

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092518** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.08.23

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.06.17

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

(31) **62/686,165**

(72) Изобретатель:

(32) **2018.06.18**

Шанто Стефани, Готье Лоран, Гурден

(33) **US**

Николя, Патурель Карин, Перро

(86) **PCT/EP2019/065877**

Иван, Росси Бенжамин (FR)

(87) **WO 2019/243252 2019.12.26**

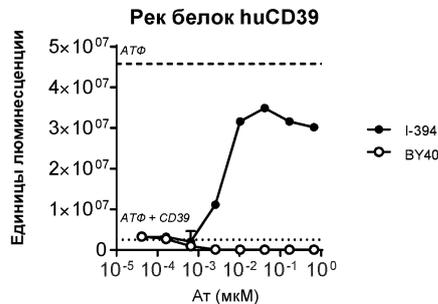
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Нилова М.И. (RU)

ИННЕЙТ ФАРМА (FR)

(57) Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим соединениям, которые ингибируют ферментативную активность растворимого CD39 человека. Настоящее изобретение также относится к клеткам, продуцирующим такие соединения; способам получения таких соединений и антителам, их фрагментам, вариантам и производным; фармацевтическим композициям, содержащим их; способам применения указанных соединений для диагностики, лечения или профилактики заболеваний, например рака.



202092518 A1

202092518 A1

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

5 В настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/686,165, поданной 18 июня 2018 года; содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки; включая любые чертежи.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

10 Настоящая заявка подается совместно с перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей представлен в виде файла под названием "CD39-9_ST25", созданного 27 мая 2019 года и имеющего размер 72 КБ. Информация перечня последовательностей в электронном формате включена в настоящую заявку посредством ссылки в полном объеме.

15

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим соединениям (например, антителам), которые ингибируют ферментативную активность растворимого CD39 человека. Настоящее изобретение также относится к клеткам, продуцирующим такие соединения; способам получения таких соединений и антителам, их фрагментам, вариантам и производным; фармацевтическим композициям, содержащим их; способам применения соединений для диагностики, лечения или профилактики заболеваний, например рака.

25

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Восемь различных генов ENTPD кодируют белки-члены семейства NTPDаз. Отдельные подтипы NTPDаз различаются по клеточному расположению и функциональным свойствам. Связанные с плазматической мембраной нуклеозидтрифосфатдифосфогидролазы контролируют уровень нуклеотидов на поверхности клетки посредством гидролиза с и b-фосфатов нуклеотидов.

30 NTPDаза 1 (эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидролаза 1), также известная как CD39/ENTPD1 или CD39 сосудов, функционирует совместно с другим ферментом, CD73 (экто-5'-нуклеотидаза), гидролизуя внеклеточный аденозинтрифосфат (АТФ) и аденозиндифосфат (АДФ) для генерации аденозина, который связывается с аденозиновыми рецепторами и ингибирует Т-клеточный и (NK)-клеточный ответы, тем самым подавляя иммунную систему. Генерация аденозина через путь CD73/CD39

35

признана основным механизмом иммуносупрессивной функции регуляторных Т-клеток (Treg). Количество CD39⁺ Treg увеличивается при некоторых видах рака человека, и важность CD39⁺ Treg в стимулировании роста опухоли и метастазирования была показана при помощи нескольких моделей *in vivo*. Однако CD39 также экспрессируется опухолевыми клетками, и CD39⁺ опухолевые клетки могут опосредовать иммуносупрессию через сигнальный путь аденозина. CD39 в раковых клетках проявляет АТФазную активность и совместно с CD73 генерирует аденозин. CD73⁺CD39⁺ раковые клетки ингибировали пролиферацию CD4 и CD8 Т-клеток и генерацию цитотоксических эффекторных CD8 Т-клеток (CTL) CD39- и аденозин-зависимым образом. Сообщалось, что уровень CD39 повышен в нескольких солидных опухолях (колоректальный рак, рак головы и шеи, рак поджелудочной железы), а также при хроническом лимфолейкозе. Антитела, которые связывают и ингибируют CD39 в CD39-экспрессирующих клетках, раскрыты в WO2009/095478. Антитело "A1" (eBiosciences, Inc.) применяют для окрашивания, и оно не проявляет способности нейтрализовать активность CD39 в клетках. В Hayes et al. (2015) Am. J. Transl. Res. 7(6): 1181-1188 применяют молекулу против CD39, которая связывает FcγR и обладает эффекторной функцией, но, как утверждается, также блокирует его. Экспрессия CD39 на различных типах клеток, включая лейкоциты и опухолевые клетки, в сочетании с применением антител, которые либо фактически не блокируют CD39, либо не являются абсолютными блокаторами, создают сложные условия для оценки основополагающей активности антител. На сегодняшний день единственным зарегистрированным ингибитором активного сайта CD39 остаются маломолекулярные негидролизующие аналоги АТФ, например ARL67156, что позволяет предположить необходимость прямого ингибирования активного сайта. ARL67156, однако, не является специфичным для CD39 и также ингибирует другие NTPДазы, такие как NTPДаза1, NTPДаза3, NPP1 или NTPДаза8 мыши, и, кроме того, выступает только как слабый конкурентный ингибитор (Levesque et al. (2007) Br. J. Pharmacol. 152:141-150).

CD39 имеет два трансмембранных домена вблизи N- и C- концов, короткие цитоплазматические N- и C-концевые сегменты и большой внеклеточный домен, содержащий активный сайт. Однако, хотя CD39 обычно прикрепляется к мембране двумя трансмембранными доменами на двух концах молекулы, недавно также сообщалось, что растворимая каталитически активная форма CD39 может быть обнаружена в кровотоке у людей и мышей. (Yegutkin et al., (2012) FASEB J. 26(9): 3875-3883). Несмотря на различные описанные антитела к CD39, не сообщалось ни об одном антителе, способном ингибировать АТФазную активность растворимого белка CD39.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения получили антитела, которые ингибируют ферментативную (АТФазную активность) активность растворимого (внеклеточного домена) белка CD39 человека. Антитела дополнительно связывают эпитоп, присутствующий на белке CD39 человека, который экспрессируется на поверхности клеток, включая опухолевые клетки, и потенциально ингибируют ферментативную (АТФазную активность) активность связанного с клеточной мембраной фермента CD39 (CD39, экспрессирующегося на поверхности клеток). Указанные антитела можно полезным образом применять для достижения большей нейтрализации активности CD39 у индивидуума посредством нейтрализации как мембраносвязанного, так и растворимого белка CD39, включая растворимый CD39, высвобождаемый или выделяемый из опухолевых клеток, тем самым снижая иммуносупрессию, например, при лечении рака и/или инфекционных заболеваний. Хотя ранее были описаны другие антитела против CD39, которые ингибируют ферментативную (АТФазную активность) активность мембраносвязанного фермента CD39, такие антитела не ингибируют растворимый белок CD39, который не связан с клеточной мембраной.

В одном варианте реализации предложен антигенсвязывающий домен молекулы против CD39 или белок, который содержит такой антигенсвязывающий домен (например, антитело или фрагмент антитела, мультиспецифичный связывающий белок, биспецифичное антитело и т.д.), где указанный антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие соответствующие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, 9 и 10, и аминокислотные последовательности каркасной области FR1, FR2 и FR3 гена IGHV1-3 человека, например IGHV1-3*01 (и необязательно дополнительные аминокислотные последовательности каркасной области 4 (FR4) гена IGHV1 человека, например IGHV1*01); и CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области легкой цепи (VL), имеющие соответствующие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11, 12 и 13, и аминокислотные последовательности каркасной области FR1, FR2 и FR3 гена IGKV4-1 человека (например, IGKV4-1*01) и необязательно дополнительные аминокислотные последовательности каркасной области 4 (FR4) гена IGKV4 человека (например, IGKV4 * 01). В одном варианте реализации VH дополнительно содержит одну или более замен остатка аминокислоты, присутствующего в последовательности каркасной области человека, на другой остаток (например, на остаток, присутствующий в каркасной области, не являющейся человеческой) в положениях, выбранных из группы, состоящей из 48, 67,

71 и 76 (нумерация согласно Кабату). В одном варианте реализации VH содержит одну или более замен аминокислот в CDR2 тяжелой цепи, например, в положениях 60 и/или 64 (нумерация согласно Кабату). Необязательно остаток в положении 60 представляет собой серин (например, CDR2 содержит замену N60S). Необязательно остаток, присутствующий в положении 64 (нумерация согласно Кабату), представляет собой глутамин (например, CDR2 содержит замену K64Q). В одном варианте реализации остаток, присутствующий в VL в положении 24 (нумерация согласно Кабату), представляет собой лизин (например, CDR1 содержит замену R24K). Причем необязательно фенилаланин присутствует в VL в положении 36 (нумерация согласно Кабату).

В одном варианте реализации предложен антигенсвязывающий домен молекулы против CD39 или белок, который содержит такой антигенсвязывающий домен (например, антитело или фрагмент антитела, мультиспецифичный связывающий белок, биспецифичное антитело и т.д.), где указанный антигенсвязывающий домен или белок, содержащий такой антигенсвязывающий домен, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 27-34, и необязательно дополнительно содержит одну или более замен остатка аминокислоты, присутствующего в последовательности каркасной области человека, другим остатком (например, остатком, присутствующим в каркасной области, не являющейся человеческой) в положениях, выбранных из группы, состоящей из 48, 67, 71 и 76 (нумерация согласно Кабату); и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 35-37, отличающуюся тем, что необязательно в положении 36 (нумерация согласно Кабату) присутствует фенилаланин. В одном варианте реализации VH дополнительно содержит одну или более аминокислотных замен в CDR2 тяжелой цепи в положениях 60 и/или 64 (нумерация согласно Кабату). Необязательно остаток, присутствующий в тяжелой цепи в положении 60 (нумерация согласно Кабату), представляет собой остаток серина. Необязательно остаток, присутствующий в тяжелой цепи в положении 64 (нумерация согласно Кабату), представляет собой остаток глутамина. В одном варианте реализации VL дополнительно содержит аминокислотную замену в CDR2 легкой цепи в положении 24 легкой цепи (нумерация согласно Кабату), причем

дополнительно необязательно остаток, присутствующий в легкой цепи в положении 24, представляет собой остаток лизина.

Необязательно, аминокислота в положении 48 тяжелой цепи (нумерация согласно Кабату) представляет собой изолейцин. Необязательно, аминокислота в
5 положении 67 тяжелой цепи (нумерация согласно Кабату) представляет собой аланин. Необязательно, аминокислота в положении 71 тяжелой цепи (нумерация согласно Кабату) представляет собой валин. Необязательно, аминокислота в положении 76 тяжелой цепи (нумерация согласно Кабату) представляет собой аргинин.

В одном варианте реализации VH содержит остаток аланина в положении 67
10 (нумерация согласно Кабату) и валина в положении 71.

В одном варианте реализации VH содержит остаток изолейцина в положении 48 (нумерация согласно Кабату), остаток аланина в положении 67 (нумерация согласно Кабату), валина в положении 71 (нумерация согласно Кабату) и аргинина в положении 76 (нумерация согласно Кабату).

В одном варианте реализации VL содержит фенилаланин в положении 36
15 (нумерация согласно Кабату) (FR2). В одном варианте реализации VL содержит лизин в положении 24 (нумерация согласно Кабату) (CDR1).

В любом варианте реализации антигенсвязывающий домен молекулы против CD39 или белок, который содержит такой антигенсвязывающий домен (например,
20 моноклональное антитело или фрагмент антитела, мультиспецифичный связывающий белок, биспецифичное антитело и т.д.), может быть охарактеризован как содержащий переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO:
25 31, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36 или 37.

В одном варианте реализации предложен антигенсвязывающий домен молекулы против CD39 или белок, который содержит такой антигенсвязывающий домен (например, моноклональное антитело или фрагмент антитела, мультиспецифичный связывающий белок, биспецифичное антитело и т.д.), где
30 указанный антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие соответствующие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, 9 и 10, и каркасные области человека (например, FR1, FR2, FR3 и FR4 человеческого происхождения.); и CDR1, CDR2 и CDR3
35

вариабельной области легкой цепи (VL), содержащие соответствующие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 11 (или 17 или 18), 12 и 13, и каркасные области человека (например, FR1, FR2, FR3 и FR4 человеческого происхождения), где (VH) содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31 или 6, и вариабельная область легкой цепи (VL) содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 36 или 37.

В любом варианте реализации VH может быть охарактеризован как содержащий замену в одном, двух, трех или всех положениях из 48, 67, 71 и 76 (нумерация согласно Кабату). В одном варианте реализации остаток в положении 48 представляет собой изолейцин (например, замену M48I). В одном варианте реализации остаток в положении 67 представляет собой аланин (например, замена V67A). В одном варианте реализации остаток в положении 71 представляет собой валин (например, замена R71V). В одном варианте реализации остаток в положении 76 представляет собой аргинин (например, замена S76R). В любом варианте реализации VL может быть охарактеризован как содержащий замену в положении 36 (нумерация согласно Кабату). В одном варианте реализации остаток в положении 36 представляет собой фенилаланин (например, замена Y36F).

В одном варианте реализации VH содержит аминокислотные последовательности каркасной области VH человека, и VL содержит аминокислотные последовательности каркасной области VL человека. В одном варианте реализации сегмент VH акцепторной каркасной области VH человека происходит из сегмента генаIGHV1-3 человека, причем необязательно J-сегмент происходит из сегмента генаIGHJ1 человека. В одном варианте реализации каркасная область VH человека происходит от сегмента генаIGHV1-3*01 человека. В одном варианте реализации акцепторный каркас домена VL человека происходит из сегмента генаIGKV4-1 человека, причем также необязательно J-сегмент происходит из сегмента генаIGKJ4 человека.

В одном варианте реализации предложен антигенсвязывающий домен против CD39 или белок, который содержит антигенсвязывающий домен (например, моноклональное антитело, мультиспецифичный связывающий белок, биспецифичное антитело и т.д.), антигенсвязывающий домен, выбранный из группы, состоящей из:

(а) связывающий домен антитела, содержащий вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36, и

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33 или 34; и

5 (b) связывающий домен антитела, содержащий вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33 или 34.

10 В любом варианте реализации тяжелая цепь антитела содержит константный домен CH1 человека и Fc-домен человека, необязательно изотипа IgG1 человека, необязательно дополнительно содержащий любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 23, 24, 25 или 26. В любом варианте реализации легкая цепь антитела содержит константный домен легкой цепи человека, причем необязательно константный домен представляет собой каппа-домен человека.

15 В одном варианте реализации предложено антитело против CD39, содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 38, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 92%,
20 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 39.

В одном варианте реализации предложено антитело против CD39, содержащее тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 38, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70%, 80%, 85%, 90%, 92%,
25 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или на 99% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 40.

В одном варианте реализации предложено антитело против CD39 или
30 фрагмент антитела, содержащий тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

В одном варианте реализации предложено антитело против CD39 или
35 фрагмент антитела, содержащий тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

В любом варианте реализации антигенсвязывающий домен или белок, содержащий такой, необязательно антитело или фрагмент антитела, может быть охарактеризован как связывающий и ингибирующий или нейтрализующий АТФазную активность растворимого белка CD39 (pCD39). В одном варианте реализации в белке pCD39 отсутствуют два трансмембранных домена (т.е. трансмембранные домены приблизительно N- и C-концов), обнаруженные в мембраносвязанном CD39. В одном варианте реализации pCD39 представляет собой не связанный с мембраной белок pCD39, находящийся в кровотоке, например, у индивидуума, представляющего собой человека. В одном варианте реализации pCD39 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 43, необязательно дополнительно содержащей C-концевую метку или другую аминокислотную последовательность, не производную от CD39; причем необязательно аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 43 дополнительно лишена N-концевых остатков с 1 по 37 последовательности SEQ ID NO: 1. Белок pCD39 можно охарактеризовать как содержащий или состоящий из фрагмента Thr38-Val478 CD39. Белок Thr38-Val478 с C-концевой меткой His доступен в продаже от R&D Systems, Inc. (номер продукта 4397-EN). В одном варианте реализации белок, антитело или фрагмент антитела ингибируют АТФазную активность pCD39 при инкубации с pCD39 в растворе, например, в соответствии с способами или анализами, проведенными в отсутствие клеток, как описано в настоящей заявке (см., например, Примеры, Способы), например в супернатантах опухолевых клеток. В одном варианте реализации белок, антитело или фрагмент антитела специфично связывают белок CD39 человека, как в растворимой (внеклеточный белковый домен), так и в мембраносвязанной форме.

Не опираясь на какую-либо теорию, некоторые антитела могут нейтрализовать мембраносвязанный CD39, ингибируя движение домена мембраносвязанного CD39 (мемCD39), однако, не влияя аналогичным образом на активность растворимого белка CD39 (pCD39). Сообщалось, что мемCD39 встречается в виде гомо-мультимера, в то время как pCD39 является мономером, и, кроме того, трансмембранные домены в мемCD39 подвергаются динамическим движениям, которые лежат в основе функциональной взаимосвязи с активным сайтом. Следовательно, в отличие от pCD39, мемCD39 может иметь настройку, которая делает возможной опосредованную антителами нейтрализацию. Одна из возможностей заключается в том, что для функциональной нейтрализации требуется использование двухвалентного антитела, которое связывается одновременно с двумя молекулами мемCD39 (например, в составе гомо-мультимера мемCD39).

Настоящие антитела, нейтрализующие активность рCD39 (и мемCD39), могут, помимо использования в качестве двухвалентных связывающих молекул, также быть эффективными в качестве одновалентных связывающих молекул, независимо от того, нацелены ли они на мемCD39 в дополнение к рCD39. Следовательно, в одном варианте реализации предложен антигенсвязывающий белок, который моновалентно связывается с белком CD39 человека (рCD39 и/или мемCD39) и нейтрализует его ферментативную (АТФазную) активность. Антигенсвязывающий белок можно необязательно определить как связывающийся с одним белком CD39 и/или несущий один антигенсвязывающий домен, способный связываться с белком CD39. В одном варианте реализации предложен фрагмент антитела, необязательно фрагмент F(ab), одноцепочечное антитело, рсFv, мультиспецифичное антитело, которое моновалентно связывается с белком CD39 человека (рCD39 и/или мемCD39) и нейтрализует его ферментативную (АТФазную) активность. В одном варианте реализации CD39-нейтрализующий антигенсвязывающий белок, который моновалентно связывается с белком CD39 человека, представляет собой мультиспецифичный антигенсвязывающий белок, например, мультиспецифичное антитело, биспецифичное антитело, триспецифичное антитело и т. д. В одном варианте реализации CD39-нейтрализующий антигенсвязывающий белок, который моновалентно связывается с белком CD39 человека, содержит первый (или единственный) антигенсвязывающий домен, который связывает CD39 (рCD39 и/или мемCD39), и второй антигенсвязывающий домен, который связывает белок, отличный от CD39.

Предпочтительно, в одном варианте реализации антитело содержит Fc-домен человека, который модифицирован таким образом, чтобы иметь пониженное или по существу не иметь связывания с Fcγ-рецептором человека, например, одним или более (или всеми) CD16, CD32a, CD32b и CD64 человека. В одном аспекте антитела не зависят от АЗКЦ -, КЗЦ - или токсин-опосредованного истощения CD39-экспрессирующих клеток для их ингибирующей активности CD39. Такие антитела могут быть использованы в качестве "абсолютных" блокаторов CD39, обладающих иммуномодулирующей активностью.

В альтернативном варианте реализации связывающая молекула может быть получена таким образом, что она сохраняет и/или опосредует эффекторную функцию через свой Fc-домен. В одном варианте реализации антитело содержит Fc домен человека, который связывается с Fcγ- рецептором человека, например, одним или более (или всеми) CD16, CD32a, CD32b и CD64 человека.

В другом варианте реализации Fc-домен может быть модифицирован для уменьшения связывания Fcγ -рецептора, необязательно посредством сохранения

связывания с одним или более Fcγ-рецепторами человека, но уменьшения связывания с одним или более другими Fcγ-рецепторами человека.

В одном аспекте антитела специфично связывают CD39 сосудов, например, антитело связывает полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1, но не связывает секретируемую изоформу полипептида CD39, например, полипептид CD39-L2 и/или -L4. Необязательно, антитело против CD39 специфично связывает CD39 сосудов, например, антитело связывает полипептид, имеющий последовательность SEQ ID NO: 1, но не связывает мембраносвязанную изоформу CD39, например, полипептид CD39-L1 и/или-L3.

Раскрытые в настоящей заявке антитела могут ингибировать ферментативную активность мембраносвязанного белка CD39, экспрессирующегося на поверхности клеток.

В одном аспекте антитела не зависят от понижающей модуляции CD39 для их ингибирующей активности CD39.

Раскрытые в настоящей заявке антитела могут в дополнение к ингибированию растворимого CD39 быть способны ингибировать ферментативную активность мембраносвязанного белка CD39, экспрессируемого на поверхности клеток, с индукцией или без индукции интернализации CD39, и с или без связывания CD16 (рецептор FcγIII) и/или с или без существенного придания АЗКЦ и/или КЗЦ CD39-экспрессирующей клетке. Необязательно антитела сохраняют Fc-домен и сохраняют связывание с FcRn человека.

В то время как антитела, которые функционируют посредством индуцирования АЗКЦ и/или КЗЦ, могут быть эффективными даже без полной нейтрализации/ингибирования АТФазной активности CD39, до тех пор, пока достаточное количество антител связано с CD39-экспрессирующей клеткой для индуцирования АЗКЦ, нейтрализующие неистощающие антитела могут потребовать более сильного ингибирования ферментативной активности АТФазы. В одном варианте реализации неистощающее антитело обеспечит по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80% или 90%-ное снижение АТФазной активности растворимого белка CD39 (например, по оценке описанными в настоящей заявке способами), необязательно дополнительно в концентрации, совместимой с введением антитела человеку. В одном варианте реализации неистощающее антитело обеспечит по меньшей мере 70%, 80%, 90% снижение АТФазной активности CD39-экспрессирующей клетки (например, как оценивается по снижению выработки AMP CD39⁺ клеткой, такой как В-клетка, клетка Ramos, в соответствии с измерениями по способами, раскрытыми в

настоящей заявке), необязательно также в концентрации, совместимой с введением антитела человеку.

Эпитоп на CD39, связанный антителами, присутствует на полипептидах CD39, экспрессируемых целым рядом клеток, например раковыми клетками, CD4-Т-клетками, CD8-Т-клетками, В-клетками, трансфицированными клетками, и связывается с высокой афинностью, что определяется при помощи проточной цитометрии.

Антитело необязательно может быть охарактеризовано через значение EC_{50} , определенной с помощью проточной цитометрии, составляющее 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, экспрессирующими на своей поверхности полипептид CD39. В одном варианте реализации указанные клетки — это клетки, которые созданы для экспрессии CD39 на их поверхности. В одном варианте реализации клетки представляют собой клетки, которые эндогенно экспрессируют CD39 на своей поверхности, например, регуляторные Т-клетки (TReg), В-клетки, раковые клетки, клетки лимфомы (например, клетки Ramos), лейкозные клетки, клетки рака мочевого пузыря, клетки глиомы, клетки глиобластомы, клетки рака яичников, клетки меланомы, клетки рака предстательной железы, клетки рака щитовидной железы, клетки рака пищевода или клетки рака молочной железы.

В одном аспекте антитело против CD39 способно: (а) ингибировать ферментативную активность мембраносвязанного белка CD39 (например, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1), экспрессирующегося на поверхности клеток, и (b) ингибировать ферментативную активность растворимого белка CD39. В одном варианте реализации антитела по существу не связываются (например, через их Fc-домен) с Fcγ-рецепторами человека (например, CD16, CD32a, CD32b, CD64) и/или C1q и/или по существу не придают АЗКЦ и/или КЗЦ к CD39-экспрессирующей клетке. Необязательно антитела сохраняют Fc-домен и сохраняют связывание с FcRn человека.

В одном варианте реализации антитела вводят в количестве, эффективном для нейтрализации ферментативной активности pCD39 и/или мемCD39 в течение желаемого периода времени, например, 1 недели, 2 недель, месяца, до следующего последовательного введения антитела против CD39.

В одном варианте реализации антитела вводят в дозировке и/или с частотой, обеспечивающей концентрацию антитела в крови, равную, по меньшей мере, EC_{50} , EC_{70} или EC_{100} для ингибирования АТФазной активности белка pCD39, необязательно при этом концентрацию поддерживают в течение, по меньшей мере, 1 недели, 2

недель, месяца или до следующего последовательного введения антитела против CD39.

5 В одном аспекте антитело связывает эпитоп CD39, содержащий аминокислотный остаток (например, один, два или три остатка), выбранный из группы, состоящей из R138, M139 и E142 (по отношению к SEQ ID NO: 1).

10 В одном аспекте антитело к CD39 демонстрирует пониженное связывание (например, практически полную потерю связывания) с полипептидом CD39, имеющим мутацию по одному, двум или трем остаткам, выбранным из группы, состоящей из: R138, M139 и E142 (по отношению к SEQ ID NO: 1) по сравнению с полипептидом CD39 дикого типа (полипептид CD39 SEQ ID NO: 1); необязательно мутантный полипептид CD39 имеет мутации: R138A, M139A и E142K. В одном необязательном аспекте антитело не имеет потери связывания ни с одним из мутантных полипептидов CD39 из Таблицы 1, кроме мутанта 19.

15 В одном варианте реализации нейтрализующие CD39 антитела могут характеризоваться способностью в очищенной форме вызывать снижение АТФазной активности белка рCD39 в анализе без использования клеток (например, рCD39 из супернатанта культуры опухолевых клеток), в некоторых случаях вызывая снижение генерации АМФ рCD39, по меньшей мере, на 70%, 80% или 90%; необязательно вызывая увеличение присутствующего АТФ (по сравнению с отрицательным контролем), например, в соответствии с оценкой по анализам, раскрытым в настоящей заявке. Например, ингибирование рCD39 может быть оценено путем количественного определения единиц люминесценции, которые пропорциональны количеству АТФ, присутствующего после инкубации с антителом против CD39. В одном варианте реализации CD39-нейтрализующие антитела могут быть охарактеризованы при помощи EC_{50} для ингибирования АТФазной активности белка рCD39 не более 1 мкг/мл, необязательно не более 0,5 мкг/мл, необязательно не более 0,1 мкг/мл.

20

25

Необязательно ингибирование АТФазной активности белка рCD39 определяют количественным определением единиц люминесценции с использованием Cell Titer Glo™ (Promega), в варианте анализа без использования клеток, отличающемся тем, что диапазоны доз тестируемого антитела инкубируют с растворимым рекомбинантным белком CD39 человека, описанным в примерах, в течение 1 часа при 37°C, при этом 20 мкМ АТФ добавляют к планшетах в течение 30 дополнительных минут при 37°C перед добавлением реагента Cell Titer Glo™ (CTG), а излучаемый свет количественно определяют с помощью прибора Enspire™ luminometer после инкубации в течение 5 минут в темноте (см., например, Примеры, Способы).

30

35

В одном варианте реализации белок рCD39 представляет собой белок рCD39, обнаруженный в супернатанте культуры опухолевых клеток человека или полученный из него, в некоторых случаях, из линии опухолевых клеток, которая экспрессирует CD39 на высоком уровне, необязательно, - из опухолевых клеток Ramos.

5 Необязательно, нейтрализующие CD39 антитела могут дополнительно характеризоваться способностью в очищенной форме вызывать снижение АТФазной активности клеток CD39, необязательно вызывая снижение генерации АМФ клеткой, экспрессирующей CD39, по меньшей мере на 70%, 80% или 90%. В одном варианте реализации CD39-нейтрализующие антитела могут быть охарактеризованы EC_{50} для ингибирования АТФазной активности (например, EC_{50} для ингибирования генерации АМФ CD39-экспрессирующей клеткой) CD39, экспрессируемого клеткой не более 1 мкг/мл, необязательно - не более 0,5 мкг/мл, необязательно - не более 0,1 мкг/мл.

10 Необязательно, ингибирование АТФазной активности CD39, экспрессируемой клеткой, определяют путем оценки нейтрализации АТФазной активности в клетках Ramos посредством количественной оценки АМФ, генерируемого гидролизом АТФ (см., например, Примеры, Способы).

15 В одном аспекте нейтрализация активности АТФазы клеткой, экспрессирующей CD39, определяется посредством приведения клеток, экспрессирующих CD39 (например, клеток лимфомы Ramos, использующихся в настоящей заявке, доступных, например, от ATCC, референс CRL-1596), в контакт с антителом, и оценки продукции АМФ, например, с помощью масс-спектрометрии, причем уменьшение образовавшегося АМФ указывает на нейтрализацию активности АТФазы. Необязательно антитело вызывает снижение генерации АМФ по меньшей мере на 70%, 80% или 90% в этом анализе. Необязательно антитело вызывает снижение 25 внеклеточной АТФазной активности В-клетки по меньшей мере на 70%, 80% или 90%.

В одном аспекте нейтрализующее антитело против CD39 связывает антигенную детерминанту, присутствующую как на рCD39, так и на CD39, экспрессирующемся на поверхности клетки (мемCD39).

30 В одном аспекте нейтрализующее антитело против CD39 конкурирует за связывание с эпитопом CD39, связанном антителом mAb20, mAb21 (или их исходным антителом I-394) (например, которое конкурирует за связывание с эпитопом полипептида CD39 с антителом, имеющим CDR тяжелой и легкой цепи или переменные области любого из mAb20, mAb21 или I-394).

35 В одном аспекте любого из раскрытых в настоящей заявке вариантов реализации, антиген-связывающее соединение связывает тот же эпитоп, и/или конкурирует за связывание с полипептидом CD39 с антителами mAb20, mAb21 (или их

исходным антителом I-394) (напр., что связывает тот же эпитоп, и/или конкурирует за связывание с полипептидом CD39 с антителом, имеющим CDRs тяжелой и легкой цепи или переменные области mAb20, mAb21 (или I-394)). В одном варианте реализации антигенсвязывающее соединение связывает один и тот же эпитоп и/или конкурирует за связывание с полипептидом CD39 с антителом, имеющим соответственно области VH и VL SEQ ID NO: 38 и 39.

В одном варианте реализации антитело против CD39 связывает эпитоп, содержащий один, два или три аминокислотных остатка, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков CD39, связанных mAb20, mAb21 (или I-394).

В любом варианте реализации связывающая молекула (например, антитело или фрагмента антитела) содержит переменный домен тяжелой цепи (V_H), содержащий CDR1, 2 и 3 тяжелой цепи (например, в соответствии с описанием в настоящей заявке) для антитела I-394, и переменный домен легкой цепи (V_L), содержащий CDR1, 2 и 3 легкой цепи (например, как описано в настоящей заявке) для соответствующего I-394 антитела, или аминокислотную последовательность, в которой CDR (или набор CDR тяжелой и/или легкой цепи) имеет по меньшей мере 70%, 80%, 90% или 95% аминокислотной идентичности для такой CDR (или такого набора CDR тяжелой и/или легкой цепи), где каждая V_H и V_L содержат каркасные домены человеческого происхождения (например, V_H и V_L отличаются от соответствующих V_H и V_L в SEQ ID NO: 6 и 7). Необязательно CDR определяют по схемам нумерации согласно Кабату или IMGT.

В одном аспекте белок, который содержит антитело или фрагмент антитела, содержит Fc-домен, который модифицирован (по сравнению с Fc-доменом дикого типа того же изотипа) для уменьшения связывания между Fc-доменом и полипептидами CD16A, CD16B, CD32A, CD32B и/или CD64 человека, причем антитело содержит: (i) тяжелую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 31, и (ii) легкую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 36 или 37. В одном аспекте Fc-домен модифицируют (по сравнению с Fc-доменом дикого типа того же изотипа) для уменьшения связывания между Fc-доменом и полипептидом C1q человека. В одном варианте реализации антитело содержит аминокислотную замену в константной области тяжелой цепи на любой один, два, три, четыре, пять или более остатков, 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 согласно Кабату ЕС). В одном варианте реализации антитело имеет аминокислотную замену в константной области тяжелой

цепи на любые три, четыре, пять или более остатков, выбранных из группы, состоящей из: 234, 235, 237, 322, 330 и 331.

В одном варианте реализации, антитела вводят индивидууму, имеющему рак, в количестве и с частотой, достаточными для нейтрализации активности рCD39 в микроокружении опухоли и/или в кровотоке. В одном варианте реализации, антитела вводят в количестве и с частотой, достаточными для снижения генерации и/или концентрации аденозина в микроокружении опухоли. В одном варианте реализации, антитела вводят в количестве и с частотой, достаточными для снижения генерации и/или концентрации АМФ в микроокружении опухоли. В одном варианте реализации антитела вводят в количестве и с частотой, достаточными для нейтрализации активности CD39, экспрессируемого опухолевыми клетками. В одном варианте реализации, антитела вводят в количестве и с частотой, достаточными для нейтрализации активности CD39, экспрессируемого лейкоцитами или лимфоцитами, например CD4 Т-клетками, CD8 Т-клетками, TReg-клетками и/или В-клетками.

Антитела будут полезны для ингибирования CD39-опосредованного гидролиза АТФ, что, например, будет приводить к снижению концентрации аденозина в микроокружении опухоли и/или в кровотоке. Поэтому данные антитела будут полезны для обращения иммуносупрессивного действия CD39 и или аденозина на Т-клетки, В-клетки и другие клетки, экспрессирующие рецепторы аденозина (A2A-рецепторы), например, при лечении рака. В одном варианте реализации антитело против CD39 нейтрализует аденозин-опосредованное ингибирование пролиферации, продукции цитокинов, цитотоксичности и/или активности NFκB в Т-клетках.

В другом аспекте предложен способ лечения индивидуума, включающий введение индивидууму (например, индивидууму, имеющему заболевание, опухоль и т.д.) терапевтически активного количества любого из антигенсвязывающих соединений против CD39, описанных в настоящей заявке.

Антитела будут полезны для ингибирования продукции, количества и/или концентрации аденозина в микроокружении опухоли и/или в кровотоке, включая, но не ограничиваясь ими, опухоли, характеризующиеся обнаруживаемой, значительной, повышенной или увеличенной генерацией аденозина, катаболизмом АТФ или катаболической активностью оси CD39/CD73 (например, по сравнению с контрольным значением). Кроме того, при увеличении концентрации, антитела, нейтрализующие растворимый CD39, обеспечивают практически полное ингибирование катаболической активности оси CD39/CD73. В одном варианте реализации антитела можно применять для ингибирования продукции, количества и/или концентрации аденозина в микроокружении опухоли при опухолях, характеризующихся присутствием белка CD73

(например, опухоли с растворимыми CD73 и/или CD73-экспрессирующими клетками; CD73-положительные опухоли).

