

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044293**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.08.14

(21) Номер заявки
202090549

(22) Дата подачи заявки
2018.10.05

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C12N 9/14 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) ВОССТАНОВЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ Т-КЛЕТОК ПОСРЕДСТВОМ СИСТЕМЫ CD39/CD73

(31) **62/568,812; 62/686,143**

(32) **2017.10.06; 2018.06.18**

(33) **US**

(43) **2020.12.07**

(86) **PCT/EP2018/077217**

(87) **WO 2019/068907 2019.04.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИННЕЙТ ФАРМА (FR)

(72) Изобретатель:
**Шанто Стефани, Гурден Николя,
Патурель Карин, Перро Иван, Росси
Бенжамин (FR)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) PAUL A BEAVIS ET AL.: "CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses", TRENDS IN IMMUNOLOGY, vol. 33, no. 5, May 2012 (2012-05), pages 231-237, XP028479101, ISSN: 1471-4906, DOI: 10.1016/J.IT.2012.02.009 [retrieved on 2012-03-02] the whole document

ALLARD B. ET AL.: "The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets", IMMUNOL. REV., vol. 276, March 2017 (2017-03), pages 121-144, XP002786951, the whole document

YOUNG ARABELLA ET AL.: "Co-inhibition of CD73 and A2AR Adenosine Signaling Improves Anti-tumor Immune Responses", CANCER CELL, CELL PRESS, US, vol. 30, no. 3, 12 September 2016 (2016-09-12), pages 391-403, XP029725575, ISSN: 1535-6108, DOI: 10.1016/J.CCELL.2016.06.025, the whole document

SEBASTIAN FM HÄUSLER ET AL.: "Anti-CD39 and anti-CD73 antibodies A1 and 7G2 improve targeted therapy in ovarian cancer by blocking adenosine-dependent immune evasion", AM J TRANSL RES, vol. 6, no. 2, 15 January 2014 (2014-01-15), pages 129-139, XP055240896, the whole document

WO-A1-2016055609

WO-A1-2009095478

WO-A1-2018167267

Perrot I. et al.: "Preclinical development of humanized CD39 (IPH52) and CD73 (IPH53) blocking antibodies targeting the ATP/Adenosine immune checkpoint pathway for cancer immunotherapy", AACR meeting, 14-18.04.2018, ID:2718 28 April 2018 (2018-04-28), XP002786975, Retrieved from the Internet: URL: https://www.innate-pharma.com/sites/default/files/poster_cd39_cd73_bat.pdf [retrieved on 2018-11-30] the whole document

(57) В настоящем изобретении предложены способы применения соединений, которые ингибируют ферментативную активность растворимого CD39 человека, для лечения рака, включая, но не ограничиваясь лечением типов рака, характеризующихся экспрессирующими CD73 клетками.

B1**044293****044293****B1**

Ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительных заявок на патент США № US 62/568812, поданной 6 октября 2017 г., и US 62/686143, поданной 18 июня 2018 г.; обе из которых полностью включены в данное изобретение посредством ссылки, включая все чертежи.

Ссылка на перечень последовательностей

Настоящая заявка подана вместе с Перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей предоставлен в виде файла, названного "CD39-7_ST25", созданного 5 октября 2018 г., размер которого составляет 73 килобайта. Информация в электронном формате о Перечне последовательностей полностью включена в данное изобретение посредством ссылки.

Область техники

В настоящем изобретении предложено применение нейтрализующих CD39 агентов для лечения рака.

Уровень техники

НТФДаза 1 (эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза 1), также известная как CD39/ENTPD1 или сосудистый CD39, действуя вместе с другим ферментом CD73 (экто-5'-нуклеотидазой), гидролизует внеклеточный аденозинтрифосфат (АТФ) и аденозиндифосфат (АДФ) с образованием аденозина, который связывается с рецепторами аденозина и ингибирует ответы Т-клеток и клеток-естественных киллеров (NK), тем самым подавляя иммунную систему. Образование аденозина посредством пути CD73/CD39 считается основным механизмом иммуносупрессорной функции регуляторных Т-клеток (Treg). CD39 содержит два трансмембранных домена, расположенных рядом с N- и C-концами, короткие цитоплазматические N- и C-концевые фрагменты и большой внеклеточный домен, содержащий активный центр. Тем не менее, хотя CD39 обычно заякорен в мембрану указанными двумя трансмембранными доменами на двух концах молекулы, недавно также сообщили, что растворимую каталитически активную форму CD39 можно найти в кровотоке человека и мышей (Yegutkin и др., (2012) FASEB J. 26(9): 3875-3883).

CD73 (экто-5'-нуклеотидаза) представляет собой заякоренный гликозилфосфатидилинозитолом (ГФИ) белок размером 70 кДа, который при нормальных условиях экспрессируется на эндотелиальных клетках и субпопуляциях гематопозитических клеток. Сообщали об экспрессии CD73 в различных опухолевых клетках, включая, среди прочих, клетки лейкоза, рака мочевого пузыря, глиомы, глиобластомы, рака яичников, меланомы, рака предстательной железы, рака щитовидной железы, рака пищевода и рака молочной железы. Экспрессия CD73 также была ассоциирована с прометастатическим фенотипом при меланоме и раке молочной железы.

Антитела, которые специфично связывают CD73, могут быть хорошей альтернативой низкомолекулярным агентам, проявляя большую селективность к CD73. Тем не менее, для исследованных антител, как правило, выявляли лишь частичное ингибирование ферментативной активности CD73. Было показано, что терапия антителом, которое связывает CD73 мыши, может ингибировать рост опухоли молочной железы и метастазирование у мышей (Stagg, и др. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:1547-1552). Тем не менее, антитела обычно не вступают в перекрестную реакцию с CD73 человека и мыши, что усложняет исследование антител и биологических функций CD73. Было показано, что генетическая делеция рецепторов A2A может вызывать зависимое от Т-клеток отторжение опухоли (Ohta, и др., (2006) Proc Natl Acad Sci USA 103:13132-13137). Нокдаун с применением мiРНК или сверхэкспрессия CD73 на опухолевых клетках может модулировать рост и метастазирование опухоли (Beavis и др., 2013, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110:14711-716; Stagg и др. (2010), выше; Jin и др. (2010) Cancer Res. 70: 2245-55). Мыши CD73-/- защищены от трансплантированных и спонтанных опухолей (Stagg и др. (2010) Cancer Res. 71: 2892-2900). У людей высокая экспрессия CD73 может быть отрицательным прогностическим фактором при раке (Loi и др., 2013, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110: 11091-11096). Были описаны антитела, которые связывают CD73, например, сообщили, что клон AD2 (изотип IgG1 мыши) функционально блокирует CD73, вызывая кластеризацию и интернализацию рецептора, но оказывает минимальное влияние на ферментативную активность. Sachsenmeier и др. ((2012) J. Biomed. Screening 17:993-998) и (Rust и др. (2013) Mol. Cancer 12:11) также сообщили об антителе, которое вызывает внутриклеточную интернализацию. Позднее были описаны антитела, которые блокируют как растворимый CD73, так и CD73 на поверхности клетки (W O2016/055609 и WO 2016/131950), а также антитела, которые ингибируют CD73 на поверхности клетки, вызывая внутриклеточную интернализацию CD73 в клетки (например, опухолевые клетки) (WO 2017/064043; WO 2016/075099 и WO 2016/081748).

CD73, вместе с CD39, регулирует метаболизм аденозинтрифосфата (АТФ). CD39 (НТФДаза-1) превращает АТФ в АМФ, при этом высвобождаются только следовые количества АДФ, тогда как CD73 катализирует превращение АМФ в аденозин. Количество CD39⁺ Treg повышено в некоторых типах рака человека, и значимость CD39⁺ Treg для стимуляции роста и метастазирования опухоли была продемонстрирована с помощью нескольких моделей in vivo. Тем не менее, CD39 также экспрессируется опухолевыми клетками, и CD39⁺ опухолевые клетки могут опосредовать подавление иммунитета через сигнальный путь аденозина. CD39 в раковых клетках проявляет АТФазную активность и, вместе с CD73, вырабатывает аденозин. CD73⁺CD39⁺ раковые клетки ингибировали пролиферацию CD4 и CD8 Т-клеток и образование цитотоксических эффекторных CD8 Т-клеток (CTL) зависимым от CD39 и аденозина образом. Антитела, которые связывают и ингибируют CD39, описаны в WO 2009/095478. Hayes и др. (2015)

Am. J. Transl. Res. 7(6):1181-1188 использовали антитело против CD39 и установили, что оно также является блокирующим, но указанное антитело также связывает FcγR и обладает эффекторной функцией.

Hausler и др. (2014) Am J Transl Res. 6(2):129-139 сообщили, что каждое из антител против CD39 и CD73, которые опосредуют антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ, благодаря способности связываться с Fcγ-рецепторами), вызывают опосредованный NK-клетками лизис клеток-мишеней, и что каждое из антител также вызывает частичное снижение образования аденозина. Тем не менее, когда исследовали снижение образования аденозина антителами против CD39 и CD73 вместе, не наблюдали аддитивного эффекта у комбинации антител.

Экспрессия CD39 на различных типах клеток, включая иммунные клетки и опухолевые клетки, вместе с применением антител, которые либо фактически не блокируют CD39, либо не являются чистыми блокаторами, создают сложные условия для оценки исходной активности антител. Общеизвестно, что блокирование активных центров ферментов с применением белковых агентов, таких как антитела, является сложной задачей. Следовательно, необходимо понять, могут ли антитела, и если могут, то как, ингибировать АТФазную активность CD39, и как разработать улучшенные молекулы.

Таким образом, несмотря на интерес к нацеливанию на CD39 и CD73, наиболее эффективный способ снижения образования аденозина еще предстоит определить.

Настоящее было создано в результате, среди прочего, открытия того, что в отличие от известных нейтрализующих антител против CD39, которые по существу не снижают подавление иммунитета, когда их применяют в комбинации с блокированием CD73, антитела, которые нейтрализуют растворимый белок CD39, вызывают значительное снижение подавления иммунитета при применении в комбинации с блокированием CD73.

Путем ингибирования АТФазной активности растворимого CD39, антитела против CD39 уменьшают количество субстрата, доступного для CD73, что в свою очередь сильно повышает эффективность агентов, которые ингибируют ферментативную активность CD73, возможно потому, что агенты, которые ингибируют CD73, ограничены в своей способности полностью ингибировать активность CD73. Наоборот, антитела, которые ингибируют связанный с мембраной CD39, но не растворимый CD39, не повышают эффективность агентов, которые ингибируют ферментативную активность CD73.

Более того, при возрастании концентраций, антитела, которые нейтрализуют растворимый CD39, вызывают по существу полное ингибирование катаболической активности системы CD39/CD73. Действия антител, которые нейтрализуют растворимый CD39, наблюдают в присутствии значительных уровней АТФ, например, которые можно наблюдать в присутствии экзогенно добавленного АТФ в аналитических системах (*in vitro*) или которые могут встречаться в опухолях, таких как солидные опухоли или, в общем, в опухолях с высокой катаболической активностью системы CD39/CD73 (например, в опухолях, для которых характерно присутствие полипептида CD73 и/или экспрессирующих полипептид CD73 клеток). Антитела, которые нейтрализуют растворимый CD39, следовательно, можно успешно применять при опухолях, для которых характерно присутствие полипептида CD73 и/или экспрессирующих полипептид CD73 клеток, или в комбинации с агентами, которые повышают экспрессию CD73 (например, химиотерапевтическими агентами, антрациклинами) или которые приводят к образованию АТФ (например, химиотерапевтическими агентами).

Кроме того, нейтрализуя АТФазную активность растворимого и связанного с мембраной CD39, антитела позволяют сохранить доступное количество АТФ, который усиливает противоопухолевый иммунитет (АТФ является иммуностимулятором). Антитела против CD39, следовательно, можно успешно применять в комбинации с терапевтическими агентами, которые вызывают высвобождение АТФ наружу из опухолевых клеток, а именно с агентами или способами лечения, которые вызывают иммуногенную гибель раковых клеток (например, с химиотерапевтическими агентами, лучевой терапией). Антитела против CD39 будут не только предотвращать пополнение количества субстрата для CD73 (и в конечном счете аденозина) высвобожденным АТФ, но и сохранять высвобожденный АТФ, чтобы активизировать его иммуностимулирующую функцию.

Соответственно, в одном аспекте настоящего изобретения предложены улучшенные способы усиления противоопухолевого иммунного ответа путем применения антител, которые связывают и нейтрализуют растворимый CD39, в комбинации с агентом, который ингибирует CD73.

В другом аспекте настоящего изобретения предложены улучшенные способы усиления противоопухолевого иммунного ответа путем применения антител, которые связывают и нейтрализуют растворимый CD39 (в комбинированной терапии агентом, который ингибирует CD73, или без него), для лечения типов рака, для которых характерно присутствие белка CD73 (например, опухолей с растворимым CD73 и/или экспрессирующими CD73 клетками; CD73-положительных опухолей).

Без привязки к какой-либо конкретной теории полагают, что антитела, которые нейтрализуют связанный с мембраной CD39 на поверхности клетки, действуют путем ингибирования подвижности домена связанного с мембраной CD39 (мем CD39), тем не менее, не оказывая аналогичного влияния на активность растворимого белка CD39 (pCD39). Сообщали, что мем CD39 встречаются в виде гомомультимеров (например, тетрамеров и/или других мультимеров, дополнительно к мономерным формам), тогда как

pCD39 представляет собой мономер, и, более того, что трансмембранные домены в мем CD39 совершают динамические движения, которые лежат в основе функциональной взаимосвязи с активным центром (Schulte am Esch и др. 1999 Biochem. 38(8):2248-58). Антитела, которые блокируют только мем CD39, могут распознавать CD39 за пределами активного центра фермента и предотвращать мультимеризацию без блокирования мономерной формы CD39. Блокирование мультимеризации может снизить активность фермента, и сообщали, что мультимеризация CD39 существенно усиливает АТФазную активность. Напротив, антитела, которые также блокируют pCD39, могут мешать субстрату CD39 и ингибировать мономерную форму фермента. Такие антитела также могут предотвращать мультимеризацию мем CD39, таким образом, обеспечивая второй механизм ингибирования ферментативной активности CD39. В присутствии АТФ (например, в окружении опухоли) частичное ингибирование CD39 путем предотвращения мультимеризации без блокирования pCD39 может приводить к достаточному количеству остаточного АМФ для предотвращения любого детектируемого аддитивного влияния на агент, который ингибирует CD73, потому что оставшийся АМФ может приводить к опосредованной CD73 продукции аденозина, достаточной для опосредования подавления иммунитета.

Следовательно, антитела, которые связывают растворимый CD39 (например, мономерный pCD39) и ингибируют его АТФазную активность, можно успешно применять, чтобы добиться большей нейтрализации активности CD39 у индивида путем нейтрализации как связанного с мембраной, так и растворимого белка CD39 (белка внеклеточного домена в растворе), тем самым снижая подавление иммунитета, например, для лечения рака и/или инфекционного заболевания.

Соответственно, в одном аспекте предложено лечение, включающее введение индивиду, страдающему от положительного по CD73 рака, антитела, которое нейтрализует ингибиторную активность pCD39. В одном варианте реализации предложен способ лечения или предотвращения рака или инфекционного заболевания у индивида, страдающего от положительного по CD73 рака, указанный способ включает введение индивиду агента, который специфично связывает мономерный белок CD39 человека (например, растворимый CD39 и/или мономерный мем CD39) и ингибирует его АТФазную активность. В одном варианте реализации положительный по CD73 рак представляет собой рак, для которого, как известно, обычно характерно присутствие растворимого белка CD73 и/или экспрессирующих CD73 клеток в опухоли или окружении опухоли. В одном варианте реализации для положительного по CD73 рака характерна опухоль, в которой определили наличие экспрессирующих CD73 клеток. В одном варианте реализации для положительного по CD73 рака характерна опухолевая ткань, содержащая злокачественные клетки, которые экспрессируют CD73. В одном варианте реализации для положительного по CD73 рака характерна опухолевая ткань или прилегающая к опухоли ткань, для которых характерна инфильтрация экспрессирующих CD73 иммунных клеток (например, незлокачественных иммунных клеток). В одном варианте реализации положительный по CD73 рак представляет собой лейкоз, глиому или глиобластому, или рак мочевого пузыря, молочной железы, толстой кишки, пищевода, почки, печени, легкого, яичника, матки, предстательной железы, поджелудочной железы, желудка, шейки матки, щитовидной железы, головы и шеи (плоскоклеточную карциному головы и шеи) и кожи (например, меланому). В одном варианте реализации лечение дополнительно включает введение индивиду агента, который нейтрализует ингибиторную активность белка CD73. Необязательно, индивида, страдающего от положительного по CD73 рака, дополнительно лечат агентом, который вызывает высвобождение АТФ наружу из опухолевых клеток, а именно агентами или способами лечения, которые вызывают иммуогенную гибель раковых клеток (например, химиотерапевтическим агентом, лучевой терапией). Необязательно, индивида, страдающего от положительного по CD73 рака, дополнительно лечат агентом, который вызывает или повышает экспрессию CD73.

В другом аспекте, в настоящем изобретении предложено применение антитела против CD39 (например, обладающего дополнительными свойствами, описанными в данном изобретении) в лечении страдающего от рака индивида, при этом лечение включает введение индивиду антитела против CD39 в комбинации со средствами ингибирования активности CD73. В одном варианте реализации предложено антитело против CD39 (например, обладающее дополнительными свойствами, описанными в данном изобретении) для применения в лечении страдающего от рака индивида, при этом лечение включает введение индивиду антитела против CD39 в комбинации с фармацевтической композицией, содержащей (а) средство (например, агент или лекарственное средство, белковый агент, агент-антитело, агент-нуклеиновую кислоту или низкомолекулярный агент) для ингибирования активности CD73 и (b) фармацевтически приемлемый носитель.

В другом аспекте, в настоящем изобретении предложено применение антител, которые связывают CD39 и ингибируют ферментативную (АТФазную) активность растворимого (внеклеточного домена) белка CD39 человека, в комбинации с агентом, который ингибирует активность CD73. Антитела, которые связывают растворимый CD39 дополнительно эффективно ингибируют ферментативную (АТФазную) активность связанного с мембраной клетки фермента CD39 (CD39, экспрессированного на поверхности клетки). Нейтрализация как мономерного (например, растворимого и связанного с мембраной CD39), так и мультимерного CD39 (например, связанного с мембраной CD39) в комбинации с агентом, который ингибирует активность CD73, может быть особенно предпочтительна для лечения положитель-

ных по CD73 типов рака. В одном варианте реализации положительный по CD73 рак представляет собой рак, для которого, как известно, обычно характерно присутствие растворимого белка CD73 и/или экспрессирующих CD73 клеток в опухоли или окружении опухоли. В одном варианте реализации для положительного по CD73 рака характерна опухоль, в которой определили наличие экспрессирующих CD73 клеток. В одном варианте реализации для положительного по CD73 рака характерна опухолевая ткань, содержащая злокачественные клетки, которые экспрессируют CD73. В одном варианте реализации для положительного по CD73 рака характерна опухолевая ткань или прилегающая к опухоли ткань, для которых характерна инфильтрация экспрессирующих CD73 иммунных клеток (например, незлокачественных иммунных клеток). В одном варианте реализации положительный по CD73 рак представляет собой лейкоз, глиому или глиобластому, или рак мочевого пузыря, молочной железы, толстой кишки, пищевода, почки, печени, легкого, яичника, матки, предстательной железы, поджелудочной железы, желудка, шейки матки, щитовидной железы, головы и шеи (плоскоклеточную карциному головы и шеи) и кожи (например, меланому).

Нейтрализация как мономерного (например, растворимого и связанного с мембраной CD39), так и мультимерного CD39 (например, связанного с мембраной CD39) может быть особенно предпочтительна для усиления активности ингибирующих CD73 агентов в условиях лечения, в которых такие ингибирующие CD73 агенты субоптимально активны, например, когда необходимо ингибирование CD73 внутри опухолевой ткани (например, в положительных по CD73 опухолях), когда ингибирующий CD73 агент невозможно ввести в дозе или схеме применения, в которой он насыщает CD73 в опухолевых тканях и/или в которой он приводит к EC₅₀, EC₇₀ или EC₁₀₀ для ингибирования CD73 в опухолевых тканях (например, в положительных по CD73 опухолях; при дозировках, которые дают концентрации в опухоли менее (или не более) 1, 5 или 10 мкг/мл в течение достаточного периода времени (например, 1, 2, 3, 4, 6 или 8 недель, или более); когда ингибирующий CD73 агент не полностью ингибирует активность CD73 (например, антитела против CD73, которые не ингибируют растворимый CD73; антитела против CD73, которые для опосредования ингибирования ферментативной активности зависят от индукции понижающей модуляции/внутриклеточной интернализации CD73); или в более общем случае для лечения типов рака, для которых характерны значительные уровни экспрессии CD73 клетками в опухоли или прилегающей к опухоли ткани (например, глиомы или глиобластомы, или рака мочевого пузыря, молочной железы, толстой кишки, пищевода, почки, печени, легкого, яичника, матки, предстательной железы, поджелудочной железы, желудка, шейки матки, щитовидной железы, головы и шеи (плоскоклеточной карциномы головы и шеи) и кожи (например, меланомы).

В одном варианте реализации предложен способ лечения или предотвращения рака или инфекционного заболевания у индивида, указанный способ включает введение индивиду: (а) агента, который связывает растворимый белок CD39 (pCD39) и который ингибирует его АТФазную активность, и (b) агента, который ингибирует активность полипептида CD73 человека.

В одном варианте реализации предложен способ лечения или предотвращения рака или инфекционного заболевания у индивида, указанный способ включает введение индивиду: (а) агента, который связывает мономерный белок CD39 человека (например, растворимый CD39 и/или мономерный мем CD39) и ингибирует его

АТФазную активность, и (b) агента, который ингибирует активность полипептида CD73 человека.

В одном аспекте любого варианта реализации, описанного в данном изобретении, соединение, которое ингибирует или нейтрализует АТФазную активность белка CD39, представляет собой или содержит антитело или фрагмент антитела, которое(ый) связывает белок CD39 (например, моноспецифическое антитело, биспецифическое или мультиспецифическое антитело).

В одном аспекте предложено лечение, включающее введение индивиду комбинации антитела, которое нейтрализует ингибиторную активность pCD39, и агента, который нейтрализует ингибиторную активность CD73.

В одном аспекте предложено лечение, включающее введение антитела, которое нейтрализует ингибиторную активность pCD39, индивиду, который невосприимчив к лечению или у которого неблагоприятный прогноз ответа на лечение агентом, нейтрализующим ингибиторную активность CD73. В одном варианте реализации у индивида есть положительный по CD73 рак.

В одном аспекте предложен способ сенсibilизации индивида к лечению агентом, который нейтрализует ингибиторную активность CD73, указанный способ включает введение индивиду антитела, которое нейтрализует ингибиторную активность pCD39.

В одном аспекте предложена композиция, содержащая антитело, которое ингибирует полипептид pCD39 человека, и агент, в некоторых случаях антитело, который ингибирует полипептид CD73 человека. В одном аспекте композиция предназначена для применения в лечении или предотвращения рака, в некоторых случаях солидной опухоли, в некоторых случаях гематологического злокачественного новообразования, в некоторых случаях гематологического злокачественного новообразования, для которого характерно присутствие злокачественных клеток, которые экспрессируют CD73, в некоторых случаях лейкоза, в некоторых случаях рака, для которого характерно присутствие злокачественных клеток, в некоторых случаях рака, для которого характерно присутствие злокачественных и/или незлокачественных

клеток в опухоли или прилегающей к опухоли ткани, которые экспрессируют полипептиды CD73.

Антитела будут полезны для ингибирования катаболизма АМФ (и предшествующих АТФ и АДФ) с образованием аденозина, например, уменьшения количества доступных предшественников аденозина на каждом этапе, и в конечном счете, уменьшения концентрации аденозина в микроокружении опухоли. Данные антитела, следовательно, будут полезны для обращения иммуносупрессорного действия CD39, и/или CD73, и/или аденозина на Т-клетки, В-клетки и другие клетки, которые экспрессируют рецепторы аденозина, например, для лечения рака. В одном варианте реализации антитела нейтрализуют опосредованное аденозином ингибирование пролиферации, продукции цитокинов, цитотоксичности и/или активности NFκB в Т-клетках. В одном варианте реализации способы согласно настоящему описанию полезны для повышения или усиления противоопухолевого иммунитета, для снижения подавления иммунитета, для активации и/или усиления активности иммунной эффекторной клетки, необязательно инфильтрирующей опухоль CD8+ Т-клетки или NK-клетки, у индивида и/или для уменьшения количества и/или концентрации аденозина в окружении опухоли.

В одном варианте реализации предложен способ активации или усиления активности иммунной эффекторной клетки, необязательно инфильтрирующей опухоль CD8+ Т-клетки или NK-клетки, у индивида и/или способ уменьшения количества и/или концентрации аденозина в окружении опухоли, указанный способ включает введение индивиду: (а) терапевтически активного количества соединения, которое связывает и ингибирует ферментативную активность (АТФазную активность) полипептида pCD39 человека, и (b) терапевтически активного количества соединения, которое ингибирует ферментативную активность полипептида CD73 человека. В одном варианте реализации предложен способ активации, усиления активности и/или повышения пролиферации инфильтрирующей опухоль Т- или NK-клетки у индивида, указанный способ включает введение индивиду: (а) терапевтически активного количества соединения, которое связывает и ингибирует ферментативную активность (АТФазную активность) полипептида pCD39 человека, и (b) терапевтически активного количества соединения, которое ингибирует полипептид CD73 человека.

В одном аспекте любого варианта реализации, описанного в данном изобретении, соединение, которое ингибирует полипептид CD73 человека, представляет собой антитело против CD73, которое ингибирует ферментативную активность CD73. В другом варианте реализации антитело против CD73 ингибирует 5'-эктонуклеотидазную активность CD73, вызывая повышение и/или индукцию внутриклеточной интернализации, или в более общем случае понижающую модуляцию, экспрессированного на поверхности клетки CD73, и/или его способность нейтрализовать CD73 по меньшей мере частично зависит от интернализации. В одном варианте реализации антитело против CD73, которое ингибирует ферментативную активность CD73, представляет собой антитело, которое не способно существенно нейтрализовать или ингибировать ферментативную активность растворимого CD73, необязательно когда антитело предложено в более высоком (например, 10-кратном) избытке антитела над ферментом. В одном варианте реализации антитело против CD73, которое ингибирует ферментативную активность CD73, представляет собой антитело, которое способно нейтрализовать ферментативную активность растворимого CD73, необязательно когда антитело способно нейтрализовать ферментативную активность растворимого CD73 при более высоком (например, 10-кратном) избытке антитела над ферментом. В одном варианте реализации соединения, которое ингибирует полипептид CD73 человека, представляет собой органическую молекулу, необязательно низкомолекулярное органическое соединение, необязательно органическое соединение с молекулярной массой не более 3000, в некоторых случаях не более 2000, в некоторых случаях не более 1000, необязательно органическое соединение с молекулярной массой от 100 до 300, от 100 до 1000, в некоторых случаях по меньшей мере 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 или 2000 г/моль.

В одном варианте реализации предложен способ лечения или предотвращения рака у индивида, указанный способ включает введение индивиду: терапевтически активного количества агента, который способен: (i) связывать растворимый белок CD39 (pCD39) и ингибировать его АТФазную активность и (ii) связывать полипептид CD73 человека и ингибировать его 5'-эктонуклеотидазную активность (например, в клетке, экспрессирующей такой полипептид CD73).

В одном аспекте любого варианта реализации, описанного в данном изобретении, белок pCD39 можно охарактеризовать как лишенный двух трансмембранных доменов (т.е. трансмембранных доменов около N- и C-концов), которые находятся в связанном с мембраной CD39. В одном варианте реализации pCD39 представляет собой не связанный с мембраной белок pCD39, которые обнаруживают в кровотоке, например, у человека. В одном варианте реализации pCD39 включает или состоит из последовательности аминокислот SEQ ID NO: 5 (необязательно дополнительно содержащей С-концевую метку или другую последовательность аминокислот, полученную не из CD39), например, белок pCD39, полученный в Примерах в данном изобретении. В одном варианте реализации белок, антитело или фрагмент антитела ингибирует или нейтрализует АТФазную активность pCD39, когда его инкубируют с pCD39 в растворе, например, в соответствии со способами, описанными в данном изобретении. В одном варианте реализации белок, антитело или фрагмент антитела специфично связывает белок CD39 человека как в растворимой (белок внеклеточного домена), так и в связанной с мембраной форме.

В одном аспекте любого варианта реализации, описанного в данном изобретении, рак представляет

собой солидную опухоль. В одном варианте реализации рак представляет собой гематологическое злокачественное новообразование. В одном аспекте любого варианта реализации, описанного в данном изобретении, для рака характерно присутствие клеток в опухоли или прилегающей к опухоли ткани (например, злокачественных клеток и/или незлокачественных клеток в окружении опухоли), экспрессирующих детектируемое количество белка CD73.

В одном аспекте любого варианта реализации, описанного в данном изобретении, можно уточнить, что индивид представляет собой человека.

В одном варианте реализации антитела против CD39 вводят индивиду, страдающему от рака, в количестве и с частотой, достаточной для нейтрализации активности CD39 (pCD39 и/или мем CD39) на периферии и/или в микроокружении опухоли. В одном варианте реализации антитела вводят в количестве и с частотой, достаточной для снижения образования и/или концентрации АМФ и/или аденозина в микроокружении опухоли. В одном варианте реализации антитела вводят в количестве и с частотой, достаточной для нейтрализации активности CD39, экспрессированного опухолевыми клетками. В одном варианте реализации антитела вводят в количестве и с частотой, достаточной для нейтрализации активности CD39, экспрессированного лейкоцитами или лимфоцитами, например, CD4 Т-клетками, CD8 Т-клетками, клетками TReg и/или В-клетками.

В одном варианте реализации агент, который ингибирует активность CD73, вводят индивиду, страдающему от рака, в количестве и с частотой, достаточной для нейтрализации активности CD73 (растворимого белка CD73 и/или связанного с мембраной CD73) на периферии и/или в микроокружении опухоли. В одном варианте реализации антитела вводят в количестве и с частотой, достаточной для нейтрализации активности CD73, экспрессированного опухолевыми клетками или неопухолевыми клетками, присутствующими в окружении опухоли. В одном варианте реализации антитела вводят в количестве и с частотой, достаточной для нейтрализации активности CD73, экспрессированного CD4 Т-клетками, CD8 Т-клетками и/или В-клетками.

В одном варианте реализации антитело против CD39 и агент, который ингибирует активность CD73, вводят в количестве и с частотой, достаточной для снижения образования и/или концентрации аденозина в микроокружении опухоли. В одном варианте реализации антитела вводят в количестве и с частотой, достаточной для повышения образования и/или концентрации АТФ в микроокружении опухоли.

В одном варианте реализации как антитело против CD39, так и агент, который ингибирует активность CD73, вводят в течение по меньшей мере одного цикла введения, указанный цикл введения включает по меньшей мере первое и второе (и необязательно 3-е, 4-е, 5-е, 6-е, 7-е и/или 8-е и т.д.) введение антитела против CD39 и агента, который ингибирует активность CD73.

В одном варианте реализации рак представляет собой распространенную и/или рефрактерную солидную опухоль. В лишь одном из вариантов реализации рак (например, распространенная рефрактерная солидная опухоль) выбран из группы, состоящей из немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака почки, аденокарциномы поджелудочной железы или пищевода, рака молочной железы, почечно-клеточной карциномы (ПКК), меланомы, колоректального рака и рака яичников (и необязательно из дополнительных типов рака, описанных в данном изобретении).

В некоторых дополнительных аспектах агент против CD39 можно применять для лечения рака у индивида, имеющего рак или опухоль, для которых характерно подавление иммунитета, необязательно отсутствие или недостаточное количество иммунного инфильтрата в опухолях, необязательно отсутствующий или недостаточный противоопухолевый иммунитет.

В некоторых дополнительных аспектах агент против CD39 можно применять для лечения рака у индивида с неблагоприятным прогнозом заболевания, а именно с неблагоприятным прогнозом ответа на лечение агентом, который нейтрализует CD73. Индивид с неблагоприятным прогнозом заболевания, например, имеет повышенный риск прогрессирования на основании одного или более прогностических факторов. В одном варианте реализации прогностический(е) фактор(ы) включает(ют) присутствие или отсутствие мутации в одном или более генах. В одном варианте реализации прогностический(е) фактор(ы) включает(ют) уровень (уровни) экспрессии одного или более генов или белков, например, ингибиторных или активирующих рецепторов на иммунных эффекторных клетках. В одном варианте реализации прогностический(е) фактор(ы) включает(ют) присутствие (например, количества) клеток в кровотоке или в окружении опухоли, экспрессирующих CD73 и/или CD39, и/или уровни экспрессии CD73 и/или CD39 на клетках в кровотоке или в окружении опухоли; в одном варианте реализации клетки представляют собой опухолевые клетки; в одном варианте реализации клетки представляют собой лейкоциты, например, В-клетки, регуляторные Т-клетки (Treg). Присутствие повышенной экспрессии CD73 и/или CD39 и/или повышенных количеств экспрессирующих CD73 и/или CD39 клеток может свидетельствовать о том, что у индивида неблагоприятный прогноз ответа на лечение антителом, которое нейтрализует CD73.

В некоторых дополнительных аспектах агент против CD39 можно применять для лечения рака у индивида, который не ответил на лечение или у которого наблюдали частичный или неполный ответ на лечение агентом, который нейтрализует CD73, или заболевание которого рецидивировало или прогрессировало после лечения антителом, которое нейтрализует CD73.

В одном варианте реализации агент против CD39 конкурирует с антителом, содержащим тяжелую и легкую цепи с последовательностями SEQ ID NO: 52 и 53, соответственно, за связывание с эпитопом или детерминантой на CD39. Указанный агент может представлять собой, например, человеческое или гуманизированное антитело против CD39. В одном варианте реализации антитело против CD39 содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 60, 70, 75, 80, 85 или 90% идентичную последовательности аминокислот тяжелой цепи SEQ ID NO: 52, и легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот, по меньшей мере на 60, 70, 75, 80, 85 или 90% идентичную последовательности аминокислот легкой цепи SEQ ID NO: 53, соответственно.

В некоторых дополнительных аспектах можно выявить пациентов, подходящих для лечения нейтрализующим CD39 агентом и нейтрализующим CD73 агентом (например, любым агентом, описанным в данном изобретении), путем оценки того, плохо ли пациент отвечает на лечение (имеет неблагоприятный прогноз ответа) нейтрализующим CD73 агентом. Плохо отвечающего на лечение пациента можно лечить комбинацией нейтрализующего CD39 агента и нейтрализующего CD73 агента.

В некоторых дополнительных аспектах можно выявить пациентов, подходящих для лечения нейтрализующим CD39 агентом (и необязательно дополнительно нейтрализующим CD73 агентом) путем оценки присутствия в кровотоке и/или в образце опухоли (например, опухолевой ткани и/или прилегающей к опухоли ткани) повышенных уровней экспрессии полипептида CD73 и/или количеств экспрессирующих CD73 клеток.

В некоторых дополнительных аспектах можно выявить пациентов, подходящих для лечения нейтрализующим CD39 агентом и нейтрализующим CD73 агентом, путем оценки присутствия в кровотоке и/или в образце опухоли (например, опухолевой ткани и/или прилегающей к опухоли ткани) повышенных уровней экспрессии полипептида CD39 и/или количеств экспрессирующих CD39 клеток.

В других вариантах реализации предложены фармацевтические композиции и наборы, а также способы их применения. В одном варианте реализации предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение, которое нейтрализует АТФазную активность полипептида CD39 человека, и агент, который нейтрализует 5'-эксонуклеотидазную активность полипептида CD73. В одном варианте реализации предложен набор, содержащий соединение, которое нейтрализует ингибиторную активность полипептида CD39 человека, и агент, который нейтрализует 5'-эксонуклеотидазную активность полипептида CD73.

Данные аспекты более полно изложены в описании настоящего изобретения, предложенном в данном изобретении, и при их рассмотрении будут очевидны дополнительные аспекты, особенности и преимущества.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показан типичный результат скрининга, показывающий антитела I-397, I-398 и I-399 по сравнению с антителом положительного контроля I-394.

На фиг. 2А показано, что антитела BY40, I-394, I-395 и I-396 ингибируют связанный с мембраной клетки CD39, при этом оба I-394 и I-395 проявили большую эффективность при всех концентрациях, а также большее максимальное ингибирование клеточного CD39 по сравнению с BY40. На фиг. 2В показано, что оба антитела I-395 и I-396 ингибируют растворимый CD39 по сравнению с антителами отрицательного контроля (BY40) и положительного контроля (I-394).

На фиг. 3А показано положение остатков, мутированных в мутантах 5 (M5), 15 (M15) и 19 (M19), на поверхности белка CD39. На фиг. 3В показаны результаты связывания с мутантами 5, 15 и 19 для различных антител.

На фиг. 4 показано связывание антитела I-394 с клетками, экспрессирующими CD39 человека, которое оценивали с помощью проточной цитометрии. I-394 связывает клетки, экспрессирующие CD39 человека (CHO-huCD39), клетки, экспрессирующие CD39 яванского макака (CHO-cyCD39), и клетки лимфомы Ramos, но не клетки, экспрессирующие CD39 мыши (CHO-moCD39).

На фиг. 5 показано, что антитело I-394 очень эффективно блокирует ферментативную активность CD39 в клетках опухоли (Ramos), в клетках, экспрессирующих CD39 человека (CHO-huCD39), и в клетках, экспрессирующих CD39 яванского макака (CHO-cyCD39), что оценивали путем определения количества единиц люминесценции, которые пропорциональны количеству присутствующего АТФ.

На фиг. 6 показано, что антитело I-394 очень эффективно блокирует ферментативную активность растворимого рекомбинантного белка CD39 человека, что оценивали путем определения количества единиц люминесценции, которые пропорциональны количеству присутствующего АТФ.

На фиг. 7 показано, что антитело I-394 связывается с CD39 человека, но не с какими-либо человеческими изоформами CD39-L1, -L2, -L3 или -L4, что оценивали в твердофазном иммуноферментном анализе (ELISA).

На фиг. 8 показана процедура эксперимента для оценки влияния опосредованной АТФ активации дендритных клеток (ДК) на активацию CD4 Т-клеток. АТФ-активированные ДК промывали, а затем инкубировали с аллогенными CD4 Т-клетками (соотношение 1 моДК/4 Т-клетки) для реакции смешанной культуры лимфоцитов (РСКЛ) в течение 5 дней. Активацию и пролиферацию Т-клеток анализировали по экспрессии CD25 и разведению CellTrace Violet с помощью проточной цитометрии.

На фиг. 9 показана экспрессия HLA-DR на моДК и на фиг. 10 показана экспрессия CD83 на моДК. На данных фигурах показано, что блокирующее антитело против CD39 I-394 и химические ингибиторы CD39 приводят к активации моДК при каждой из концентраций: 0,125, 0,25 или 0,5 мМ. Тем не менее, антитело против CD39 BY40 или антитела против CD73 были не способны содействовать вызванной АТФ активации дендритных клеток (ДК), позволяя предположить, что антитела не способны блокировать ферментативную активность в достаточной степени, чтобы избежать катаболизма АТФ. Подписи сверху вниз соответствуют столбикам на диаграмме слева направо.

На фиг. 11, на которой показана экспрессия CD25, показано, что моДК, активированные в присутствии АТФ, были способны вызывать активацию и пролиферацию Т-клеток в анализе РСКЛ; усиление опосредованной АТФ активации моДК блокирующим антителом против CD39 I-394 приводило к большей пролиферации и активации Т-клеток. Подписи сверху вниз соответствуют столбикам на диаграмме слева направо.

На фиг. 12А показано влияние диапазона доз антител против CD73 на пролиферацию CD4 Т-клеток в присутствии добавленного АТФ, при 3 различных дозах антител против рCD39: либо 0,01 мкг/мл, либо 0,1 мкг/мл, либо 1 мкг/мл. Антитела против CD39, которые способны нейтрализовать растворимый CD39 человека, проявили сильное усиление действия антител против CD73 в отношении восстановления пролиферации CD4 Т-клеток. На фиг. 12В показано влияние диапазона доз антител против CD73 на пролиферацию CD8 Т-клеток в присутствии добавленного АТФ, антитела против рCD39 проявили сильное усиление действия антител против CD73 в отношении восстановления пролиферации CD8 Т-клеток.

