

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291806** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.10.31

(22) Дата подачи заявки
2020.12.30

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)
C07D 401/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ С ИНГИБИТОРОМ CD73 И ИНГИБИТОРОМ АДЕНОЗИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ A2A/A2B

(31) **62/956,840**

(32) **2020.01.03**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/067576**

(87) **WO 2021/138498 2021.07.08**

(71) Заявитель:
ИНСАЙТ КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:

**Настри Орасио Г., Стюарт Шон М.,
Альмагро Хуан Карлос, Чжоу Цзин,
Буонпейн Ребекка А., Ван Хой, Чэнь
Инань, Ван Сяочжао, Карлсен Петер
Нильс, Ли Юн, Ци Чао, Ву Лянсин,
Яо Вэньцин, Чжу Вэньюй, Хуан
Тайшэн (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Описаны комбинированные терапии, включающие введение ингибитора CD73 и ингибитора аденозинового рецептора A2A или A2B. Описанные комбинированные терапии полезны при лечении заболеваний, связанных с активностью аденозиновых рецепторов и/или CD73, включая, например, злокачественное новообразование, воспалительные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания и нейродегенеративные заболевания. Также описаны антитела к CD73 и ингибиторы A2A/A2B.

202291806

A1

A1

202291806

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574744EA/061

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ С ИНГИБИТОРОМ CD73 И ИНГИБИТОРОМ АДЕНОЗИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ A2A/A2B

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка испрашивает приоритет относительно предварительной заявки на патент США № 62/956840, поданной 3 января 2020 года, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Данная заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронной виде в формате ASCII и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная ASCII-копия, созданная 23 декабря 2020 года, называется «20443-0645WO1_SL.txt» и имеет размер 112058 байт.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Описаны комбинированные терапии, включающие введение ингибитора CD73 и ингибитора аденозинового рецептора A2A и/или A2B. Описанная комбинированная терапия полезна при лечении заболеваний, связанных с активностью аденозиновых рецепторов A2A и/или A2B и/или CD73, включая, например, злокачественное новообразование, воспалительные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания и нейродегенеративные заболевания. Также описаны анти-CD73 ингибиторы и ингибиторы аденозиновых рецепторов A2A/A2B.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Кластер дифференцировки 73 (CD73) представляет собой связанный с гликозилфосфатидилинозитолом (ГФИ) мембранный белок, который катализирует превращение внеклеточного аденозинмонофосфата (АМФ) в аденозин. Он функционирует как гомодимер, может отделяться от поверхности клетки и проявлять активность в виде растворимого белка в циркуляции. В дополнение к своей ферментативной функции CD73 также является молекулой клеточной адгезии и играет роль в регуляции миграции лейкоцитов. Известно, что уровни CD73 повышаются вследствие повреждения тканей или гипоксических условий, и уровни CD73 повышены в ряде солидных опухолей. Повышение уровня CD73 в опухоли способствует развитию обогащенного аденозином микроокружения опухоли, которое обладает многочисленными проопухолевыми и иммуносупрессивными эффектами.

Аденозин представляет собой внеклеточную сигнальную молекулу, которая может модулировать иммунные ответы через многие типы иммунных клеток. Аденозин был впервые признан физиологическим регулятором тонуса коронарных сосудов Drugy и Szent-György (Sachdeva, S. и Gupta, M. Saudi Pharmaceutical Journal, 2013, 21, 245-253), однако только в 1970 году Sattin и Rall показали, что аденозин регулирует функцию клетки посредством занятия специфических рецепторов на поверхности клетки (Sattin, A. и Rall, T.W., 1970. Mol. Pharmacol. 6, 13-23; Hasko', G., et al., 2007, Pharmacol. Ther. 113,

264-275).

Аденозин играет жизненно важную роль в различных других физиологических функциях. Он участвует в синтезе нуклеиновых кислот, когда связан с тремя фосфатными группами; он образует АТФ, неотъемлемый компонент энергетической системы клетки. Аденозин может вырабатываться путем ферментативного расщепления внеклеточного АТФ или также может высвобождаться из поврежденных нейронов и глиальных клеток, проходя через поврежденную плазматическую мембрану (Tautenhahn, M. et al. *Neuropharmacology*, 2012, 62, 1756-1766). Аденозин оказывает различные фармакологические эффекты как на периферии, так и в центральной нервной системе, воздействуя на специфические рецепторы, локализованные на клеточных мембранах (Matsumoto, T. et al. *Pharmacol. Res.*, 2012, 65, 81-90). Описаны альтернативные пути образования внеклеточного аденозина. Эти пути включают производство аденозина из никотинамиддинуклеотида (НАД) вместо АТФ за счет согласованного действия CD38, CD203a и CD73. CD73-независимая продукция аденозина также может осуществляться с помощью других фосфатов, таких как щелочная фосфатаза или стромальная гиперплазия предстательной железы.

Существует четыре известных подтипа аденозинового рецептора у человека, включая рецепторы A1, A2A, A2B и A3. A1 и A2A являются рецепторами с высоким сродством, тогда как A2B и A3 являются рецепторами с низким сродством. Аденозин и его агонисты могут действовать через один или несколько из этих рецепторов и могут модулировать активность аденилатциклазы, фермента, ответственного за повышение уровня циклического АМФ (цАМФ). Различные рецепторы оказывают различное стимулирующее и ингибирующее действие на этот фермент. Повышенные внутриклеточные концентрации цАМФ могут подавлять активность иммунных и воспалительных клеток (Livingston, M. et al., *Inflamm. Res.*, 2004, 53, 171-178).

Рецептор аденозина A2A может передавать сигналы на периферии и в ЦНС, при этом агонисты исследуются как противовоспалительные препараты, а антагонисты исследуются для нейродегенеративных заболеваний (Carlsson, J. et al., *J. Med. Chem.*, 2010, 53, 3748-3755). В большинстве типов клеток подтип A2A подавляет уровень внутриклеточного кальция, тогда как A2B усиливает его. Рецептор A2A обычно подавляет воспалительную реакцию иммунных клеток (Borrmann, T. et al., *J. Med. Chem.*, 2009, 52(13), 3994-4006).

Рецепторы A2B высоко экспрессируются в желудочно-кишечном тракте, мочевом пузыре, легких и тучных клетках (Antonioli, L. et al., *Nature Reviews Cancer*, 2013, 13, 842-857). Рецептор A2B, хотя структурно тесно связан с рецептором A2A и способен активировать аденилатциклазу, функционально отличается. Было высказано предположение, что этот подтип может использовать системы передачи сигнала, отличные от аденилатциклазы (Livingston, M. et al., *Inflamm. Res.*, 2004, 53, 171-178). Среди всех аденозиновых рецепторов рецептор A2B представляет собой рецептор с низкой аффинностью, который, как полагают, остается молчащим в физиологических

условиях и активируется вследствие повышенных внеклеточных уровней аденозина (Ryzhov, S. et al. *Neoplasia*, 2008, 10, 987-995). Активация аденозинового рецептора A2B может стимулировать аденилатциклазу и фосфолипазу C за счет активации белков Gs и Gq, соответственно. Также описано связывание с митоген-активированными протеинкиназами (Bortmann, T. et al., *J. Med. Chem.*, 2009, 52(13), 3994-4006).

В иммунной системе включение передачи сигналов аденозина может быть важным регуляторным механизмом, который защищает ткани от чрезмерных иммунных реакций. Аденозин может отрицательно модулировать иммунные ответы через многие типы иммунных клеток, включая Т-клетки, естественные клетки-киллеры, макрофаги, дендритные клетки, тучные клетки и клетки-супрессоры миелоидного происхождения (Allard, B. et al. *Current Opinion in Pharmacology*, 2016, 29, 7-16).

В опухолях этот путь захватывается микроокружением опухоли и блокирует противоопухолевую способность иммунной системы, способствуя прогрессированию злокачественного новообразования. В микроокружении опухоли аденозин в основном образуется из внеклеточного АТФ двумя эктонуклеотидазами CD39 и CD73. Множественные типы клеток могут генерировать аденозин, экспрессируя CD39 и CD73. Это относится к опухолевым клеткам, Т-эффекторным клеткам, Т-регуляторным клеткам, опухолевым макрофагам, подавляющим клеткам миелоидного происхождения (MDSC), эндотелиальным клеткам, связанным со злокачественным новообразованием фибробластам (CAF) и мезенхимальным стромальным/стволовым клеткам (MSC). Кроме того, гипоксия и воспаление, условия, характерные для микроокружения опухоли, индуцируют экспрессию CD39 и CD73, что приводит к увеличению продукции аденозина. В результате уровень аденозина в солидных опухолях выше по сравнению с нормальным физиологическим состоянием.

A2A в основном экспрессируются на клетках лимфоидного происхождения, включая Т-эффекторные клетки, Т-регуляторные клетки и натуральные клетки-киллеры (NK). Блокирование рецептора A2A может предотвратить нижестоящие иммуносупрессивные сигналы, которые временно инактивируют Т-клетки. Рецепторы A2B в основном экспрессируются на клетках, происходящих из моноцитов, включая дендритные клетки, опухолевые макрофаги, супрессивные клетки миелоидного происхождения (MDSC) и мезенхимные стромальные/стволовые клетки (MSC). Блокирование рецептора A2B в доклинических моделях может подавлять рост опухоли, блокировать метастазирование и увеличивать представление опухолевых антигенов.

С точки зрения профиля безопасности ADORA2A/ ADORA2B (A2A/A2B), мыши с нокаутом (KO) рецепторов A2A и A2B являются жизнеспособными, не демонстрируют аномалий роста и являются фертильными (Allard, B. et al. *Current Opinion in Pharmacology*, 2016, 29, 7-16). Мыши A2A KO демонстрировали повышенные уровни провоспалительных цитокинов только после стимуляции липополисахаридами (LPS) и без признаков воспаления на исходном уровне (Antonoli, L. et al., *Nature Reviews Cancer*, 2013, 13, 842-857). Мыши A2B KO показали нормальное количество тромбоцитов,

эритроцитов и лейкоцитов, но увеличили воспаление на исходном уровне, например, TNF-альфа и IL-6) (Antonioli, L. et al., Nature Reviews Cancer, 2013, 13, 842-857). Дальнейшее увеличение продукции TNF-альфа и IL-6 было обнаружено после обработки LPS. У мышей A2B КО также наблюдали повышенное содержание молекул сосудистой адгезии, которые опосредуют воспаление, а также адгезию/выворачивание лейкоцитов; усиленная активация тучных клеток; повышенная чувствительность к IgE-опосредованной анафилаксии и повышенная утечка из сосудов и приток нейтрофилов при гипоксии (Antonioli, L. et al., Nature Reviews Cancer, 2013, 13, 842-857).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте настоящего изобретения представлен способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающий введение субъекту-человеку эффективного количества ингибитора CD73 человека и ингибитора аденозинового рецептора A2A и/или аденозинового рецептора A2B.

В некоторых вариантах осуществления (1) ингибитор CD73 человека содержит:

(а) антитело, содержащее переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR) 1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO: 1);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO: 2); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFDY (SEQ ID NO: 3); и

содержащее переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO: 4);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO: 5); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO: 6);

(b) антитело, которое связывается с CD73 человека в эпитопе в пределах аминокислот 40-53 SEQ ID NO:70;

(c) антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; или

(d) антитело, содержащее домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GFTFSSYD (SEQ ID NO: 34);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность MSYDGSNK (SEQ ID NO: 35) или MSYEGSNK (SEQ ID NO: 40); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ATEIAAKGDY (SEQ ID NO: 36); и

антитело, содержащее домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO: 37);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AAS (SEQ ID NO: 38); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39);

(е) антитело, которое связывается с CD73 человека в эпитопе в пределах аминокислот 386-399 и 470-489 из SEQ ID NO: 70;

(f) антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31;

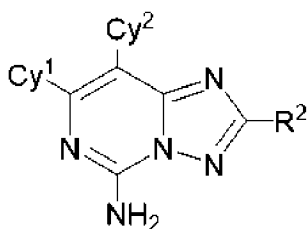
(g) антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31;

(h) антитело, выбранное из группы, состоящей из 11E1, Medi9447, CPI-006 и BMS-986179; или

(i) ингибитор, выбранный из группы, состоящей из CB-708 и AB680.