5 В одном варианте реализации, антитела, раскрытые в настоящей заявке, нейтрализующие растворимый белок CD39, могут быть предпочтительно использованы в комбинации с блокадой CD73, например, антитела, раскрытые в настоящей заявке, могут быть введены индивидууму, имеющему рак, в комбинации с агентом, который ингибирует активность CD73.

10 В одном аспекте предложен способ лечения индивидуума, включающий, состоящий фактически из или состоящий из: введения индивидууму (например, индивидууму, имеющему заболевание, опухоль и т.д.) терапевтически активного количества связывающего антиген соединения, раскрытого в настоящей заявке, которое ингибирует полипептид CD39. В одном варианте реализации антигенсвязывающее соединение против CD39 (например, антитело) вводят индивидууму в комбинации со вторым терапевтическим агентом. В одном варианте реализации второй терапевтический агент представляет собой агент (например, антитело), который нейтрализует 5'-эксонуклеотидазную активность CD73 человека. В одном варианте реализации второй терапевтический агент представляет собой агент (например, антитело), который нейтрализует ингибирующую активность PD-1 человека, необязательно антитело против PD-1, необязательно антитело против PD-1. В одном варианте реализации второй терапевтический агент включает агент или способ лечения (например, химиотерапевтический агент, таксан, антрациклин, камптотецин, эпотилоны, митомицин, комбретастатин, алкалоид барвинка, азотистый иприт, майтанзиноиды, калихеамицин, дуокармицин, тубулизин, доластатин или аристарин, энедин, аматоксин, пирролобензодиазепин, этиленимин, радиоизотоп, терапевтический белок или пептид, или токсин), который индуцирует внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток и/или индуцирует гибель опухолевых клеток.

30 В одном варианте реализации антигенсвязывающее соединение против CD39 (например, антитело) вводят индивидууму, имеющему рак и имеющему слабый ответ или имеющему прогноз в отношении ответа на лечение агентом, который нейтрализует ингибирующую активность PD-1 человека. В одном варианте реализации антитело ингибирует полипептид CD39 в клеточном анализе. В одном варианте реализации соединение представляет собой неистощающее антитело (антитело, которое не истощает клетки, с которыми оно связывается, например, антитело с молчащей Fc областью). Необязательно, соединение связывается с полипептидами CD39 двухвалентным образом. Необязательно антитело представляет

собой химерное, гуманизированное или человеческое антитело. Необязательно антитело содержит константную область тяжелой цепи изотипа IgG (например, IgG1), модифицированную для устранения связывания с рецепторами Fc γ человека (например, CD16A, CD16B, CD32A, CD32B и/или CD64).

5 В одном аспекте предложен способ снижения гидролиза АТФ экспрессирующей CD39 клеткой (например, лейкоцит и/или опухолевая клетка у индивидуума) или способ нейтрализации ферментативной активности клеточного CD39, включающий: приведение экспрессирующей CD39 клетки в контакт с антигенсвязывающим соединением (например, антителом или фрагментом антитела) согласно настоящему
10 изобретению, которое ингибирует CD39. В одном варианте реализации стадия приведения экспрессирующей CD39 клетки в контакт с антигенсвязывающим соединением, раскрытым в настоящей заявке, включает введение индивидууму терапевтически активного количества антигенсвязывающего соединения, которое ингибирует CD39. В одном варианте индивидуум имеет рак.

15 В одном аспекте предложен способ уменьшения аденозина, присутствующего в окружении опухоли (например, у индивидуума), способ, включающий, состоящий фактически или состоящий из: введения индивидууму терапевтически активного количества антигенсвязывающего соединения (например, антитела или фрагмента антитела), раскрытого в настоящей заявке, которое ингибирует полипептид CD39. В
20 одном варианте реализации индивидуум имеет рак.

В одном варианте реализации активное количество антитела, которое ингибирует полипептид CD39, представляет собой количество, эффективное для достижения и/или поддержания (например, до последующего введения антигенсвязывающего соединения) концентрации в крови, по меньшей мере, EC₅₀,
25 необязательно EC₇₀, необязательно по существу EC₁₀₀, для ингибирования CD39-опосредованного катаболизма АТФ в АМФ у индивидуума. В одном варианте реализации активное количество антигенсвязывающего соединения, которое ингибирует полипептид CD39, представляет собой количество, эффективное для достижения EC₅₀, необязательно EC₇₀, необязательно по существу EC₁₀₀ для
30 ингибирования CD39-опосредованного катаболизма АТФ в АМФ во внесосудистой ткани индивидуума. В одном варианте реализации активное количество антигенсвязывающего соединения, которое ингибирует полипептид CD39, представляет собой количество, эффективное для достижения EC₅₀, необязательно EC₇₀, необязательно по существу EC₁₀₀, для ингибирования CD39-опосредованного
35 катаболизма АТФ в АМФ у индивидуума. В одном варианте реализации активное количество антигенсвязывающего соединения, которое ингибирует полипептид CD39,

составляет от 1 до 20 мг/кг массы тела. В одном варианте реализации активное количество вводят индивидууму еженедельно, каждые две недели, ежемесячно или каждые два месяца.

5 Не обязательно, индивидуум представляет собой человека, имеющий рак или восприимчивый к нему. Не обязательно, индивидуум представляет собой человека, имеющего рак или восприимчивого к раку, характеризующемуся злокачественными клетками, в которых экспрессируется CD39 и/или имеется (секреция или выделение) или растворимый белок CD39. Не обязательно индивидуум - это человек, имеющий рак или восприимчивый к нему и имеющий обнаруживаемые уровни циркулирующего
10 растворимого внеклеточного белка CD39 или инфильтрирующих опухоль лейкоцитов, экспрессирующих CD39.

Не обязательно, антитела характеризуются аффинностью связывания (K_D) для полипептида CD39 человека менее (лучше) 10^{-9} М, предпочтительно менее 10^{-10} М или предпочтительно менее 10^{-11} М и/или связыванием CD39 человека с EC_{50} ниже
15 (лучше) 1 мкг/мл, предпочтительно где антитело имеет EC_{50} не более 0,5 мкг/мл, необязательно не более 0,2 мкг/мл, необязательно не более 0,1 мкг/мл, для связывания с клетками (например, опухолевыми клетками), экспрессирующими CD39 человека на поверхности клетки.

Не обязательно, антитела представляет собой химерные, человеческие или
20 гуманизированные антитела.

Не обязательно, антитела характеризуются EC_{50} для нейтрализации ферментативной активности CD39 в CD39-экспрессирующих клетках (например, опухолевых клетках Ramos) менее (лучше) 1 мкг/мл, необязательно менее 0,5 мкг/мл.

В одном варианте реализации антитело представляет собой моноклональное
25 антитело или его фрагмент, который сохраняет специфичность связывания и способность нейтрализовать ферментативную активность CD39. В одном варианте реализации антитело представляет собой антитело IgG1. Например, антитело может быть антителом, содержащим Fc-домен изотипа IgG1 человека, модифицированный для уменьшения связывания между Fc-доменом и Fc γ -рецептором (например, CD16).
30 В одном варианте реализации антитело или его фрагмент не имеет Fc-домена или содержит Fc-домен, который не индуцирует опосредованную антителом клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) и/или КЗЦ; необязательно антитело или его фрагмент содержит Fc-домен, который не связывается с полипептидом Fc γ RIIIA (CD16). В одном варианте реализации Fc-домен (например, изотипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4
35 человека) содержит аминокислотную модификацию (например, замену) по сравнению с Fc-доменом дикого типа, причем замена снижает способность Fc-домена (или

антител, содержащих его) связываться с рецептором Fcγ (например, CD16) и/или связывать комплемент. В одном варианте реализации антитело или его фрагмент не связаны с токсическим фрагментом.

5 Также предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие гуманизованное антитело или фрагмент антитела, обладающий любым из предыдущих свойств, вектор, содержащий такую нуклеиновую кислоту, клетка, содержащая такой вектор, и способ получения человеческого антитела против CD39, включающий культивирование такой клетки в условиях, подходящих для экспрессии антитела против CD39, и необязательно восстановление или очистку полученного антитела.
10 Изобретение также относится к композициям, таким как фармацевтически приемлемые композиции и наборы, содержащие такие белки, нуклеиновые кислоты, векторы и/или клетки и, как правило, один или более дополнительных ингредиентов, которые могут быть активными ингредиентами или неактивными ингредиентами, которые способствуют составлению, доставке, стабильности или другим
15 характеристикам композиции (*например*, различные носители). Изобретение также относится к различным новым и полезным способам получения и применения таких антител, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, организмов и/или композиций, таких как модуляция CD39-опосредованной биологической активности, например, при лечении связанных с этим заболеваний, в частности рака.

20 Настоящее изобретение также обеспечивает способ потенцирования активности лимфоцитов (например, Т-клеток) у индивидуума, нуждающегося в этом, или для восстановления активности лимфоцитов (например, Т-клеток), или способ снятия аденозин-опосредованного ингибирования лимфоцитов (например, Т-клеток), который включает введение индивидууму эффективного количества любой из
25 указанных композиций. В одном варианте реализации индивидуум является пациентом, имеющим рак. Например, пациент может иметь солидную опухоль, например, колоректальный рак, рак почек, рак яичников, рак легких, рак молочной железы или злокачественную меланому. В качестве альтернативы пациент может иметь гемопозитический рак, например, острый миелолейкоз, хронический
30 миелолейкоз, множественную миелому или неходжкинскую лимфому.

В настоящем изобретении также предложен способ лечения заболевания у индивидуума, где указанное лечение включает введение индивидууму антитела против CD39, которое нейтрализует ферментативную активность CD39 в течение по
35 меньшей мере одного цикла введения, отличающегося тем, что антитело против CD39 вводят по меньшей мере один раз, необязательно по меньшей мере два раза, в количестве, эффективном для достижения и/или поддержания между двумя

последовательными введениями в крови (сыворотке) или внесосудистой ткани (например, окружении опухоли), концентрации антитела против CD39, которая соответствует по меньшей мере EC_{50} (например, EC_{50} между 0,01 и 0,5 мкг/мл), необязательно EC_{70} или необязательно EC_{100} , для нейтрализации ферментативной активности CD39 (например, EC_{100} между 0,05 и 1 мкг/мл, между 0,1 и 1 мкг/мл). Антитело можно, например, вводить в количестве, обеспечивающем достижение и/или поддержание концентрации в кровотоке или во внесосудистой ткани (например, в окружении опухоли), по меньшей мере, приблизительно 0,1 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 1 мкг/мл или 2 мкг/мл). Например, для достижения концентрации во внесосудистой ткани 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 в указанной 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 рамках настоящего изобретения также предложен способ лечения заболевания у индивидуума, где указанное лечение включает введение индивидууму антитела против CD39, которое нейтрализует ферментативную активность CD39 в течение по меньшей мере одного цикла введения, при этом антитело против CD39 вводят по меньшей мере один раз, необязательно по меньшей мере два раза, в количестве, эффективном для достижения и/или поддержания между двумя последовательными введениями антитела против CD39, концентрации антитела против CD39 в крови или тканях по меньшей мере 1 мкг/мл, необязательно по меньшей мере 10 мкг/мл, необязательно от 1 до 100 мкг/мл. Необязательно антитело против CD39 вводят по меньшей мере дважды и в количествах, эффективных для поддержания непрерывной концентрации антитела против CD39 в крови или тканях по меньшей мере 1 мкг/мл, необязательно по меньшей мере 10 мкг/мл, необязательно от 1 до 100 мкг/мл, 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.

Такие аспекты более полно описаны в приведенном в настоящей заявке описании, а дополнительные аспекты, особенности и преимущества будут понятны из приведенного в настоящей заявке описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На Фигуре 1 показан репрезентативный результат скрининга, показывающий антитела I-397, I-398 и I-399 в сравнении с антителом I-394 положительного контроля.

5 На Фигуре 2А показано, что антитела ВУ40, I-394, I-395 и I-396 ингибируют CD39, связанный с клеточной мембраной, причем как I-394, так и I-395 демонстрируют большую эффективность при всех концентрациях, а также большее максимальное ингибирование клеточного CD39 по сравнению с ВУ40. На Фигуре 2В показано, что антитела I-395 и I-396 оба ингибируют растворимый CD39 по сравнению с антителами отрицательного контроля (ВУ40) и положительного контроля (I-394).

10 На Фигуре 3А показано положение мутированных остатков у мутантов 5 (М5), 15 (М15) и 19 (М19) на поверхности белка CD39. На Фигуре 3В показаны результаты связывания различных антител с мутантами 5, 15 и 19.

15 На Фигуре 4 показано связывание антитела I-394 с клетками, экспрессирующими CD39 человека по данным проточной цитометрии. I-394 связывает клетки, экспрессирующие CD39 человека (CHO-huCD39), клетки, экспрессирующие CD39 яванского макака (CHO-cuCD39), и клетки лимфомы Ramos, но не клетки, экспрессирующие CD39 мыши (CHO-moCD39).

20 На Фигуре 5 показано, что антитело I-394 обладает высокой эффективностью в отношении блокирования ферментативной активности CD39 в опухолевых клетках (Ramos), в клетках, экспрессирующих CD39 человека (CHO-huCD39), и в клетках, экспрессирующих CD39 яванского макака (CHO-cuCD39), по данным количественной оценки единиц люминесценции, которые пропорциональны количеству присутствующего АТФ.

25 На Фигуре 6 показано, что антитело I-394 обладает высокой эффективностью в отношении блокирования ферментативной активности растворимого рекомбинантного белка CD39 человека по данным количественного определения единиц люминесценции, которые пропорциональны количеству присутствующего АТФ.

30 На Фигуре 7 показано, что антитело I-394 связывается с CD39 человека, но не с какой-либо из изоформ CD39-L1, -L2, -L3 или -L4 человека, по данным анализа ИФА (ELISA).

35 На Фигуре 8 показана экспериментальная процедура для оценки влияния АТФ-опосредованной активации ДК на активацию CD4 Т-клеток, АТФ-опосредованно активированные ДК промывали и затем инкубировали с аллогенными CD4 Т-клетками (соотношение 1 моДК/4 Т-клетки) для смешанной реакции лимфоцитов (MLR) в

течение 5 дней. Активацию и пролиферацию Т-клеток анализировали с помощью экспрессии CD25 и разведения Cell Trace Violet с помощью проточной цитометрии.

5 На Фигуре 9 показана экспрессия HLA-DR на моДК, а на Фигуре 10 показана экспрессия CD83 на моДК. Данные Фигуры показывают, что блокирующее антитело против CD39 I-394 и химические ингибиторы CD39 приводят к активации моДК в каждом из 0,125 мМ, 0,25 мМ или 0,5 мМ. Однако антитела против CD39 BY40 или антитела против CD73 не могли способствовать активации АТФ-индуцированной дендритной клетки (ДК), что позволяет предположить, что антитела не способны в достаточной степени заблокировать ферментативную активность, чтобы избежать катаболизма АТФ. Условные обозначения сверху вниз соответствуют столбцам на графике слева направо.

10 На Фигуре 11 показана экспрессия CD25, показывающая, что моДК, активированные в присутствии АТФ, были способны индуцировать активацию и пролиферацию Т-клеток в анализе MLR; усиление АТФ-опосредованной активации моДК антителом I-394, блокирующим CD39, привело к более высокой пролиферации и активации Т-клеток. Условные обозначения сверху вниз соответствуют столбцам на графике слева направо.

15 На Фигуре 12А показан диапазон доз антител против CD73 на пролиферацию CD4 Т-клеток в присутствии добавленного АТФ при 3 различных дозах антител против рCD39: 0,01 мкг/мл, 0,1 мкг/мл и 1 мкг/мл. Антитела против CD39, которые способны нейтрализовать растворимый CD39 человека, демонстрируют сильное усиление антител против CD73 в отношении восстановления пролиферации CD4 Т-клеток. На Фигуре 12В показан диапазон доз антител против CD73 в отношении пролиферации Т-лимфоцитов CD8, в присутствии добавленного АТФ, антитела против рCD39 демонстрируют сильное усиление антител против CD73 в отношении восстановления пролиферации Т-клеток CD8.

20 На Фигуре 13 показаны антитела, титрованные на клетках лимфомы Ramos с помощью проточной цитометрии. Антитела H2L1, H2L1*, H4L1 и h4l1* антитела (mAb8, 9, 20 и 21 соответственно) показали лучшее связывание.

30 На Фигуре 14 показано ингибирование активности АТФазы в линиях опухолевых клеток Ramos и Mino, экспрессирующих мембраносвязанный CD39. Антитела H4L1 и H4L1* (mAb20 и mAb21) были наиболее мощными при блокировании ферментативной активности CD39.

35 На Фигуре 15А показано, что антитело I-394 (исходные легкие и тяжелые цепи) имеет более высокую температуру агрегации (TAgg) и улучшенную стабильность по сравнению с антителом BY40. На Фигуре 15В показано, что гуманизированные

варианты антител I-394 с вариабельными областями H2L1 (mAb 8), H2L1 * (mAb9), H4L1 (mAb20) и H4L1 * (mAb21) все имеют высокую температуру агрегации (TAgg) и хорошую стабильность.

5

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

В тех случаях, когда используется слово "содержащий", оно может быть необязательно заменено словом "состоящий фактически из" или словом "состоящий из".

10

CD39 человека, также известный как CD39 сосудов, NTPdaza1, ENTPD1, ATPDaza и АТФ-дифосфогидролаза сосудов, проявляет АТФазную активность. CD39 гидролизует внеклеточные АТФ и АДФ до АМФ, который далее преобразуется в аденозин другим ферментом, 5'-нуклеотидазой. Аминокислотная последовательность зрелой полипептидной цепи CD39 сосудов человека показана в Genbank под номером

15

доступа P49961, полное раскрытие которого включено в настоящей заявке по ссылке и выглядит следующим образом:

1 MEDTKESNVK TFCSKNILAI LGFSSIIAVI ALLAVGLTQN KALPENVKYG
IVLDAGSSHT

20

61 SLYIYKWPAE KENDTGVVHQ VEECRVKGGP ISKQVQKVNE IGIYLTDCME
RAREVIPRSQ

121 HQETPVYLGA TAGMRLLRME SEELADRVLV VVERSLSNYP FDFQGARIIT
GQEEGAYGWI

25

181 TINYLLGKFS QKTRWFSIVP YETNNQETFG ALDLGGASTQ VTFVPQNQTI
ESPDNALQFR

241 LYGKDYNVYT HSFLCYGKDQ ALWQKLAKDI QVASNEILRD PCFHPGYKKV
VNVSDLYKTP

301 CTKRFEMTLP FQQFEIQGIG NYQQCHQSIL ELFNTSYCPY SQCAFNGIFL
PPLQGDFGAF

30

361 SAFYFVMKFL NLTSEKVSQE KVTEMMKKFC AQPWEEIKTS YAGVKEKYLS
EYCFSGTYIL

421 SLLLQGYHFT ADSWEIHFI GKIQQSDAGW TLGYMLNLTN MIPAEQPLST
PLSHSTYVFL

481 MVLFLSLVLFV VAIIGLLIFH KPSYFWKDMV (SEQ ID NO: 1).

35

В контексте настоящей заявки "нейтрализовать" или "нейтрализующий" по отношению к полипептиду CD39 (например, "нейтрализовать CD39", "нейтрализовать активность CD39" или "нейтрализовать ферментативную активность CD39") относится к процессу, в котором активность CD39 по гидролизу АТФ (АТФаза) ингибируется. Это включает, в частности, ингибирование CD39-опосредованной генерации АМФ и/или АДФ, то есть ингибирование CD39-опосредованного катаболизма АТФ до АМФ и/или АДФ. Для мембраносвязанного CD39 оно может быть измерено, например, в

40

клеточном анализе, который измеряет способность тестируемого соединения ингибировать превращение АТФ в АМФ и/или АДФ, прямо или косвенно. Для растворимого CD39 это можно измерить посредством инкубации рекомбинантного растворимого CD39, в соответствии с приведенным в настоящей заявке описанием, с тестируемым соединением и измерения конверсии АТФ в АМФ и/или АДФ, прямо или косвенно. Например, исчезновение АТФ и/или образование АМФ можно оценить, в соответствии с описанием в настоящей заявке, например, посредством количественного определения единиц люминесценции, которые пропорциональны количеству присутствующего АТФ. В одном варианте реализации препарат антитела вызывает снижение превращения АТФ в АМФ по меньшей мере на 60%, уменьшение превращения АТФ в АМФ по меньшей мере на 70% или уменьшение превращения АТФ в АМФ по меньшей мере на 80 или 90%, со ссылкой, например, на описанные в настоящей заявке анализы (например, исчезновение АТФ и/или образование АМФ).

Всякий раз, когда "лечение рака" или подобное упоминается со ссылкой на связывающий агент против CD39 (например, антитело), это может включать: (а) способ лечения рака, указанный способ включает стадию введения (по меньшей мере, для одной обработки) связывающим агентом против CD39 (предпочтительно в фармацевтически приемлемом носителе) индивидууму, млекопитающему, особенно человеку, нуждающемуся в таком лечении, в дозе, позволяющей лечить рак (терапевтически эффективное количество), предпочтительно в дозе (количестве), в соответствии с описанием в настоящей заявке; (b) применение связывающего агента против CD39 для лечения рака или связывающего агента против CD39 для применения в указанном лечении (особенно у человека); (c) применение связывающего агента против CD39 для производства фармацевтического препарата для лечения рака, способ применения CD39-связывающего агента против CD39 для производства фармацевтического препарата для лечения рака, необязательно включающий смешивание связывающего агента против CD39 с фармацевтически приемлемым носителем или фармацевтического препарата, содержащего эффективную дозу связывающего агента против CD39, подходящую для лечения рака; или (d) любая комбинация пунктов а), b) и c) в соответствии с предметом, допустимым для патентования в стране, где подана данная заявка.

Используемый в настоящей заявке термин "антигенсвязывающий домен" относится к домену, содержащему трехмерную структуру, способную иммуноспецифично связываться с эпитопом. Таким образом, в одном варианте реализации указанный домен может содержать гипервариабельную область, необязательно домен VH и/или VL цепи антител, необязательно, по меньшей мере,

домен VH. В другом варианте реализации связывающий домен может содержать по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR) цепи антитела. В другом варианте реализации связывающий домен может содержать полипептидный домен из неиммуноглобулиновой каркасной области.

5 Термин "антитело", используемый в настоящей заявке, может включать поликлональные и моноклональные антитела. В зависимости от типа константного домена в тяжелых цепях антитела относятся к одному из пяти основных классов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. Некоторые из них далее делятся на подклассы или изоотипы, такие как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и тому подобные. Иллюстративная структурная единица
10 иммуноглобулина (антитела) содержит тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух одинаковых пар полипептидных цепей, каждая пара имеет одну "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепи (приблизительно 50-70 кДа). N-конец каждой цепи определяет переменную область приблизительно от 100 до 110 или более аминокислот, которая в первую очередь отвечает за распознавание антигена.
15 Термины переменная легкая цепь (V_L) и переменная тяжелая цепь (V_H) относятся к таким легким и тяжелым цепям соответственно. Константные домены тяжелой цепи, соответствующие различным классам иммуноглобулинов, называются соответственно "альфа", "дельта", "эпсилон", "гамма" и "мю". Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. IgG
20 представляют собой типичные классы антител, используемых в настоящей заявке, потому что они являются наиболее распространенными антителами в физиологической ситуации и потому, что их легче всего получить в лабораторных условиях. Необязательно антитело представляет собой моноклональное антитело. Конкретные примеры антител представляют собой гуманизированные, химерные,
25 человеческие или другие подходящие для человека антитела. "Антитела" также включают любой фрагмент или производное любого из описанных в настоящей заявке антител.

Термин "специфично связывается с" означает, что антитело может связываться предпочтительно в анализе конкурентного связывания с партнером по связыванию,
30 например с CD39, что оценивается с использованием либо рекомбинантных форм белков, их эпитопов, либо нативных белков, присутствующих на поверхности выделенных клеток-мишеней. Конкурентные анализы связывания и другие способы определения специфичного связывания подробно описаны далее и хорошо известны в данной области.

35 Когда говорится, что антитело "конкурирует" с конкретным моноклональным антителом (например, антителом I-394), это означает, что антитело конкурирует с

моноклональным антителом в анализе связывания с использованием либо рекомбинантных молекул CD39, либо поверхностно экспрессируемых молекул CD39. Например, если тестируемое антитело уменьшает связывание эталонного антитела с полипептидом CD39 или CD39-экспрессирующей клеткой в анализе связывания, то

5 говорят, что антитело "конкурирует" соответственно с эталонным антителом.

Термин "аффинность", используемый в настоящей заявке, означает силу связывания антитела с эпитопом. Аффинность антитела определяется константой диссоциации K_d , определяемой как $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$, где $[Ab-Ag]$ - молярная концентрация комплекса антитело-антиген, $[Ab]$ - молярная концентрация

10 несвязанного антитела и $[Ag]$ - молярная концентрация несвязанного антигена. Константа сродства K_a определяется как $1/K_d$. Способы определения аффинности моноклональных антител можно найти в Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Coligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y.,

15 (1992, 1993), и Muller, *Meth. Enzymol.* 92: 589-601 (1983), ссылки на которые полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки. Одним из стандартных способов, хорошо известных в данной области техники для определения сродства mAb, является скрининг с использованием поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (например, путем анализа с помощью аналитического устройства BIAcore™ SPR).

20 В контексте настоящей заявки "детерминанта" обозначает сайт взаимодействия или связывания с полипептидом.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте и представляет собой область или участок на антигене, с которой связывается антитело. Белковый эпитоп может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в

25 связывании, а также аминокислотные остатки, которые эффективно блокируются специфичным антигенсвязывающим антителом или пептидом, *то есть* аминокислотные остатки в пределах "отпечатка подошвы (footprint)" антитела. Это самая простая форма или самая маленькая структурная область на сложной молекуле антигена, которая может сочетаться, например, с антителом или рецептором. Эпитопы

30 могут быть линейными или конформационными/структурными. Термин "линейный эпитоп" определяется как эпитоп, состоящий из аминокислотных остатков, которые представляют собой смежные по линейной последовательности аминокислот (первичная структура). Термин "конформационный или структурный эпитоп" определяется как эпитоп, состоящий из аминокислотных остатков, которые не все

35 представляют собой смежные и, таким образом, представляют собой отделенные части линейной последовательности аминокислот, которые сближаются друг с другом

посредством фолдинга молекулы (вторичные, третичные и/или четвертичные структуры). Конформационный эпитоп зависит от 3-мерной структуры. Поэтому термин "конформационный" часто используется как синоним термина "структурный".

5 Термин "интернализация", используемый взаимозаменяемо с "внутриклеточной интернализацией", относится к молекулярным, биохимическим и клеточным событиям, связанным с процессом транслокации молекулы с внеклеточной поверхности клетки на внутриклеточную поверхность клетки. Процессы, ответственные за внутриклеточную интернализацию молекул, хорошо известны и могут включать, среди прочего, *интернализацию* внеклеточных молекул (таких как гормоны, антитела и 10 небольшие органические молекулы); ассоциированных с мембраной молекул (таких как рецепторы клеточной поверхности); и комплексов связанных с мембраной молекул, связанных с внеклеточными молекулами (например, лиганд, связанный с трансмембранным рецептором, или антитело, связанное с молекулой, связанной с мембраной). Таким образом, "индуцирование и/или усиление интернализации" 15 включают события, при которых инициируется внутриклеточная интернализация и/или увеличивается скорость и/или степень внутриклеточной интернализации.

Термин "агент" используется в настоящей заявке для обозначения химического соединения, смеси химических соединений, биологической макромолекулы или экстракта, изготовленного из биологических материалов. Термин "терапевтический 20 агент" относится к агенту, обладающему биологической активностью.

Для целей настоящей заявки "гуманизированное" антитело относится к антителу, отличающемуся тем, что константная и переменная каркасная область одного или более иммуноглобулинов человека слита со связывающей областью, например CDR, иммуноглобулина животного происхождения. Такие антитела 25 предназначены для поддержания связывающей специфичности антитела не происходящего от человека, из которого получены связывающие области, но для того, чтобы избежать иммунной реакции против антитела не происходящего от человека.

Термин "гипервариабельная область" при использовании в настоящей заявке относится к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание 30 антигена. Гипервариабельная область обычно 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 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в переменном домене тяжелой цепи; Kabat et al. 1991) и/или такие остатки из "гипервариабельной петли" (например, остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 35 (L3) в переменном домене легкой цепи и 26-32 (h1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в переменном домене тяжелой цепи; Chothia and Lesk, J. Mol. Biol 1987;196: 901-917),

или аналогичную систему для определения незаменимых аминокислот, ответственных за связывание антигена. Как правило, нумерация аминокислотных остатков в этой области выполняется способом, описанным в работе Kabat et al., supra. Такие фразы, как "нумерация согласно Кабату", "нумерация остатков переменных доменов, согласно Кабату" и "согласно Кабату", в настоящей заявке относятся к этой системе нумерации для переменных доменов тяжелой цепи или переменных доменов легкой цепи. Используя систему нумерации согласно Кабату, фактическая линейная аминокислотная последовательность пептида может содержать меньшее количество или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорочению или вставке в FR или CDR переменного домена. Например, переменный домен тяжелой цепи может содержать одну аминокислотную вставку (остаток 52а, нумерация согласно Кабату) после остатка 52 CDR H2 и вставленные остатки (например, остатки 82а, 82b и 82с и т. д., нумерация согласно Кабату) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерация остатков согласно Кабату может быть определена для данного антитела посредством выравнивания в областях гомологии последовательности антитела со "стандартной" последовательностью с номером согласно Кабату.

Под "каркасными" или "FR" остатками, используемыми в настоящей заявке, подразумевается область переменного домена антитела, исключая те области, которые определены как CDRs. Каждая каркасная область переменного домена антитела может быть далее подразделена на смежные области, разделенные CDR (FR1, FR2, FR3 и FR4).

Термины "Fc-домен", "Fc-часть" и "Fc-область" относятся к С-концевому фрагменту тяжелой цепи антитела, например, приблизительно от аминокислоты (АК) 230 до приблизительно АК 450 тяжелой цепи человека γ (гамма) или его аналоговой последовательности в других типах тяжелых цепей антител (например, α , δ , ϵ и μ для человеческих антител), или их естественному аллотипу. Если не указано иное, общепринятая нумерация аминокислот согласно Кабату для иммуноглобулинов используется в данном изобретении (см. Kabat et al. (1991) *Sequences of Protein of Immunological Interest*, 5th ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD).

Термины "выделенный", "очищенный" или "биологически чистый" относятся к материалу, который по существу или фактически свободен от компонентов, которые обычно сопровождают его в его естественном состоянии. Чистоту и однородность обычно определяют с помощью способов аналитической химии, таких как электрофорез в полиакриламидном геле или высокоэффективная жидкостная

хроматография. Белок, который представляют собой преобладающий вид, присутствующий в препарате, по существу очищен.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются в настоящей заявке взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Данные термины применяются к аминокислотным полимерам, отличающимся тем, что один или более аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический миметик соответствующей природной аминокислоты, а также к природным аминокислотным полимерам и ненатуральным аминокислотным полимерам.

Термин "рекомбинантный" при использовании со ссылкой, например, на клетку или нуклеиновую кислоту, белок (например, антитело или фрагмент антитела) или вектор, указывает на то, что клетка, нуклеиновая кислота, белок или вектор были модифицированы посредством введения гетерологичной нуклеиновой кислоты или белка или изменения нативной нуклеиновой кислоты или белка, или что клетка происходит от клетки, модифицированной таким образом. Так, например, рекомбинантные клетки экспрессируют гены, которые не обнаруживаются в нативной (нерекомбинантной) форме клетки, или экспрессируют нативные гены, которые в противном случае аномально экспрессируются, недостаточно экспрессируются или вообще не экспрессируются.

В контексте настоящей заявки термин антитело, которое "связывает" полипептид или эпитоп, обозначает антитело, которое связывает указанную детерминанту со специфичностью и/или аффинностью.

Термин "идентичность" или "идентичный", когда он используется в отношениях между последовательностями двух или более полипептидов, относится к степени связанности последовательностей между полипептидами, определяемой числом совпадений между последовательностями двух или более аминокислотных остатков. "Идентичность" измеряет процент идентичных совпадений между меньшими из двух или более последовательностей с выравниванием промежутков (если таковые имеются), адресованными конкретной математической моделью или компьютерной программой (т.е. идентичность родственных полипептидов может быть легко вычислена известными способами. Такие способы включают, но не ограничиваются теми, которые описаны в Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer,

Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; и Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988).

Способы определения идентичности предназначены для того, чтобы дать наибольшее совпадение между тестируемыми последовательностями. Способы определения идентичности описаны в общедоступных компьютерных программах. Способы компьютерной программы для определения идентичности между двумя последовательностями включают пакет программ GCG, включая GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res. 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)). Программа BLASTX находится в открытом доступе в Национальном центре биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information, (NCBI) и других источниках (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., supra). Хорошо известный алгоритм Смита Уотермана также может быть использован для определения идентичности.

Получение антител

Антигенсвязывающий домен против CD39 или белок (например, антитело или фрагмент антитела), который содержит такой домен, связывает и нейтрализует растворимый полипептид CD39 человека, например полипептид CD39 человека, лишенный двух трансмембранных доменов вблизи N - и C-концов, обнаруженных в мембраносвязанном CD39. В одном варианте реализации агент ингибирует АТФазную активность CD39. В одном варианте реализации антитело ингибирует CD39-опосредованную генерацию аденозина. В одном варианте реализации антитело ингибирует CD39-опосредованный катаболизм АТФ в АМФ. В одном варианте реализации антитело ингибирует аденозин-опосредованное ингибирование активности лимфоцитов (например, Т-клеток). В одном аспекте антитело выбрано из полноразмерного антитела, фрагмента антитела и синтетической или полусинтетической молекулы, полученной из антитела.

Антитела, которые потенциально ингибируют ферментативную (АТФазную) активность растворимого (и необязательно мембраносвязанного) белка CD39, могут в одном варианте реализации иммобилизовать или ограничивать доменное движение растворимого (и необязательно мембраносвязанного) белка CD39 в одной из его конформаций, тем самым предотвращая гидролиз его субстрата. Антитела могут достигнуть этого, связываясь как с C-, так и с N-концевыми доменами растворимого (и необязательно мембраносвязанного) CD39 одновременно.

