剂和ADK抑制剂。这些抑制剂可以帮助降低样品中的背景腺苷降解。在一些实施方案中,所述腺苷脱氨酶抑制剂是EHNA。在一些实施方案中,所述SAH脱水酶抑制剂是芒霉素(aristromycin)。在一些实施方案中,所述ADK抑制剂是碘代杀结核菌素(iodotubericidin)。

[0176] 在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包含单磷酸腺苷(AMP)。

[0177] 在进一步的方面,本文还提供了用于确定样品中CD73介导的单磷酸腺苷(AMP)水解活性的方法。所述方法包括,

- a) 使样品与CD73抑制剂、单磷酸腺苷(AMP)和AMP-Glo™接触以形成CD73i样品;
- b) 使样品的单独的等分试样与单磷酸腺苷(AMP)和AMP-Glo™接触以形成基线样品;
- c) 对CD73i样品和基线样品在指定时间段后测量终末RLU信号;以及
- d) 评估CD73i样品与基线样品的终末RLU之间的差异,以确定样品中CD73介导的AMP水解活性。

[0178] 在进一步的方面,本文还提供了用于确定样品中TNAP介导的单磷酸腺苷(AMP)水解活性的方法。所述方法包括,

- a) 使样品与TNAP抑制剂、单磷酸腺苷(AMP)和AMP-Glo™接触以形成TNAPi样品;
- b) 使样品的单独的等分试样与单磷酸腺苷(AMP)和AMP-Glo™接触以形成基线样品;
- c) 对TNAPi样品和基线样品在指定时间段后测量终末RLU信号;以及
- d) 评估TNAPi样品与基线样品的终末RLU之间的差异,以确定样品中TNAP介导的AMP水解活性。

[0179] 在一些实施方案中,CD73i样品、TNAPi样品和基线样品进一步包含腺苷脱氨酶抑制剂、芒霉素脱水酶抑制剂和ADK抑制剂中的一种或多种。在一些实施方案中,CD73i样品和/或TNAPi样品进一步包含腺苷脱氨酶抑制剂、SAH脱水酶抑制剂和ADK抑制剂。在一些实施方案中,所述腺苷脱氨酶抑制剂是EHNA。在一些实施方案中,所述SAH脱水酶抑制剂是芒霉素(aristromycin)。在一些实施方案中,所述ADK抑制剂是碘代杀结核菌素(iodotubericidin)。

[0180] 用于测量终末RLU信号的指定时间段取决于多种因素。其中最主要的是样品中包含的AMP的量(步骤a和步骤b),因为RLU是经指定的时间段后剩余的AMP的测量值。当使用25 μM AMP时,近似几分钟的反应时间通常足以看到可测量的信号变化。在一些实施方案中,所述指定的时间段是2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或更多分钟。在一些实施方案中,所述指定的时间段是8分钟。

[0181] 在一些实施方案中,所述样品是血液。在一些实施方案中,所述样品是血清。在一些实施方案中,所述样品是血浆。

#### IV. 实施例

[0182] 提出以下实施例以向本领域普通技术人员提供如何制备和使用本发明的完整公

开和描述,并不旨在限制诸位发明人视为其发明的范围,也不旨在表示进行了下文的实验或它们是可以进行的所有实验。应理解,不一定进行了以一般现在时书写的示例性描述,而是可以进行描述以生成在其中描述的性质的数据等。已经努力确保关于所使用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但是应当考虑一些实验误差和偏差。

实施例1-经由夹心ELISA确定人血液中可溶性CD73的量

[0183] 用于经由夹心ELISA确定人血液中可溶性CD73的量的方法包括包被微量滴定板的孔的捕获抗体、含有感兴趣的分析物的样品、洗涤缓冲液和用于检测结合的靶标的第二生物素缀合的抗体。生物素化的抗体的二次检测是使用HRP-链霉亲和素,然后用比色或化学发光底物来完成的。图1中概述了CD73 ELISA测定的原理。

材料与amp;方法

试剂与设备

■ sCD73捕获抗体 (7G2, Thermo Scientific#41-0200)

■ 包被缓冲液:

■ 0.2M NaHCO<sub>3</sub>缓冲液, pH 9.6 (Thermo Scientific#28382)

■ 洗涤缓冲液:

■ 在PBS中的0.1% Tween20

■ 封闭缓冲液:

■ 在PBS中的0.02% Tween20+1% 牛血清白蛋白+10μg/ml 牛IgG (Jackson ImmunoResearch#001-000-003)+10μg/ml 小鼠IgG (Jackson ImmunoResearch#015-000-003)

■ CD73蛋白标准品

■ 生物素化的sCD73检测抗体 (AD2克隆, BioLegend#344017)

■ 链霉亲和素-辣根过氧化物酶 (Thermo Scientific#21130)

■ 化学发光ELISA试剂 (Thermo Scientific#37069)

■ 平底白色的高结合聚苯乙烯的96孔微量滴定板 (Costar#3922)

■ 平板用粘性箔密封件

■ EnVision板读取器

方案

包被板:

1. 在4℃下将微量滴定板的孔用抗sCD73 mAb (2μg/ml, 100μl) 包被过夜。将板密封用于孵育。

2. 将孔用在PBS中的0.1% Tween 20洗涤四次 (Tween/PBS, 每次洗涤350μl)。

3. 在室温下用封闭缓冲液 (200μl) 封闭至少4h。

4. 将孔洗涤四次。

- 立即使用板,或在孔中用洗涤缓冲液紧密密封并且在4℃下储存。

ELISA测定:

1. 将每个样品在封闭溶液中稀释 (或为样品和标准品创建稀释系列),然后将每个样品 (100μl) 添加到孔中。

2. 将板密封并且在4℃下孵育过夜。

3. 将孔洗涤四次。
4. 添加生物素化的抗CD73 mAb (0.5 $\mu$ g/ml, 在封闭溶液中100 $\mu$ l)。
5. 将板密封并且在室温下孵育1h。
6. 将孔洗涤四次。
7. 将链霉亲和素-辣根过氧化物酶 (100 $\mu$ l, 在封闭溶液中按1:10000稀释) 添加到孔中。
8. 再次在室温下孵育1h。
9. 将孔洗涤四次。
10. 根据制造商的说明, 用化学发光ELISA试剂显色。
  - a. 将等部分的Luminol/增强剂和稳定的过氧化物溶液混合 (溶液在室温下稳定24h-在黑暗中储存)。
  - b. 向每个孔中添加100 $\mu$ l工作溶液。
  - c. 将一个或多个板以1000x g旋转2分钟以去除所有气泡。
  - d. 用光度计测量孔中化学发光反应的强度 (1-5min的范围是最佳的)。

#### 数据分析

[0184] 针对标准曲线将来自EnVision板读取器的原始发光数据插值以确定绝对sCD73水平。每个未稀释的样品的浓度是从稀释系列的所有孔计算的, 并且将这些值相互比较以评估稀释线性度。

[0185] 使用上述测定, 评估来自健康供体的血清和肝素钠血浆以测量可溶性CD73。如图2A所示, 测量值是高度相关的。为了确定测定的定量范围, 进行样品的平行评估。图2B示出了这项测定展示了可接受的测定平行性。图2C示出了健康受试者与患有癌症的受试者之间血清sCD73的比较。癌症患者中的CD73水平通常高于健康供体。

#### 实施例2-经由AMP-Glo水解测定确定人血液中可溶性CD73和/或TNAP的量

[0186] 当前描述的测定允许确定由于CD73和/或TNAP导致的血液样品中AMP的水解活性的量。这是在25 $\mu$ M的AMP、CD73和/或TNAP抑制剂的存在下使用AMP-Glo<sup>TM</sup>测定实现的。AMP-Glo<sup>TM</sup>是一种均匀生物化学分析, 其从产生AMP的生物化学反应产生发光信号。图3A中概述了AMP Glo测定的原理。

#### 材料与amp方法

##### 试剂

- CD73抑制剂 (化合物A)
- AMP-Glo<sup>TM</sup> (目录号V5011, Promega Corporation)
- PBS-磷酸盐缓冲盐水 (目录号10010023, Gibco)
- TNAP抑制剂混合剂:
  - 625 $\mu$ M TNAP抑制剂 (目录496014-13-2, Calbiochem)
  - 10 $\mu$ M EHNA, 腺苷脱氨酶抑制剂 (目录号E114-25 mg, Sigma)
  - 4 $\mu$ M 芒霉素, SAH脱水酶抑制剂 (目录号SC-233890, Chem Cruz)
  - 10 $\mu$ M 5-碘代杀结核菌素, ADK抑制剂 (目录号I100-5MG, Sigma)

##### 材料与设备

- 96孔测定板 (目录号3992, Corning)