В некоторых вариантах реализации ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или аденозинового рецептора A2B (A2A/A2B) содержит соединение:

(а) Формулы (I):



(I),

или его фармацевтически приемлемую соль, где

Cy¹ представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

Cy² представляет собой 5-6-членный гетероарил или 4-7-членный гетероциклоалкил, где каждый из 5-6-членного гетероарила или 4-7-членного гетероциклоалкила Cy² необязательно замещен 1, 2 или 3 группами, каждая из которых независимо выбрана из C₁₋₃ алкила, C₁₋₃ алкокси, NH₂, NH(C₁₋₃ алкил) и N(C₁₋₃ алкил)₂;

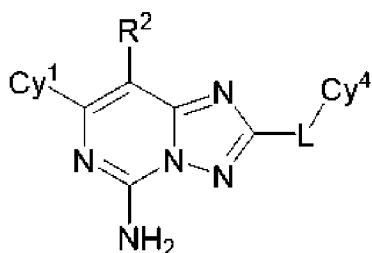
R^2 выбран из фенил- C_{1-3} алкил-, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкил-, (5-7-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил-, (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкил- и OR^{a2} , где каждый из фенил- C_{1-3} алкил-, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкил-, (5-7-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил- и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкил- из R^2 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^C ;

R^{a2} представляет собой (5-7-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил-, необязательно замещенный 1 или 2 независимо выбранными заместителями R^C ;

каждый R^C независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, C_6 арила, 5-7-членного гетероарила, (4-7-членного гетероциклоалкила)- C_{1-3} алкила, OR^{a4} и $NR^{c4}R^{d4}$, и

каждый R^{a4} , R^{c4} и R^{d4} независимо выбран из H и C_{1-6} алкила;

(b) Формулы (II):



(II)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

R^2 выбран из H и CN;

Cy^1 представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

L представляет собой C_{1-3} алкилен, где указанный алкилен необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8D} ;

Cy^4 выбран из фенила, циклогексила, пиридила, пирролидинонила и имидазолила, где каждый фенил, циклогексил, пиридил, пирролидинонил и имидазолил необязательно замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из R^{8D} и R^8 ;

каждый R^8 независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, C_{1-6} галогеналкила, C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, фенила, C_{3-7} циклоалкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, фенил- C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкила, (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкила и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкила, где каждый из C_{1-6} алкила, C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, фенила, C_{3-7} циклоалкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, фенил- C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкила, (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкила и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкила R^8 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8A} ;

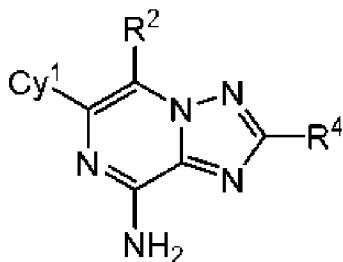
каждый R^{8A} независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, CN, OR^{a81} и $NR^{c81}R^{d81}$, где каждый из C_{1-3} алкила, 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила R^{8A} необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8B} ;

каждый R^{a81} , R^{c81} и R^{d81} независимо выбран из H, C_{1-6} алкила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где каждый из C_{1-6} алкила и 4-7-членного гетероциклоалкила R^{a81} , R^{c81} и R^{d81} необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8B} ;

каждый R^{8B} независимо выбран из галогена и C_{1-3} алкила; и

каждый R^{8D} независимо выбран из OH, CN, галогена, C_{1-6} алкила и C_{1-6} галогеналкила;

(с) Формулы (III):



(III)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

Cy^1 представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

R^2 выбран из 5-6 членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где каждый из 5-6 членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила из R^2 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{2A} ;

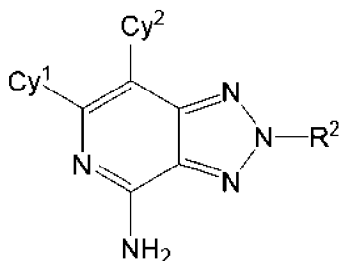
каждый R^{2A} независимо выбран из D, галогена, C_{1-6} алкила и C_{1-6} галогеналкила;

R^4 выбран из фенил- C_{1-3} алкил-, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкил-, (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил- и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкила, где каждый из фенил- C_{1-3} алкил-, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкил-, (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил- и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкил- из R^4 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{4A} ;

каждый R^{4A} независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a41} и $NR^{c41}R^{d41}$; и

каждый R^{a41} , R^{c41} и R^{d41} независимо выбран из H и C_{1-6} алкила; или

(d) Формулы (IV):



(IV)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

Cy^1 представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

Sy^2 выбран из 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где каждый из 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила Sy^2 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^6 ;

каждый R^6 независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила и C_{1-6} галогеналкила;

R^2 представляет собой фенил- C_{1-3} алкил- или (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил-, где каждый из фенил- C_{1-3} алкил- и (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил- из R^2 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{2A} , и

каждый R^{2A} независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила и C_{1-6} галогеналкила.

или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CD73 человека содержит:

(а) антитело, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR) 1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO: 1);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO: 2); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFDY (SEQ ID NO: 3); и

содержащее вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO: 4);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO: 5); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO: 6);

(b) антитело, которое связывается с CD73 человека в эпитопе в пределах аминокислот 40-53 SEQ ID NO:70;

(c) антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; или

(d) антитело, содержащее домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GFTFSSYD (SEQ ID NO: 34);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность MSYDGSNK (SEQ ID NO: 35) или MSYEGSNK (SEQ ID NO: 40); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ATEIAAKGDY (SEQ ID NO: 36); и

антитело, содержащее домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL,

где:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO: 37);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AAS (SEQ ID NO: 38); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39);

(е) антитело, которое связывается с CD73 человека в эпитопе в пределах аминокислот 386-399 и 470-489 из SEQ ID NO: 70;

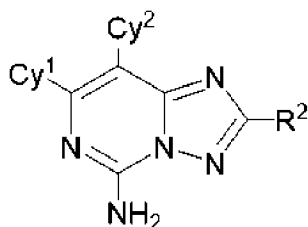
(f) антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31;

(g) антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31;

(h) антитело, выбранное из группы, состоящей из 11E1, Medi9447, CPI-006 и BMS-986179; или

(i) ингибитор, выбранный из группы, состоящей из CB-708 и AB680; и ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или аденозинового рецептора A2B (A2A/A2B) включает соединение:

(a) Формулы (I):



(I),

или его фармацевтически приемлемую соль, где

Cy¹ представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

Cy² представляет собой 5-6-членный гетероарил или 4-7-членный гетероциклоалкил, где каждый из 5-6-членного гетероарила или 4-7-членного гетероциклоалкила Cy² необязательно замещен 1, 2 или 3 группами, каждая из которых независимо выбрана из C₁₋₃ алкила, C₁₋₃ алкокси, NH₂, NH(C₁₋₃ алкил) и N(C₁₋₃ алкил)₂;

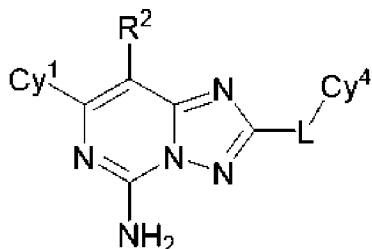
R² выбран из фенил-C₁₋₃ алкил-, C₃₋₇ циклоалкил-C₁₋₃ алкил-, (5-7-членный гетероарил)-C₁₋₃ алкил-, (4-7-членный гетероциклоалкил)-C₁₋₃ алкил- и OR^{a2}, где каждый из фенил-C₁₋₃ алкил-, C₃₋₇ циклоалкил-C₁₋₃ алкил-, (5-7-членный гетероарил)-C₁₋₃ алкил- и (4-7-членный гетероциклоалкил)-C₁₋₃ алкил- из R² необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^C;

R^{a2} представляет собой (5-7-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил-, необязательно замещенный 1 или 2 независимо выбранными заместителями R^C ;

каждый R^C независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, C_6 арила, 5-7-членного гетероарила, (4-7-членного гетероциклоалкила)- C_{1-3} алкила, OR^{a4} и $NR^{c4}R^{d4}$; и

каждый R^{a4} , R^{c4} и R^{d4} независимо выбран из H и C_{1-6} алкила;

(b) Формулы (II):



(II)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

R^2 выбран из H и CN;

Cy^1 представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

L представляет собой C_{1-3} алкилен, где указанный алкилен необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8D} ;

Cy^4 выбран из фенила, циклогексила, пиридила, пирролидинонила и имидазолила, где каждый фенил, циклогексил, пиридил, пирролидинонил и имидазолил необязательно замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из R^{8D} и R^8 ;

каждый R^8 независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, C_{1-6} галогеналкила, C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, фенила, C_{3-7} циклоалкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, фенил- C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкила, (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкила и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкила, где каждый из C_{1-6} алкила, C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, фенила, C_{3-7} циклоалкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, фенил- C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкила, (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкила и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкила R^8 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8A} ;

каждый R^{8A} независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, CN, OR^{a81} и $NR^{c81}R^{d81}$, где каждый из C_{1-3} алкила, 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила R^{8A} необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8B} ;

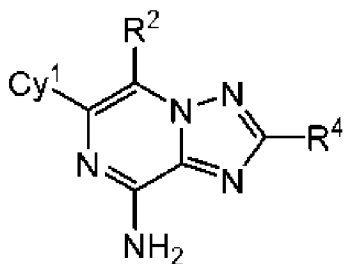
каждый R^{a81} , R^{c81} и R^{d81} независимо выбран из H, C_{1-6} алкила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где каждый из C_{1-6} алкила и 4-7-членного гетероциклоалкила R^{a81} , R^{c81} и R^{d81} необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8B} ;

каждый R^{8B} независимо выбран из галогена и C_{1-3} алкила; и

каждый R^{8D} независимо выбран из OH, CN, галогена, C_{1-6} алкила и C_{1-6}

галогеналкила;

(с) Формулы (III):



(III)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

Cy¹ представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

R² выбран из 5-6 членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где каждый из 5-6 членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила из R² необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{2A};

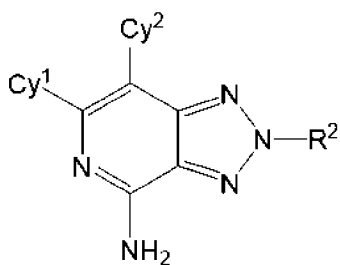
каждый R^{2A} независимо выбран из D, галогена, C₁₋₆ алкила и C₁₋₆ галогеналкила;

R⁴ выбран из фенил-C₁₋₃ алкил-, C₃₋₇ циклоалкил-C₁₋₃ алкил-, (5-6-членный гетероарил)-C₁₋₃ алкил- и (4-7-членный гетероциклоалкил)-C₁₋₃ алкила, где каждый из фенил-C₁₋₃ алкил-, C₃₋₇ циклоалкил-C₁₋₃ алкил-, (5-6-членный гетероарил)-C₁₋₃ алкил- и (4-7-членный гетероциклоалкил)-C₁₋₃ алкил- из R⁴ необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{4A};

каждый R^{4A} независимо выбран из галогена, C₁₋₆ алкила, C₁₋₆ галогеналкила, CN, OR^{a41} и NR^{c41}R^{d41}; и

каждый R^{a41}, R^{c41} и R^{d41} независимо выбран из H и C₁₋₆ алкила; или

(d) Формулы (IV):



(IV)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

Cy¹ представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

Cy² выбран из 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где каждый из 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила Cy² необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R⁶;

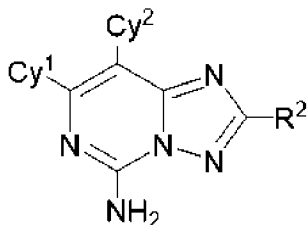
каждый R⁶ независимо выбран из галогена, C₁₋₆ алкила и C₁₋₆ галогеналкила;

R² представляет собой фенил-C₁₋₃ алкил- или (5-6-членный гетероарил)-C₁₋₃ алкил-,

где каждый из фенил- C_{1-3} алкил- и (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил- из R^2 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{2A} , и

каждый R^{2A} независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила и C_{1-6} галогеналкила.
или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B представляет собой соединение Формулы (I):



(I),

или его фармацевтически приемлемую соль, где

Cy^1 представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

Cy^2 представляет собой 5-6-членный гетероарил или 4-7-членный гетероциклоалкил, где каждый из 5-6-членного гетероарила или 4-7-членного гетероциклоалкила Cy^2 необязательно замещен 1, 2 или 3 группами, каждая из которых независимо выбрана из C_{1-3} алкила, C_{1-3} алкокси, NH_2 , $NH(C_{1-3}$ алкил) и $N(C_{1-3}$ алкил) $_2$;

R^2 выбран из фенил- C_{1-3} алкил-, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкил-, (5-7-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил-, (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкил- и OR^{a2} , где каждый из фенил- C_{1-3} алкил-, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкил-, (5-7-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил- и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкил- из R^2 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^C ;

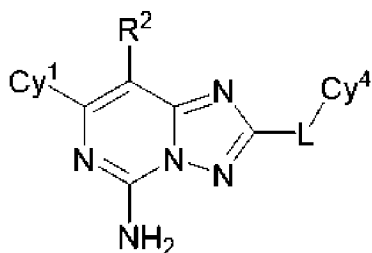
R^{a2} представляет собой (5-7-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил-, необязательно замещенный 1 или 2 независимо выбранными заместителями R^C ;

каждый R^C независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, C_6 арила, 5-7-членного гетероарила, (4-7-членного гетероциклоалкила)- C_{1-3} алкила, OR^{a4} и $NR^{c4}R^{d4}$, и

каждый R^{a4} , R^{c4} , и R^{d4} независимо выбран из H и C_{1-6} алкила. В некоторых случаях ингибитор A2A/A2B выбран из: 3-(5-амино-2-(пиридин-2-илметил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли; 3-(5-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидроксиметил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли; 3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-2H-тетразол-2-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемой соли, 3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-1H-тетразол-1-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли; 3-(5-амино-2-((3-метилпиридин-2-ил)метокси)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли; и 3-(2-((5-(1H-пиразол-1-ил)-1H-тетразол-1-

ил)метил)-5-амино-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B представляет собой соединение Формулы (II):



(II)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

R^2 выбран из H и CN;

Cy^1 представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

L представляет собой C_{1-3} алкилен, где указанный алкилен необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8D} ;

Cy^4 выбран из фенила, циклогексила, пиридила, пирролидинонила и имидазолила, где каждый фенил, циклогексил, пиридил, пирролидинонил и имидазолил необязательно замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из R^{8D} и R^8 ;

каждый R^8 независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, C_{1-6} галогеналкила, C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, фенила, C_{3-7} циклоалкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, фенил- C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкила, (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкила и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкила, где каждый из C_{1-6} алкила, C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, фенила, C_{3-7} циклоалкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, фенил- C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкила, (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкила и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкила R^8 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8A} ;

каждый R^{8A} независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, CN, OR^{a81} и $NR^{c81}R^{d81}$, где каждый из C_{1-3} алкила, 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила R^{8A} необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8B} ;