На фиг. 13А, 13В и 13С показано исследование, устанавливающее взаимосвязь экспрессии генов CD39 и CD73 в образцах рака человека с выживаемостью, с учетом стадии заболевания и времени. На фиг. 13А показаны результаты для рака яичников, а именно низкая экспрессия CD39 в образцах рака коррелировала с большей вероятностью выживания при раке яичников; также показана корреляция высокой экспрессии CD73 с меньшей вероятностью выживания при раке яичников. На фиг. 13В показаны результаты для рак пищевода, а именно низкая экспрессия CD39 в образцах рака коррелировала с большей вероятностью выживания при раке пищевода; также показана корреляция высокой экспрессии CD73 с меньшей вероятностью выживания при раке пищевода. На фиг. 13С показаны результаты для аденокарциномы желудка, а именно низкая экспрессия CD39 в образцах рака коррелировала с большей вероятностью выживания при раке желудка; также показана корреляция высокой экспрессии CD73 с меньшей вероятностью выживания при раке желудка.

Подробное описание изобретения

Определения

В настоящем описании формы единственного числа могут означать один или несколько. В пункте(ах) формулы изобретения, при использовании в сочетании с термином "включающий", формы единственного числа могут означать один или более чем один. В данном изобретении "другой" может означать по меньшей мере второй или более.

Если используется термин "включающий", то его необязательно можно заменить на "состоящий по существу из" или на "состоящий из".

CD73 человека, также известный как экто-5'-нуклеотидаза и как 5'-рибонуклеотидфосфогидролаза, ЕС 3.1.3.5, кодируемый геном NT5E, проявляет 5'-нуклеотидазную, а именно АМФ-, НАД- и НМН-нуклеозидазные активности. CD73 катализирует превращение при нейтральном pH пуриновых 5'-моонуклеотидов в нуклеозиды, предпочтительным субстратом является АМФ. Данный фермент состоит из димера из 2 идентичных субъединиц с молекулярной массой 70 кДа, связанных гликозилфосфатидилинозитольной связью с внешней поверхностью плазматической мембраны. Последовательность аминокислот пребелка CD73 человека (мономер), включая сигнальную последовательность (аминокислоты 1-26), представлена в Genbank под номером доступа NP_002517, сведения о которой полностью включены в данное изобретение посредством ссылки и приведены далее:

```

MCPRAARAPA TLLLALGAVL WPAAGAWELT ILHTNDVHSR LEQTSSEDSSK CVNASRCMGG
VARLFTKVQQ IRRAPNVLL LDAGDQYQGT IWFTVYKGAE VAHFMNALRY DAMALGNHEF
DNGVEGLIEP LLKEAKFPIL SANIKAKGPL ASQISGLYLP YKVLPVGDEV VGIVGYTSKE

TPFLSNPGTN LVFEDEITAL QPEVDKLT NLNKKIALGH SGFEMDKLIA QKVRGVDVVV
GGHSNTFLYT GNPPSKEVPA GKYPFIVTSD DGRKVPVQA YAFGKYLGYL KIEFDERGNV
ISSHGNPILL NSSIPEDPSI KADINKWRIK LDNYSTQELG KTIVYLDGSS QSCRFRECNM
GNLICDAMIN NNLRHTDEM FWNHVMCILN GGGIRSPIDE RNNGTITWEN LAAVLFPFGGT
FDLVQLKGST LKKAFFHSVH RYQGSTGEFL QVGGIHVVYD LSRKPGDRVV KLDVLTCTKR
VPSYDPLKMD EVYKVILPNF LANGGDGFQM IKDELLRHDS GDQDINVVST YISKMKVIYP
AVEGRIKFST GSHCHGSFSL IFLSLWAVIF VLYQ

```

(SEQ ID NO: 1).

В контексте данного изобретения "ингибируют", "ингибирование", "нейтрализовать" или "нейтрализующий" в отношении полипептида CD73 (например, "нейтрализовать CD73", "нейтрализовать CD73" или "нейтрализовать ферментативную активность CD73" и т.д.), относится к процессу, в

котором 5'-нуклеотидазная (5'-эктонуклеотидазная) активность CD73 ингибируется. Это включает, в частности, ингибирование опосредованного CD73 образования аденозина, т.е. ингибирование опосредованного CD73 катаболизма АМФ в аденозин. Это можно измерить, например, в бесклеточном анализе, в котором измеряют способность тестируемого соединения ингибировать превращение АМФ в аденозин, либо непосредственно, либо опосредованно. В одном варианте реализации препарат антител вызывает снижение по меньшей мере на 50% превращения АМФ в аденозин, снижение по меньшей мере на 70% превращения АМФ в аденозин или снижение по меньшей мере на 80% превращения АМФ в аденозин, обращаясь, например, к способам анализа, описанным в данном изобретении.

CD39 человека, также известный как НТФДаз1, ENTPD1, АТФДаз и сосудистая АТФ-дифосфогидролаза, проявляет АТФазную активность. CD39 представляет собой связанный с мембраной белок, который гидролизует внеклеточный АТФ и АДФ с образованием АМФ, который далее превращается в аденозин другим ферментом - 5'-нуклеотидазой. Последовательность аминокислот зрелой полипептидной цепи CD39 человека представлена в Genbank под номером доступа P49961, сведения о которой полностью включены в данное изобретение посредством ссылки и приведены далее:

```
MEDTKESNVK TFCSKNILAI LGFSSIIAVI ALLAVGLTQN KALPENVKYG IVLDAGSSHT
SLYIYKWPAE KENDTGCVHQ VEECRVKGPG ISKFVQKVNE IGIYLTDCME RAREVIPRSQ
HQETPVYLGTA TAGMRLLRME SEELADRVLD VVERSLSNYP FDFQGARIIT GQEEGAYGWI
TINYLLGKFS QKTRWFSIVP YETNNQETFG ALDLGGASTQ VTFVPQNQTI ESPDNALQFR
LYGKDYNVYT HSFLCYGKDQ ALWQKLAQDI QVASNEILRD PCFHPPGYKKV VNVSDLYKTP
CTKRFEMTLP FQQFEIQGIG NYQQCHQSIL ELFNTSYCPY SQCAFNGIFL PPLQGDGFAF
SAFYFVMKFL NLTSEKVSQE KVTEMMKKFC AQPWEEIKTS YAGVKEKYLS EYCFSGTYIL
SLLLQGYHFT ADSWEHINFI GKIQGS DAGW TLGYMLNLTN MIPAEQPLST PLSHSTYVFL
MVLFLSLVLT VAIIGLLIFH KPSYFWKDMV
```

(SEQ ID NO: 2).

В контексте данного изобретения "ингибируют", "ингибирование", "нейтрализовать" или "нейтрализующий" в отношении полипептида CD39 (например, "нейтрализовать CD39", "нейтрализовать активность CD39" или "нейтрализовать ферментативную активность CD39" и т.д.), относится к процессу, в котором активность гидролиза АТФ (АТФазная активность) CD39 ингибируется. Это включает, в частности, ингибирование опосредованного CD39 образования АМФ и/или АДФ, т.е. ингибирование опосредованного CD39 катаболизма АТФ с образованием АМФ и/или АДФ. Это можно измерить, например, в клеточном анализе, в котором измеряют способность тестируемого соединения ингибировать превращение АТФ в АМФ и/или АДФ, либо непосредственно, либо опосредованно. Например, исчезновение АТФ и/или образование АМФ можно оценить, как описано в данном изобретении. В одном варианте реализации препарат антител вызывает снижение по меньшей мере на 60% превращения АТФ в АМФ, снижение по меньшей мере на 70% превращения АТФ в АМФ или снижение по меньшей мере на 80 или 90% превращения АТФ в АМФ, например, в способах анализа, описанных в данном изобретении (например, исчезновения АТФ и/или образования АМФ).

"EC₅₀" в отношении агента и конкретной активности (например, связывания с клеткой, ингибирования ферментативной активности, активации или ингибирования иммунной клетки), относится к эффективной концентрации агента, которая вызывает 50% от максимального ответа или эффекта в отношении такой активности. "EC₁₀₀" в отношении агента и конкретной активности относится к эффективной концентрации агента, которая вызывает по существу максимальный ответ в отношении такой активности.

Термин "антитело" в данном изобретении относится к поликлональным и моноклональным антителам. В зависимости от типа константного домена в тяжелых цепях, антитела относят к одному из пяти основных классов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. Некоторые из них дополнительно подразделяют на подклассы или изоотипы, такие как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и тому подобные. Типичная структурная единица иммуноглобулина (антитела) включает тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара содержит одну "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50-70 кДа). N-конец каждой цепи содержит вариабельную область из приблизительно 100-110 или более аминокислот, которая в первую очередь отвечает за распознавание антигена. Термины вариабельная легкая цепь (VL) и вариабельная тяжелая цепь (VH) относятся к данным легкой и тяжелой цепям, соответственно. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называют "альфа", "дельта", "эпсилон", "гамма" и "мю", соответственно. Субъединичные структуры и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. IgG являются примерами классов антител, используемыми в данном изобретении, потому что они представляют собой наиболее распространенные антитела в физиологических условиях и потому что их наиболее просто получить в лабораторных условиях. Необязательно антитело представляет собой моноклональное антитело. Конкретными примерами антител являются гуманизированные, химерные, человеческие или другим образом подходящие человеку антитела. Термин "антитела" также включает любой фрагмент или производное любого из описанных в данном изобретении антител.

Термин "специфично связывается" означает, что антитело может предпочтительно связываться в

анализе конкурентного связывания с партнером по связыванию, например, CD39, CD73, что оценивают, используя либо рекомбинантные формы белков, либо эпитопы из них, либо нативные белки, присутствующие на поверхности выделенных клеток-мишеней. Способы анализа конкурентного связывания и другие способы определения специфического связывания хорошо известны в данной области. Например, связывание можно детектировать с помощью радиоактивных меток, физических способов, таких как масс-спектрометрия, или прямых или непрямых флуоресцентных меток, детектируемых с применением, например, цитофлуориметрического анализа (например, FACScan). Связывание на более высоком уровне, чем наблюдаемый для контрольного неспецифического агента, свидетельствует о том, что агент связывается с мишенью.

Если указано, что антитело "конкурирует с" конкретным моноклональным антителом, то это означает, что антитело конкурирует с моноклональным антителом в анализе связывания с применением либо рекомбинантных молекул (например, CD39, CD73), либо экспрессированных на поверхности молекул (например, CD39, CD73). Например, если тестируемое антитело уменьшает связывание антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи любого из антител 11E1, 6E1, 3C12 или 8C7, с полипептидом CD73 или экспрессирующей CD73 клеткой в анализе связывания, то говорят, что указанное антитело "конкурирует", соответственно, с таким антителом. Например, если тестируемое антитело уменьшает связывание антитела, содержащего тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 6 и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 7, с полипептидом CD39 или экспрессирующей CD39 клеткой в анализе связывания, то говорят, что указанное антитело "конкурирует", соответственно, с таким антителом.

Термин "аффинность" в данном изобретении означает силу связывания антитела с эпитопом. Аффинность антитела задается константой диссоциации K_d , которую определяют как $[AT] \times [AG] / [AT-AG]$, где $[AT-AG]$ представляет собой молярную концентрацию комплекса антитело-антиген, $[AT]$ представляет собой молярную концентрацию несвязанного антитела и $[AG]$ представляет собой молярную концентрацию несвязанного антигена. Константу аффинности K_d определяют как $1/K_d$. Способы определения аффинности МАТ можно найти в Harlow, и др., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк, 1988), Coligan и др., ред., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. и Wiley Interscience, Нью-Йорк, (1992, 1993), и Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601 (1983), указанные материалы полностью включены в данное изобретение посредством ссылки. Одним стандартным способом, хорошо известным в данной области для определения аффинности МАТ, является применение скрининга методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (такого как анализ с применением аналитического устройства для ППР BIAcore™).

В рамках контекста в данном изобретении "детерминанта" обозначает место взаимодействия или связывания на полипептиде.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте и представляет собой область или участок на антигене, с которым связывается антитело. Эпитоп белка может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании, а также аминокислотные остатки, которые эффективно блокируются специфическим связывающим антиген антителом или пептидом, т.е. аминокислотные остатки внутри "области узнавания" антитела. Это наиболее простая форма или наименьшая структурная область на сложной молекуле антигена, которая может соединяться, например, с антителом или рецептором. Эпитопы могут быть линейными или конформационными/структурными. Термин "линейный эпитоп" представляет собой эпитоп, состоящий из аминокислотных остатков, которые являются смежными на линейной последовательности аминокислот (первичной структуре). Термин "конформационный или структурный эпитоп" представляет собой эпитоп, состоящий из аминокислотных остатков, не все из которых являются смежными и, следовательно, представляют собой отдельные части линейной последовательности аминокислот, которые сближены друг с другом посредством укладки молекулы (вторичной, третичной и/или четвертичной структур). Конформационный эпитоп зависит от 3-мерной структуры. Термин "конформационный", следовательно, часто используют взаимозаменяемо с термином "структурный".

Термин "обеднять" или "обеднение", в отношении экспрессирующих CD73 или CD39 клеток, означает процесс, способ или соединение, которые приводят к уничтожению, элиминированию, лизису или индукции такого уничтожения, элиминирования или лизиса, чтобы отрицательно повлиять на количество таких экспрессирующих CD73 или CD39 клеток, присутствующих в образце или в субъекте.

Термин "интернализация", используемый взаимозаменяемо с термином "внутриклеточная интернализация", относится к молекулярным, биохимическим и клеточным событиям, связанным с процессом перемещения молекулы с внеклеточной поверхности клетки на внутриклеточную поверхность клетки. Процессы, отвечающие за внутриклеточную интернализацию молекул, хорошо известны и могут включать, среди прочего, интернализацию внеклеточных молекул (таких как гормоны, антитела и малые органические молекулы); ассоциированных с мембраной молекул (таких как рецепторы на поверхности клеток); и комплексов ассоциированных с мембраной молекул, связанных с внеклеточными молекулами (например, лиганда, связанного с трансмембранным рецептором, или антитела, связанного с ассоциированной с мембраной молекулой). Таким образом, формулировка "вызвать и/или повысить интернализа-

цию" включает события, при которых вызывается внутриклеточная интернализация и/или скорость и/или масштаб внутриклеточной интернализации повышается.

Термин "агент" используют в данном изобретении для обозначения химического соединения, смеси химических соединений, биологической макромолекулы или экстракта, полученного из биологических материалов. Термин "терапевтический агент" относится к агенту, который проявляет биологическую активность.

Для целей, описанных в данном изобретении, "гуманизированное" или "человеческое" антитело относится к антителу, в котором константная и переменная область каркасной области одного или более иммуноглобулинов человека соединена со связывающей областью, например, определяющей комплементарность областью (CDR), иммуноглобулина животного. Такие антитела разработаны, чтобы сохранить специфичности связывания не принадлежащего человеку антитела, из которого получены указанные связывающие области, но избежать реакции иммунной системы против не принадлежащего человеку антитела. Такие антитела можно получить из трансгенных мышей или других животных, которые были "сконструированы", чтобы они продуцировали специфические человеческие антитела в ответ на провокацию антигеном (см., например, Green и др. (1994) *Nature Genet* 7:13; Lonberg и др. (1994) *Nature* 368:856; Taylor и др. (1994) *Int Immun* 6:579, информация из которых полностью включена в данное изобретение посредством ссылки).

Полностью человеческое антитело также можно сконструировать с помощью способов генетической или хромосомной трансфекции, а также технологии фагового дисплея, все из которых известны в данной области (см., например, McCafferty и др. (1990) *Nature* 348:552-553). Человеческие антитела также можно получить с помощью активированных *in vitro* В-клеток (см., например, патенты США номер 5567610 и 5229275, которые полностью включены в данное изобретение посредством ссылки).

"Химерное антитело" представляет собой молекулу антитела, в которой (а) константная область, или ее часть, изменена, заменена или обменена таким образом, что сайт связывания антигена (вариативная область) связан с константной областью из отличного или измененного класса, вида и/или с отличной или измененной эффекторной функцией, или с полностью отличной молекулой, которая придает новые свойства химерному антителу, например, с ферментом, токсином, гормоном, фактором роста, лекарственным средством и т.д.; или (b) переменная область, или ее часть, изменена, заменена или обменена на переменную область, обладающую отличной или измененной антигенной специфичностью.

Термин "гипервариативный участок", используемый в данном изобретении, относится к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание с антигеном. Гипервариативный участок, как правило, содержит аминокислотные остатки из "определяющей комплементарности области" или "CDR" (например, остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в переменном домене легкой цепи и 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-02 (H3) в переменном домене тяжелой цепи; Kabat и др. 1991) и/или остатки из "гипервариативной петли" (например, остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в переменном домене легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в переменном домене тяжелой цепи; Chothia и Lesk, *J. Mol. Biol.* 1987;196:901-917), или см. аналогичную систему определения необходимых аминокислот, отвечающих за связывание антигена. Обычно, нумерацию аминокислотных остатков в данном участке осуществляют с помощью способа, описанного в Kabat и др., выше. Такие формулировки, как "положение по Кабату", "нумерация остатков переменного домена по Кабату" и "согласно Кабату", используемые в данном тексте, относятся к данной системе нумерации для переменных доменов тяжелой цепи или переменных доменов легкой цепи. При использовании системы нумерации по Кабату фактическая линейная последовательность аминокислот пептида может содержать меньшее количество аминокислот, что соответствует укорачиванию, или дополнительные аминокислоты, что соответствует вставке в FR или CDR переменного домена. Например, переменный домен тяжелой цепи может содержать вставку одной аминокислоты (остаток 52a согласно Кабату) после остатка 52 в CDR H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т.д. согласно Кабату) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерацию остатков по Кабату можно определить для данного антитела путем выравнивания в участках гомологии последовательности антитела со "стандартной" пронумерованной по Кабату последовательностью.

Термин остатки "каркаса" или "FR" в данном изобретении означает участок переменного домена антитела за исключением участков, определенных как CDR. Каждый каркас переменного домена антитела можно дополнительно подразделить на непрерывные участки, разделенные участками CDR (FR1, FR2, FR3 и FR4).

Термины "домен Fc", "часть Fc" и "область Fc" относятся к С-концевому фрагменту тяжелой цепи антитела, например, от приблизительно аминокислоты (АК) 230 до приблизительно АК 450 тяжелой цепи γ (гамма) человека или аналогичной ей последовательности в другом типе тяжелых цепей антитела (например, α , δ , ϵ и μ для антитела человека), или встречающегося в природе ее аллотида. Если не указано иное, в настоящем описании используют общепринятую нумерацию аминокислот по Кабату для иммуноглобулинов (см. Kabat и др. (1991), *Sequences of Protein of Immunological Interest*, 5-е изд., Министерство здравоохранения Соединенных Штатов Америки, Национальный институт здоровья, Бетесда,

Мэриленд).

Термины "выделенный", "очищенный" или "биологически чистый" относятся к материалу, который практически или по существу не содержит компонентов, которые при нормальных условиях сопутствуют ему при нахождении в природном состоянии. Чистоту и гомогенность обычно определяют, применяя методики аналитической химии, такие как электрофорез в полиакриламидном геле или высокоэффективная жидкостная хроматография. Белок, который является преобладающим видом из присутствующих в препарате, является по существу очищенным.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используют взаимозаменяемо в данном изобретении по отношению к полимеру из аминокислотных остатков. Указанные термины распространяются на полимеры аминокислот, в которых один или более аминокислотных остатков представляет собой искусственный химический миметик соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также на встречающиеся в природе полимеры аминокислот и не встречающиеся в природе полимеры аминокислот.

Термин "рекомбинантный", используемый, например, по отношению к клетке, или нуклеиновой кислоте, белку или вектору, указывает на то, что клетка, нуклеиновая кислота, белок или вектор были модифицированы путем внедрения гетерологичной нуклеиновой кислоты или белка или изменения нативной нуклеиновой кислоты или белка, или что клетка произошла из клетки, модифицированной таким образом. Следовательно, например, рекомбинантные клетки экспрессируют гены, которые не обнаруживаются внутри нативной (нерекомбинантной) формы клетки, или экспрессируют нативные гены, которые иным образом аномально экспрессируются, экспрессируются на пониженном уровне или не экспрессируются вообще.

В рамках контекста в данном изобретении, термин антитело, которое "связывает" полипептид или эпитоп, обозначает антитело, которое связывает указанную детерминанту со специфичностью и/или аффинностью.

Термин "идентичность" или "идентичный", используемый по отношению к родству между последовательностями двух или более полипептидов, относится к степени родства между последовательностями полипептидов, которую определяют по количеству совпадений между цепочками из двух или более аминокислотных остатков. "Идентичность" является мерой процента точных совпадений меньшей из двух или более последовательностей с выровненными с использованием гэпов (при необходимости) последовательностями, что вычисляют с помощью конкретной математической модели или компьютерной программы (т.е. "алгоритмов"). Идентичность родственных полипептидов можно легко рассчитать с помощью известных способов. Такие способы включают, но не ограничены способами, описанными в Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ред., Oxford University Press, Нью-Йорк, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ред., Academic Press, Нью-Йорк, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, часть 1, Griffin, A. M., и Griffin, H. G., ред., Humana Press, Нью-Джерси, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. и Devereux, J., ред., M. Stockton Press, Нью-Йорк, 1991; и Carillo и др., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988).

Способы определения идентичности разработаны, чтобы определить наибольшее совпадение между исследуемыми последовательностями. Способы определения идентичности описаны в общедоступных компьютерных программах. Способы определения идентичности между двумя последовательностями с помощью компьютерных программ включают пакет программ GCG, включая GAP (Devereux и др., Nucl. Acid. Res. 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, Университет Висконсина, Мэдисон, Висконсин), BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul и др., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)). Программа BLASTX общедоступна на National Center for Biotechnology Information (NCBI) и в других источниках (BLAST Manual, Altschul и др. NCB/NLM/NIH Бетесда, Мэриленд. 20894; Altschul и др., выше). Хорошо известный алгоритм Смита-Уотермана также можно использовать для определения идентичности.

Агенты, которые ингибируют белок pCD39.

Агент, который связывает и ингибирует CD39, для применения в соответствии с данным изобретением может представлять собой связывающий антиген домен или белок, содержащий его, необязательно антитело или фрагмент антитела, которое(ый) связывается с растворимым белком CD39 (pCD39) и ингибирует или нейтрализует его АТФазную активность. В одном варианте реализации в белке pCD39 отсутствуют два трансмембранных домена (т.е. трансмембранные домены около N- и C-концов), которые находятся в связанном с мембраной CD39 состоянии. В одном варианте реализации pCD39 представляет собой не связанный с мембраной белок pCD39, обнаруживаемый в кровотоке, например, у человека. В одном варианте реализации pCD39 включает или состоит из последовательности аминокислот SEQ ID NO: 5 (необязательно дополнительно содержащей C-концевую метку или другую последовательность аминокислот, полученную не из CD39). В одном варианте реализации белок, антитело или фрагмент антитела ингибирует АТФазную активность pCD39, когда его инкубируют с pCD39 в растворе, например, в соответствии со способами, описанными в данном изобретении. В одном варианте реализации белок, антитело или фрагмент антитела специфично связывает белок CD39 человека, как в растворимой (белок внеклеточного домена), так и в связанной с мембраной форме.

Антитела, которые нейтрализуют активность pCD39 (и мем CD39), дополнительно к применению в

качестве бивалентных связывающих веществ, также могут быть эффективны в качестве моновалентных связывающих веществ, независимо от того, нацелены ли они на мем CD39 дополнительно к pCD39. Следовательно, в одном варианте реализации агент, который ингибирует CD39, может представлять собой связывающий антиген белок, который связывается моновалентно с белком CD39 человека (pCD39 и необязательно дополнительно мем CD39) и нейтрализует его ферментативную (АТФазную) активность. Необязательно можно уточнить, что связывающий антиген белок связывает один белок CD39 и/или не-сет один связывающий антиген домен, способный связываться с белком CD39. В одном варианте реализации предложен фрагмент антитела, необязательно фрагмент F(ab), одноцепочечное антитело, scFv, мультиспецифическое антитело, которое моновалентно связывается с белком CD39 человека (pCD39 и/или мем CD39) и нейтрализует его ферментативную (АТФазную) активность. В одном варианте реализации нейтрализующий CD39 связывающий антиген белок, который моновалентно связывается с белком CD39 человека, представляет собой мультиспецифический связывающий антиген белок, например, мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, триспецифическое антитело и т.д. В одном варианте реализации нейтрализующий CD39 связывающий антиген белок, который моновалентно связывается с белком CD39 человека, дополнительно связывается с белком CD73 человека и ингибирует его ферментативную активность. В одном варианте реализации предложено применение нейтрализующего CD39 связывающего антиген белка, который моновалентно связывается с белком CD39 человека, содержащего первый (или один) связывающий антиген домен, который связывает CD39 (pCD39 и/или мем CD39), и второй (и необязательно дополнительные) связывающий(е) антиген домен(ы), который (которые) связывает(ют) белок CD73 и ингибирует(ют) его.

В одном варианте реализации антитело против CD39 не повышает или не вызывает внутриклеточную интернализацию, или в более общем случае понижающую модуляцию, экспрессированного на поверхности клетки CD39 и/или не зависит от нее для проявления своей ингибирующей CD39 активности.

В одном аспекте антитело против CD39 способно: (а) ингибировать ферментативную активность связанного с мембраной белка CD39 (например, содержащего последовательность аминокислот SEQ ID NO: 2), экспрессированного на поверхности клетки, и (b) ингибировать ферментативную активность растворимого белка CD39 (например, имеющего последовательность аминокислот SEQ ID NO: 5).

В одном варианте реализации антитело против CD39 по существу не связывается (например, посредством своего домена Fc) с Fcγ-рецепторами человека (например, CD16, CD32a, CD32b, CD64) и/или C1q, и/или по существу не направляет АЗКЦ и/или КЗЦ на экспрессирующую CD39 клетку. Необязательно антитело сохраняет домен Fc (например, изотипа IgG человека) и сохраняет связывание с FcRn человека.

В одном варианте реализации нейтрализующие CD39 антитела можно охарактеризовать как способные вызывать снижение АТФазной активности полипептида pCD39 и/или мономерного полипептида CD39, необязательно вызывая снижение образования АМФ растворимым мономерным белком CD39 человека, например, белком CD39, состоящим из последовательности аминокислот SEQ ID NO: 5, на по меньшей мере 50, 60, 70, 80 или 90%.

В одном варианте реализации нейтрализующие CD39 антитела можно охарактеризовать как способные вызывать снижение АТФазной активности CD39 в клетках, необязательно вызывая снижение продукции АМФ экспрессирующей CD39 клеткой, на по меньшей мере 50, 60, 70, 80 или 90%. В одном варианте реализации для нейтрализующих CD39 антител может быть характерна EC₅₀ для ингибирования АТФазной активности (например, EC₅₀ для ингибирования продукции АМФ экспрессирующей CD39 клеткой) CD39, экспрессированного клеткой, составляющая не более 1 мкг/мл, в некоторых случаях не более 0,5 мкг/мл, в некоторых случаях не более 0,2 мкг/мл.

Связывающее антиген соединение можно получить, как описано далее в данном изобретении, и на любой желательной стадии оценить его способность ингибировать ферментативную активность CD39, а именно блокировать АТФазную активность pCD39 и снизить продукцию АДФ и АМФ (и, вместе с CD73, аденозина) растворимым белком CD39 и необязательно дополнительно экспрессирующей CD39 клеткой, и, в свою очередь, восстановить активность и/или освободить от опосредованного аденозином ингибирования активации и/или пролиферации лимфоцитов.

Ингибиторную активность (например, иммуностимулирующий потенциал) антитела можно оценить, например, в анализе детектирования исчезновения (гидролиза) АТФ и/или образования АМФ.

Способность антитела ингибировать растворимый рекомбинантный белок CD39 человека можно исследовать путем обнаружения АТФ после инкубации тестируемого антитела с растворимым белком CD39 (например, белком CD39, имеющим последовательность аминокислот SEQ ID NO: 5, полученным в примере 1, необязательно дополнительно содержащим метку для очистки или другую функциональную или нефункциональную последовательность аминокислот не из CD39). См., например, пример 1. Вкратце, можно определить количество АТФ, применяя Cell Titer Glo™ (Promega), в анализе, в котором диапазоны доз тестируемого антитела инкубируют с растворимым рекомбинантным белком CD39 человека, описанным в примере 1, в течение 1 ч при 37°C. 20 мкМ АТФ добавляют в планшеты на 30 дополнительных минут при 37°C перед добавлением реагента CTG. Проводят количественный анализ излученного

света, применяя люминометр Enspire™, после короткого периода инкубации в течение 5 мин в темноте.

Способность антитела ингибировать клетки, экспрессирующие белок CD39, можно исследовать путем детектирования АТФ после инкубации тестируемого антитела с клетками (например, клетками Ramos, клетками, трансфицированными CD39, и т.д.). См., например, пример 1. Клетки можно инкубировать в течение 1 ч при 37°C с тестируемым антителом. Клетки затем инкубируют с 20 мкМ АТФ в течение 1 дополнительного ч при 37°C. Планшеты центрифугируют в течение 2 мин при 400 g и клеточный супернатант переносят в микропланшет для измерения люминесценции (с белыми лунками). В супернатант добавляют СТГ и проводят количественный анализ излученного света после инкубации в течение 5 мин в темноте, применяя люминометр Enspire™. Эффективность антитела против CD39 определяют путем сравнения излученного света в присутствии антитела с АТФ отдельно (максимальное излучение света) и АТФ вместе с клетками (минимальное излучение света).

Снижение гидролиза АТФ с образованием АМФ, и/или повышение количества АТФ, и/или снижение образования АМФ в присутствии антитела указывало на то, что антитело ингибирует CD39. В одном варианте реализации препарат антител способен вызывать по меньшей мере 60%-ное снижение ферментативной активности полипептида CD39, экспрессируемого клеткой, предпочтительно антитело вызывает по меньшей мере 70, 80 или 90%-ное снижение ферментативной активности полипептида CD39 в клетке, которое оценивали путем детектирования АТФ, применяя Cell Titer Glo™ (Promega), после инкубации клеток, экспрессирующих полипептид CD39 (например, клеток Ramos), с тестируемым антителом, например, как описано в Примерах в данном изобретении. В одном варианте реализации для антитела характерна EC_{50} для осуществления снижения ферментативной активности полипептида CD39, экспрессируемого клеткой (например, что оценивали путем детектирования АТФ), не более EC_{50} , наблюдаемой для антитела против CD39, описанного в данном изобретении, например, I-394, I-395, I-396 или I-399, необязательно EC_{50} не более чем на 2 log или 1 log больше, чем таковая для антитела против CD39, описанного в данном изобретении, например, I-394, I-395, I-396 или I-399.

В одном варианте реализации препарат антител способен вызывать по меньшей мере 60%-ное снижение ферментативной активности растворимого рекомбинантного полипептида CD39, предпочтительно по меньшей мере 70, 80 или 90%-ное снижение ферментативной активности растворимого рекомбинантного полипептида CD39, которое оценивали путем детектирования АТФ, применяя Cell Titer Glo™ (Promega), после инкубации растворимого рекомбинантного полипептида CD39 с тестируемым антителом, например, как описано в примере 1.

Активность антитела также можно измерить в непрямом анализе в отношении его способности модулировать активность иммунных клеток (например, экспрессирующих рецептор аденозина иммунных клеток; экспрессирующих рецептор A2A клеток), например, чтобы освободить от опосредованного аденозином ингибирования активности лимфоцитов или чтобы вызвать стимуляцию активности лимфоцитов. Это можно осуществить, например, применяя анализ высвобождения цитокинов. В другом примере антитело можно оценить в непрямом анализе в отношении его способности модулировать пролиферацию лимфоцитов.

В одном примере предложен способ получения или идентификации антитела или связывающего антиген домена против CD39, которое(ый) можно применять в способах согласно настоящему описанию (например, для применения в лечении CD73-положительных типов рака; для применения в комбинации с агентом, который ингибирует ферментативную активность CD73), указанный способ включает следующие этапы:

- (a) предоставление множества антител, которые связывают полипептид CD39 человека,
- (b) приведение каждого антитела в контакт с растворимым белком внеклеточного домена CD39 и оценку нейтрализации его АТФазной активности, и
- (c) выбор антитела из этапа (b), которое приводит к нейтрализации АТФазной активности на по меньшей мере 70%, необязательно на 80% или необязательно на 90%.

Необязательно способ дополнительно включает следующие этапы:

- (d) оценку способности антитела, выбранного на этапе (c), усиливать активность агента, который ингибирует ферментативную активность белка CD73; и
- (e) выбор антитела из этапа (d), которое усиливает активность агента, который ингибирует ферментативную активность белка CD73.

Необязательно этап (d) включает приведение антитела, выбранного на этапе (c), и агента, который ингибирует ферментативную активность белка CD73, в контакт с клетками, необязательно Т-клетками человека, необязательно CD4 Т-клетками, необязательно CD8 Т-клетками, и оценку активации и/или пролиферации клеток. Необязательно анализ проводят в присутствии АТФ (например, экзогенно добавленного АТФ).

Необязательно в любом варианте реализации в данном изобретении нейтрализующее антитело против CD39 связывает антигенную детерминанту, присутствующую как на pCD39, так и на CD39, экспрессируемом на поверхности клетки (мем CD39).

Необязательно в любом варианте реализации в данном изобретении нейтрализующее антитело про-

тив CD39 конкурирует за связывание с эпитопом на CD39, с которым связывается антитело I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 или I-399 (например, которое конкурирует за связывание с эпитопом на полипептиде CD39 с антителом, содержащим участки CDR или переменные области тяжелой и легкой цепей любого из I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 или I-399).

Необязательно в любом варианте реализации в данном изобретении нейтрализующее антитело против CD39 связывает тот же эпитоп и/или конкурирует за связывание с полипептидом CD39 с моноклональным антителом I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 или I-399, например, которое конкурирует за связывание с полипептидом CD39 с антителом, содержащим участки CDR или переменные области тяжелой и легкой цепей из I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 или I-399. В одном варианте реализации нейтрализующее антитело против CD39 связывает тот же эпитоп и/или конкурирует за связывание с полипептидом CD39 с антителом, содержащим, соответственно, область V_H и V_L с последовательностями SEQ ID NO: 6 и 7.

Необязательно в любом варианте реализации в данном изобретении антитело против CD39 связывает эпитоп, содержащий один, два или три аминокислотных остатка, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков на CD39, с которыми связывается I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 или I-399.

Необязательно в любом варианте реализации в данном изобретении связывающая молекула (например, антитело против CD39) содержит переменный домен тяжелой цепи (V_H), содержащий CDR1, 2 и 3 тяжелой цепи, описанные в данном изобретении, и переменный домен легкой цепи (V_L), содержащий CDR1, 2 и 3 легкой цепи, описанные в данном изобретении, или последовательность аминокислот, в которой CDR (или набор участков CDR тяжелой и/или легкой цепи) идентичен по меньшей мере на 60, 70, 80, 85, 90 или 95% аминокислот указанному CDR (или указанному набору участков CDR тяжелой и/или легкой цепи). В одном аспекте любого из вариантов реализации в данном изобретении антитело может содержать тяжелую цепь, содержащую три CDR переменной области тяжелой цепи (V_H) антитела I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 или I-399, и легкую цепь, содержащую три CDR переменной области легкой цепи (V_L) антитела I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 или I-399.

Необязательно в любом варианте реализации в данном изобретении антитело против CD39 можно охарактеризовать как содержащее тяжелую цепь, содержащую последовательность аминокислот, идентичную по меньшей мере на 60, 70, 80, 85, 90 или 95% аминокислотам тяжелой цепи, описанной в данном изобретении (например, тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 52), и легкую цепь, содержащую последовательность аминокислот, идентичную по меньшей мере на 60, 70, 80, 85, 90 или 95% аминокислотам легкой цепи, описанной в данном изобретении (например, легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 53).

Необязательно в любом варианте реализации в данном изобретении антитело против CD39 можно охарактеризовать как функционально консервативный вариант любого антитела, описанного в данном изобретении. "Функционально консервативные варианты" представляют собой варианты, в которых данный аминокислотный остаток в белке или ферменте был изменен без изменения общей конформации и функции полипептида, включая, но не ограничиваясь заменой аминокислоты на аминокислоту, обладающую сходными свойствами (такими как, например, полярность, потенциал водородного связывания, кислотные, основные, гидрофобные, ароматические свойства, и тому подобные). Аминокислоты, отличные от аминокислот, указанных как консервативные, могут отличаться в белке так, что процент подобия последовательности белка или аминокислот между любыми двумя белками с аналогичной функцией может изменяться и может составлять, например, от 70 до 99%, что определяют в соответствии со схемой выравнивания, например, с помощью Кластерного метода, в котором подобие определяют на основании алгоритма MEGALIGN. "Функционально консервативный вариант" также включает полипептид, идентичность аминокислот которого составляет по меньшей мере 60%, что определяют с помощью алгоритмов BLAST или FASTA, предпочтительно по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, еще более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 95%, и который обладает такими же или по существу аналогичными свойствами или функциями, как и нативный или исходный белок, с которым его сравнивают.

Необязательно в любом варианте реализации в данном изобретении антитело против CD39 содержит домен Fc человека, который модифицирован (по сравнению с доменом Fc дикого типа того же изотипа), чтобы уменьшить связывание между доменом Fc и полипептидами CD16A, CD16B, CD32A, CD32B и/или CD64 человека, необязательно при этом антитело содержит: (i) тяжелую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 переменной области тяжелой цепи, с последовательностью SEQ ID NO: 6 и (ii) легкую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 переменной области легкой цепи, с последовательностью SEQ ID NO: 7. В одном аспекте домен Fc модифицирован (по сравнению с доменом Fc дикого типа того же изотипа), чтобы уменьшить связывание между доменом Fc и полипептидом C1q человека. В одном варианте реализации антитело содержит замену аминокислоты в константной области тяжелой цепи в любом одном, двух, трех, четырех, пяти или более остатках, выбранных из группы, состоящей из: 220, 226, 229, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 243, 264, 268, 297, 298, 299, 309, 310, 318, 320, 322, 327, 330 и 331 (нумерация по Кабату EU). В одном варианте реализации антитело содержит замену аминокислоты в константной области тяжелой цепи в любых трех, четырех, пяти или более остатках, выбранных из группы, состоящей из: 234, 235, 237, 322, 330 и 331. В одном варианте реализации антитело содержит домен Fc, содержащий

любую их последовательностей аминокислот: SEQ ID NO: 59-62.

В одном варианте реализации антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, представленную ниже, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90, 95 или 99% идентичную ей, но сохранившую аминокислотные остатки в положениях по Кабату 234, 235 и 331 (подчеркнуты):

```
A S T K G P S V F F L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S
C D K T H T C P P C P A P E A E G G P S V F L F P P K P K D T L M I
S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A
K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
K V S N K A L P A S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R
E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F
S C S V M H E A L H N N H Y T Q K S L S L S P G K (SEQ ID NO: 59).
```

В одном варианте реализации антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, представленную ниже, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90, 95 или 99% идентичную ей, но сохранившую аминокислотные остатки в положениях по Кабату 234, 235 и 331 (подчеркнуты):

```
A S T K G P S V F F L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S
C D K T H T C P P C P A P E F E G G P S V F L F P P K P K D T L M I
S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A
K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
K V S N K A L P A S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R
E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F
S C S V M H E A L H N N H Y T Q K S L S L S P G K (SEQ ID NO: 60).
```

В одном варианте реализации антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, представленную ниже, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 90, 95 или 99% идентичную ей, но сохранившую аминокислотные остатки в положениях по Кабату 234, 235, 237, 330 и 331 (подчеркнуты):

```
A S T K G P S V F F L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S
C D K T H T C P P C P A P E A E G A P S V F L F P P K P K D T L M I
S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A
K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
K V S N K A L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R
E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F
S C S V M H E A L H N N H Y T Q K S L S L S P G K (SEQ ID NO: 61).
```

В одном варианте реализации антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, представленную ниже, или последовательность, по меньшей мере на 90, 95 или 99% идентичную ей, но сохранившую аминокислотные остатки в положениях по Кабату 234, 235, 237 и 331 (подчеркнуты):

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P
 E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
 V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S
 C D K T H T C P P C P A P E A E G A P S V F L F P P K P K D T L M I
 S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A
 K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
 K V S N K A L P A S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R
 E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N
 N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F
 S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (SEQ ID NO: 62).