### ●EnVision读取器

#### 人血清中AMP水解活性的确定

[0187] 将从健康志愿者和癌症患者全血中分离的血清在-80℃下储存。将来自每个供体的50μl血清转移到4×500ul等分试样中。然后将样品用以下条件标记a-d:a)无化合物A,无TNAP抑制剂混合剂;b)10μM化合物A,无TNAP抑制剂混合剂;c)无化合物A,有TNAP抑制剂混合剂;d)10μM化合物A,有TNAP抑制剂混合剂。向条件c和d中添加1:200的TNAP抑制剂混合剂(0.25μL),而向条件b和d(含10μM化合物A)中添加1:100的1mM化合物A溶液(最终浓度是10μM)。然后将样品混合并且在37℃下孵育1小时,然后将样品以18μL/孔转移到含有2μL的终浓度为25μM的AMP的低体积96孔AMP Glo™测定板中。使用多通道移液器,将样品混合6-10次并且在室温下孵育8分钟,然后将反应用20μL试剂盒提供的R1溶液停止。在一系列实验后选择8分钟的时间点,以确定AMP加标(Spike-in)后的时间点,所述时间点在人血清中不添加CD73抑制剂的测定中提供了最佳窗口。将样品与R1混合,就将预先制备的R2溶液+AMP glo试剂以40μL/孔添加到孔中。将最终反应混合物孵育30分钟,然后在Wallac EnVision读取器上读数以测量发光。

#### 来自AMP Glo测定的数据的分析

[0188] 可以以多种方式分析来自AMP Glo测定的数据。原始数据呈来自Envision读取器的原始发光单位(RLU)的形式。数据可以呈现为RLU值、AMP剩余物的百分比(与0分钟相比,在8分钟反应时间结束时的AMP剩余物)、水解活性(将测试样品中的RLU与含有最大CD73抑制剂的含或不含TNAP抑制剂的孔进行比较)。

[0189] 使用上述测定,在CD73和/或TNAP抑制剂的存在下测试健康志愿者血清,图3B中示出了测量的发光(RLU)值。图3C中示出了在健康受试者和癌症受试者中CD73的水解活性百分比与CD73蛋白浓度之间的相关性。

#### 实施例3-使用免疫染色确定CD73和/或TNAP的量

[0190] 抗原修复后,使用来自Cell Signaling Technology的抗NT5E/CD73 D7F9A抗体克隆和来自Sino Biological的抗碱性磷酸酶/ALPL R034抗体克隆,在福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)的组织中检测膜外5'核苷酸酶(CD73)和组织非特异性碱性磷酸酶(TNAP)蛋白。使用与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗兔IgG和3,3'-二氨基联苯胺(DAB)的显色沉积进行单重抗体染色检测。使用上述抗体克隆在多重荧光测定中进行CD73和TNAP二者的同时检测,并且使用HRP来沉积荧光色原。使用图像分析程序计算阳性染色面积、阳性染色细胞的百分比、H得分、组合的阳性评分(CPS)和肿瘤比例得分(TPS)。对于单重显色染色,使用QuPath定量病理学和生物图像分析程序。对于多重荧光,使用来自Indica labs的HALO软件。图5A-D和图6A-D分别示出了针对CD73和TNAP的免疫染色的代表性图像。图5E和图6E绘制了CD73和TNAP的染色面积占总肿瘤面积的百分比的定量。图5F绘制了染色面积百分比与H得分之间的相关性。

#### 实施例4-确定CD73、TNAP或其他腺苷机制mRNA的量

[0191] 使用Qiagen RNeasy FFPE试剂盒(#73504)进行从福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)的组织中提取RNA。将组织切片使用手术刀从显微镜载玻片上刮下,或将切片直接放入微量离心管中。在nCounter SPRINT分析仪上使用nCounter肿瘤学或免疫学面板用提取的RNA进行NanoString分析,然后使用nSolver软件包进行分析。在Applied Biosystems

QuantStudio 6Flex实时PCR系统上使用Taqman探针对从提取的FFPE RNA产生的cDNA进行实时PCR。

#### 实施例5-确定受试者的肿瘤突变负荷 (TMB)

[0192] 用于确定本文所述受试者的肿瘤突变负荷 (TMB) 的方法公开于Goodman等人Tumor Mutational Burden as an Independent Predictor of Response to Immunotherapy in Diverse Cancers.Mol Cancer Ther. (2017) .16 (11) :2598-2608中。

#### 实施例6-确定受试者的PD-L1状态

[0193] 存在多种已知用于确定受试者的PD-L1状态的方法。一种有用的方法是使用FDA批准的PD-L1 IHC 22C3 pharmDx装置和由Dako North America, Inc开发的方法。

#### 实施例7-使用同位素AMP水解测定确定CD73和/或TNAP的量

##### 测定设计

[0194] 使用监测<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-AMP去磷酸化为<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-腺苷的LC-MS/MS方法体外评估人血浆中CD73的活性。使用抑制剂混合剂封闭神经元组织非特异性碱性磷酸酶 (TNAP) 并且稳定<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-腺苷, 所述抑制剂混合剂由以下组成: 2,5-二甲氧基-N-(喹啉-3-基) 苯磺酰胺 (TNAP抑制剂)、赤式-9-(2-羟基-3-壬基) 腺嘌呤 (EHNA, 腺苷脱氨酶抑制剂)、5-碘代杀结核菌素 (腺苷激酶抑制剂) 和芒霉素 (S-腺苷基-L-同型半胱氨酸水解抑制剂)。

[0195] 通过非线性回归分析估计IC<sub>50</sub>值。

##### 测定条件

[0196] 将pH 7.4的人血浆 (50μL) 与CD73抑制剂 (化合物A) (0至10μM) 和EHNA (10μM)、二甲氧基-N-(喹啉-3-基) 苯磺酰胺 (625μM)、5-碘代杀结核菌素 (10μM) 和芒霉素 (4μM) 一起预孵育1小时。用5μM<sup>13</sup>C<sub>5</sub>-AMP引发反应, 并且允许在摇动的水浴中在37°C下进行1min。通过添加四体积的含有内标 (cIMP, 5ng/mL) 的0.4M高氯酸来终止反应。将样品涡旋15分钟, 并且然后在10°C下以4,200rpm离心20分钟。如分析方法部分所述, 将上清液通过LC-MS/MS分析。

##### 分析方法和数据分析

[0197] 使用Applied Biosystems-Sciex Analyst软件 (1.6.3版) 进行质谱仪采集和积分。

##### 仪器:

●API 4000质谱仪 (Applied Biosystems, 加利福尼亚州福斯特城)

●API 6500质谱仪 (Applied Biosystems, 加利福尼亚州福斯特城)

●Shimadzu Nexera X2 UHPLC系统 (Shimadzu Scientific Instruments, 俄勒冈州坎比 (Canby))

柱:Atlantis dC18, 100Å, 3.0×100mm, 3μm (Waters, 马萨诸塞州米尔福德)

注入体积:0.5μL

流速:0.80mL/min

##### HPLC梯度:

Time(min)	流动相A 在水中的10 mM甲酸铵和0.1%	流动相B 在95%乙腈、5%水中的10
-----------	---------------------------	------------------------

	甲酸	mM甲酸铵
0	99	1
1.0	92	8
2.0	5	95
2.8	5	95
2.9	99	1
4.2	99	1

电离模式:电喷雾 (ESI)

检测模式:正MRM (Q1/Q3过渡:对于 $^{13}\text{C}_5$ -腺苷, m/z 273.14/136.10;对于cIMP, m/z 330.98/137.10)

[0198] 不含CD73抑制剂的样品的分析提供了关于样品中CD73活性的信息。用CD73抑制剂和/或TNAP抑制剂进行相同的评估允许评估CD73与TNAP介导的AMP去磷酸化的相对贡献。

[0199] 使用CD73抑制剂的滴定,通过将数据拟合到以下4参数方程(具有可变斜率),使用GraphPad Prism 5.0版(GraphPad Software Inc.,加利福尼亚州圣地亚哥)中包含的算法来估计 $\text{IC}_{50}$ 值:

$$\text{活性}\% = \text{最小} + \frac{(\text{最大} - \text{最小})}{(1 + 10^{(\log[\text{IC}_{50} \log(I)] \text{Hill斜率})})}$$

[0200] 下表1以及图7A-C示出了来自两个志愿者的代表性 $\text{IC}_{50}$ 值。

表1:化合物A针对人血浆中的CD73的抑制效力( $\text{IC}_{50}$ )