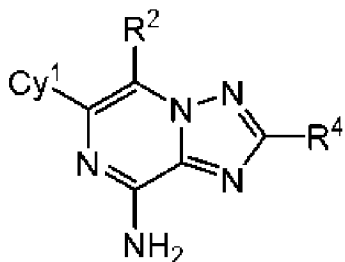
каждый R^{a81} , R^{c81} и R^{d81} независимо выбран из H, C_{1-6} алкила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где каждый из C_{1-6} алкила и 4-7-членного гетероциклоалкила R^{a81} , R^{c81} и R^{d81} необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8B} ;

каждый R^{8B} независимо выбран из галогена и C_{1-3} алкила; и

каждый R^{8D} независимо выбран из OH, CN, галогена, C_{1-6} алкила и C_{1-6} галогеналкила. В некоторых случаях ингибитор A2A/A2B выбран из: 3-(5-амино-2-(гидрокси(фенил)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила или его

фармацевтически приемлемой соли; 3-(5-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидроксиметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрила, или его фармацевтически приемлемой соли; 5-амино-7-(3-циано-2-фторфенил)-2-((2,6-дифторфенил)(гидроксиметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-8-карбонитрила или его фармацевтически приемлемой соли; и 3-(5-амино-2-((2-фтор-6-(((1-метил-2-оксопирролидин-3-ил)амино)метил)фенил)(гидроксиметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B представляет собой соединение Формулы (III):



(III)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

Cy¹ представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

R² выбран из 5-6 членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где каждый из 5-6 членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила из R² необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{2A};

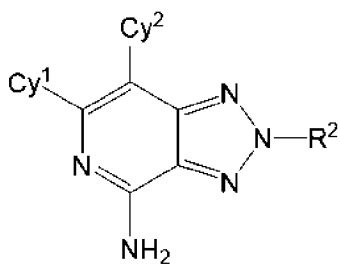
каждый R^{2A} независимо выбран из D, галогена, C₁₋₆ алкила и C₁₋₆ галогеналкила;

R⁴ выбран из фенил-C₁₋₃ алкил-, C₃₋₇ циклоалкил-C₁₋₃ алкил-, (5-6-членный гетероарил)-C₁₋₃ алкил- и (4-7-членный гетероциклоалкил)-C₁₋₃ алкила, где каждый из фенил-C₁₋₃ алкил-, C₃₋₇ циклоалкил-C₁₋₃ алкил-, (5-6-членный гетероарил)-C₁₋₃ алкил- и (4-7-членный гетероциклоалкил)-C₁₋₃ алкил- из R⁴ необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{4A};

каждый R^{4A} независимо выбран из галогена, C₁₋₆ алкила, C₁₋₆ галогеналкила, CN, OR^{a41} и NR^{c41}R^{d41}; и

каждый R^{a41}, R^{c41} и R^{d41} независимо выбран из H и C₁₋₆ алкила. В некоторых случаях ингибитор A2A/A2B выбран из: 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила; 3-(8-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидроксиметил)-5-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли; 3-(8-амино-2-(амино(2,6-дифторфенил)метил)-5-(4-метилоксазол-5-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли; и 3-(8-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидроксиметил)-5-(2,6-диметилпиридин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B представляет собой соединение Формулы (IV):



(IV)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

Cy^1 представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

Cy^2 выбран из 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где каждый из 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила Cy^2 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^6 ;

каждый R^6 независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила и C_{1-6} галогеналкила;

R^2 представляет собой фенил- C_{1-3} алкил- или (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил-, где каждый из фенил- C_{1-3} алкил- и (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил- из R^2 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{2A} ; и

каждый R^{2A} независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила и C_{1-6} галогеналкила.

или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых случаях ингибитор A2A/A2B выбран из: 3-(4-амино-2-(пиридин-2-илметил)-7-(пиримидин-4-ил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил) бензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли; 3-(4-амино-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-7-(пиримидин-4-ил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли; 3-(4-амино-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-7-(пиридин-4-ил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли; и 3-(4-амино-7-(1-метил-1Н-пиразол-5-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)-2-фторбензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B представляет собой 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B представляет собой 3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-2Н-тетразол-2-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B представляет собой 3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-1Н-тетразол-1-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-

[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах реализации ингибитор CD73 человека включает антитело, содержащее:

домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO: 1);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO: 2); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFDY (SEQ ID NO: 3); и

домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO: 4);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO: 5); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPTYT (SEQ ID NO: 6).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CD73 человека включает антитело, которое связывается с CD73 человека в эпитопе в пределах аминокислот 40-53 SEQ ID NO:70.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CD73 человека включает антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25.

В некоторых вариантах реализации ингибитор CD73 человека включает антитело, содержащее:

домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GFTFSSYD (SEQ ID NO: 34);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность MSYDGSNK (SEQ ID NO: 35) или MSYEGSNK (SEQ ID NO: 40); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ATEIAAKGDY (SEQ ID NO: 36); и

домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO: 37);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AAS (SEQ ID NO: 38); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CD73 человека включает антитело, которое связывается с CD73 человека в эпитопе в пределах аминокислот 386-399 и 470-489 SEQ ID NO:70.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CD73 человека включает антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CD73 человека включает антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CD73 человека включает антитело, выбранное из группы, состоящей из 11E1, Medi9447, CPI-006 и BMS-986179.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CD73 человека выбран из группы, состоящей из CB-708 и AB680.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CD73 человека включает антитело, содержащее домен VH, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и домен VL, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:23, и ингибитор A2A/A2B включает 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CD73 человека включает антитело, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24, а легкая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:25, а ингибитор A2A/A2B включает 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CD73 человека включает антитело, содержащее домен VH, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:62, и домен VL, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, и ингибитор A2A/A2B включает 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CD73 человека включает антитело, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30, а легкая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:31, а ингибитор A2A/A2B включает 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-

(пиридин-2 -илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CD73 человека включает антитело, содержащее домен VH, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:63, и домен VL, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, и ингибитор A2A/A2B включает 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CD73 человека включает антитело, содержащее тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33, а легкая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:31, а ингибитор A2A/A2B включает 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2 -илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил.

Во втором аспекте настоящего изобретения представлен способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающий введение субъекту-человеку эффективного количества антитела, которое связывается с CD73 человека, и ингибитора аденозинового рецептора A2A и/или аденозинового рецептора A2B, причем антитело:

(а) содержит домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO: 1);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO: 2); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFDY (SEQ ID NO: 3); и

содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO: 4);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO: 5); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO: 6);

(b) связывается с CD73 человека в эпитопе в пределах аминокислот 40-53 SEQ ID NO:70;

(c) связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25;

(d) содержит домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GFTFSSYD (SEQ ID NO: 34);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность MSYDGSNK (SEQ ID NO: 35) или MSYEGSNK (SEQ ID NO: 40); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ATEIAAKGDY (SEQ ID NO: 36); и

где антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO: 37);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AAS (SEQ ID NO: 38); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39);

(е) связывается с CD73 человека в эпитопе в пределах аминокислот 386-399 и 470-489 SEQ ID NO:70;

(f) связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31; или

(g) связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO: 1);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO: 2); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFDY (SEQ ID NO: 3); и

где антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO: 4);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO: 5); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23. В

некоторых вариантах осуществления антитело содержит легкую цепь, при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления домен VH по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 22, и домен VL по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22, и домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с CD73 человека в эпителии в пределах аминокислот 40-53 SEQ ID NO:70.

В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GFTFSSYD (SEQ ID NO: 34);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность MSYDGSNK (SEQ ID NO: 35) или MSYEGSNK (SEQ ID NO: 40); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ATEIAAKGDY (SEQ ID NO: 36); и

где антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO: 37);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AAS (SEQ ID NO: 38); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39).

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GFTFSSYD (SEQ ID NO: 34);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность MSYDGSNK (SEQ ID NO: 35);

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ATEIAAKGDY (SEQ ID NO: 36); и

где антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO: 37);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AAS (SEQ ID NO: 38); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39). В некоторых случаях домен VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30. В некоторых случаях домен VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61. В некоторых случаях антитело содержит легкую цепь, при этом легкая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31. В некоторых случаях домен VH имеет по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 62, и домен VL имеет по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 61. В некоторых случаях домен VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 62, и домен VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61. В некоторых случаях антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30, и легкая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GFTFSSYD (SEQ ID NO: 34);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность MSYEGSNK (SEQ ID NO: 40);

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ATEIAAKGDY (SEQ ID NO: 36); и

где антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO: 37);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AAS (SEQ ID NO: 38); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39). В некоторых случаях домен VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит тяжелую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33. В некоторых случаях домен VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61. В некоторых случаях антитело

содержит легкую цепь, при этом легкая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31. В некоторых случаях домен VH имеет по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 63, и домен VL имеет по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 61. В некоторых случаях домен VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 63, и домен VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61. В некоторых случаях антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, причем тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33, и легкая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с CD73 человека в эпитопе в пределах аминокислот 386-399 и 470-489 SEQ ID NO:70.

В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор выбран из группы, состоящей из:

7-(5-метилфуран-2-ил)-3-[[6-[[[(3S)-оксолан-3-ил]оксиметил]пиридин-2-ил]метил]триазоло[4,5-d]пиримидин-5-амин; 3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-2H-тетразол-2-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила; 3-[2-амино-6-[1-[[6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-2-ил]метил]триазол-4-ил]пиримидин-4-ил]-2-метилбензонитрила; 6-(2-хлор-6-метилпиридин-4-ил)-5-(4-фторфенил)-1,2,4-триазин-3-амин, 5-бром-2,6-ди(1H-пиразол-1-ил)пиримидин-4-амин; и EOS100850.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор выбран из группы, состоящей из:

7-(5-метилфуран-2-ил)-3-[[6-[[[(3S)-оксолан-3-ил]оксиметил]пиридин-2-ил]метил]триазоло[4,5-d]пиримидин-5-амин; 3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-1H-тетразол-1-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила; 3-[2-амино-6-[1-[[6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-2-ил]метил]триазол-4-ил]пиримидин-4-ил]-2-метилбензонитрила; 6-(2-хлор-6-метилпиридин-4-ил)-5-(4-фторфенил)-1,2,4-триазин-3-амин, 5-бром-2,6-ди(1H-пиразол-1-ил)пиримидин-4-амин; и EOS100850.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных способов злокачественное новообразование характеризуется высокоаденозиновым профилем. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанных способов злокачественное новообразование представляет собой рак головы и шеи, колоректальный рак, рак легкого, меланому, рак

яичников, мочевого пузыря, рак печени или почечно-клеточную карциному.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1А показаны аминокислотные последовательности вариабельного домена тяжелой цепи (VH) и вариабельного домена легкой цепи (VL) для гуманизированных антител CL25 - CL_hu10-4, HzCL25, CL25_hu_10-6 и CL25_hu_11-4.

На Фиг. 1В показаны аминокислотные последовательности VH и VL для гуманизированных антител CL25 - CL25_hu_11-5, CL25_hu_11-6, CL25_hu_8-4 и CL25_hu_8-5.

На Фиг. 1С показаны аминокислотные последовательности VH и VL для гуманизированных антител CL25 - CL25_hu_8-6, CL25_hu_9-4, CL25_hu_9-5 и CL25_hu_9-6.

На Фиг. 1D показано выравнивание VH для CL25 и гуманизированных антител CL25. CDR согласно определению по IMGT подчеркнуты.

На Фиг. 1Е показано выравнивание VL для CL25 и гуманизированных антител CL25. CDR согласно определению по IMGT подчеркнуты.

На Фиг. 2А представлен график, показывающий связывание с клетками (измеренное на основании средней геометрической интенсивности флуоресценции - СГИФ, англ. [GMFI]) для антител в указанных концентрациях на клетках MDA-MB-231.

На Фиг. 2В представлен график, показывающий связывание с клетками (измеренное на основании СГИФ) для CL25 или изотипического контроля (ИК) в указанных концентрациях на клетках A375.

На Фиг. 3А представлен график, показывающий ингибирование клеточного CD73 на клетках A375, на которые воздействовали антителами или изотипическим контролем (ИК) в указанных концентрациях.

На Фиг. 3В представлен график, показывающий ингибирование клеточного CD73 на клетках MDA-MB-231, на которые воздействовали антителами или изотипическим контролем (ИК) в указанных концентрациях.

На Фиг. 3С представлен график, показывающий ингибирование клеточного CD73 на клетках MDA-MB-231, на которые воздействовали антителами или изотипическим контролем (ИК) в указанных концентрациях.

На Фиг. 4 представлен график, показывающий ингибирование рекомбинантного CD73 при воздействии антителами или изотипическим контролем (ИК) в указанных концентрациях.

На Фиг. 5 представлена карта кристаллической структуры CD73 человека (4H2F.pdb) с эпитопом антитела CL25, обозначенным темно-серым цветом (и стрелками).

На Фиг. 6 представлен график, показывающий уровни поверхностного CD73 после 24-часовой инкубации с указанным антителом или изотипическим контролем («ИК») или без воздействия («БВ»), измеренные с помощью непосредственно конъюгированного неконкурирующего антитела.

На Фиг. 7А представлен график, показывающий связывание с клетками (СГИФ)

для антитела 3-F03 в указанных концентрациях на клетках MDA-MB-231.

На Фиг. 7B представлен график, показывающий связывание с клетками (измеренное на основании СГИФ) для 3-F03 или изотипического контроля (ИК) в указанных концентрациях на клетках A375.

На Фиг. 8A представлен график, показывающий ингибирование клеточного CD73 на клетках A375, на которые воздействовали 3-F03 или изотипическим контролем (ИК) в указанных концентрациях.