В одном аспекте антитело против CD39 связывает тот же эпитоп, что и антитело I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 или I-399. В одном варианте реализации антитела связываются с эпитопом CD39, который по меньшей мере частично перекрывается или содержит по меньшей мере один остаток из эпитопа, который связывает антитело I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 или I-399. Остатки, которые связывает антитело, можно определить как остатки, присутствующие на поверхности полипептида CD39, например, в полипептиде CD39, экспрессированном на поверхности клетки.

Связывание антитела против CD39 с клетками, трансфицированными мутантами CD39, можно измерить и сравнить со способностью антитела против CD39 связывать полипептид CD39 дикого типа (например, SEQ ID NO: 2). Снижение связывания между антителом против CD39 и мутантным полипептидом CD39 (например, мутантом из табл. 1) означает, что наблюдается снижение аффинности связывания (например, что измеряют с помощью известных способов, таких как тестирование методом FACS клеток, экспрессирующих конкретного мутанта, или с помощью тестирования методом Biacore связывания с мутантными полипептидами) и/или снижение общей способности антитела против CD39 к связыванию (например, о чем свидетельствует снижение Bmax на графике концентрации антитела против CD39 и концентрации полипептида). Значимое снижение связывания свидетельствует о том, что мутированный остаток непосредственно вовлечен в связывание с антителом против CD39 или находится в непосредственной близости от связывающего белка, когда антитело против CD39 связано с CD39.

В некоторых вариантах реализации значимое снижение связывания означает, что аффинность и/или способность связывания между антителом против CD39 и мутантным полипептидом CD39 снижена более чем на 40%, более чем на 50%, более чем на 55%, более чем на 60%, более чем на 65%, более чем на 70%, более чем на 75%, более чем на 80%, более чем на 85%, более чем на 90% или более чем на 95% по сравнению со связыванием между антителом и полипептидом CD39 дикого типа. В некоторых вариантах реализации связывание снижается ниже детектируемых пределов. В некоторых вариантах реализации значимое снижение связывания подтверждается тем, что связывание антитела против CD39 с мутантным полипептидом CD39 составляет менее 50% (например, менее чем 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 или 10%) от связывания, наблюдаемого между антителом против CD39 и полипептидом CD39 дикого типа.

В некоторых вариантах реализации антитела против CD39 проявляют значительно более низкое связывание с мутантным полипептидом CD39, в котором остаток во фрагменте, содержащем аминокислотный остаток, с которым связывается антитело I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 или I-399, заменен на отличную аминокислоту.

В некоторых вариантах реализации предложены антитела против CD39 (например, отличные от I-394), связывающие эпитоп на CD39, который связывает антитело I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 или I-399.

В одном аспекте антитело связывает эпитоп на CD39, содержащий аминокислотный остаток (например, один, два или три из указанных остатков), выбранный из группы, состоящей из R138, M139 и E142 (в последовательности SEQ ID NO: 2).

В одном аспекте антитело против CD39 проявляет пониженное связывание (например, по существу полную утрату связывания) с полипептидом CD39, содержащим мутацию в одном, двух или трех из остатков, выбранных из группы, состоящей из: R138, M139 и E142 (в последовательности SEQ ID NO: 2), по сравнению с полипептидом CD39 дикого типа (полипептидом CD39 с последовательностью SEQ ID NO: 2); необязательно мутантный полипептид CD39 содержит следующие мутации:

R138A, M139A и E142K. В одном необязательном аспекте антитело не утрачивает связывания ни с каким из мутантных полипептидов CD39 из табл. 1, кроме мутанта 19. В другом необязательном аспекте антитело против CD39 проявляет пониженное связывание (как вариант, снижение, но не по существу полную утрату связывания; или, как вариант, по существу полную утрату связывания) с полипептидом CD39, содержащим мутацию в одном, двух, трех или четырех остатках, выбранных из группы, состоящей из: Q96, N99, E143 и R147 (в последовательности SEQ ID NO: 2), по сравнению с полипептидом CD39 дикого типа (полипептидом CD39 с последовательностью SEQ ID NO: 2); необязательно мутантный полипептид CD39 содержит следующие мутации: Q96A, N99A, E143A и R147E.

В одном аспекте антитело связывает эпитоп на CD39, содержащий аминокислотный остаток (на-

пример, один, два, три или четыре остатка), выбранный из группы, состоящей из Q96, N99, E143 и R147 (в последовательности SEQ ID NO: 2). В одном аспекте антитело проявляет пониженное связывание (например, по существу полную утрату связывания) с мутантным полипептидом CD39, содержащим мутацию в 1, 2, 3 или 4 остатках, выбранных из группы, состоящей из Q96, N99, E143 и R147 (в последовательности SEQ ID NO: 2), в каждом случае по сравнению со связыванием между антителом и полипептидом CD39 дикого типа, содержащим последовательность аминокислот SEQ ID NO: 2.

В одном аспекте антитело связывает эпитоп на CD39, содержащий (а) аминокислотный остаток (например, один, два или три остатка), выбранный из группы, состоящей из R138, M139 и E142 (в последовательности SEQ ID NO: 2), и (b) аминокислотный остаток (например, один, два, три или четыре остатка), выбранный из группы, состоящей из Q96, N99, E143 и R147.

В одном аспекте антитело против CD39 проявляет пониженное (например, по существу полную утрату) связывание как с (а) полипептидом CD39, содержащим мутацию в одном, двух, трех или четырех остатках, выбранных из группы, состоящей из: Q96, N99, E143 и R147 (в последовательности SEQ ID NO: 2), так и (b) с полипептидом CD39, содержащим мутацию в одном, двух или трех остатках, выбранных из группы, состоящей из: R138, M139 и E142 (в последовательности SEQ ID NO: 2), в каждом случае по сравнению с полипептидом CD39 дикого типа (полипептидом CD39 с последовательностью SEQ ID NO: 2). Необязательно мутантный полипептид CD39 из (а) содержит следующие мутации: Q96A, N99A, E143A и R147E. Необязательно мутантный полипептид CD39 из (b) содержит следующие мутации: R138A, M139A и E142K. Необязательно антитело не утрачивает связывания ни с каким из мутантных полипептидов CD39 из табл. 1, кроме мутантов 5 и 19.

В одном аспекте антитело связывает эпитоп на CD39, содержащий аминокислотный остаток (например, один, два, три или четыре остатка), выбранный из группы, состоящей из K87, E100 и D107 (в последовательности SEQ ID NO: 2).

В одном аспекте антитело против CD39 проявляет пониженное связывание (например, по существу полную утрату связывания) с полипептидом CD39, содержащим мутацию в одном, двух, трех или четырех остатках, выбранных из группы, состоящей из: K87, E100 и D107 (в последовательности SEQ ID NO: 2), по сравнению с полипептидом CD39 дикого типа (полипептидом CD39 с последовательностью SEQ ID NO: 2); необязательно мутантный полипептид CD39 содержит следующие мутации: K87A, E100A и D107A. Необязательно антитело не утрачивает связывания ни с каким из мутантных полипептидов CD39 из табл. 1, кроме мутанта 15.

В одном аспекте антитело связывает эпитоп на CD39, содержащий аминокислотный остаток (например, один, два, три или четыре остатка), выбранный из группы, состоящей из N371, L372, E375, K376 и V377 (в последовательности SEQ ID NO: 2).

В одном аспекте антитело против CD39 проявляет пониженное (например, по существу полную утрату) связывание с полипептидом CD39, содержащим мутацию в одном, двух, трех, четырех или пяти остатках, выбранных из группы, состоящей из: N371, L372, E375, K376 и V377 (в последовательности SEQ ID NO: 2), по сравнению с полипептидом CD39 дикого типа (полипептидом CD39 с последовательностью SEQ ID NO: 2); необязательно мутантный полипептид CD39 содержит следующие мутации: N371K, L372K, E375A, K376G и V377S и вставку валина между остатками 376 и 377. Необязательно антитело не утрачивает связывания ни с каким из мутантных полипептидов CD39 из табл. 1, кроме мутанта 11.

Антитело против CD39 может, например, содержать: HCDR1, содержащий последовательность аминокислот: DYNMH (SEQ ID NO: 8) или последовательность из по меньшей мере 4 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; HCDR2, содержащий последовательность аминокислот: YIVPLNGGSTFNQKFKG (SEQ ID NO: 9) или последовательность из по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; HCDR3, содержащий последовательность аминокислот: GGTRFAY (SEQ ID NO: 10) или последовательность из по меньшей мере 4, 5 или 6 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; LCDR1, содержащий последовательность аминокислот: RASESVDNFGVSFMY (SEQ ID NO: 11) или последовательность из по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; участок LCDR2, содержащий последовательность аминокислот: GASNQQS (SEQ ID NO: 12) или последовательность из по меньшей мере 4, 5 или 6 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; и/или участок LCDR3 из I-394, содержащий последовательность аминокислот: QQTKEVPYT (SEQ ID NO: 13) или последовательность из по меньшей мере 4, 5, 6, 7 или 8 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно удалить или заменить на отличную аминокислоту. Положения CDR могут соответствовать нумерации по Кабату.

Типичная пара VH и VL против CD39 антитела, которое ингибирует ферментативную активность белка rCD39 человека, представляет собой таковую из антитела I-394, последовательность аминокислот варибельной области тяжелой цепи которого представлена ниже (SEQ ID NO: 6), и последовательность

аминокислот варибельной области легкой цепи которого представлена ниже (SEQ ID NO: 7). Участки CDR в соответствии с нумерацией по Кабату подчеркнуты в последовательностях SEQ ID NO: 6 и 7. Необязательно VH и VL содержат (например, модифицированы, чтобы содержали) акцепторные каркасы из человека. В одном варианте реализации антитело против CD39 согласно настоящему описанию содержит CDR1, CDR2 и/или CDR3 VH (например, в соответствии с нумерацией по Кабату) варибельной области тяжелой цепи, имеющей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 6. В одном варианте реализации антитело против CD39 согласно настоящему описанию содержит CDR1, CDR2 и/или CDR3 VL (например, в соответствии с нумерацией по Кабату) варибельной области легкой цепи, имеющей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 7.

VH I-394:

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYNMHVWKQSHGRTLEWIGYIVPLNGGSTF
NQKFKGRATLTVNTSSRTAYMELRSLTSEDSAAYYCARGGTRFAYWGQGTTLTVSA (SEQ
 ID NO: 6).

VL I-394:

DIVLTQSPASLAIVSLGQRATISCRASESVDNFGVSFMYWFQQKPGQPPNLLIYGASNQGS
 VPARFRGSGSGTDFSLNIHPMEADDTAMFYFCQQTKEVPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:
 7).

Другая типичная пара VH и VL против CD39 согласно настоящему описанию представляет собой такую из антитела I-395, последовательность аминокислот варибельной области тяжелой цепи которого представлена ниже (SEQ ID NO: 14), и последовательность аминокислот варибельной области легкой цепи которого представлена ниже (SEQ ID NO: 15). Участки CDR в соответствии с нумерацией по Кабату подчеркнуты в последовательностях SEQ ID NO: 14 и 15. Необязательно VH и VL содержат (например, модифицированы, чтобы содержали) акцепторные каркасы из человека. В одном варианте реализации антитело против CD39 согласно настоящему описанию содержит CDR1, CDR2 и/или CDR3 VH (например, в соответствии с нумерацией по Кабату) варибельной области тяжелой цепи, имеющей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 14. В одном варианте реализации антитело против CD39 согласно настоящему описанию содержит CDR1, CDR2 и/или CDR3 VL (например, в соответствии с нумерацией по Кабату) варибельной области легкой цепи, имеющей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 15.

VH I-395:

EVQLQQSGPELVKPGASVRMSCKASGYTFTDYNMHVWKKNHGKGLEWIGYINPNNGGTT
YNQKFKGKATLTVNTSSKTAAYMELRSLTSEDSAVYYCTRGGTRFASWGQGTTLTVSA
 (SEQ ID NO: 14).

VL I-395:

NIVLTQSPASLAIVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMYWFQQKPGQPPKLLIYAASQTQGS
 VPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMFYFCQQSKEVPFTFGSGTKLEIK
 (SEQ ID NO: 15).

Антитело против CD39 может, например, содержать: HCDR1 из I-395, содержащий последовательность аминокислот: DYNMH (SEQ ID NO: 16) или последовательность из по меньшей мере 4 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; HCDR2 из I-395, содержащий последовательность аминокислот: YINPN-NGGTTYNQKFKG (SEQ ID NO: 17) или последовательность из по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; HCDR3 из I-395, содержащий последовательность аминокислот: GGTRFAS (SEQ ID NO: 18) или последовательность из по меньшей мере 4, 5, 6 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; LCDR1 из I-395, содержащий последовательность аминокислот: RASESVDNYGISFMY (SEQ ID NO: 19) или последовательность из по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; участок LCDR2 из I-395, содержащий последовательность аминокислот: AASTQGS (SEQ ID NO: 20) или последовательность из по меньшей мере 4, 5 или 6 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; и/или участок LCDR3 из I-395, содержащий последовательность аминокислот: QQSKEVPFT (SEQ ID NO: 21) или последовательность из по меньшей мере 4, 5, 6, 7 или 8 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно удалить или заменить на отличную аминокислоту. Положения CDR могут соответствовать нумерации по Кабату.

Другая типичная пара VH и VL против CD39 согласно настоящему описанию представляет собой такую из антитела I-396, последовательность аминокислот переменной области тяжелой цепи которого представлена ниже (SEQ ID NO: 22), и последовательность аминокислот переменной области легкой цепи которого представлена ниже (SEQ ID NO: 23). Участки CDR в соответствии с нумерацией по Кабату подчеркнуты в последовательностях SEQ ID NO: 22 и 23. Необязательно VH и VL содержат (например, модифицированы, чтобы содержали) акцепторные каркасы из человека. В одном варианте реализации антитело против CD39 согласно настоящему описанию содержит CDR1, CDR2 и/или CDR3 VH (например, в соответствии с нумерацией по Кабату) переменной области тяжелой цепи, имеющей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 22. В одном варианте реализации антитело против CD39 согласно настоящему описанию содержит CDR1, CDR2 и/или CDR3 VL (например, в соответствии с нумерацией по Кабату) переменной области легкой цепи, имеющей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 23.

I-396 VH:

EVQLQQSGAELVPGASVKLSCIVSGFNIK**DTYIN**WVKQRPEQGLEWIG**RIDPANGNTKYD**
PKFQQKATMTSDTSSNTAYLHLSLTSDSSAVYYCAR**WGYDDEEADYFDS**WGQGTTTLTV
 SS

(SEQ ID NO: 22).

I-396 VL:

DIVLTQSPASLAIVSLGQRATISCR**ASESVDNYGISFMN**WFQQKPGQPPKLLIY**AASNQGS**G
 VPARFSGSGSGTDFTSLNIPMEVDAAAMYFC**HQSKEVPWT**FGGGTKLEIK

(SEQ ID NO: 23).

Антитело против CD39 может, например, содержать: HCDR1, содержащий последовательность аминокислот: DTYIN (SEQ ID NO: 24) или последовательность из по меньшей мере 4 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; HCDR2, содержащий последовательность аминокислот: RIDPANGNTKYDPKFQ (SEQ ID NO: 25) или последовательность из по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; HCDR3, содержащий последовательность аминокислот: WGYDDEEADYFDS (SEQ ID NO: 26) или последовательность из по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; LCDR1, содержащий последовательность аминокислот: RASESVDNYGISFMN (SEQ ID NO: 27) или последовательность из по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; участок LCDR2, содержащий последовательность аминокислот: AASNQGS (SEQ ID NO: 28) или последовательность из по меньшей мере 4, 5 или 6 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; и/или участок LCDR3 из I-396, содержащий последовательность аминокислот: HQSKEVPWT (SEQ ID NO: 29) или последовательность из по меньшей мере 4, 5, 6, 7 или 8 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно удалить или заменить на отличную аминокислоту. Положения CDR могут соответствовать нумерации по Кабату.

Другая типичная пара VH и VL против CD39 согласно настоящему описанию представляет собой такую из антитела I-399, последовательность аминокислот переменной области тяжелой цепи которого представлена ниже (SEQ ID NO: 30), и последовательность аминокислот переменной области легкой цепи которого представлена ниже (SEQ ID NO: 31). Участки CDR в соответствии с нумерацией по Кабату подчеркнуты в последовательностях SEQ ID NO: 30 и 31. Необязательно VH и VL содержат (например, модифицированы, чтобы содержали) акцепторные каркасы из человека. В одном варианте реализации антитело против CD39 согласно настоящему описанию содержит CDR1, CDR2 и/или CDR3 VH (например, в соответствии с нумерацией по Кабату) переменной области тяжелой цепи, имеющей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 30. В одном варианте реализации антитело против CD39 согласно настоящему описанию содержит CDR1, CDR2 и/или CDR3 VL (например, в соответствии с нумерацией по Кабату) переменной области легкой цепи, имеющей последовательность аминокислот SEQ ID NO: 31.

I-399 VH:

PVQLQQPGAEEVMPGASVKLSCKASGYTFT SFWMNWMRQRPQGGLWIG EIDPSDFYTN
SNQRFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAR GDFGWYFDVWGTGTSVTVSS
 (SEQ ID NO: 30).

I-399 VL:

EIVLTQSPPTMTSSPGKITFTTC SASSSINSNYLHWYQQKPGFSPKLLIY RTSNLASGVPTRF
 SGSGSGTSYSLTIGTMEAEDVATYYC QQGSSLPRTFGGGTKLEIK
 (SEQ ID NO: 31).

Антитело против CD39 может, например, содержать: HCDR1, содержащий последовательность аминокислот: SFWMN (SEQ ID NO: 32) или последовательность из по меньшей мере 4 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; HCDR2, содержащий последовательность аминокислот: EIDPSDFYTN SNQRFKG (SEQ ID NO: 33) или последовательность из по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; HCDR3, содержащий последовательность аминокислот: GDFGWYFDV (SEQ ID NO: 34) или последовательность из по меньшей мере 4, 5 или 6 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; LCDR1, содержащий последовательность аминокислот: SASSSINSNYLH (SEQ ID NO: 35) или последовательность из по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; участок LCDR2, содержащий последовательность аминокислот: RTSNLAS (SEQ ID NO: 36) или последовательность из по меньшей мере 4, 5 или 6 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; и/или участок LCDR3 из I-399, содержащий последовательность аминокислот: QQGSSLPRT (SEQ ID NO: 37) или последовательность из по меньшей мере 4, 5, 6, 7 или 8 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно удалить или заменить на отличную аминокислоту. Положения CDR могут соответствовать нумерации по Кабату.

В любом из антител I-394, I-395, I-396 и I-399 можно указать, что последовательности HCDR1, 2, 3 и LCDR1, 2, 3 (каждый CDR независимо или все CDR) соответствуют системе нумерации по Кабату (показаны в последовательностях VH и VL путем подчеркивания), соответствуют системе нумерации по Чотиа или соответствуют системе нумерации по IMGT или любой другой подходящей системе нумерации.

В любом аспекте конкретные последовательности вариабельной области, FR и/или CDR могут содержать одну или более модификаций последовательности, например, замену (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более модификаций последовательности). В одном варианте реализации замена представляет собой консервативную модификацию.

В другом аспекте соединение против CD39 содержит домен VH, последовательность которого идентична по меньшей мере приблизительно на 60, 70 или 80%, в некоторых случаях идентична по меньшей мере приблизительно на 85, 90, 95, 97, 98 или 99%, домену VH антитела, описанного в данном изобретении. В другом аспекте антитело против CD39 содержит домен VL, последовательность которого идентична по меньшей мере приблизительно на 60, 70 или 80%, в некоторых случаях идентична по меньшей мере приблизительно на 85, 90, 95, 97, 98 или 99%, домену VL антитела, описанного в данном изобретении.

Агенты, которые ингибируют CD73.

Ингибирование или нейтрализация экто-5' нуклеотидазной активности фермента CD73 может предпочтительно включать применение агента (например, низкомолекулярного органического соединения, антитела, полипептида, слитого с доменом Fc, иммуноадгезина и т.д.), который связывает CD73 и ингибирует экто-5' нуклеотидазную активность фермента CD73.

Каждая субъединица димера CD73 состоит из двух структурных доменов: N-концевого домена (остатки 27-317, нумерация согласно указанной в Кнапп и др. (2012)) и С-концевого домена (остатки 337-549), при этом больший N-концевой домен CD73 содержит область связывания иона металла и имеет четырехслойную структуру a/b-b-b-a, содержащую два чередующихся смешанных b-слоя. С-концевой домен содержит область связывания субстрата и поверхность димеризации и имеет четырехслойную структуру состава a/b-b-a-b. Указанные два домена связаны одной спиралью (остатки 318-336), содержащей небольшую шарнирную область, которая позволяет ферменту совершать движения большим доменом и, тем самым, перекладываться между открытой и закрытой конформациями. Активный центр, наблюдаемый в закрытой конформации, расположен границе между N- и С-концевыми доменами и образован из остатков обоих доменов. См., например, Кнапп и др. (2012) Structure 20, 2161-2173, описание которого включено в данное изобретение посредством ссылки.

Множество различных связывающих CD73 агентов известны в данной области, которые ингибиру-

ют экто-5'-нуклеотидазную активность CD73 посредством различных механизмов действия. Низкомолекулярные агенты, такие как пурины и аналоги АДФ, такие как негидролизуемый аналог АДФ-АРСР (аденозин 5'-[α,β -метилен]дифосфат), действуют как конкурентные ингибиторы АДФ (например, путем связывания сайта связывания АДФ на CD73). Другие агенты, включая как антитела, так и низкомолекулярные агенты, могут действовать как неконкурентные ингибиторы. Например, были описаны антитела, такие как BMS-986179, которые ингибируют ферментативную активность CD73, вызывая внутриклеточную интернализацию CD73 (см., например, публикацию РСТ № WO 2016/081748). В других примерах низкомолекулярные агенты и/или агенты-антитела могут действовать как аллостерические ингибиторы, например, путем связывания CD73 в некотором сайте, что приводит к нарушению подвижности домена, необходимой для ферментативной активности. Например, вычислительная биология позволила разработку малых молекул путем комбинирования жестких каркасов, таких как пяти- или шестичленные ароматические кольца, в виде молекул на основе трех ветвей, которые могут нацеливаться на область димеризации CD73, тем самым неконкурентно ингибируя CD73 (см. Rahimova и др. (2018) PLOS Computational Biology; <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005943>), и производные 2-алкокси-3-(сульфонилариламинометил)-хроман-4-она были описаны как неконкурентные ингибиторы (см. Al-Rashida и Iqbal (2014) Med Res Rev 34: 703-743). Антитело MEDI9447 (олекулмаб; см. также публикацию РСТ № WO 2016/075099 стерически блокирует CD73 и не дает CD73 принять каталитически активную конформацию (см. Geoghegan и др. (2016) mAbs 8: 454-467). Также были описаны антитела, которые действуют как неконкурентные ингибиторы связанного с мембраной клетки CD73 (вне зависимости от интернализации) и дополнительно ингибируют ферментативную активность растворимого CD73, могут необязательно дополнительно ингибировать также растворимый полипептид CD73, не полагаясь на интернализацию (см. публикацию РСТ № WO 2016/055609). Другие агенты могут включать ингибиторы экспрессии CD73 на основе нуклеиновых кислот (например, РНК).

Примеры агентов-антител, которые, согласно опубликованным данным, ингибируют ферментативную активность CD73, описаны в публикациях РСТ № WO 2016/055609; WO 2016/131950; WO 2017/064043; WO 2017/100670; WO 2016/075099; и WO 2016/081748, описания которых включены в данное изобретение посредством ссылки. Примеры низкомолекулярных органических соединений, которые, согласно опубликованным данным, ингибируют ферментативную активность CD73, описаны в публикациях РСТ № WO 2015/049447 и WO 2015/164573 (производные пурина), WO 2018094148, WO 2017/120508, WO 2017/153952 и WO 2017/098421, описания которых включены в данное изобретение посредством ссылки.

Антитела предпочтительно связываются с эпитопом, присутствующим на CD73, экспрессированном на поверхности клеток, включая опухолевые клетки, и ингибируют ферментативную (экто-5'-нуклеотидазную) активность фермента CD73 (например, связанного с мембраной белка CD73, экспрессированного на поверхности клеток). В одном варианте реализации данные антитела можно применять в качестве только блокирующих CD73 антител, например, они ингибируют ферментативную активность связанного с мембраной белка CD73, экспрессированного на поверхности клеток, по существу не связывая Fc γ -рецепторы и/или по существу не направляя АЗКЦ на экспрессирующую CD73 клетку. Необязательно антитела сохраняют домен Fc и сохраняют связывание с FcRn человека. Необязательно антитела содержат модифицированный домен Fc, например, чтобы уменьшить чувствительность к протеазам (например, к протеазам, таким как MMP в окружении опухоли) и/или чтобы уменьшить связывание с Fc γ -рецепторами человека (например, CD16).

Необязательно антитела вводят в количестве, эффективном для ингибирования ферментативной активности CD73 в течение необходимого периода времени, например, 1 недели, 2 недель, месяца, до момента последующего введения антитела против CD73.

Примеры антител против CD73 предложены в публикациях РСТ № WO 2017/064043; WO 2017/100670; WO 2016/075099 и WO 2016/081748.

В одном примере антитела против CD73, которые применяют в соответствии с настоящим описанием, нейтрализуют ферментативную активность CD73, вызывая или стимулируя внутриклеточную интернализацию, или в более общем случае понижающую модуляцию, экспрессированного на поверхности клетки CD73. Антитело BMS-986179 (публикация РСТ № WO 2016/081748) является примером такого антитела; указанное антитело действует путем связывания с конформационным эпитопом на CD73, в котором антитело связывается с сайтом, который содержит аминокислотные остатки из фрагментов 65-83 и 157-172 CD73 человека (ссылка на SEQ ID NO: 1).

В одном аспекте антитела против CD73 могут связывать эпитоп на CD73, который присутствует на CD73 не только в "открытой" конформации, когда он не связан с субстратом, но также и в "закрытой" конформации, когда он связан с субстратом (например, природным субстратом, таким как АМФ, или ингибитором или другим соединением, которое связывает активный центр, таким как аналог АМФ - аденозин-5'-(α,β -метилен)дифосфат (АРСР)). В одном аспекте антитело против CD73 не конкурирует с субстратом CD73 за связывание с полипептидом CD73. Примеры субстратов CD73 включают, например, природный субстрат, такой как АМФ, или ингибитор или другое соединение, которое связывает актив-

ный центр, такое как аналог АМФ - аденозин 5'-(α,β -метилен)дифосфат (АРСР).

В одном варианте реализации данные антитела не ингибируют ферментативную активность CD73, когда он находится в виде растворимого рекомбинантного белка CD73, например, антитела не способны ингибировать ферментативную активность растворимого димерного полипептида CD73 человека, когда антитела находятся в укладке/конфигурации, в которой они не способны образовывать олигомеры, например, когда они представлены в значительном молярном избытке (например, по меньшей мере в 10-кратном, 20-кратном, 100-кратном и т.д.) над димерами полипептида CD73. Например, антитела, которые ингибируют CD73, вызывая внутриклеточную интернализацию CD73 (например, BMS-986179), или антитела, разработанные таким образом, чтобы они ингибировали связанный с мембраной CD73, но не обязательно растворимый CD73 (например, олеклумаб и/или гуманизированное антитело 1E9), могут быть не способны ингибировать ферментативную активность растворимого димерного полипептида CD73 человека, когда указанные антитела находятся в укладке/конфигурации, в которой они неспособны образовывать олигомеры. Поскольку остаточная ферментативная активность CD73 может привести к достаточному образованию аденозина для опосредования иммуносупрессорного действия, предпочтительны высокие уровни опосредованного антителами блокирования фермента, чтобы опосредовать терапевтический эффект. Способы и композиции для лечения, описанные в данном изобретении, в которых используют комбинации с антителами, которые ингибируют pCD39, могут быть особенно полезны для усиления активности таких антител.

В одном варианте реализации антитело против CD73 представляет собой MEDI9447 (олеклумаб; см. публикацию РСТ № WO 2016/075099) или антитело, которое делит с ним общую детерминанту или область эпитопа на CD73. В одном варианте реализации терапевтическое антитело против CD73 представляет собой BMS-986179 (см. публикацию РСТ № WO 2016/081748) или антитело, которое делит с ним общую детерминанту или область эпитопа на CD73. В одном варианте реализации терапевтическое антитело против CD73 представляет собой гуманизированное 1E9 (см. публикацию РСТ № WO 2017/100670) или антитело, которое делит с ним общую детерминанту или область эпитопа на CD73.

В одном примере антитела против CD73, используемые в соответствии с настоящим описанием, не вызывают внутриклеточную интернализацию, или в более общем случае понижающую модуляцию, экспрессированного на поверхности клетки CD73, и/или не зависят от нее для проявления своей нейтрализующей CD73 активности. Примеры таких антител описаны в публикациях РСТ № WO 2016/075099 (например, антитело MEDI9447, олеклумаб), WO 2016/055609 (например, антитела 11E1, 6E1, 3C12 и 8C7) и WO 2016/131950. Олеклумаб связывается с CD73 с остатками во фрагментах аминокислот 158-171 и 206-211, например, с остатками V170, K206 и N211 (в последовательности SEQ ID NO: 1). Антитела 11E1, 6E1, 3C12 и 8C7 утрачивают связывание с мутантами CD73, содержащими замену в остатке K136 (в полипептиде CD73 с последовательностью SEQ ID NO: 1). Антитела 11E1, 6E1, 3C12 и 8C7 также утрачивают связывание с мутантами, содержащими замену в остатках A99, E129, K133, E134 и A135 (в полипептиде CD73 с последовательностью SEQ ID NO: 1), а также с мутантами, содержащими замену в остатках K97, E125, Q153 и K330 (в полипептиде CD73 с последовательностью SEQ ID NO: 1).

Антитела против CD73, используемые в соответствии с настоящим описанием, необязательно могут ингибировать ферментативную активность CD73 в виде растворимого рекомбинантного белка CD73 (например, антитела способны ингибировать ферментативную активность растворимого димерного полипептида CD73 человека, когда указанные антитела находятся в укладке/конфигурации, в которой они неспособны образовывать олигомеры, например, когда они представлены в значительном молярном избытке (например, по меньшей мере в 10-кратном, 20-кратном, 100-кратном и т.д.) над димерами полипептида CD73). Антитела 11E1, 6E1, 3C12 и 8C7 являются примерами таких антител. Способы анализа с применением растворимого CD73, которые можно применять для определения таких блокирующих функцию CD73 антител, предложены в публикациях РСТ № WO 2016/055609 и WO 2016/131950. Такие антитела, при применении в комбинации с антителами, которые ингибируют pCD39, могут обеспечить наибольшую степень ингибирования образования аденозина и/или подавления иммунитета.

Соответственно, антитело может представлять собой аллостерический ингибитор полипептида CD73, например, антитело связывает полипептид CD73 человека, экспрессированный на поверхности клетки, включая, но не ограничиваясь опухолевыми клетками, и ингибирует ферментативную (экто-5'-нуклеотидазную) активность полипептида CD73, не препятствуя возможности субстрата полипептида CD73 связывать полипептид CD73.

В данном изобретении описаны примеры антител, которые связываются с эпитопом на CD73, который присутствует на той же поверхности, когда CD73 представлен в виде димера CD73, например, потенциально позволяя антителу связываться бивалентно с одним димером CD73, т.е. в "закрытом" положении, в котором сайты связывания пространственно отдалены друг от друга. Ввиду связывания со связанным с лигандом CD73, антитела, описанные в данном изобретении, могут быть пригодны для связывания с CD73, когда он связан с АМФ, например, в окружении опухоли, в котором его предшественники АДФ и/или АМФ присутствуют на значительных уровнях до лечения. Микроокружение опухоли можно охарактеризовать по любому подходящему параметру, например, высоким уровням АДФ (например, продуцированным умирающими клетками), захваченному CD39 на стромальном и клеточном инфильт-

рате (например, клетках TReg), чтобы получить высокие уровни АМФ, а также, в более общем случае, по АМФ, аденозину, по присутствию или уровням экспрессии CD39 или экспрессирующих CD39 клеток, по присутствию или уровням экспрессии CD73 или экспрессирующих CD73 клеток, по присутствию или уровням экспрессии рецептора аденозина или экспрессирующих рецептор аденозина клеток. Таким образом, молекулы CD73 в окружении опухоли могут находиться в связанной с субстратом конформации, и способность связывать и ингибировать связанный с субстратом клеточный CD73 (например, клетки, экспрессирующие CD73, предварительно инкубированные с субстратом, таким как АМФ), дополнительно к несвязанному с субстратом CD73, может обеспечить большую способность ингибировать CD73 *in vivo*. Необязательно уровни АДФ или АМФ (и/или АТФ или аденозина) можно оценить в окружении опухоли перед лечением. Антитела могут быть особенно полезны для лечения индивида, имеющего значительные уровни (например, высокие уровни по сравнению с эталонным) АДФ, АМФ, АТФ или аденозина в образце опухоли.

Типичные антитела могут связывать полипептид CD73 человека, экспрессированный на поверхности клеток, и ингибировать ферментативную (экто-5' нуклеотидазную) активность полипептида CD73, при этом антитело способно бивалентно связываться с одним димером полипептидов CD73 (димером растворимых полипептидов CD73 или димером полипептидов CD73, экспрессированных клеткой). Необязательно антитело связывается с первым связывающим антиген доменом первого полипептида CD73 в димере и со вторым связывающим антиген доменом второго полипептида CD73.

Типичное антитело может связывать полипептид CD73 человека, экспрессированный на поверхности клеток, и ингибировать ферментативную (экто-5' нуклеотидазную) активность полипептида CD73, при этом антитело способно связывать полипептид CD73 в связанной с субстратом конформации.

Агент (например, связывающее CD73 соединение, антитело против CD73) можно оценить и выбрать по его способности ингибировать ферментативную активность CD73, т.е. блокировать 5'-нуклеотидазную активность CD73 и снижать продукцию аденозина экспрессирующей CD73 клеткой, и, в свою очередь, восстанавливать активность и/или снимать опосредованное аденозином ингибирование лимфоцитов.

Способность антитела ингибировать ферментативную активность CD73 можно исследовать в анализе в бесклеточной системе с применением рекомбинантного растворимого CD73 человека (в виде димеров) и АМФ, в котором превращение АМФ в аденозин (и/или его ингибирование) детектируют непосредственно (например, путем измерения субстратов и продуктов, т.е. АМФ, аденозина и/или фосфата), или опосредованно. В одном примере АМФ и/или аденозин детектируют с помощью ВЭЖХ до и после инкубации тестируемого соединения с рекомбинантным CD73. Рекомбинантный CD73 описан, например, в WO 2016/055609 и WO 2016/131950.

Ингибиторную активность антитела также можно оценить любым из множества других способов. Например, в непрямом анализе применяют реагент на основе люциферазы (например, систему CellTiter-Glo®, доступную для приобретения у Promega), чтобы детектировать исчезновение АМФ. Реакция люциферазы в данном анализе ингибируется АМФ. Добавление фермента CD73 в реакционную смесь разрушает АМФ и снимает ингибирование, вызывая детектируемый сигнал.

Способы анализа с применением растворимого CD73 могут предпочтительно включать тестирование в условиях, в которых антитела представлены в значительном молярном избытке (например, 10-кратном, 20-кратном, 50-кратном, 100-кратном и т.д.) над димерами полипептида CD73. Когда они представлены в молярном избытке над ферментом, антитела против CD73 будут более не способны образовывать мультимерные комплексы антител и димеров CD73; затем можно выбрать антитела, у которых сохранилась способность ингибировать ферментативную активность CD73.

Способность антител ингибировать 5'-эктонуклеотидазную ферментативную активность CD73 можно в качестве альтернативы или дополнения также исследовать в клеточном анализе (применяя клетки, которые экспрессируют CD73). Предпочтительно, антитела можно сначала исследовать или подвергнуть скринингу в анализе в бесклеточной системе, чтобы определить антитела, которые блокируют активность фермента, чтобы снизить вероятность выбора антител, которые ингибируют CD73, вызывая интернализацию CD73, а затем исследовать в виде очищенного антитела в клеточном анализе. Клеточный анализ можно осуществить, как описано в WO 2016/055609. Например, экспрессирующую CD73 линию клеток (например, линию клеток MDA-MB-231) высевает в 96-луночные планшеты с плоским дном в присутствии антитела против CD73 и инкубируют. АМФ добавляют к клеткам и инкубируют при 4°C (чтобы избежать понижающей модуляции CD73). Планшеты затем центрифугируют и супернатант переносят в 96-луночный культуральный планшет с плоским дном. Затем проводят количественный анализ свободного фосфата, полученного в результате гидролиза АМФ с образованием аденозина. Снижение гидролиза АМФ с образованием аденозина в присутствии антитела свидетельствует о том, что антитело ингибирует клеточный CD73.

В одном варианте реализации препарат антител вызывает снижение по меньшей мере на 50% ферментативной активности полипептида CD73, предпочтительно снижение по меньшей мере на 60, 70 или 80% ферментативной активности полипептида CD73 (например, растворимого гомодимерного полипептида CD73; экспрессированного клетками CD73).

Активность антитела также можно измерить в непрямом анализе в отношении его способности модулировать активность лимфоцитов, например, чтобы освободить от опосредованного аденозином ингибирования активности лимфоцитов или чтобы вызвать активацию активности лимфоцитов. Это можно осуществить, например, применяя анализ высвобождения цитокинов. В другом примере антитело можно оценить в непрямом анализе в отношении его способности модулировать пролиферацию лимфоцитов.

Антитело можно исследовать в отношении его способности интернализировать или вызывать понижающую модуляцию CD73, например, либо путем интернализации, либо путем индукции сбрасывания (шеддинга) CD73 с поверхности клетки. Происходит ли интернализация антитела против CD73 при связывании CD73 на клетке млекопитающего, или подвергается ли полипептид CD73 внутриклеточной интернализации (например, при связывании антителом) можно определить с помощью различных тестов, включая описанные в WO 2016/055609, например, описание которого включено в данное изобретение посредством ссылки.

В одном примере антитела можно выбрать по их способности ингибировать ферментативную активность растворимого димерного полипептида CD73 человека когда указанные антитела находятся в упаковке/конфигурации, в которой они неспособны образовывать олигомеры, например, когда они представлены в значительном молярном избытке (например, по меньшей мере в 10-кратном, 20-кратном, 100-кратном и т.д.) над димерами полипептида CD73. Антитела, действующие вызывая олигомеризацию, не способны ингибировать CD73, когда указанные антитела представлены в значительном молярном избытке над димерами полипептида CD73. Более того, указанные антитела связывают эпитоп на CD73, который сохраняется, когда CD73 экспрессирован на поверхности клетки. Путем применения данного анализа также можно идентифицировать антитела, которые бивалентно связываются с одним димером CD73; у таких антител может быть улучшенная способность к связыванию CD73 и активность блокирования CD73 *in vitro* и *in vivo* в экспрессирующих CD73 клетках. Антитела, идентифицированные с помощью данных способов, затем исследовали в анализе клеточной ферментативной активности, применяя очищенные антитела, и обнаружили, что они нейтрализуют ферментативную активность клеточного CD73. Антитела, которые ингибируют CD73, вызывая интернализацию, или которые утрачивают значительное связывание с клеточным CD73, были менее эффективны и были неспособны нейтрализовать ферментативную активность, обеспечивая в лучшем случае лишь частичное ингибирование ферментативной активности CD73 в клетках.

Эпитоп на CD73, с которым связываются данные антитела, присутствует на полипептидах CD73, экспрессируемых рядом клеток, например, раковыми клетками, CD4 Т-клетками, CD8 Т-клетками, В-клетками, трансфицированными клетками, и связывается с высокой аффинностью, которую определяют с помощью проточной цитометрии. Например, для антитела может быть характерна EC_{50} , определенная с помощью проточной цитометрии, которая сравнима или не более чем на 2 log, необязательно на 1 log превышает таковую для антитела против CD73, описанного в данном изобретении (например, антитела 6E1), или составляет не более 5 мкг/мл, в некоторых случаях не более 2 мкг/мл, не более 1 мкг/мл, не более 0,5 мкг/мл, не более 0,1 мкг/мл или не более 0,05 мкг/мл для связывания с клетками, которые экспрессируют на поверхности полипептид CD73. В одном варианте реализации клетки представляют собой клетки, которые заставили экспрессировать CD73 на своей поверхности. В одном варианте реализации клетки представляют собой клетки, которые эндогенно экспрессируют CD73 на поверхности, например, раковые клетки, клетки лейкоза, клетки рака мочевого пузыря, клетки глиомы, клетки глиобластомы, клетки рака яичников, клетки меланомы, клетки рака предстательной железы, клетки рака щитовидной железы, клетки рака пищевода или клетки рака молочной железы.