血浆ID	$\text{IC}_{50}$ (nM)
志愿者1	24.8
志愿者2	25.0
志愿者3	15.4

[0201] 在本文中描述了本发明的具体的实施方案,包括诸位发明人已知用于实施本发明的最佳模式。在阅读了前述说明书后,所公开的实施方案的变化对于在本领域工作的个体来说可能将变得清楚,并且预期那些熟练技术人员可以适当地采用此类变化。因此,本发明旨在以不同于本文具体描述的其他方式实践,并且本发明包括如适用法律所允许的所附权利要求中阐述的主题的所有修改和等效物。此外,除非本文另有指示或在其他方面与上下文明确矛盾,否则本发明包括处于其所有可能变化形式的上述要素的任何组合。

[0202] 将在本说明书中引用的所有出版物、专利申请、登录号和其他参考文献均通过引用并入本文,如同每个单独的出版物或专利申请被具体且单独地指出通过引用并入一样。

# ELISA (酶联免疫吸附测定)

— 快速、高通量、定量、灵敏、高特异性

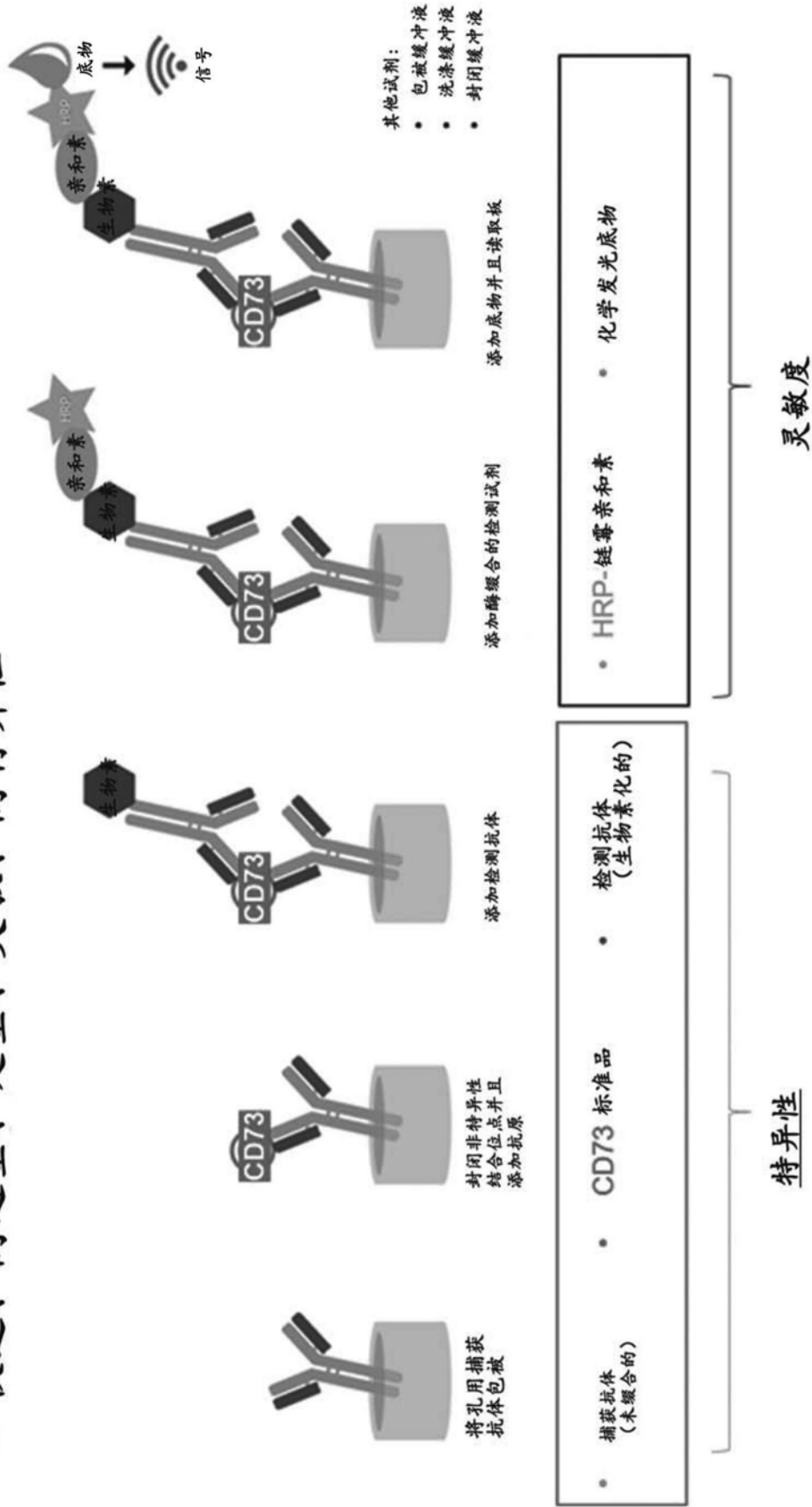


FIG. 1

健康供体相关性  
血浆与血清

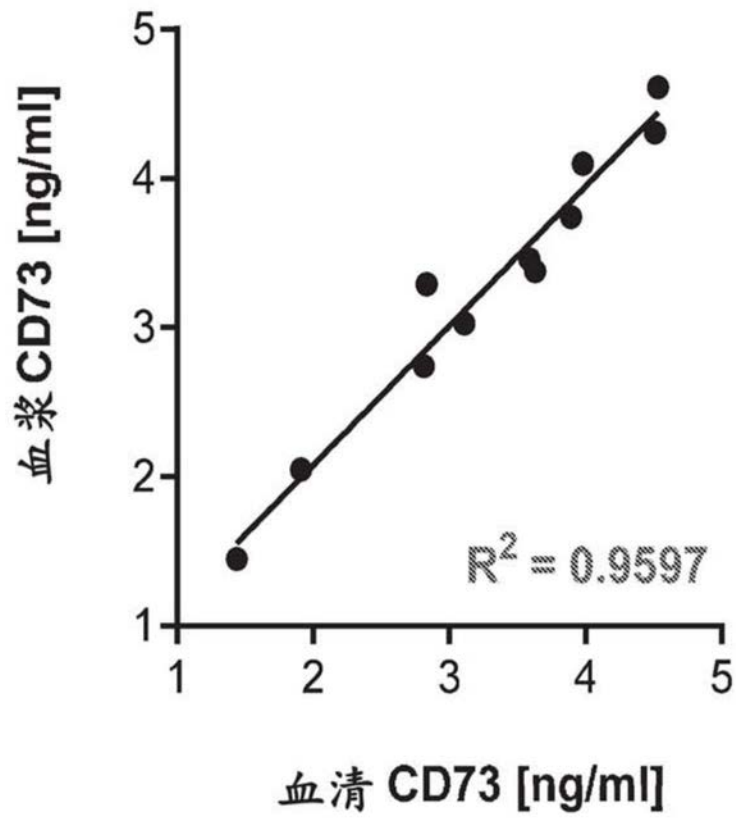


FIG.2A

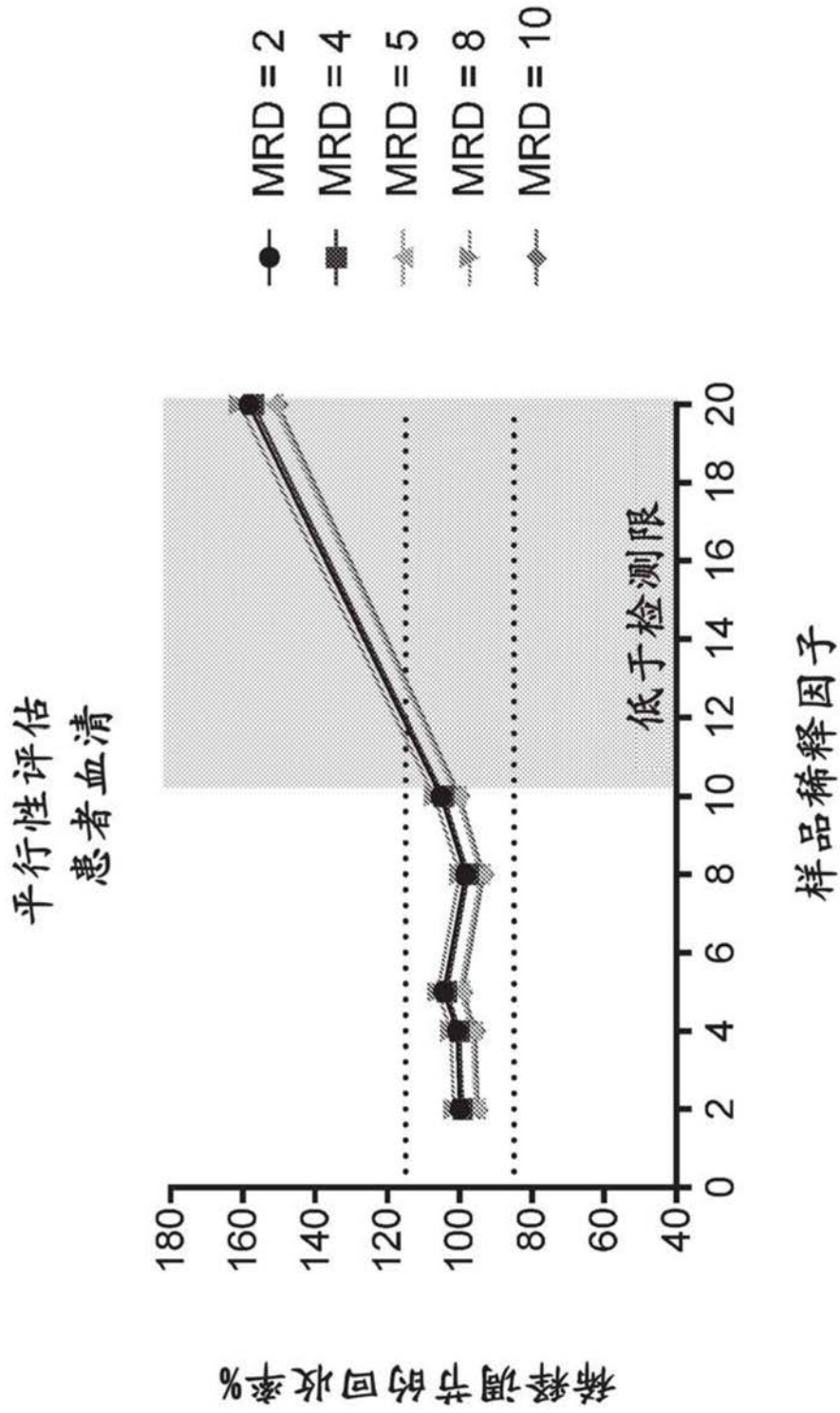


FIG.2B

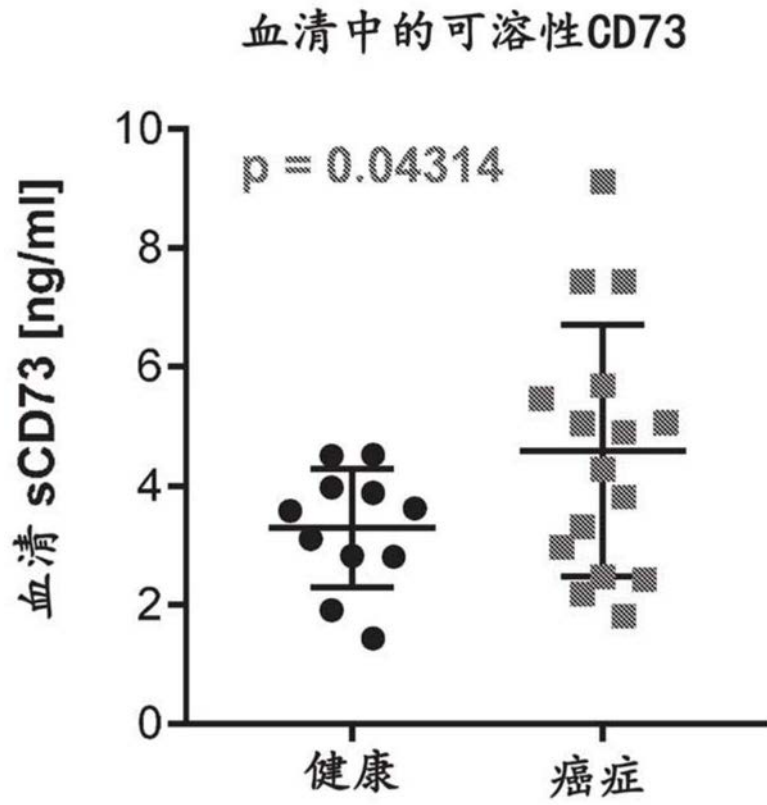


FIG. 2C



FIG. 3A

健康志愿者血清中的AMP水解  
(25 μM AMP)