На Фиг. 8B представлен график, показывающий ингибирование клеточного CD73 на клетках MDA-MB-231, на которые воздействовали антителом 3-F03 или изотипическим контролем (ИК) в указанных концентрациях.

На Фиг. 9 представлен график, показывающий ингибирование рекомбинантного CD73 при воздействии 3-F03 или изотипического контроля (ИК) в указанных концентрациях.

На Фиг. 10 представлена карта кристаллической структуры CD73 человека (4H2F.pdb) с эпитопом антитела 3-F03, обозначенным темно-серым цветом (и стрелками).

На Фиг. 11 представлен график, показывающий поверхностные уровни CD73 после 24-часовой инкубации с 3-F03, изотипическим контролем (ИК) или необработанным (БВ) при измерении с непосредственно конъюгированным неконкурирующим антителом, CL43-Dy650.

На Фиг. 12A-12J показаны аминокислотные последовательности VH и VL для 3-F03 и иллюстративных вариантов 3-F03.

На Фиг. 13 представлен график, показывающий клеточное связывание (СГИФ) для указанных антител в указанных концентрациях на клетках MDA-MB-231.

На Фиг. 14 представлен график, показывающий ингибирование клеточного CD73 на клетках MDA-MB-231, на которые воздействовали указанными антителами или изотипическим контролем в указанных концентрациях.

На Фиг. 15 показаны иллюстративные аминокислотные последовательности CH1-шарнир-CH2-CH3 тяжелой цепи IgG1 человека с мутацией N297A (SEQ ID NO: 73), CH1-шарнир-CH2-CH3 тяжелой цепи IgG1 человека с мутацией N297A с С-концевым лизином (SEQ ID NO: 75) и константная область легкой цепи каппа человека (SEQ ID NO: 74).

На Фиг. 16A представлен график, показывающий соотношение сигналов IFN γ гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF) в CD4⁺ Т-клетках, обработанных (i) титрованным HzCL25, (ii) титрованным соединением 9 или (iii) титрованным HzCL25 и 0,5 мкМ соединения 9.

На Фиг. 16B представлен график, показывающий соотношение сигналов IFN γ HTRF в CD4⁺ Т-клетках, обработанных (i) титрованным антителом А, (ii) титрованным соединением 9 или (iii) титрованным антителом А и 0,5 мкМ соединения 9.

На Фиг. 16C представлен график, показывающий соотношение сигналов IFN γ HTRF в CD4⁺ Т-клетках, обработанных (i) титрованным антителом В, (ii) титрованным соединением 9 или (iii) титрованным антителом В и 0,5 мкМ соединения 9.

На Фиг. 17А представлен график, показывающий соотношение сигналов IFN γ HTRF в CD4⁺ Т-клетках, обработанных (i) титрованным HzCL25, (ii) титрованным соединением 9 или (iii) титрованным соединением 9 и 1 мкг/мл HzCL25.

На Фиг. 17В представлен график, показывающий соотношение сигналов IFN γ HTRF в CD4⁺ Т-клетках, обработанных (i) титрованным HzCL25, (ii) титрованным соединением А или (iii) титрованным соединением А и 1 мкг/мл HzCL25.

На Фиг. 17С представлен график, показывающий соотношение сигналов IFN γ HTRF в CD4⁺ Т-клетках, обработанных (i) титрованным HzCL25, (ii) титрованным соединением В или (iii) титрованным соединением В и 1 мкг/мл HzCL25.

На Фиг. 18А представлен график, показывающий процент пролиферации Т-клеток CD4⁺ в донорских клетках, обработанных: (i) титрованным соединением 9, (ii) титрованным HzCL25 или (iii) титрованным HzCL25 и 0,5 мкМ соединением 9.

На Фиг. 18В представлен график, показывающий процент пролиферации Т-клеток CD4⁺ в донорских клетках, обработанных: (i) титрованным соединением 9, (ii) титрованным антителом А или (iii) титрованным антителом А и 0,5 мкМ соединения 9.

На Фиг. 18С представлен график, показывающий процент пролиферации Т-клеток CD4⁺ в донорских клетках, обработанных: (i) титрованным соединением 9, (ii) титрованным антителом В или (iii) титрованным антителом В и 0,5 мкМ соединения 9.

На Фиг. 19А представлен график, показывающий объем опухоли у мышей, которым вводили (i) человеческий IgG1 и носитель (кружки) или (ii) HzCL25 и соединение 9 (квадраты).

На Фиг. 19В представлен график, показывающий объем опухоли у мышей, которым вводили (i) человеческий IgG1 и носитель (кружки) или (ii) 3-F03_413 и соединение 9 (квадраты).

На Фиг. 20А показаны последовательности ДНК, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь HzCL25.

На Фиг. 20В показана последовательность ДНК, кодирующая тяжелую цепь 3-F03_411.

На Фиг. 20С показаны последовательности ДНК, кодирующие легкую цепь 3-F03_411 и 3-F03_413, и тяжелую цепь 3-F03_413.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе предложена комбинированная терапия, включающая введение ингибитора CD73 и ингибитора аденозинового рецептора A2A и/или A2B. Описанная комбинированная терапия полезна при лечении заболеваний, связанных с активностью аденозиновых рецепторов A2A и/или A2B и/или CD73, включая, например, злокачественное новообразование, воспалительные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания и нейродегенеративные заболевания. Также описаны ингибиторы CD73 и ингибиторы аденозиновых рецепторов A2A/A2B.

CD73

CD73 (также известный как «5'-нуклеотидаза» и «экто-5'-нуклеотидаза»)

представляет собой димерный фермент (ЕС: 3.1.3.5), который функционирует как гомодимер, связанный ГФИ-связью с внешней поверхностью плазматической мембраны. CD73 может отделяться от поверхности клетки и проявлять активность в виде растворимого белка в циркуляции. CD73 катализирует превращение внеклеточного АМФ в аденозин. Ферментативная активность CD73 требует связывания субстрата в открытой конформации CD73. После связывания с субстратом CD73 претерпевает значительные конформационные изменения от открытой к закрытой конформации для превращения АМФ в аденозин (см., например, работу Knapp et al., 2012, *Structure*, 20 (12): 2161-73). CD73 также функционирует как молекула клеточной адгезии и играет роль в регуляции миграции лейкоцитов.

Ферментативная активность CD73 играет роль в развитии и метастазировании рака (см., например, работы Stagg and Smyth, 2010, *Oncogene*, 29:5346-5358; Salmi and Jalkanen, 2012, *OncoImmunology*, 1:247-248, 2012; Stagg, 2012, *OncoImmunology*, 1:217-218; Zhang, 2012, *OncoImmunology*, 1:167-70). Сверхэкспрессия CD73 в раковых клетках нарушает адаптивные противоопухолевые иммунные реакции, усиливая рост опухоли и метастазирование (см., например, работы Niemelä et al., 2004, *J. Immunol.*, 172:1646-1653; Sadej et al., 2006, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 25:1119-1123; Braganhol et al., 2007, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1770:1352-1359; Zhang, 2010, *Cancer Res.*, 70:6407-6411; Zhang, 2012, *OncoImmunology*, 1:67-70).

Иллюстративная аминокислотная последовательность зрелого белка CD73 человека (аминокислоты 27-549 белка под номером доступа NP_002517 базы данных GenBank) представляет собой:

WELTILHTNDVHSRLEQTSSEDSSKCVNASRCMGGVARLFTKVQQIRRAEPNVLL
LDAGDQYQGFTWFTVYKGAEVAHF MNALRYDAMALGNHEFDNGVEGLIEPLLKEAKF
PILSANIKAKGPLASQISGLYLPYKVLPVGDEVVGIVGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEIT
ALQPEVDKCLKTLNVNKKIALGHSGFEMDKLIAQKVRGVDVVVGHSNTFLYTGNPPSKE
VPAGKYPFIVTSDDGRKVPVVQAYAFGKYLGYLKIEFDERGNVISSHGNPILLNSSIPEDP
SIKADINKWRIKLDNYSTQELGKTIVYLDGSSQSCRFRECNMGNLICDAMINNNLRHTDE
MFWNHVSMCILNGGGIRSPIDERNNGTITWENLA AVLPPFGGTFDLVQLKGSTLKKAFEH
SVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVDLSRKPGDRVVKLDVLCTKCRVPSYDPLKMDEVYK
VILPNFLANGGDGFQMIKDELLRHDSDGDQDINVVSTYISKMKVIYPAVEGRIKFS (SEQ
ID NO:70).

Иллюстративная аминокислотная последовательность зрелого белка CD73 мыши (аминокислоты 29-551 белка под номером доступа NP_035981 базы данных GenBank) представляет собой:

WELTILHTNDVHSRLEQTSDDSTKCLNASLCVGGVARLFTKVQQIRKEEPNVLFLL
DAGDQYQGFTWFTVYKGLEVAHF MNILGYDAMALGNHEFDNGVEGLIDPLLRNVKFI
LSANIKARGPLAHQISGLFLPSKVLSVGGEVVGIVGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEISAL
QPEVDKCLKTLNVNKKIALGHSGFEMDKLIAQKVRGVDIVVGHSNTFLYTGNPPSKEVP
AGKYPFIVTADDGRQVPVVQAYAFGKYLGYLKVEFDKGNVITSYGNPILLNSSIPEDA

TIKADINQWRIKLDNYSTQELGRTIVYLDGSTQTCRFRECNMGNLICDAMINNNLRHPD
EMFWNHVSMCIVNGGGIRSPIDEKNNGTITWENLAAVLPFGGTFDLVQLKGSTLKKAFE
HSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDINRKPWNRVQLEVLCTKCRVPIYEPLMDKVYK
VTLPSYLANGGDGFQMIKDELLKHDSGDQDISVVSEYISKMKVVYPAVEGRIKFS (SEQ
ID NO:71).

Иллюстративная аминокислотная последовательность зрелого белка CD73 яванского макака представляет собой:

WELTILHTNDVHSRLEQTSSEDSSKCVNASRCMGGVARLFTKVQQIRRAEPNVLL
LDAGDQYQGTIWFTVYKGAEV AHFMNALRYDAMALGNHEFDNGVEGLIEPLLKEAKF
PILSANIKAKGPLASQISGLYLPYKVLPVGDEVVGIVGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEIT
ALQPEVDKLTNLNVNKIIALGHSGFETDKLIAQKVRGVDVVGGHSTFLYTGNPPSKE
VPAGKYPPFIVTSDDGRKVPVVQAYAFGKYLGYLKIEFDERGNVISSHGPNILLNSSIPEDP
SIKADINKWRIKLDNYSTQELGKTIVYLDGSSQSCRFRFCNMGNLICDAMINNNLRHAD
EMFWNHVSMCILNNGGGIRSPIDERNNGTITWENLAAVLPFGGTFDLVQLKGSTLKKAFE
HSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDLSRKPGDRVVKLDVLCTKCRVPSYDPLKMDIYK
VILPNFLANGGDGFQMIKDELLRHDSGDQDINVVSTYISKMKVIYPAVEGRIKFS (SEQ
ID NO:72).

Антитела к CD73

В этом описании предложены антитела к CD73, которые можно использовать в комбинации с ингибитором аденозинового рецептора A2A и/или A2B при лечении заболеваний, например, злокачественного новообразования. Эти антитела к CD73 могут связывать CD73 человека.

В некоторых случаях антитела связывают CD73 человека и CD73 яванского макака. В некоторых случаях антитела связывают CD73 человека и CD73 яванского макака, и не связывают CD73 мыши. Такие антитела к CD73 включают последовательности моноклонального антитела к CD73, CL25, и его гуманизированной версии, HzCL25, причем эта его гуманизированная версия связывается с высокой аффинностью как с CD73 человека, так и с CD73 яванского макака, и имеет необнаруживаемое связывание с CD73 мыши.

В некоторых случаях антитела связывают CD73 человека, CD73 яванского макака и CD73 мыши. Такие антитела к CD73 включают последовательности человеческого моноклонального антитела к CD73, 3-F03, которое с высокой аффинностью связывается с открытой конформацией CD73 человека, яванского макака и мыши.

Антитело HzCL25

Антитело HzCL25 представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG1/каппа с аланином в положении аспарагин-297 (N297, согласно нумерации ЕС) константной области тяжелой цепи для снижения эффекторной функции. Оно специфически связывает CD73 человека и яванского макака с высокой аффинностью ($K_D \leq 0,5$ нМ) и обладает низкой эффекторной функциональностью.

HzCL25 было сконструировано из химерной версии антитела CL25. Мышиные

вариабельный домен тяжелой цепи CL25 (VH) и вариабельный домен легкой цепи (VL) были получены от мыши, иммунизированной рекомбинантным CD73 человека (SEQ ID NO: 70), содержащим гистициновую метку (HIS-tag). Были определены последовательности антител В-клеток и мышинные вариабельный домен тяжелой цепи (VH) (SEQ ID NO: 26) и вариабельный домен легкой цепи (VL) (SEQ ID NO: 27) были экспрессированы в виде химер с Fc IgG1 человека (константная область тяжелой цепи, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73, и константная область легкой цепи каппа, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 74). В таблице 1, приведенной ниже, показаны аминокислотные последовательности областей, определяющих комплементарность (CDR), CL25 в соответствии с системами нумерации IMGT, по Chothia, по AbM, по Kabat и по Contact. В таблице 1, приведенной ниже, также показаны аминокислотные последовательности зрелых VH и VL CL25.