В одном варианте реализации нейтрализующие CD73 антитела можно охарактеризовать как способные вызывать снижение 5'-эктонуклеотидазной активности CD73 в клетках по меньшей мере на 60, 75 или 80%. В одном варианте реализации нейтрализующие CD73 антитела можно охарактеризовать по EC_{50} для ингибирования 5'-эктонуклеотидазной активности CD73, экспрессируемого клеткой, которая сравнима или не превышает таковую у антитела, описанного в данном изобретении, не более чем на 2 log, необязательно на 1 log превышает таковую для антитела против CD73, описанного в данном изобретении (например, антитела 6E1), или составляет не более 1 мкг/мл, в некоторых случаях не более 0,5 мкг/мл, в некоторых случаях не более 0,2 мкг/мл.

Необязательно ингибирование 5'-эктонуклеотидазной активности CD73, экспрессируемого клеткой, определяли путем оценки нейтрализации 5'-эктонуклеотидазной активности в клетках MDA-MB-231 путем количественного анализа гидролиза АМФ с образованием аденозина (см., например, пример 5 из WO 2016/055609).

Связывание эпитопа на CD73 нейтрализующими антителами, описанными в данном изобретении, не приводит к понижающей модуляции экспрессии CD73 на клетках (и, например, не вызывает кластеризацию и интернализацию комплекса антитело-CD73), включая случай, когда используют полноразмерные антитела, которые связывают CD73 бивалентным образом. Антитело против CD73, следовательно, остается связанным, вместе с CD73, на поверхности клетки. Ввиду обширной тканевой экспрессии CD73, антитела, которые не запускают понижающую модуляцию и/или интернализацию CD73, могут приводить к улучшенным фармакологическим свойствам и большему количеству антитела в микроокруже-

нии опухоли.

В одном варианте реализации предложено изолированное антитело, которое специфично связывает CD73 человека (например, полипептид, содержащий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 1) и которое нейтрализует 5'-эксонуклеотидазную активность гомодимерного полипептида CD73 человека в растворе. В одном варианте реализации предложено антитело, которое связывает и ингибирует ферментативную активность растворимого полипептида CD73 человека, то есть антитело, которое нейтрализует опосредованный CD73 катаболизм АМФ с образованием аденозина. В одном варианте реализации антитело связывает CD73 бивалентным образом. В одном варианте реализации антитело представляет собой необедняющее антитело, например, Fc-молчащее антитело. В одном варианте реализации антитело нейтрализует CD73 в растворе без необходимости индукции образования олигомеров полипептида CD73:антитело против CD73.

В одном варианте реализации антитело специфично связывает CD73 человека на поверхности клетки и способно нейтрализовать 5'-эксонуклеотидазную активность растворимого полипептида CD73 человека. В одном варианте реализации антитело не вызывает олигомеризацию растворимого CD73.

В одном варианте реализации антитело специфично связывает CD73 человека на поверхности клетки и способно нейтрализовать 5'-эксонуклеотидазную активность клеточного CD73 (CD73, экспрессируемого клетками). В одном варианте реализации антитело специфично связывает и нейтрализует 5'-эксонуклеотидазную активность CD73 человека на поверхности клетки, и не интернализуется в экспрессирующие CD73 клетки при связывании с CD73. Антитело не вызывает мультимеризацию и последующую интернализацию CD73. В одном варианте реализации антитело связывает и способно ингибировать ферментативную активность рекомбинантного полипептида CD73 человека в растворе, при этом указанное антитело не интернализуется в экспрессирующие CD73 клетки. В одном варианте реализации неинтернализирующееся антитело связывает CD73 бивалентным образом. В одном варианте реализации антитело представляет собой необедняющее антитело, например, Fc-молчащее антитело. Антитело способно нейтрализовать 5'-эксонуклеотидазную активность димерного полипептида CD73 человека в растворе, более того, без необходимости индукции образования олигомеров полипептида CD73:антитела против CD73.

В одном варианте реализации антитело специфично связывается бивалентно с полипептидами CD73 человека и ингибирует ферментативную активность клеточного CD73 человека (и необязательно дополнительно рекомбинантного растворимого CD73 человека), при этом указанное антитело не интернализуется в экспрессирующие CD73 клетки. Предпочтительно, антитело по существу не связывается с Fcγ-рецептором (например, посредством своего домена Fc).

В одном варианте реализации антитело специфично связывается с полипептидами CD73 человека и ингибирует ферментативную активность клеточного CD73 человека (и необязательно дополнительно рекомбинантного растворимого CD73 человека), при этом указанное антитело повышает или вызывает внутриклеточную интернализацию CD73 в экспрессирующих CD73 клетках. Предпочтительно, антитело по существу не связывается с Fcγ-рецептором (например, посредством своего домена Fc).

В одном аспекте антитело специфично связывает CD73 человека на поверхности клетки, предварительно инкубированной с АМФ, и способно нейтрализовать его 5'-эксонуклеотидазную активность. Необязательно нейтрализацию 5'-эксонуклеотидазной активности определяли путем оценки нейтрализации 5'-эксонуклеотидазной активности в клетках MDA-MB-231 путем количественного анализа гидролиза АМФ с образованием аденозина (см., например, пример 5 из WO 2016/055609).

Необязательно антитело против CD73 может связываться с общей антигенной детерминантой, присутствующей как на растворимом CD73, так и на CD73, экспрессированном на поверхности клеток.

Необязательно антитело против CD73 связывает общую антигенную детерминанту, присутствующую на CD73, когда он находится в "открытой" конформации (когда активный центр CD73 не занят/не связан с субстратом, например, АМФ, АРСР), и "закрытый" CD73, когда он находится в "закрытой" конформации (когда активный центр CD73 занят/связан с субстратом, например, АМФ, АРСР).

В одном аспекте антитело против CD73 связывает антигенную детерминанту в каждой полипептидной цепи CD73 внутри димера CD73, например, когда антигенные детерминанты присутствуют на общей поверхности димера CD73.

В одном аспекте антитело против CD73 проявляет пониженное связывание с полипептидом CD73, содержащим замену аминокислоты в остатке во фрагменте 158-171 и/или в остатке во фрагменте 206-211, например, с полипептидом CD73, содержащим замену аминокислоты в любом одном или более остатках V170, K206 и N211 (в последовательности SEQ ID NO: 1).

В одном аспекте антитело против CD73 проявляет пониженное связывание с полипептидом CD73, содержащим замену аминокислоты в остатке во фрагменте 65-83 и/или в остатке во фрагменте 157-172 (в последовательности SEQ ID NO: 1).

В одном аспекте антитело против CD73 связывает эпитоп на CD73, содержащий остаток K136 (в последовательности SEQ ID NO: 1).

В одном аспекте антитело против CD73 связывает эпитоп на CD73, содержащий один, два, три или четыре остатка, выбранных из группы, состоящей из K97, E125, Q153 и K330 (в последователь-

ности SEQ ID NO: 1).

В одном аспекте антитело против CD73 связывает эпитоп на CD73, содержащий один, два, три, четыре или пять остатков, выбранных из группы, состоящей из A99, E129, K133, E134 и A135 (в последовательности SEQ ID NO: 1).

В одном аспекте антитело против CD73 связывается по меньшей мере частично внутри домена или фрагмента из аминокислотных остатков на белке CD73 человека (например, гомодимерном белке CD73), содержащего аминокислотные остатки K97, A99, E125, E129, K133, E134, A135, K136, Q153 и K330 (в последовательности SEQ ID NO: 1). В одном аспекте антитело против CD73 связывает эпитоп на CD73, содержащий по меньшей мере один, два, три, четыре, пять или более остатков, выбранных из группы, состоящей из K97, A99, E125, E129, K133, E134, A135, K136, Q153 и K330 (в последовательности SEQ ID NO: 1).

В одном аспекте антитело против CD73 проявляет пониженное связывание с полипептидом CD73, содержащим мутацию в остатке K136 (в последовательности SEQ ID NO: 1); необязательно мутантный полипептид CD73 содержит мутацию: K136A.

В одном аспекте антитело против CD73 проявляет пониженное связывание с полипептидом CD73, содержащим мутацию в остатке, выбранном из группы, состоящей из: K97, E125, Q153 и K330 (в последовательности SEQ ID NO: 1); необязательно мутантный полипептид CD73 содержит следующие мутации: K97A, E125A, Q153A и/или K330A (например, K97A, E125A и K330A; K97A, E125A и/или Q153A).

В одном аспекте антитело против CD73 проявляет пониженное связывание с полипептидом CD73, содержащим мутацию в остатке, выбранном из группы, состоящей из: A99, E129, K133, E134 и A135 (в последовательности SEQ ID NO: 1); необязательно мутантный полипептид CD73 содержит следующие мутации: A99S, E129A, K133A, E134N и A135S.

В одном аспекте антитело против CD73 конкурирует за связывание с эпитопом на CD73, с которым связывается олеклумаб, гуманизированное 1E9, BMS-986179, 11E1, 8C7, 3C12 и/или 6E1 (например, которое конкурирует за связывание с эпитопом на полипептиде CD73 с антителом, содержащим участки CDR или переменные области тяжелой и легкой цепей из указанного антитела).

В одном аспекте любого из вариантов реализации в данном изобретении связывающее антиген соединение связывает тот же эпитоп и/или конкурирует за связывание с эпитопом на полипептиде CD73 с моноклональными антителами 11E1, 8C7, 3C12 и/или 6E1 (например, которое конкурирует за связывание с полипептидом CD73 с антителом, содержащим участки CDR или переменные области тяжелой и легкой цепей любого из 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1). В одном варианте реализации связывающее антиген соединение связывает тот же эпитоп и/или конкурирует за связывание с эпитопом на полипептиде CD73 с антителом, выбранным из группы, состоящей из:

(a) антитела, содержащего, соответственно, области VH и VL с последовательностями SEQ ID NO: 3 и 4 (6E1);

(b) антитела, содержащего, соответственно, области VH и VL с последовательностями SEQ ID NO: 40 и 41 (11E1);

(c) антитела, содержащего, соответственно, области VH и VL с последовательностями SEQ ID NO: 42 и 43 (8C7); и

(d) антитела, содержащего, соответственно, области VH и VL с последовательностями SEQ ID NO: 44 и 45 (3C12).

В одном варианте реализации антитело против CD73 связывает эпитоп, содержащий один, два или три аминокислотных остатка, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков на CD73, с которыми связывается 11E1, 6E1, 3C12 или 8C7.

В одном аспекте любого из вариантов реализации в данном изобретении антитело может содержать тяжелую и/или легкую цепь, содержащую один, два или три CDR из соответствующей тяжелой и/или легкой цепи антитела, выбранного из группы антител, состоящей из олеклумаба, гуманизированного 1E9, BMS-986179, 11E1, 6E1, 3C12 и 8C7.

В любом из вариантов реализации в данном изобретении антитела против CD73 можно охарактеризовать по связыванию с полипептидами CD73 человека, экспрессированными на поверхности клетки (например, клетки опухоли, клетки, которую заставили экспрессировать CD73, например, линии опухолевых клеток MDA-MB-231, или рекомбинантной клетки-хозяина, которую заставили экспрессировать CD73, как описано в WO 2016/055609), и необязательно дополнительно при этом антитело связывается с высокой аффинностью, определенной с помощью проточной цитометрии. Например, для антитела может быть характерна EC_{50} *in vitro*, определенная с помощью проточной цитометрии, составляющая не более 5 мкг/мл, в некоторых случаях не более 1 мкг/мл, не более 0,5 мкг/мл, не более 0,1 мкг/мл или не более 0,05 мкг/мл, для связывания с клетками, которые экспрессируют на поверхности полипептид CD73, например, опухолевыми клетками, экспрессирующими CD73, клетками, экспрессирующими на поверхности полипептид CD73, лимфоцитами, экспрессирующими CD73, и т.д. Необязательно для связывающего антиген соединения EC_{50} *in vitro* составляет не более 1 мкг/мл, в некоторых случаях не более 0,5 мкг/мл, не более 0,1 мкг/мл, или не более 0,05 мкг/мл для связывания с (i) клетками, экспрессирующими на поверхности CD73 человека (например, полипептид с последовательностью аминокислот SEQ ID NO: 1),

и/или с (ii) клетками, экспрессирующими на поверхности CD73 отличного от человека примата (например, CD73 яванского макака).

В одном аспекте любого из вариантов реализации в данном изобретении антитело против CD73 представляет собой тетрамерное антитело, содержащее две тяжелые и две легкие цепи, указанные тяжелые цепи содержат участки Fc из изотипа человека и которые по существу не связываются с Fcγ-рецепторами человека (например, CD16A, CD16B, CD32A, CD32B и/или CD64). В одном аспекте антитело против CD73 содержит домен Fc, который модифицирован (по сравнению с доменом Fc дикого типа того же изотипа), чтобы уменьшить связывание между доменом Fc и полипептидами CD16A, CD16B, CD32A, CD32B и/или CD64 человека. В одном варианте реализации антитело содержит замену аминокислоты в константной области тяжелой цепи в любом одном, двух, трех, четырех, пяти или более остатках, выбранных из группы, состоящей из: 220, 226, 229, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 243, 264, 268, 297, 298, 299, 309, 310, 318, 320, 322, 327, 330 и 331 (нумерация по Кабату EU). В одном варианте реализации антитело содержит замену аминокислоты в константной области тяжелой цепи в любых трех, четырех, пяти или более остатках, выбранных из группы, состоящей из: 234, 235, 237, 322, 330 и 331. В одном варианте реализации антитело содержит домен Fc, содержащий любую из последовательностей аминокислот: SEQ ID NO: 59-62.

Последовательности аминокислот переменных областей тяжелой и легкой цепи антител 11E1, 6E1, 3C12 и 8C7 приведены в табл. А. В конкретном варианте реализации в соответствии с настоящим описанием предложено антитело, которое связывает тот же или по существу тот же эпитоп или детерминанту, что и моноклональные антитела 11E1, 6E1, 3C12 или 8C7; необязательно антитело содержит гипервариабельный участок антитела 11E1, 6E1, 3C12 или 8C7. В любом из вариантов реализации в данном изобретении антитело 11E1 можно охарактеризовать по последовательностям аминокислот и/или последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим его. В одном варианте реализации моноклональное антитело содержит Fab- или F(ab')₂-часть 11E1, 6E1, 3C12 или 8C7. Также предложено моноклональное антитело, которое содержит переменную область тяжелой цепи 11E1, 6E1, 3C12 или 8C7. Согласно одному варианту реализации моноклональное антитело содержит три CDR (например, согласно нумерации по Кабату, Чотиа или IGMT) переменной области тяжелой цепи 11E1, 6E1, 3C12 или 8C7. Также предложено моноклональное антитело, которое дополнительно содержит переменную область легкой цепи 11E1, 6E1, 3C12 или 8C7 или один, два или три из CDR (например, согласно нумерации по Кабату, Чотиа или IGMT) переменной области легкой цепи 11E1, 6E1, 3C12 или 8C7. Необязательно любой один или более участков CDR указанной легкой или тяжелой цепи может содержать один, два, три, четыре, пять или более модификаций аминокислот (например, замен, вставок или делеций). Необязательно предложено антитело, в котором любая из переменных областей легкой и/или тяжелой цепи, содержащая часть или всю связывающую антиген область антитела 11E1, 6E1, 3C12 или 8C7, соединена с константной областью иммуноглобулина типа IgG человека, необязательно с человеческой константной областью, необязательно изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. В одном варианте реализации человеческая константная область необязательно дополнительно содержит замену аминокислоты, чтобы снизить эффекторную функцию (связывание с Fcγ-рецепторами человека). В одном варианте реализации человеческая константная область (необязательно шарнирная область) необязательно дополнительно содержит замену аминокислоты, чтобы повысить или вызвать внутриклеточную интернализацию CD73.

Антитело против CD73 может, например, содержать: HCDR1 из 6E1, содержащий последовательность аминокислот: SYNMY (SEQ ID NO: 46) или последовательность из по меньшей мере 4 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; HCDR2 из 6E1, содержащий последовательность аминокислот: YIDPYNGGSSYNQKFKG (SEQ ID NO: 47) или последовательность из по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; HCDR3 из 6E1, содержащий последовательность аминокислот: GYNNYKAWFAY (SEQ ID NO: 48) или последовательность из по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; LCDR1 из 6E1, содержащий последовательность аминокислот: KASQSVTNDVA (SEQ ID NO: 49) или последовательность из по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; LCDR2 из 6E1, содержащий последовательность аминокислот: YASNRYT (SEQ ID NO: 50) или последовательность из по меньшей мере 4, 5 или 6 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно заменить на отличную аминокислоту; и/или LCDR3 из 6E1, содержащий последовательность аминокислот: QQDYSSLT (SEQ ID NO: 51) или последовательность из по меньшей мере 4, 5, 6, 7 или 8 смежных аминокислот из нее, необязательно при этом одну или более данных аминокислот можно удалить или заменить на отличную аминокислоту. Положения CDR могут соответствовать нумерации по Кабату.

В другом аспекте любого из вариантов реализации в данном изобретении любой из участков CDR 1, 2 и/или 3 тяжелой и легкой цепей можно охарактеризовать по последовательности из по меньшей мере 4,

5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот из них, и/или как содержащие последовательность аминокислот, идентичную по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 85, 90 или 95% последовательности конкретного CDR или набора CDR, перечисленных в соответствующей последовательности SEQ ID NO.

В любом из антител, например, 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1, определенные последовательности варибельной области и CDR могут содержать модификации последовательности, например, замену (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более модификаций последовательности). В одном варианте реализации участки CDR 1, 2 и/или 3 тяжелой и легкой цепей содержат одну, две, три или более замен аминокислот, где замененный остаток представляет собой остаток, присутствующий в последовательности человеческого происхождения. В одном варианте реализации замена представляет собой консервативную модификацию. Консервативная модификация последовательности относится к модификации аминокислоты, которая значительно не влияет или не изменяет параметры связывания антитела, содержащего последовательность аминокислот. Такие консервативные модификации включают замены, вставки и делеции аминокислот. Модификации можно ввести в антитело с помощью стандартных методик, известных в данной области, таких как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные замены аминокислот обычно представляют собой замены, при которых аминокислотный остаток заменен на аминокислотный остаток, содержащий боковую цепь со сходными физико-химическими свойствами. Указанные последовательности варибельной области и CDR могут содержать одну, две, три, четыре или более вставок, делеций или замен аминокислот. Если сделаны замены, то предпочтительные замены будут представлять собой консервативные модификации. Семейства аминокислотных остатков, содержащих сходные боковые цепи, установлены в данной области. Данные семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или более аминокислотных остатков внутри участков CDR антитела можно заменить на другие аминокислотные остатки из того же семейства боковых цепей, и можно исследовать сохранение функции (т.е. свойств, описанных в данном изобретении) измененным антителом, применяя способы анализа, описанные в данном изобретении.

Последовательности варибельных областей антител приведены ниже в табл. А (если присутствуют лидерные последовательности, то начало любой цепи антитела можно определить как положение аминокислоты, следующее сразу после конца лидерной последовательности). В любом варианте реализации в данном изобретении, последовательность VL или VH можно указать или пронумеровать таким образом, чтобы в ней присутствовал или отсутствовал сигнальный пептид или любая его часть. HCDR1, 2, 3 и LCDR1, 2, 3 антитела, содержащего последовательности VH и VL, указанные в табл. А, необязательно можно уточнить как все (или каждый независимо) соответствующие системе нумерации по Кабату, соответствующие системе нумерации по Чотиа, соответствующие системе нумерации по IMGT или любой другой подходящей системе нумерации.

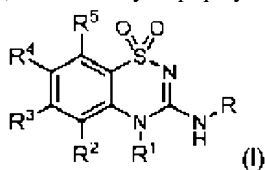
Таблица А

	SEQ ID NO:	Последовательность аминокислот антител против CD73
6E1 VH	3	EFQLQQSGPELVKPGASVKVSCASGYAFTSYNMYWVKQSHGKRLEWIG YIDPYNGGSSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNLTSEDSAVYYCAR GYNNYKAWFAYWGQGLTVTSA
6E1 VL	4	SIVMTQTPKFLVLSAGDRVITITCKASQSVTNDVAWYQQKPGQSPKLLIY YASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFITSTMQAEDLAVYFCQQDYSSLTFG AGTKLELK
11E1 VH	40	EIQLQQSGPELVKPGASVKVSCASGYAFTSYNMYWVKQSHGKSLEWIG YIDPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNLTSEDSAVYYCAR GYGNYKAWFAYWGQGLTVTSA
11E1 VL	41	DAVMTQTPKFLVLSAGDRVITITCKASQSVTNDVAWYQQKPGQSPKLLIY YASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFITSTVQAEDLAVYFCQQDYSSLTFG AGTKLELK
8C7 VH	42	EVQLQQSGPELVKPGASVKVSCASGYAFASYNMNVKQSHGKSLDWIG YIDPYNGGSSYNLTFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNLTSEDSAVYYCAR GYGNYKAWFAYWGQGLTVTSAASTKGP

8C7 VL	43	SIVMTPTPKFLLVSAGDRVITITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLIY YASTRYTGVPDRFTGSGYGTDFFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSLTFG AGTKLELKRTVAAP
3C12 VH	44	QIQQLQQSGPELVKPGASVKVSCASGYAFASYNMNVKQSHGKSLDWIG YIDPYNGGSSYNLTFKGKATLTVDKSSTTAYMHLNSLTSEDSAVYYCAR GYGNYKAWFAYWGQGLTVTVSAASTKGP
3C12 VL	45	DVVMQTPTPKFLLVSAGDRVITITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLIY YASTRYTGVPDRFTGSGYGTDFFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSLTFG AGTKLELKRTVAAP

В одном варианте реализации антитела вводят индивиду, страдающему от рака, в количестве и с частотой, достаточной, чтобы ингибировать активность CD73 в микроокружении опухоли. В одном варианте реализации антитела вводят в количестве и с частотой, достаточной для снижения образования и/или концентрации аденозина в микроокружении опухоли. В одном варианте реализации антитела вводят в количестве и с частотой, достаточной для повышения образования и/или концентрации АТФ в микроокружении опухоли. В одном варианте реализации антитела вводят в количестве и с частотой, достаточной для нейтрализации активности CD73, экспрессированного CD4 Т-клетками, CD8 Т-клетками и/или В-клетками. В одном варианте реализации антитела вводят в количестве и с частотой, достаточной для нейтрализации активности CD73, экспрессированного CD4 Т-клетками, CD8 Т-клетками и/или В-клетками.

В одном варианте реализации низкомолекулярный ингибитор CD73 связывается с областью димеризации CD73 и действует как неконкурентный ингибитор. В другом варианте реализации низкомолекулярный ингибитор CD73 связывает сайт связывания субстрата (АДФ) CD73. В одном варианте реализации ингибитор включает молекулу-производное пурина. В одном варианте реализации ингибитор включает молекулу согласно WO 2017/098421, отвечающую формуле (I):



где R выбран из: арила,

арила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из:

фтора,

хлора,

брома,

йода,

C₁₋₆алкила,

C₁₋₆алкила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома, йода, оксо, C₁₋₄алкилоксила, -OH, -COOH, -NH₂-N(H)C₁₋₄алкила,

-N(C₁₋₄алкила)₂ и -CN,

циклоалкила,

C₁₋₄алкоксила,

C₁₋₄алкоксила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома, оксо, -OH и -CN,

-CN,

оксо,

-OH,

-O-арила,

-C(O)OC(CH₃)₃,

-COOH,

-C₁₋₄алкил-OC₁₋₄алкила,

-NO₂,

-NH₂,

-N(H)C₁₋₄алкила,

-N(C₁₋₄алкила)₂,

-C₁₋₄алкил-NHВос,

-N(H)-арила,

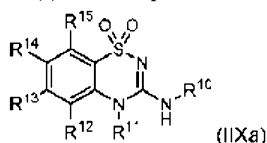
-N(H)C(O)-арила,

-N(H)OC(O)C₁₋₄алкила,

$-N(H)C(O)C_{1-4}$ алкила,
 $-N(H)S(O)_2C_{1-4}$ алкила,
 $-N(H)S(O)_2$ арила,
 $-N(H)S(O)_2$ циклоалкила,
 $-N(H)S(O)_2CH_2$ арила и
 $-SO_2NH_2$, гетероарила,
 гетероарила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из:
 фтора,
 хлора,
 брома,
 йода,
 C_{1-6} алкила,
 C_{1-6} алкила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома,
 йода, оксо, C_{1-4} алкилоксила, $-OH$,
 $-COOH$, $-NH_2$,
 $-N(H)C_{1-4}$ алкила, $-N(C_{1-4}$ алкила) $_2$ и $-CN$, циклоалкила,
 C_{1-4} алкоксила,
 C_{1-4} алкоксила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома,
 оксо, $-OH$ и $-CN$,
 $-CN$,
 оксо,
 $-OH$,
 $-O$ -арила,
 $-C(O)OC(CH_3)_3$,
 $-COOH$,
 $-C_{1-4}$ алкил- OC_{1-4} алкила,
 $-NO_2$,
 $-NH_2$,
 $-N(H)C_{1-4}$ алкила,
 $-N(C_{1-4}$ алкила) $_2$,
 $-C_{1-4}$ алкил- NH Вос,
 $-N(H)$ -арила,
 $-N(H)C(O)$ -арила,
 $-N(H)OC(O)C_{1-4}$ алкила,
 $-N(H)C(O)C_{1-4}$ алкила,
 $-N(H)S(O)_2C_{1-4}$ алкила,
 $-N(H)S(O)_2$ арила,
 $-N(H)S(O)_2$ циклоалкила,
 $-N(H)S(O)_2CH_2$ арила и
 SO_2NH_2 ,
 бициклогетероарила,
 бициклогетероарила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из:
 фтора,
 хлора,
 брома,
 йода,
 C_{1-6} алкила,
 C_{1-6} алкила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома,
 йода, оксо, C_{1-4} алкилоксила, $-OH$,
 $-COOH$, $-NH_2$,
 $-N(H)C_{1-4}$ алкила, $-N(C_{1-4}$ алкила) $_2$ и $-CN$, циклоалкила,
 C_{1-4} алкоксила,
 C_{1-4} алкоксила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома,
 оксо, $-OH$ и $-CN$,
 $-CN$,
 оксо,
 $-OH$,
 $-O$ -арила,
 $-C(O)OC(CH_3)_3$,
 $-COOH$,
 $-C_{1-4}$ алкил- OC_{1-4} алкила,
 $-NO_2$,

-NH_2 ,
 $\text{-N(H)C}_{1-4}\text{алкила}$,
 $\text{-N(C}_{1-4}\text{алкила})_2$,
 $\text{-C}_{1-4}\text{алкил-NHBoc}$,
 -N(H)-арила ,
 -N(H)C(O)-арила ,
 $\text{-N(H)OC(O)C}_{1-4}\text{алкила}$,
 $\text{-N(H)C(O)C}_{1-4}\text{алкила}$,
 $\text{-N(H)S(O)}_2\text{C}_{1-4}\text{алкила}$,
 $\text{-N(H)S(O)}_2\text{арила}$,
 $\text{-N(H)S(O)}_2\text{циклоалкила}$,
 $\text{-N(H)S(O)}_2\text{CH}_2\text{арила}$ и
 SO_2NH_2 , циклоалкила, и
 циклоалкила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из:
 фтора,
 хлора,
 брома,
 йода,
 $\text{C}_{1-6}\text{алкила}$,
 $\text{C}_{1-6}\text{алкила}$, содержащего от 1 до 5 заместителей,
 независимо выбранных из: фтора, хлора, брома, йода, оксо, $\text{C}_{1-4}\text{алкилоксила}$, -OH ,
 -COOH , -NH_2
 $\text{-N(H)C}_{1-4}\text{алкила}$, $\text{-N(C}_{1-4}\text{алкила})_2$ и -CN , циклоалкила,
 $\text{C}_{1-4}\text{алкоксила}$,
 $\text{C}_{1-4}\text{алкоксила}$, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома,
 оксо, -OH и -CN ,
 -CN ,
 оксо,
 -OH ,
 -O-арила ,
 $\text{-C(O)OC(CH}_3)_3$,
 -COOH ,
 $\text{-C}_{1-4}\text{алкил-OC}_{1-4}\text{алкила}$,
 -NO_2 ,
 -NH_2 ,
 $\text{-N(H)C}_{1-4}\text{алкила}$,
 $\text{-N(C}_{1-4}\text{алкила})_2$,
 $\text{-C}_{1-4}\text{алкил-NHBoc}$,
 -N(H)-арила ,
 -N(H)C(O)-арила ,
 $\text{-N(H)OC(O)C}_{1-4}\text{алкила}$,
 $\text{-N(H)C(O)C}_{1-4}\text{алкила}$,
 $\text{-N(H)S(O)}_2\text{C}_{1-4}\text{алкила}$,
 $\text{-N(H)S(O)}_2\text{арила}$,
 $\text{-N(H)S(O)}_2\text{циклоалкила}$,
 $\text{-N(H)S(O)}_2\text{CH}_2\text{арила}$ и
 SO_2NH_2 ; R^1 выбран из:
 водорода,
 $\text{C}_{1-4}\text{алкила}$ и
 $\text{C}_{1-4}\text{алкила}$, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора,
 -OH и -NH_2 ; R^2 выбран из:
 водорода,
 фтора,
 хлора,
 брома,
 йода,
 -OH ,
 -CN ,
 $\text{C}_{1-6}\text{алкила}$,
 $\text{C}_{1-4}\text{алкила}$, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора,
 брома, йода, $\text{C}_{1-4}\text{алкила}$, $\text{C}_{1-4}\text{алкилоксила}$, -OH , -COOH , -CF_3 ,
 $\text{-C}_{1-4}\text{алкил-OC}_{1-4}\text{алкила}$, -NO_2 , -NH_2 и -CN ,

C_{1-4} алкилоксила,
 C_{1-4} алкилоксила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора и брома, и
 $-OC(O)C_{1-4}$ алкила; R^3 выбран из:
 водорода,
 фтора,
 хлора,
 брома,
 йода,
 $-OH$,
 $-CN$,
 C_{1-6} алкила,
 C_{1-4} алкила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома, йода, C_{1-4} алкила, C_{1-4} алкилоксила, $-OH$, $-COOH$, $-CF_3$,
 $-C_{1-4}$ алкил- OC_{1-4} алкила, $-NO_2$, $-NH_2$ и $-CN$,
 C_{1-4} алкилоксила,
 C_{1-4} алкилоксила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора и брома, и
 $-OC(O)C_{1-4}$ алкила; R^4 выбран из:
 водорода,
 фтора,
 хлора,
 брома,
 йода,
 $-OH$,
 $-CN$,
 C_{1-6} алкила,
 C_{1-4} алкила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома, йода, C_{1-4} алкила, C_{1-4} алкилоксила, $-OH$, $-COOH$, $-CF_3$,
 $-C_{1-4}$ алкил- OC_{1-4} алкила, $-NO_2$, $-NH_2$ и $-CN$,
 C_{1-4} алкилоксила,
 C_{1-4} алкилоксила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора и брома, и
 $-OC(O)C_{1-4}$ алкила; и R^5 выбран из:
 водорода,
 фтора,
 хлора,
 брома,
 йода,
 $-OH$,
 $-CN$,
 C_{1-6} алкила,
 C_{1-4} алкила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома, йода, C_{1-4} алкила, C_{1-4} алкилоксила, $-OH$,
 $-COOH$, $-CF_3$,
 $-C_{1-4}$ алкил- OC_{1-4} алкила, $-NO_2$, $-NH_2$ и $-CN$,
 C_{1-4} алкилоксила,
 C_{1-4} алкилоксила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора и брома, и
 $-OC(O)C_{1-4}$ алкила; и фармацевтически приемлемые соли указанного соединения.
 Необязательно соединение формулы (I) выше представлено следующей формулой (IIa):



где:

R^{10} выбран из:

арила,

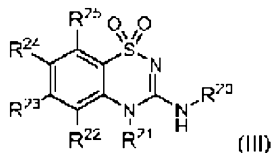
арила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из:

фтора,

хлора,
 брома,
 йода,
 C_{1-6} алкила,
 C_{1-6} алкила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома,
 йода, оксо, C_{1-4} алкилоксила, -ОН,
 -COOH, -NH₂
 -N(H) C_{1-4} алкила, -N(C_{1-4} алкила)₂ и -CN, циклоалкила,
 C_{1-4} алкоксила,
 C_{1-4} алкоксила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома,
 оксо, -ОН и -CN,
 -CN,
 оксо,
 -ОН,
 -О-арила,
 -C(O)OC(CH₃)₃,
 -COOH,
 - C_{1-4} алкил-OC C_{1-4} алкила,
 -NO₂,
 -NH₂,
 -N(H) C_{1-4} алкила,
 -N(C_{1-4} алкила)₂,
 - C_{1-4} алкил-NHBoc,
 -N(H)-арила,
 -N(H)C(O)-арила,
 -N(H)OC(O) C_{1-4} алкила,
 -N(H)C(O) C_{1-4} алкила,
 -N(H)S(O)₂ C_{1-4} алкила,
 -N(H)S(O)₂арила,
 -N(H)S(O)₂циклоалкила,
 -N(H)S(O)₂CH₂арила и
 SO₂NH₂, гетероарила,
 гетероарила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из:
 фтора,
 хлора,
 брома,
 C_{1-6} алкила,
 C_{1-6} алкила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома,
 оксо, C_{1-4} алкилоксила, -ОН,
 -COOH, -NH₂
 -N(H) C_{1-4} алкила, -N(C_{1-4} алкила)₂ и -CN, циклоалкила,
 C_{1-4} алкоксила,
 C_{1-4} алкоксила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома,
 оксо, -ОН и -CN,
 оксо,
 -ОН,
 -COOH,
 -NO₂,
 -NH₂,
 -N(H) C_{1-4} алкила, и
 -N(C_{1-4} алкила)₂,
 бициклогетероарила,
 бициклогетероарила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из:
 фтора,
 хлора,
 брома,
 C_{1-6} алкила,
 C_{1-6} алкила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома,
 оксо, C_{1-4} алкилоксила, -ОН,
 -COOH, -NH₂
 -N(H) C_{1-4} алкила, -N(C_{1-4} алкила)₂ и -CN, циклоалкила,
 C_{1-4} алкоксила,

C_{1-4} алкоксила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома, оксо, -ОН и -CN,
 оксо,
 -ОН,
 -COOH,
 -NO₂,
 -NH₂,
 -N(H) C_{1-4} алкила, и
 -N(C_{1-4} алкила)₂, циклоалкила и
 циклоалкила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из:
 фтора,
 хлора,
 брома,
 C_{1-6} алкила,
 C_{1-6} алкила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома,
 оксо, C_{1-4} алкилоксила, -ОН,
 -COOH, -NH₂, -N(H) C_{1-4} алкила, -N(C_{1-4} алкила)₂ и -CN, циклоалкила,
 C_{1-4} алкоксила,
 C_{1-4} алкоксила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома,
 оксо, -ОН и -CN,
 оксо,
 -ОН,
 -COOH,
 -NO₂,
 -NH₂,
 -N(H) C_{1-4} алкила, и
 -N(C_{1-4} алкила)₂; R¹¹ выбран из:
 водорода и
 C_{1-4} алкила; R¹² выбран из:
 водорода,
 фтора,
 хлора,
 брома,
 йода,
 -ОН,
 C_{1-6} алкила,
 C_{1-4} алкила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора и
 брома,
 C_{1-4} алкилоксила,
 C_{1-4} алкилоксила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из: фтора,
 хлора и брома, и
 -OC(O) C_{1-4} алкила; R¹³ выбран из:
 водорода,
 фтора,
 хлора,
 брома,
 йода,
 -ОН,
 C_{1-6} алкила,
 C_{1-4} алкила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора и
 брома,
 C_{1-4} алкилоксила,
 C_{1-4} алкилоксила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из: фтора,
 хлора и брома, и
 -OC(O) C_{1-4} алкила; R¹⁴ выбран из:
 водорода,
 фтора,
 хлора,
 брома,
 йода,
 -ОН,
 -CN,

C_{1-6} алкила,
 C_{1-4} алкила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора и брома,
 C_{1-4} алкилоксила,
 C_{1-4} алкилоксила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора и брома, и $-OC(O)C_{1-4}$ алкила; и R^{15} выбран из:
 водорода,
 фтора,
 хлора,
 брома,
 йода,
 $-OH$,
 $-CN$,
 C_{1-6} алкила,
 C_{1-4} алкила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора и брома,
 C_{1-4} алкилоксила,
 C_{1-4} алкилоксила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора и брома, и
 $-OC(O)C_{1-4}$ алкила; и включает фармацевтически приемлемые соли указанного соединения.
 Необязательно соединение представлено следующей формулой (III):



где:
 R^{20} выбран из:
 фенила,
 фенила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из:
 фтора,
 хлора,
 брома,
 йода,
 C_{1-6} алкила,
 C_{1-6} алкила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома, йода, оксо, C_{1-4} алкилоксила, $-OH$, $-COOH$, $-NH_2$
 $-N(H)C_{1-4}$ алкила, $-N(C_{1-4}$ алкила) $_2$ и $-CN$, циклоалкила,
 C_{1-4} алкоксила,
 C_{1-4} алкоксила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома, оксо, $-OH$ и $-CN$,
 $-CN$,
 оксо,
 $-OH$,
 $-O$ -арила,
 $-C(O)OC(CH_3)_3$,
 $-COOH$,
 $-C_{1-4}$ алкил- OC_{1-4} алкила,
 $-NO_2$,
 $-NH_2$,
 $-N(H)C_{1-4}$ алкила,
 $-N(C_{1-4}$ алкила) $_2$,
 $-C_{1-4}$ алкил- NH Вос,
 $-N(H)$ -арила,
 $-N(H)C(O)$ -арила,
 $-N(H)OC(O)C_{1-4}$ алкила,
 $-N(H)C(O)C_{1-4}$ алкила,
 $-N(H)S(O)_2C_{1-4}$ алкила,
 $-N(H)S(O)_2$ арила,
 $-N(H)S(O)_2$ циклоалкила,
 $-N(H)S(O)_2CH_2$ арила и

SO_2NH_2 , гетероарила,
 гетероарила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из:
 фтора,
 хлора,
 брома,
 C_{1-6} алкила,
 C_{1-6} алкила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома,
 йода, оксо, C_{1-4} алкилоксила, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$
 $-\text{N}(\text{H})\text{CH}_3$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ и $-\text{CN}$,
 C_{1-4} алкоксила,
 C_{1-4} алкоксила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома,
 оксо, $-\text{OH}$ и $-\text{CN}$,
 оксо,
 $-\text{OH}$,
 $-\text{NH}_2$,
 $-\text{N}(\text{H})\text{CH}_3$, и
 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$,
 бициклогетероарила и
 бициклогетероарила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из:
 фтора,
 хлора,
 брома,
 C_{1-6} алкила,
 C_{1-6} алкила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома,
 йода, оксо, C_{1-4} алкилоксила, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$
 $-\text{N}(\text{H})\text{CH}_3$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ и $-\text{CN}$,
 C_{1-4} алкоксила,
 C_{1-4} алкоксила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома,
 оксо, $-\text{OH}$ и $-\text{CN}$,
 оксо,
 $-\text{OH}$,
 $-\text{NH}_2$,
 $-\text{N}(\text{H})\text{CH}_3$, и
 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$; R^{21} выбран из:
 водорода и
 C_{1-4} алкила; R^{22} выбран из:
 водорода,
 фтора,
 хлора,
 брома,
 $-\text{OH}$,
 $-\text{CN}$,
 C_{1-4} алкила,
 C_{1-4} алкилоксила и $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{1-4}$ алкила; R^{23} выбран из:
 водорода, фтора,
 хлора,
 брома,
 $-\text{OH}$,
 $-\text{CN}$,
 C_{1-4} алкила,
 C_{1-4} алкилоксила и
 $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{1-4}$ алкила; R^{24} выбран из:
 водорода, фтора,
 хлора,
 брома,
 $-\text{OH}$,
 $-\text{CN}$,
 C_{1-4} алкила,
 C_{1-4} алкилоксила и $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{1-4}$ алкила; и
 R^{25} выбран из:
 водорода, фтора,
 хлора,

брома,

-ОН,

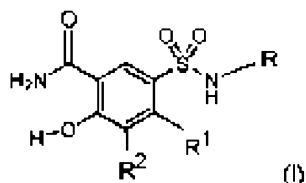
-CN,

C₁₋₄алкила,

C₁₋₄алкилоксила и

-OC(O)C₁₋₄алкила; и включает фармацевтически приемлемые соли указанного соединения.