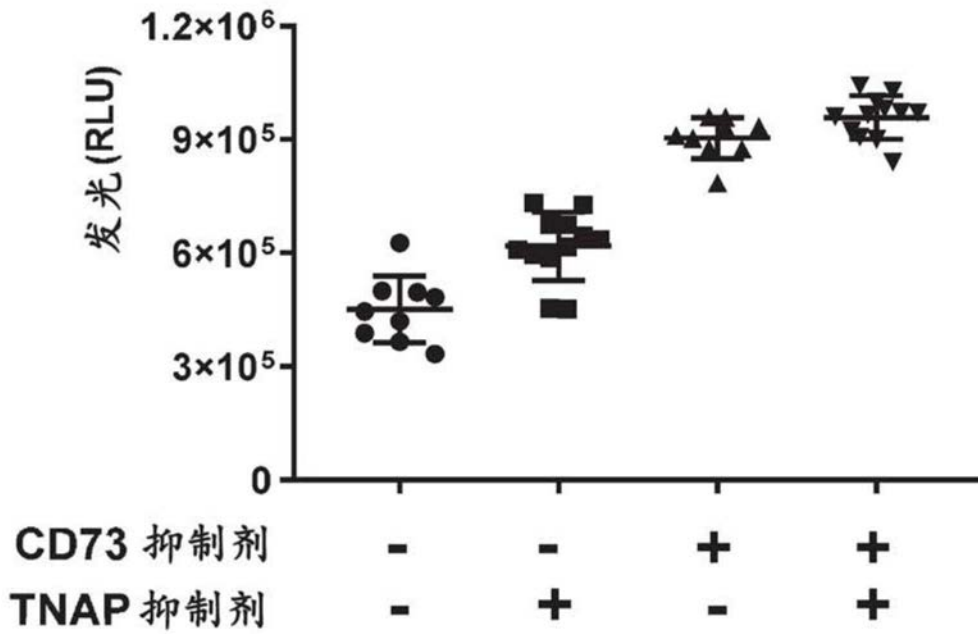


FIG. 3B

对于患者血清和健康血清的  
CD73活性与蛋白质的相关性

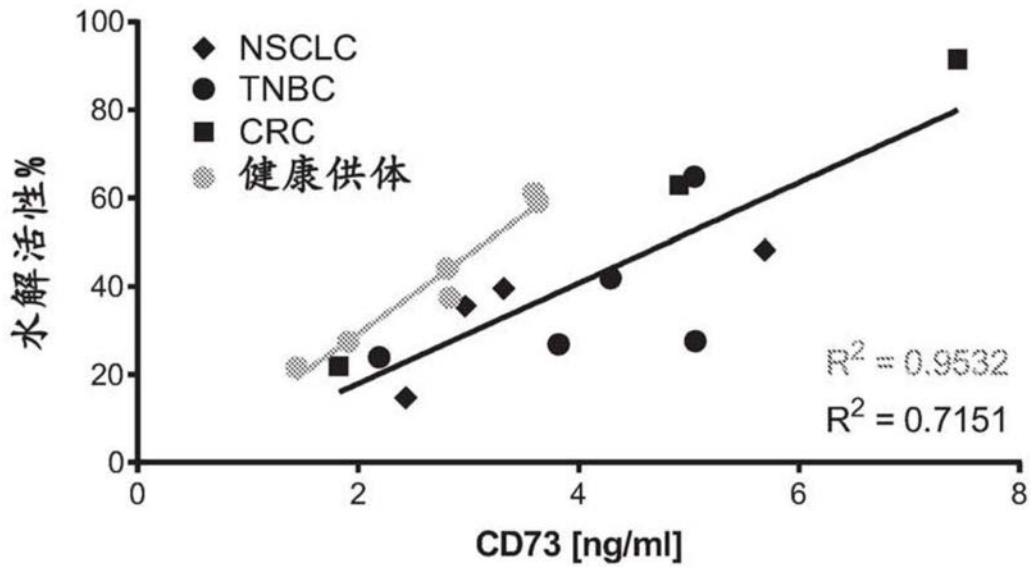


FIG. 3C

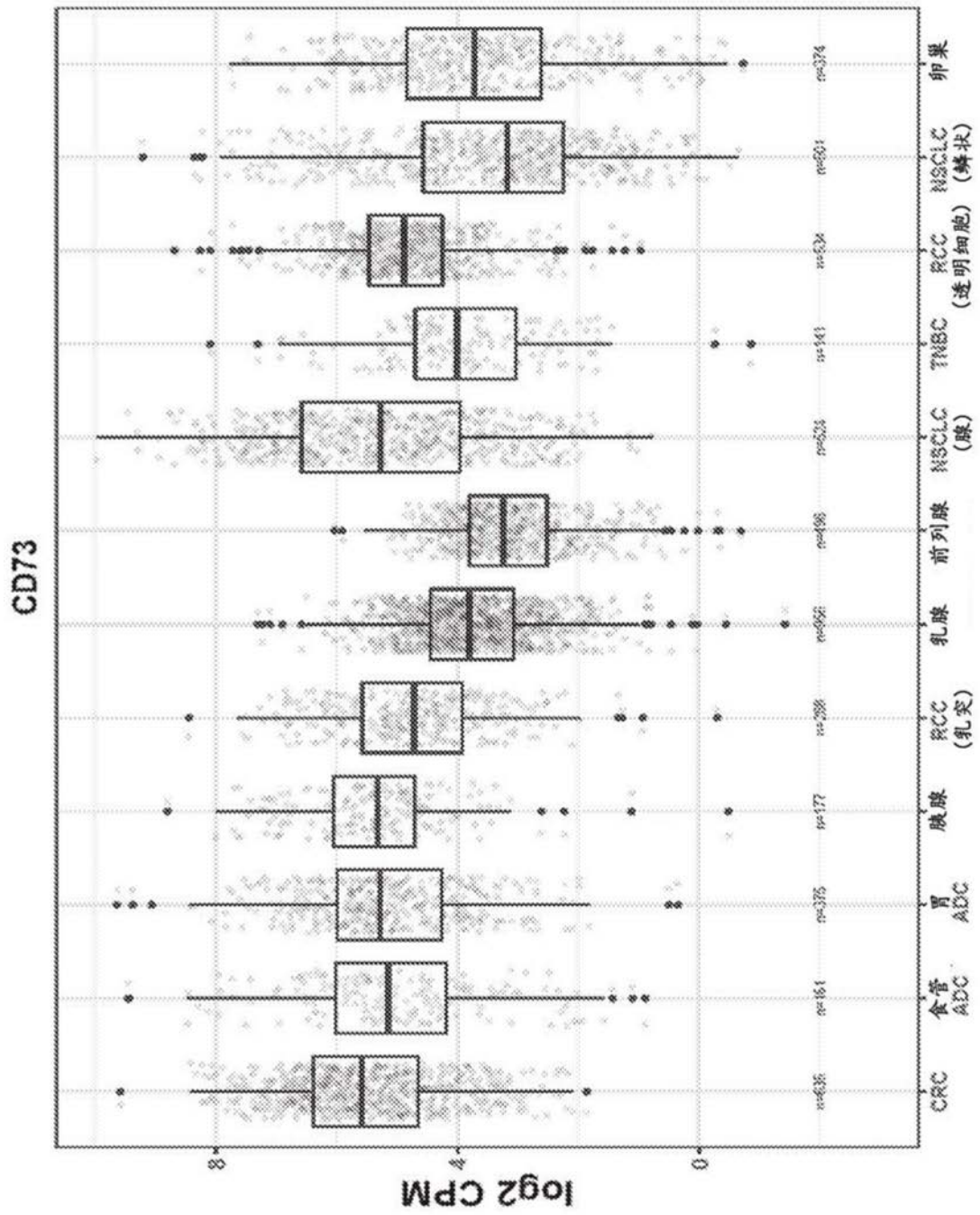


FIG. 4A