Таблица 1. CDR, VH и VL CL25

	IMGT	Chothia	AbM	Kabat	Contact
CDR1 VH	GYTFTSYG (SEQ ID NO:1)	GYTFTSY (SEQ ID NO:7)	GYTFTSYGLS (SEQ ID NO:12)	SYGLS (SEQ ID NO:14)	TSYGLS (SEQ ID NO:16)
CDR2 VH	IYPGSGNT (SEQ ID NO:2)	YPGSGN (SEQ ID NO:8)	EIYPGSGNTY (SEQ ID NO:13)	EIYPGSGN TYYNEKF KG (SEQ ID NO:15)	WIGEIYPGS GNTY (SEQ ID NO:28)
CDR3 VH	ARYDYLGS YGFYD (SEQ ID NO:3)	YDYLGS SYGFYD (SEQ ID NO:9)	YDYLGS SYGFYD (SEQ ID NO:9)	YDYLGS YGFYD (SEQ ID NO:9)	ARYDYLGS SYGFYD (SEQ ID NO:18)
CDR1 VL	QDVSTA (SEQ ID NO:4)	KASQDVSTA VA (SEQ ID NO:10)	KASQDVSTAV A (SEQ ID NO:10)	KASQDVS TAVA (SEQ ID NO:10)	STAVAWY (SEQ ID NO:19)
CDR2 VL	SAS (SEQ ID NO:5)	SASYRYN (SEQ ID NO:29)	SASYRYN (SEQ ID NO:29)	SASYRYN (SEQ ID NO:29)	LLIYSASYR Y (SEQ ID NO:20)
CDR3 VL	QQHYNTPYT (SEQ ID NO:6)	QQHYNTPYT (SEQ ID NO:6)	QQHYNTPYT (SEQ ID NO:6)	QQHYNTP YT	QQHYNTPY (SEQ ID NO:6)

	NO:6)	NO:6)		(SEQ ID NO:6)	NO:21)
VH	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCRASGYTFTSYGLSWVKQRTGQGLEWIGEI YPGSGNTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARYDYL GSSYGFYDWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 26)				
VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSA SYRYNGVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYNTPTYTFGGGT KLEIK (SEQ ID NO: 27)				

Чтобы сконструировать HzCL25, последовательности VH и VL CL25 были выровнены с генами VH и VK человека по базе данных. CDR (таблица 1) из мышиного антитела CL25 были привиты к генам VH и VK человека.

В таблице 2, приведенной ниже, показаны аминокислотные последовательности CDR HzCL25 в соответствии с системами нумерации IMGT, по Chothia, по AbM, по Kabat и по Contact. В таблице 2, приведенной ниже, также показаны аминокислотные последовательности зрелых VH, VL, тяжелой цепи и легкой цепи HzCL25.

Таблица 2. Аминокислотные последовательности CDR, VH, VL, тяжелой цепи и легкой цепи HzCL25

	IMGT	Chothia	AbM	Kabat	Contact
CDR1 VH	GYTFTSY G (SEQ ID NO:1)	GYTFTSY (SEQ ID NO:7)	GYTFTSYGL S (SEQ ID NO:12)	SYGLS (SEQ ID NO:14)	TSYGLS (SEQ ID NO:16)
CDR2 VH	IYPGSG NT (SEQ ID NO:2)	YPGSGN (SEQ ID NO:8)	EIYPGSGNT Y (SEQ ID NO:13)	EIYPGSGNT YYNEKFKG (SEQ ID NO:15)	WMGEIYPG SGNTY (SEQ ID NO:17)
CDR3 VH	ARYDYL GSSYGF DY (SEQ ID NO:3)	YDYLGSSYG FDY (SEQ ID NO:9)	YDYLGSSYG FDY (SEQ ID NO:9)	YDYLGSSYG FDY (SEQ ID NO:9)	ARYDYLGS SYGFD (SEQ ID NO:18)
CDR1 VL	QDVSTA (SEQ ID NO:4)	KASQDVSTA VA (SEQ ID NO:10)	KASQDVSTA VA (SEQ ID NO:10)	KASQDVSTA VA (SEQ ID NO:10)	STAVAWY (SEQ ID NO:19)
CDR2 VL	SAS	SASYRYS	SASYRYS	SASYRYS	LLIYSASYR

	(SEQ ID NO:5)	(SEQ ID NO:11)	(SEQ ID NO:11)	(SEQ ID NO:11)	Y (SEQ ID NO:20)
CDR3 VL	QQHYNTPYT (SEQ ID NO:6)	QQHYNTPYT (SEQ ID NO:6)	QQHYNTPYT (SEQ ID NO:6)	QQHYNTPYT (SEQ ID NO:6)	QQHYNTPY (SEQ ID NO:21)
VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFTSYGLSWVRQMPGKGLEWM GEIYPGSGNTYYNEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCA RYDYLGSYGFDYWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 22)				
VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYS ASYRYSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYNTPYTFGG GTKLEIK (SEQ ID NO: 23)				
Тяжелая цепь	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFTSYGLSWVRQMPGKGLEWM GEIYPGSGNTYYNEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCA RYDYLGSYGFDYWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG (SEQ ID NO: 24)				
Легкая цепь	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYS ASYRYSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYNTPYTFGG GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 25)				

Антитела к CD73 могут включать в себя CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, и CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из HzCL25 или CL25. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из HzCL25 (см. таблицу 2). В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из HzCL25 (см. таблицу 2). В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из HzCL25 (см. таблицу 2), и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из HzCL25 (см. таблицу 2). В некоторых

случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из CL25 (см. таблицу 1). В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из CL25 (см. таблицу 1). В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из CL25 (см. таблицу 1), и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из CL25 (см. таблицу 1). В некоторых случаях антитела к CD73 могут иметь, например, 1, 2 или 3 замещения в пределах одной (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) или шести CDR из H₂CL25 или CL25. В некоторых случаях антитела: (i) ингибируют клеточный CD73 (например, снижение активности клеточного CD73 по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 3); и/или (ii) ингибируют растворимый CD73 (например, снижение активности растворимого CD73 по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 4); и/или (iii) связывают CD73 человека или яванского макака в открытой конформации с высокой аффинностью (например, $K_D \leq 0,5$ нМ), но не связывают в значительной степени CD73 мыши в открытой конформации (например, как определено с помощью анализа связывания, описанного в примере 5); и/или (iv) связывают CD73 человека или яванского макака в закрытой конформации с высокой аффинностью (например, $K_D \leq 0,5$ нМ), но не связывают в значительной степени CD73 мыши в закрытой конформации; и/или (v) связываются с эпитопом в пределах аминокислот 40-53 из SEQ ID NO: 70 (т. е. в пределах TKVQQIRRAEPNVL (SEQ ID NO: 76)) (например, как определено с помощью анализа связывания, описанного в примере 5); и/или (vi) снижают АМФ-опосредованную супрессию пролиферации Т-клеток (например, снижение пролиферации Т-клеток по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 16); и/или (vii) снижают уровни CD73 на клеточной поверхности (например, на раковых клетках, например, на раковых клетках меланомы, например, по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с

изотипическим контролем); и/или (viii) уменьшают рост опухоли (например, опухолей меланом, например, по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 17); и/или (ix) снижают уровни свободного CD73 на поверхности клеток (например, раковых клеток, например, раковых клеток меланомы, например, по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем).

Антитела к CD73 могут содержать CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из H₂CL25 или CL25 согласно определению по IMGT, или согласно альтернативному определению CDR, такому как, но не ограничиваясь ими, определению по Kabat, определению по Chothia, определению CDR по AbM определению по областям контакта. Такие антитела к CD73 могут содержать нуль, одно, два или три замещения в CDR1 VH и/или в CDR2 VH, и/или в CDR3 VH из H₂CL25 или CL25. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 могут содержать CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из H₂CL25 или CL25 согласно определению по IMGT, или согласно альтернативному определению CDR, такому как, но не ограничиваясь ими, определению по Kabat, определению по Chothia, определению CDR по AbM определению по областям контакта. Такие антитела к CD73 могут содержать нуль, одно, два или три замещения в CDR1 VL и/или в CDR2 VL, и/или в CDR3 VL из H₂CL25 или CL25. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 1, 2 и 3, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 4, 5 и 6, соответственно. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 7, 8 и 9, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 10, 11 и 6, соответственно. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 12, 13 и 9, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 10, 11 и 6, соответственно. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 14, 15 и 9, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 10, 11 и 6, соответственно. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 16, 17 и 18, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 19, 20 и 21, соответственно. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1

VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 7, 8 и 9, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 10, 29 и 6, соответственно. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 12, 13 и 9, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 10, 29 и 6, соответственно. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 14, 15 и 9, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 10, 29 и 6, соответственно. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 16, 28 и 18, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 19, 20 и 21, соответственно. В некоторых случаях эти антитела: (i) ингибируют клеточный CD73 (например, снижение активности клеточного CD73 по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 3); и/или (ii) ингибируют растворимый CD73 (например, снижение активности растворимого CD73 по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 4); и/или (iii) связывают CD73 человека или яванского макака в открытой конформации с высокой аффинностью (например, $K_D \leq 0,5$ нМ), но не связывают в значительной степени CD73 мыши в открытой конформации (например, как определено с помощью анализа связывания, описанного в примере 5); и/или (iv) связывают CD73 человека или яванского макака в закрытой конформации с высокой аффинностью (например, $K_D \leq 0,5$ нМ), но не связывают в значительной степени CD73 мыши в закрытой конформации; и/или (v) связываются с эпитопом в пределах аминокислот 40-53 из SEQ ID NO: 70 (т. е. в пределах TKVQQIRRAEPNVL (SEQ ID NO: 76)) (например, как определено с помощью анализа связывания, описанного в примере 5); и/или (vi) снижают АМФ-опосредованную супрессию пролиферации Т-клеток (например, снижение пролиферации Т-клеток по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 16); и/или (vii) снижают уровни CD73 на клеточной поверхности (например, на

раковых клетках, например, на раковых клетках меланомы, например, по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем); и/или (viii) уменьшают рост опухоли (например, опухолей меланом, например, по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 17); и/или (ix) снижают уровни свободного CD73 на поверхности клеток (например, раковых клеток, например, раковых клеток меланомы, например, по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем).

В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1-3, соответственно), где VH включает аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен, добавлений и/или делеции относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат тяжелую цепь, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1-3, соответственно), где тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен, добавлений и/или делеции относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 24. В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат

аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4-6, соответственно), где VL включает аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен, добавлений и/или делеции относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 23, 27, 80, и 81. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат легкую цепь, содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4-6, соответственно), где легкая цепь включает аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен, добавлений и /или делеции относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 25. В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат: (i) аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84; и (ii) аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81. В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат: (i) VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1-3, соответственно), где VH включает аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен, добавлений и/или делеции относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84; и (ii) VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4-6, соответственно), где VL включает аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен, добавлений и/или делеции относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 23, 27, 80, и 81. В

некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат: (i) аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 24; и (ii) аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат: (i) тяжелую цепь, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1-3, соответственно), где тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен, добавлений и /или делеции относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:24; и (ii) легкую цепь, содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4-6, соответственно), где легкая цепь включает аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен, добавлений и /или делеции относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:25.

В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH, указанному в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1-3, соответственно), где VH включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VH, указанным в любой из SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84. В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на

92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL, указанному в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из H₂CL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4-6, соответственно), где VL включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VL, указанным в любой из SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81. В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH, указанному в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90% по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VL, указанным в SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81. В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат: (i) VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH H₂CL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1-3, соответственно), где VH включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VH, указанным в любой из SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84, и (ii) VL, содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из H₂CL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4-6, соответственно), где VL включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VL, указанным в любой из SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81.

мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VL, указанным в любой из SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81.

В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH из H₂CL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 22). В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из H₂CL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1-3, соответственно), где VH включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VH H₂CL25 (т.е. аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 22). В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат VH, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична тяжелой цепи из H₂CL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 24). В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат тяжелую цепь, содержащую VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH H₂CL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1-3, соответственно), где VH включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VH H₂CL25 (т.е. аминокислотной последовательностью,

указанной в SEQ ID NO:22), где тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с тяжелой цепью H₂CL25 (т.е. аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:24). В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24. В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL из H₂CL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 23). В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из H₂CL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4-6, соответственно), где VL включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VL H₂CL25 (т.е. аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:23). В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат VL, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична легкой цепи из H₂CL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 25). В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат легкую цепь, содержащую VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL H₂CL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4-6, соответственно), где VL включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%,

по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VL HzCL25 (т.е. аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:23), где легкая цепь включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с легкой цепью HzCL25 (т.е. аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:25). В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25. В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат: (i) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VH HzCL25 (т. е. аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:22); и (ii) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VL HzCL25 (т. е., аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:23). В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат: (i) VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1-3, соответственно), где VH включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VH HzCL25 (т.е. аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:22), и (ii) VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4-6, соответственно), где VL включает аминокислотную

последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VL HzCL25 (т.е. аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:23). В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат: VH, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22, и (ii) VL, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат: (i) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична тяжелой цепи из HzCL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 24); и (ii) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична легкой цепи из HzCL25 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 25). В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат: (i) тяжелую цепь, содержащую VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 1-3, соответственно), где тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с тяжелой цепью из HzCL25 (т.е. аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:24), и (ii) легкую цепь, содержащую VL, содержащий VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 из HzCL25 (см. таблицу 1, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 4-6, соответственно), где легкая цепь включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%,

по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с легкой цепью из HzCL25 (т.е. аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:25). В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат: (i) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, и (ii) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:25.

CD73-связывающий эпитоп HzCL25 находится в пределах аминокислотной последовательности TKVQQIRRAEPNVL (SEQ ID NO: 76) (т.е. аминокислот 40-53 из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 70). В данном изобретении представлены антитела, которые связываются с CD73 в пределах последовательности TKVQQIRRAEPNVL (SEQ ID NO: 76). В данном изобретении также представлены антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и HzCL25. В данном изобретении также представлены антитела, которые конкурентно ингибируют связывание HzCL25 с CD73 человека.