В одном варианте реализации ингибирующий CD73 агент представляет собой низкомолекулярное органическое соединение согласно описанию в публикации РСТ № WO 2017/153952, например, соединение, отвечающее формуле (I) ниже:



где:

R выбран из:

арила,

арила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из:

фтора,

хлора,

брома,

йода,

C₁₋₆алкила,

C₁₋₆алкила, содержащего от 1 до 9 заместителей, независимо выбранных из:

фтора, хлора, брома, йода, оксо, C₁₋₄алкилоксила, -ОН, -COOH, -NR³¹⁰R³²⁰,

-N(H)C₁₋₄алкила, -N(C₁₋₄алкила)₂ и -CN, циклоалкила,

гетероарила,

C₁₋₆алкоксила,

C₁₋₆алкоксила, содержащего от 1 до 9 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома, оксо, -ОН, фенила и -CN,

-CN,

оксо,

-ОН,

-О-циклоалкила,

-О-фенила,

-C(O)OC(CH₃)₃,

-COOH,

-C1-4алкил-OC₁₋₄алкила,

-NO₂,

-NH₂,

-N(H)C₁₋₄алкила,

-N(H)C₁₋₄алкила, содержащего от 1 до 9 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома, оксо, -ОН и -CN,

-N(C₁₋₄алкила)₂,

-C₁₋₄алкил-NHBoc,

-N(H)-арила,

-N(H)C(O)-арила,

-N(H)OC(O)C₁₋₄алкила,

-N(H)C(O)C₁₋₄алкила,

-N(H)S(O)₂C₁₋₄алкила,

-N(H)S(O)₂циклоалкила,

-N(H)S(O)₂фенила,

-SC₁₋₆алкила,

-SC₁₋₆алкила, содержащего от 1 до 9 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома, оксо, -ОН и -CN,

-SO₂NH₂, и гетероарила,

гетероарила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из:

фтора,

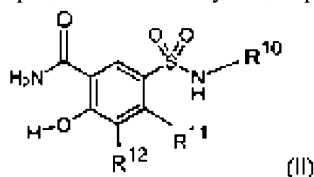
хлора,

брома,

йода,

C_{1-6} алкила,
 C_{1-6} алкила, содержащего от 1 до 9 заместителей, независимо выбранных из:
 фтора, хлора, брома, йода, оксо, -OH, -NR³¹⁰R³²⁰ и -CN, арила,
 C_{1-4} алкоксила,
 -CN,
 оксо,
 -OH,
 -COOH,
 -NO₂,
 -IMH₂, и
 SO₂NH₂,
 бициклотетероарила,
 бициклотетероарила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из:
 фтора,
 хлора,
 брома,
 йода,
 C_{1-6} алкила,
 C_{1-6} алкила, содержащего от 1 до 9 заместителей, независимо выбранных из:
 фтора, хлора, брома, йода, оксо, -OH, -COOH, -NR³¹⁰R³²⁰ и -CN,
 -C(O)OC₁₋₆алкила, циклоалкила,
 арила,
 C_{1-4} алкоксила,
 C_{1-4} алкоксила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома,
 оксо, -OH и -CN,
 -CN,
 оксо,
 -OH,
 -О-фенила,
 -COOH,
 -NO₂,
 -NH₂,
 -N(H)C₁₋₄алкила,
 -N(C₁₋₄алкила)₂,
 -N(H)-арила и
 -N(H)C(O)-арила; и R¹ и R² независимо выбраны из:
 водорода,
 C_{1-6} алкила,
 C_{1-6} алкила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора,
 оксо, -OH и -NH₂,
 фтора,
 хлора,
 брома,
 йода,
 -N(H)C₁₋₆алкила,
 -N(H)C₁₋₆алкила, содержащего от 1 до 9 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, ок-
 со, -OH, -NH₂, фенила, содержащего заместители фенила, гетероарила и содержащего заместители гете-
 роарила; где
 R³¹⁰ и R³²⁰ независимо выбраны из водорода и C₁-C₄-алкила, или R³¹⁰ и R³²⁰ вместе с азотом, к кото-
 рому они присоединены, образуют 5-6-членное гетероциклическое кольцо, содержащее до одного друго-
 го гетероатома, выбранного из кислорода и азота; или фармацевтически приемлемую соль указанного
 соединения.

Необязательно формула (I) выше представлена следующей формулой (II):

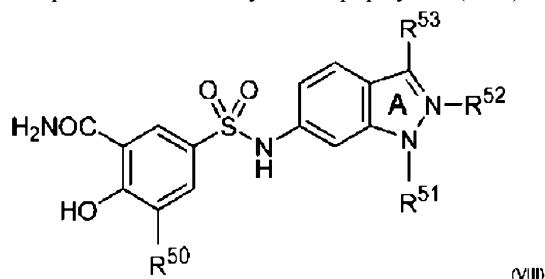


где
 R¹⁰ выбран из:
 арила,

арила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из:
 фтора,
 хлора,
 брома,
 C_{1-6} алкила,
 C_{1-6} алкила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из:
 фтора, хлора, брома, йода, оксо, C_{1-4} алкилоксила, -ОН, -COOH, и $-NR^{311}R^{321}$, циклоалкила,
 гетероарила,
 C_{1-6} алкоксила,
 C_{1-6} алкоксила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома,
 оксо, -ОН, фенила и -CN,
 -CN,
 оксо,
 -ОН,
 -О-циклоалкила,
 -О-фенила,
 -COOH,
 -NO₂,
 -NH₂,
 -N(H) C_{1-4} алкила,
 -N(H) C_{1-4} алкила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора,
 брома, оксо, -ОН и -CN,
 -N(C_{1-4} алкила)₂,
 -N(H)-арила,
 -N(H)C(O)-арила,
 -N(H)OC(O) C_{1-4} алкила,
 -N(H)C(O) C_{1-4} алкила,
 -N(H)S(O)₂ C_{1-4} алкила,
 -N(H)S(O)₂циклоалкила,
 -N(H)S(O)₂фенила,
 -SC₁₋₆алкила,
 -SC₁₋₆алкила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома,
 оксо, -ОН и -CN, и
 -SO₂NH₂, гетероарила,
 гетероарила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из:
 фтора,
 хлора,
 брома,
 йода,
 C_{1-6} алкила,
 C_{1-6} алкила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из:
 фтора, хлора, брома, йода, оксо, -ОН, $-NR^{311}R^{321}$ и -CN,
 арила,
 C_{1-4} алкоксила,
 -CN,
 оксо,
 -ОН,
 -COOH,
 -NO₂,
 -IMH₂, и
 SO₂NH₂,
 бициклогетероарила,
 бициклогетероарила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из:
 фтора,
 хлора,
 брома,
 йода,
 C_{1-6} алкила,
 C_{1-6} алкила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома,
 йода, оксо, -ОН, -COOH, $-NR^{311}R^{321}$ и -CN,
 -C(O)OC₁₋₆алкила, циклоалкила,
 арила,

C_{1-4} алкоксила,
 C_{1-4} алкоксила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома, оксо, -ОН и -CN, -CN, оксо, -ОН, -О-фенила, -COOH, -NO₂, -IMH₂, и -N(H) C_{1-4} алкила; и R¹¹ и R¹² независимо выбраны из: водорода, C_{1-6} алкила, C_{1-6} алкила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, оксо, -ОН и -NH₂, фтора, хлора, брома, йода, -N(H) C_{1-6} алкила, -N(H) C_{1-6} алкила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, оксо, -ОН, -NH₂, фенила, содержащего заместители фенила, гетероарила и содержащего заместители гетероарила; где R³¹¹ и R³²¹ независимо выбраны из водорода и C_1 - C_4 -алкила, R³¹¹ и R³²¹ вместе с азотом, к которому они присоединены, образуют 5-6-членное гетероциклическое кольцо, содержащее до одного другого гетероатома, выбранного из кислорода и азота; или включает фармацевтически приемлемую соль указанного соединения.

Необязательно соединение представлено следующей формулой (VIII):



где:

кольцо А обязательно содержит двойную связь там, где указано пунктирной линией,
 R⁵⁰ выбран из:
 водорода,
 C_{1-6} алкила,
 C_{1-6} алкила, содержащего от одного до пяти заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, оксо, -ОН и -NH₂, фтора, хлора, брома, йода, и -N(H) C_{1-6} алкила; R⁵¹ выбран из:
 водорода,
 фтора,
 хлора,
 C_{1-6} алкила,
 C_{1-6} алкила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора и -ОН,
 C_{1-6} алкоксила,
 C_{1-6} алкоксила, содержащего от 1 до 3 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома, оксо, -ОН, -CN, и фенила, -ОН и -C(O)OC C_{1-6} алкила; R⁵² отсутствует или выбран из:
 водорода,
 фтора,
 хлора,
 C_{1-6} алкила,
 C_{1-6} алкила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора и -ОН,
 C_{1-6} алкоксила,
 C_{1-6} алкоксила, содержащего от 1 до 3 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома, оксо, -ОН, -CN и фенила, -ОН и -C(O)OC C_{1-6} алкила; и R⁵³ выбран из:

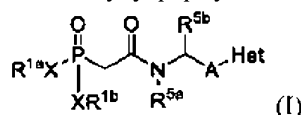
водорода,
фтора,
хлора,
C₁₋₆алкила,
C₁₋₆алкила, содержащего от 1 до 5 заместителей, независимо выбранных из: фтора и -ОН,
C₁₋₆алкоксила,
C₁₋₆алкоксила, содержащего от 1 до 3 заместителей, независимо выбранных из: фтора, хлора, брома,
оксо, -ОН, -CN и фенила,
-ОН и
-C(O)OC₁₋₆алкила;
и включает фармацевтически приемлемые соли указанного соединения; в том случае, если R⁵² не отсутствует, кольцо А не содержит двойную связь в месте, указанном пунктирной линией.

Дополнительными примерами низкомолекулярных органических агентов, которые ингибируют ферментативную активность CD73, являются агенты на основе пуринов. Например, агент, который ингибирует ферментативную активность CD73, может представлять собой соединение формулы I из WO 2015/164573, или например, любой один из следующих агентов:

(1-((5-(6-амино-2-хлор-9Н-пурин-9-ил)-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)-2-этокси-2-оксоэтил)фосфоновую кислоту;

(1-(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-амино-2-хлор-9Н-пурин-9-ил)-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)-2-этокси-2-оксоэтил)фосфоновую кислоту; или ((R)-1-(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-амино-2-хлор-9Н-пурин-9-ил)-3,4-дигидрокситетрагидрофуран-2-ил)метокси)-2-этокси-2-оксоэтил)фосфоновую кислоту; или фармацевтически приемлемую соль указанных соединений.

В дополнительных примерах низкомолекулярный органический агент, который ингибирует ферментативную активность CD73, включает молекулу формулы I из WO 2018/094148:



где
R^{1a} и R^{1b} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, необязательно содержащего заместители C₁₋₆-алкила, необязательно содержащего заместители арила, необязательно содержащего заместители -C(R^{2a}R^{2b})-арила, -C(R^{2a}R^{2b})-O-C(O)-OR³, -C(R^{2a}R^{2b})-O-C(O)R³ и -C(R^{2a}R^{2b})C(O)OR³;

необязательно группы R^{1a} и R^{1b} соединяют с образованием 5-6-членного гетероциклического кольца;

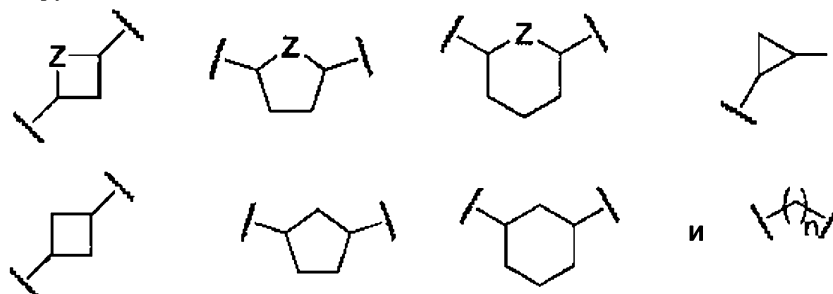
каждый из R^{2a} и R^{2b} независимо выбран из группы, состоящей из H и необязательно содержащего заместители C₁₋₆-алкила;

каждый из R³ независимо выбран из группы, состоящей из H, C₁₋₆-алкила, C₁₋₄-алкокси(C₁₋₄алкила и необязательно содержащего заместители арила);

R^{5a} и R^{5b} независимо выбраны из группы, состоящей из H, необязательно содержащего заместители C₁₋₆-алкила, -C(O)OR³, C₃₋₆-циклоалкил(C₁₋₆-алкила, арил(C₁₋₆-алкила, C₃₋₆-циклоалкила и арила);

каждый X выбран из группы, состоящей из O, N и S;

A выбран из группы, состоящей из:



каждый из которых необязательно содержит в качестве заместителей от 1 до 5 заместителей R⁶, и где подстрочный индекс n представляет собой целое число от 0 до 3;

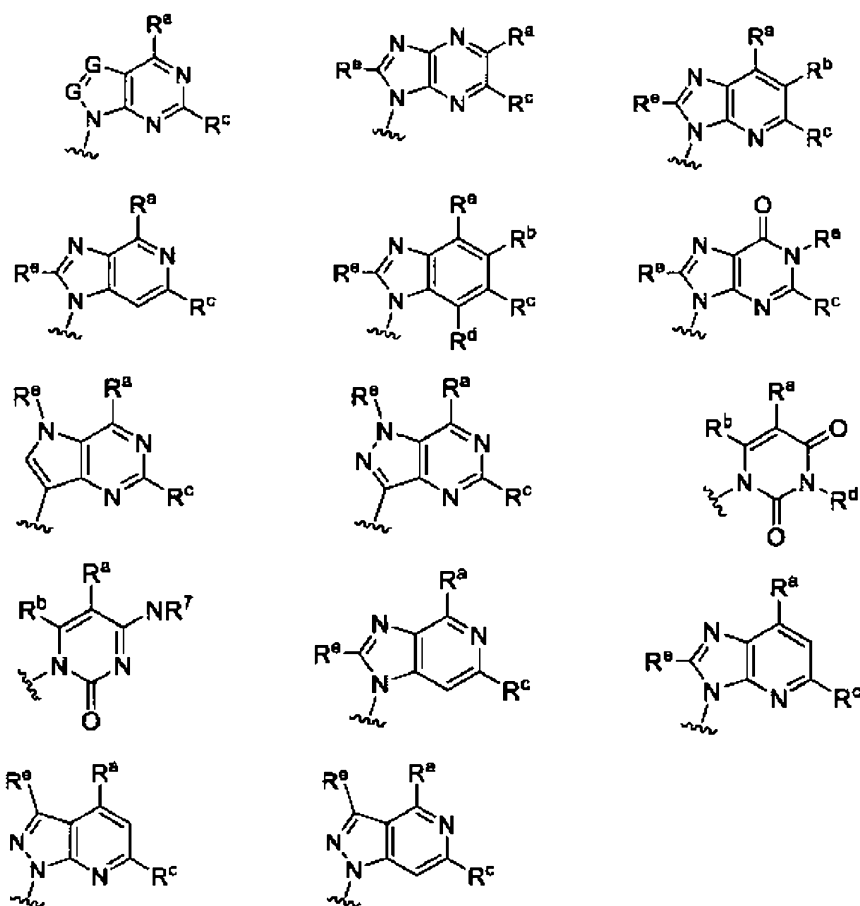
Z выбран из группы, состоящей из NH, NR⁶ и O;

каждый из R⁶ независимо выбран из группы, состоящей из CH₃, OR^g, CN, F и

необязательно содержащего заместители C₁₋₆-алкила; или две группы R⁶ на соседних вершинах кольца необязательно соединены с образованием 5-6-членного кольца, содержащего по меньшей мере один гетероатом в качестве вершины кольца;

и

Het выбран из группы, состоящей из:



где волнистая линия указывает на точку присоединения остальной части соединения, где каждый G, когда он присутствует, независимо выбран из группы, состоящей из N и CR^e , и где:

R^a выбран из группы, состоящей из H, NH_2 , NHR^{7a} , $NHC(O)R^{7a}$, $NR^{7a}R^{7b}$, R^{7a} , OH, SR^{7a} и OR^{7a} ;

R^b выбран из группы, состоящей из H, галогена, NH_2 , NHR^{7a} , $NR^{7a}R^{7b}$, R^{7a} , OH и

R^c и R^d независимо выбраны из группы, состоящей из H, галогена, галогеналкила, NH_2 , NHR^{7a} , $NR^{7a}R^{7b}$, R^{7a} , OH, OR^{7a} , SR^{7a} , SO_2R^{7a} , $-X^1NH_2$, $-X^1NHR^{7a}$, $-X^1NR^{7a}R^{7b}$, $-X^1OH$, $-X^1OR^{7a}$, $-X^1SR^{7a}$ и $-X^1SO_2R^{7a}$;

каждый из R^e независимо выбран из группы, состоящей из H, галогена и необязательно содержащего заместители C_1 - C_6 -алкила;

каждый из R^f независимо выбран из группы, состоящей из H и $-C(O)-C_1$ - C_6 -алкила;

каждый X^1 представляет собой C_1 - C_4 -алкилен; и

каждый из R^{7a} и R^{7b} независимо выбран из группы, состоящей из необязательно содержащего заместители C_1 - C_{10} -алкила, необязательно содержащего заместители C_2 - C_{10} -алкенила, необязательно содержащего заместители C_2 - C_{10} -алкинила, необязательно содержащего заместители C_3 - C_7 -циклоалкила, необязательно содержащего заместители C_3 - C_7 -циклоалкил(C_1 - C_4)алкила, необязательно содержащего заместители 4-7-членного циклогетероалкила, необязательно содержащего заместители 4-7-членного циклогетероалкил(C_1 - C_4)алкила, необязательно содержащего заместители арила, необязательно содержащего заместители арил(C_1 - C_4)алкила, необязательно содержащего заместители арил(C_2 - C_4)алкенила, необязательно содержащего заместители арил(C_2 - C_4)алкинила, необязательно содержащего заместители гетероарила, необязательно содержащего заместители гетероарил(C_1 - C_4)алкила, необязательно содержащего заместители гетероарил(C_1 - C_4)алкенила и необязательно содержащего заместители гетероарил(C_2 - C_4)алкинила; или R^{7a} и R^{7b} , когда они присоединены к одному атому азота, необязательно соединены с образованием 4-7-членного гетероциклического кольца, необязательно конденсированного с арильным кольцом.

Получение антител.

Антитела против CD73 и против CD39 можно получить с помощью любой из различных методик, известных в данной области. Обычно, их получают путем иммунизации отличного от человека животного, например, мыши, иммуногеном, содержащим полипептид CD73 или CD39, соответственно, или путем скрининга библиотеки кандидатных связывающих доменов с помощью полипептида CD73 или CD39. Полипептид CD39 или CD73 может содержать полноразмерную последовательность полипептида CD39 или CD73 человека, соответственно, или ее фрагмент или производное, необязательно иммуногенный фрагмент, т.е. часть полипептида, содержащую эпитоп, выставленный на поверхность клеток, экспрессирующих полипептид CD39 или CD73. Такие фрагменты обычно содержат по меньшей мере при-

близительно 7 последовательных аминокислот последовательности зрелого полипептида, еще более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 10 последовательных аминокислот из него. Фрагменты обычно по существу получены из внеклеточного домена рецептора. В одном варианте реализации иммуноген включает человеческий полипептид CD39 или CD73 дикого типа в липидной мембране, обычно на поверхности клетки. В конкретном варианте реализации иммуноген включает интактные клетки, в частности, интактные клетки человека, необязательно обработанные или лизированные. В другом варианте реализации полипептид представляет собой рекомбинантный полипептид CD39 или CD73.

Этап иммунизации отличного от человека млекопитающего антигеном можно осуществить любым способом стимулирования продукции антител у мышей, хорошо известным в данной области (см., например, E. Harlow и D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Колд Спринг Харбор, Нью-Йорк (1988), описание которого полностью включено в данное изобретение посредством ссылки). Иммуноген суспендируют или растворяют в буфере, необязательно с адъювантом, таким как полный или неполный адъювант Фрейнда. Способы определения количества иммуногена, типов буферов и количеств адъюванта хорошо известны специалистам в данной области и ни коим образом не являются ограничивающими. Данные параметры могут различаться для различных иммуногенов, но их можно легко установить.

Аналогично, место введения и частота иммунизаций, достаточная для стимуляции продукции антител, также хорошо известны в данной области. В обычном протоколе иммунизации отличным от человека животным вводят путем интраперитонеальной инъекции антиген в день 1 и еще раз приблизительно через неделю. Затем следуют повторные инъекции антигена около дня 20, необязательно с адъювантом, таким как неполный адъювант Фрейнда. Повторные инъекции проводят внутривенно и могут повторять в течение нескольких последовательных дней. Затем следует бустер-инъекция в день 40, либо внутривенно, либо интраперитонеально, обычно без адъюванта. Данный протокол приводит к продукции антигенспецифических продуцирующих антитела В-клеток приблизительно через 40 дней. Другие протоколы также можно применять при условии, что они приводят к продукции В-клеток, экспрессирующих антитело, направленное против антигена, применяемого для иммунизации.

Для получения моноклональных антител выделяют спленоциты из иммунизированного отличного от человека млекопитающего с последующим слиянием данных спленоцитов с иммортализованной клеткой, чтобы получить продуцирующую антитела гибридому. Выделение спленоцитов из отличного от человека млекопитающего хорошо известно в данной области и обычно включает удаление селезенки из обезболенного отличного от человека млекопитающего, ее разрезание на маленькие кусочки и выдавливание спленоцитов из капсулы селезенки через нейлоновую сетку клеточного сита в подходящий буфер, чтобы получить суспензию отдельных клеток. Клетки промывают, центрифугируют и ресуспендируют в буфере, который лизирует все красные кровяные клетки. Полученный раствор снова центрифугируют и оставшиеся в осадке лимфоциты, наконец, ресуспендируют в свежем буфере.

После выделения и получения суспензии отдельных клеток лимфоциты можно слить с иммортализованной линией клеток. Такая линия клеток обычно представляет собой линию клеток миеломы мыши, хотя множество других иммортализованных линий клеток, пригодных для создания гибридомы, известны в данной области. Линии клеток миеломы мыши включают, но не ограничены линиями клеток, полученными из опухолей мыши MOPC-21 и MPC-11, доступных от Salk Institute Cell Distribution Center, Сан-Диего, США, клетками X63 Ag8653 и SP-2, доступными от American Type Culture Collection, Роквилл, Мэриленд, США. Слияние осуществляют, применяя полиэтиленгликоль или тому подобные агенты. Полученные в результате этого гибридомы затем выращивают в селективных средах, которые содержат одно или более веществ, которые ингибируют рост или выживаемость неслитых, исходных клеток миеломы. Например, если в исходных клетках миеломы отсутствует фермент гипоксантингуанинфосфотрибузилтрансфераза (HGPRT или HPRT), то культуральная среда для гибридомы, как правило, будет содержать гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), указанные вещества предотвращают рост лишенных HGPRT клеток.

Гибридомы обычно выращивают на питающем (фидерном) слое макрофагов. Макрофаги предпочтительно получают из того же помета, что и отличное от человека млекопитающее, используемое для выделения спленоцитов, и обычно примируют неполным адъювантом Фрейнда или тому подобным агентом за несколько дней до посева гибридом. Способы слияния описаны в Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", стр. 59-103 (Academic Press, 1986), описание которого включено в данное изобретение посредством ссылки.

Клеткам позволяют расти в селективных средах в течение достаточного времени для образования колоний и продукции антител. Обычно этот промежуток времени составляет от приблизительно 7 до приблизительно 14 дней.

Затем анализируют продукцию колониями гибридомы антител, которые специфично связываются с продуктами гена полипептида CD39 или CD73. Анализ, как правило, представляет собой колориметрический анализ типа ELISA, хотя можно применять любой анализ, который можно приспособить для использования лунок, в которых выращивают гибридомы. Другие способы анализа включают радиоиммунанализ или сортировку клеток с возбуждением флуоресценции. Лунки, положительные по продукции

желательного антитела, исследуют, чтобы определить, присутствует ли одна или несколько различных колоний. Если присутствует более одной колонии, то клетки можно повторно клонировать и вырастить, чтобы удостовериться в том, что только одна клетка дала начало колонии, продуцирующей желательное антитело. Как правило, также будут исследовать способность антител связываться с полипептидами CD39 или CD73, например, с экспрессирующими CD39 или CD73 клетками.

Гибридомы, для которых подтвердили продукцию моноклонального антитела, можно нарастить в больших количествах в подходящей среде, такой как DMEM или RPMI-1640. В качестве альтернативы, клетки гибридомы можно растить *in vivo* в виде асцитных опухолей у животного.

После роста, достаточного для продукции желательного моноклонального антитела, ростовые среды, содержащие моноклональное антитело (или асцитную жидкость), отделяли от клеток и очищали присутствующее в них моноклональное антитело. Очистку обычно осуществляют путем электрофореза в геле, диализа, хроматографии с применением сефарозы с белком А или белком G или Ig против мыши, связанного с твердой подложкой, такой как гранулы агарозы или сефарозы (все способы описаны, например, в *Antibody Purification Handbook*, Biosciences, публикация № 18-1037-46, издание АС, описание которой настоящим включено посредством ссылки). Связанное антитело обычно элюируют с колонок с белком А/белком G, применяя буферы с низким pH (глициновый или ацетатный буферы с pH 3,0 или менее), с незамедлительной нейтрализацией содержащих антитела фракций. Данные фракции объединяют, диализируют и концентрируют при необходимости.

Положительные лунки с одной видимой колонией обычно повторно клонируют и повторно анализируют, чтобы убедиться, что детектировали и получили только одно моноклональное антитело.

Антитела также можно получить путем селекции из комбинаторных библиотек иммуноглобулинов, как описано, например, в Ward и др. *Nature*, 341 (1989), стр. 544, описание которого полностью включено в данное изобретение посредством ссылки.

Идентификация одного или более антител, которые связываются с интересующим антигеном, т.е. CD39 или CD73, в частности, практически или по существу с таким же эпитопом, как у моноклонального антитела 11E1, 8C7 или 6E1 по отношению к CD73, или, в частности, практически или по существу с таким же эпитопом, как у моноклонального антитела I-394, I-395, I-396 или I-399 по отношению к CD39, можно легко определить, применяя любой один из различных анализов методом иммунологического скрининга, в которых можно оценить конкурирование антител. Множество таких способов анализа широко применяются и хорошо известны в данной области (см., например, патент США № 5660827, опубликованный 26 августа 1997 г., который конкретно включен в данное изобретение посредством ссылки). Очевидно, что фактическое определение эпитопа, с которым связывается антитело, описанное в данном изобретении, не требуется никоим образом для идентификации антитела, которое связывается с тем же или по существу тем же эпитопом, что и моноклональное антитело, описанное в данном изобретении.

Например, когда тестируемые антитела для исследования получают из различных животных источников, или когда они даже различных изотипов Ig, можно применять простой конкурентный анализ, в котором контрольное (I-394, I-395, I-396 или I-399, например) и тестируемые антитела смешивают (или заранее адсорбируют) и наносят на образец, содержащий полипептиды CD39 или CD73. Протоколы на основе вестерн-блоттинга и использования анализа BIACORE подходят для применения в таких конкурентных исследованиях.

В некоторых вариантах реализации предварительно смешивают контрольные антитела (например, I-394, I-395, I-396 или I-399, например) с различными количествами тестируемых антител (например, приблизительно 1:10 или приблизительно 1:100) в течение некоторого периода времени перед нанесением на образец антигена CD39. В других вариантах реализации контрольное и различные количества тестируемых антител можно просто смешать в процессе контакта с образцом антигена CD39. При условии, что можно отличить связанные антитела от свободных (например, применяя методики разделения или промывки, чтобы удалить несвязанные антитела) и I-394, I-395, I-396 или I-399 от тестируемых антител (например, применяя видоспецифические или специфические к изотипу вторичные антитела или путем специфического мечения I-394, I-395, I-396 или I-399 детектируемой меткой), можно определить, уменьшают ли тестируемые антитела связывание I-394, I-395, I-396 или I-399 с антигенами, что означает, что тестируемое антитело конкурирует за связывание с тем же сайтом на CD39, что и I-394, I-395, I-396 или I-399. Связывание (меченых) контрольных антител в отсутствие полностью неродственного антитела может служить в качестве контрольного наибольшего значения. Контрольное наименьшее значение можно получить путем инкубации меченых (I-394, I-395, I-396 или I-399) антител с немечеными антителами точно такого же типа (I-394, I-395, I-396 или I-399), при этом будет происходить конкурирование и уменьшать связывание меченых антител. В экспериментальном анализе значимое снижение реакционной способности меченого антитела в присутствии тестируемого антитела указывает на то, что тестируемое антитело распознает по существу такой же эпитоп, т.е. оно "вступает в перекрестную реакцию" или конкурирует с меченым (I-394, I-395, I-396 или I-399) антителом. Любое тестируемое антитело, которое уменьшает связывание I-394, I-395, I-396 или I-399 с антигенами CD39 по меньшей мере приблизительно на 50%, например, по меньшей мере приблизительно на 60% или более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80 или 90% (например, приблизительно на 65-100%) при любом отношении I-

394, I-395, I-396 или I-399: тестируемое антитело от приблизительно 1:10 до приблизительно 1:100, считают антителом, которое конкурирует за связывание по существу с таким же эпитопом или детерминантой, что и I-394, I-395, I-396 или I-399. Предпочтительно, такое тестируемое антитело будет уменьшать связывание I-394, I-395, I-396 или I-399 с антигеном CD39 по меньшей мере приблизительно на 90% (например, приблизительно на 95%).

Конкурирование также можно оценить, например, с помощью анализа методом проточной цитометрии. В таком анализе клетки, несущие данный полипептид CD39, можно инкубировать сначала с I-394, I-395, I-396 или I-399 (или для полипептида CD73 - инкубировать с 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1), например, а затем с тестируемым антителом, меченым флуорохромом или биотином. Говорят, что антитело конкурирует с I-394, I-395, I-396 или I-399, если связывание, полученное после предварительной инкубации с насыщающим количеством I-394, I-395, I-396 или I-399, составляет приблизительно 80%, предпочтительно приблизительно 50%, приблизительно 40% или менее (например, приблизительно 30, 20 или 10%) от связывания (измеренного по флуоресценции), полученного для антитела без предварительной инкубации с I-394, I-395, I-396 или I-399. В качестве альтернативы, говорят, что антитело конкурирует с I-394, I-395, I-396 или I-399, если связывание, полученное с меченым антителом I-394, I-395, I-396 или I-399 (измеренное с помощью флуорохрома или биотина) на клетках, предварительно инкубированных с насыщающим количеством тестируемого антитела, составляет приблизительно 80%, предпочтительно приблизительно 50%, приблизительно 40% или менее (например, приблизительно 30, 20 или 10%) от связывания, полученного без предварительной инкубации с тестируемым антителом.

Также можно применять простой конкурентный анализ, в котором тестируемое антитело заранее адсорбируют и наносят при насыщающей концентрации на поверхность, на которой иммобилизован антиген CD39 (или CD73 для антител против CD73). В простом конкурентном анализе поверхность предпочтительно представляет собой чип BIACORE (или другие среды, подходящие для анализа методом поверхностного плазмонного резонанса). Контрольное антитело (например, I-394, I-395, I-396 или I-399) затем приводят в контакт с поверхностью при насыщающей концентрации CD39 и с CD39 и измеряют связывание с поверхностью контрольного антитела. Это связывание контрольного антитела сравнивают со связыванием контрольного антитела с содержащей CD39 поверхностью в отсутствие тестируемого антитела. В экспериментальном анализе значимое снижение связывания контрольного антитела с содержащей CD39 поверхностью в присутствии тестируемого антитела может свидетельствовать о том, что тестируемое антитело конкурирует за связывание с той же детерминантой или эпитопом, что и контрольное антитело, так что тестируемое антитело "вступает в перекрестную реакцию" с контрольным антителом. Любое тестируемое антитело, которое уменьшает связывание контрольного (такого как I-394, I-395, I-396 или I-399) антитела с антигеном CD39 по меньшей мере приблизительно на 30% или более, предпочтительно приблизительно на 40%, можно считать антителом, которое связывается по существу с тем же эпитопом или детерминантой, что и контрольное антитело (например, I-394, I-395, I-396 или I-399). Предпочтительно, такое тестируемое антитело будет уменьшать связывание контрольного антитела (например, I-394, I-395, I-396 или I-399) с антигеном CD39 по меньшей мере приблизительно на 50% (например, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 70% или более). Должно быть очевидно, что порядок контрольного и тестируемых антител может быть обратным: то есть, сначала можно связать с поверхностью контрольное антитело, а затем привести в контакт с поверхностью тестируемое антитело в конкурентном анализе. Предпочтительно, антитело с более высокой аффинностью к антигену CD73 связывают с поверхностью первым, так как будут ожидать, что снижение связывания, наблюдаемое для второго антитела (предположительно антитела дают перекрестную реакцию), будет большей величины. Дополнительные примеры таких способов анализа предложены, например, в Saunal (1995) *J. Immunol. Methods* 183: 33-41, описание которого включено в данное изобретение посредством ссылки.

В одном варианте реализации антитела проверяют в иммуноанализе, чтобы протестировать их способность связываться, соответственно, с экспрессирующими CD39 или CD73 клетками. Например, берут образец крови или проводят биопсию опухоли и собирают опухолевые клетки или инфильтрирующие опухоль клетки. Способность данного антитела связываться с клетками затем оценивают, применяя стандартные способы, хорошо известные специалистам в данной области. Антитела могут связываться, например, со значительной частью (например, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80% или более) клеток, которые, как известно, экспрессируют, соответственно, CD39 или CD73, например, опухолевых клеток, из значительного процента индивидов или пациентов (например, 10, 20, 30, 40, 50% или более). Антитела можно применять в целях диагностики, чтобы определить присутствие или уровень злокачественных клеток у пациента, например, в качестве биомаркера, чтобы оценить, подходит ли пациент для лечения агентом против CD73 или для применения в описанных в данном изобретении терапевтических способах. Для того чтобы оценить связывание антител с клетками, антитела можно либо непосредственно, либо опосредованно пометить. При опосредованном мечении обычно добавляют вторичное меченое антитело.

Определение того, связывается ли антитело в пределах области эпитопа, можно осуществить способами, известными специалисту в данной области. В качестве одного примера таких способов картирования/определения строения, область эпитопа антитела против CD73 или против CD39 можно определить с

помощью способа "отпечатка подошвы" эпитопа, используя химическую модификацию выставленных аминов/карбоксилатов в соответствующем белке CD73 или CD39. Одним конкретным примером такой методики отпечатка подошвы является применение HXMS (водородно-дейтериевого обмена, детектируемого с помощью масс-спектрометрии), при котором происходит обмен водорода на дейтерий в протонах амида белка рецептора и лиганда, связывание и обратный обмен, причем амидные группы остова, участвующие в связывании белка, защищены от обратного обмена и, следовательно, остаются дейтерированными. Соответствующие участки на данном этапе можно детектировать с помощью пепсинового протеолиза, разделения с помощью быстрой микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии и/или масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением. См., например, Ehring H, *Analytical Biochemistry*, том 267 (2), стр. 252-259 (1999) Engen, J. R. и Smith, D. L. (2001) *Anal. Chem.* 73, 256A-265A. Другим примером подходящей методики идентификации эпитопа является картирование эпитопа с помощью ядерного магнитного резонанса (ЯМР), в котором обычно сравнивают положение сигналов на двумерных спектрах ЯМР свободного антигена и антигена в комплексе со связывающим антиген пептидом, таким как антитело. Антиген обычно селективно метят изотопом ^{15}N так, что в спектре ЯМР видны только сигналы, соответствующие антигену, и не видны сигналы от связывающего антиген пептида. Положение сигналов антигена, происходящих от аминокислот, участвующих во взаимодействии со связывающим антиген пептидом, как правило, будет сдвигаться в спектре комплекса по сравнению со спектром свободного антигена, и таким способом можно обнаружить аминокислоты, участвующие в связывании. См., например, Ernst Schering Res Found Workshop. 2004; (44): 149-67; Huang и др., *Journal of Molecular Biology*, том 281 (1), стр. 61-67 (1998); и Saito и Patterson, *Methods.*, июнь, 1996; 9 (3): 516-24.

Картирование/определение строения эпитопов также можно осуществить, применяя способы масс-спектрометрии. См., например, Downard, *J Mass Spectrom.*, апрель 2000; 35 (4): 493-503 и Kiselar и Downard, *Anal Chem.*, 1 мая 1999; 71 (9): 1792-1801. Методики расщепления протеазами также могут быть полезны в контексте картирования и идентификации эпитопов. Соответствующие антигенной детерминанте области/последовательности можно определить путем расщепления протеазами, например, путем применения трипсина в отношении приблизительно 1:50 к CD73 или расщепления в течение ночи при pH 7-8, с последующим анализом методом масс-спектрометрии (МС) для идентификации пептида. Пептиды, защищенные от расщепления трипсином связывающим CD73 или CD39 веществом, впоследствии можно идентифицировать путем сравнения образцов, подвергнутых расщеплению трипсином, и образцов, инкубированных с антителом, а затем подвергнутых расщеплению, например, трипсином (тем самым выявляя область узнавания связывающим веществом). Другие ферменты, такие как химотрипсин, пепсин и т.д., также или в качестве альтернативы можно применять в аналогичных способах определения эпитопа. Более того, ферментативное расщепление может служить быстрым способом анализа того, находится ли последовательность потенциальной антигенной детерминанты внутри участка полипептида CD73 или CD39, который не выставлен на поверхность, и, соответственно, наиболее вероятно не важен с точки зрения иммуногенности/антигенности.

Сайт-направленный мутагенез является другой методикой, пригодной для выявления связывающегося эпитопа. Например, при "сканировании аланином" каждый остаток во фрагменте белка заменяют на остаток аланина и измеряют последствия для аффинности связывания. Если мутация приводит к значимому снижению аффинности связывания, то данный остаток наиболее вероятно участвует в связывании. Моноклональные антитела, специфические к структурным эпитопам (т.е. антитела, которые не связываются с развернутым белком), можно применять для проверки того, что замена на аланин не влияет общую укладку белка. См., например, Clackson и Wells, *Science* 1995; 267:383-386; и Wells, *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:1-6.

Электронную микроскопию также можно применять для определения "отпечатка подошвы" эпитопа. Например, Wang и др., *Nature* 1992; 355:275-278 использовали скоординированное применение криоэлектронной микроскопии, реконструирования трехмерных изображений и рентгеноструктурный анализ, чтобы определить физическую область узнавания Fab-фрагментом на поверхности капсида нативного вируса мозаики коровьего гороха.

Другие виды анализа "без мечения" для оценки эпитопа включают поверхностный плазмонный резонанс (ППР, BIACORE) и рефлектометрическую интерференционную спектроскопию (РИС). См., например, Fägerstam и др., *Journal Of Molecular Recognition* 1990;3:208-14; Nice и др., *J. Chroma-togr.* 1993; 646:159-168; Leipert и др., *Angew. Chem. Int. изд.* 1998; 37:3308-3311; Kröger и др., *Biosensors and Bioelectronics* 2002; 17:937-944.

Также следует отметить, что антитело, связывающее тот же или по существу тот же эпитоп, что и некоторое антитело, можно обнаружить в одном или более приведенных в качестве примера конкурентных анализах, описанных в данном изобретении.

Обычно, антитело против CD73 или против CD39, предложенное в данном изобретении, обладает аффинностью к соответствующему полипептиду CD73 (например, в виде гомодимера CD73) или CD39 в диапазоне от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^{11} M^{-1} (например, от приблизительно 10^8 до приблизительно 10^{10} M^{-1}).