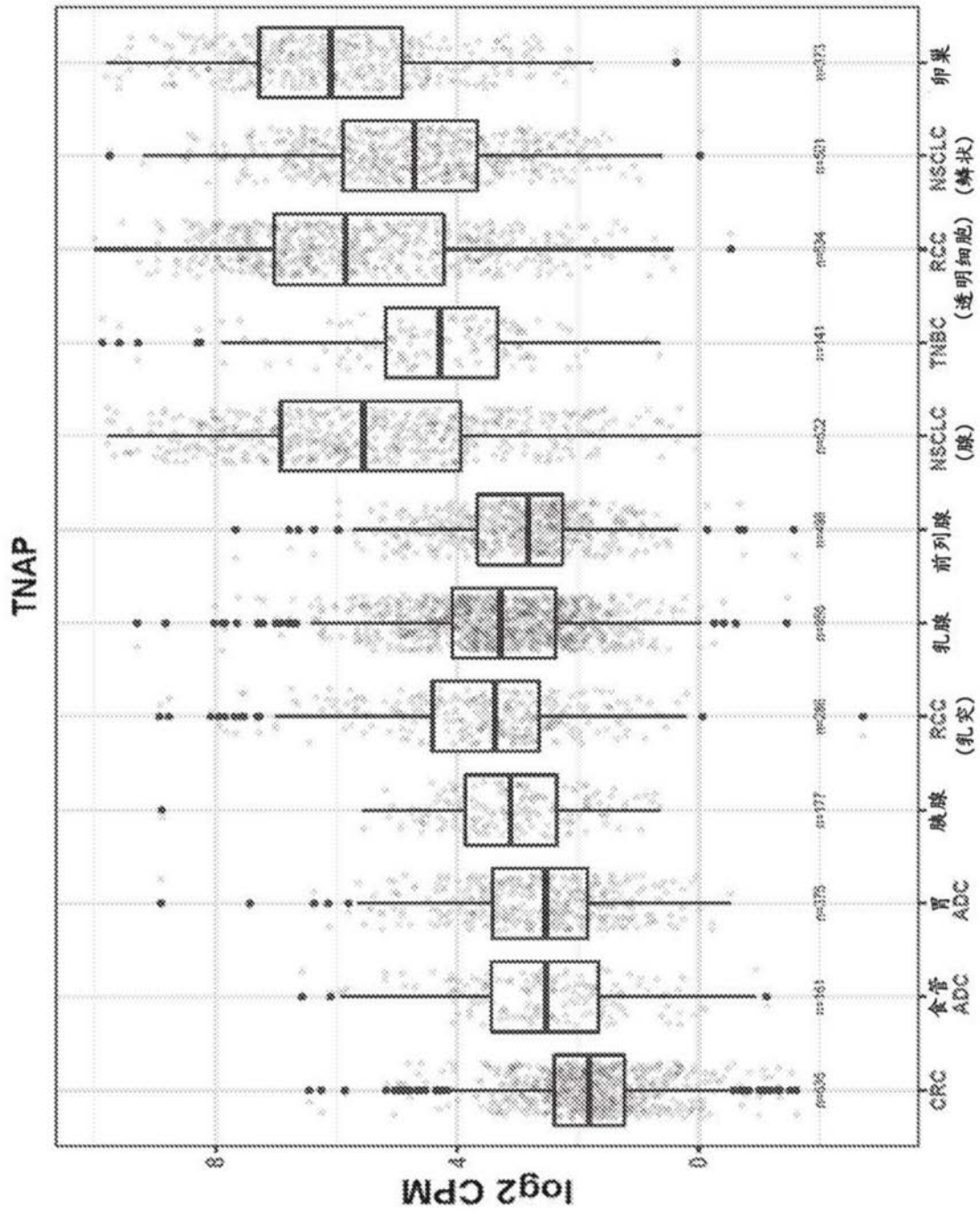


FIG.4B

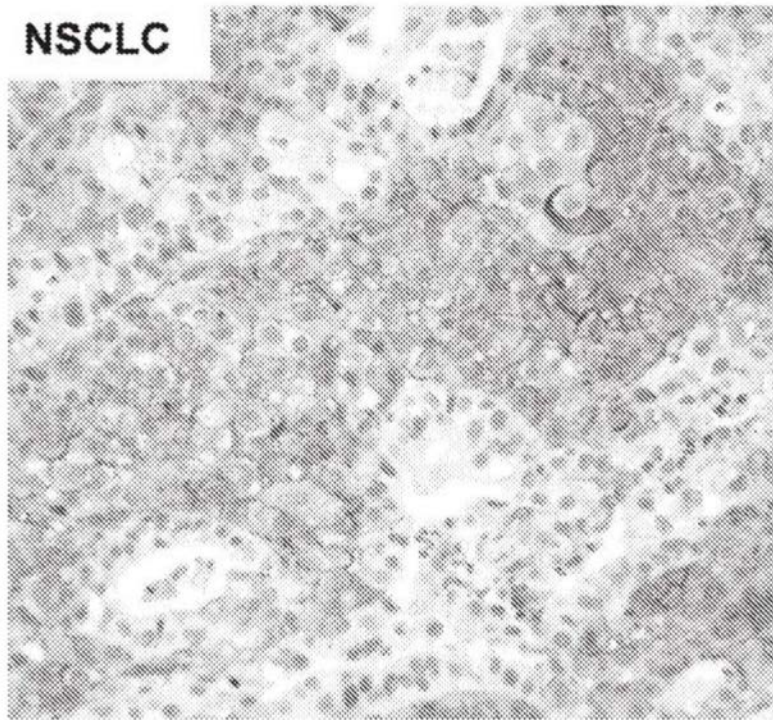


FIG. 5A

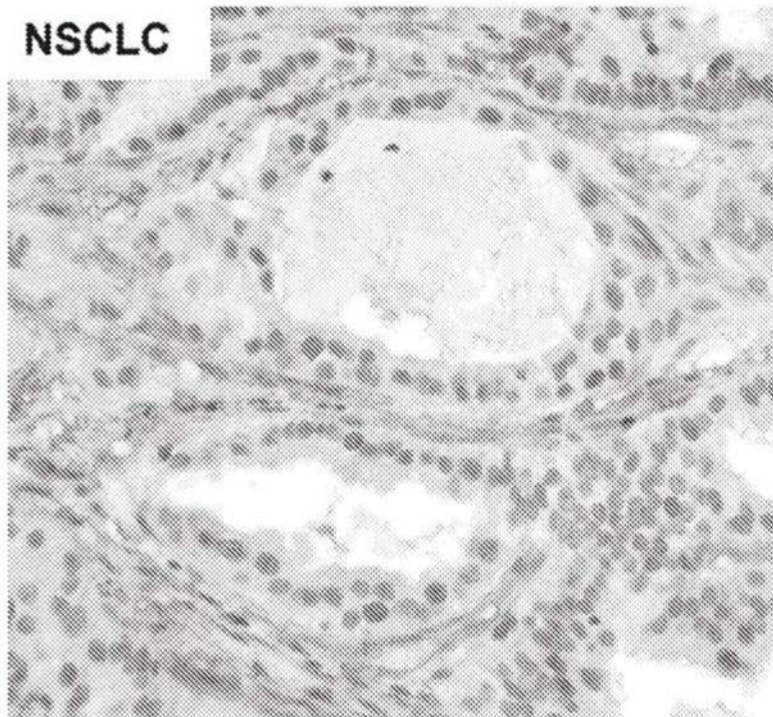


FIG. 5B

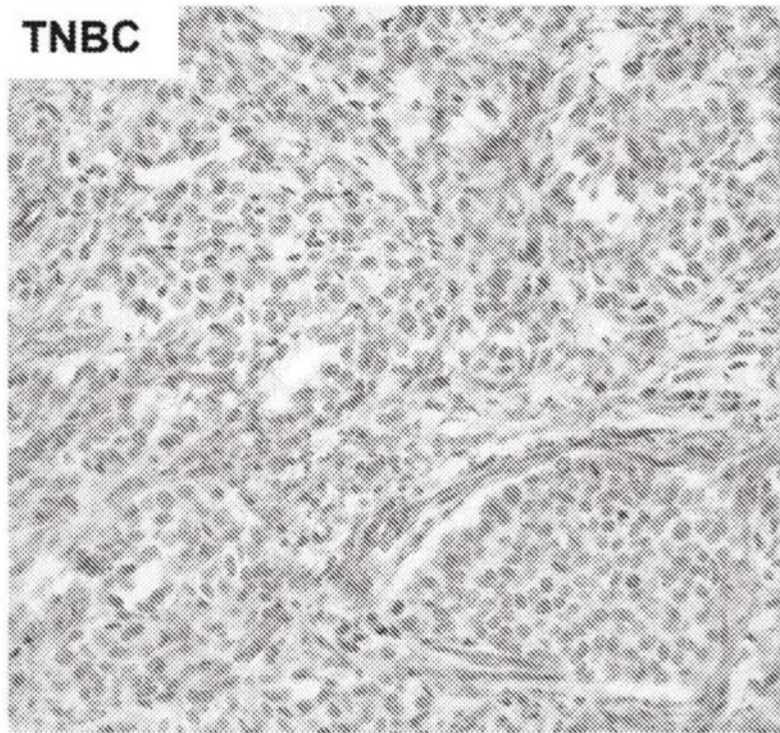