В одном варианте реализации антигенсвязывающий домен против CD39 или антигенсвязывающий белок, который содержит антигенсвязывающий домен (например, антитело или фрагмент антитела, мультиспецифичный связывающий белок, биспецифичное антитело и т.д.), содержит определяющие комплементарность области (CDR) и каркасные области (FR). Антигенсвязывающие домены могут быть сконструированы или модифицированы таким образом, чтобы обеспечить желаемые и/или улучшенные свойства.

В одном варианте реализации антигенсвязывающий белок против CD39 способен связывать и ингибировать активность полипептида CD39 человека, антигенсвязывающий белок содержит V_H и V_L, каждый из которых содержит каркасную область (например, каркасную область, имеющую аминокислотную последовательность человеческого происхождения) и CDR1, CDR2 и CDR3. В одном варианте реализации антиген-связывающий белок ограничивает движение домена CD39 при связывании с CD39. Необязательно, каркасные области V_H и/или V_L (например, FR1, FR2, FR3 и/или FR4) имеют человеческое происхождение.

В определенном варианте реализации связывающие молекулы и домены могут быть получены из переменных доменов иммуноглобулина, например, в виде ассоциированных доменов V_L и V_H, обнаруженных на двух полипептидных цепях, или одноцепочечного антигенсвязывающего домена, такого как scFv, домен V_H, домен V_L, dAb, домен V-NAR или домен V_HH.

В одном аспекте связывающий CD39 агент представляет собой антитело, выбранное из полностью человеческого антитела, гуманизированного антитела и химерного антитела.

В одном аспекте агент представляет собой фрагмент антитела, содержащий константный или Fc-домен, полученный из константного IgG1 человека или Fc-домена, например, модифицированный, в соответствии с дальнейшим описанием.

В одном аспекте агент содержит фрагмент антитела, выбранный из фрагмента Fab, фрагмента Fab', фрагмента Fab' - SH, фрагмента F(ab)₂, фрагмента F(ab')₂, фрагмента Fv, Ig тяжелой цепи (Ig ламы или верблюда), фрагмента V_HH,

однодоменного FV и одноцепочечного фрагмента антитела. В одном аспекте агент содержит синтетическую или полусинтетическую молекулу антитела, полученную из scFV, dsFV, мини-тела, диатела, триатела, каппа-тела, IgNAR; и мультиспецифичное (например, биспецифичное) антитело. Агент может дополнительно содержать домен Fc.

В одном аспекте антитело находится, по меньшей мере, в частично очищенной форме.

В одном аспекте антитело находится в фактически выделенной форме.

Антитела могут быть получены с помощью различных способов, известных в данной области. В одном варианте реализации антитела согласно настоящему изобретению продуцируют посредством отбора из библиотеки антител (например, из фаг-дисплейной библиотеки). В другом варианте реализации антитела получают посредством иммунизации животного, не являющегося человеком, предпочтительно мыши, иммуногеном, содержащим полипептид CD39, предпочтительно растворимый полипептид внеклеточного домена CD39 человека. Полипептид CD39 может необязательно быть или содержать фрагмент или производное полноразмерного полипептида CD39, обычно иммуногенный фрагмент, т.е. часть полипептида, содержащую эпитоп, экспрессируемый на поверхности клеток, экспрессирующих полипептид CD39. Такие фрагменты обычно содержат, по меньшей мере, приблизительно 7 последовательных аминокислот зрелой полипептидной последовательности, еще более предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно 10 последовательных аминокислот. Фрагменты, как правило, фактически представляют собой производные от внеклеточного домена рецептора. В одном варианте реализации иммуноген содержит полипептид CD39 человека дикого типа в липидной мембране, обычно на поверхности клетки. В конкретном варианте реализации иммуноген содержит интактные клетки, в частности интактные клетки человека, необязательно обработанные или лизированные. В другом варианте полипептид представляет собой рекомбинантный полипептид CD39.

Стадия иммунизации млекопитающего, отличного от человека, антигеном может быть выполнена любым хорошо известным в данной области способом для стимуляции выработки антител у мыши (см., например, E. Harlow and D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988), полное раскрытие которого в настоящей заявке включено посредством ссылки). Выделение гибридом, продуцирующих антитела, хорошо известно и может быть реализовано любым способом, хорошо известным в данной области.

Антитела также могут быть получены посредством отбора комбинаторных библиотек иммуноглобулинов, как описано, например, в (Ward et al. Nature, 341 (1989) p. 544, полное раскрытие которого в настоящей заявке включено посредством ссылки).

5 Идентификация одного или более антител, которые связываются с CD39, в частности, по существу или фактически с той же областью на CD39, что и моноклональное антитело mAb20 или mAb21, может быть легко определена с использованием любого из множества иммунологических скрининговых анализов, в которых может быть оценена конкуренция антител. Многие такие анализы обычно практикуются и хорошо известны в данной области (см., например, патент США No. 10 5,660,827, выд. 26 августа 1997, который специально включен в настоящую заявку посредством ссылки).

Например, если тест-антитела, подлежащие исследованию, получены от разных исходных животных или даже имеют различный изотип Ig, может быть использован простой конкурентный анализ, в котором контрольные (например, mAb20 15 или mAb21) и тест-антитела смешиваются (или предварительно адсорбируются) и наносятся на образец, содержащий полипептиды CD39, например, как описано в публикации PCT no. WO2018/167267, раскрытие которой включено в настоящую заявку посредством ссылки. Протоколы, основанные на вестерн-блоттинге и использовании анализа BIACORE, подходят для использования в таких исследованиях конкуренции.

20 Определение того, связывается ли антитело в пределах области эпитопа, может быть выполнено способами, известными специалисту в данной области. В качестве одного из примеров таких способов картирования/характеристики, область эпитопа для антитела против CD39 может быть определена посредством "отпечатка подошвы" эпитопов с использованием химической модификации экспонированных 25 аминов/карбоксилатов в белке CD39. Одним из конкретных примеров такого способа отпечатков подошвы является использование HXMS (водородно-дейтериевый обмен, обнаруживаемый масс-спектрометрией), в котором происходит водородно-дейтериевый обмен протонами амида рецептора и лиганда белка, связывание и обратный обмен, при этом основные амидные группы, участвующие в связывании 30 белка, защищены от обратного обмена и, следовательно, остаются дейтерированными. Соответствующие области могут быть идентифицированы на этом этапе с помощью пептического протеолиза, быстрого микробного высокоэффективного жидкостного хроматографического разделения и/или электроспрейной ионизационной масс-спектрометрии. См., например, Ehring H, Analytical Biochemistry, Vol. 267 (2) pp. 35 252-259 (1999) Engen, J. R. и Smith, D. L. (2001) Anal. Chem. 73, 256A-265A. Другим примером подходящего способа идентификации эпитопов является ядерно-магнитно-

резонансное картирование эпитопов (ЯМР), где обычно сравнивают положение сигналов в двумерных спектрах ЯМР свободного антигена и антигена, в комплексе с антигенсвязывающим пептидом, таким как антитело. Антиген как правило селективно изотопно метят ^{15}N , так что в ЯМР-спектре видны только сигналы, соответствующие антигену, и никаких сигналов от антигенсвязывающего пептида. Сигналы антигена, исходящие от аминокислот, участвующих во взаимодействии с антигенсвязывающим пептидом, обычно будут сдвигать положение в спектре комплекса по сравнению со спектром свободного антигена, и таким образом можно идентифицировать аминокислоты, участвующие в связывании. См., например, Ernst Schering Res Found Workshop. 2004; (44): 149-67; Huang et al., Journal of Molecular Biology, Vol. 281 (1) pp. 61-67 (1998); и Saito and Patterson, Methods. 1996 Jun; 9 (3): 516-24.

Картирование/характеристика эпитопов также может быть выполнено с использованием способов масс-спектрометрии. См., например, Downard, J Mass Spectrom. 2000 Apr; 35 (4): 493-503 и Kiselar and Downard, Anal Chem. 1999 May 1; 71 (9): 1792-1801. Способы расщепления протеазой также могут быть полезны в контексте картирования и идентификации эпитопа. Области/последовательности, релевантные антигенным детерминантам, могут быть определены расщеплением протеазой, например, с использованием трипсина в соотношении приблизительно 1:50 к CD39 или в течение ночи при pH 7-8, с последующим анализом масс-спектрометрией (МС) для идентификация пептидов. Пептиды, защищенные от расщепления трипсином связывающим молекулу против CD39, впоследствии могут быть идентифицированы посредством сравнения образцов, подвергнутых расщеплению трипсином, и образцов, инкубированных с антителом, а затем подвергнутых расщеплению, например, трипсином (тем самым выявляя "отпечаток подошвы" для связующей молекулы). Другие ферменты, такие как химотрипсин, пепсин и т. д., также или альтернативно могут быть использованы в аналогичных способах характеристики эпитопов. Кроме того, ферментативное расщепление может обеспечить быстрый способ анализа того, находится ли потенциальная антигенная детерминантная последовательность в области полипептида CD39, которая не экспонирована на поверхности, и, соответственно, наиболее вероятно не имеет отношения к иммуногенности/антигенности.

Сайт-направленный мутагенез - еще один способ, который можно применять для выявления связывающего эпитопа. Например, при "аланиновом сканировании" каждый остаток в белковом сегменте заменяется остатком аланина, и измеряются последствия для аффинности связывания. Если мутация приводит к значительному снижению аффинности связывания, то она, скорее всего, участвует в связывании.

Моноклональные антитела, специфичные для структурных эпитопов (т.е. антитела, которые не связывают несвернутый белок), могут быть использованы для проверки того, что замена аланина не влияет на общую укладку белка. См., например, Clackson and Wells, *Science* 1995; 267:383-386; и Wells, *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:1-6.

5 Электронная микроскопия также может быть использована для определения "отпечатка подошвы" эпитопа. Например, в Wang et al., *Nature* 1992; 355:275-278 использовали скоординированное применение криоэлектронной микрокопии, трехмерной реконструкции изображений и рентгеновской кристаллографии для определения физического отпечатка Fab-фрагмента на поверхности капсида
10 нативного вируса мозаики коровьего гороха.

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

 Как правило, антитело против CD39, представленное в настоящей заявке, имеет афинность к полипептиду CD39 (например, мономерному полипептиду CD39, полученному в приведенных в настоящей заявке примерах) в диапазоне от
20 приблизительно 10^4 до приблизительно 10^{11} M^{-1} (например, от приблизительно 10^8 до приблизительно 10^{10} M^{-1}). Например, антитела против CD39 могут иметь среднюю константу диссоциации (K_D) менее 1×10^{-9} М по отношению к CD39, определяемую, например, скринингом путем поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (например, анализом с помощью аналитического устройства BIAcore™ SPR). В более конкретном
25 примерном аспекте изобретение обеспечивает антитела против CD39, которые имеют 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 для CD39.

 Антитела могут быть охарактеризованы, например, средней K_D не более чем приблизительно (т. е. афинность лучше, чем) 100, 60, 10, 5 или 1 наномоляр, предпочтительно субнаномоляр или необязательно не более чем приблизительно 500,
30 200, 100 или 10 пикомоляр. K_D может быть определена, например, посредством иммобилизации рекомбинантно продуцируемых белков CD39 человека на поверхности чипа с последующим внесением тестируемого антитела в раствор. В одном варианте реализации способ дополнительно включает этап (d), отбора антитела из (b), которые
35 способны конкурировать за связывание с CD39 с антителом I-394 или, например, с любым из МАТ 1-24.

ДНК, кодирующая моноклональные антитела согласно настоящему изобретению, например, антитело mAb20 или mAb21, может быть легко выделена и секвенирована с использованием обычных процедур (например, с помощью олигонуклеотидных зондов, которые способны специфично связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антител мыши). В одном аспекте обеспечена нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую цепь или легкую цепь антитела против CD39 согласно любому варианту реализации в настоящей заявке. После выделения ДНК может быть помещена в экспрессионные векторы, которые затем трансфицируются в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки обезьяны COS, клетки яичников китайского хомяка (CHO) или клетки миеломы, которые в противном случае не продуцируют белок иммуноглобулина, чтобы получить синтез моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. Как описано в другом месте настоящей заявки, такие последовательности ДНК могут быть модифицированы для любой из большого числа целей, например, для гуманизации антител, получения фрагментов или производных, или для модификации последовательности антитела, например, в сайте связывания антигена для оптимизации специфичности связывания антитела. В одном варианте реализации предложена выделенная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела (например, mAb20 или mAb21), а также рекомбинантная клетка-хозяин, содержащая (например, в своем геноме) такую нуклеиновую кислоту. Рекомбинантная экспрессия в бактериальной ДНК, кодирующей антитело, хорошо известна в данной области (см., например, Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5, pp. 256 (1993); и Pluckthun, Immunol. 130, p. 151 (1992)).

После идентификации антител, способных связывать pCD39 и/или мемCD39 и/или обладающих другими желательными свойствами, их как правило также оценивают с использованием способов, таких как описанные в настоящей заявке, на предмет их способности связываться с другими полипептидами, включая неродственные полипептиды. В идеале антитела связываются со значительной афинностью только с CD39 и не связываются на значительном уровне с неродственными полипептидами или другими полипептидами семейства NTPDаз, в частности CD39-L1, L2, L3 и L4 или NTPDаз8. Однако следует понимать, что до тех пор, пока афинность к CD39 существенно больше (например, 10x, 100x, 500x, 1000x, 10,000x или более), чем к другим, неродственным полипептидам, тогда антитела пригодны для применения в настоящих способах.

В одном варианте реализации антитела против CD39 могут быть получены таким образом, чтобы они не имели существенного специфического связывания с

рецепторами Fc γ человека, например, с одним или более из CD16A, CD16B, CD32A, CD32B и/или CD64). Такие антитела могут содержать константные области различных тяжелых цепей, которые, как известно, не имеют или имеют низкое связывание с рецепторами Fc γ . Альтернативно, фрагменты антител, которые не содержат (или содержат части) константных областей, таких как фрагменты F(ab')₂, могут быть использованы для предотвращения связывания Fc-рецептора. Связывание с рецептором Fc можно оценить в соответствии с способами, известными в данной области техники, включая, например, тестирование связывания антитела с Fc рецептором в анализе BIACORE. Кроме того, как правило, можно применять любой изотип IgG антитела, отличающийся тем, что Fc-часть модифицирована (например, посредством введения 1, 2, 3, 4, 5 или более аминокислотных замен) для минимизации или устранения связывания с Fc-рецепторами (см., например, WO 03/101485, раскрытие которого в настоящей заявке включено по ссылке). Анализы, такие как клеточные анализы для оценки связывания Fc-рецепторов, хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в WO 03/101485.

В одном варианте реализации антитело может содержать одну или более специфичных мутаций в области Fc, которые приводят к антителам с "молчащей Fc областью", которые имеют минимальное взаимодействие с эффекторными клетками. Подавления эффекторных функций можно достигнуть посредством мутации в Fc-области антител, они описаны в данной области техники: мутация N297A, мутации LALA (Strohl, W., 2009, Curr. Opin. Biotechnol. Vol. 20(6): 685-691); и D265A (Baudino et al., 2008, J. Immunol. 181: 6664-69), см. также Heusser et al., WO2012/065950, раскрытие которых включено в настоящую заявку путем ссылки. В одном варианте реализации антитело содержит одну, две, три или более аминокислотных замен в области шарнира. В одном варианте реализации антитело представляет собой IgG1 или IgG2 и содержит одну, две или три замены в остатках 233-236, необязательно 233-238 (нумерация ЕС). В одном варианте реализации антитело представляет собой IgG4 и содержит одну, две или три замены в остатках 327, 330 и/или 331 (нумерация ЕС). Примерами антител с молчащей Fc областью IgG1 являются мутанты LALA, содержащие мутации L234A и L235A в аминокислотной последовательности Fc IgG1. Другой пример молчащей мутации Fc представляет собой мутацию в остатке D265 или в D265 и P329, например, используемая в антителе IgG1 в качестве мутации DAPA (D265A, P329A) (US 6,737,056). Другое молчащее IgG1 антитело содержит мутацию в остатке N297 (например, мутация N297A, N297S), которая приводит к агликозилированным/негликозилированным антителам. Другие молчащие мутации включают: замены по остаткам L234 и G237 (L234A/G237A); замены по остаткам S228,

L235 и R409 (S228P/L235E/R409K,T,M,L); замены по остаткам H268, V309, A330 и A331 (H268Q/V309L/A330/A331S); замены по остаткам C220, C226, C229 и P238 (C220S/C226S/C229S/P238S); замены по остаткам C226, C229, E233, L234 и L235 (C226S/C229S/E233P/L234V/L235A; замены по остаткам K322, L235 и L235 (K322A/L234A/L235A); замены по остаткам L234, L235 и P331 (L234F/L235E/P331S); замены по остаткам 234, 235 и 297; замены по остаткам E318, K320 и K322 (L235E/E318A/K320A/K322A); замены по остаткам (V234A, G237A, P238S); замены по остаткам 243 и 264; замены по остаткам 297 и 299; замены, такие, что остатки 233, 234, 235, 237 и 238 согласно системе нумерации ЕС, содержат последовательность, выбранную из PAAAP, PAAAS и SAAAS (см. WO2011/066501).

В одном варианте реализации антитело может содержать одну или более специфичных мутаций в области Fc. Например, такое антитело может содержать Fc-домен IgG1 человеческого происхождения, содержащий мутацию в остатке (остатках) 234, 235, 237, 330 и/или 331 согласно Кабату. Один из примеров такого Fc-домена содержит замены в остатках L234, L235 и P331 согласно Кабату (например, L234A/L235E/P331S или (L234F/L235E/P331S). Другой пример такого Fc-домена содержит замены в остатках L234, L235, G237 и P331 согласно Кабату (например, L234A/L235E/G237A/P331S). Другой пример такого Fc-домена содержит замены в остатках L234, L235, G237, A330 и P331 согласно Кабату (например, L234A/L235E/G237A/A330S/P331S). В одном варианте антитело содержит Fc домен, необязательно изотипа IgG1 человека, содержащий: замену L234X₁, замену L235X₂, и замену P331X₃, где X₁ представляет собой любой аминокислотный остаток, кроме лейцина, X₂ представляет собой любой аминокислотный остаток, кроме лейцина, и X₃ представляет собой любой аминокислотный остаток, кроме пролина; причем необязательно X₁ представляет собой аланин или фенилаланин, или их консервативные замены; причем необязательно X₂ представляет собой глутаминовую кислоту или ее консервативные замены; причем необязательно X₃ представляет собой серин или его консервативные замены. В другом варианте реализации антитело содержит Fc-домен, необязательно изотипа IgG1 человека, содержащий: замену L234X₁, замену L235X₂, замену G237X₄ и замену P331X₄, где X₁ является любым аминокислотным остатком, кроме лейцина, X₂ представляет собой любой аминокислотный остаток, кроме лейцина, X₃ представляет собой любой аминокислотный остаток, кроме глицина, и X₄ представляет собой любой аминокислотный остаток, кроме пролина; причем необязательно X₁ представляет собой аланин или фенилаланин или их консервативные замены; причем необязательно X₂ представляет собой глутаминовую кислоту или ее консервативную

замену; необязательно X_3 представляет собой аланин или его консервативные замены; необязательно X_4 представляет собой серин или его консервативные замены. В другом варианте реализации антитело содержит Fc-домен, необязательно изотипа IgG1 человека, содержащий: замену L234 X_1 , замену L235 X_2 , замену G237 X_4 , замену G330 X_4 и замену R331 X_5 , причем X_1 представляет собой любой аминокислотный остаток, кроме лейцина, X_2 является любым аминокислотным остатком, кроме лейцина, X_3 представляет собой любой аминокислотный остаток, кроме глицина, X_4 является любым аминокислотным остатком, кроме аланина, X_5 представляет собой любой аминокислотный остаток, кроме пролина; причем необязательно X_1 представляет собой аланин или фенилаланин или их консервативные замены; причем необязательно X_2 представляет собой глутаминовую кислоту или ее консервативную замену; необязательно X_3 представляет собой аланин или его консервативные замены; необязательно X_4 представляет собой серин или его консервативные замены, необязательно X_5 представляет собой серин или его консервативные замены. В краткой записи, используемой в настоящей заявке, формат выглядит следующим образом: остаток дикого типа: положение в полипептиде: мутантный остаток, где положения остатков обозначаются в соответствии с нумерацией ЕС согласно Кабату.

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

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
 GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNH
 KPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGGPSVFLFPPKPK
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPSIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 23).

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

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
 GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
 KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEEEGGPSVFLFPPKP
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 5 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIE
 KTISKAAGQPREEQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMHEALHNYHTQKSLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 24).

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

15 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
 GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
 KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKP
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIE
 20 KTISKAAGQPREEQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMHEALHNYHTQKSLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 25).

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

30 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
 GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
 KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKP
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
 PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIE
 35 KTISKAAGQPREEQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMHEALHNYHTQKSLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 26).

35 Антитела с молчащей Fc областью опосредуют отсутствие или низкую
 активность АЗКЦ, что означает, что антитело с молчащей Fc областью проявляет

активность АЗКЦ, которая ниже 50% специфического лизиса клеток. Предпочтительно антитело, по существу, не обладает активностью АЗКЦ, например, антитело с молчащей Fc областью проявляет активность АЗКЦ (специфичный лизис клеток), которая ниже 5% или ниже 1%. Антитела с молчащей Fc областью также могут приводить к отсутствию FcγR-опосредованного сшивания CD39 на поверхности CD39-экспрессирующей клетки.

В одном варианте реализации антитело имеет замену в константной области тяжелой цепи по любому одному, двум, трем, четырем, пяти или более остатков, выбранных из группы, состоящей из: 220, 226, 229, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 243, 264, 268, 297, 298, 299, 309, 310, 318, 320, 322, 327, 330, 331 и 409 (нумерация остатков в константной области тяжелой цепи соответствует нумерации ЕС согласно Кабату). В одном варианте реализации антитело содержит замену по остаткам 234, 235 и 322. В одном варианте реализации антитело имеет замену по остаткам 234, 235 и 331. В одном варианте реализации антитело имеет замену по остаткам 234, 235, 237 и 331. В одном варианте реализации антитело имеет замену по остаткам 234, 235, 237, 330 и 331. В одном варианте реализации домен Fc относится к подтипу IgG1 человека. Аминокислотные остатки обозначаются в соответствии с нумерацией ЕС согласно Кабату.

В одном варианте реализации антитело содержит Fc-домен, содержащий аминокислотную замену, которая увеличивает связывание с полипептидами FcRn человека с целью увеличения периода полувыведения антитела *in vivo*. Типичные мутации описаны в Strohl, W., 2009, Curr. Opin. Biotechnol. Vol. 20(6):685-691, раскрытие которого включено в настоящую заявку посредством ссылки. Примеры замен, используемых в антителах изотипа IgG1 человека, представляют собой замены по остаткам M252, S254 и T256 согласно Кабату; замены по остаткам T250 и M428; замены по остаткам N434; замены по остаткам H433 и N434; замены по остаткам T307, E380 и N434; замены по остаткам T307, E380 и N434; замены по остаткам M252, S254, T256, H433, N434 и 436; замены по остатку I253; замены по остаткам P257, N434, D376 и N434.

В одном варианте реализации антитело содержит Fc-домен, содержащий аминокислотную замену, которая придает пониженную чувствительность к расщеплению протеазами. Матриксные металлопротеиназы (ММП) представляют собой наиболее заметное семейство протеиназ, связанных с опухолевым генезом. В то время как раковые клетки могут экспрессировать ММП, основная часть внеклеточных ММП обеспечивается различными типами стромальных клеток, которые инфильтрируют опухоль и производят определенный набор протеиназ и ингибиторов

протеиназ, которые высвобождаются во внеклеточное пространство и специфично изменяют среду вокруг опухоли. ММП, присутствующие в микроокружении опухоли, могут расщеплять антитела в области шарнира и, таким образом, могут приводить к инактивации терапевтических антител, которые предназначены для функционирования в области опухоли. В одном варианте реализации Fc-домен, содержащий аминокислотную замену, имеет пониженную чувствительность к расщеплению любой одной, двумя, тремя или более (или всеми) протеазами, выбранными из группы, состоящей из: GluV8, IdeS, желатиназы А (MMP2), желатиназы В (MMP-9), матричной металлопротеиназы-7 (MMP-7), стромелизина (MMP-3) и макрофагальной эластазы (MMP-12). В одном варианте реализации антитело с пониженной чувствительностью к расщеплению содержит Fc-домен, содержащий аминокислотную замену в остатках E233-L234 и/или L235. В одном варианте реализации антитело содержит Fc-домен, содержащий аминокислотную замену в остатках E233, L234, L235 и G236. В одном варианте реализации антитело содержит Fc-домен, содержащий аминокислотную замену в одном или более остатках 233-238, например, такую, что последовательность E233-L234-L235-G236 заменяется последовательностью P233-V234-A235 (G236 удаляется). См., например, WO99/58572 и WO2012087746, раскрытие которых включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Антигенсвязывающее соединение может на любой желаемой стадии быть оценено на предмет его способности ингибировать ферментативную активность CD39, в частности блокировать АТФазную активность рCD39 и снижать продукцию АДФ и АМФ (и, совместно с CD73, аденозина) растворимым белком CD39 и, необязательно, далее клеткой, экспрессирующей CD39, и, в свою очередь, восстанавливать активность и/или ослаблять аденозин-опосредованное ингибирование лимфоцитов.

Ингибирующая активность (например, иммуностимулирующий потенциал) антитела может быть оценена, например, в анализе для обнаружения исчезновения (гидролиза) АТФ и/или образования АМФ.

Способность антитела ингибировать растворимый рекомбинантный белок CD39 человека может быть проверена посредством обнаружения АТФ после инкубации тестового антитела с растворимым белком CD39. Вкратце, АТФ может быть количественно определен с помощью 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 часа при 37°C. 20 мкМ АТФ добавляют к планшетах в течение 30 дополнительных минут при 37°C перед

добавлением реагента CTG. Излучаемый свет количественно измеряют с помощью люминометра Enspire™ после короткого инкубационного периода в 5 мин в темноте.

Способность антитела ингибировать клетки, экспрессирующие белок CD39, можно проверить посредством обнаружения АТФ после инкубации тестируемого антитела с клетками (например, клетками Ramos, клетками, трансфицированными CD39 и т. д.). См., например, Примеры, Способы. Клетки можно инкубировать в течение 1 часа при 37°C с тестируемым антителом. Затем клетки инкубируют с 20 мкМ АТФ в течение 1 дополнительного часа при 37°C. Планшеты центрифугируют в течение 2 мин при 400g и надосадочную жидкость клеток переносят в люминесцентный микропланшет (белые лунки). CTG добавляют в супернатант и количественно определяют излучаемый свет после 5-минутной инкубации в темноте с помощью люминометра Enspire™. Эффективность антител против CD39 определяют сравнением испускаемого света в присутствии антитела только с АТФ (максимальное излучение света) и АТФ совместно с клетками (минимальное излучение света).

Уменьшение гидролиза АТФ в АМФ и/или увеличение АТФ и/или уменьшение генерации АМФ в присутствии антитела указывают на то, что антитело ингибирует CD39. В одном варианте реализации препарат антитела 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, согласно оценке путем обнаружения АТФ с использованием Cell Titer Glo™ (Promega) после инкубации клеток, экспрессирующих полипептид CD39 (например, клеток Ramos), с тестируемым антителом, например, как в Примерах, Способы.

В одном варианте реализации препарат антитела способен вызывать, по меньшей мере, 60%-ное снижение ферментативной активности растворимого рекомбинантного полипептида CD39 (например, в отсутствие клеток), предпочтительно, по меньшей мере, 70%, 80% или 90%-ное снижение ферментативной активности растворимого рекомбинантного полипептида CD39, оцениваемое путем детекции АТФ с использованием Cell Titer Glo™ (Promega) после инкубации растворимого рекомбинантного полипептида CD39 с тестируемым антителом, например, как в Примерах, Способы.

Активность антитела также может быть измерена в непрямом анализе на его способность модулировать активность иммунных клеток (например, иммунных клеток, экспрессирующих рецепторы аденозина; клеток, экспрессирующих A2A-рецепторы), например, чтобы облегчить аденозин-опосредованное ингибирование активности лимфоцитов или вызвать активацию активности лимфоцитов. Это можно решить,

например, с помощью анализа высвобождения цитокинов. В другом примере антитело может быть оценено в непрямом анализе на его способность модулировать пролиферацию лимфоцитов.

5 Эпитопы на CD39

В одном аспекте антитела связывают антигенную детерминанту, присутствующую на CD39, экспрессирующемся на поверхности клетки.

10 В одном аспекте антитела связывают по существу тот же эпитоп, что и антитела, имеющие VH и VL mAb1-24 (или I-394). В одном варианте реализации антитела связываются с эпитопом CD39, который, по меньшей мере, частично перекрывается с эпитопом, связываемым антителом mAb1-24 (или I-394), или содержит, по меньшей мере, один остаток. Остатки, связанные антителом, могут быть определены как присутствующие на поверхности полипептида CD39, например, на полипептиде CD39, экспрессируемом на поверхности клетки.

15 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: 1). Снижение связывания между антителом к CD39 и мутантным полипептидом CD39 (например, мутант из Таблицы 1) означает снижение аффинности связывания (например, при измерении известными способами, такими как FACS тестирование клеток, экспрессирующих конкретный мутант), или посредством тестирования Biacore связывания с мутантными полипептидами) и/или снижения общей связывающей способности антитела против CD39 (например, о чем свидетельствует уменьшение Bmax на графике зависимости концентрации антитела против CD39 от концентрации полипептида). Значительное снижение связывания указывает на то, что мутантный остаток непосредственно участвует в связывании с антителом против CD39 или находится в непосредственной близости от связывающего белка, когда антитело против CD39 связывается с CD39.

30 В некоторых вариантах реализации значительное снижение связывания означает, что связывающая аффинность и/или способность между антителом против CD39 и мутантным CD39 полипептидом снижаются более чем на 40%, более чем на 50%, более чем на 55%, более чем на 60%, более чем на 65%, более чем на 70%, более чем на 75%, более чем на 80%, более чем на 85%, более чем на 90% или более чем на 95% относительно связывания между антителом и полипептидом CD39 дикого типа. В некоторых вариантах реализации связывание снижается ниже обнаруживаемых пределов. В некоторых вариантах реализации показано

значительное снижение связывания, когда связывание антитела против CD39 с мутантным полипептидом CD39 составляет менее 50% (например, менее 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15% или 10%) связывания, наблюдаемого между антителом против CD39 и полипептидом CD39 дикого типа.

5 В некоторых вариантах реализации предложены антитела против CD39, которые демонстрируют значительно более низкое связывание с мутантным полипептидом CD39, отличающимся тем, что остаток в сегменте, содержащем аминокислотный остаток, связанный антителом mAb1-24 (или I-394), замещен другой аминокислотой, по сравнению со связыванием с полипептидом CD39 дикого типа, не
10 содержащим таких замен(ы) (например, полипептид SEQ ID NO: 1).

В одном варианте реализации антитело имеет пониженное связывание с мутантным полипептидом CD39, содержащим мутацию в одном или более (или всех) остатках, выбранных из группы, состоящей из R138, M139 и E142 (по отношению к SEQ ID NO: 1), в каждом случае относительно связывания между антителом и
15 полипептидом CD39 дикого типа, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

Типичные последовательности вариабельной области антитела

Примеры антител согласно настоящему изобретению включают антитела, содержащие домен VH и домен VL любого из антител mAb1-mAb24. Последовательности VH и VL антител против CD39 mAb1-mAb24 представлены в Таблицах A и B (Пример 13).

Одна из типичных высокоэффективных пар VH и VL против CD39 согласно настоящему изобретению представляет собой антитело mAb20, аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи которого указана ниже (SEQ ID NO: 31), и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи которого указана ниже (SEQ ID NO: 36). Такое антитело может, например, иметь тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

30 Другая типичная высокоэффективная пара VH и VL против CD39 согласно настоящему изобретению представляет собой антитело mAb21, аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи которого указана ниже (SEQ ID NO: 31), и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи которого указана ниже (SEQ ID NO: 37). Такое антитело может, например, иметь
35 тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38 и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

В любом аспекте выделенное антитело, связывающее полипептид CD39 человека, может быть определено как содержащее каркасные области VH и VL (например, FR1, FR2, FR3 и FR4) человеческого происхождения. В одном аспекте антитело содержит: HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность: DYNMH (SEQ ID NO: 8), или последовательность из, по меньшей мере, 4 смежных аминокислот, причем необязательно одна или более из таких аминокислот могут быть замещены другой аминокислотой; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность: YIVPLNGGSTFNQKFKG (SEQ ID NO: 9), или последовательность из по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот, причем необязательно одна или более из таких аминокислот могут быть замещены другой аминокислотой, причем необязательно замещен аспарагин в положении 61 согласно Кабату, причем необязательно замещен лизин в положении 65 согласно Кабату; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность: GGTRFAY (SEQ ID NO: 10), или ее последовательность из, по меньшей мере, 4, 5 или 6 смежных аминокислот, причем необязательно одна или более из таких аминокислот могут быть заменены другой аминокислотой; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность: RASESVDNFGVSFMY (SEQ ID NO: 11) или последовательность из по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот, причем необязательно одна или более из таких аминокислот могут быть замещены другой аминокислотой, причем необязательно аргинин в положении 24 согласно Кабату замещен; область LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность: GASNQGS (SEQ ID NO: 12) или последовательность из по меньшей мере 4, 5 или 6 смежных аминокислот, причем необязательно одна или более из этих аминокислот могут быть замещены другой аминокислотой; и/или область LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность: QQTKEVPYT (SEQ ID NO: 13) или последовательность из по меньшей мере 4, 5, 6, 7 или 8 смежных аминокислот, причем необязательно одна или более из таких аминокислот могут быть удалены или замещены другой аминокислотой. Положения в CDR могут соответствовать нумерации согласно Кабату.

В одном варианте реализации HCDR2 содержит аминокислотную последовательность Формулы I:

Y - I - V - P - L - N - G - G - S - T - F - Хаа₁ - Q - K - F - Хаа₂ - G (SEQ ID NO: 14), или ее подпоследовательность, где Хаа₁ может быть любым аминокислотным остатком, причем необязательно Хаа₁ представляет собой аспарагин или серин; причем Хаа₂ может быть любым аминокислотным остатком, причем дополнительно Хаа₂ представляет собой лизин или глутамин. В одном варианте реализации HCDR2

содержит аминокислотную последовательность: YIVPLNGGSTFSQKFKG (SEQ ID NO: 15). В одном варианте реализации HCDR2 содержит аминокислотную последовательность: YIVPLNGGSTFSQKFQG (SEQ ID NO: 16).