Например, в конкретном аспекте предложено антитело против CD73 или против CD39, проявляю-

щее среднюю константу диссоциации (K_D) менее 1×10^{-9} М по отношению к CD73 или CD39, соответственно, что определяют с помощью, например, скрининга методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (например, с помощью анализа на аналитическом устройстве SPR BIAcore™). В более конкретном типичном аспекте предложены антитела против CD73 или против CD39, проявляющие K_D от приблизительно 1×10^{-8} М до приблизительно 1×10^{-10} М, или от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-11} М, от CD73 или CD39, соответственно. В одном варианте реализации связывание представляет собой моновалентное связывание. В одном варианте реализации связывание представляет собой бивалентное связывание.

Антитела можно охарактеризовать, например, по средней K_D , не более чем приблизительно (т.е. лучшей аффинности) 100, 60, 10, 5 или 1 наномолярной, предпочтительно субнаномолярной или в некоторых случаях не более чем приблизительно 500, 200, 100 или 10 пикомолярной. K_D можно определить, например, путем иммобилизации полученных рекомбинантным способом белков CD73 человека или CD39 на поверхности микрочипа, а затем нанесения антитела, которое нужно исследовать, в растворе. В одном варианте реализации способ дополнительно включает этап селекции антител из (b), которые способны конкурировать за связывание с CD73 с антителом 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1 или которые способны конкурировать за связывание с CD39 с антителом I-394, I-395, I-396 или I-399.

В одном аспекте любого из вариантов реализации антитела, полученные в соответствии с настоящими способами, представляют собой моноклональные антитела. В другом аспекте отличное от человека животное, используемое для получения антитела согласно способам, описанным в данном изобретении, представляет собой млекопитающее, такое как грызун, крупный рогатый скот, свинья, домашняя птица, верблюдовое, лошадь, кролик, коза или овца.

ДНК, кодирующую антитело, которое связывает эпитоп, присутствующий на полипептиде CD73 или CD39, выделяют из гибридомы и помещают в подходящий вектор экспрессии для трансфекции подходящего хозяина. Хозяина затем используют для рекомбинантной продукции антитела, или его вариантов, таких как гуманизированный вариант данного моноклонального антитела, активные фрагменты антитела, химерные антитела, содержащие участок распознавания антигена из антитела, или варианты, содержащие детектируемую молекулу.

ДНК, кодирующую моноклональные антитела согласно настоящему описанию, например, антитело I-394, I-395, I-396 или I-399, 11E1, 8C7, 3C12 или 6E1, можно легко выделить и секвенировать, применяя обычные процедуры (например, применяя олигонуклеотидные зонды, которые способны специфично связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антител мыши). После выделения ДНК можно поместить в векторы экспрессии, которыми затем трансфицируют клетки-хозяева, такие как клетки *E.coli*, клетки обезьян COS, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки миеломы, которые в противном случае не продуцируют белок иммуноглобулина, чтобы добиться синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. В других местах настоящего изобретения описано, что такие последовательности ДНК можно модифицировать для любой из большого числа целей, например, для гуманизирования антител, продуцирующих фрагменты или производные, или для модификации последовательности антитела, например, в сайте связывания антигена, чтобы оптимизировать специфичность связывания антитела. Рекомбинантная экспрессия в бактериях ДНК, кодирующей антитело, хорошо известна в данной области (см., например, Skerra и др., *Curr. Opin. in Immunol.*, 5, стр. 256 (1993); и Pluckthun, *Immunol.* 130, стр. 151 (1992)).

Фрагменты и производные антител (которые входят в объем термина "антитело" или "антитела", используемого в данном описании, если не указано иное или нет явных противоречий с контекстом) можно получить с помощью методик, которые известны в данной области. "Фрагменты" включают часть интактного антитела, как правило, сайт связывания антигена или вариабельную область. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ и Fv; диатела; любой фрагмент антитела, который представляет собой полипептид, имеющий первичную структуру, состоящую из одной непрерывной последовательности смежных аминокислотных остатков (называемую в данном изобретении "одноцепочечным фрагментом антитела" или "одноцепочечным полипептидом"), включая, без ограничения, (1) молекулы одноцепочечного Fv, (2) одноцепочечные полипептиды, содержащие только один вариабельный домен легкой цепи, или его фрагмент, который содержит три CDR вариабельного домена легкой цепи, без связанной с ними молекулы тяжелой цепи, и (3) одноцепочечные полипептиды, содержащие только одну вариабельную область тяжелой цепи или ее фрагмент, содержащий три CDR вариабельной области тяжелой цепи, без связанной с ними молекулы легкой цепи; и мультиспецифические (например, биспецифические) антитела, образованные из фрагментов антител. Включены, среди прочего, нанотело, доменное антитело, однодоменное антитело или "dAb".

В одном аспекте агент представляет собой антитело, выбранное из полностью человеческого антитела, гуманизированного антитела и химерного антитела.

В одном аспекте агент представляет собой фрагмент антитела, содержащий константный домен, выбранный из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В одном аспекте агент представляет собой фрагмент антитела, выбранный из фрагмента Fab, фрагмента Fab', фрагмента Fab'-SH, фрагмента F(ab)₂, фрагмента F(ab')₂,

фрагмента Fv, тяжелой цепи Ig (Ig ламы или верблюда), фрагмента V_{HH}, однодоменного FV и одноцепочечного фрагмента антитела. В одном аспекте агент представляет собой синтетическую или полусинтетическую полученную из антитела молекулу, выбранную из scFV, dsFV, минитела, диатеда, триатеда, кап-патеда, IgNAR и мультиспецифического антитела. В одном аспекте антитело находится в по меньшей мере частично очищенной форме. В одном аспекте антитело находится в по существу выделенной форме.

Агент против CD39 или против CD73, такой как антитело, можно включить в фармацевтический состав, включая концентрацию от 1 мг/мл до 500 мг/мл, причем pH указанного состава составляет от 2,0 до 10,0. Указанный состав может дополнительно содержать буферную систему, консервант(ы), агент(ы), регулирующий(е) тоничность, хелатирующий(е) агент(ы), стабилизаторы и поверхностно-активные вещества. В одном варианте реализации фармацевтический состав представляет собой водный состав, т.е. состав, содержащий воду. Такой состав обычно представляет собой раствор или суспензию. В дополнительном варианте реализации фармацевтический состав представляет собой водный раствор. Термин "водный состав" описывает состав, содержащий по меньшей мере 50% по массе воды. Аналогичным образом, термин "водный раствор" описывает раствор, содержащий по меньшей мере 50% по массе воды, и термин "водная суспензия" описывает суспензию, содержащую по меньшей мере 50% по массе воды.

В другом варианте реализации фармацевтический состав представляет собой лиофилизированный состав, в который врач или пациент добавляет растворители и/или разбавители перед применением.

В другом варианте реализации фармацевтический состав представляет собой высушенный состав (например, лиофилизированный или высушенный распылением), готовый для применения без какого-либо предварительного растворения.

В дополнительном аспекте фармацевтический состав содержит водный раствор такого антитела и буфер, причем антитело присутствует в концентрации от 1 мг/мл или выше, и причем pH указанного состава составляет от приблизительно 2,0 до приблизительно 10,0.

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

В дополнительном варианте реализации буфер выбран из группы, состоящей из ацетата натрия, карбоната натрия, цитрата, глицилглицина, гистидина, глицина, лизина, аргинина, однозамещенного фосфата натрия, двузамещенного фосфата натрия, фосфата натрия и трис(гидроксиметил)аминометана, бицина, трицина, яблочной кислоты, сукцината, малеиновой кислоты, фумаровой кислоты, винной кислоты, аспарагиновой кислоты или их смеси. Каждый из данных конкретных буферов составляет альтернативный вариант реализации настоящего изобретения.

В дополнительном варианте реализации состав дополнительно содержит фармацевтически приемлемый консервант. В дополнительном варианте реализации состав дополнительно содержит изотонический агент. В дополнительном варианте реализации состав также содержит хелатирующий агент. В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения состав дополнительно содержит стабилизатор. В дополнительном варианте реализации состав дополнительно содержит поверхностно-активное вещество. Для удобства можно сослаться на Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19-е издание, 1995.

Возможно, что в пептидном фармацевтическом составе согласно настоящему изобретению могут присутствовать другие ингредиенты. Такие дополнительные ингредиенты могут включать смачивающие агенты, эмульгаторы, антиоксиданты, наполнители, модификаторы тоничности, хелатирующие агенты, ионы металлов, маслянистые среды, белки (например, человеческие сывороточный альбумин, желатин или белки) и цвиттер-ион (например, аминокислоту, такую как бетаин, таурин, аргинин, глицин, лизин и гистидин). Такие дополнительные ингредиенты, конечно, не должны нежелательно влиять на общую стабильность фармацевтического состава согласно настоящему изобретению.

Введение фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению можно осуществить несколькими путями введения, например, внутривенным. Подходящие составы с антителами также можно определить, изучая опыт с другими уже разработанными терапевтическими моноклиральными антителами. Некоторые моноклональные антитела, эффективность которых была показана в клинических условиях, таких как ритуксан (ритуксимаб), герцептин (трастузумаб), ксолар (омализумаб), бекскасар (тозитумаб), кэмпас (алемтузумаб), зевалин, онколим, и аналогичные составы можно применять с антителами согласно настоящему изобретению.

Также предложены наборы, которые содержат фармацевтическую композицию, содержащую антитело против CD39, антитело против CD73 и фармацевтически приемлемый носитель, в терапевтически эффективном количестве, пригодном для применения в описанных выше способах. Указанные наборы необязательно также могут содержать инструкции, например, содержащие режимы применения, чтобы позволить практикующему клиницисту (например, врачу, медицинской сестре или пациенту) вводить композицию, содержащуюся в нем, чтобы вводить указанную композицию пациенту, имеющему рак (например, солидную опухоль). Набор также может содержать шприц.

Необязательно наборы содержат множество упаковок с однократными фармацевтическими компо-

зияциями, каждая из которых содержит эффективное количество антитела против CD39 или против CD73 для однократного введения в соответствии со способами, предложенными выше. Инструменты или устройства, необходимые для введения фармацевтической(их) композиции(ий), также могут содержаться в наборах. Например, в наборе могут быть предоставлены один или более предварительно наполненных шприцев, содержащих некоторое количество антитела против CD39, и шприцев, содержащих некоторое количество антитела против CD73, или шприцев, содержащих количества обоих антител против CD39 и против CD73.

В одном варианте реализации в соответствии с настоящим изобретением предложен набор для лечения рака у пациента-человека, указанный набор содержит:

(а) дозу антитела против CD39, которое нейтрализует активность pCD39, необязательно при этом указанное антитело содержит гипервариабельный участок (например, домены CDR1, CDR2 и CDR3) вариабельной области тяжелой цепи антитела I-394, I-395, I-396 или I-399 и гипервариабельный участок (например, домены CDR1, CDR2 и CDR3) вариабельной области легкой цепи антитела I-394, I-395, I-396 или I-399;

(b) дозу агента, который связывает CD73 и который нейтрализует активность CD73, необязательно при этом указанный агент представляет собой антитело против CD73; и

(с) необязательно инструкции по применению антитела против CD39 и связывающего агента CD73 в любом из способов, описанных в данном изобретении.

Диагностика, прогнозирование и лечение злокачественных новообразований.

Описаны способы, полезные для диагностики, прогнозирования, мониторинга, лечения и предотвращения рака у индивида. Хотя схемы лечения и способы, описанные в данном изобретении, особенно полезны для лечения солидных опухолей, схемы лечения и способы, описанные в данном изобретении, также можно применять для лечения различных гематологических типов рака. Способы и композиции согласно настоящему изобретению применяют, например, для лечения различных типов рака и других пролиферативных заболеваний, включая, но не ограничиваясь перечисленными: карциному, включая карциному мочевого пузыря, молочной железы, толстой кишки, почки, печени, легкого, яичника, матки, предстательной железы, поджелудочной железы, желудка, шейки матки, щитовидной железы, головы и шеи (плоскоклеточную карциному головы и шеи) и кожи (например, меланому); гематопозитические опухоли лимфоидной линии дифференцировки, включая лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, волосатоклеточную лимфому и лимфому Беркитта, и множественную миелому; гематопозитические опухоли миелоидной линии дифференцировки, включая острые и хронические миелогенные лейкозы, промиелоцитарный лейкоз и миелодиспластический синдром; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому и рабдомиосаркому; другие опухоли, включая меланому, семиному, тератокарциному, нейробластому и глиому; опухоли центральной и периферической нервной системы, включая астроцитому, нейробластому, глиому и шванномы; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; и другие опухоли, включая меланому, пигментную ксеродерму, кератоакантому, семиному и фолликулярный рак щитовидной железы.

В одном варианте реализации антитела против CD39, описанные в данном изобретении, можно успешно применять для лечения рака, который является CD73-положительным. Соответственно, предложен способ лечения или предотвращения рака или инфекционного заболевания у индивида, страдающего от положительного по CD73 рака, указанный способ включает введение индивиду агента или антитела, которое связывает мономерный белок CD39 человека (например, растворимый CD39 и/или мономерный мем CD39) и ингибирует его АТФазную активность. В одном варианте реализации в настоящем описании предложен способ лечения или предотвращения положительного по CD73 рака у индивида, указанный способ включает: введение индивиду антитела, которое связывает и ингибирует активность растворимого белка CD39 человека. В одном варианте реализации антитело связывает и ингибирует АТФазную активность мономерного белка CD39 человека.

Положительный по CD73 рак представляет собой рак, для которого, как известно, обычно характерно присутствие экспрессирующих CD73 клеток в опухоли или окружении опухоли. Соответственно, страдающего от рака индивида можно лечить антителом против CD39 с предшествующим этапом детектирования, или без него, для оценки экспрессии CD73 на клетках в микроокружении опухоли (например, на опухолевых клетках, CD4 Т-клетках, CD8 Т-клетках, В-клетках).

Необязательно способы лечения могут включать этап обнаружения нуклеиновой кислоты или полипептида CD73 в биологическом образце опухоли из индивида (например, в ткани рака, ткани, проксимальной или находящейся на периферии рака, прилегающей к раку ткани, прилегающей неопухолевой ткани или нормальной прилегающей ткани). Определение того, что биологический образец характеризуется наличием полипептида CD73, например, содержит клетки, экспрессирующие CD73, свидетельствует о том, что у пациента есть рак, который можно очень успешно лечить агентом, который ингибирует pCD39 (необязательно дополнительно в комбинации с агентом, который ингибирует CD73). Пациента, у которого есть рак, подходящий для лечения согласно настоящему описанию, можно определить как

имеющего опухоль, которая заметно экспрессирует CD73; которая экспрессирует CD73 на высоком уровне (например, по сравнению с эталонным значением, по сравнению со здоровым индивидом, на уровне, соответствующем индивидам, которые плохо отвечают на лечение агентом против CD73, на уровне, соответствующем индивидам, опухоль у которых не поддается лечению одним или более иммунотерапевтическими средствами), которая проявляет высокую интенсивность окрашивания антителом против CD73.

В одном варианте реализации способ включает определение уровня экспрессии нуклеиновой кислоты или полипептида CD73 в биологическом образце и сравнение указанного уровня с эталонным уровнем, соответствующим здоровому индивиду. Определение того, что биологический образец содержит клетки, экспрессирующие нуклеиновую кислоту или полипептид CD73 на уровне, который повышен по сравнению с эталонным уровнем, свидетельствует о том, что у пациента есть рак, который можно лечить антителом против CD39. Необязательно детектирование полипептида CD73 в биологическом образце включает детектирование полипептида CD73, экспрессированного на поверхности злокачественной клетки, CD4 Т-клетки, CD8 Т-клетки, В-клетки. В одном варианте реализации определение того, что биологический образец содержит клетки, которые заметно экспрессируют нуклеиновую кислоту или полипептид CD73, свидетельствует о том, что у указанных пациентов есть рак, который можно лечить антителом против CD39. "Заметно экспрессируется", в отношении полипептида CD73, означает, что полипептид CD73 экспрессируется на значительном количестве клеток, взятых из данного пациента. Хотя определение термина "заметно экспрессирован" не ограничено точным процентным значением, в некоторых примерах рецептор, про который говорят, что он "заметно экспрессирован", будет присутствовать на по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80% или более опухолевых клеток или клеток в образце опухолевой ткани или прилегающей к опухоли ткани (например, биоптата), взятом из пациента.

Определение того, есть ли у индивида рак, для которого характерны клетки, экспрессирующие полипептид CD73, может, например, включать получение биологического образца (например, путем проведения биопсии) из индивида, который содержит клетки из окружения рака (например, опухоли или прилегающей к опухоли ткани), приведение указанных клеток в контакт с антителом, которое связывает полипептид CD73, и детектирование того, экспрессируют ли клетки CD73 на своей поверхности. Необязательно определение того, есть ли у индивида клетки, которые экспрессируют CD73, включает проведение иммуногистохимического анализа.

В одном варианте реализации в настоящем описании предложен способ лечения или предотвращения рака у нуждающегося в этом индивида, указанный способ включает:

а) детектирование полипептида CD73 (например, экспрессирующих CD73 клеток) в окружении опухоли, необязательно внутри опухоли и/или внутри прилегающей ткани, и

б) после определения того, что окружение опухоли содержит CD73, необязательно на уровне, который повышен по сравнению с эталонным уровнем, введение индивиду фармацевтической композиции, содержащей (а) средство (например, агент или средство лечения, белковый агент, агент - антитело, агент - нуклеиновую кислоту или низкомолекулярный агент) для ингибирования активности CD39 и (б) фармацевтически приемлемый носитель. В одном варианте реализации агент представляет собой антитело, которое связывает и ингибирует активность растворимого белка CD39 человека. Необязательно способ дополнительно включает введение индивиду (т.е. дополнительно к ингибирующему CD39 агенту) агента, который связывает и ингибирует активность белка CD73 человека. Необязательно способ дополнительно включает введение индивиду, дополнительно к ингибирующему CD39 агенту, средства лечения (например, агента), которое вызывает высвобождение АТФ наружу из опухолевых клеток и/или вызывает гибель опухолевых клеток, которое представляет собой лучевую терапию или композицию, содержащую химиотерапевтический агент. Необязательно детектирование полипептида CD73 или экспрессирующих CD73 клеток в окружении опухоли включает получение из индивида биологического образца, который содержит ткань рака и/или ткань, проксимальную или находящуюся на периферии рака (например, прилегающую к раку ткань, прилегающую неопухолевую ткань или нормальную прилегающую ткань), и детектирование уровней полипептида CD73 или экспрессирующих CD73 клеток. Экспрессирующие CD73 клетки могут включать, например, опухолевые клетки, CD4 Т-клетки, CD8 Т-клетки, В-клетки.

Комбинированная терапия для лечения рака, предложенная в данном изобретении, включает введение нейтрализующего агента против CD39 (например, антитела) и нейтрализующего CD73 агента (например, антитела) для лечения субъектов, пораженных раком. В одном варианте реализации в соответствии с настоящим изобретением предложено антитело против CD39 и антитело против CD73 для применения в комбинации для лечения субъектов, имеющих солидную опухоль (например, солидную опухоль, распространенную рефрактерную солидную опухоль), или субъектов, имеющих гематологическую опухоль.

В данном изобретении дополнительное или комбинированное введение (совместное введение) включает одновременное введение соединений в одной или различных лекарственных формах или отдельное введение соединений (например, последовательное введение). Таким образом, антитела против CD39 и против CD73 можно вводить одновременно в одном составе. В качестве альтернативы антитела против CD39 и против CD73 могут находиться в формах для раздельного введения, и их вводят одновре-

менно или последовательно.

Пациента, страдающего раком, можно лечить агентом против CD39 и агентом против CD73 с предшествующим этапом детектирования или без него, чтобы оценить АТФазную активность опухоли, 5'-эктонуклеотидазную активность, накопление аденозина в опухоли (например, внутриопухолевую концентрацию аденозина) и/или экспрессию CD39 и/или CD73 на клетках (например, циркулирующих и/или инфильтрирующих опухоль лейкоцитах, клетках T_{Reg}, В-клетках и/или на опухолевых клетках). Необязательно способы лечения могут включать этап обнаружения АТФазной активности опухоли и/или накопления аденозина в опухоли (например, повышенной внутриопухолевой концентрации аденозина) в биологическом образце из индивида, имеющего опухоль (например, в образце, содержащем опухолевую ткань и/или прилегающую к опухоли ткань). Определение того, что в биологическом образце повышена АТФазная активность опухоли или накопление аденозина в опухоли (например, внутриопухолевая концентрация аденозина), например, по сравнению с эталоном, свидетельствует о том, что у индивида есть рак, который можно очень успешно лечить агентом, который ингибирует CD39, в комбинации с агентом, который ингибирует CD73. Необязательно способы лечения могут включать этап обнаружения нуклеиновой кислоты или полипептида CD39 в биологическом образце опухоли (например, на клетке опухоли) из индивида. Определение того, что биологический образец экспрессирует CD39 (например, опухолевые клетки, инфильтрирующие опухоль клетки или, в целом, клетки T_{Reg} экспрессируют CD39, клетки экспрессируют CD39 на высоком уровне, большое количество клеток являются положительными по CD39, высокая интенсивность окрашивания антителом против CD39, по сравнению с эталоном), свидетельствует о том, что у индивида есть рак, который можно очень успешно лечить агентом, который ингибирует растворимый белок CD39, необязательно в комбинации с агентом, который ингибирует CD73.

Необязательно способы лечения могут включать этап обнаружения нуклеиновой кислоты или полипептида CD39 в биологическом образце из индивида. Примеры биологических образцов включают любую подходящую биологическую жидкость (например, сыворотку, лимфу, кровь), образец клеток или образец ткани. Любое определение того, что клетки в биологическом образце (например, раковые клетки, лимфоциты, например, клетки T_{Reg}, В-клетки, Т-клетки) экспрессируют CD39 на высоком уровне, или что большое количество клеток в образце являются положительными по CD39 или проявляют высокую интенсивность окрашивания антителом против CD39, по сравнению с эталоном), может свидетельствовать о том, что у индивида есть рак, который можно очень успешно лечить агентом, который ингибирует CD39, в комбинации с агентом, который ингибирует CD73. В одном варианте реализации способы лечения могут включать этап обнаружения нуклеиновой кислоты или полипептида CD39 в биологическом образце опухоли (например, на инфильтрирующей опухоль клетке) из индивида.

В указанных способах лечения антитело против CD39 и нейтрализующий CD73 агент (например, антитела против CD73) можно вводить отдельно, вместе или последовательно, или в виде коктейля. В некоторых вариантах реализации антитело против CD39 вводят перед введением нейтрализующего CD73 агента. Например, антитело против CD39 можно вводить приблизительно за от 0 до 30 дней до введения нейтрализующего CD73 агента. В некоторых вариантах реализации антитело против CD39 вводят за от приблизительно 30 мин до приблизительно 2 недель, от приблизительно 30 мин до приблизительно 1 недели, от приблизительно 1 ч до приблизительно 2 ч, от приблизительно 2 ч до приблизительно 4 ч, от приблизительно 4 ч до приблизительно 6 ч, от приблизительно 6 ч до приблизительно 8 ч, от приблизительно 8 ч до 1 дня или от приблизительно 1 до 5 дней до введения нейтрализующего CD73 агента. В некоторых вариантах реализации антитело против CD39 вводят одновременно с введением нейтрализующего CD73 агента. В некоторых вариантах реализации антитело против CD39 вводят после введения антитела против CD73. Например, антитело против CD39 можно вводить приблизительно через от 0 до 30 дней после введения нейтрализующего CD73 агента. В некоторых вариантах реализации антитело против CD39 вводят через от приблизительно 30 мин до приблизительно 2 недель, от приблизительно 30 мин до приблизительно 1 недели, от приблизительно 1 ч до приблизительно 2 ч, от приблизительно 2 ч до приблизительно 4 ч, от приблизительно 4 ч до приблизительно 6 ч, от приблизительно 6 ч до приблизительно 8 ч, от приблизительно 8 ч до 1 дня или от приблизительно 1 до 5 дней после введения нейтрализующего CD73 агента.

Подходящие протоколы лечения для лечения человека, страдающего раком, включают, например, введение пациенту эффективного количества каждого из антитела, которое ингибирует активность CD39, и антитела, которое нейтрализует активность CD73 человека, причем указанный способ включает по меньшей мере один цикл введения, в котором по меньшей мере одну дозу антитела против CD39 вводят в дозе 1-20 мг/кг массы тела и по меньшей мере одну дозу антитела против CD73 вводят в дозе 1-20 мг/кг массы тела. В одном варианте реализации цикл введения длится от 2 до 8 недель.

В одном варианте реализации способ включает по меньшей мере один цикл введения, причем указанный цикл представляет собой период восемь недель или менее, причем в каждом из по меньшей мере одного цикла две, три или четыре дозы антитела против CD39 вводят в дозе 1-20 мг/кг массы тела и две, три или четыре дозы антитела против CD73 вводят в дозе 1-20 мг/кг массы тела.

В одном варианте реализации антитела против CD39 вводят в количестве, эффективном для нейтрализации ферментативной активности pCD39 и/или мем CD39 в течение необходимого периода време-

ни, например, 1 недели, 2 недель, месяца, до момента следующего введения антитела против CD39. В одном варианте реализации антитела вводят в дозировке и/или с частотой, которая обеспечивает концентрацию антитела в крови, равную по меньшей мере EC_{50} , EC_{70} или EC_{100} для ингибирования АТФазной активности белка рCD39, необязательно при этом концентрация поддерживается в течение по меньшей мере 1 недели, 2 недель, месяца или до следующего введения антитела против CD39.

В одном варианте реализации антитело против CD73 и антитело против CD39 вводят внутривенным (в/в) путем. В одном варианте реализации антитело против CD73 и антитело против CD39 вводят в один и тот же день, необязательно дополнительно приблизительно раз в две недели, необязательно дополнительно в/в путем.

В любом варианте реализации в данном изобретении лечение может включать введение индивиду антитела против CD39, которое нейтрализует ферментативную активность CD39, в рамках по меньшей мере одного цикла введения, в котором антитело против CD39 вводят по меньшей мере однократно, в некоторых случаях по меньшей мере дважды, в количестве, эффективном, чтобы добиться и/или поддержать между двумя последовательными введениями антитела против CD39 концентрацию в крови (сыворотке) или во внесосудистой ткани (например, в окружении опухоли), которая соответствует по меньшей мере EC_{50} *in vitro* (например, EC_{50} от 0,01 до 0,5 мкг/мл), необязательно EC_{70} или необязательно EC_{100} , для нейтрализации ферментативной активности CD39 (например, EC_{100} от 0,05 до 1 мкг/мл, от 0,1 до 1 мкг/мл). EC_{50} , EC_{70} или EC_{100} *in vitro* можно определить, например, в соответствии со способами, описанными в данном изобретении, тестирования нейтрализующей активности антитела против CD39. Антитело можно, например, вводить в количестве, достаточном для достижения и/или поддержания концентрации в кровотоке или во внесосудистой ткани (например, в окружении опухоли), равной по меньшей мере приблизительно 0,1, 0,5, 1 или 2 мкг/мл. Например, чтобы добиться концентрации во внесосудистой ткани, равной от 0,05 до 1 мкг/мл, или от 0,1 до 1 мкг/мл, антитело против CD39 вводят в количествах, эффективных для достижения концентрации в кровотоке антитела против CD39 от 0,5 до 10 мкг/мл или от 1 до 10 мкг/мл. Необязательно антитело против CD39 вводят по меньшей мере дважды и в количествах, эффективных для поддержания концентрации антитела против CD39, по меньшей мере упомянутой выше концентрации, в течение по меньшей мере 1 недели, 2 недель, 3 недель, 4 недель между двумя последовательными введениями антитела против CD39 и/или в течение всего цикла введения.

В любом варианте реализации в данном изобретении лечение может включать введение индивиду антитела против CD73, которое нейтрализует ферментативную активность CD73 в течение по меньшей мере одного цикла введения, в котором антитело против CD73 вводят по меньшей мере однократно, в некоторых случаях по меньшей мере дважды, в количестве, эффективном, чтобы добиться и/или поддержать между двумя последовательными введениями антитела против CD73 концентрацию в крови (сыворотке) или во внесосудистой ткани (например, в окружении опухоли), которая соответствует по меньшей мере EC_{50} *in vitro* (например, EC_{50} от 0,01 до 0,5 мкг/мл), необязательно EC_{70} или необязательно EC_{100} , для нейтрализации ферментативной активности CD73 (например, EC_{100} от 0,05 до 1 мкг/мл, от 0,1 до 1 мкг/мл). Антитело можно, например, вводить в количестве, достаточном для достижения и/или поддержания концентрации в кровотоке или во внесосудистой ткани (например, в окружении опухоли), равной по меньшей мере приблизительно 0,1, 0,5, 1 или 2 мкг/мл. Например, чтобы добиться концентрации во внесосудистой ткани, равной от 0,05 до 1 мкг/мл, или от 0,1 до 1 мкг/мл, антитело против CD73 вводят в количествах, эффективных для достижения концентрации в кровотоке антитела против CD73 от 0,5 до 10 мкг/мл, или от 1 до 10 мкг/мл. Необязательно антитело против CD73 вводят по меньшей мере дважды и в количествах, эффективных для поддержания концентрации антитела против CD73, по меньшей мере упомянутой выше концентрации, в течение по меньшей мере 1 недели, 2 недель, 3 недель, 4 недель между двумя последовательными введениями антитела против CD73 и/или в течение всего цикла введения.

В некоторых аспектах агент против CD39 и агент против CD73 можно применять для лечения рака у индивида, у которого есть иммунные эффекторские клетки, для которых характерно присутствие одного или более маркеров истощения и/или подавления иммунитета.

В некоторых аспектах агент против CD39 (необязательно в комбинации с агентом против CD73 или необязательно без комбинированного лечения агентом против CD73) можно применять для лечения рака у индивида с неблагоприятным прогнозом ответа заболевания на агент против CD73, например, с неблагоприятным прогнозом, о котором свидетельствует один или более маркеров, указывающих на отсутствие достаточного противоопухолевого иммунного ответа, указывающих на истощение иммунной системы и/или указывающих на подавление иммунитета, а именно, с неблагоприятным прогнозом ответа на лечение агентом, который нейтрализует CD73 (например, антителом против CD73). Индивид с неблагоприятным прогнозом заболевания, например, имеет повышенный риск прогрессирования на основании одного или более прогностических факторов. В одном варианте реализации прогностический(ие) фактор(ы) включает наличие или отсутствие мутации в одном или более генах. В одном варианте реализации прогностический(ие) фактор(ы) включает(ют) уровень(ни) экспрессии одного или более генов или белков (например, профиль экспрессии генов).

В одном варианте реализации прогностический(е) фактор(ы) включает(ют) присутствие (например, количества) клеток в кровотоке или в окружении опухоли, экспрессирующих CD39 и/или CD73, и/или

уровни экспрессии CD39 и/или CD73 на клетках в кровотоке или в окружении опухоли; в одном варианте реализации клетки представляют собой опухолевые клетки; в одном варианте реализации клетки представляют собой лейкоциты, например, В-клетки, регуляторные Т-клетки (Treg). Наличие повышенной экспрессии CD39 и/или CD73, и/или повышенные уровни экспрессирующих CD39 и/или CD73 клеток могут свидетельствовать о том, что у индивида неблагоприятный прогноз ответа на лечение антителом, которое нейтрализует CD73.

В одном аспекте агент против CD39 можно применять для лечения рака у индивида, который не ответил на лечение или у которого наблюдали частичный или неполный ответ на лечение агентом, который нейтрализует CD73 (например, антителом против CD73), или заболевание которого прогрессировало после лечения агентом, который нейтрализует CD73. В одном варианте реализации индивида лечат агентом против CD39 без комбинированного лечения агентом, который нейтрализует CD73 (например, в виде монотерапии против CD39 или комбинацией антитела против CD39 и второго терапевтического агента, отличного от агента, который нейтрализует CD73). В другом варианте реализации индивида лечат агентом против CD39 в комбинации с агентом, который нейтрализует CD73.

В одном аспекте агент против CD39 можно применять для лечения рака у индивида с неблагоприятным прогнозом ответа на агент (например, антитело), который ингибирует систему CTLA-4 или PD-1, или который не отвечает на лечение или у которого наблюдают частичный или неполный ответ на лечение агентом (например, антителом), который ингибирует систему CTLA-4 или PD-1, или заболевание которого прогрессировало после лечения агентом (например, антителом), который ингибирует систему CTLA-4 или PD-1. В одном варианте реализации индивида лечат агентом против CD39 без комбинированного лечения агентом, который нейтрализует CD73 (например, в виде монотерапии против CD39 или комбинацией антитела против CD39 и второго терапевтического агента, отличного от антитела, которое нейтрализует CD73). В другом варианте реализации индивида лечат агентом против CD39 в комбинации с антителом, которое нейтрализует CD73.

Композиции антитела против CD39, необязательно дополнительно в комбинации с агентом, который связывает и ингибирует CD73, необязательно могут представлять собой комбинированные (дополнительно комбинированные) способы лечения с одним или более другими способами лечения или терапевтическими агентами. Такие терапевтические агенты включают, но не ограничены противораковыми агентами и химиотерапевтическими агентами.

В одном варианте реализации дополнительный терапевтический агент представляет собой агент или средство лечения, которое вызывает гибель опухолевых клеток, например, агент или средство лечения, которое способно вызывать высвобождение АТФ наружу из опухолевых клеток, агент или средство лечения, которое вызывает иммуногенную гибель раковых клеток. Внеклеточный АТФ высвобождается из опухолевых клеток в случае стресса (механического, гипотонического или гипоксического) или в случае гибели клетки. Некроз способствует пассивному высвобождению АТФ посредством высвобождения всего содержимого клетки, тогда как апоптоз способствует высвобождению АТФ путем активации каспаз 3 и 9, которые расщепляют и активируют паннексин 1 (переносчик АТФ). Примеры агентов, которые вызывают высвобождение АТФ наружу из опухолевых клеток, могут включать химиотерапию, лучевую терапию и, в более общем случае, агенты, которые вызывают апоптоз и тем самым способствуют высвобождению АТФ. Было показано, что агенты, которые вызывают высвобождение АТФ из клетки, вызывают иммуногенную гибель клетки. Например, значительное высвобождение АТФ вызывается антрациклинами, оксалиплатином, цисплатином и рентгеновским излучением. Дополнительный пример агентов, которые вызывают высвобождение АТФ из клетки, может включать таксаны, антрациклины, камптотецины, эпотилоны, митомицины, комбретастины, алкалоиды барвинка, азотистые иприты, майтанзиноид, калихеамицины, дуокармицины, тубулизины, доластатины и ауристатины, ендиины, аматоксины, пирролобензодиазепины, этиленимины, радиоактивные изотопы, терапевтические белки и пептиды, и токсины или их фрагменты. Агенты могут находиться в любой подходящей конфигурации или составе, например, в виде свободного соединения или части конъюгата. Агенты можно удобно конъюгировать с нацеливающей молекулой, как, например, в иммуноконъюгате. Термины "иммуноконъюгат" и "конъюгат антитела" используют взаимозаменяемо, и они относятся к связывающему антиген агенту, например, антителу, связывающему белок, или антителу, которое конъюгировано с другой молекулой (например, цитотоксическим агентом). Иммуноконъюгат, содержащий связывающий антиген агент, конъюгированный с цитотоксическим агентом, также могут называть "конъюгатом антитела с лекарственным средством" или "ADC".

В одном варианте реализации дополнительный терапевтический агент представляет собой агент (например, антитело), который ингибирует систему CTLA-4 или PD-1 (т.е. ингибирует PD-1 или PD-L1). Антитела, которые связывают CTLA-4, PD1 или PD-L1, можно применять, например, при типичных дозах и/или частоте, при которых такие агенты применяют в виде монотерапии, например, как описано ниже.

В одном варианте реализации второй или дополнительный второй терапевтический агент представляет собой агент (например, антитело), который ингибирует систему CTLA-4 или PD-1 (т.е. ингибирует PD-1 или PD-L1). Антитела, которые связывают CTLA-4, PD1 или PD-L1, можно применять, например, при типичных дозах и/или частоте, при которых такие агенты применяют в виде монотерапии, например,

как описано ниже.

PD-1 является ингибиторным представителем семейства рецепторов CD28, которое также включает CD28, CTLA-4, ICOS и BTLA. PD-1 экспрессируется на активированных В-клетках, Т-клетках и миелоидных клетках. Okazaki и др. (2002) *Curr. Opin. Immunol.* 14: 391779-82; Bennett и др. (2003) *J Immunol* 170:711-8). Было обнаружено два лиганда для PD-1 - PD-L1 и PD-L2, - которые, как было показано, подавляют активацию Т-клеток при связывании с PD-1 (Freeman и др. (2000) *J Exp Med* 192:1027-34; Latchman и др. (2001) *Nat Immunol* 2:261-8; Carter и др. (2002) *Eur J Immunol* 32:634-43). PD-L1 широко распространен в различных типах рака человека (Dong и др. (2002) *Nat. Med.* 8:787-9). Взаимодействие между PD-1 и PD-L1 приводит к уменьшению количества инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, снижению опосредованной Т-клеточным рецептором пролиферации и ускользанию раковых клеток от иммунологического надзора. Супрессию иммунного ответа можно обратить путем ингибирования локального взаимодействия PD-1 с PD-L1, и данный эффект аддитивен при блокировании также взаимодействия PD-1 с PD-L2. Блокирование PD-1 может предпочтительно включать применение антитела, которое предотвращает вызванную PD-L1 передачу сигналов PD-1, например, путем блокирования взаимодействия с природным лигандом PD-L1. В одном аспекте антитело связывает PD-1 (антитело против PD-1); такое антитело может блокировать взаимодействие между PD-1 и PD-L1 и/или между PD-1 и PD-L2. В другом аспекте антитело связывает PD-L1 (антитело против PD-L1) и блокирует взаимодействие между PD-1 и PD-L1.

На сегодняшний день существует по меньшей мере шесть агентов, блокирующих сигнальный путь PD-1/PD-L1, которые доступны на рынке или проходят клиническую оценку, любые из них могут быть полезны в комбинации с антителами против CD73 согласно настоящему описанию. Один агент представляет собой BMS-936558 (ниволумаб/ONO-4538, Bristol-Myers Squibb; прежнее название MDX-1106). Ниволумаб (торговое наименование Опдиво®) представляет собой одобренное FDA полностью человеческое МАТ IgG4 против PD-L1, которое ингибирует связывание лиганда PD-L1 как с PD-1, так и CD80 и описано как антитело 5C4 в WO 2006/121168, описание которого включено в данное изобретение посредством ссылки. Для пациентов с меланомой наиболее значимый общий ответ (ОО) наблюдали при дозе 3 мг/кг, тогда как при других типах рака его наблюдали при дозе 10 мг/кг. Ниволумаб, как правило, вводили в дозе 10 мг/кг раз в 3 недели до тех пор, пока не происходило прогрессирования рака.

Другой агент представляет собой дурвалумаб (Имфинзи®, MEDI-4736), антитело против PD-L1, разработанное AstraZeneca/Medimmune и описанное в WO 2011/066389 и US 2013/034559.

Другой агент представляет собой МК-3475 (человеческое МАТ IgG4 против PD1 от Merck), также называемый ламбролизумабом или пембролизумабом (торговое наименование Китруда®), он был одобрен FDA для лечения меланомы и тестируется при других типах рака. Пембролизумаб исследовали при дозе 2 или 10 мг/кг раз в 2 или 3 недели до тех пор, пока не происходило прогрессирование заболевания.

Другой агент представляет собой атезолизумаб (Тецентрик®, MPDL3280A/RG7446, Roche/Genentech), человеческое МАТ против PD-L1, которое содержит сконструированный домен Fc, разработанный для оптимизации эффективности и безопасности путем минимизирования связывания FcγR и последующей антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). Дозы ≤ 1, 10, 15 и 25 мг/кг MPDL3280A вводили раз в 3 недели в течение до 1 года. В 3 фазе клинического испытания, MPDL3280A вводят в дозе 1200 мг путем внутривенной инфузии раз в три недели при НМРЛ.

Дополнительные известные антитела против PD-1 и другие ингибиторы PD-1 включают цемиплимаб (Sanofi and Regeneron Pharmaceuticals), MGA012 (MacroGenics inc. и Incyte Corp.), пидлизумаб (pidlizumab) (CT-011; CureTech) (гуманизированное МАТ IgG1 против PD1 от CureTech/Teva, см., например, WO 2009/101611), AMP-224 (слитый белок B7-DC/IgG1, являющийся зарегистрированной торговой маркой GSK), AMP-514, описанный в WO 2012/145493, антитело YW243.55.S70 (против PD-L1), описанное в WO 2010/077634, MDX-1105, также известное как BMS-936559, представляет собой антитело против PD-L1, разработанное Bristol-Myers Squibb, описанное в WO 2007/005874, и антитела и ингибиторы, описанные в WO 2006/121168, WO 2009/014708, WO 2009/114335 и WO 2013/019906, описания которых настоящим включены посредством ссылки. Дополнительные примеры антител против PD-1 описаны в WO 2015/085847 (Shanghai Hengrui Pharmaceuticals Co. Ltd.). Антитела, которые конкурируют с любыми из данных антител за связывание с PD-1 или PD-L1 также можно применять.