В некоторых вариантах осуществления VH HzCL25 связан с константной областью тяжелой цепи, содержащей домен CH1 и шарнирный домен. В некоторых вариантах осуществления VH HzCL25 связан с константной областью тяжелой цепи, содержащей домен CH3. В некоторых вариантах осуществления в домене CH3 отсутствует С-концевой аминокислотный остаток лизина (K). В некоторых вариантах осуществления домен CH3 содержит С-концевой аминокислотный остаток лизина (K). В определенных вариантах осуществления VH HzCL25 связан с константной областью тяжелой цепи, содержащей домен CH1, шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3 из IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления в домене CH3 из IgG1 человека отсутствует С-концевой аминокислотный остаток лизина (K). В некоторых вариантах осуществления домен CH3 из IgG1 человека содержит С-концевой аминокислотный остаток лизина (K). В определенных вариантах осуществления такое антитело содержит одну или большее число мутаций в константной области тяжелой цепи, которые повышают стабильность антитела. В определенных вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит замещения, которые модифицируют свойства антитела (например, снижают связывание с рецептором Fc, повышают или снижают гликозилирование антитела, снижают связывание с C1q). В определенных вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит аланин в положении аспарагин-297 (N297, согласно нумерации ЕС) константной области тяжелой цепи для снижения эффекторной функции.

В определенных вариантах осуществления антитело к CD73 представляет собой антитело IgG. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG1. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG4. В другом варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG2. В определенных вариантах осуществления антитело к CD73 содержит константную область тяжелой цепи, в которой отсутствуют один или большее число аминокислотных остатков лизина (K) относительно константной области тяжелой цепи дикого типа. Например, в

определенных вариантах осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи, в которой отсутствует С-концевой аминокислотный остаток лизина (K) в домене CH3 константной области тяжелой цепи. В определенных вариантах осуществления антитело к CD73 содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 73. В определенных вариантах осуществления антитело к CD73 содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 75. В определенных вариантах осуществления антитело к CD73 содержит константную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 74. В определенных вариантах осуществления антитело к CD73 содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 73, константную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 74. В определенных вариантах осуществления антитело к CD73 содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 75, константную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 74.

Антитело 3-F03

Антитело 3-F03 представляет собой моноклональное антитело IgG1/каппа человека с аланином в положении аспарагин-297 (N297, согласно нумерации ЕС) константной области тяжелой цепи для снижения эффекторной функции. 3-F03 специфически связывает CD73 человека, яванского макака и мыши с высокой аффинностью ($K_D \leq 2$ нМ) и обладает низкой эффекторной функциональностью.

3-F03 было сконструировано из последовательностей, полученных в ходе нескольких раундов селекции из библиотеки одного донора. Кассеты scFv из этого пула затем рекомбинировали в библиотеку векторов дрожжевого дисплея, которую подвергали селекции с помощью FACS с использованием CD73 мыши (SEQ ID NO: 71). Аминокислотные последовательности дрожжевой кассеты scFv 3-F03 указаны в SEQ ID NO: 77 и 65, соответственно:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMS
YDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQ
GTLVTVSS (SEQ ID NO: 77); и

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQ
SGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ ID
NO: 65).

Чтобы сконструировать антитело 3-F03, дрожжевые VH и VL 3-F03 модифицировали следующим образом и клонировали в каркас IgG1/каппа человека. Для получения VH удаляли N-концевой глутамат (E) дрожжевого VH 3-F03 (SEQ ID NO: 77), а треонин (T) в положении H77 по Kabat из SEQ ID NO: 77 (т. е. положение 78 в SEQ ID NO: 77) замещали аланином (A). Для получения VL удаляли N-концевой аланин (A) из

SEQ ID NO: 65. Полученное в результате полноразмерное антитело 3-F03 человека содержит VH и VL, указанные в аминокислотных последовательностях SEQ ID NO: 60 и 61, соответственно. Полученное в результате полноразмерное антитело 3-F03 человека указано в данном документе как «3-F03». В таблице 3, приведенной ниже, показаны аминокислотные последовательности CDR 3-F03 в соответствии с системами нумерации IMGT, по Chothia, по AbM, по Kabat и по Contact. В таблице 3, приведенной ниже, также показаны аминокислотные последовательности зрелых VH, VL, тяжелой цепи и легкой цепи 3-F03.

Таблица 3. Аминокислотные последовательности CDR, VH и VL 3-F03

	IMGT	Chothia	AbM	Kabat	Contact
CDR1 VH	GFTFSSYD (SEQ ID NO: 34)	GFTFSSY (SEQ ID NO: 41)	GFTFSSYDM H (SEQ ID NO: 46)	SYDMH (SEQ ID NO: 49)	SSYDMH (SEQ ID NO: 53)
CDR2 VH	MSYDGSNK (SEQ ID NO: 35)	SYDGSN (SEQ ID NO: 42)	VMSYDGSN KY (SEQ ID NO: 47)	VMSYDGSN KYYADSVK G (SEQ ID NO: 50)	WVAVMSYD GSNKY (SEQ ID NO: 54)
CDR3 VH	ATEIAAKG DY (SEQ ID NO: 36)	EIAAKGDY (SEQ ID NO: 52)	EIAAKGDY (SEQ ID NO: 52)	EIAAKGDY (SEQ ID NO: 52)	ATEIAAKGD (SEQ ID NO: 56)
CDR1 VL	QGISNY (SEQ ID NO: 37)	RASQGISNY LA (SEQ ID NO: 44)	RASQGISNY LA (SEQ ID NO: 44)	RASQGISNY LA (SEQ ID NO: 44)	SNYLAWY (SEQ ID NO: 57)
CDR2 VL	AAS (SEQ ID NO: 38)	AASTLQS (SEQ ID NO: 45)	AASTLQS (SEQ ID NO: 45)	AASTLQS (SEQ ID NO: 45)	LLIYAASTL Q (SEQ ID NO: 58)
CDR3 VL	QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39)	QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39)	QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39)	QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39)	QQSYSTP (SEQ ID NO: 59)
VH	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALY LQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 60)				
VL	IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 61)				
HC	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVM				

	SYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAA KGDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 66)
LC	IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASL QSGVPSRFSFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO: 31)

В данном документе также описаны варианты 3-F03. 3-F03_411 идентично 3-F03, за исключением того, что тяжелая цепь 3-F03_411: (i) содержит N-концевой глутамат (E), который отсутствует в 3-F03, и (ii) не содержит C-концевой лизин, присутствующий в 3-F03. В таблице 4 ниже показаны аминокислотные последовательности зрелых VH, VL, тяжелой цепи и легкой цепи 3-F03_411. 3-F03_413 идентичен 3-F03_411, за исключением того, что он содержит глутамат (E) в положении H53 VH по Kabat (положение 54 SEQ ID NO: 60) вместо аспарагиновой кислоты (D). В таблице 5, приведенной ниже, показаны аминокислотные последовательности CDR 3-F03_413 в соответствии с системами нумерации IMGT, по Chothia, по AbM, по Kabat и по Contact. В таблице 5, приведенной ниже, также показаны аминокислотные последовательности зрелых VH, VL, тяжелой цепи и легкой цепи 3-F03_413. Дополнительные варианты описаны в приведенных ниже примерах (см. **Фиг. 12А-Фиг. 12J**).

Таблица 4. Аминокислотные последовательности HC и LC 3-F03_411

	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWV AVMSYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYC ATEIAAKGDYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 62)
VL	IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAA STLQSGVPSRFSFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTR LEIK (SEQ ID NO: 61)
Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWV AVMSYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYC ATEIAAKGDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV

	KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL SPG (SEQ ID NO:30)
Легкая цепь	IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAA STLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTR LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 31)

Таблица 5. Аминокислотные последовательности CDR, VH, VL, HC, LC 3-F03_413

	IMGT	Chothia	AbM	Kabat	Contact
CDR1 VH	GFTFSSYD (SEQ ID NO: 34)	GFTFSSY (SEQ ID NO: 41)	GFTFSSYDM H (SEQ ID NO: 46)	SYDMH (SEQ ID NO: 49)	SSYDMH (SEQ ID NO: 53)
VH CDR2	MSYEGSNK (SEQ ID NO: 40)	SYEGSN (SEQ ID NO: 43)	VMSYEGSN KY (SEQ ID NO: 48)	VMSYEGSN KYYADSVK G (SEQ ID NO: 51)	WVAVMSYE GSNKY (SEQ ID NO: 55)
CDR3 VH	ATEIAAKG DY (SEQ ID NO:36)	EIAAKGDY (SEQ ID NO: 52)	EIAAKGDY (SEQ ID NO: 52)	EIAAKGDY (SEQ ID NO: 52)	ATEIAAKGD (SEQ ID NO: 56)
CDR1 VL	QGISNY (SEQ ID NO: 37)	RASQGISNY LA (SEQ ID NO: 44)	RASQGISNY LA (SEQ ID NO: 44)	RASQGISNY LA (SEQ ID NO: 44)	SNYLA WY (SEQ ID NO: 57)
CDR2 VL	AAS (SEQ ID NO: 38)	AASTLQS (SEQ ID NO: 45)	AASTLQS (SEQ ID NO: 45)	AASTLQS (SEQ ID NO: 45)	LLIYA ASTLQ (SEQ ID NO: 58)
CDR3 VL	QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39)	QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39)	QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39)	QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39)	QQSYSTP (SEQ ID NO: 59)
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAV				

	MSYEGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIA AKGDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 63)
VL	IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLT QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 61)
HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAV MSYEGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIA AKGDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 33)
LC	IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLT QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO: 31)

Антитела к CD73 могут включать в себя CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, и CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03 или 3-F03_413. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03 (см. таблицу 3). В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03 (см. таблицу 3). В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03 (см. таблицу 3), и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03 (см. таблицу 3). В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03_413 (см. таблицу 5). В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03_413 (см. таблицу 5). В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03_413 (см. таблицу 5), и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03_413 (см. таблицу 5). В некоторых случаях антитела к CD73 могут иметь, например, 1, 2 или 3 замещения в пределах одной (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) или шести CDR из 3-F03 или 3-F03_413. В некоторых случаях такие антитела: (i) ингибируют клеточный CD73 (например, снижение активности клеточного CD73 по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на

90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 10); и/или (ii) ингибируют растворимый CD73 (например, снижение активности растворимого CD73 по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 11); и/или (iii) связывают CD73 человека, яванского макака или мыши в открытой конформации с высокой аффинностью (например, $K_D \leq 2$ нМ) (например, как определено с помощью анализа связывания, описанного в примере 12); и/или (iv) не связывают CD73 человека, яванского макака и мыши в закрытой конформации; и/или (v) связываются с эпитопом в пределах аминокислот 386-399 из SEQ ID NO: 70 (т.е. в пределах AAVLPFGGTFDLVQ (SEQ ID NO: 78), аминокислот 470-489 из SEQ ID NO: 70 (т.е. в пределах ILPNFLANGGDGFQMIKDEL (SEQ ID NO: 79)) (например, как определено с помощью анализа связывания, описанного в примере 12); и/или (vi) снижают АМФ-опосредованную супрессию пролиферации Т-клеток (например, снижение пролиферации Т-клеток по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 16); и/или (vii) снижают уровни CD73 на клеточной поверхности (например, на раковых клетках, например, на раковых клетках меланомы, например, по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем); и/или (viii) уменьшают рост опухоли (например, опухолей меланом, например, по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 17).

Антитела к CD73 могут содержать CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03 или 3-F03_413 согласно определению по IMGT, или согласно альтернативному определению CDR, такому как, но не ограничиваясь ими, определению по Kabat, определению по Chothia, определению CDR по AbM, определению по Contact. Такие антитела к CD73 могут содержать нуль, одно, два или три замещения в CDR1 VH и/или в CDR2 VH, и/или

в CDR3 VH из 3-F03 или 3-F03_413. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 могут содержать CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03 или 3-F03_413 согласно определению по IMGT, или согласно альтернативному определению CDR, такому как, но не ограничиваясь ими, определению по Kabat, определению по Chothia, определению CDR по AbM определению по Contact. Такие антитела к CD73 могут содержать нуль, одно, два или три замещения в CDR1 VL и/или в CDR2 VL, и/или в CDR3 VL из 3-F03 или 3-F03_413. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 34, 35 и 36, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 37, 38 и 39, соответственно. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 41, 42 и 52, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 44, 45 и 39, соответственно. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 46, 47 и 52, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 44, 45 и 39, соответственно. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 49, 50 и 52, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 44, 45 и 39, соответственно. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 53, 54 и 56, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 57, 58 и 59, соответственно. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 34, 40 и 36, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 37, 38 и 39, соответственно. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 41, 43 и 52, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 44, 45 и 39, соответственно. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 46, 48 и 52, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 44, 45 и 39, соответственно. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 49, 51 и 52, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 44, 45 и 39, соответственно. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, указанные в SEQ ID NO: 53, 55 и 56, соответственно, и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, указанные в SEQ ID NO: 57, 58 и 59, соответственно. В некоторых случаях такие антитела: (i) ингибируют клеточный CD73 (например, снижение активности клеточного CD73 по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по

меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 10); и/или (ii) ингибируют растворимый CD73 (например, снижение активности растворимого CD73 по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 11); и/или (iii) связывают CD73 человека, яванского макака или мыши в открытой конформации с высокой аффинностью (например, $K_D \leq 2$ нМ) (например, как определено с помощью анализа связывания, описанного в примере 12); и/или (iv) не связывают CD73 человека, яванского макака и мыши в закрытой конформации; и/или (v) связываются с эпитопом в пределах аминокислот 386-399 из SEQ ID NO: 70 (т.е. в пределах AAVLPFGGTFDLVQ (SEQ ID NO: 78), аминокислот 470-489 из SEQ ID NO: 70 (т.е. в пределах ILPNFLANGGDGFQMIKDEL (SEQ ID NO: 79)) (например, как определено с помощью анализа связывания, описанного в примере 12); и/или (vi) снижают АМФ-опосредованную супрессию пролиферации Т-клеток (например, снижение пролиферации Т-клеток по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 16); и/или (vii) снижают уровни CD73 на клеточной поверхности (например, на раковых клетках, например, на раковых клетках меланомы, например, по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем); и/или (viii) уменьшают рост опухоли (например, опухолей меланом, например, по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем, как определено, например, с помощью анализа, описанного в примере 17).