В одном варианте реализации LCDR1 содержит аминокислотную последовательность Формулы II:

Хаа₃ - A - S - E - S - V - D - N - F - G - V - S - F - M - Y (SEQ ID NO: 17), где Хаа₃ может быть любым аминокислотным остатком, причем необязательно Хаа₃ представляет собой лизин или аргинин. В одном варианте реализации LCDR1 содержит аминокислотную последовательность: KASESVDNFGVSEFMY (SEQ ID NO: 18).

В одном варианте реализации антитело содержит каркасную область тяжелой цепи из подгруппы IGHV1-3 человека (необязательно совместно с IGHJ1), необязательно IGHV1-3 представляет собой IGHV1-3*01. В одном варианте реализации гуманизованное антитело содержит каркасную область легкой цепи из подгруппы гена IGKV4-1 человека (необязательно совместно с IGKJ4).

В одном аспекте в настоящем изобретении предложен антигенсвязывающий домен или антитело, которое связывает полипептид CD39 человека, содержащее:

(a) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8;

(b) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, 14, 15 или 16;

(c) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10;

(d) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, 17 или 18;

(e) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12;

(f) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и

(g) последовательности каркасной области тяжелых и легких цепей человека.

Антитело может дополнительно содержать одну, две, три, четыре, пять или более аминокислотных замен в каркасной области тяжелой и/или легкой цепи человека, например, для повышения аффинности, стабильности или других свойств антитела. Необязательно, замена вводит остаток, присутствующий в определенном

положении у млекопитающего, не являющегося человеком (например, мыши или крысы).

5 В любом из приведенных в настоящей заявке вариантов последовательностей VH аминокислота в положении 67 тяжелой цепи (нумерация согласно Кабату) может быть аланином.

В любом из приведенных в настоящей заявке вариантов последовательностей VH аминокислота в положении 71 тяжелой цепи (нумерация согласно Кабату) представляет собой валин.

10 В любом из приведенных в настоящей заявке вариантов последовательностей VH аминокислота в положении 76 тяжелой цепи (нумерация согласно Кабату) представляет собой аргинин.

15 В некоторых вариантах реализации последовательностей VH в настоящей заявке, аминокислота в положении 48 тяжелой цепи (нумерация согласно Кабату) может быть изолейцином. В некоторых вариантах реализации последовательностей VH в настоящей заявке, аминокислота в положении 48 тяжелой цепи (нумерация согласно Кабату) может быть метионином.

В одном варианте реализации VH содержит остаток аланина в положении 67 (нумерация согласно Кабату) и валин в положении 71.

20 В одном варианте реализации VH содержит остаток изолейцина в положении 48 (нумерация согласно Кабату), остаток аланина в положении 67 (нумерация согласно Кабату), валин в положении 71 (нумерация согласно Кабату) и аргинин в положении 76 (нумерация согласно Кабату).

25 В любом из приведенных в настоящей заявке вариантов последовательностей VL, VL содержит фенилаланин в положении 36 (нумерация согласно Кабату) (FR2). В одном варианте реализации VL содержит лизин в положении 24 (нумерация согласно Кабату)(CDR1).

30 Положения в доменах VH и VL, описаны в настоящей заявке с использованием системы нумерации согласно Кабату (Kabat et al. (1991) Sequences of Protein of Immunological Interest, 5th ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD).

35 В одном аспекте антитело против CD39 содержит тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере приблизительно 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности) с тяжелой цепью, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38.

В одном аспекте антитело против CD39 содержит легкую цепь, имеющую по меньшей мере приблизительно 80% идентичности последовательности (например, по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности) с легкой цепью, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39 или 40.

В любом аспекте указанные тяжелые цепи, легкие цепи, переменная область, последовательности FR и/или CDR могут содержать одну или более модификаций последовательностей, например замену (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более последовательных модификаций). В одном варианте реализации замена представляет собой консервативную модификацию.

Дальнейший объект настоящего изобретения также включает функционально-консервативные варианты антител, раскрытых в настоящей заявке. "Функционально-консервативные варианты" - это те, в которых данный аминокислотный остаток в белке или ферменте был изменен без изменения общей конформации и функции полипептида, включая, но не ограничиваясь ими, замену аминокислоты на аминокислоту, имеющую сходные свойства (такие как, например, полярность, потенциал водородной связи, кислотность, основность, гидрофобность, ароматичность и тому подобные). Аминокислоты, отличные от тех, которые указаны как консервативные, могут отличаться в белке так, что процент сходства белковой или аминокислотной последовательности между любыми двумя белками сходной функции может варьировать и может составлять, например, от 70% до 99%, как определено в соответствии со схемой выравнивания, такой как Кластерный Способ, где сходство основано на алгоритме MEGALIGN. "Функционально-консервативный вариант" также включает полипептид, который имеет по меньшей мере 60% аминокислотной идентичности, определенной алгоритмами BLAST или FASTA, предпочтительно по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% и еще более предпочтительно по меньшей мере 95%, и который имеет те же или по существу аналогичные свойства или функции, что и нативный или исходный белок, с которым он сравнивается.

В любом варианте реализации антитело или фрагмент антитела могут быть необязательно определены как антитела, отличные от антитела I-394 (например, имеющие аминокислотные последовательности VH и VL SEQ ID NO: 6 и 7 соответственно). В любом варианте реализации антитело или фрагмент антитела могут быть необязательно определены как антитела, отличные от антител I-395, I-396, I-397, I-398 или I-399 (например, имеющие аминокислотные последовательности VH и VL, раскрытые в патентной заявке PCT № PCT/EP2018/056661, поданной 16 марта

2018 года, раскрытие информации о котором включено в настоящую заявку посредством ссылки). В любом варианте реализации антитело или фрагмент антитела могут быть необязательно определены как антитело, отличное от антитела Bu40, Va54g или BY12, раскрытого в публикации патента США US 2016/0137747A1 (например, имеющие аминокислотные последовательности VH и VL Bu40, Va54g или BY12; антитело, отличное от антитела BY40, продуцируемого гибридомной клеточной линией, продуцирующей такое антитело.

Фрагменты и производные антител (которые охватываются термином "антитело" или "антитела", используемым в настоящей заявке, если иное не указано или явно не противоречит контексту) могут быть получены способами, известными в данной области техники. "Фрагменты" включают часть интактного антитела, как правило, сайт связывания антигена или переменную 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 (называемых в настоящей заявке "фрагментом одноцепочечного антитела" или "одноцепочечным полипептидом"), включая, без ограничения, (1) одноцепочечные молекулы Fv (2) одноцепочечные полипептиды, содержащие только один переменный домен легкой цепи, или его фрагмент, который содержит три CDR переменного домена легкой цепи, без связанной части тяжелой цепи и (3) одноцепочечные полипептиды, содержащие только одну переменную область тяжелой цепи или ее фрагмент, содержащий три CDR переменной области тяжелой цепи, без связанной части легкой цепи; и мультиспецифичные (например, биспецифичные) антитела, образованные из фрагментов антител. Сюда, в частности, входят нанотело, доменное антитело, однодоменное антитело или "dAb".

Антитело против CD39 может быть включено в фармацевтический состав, содержащий концентрации от 1 мг/мл до 500 мг/мл, причем указанный состав имеет pH от 2,0 до 10,0. Состав может дополнительно содержать буферную систему, консервант(ы), тонирующий агент(ы), хелатирующий агент(ы), стабилизаторы и поверхностно-активные вещества. В одном варианте реализации фармацевтический состав представляет собой водный состав, то есть состав, содержащий воду. Такой состав обычно представляет собой раствор или суспензию. В другом варианте реализации фармацевтический состав представляет собой водный раствор. Термин "водный состав" определяют как состав, содержащий по меньшей мере 50% мас./мас. воды. Аналогичным образом, термин "водный раствор" определяют как раствор,

содержащий по меньшей мере 50% мас./мас. воды, а термин “водная суспензия” определяют как суспензия, содержащая по меньшей мере 50% мас./мас. воды.

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

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

10 В другом аспекте фармацевтический состав содержит водный раствор такого антитела и буфер, в котором антитело присутствует в концентрации от 1 мг/мл или выше, и где указанный состав имеет рН от приблизительно 2,0 до приблизительно 10,0.

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

20 В дальнейшем варианте реализации буфер выбран из группы, состоящей из ацетата натрия, карбоната натрия, цитрата, глицил-глицина, гистидина, глицина, лизина, аргинина, дигидрофосфата натрия, динатрийводородфосфата, фосфата натрия и Трис (гидроксиметил) - аминометана, бицина, трицина, яблочной кислоты, сукцината, малеиновой кислоты, фумаровой кислоты, винной кислоты, аспарагиновой кислоты или их смесей. Каждый из таких специфичных буферов представляет собой альтернативный вариант реализации.

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

35 Возможно, что в пептидном фармацевтическом составе могут присутствовать и другие ингредиенты. Такие дополнительные ингредиенты могут включать смачивающие агенты, эмульгаторы, антиоксиданты, наполнители, регуляторы тоничности, хелатирующие агенты, ионы металлов, маслянистые носители, белки (например, человеческий сывороточный альбумин, желатин или белки) и цвиттерион

(например, аминокислоты, такие как бетаин, таурин, аргинин, глицин, лизин и гистидин). Такие дополнительные ингредиенты, конечно, не должны отрицательно влиять на общую стабильность фармацевтического состава.

5 Фармацевтические композиции, содержащие антитело, могут быть введены пациенту, нуждающемуся в таком лечении, в нескольких местах, например, в местах местного применения, например, на коже и слизистых оболочках, в местах, которые обходят абсорбцию, например, введение в артерию, в вену, в сердце, и в местах, которые включают абсорбцию, например, введение в кожу, под кожу, в мышцу или в брюшную полость. Введение фармацевтических композиций может быть реализовано
10 несколькими путями введения, например подкожным, внутримышечным, внутривенным, лингвальным, сублингвальным, буккальным, пероральным, оральным, в желудок и кишечник, назальным, легочным, например, через бронхиолы и альвеолы или их комбинацию, эпидермальным, кожным, трансдермальным, вагинальным, ректальным, глазным, например, через конъюнктиву,
15 уретальным и парентеральным пациентам, нуждающимся в таком лечении.

Подходящие составы антител также могут быть определены посредством изучения опыта с другими уже разработанными терапевтическими моноклональными антителами. Было показано, что некоторые моноклональные антитела эффективны в
20 клинических ситуациях, такие как Ритуксан (Ритуксимаб), Герцептин (Трастузумаб), Ксолаир (омализумаб), Бексар (Тозитумомаб), Кампат (Алемтузумаб), Зевалин, Онколим и аналогичные составы можно применять с такими антителами. Например, моноклональное антитело можно поставлять в концентрации 10 мг/мл либо в 100 мг (10 мл), либо в 500 мг (50 мл) в одноразовых флаконах, приготовленных для внутривенного введения в 9,0 мг/мл хлорида натрия, 7,35 мг/мл дигидрата цитрата натрия, 0,7 мг/мл полисорбата 80 и стерильной воде для инъекций. pH доводят до 6,5.
25 В другом варианте реализации антитело поставляют в составе, содержащем приблизительно 20 мМ Na-цитрата, приблизительно 150 мМ NaCl, при pH приблизительно 6,0.

30 **Диагностика и лечение заболевания**

Также предусмотрены способы лечения индивидуума, в частности индивидуума, представляющего собой человека, с использованием агента против CD39 согласно настоящему изобретению. В одном варианте реализации изобретение обеспечивает применение антитела или фрагмента антитела в соответствии с
35 описанием в настоящей заявке, при приготовлении фармацевтической композиции для введения пациенту-человеку. Как правило, индивидуум страдает от или

подвержен риску развития рака или инфекционного заболевания (например, вирусной инфекции, бактериальной инфекции). В одном варианте реализации индивидуум имеет обнаруживаемый растворимый (внеклеточный) белок CD39 в кровотоке и/или в образце ткани (например, в образце опухоли или прилегающей к опухоли ткани).

5 Например, в одном аспекте предложен способ восстановления или потенцирования активности лимфоцитов у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий стадию введения указанному индивидууму нейтрализующего антитела против CD39 или фрагмента антитела согласно настоящему изобретению. В одном варианте реализации способ направлен на повышение активности лимфоцитов
10 (например, Т-клеток) у индивидуума, имеющего заболевание, при котором повышенная активность лимфоцитов благоприятна или которое вызвано или характеризуется иммуносупрессией, иммуносупрессивными клетками или, например, аденозином, генерируемым CD4-Т-клетками, CD8-Т-клетками, В-клетками). Такие способы будут особенно полезны, например, для лечения индивидуума, имеющего
15 солидную опухоль, при которой подозревают, что опухолевое микроокружение (и CD39-опосредованная в нем продукция аденозина) может способствовать отсутствию распознавания иммунной системой (иммунное ускользание). Опухолевая среда (опухолевая ткань или опухолевая соседняя ткань) может, например, характеризоваться присутствием CD39-экспрессирующих иммунных клеток, например,
20 CD4-Т-клеток, CD8-Т-клеток, В-клеток.

 Более конкретно, способы и композиции используют для лечения различных видов рака и других пролиферативных заболеваний, а также инфекционных заболеваний. Поскольку данные способы работают за счет снижения аденозина, который ингибирует анти-целевую клеточную (например, противоопухолевую)
25 активность лимфоцитов, и, возможно, дополнительно за счет увеличения АТФ, который может увеличить противоопухолевую активность лимфоцитов, они будут полезны при очень широком спектре раковых и инфекционных заболеваний. В одном варианте реализации композиции против CD39 полезны для лечения рака у индивидуумов, которые плохо реагируют (или не чувствительны) на лечение агентом,
30 который нейтрализует ингибирующую активность PD-1 человека, например, который ингибирует взаимодействие между PD-1 и PD-L1. Репрезентативные примеры рака, которые можно лечить, включают, в частности, солидные опухоли, отличающиеся тем, что аденозин в микроокружении опухоли может играть сильную роль в подавлении противоопухолевого иммунного ответа. В одном варианте, пациент-человек, которого
35 лечили антителом к CD39, имеет рак печени, рак костей, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, в том числе плоскоклеточный рак органов головы и шеи

(HNSCC), рак молочной железы, рак легких, немелкоклеточный рак легких (НМРЛ), кастрационно-резистентный рак предстательной железы (КРРП), меланому, рак матки, рак толстой кишки, ректальный рак, рак анальной области, рак желудка, рак яичка, рак матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, неходжкинскую лимфому, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечника, саркому мягкой ткани, рак уретры, рак пениса, солидные опухоли детского возраста, лимфоцитарную лимфому, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, карциному почечной лоханки, новообразования центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, ангиогенез опухоли, опухоль оси позвоночника, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, экологически индуцированный рак, в том числе вызванный асбестом, гематологические злокачественные опухоли, в том числе, например, множественную миелому, В-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина/первичную медиастинальную В-крупноклеточную лимфому, неходжкинские лимфомы, острый лейкоз, лимфому, хронический миелолейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, фолликулярную лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому, лимфому Беркитта, иммунобластную крупноклеточную лимфому, В-лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников, лимфому из клеток мантийной зоны, острый лимфобластный лейкоз, фунгоидную гранулему, анапластическую крупноклеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, и острый лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников Т-лимфоцитов, а также любые комбинации указанных видов рака. Настоящее изобретение также полезно при лечении метастатического рака. Пациенты могут быть протестированы или отобраны по одному или более из описанных выше клинических признаков до, во время или после лечения.

В одном варианте реализации антитело против CD39 или фрагмент антитела применяют при лечении рака, характеризующегося обнаруживаемым и/или повышенным уровнем растворимого (внеклеточного) белка CD39, например, в кровотоке и/или в тканях, например в опухоли или прилегающей к опухоли ткани.

В одном варианте реализации антитело против CD39 или фрагмент антитела используют при лечении рака, характеризующегося злокачественными клетками, экспрессирующими CD39.

В одном варианте реализации антитело против CD39 или фрагмент антитела вводят в количестве, эффективном для достижения и/или поддержания у индивидуума (например, в течение 1, 2, 3, 4 недель и/или до последующего введения антигенсвязывающего соединения) концентрации в крови, по меньшей мере, EC_{50} ,

необязательно EC_{70} , необязательно по существу EC_{100} , для нейтрализации ферментативной активности CD39, необязательно pCD39, необязательно мемCD39. В одном варианте реализации активное количество антитела против CD39 представляет собой количество, эффективное для достижения EC_{50} , необязательно EC_{70} ,
5 необязательно по существу EC_{100} , для нейтрализации ферментативной активности CD39, необязательно pCD39, необязательно мемCD39 во внесосудистой ткани индивидуума. В одном варианте реализации активное количество антитела против CD39 представляет собой количество, эффективное для достижения (или поддержания) у индивидуума EC_{50} , необязательно EC_{70} , необязательно по существу
10 EC_{100} , для ингибирования нейтрализующей ферментативной активности CD39, необязательно pCD39, необязательно мемCD39.

Необязательно, в одном варианте реализации, в отличие от некоторых антител, которые направлены на истощение CD39-экспрессирующих опухолевых клеток посредством АЗКЦ (которые, например, могут обеспечить полную
15 эффективность при концентрациях, равных или существенно ниже той, которая обеспечивает насыщение рецептора), антитело против CD39 не проявляет существенной опосредованной рецептором F_{cy} активности и вводится в количестве, эффективном для нейтрализации ферментативной активности, необязательно
20 дополнительно CD39, без существенного снижения модуляции экспрессии CD39, в течение желаемого периода времени, например, 1 недели, 2 недели, месяца, до следующего последовательного введения антитела против CD39.

В одном варианте реализации антитело против CD39 или фрагмент антитела вводят в количестве, эффективном для достижения и/или поддержания (например, в течение 1, 2, 3, 4 недель и/или до последующего введения антитела против CD39) в
25 крови индивидуума концентрации, по меньшей мере, EC_{50} , необязательно EC_{70} , необязательно по существу EC_{100} , для ингибирования CD39-опосредованного катаболизма АТФ в АМФ (например, путем оценки нейтрализации АТФазной активности pCD39; путем оценки нейтрализации АТФазной активности растворимого (внеклеточного) белка CD39, см. Примеры, Способы).

В одном варианте реализации предложен способ лечения или профилактики рака у индивидуума, включающий введение индивидууму, имеющему заболевание, антитела против CD39 или фрагмента антитела в количестве, которое позволяет
30 достичь или поддержать в течение определенного периода времени концентрацию в кровотоке, необязательно во внесосудистой ткани, представляющей интерес (например, опухоль или опухолевая среда), которая выше концентрации, требуемой для 50%, 70% или полного (например, 90%) насыщения рецепторов CD39-

экспрессирующими клетками в кровотоке (например, как оценивается в МКПК). Необязательно достигаемая концентрация по меньшей мере на 20%, 50% или 100% выше концентрации, необходимой для насыщения указанного рецептора.

5 В одном варианте реализации предложен способ лечения или профилактики рака у индивидуума, включающий введение индивидууму антитела против CD39 или фрагмента антитела в количестве, которое позволяет достигать или поддерживать в течение определенного периода времени концентрацию в циркуляции, необязательно во внесосудистой ткани, представляющей интерес (например, опухоль или опухолевая среда), которая выше, чем EC_{50} , необязательно EC_{70} или необязательно EC_{100} , для связывания с CD39-экспрессирующими клетками (например, как оценивается проточной цитометрией, посредством титрования антитела против CD39 на CD39-экспрессирующих клетках, например клетках Ramos), как и в Примерах, Способах).
10 Необязательно достигаемая концентрация по меньшей мере на 20%, 50% или 100% выше, чем EC_{50} , необязательно EC_{70} или необязательно EC_{100} , для связывания с CD39-экспрессирующими клетками.
15

EC_{50} , EC_{70} или EC_{100} могут быть оценены, например, в клеточном анализе для нейтрализации ферментативной активности CD39, как показано в приведенных в настоящей заявке Примерах, например, нейтрализация активности АТФазы в В-клетках посредством количественного определения гидролиза АТФ до АМФ (или АТФ до нисходящего аденозина), см. Примеры, Способы. " EC_{50} " в отношении нейтрализации ферментативной активности CD39 относится к эффективной концентрации антитела против CD39, которое производит 50% своего максимального ответа или эффекта в отношении нейтрализации ферментативной активности. " EC_{70} " в отношении нейтрализации ферментативной активности CD39 относится к эффективной концентрации антитела против CD39, которое производит 70% его максимального ответа или эффекта. " EC_{100} " в отношении нейтрализации ферментативной активности CD39 относится к эффективной концентрации антитела против CD39, которое производит свой по существу максимальный ответ или эффект в отношении такой нейтрализации ферментативной активности.
20
25

30 В некоторых вариантах реализации, в частности для лечения солидных опухолей, достигаемая концентрация предназначена для того, чтобы привести к концентрации в тканях (вне сосудистой сети, например, в опухоли или окружении опухоли), которая соответствует, по меньшей мере, EC_{50} или EC_{70} для нейтрализации ферментативной активности, необязательно приблизительно или, по меньшей мере, приблизительно EC_{100} .
35

В одном варианте реализации количество антитела против CD39 составляет от 1 до 20 мг/кг массы тела. В одном варианте реализации данное количество вводят индивидууму еженедельно, каждые две недели, ежемесячно или каждые два месяца.

5 В одном варианте реализации предложен способ лечения человека, больного раком, включающий введение индивидууму эффективного количества антитела против CD39 согласно настоящему изобретению в течение по меньшей мере одного цикла введения (необязательно по меньшей мере 2, 3, 4 или более циклов введения), причем цикл представляет собой период в восемь недель или менее, причем для
10 каждого из по меньшей мере одного цикла вводят одну, две, три или четыре дозы антитела против CD39 в дозе 1-20 мг/кг массы тела. В одном варианте реализации антитело против CD39 вводят посредством внутривенной инфузии.

Подходящие протоколы лечения для лечения человека включают, например, введение пациенту количества, описанного в настоящей заявке, антитела против CD39, причем способ включает по меньшей мере один цикл введения, отличающимся
15 тем, что вводится по меньшей мере одна доза антитела против CD39. Необязательно, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7 или вводят 8 доз антитела против CD39. В одном варианте реализации цикл введения составляет от 2 недель до 8 недель.

В одном варианте реализации предложен способ лечения или профилактики заболевания (например, рака, солидной опухоли, гематологической опухоли) у
20 индивидуума, включающий введение индивидууму, имеющему заболевание (например, рак, солидную опухоль, гематологическую опухоль), антитела против CD39, которое нейтрализует ферментативную активность CD39 в течение, по меньшей мере, одного цикла введения, причем 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} или больше)
25 введение антитела против CD39, причем антитело против CD39 вводят в количестве, эффективном для достижения или поддержания между двумя последовательными введениями концентрации антитела против CD39 в крови (сыворотке) по меньшей мере 0,1 мкг/мл, необязательно по меньшей мере 0,2 мкг/мл, необязательно по меньшей мере 1 мкг/мл или необязательно по меньшей мере 2 мкг/мл (например, для
30 лечения гематологической опухоли), или необязательно по меньшей мере приблизительно 1 мкг/мл, 2 мкг/мл, 10 мкг/мл или 20 мкг/мл, например, между 1-100 мкг/мл, 1-50 мкг/мл, 1-20 мкг/мл или 1-10 мкг/мл (например, для лечения солидной опухоли, для лечения гематологической опухоли). В одном варианте реализации поддерживается заданная непрерывная концентрация в крови, при этом концентрация
35 в крови не падает существенно ниже заданной концентрации в течение заданного периода времени (например, между двумя введениями антитела, количество недель,

1 неделя, 2 недели, 3 недели, 4 недели), т. е. хотя концентрация в крови может изменяться в течение заданного периода времени, заданная поддерживаемая концентрация в крови представляет собой минимальную или “минимальную” концентрацию. В одном варианте реализации терапевтически активное количество антитела против CD39 представляет собой количество такого антитела, способного обеспечить (по меньшей мере) концентрацию EC₅₀, необязательно концентрацию EC₇₀, необязательно концентрацию EC₁₀₀ в крови и/или в ткани для нейтрализации ферментативной активности CD39 в течение периода, по меньшей мере, приблизительно 1 недели, приблизительно 2 недель или приблизительно одного месяца после введения антитела.

До или во время курса лечения антителом против CD39 согласно настоящему изобретению, наличия или уровней растворимого (внеклеточного) белка CD39, CD39-экспрессирующих клеток, аденозина, АТФ, АДФ и/или АМФ уровни могут быть оценены внутри и/или рядом с опухолью пациента, чтобы оценить, подходит ли пациент для лечения (например, чтобы предсказать, ответит ли пациент на лечение). Повышенное присутствие или уровни растворимого (внеклеточного) CD39, CD39-экспрессирующих клеток, уровни аденозина, АТФ, АДФ и/или АМФ могут указывать на то, что индивидуум подходит для лечения (например, вероятно, получит пользу) антителом против CD39 согласно настоящему изобретению (включая, но не ограничиваясь им, антитело, которое ингибирует субстрат-связанный CD39).

До или во время курса лечения антителом против CD39 согласно настоящему изобретению, уровни аденозина, АДФ и/или АМФ могут дополнительно оцениваться внутри и/или рядом с опухолью пациента, чтобы оценить, получит ли пациент пользу от лечения антителом против CD39. Снижение уровней аденозина, АТФ, АДФ и/или АМФ после введения (или дозирования антитела) по сравнению с уровнями до лечения (или дозирования антитела) может указывать на то, что индивидуум получает пользу от лечения антителом к CD39 раскрытие (включая, но не ограничиваясь им, антитело, которое ингибирует связанный с субстратом CD39). Необязательно, если пациент получает пользу от лечения антителом против CD39, способы могут дополнительно включать введение пациенту дополнительной дозы антитела против CD39 (например, продолжение лечения).

В одном варианте реализации оценка уровней аденозина, АДФ и/или АМФ в образце ткани внутри и/или рядом с опухолью пациента включает получение от пациента биологического образца ткани человека, выбранного из группы, состоящей из ткани пациента, больного раком, например, ткани рака, ткани проксимальнее или на периферии рака, соседней ткани рака, соседней неопухолевой ткани или нормальной

соседней ткани, и обнаружение уровней аденозина, АТФ, АДФ и/или АМФ внутри ткани. Уровни от пациента можно сравнить с референсным уровнем, например, соответствующем здоровому индивидууму.

5 В одном варианте реализации изобретения предложен способ лечения или профилактики рака у индивидуума, нуждающегося в этом, причем способ включает:

а) обнаружение растворимого (внеклеточного) белка CD39 и/или CD39-экспрессирующих клеток в кровотоке или в окружении опухоли, необязательно внутри опухоли и/или в прилегающей ткани, и

10 б) после определения того, что растворимый (внеклеточный) белок CD39 и/или экспрессирующие CD39 клетки содержатся в кровотоке или окружении опухоли, необязательно на уровне, который повышен по сравнению с референсным уровнем (например, уровнем, наблюдаемым в здоровой ткани; необязательно уровнем, соответствующим здоровому индивидууму или индивидууму, не получающему существенной пользы от антитела против CD39), индивидууму вводят антитело против
15 CD39. Экспрессирующие CD39 клетки могут содержать опухолевые клетки или лейкоциты, например циркулирующие или инфильтрирующие опухоль клетки, например CD4 Т-клетки, CD8 Т-клетки, TReg-клетки, В-клетки.

В одном варианте реализации изобретения предложен способ лечения или профилактики рака у индивидуума, нуждающегося в этом, причем способ включает:

20 а) оценку наличия у индивидуума обнаруживаемого растворимого (внеклеточного) CD39, необязательно находящегося в кровотоке, необязательно внутри опухоли и/или в прилегающей ткани, и

б) при обнаружении растворимого (внеклеточного) CD39, необязательно на уровне, который повышен по сравнению с референсным уровнем (например, соответствующим здоровому индивидууму или индивидууму, не получающему
25 существенной пользы от антитела против CD39 согласно настоящему изобретению), введение индивидууму антитела против CD39 согласно настоящему изобретению.

Необязательно, в любом из способов реализации обнаружение растворимого белка CD39 и/или CD39-экспрессирующих клеток (или аденозина, АТФ, АДФ и/или
30 АМФ) в окружении опухоли включает получение от индивидуума биологического образца, который содержит раковую ткань и/или ткань проксимальнее или на периферии рака (например, соседнюю раковую ткань, соседнюю неопухолевую ткань или нормальную соседнюю ткань), и обнаружение уровней белка pCD39, CD39-экспрессирующих клеток (или аденозина, АТФ, АДФ и/или АМФ). CD39-экспрессирующие клетки могут включать, например, опухолевые клетки, CD4-Т-клетки,
35 CD8-Т-клетки, TReg-клетки, В-клетки.

Индивидуума, имеющего рак, можно лечить антителом к CD39 без предварительной стадии обнаружения для оценки наличия pCD39 и/или экспрессии CD39 на циркулирующих клетках или на клетках в микроокружении опухоли (например, на опухолевых клетках, CD4 T-клетки, T-клетки CD8, клетки TReg, B-клетки).

5 Необязательно, способ лечения может включать стадию обнаружения нуклеиновой кислоты CD39 или полипептида в биологическом образце из крови или опухоли от индивидуума (например, в раковой ткани, ткани проксимальнее или на периферии рака, раковой соседней ткани, соседней неопухолевой ткани или нормальной соседней ткани). Определение того, что биологический образец содержит клетки, экспрессирующие CD39 (например, заметно экспрессирующие; экспрессирующие CD39 на высоком уровне, высокая интенсивность окрашивания антителом против CD39 по сравнению с эталонной, например здоровой тканью), указывает на то, что у пациента есть рак, который может иметь сильную пользу от лечения агентом, ингибирующим CD39. В одном варианте реализации способ включает определение

10 уровня экспрессии нуклеиновой кислоты CD39 или полипептида в биологическом образце и сравнение этого уровня с эталонным уровнем, соответствующим здоровому индивидууму (например, здоровой ткани). Определение того, что биологический образец содержит белок pCD39 и/или клетки, экспрессирующие CD39 нуклеиновую кислоту или полипептид на уровне, который повышен по сравнению с референсным

15 уровнем, указывает на то, что у пациента имеется рак, который можно успешно лечить с помощью антитела к CD39 согласно настоящему изобретению. В одном варианте реализации обнаружение полипептида CD39 в биологическом образце включает обнаружение растворимого внеклеточного белка CD39. В одном варианте реализации обнаружение полипептида CD39 в биологическом образце включает обнаружение

20 полипептида CD39, экспрессируемого на поверхности злокачественной клетки, CD4-T-клетки, CD8-T-клетки, TReg-клетки, B-клетки. В одном варианте реализации определение того, что биологический образец содержит клетки, которые заметно экспрессируют нуклеиновую кислоту или полипептид CD39, указывает на то, что у пациентов имеется рак, который можно успешно лечить с помощью антитела к CD39

25 согласно настоящему изобретению. "Явно выраженный", когда речь идет о полипептиде CD39, означает, что полипептид CD39 экспрессируется в значительном количестве клеток, взятых у данного пациента. Хотя определение термина "явно выраженный" не связано точным процентным значением, в некоторых примерах рецептор, о котором говорят, что он "явно выражен", будет присутствовать по

30 меньшей мере на 10%, 20% 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, или больше опухолевых клеток, взятых у пациента.

35

Определение того, есть ли у индивидуума рак, характеризующийся клетками, которые экспрессируют полипептид CD39, может, например, включать получение биологического образца (например, посредством выполнения биопсии) от индивидуума, который содержит клетки из окружающей среды рака (например, опухоли или ткани, прилегающей к опухоли), приведение указанных клеток в контакт с антителом, связывающим полипептид CD39, и определение того, экспрессируют ли клетки CD39 на своей поверхности. Необязательно, определение того, есть ли у индивидуума клетки, экспрессирующие CD39, включает проведение иммуногистохимического анализа.

В одном варианте реализации антитела против CD39, описанные в настоящей заявке, могут быть использованы преимущественно для лечения рака, который представляет собой CD73-положительный рак. Экспрессия CD73 была зарегистрирована в ряде опухолевых клеток, включая, среди прочего, лейкемию, рак мочевого пузыря, глиому, глиобластому, рак яичников, меланому, рак предстательной железы, рак щитовидной железы, рак пищевода и рак молочной железы. Экспрессия CD73 также была связана с прометастатическим фенотипом при меланоме и раке молочной железы.

Соответственно, предложен способ лечения или профилактики рака или инфекционного заболевания у индивидуума, имеющего CD73-положительный рак, способ, включающий введение индивидууму антитела против CD39 или фрагмента антитела согласно настоящему изобретению. В одном варианте реализации изобретения предложен способ лечения или профилактики CD73-положительного рака у индивидуума, включающий: введение индивидууму антитела согласно настоящему изобретению, которое связывает и ингибирует активность растворимого белка CD39 человека. В одном варианте реализации CD73-положительный рак представляет собой рак, который, как известно, обычно характеризуется присутствием CD73-экспрессирующих клеток в опухоли или окружении опухоли.

Пациент, имеющий рак, может получать лечение антителом против CD39 с или без предварительного этапа обнаружения 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 стадию обнаружения нуклеиновой кислоты CD73 или полипептида в биологическом образце опухоли от индивидуума (например, в раковой ткани, ткани проксимальнее или на периферии рака, раковой соседней ткани, соседней неопухолевой ткани или нормальной соседней ткани). Определение того, что биологический образец содержит клетки, экспрессирующие CD73 (например, заметно экспрессирующие;

экспрессирующие CD73 на высоком уровне, высокая интенсивность окрашивания антителом против CD73, по сравнению с эталонной, например здоровой тканью), указывает на то, что у пациента есть рак, который может иметь сильную пользу от лечения агентом, ингибирующим pCD39 (необязательно также в комбинации с агентом, ингибирующим CD73). В одном варианте реализации способ включает определение уровня экспрессии нуклеиновой кислоты или полипептида CD73 в биологическом образце и сравнение этого уровня с эталонным уровнем, соответствующим, например, здоровому индивидууму (например, здоровой ткани). Определение того, что биологический образец содержит клетки, экспрессирующие CD73 нуклеиновую кислоту или полипептид на уровне, который повышен по сравнению с контрольным уровнем, указывает на то, что у пациента есть рак, который можно лечить с помощью антитела против CD39. Необязательно, обнаружение полипептида CD73 в биологическом образце включает обнаружение полипептида CD73, экспрессируемого на поверхности злокачественной клетки, CD4-T-клетки, CD8-T-клетки, В-клетки. В одном варианте реализации определение того, что биологический образец содержит клетки, экспрессирующие CD73 нуклеиновую кислоту или полипептид, указывает на то, что у пациентов имеется рак, который может получить особую пользу от лечения антителом против CD39. Полипептид CD73 может, например, экспрессироваться в значительном количестве клеток, взятых у данного пациента, например, CD73 может быть обнаружен по меньшей мере на 10%, 20% 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, или больше опухолевых клеток, взятых у пациента.