CTLA-4 (цитотоксический ассоциированный с Т-лимфоцитами белок 4), также известный как CD152, является другим ингибиторным представителем семейства рецепторов CD28 и экспрессируется на Т-клетках. Антитела, которые связывают и ингибируют CTLA-4, известны в данной области. В одном примере антитело представляет собой ипилимумаб (торговое наименование Ервой®, Bristol-Myers Squibb), человеческое антитело IgG. В одном примере антитело представляет собой тремелиумаб (CP-675.206; Medimmune/AstraZeneca). Типичный режим введения Ервой: 3 мг/кг внутривенно в течение 90 мин раз в три недели. В одном примере антитело, которое применяют в комбинации с антителами против CD73 согласно настоящему описанию, представляет собой антитело, которое конкурирует с ипилимумабом или тремелиумабом за связывание с CTLA-4.

Примеры

Методы.

Получение мутантов CD39.

Мутантов CD39 получали с помощью ПЦР. Амплифицированные последовательности разгоняли в агарозном геле и очищали, применяя набор для экстрагирования из геля Macherey Nagel PCR Clean-Up (номер в каталоге 740609). Очищенные продукты ПЦР, полученные для каждого мутанта, затем лигировали в вектор экспрессии с помощью системы InFusion ClonTech. Векторы, содержащие мутированные последовательности, получали в формате Miniprep и секвенировали. После секвенирования векторы, содержащие мутированные последовательности, получали в формате Midiprep, применяя систему для выделения плазмидной ДНК PureYield™ Plasmid Midiprep от Promega. Клетки HEK293T растили в среде DMEM (Invitrogen), трансфицировали векторами, применяя липофектамин 2000 от Invitrogen, и инкубировали при 37°C в CO₂-термостате в течение 48 ч перед тестированием экспрессии трансгена. Мутанты трансфицировали в клетках HEK293T, как показано в таблице ниже. Целевые мутации аминокислот в табл. 1 ниже представлены с использованием нумерации последовательности SEQ ID NO: 2.

Таблица 1

Мутант	Замены					
1	V77G	H79Q	Q444K	G445D		
2A	V81S	E82A	R111A	V115A		
2B	E110A	R113T	E114A			
3	R118A	S119A	Q120K	Q122H	E123A	
4	D150A	E153S	R154A	S157K	N158A	L278F
5	Q96A	N99A	E143A	R147E		
6	K188R	Замена остатков с 190 по 207 на KTPGGS				
7	A273S	N275A	I277S	R279A		
8	S294A	K298G	K303A	E306A	T308K	Q312A
9	K288E	K289A	V290A	E315R		
10A	Q354A	D356S	E435A	H436Q		
10B	H428A	T430A	A431D	D432A		
11	N371K	L372K	E375A	K376G	Вставка377V	V377S
12	K388N	Q392K	P393S	E396A		
13	A402P	G403A	K405A	E406A		
15	K87A	E100A	D107A			
16	Q323A	Q324A	Q327A	E331K		
17	N334A	S336A	Y337G	N346A		
18	Q228A	I230S	D234A	Q238A		
19	R138A	M139A	E142K			

Клонирование, продуцирование и очистка растворимого huCD39.

Молекулярная биология.

Белок huCD39 клонировали из кДНК МКПК человека, применяя следующие праймеры:

TACGACTCACAAGCTTGCCGCCACCATGGAAGATACAAAGGAGTC (SEQ ID

NO: 38) (прямой) и CCGCCCCGACTCTAGATCACTTGTCATCGTCATCTTTGTAATCGA

CATAGGTGGAGTGGGAGAG (SEQ ID NO: 56) (обратный).

Очищенный продукт ПЦР затем клонировали в вектор экспрессии, применяя систему клонирования InFusion. Метку M2 (метка FLAG, подчеркнута в SEQ ID NO: 39) добавляли в С-концевую часть белка для этапа очистки; должно быть очевидно, что в любом варианте реализации необязательно может быть указано, что белок внеклеточного домена CD39 (например, с последовательностью SEQ ID NO: 54) не содержит метку M2.

Экспрессия и очистка белков huCD39.

После подтверждения клонированной последовательности клетки CHO подвергали нуклеофекции и совокупность продуцирующих клеток затем субклонировали с получением клона клетки, продуцирующей белок huCD39. Собирали супернатант, кондиционированный клоном huCD39, который растили в устройстве для роллерного культивирования, и очищали, применяя колонку для хроматографии M2 и элюирование с применением пептида M2. Очищенные белки затем загружали на колонку для эксклюзионной хроматографии S200. Очищенный белок, соответствующий мономеру, помещали в трис-буферный солевой раствор (ТБС), pH7,5. Последовательность аминокислот рекомбинантного белка внеклеточного домена CD39-M2 без метки M2 была следующей:

```
MEDTKESNVKTFCSKNILAILGFSSIIAVIALAVGLTQNKALPENVKYGIVLDAGSSHTSLYIY
KWPAEKENDTGVVHQVEECRVKGPISKVQKVNEIGIYLTDCMERAREVIPSQHQETPV
YLGATAGMRLLRMESEELADRVLDVVERSLSNYPFDQFQGARIITGQEEGAYGWITINYLLGK
FSQKTRWFSIVPYETNNQETFGALDLGGASTQVTFVPQNQTIESPDNALQFRLYGKDYNNVY
THSFLCYGKDQALWQKLAKDIQVASNEILRDPCHFPGYKKVVNVSDLYKTPCTKRFEMTLP
FQQFEIQGIGNYQQCHQSILELFNTSYCPYSQCAFNGIFLPLQGDFGAFSAFYFVMKFLNL
TSEKVSQEKVTEMMKKFCAQPWEEIKTSYAGVKEKYLSEYCFSGTYILSLLLQGYHFTADS
WEHINFIGIKQGS DAGWTLGYMLNLTNMIPAEQPLSTPLSHSTYV
```

(SEQ ID NO: 5).

Окончательная последовательность аминокислот рекомбинантного белка внеклеточного домена CD39-M2 с меткой M2 была следующей:

```
MEDTKESNVKTFCSKNILAILGFSSIIAVIALAVGLTQNKALPENVKYGIVLDAGSSHTSLYIY
KWPAEKENDTGVVHQVEECRVKGPISKVQKVNEIGIYLTDCMERAREVIPSQHQETPV
YLGATAGMRLLRMESEELADRVLDVVERSLSNYPFDQFQGARIITGQEEGAYGWITINYLLGK
FSQKTRWFSIVPYETNNQETFGALDLGGASTQVTFVPQNQTIESPDNALQFRLYGKDYNNVY
THSFLCYGKDQALWQKLAKDIQVASNEILRDPCHFPGYKKVVNVSDLYKTPCTKRFEMTLP
FQQFEIQGIGNYQQCHQSILELFNTSYCPYSQCAFNGIFLPLQGDFGAFSAFYFVMKFLNL
TSEKVSQEKVTEMMKKFCAQPWEEIKTSYAGVKEKYLSEYCFSGTYILSLLLQGYHFTADS
WEHINFIGIKQGS DAGWTLGYMLNLTNMIPAEQPLSTPLSHSTYVDYKDDDDK
```

(SEQ ID NO: 54).

Ингибирование ферментативной активности растворимого CD39.

Ингибирование антителами ферментативной активности полученного растворимого белка CD39 оценивали, применяя Cell Titer Glo™ (Promega, номер в каталоге G7571), который позволяет оценить гидролиз АТФ посредством применения реагента, который генерирует люминесцентный сигнал, пропорциональный присутствующему количеству АТФ. Таким образом можно оценить ингибирование опосредованного растворимым CD39 гидролиза АТФ. Вкратце, диапазоны доз антител против CD39 от 100 мкг/мл до 6×10^{-3} мкг/мл инкубировали с 400 нг/мл растворимого рекомбинантного белка CD39 человека, имеющего последовательность аминокислот, описанную в разделе Методы (SEQ ID NO: 54), в течение 1 ч при 37°C. 20 мкМ АТФ добавляли в планшеты и дополнительно инкубировали в течение 30 мин при 37°C перед добавлением реагента CTG (Cell Titer Glo). Проводили количественный анализ излученного света, применяя люминометр Enspire™, после короткого периода инкубации в течение 5 мин в темноте. Эффективность антитела против CD39 определяли путем сравнения излученного света в присутствии антитела с АТФ отдельно (максимальное излучение света) и с АТФ вместе с растворимым белком CD39 (минимальное излучение света).

Ингибирование ферментативной активности клеточного CD39.

Ингибирование ферментативной активности CD39 в экспрессирующих CD39 клетках антителами оценивали, применяя Cell Titer Glo™ (Promega, номер в каталоге G7571), который позволяет оценить гидролиз АТФ посредством применения реагента, который генерирует люминесцентный сигнал, пропорциональный присутствующему количеству АТФ. Анализ был разработан таким образом, чтобы позволить оценку ингибирования АТФ, гидролизованного посредством CD39, в супернатанте культуры клеток. Вкратце, 5×10^4 клеток лимфомы человека Ramos, 5×10^3 клеток CHO, экспрессирующих CD39 человека, CD39 яванского макака и CD39 мыши, инкубировали 1 час при 37°C с антителами против CD39 при концентрации от 30 мкг/мл до 5×10^{-4} мкг/мл. Клетки затем дополнительно инкубировали с 20 мкМ АТФ в течение 1 ч при 37°C. Планшеты центрифугировали в течение 2 мин при 400 g и 50 мкл супернатанта клеток переносили в микропланшет для измерения люминесценции (с белыми лунками). 50 мкл реагента CellTiter-Glo® (CTG) добавляли в супернатант и проводили количественный анализ излученного света после инкубации в течение 5 мин в темноте, применяя люминометр Enspire™. Эффектив-

ность антитела против CD39 определяли путем сравнения излученного света в присутствии антитела с АТФ отдельно (максимальное излучение света) и с АТФ вместе с клетками (минимальное излучение света).

Получение антител: иммунизация и скрининг на мышах.

Для получения антител против CD39 человека мышей Balb/c иммунизировали рекомбинантным белком внеклеточного домена CD39-M2 человека, описанным выше. Мыши получали одну примирующую иммунизацию эмульсией 50 мкг белка CD39 и полного адъюванта Фрейнда, интраперитонеально, и 2-ую иммунизацию эмульсией 50 мкг белка CD39 и неполного адъюванта Фрейнда, интраперитонеально, и, наконец, стимулирующую иммунизацию 10 мкг белка CD39, внутривенно. Иммунные клетки селезенки сливали через 3 дня после стимулирующей иммунизации с иммортализованными В-клетками X63.Ag8.653 и культивировали в присутствии облученных клеток селезенки. Гибридомы высевали в полутвердую содержащую метилцеллюлозу среду и растущие клоны отбирали, применяя устройство ClonePix2 (Molecular Devices).

Пример 1. Картирование эпитопов известных нейтрализующих CD39 МАТ.

Для того чтобы получить ясное представление о функции антител, которые ингибируют ферментативную (АТФазную) активность клеточного CD39, мы исследовали эпитопы, с которыми связываются антитела, которые были описаны как ингибирующие АТФазную активность CD39 в клеточном анализе: ВУ40, описанное в публикации РСТ № WO 2009/095478.

Для того чтобы определить эпитопы антител против CD39, мы разработали мутантов CD39, характеризующихся заменами аминокислот, выставленных на молекулярной поверхности CD39. Мутантами трансфицировали клетки НЕК293Т, как показано в табл. 1, с использованием нумерации последовательности SEQ ID NO: 2.

Диапазоны доз I-394 (10 - 2,5 - 0,625 - 0,1563 - 0,0391 - 0,0098 - 0,0024 - 0,0006 мкг/мл) исследовали на 20 полученных мутантах с помощью проточной цитометрии. Для антител ВУ40 наблюдали полную утрату связывания с клетками, экспрессирующими мутант 5 CD39, при этом не наблюдали утраты связывания со всеми остальными мутантами. Мутант 5 содержит замены аминокислот в остатках Q96, N99, E143 и R147. Положение мутанта 5 на поверхности CD39 показано на фиг. 3А.

Пример 2. Известные нейтрализующие CD39 МАТ неспособны ингибировать АТФазную активность рекомбинантного растворимого белка CD39.

Два антитела, о которых сообщали, что они ингибируют АТФазную активность CD39 в клеточном анализе (ВУ40 и ВУ12), оценивали, чтобы определить, способны ли они ингибировать АТФазную активность рекомбинантного растворимого белка CD39. Ингибирование антителами ферментативной активности растворимого белка CD39, полученного как описано выше, оценивали, применяя Cell Titer Glo™ (Promega, номер в каталоге G7571). Ингибирование антителами ферментативной активности клеточного белка CD39 оценивали, как указано выше.

Как ожидалось, ВУ40 ингибировал АТФазную активность белка CD39 в клетках. Тем не менее, ВУ40 было неспособно ингибировать ферментативную активность растворимого белка CD39. На фиг. 2В показано сравнение ВУ40 с новыми антителами, описанными в данном изобретении.

Пример 3. Скрининг новых МАТ для блокирования активности рCD39.

Проводили серию иммунизаций, чтобы найти антитела, которые нейтрализуют АТФазную активность рCD39. Для получения антител против CD39 человека животных иммунизировали рекомбинантным белком внеклеточного домена CD39-M2 человека, описанным выше. Всего проводили 15 серий иммунизаций, используя различные протоколы и различных животных. В исследование включали различные линии мышей, крыс и кроликов.

В первоначальных протоколах иммунизации первичный скрининг включал тестирование супернатанта (с/н) растущих клонов с помощью проточной цитометрии, используя линии клеток СНО дикого типа и СНО, экспрессирующих huCD39. Клетки окрашивали 0,1 мкМ и 0,005 мкМ CFSE, соответственно. Для скрининга методом проточной цитометрии все клетки одинаково смешивали, и присутствие реагирующих антител в супернатантах обнаруживали с помощью поликлонального антитела козы против антител мыши (ПАТ), меченого APC. Для выявления антител, которые связались с huCD39, супернатанты затем подвергали скринингу на ингибирование ферментативной активности растворимого CD39, применяя скрининговый тест, разработанный и описанный выше (методы).

Результаты показали, что хотя можно получить множество специфических связывающих CD39 антител, ни одно из антител не из одной из данных иммунизаций не проявило какого-либо ингибирования ферментативной активности растворимого CD39. Одно объяснение может состоять в том, что доминантные эпитопы на CD39 не включают никакие эпитопы, подходящим образом расположенные в каталитическом центре CD39 или около него. Ввиду малого количества доступных антител, которые ингибируют клеточный CD39, и известных трудностей при ингибировании каталитических центров ферментов с применением антител, отсутствие антител, которые нейтрализуют рCD39, может свидетельствовать о том, что невозможно получить антитела, которые ингибируют растворимый (внеклеточный домен) CD39. Другие возможные объяснения относятся к нефункциональным скрининговым тестам и/или неправильной укладке или функционированию растворимого белка CD39, в частности, поскольку отсутст-

вие какого-либо антитела, которое может ингибировать растворимый CD39, затрудняет подтверждение достоверности анализа блокирования pCD39.

Ввиду отсутствия антител, способных ингибировать растворимый CD39, проводили дополнительную иммунизацию с протоколом скрининга, разработанным таким образом, чтобы способствовать выработке антител, которые связываются с активным центром CD39, идентифицированным по эпитопу антитела BУ40. Вкратце, первичный скрининг включал тестирование супернатанта (с/н) растущих клонов с помощью проточной цитометрии, используя линии клеток CHO дикого типа и CHO, экспрессирующих huCD39, как и в предшествующих иммунизациях, а затем скрининг утраты связывания клеток НЕК293Т, экспрессирующих мутант 5 CD39, по сравнению с CD39 дикого типа, как показано в табл. 1. Мутант 5 содержит замены в остатках Q96, N99, E143 и R147. Тем не менее, снова результаты показали, что хотя можно получить множество специфических связывающих CD39 антител, которые проявили утрату связывания с мутантом 5, ни одно из антител из любой из первоначальных иммунизаций не проявило ингибирования ферментативной активности растворимого CD39.

Пример 4. Идентификация первого антитела, которое ингибирует активность pCD39, в рамках направленного на эпитоп скрининга.

Мы пытались идентифицировать антитела против CD39, которые не связывают участок Q96, N99, E143 и R147 (обозначен как мутант 5), чтобы получить антитела, которые не конкурируют с подобными BУ40 антителами. Такие антитела, которые не должны обладать способностью блокировать АТФазную активность CD39, могут быть полезны для фармакологических исследований антител, которые ингибируют клеточный CD39, который связывается с сайтом связывания BУ40, например, чтобы детектировать и определить количество свободных белков CD39 на клетках в присутствии BУ40 или подобных BУ40 антител, которые ингибируют клеточный CD39.

Исходя из результатов иммунизации согласно Примеру 3, в котором гибридомы подвергали скринингу на утрату связывания с мутантом 5 CD39, выбрали гибридому, которая не была среди проявивших утрату связывания с мутантом 5 CD39. Эта гибридома (I-394) находилась среди более обширного пула возможно вследствие неубедительных результатов, указывающих на возможное частичное снижение связывания с мутантом 5, но I-394 не утрачивала связывание с мутантом 5 и поэтому изначально ее не оставили.

В контексте текущего скрининга ингибирования супернатантами после дополнительных иммунизаций ферментативной активности растворимого CD39, антитело I-394, которое было клонировано и продуцировано, включили в качестве контроля. Неожиданно, несмотря на то, что антитело I-394 не было среди клонов, которые оставили в результате направленного на эпитоп скрининга, данное антитело проявило сильное ингибирование ферментативной активности растворимого CD39 в описанном выше анализе (Методы).

I-394 было получено с человеческими константными областями изотипа IgG1, с модифицированным доменом Fc, содержащим мутации L234A/L235E/G237A/A330S/P331S (нумерация по Кабату EU), которые приводят к отсутствию связывания с Fcγ-рецепторами человека CD16A, CD16B, CD32A, CD32B и CD64. Вкратце, последовательности VH и Vk антитела I-394 (вариабельные области VH и Vk, представленные в последовательностях SEQ ID NO: 6 и 7, соответственно) клонировали в векторы экспрессии, содержащие константные домены hulgG1, несущие упомянутые выше мутации, и константный домен huCk, соответственно. Двумя полученными векторами котрансфицировали линию клеток CHO. Созданный пул клеток использовали для получения антитела в среде CHO. Антитело затем очищали, применяя белок А. Последовательности аминокислот соответствующих вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей I-394 представлены ниже (CDR по Кабату подчеркнуты).

Последовательность вариабельного домена тяжелой цепи I-394:

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT**DYNMH**VVKQSHGRTLEWIG**YIVPLNGGSTFNQKF**KGRA

TLTVNTSSRTAYMELRSLTSEDSAAYYCAR**GGTRFAY**WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 6).

Последовательность вариабельного домена легкой цепи I-394:

DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS**C****RASESV**DNFGV**SFMY**WFQQKPGQPNNLLI**YGAS****NQGS**GVPARFRG

SGSGTDFSLNIHPMEADDTAM**YFCQQTKEVPY**TFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 7).

Последовательности тяжелой и легкой цепей I-394 с константными областями IgG1 человека, с заменами L234A/L235E/G237A/A330S/P331S (сохраняющими N297-связанное гликозилирование) представлены ниже:

Последовательность тяжелой цепи I-394:

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYNMHVVKQSHGRTLEWIGYIVPLNGGSTFNQKFKGRA
 TLTVTNTSSRTAYMELRSLTSEDSAAYYCARGGTRFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAPSS
 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC
 NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVSNAKALPSSIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPFVLDSGGSF
 FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 52).

Последовательность легкой цепи I-394:

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASEVDNFGVSFMYWFQQKPGQPNNLLIYGASNQGSVGPFRFG
 SGSGTDFSLNIHPMEADDTAMYFCQOTKEVPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
 ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT
 HQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 53).

Затем исследовали утрату связывания антитела I-394 с мутантами CD39, характеризующимися заменами аминокислот, выставленных на молекулярную поверхность на всей поверхности CD39. Мутантами трансфицировали клетки HEK293T, как показано в табл. 1, используя нумерацию последовательности SEQ ID NO: 2. Диапазоны доз антител I-394 исследовали на 20 мутантах с помощью проточной цитометрии. На фиг. 3В показано, что I-394 проявило полную утрату связывания с клетками, экспрессирующими мутант 19 CD39. Мутант 19 содержит замены в остатках R138, M139 и E142. Коровый эпитоп I-394, следовательно, содержит один или более (или все) из остатков R138, M139 и E142.

В отличие от предыдущего антитела BY40, которое утрачивает связывание с мутантом 5 и обладает способностью ингибировать клеточный CD39, но не растворимый CD39, антитело I-394 утрачивает связывание с соседним мутантом 19, при этом сильно снижается связывание с мутантом 5 (но с некоторым остаточным связыванием с мутантом 5). Интересно, что остатки мутанта 19 находятся в непосредственной близости или расположены рядом с остатками мутанта 5, так что I-394 может демонстрировать сдвиг эпитопа по сравнению с BY40. Антитело I-394, таким образом, представляет новый полезный эпитоп для антител против CD39, который позволяет ингибирование АТФазной активности растворимого белка CD39. Оно также позволяет специфический положительный контроль, который позволяет подтверждение и проверку скрининговых тестов для обнаружения дополнительных антител, которые нейтрализуют АТФазную активность растворимого белка CD39.

Пример 5. Не основанный на эпитопах скрининг нейтрализующих pCD39 МАТ.

На основании результатов, описанных в примере 4, свидетельствующих о том, что возможно опосредованное антителом ингибирование растворимого CD39, слияния из различных иммунизаций с применением различных протоколов из примера 3 заново пересмотрели, чтобы найти антитела, которые нейтрализуют АТФазную активность pCD39.

Затем оценивали различные подходы к скринингу ингибирования АТФазы. В одном эксперименте антитело I-394 применяли для добавления в супернатанты, кондиционированные гибридами в иммунизациях из примера 3, которые оказались отрицательными по способности ингибировать АТФазную активность растворимого CD39. Такое добавление I-394 в супернатант не восстанавливало способность отрицательных супернатантов ингибировать АТФазную активность CD39. Антитело I-394 затем очищали из отрицательных супернатантов, применяя покрытые белком А гранулы, и мы наблюдали, что снова способность очищенного I-394 ингибировать АТФазную активность восстанавливалась.

Ввиду описанных выше результатов были разработаны новые протоколы иммунизации и скрининга, в которых растущие клоны из новых и предыдущих иммунизаций подвергали скринингу с помощью проточной цитометрии, применяя линии клеток CHO дикого типа и CHO, экспрессирующих huCD39, без оценки ингибирования АТФазной активности растворимого CD39 или клеточного CD39 и без направленности скрининга на эпитопы. Хотя результаты, касающиеся утраты связывания с мутантом 5 или 19, были доступны для некоторых гибридов, эти результаты не использовали для селекции клонов, но только сохраняли с целью спасения гибридом для клонирования в случае отрицательных результатов в анализе блокирования АТФазы. Гибридомы, которые связывают CD39, подвергали селекции и клонировали, а затем очищали, применяя белок А, согласно следующему протоколу:

- добавить к 300 мкл супернатанта гибридом 10 мкл гранул с белком А;
- добавить NaCl до конечной концентрации 1,5 М;
- перемешивать вращением пробирки в течение 3-4 ч при 4°C;
- центрифугировать 1 мин при 1500 об/мин;
- удалить супернатант и провести три промывки 1 мл ТБС;

удалить весь ТБС после третьей промывки;
добавить 50 мкл 0,1 М цитрата, pH 3, гомогенизировать и инкубировать при комнатной температуре в течение 5 мин;

центрифугировать гранулы в течение 1 мин при 1500 об/мин;

собрать 50 мкл элюата, быстро добавить 450 мкл ТБС и хранить при 4°C. Полученные антитела затем подвергали скринингу в сравнительном анализе способности ингибировать АТФазную активность CD39 в сходной степени с I-394. Тесты, используемые для ингибирования ферментативной активности растворимого и клеточного CD39, были описаны выше (Методы). Неожиданно, среди типичных антител, полученных таким образом, несколько проявили ингибирование растворимого CD39 (а также ингибирование клеточного CD39). На фиг. 1 показан типичный результат скрининга, показывающий антитела I-397, I-398 и I-399 по сравнению с антителом положительного контроля I-394. Аналогично, антитела I-395 и I-396 из различных иммунизаций ингибировали ферментативную активность растворимого белка CD39. На фиг. 2А и 2В показаны результаты для антител I-395 и I-396, для которых были доступны большие количества антител для дополнительных экспериментов по нейтрализации как растворимого, так и клеточного CD39. На фиг. 2А показано, что оба антитела I-395 и I-396 ингибируют связанный с мембраной клетки CD39, в сравнении с антителами ВУ40 и I-394, при этом оба I-394 и I-395 проявили большую эффективность и максимальное ингибирование клеточного CD39 по сравнению с ВУ40. На фиг. 2В показано, что оба антитела I-395 и I-396 ингибируют растворимый CD39, в сравнении с антителами ВУ40 и I-394. Хотя ВУ40 не ингибирует растворимый CD39 при любой концентрации, все I-394, I-395 и I-396 ингибировали растворимый CD39, при этом для I-394 выявили наибольшую эффективность, за которым следовало I-395, а затем I-396 с меньшей эффективностью.

Полученные результаты указывают на возможность того, что фактор(ы) в супернатантах гибридом быстро гидролизует(ют) АТФ как в культуре клеток, так и в анализе растворимого CD39, так что при скрининге антител с применением обычных способов не детектируется сигнал АТФ. Указанный растворимый фактор может представлять собой CD39 или некоторый другой фермент, например, созданный партнером по слиянию.

Антитела затем клонировали с модификациями, чтобы получить человеческие константные области с доменом Fc IgG1, содержащим мутации L234A/L235E/G237A/A330S/P331S (нумерация по Кабаты EU), которые приводят к отсутствию связывания с Fcγ-рецепторами человека CD16A, CD16B, CD32A, CD32B и CD64, таким же образом, как показано в данном изобретении для I-394. Полученные в результате этого антитела затем можно подвергнуть титрованию, а затем более детальной оценке активности, как показано в примерах 7-9 (титрование, ингибирование АТФазной активности), чтобы оценить EC₅₀ и IC₅₀ для выстраивания антител по эффективности.

Пример 6. Картирование эпитопов нейтрализующих pCD39 МАТ.

Как показано в примере 4, выявили полную утрату связывания I-394 с клетками, экспрессирующими мутант 19 CD39, но не утрату связывания с мутантом 5. Для того чтобы определить эпитопы дополнительных антител против CD39 из примера 5, исследовали утрату их связывания с панелью мутантов CD39, как описано в примере 1 и табл. 1. Мутантами трансфицировали клетки НЕК293Т, как показано в табл. 1, используя нумерацию последовательности SEQ ID NO: 2. Диапазоны доз тестируемых антител (10 - 2,5 - 0,625 - 0,1563 - 0,0391 - 0,0098 - 0,0024 - 0,0006 мкг/мл) исследовали на 20 полученных мутантах с помощью проточной цитометрии.

Результаты показали, что антитела, выбранные в примере 5 по способности ингибировать растворимый CD39, представляли несколько различных эпитопов. Среди антител, для которых выявили ингибирование растворимого внеклеточного CD39 в примере 5, антитело I-395 является примером антитела, для которого выявили утрату связывания с мутантом 5, содержащим замены в остатках Q96, N99, E143 и R147, а также утрату связывания с мутантом 19, содержащим замены в остатках R138, M139 и E142. Мутант 19 содержит замены в остатках R138, M139 и E142. Коровый эпитоп на CD39 для I-395, таким образом, содержит один, два, три или четыре остатка Q96, N99, E143 и R147, а также один, два или три остатка R138, M139 и E142.

Антитело I-398, с другой стороны, является примером антитела, для которого выявили утрату связывания с мутантом 19, содержащим замены в остатках R138, M139 и E142, но не выявили снижения или утраты связывания с мутантом 5, содержащим замены в остатках Q96, N99, E143 и R147.

Другие антитела, для которых выявили ингибирование растворимого внеклеточного CD39 в примере 5, содержали совсем различные эпитопы, и для них не выявили утраты связывания ни с одним из мутантов 5 или 19, позволяя предположить, что растворимый CD39 также можно ингибировать путем связывания с другими сайтами на pCD39. Для некоторых антител утрата связывания с одним из 20 мутантов из табл. 1 позволяла локализовать сайт связывания на CD39, тогда как для других сайт связывания предстояло определить, так как они не утрачивали связывания ни с одним из 20 мутантов. Среди антител, проявивших ингибирование АТФазной активности растворимого CD39 в примере 5, для антитела I-396 выявили утрату связывания с мутантом 15, содержащим замены K87A, E100A и D107A, без утраты связывания с любым из остальных 20 мутантов. Коровый эпитоп на CD39 для данного антитела, следовательно, содержит один или более (или все) из остатков K87, E100 и D107. Для антитела I-399 выявили

утрату связывания с мутантом 11, содержащим замены N371K, L372K, E375A, K376G, V377A и вставку валина между K376 и V377 (обозначили в табл. 1 "вставка 377V"), без утраты связывания с любым из остальных 20 мутантов. Коровий эпитоп на CD39 для данного антитела, следовательно, содержит один или более (или все) из остатков N371, L372, E375, K376 и V377. На фиг. 3А показано положение остатков, мутированных в мутантах 5 (M5), 15 (M15) и 19 (M19) на поверхности белка CD39. На фиг. 3В показаны результаты связывания с мутантами 5, 15 и 19 для различных антител.

Таким образом, результаты показывают, что антитела, которые ингибируют растворимый CD39, можно получить против различных эпитопов. Указанные эпитопы включают эпитопы, определенные по одному или более остаткам из мутанта 19, которые расположены рядом с сайтом связывания BУ40 или подобных BУ40 антител, которые ингибируют только клеточный CD39, но не растворимый CD39 (которые утрачивают связывание с мутантом 5), эпитопы, которые определяются по одному или более остаткам мутанта 19, но также частично мутанта 5, указывая, возможно, на меньший сдвиг по сравнению с BУ40 или подобными BУ40 антителами, эпитопы, которые определяются по одному или более остаткам мутанта 19, но не по остаткам мутанта 5, а также другие эпитопы, такие как эпитопы, которые определяются по одному или более остаткам мутанта 11 или по одному или более остаткам мутанта 15, или дополнительно по другим антителам, которые не проявляют какого-либо снижения связывания с любым из мутантов 5, 15 или 19, для которых локализацию эпитопов предстоит определить.

Пример 7. Титрование антител на экспрессирующих CD39 клетках с помощью проточной цитометрии.

Антитело I-394 исследовали в двух повторных экспериментах на связывание с клетками CHO, экспрессирующими CD39 человека, клетками CHO, экспрессирующими CD39 яванского макака (*macaca fascicularis*), клетками CHO, экспрессирующими CD39 мыши, и клетками лимфомы Ramos человека (ATCC™, номер CRL-1596). Клетки инкубировали с различными концентрациями немеченого антитела против CD39 от 30 мкг/мл до 5×10^{-4} мкг/мл в течение 30 мин при 4°C. После промывок клетки инкубировали с меченым вторичным антителом козы против H+L мыши в течение 30 мин при 4°C.

Результаты показаны на фиг. 4. Антитело I-394 связывалось с клетками, экспрессирующими CD39 человека (CHO-huCD39), клетками, экспрессирующими CD39 яванского макака (CHO-cuCD39), и клетками лимфомы Ramos, но не с клетками, экспрессирующими CD39 мыши (CHO-moCD39). I-394 связывалось с клетками Ramos со значениями EC₅₀, равными 0,16 мкг/мл и 0,19 мкг/мл, в соответствующей первой и второй серии экспериментов. Для нескольких других антител против CD39 выявили сопоставимые значения EC₅₀ для связывания с клетками Ramos.

Пример 8. Определение IC₅₀ для ингибирования АТФазной активности клеток.

Ингибирование антителом I-394 АТФазной активности CD39 в экспрессирующих CD39 клетках оценивали, применяя анализ, используемый для выявления ингибирования ферментативной активности клеточного CD39, описанный выше (Методы).

Результаты представлены на фиг. 5. I-394 очень эффективно блокировало ферментативную активность CD39 в клетках опухоли (Ramos), при этом эффективность была наибольшей по сравнению со всеми другими исследованными антителами. I-394 также блокировало ферментативную активность CD39 в клетках, экспрессирующих CD39 человека (CHO-huCD39), и в клетках, экспрессирующих CD39 яванского макака (CHO-cuCD39). Клетки, экспрессирующие CD39 мыши (CHO-moCD39), показаны в качестве отрицательного контроля. Рассчитанная IC₅₀ (ингибирование 50% ферментативной активности CD39, экспрессированного 50000 клеток Ramos) составляла 0,05 мкг/мл. Максимальное достигнутое ингибирование составляло 81,6%. Изотипический контроль не оказывал никакого действия.

Пример 9. Определение IC₅₀ для ингибирования АТФазной активности рекомбинантного растворимого белка CD39.

Ингибирование антителом I-394 АТФазной активности растворимого белка CD39 оценивали, применяя способы анализа, используемые для оценки ингибирования ферментативной активности растворимого CD39, описанные выше (Методы). Результаты представлены на фиг. 6. I-394 ингибирует ферментативную активность растворимого белка CD39. Антитело BУ40, в сравнении, не ингибирует ферментативную активность растворимого белка CD39. Рассчитанная IC₅₀ составляла 0,003 мкг/мл. Максимальное достигнутое ингибирование составляло 74,9%.

Пример 10. Титрование ELISA на изоформах CD39 - L1, L2, L3, L4.

Исследовали связывание антитела I-394 с изоформами рекомбинантного CD39 человека (изоформами Rec-huCD39), имеющими последовательности аминокислот, представленные ниже, которыми покрывали 96-луночный планшет в1Х ФБР при 500 нг/мл или 1 мкг/мл при 4°C в течение ночи. Лунки промывали ТБС-твин 20 и дополнительно насыщали в течение 2 ч при комнатной температуре блокирующим буфером ТБС. Диапазон доз концентраций первичного антитела инкубировали в блокирующем буфере ТБС в течение 2 ч при комнатной температуре. Лунки промывали ТБС-твин 20. Вторичное антитело (GAM-HRP или GAN-HRP в блокирующем буфере ТБС) инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и обнаруживали с помощью ТМВ. Оптическую плотность измеряли на Enspire™ при ОП = 450.

CD39-L1 человека, также известный как НТФДаза2 или ENTPD2:

```

1 MAGKVRSLLP PLLLAAGLA GLLLLCVPTR DVREPPALKY GIVLDAGSSH TSMFIYKWA
61 DKENDTGIVG QHSSCDVPGG GISSYADNPS GASQSLVGCL EQALQDVPKE RHAGTPLYLG
121 ATAGMRLNL TNPEASTSVL MAVTHTLTQY PFDFRGARIL SGQEEGVFGW VTANYLLENF
181 IKYGVVGRWF RPRKGTLGAM DLGGASTQIT FETTSAPEDR ASEVQLHLYG QHYRVYTHSF
241 LCYGRDQVLQ RLLASALQTH GFHPCWPRGF STQVLLGDVY QSPCTMAQRP QNFNSSARVS
301 LSGSSDPHLC RDLVSGLFSE SSCPFSSRCSE NGVFQPPVAG NFVAFSAFFY TVDFLRTSMG
361 LPVATLQQLQ AAANVVCNQT WAQQLLSRGY GFDERAFGGV IFQKKAADTA VGWALGYMLN
421 LTNLIPADPP GLRKGTDFSS WVVLILLFAS ALLAALVLLL RQVHSAKLPS TI

```

(SEQ ID NO: 55).

CD39-L2 человека, также известный как НТФДаза6 или ENTPD6:

```

1 MKKGIRYETS RKTSYIFQPP QHGPWQTRMR KISNHGSLRV AKVAYPLGLC VGVFIYVAYI
61 KWHRATATQA FFSITRAAPG ARWGQQAHSF LGTAADGHEV FYGIMFDAGS TGTRVHVVFQF
121 TRPPRETPTL THETFKALKP GLSAYADDVE KSAQGIRELL DVAKQDIPFD FWKATPLVLK
181 ATAGLRLLPG EKAQKLLQKV KEVFKASPFV VGDDCVSIMN GTDEGVSAWI TINFLTGSLLK
241 TPGGSSVGML DLGGGSTQIA FLPRVEGTLO ASPPGYLTAL RMFNRTYKLY SYSYLGGLML
301 SARLAILGGV EGQPAKDGEK LVSPCLSPSF KGEWEHAEVT YRVSGQKAAA SLHELCAARV
361 SEVLQNRVHR TEEVKHVDYF AFSYYDLAA GVGLIDAEKG GSVLVGDFEI AAKYVCRTLE
421 TQPQSSPFSC MDLTYVSLLL QEFGFPRSKV LKLTRKIDNV ETSWALGAIF HYIDSLNRQK
481 SPAS

```

(SEQ ID NO: 56).

CD39-L3 человека, также известный как НТФДаза3 или ENTPD3:

```

1 MFTVLTRQPC EQAGLKALYR TPTIALLVVL LVSIVVLVSI TVIQIHKEV LPPGLKYGIV
61 LDAGSSRTTV YVYQWPAEKE NNTGVVSQTF KCSVKGSGIS SYGNNPQDVP RAFEECMQVKI
121 KGQVPSHLHG STPIHLGATA GMRLRLQNE TAANEVLESI QSYFKSQPFV FRGAQIISGQ
181 EEGVYGWITA NYLMGNFLEK NLWHMVVHPH GVETTGALDL GGASTQISFV AGEKMDLNTS
241 DINQVSLYGY VYTLYTHSFQ CYGRNEAEKK FLAMLLQNSP TKNHLTNPCY PRDYSISFTM
301 GHVFDLSCTV DQRPESYNFN DVITFEETGD PSLCKEKVAS IFDFKACHQD ETCSEFQVYQ
361 PKIKGPFVAF AGFYATASAL NLSGSFSLDT FNSSTWNFCS QNWSQLPLLL PKFDEVYARS
421 YCFSANIYH LFNNGYKFTF ETWPQIHFEK EVGNSSIAWS LGYMLSLTNQ IPAESPLIRL
481 PIEPPVFVGT LAFFTAALL CLAFLAYLCS ATRRKRHSEH AFDHAVDSD

```

(SEQ ID NO: 57).

CD39-L4 человека, также известный как НТФДаза5 или ENTPD5:

```

1 MATSWGTVFF MLVVSCVCSA VSHRNQQTWF EGIFLSSMCP INVSASTLYG IMFDAGSTGT
61 RIHVYTFVQK MPQQLPILEG EVFDSVKPGL SAFVDQPKQG AETVQGLLEV AKDSIPRSHW
121 KKTPVVLKAT AGLRLLPEHK AKALLFEVKE IFRKSPFLVP KGSVSIMDGS DEGILAWVTV
181 NFLTQQLHGH RQETVGTLDL GGASTQITFL PQFEKTLEQT PRGYLTSFEM FNSTYKLYTH
241 SYLGFGLKAA RLATLGALET EGTDGHTFRS ACLPRWLEAE WIFGGVKYQY GGNQEGEVGF
301 EPCYAEVLRV VRGKLHQPEE VQRGSFYAFS YYYDRAVDTD MIDYEKGGIL KVEDFERKAR
361 EVCDNLENFT SGSPFLCMDL SYITALLKDG FGFADSTVLQ LTKKVNNIET GWALGATFHL
421 LQSLGISH

```

(SEQ ID NO: 58).

I-394 связывалось с CD39, но не с любыми из изоформ CD39-L1, -L2, -L3 или -L4. Антитела изотипического контроля (ИК) не связывались ни с одной молекулой CD39 или CD39-L. Результаты представлены на фиг. 7.

Пример 11. Активация дендритных клеток.

Последовательность аминокислот клонированного huCD39 (сосудистая изоформа).