В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из

последовательностей с SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88. В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат VH, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH 3-F03 или его варианта (например, 3-F03_411 или 3-F03_413) (см., например, таблицу 3 и таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, например, аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34-36, соответственно, или SEQ ID NO: 34, 40 и 36, соответственно), где VH включает аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотные замены, добавления и/или делеции относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 30, 33 и 66. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат тяжелую цепь, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03 или его варианта (например, 3-F03_411 или 3-F03_413) (см., например, таблицу 3 и таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34-36, соответственно, или в SEQ ID NO: 34, 40 и 36, соответственно), при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 30, 33 и 66. В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат VL, содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL 3-F03 или его варианта (например, 3-F03_411 или 3-F03_413) (см., например, таблицу 3 и таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, например, аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно), где VL включает аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен, добавлений и/или делеции относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат легкую цепь, содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03 или его варианта (например, 3-F03_411 или 3-F03_413) (см., например, таблицу 3 и таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е.

аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно), при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31. В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат: (i) аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88; и (ii) аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен, добавлений и/или делеций относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат: (i) VH, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03 или его варианта (например, 3-F03_411 или 3-F03_413) (см., например, таблицу 3 и таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, например, аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34-36, соответственно, или SEQ ID NO: 34, 40, и 36, соответственно), где VH включает аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен, добавлений и/или делеции относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88; и (ii) VL, содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03 или его варианта (например, 3-F03_411 или 3-F03_413) (см., например, таблицу 3 и таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, например, аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно), где VL включает аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен, добавлений и/или делеции относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат: (i) аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен, добавлений и/или делеций относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 30, 33 и 66; и (ii) аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замен, добавлений и/или делеций относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат: (i) тяжелую цепь, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03 или его варианта (например, 3-F03_411 или 3-F03_413) (см., например, таблицу 3 и таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, например, аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34-36, соответственно, или SEQ ID NO: 34, 40 и 36, соответственно), где тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10)

аминокислотные замены, добавления и/или делеции относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 30, 33, и 66; и (ii) легкую цепь, содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03 или его варианта (например, 3-F03_411 или 3-F03_413) (см., например, таблицу 3 и таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно), при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31.

В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH, указанному в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88. В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03 или его варианта (например, 3-F03_411 или 3-F03_413) (см., например, таблицу 3 и таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34-36, соответственно, или в SEQ ID NO: 34, 40 и 36, соответственно), при этом VH содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH, указанному в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88. В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL, указанному в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03 или его варианта (например, 3-F03_411 или 3-F03_413) (см., например, таблицу 3 и таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно),

при этом VL содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL, указанному в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH, указанному в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77, и 85-88, и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VL, указанным в SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат: (i) VH, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03 или его варианта (например, 3-F03_411 или 3-F03_413) (см., например, таблицу 3 и таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, например аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34-36, соответственно, или SEQ ID NO: 34, 40 и 36, соответственно), где VH включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VH, указанным в любой из SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88, и (ii) VL, содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03 или его варианта (например, 3-F03_411 или 3-F03_413) (см., например, таблицу 3 и таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, например, аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно), где VL включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VL, указанным в любой из SEQ ID NO: 61,

64 и 65.

В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH из 3-F03_411 или 3-F03_413 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 62 или 63, соответственно). В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат VH, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03_411 (см. таблицу 3, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34-36, соответственно), где VH включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VH из 3-F03_411 (т.е. аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:62). В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат VH, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03_413 (см. таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34, 40, и 36, соответственно), где VH включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VH 3-F03_411 (т.е. аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:63). В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат VH, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат VH, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична тяжелой цепи из 3-F03_411 или 3-F03_F13 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 30 или

33, соответственно). В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат тяжелую цепь, содержащую VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03_411 (см. таблицу 3, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34-36, соответственно), где тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с тяжелой цепью из 3-F03_411 (т.е. аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:30). В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат тяжелую цепь, содержащую VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из 3-F03_413 (см. таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34, 40, и 36, соответственно), где тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с тяжелой цепью из 3-F03_413 (т.е. аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:33). В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33. В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL из 3-F03_411 или 3-F03_413 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 61). В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат VL, содержащую CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03_411 или 3-F03_413 (см. таблицу 3, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно), где VL включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по

меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VL из 3-F03_411 или 3-F03_413 (т.е. аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:61). В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат VL, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична легкой цепи из 3-F03_411 или 3-F03_413 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31). В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат легкую цепь, содержащую VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03_411 или 3-F03_413 (см. таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно), где легкая цепь включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с легкой цепью из 3-F03_411 или 3-F03_413 (т.е. аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31. В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VH из 3-F03_411 или 3-F03_413 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 62 или 63, соответственно), и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична VL из 3-F03_411 или 3-F03_413 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 61). В

определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат: (i) VH, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH 3-F03_411 (см. таблицу 3, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34-36, соответственно), где VH включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VH 3-F03 (т.е. аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:62), и (ii) VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03_411 (см. таблицу 3, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно), где VL включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VL 3-F03 (т.е. аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:61). В определенных вариантах осуществления антитела к CD73 содержат: (i) VH, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH 3-F03_413 (см. таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34, 40 и 36, соответственно), где VH включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VH 3-F03_413 (т.е. аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:63), и (ii) VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из 3-F03_413 (см. таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно), где VL включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VL из 3-F03_413 (т.е. аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:61). В некоторых вариантах осуществления антитело к CD73 содержит: (i) VH, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:62; и (ii) VL, включающую аминокислотную последовательность,

указанную в SEQ ID NO:61. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD73 содержит: (i) VH, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:63; и (ii) VL, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:61. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична тяжелой цепи из 3-F03_411 или 3-F03_413 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 30 или 33), и аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична легкой цепи из 3-F03_411 или 3-F03_413 (т. е. аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31). В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат: (i) тяжелую цепь, содержащую VH, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH 3-F03_411 (см. таблицу 3, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34-36, соответственно), где тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с тяжелой цепью из 3-F03_411 (т.е. аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:30), и (ii) легкую цепь, содержащую VL, содержащий VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 из 3-F03_411 (см. таблицу 3, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно), где легкая цепь включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с легкой цепью из 3-F03 (т.е. аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления антитела к CD73 содержат: (i) тяжелую цепь, содержащую VH, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 из VH 3-F03_413 (см. таблицу 5, например, в соответствии с

определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34, 40, и 36, соответственно), где тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с тяжелой цепью из 3-F03 (т.е. аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:33), и (ii) легкую цепь, содержащую VL, содержащий VL CDR1, VL CDR2 и VL CDR3 из 3-F03_413 (см. таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39, соответственно), где легкая цепь включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с легкой цепью из 3-F03_413 (т.е. аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления антитело к CD73 содержит: (i) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:30; и (ii) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:31. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD73 содержит: (i) тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:33; и (ii) легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:31.

CD73-связывающий эпитоп 3-F03 (и его вариантов, например, 3-F03_411 и 3-F03_413) содержит AAVLPFGGTFDLVQ (SEQ ID NO: 78) (т. е. аминокислоты 386-399 из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 70) и ILPNFLANGGDGFQMIKDEL (SEQ ID NO: 79) (т. е. аминокислоты 470-489 из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 70). В данном изобретении представлены антитела, которые связываются с CD73 в эпитопе в пределах последовательностей AAVLPFGGTFDLVQ (SEQ ID NO: 78) и ILPNFLANGGDGFQMIKDEL (SEQ ID NO: 79). В данном изобретении представлены антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и 3-F03 (или его вариант, например, 3-F03_411 или 3-F03_413). В данном изобретении также представлены антитела, которые конкурентно ингибируют связывание 3-F03 (или его варианта, например, 3-F03_411 или 3-F03_413) с CD73 человека.

В некоторых вариантах осуществления VH 3-F03 (или его вариант, например, 3-F03_411 или 3-F03_413) связан с константной областью тяжелой цепи, содержащей домен CH1 и шарнирный домен. В некоторых вариантах осуществления VH 3-F03 (или его варианта, например, 3-F03_411 или 3-F03_413) связан с константной областью тяжелой

цепи, содержащей домен СН3. В некоторых вариантах осуществления в домене СН3 отсутствует С-концевой аминокислотный остаток лизина (К). В некоторых вариантах осуществления домен СН3 содержит С-концевой аминокислотный остаток лизина (К). В определенных вариантах осуществления VH 3-F03 (или его варианта, например, 3-F03_411 или 3-F03_413) связан с константной областью тяжелой цепи, содержащей домен СН1, шарнирный домен, домен СН2 и домен СН3 из IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления в домене СН3 из IgG1 человека отсутствует С-концевой аминокислотный остаток лизина (К). В некоторых вариантах осуществления домен СН3 из IgG1 человека содержит С-концевой аминокислотный остаток лизина (К). В определенных вариантах осуществления такое антитело содержит одну или большее число мутаций в константной области тяжелой цепи, которые повышают стабильность антитела. В определенных вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит замещения, которые модифицируют свойства антитела (например, снижают связывание с рецептором Fc, повышают или снижают гликозилирование антитела, снижают связывание с C1q). В определенных вариантах осуществления константная область тяжелой цепи содержит аланин (А) в положении аспарагин-297 (N297, согласно нумерации ЕС) константной области тяжелой цепи для снижения эффекторной функции.

В определенных вариантах осуществления антитело к CD73 представляет собой антитело IgG. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG1. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG4. В другом варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG2. В определенных вариантах осуществления антитело к CD73 содержит константную область тяжелой цепи, в которой отсутствуют один или большее число аминокислотных остатков лизина (К) относительно константной области тяжелой цепи дикого типа. Например, в определенных вариантах осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи, в которой отсутствует С-концевой аминокислотный остаток лизина (К) в домене СН3 константной области тяжелой цепи. В определенных вариантах осуществления антитело к CD73 содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 73. В определенных вариантах осуществления антитело к CD73 содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 75. В определенных вариантах осуществления антитело к CD73 содержит константную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 74. В определенных вариантах осуществления антитело к CD73 содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 73, константную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 74. В определенных вариантах осуществления антитело к CD73 содержит константную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 75, константную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:

74.

Дополнительные антитела и ингибиторы к CD73

В данном описании представлены дополнительные антитела к CD73 и ингибиторы CD73, которые можно использовать в комбинации с ингибитором аденозинового рецептора A2A и/или A2B при лечении заболеваний, например, злокачественного новообразования.

Другие антитела к CD73, применимые в комбинации с ингибитором аденозинового рецептора A2A и/или A2B в способах, описанных в данном документе, известны в данной области техники. См., например, патенты США №№ 9090697, 9388249, 9605080, 9938356, 10100129 и 10287362, публикации заявок на патенты США №№. 2004/0142342, 2007/0009518, 2011/0300136, 2018/0009899, 2018/0030144, 2018/0237536, 2018/0264107, 2019/0031766, 2019/0225703, 2019/0077873 и 2019/0256598, и публикации международных заявок на патенты №№. WO 2004/079013, WO 2011/089004, WO 2014/153424, WO 2017/100670, WO 2001/080884, WO 2018/110555, WO 2018/137598, WO 2018/187512, WO 2018/215535, WO 2018/237173, WO 2019/170131, WO 2019/173692, and WO 2019/173291, каждый из которых полностью включен в данный документ посредством ссылки.

В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из VH, который включает аминокислотную последовательность EIQ LQQSGPELVKPGASVKVSCASGYAFTSYNMYWVKQSHGKSLEWIGYIDPYNGGT SYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCARGYGNYKAWFAYWGQGT LVTVSA (SEQ ID NO:100), и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL из VL, который включает аминокислотную последовательность DAVMTQTTPKFLLVSA GDRVTITCKASQSVTNDVAWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGV PDRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:101). В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:100, и VL, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:101. В некоторых случаях антитело к CD73 представляет собой 11E1 (см. публикацию заявки на патент США № 2018/0237536, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки). В некоторых случаях антитело к CD73 содержит тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:102. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:103. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:102, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:103.

В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH из VH, который включает аминокислотную последовательность EVQLLES GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGRTY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGRVDEWGRGTLVTVS

S (SEQ ID NO:96), и VL, содержащую CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL из VL, который включает аминокислотную последовательность QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRSLSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:97). В некоторых случаях антитело к CD73 содержит VH, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:96, и VL, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:97. В некоторых случаях антитело к CD73 представляет собой Medi9447 (см. патент США № 10287362, который полностью включен в данный документ посредством ссылки). В некоторых случаях антитело к CD73 содержит тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:98. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:99. В некоторых случаях антитело к CD73 содержит тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:98, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:99.

В некоторых случаях ингибитором CD73 является CPI-006 (Corvus; см. публикацию заявки на патент США № US 2018/0009899 A1 и публикацию международной заявки на патент № WO 2017/100670 A1, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки).

В некоторых случаях ингибитор CD73 представляет собой CB-708 SM (Calithera).

В некоторых случаях ингибитор CD73 представляет собой AB680 (Arcus).

В некоторых случаях ингибитор CD73 представляет собой BMS-986179 (BMS).