Определение того, имеет ли индивидуум рак, характеризующийся клетками, экспрессирующими полипептид CD73, может, например, включать получение биологического образца (например, посредством выполнения биопсии) от индивидуума, содержащего клетки из раковой среды (например, опухоль или прилегающая к опухоли ткань), приведение указанных клеток в контакт с антителом, связывающим полипептид CD73, и обнаружение того, экспрессируют ли клетки CD73 на своей поверхности. Необязательно, определение или обнаружение наличия у индивидуума клеток, экспрессирующих CD73, включает проведение иммуногистохимического анализа.

В одном варианте реализации изобретения предложен способ лечения или профилактики рака у индивидуума, нуждающегося в этом, причем способ включает:

а) обнаружение CD73-экспрессирующих клеток в окружении опухоли, необязательно внутри опухоли и/или в прилегающей ткани, и

б) при определении содержания в окружении опухоли CD73-экспрессирующих клеток, необязательно на уровне, который повышен по сравнению с референсным

уровнем (например, уровнем наблюдаемой здоровой ткани), вводят индивидууму антитело согласно настоящему изобретению, которое связывает и ингибирует активность растворимого белка CD39 человека. Необязательно, обнаружение CD73-экспрессирующих клеток в окружении опухоли включает получение от индивидуума биологического образца, который содержит раковую ткань и/или ткань проксимальнее или на периферии рака (например, соседнюю раковую ткань, соседнюю неопухолевую ткань или нормальную соседнюю ткань), и обнаружение уровней CD73-экспрессирующих клеток (например, посредством проведения иммуногистохимического анализа). CD73-экспрессирующие клетки могут включать, например, опухолевые клетки, CD4-T-клетки, CD8-T-клетки, В-клетки.

Композиции антител против CD39 согласно настоящему изобретению можно применять в качестве монотерапии или комбинированном лечении с одним или более другими терапевтическими агентами, включая агенты, обычно используемые для конкретной терапевтической цели, для которой вводится антитело. Дополнительный терапевтический агент обычно вводят в количествах и схемах лечения, которые как правило применяют для этого агента в монотерапии конкретного заболевания или состояния, которое лечится.

В одном варианте реализации композиции антитела против CD39 согласно настоящему изобретению можно применять в комбинированном лечении с химиотерапевтическим агентом, способным вызывать внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток.

В одном варианте реализации нейтрализующие антитела против CD39 не связываются с CD16 человека, но потенцируют активность CD16-экспрессирующих эффекторных клеток (например, NK или эффекторных Т-клеток). Соответственно, в одном варианте реализации второй или дополнительный второй терапевтический агент представляет собой антитело или другой белок, содержащий Fc-домен способны индуцировать АЗКЦ к клетке, с которой они связаны, например, через CD16, экспрессируемый NK-клеткой. Как правило, такое второе антитело-агент или другой белок будут содержать домен, который связывается с представляющим интерес антигеном, например, антигеном, присутствующим на опухолевой клетке (опухолевый антиген), и Fc-домен или его часть, и будет демонстрировать связывание с антигеном через антигенсвязывающий домен и с Fc γ -рецепторами (например, CD16) через Fc-домен. В одном варианте реализации его активность АЗКЦ будет опосредована, по меньшей мере частично, CD16. В одном варианте реализации дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело, имеющее нативный или модифицированный Fc-домен человека, например Fc-домен человеческого IgG1 или

IgG3-антитела. Термин "антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" или "АЗКЦ" является термином, хорошо известным в данной области техники, и относится к клеточно-опосредованной реакции, при которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы (FcRs), распознают связанное антитело на клетке-мишени и впоследствии вызывают лизис клетки-мишени. Неспецифические цитотоксические клетки, опосредующие АЗКЦ, включают натуральные клетки-киллеры (NK), макрофаги, моноциты, нейтрофилы и эозинофилы. Термин "АЗКЦ-индуцирующее антитело" относится к антителу, которое демонстрирует АЗКЦ, измеренное с помощью анализа(ов), известного специалистам в данной области. Такая активность обычно характеризуется связыванием области Fc с различными FcRs. Не будучи ограниченным каким-либо конкретным механизмом, специалисты в данной области признают, что способность антитела демонстрировать АЗКЦ может быть, например, в силу его подкласса (такого как IgG1 или IgG3), мутаций, введенных в Fc-область, или в силу модификаций углеводных паттернов в Fc-области антитела. Примеры антител, индуцирующих АЗКЦ, включают ритуксимаб (для лечения лимфом, ХЛЛ, трастузумаб (для лечения рака молочной железы), алемтузумаб (для лечения хронического лимфолейкоза) и цетуксимаб (для лечения колоректального рака, плоскоклеточного рака головы и шеи). Примеры антител, с усиленным АЗКЦ, включают, но не ограничиваются ими: GA-101 (гипофукозилированная молекула против CD20), маргетуксимаб (молекула против HER2 с усилением Fc), меполизумаб, MEDI-551 (молекула против CD19, сконструированная с помощью Fc), обинутузумаб (созданная на основе гликозилин-инженерии/гипофукозуилированный молекула против CD20), окаратузумаб (Fc-сконструированная молекула против CD20), XmAb®5574/MOR208 (Fc-сконструированная молекула против CD19).

В одном варианте реализации нейтрализующие антитела против CD39 увеличивают эффективность агентов, которые нейтрализуют ингибирующую активность PD-1 человека, например, которые ингибируют взаимодействие между PD-1 и PD-L1, особенно у индивидуумов, которые плохо реагируют на (или не чувствительны) лечению агентом, который нейтрализует ингибирующую активность PD-1 человека. Соответственно, в одном варианте реализации второй или дополнительный второй терапевтический агент представляет собой антитело или другой агент, который нейтрализует ингибирующую активность PD-1 человека.

Белок программируемой клеточной гибели 1 (PD-1) (также называемый "белок программируемой клеточной смерти 1") является членом семейства рецепторов CD28 с ингибиторными свойствами. Полную последовательность PD-1 человека можно найти в GenBank под регистрационным номером U64863. Ингибирование или

нейтрализация ингибирующей активности PD-1 может включать применение полипептидного агента (например, антитела, полипептида, слитого с Fc-доменом, иммуноадгезина и т.д.), который предотвращает индуцированную PD-L1 передачу сигнала PD-1. В настоящее время существует по меньшей мере шесть агентов, блокирующих путь PD-1/PD-L1, которые выведены на рынок или проходят клиническую оценку. Один из агентов представляет собой BMS-936558 (Nivolumab/ONO-4538, Bristol - Myers Squibb; ранее MDX-1106). Ниволумаб (торговое название Opdivo®), является полностью одобренным FDA человеческим IgG4 mAb против PD-L1, который ингибирует связывание лиганда PD-L1 как с PD-1, так и с CD80, и описан как антитело 5C4 в WO 2006/121168, раскрытие которого включено в настоящей заявке посредством ссылки. Для пациентов с меланомой наиболее значимый OR наблюдался в дозе 3 мг/кг, в то время как для других типов рака он составлял 10 мг/кг. Ниволумаб обычно вводят в дозе 10 мг/кг каждые 3 недели до прогрессирования рака. Термины "снижает ингибирующую активность PD-1 человека", "нейтрализует PD-1" или "нейтрализует ингибирующую активность PD-1 человека" относятся к процессу, отличающемуся тем, что PD-1 ингибируется в своей способности к передаче сигнала в результате взаимодействия PD-1 с одним или более его связывающими партнерами, такими как PD-L1 или PD-L2. Агент, нейтрализующий ингибирующую активность PD-1, уменьшает, блокирует, ингибирует, отменяет или препятствует передаче сигнала, возникающего в результате взаимодействия PD-1 с одним или более его связывающими партнерами, такими как PD-L1, PD-L2. Такой агент может, таким образом, уменьшить отрицательный ко-стимулирующий сигнал, опосредованный белками клеточной поверхности или через них, экспрессируемыми на Т-лимфоцитах, чтобы усилить эффекторные функции Т-клеток, такие как пролиферация, продукция цитокинов и/или цитотоксичность.

МК-3475 (человеческое IgG4 mAb против PD-L1 от Merck), также называемый ламбролизумабом или пембролизумабом (торговое название Keytruda®), было одобрено FDA для лечения меланомы и проходит тестирование на других видах рака. Пембролизумаб тестировали в дозе 2 мг/кг или 10 мг/кг каждые 2 или 3 недели до прогрессирования заболевания. МК-3475, также известный как Merck 3745 или SCH-900475, также описан в WO2009/114335.

MPDL3280A/RG7446 (atezolizumab, торговое наименование Tecentriq™, молекула против PD-L1 от компании Roche/компания Genentech) представляет собой mAb против PD-L1 человека, которое содержит сконструированный Fc домен, предназначенный для оптимизации эффективности и безопасности за счет минимизации связывания FcγR и как следствие антитело-зависимой клеточной

цитотоксичности (АЗКЦ). Дозы ≤ 1 , 10, 15 и 25 мг/кг MPDL3280A вводили каждые 3 недели в течение 1 года. В фазе 3 исследования MPDL3280A вводят в дозе 1200 мг посредством внутривенной инфузии каждые три недели при НМПЛ.

5 AMP-224 (Amplimmune и GSK) - это иммуноадгезин, содержащий внеклеточный домен PD-L2, слитый с Fc-доменом. Другие примеры агентов, нейтрализующих PD-1, могут включать антитело, которое связывает PD-L2 (антитело против PD-L2) и блокирует взаимодействие между PD-1 и PD-L2.

10 Пидлизумаб (CT-011; CureTech) (гуманизированное mAb против PD1 IgG1 от CureTech/Teva), пидлизумаб (CT-011; CureTech) (см., например, WO2009/101611) представляет собой другой пример; препарат тестировали на тридцати пациентах с рецидивом ФЛ, чувствительным к ритуксимабу, которым вводили 3 мг/кг внутривенно CT-011 каждые 4 недели в течение 4 инфузий в комбинации с ритуксимабом в дозе 375 мг/м² еженедельно в течение 4 недель, начиная с 2 недель после первой инфузии CT-011.

15 Другие известные антитела к PD-1 и другие ингибиторы PD-1 включают AMP-224 (слитый белок B7-DC/IgG1, лицензированный GSK), AMP-514, описанный в WO 2012/145493, антитело MEDI-4736 (дурвалумаб, торговое название Imfinzi™, молекула против PD-L1, разработанное AstraZeneca/Medimmune), описанное в WO2011/066389 и US2013/034559, антитело YW243.55.S70 (молекула против PD-L1), описанное в
20 WO2010/077634, MDX-1105, также известное как BMS-936559, представляет собой антитело против PD-L1, разработанное Bristol-Myers Squibb, описанное в WO2007/005874, и антитела и ингибиторы, описанные в WO2006/121168, WO2009/014708, WO2009/114335 и WO2013/019906, раскрытия которых включены сюда посредством ссылки. Другие примеры антител против PD-L1 раскрыты в
25 WO2015/085847 (Shanghai Hengrui Pharmaceutical Co. Ltd.), например антитела, имеющие CDR1, 2 и 3 переменного домена легкой цепи SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и/или SEQ ID NO: 8 соответственно, и антитела с CDR1, 2 и 3 переменного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 соответственно, причем ссылки на SEQ ID NO представляют собой нумерацию в соответствии с
30 WO2015/085847, раскрытие которой включено в настоящую заявку посредством ссылки. Также могут быть использованы антитела, конкурирующие с любым из таких антител за связывание с PD-1 или PD-L1.

35 В некоторых вариантах реализации нейтрализующий PD-1 агент представляет собой mAb против PD-L1, которое ингибирует связывание PD-L1 с PD-1. В некоторых вариантах реализации нейтрализующий PD-1 агент представляет собой mAb против PD-L1, которое ингибирует связывание PD-1 с PD-L1. В некоторых вариантах

реализации нейтрализующий PD-1 агент представляет собой иммуноадгезин (например, иммуноадгезин, содержащий внеклеточную или PD-1 связывающую часть PD-L1 или PD-L2, слитую с константной областью (например, Fc-областью последовательности иммуноглобулина).

5 В способах лечения антитело против CD39 и второй терапевтический агент могут вводиться отдельно, совместно или последовательно, или в коктейле. В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающее соединение вводят до введения второго терапевтического агента. Например, антитело против CD39 может быть введено приблизительно за 0-30 дней до введения второго терапевтического

10 агента. В некоторых вариантах реализации антитело против CD39 вводят приблизительно от 30 минут до приблизительно 2 недель, приблизительно от 30 минут до приблизительно 1 недели, приблизительно от 1 часа до приблизительно 2 часов, приблизительно от 2 часов до приблизительно 4 часов, приблизительно от 4 часов до приблизительно 6 часов, приблизительно от 6 часов до приблизительно 8 часов,

15 приблизительно от 8 часов до 1 дня или приблизительно от 1 до 5 дней до введения второго терапевтического агента. В некоторых вариантах реализации антитело против CD39 вводят одновременно с введением второго терапевтического агента. В некоторых вариантах реализации антитело против CD39 вводят после введения второго терапевтического агента. Например, антитело против CD39 может быть

20 введено приблизительно через 0-30 дней после введения второго терапевтического агента. В некоторых вариантах реализации антитело против CD39 вводят приблизительно от 30 минут до приблизительно 2 недель, приблизительно от 30 минут до приблизительно 1 недели, приблизительно от 1 часа до приблизительно 2 часов, приблизительно от 2 часов до приблизительно 4 часов, приблизительно от 4 часов до

25 приблизительно 6 часов, приблизительно от 6 часов до приблизительно 8 часов, приблизительно от 8 часов до 1 дня или приблизительно от 1 до 5 дней после введения второго терапевтического агента.

Примеры

30 Способы

Генерация мутантов CD39

Мутанты CD39 получали способом ПЦР. Амплифицированные последовательности анализировали на агарозном геле и очищали с помощью набора

35 Macherey Nagel PCR Clean-Up Gel Extraction kit (референс 740609). Очищенные продукты ПЦР, полученные для каждого мутанта, затем лигировали в экспрессионный

вектор с помощью системы ClonTech InFusion. Векторы, содержащие мутантные последовательности готовили как Miniprep и секвенировали. После секвенирования векторы, содержащие мутантные последовательности, готовили в виде Midiprep с использованием Promega PureYield™ Plasmid Midiprep System. Клетки HEK293T выращивали в среде DMEM (Invitrogen), трансфицировали векторами с использованием Липофектамина Invitrogen 2000 и инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 48 часов перед тестированием на экспрессию трансгена. Мутанты трансфицировали в клетки Нек-293Т, как показано в таблице ниже. Целевые мутации аминокислот в Таблице 1 ниже показаны с использованием нумерации SEQ ID NO: 1.

Таблица 1

Мутан m	Замены					
1			Q444	G445		
	V77G	H79Q	K	D		
2A	V81S	E82A	R111A	V115A		
2B	E110A	R113T	E114A			
3			Q120	Q122		
	R118A	S119A	K	H	E123A	
4	D150A	E153S	R154A	S157K	N158A	L278F
5	Q96A	N99A	E143A	R147E		
6	K188P	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					Вставка	
	N371K	L372K	E375A	K376G	377V	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		

Клонирование, производство и очистка растворимого huCD39

Молекулярная Биология

5 Белок huCD39 клонировали из кДНК МКПК человека с использованием
 следующих праймеров
 TACGACTCACAAGCTTGCCGCCACCATGGAAGATACAAAGGAGTC (SEQ ID NO: 41)
 (прямой) и CCGCCCCGACTCTAGATCACTTGTCTCTCT
 TTGTAATCGACATAGGTGGAGGAGAGAG (SEQ ID NO: 42) (обратный). Очищенный
 10 продукт ПЦР затем клонировали в экспрессионный вектор с использованием системы
 инфузионного клонирования. Метку M2 (FLAG-метка, подчеркнутая в SEQ ID NO: 44)
 добавляли в С-концевую часть белка для стадии очистки; следует понимать, что белок
 внеклеточного домена CD39 (например, SEQ ID NO: 44) может в любом варианте
 реализации необязательно указываться без метки M2.

15 *Экспрессия и очистка белков huCD39*

После валидации клонированной последовательности клетки CHO подвергали
 нуклеофекции, а затем продуцирующий пул субклонировали для получения
 клеточного клона, продуцирующего белок huCD39. Супернатант от клона huCD39,
 выращенного в роллерных флаконах, собирали и очищали с использованием
 20 хроматографической колонки M2 и элюировали с использованием пептида M2. Затем
 очищенные белки загружали на хроматографическую колонку размера S200.
 Очищенный белок, соответствующий мономеру, готовили в буфере ТБС pH 7,5.
 Аминокислотная последовательность внеклеточного домена рекомбинантного белка
 CD39-M2 без метки M2 была следующей:

25 MEDTKESNVKTFCSKNILAILGFSSIIAVIALLAVGLTQNKALPENVKYGIVLDAGSSHTSLYIY
 KWPAEKENDTGVVHQVEECRVKGPISKFVQKVNEIGIYLTDCMERAREVIPRSQHQETPV
 YLGATAGMRLLRMESEELADRVLVDVVERSLSNYPDFDQGARIIITGQEEGAYGWITINYLLGK
 FSQKTRWFSIVPYETNNQETFGALDLGGASTQVTFVPQNQTIESPDNALQFRLYGKDYNVY
 THSFLCYGKDQALWQKLAQDIQVASNEILRDPCHFPGYKKVVNVSDLYKTPCTKRFEMTLP
 30 FQQFEIQGIGNYQQCHQSILELFNTSYCPYSQCAFNGIFLPPQLQGDFGAFSAFYFVMKFLNL
 TSEKVSQEKVTEMMKKFCAQPWEEIKTSYAGVKEKYLSEYCFSGTYILSLLLQGYHFTADS
 WEHIFIGIKIQGSDAGWTLGYMLNLTNMIPAEQPLSTPLSHSTYV
 (SEQ ID NO: 43).

35 Конечная аминокислотная последовательность внеклеточного домена
 рекомбинантного белка CD39-M2 с меткой M2 была следующей:

MEDTKESNVKTFCSKNILAILGFSSIIAVIALAVGLTQNKALPENVKYGIVLDAGSSHTSLYIY
KWPAEKENDTGVVHQVEECRVKGPISKVQVNEIGIYLTDCMERAREVIPRSQHQETPV
YLGATAGMRLLRMESEELADRVLDDVVERSLSNYPDFDQGARIIITGQEEGAYGWITINYLLGK
FSQKTRWFSIVPYETNNQETFGALDLGGASTQVTFVPQNQTIESPDNALQFRLYGKDYNVY
5 THSFLCYGKDQALWQKLAQDIQVASNEILRDPCFHPGYKKVVNVSDLYKTPCTKRFEMTLP
FQQFEIQGIGNYQQCHQSILELNFNTSYCPYSQCAFNGIFLPLQGDFGAFSAFYFVMKFLNL
TSEKVSQEKVTEMMKKFCAQPWEEIKTSYAGVKEKYLSEYCFSGTYILSLLLQGYHFTADS
WEHIFIGKIQGSDAGWTLGYMLNLTNMIPAEQPLSTPLSHSTYVDYKDDDDK
(SEQ ID NO: 44).

10

Ингибирование ферментативной активности растворимого CD39

Ингибирование антителами ферментативной активности продуцируемого растворимого белка CD39 оценивали с помощью Cell Titer Glo™ (Promega, референс G7571), позволяющего оценить гидролиз АТФ с помощью реагента, генерирующего люминесцентный сигнал, пропорциональный количеству присутствующего АТФ. Таким образом можно оценить ингибирование опосредованного растворимыми 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 человека CD39, имеющего аминокислотную последовательность, описанную в разделе способы (SEQ ID NO: 44), в течение 1 ч при 37°C. 20 мкМ АТФ добавляли к планшетах в течение 30 дополнительных минут при 37°C перед добавлением реагента CTG (Cell Titer Glo). Излучаемый свет количественно определяли с помощью люминометра Enspire™ после короткого инкубационного периода в 5 мин в темноте. Эффективность антител против CD39 определяли путем сравнения испускаемого света в присутствии антитела только с АТФ (максимальное световое излучение) и АТФ совместно с растворимым белком CD39 (минимальное световое излучение).

25

Ингибирование ферментативной активности клеточного CD39

Ингибирование ферментативной активности CD39 в CD39-экспрессирующих клетках антителами оценивали с помощью Cell Titer Glo™ (Promega, референс G7571), позволяющего оценить гидролиз АТФ с помощью реагента, генерирующего люминесцентный сигнал, пропорциональный количеству присутствующего АТФ. Таким образом, анализ разрабатывали так, чтобы он позволял оценить ингибирование АТФ, гидролизованного CD39 в супернатанте клеточной культуры. Вкратце, 5×10^4 человеческих клеток лимфомы Ramos, 5×10^3 клеток CHO, экспрессирующих CD39 человека, CD39 макака и мышинный CD39, инкубировали 1 час при 37°C с от 30 мкг/мл

35

до 5×10^{-4} мкг/мл антител против CD39. Затем клетки инкубировали с 20 мкМ АТФ в течение 1 дополнительного часа при 37°C. Планшеты центрифугировали в течение 2 мин при 400g и 50 мкл клеточного супернатанта переносили в люминесцентный микропланшет (белые лунки). 50 мкл реагента CellTiter-Glo™ (CTG) добавляли к супернатанту и количественно определяли излучаемый свет после 5-минутной инкубации в темноте с помощью люминометра Enspire™. Эффективность антител против CD39 определяли путем сравнения излучаемого света в присутствии антитела только с АТФ (максимальное излучение света) и АТФ совместно с клетками (минимальное излучение света).

Генерация антител: иммунизация и скрининг на мышах

Для получения антител к CD39 человека, мышей Balb/c иммунизировали внеклеточным доменом рекомбинантного белка CD39-М человека, описанным выше. Мыши получали одну первичную иммунизацию эмульсией 50 мкг белка CD39 и полным адъювантом Фрейнда внутрибрюшинно, 2-ю иммунизацию эмульсией 50 мкг белка CD39 и неполным адъювантом Фрейнда внутрибрюшинно и, наконец, повышенную дозу 10 мкг белка CD39 внутривенно. Иммунные клетки селезенки сливали через 3 дня после иммортализованных В-клеток X63.Ag8.653 и культивировали в присутствии облученных клеток селезенки. Гибридомы высевали в полутвердую метилцеллюлозо-содержащую среду и выращенные клоны отбирали с помощью аппарата Clonepix™ 2 (Molecular Devices Corp).

Пример 1: Эпитопное картирование известных нейтрализующих CD39 mAb

Чтобы получить представление о том, как антитела, способные ингибировать ферментативную (АТФазную) активность клеточного CD39, авторы изобретения исследовали эпитопы, связанные антителами, которые, как сообщалось, ингибируют АТФазную активность CD39 в клеточных анализах: BY40 раскрыто в публикации PCT no. WO2009/095478.

Чтобы определить эпитопы антител против CD39, авторы изобретения разработали мутанты CD39, определяемые заменами аминокислот, экспонированных на молекулярной поверхности над поверхностью CD39. Мутанты трансфицировали в клетки Нек-293Т, как показано в Таблице 1, с использованием нумерации SEQ ID NO: 1.

Диапазоны доз I-394 (10 – 2.5 – 0.625 – 0.1563 – 0.0391 – 0.0098 – 0.0024 – 0.0006 мкг/мл) тестировали на 20 сгенерированных мутантах способом проточной цитометрии. Антитела BY40 имели полную потерю связывания с клетками,

экспрессирующими мутант 5 CD39, без потери связывания с любым другим мутантом. Мутант 5 содержит аминокислотные замены в остатках Q96, N99, E143 и R147. Положение мутанта 5 на поверхности CD39 показано на **Фигуре 3А**.

5 **Пример 2: Известные нейтрализующие моноклональные антитела к CD39 не способны ингибировать АТФазную активность рекомбинантного растворимого белка CD39.**

10 Два антитела, которые, как сообщалось, ингибируют АТФазную активность CD39 в клеточных анализах (BY40 и BY12), оценивали, чтобы определить, способны ли они ингибировать АТФазную активность рекомбинантного растворимого белка CD39. Ингибирование антителами ферментативной активности растворимого белка CD39, продуцируемого описанным выше способом, оценивали с помощью Cell Titer Glo™ (Promega, референс G7571). Ингибирование антителами ферментативной активности клеточного белка CD39 оценивали, как указано выше.

15 Как и ожидалось, BY40 ингибировал АТФазную активность белка CD39 в клетках. Однако, BY40 был не в состоянии ингибировать ферментативную активность растворимого белка CD39. **На Фигуре 2В** показано сравнение BY40 с новыми антителами, идентифицированными в настоящей заявке.

20 **Пример 3: Скрининг новых mAb для блокирования активности pCD39**

Проводили серию иммунизаций с целью поиска антител, нейтрализующих АТФазную активность pCD39. Для получения антител к антителу к CD39 человека животных иммунизировали рекомбинантным внеклеточным доменом рекомбинантного CD39-M2 человека, описанным выше. В общей сложности серия иммунизаций
25 включала различные протоколы и у разных животных, включая различные штаммы мышей, крыс и кроликов.

В первоначальных протоколах иммунизации первичный скрининг включал тестирование супернатанта (СН) растущих клонов способом проточной цитометрии с использованием клеточных линий CHO дикого типа и CHO, экспрессирующих huCD39.
30 Клетки окрашивали 0,1 мкМ и 0,005 мкМ CFSE соответственно. Для скрининга проточной цитометрией все клетки смешивали одинаково, и наличие реагирующих антител в супернатантах выявляли с помощью поликлонального антитела козы против антитела мыши (pAb), меченного APC. Для антител, связывающих huCD39, супернатанты затем подвергали скринингу на ингибирование ферментативной
35 активности растворимого CD39 с использованием скринингового анализа, разработанного и описанного выше (Способы).

Результаты показали, что в то время как можно получить многочисленные специфичные CD39-связывающие антитела, ни одно из антител ни от одной из таких иммунизаций не показало какого-либо ингибирования ферментативной активности растворимого CD39. Одна из возможностей заключается в том, что доминантные эпитопы на CD39 не содержат никаких эпитопов, подходящим образом расположенных на этом каталитическом сайте CD39 или вблизи него. Ввиду немногочисленности доступных антител, ингибирующих клеточный CD39, и известных трудностей ингибирования каталитических сайтов ферментов с помощью антител, отсутствие антител, нейтрализующих рCD39, может указывать на невозможность получения антител, ингибирующих растворимый (внеклеточный домен) CD39. Другие возможности связаны с нефункциональными скрининговыми анализами и/или неправильно уложенным или функционирующим растворимым белком CD39, особенно с учетом того, что отсутствие какого-либо антитела, которое может ингибировать растворимый CD39, препятствует валидации анализов блокады рCD39.

Ввиду отсутствия антител, способных ингибировать растворимый CD39, проводили дальнейшую иммунизацию с использованием протокола скрининга, разработанного в пользу генерации антител, которые связывают активный сайт CD39, идентифицированный эпитопом антитела BY40. Вкратце, первичный скрининг включал тестирование супернатанта (СН) растущих клонов способом проточной цитометрии с использованием СНО дикого типа и клеточных линий СНО, экспрессирующих huCD39, как и в предыдущих иммунизациях, с последующим скринингом на потерю связывания клеток Нек-293Т, экспрессирующих мутант CD39 5, по сравнению с диким типом CD39, как показано в Таблице 1. Мутант 5 имеет замены в остатках Q96, N99, E143 и R147. Однако опять же результаты показали, что, хотя можно было получить множество специфичных CD39-связывающих антител, которые показали потерю связывания с мутантом 5, ни одно из антител ни от одной из первоначальных иммунизаций не показало какого-либо ингибирования ферментативной активности растворимого CD39.

Пример 4: Идентификация антитела I-394

Мы стремились идентифицировать антитела против CD39, которые не связывают область Q96, N99, E143 и R147 (определяемую мутантом 5), чтобы иметь антитела, которые не конкурируют с BY40-подобными антителами. Такие антитела, которые не должны обладать какой-либо способностью блокировать АТФазную активность CD39, могут быть полезны для фармакологических исследований антител, ингибирующих клеточный CD39, который связывается с сайтом связывания BY40, например, для обнаружения и количественного определения свободных белков CD39

на клетках в присутствии BY40 или by40-подобных антител, которые ингибируют клеточный CD39.

Исходя из результатов иммунизации Примера 3, в котором гибридомы скринировали на предмет потери связывания с мутантом CD39 5, выбрали гибридому, которая не была среди тех, которые показали потерю связывания с мутантом CD39 5. Эта гибридома (I-394) входила в более широкий пул из-за неубедительных данных, указывающих на возможное частичное снижение связывания с мутантом 5, но не теряла связывания с мутантом 5 и поэтому изначально не сохранялась.

В контексте продолжающегося скрининга супернатантов от дальнейших иммунизаций на предмет ингибирования ферментативной активности растворимого CD39 в качестве контроля включали клонированное и продуцированное антитело I-394. Удивительно, но, несмотря на то, что антитела I-394 не было среди клонов, сохраненных в эпитопно-направленном скрининге, это антитело показало сильное ингибирование ферментативной активности растворимого CD39 в анализе, описанном выше (способы).

I-394 получали с константными областями изотипа IgG1 человека, с модифицированным Fc-доменом, имеющим мутации L234A/L235E/G237A/A330S/P331S (нумерация согласно Кабату EC), что привело к отсутствию связывания с FCY-рецепторами CD16A, CD16B, CD32A, CD32B и CD64 человека, вкратце, последовательности VH и Vk антитела I-394 (вариабельные области VH и Vk показаны в SEQ ID NO: 6 и 7 соответственно) клонировали в векторы экспрессии, содержащие константные домены hulgG1, содержащие указанные мутации, и константный домен huCk соответственно. Два полученных вектора совместно трансфицировали в клетки линии CHO. Созданный пул клеток использовали для того чтобы произвести антитела в среде CHO. Затем антитело очищали с помощью белка А. Аминокислотные последовательности соответствующих вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей I-394 показаны ниже (CDR согласно Кабату подчеркнуты).

Последовательность вариабельного домена тяжелой цепи I-394:
 EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT**DYNMH**WVKQSHGRTLEWIGY**YIVPLN**GGSTF
NQKFKGRATLTVNTSSRTAYMELRSLTSEDSAAYYCARG**GGTRFAY**WGQGLVTVSA (SEQ ID NO: 6).

Последовательность вариабельного домена легкой цепи I-394:

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNFGVSMFYWFQQKPGQPPNLLIYGASNQGS
V
P
R
F
R
G
S
G
S
G
T
D
F
S
L
N
I
H
P
M
E
A
D
D
T
A
M
Y
F
C
Q
Q
T
K
E
V
P
Y
T
F
G
G
G
T
K
L
E
I
K (SEQ ID NO:
7).

Затем антитело I-394 тестировали на предмет потери связывания с мутантами CD39, определяемого заменами аминокислот, экспонированных на молекулярной поверхности над поверхностью CD39. Мутанты трансфицировали в клетки Нек-293Т, как показано в Таблице 1 с использованием нумерации SEQ ID NO: 1. Диапазоны доз антител I-394 тестировали на 20 мутантах способом проточной цитометрии. Как показано на **Фигуре 3В**, I-394 показал полную потерю связывания с клетками, экспрессирующими мутантный 19 из CD39. Мутант 19 содержит замены в остатках R138, M139 и E142. Таким образом, основной эпитоп I-394 содержит один или более (или все) из остатков R138, M139 и E142.

В отличие от предшествующего антитела BY40, которое теряет связывание с мутантом 5 и обладает способностью ингибировать клеточный CD39, но не растворимый CD39, антитело I-394 теряет связывание с соседним мутантом 19, с сильно сниженным связыванием с мутантом 5 (но с некоторым остаточным связыванием с мутантом 5). Интересно, что остатки мутанта 19 находятся в непосредственной близости или рядом с остатками мутанта 5, так что I-394 может представлять собой сдвиг в эпитопе по сравнению с BY40. Таким образом, антитело I-394 представляет собой ценный новый эпитоп для антител против CD39, который позволяет ингибировать АТФазную активность растворимого белка CD39. Он также обеспечивал специфичный положительный контроль, который позволяет валидировать и тестировать скрининговые анализы для обнаружения дальнейших антител, нейтрализующих АТФазную активность растворимого белка CD39.

Пример 5: Неэпитопно-направленный скрининг моноклональных антител, нейтрализующих рCD39

На основании результатов Примера 4, указывающих на возможность опосредованного антителами ингибирования растворимого CD39, слияния из разных иммунизаций с использованием различных протоколов из Примера 3 пересматривали для поиска антител, которые нейтрализуют АТФазную активность рCD39.

Затем оценивали различные подходы к скринингу на предмет ингибирования АТФазы. В одном эксперименте антитело I-394 использовали для добавления супернатантов из гибридом иммунизации Примера 3, которые оказались отрицательными по способности ингибировать АТФазную активность растворимого CD39. Это добавление I-394 к супернатанту не восстанавливало способность

отрицательных супернатантов ингибировать АТФазную активность CD39. Затем антитело I-394 очищали из отрицательного супернатанта с использованием гранул, покрытых белком А, и авторы изобретения наблюдали, что очищенный I-394 снова был способен ингибировать активность АТФазы.