FIG. 5C

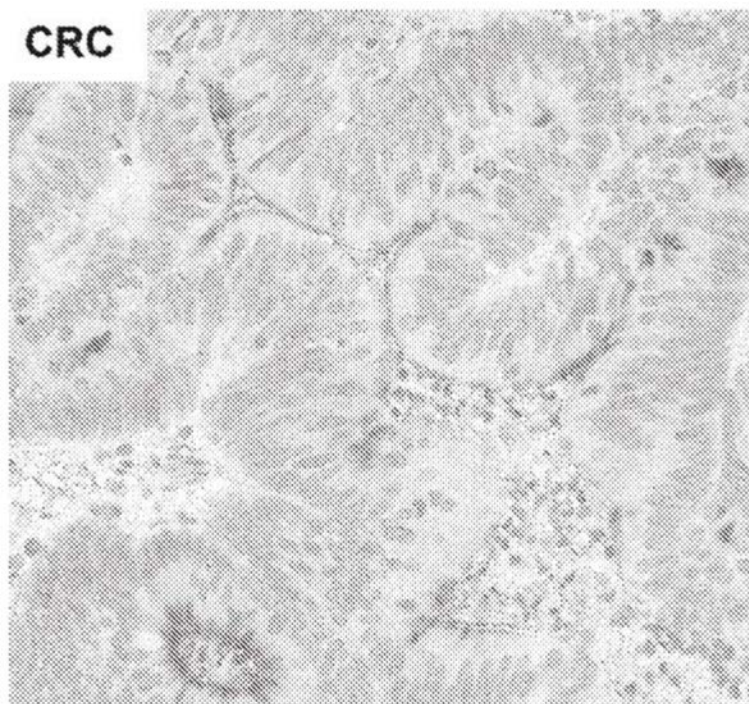


FIG. 5D

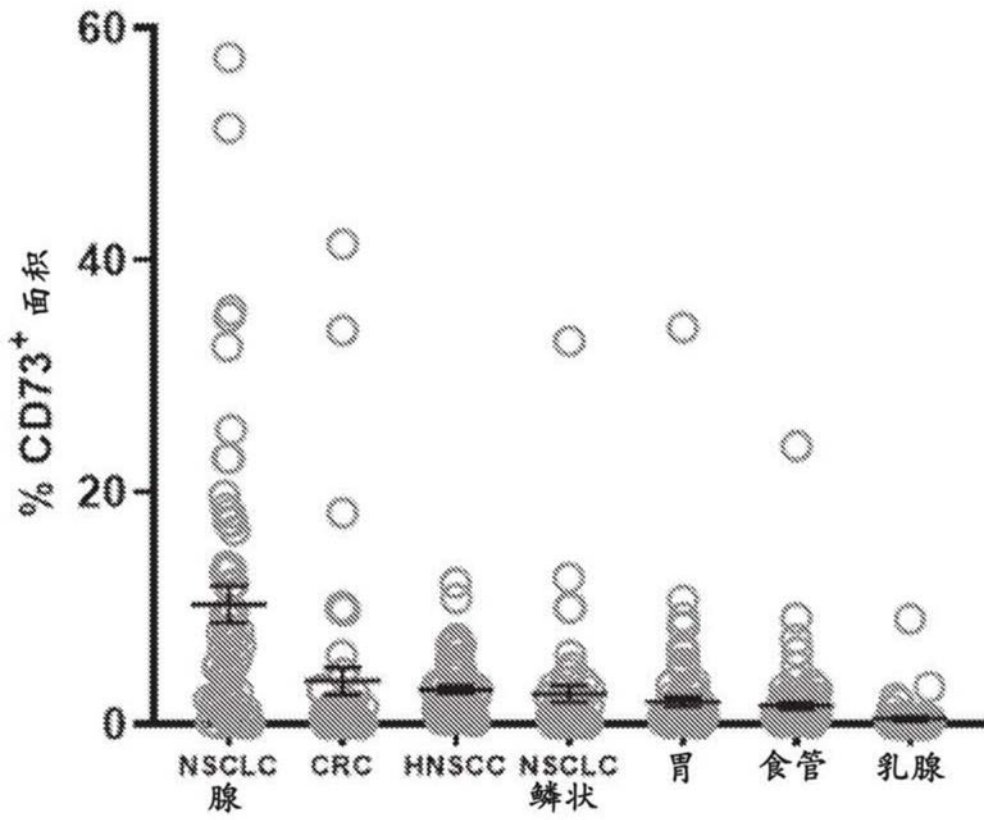


FIG. 5E

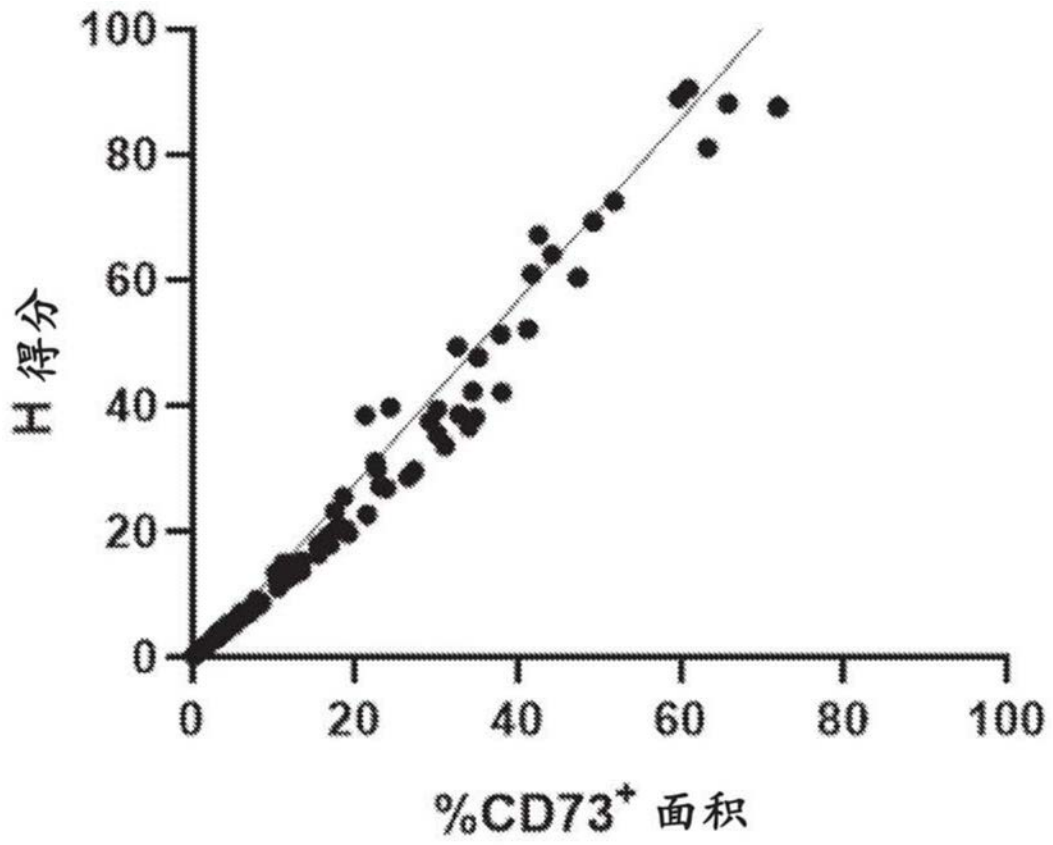


FIG. 5F