Хотя АТФ обладает провоспалительной активностью, полагают, что опосредованный CD39 катаболизм АТФ способен нарушать активацию дендритных клеток (ДК), в свою очередь изменяя более обширный приобретенный иммунный ответ на антиген опухоли. Для того чтобы оценить, может ли блокирование CD39 с применением антител против CD39 преодолеть опосредованное CD39 изменение активации дендритных клеток (ДК) в присутствии АТФ, мы инкубировали ДК моноцитарного происхождения (моДК) с антителами против CD39 в присутствии АТФ.

Вкратце, моноциты человека очищали из крови здорового человека и дифференцировали с получением моДК в присутствии GM-CSF и IL-4 в течение 6 дней. Затем моДК активировали в присутствии АТФ (Sigma, 0,25-1 мМ) в течение 24 ч и активацию ДК оценивали путем анализа экспрессии CD80, CD83 и HLA-DR с помощью проточной цитометрии. В некоторых случаях моДК предварительно инкубировали в течение 1 ч в присутствии ингибитора CD39: ARL6716 (Tocris, 250 мкМ), ингибитора CD73: APCP (Tocris 50 мкМ), блокирующего антитела против CD39 I-394 или BY40 (BY40 см. в WO 2009/095478), или блокирующих антител против CD73. Липополисахарид (ЛПС) (Invivogen, 10 нг/мл) использовали в качестве положительного контроля. Для того чтобы оценить окончательное влияние опосредованной АТФ активации ДК на активацию CD4 Т-клеток, активированные АТФ ДК промывали, а затем инкубировали с аллогенными CD4 Т-клетками (соотношение 1 моДК /4 Т-клетки) для проведения реакции смешанной культуры лимфоцитов (РСКЛ) в течение 5 дней. Активацию и пролиферацию Т-клеток анализировали по экспрессии CD25 и разведению CellTrace Violet с помощью проточной цитометрии (фиг. 8).

Результаты представлены на фиг. 9, 10 и 11. В присутствии отрицательного контроля (среды) активацию моДК наблюдали в присутствии 1 мМ АТФ, тем не менее АТФ при 0,125 мМ, 0,25 мМ или 0,5 мМ не позволял активацию моДК. Добавление химических ингибиторов CD39, которые, как полагают, пол-

ностью блокируют ферментативную активность CD39 путем связывания с активным центром, приводят к активации моДК при каждой из концентраций: 0,125 мМ, 0,25 мМ или 0,5 мМ. Тем не менее, антитела против CD39, такие как BY40, или антитела против CD73 были не способны содействовать вызванной АТФ активации дендритных клеток (ДК), позволяя предположить, что антитела не способны блокировать ферментативную активность в достаточной мере, чтобы избежать катаболизма АТФ. Неожиданно, блокирующее антитело против CD39 I-394 (представленное на фигурах при концентрации 10 мкг/мл), которое по существу полностью блокирует АТФазную активность CD39 и, следовательно, может позволить накопление АТФ, позволяло активацию моДК, которую оценивали по экспрессии HLA-DR или CD83 при каждой из концентраций: 0,125, 0,25 или 0,5 мМ (фиг. 9 и 10). Интересно, что моДК, активированные в присутствии АТФ, были способны вызывать лучшую активацию и пролиферацию Т-клеток в анализе РСКЛ. Более того, повышение опосредованной АТФ активации моДК блокирующим антителом против CD39 - I-394 - приводило к более высокому уровню пролиферации и активации Т-клеток (фиг. 11).

Оценка способности ингибиторов CD39 активировать ДК в присутствии АТФ представляет собой способ идентификации и оценки антител против CD39, которые способны достигнуть высокой степени ингибирования CD39. Более того, возможность применения антител против CD39 для снятия иммуносупрессорного действия, оказываемого CD39 на ДК, может привести к усилению приобретенного иммунного ответа на антигены, а именно на клетки опухоли. Более того, такие антитела против CD39 могут представлять особый интерес при применении для усиления иммуногенного действия химиотерапевтических агентов. Множество химиотерапевтических агентов, которые вызывают некроз опухолевых клеток, способны индуцировать АТФ; комбинированное применение с антителами против CD39 может быть особенно полезным для усиления противоопухолевого ответа в данных условиях.

Пример 12. Антитела, которые ингибируют АТФазную активность рекомбинантного растворимого белка CD39, сильно усиливают блокирование CD73 в присутствии АТФ.

Анализ пролиферации Т-клеток.

Периферическую кровь из здоровых доноров получали от EFS, и мононуклеарные клетки выделяли в градиенте фикола. Проводили дополнительное обогащение лимфоцитами в градиенте 52% перколла путем сбора осадка клеток, и окрашивали их красителем Cell Trace (Thermofisher) после TDS, предоставленным производителем. 5×10^4 - 1×10^5 окрашенных клеток распределяли по 96-луночным планшетах со скругленным дном лунок, инкубировали в течение 1 ч при 37°C с антителами против huCD73 (антителом 6E1) и/или АТ против huCD39 (I-394, описанным в данном изобретении) и активировали в течение от 3 до 5 дней путем добавления покрытых антителом против CD3/против CD28 гранул (гранулы:клетки = 1:4; Life Technologies). Ингибирования пролиферации Т-клеток достигали путем добавления АТФ (200 мкМ). Пролиферацию Т-клеток и способность АТ блокировать иммуносупрессивное действие АМФ оценивали с помощью проточной цитометрии путем количественного анализа разведения красителя в субпопуляции пролиферирующих Т-клеток.

Процент пролиферирующих Т-клеток в зависимости от концентрации АТ против CD73 наносили на график, применяя программное обеспечение GraphPad Prism.

Результаты.

Исследовали способность антител восстанавливать пролиферацию CD4 или CD8 Т-клеток в присутствии добавленного АТФ, что предположительно моделирует условия, которые можно найти в окружении опухоли. Каждое из антител против CD73 и CD39 исследовали в диапазоне доз при 3 различных дозах другого антитела против CD73 или против CD39. Антитело против CD39 I-394 сильно усиливало действие антител против CD73 в отношении восстановления пролиферации CD4 или CD8 Т-клеток, так что даже низкие концентрации антител против CD73 (например, ниже 0,01 мкг/мл, ниже 0,001 мкг/мл и даже ниже 0,001 мкг/мл) сильно повышали пролиферацию CD4 или CD8 Т-клеток, при применении в комбинации с антителами против CD39. Более того, при исследовании в диапазоне доз отдельно без антитела против CD73, антитело против CD39 I-394 приводило к заметному повышению пролиферации CD4 или CD8 Т-клеток при концентрации 0,1 мкг/мл и 1 мкг/мл. На фиг. 12А показано влияние диапазона доз антитела против CD73 6E1 на пролиферацию CD4 Т-клеток при 3 различных дозах антитела против CD39 I-394, либо 0,01 мкг/мл, либо 0,1 мкг/мл, либо 1 мкг/мл. Антитела против CD39, которые способны нейтрализовать растворимый и/или мономерный CD39 человека, проявили сильное усиление действия антитела против CD73 в отношении восстановления пролиферации CD4 Т-клеток. Такое действие было особенно сильным при концентрациях, при которых антитела против CD73 были субоптимально активны, что соответствует диапазонам концентраций, которые можно наблюдать в опухолевых тканях в ходе лечения антителом против CD73. При концентрации 0,01 мкг/мл антитела против CD39 вызывали повышение эффективности антител против CD73 приблизительно на 1 log, и при концентрации 0,1 мкг/мл антитела против CD39 вызывали повышение эффективности антител против CD73 приблизительно на 4 log. Антитела против CD39, следовательно, могут быть полезны для усиления активности антител против CD73, особенно в опухолевой ткани, например, в опухолях, несущих экспрессирующие CD73 клетки. Более того, хотя исследованные антитела против CD73 (которые способны нейтрализовать растворимый белок CD73) обладали высокой способностью восстанавливать пролиферацию CD4 Т-клеток, для других антител с меньшей эффективностью (например, которую оценивали в анализе фер-

ментативного ингибирования, в анализе пролиферации Т-клеток или в другом подходящем анализе) комбинация с антителами против рCD39 может оказаться еще более полезной. На фиг. 12В показано влияние диапазона доз антител против CD73 на пролиферацию

CD8 Т-клеток. Снова, антитела против CD39 проявили сильное синергичное действие и/или аддитивный эффект с антителами против CD73 в отношении восстановления пролиферации CD8 Т-клеток. Эффект был особенно сильным при концентрациях, при которых антитела против CD73 были субоптимально активны, что соответствует диапазонам концентраций, которые можно наблюдать в опухолевых тканях в ходе лечения антителом против CD73.

Исследование экспрессии генов CD39 и CD73 проводили, используя Атлас генома рака (Cancer Genome Atlas, совместный проект Национального института рака (National Cancer Institute) и Национального института исследований генома человека (National Human Genome Research Institute)), в котором представлены многомерные карты ключевых геномных изменений при 33 типах рака. Уровни экспрессии (указаны как высокие или низкие) рассматриваются с учетом стадии и времени заболевания. Для каждого рака и каждого гена (CD39/ENTPD1 и CD73/NT5E) пациентов делили на 2 группы (высокая и низкая экспрессия гена) согласно р-значению регрессии Кокса (каждая группа должна включать по меньшей мере 10% пациентов). Кривые вероятности выживаемости строили для каждой из 2 групп. Статистические различия в выживаемости между низкой и высокой экспрессией CD39 наблюдали для образцов рака яичников и аденокарциномы желудка, при этом высокая экспрессия CD39 соответствовала низкой выживаемости. Тенденцию также наблюдали для образцов плоскоклеточной карциномы пищевода и плоскоклеточной карциномы легкого. Результаты представлены на фиг. 13А-С и показывают, что низкая экспрессия CD39 при раке человека (рак яичников, пищевода и желудка на фиг. 13А, В и С, соответственно) коррелировала с большей вероятностью выживания, тогда как высокая экспрессия CD73 коррелировала с меньшей вероятностью выживания (рак яичников, пищевода и желудка).

Все ссылочные материалы, включая публикации, заявки на патент и патенты, цитированные в данном изобретении, настоящим полностью включены посредством ссылки и в той же степени, как если бы каждый ссылочный материал был отдельно и конкретно указан как включенный посредством ссылки, и были полностью изложены в данном изобретении (в максимальный объем, дозволенный законом), независимо от любого отдельно приведенного включения конкретных документов, сделанного в других местах в данном изобретении.

Если не указано иное, все точные значения, приведенные в данном изобретении, являются примером соответствующих приблизительных значений (например, все точные примеры значений, предложенные в отношении конкретного показателя или меры, можно считать также включающими соответствующую приблизительную меру, измененную термином "приблизительно", когда это целесообразно). Когда термин "приблизительно" использую вместе с числом, его можно уточнить как включающий значения, соответствующие $\pm 10\%$ от указанного числа.

В данном изобретении предполагается, что описание любого аспекта или варианта реализации согласно настоящему изобретению с использованием таких терминов как "включающий", "имеющий", "закрывающий" или "содержащий" в отношении элемента или элементов включает аналогичный аспект или вариант реализации настоящего изобретения, который "состоит из", "состоит по существу из" или "по существу включает" данный конкретный элемент или элементы, если не указано иное или нет явных противоречий с контекстом (например, упоминание композиции, описанной в данном изобретении как содержащей конкретный элемент, следует понимать также описывающим композицию, состоящую из такого элемента, если не указано иное или нет явных противоречий с контекстом).

Использование любого и всех примеров или языка примеров (например, "такой как"), предложенных в данном изобретении, предназначено только для лучшего освещения настоящего изобретения и не устанавливает ограничения на объем настоящего изобретения, если не утверждается иное. Ни одна формулировка в настоящем описании не должна рассматриваться как указывающая, что какой-либо незааявленный элемент незаменим для осуществления настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение антитела, которое способно связывать и ингибировать АТФазную активность белка растворимого внеклеточного домена CD39 человека (НТФДазы 1), для лечения рака у человека, причем указанное лечение включает введение:

(а) антитела, которое способно связывать и ингибировать АТФазную активность белка растворимого внеклеточного домена CD39 человека (НТФДазы 1), причем указанное антитело содержит HCDR1, содержащий последовательность аминокислот DYNMH (SEQ ID NO: 8); HCDR2, содержащий последовательность аминокислот YIVPLNGGSTFNQKFKG (SEQ ID NO: 9); HCDR3, содержащий последовательность аминокислот GGTRFAY (SEQ ID NO: 10); LCDR1, содержащий последовательность аминокислот RASESVDNFGVSFMY (SEQ ID NO: 11); участок LCDR2, содержащий последовательность аминокислот GASNQGS (SEQ ID NO: 12); и участок LCDR3, содержащий последовательность аминокислот QQTKEVPYT (SEQ ID NO: 13), и

(b) антитела, которое нейтрализует 5'-эксонуклеотидазную активность CD73 человека, где указанный рак представляет собой лейкемию, глиому или глиобластому, или рак мочевого пузыря, молочной железы, толстой кишки, пищевода, почек, печени, легких, яичников, матки, предстательной железы, поджелудочной железы, желудка, шейки матки, щитовидной железы, головы и шеи или кожи.

2. Применение по п.1, отличающееся тем, что указанное антитело, которое нейтрализует АТФазную активность CD39 человека, вводят перед введением антитела, которое нейтрализует 5'-эксонуклеотидазную активность CD73 человека.

3. Применение по любому из пп.1 или 2, отличающееся тем, что антитело, которое нейтрализует АТФазную активность CD39 человека, и антитело, которое нейтрализует 5'-эксонуклеотидазную активность CD73, представлены в формах для отдельного введения, и их вводят одновременно или последовательно.

4. Применение по любому из пунктов выше, отличающееся тем, что указанное антитело, которое способно связывать и ингибировать АТФазную активность белка растворимого внеклеточного домена CD39 человека (НТФДазы 1), не содержит домен Fc или содержит домен Fc, который модифицирован с целью уменьшения связывания между доменом Fc и Fcγ-рецептором.

5. Применение по любому из пунктов выше, отличающееся тем, что указанное антитело, которое нейтрализует 5'-эксонуклеотидазную активность CD73 не содержит домен Fc или содержит домен Fc, который модифицирован с целью уменьшения связывания между доменом Fc и Fcγ-рецептором.

6. Применение по любому из пунктов выше, отличающееся тем, что у индивида есть опухолевая ткань и/или прилегающая к опухоли ткань, для которой характерен высокий уровень экспрессирующих CD73 клеток.

7. Применение по любому из пунктов выше, отличающееся тем, что индивид страдает от рака, который прогрессировал или рецидивировал после предшествующего лечения агентом, который ингибирует полипептид CD73 человека.

8. Применение по любому из пунктов выше, отличающееся тем, что индивид страдает от солидной опухоли.

9. Применение по любому из пп.1-8, отличающееся тем, что индивид страдает от рака яичников.

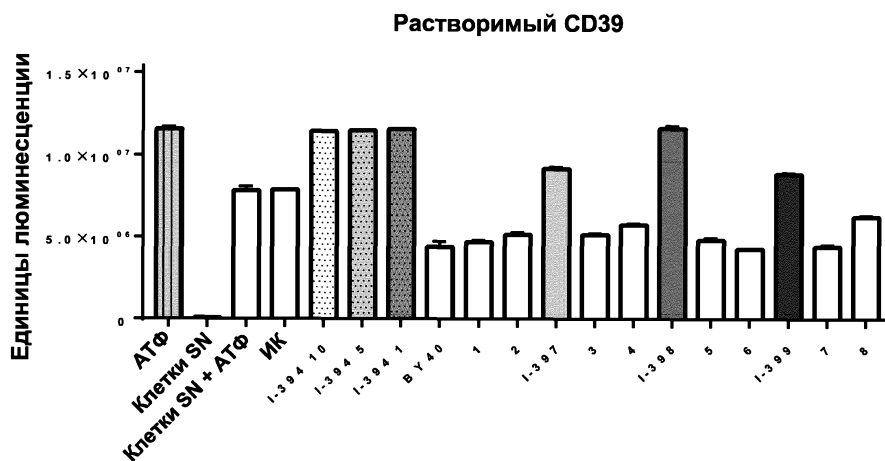
10. Применение по любому из пп.1-8, отличающееся тем, что индивид страдает от рака желудка.

11. Применение по любому из пп.1-8, отличающееся тем, что индивид страдает от рака легких.

12. Применение по любому из пп.1-8, отличающееся тем, что индивид страдает от рака толстой кишки.

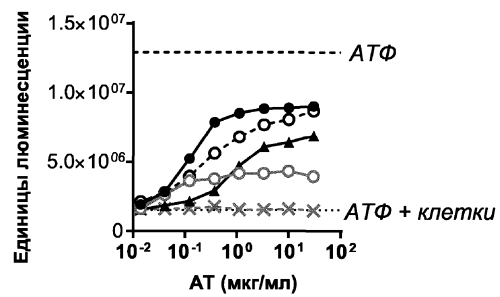
13. Применение по любому из пп.1-8, отличающееся тем, что индивид страдает от рака пищевода.

14. Применение по любому из пп.1-8, отличающееся тем, что индивид страдает от рака молочной железы.



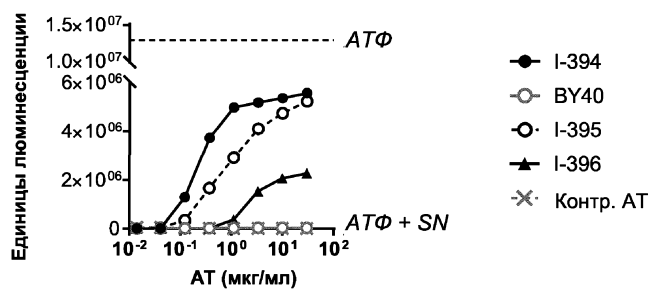
Фиг. 1

Мембранный CD39

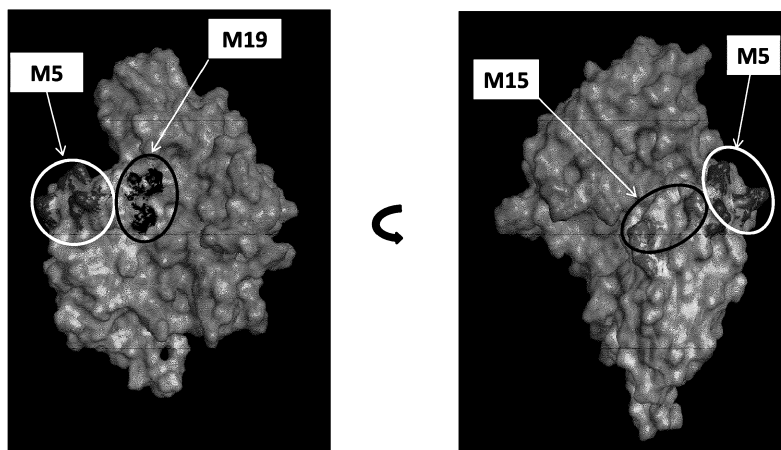


Фиг. 2А

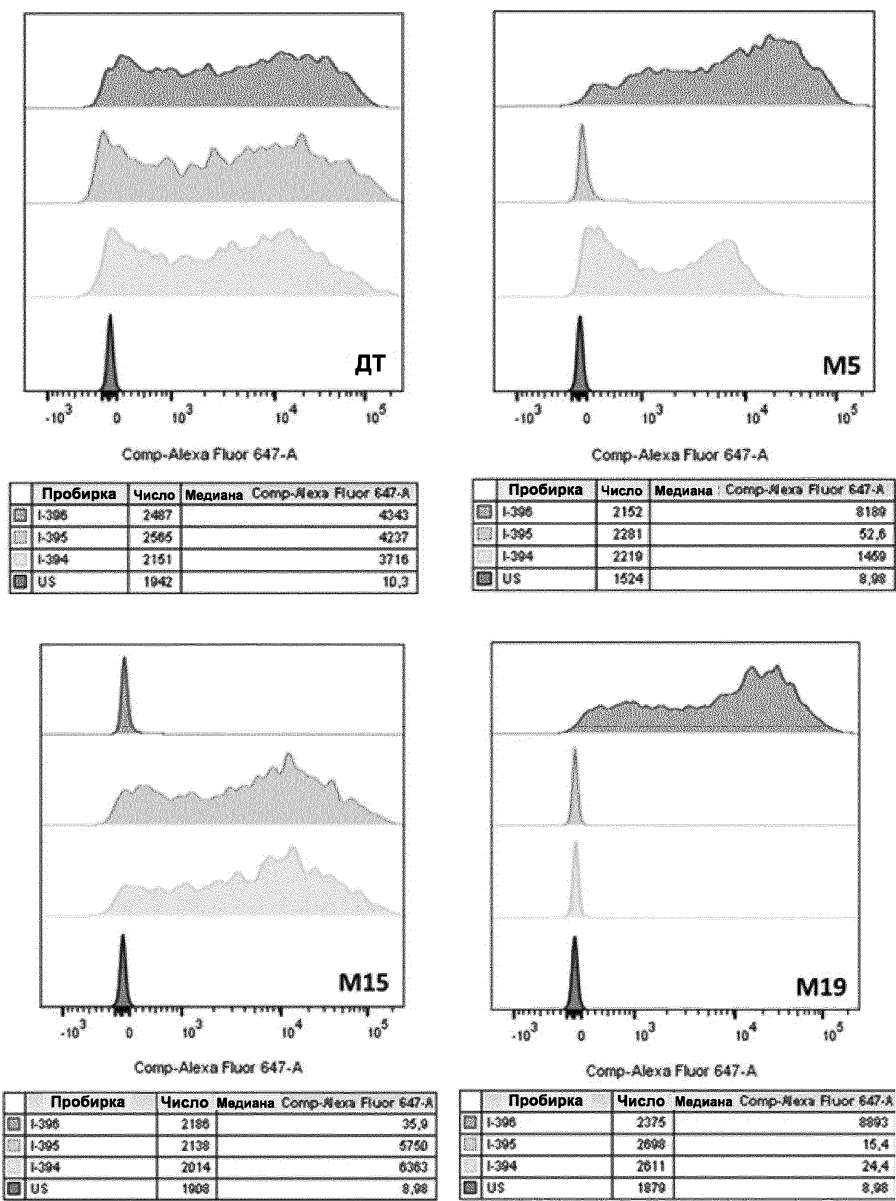
Растворимый CD39



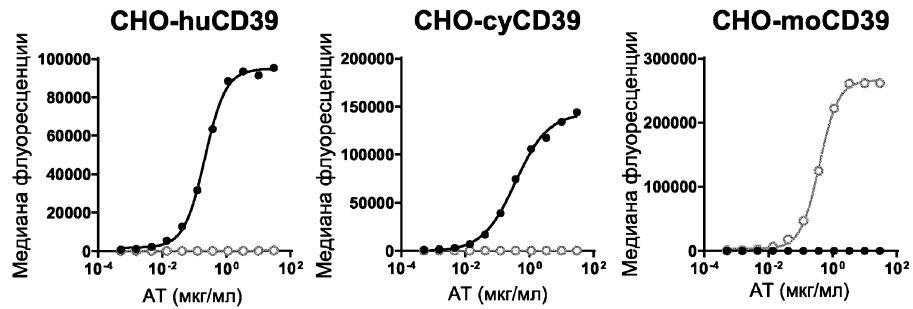
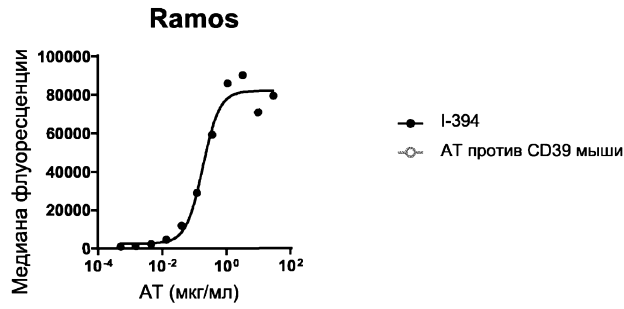
Фиг. 2В



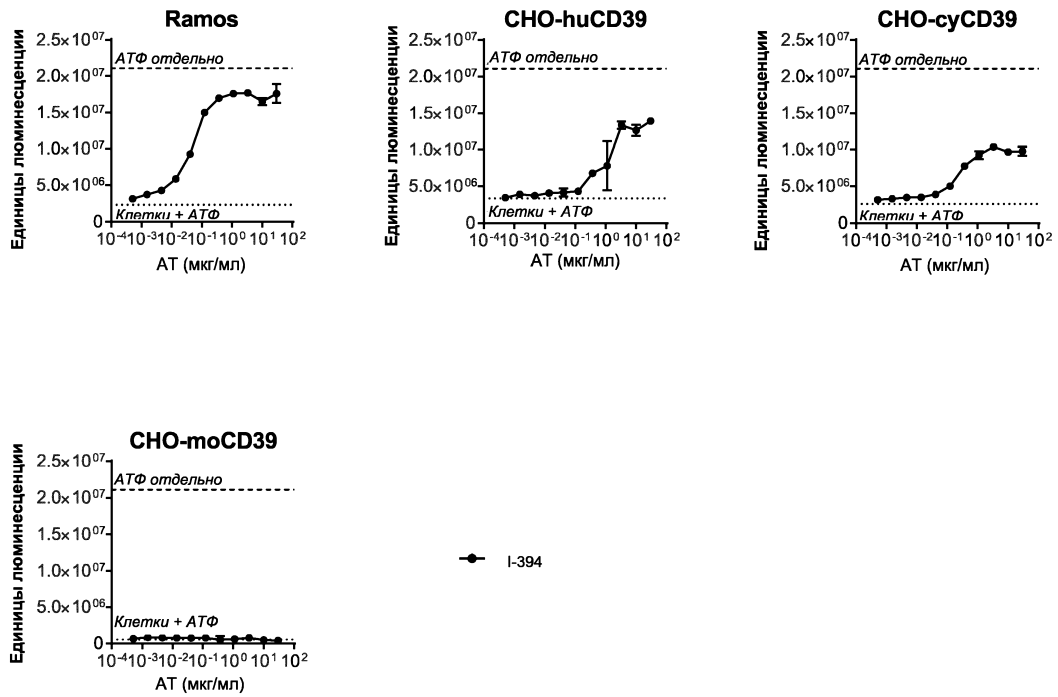
Фиг. 3А



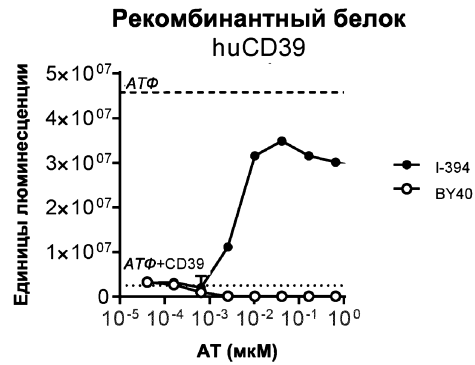
Фиг. 3В



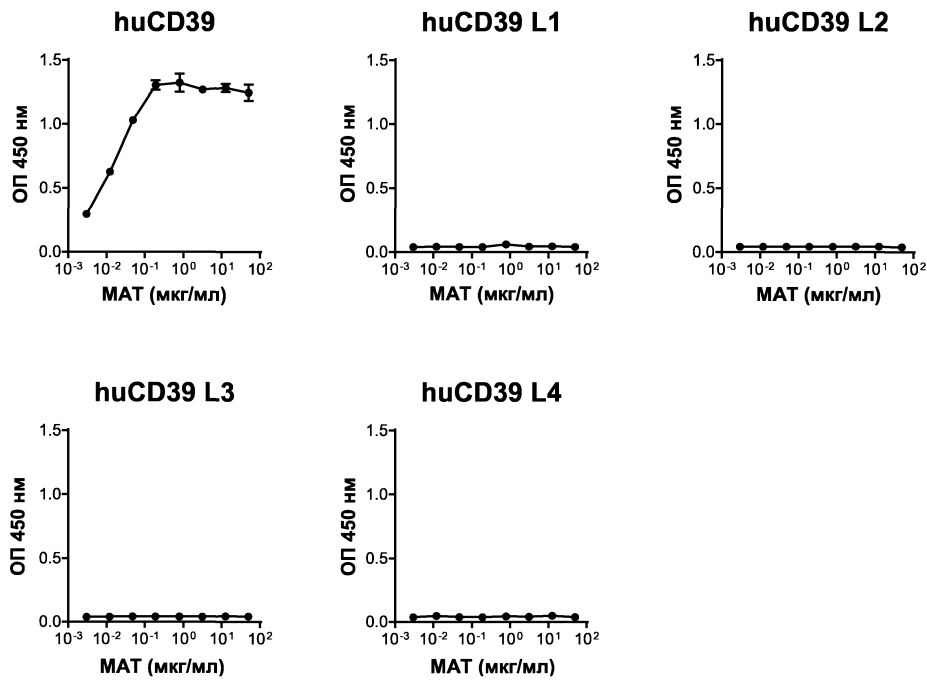
Фиг. 4



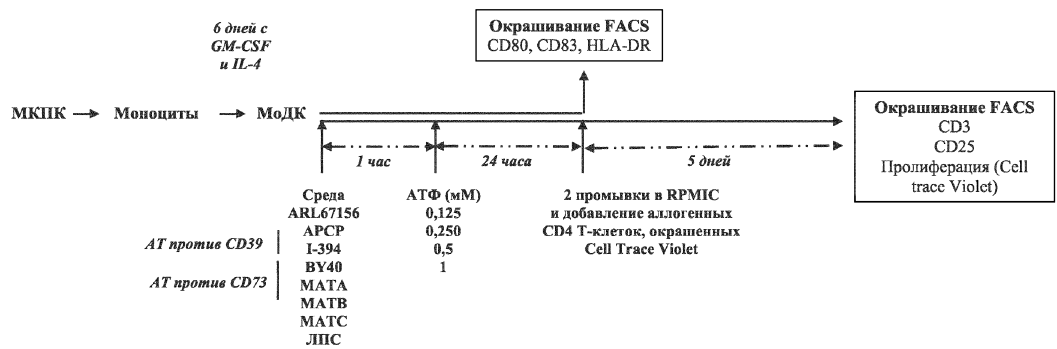
Фиг. 5



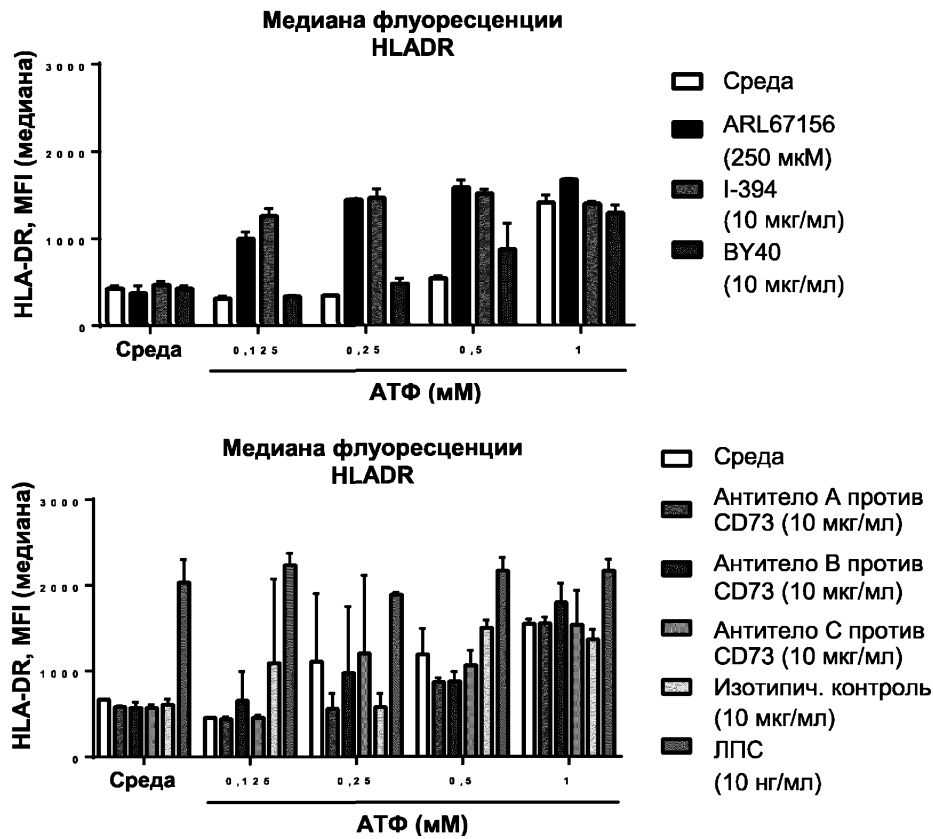
Фиг. 6



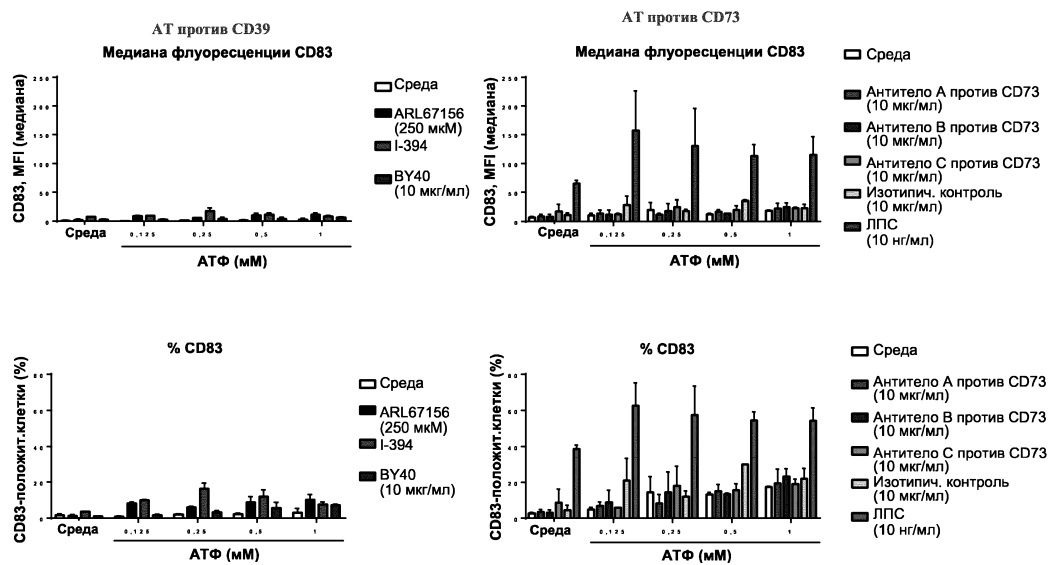
Фиг. 7



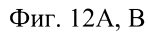
Фиг. 8



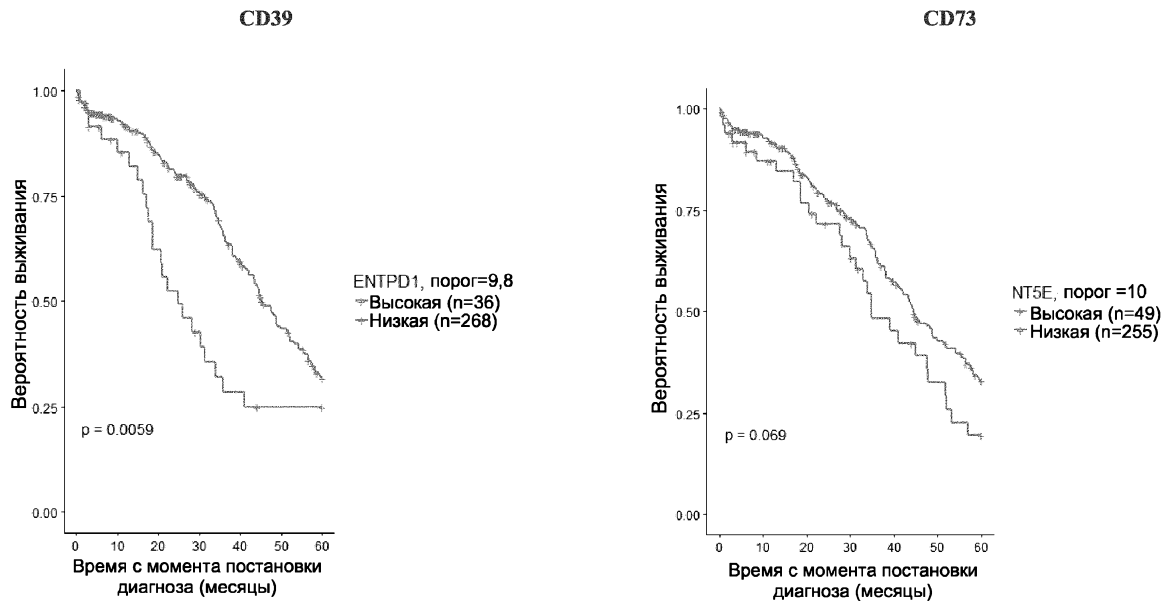
Фиг. 9



Фиг. 10

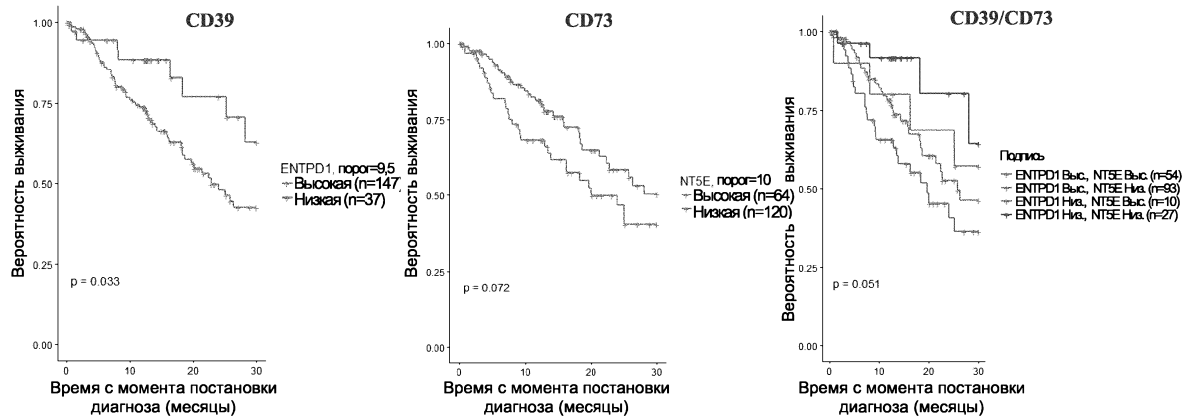


Рак яичников, 60 месяцев



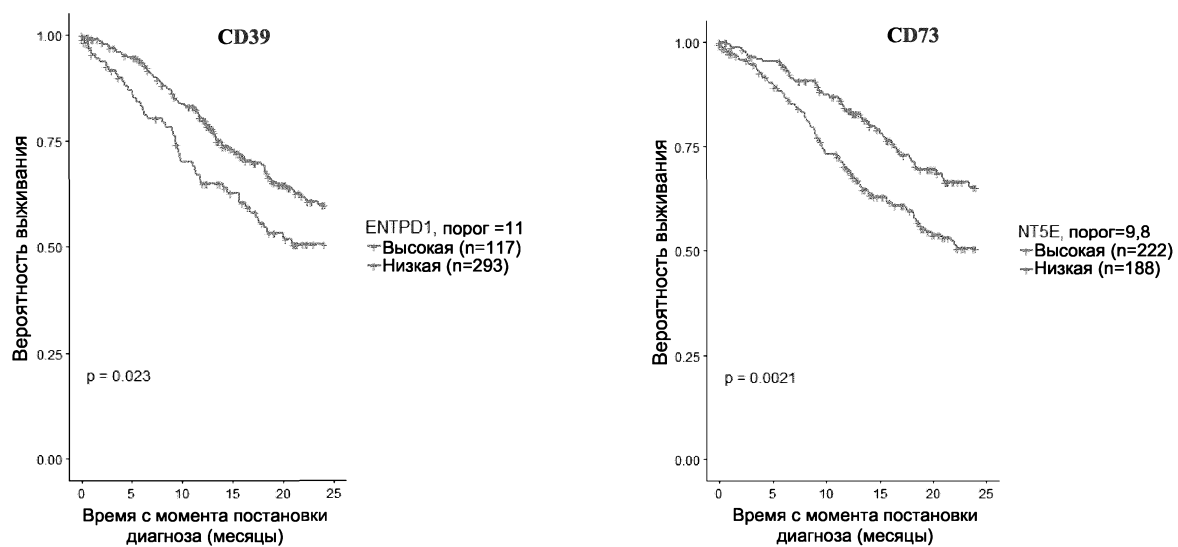
Фиг. 13А

Плоскоклеточный рак пищевода



Фиг. 13В

Аденокарцинома желудка, 24 месяца



Фиг. 13С



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2