5 Ввиду вышеизложенных результатов, разрабатывали новые протоколы иммунизации и скрининга, в которых растущие клоны от новых и прошлых иммунизаций подвергали скринингу с помощью проточной цитометрии с использованием клеточных линий СНО, экспрессирующих huCD39, и СНО дикого типа, без оценки ингибирования активности растворимых CD39 или клеточной CD39
10 АТФазы и без систематической ошибки скрининга на эпитопы. В то время как данные о потере связывания с мутантом 5 или 19 были доступны для некоторых гибридом, такие данные не использовали для отбора клонов, а сохраняли только для целей сохранения гибридом для клонирования в случае отрицательных результатов анализа блокировки АТФазы. Гибридомы, связывающие CD39, отбирали и клонировали, а
15 затем очищали с использованием белка А в соответствии со следующим протоколом:

- Добавляют к 300 мкл супернатанта гибридомы 10 мкл шариков белка А
- Добавляют NaCl до конечной концентрации 1,5 М
- Вращают пробирки в течение 3-4 часов при температуре 4°C
- Центрифугируют 1 мин при 1500 об/мин
- 20 - Удаляют супернатант и выполняют три промывки 1 мл ТБС.
- Удаляют весь ТБС после третьей промывки
- Добавляют 50 мкл цитрата 0,1 М рН 3, гомогенизируют и инкубируют при комнатной температуре в течение 5 мин.
- Центрифугируют шарики в течение 1 мин при 1500 об/мин
- 25 - Собирают 50 мкл элюата и быстро добавляют 450 мкл ТБС и хранят при температуре 4°C

Полученные антитела затем подвергали сравнительному анализу на предмет способности ингибировать АТФазную активность CD39 в той же степени, что и I-394. Анализы, используемые для ингибирования ферментативной активности растворимых
30 и клеточных CD39, были описаны выше (Способы). Удивительно, но среди иллюстративных антител, полученных таким образом, несколько показали ингибирование растворимого CD39 (а также ингибирование клеточного CD39). На **Фигуре 1** показан репрезентативный результат скрининга, показывающий антитела I-397, I-398 и I-399 по сравнению с антителом I-394 положительного контроля. Точно так же антитела I-395 и I-396 от различных иммунизаций ингибировали ферментативную
35 активность растворимого белка CD39. На **Фигурах 2А и 2В** показаны результаты для

антител I-395 и I-396, для которых большее количество антител было доступно для дополнительных экспериментов как для растворимой, так и для клеточной нейтрализации CD39. На **Фигуре 2А** показано, что антитела I-395 и I-396 оба ингибируют связанный с клеточной мембраной CD39 по сравнению с антителами BY40 и I-394, причем оба антитела I-394 и I-395 демонстрируют большую эффективность и максимальное ингибирование клеточного CD39 по сравнению с BY40. На **Фигуре 2В** показано, что антитела I-395 и I-396 оба ингибируют растворимый CD39 по сравнению с BY40 и I-394 антител. В то время как BY40 не ингибирует растворимый CD39 при любой концентрации, I-394, I-395 и I-396 все ингибируют растворимый CD39, причем I-394 демонстрирует наибольшую эффективность, за ним следует I-395 и затем I-396 с более низкой эффективностью.

Полученные результаты повышают вероятность того, что фактор(ы) в супернатантах гибридомы быстро гидролизует АТФ как в культуре клеток, так и в анализе растворимого CD39, так что сигнал для АТФ не обнаруживается при скрининге антител с использованием традиционных способов. Растворимым фактором может быть CD39 или какой-либо другой фермент, например, продуцируемый партнером по слиянию.

Затем клонировали антитела с модификацией, для получения константных областей с доменом Fc IgG1 человека, имеющим мутации L234A/L235E/G237A/A330S/P331S (нумерация согласно Кабату ЕС), что приводит к отсутствию связывания с рецепторами Fcγ CD16A, CD16B, CD32A, CD32B и CD64 человека таким же образом, как показано в настоящей заявке для I-394. Полученные антитела затем могут быть подвергнуты титрованию, а затем более детальной оценке активности, как показано в Примере 7-9 (титрование, ингибирование активности АТФазы), чтобы оценить определения EC₅₀ и IC₅₀ для ранжирования антител по потенциалу.

Пример 6: эпитопное картирование нейтрализующих pCD39 mAb

Как показано в Примере 4, I-394 показал полную потерю связывания с клетками, экспрессирующими мутант 19 CD39, но не потерял связывания с мутантом 5. Чтобы определить эпитопы других антител против CD39 из примера 5, их тестировали на предмет потери связывания с панелью мутантов CD39, как описано в Примере 1 и Таблице 1. Мутанты трансфицировали в клетки Нек-293Т, как показано в Таблице 1, с использованием нумерации SEQ ID NO: 1. Диапазоны доз тестируемых антител (10 – 2,5 – 0,625 – 0,1563 – 0,0391 – 0,0098 – 0,0024 – 0,0006 мкг/мл) тестировали на 20 сгенерированных мутантах способом проточной цитометрии.

Результаты показали, что антитела, выбранные в Примере 5 по способности ингибировать растворимый CD39, представляют несколько различных эпитопов. Среди антител, которые показали ингибирование растворимого внеклеточного CD39 в Примере 5, антитело I-395 представляет собой пример антитела, которое показало потерю связывания с мутантом 5, имеющим замены в остатках Q96, N99, E143 и R147, а также потерю связывания с мутантом 19, имеющим замены в остатках R138, M139 и E142. Мутант 19 содержит замены в остатках R138, M139 и E142. Таким образом, коровый эпитоп на CD39 I-395 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, представляет собой пример антитела, которое показало потерю связывания с мутантом 19, имеющим замены в остатках R138, M139 и E142, но не имеет снижения или потери связывания с мутантом 5, имеющим замены в остатках Q96, N99, E143 и R147.

Другие антитела, которые показали ингибирование растворимого внеклеточного CD39 в Примере 5, имели очень разные эпитопы и не показали потери связывания ни с одним из мутантов 5 или 19, предполагая, что растворимый CD39 также может быть ингибирован связыванием с другими сайтами на рCD39. Для некоторых антител потеря связывания с одним из 20 мутантов Таблицы 1 позволила локализовать сайт связывания на CD39, в то время как для других сайт связывания оставался неопределенным, поскольку они не теряли связывания ни с одним из 20 мутантов. Среди антител, демонстрирующих ингибирование АТФазной активности растворимого CD39 в Примере 5, антитело I-396 показало потерю связывания с мутантом 15, имеющим замены K87A, E100A и D107A, без потери связывания с любым из других 20 мутантов. Таким образом, коровый эпитоп на CD39 этого антитела содержит один или более (или все) из остатков K87, E100 и D107. Антитело I-399 показало потерю связывания с мутантом 11, имеющим замены N371K, L372K, E375A, K376G, V377A и вставку валина между K376 и V377 (указанную в Таблице 1 как "вставка 377V"), без потери связывания с любым из других 20 мутантов. Таким образом, коровый эпитоп на CD39 этого антитела содержит один или более (или все) из остатков N371, L372, E375, K376 и V377. На **Фигуре 3А** показано положение остатков, мутировавших у мутантов 5 (M5), 15 (M15) и 19 (M19) на поверхности белка CD39. На **Фигуре 3В** показаны результаты связывания с мутантами 5, 15 и 19 различных антител.

Таким образом, полученные результаты показывают, что антитела, ингибирующие растворимый CD39, могут быть получены против различных эпитопов. Эпитопы включают эпитопы, определенные одним или более остатками мутанта 19,

которые расположены рядом с сайтом связывания ВУ40 или ВУ40-подобных антител, которые ингибируют только клеточный CD39, но не растворимый CD39 (которые теряют связывание с мутантом 5), эпитопы, которые определяются одним или более остатками мутанта 19, но также частично мутанта 5, что указывает, возможно, на меньший сдвиг по сравнению с ВУ40 или ВУ40-подобными антителами, эпитопы, определенные одним или более остатками мутанта 19, а не остатками мутанта 5, а также другие эпитопы, такие как те, которые определяются одним или более остатками мутанта 11 или одним или более остатками мутанта 15, или далее другими антителами, которые не имеют никакого пониженного связывания ни с одним из мутантов 5, 15 или 19, для которых локализация эпитопов еще не определена.

Пример 7: Титрование антител на CD39-экспрессирующих клетках способом проточной цитометрии

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

Результаты приведены на **Фигуре 4**. Антитело I-394 связывалось с клетками, экспрессирующими CD39 человека (CHO-huCD39), клетками, экспрессирующими CD39 макака (CHO-cyCD39) и клетками лимфомы Ramos, но не с клетками, экспрессирующими мышиный CD39 (CHO-moCD39). I-394 связывался с клетками Ramos со значениями EC_{50} 0,16 мкг/мл и 0,19 мкг/мл в соответствующих первой и второй сериях экспериментов. Несколько других антител против CD39 показали сопоставимые значения EC_{50} для связывания с клетками Ramos.

Пример 8: Определение IC50 для ингибирования клеточной АТФазной активности

Ингибирование антителом I-394 АТФазной активности CD39 в CD39-экспрессирующих клетках оценивали с помощью анализа, используемого для ингибирования ферментативной активности клеточного CD39, в соответствии с описанием выше (Способы).

Результаты представлены на **Фигуре 5**. I-394 обладал высокой эффективностью при блокировании ферментативной активности CD39 в опухолевых клетках (Ramos) с большей эффективностью по сравнению со всеми другими протестированными антителами. I-394 также блокировал ферментативную активность CD39 в клетках, экспрессирующих CD39 человека (CHO-huCD39), и в клетках, экспрессирующих CD39 макака (CHO-cyCD39). Клетки, экспрессирующие мышинный CD39 (CHO-moCD39), приведены в качестве отрицательного контроля. Рассчитанный IC₅₀ (ингибирование 50% ферментативной активности CD39, экспрессируемой 50 000 клетками Ramos) составляет 0,05 мкг/мл. Максимум ингибирования составил 81,6%. Контроль изотипа не имел никакого эффекта.

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

Ингибирование антителом I-394 АТФазной активности растворимого белка CD39 оценивали при помощи анализов, используемых для ингибирования ферментативной активности растворимого белка CD39, в соответствии с описанием выше (Способы). Результаты приведены на **Фигуре 6**. I-394 ингибировал ферментативную активность растворимого белка CD39. Антитело BY40 в сравнении не ингибировало ферментативную активность растворимого белка CD39. Рассчитанный IC₅₀ составляет 0,003 мкг/мл. Максимум ингибирования составил 74,9%.

Пример 10: Титрование ИФА на изоформах CD39-L1, L2, L3, L4

Антитело I-394 тестировали на предмет связывания с рекомбинантными изоформами CD39 человека (изоформами Rec-huCD39), имеющими аминокислотные последовательности, показанные ниже, покрывали в 96-луночной планшете в ФСБ 1X при 500 нг/мл или 1 мкг/мл при 4 ° C в течение ночи. Лунки промывали в ТБС-Твин 20, и дополнительно насыщали в течение 2ч при комнатной температуре в блокирующем буфере ТБС. Концентрацию первичного антитела в диапазоне доз инкубировали в блокирующем буфере ТБС в течение 2 ч при комнатной температуре. Лунки промывали в ТБС Твин 20. Вторичное антитело (GAM-HRP или GAN-HRP в блокирующем буфере ТБС) инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и выявляли с помощью ТМБ. Оптическую плотность измеряли на Enspire™ при ОП=450.

Аминокислотная последовательность клонированного huCD39 (изоформа сосудов):

CD39-L1 человека, также известный как NTPDаза2 или ENTPD2:

1 MAGKVRSLLP PLLLAAAGLA GLLLLCVPTR DVREPPALKY GIVLDAGSSH
 TSMFIYKWPA
 61 DKENDTGIVG QHSSCDVPGG GISSYADNPS GASQSLVGCL EQALQDVPKE
 RHAGTPLYLG
 5 121 ATAGMRLNL TNPEASTSVL MAVTHLTQY PFDFRGARIL SGQEEGVFGW
 VTANYLLENF
 181 IKYGWVGRWF RPRKGTGAM DLGGASTQIT FETTSPAEDR ASEVQLHLYG
 QHYRVYTHSF
 241 LCYGRDQVLQ RLLASALQTH GFHPCWPRGF STQVLLGDVY QSPCTMAQRP
 10 QNFNSSARVS
 301 LSGSSDPHLC RDLVSGLFSF SSCPFSRCSF NGVFQPPVAG NFVAFSAFFY
 TVDFLRTSMG
 361 LPVATLQQL EAAVNVCNQT WAQQLLSRGY GFDERAFGGV IFQKKAADTA
 VGWALGYMLN
 15 421 LTNLIPADPP GLRKGTDFFS WVLLLLLFAS ALLAALVLLL RQVHSAKLPS TI
 (SEQ ID NO: 2).

CD39-L2 человека, также известный как NTPДаза 6 или ENTPD6:

1 MKKGIRYETS RKTSYIFQQP QHGPWQTRMR KISNHGSLRV AKVAYPLGLC
 VGVFIYVAYI
 20 61 KWHRATATQA FFSITRAAPG ARWGQQAHS LGTAADGHEV FYGIMFDAGS
 TGTRVHVFQF
 121 TRPPRETPTL THETFKALKP GLSAYADDVE KSAQGIRELL DVAKQDIPFD
 FWKATPLVLK
 181 ATAGLRLLP EKAQKLLQKV KEVFKASPFL VGDDCVSIMN GTDEGVSAWI
 25 TINFLTGSLK
 241 TPGGSSVGML DLGGGSTQIA FLPRVEGTLQ ASPPGYLTAL RMFNRTYKLY
 SYSYLGGLM
 301 SARLAILGGV EGQPAKDGKE LVSPCLSPSF KGEWEHAEVT YRVSGQKAAA
 SLHELCAARV
 30 361 SEVLQNRVHR TEEVKHVDY AFSYYYDLAA GVGLIDAEKG GSLVVGDFEI
 AAKYVCRTLE
 421 TQPQSSPFSC MDLTYVSLLL QEFGFPRSKV LKLTRKIDNV ETSWALGAIF
 HYIDSLNRQK
 481 SPAS
 35 (SEQ ID NO: 3).

CD39-L3 человека, также известный как NTPДаза 3 или ENTPD3:

1 MFTVLTRQPC EQAGLKALYR TPTIHALVVL LVSIVLVSI TVIQIHKQEV
 LPPGLKYGIV
 40 61 LDAGSSRTTV YVYQWPAEKE NNTGWVSQTF KCSVKSGSIS SYGNNPQDVP
 RAFEECMQKV
 121 KGQVPSHLHG STPIHLGATA GMRLRLQNE TAANEVLESI QSYFKSQPFD
 FRGAQIISGQ
 181 EEGVYGWITA NYLMGNFLEK NLWHMWWHPH GVETTALDL GGASTQISFV
 AGEKMDLNTS
 45 241 DIMQVSLYGY VYTYLTHSFQ CYGRNEAEKK FLAMLLQNSP TKNHLTNPY
 PRDYSISFTM
 301 GHVFDSLCTV DQRPEYNPN DVITFEGTGD PSLCKEKVAS IFDFKACHDQ
 ETCSFDGVYQ
 361 PKIKGPFVAF AGFYITASAL NLSGSFSLDT FNSSTWNFCS QNWSQLPLLL
 50 PKFDEVYARS

421 YCFSANYIYH LFNNGYKFTE ETWPQIHFEK EVGNSSIAWS LGYMLSLTNQ
IPAESPLIRL

481 PIEPPVFGT LAFFTAAALL CLAFLAYLCS ATRRKRHSEH AFDHAVDSD
(SEQ ID NO: 4).

5 CD39-L4 человека, также известный как NTPДаза 5 или ENTPD5:

1 MATSWGTVFF MLVVSCVCSA VSHRNQQTWF EGIFLSSMCP INVSASTLYG
IMFDAGSTGT

61 RIHVYTFVQK MPGQLPILEG EVFDSVKPGL SAFVDQPKQG AETVQGLLEV
AKDSIPRSHW

10 121 KKTPVVLKAT AGLRLLPEHK AKALLFEVKE IFRKSPFLVP KGSVSIMDGS
DEGILAWWTV

181 NFLTGQLHGH RQETVGTLDL GGASTQITFL PQFEKTLEQT PRGYLTSFEM
FNSTYKLYTH

15 241 SYLGFGLKAA RLATLGALET EGTDGHTFRS ACLPRWLEAE WIFGGVKYQY
GGNQEGEVGF

301 EPCYAEVLRV VRGKLHQPEE VQRGSFYAFS YYYDRAVDTD MIDYEKGGIL
KVEDFERKAR

361 EVCDNLENFT SGSPFLCMDL SYITALLKDG FGFADSTVLQ LTKKVNNIET
GWALGATFHL

20 421 LQSLGISH
(SEQ ID NO: 5).

I-394 связывался с CD39, но не с какой-либо из изоформ CD39-L1,- L2, -L3 или
L4. Антитела контроля изотипа (IC) не связывались ни с одной молекулой CD39 или
25 CD39-L. Результаты приведены на **Фигуре 7**.

Пример 11: Активация дендритных клеток

В то время как АТФ обладает провоспалительной активностью, считается, что
CD39-опосредованный катаболизм АТФ способен нарушать активацию дендритных
30 клеток (ДК), в свою очередь изменяя более широкий адаптивный иммунный ответ
против опухолевого антигена. Чтобы оценить, может ли блокада CD39 с помощью
антител против CD39 преодолеть CD39-опосредованное изменение активации
дендритных клеток (ДК) в присутствии АТФ, авторы изобретения инкубировали
происходящие из моноцитов ДК (модК) с антителами против CD39 в присутствии АТФ.

35 Вкратце, моноциты человека очищали от здоровой крови человека и
дифференцировали в 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 часов, а
активацию ДК оценивали посредством анализа экспрессии CD80, CD83 и HLA-DR
способом проточной цитометрии. Необязательно, модК предварительно инкубировали
40 в течение 1 часа в присутствии ингибитора CD39: ARL6716 (компании Tocris, 250 мкМ),
ингибитора CD73: APCP (компании Tocris 50 мкМ), блокирующих антител против CD39
I-394 или BY40 (для BY40 см. WO2009/095478), или блокирующих антител против

CD73. ЛПС (Invivogen, 10 нг/мл) использовали в качестве положительного контроля. Для оценки результирующего влияния АТФ-опосредованной активации ДК на активацию CD4-T-клеток АТФ-активированные ДК промывали и затем инкубировали с аллогенными CD4-T-клетками (соотношение 1 моДК/4 Т-клетки) для смешанной реакции лимфоцитов (MLR) в течение 5 дней. Активацию и пролиферацию Т-клеток анализировали с помощью экспрессии CD25 и разведения Cell Trace Violet способом проточной цитометрии (**Фигура 8**).

Результаты представлены на **Фигурах 9, 10 и 11**. В присутствии отрицательного контроля (среда) активацию моДК наблюдали в присутствии 1 мМ АТФ, однако АТФ при 0,125 мМ, 0,25 мМ или 0,5 мМ не допускал активации моДК. Добавление химических ингибиторов CD39, которые, как полагают, полностью блокируют ферментативную активность CD39 посредством связывания с активным сайтом, приводило к активации моДК на каждой из 0,125 мМ, 0,25 мМ или 0,5 мМ. Однако антитела против CD39, такие как BY40 или антитела против CD73, не были способны способствовать АТФ-индуцированной активации дендритных клеток (ДК), что позволяет предположить, что антитела не способны блокировать ферментативную активность в достаточной степени, чтобы избежать катаболизма АТФ. Удивительно, но блокирующее антитело против CD39 I-394 (показано на Фигурах в концентрации 10 мкг/мл), которое практически полностью блокирует АТФазную активность CD39 и поэтому может допускать накопление АТФ, допускает активацию моДК, оцениваемую по экспрессии HLA-DR или CD83 на каждом из 0,125 мМ, 0,25 мМ или 0,5 мМ (**Фигуры 9 и 10**). Интересно, что моДК, активированные в присутствии АТФ, были способны индуцировать лучшую активацию и пролиферацию Т-клеток в анализе MLR. Кроме того, усиление АТФ-опосредованной активации моДК блокирующим антителом против CD39 I-394 приводило к более высокой пролиферации и активации Т-клеток (**Фигура 11**).

Оценка способности ингибиторов CD39 активировать ДК в присутствии АТФ обеспечивает способ выявления и оценки антител против CD39, способных достигать высокой степени ингибирования CD39. Кроме того, возможность применения антител против CD39 для ослабления иммуносупрессивного эффекта, оказываемого CD39 на ДК, может обеспечить усиление адаптивного иммунного ответа к антигенам, особенно на опухолевых клетках. Кроме того, такие антитела против CD39 могут представлять особый интерес при применении для усиления иммуногенного эффекта химиотерапевтических агентов. Многочисленные химиотерапевтические агенты, вызывающие некроз опухолевых клеток, способны индуцировать АТФ;

комбинированное применение таких агентов совместно с антителами против CD39 может быть особенно полезно для усиления противоопухолевого ответа.

Пример 12: Антитела, ингибирующие АТФазную активность рекомбинантного растворимого белка CD39, сильно потенцируют блокаду CD73 в присутствии АТФ.

Анализ пролиферации Т-клеток

Периферическую кровь от здоровых доноров получали из ЭФС, а мононуклеарные клетки выделяли на градиенте Ficoll™. Лимфоциты дополнительно обогащали на градиенте 52% Percoll™ посредством сбора клеточных гранул и окрашивали красителем Cell Trace (ThermoFisher) в соответствии с TDS, предоставленным производителем. 5x10⁴-1x10⁵ окрашенных клеток распределяли в 96 круглодонных планшетах, инкубировали в течение 1 часа при 37°C с антителами против huCD73 (антитело 6E1 описано в WO2016/131950) и/или mAb против huCD39 (описано в настоящей заявке как I-394) и активировали в течение 3-5 дней добавлением бусин с покрытием против CD3/CD28 (бусина:клетка = 1:4; Life Technologies). Ингибирование пролиферации Т-клеток достигали посредством добавления АТФ (200 мкМ). Пролиферацию Т-клеток и способность Abs блокировать иммуносупрессивный эффект АМФ оценивали способом проточной цитометрии посредством количественного определения разведения красителя в пролиферирующем подмножестве Т-клеток.

Процент пролиферирующих Т-клеток по сравнению с концентрацией Ab против CD73 строки на графиках с помощью программного обеспечения GraphPad Prism™.

Результаты

Антитела тестировали на предмет способности восстанавливать пролиферацию CD4 или CD8 Т-клеток в присутствии добавленного АТФ, предназначенного для представления условий, которые могут быть обнаружены в окружении опухоли. Каждую из молекул против CD73 и CD39 тестировали в диапазоне доз при 3 различных дозах антитела против CD73 или против CD39. Антитело против CD39 I-394 значительно усиливало эффект антител против CD73 в восстановлении 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 усиливали пролиферацию Т-клеток CD4 или CD8 при применении в сочетании с антителами к CD39. Кроме того, при тестировании только в диапазоне доз без антитела против CD73 I-394 против CD39 приводило к заметному усилению

пролиферации CD4 или CD8 Т-клеток в концентрациях 0,1 мкг/мл и 1 мкг/мл. На **Фигуре 12А** показан диапазон доз антитела против CD73 6E1 на пролиферацию CD4 Т-клеток при 3 различных дозах антитела против CD39 I-394, либо 0,01 мкг/мл, 0,1 мкг/мл и 1 мкг/мл. Антитела против CD39, способные нейтрализовать растворимые и/или мономерные CD39 человека, демонстрируют сильное потенцирование эффекта с антителами против CD73 в восстановлении пролиферации CD4-Т-клеток. Эффект был особенно сильным в концентрациях, где антитела против CD73 были субоптимально активны, что соответствовало диапазонам концентраций, которые можно наблюдать в опухолевых тканях во время курса лечения антителом против CD73. При концентрации 0,01 мкг/мл антитела против CD39 обеспечивали приблизительно 1-log увеличение активности антител против CD73, а при концентрации 0,1 мкг/мл антитела против CD39 обеспечивали приблизительно 4-log увеличение активности антител против CD73. Таким образом, антитела против CD39 могут быть полезны для повышения активности антител против CD73, особенно в опухолевой ткани, например в опухолях, содержащих CD73-экспрессирующие клетки. Кроме того, в то время как тестируемые антитела против CD73 (которые способны нейтрализовать растворимый белок CD73) обладали высокой способностью восстанавливать пролиферацию CD4-Т-клеток, другие антитела обладали более низкой активностью (например, как оценивалось в анализе ферментативного ингибирования, в анализе пролиферации Т-клеток или другом подходящем анализе) и могут еще больше выиграть от комбинации с антителами против рCD39. На **Фигуре 12В** представлен диапазон доз антител против CD73 на пролиферацию CD8 Т-клеток. Опять же, антитела против CD39 демонстрируют сильную синергию и/или аддитивный эффект с антителами против CD73 в восстановлении пролиферации CD8 Т-клеток. Эффект был особенно сильным в концентрациях, где антитела против CD73 были субоптимально активны, что соответствовало диапазонам концентраций, которые можно наблюдать в опухолевых тканях во время курса лечения антителом против CD73.

Пример 13: Генерация сильных гуманизированных вариантов антитела I-394

Исходное антитело I-394, имеющее аминокислотные последовательности VH и VL SEQ ID NO: 6 и 7, соответственно, модифицировали посредством введения в VH каркасных областей тяжелой цепи (FR1, FR2, FR3) из подгруппы IGHV1-3 человека совместно с IGHJ1 * 01 (FR4), и введение в VL каркасных областей легких цепей (FR1, FR2, FR3) из подгруппы генов IGKV4-1 человека совместно с IGKJ4 * 01 (FR4).

Накладывали трехмерные модели, основанные на различных сегментах генов VH и VL человека, и все аминокислотные различия тщательно изучали один за другим. Молекулярный дизайн *in silico* оспаривали с использованием 3D-моделей как исходных химерных (HPLP), так и гуманизированных (H0L0) антител. 3D-модели Fab-фрагментов строили с использованием модельного протокола антител Discovery Studio (DS версии 4.5).

Последовательности тяжелой и легкой цепей, применяемые для моделирования химерной версии Fab I-394 с константными областями IgG1 человека, содержащие домен Fc, содержащий замену N297S (без N297-связанного гликозилирования) или замены L234A/L235E/G237A/A330S/P331S (сохраняющие N297-связанное гликозилирование) были следующими:

I-394-LP (исходная легкая цепь Fab):

DIVMTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNFGVFSFMYWFQQKPGQPPNLLIYGAS
 NQGSGVPARFRGSGSGTDFSLNIHPMEADDTAMYFCQQTKVEPYTFGGGKLEIKRTVAA
 PSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
 YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 19).

I-394-HP (исходная тяжелая цепь Fab):

EVKLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYNMHWKQSPGRTLEWIGYIVPLN
 GGSTFNQKFKGRATLTVNTSSRTAYMELRSLTSEDSAAYYCARGGTRFAYWGQGLTVTVS
 AASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDK (SEQ ID NO: 20).

Идентифицировали матричные структуры тяжелой и легкой цепей, и референсы 4M7K, 1I7Z и 3D85 из Protein Data Bank (PDB) использовали для интерфейса VH/VL, моделирования LC и HC соответственно. Используемая база данных PDB — это RCSB PDB от Исследовательского сотрудничества в области структурной биоинформатики, управляемого членами RCSB Рутгерсом и UCSD/SDSC, см. www.rcsb.org и H.M. Berman, et al. (2000) The Protein Data Bank Nucleic Acids Research, 28: 235-242. Референс на запись PDB 4M7K: Teplyakov, A., et al. (2014) Proteins 82: 1563-1582. Референс на запись PDB 1I7Z: Larsen, N. A., et al., (2001) J. Mol. Biol. 311: 9-15. Референс на запись PDB 3D85: Beyer, B. M., et al. (2008) J. Mol. Biol. 382: 942-955.

Последовательности тяжелых и легких цепей, примененные для моделирования гуманизированной версии Fab I-394, были следующими.

Легкая цепь I-394 Fab L0:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNFGVFSFMYWYQQKPGQPPKLLIYGAS
 NQGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQTKVEVPYTFGGGTKVEIKRTVAAP
 SVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
 SLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 21).

5

Тяжелая цепь I-394 Fab H0:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYNMHWRQAPGQRLEWWMGYIVPL
 NGGSTFNQFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGTRFAYWGQGLTVT
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK (SEQ ID NO: 22).

10

Для гуманизированной версии Fab I-394 референсы PDB 4NWT, 4I77 и 4JPI
 использовали для моделирования интерфейса VH/VL, LC и HC соответственно.
 Референс на запись PDB 4NWT: Bowers, P. M., et al., (2014) J. Biol. Chem.289: 33557-
 33567. Референс на запись PDB 4I77: Ultsch, M., et al., (2013) J. Mol.Biol. 425: 1330-
 1339. Референс на запись PDB 4JPI: Jardine, J., et al., (2013) Science 340: 711-716.

15

Для промежуточного отбора гуманизированных вариантов легкой и тяжелой
 цепей накладывали 3D-модели HPLP и H0L0, и все аминокислотные различия
 тщательно изучали один за другим. Внутрицепочечные и внецепочечные связи между
 остатками также оценивали для того, чтобы не нарушить какую-либо важную
 низкоэнергетическую связь посредством введения обратной мутации в данную цепь.
 Кроме того, для гуманизированных вариантов легкой и тяжелой цепей аминокислоты,
 на которые оказывает влияние несоответствие между схемами нумерации CDR
 согласно Кабату и IMGT, специально исследовали в наложении 3D-моделей HPLP и
 H0L0; находки побудили дизайн вариантов VH (обозначенных * как H2 *, H3 * и H4 *),
 которые сохраняли родительский остаток (тирозин), присутствующий в остатке 50 в VH
 согласно Кабату (остаток согласно Кабату, но не CDR2 IGMT), но это не сохраняли
 исходные остатки в положениях 60 и 64 (оба остатка CDR2 согласно Кабату).
 Аналогичным образом получали вариант VL L1*, который не сохранил исходный
 остаток в положении 24 (остаток CDR1 согласно Кабату).

20

25

30

Аминокислотные модификации вводили в исходные последовательности.
 Последовательности VH и VL антитела против CD39 представлены ниже в Таблице А.
 По сравнению с исходной VH H0 из SEQ ID NO: 27, H1 содержит замену R72V
 (FR3); H2 содержит замену V68A (FR3) и R72V (FR3); H2 * содержит замену V68A
 (FR3) и R72V (FR3), а также замену N61S (CDR2); H3 содержит замену M48I (FR2),
 V68A (FR3) и R72V (FR3); H3 содержит замену M48I (FR2), V68A (FR3) и R72V (FR3), а

35

также замены N61S и K65Q в CDR2; H4 содержит замену M48I (FR2), V68A (FR3), R72V (FR3) и S77R (FR3); и H4 * содержит замены M48I (FR2), V68A (FR3), R72V (FR3) и S77R (FR3), а также замены N61S и K65Q в CDR2. По сравнению с исходной цепью L0 VL SEQ ID NO: 35, L1 содержит замену Y40F (FR2), а L1* содержит замену Y40F (FR2) и замену R24K (CDR1).

5

Таблица А

Домен V	SEQ ID	Аминокислотная последовательность
VH "H0"	27	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQRLE WMGYIVPLNGGSTFNQKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVY YCARGGTRFAYWGQGLTVTVSS
VH "H1"	28	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQRLE WMGYIVPLNGGSTFNQKFKGRVTITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVY YCARGGTRFAYWGQGLTVTVS
VH "H2"	29	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQRLE WMGYIVPLNGGSTFNQKFKGRATITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVY YCARGGTRFAYWGQGLTVTVSS
VH "H3"	30	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQRLE WIGYIVPLNGGSTFNQKFKGRATITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYY CARGGTRFAYWGQGLTVTVSS
VH "H4"	31	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQRLE WIGYIVPLNGGSTFNQKFKGRATITVDTSARTAYMELSSLRSEDTAVYY CARGGTRFAYWGQGLTVTVSS
VH "H2*"	32	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQRLE WMGYIVPLNGGSTFSQKFKGRATITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVY YCARGGTRFAYWGQGLTVTVSS
VH "H3*"	33	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQRLE WIGYIVPLNGGSTFSQKFKQGRATITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYY CARGGTRFAYWGQGLTVTVSS
VH "H4*"	34	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQRLE WIGYIVPLNGGSTFSQKFKQGRATITVDTSARTAYMELSSLRSEDTAVYY CARGGTRFAYWGQGLTVTVSS
VL "L0"	35	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNFGVFSFMYWYQQKPGQP PKLLIYGASNQGSVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQT

		KEVPYTFGGGTKVEIK
VL "L1"	36	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNFGVVSFMYWFQQKPGQP PKLLIYGASNQSGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQT KEVPYTFGGGTKVEIK
VL "L1*"	37	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDNFGVVSFMYWFQQKPGQPP KLLIYGASNQSGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQT EVPYTFGGGTKVEIK

5 Антитела, имеющие вариабельные области VH и VL, продуцировали в виде рекомбинантных химерных антител с молчащей Fc областью IgG1 человека с заменами в тяжелой цепи L234A/L235E/G237A/A330S/P331S (нумерация согласно Кабату ЕС), что приводит к потере связывания с рецепторами Fc γ человека CD16A, CD16B, CD32A, CD32B и CD64.

10 Вкратце, последовательности VH и V κ , показанные ниже, клонировали в векторы, содержащие константные домены hulgG1 (содержащие замены L234A/L235E/G237A/A330S/P331S) и константный домен huC κ соответственно. Два полученных вектора котрансфицировали в клетки линии CHO комбинаторным способом таким образом, чтобы генерировать комбинации VH и VL. Созданный пул клеток применяли для производства антител в среде CHO. Затем антитело очищали с помощью белка A.

15 В дополнение к исходному гуманизированному антителу с привитым CDR (mAb1) сконструировали еще 23 варианта гуманизированных антител, которые содержали разные аминокислотные замены по сравнению с исходной версией с привитым CDR. Все варианты антител успешно продуцировали в клетках CHO в виде человеческих IgG1-антител. VH и VL полученных антител mAb1-mAb24 показаны в Таблице В.

20

Таблица В

эталон mAb	VH	VL
mAb1 H0L0	H0 (SEQ ID NO: 27)	L0 (SEQ ID NO: 35)
mAb2 H0L1	H0 (SEQ ID NO: 27)	L1 (SEQ ID NO: 36)
mAb3 H0L1*	H0	L1*

	(SEQ ID NO: 27)	(SEQ ID NO: 37)
mAb4 H1L0	H1 (SEQ ID NO: 28)	L0 (SEQ ID NO: 35)
mAb5 H1L1	H1 (SEQ ID NO: 28)	L1 (SEQ ID NO: 36)
mAb6 H1L1*	H1 (SEQ ID NO: 28)	L1* (SEQ ID NO: 37)
mAb7 H2L0	H2 (SEQ ID NO: 29)	L0 (SEQ ID NO: 35)
mAb8 H2L1	H2 (SEQ ID NO: 29)	L1 (SEQ ID NO: 36)
mAb9 H2L1*	H2 (SEQ ID NO: 29)	L1* (SEQ ID NO: 37)
mAb10 H2*L0	H2* (SEQ ID NO: 32)	L0 (SEQ ID NO: 35)
mAb11 H2*L1	H2* (SEQ ID NO: 32)	L1 (SEQ ID NO: 36)
mAb12 H2*L1*	H2* (SEQ ID NO: 32)	L1* (SEQ ID NO: 37)
mAb13 H3L0	H3 (SEQ ID NO: 30)	L0 (SEQ ID NO: 35)
mAb14 H3L1	H3 (SEQ ID NO: 30)	L1 (SEQ ID NO: 36)
mAb15 H3L1*	H3 (SEQ ID NO: 30)	L1* (SEQ ID NO: 37)
mAb16 H3*L0	H3* (SEQ ID NO: 33)	L0 (SEQ ID NO: 35)
mAb17 H3*L1	H3* (SEQ ID NO: 33)	L1 (SEQ ID NO: 36)
mAb18 H3*L1*	H3* (SEQ ID NO: 33)	L1* (SEQ ID NO: 37)
mAb19 H4L0	H4 (SEQ ID NO: 31)	L0 (SEQ ID NO: 35)
mAb20 H4L1	H4 (SEQ ID NO: 31)	L1 (SEQ ID NO: 36)

mAb21 H4L1*	H4 (SEQ ID NO: 31)	L1* (SEQ ID NO: 37)
mAb22 H4*L0	H4* (SEQ ID NO: 34)	L0 (SEQ ID NO: 35)
mAb23 H4*L1	H4* (SEQ ID NO: 34)	L1 (SEQ ID NO: 36)
mAb24 H4*L1*	H4* (SEQ ID NO: 34)	L1* (SEQ ID NO: 37)

Антитела mAb1-21 оценивали на предмет связывания с CD39 способом проточной цитометрии, в соответствии с описанием в Примере 7, с использованием клеток CHO, экспрессирующих CD39 человека, и клеток CHO, экспрессирующих CD39 макака (*macaca fascicularis*). Все mAb показали сопоставимое связывание с исходным антителом I-394 на клеточных линиях CHO CD39 человека и макака.