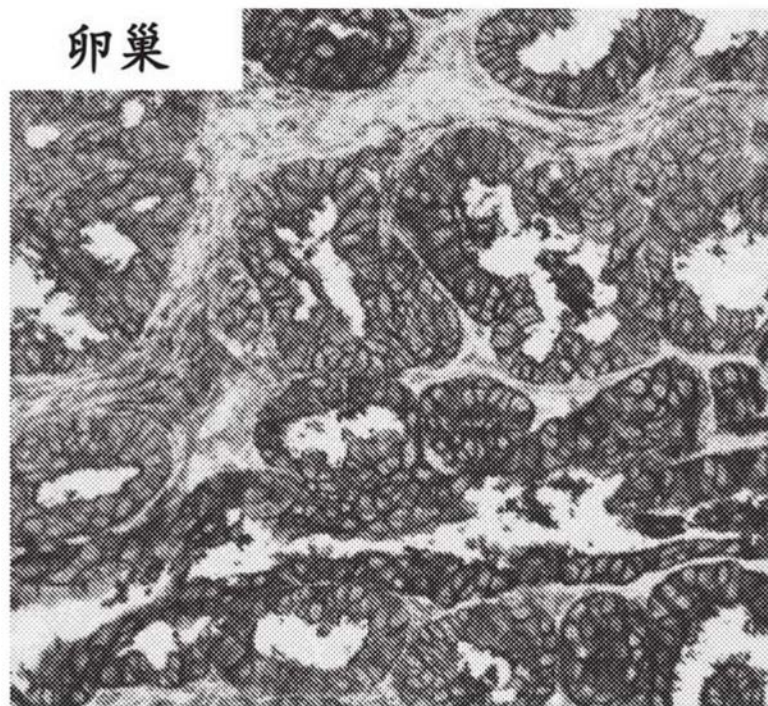


FIG. 6A

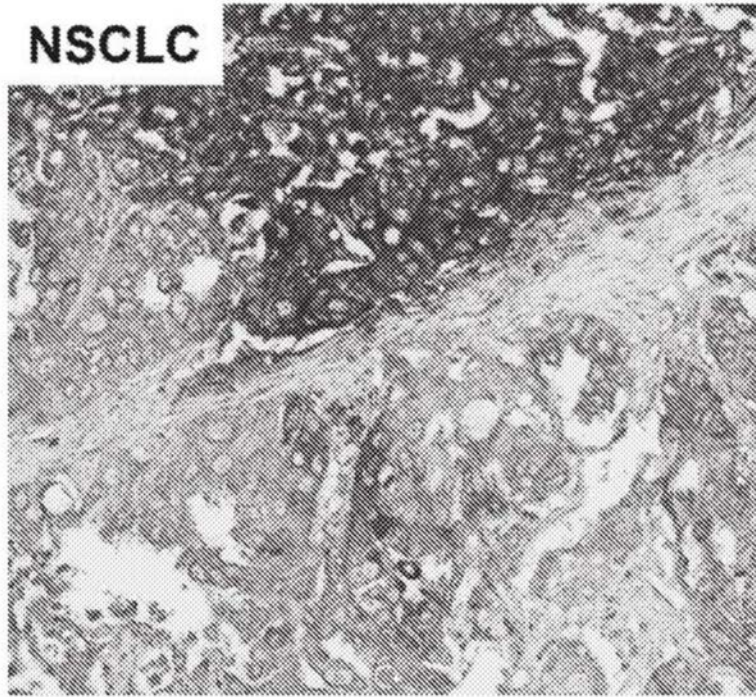


FIG.6B



FIG.6C

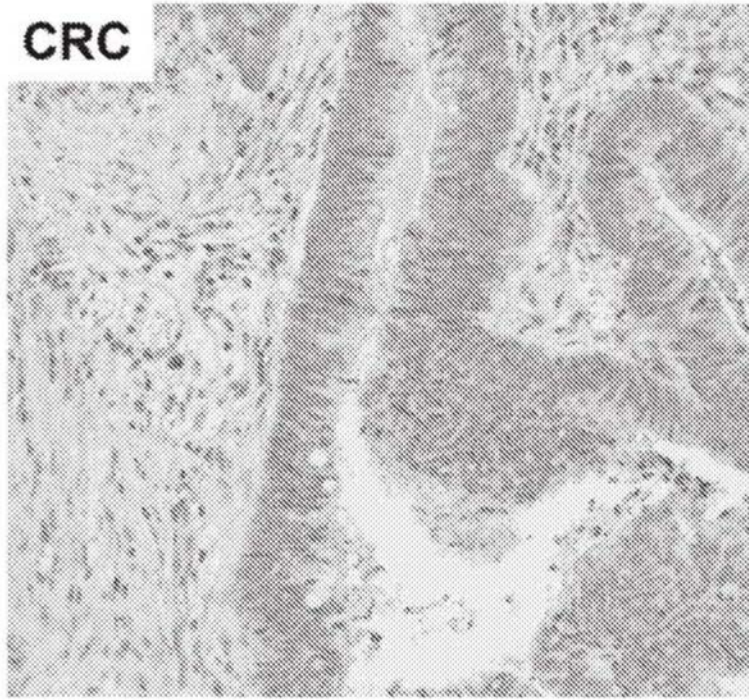


FIG. 6D