Пример 14: Активность гуманизированных вариантов антитела I-394

MAb1-24 дополнительно оценивали на предмет связывания и ингибирования CD39 с помощью различных анализов, включая связывание с CD39, присутствующим на линиях опухолевых клеток Ramos, которые, как было обнаружено, экспрессируют особенно высокие уровни CD39, ингибирование ферментативной активности рекомбинантного продуцируемого pCD39, а также ингибирование ферментативной активности белка pCD39, выделяемого в супернатантах клеточных культур из клеток CHO, экспрессирующих CD39 человека, и из опухолевых клеток Ramos.

Антитела титровали на клетках лимфомы Ramos способом проточной цитометрии в соответствии с способами, описанными в Примере 7. Результаты показали, что все варианты L0 связываются менее сильно на клеточной линии Ramos по сравнению с исходным антителом I-394, тогда как антитела H2L1, H2L1*, H4L1 и H4L1* (mAb8, 9, 20 и 21 соответственно) показали лучшее связывание и были все похожи на исходное антитело I-394. См. **Фигуру 13**.

Антитела тестировали на предмет способности ингибировать АТФазную активность растворимого белка CD39 с использованием анализов, используемых для ингибирования ферментативной активности растворимого белка CD39, в соответствии с описанием выше (Способы). Все антитела проявляли хорошую активность, причем H3L1, H3L1*, H4L1 и H4L1* (mAb14, 15, 20 и 21 соответственно) были сопоставимы с исходным антителом I-394, тогда как другие антитела имели несколько более низкую активность. Антитела также тестировали на предмет способности ингибировать

АТФазную активность растворимого белка CD39, высвобождаемого в супернатанте клеточной культуры из клеток CHO, экспрессирующих CD39 человека, с использованием анализов, используемых для ингибирования ферментативной активности растворимого CD39, в соответствии с описанием выше (Способы). Все антитела проявляли хорошую активность, причем H4L1 и H4L1* (mAb20 и mAb21) были сопоставимы с исходным антителом I-394, тогда как другие антитела имели несколько более низкую активность.

Антитела тестировали для оценки их эффективности в снижении подавления Т-клеток в анализе, описанном в Примере 12. При тестировании влияния АТФ-опосредованной активации ДК на активацию CD4-Т-клеток АТФ-активированные ДК промывали и затем инкубировали с аллогенными CD4-Т-клетками (соотношение 1 моДК/4 Т-клетки) для смешанной реакции лимфоцитов (MLR) в течение 5 дней. Активацию и пролиферацию Т-клеток анализировали с помощью экспрессии CD25 и разведения Cell Trace Violet с помощью проточной цитометрии. Результаты показали, что антитела с тяжелыми цепями H2, H3 или H4 в сочетании с легкими цепями L1 были столь же эффективны, как и исходное антитело I-394, в то время как антитела с легкими цепями L0 были менее эффективны.

Антитела тестировали на предмет способности ингибировать активность АТФазы в клеточных линиях, экспрессирующих мембраносвязанный CD39. Ингибирование антителами АТФазной активности CD39 в CD39-экспрессирующих клетках оценивали с помощью анализа, используемого для ингибирования ферментативной активности клеточного CD39, в соответствии с описанием выше (Способы). Антитела впервые оценивали на клетках CHO, экспрессирующих CD39 человека; в таких условиях не наблюдалось существенных различий между вариантами mAb1-24 и исходным антителом I-394 на трансфицированных клеточных линиях CHO. Однако при оценке антител на линиях опухолевых клеток Ramos и Mino антитела H4L1 и H4L1* (mAb20 и mAb21) были более мощными при блокировании ферментативной активности CD39 по сравнению со всеми другими антителами. На **Фигуре 14** показаны результаты на клетках Mino. Различия, наблюдаемые между анализами трансфектантов и опухолевых клеток, могут возникать из-за особенно высокой экспрессии CD39, обнаруженной в таких линиях опухолевых клеток по сравнению с клетками CHO, что позволяет выявить различия в эффективности между антителами. Антитела, имеющие тяжелую цепь H4* и легкие цепи L1 или L1*, также тестировали на опухолевых клетках Ramos; в этом случае антитела H4* mAb23 и mAb24 имели несколько более низкую эффективность, чем mAb20 и mAb21. Таким образом, наиболее мощными ингибиторами рCD39, полученного из опухолевых клеток

(например, в опухолевых клетках, экспрессирующих высокие уровни CD39), были антитела с тяжелыми цепями H4, за которыми следовали антитела с тяжелой цепью H2, за которыми следовали антитела с тяжелой цепью H3, в каждом случае с легкой цепью L1. Одно из возможных объяснений состоит в том, что существует вредная обратная мутация (BM) в варианте H3, делающая их менее эффективными, чем варианты H2, но которая, в свою очередь, уравнивается заменой в вариантах тяжелой цепи H4, которая восстанавливает активность до уровня исходного I-394. Таким образом, наиболее эффективными антителами среди гуманизированных вариантов были антитело H4L1 (имеющее VH SEQ ID NO: 31 и VL SEQ ID NO: 36) и антитело H4L1 * (имеющее VH SEQ ID NO: 31 и VL SEQ ID NO: 37). MAb20 имеет соответствующие CDR тяжелой и легкой цепей SEQ ID NO: 8-13, с каркасными областями тяжелой цепи (FR1, FR2, FR3) из гена IGHV1-3 человека совместно с геном IGJH1 * 01 (FR4), и следующие замены (нумерация согласно Кабату): M48I (FR2), V68A (FR3), R72V (FR3) и S77R (FR3); и каркасные области легких цепей (FR1, FR2, FR3) из подгруппы генов IGKV4-1 человека совместно с IGKJ4*01 (FR4) и заменой Y40F (FR2). MAb21 дополнительно содержит замену в CDR1 легкой цепи по остатку 24 согласно Кабату (замена R24K).

Полная тяжелая цепь антитела H4L1 (mAb20) с заменами L234A/L235E/G237A/A330S/P331S показана ниже:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQRLEWIGYIVPLNGGST
 FNQKFKGRATITVDTSARTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGGTRFAYWGQGLTVTVSSASTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLF
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 38).

Полная легкая цепь антитела H4L1 (mAb20) показана ниже:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNFGVFSFMYWFQQKPGQPPKLLIYGASNQGS
 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQTKKEVPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
 LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 39).

Полная легкая цепь антитела H4L1* (mAb21) показана ниже:

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDNFGVVSFMYWFQQKPGQPPKLLIYGASNQGS
 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQTKVEVPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF
 PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
 LTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5 (SEQ ID NO: 40).

Пример 15: стабильность гуманизированных вариантов антитела I-394

Антитела mAb1-24 и антитело против CD39 BY40 предшествующего уровня
 техники, все продуцированные как изотипы IgG1 человека с заменами
 10 L234A/L235E/G237A/A330S/P331S, тестировали на стабильность в следующем
 эталонном составе при концентрации приблизительно 7 мг/мл: pH 6,0.; гистидиновый
 буфер (10 мМ); сахароза (200 мМ); NaCl (50 мМ); Полисорбат 80 (PS80) (0,2 г/л).
 Стабильность составов контролировали в двух условиях хранения (при +5 ° C ± 3°C и
 при +40 ± 3°C. Для каждого исследования было проводили 3 временные точки: T0,
 15 T15D (15 дней) и T1M (1 месяц). Для сравнения формата проводили замораживание-
 оттаивание (F/T) и анализ стабильности теплового сдвига (TSSA). Для выполнения
 циклов F/T образцы замораживали не менее 2 часов при температуре -20°C и
 оттаивали не менее 1 часа при комнатной температуре, цикл F/T повторяли три раза и
 образцы испытывали через 24 часа после последнего цикла
 20 замораживания/оттаивания. В каждый момент времени тестировали следующее:

- Твердые частицы (MFI)
- Визуальный Осмотр (Внешний Вид)
- Примеси (SE-HPLC)
- Мутность (400 Нм)
- 25 • Концентрация белка (280 Нм) (выполняли с помощью Nanodrop, Thermo Fisher Scientific Inc.)

Полученные антитела H2L1 (mAb 8), H2L1* (mAb9), H4L1 (mAb20) и H4L1*
 (mAb21) показали хорошую физико-химическую стабильность. Температура агрегации
 (T_{Agg}) показана на **Фигуре 15А** для исходного антитела I-394 по сравнению с
 30 антителом BY40 и на **Фигуре 15В** для антител, имеющих комбинации цепей H2L1,
 H2L1*, H4L1 или H4L1*. Каждое из антител I-394 и H2L1, H2L1*, H4L1 и H4L1*
 показывало T_{Agg} , приближающийся к 70°C. По сравнению с антителом BY40, имеющим
 T_{Agg} ближе к 60 °C, антитела H2L1, H2L1*, H4L1 и H4L1 * демонстрировали
 35 относительно низкой внутренней стабильности антитела BY40 являются
 многочисленные ароматические аминокислотные остатки на поверхности mAb,

расположенные в CDRs, особенно в CDR3 тяжелой цепи, которые придают антителу BY40 относительно высокую прогнозируемую гидрофобность.

5 Все ссылки, включая публикации, патентные заявки и патенты, цитируемые в
настоящей заявке, настоящим включаются посредством ссылки полностью и в той же
степени, как если бы каждая ссылка была индивидуально и конкретно была указана
для включения посредством ссылки и была изложена в настоящей заявке полностью
(в максимальной степени, разрешенной законом), независимо от любого отдельно
10 предусмотренного включения конкретных документов, сделанных в другом месте
настоящей заявки.

При использовании единственного числа подразумевается также и
множественное число существительного, если специально не указано иное. Если не
указано иное, все точные значения, представленные в настоящей заявке, являются
репрезентативными для соответствующих приблизительных значений (например, все
15 точные примерные значения, представленные в отношении конкретного фактора или
измерения, могут считаться также обеспечивающими соответствующее
приблизительное измерение, модифицированное "приблизительно", где это уместно).

Описание любого аспекта или варианта реализации в настоящей заявке с
использованием таких терминов, как "содержащий", "имеющий", "включающий" или
20 "содержащий в себе" со ссылкой на элемент или элементы, предназначено для
обеспечения поддержки аналогичного аспекта или варианта реализации в настоящей
заявке, который "состоит из", "состоит фактически из" или "по существу содержит" этот
конкретный элемент или элементы, если иное не указано или явно не противоречит
контексту (например, композиция, описанная в настоящей заявке как содержащая
25 конкретный элемент, должна пониматься как также описывающая композицию,
состоящую из этого элемента, если иное не указано или явно не противоречит
контексту).

Использование любых и всех примеров или образцовых формулировок
(например, "таких, как"), приведенных в настоящей заявке, предназначено только для
30 лучшего освещения изобретения и не ограничивает сферу применения изобретения,
если не заявлено иное. Никакие формулировки в спецификации не следует
истолковывать как указывающие на какой-либо не заявленный элемент как
существенный для практического применения изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или фрагмент антитела, которые связывают полипептид CD39 человека и которые способны ингибировать АТФазную активность растворимого внеклеточного домена полипептида CD39 человека, причем указанные антитело или фрагмент антитела содержат вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 или 37.

2. Антитело или фрагмент антитела по п. 1, отличающиеся тем, что указанные антитело или фрагмент антитела содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 38, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 39 или 40.

3. Антитело или фрагмент антитела по пп. 1 или 2, отличающиеся тем, что указанные антитело или фрагмент антитела содержат аминокислотные последовательности каркасных областей тяжелой цепи FR1, FR2 и FR3 из гена IGHV1-3 человека; и аминокислотные последовательности каркасных областей легкой цепи FR1, FR2 и FR3 из гена IGKV4-1 человека.

4. Антитело или фрагмент антитела, которые связывают полипептид CD39 человека и способны связывать и ингибировать АТФазную активность растворимого внеклеточного домена белка CD39 человека, причем указанные антитело или фрагмент антитела содержат: вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие соответствующие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8, 9 и 10, и аминокислотные последовательности каркасных областей FR1, FR2 и FR3 из гена IGHV1-3 человека; и вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую CDR1, CDR2 и CDR3, имеющие соответствующие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 17, 12 и 13, и аминокислотные последовательности каркасной области FR1, FR2 и FR3 из гена IGKV4-1 человека.

5. Антитело или фрагмент антитела по п. 4, отличающиеся тем, что указанные антитело или фрагмент антитела содержат переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 31, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 36 и 37.

6. Антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что указанные антитело или фрагмент антитела содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

7. Антитело или фрагмент антитела, при этом указанные антитело или фрагмент антитела содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

8. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-5, отличающиеся тем, что указанные антитело или фрагмент антитела содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37.

9. Антитело или фрагмент антитела, при этом указанные антитело или фрагмент антитела содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

10. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 4-5, отличающиеся тем, что указанные антитело или фрагмент антитела содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 или 37.

11. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 4-5, отличающиеся тем, что указанные антитело или фрагмент антитела содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 или 37.

12. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 4-5, отличающиеся тем, что указанные антитело или фрагмент антитела содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 или 37.

13. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 4-5, отличающиеся тем, что указанные антитело или фрагмент антитела содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 или 37.

14. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 4-5, отличающиеся тем, что указанное антитело или фрагмент антитела содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 или 37.

15. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 4-5, отличающиеся тем, что указанные антитело или фрагмент антитела содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 или 37.

16. Антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что указанное антитело способно ингибировать АТФазную активность растворимого внеклеточного домена белка CD39 человека, продуцируемого опухолевыми клетками человека.

17. Антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что указанное антитело способно ингибировать АТФазную активность белка рCD39, выделяемого в супернатанты клеточной культуры CD39-экспрессирующими опухолевыми клетками человека.

18. Антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов, при этом опухолевые клетки являются опухолевыми клетками Ramos.

19. Антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что указанное антитело ингибирует АТФазную активность белка CD39 в присутствии экзогенно добавленного АТФ, при этом необязательно экзогенно добавленный АТФ обеспечен в концентрации 20 мкМ.

20. Антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что указанное антитело способно связывать белок CD39 человека на поверхности клетки и способно ингибировать АТФазную активность указанного белка CD39 на поверхности клетки.

21. Антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что указанное антитело способно вызывать снижение АТФазной активности белка рCD39, выделяемого в супернатантах клеточной культуры CD39-экспрессирующих опухолевых клеток человека, более чем на 50%, необязательно более чем на 70%, необязательно более чем на 80%.

22. Антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что указанное антитело способно вызывать снижение внеклеточной АТФазной активности CD39-экспрессирующей клетки по меньшей мере на 80%.

23. Антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что указанное антитело характеризуется EC_{50} в отношении ингибирования АТФазной активности CD39 не более 1 мкг/мл, причем ингибирование ферментативной активности CD39 определено путем оценки нейтрализации АТФазной активности в клетках Ramos посредством количественного определения АТФ.

24. Антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что указанное антитело характеризуется EC_{50} , которая определена

проточной цитометрией, не более 2 мкг/мл, необязательно не более 1 мкг/мл, не более 0,5 мкг/мл, не более 0,1 мкг/мл, в отношении связывания с клетками Ramos.

25. Антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что указанное антитело конкурирует за связывание с полипептидом CD39 SEQ ID NO: 1 с антителом, содержащим соответствующие аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи SEQ ID NO: 31 и 36.

26. Антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что указанное антитело способно увеличивать активацию дендритных клеток в присутствии АТФ.

27. Антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что указанное антитело способно вызывать увеличение экспрессии маркера активации клеточной поверхности в происходящих из моноцитов дендритных клетках, когда такие моДК инкубируют *in vitro* с антителом и АТФ.

28. Антитело или фрагмент антитела по п. 26 или 27, отличающиеся тем, что экзогенно добавленный АТФ обеспечен в концентрации 0,125 мМ, 0,25 мМ или 0,5 мМ.

29. Антитело или фрагмент антитела по п. 26-28, отличающиеся тем, что увеличение экспрессии маркера активации клеточной поверхности оценивают посредством инкубации моДК в присутствии АТФ в течение 24 часов и анализа экспрессии CD80, CD83 и/или HLA-DR на клеточной поверхности моДК проточной цитометрией.

30. Антитело или фрагмент антитела по п. 27-29, отличающиеся тем, что увеличение экспрессии маркера клеточной поверхности составляет по меньшей мере 40%, 50%, 75% или 80% по сравнению с отрицательным контролем (например, средой).

31. Антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что указанное антитело способно увеличивать пролиферацию Т-клеток, когда Т-клетки совместно культивируют *in vitro* с CD39-экспрессирующими дендритными клетками (ДК) в присутствии АТФ.

32. Антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что указанное антитело имеет уменьшенное связывание с мутантным полипептидом CD39, содержащим мутации R138A, M139A и E142K (по отношению к SEQ ID NO: 1), в каждом случае относительно связывания между антителом и полипептидом CD39 дикого типа, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

33. Антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что указанное антитело представляет собой "голое" антитело, необязательно антитело, не связанное с цитотоксическим агентом.

34. Антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело представляет собой фрагмент антитела, необязательно фрагмент антитела, не имеющий Fc-домен.

35. Антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что указанное антитело представляет собой антитело, имеющее Fc-домен человека, который модифицирован для уменьшения связывания между указанным Fc-доменом и Fc γ -рецептором человека.

36. Антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что указанное антитело по существу не имеет связывания с полипептидами CD16, CD32a, CD32b и/или CD64 человека.

37. Антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что указанное антитело содержит Fc-домен, при этом необязательно Fc-домен содержит аминокислотную модификацию по сравнению с Fc-доменом дикого типа, которая уменьшила или отменила связывание с одним или более или со всеми Fc γ -рецепторами человека CD16A, CD16B, CD32A, CD32B и/или CD64.

38. Антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что указанное антитело представляет собой полноразмерное антитело.

39. Антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что указанные антитело или фрагмент антитела содержат модифицированный Fc-домен IgG1 человека, содержащий N-связанное гликозилирование по остатку N297 согласно Кабату и содержащий аминокислотную замену по остатку(ам) 234 и 235 согласно Кабату, необязательно дополнительно по остатку 331 согласно Кабату, необязательно по остаткам 234, 235, 237 согласно Кабату и по остаткам 330 и/или 331 согласно Кабату, причем необязательно указанный Fc-домен содержит замены L234A/L235E/P331S, замены L234F/L235E/P331S, замены L234A/L235E/G237A/P331S или замены L234A/L235E/G237A/A330S/P331S.

40. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из предыдущих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель.

41. Набор, содержащий антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов, необязательно дополнительно содержащий меченое вторичное антитело или фрагмент антитела, которые специфично распознают указанные антитело или фрагмент антитела по любому из предыдущих пунктов.

42. Нуклеиновая кислота, кодирующая тяжелую и/или легкую цепь антитела или фрагмент антитела по любому из пп. 1-39.

43. Рекомбинантная клетка-хозяин, продуцирующая антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1-39.

44. Способ лечения или профилактики рака у индивидуума, нуждающегося в этом, при этом указанный способ включает введение указанному индивидууму эффективного количества антитела или фрагмента антитела по любому из пп.1-39 или композиции по п. 40.

45. Способ уменьшения АТФазной активности растворимого белка CD39 у индивидуума, включающий введение указанному пациенту эффективного количества антитела или фрагмента антитела по любому из пп. 1-39 или композиции по п. 40.

46. Способ по п. 45, отличающийся тем, что указанный индивидуум имеет рак.

47. Способ увеличения активности Т, НК и/или В-клеток у субъекта, имеющего рак, и/или ослабления опосредованного аденозином ингибирования активности Т, НК и/или В-клеток у субъекта, имеющего рак, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту эффективного количества антитела или фрагмента антитела по любому из пп. 1-39 или композиции по п. 40.

48. Способ увеличения активации дендритных клеток у субъекта, имеющего рак, и/или восстановления АТФ-опосредованной активации ДК у субъекта, имеющего рак, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту эффективного количества антитела или фрагмента антитела по любому из пп. 1-39 или композиции по п. 40.

49. Способ по п. 44-48, отличающийся тем, что индивидуум имеет обнаруживаемый растворимый белок CD39.

50. Способ по п. 49, отличающийся тем, что индивидуум имеет обнаруживаемый растворимый белок CD39 в кровотоке, в опухолевой ткани и/или в прилегающей к опухоли ткани.

51. Способ лечения или профилактики рака у индивидуума, нуждающегося в этом, при этом указанный способ включает:

а) обнаружение растворимого белка CD39 в кровотоке и/или в окружении опухоли; и

б) при определении того, что растворимый белок CD39 содержится в кровотоке и/или в окружении опухоли, необязательно на уровне, который увеличен по сравнению с референсным уровнем, введение указанному индивидууму антитела или фрагмента антитела по любому из пп. 1-39 или композиции по п. 40.

52. Способ по п. 51, отличающийся тем, что обнаружение растворимого белка CD39 включает получение от указанного индивидуума биологического образца, приведение указанного образца в контакт с антителом, которое связывает растворимый белок CD39, и обнаружение антитела, связанного с растворимым белком CD39.

53. Способ по любому из пп. 44-52, отличающийся тем, что указанное антитело против CD39 вводят по меньшей мере один раз в количестве, эффективном

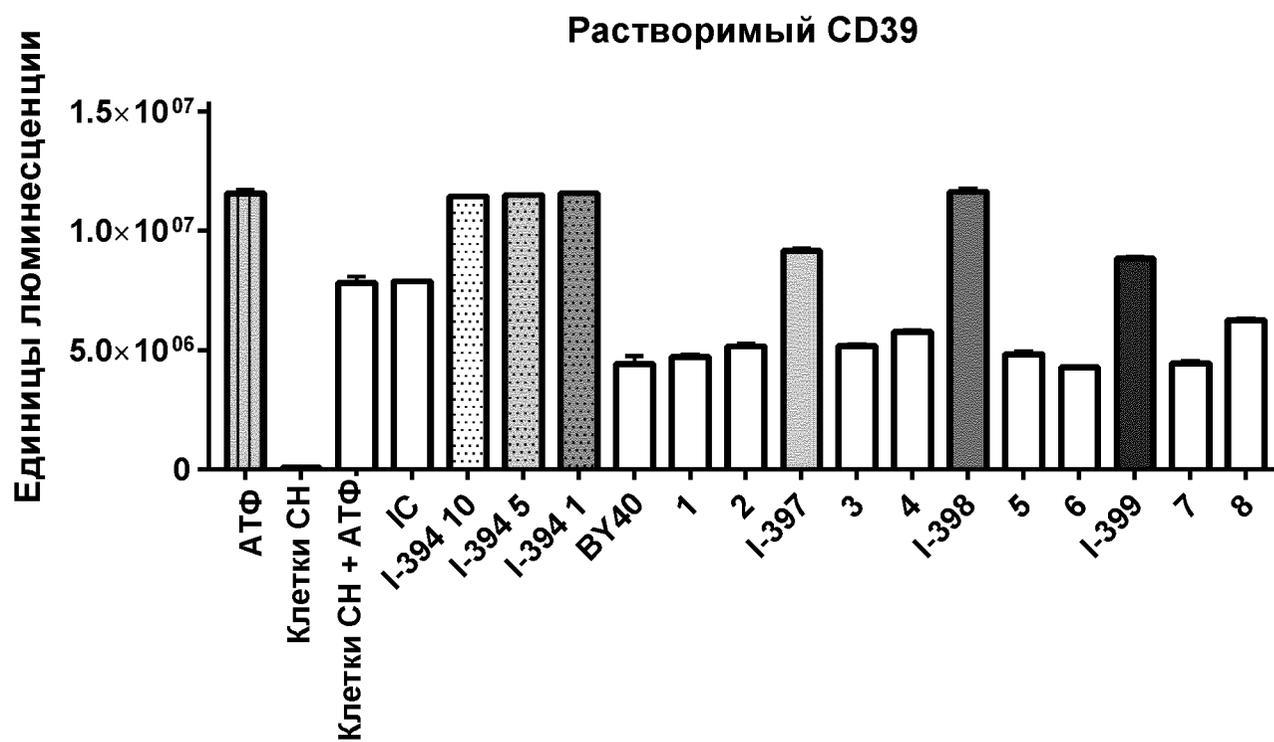
для достижения концентрации в крови (сыворотке) и/или опухолевой ткани, соответствующей по меньшей мере EC_{50} для нейтрализации ферментативной активности растворимого белка CD39.

54. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что нейтрализацию ферментативной активности растворимого белка CD39 определяют путем оценки нейтрализации АТФазной активности белка внеклеточного домена CD39 в растворе посредством количественного определения восстановления АТФ, гидролизованного при инкубации белка CD39 с антителом против CD39 или фрагментом указанного антитела.

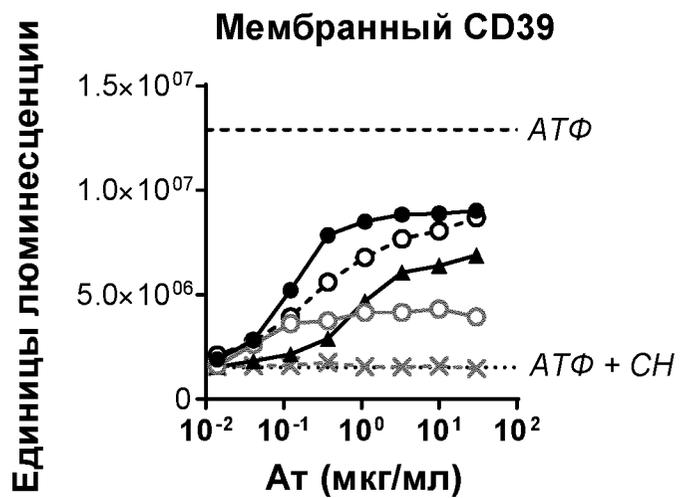
55. Способ по любому из пп. 44-51, отличающийся тем, что указанные опухоль или рак представляют собой солидную опухоль.

56. Способ по п. 55, отличающийся тем, что указанные опухоль или рак представляют собой плоскоклеточный рак головы и шеи, рак мочевого пузыря, рак яичника, колоректальный рак, меланому, рак желудка, рак пищевода или рак молочной железы.

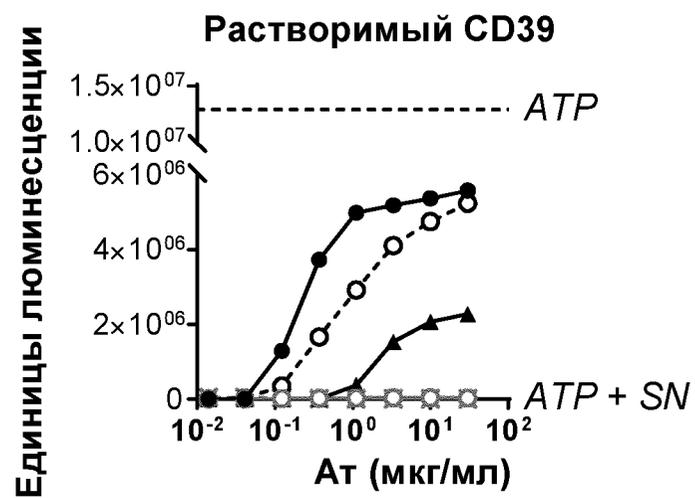
Фигура 1



Фигура 2А

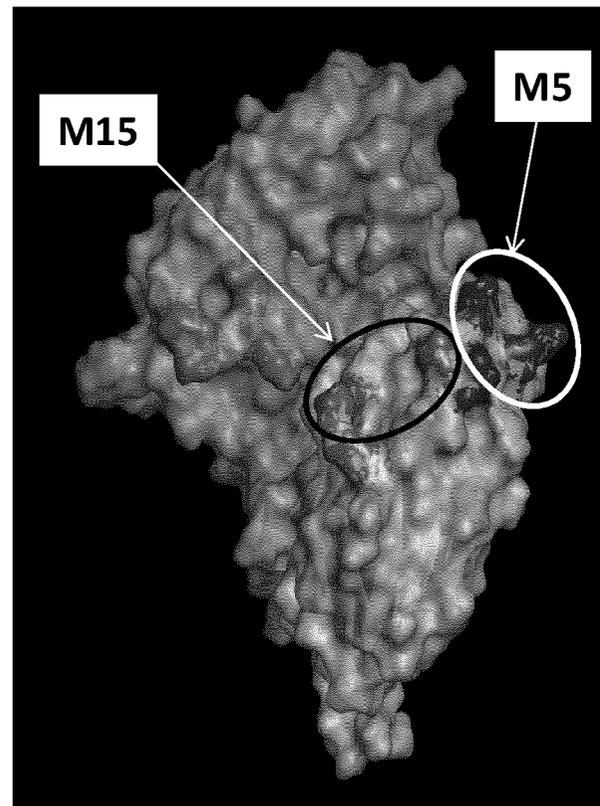
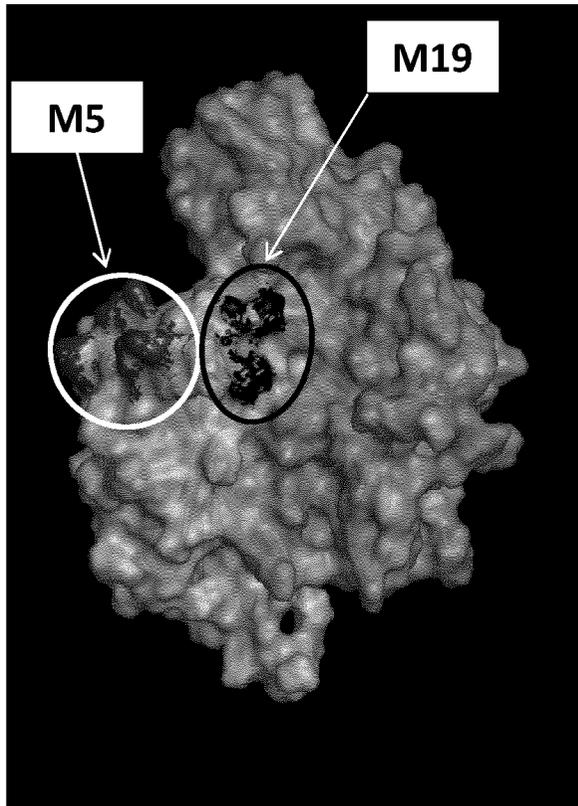


Фигура 2В

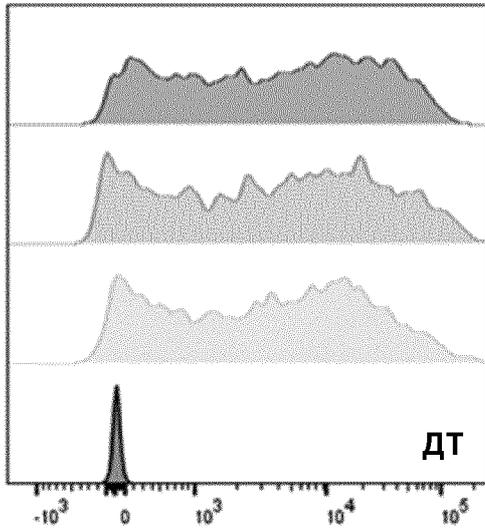


- I-394
- BY40
- I-395
- ▲ I-396
- × Контрольное АТ

Фигура 3А

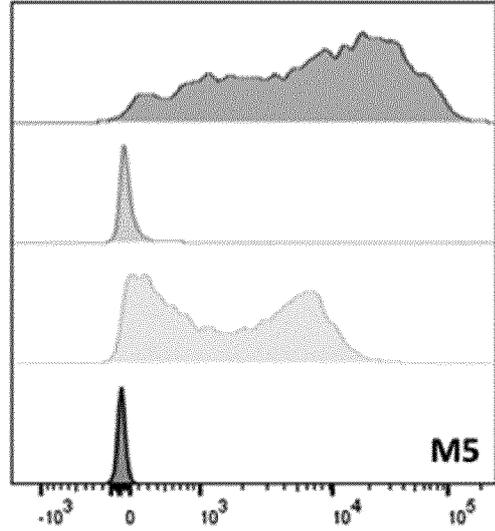


Фигура 3В



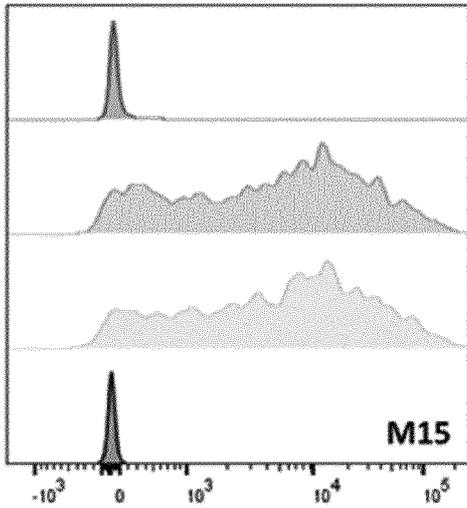
Компонент - Alexa Fluor 647 А

	НАЗВАНИЕ ПРОБИРКИ	Под-счет	Медиана: Компонент - Alexa Fluor 647-А
■	I-396	2487	4343
■	I-395	2585	4237
■	I-394	2151	3716
■	US	1942	10,3