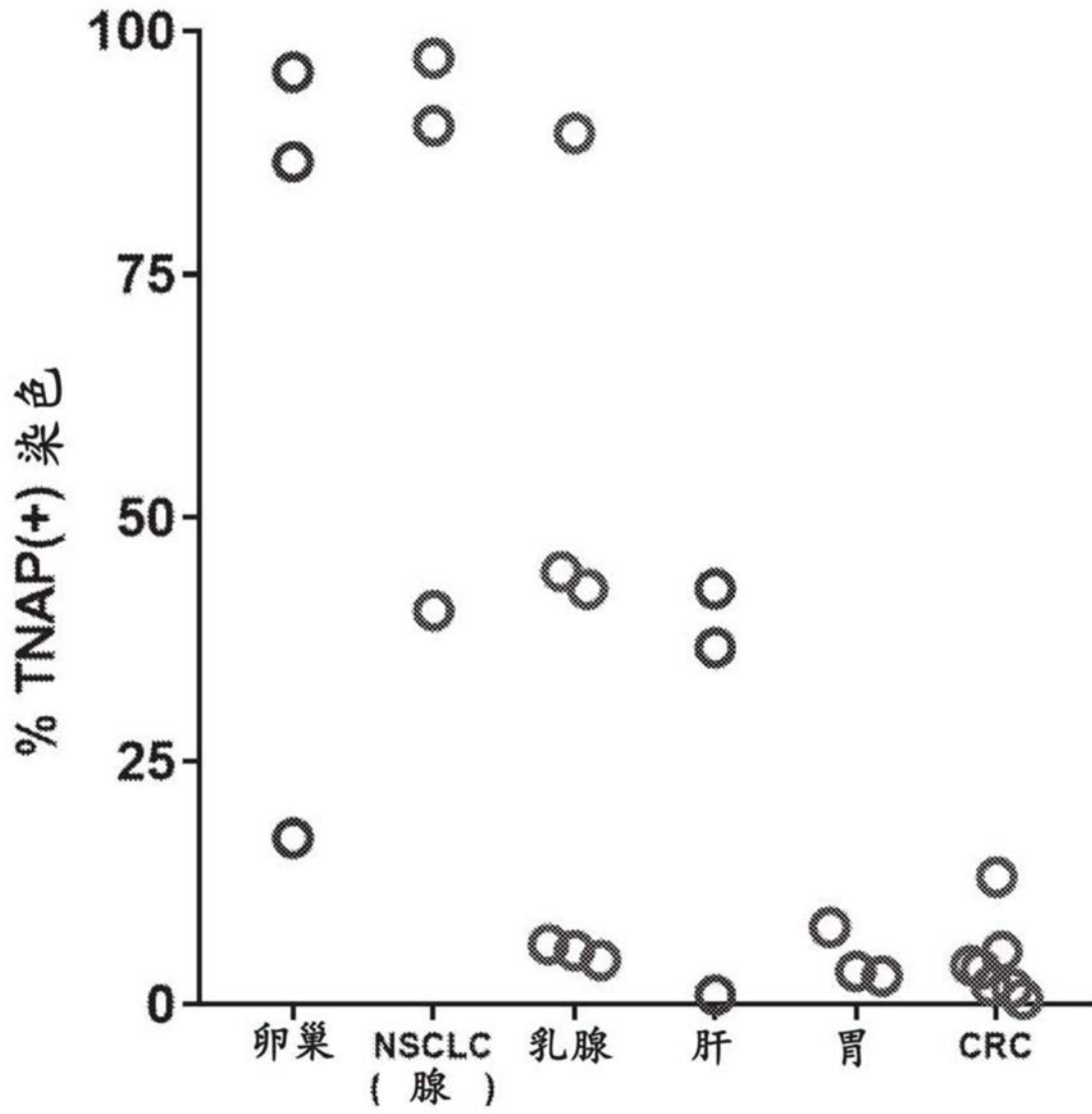


FIG.6E

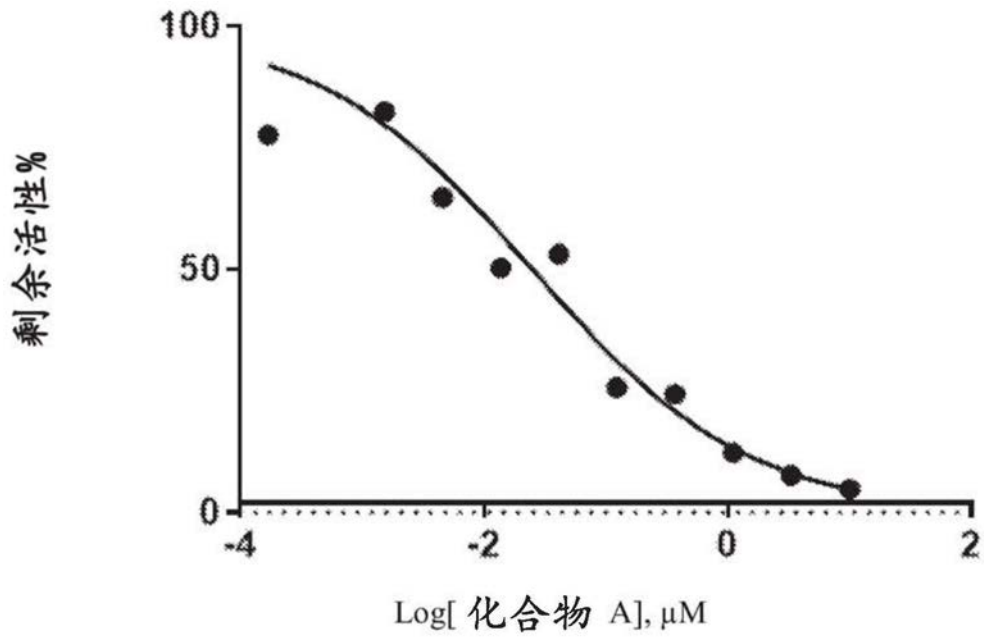


FIG. 7A

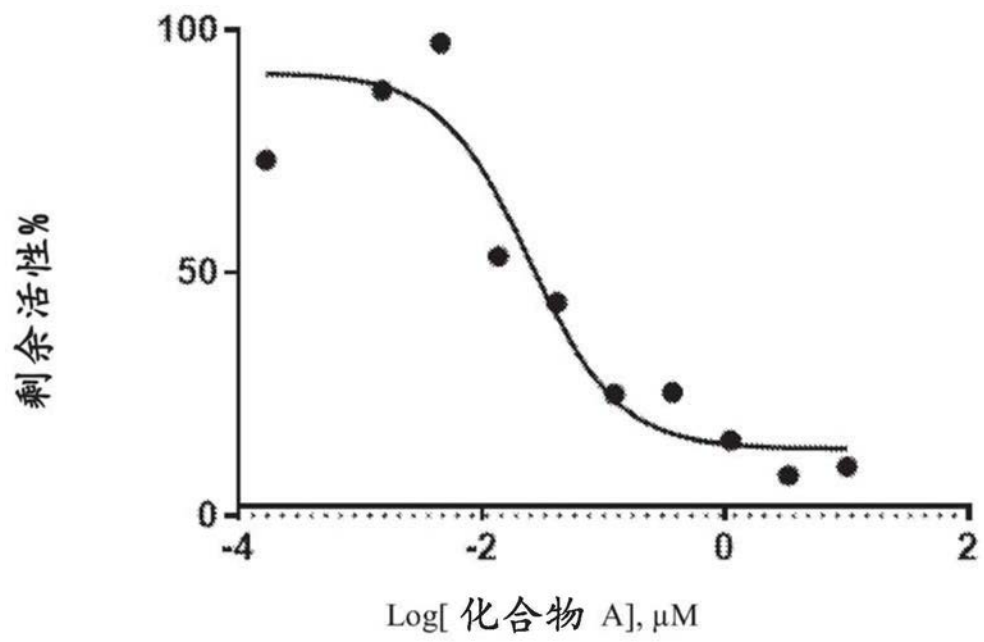


FIG. 7B

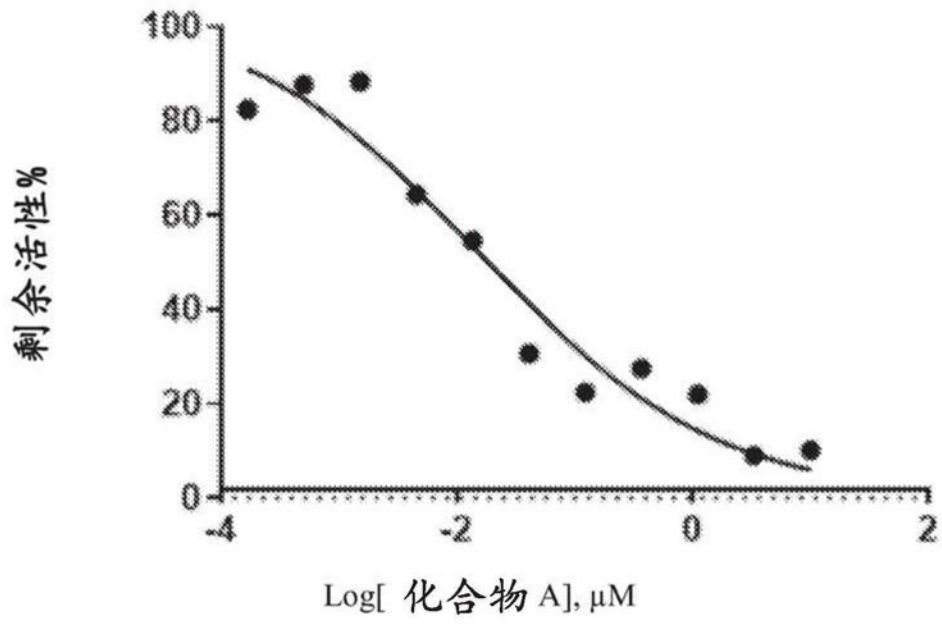


FIG.7C