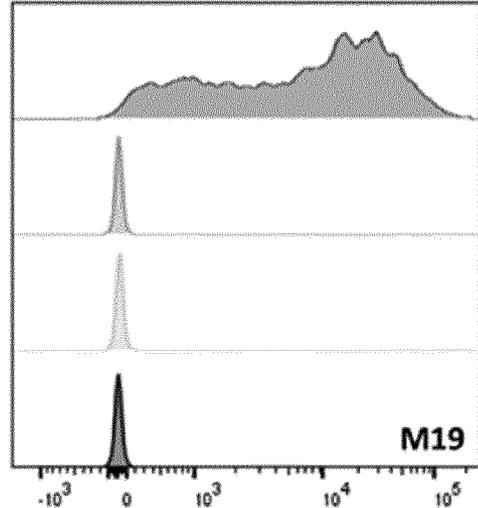
Компонент - Alexa Fluor 647 А

	НАЗВАНИЕ ПРОБИРКИ	Под-счет	Медиана: Компонент - Alexa Fluor 647-А
■	I-396	2152	8189
■	I-395	2281	52,6
■	I-394	2219	1459
■	US	1524	9,98



Компонент - Alexa Fluor 647 А

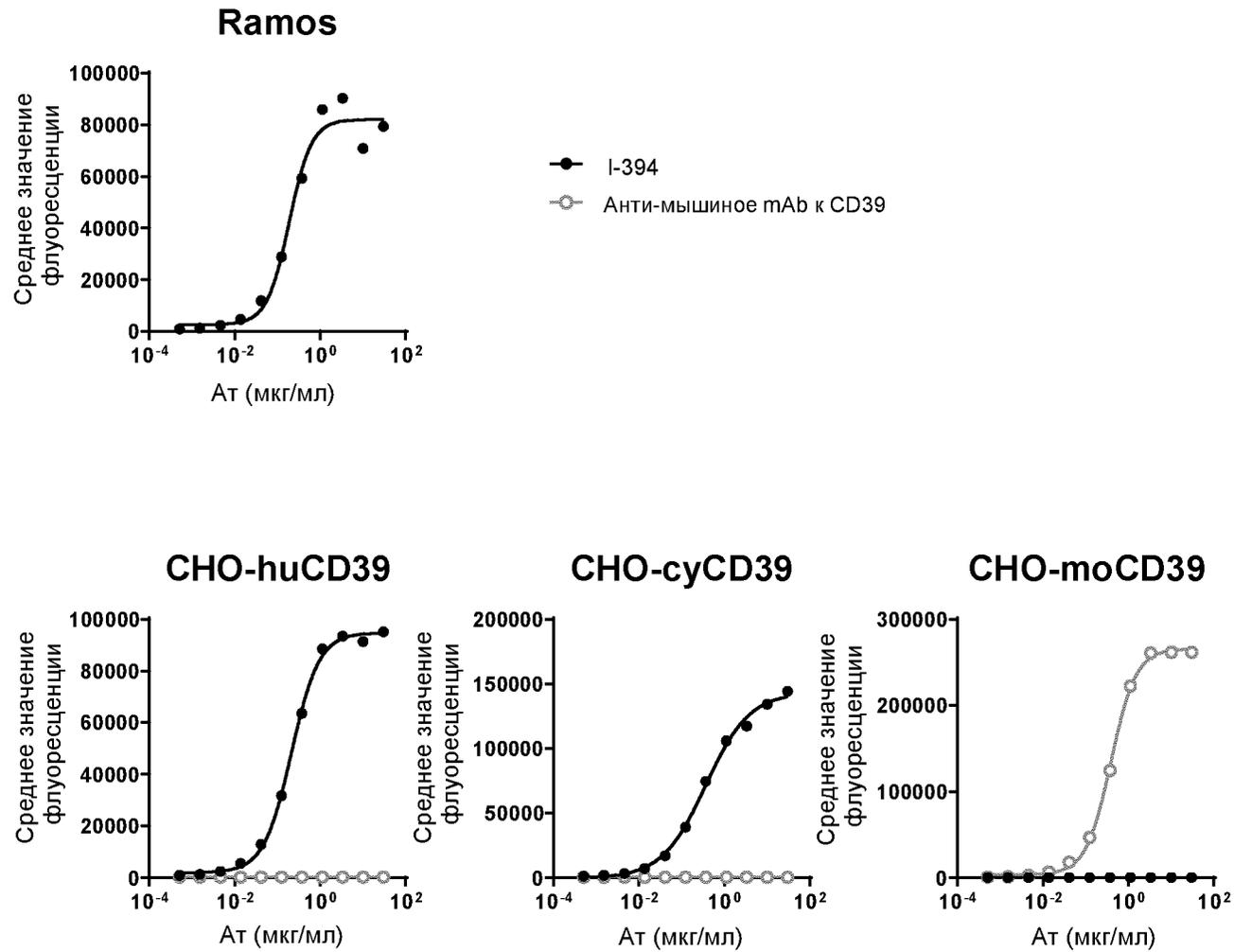
	НАЗВАНИЕ ПРОБИРКИ	Под-счет	Медиана: Компонент - Alexa Fluor 647-А
■	I-396	2188	35,9
■	I-395	2138	5750
■	I-394	2014	6363
■	US	1908	9,98



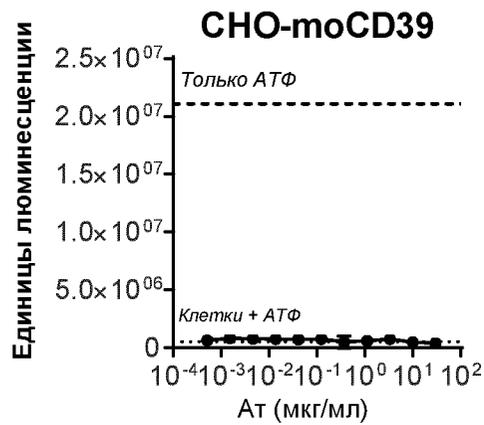
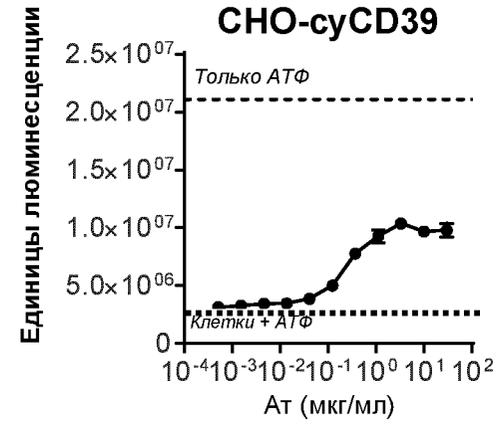
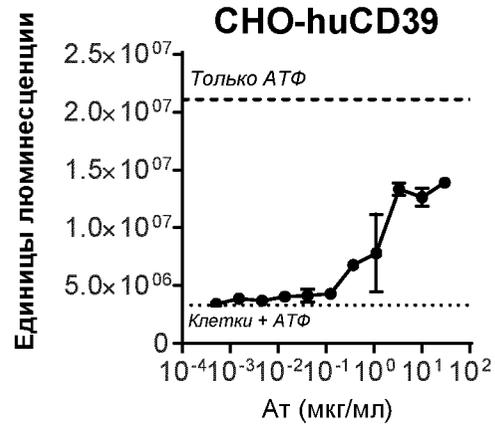
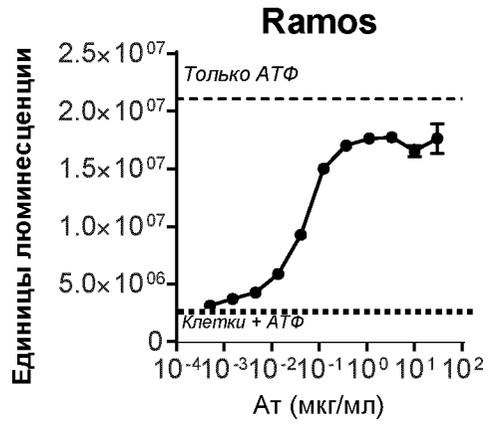
Компонент - Alexa Fluor 647 А

	НАЗВАНИЕ ПРОБИРКИ	Под-счет	Медиана: Компонент - Alexa Fluor 647-А
■	I-396	2375	8893
■	I-395	2098	15,4
■	I-394	2611	24,4
■	US	1879	9,98

Фигура 4

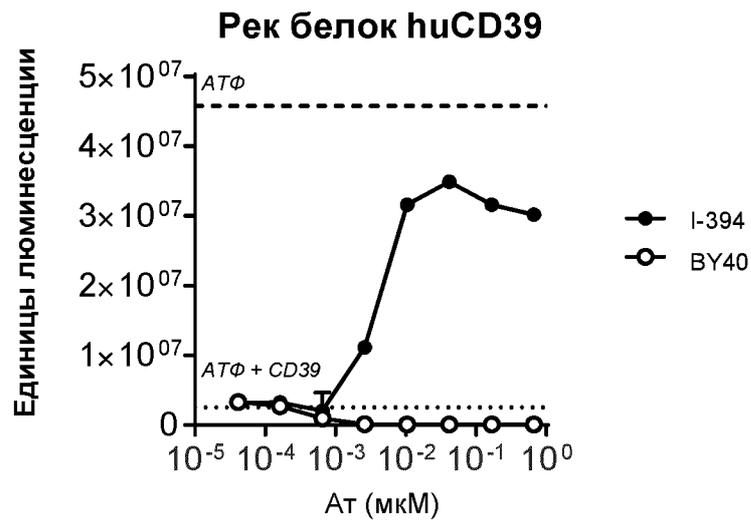


Фигура 5

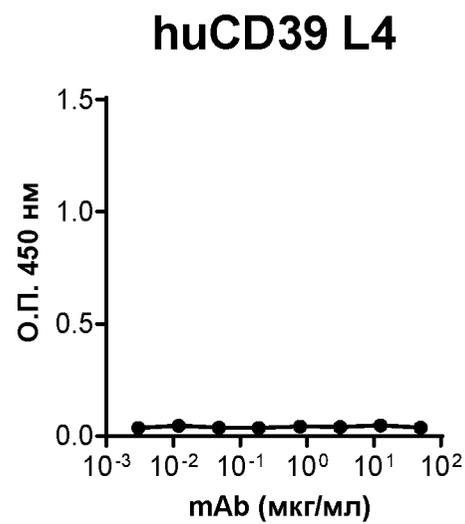
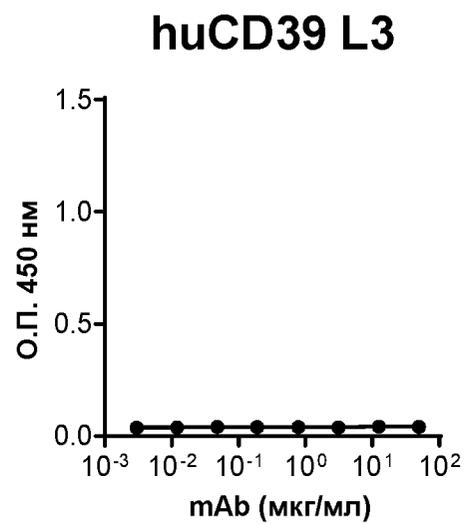
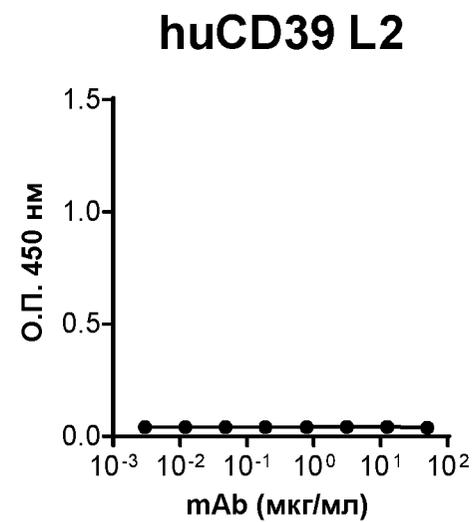
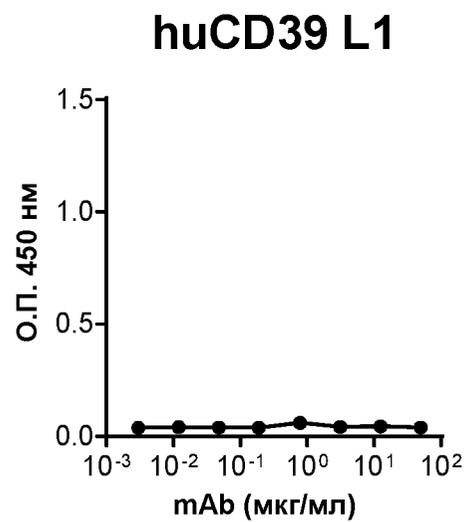
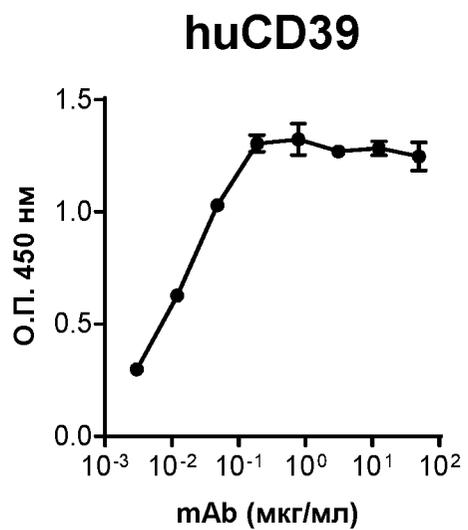


● I-394

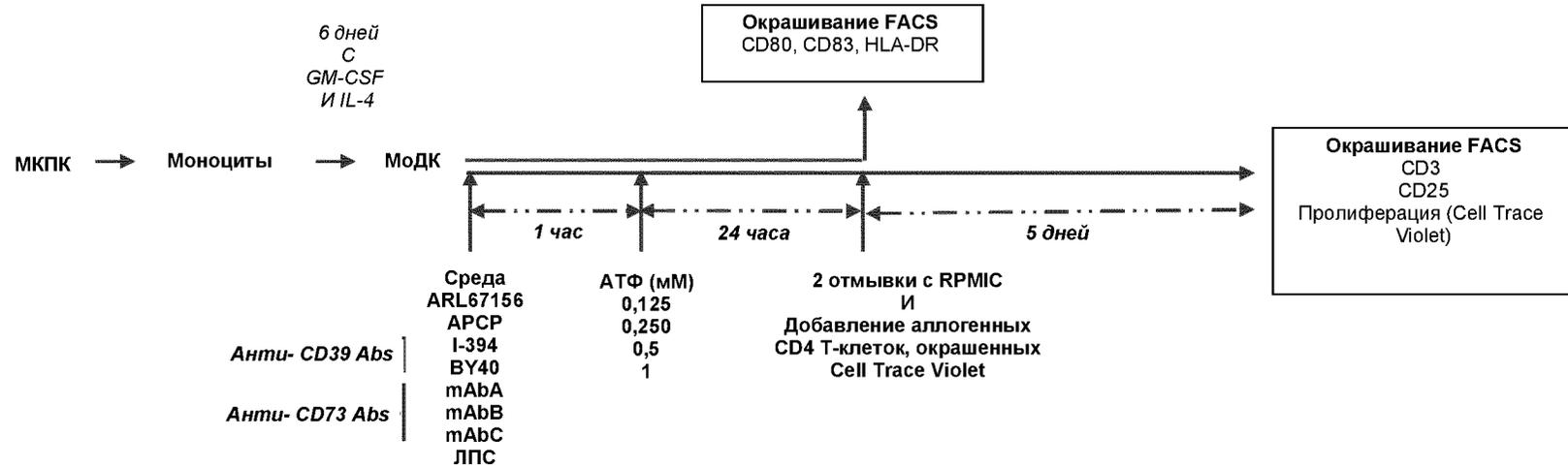
Фигура 6



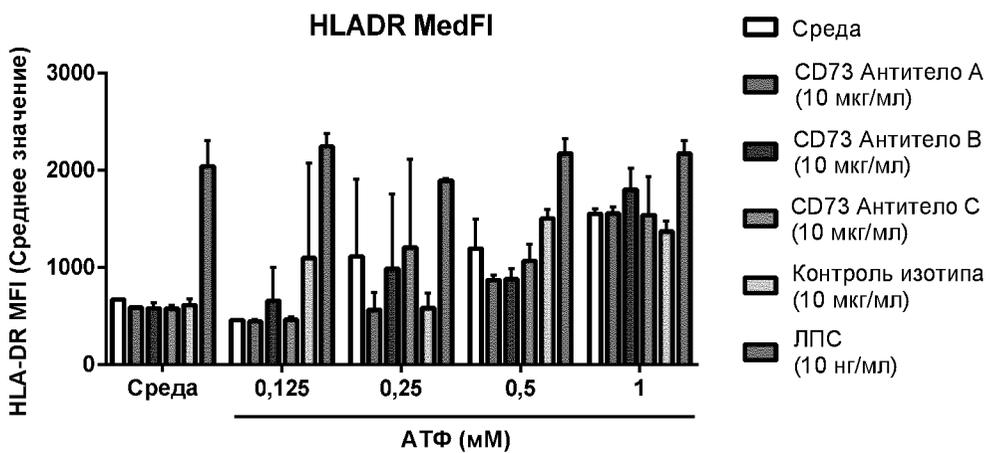
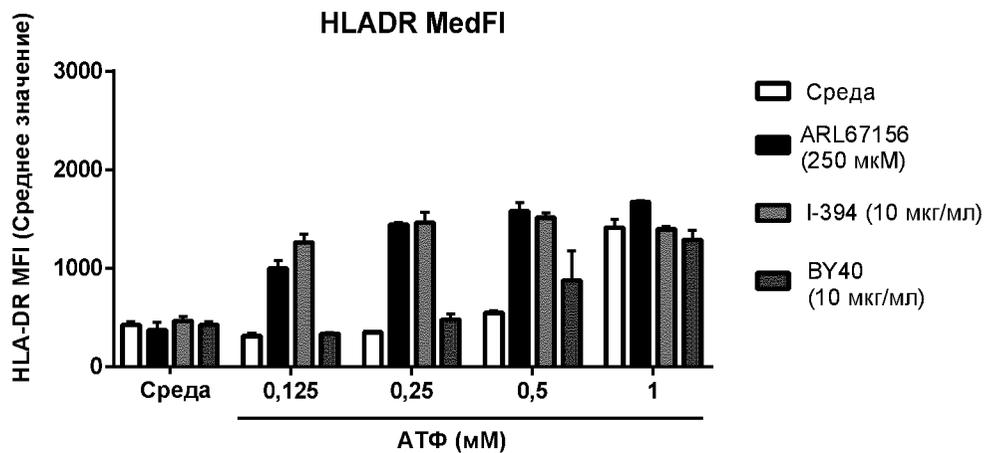
Фигура 7



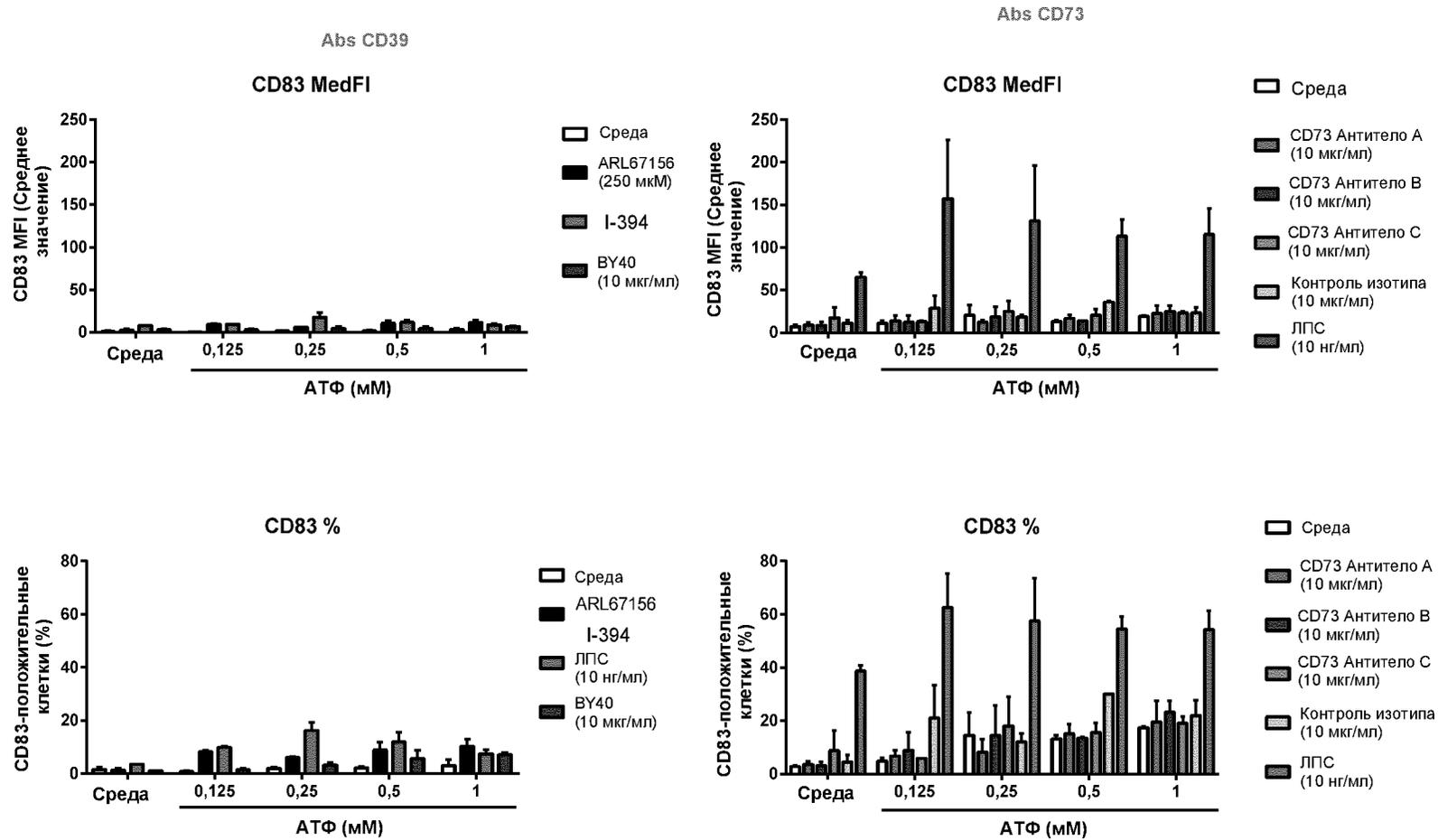
Фигура 8



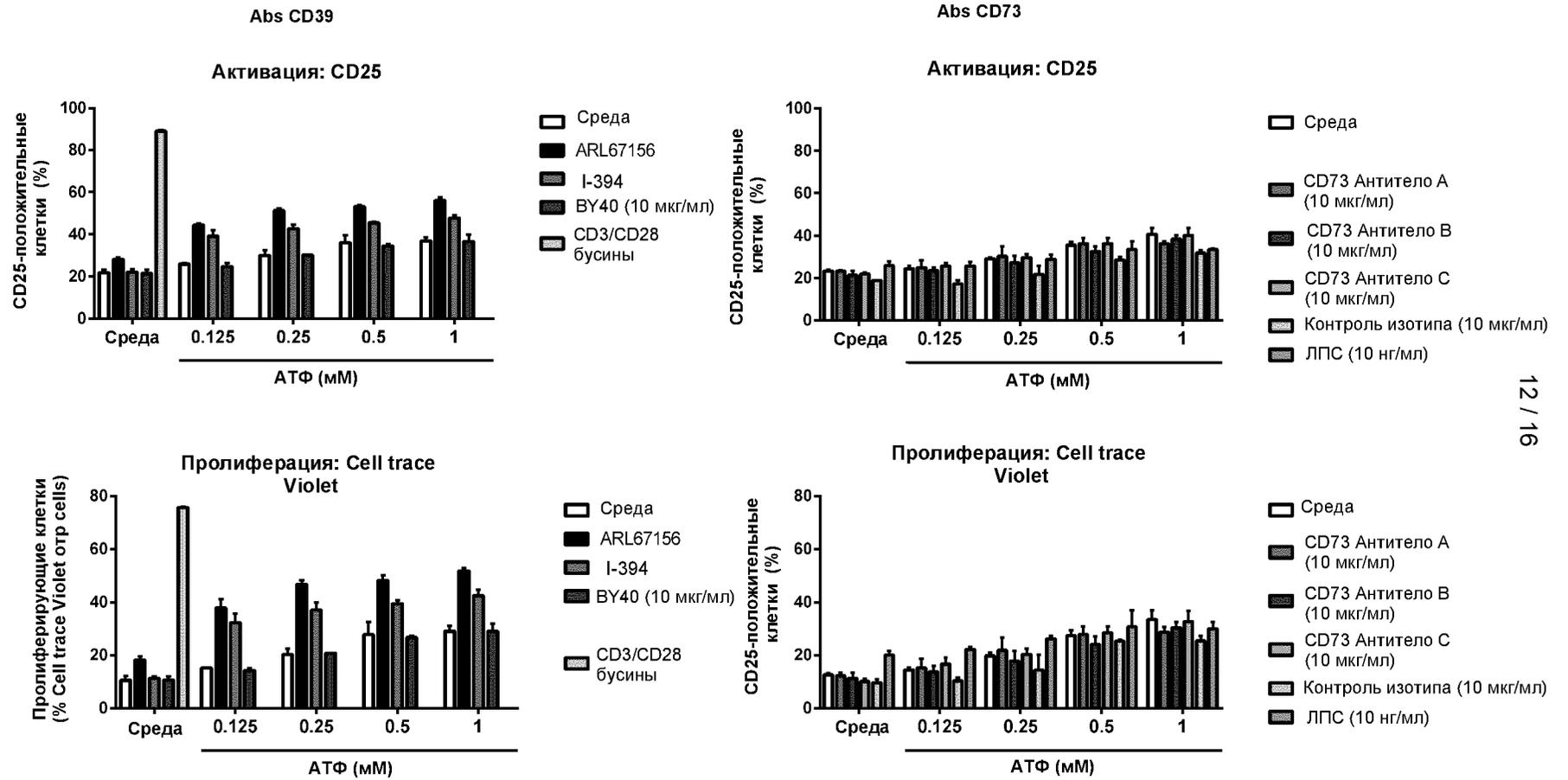
Фигура 9



Фигура 10

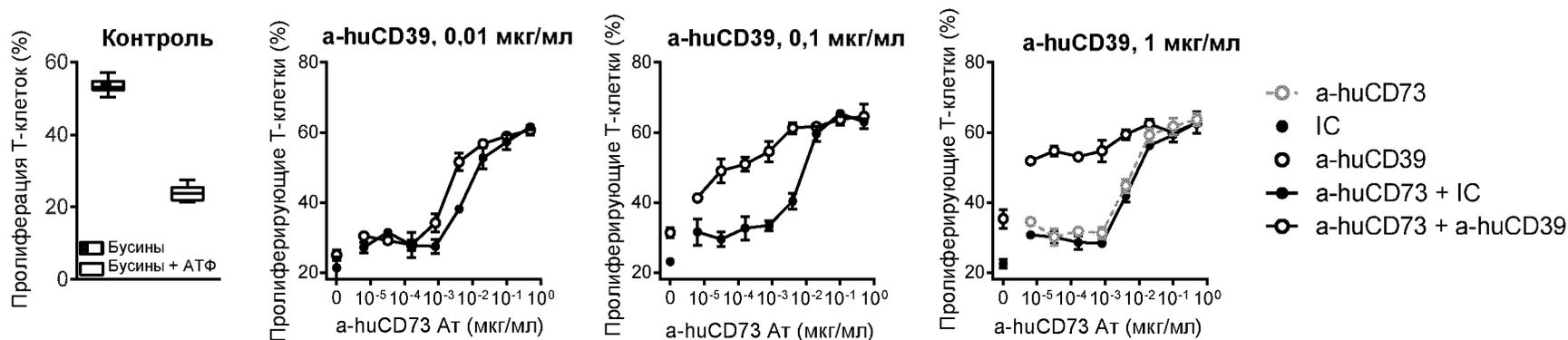


Фигура 11



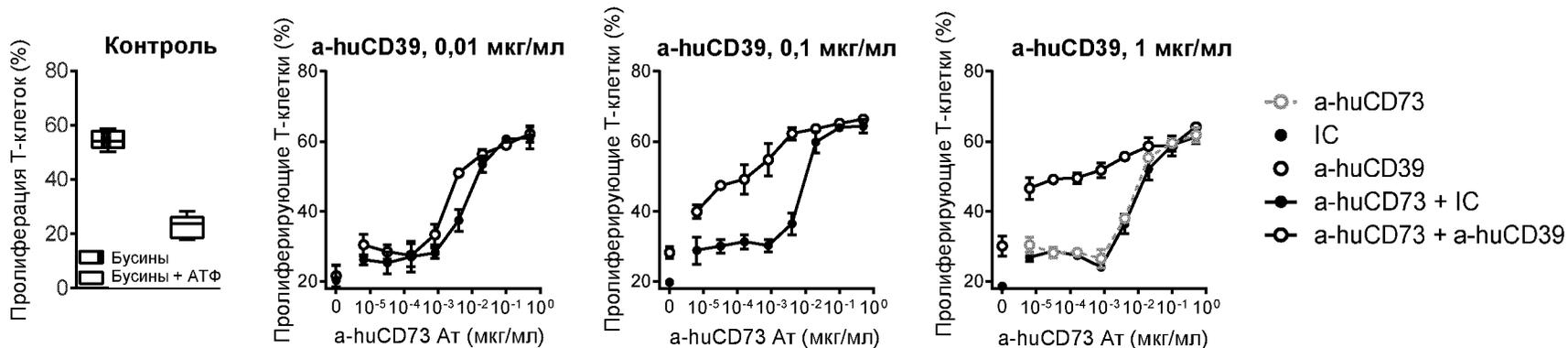
Фигура 12А

CD4 Т-клетки

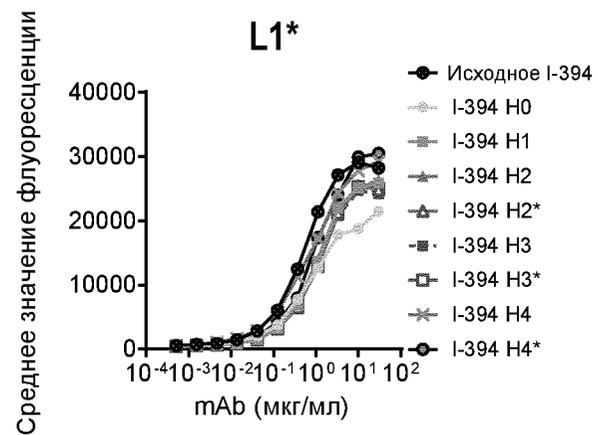
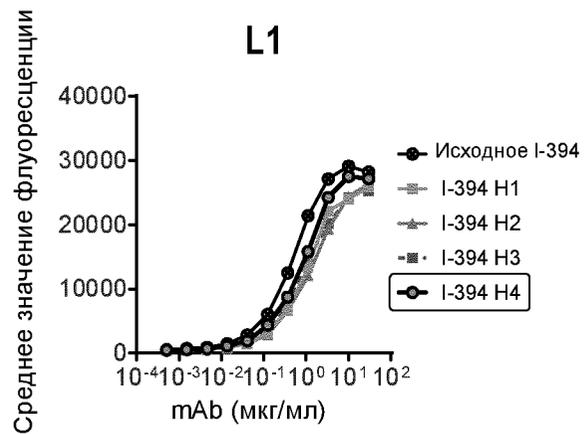
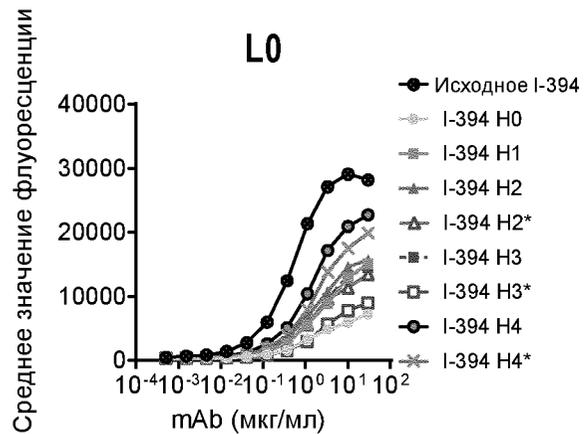


Фигура 12В

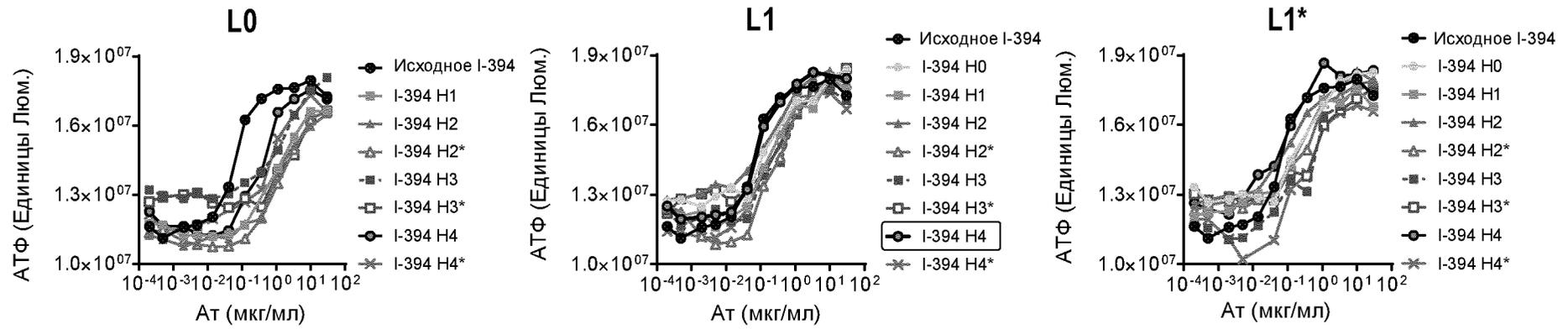
CD8 Т-клетки



Фигура 13

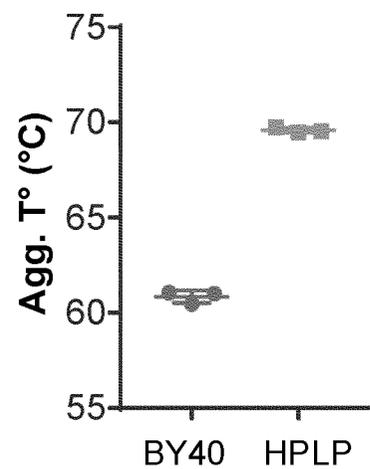


Фигура 14



Фигура 15А

Анализ TSSA



Фигура 15В

Анализ TSSA