Фрагменты антител

В некоторых случаях антитело к CD73 представляет собой фрагмент антитела. Фрагменты описанных антител, описанных в данном документе, (например, Fab, Fab', F(ab')₂, Facb и Fv) можно получать путем протеолитического расщепления интактных антител. Например, фрагменты антител можно получать путем обработки целого антитела ферментом, таким как папаин, пепсин или плазмин. Расщепление целых антител папаином приводит к образованию фрагментов F(ab)₂ или Fab; расщепление целых антител пепсином приводит к образованию F(ab')₂ или Fab'; а расщепление целых антител плазмином приводит к образованию фрагментов Facb.

В качестве альтернативы фрагменты антител можно получать рекомбинантно. Например, нуклеиновые кислоты, кодирующие фрагменты антител, представляющие интерес, можно сконструировать, ввести в вектор экспрессии и экспрессировать в подходящих клетках-хозяевах. См., например, работы Co, M.S. et al., J. Immunol., 152:2968-2976 (1994); Better, M. and Horwitz, A.H., Methods in Enzymology, 178:476-496 (1989); Plueckthun, A. and Skerra, A., Methods in Enzymology, 178:476-496 (1989); Lamoyi, E., Methods in Enzymology, 121:652-663 (1989); Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology, (1989) 121:663-669 (1989); and Bird, R.E. et al., TIBTECH, 9:132-137 (1991)). Фрагменты антител могут экспрессироваться в E. Coli и секретироваться из нее, что позволяет легко

получать большое количество указанных фрагментов. Фрагменты антител можно выделять из фаговых библиотек антител. В качестве альтернативы фрагменты Fab'-SH можно непосредственно выделять из *E. coli* и химически соединять с образованием фрагментов F(ab)₂ (Carter et al., Bio/Technology, 10:163-167 (1992)). Согласно другому подходу фрагменты F(ab')₂ можно непосредственно выделять из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Фрагменты Fab и F(ab')₂ с увеличенным периодом полужизни *in vivo*, содержащие остатки эпитопа связывания рецептора реутилизации, описаны в патенте США № No. 5869046.

Миниантитела

В некоторых случаях антитело к CD73 представляет собой миниантитело. Миниантитела антител к CD73 включают в себя диатела, одноцепочечные (scFv) и одноцепочечные (Fv)₂ (sc(Fv)₂) антитела.

«Диатело» представляет собой двухвалентное миниантитело, сконструированное путем слияния генов (см., например, Holliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90:6444-6448 (1993); EP 404,097; WO 93/11161). Диатела представляют собой димеры, состоящие из двух полипептидных цепей. Домены VL и VH каждой полипептидной цепи диатела связаны линкерами. Число аминокислотных остатков, которые образуют линкер, может составлять от 2 до 12 остатков (например, 3-10 остатков, или пять, или около пяти остатков). Линкеры полипептидов в диателе, как правило, слишком короткие, чтобы позволить VL и VH связываться друг с другом. Следовательно, VL и VH, кодируемые в одной и той же полипептидной цепи, не могут образовывать одноцепочечный фрагмент вариабельной области, а вместо этого образуют димер с другим одноцепочечным фрагментом вариабельной области. Вследствие этого диатело имеет два антигенсвязывающих сайта.

ScFv представляет собой одноцепочечное полипептидное антитело, полученное путем связывания VH и VL линкером (см., например, Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85:5879-5883 (1988); and Plickthun, "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol.113, Ed Resenbarg and Moore, Springer Verlag, New York, pp.269-315, (1994)). Порядок соединения VH и VL не ограничен особым образом, и они могут быть расположены в любом порядке. Примеры порядков расположения включают: [VH] линкер [VL]; или [VL] линкер [VH]. Вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи в scFv можно получить из любого антитела к CD73, описанного в данном документе.

sc(Fv)₂ представляет собой миниантитело, в котором два VH и два VL связаны линкером с образованием одной цепи (Hudson, et al., J. Immunol. Methods, (1999) 231: 177-189 (1999)). sc(Fv)₂ можно получить, например, путем соединения scFv-фрагментов с линкером. sc(Fv)₂ по настоящему изобретению предпочтительно включают антитела, в которых два VH и два VL расположены в следующем порядке: VH, VL, VH и VL ([VH] линкер [VL] линкер [VH] линкер [VL]), начиная с N-конца одноцепочечного полипептида; однако порядок двух VH и двух VL не ограничен вышеуказанной схемой, и они могут быть расположены в любом порядке.

Биспецифические антитела

В некоторых случаях антитело к CD73 представляет собой биспецифическое антитело. Биспецифические антитела представляют собой антитела, которые обладают специфичностью связывания с по меньшей мере двумя различными эпитопами. Иллюстративные биспецифические антитела могут связываться с двумя различными эпитопами белка CD73. Другие такие антитела могут объединять в себе сайт связывания CD73 с сайтом связывания другого белка. Биспецифические антитела можно получить в виде полноразмерных антител или их низкомолекулярных форм (например, биспецифические антитела $F(ab')_2$, биспецифические антитела $sc(Fv)_2$, биспецифические антитела - диатела).

Классическое получение полноразмерных биспецифических антител основано на коэкспрессии двух пар легкая цепь/тяжелая цепь иммуноглобулина, при этом две цепи имеют разную специфичность (Millstein et al., Nature, 305: 537-539 (1983)). В другом подходе вариабельные домены антител с желаемой специфичностью связывания сливают с последовательностями константных доменов иммуноглобулинов. ДНК, кодирующие слитые структуры тяжелой цепи иммуноглобулина и, если желательно, легкой цепи иммуноглобулина, вставляют в отдельные векторы экспрессии и совместно трансфицируют в подходящую клетку-хозяина. Это обеспечивает повышенную гибкость в регулировании пропорций трех полипептидных фрагментов. Тем не менее, возможно вставить кодирующие последовательности для двух или для всех трех полипептидных цепей в один вектор экспрессии, когда экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных соотношениях приводит к высоким выходам.

Согласно другому подходу, описанному в патенте США № 5731168, между парой молекул антител можно сконструировать поверхность взаимодействия таким образом, чтобы максимизировать процент гетеродимеров, получаемых из культуры рекомбинантных клеток. Предпочтительная поверхность взаимодействия содержит по меньшей мере часть домена СН3. В данном способе одну или большее число малых боковых цепей аминокислот с поверхности взаимодействия первой молекулы антитела заменяют более крупными боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). На поверхность взаимодействия второй молекулы антитела создают компенсационные «полости», имеющие размер, идентичный или сходный с размером большой (-их) боковой (-ых) цепи (цепей), путем замены больших аминокислотных боковых цепей меньшими (например, аланином или треонином). Это обеспечивает механизм увеличения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры.

Биспецифические антитела включают в себя перекрестно-сшитые или «гетероконъюгатные» антитела. Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть связано с авидином, другое - с биотином. Гетероконъюгатные антитела можно получать с применением любых подходящих способов перекрестного сшивания.

Технология «диатела» обеспечивает альтернативный механизм для получения

биспецифических фрагментов антител. Фрагменты содержат VH, соединенный с VL посредством линкера, который является слишком коротким, чтобы позволить соединение между двумя доменами на одной цепи. Соответственно, домены VH и VL одного фрагмента вынуждены соединяться с комплементарными доменами VL и VH другого фрагмента, тем самым образуя два антигенсвязывающих участка.

Поливалентные антитела

В некоторых случаях антитело к CD73 представляет собой поливалентное антитело. Поливалентное антитело может быть интернализировано (и/или катаболизировано) клеткой, экспрессирующей антиген, с которым связываются антитела, быстрее, чем бивалентное антитело. Антитела, описанные в данном документе, могут представлять собой поливалентные антитела с тремя или большим числом антигенсвязывающих сайтов (например, четырехвалентные антитела), которые можно легко получить путем рекомбинантной экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидные цепи антитела. Поливалентное антитело может содержать домен димеризации и три или большее число антигенсвязывающих сайтов. Иллюстративный домен димеризации содержит (или состоит из) область Fc и шарнирную область. Поливалентное антитело может содержать (или состоять из) от трех до около восьми (например, четырех) антигенсвязывающих сайтов. Поливалентное антитело необязательно содержит по меньшей мере одну полипептидную цепь (например, по меньшей мере две полипептидные цепи), при этом полипептидная (-ые) цепь (цепи) содержит (-ат) два или большее число переменных доменов. Например, полипептидная (-ые) цепь (цепи) может (могут) содержать $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, где VD1 представляет собой первый переменный домен, VD2 представляет собой второй переменный домен, Fc представляет собой полипептидную цепь области Fc, X1 и X2 представляют собой аминокислоту или пептидный спейсер, а n равно 0 или 1.

Конъюгированные антитела

В некоторых случаях антитело к CD73 представляет собой конъюгированное антитело. Антитела, описанные в данном документе, могут представлять собой конъюгированные антитела, которые связаны с различными молекулами, включая макромолекулярные вещества, такие как полимеры (например, полиэтиленгликоль (ПЭГ), полиэтиленмин (ПЭИ), модифицированный ПЭГ (ПЭИ-ПЭГ), сополимеры полиглутаминовой кислоты (ПГА) и N-2-гидроксипропилметакриламида (ГПМА), гиалуроновая кислота, радиоактивные материалы (например, ^{90}Y , ^{131}I), флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества, гаптены, ферменты, хелаты металлов, лекарственные вещества и токсины (например, калихеамицин, экзотоксин A *Pseudomonas*, рицин (например, дегликозилированная цепь рицина A)).

В одном варианте осуществления, чтобы улучшить цитотоксическое действие антител к CD73 и, следовательно, их терапевтическую эффективность, антитела конъюгируют с высокотоксичными веществами, включая радиоизотопы и цитотоксические агенты. Эти конъюгаты могут избирательно доставлять токсическую

нагрузку к месту-мишени (т. е. к клеткам, экспрессирующим антиген, распознающийся антителом), в то время как клетки, которые не распознаются антителом, сохраняются. Чтобы свести к минимуму токсичность, конъюгаты, как правило, конструируют на основе молекул с коротким периодом полужизни в сыворотке крови (следовательно, применяют мышинные последовательности, и изотипы IgG3 или IgG4).

В определенных вариантах осуществления антитело к CD73 модифицируют фрагментом, который улучшает его стабилизацию и/или удержание в циркуляции, например, в крови, сыворотке крови или других тканях, например, по меньшей мере в 1,5, 2, 5, 10 или 50 раз. Например, антитело к CD73 может быть связано (например, конъюгировано) с полимером, например, по существу неантигенным полимером, таким как полиалкиленоксид или полиэтиленоксид. Подходящие полимеры существенно различаются по массе. Можно применять полимеры со средней молекулярной массой в диапазоне от около 200 до около 35000 Дальтон (или от около 1000 до около 15000 и от 2000 до около 12500). Например, антитело к CD73 может быть конъюгировано с водорастворимым полимером, например, гидрофильным поливиниловым полимером, например, поливиниловым спиртом или поливинилпирролидоном. Примеры таких полимеров включают в себя гомополимеры полиалкиленоксида, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ) или полипропиленгликоли, полиоксиэтилированные полиолы, их сополимеры и их блок-сополимеры, при условии, что сохраняется растворимость таких блок-сополимеров в воде. Дополнительные полезные полимеры включают в себя полиоксиалкилены, такие как полиоксиэтилен, полиоксипропилен, и блок-сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена; полиметакрилаты; карбомеры; и разветвленные или неразветвленные полисахариды.

Описанные выше конъюгированные антитела можно получать путем выполнения химических модификаций антител, соответственно, или их низкомолекулярных форм, описанных в данном документе. Способы модификации антител хорошо известны в данной области техники (например, US 5057313 и US 5156840).

Способы получения антител

Антитела могут продуцироваться в бактериальных или эукариотических клетках. Некоторые антитела, например, Fab, могут продуцироваться в бактериальных клетках, например, в клетках *E. coli*. Антитела также могут продуцироваться в эукариотических клетках, таких как трансформированные клеточные линии (например, CHO, 293E, COS). В дополнение к этому, антитела (например, scFv) могут экспрессироваться в дрожжевой клетке, такой как *Pichia* (см., например, работу Powers et al., *J Immunol Methods*. 251:123-35 (2001)), *Hansenula*, or *Saccharomyces*. Для получения антитела, представляющего интерес, конструируют полинуклеотид, кодирующий антитело, вводят его в вектор экспрессии и затем экспрессируют его в подходящих клетках-хозяевах. Для подготовки рекомбинантного вектора экспрессии, трансфекции клеток-хозяев, отбора трансформантов, культивирования клеток-хозяев и выделения антитела применяют стандартные методики молекулярной биологии.

Если антитело должно экспрессироваться в бактериальных клетках (например, *E. coli*), вектор экспрессии должен обладать характеристиками, которые позволяют амплифицировать вектор в бактериальных клетках. В дополнение к этому, если в качестве хозяина применяют такую *E. coli*, как JM109, DH5 α , HB101 или XL1-Blue, вектор должен иметь промотор, например, промотор *lacZ* (Ward et al., 341: 544-546 (1989), промотор *araB* (Better et al., Science, 240: 1041-1043 (1988)) или промотор T7, который может обеспечить эффективную экспрессию в *E. coli*. Примеры таких векторов включают в себя, например, векторы серий M13, векторы серий pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script, pGEX-5X-1 (Pharmacia), систему «QIAexpress» (QIAGEN), pEGFP и pET (когда применяют данный вектор экспрессии, хозяином, предпочтительно, является BL21, экспрессирующая РНК-полимеразу T7). Вектор экспрессии может содержать сигнальную последовательность для секреции антитела. Для продуцирования в периплазму *E. Coli* можно применять сигнальную последовательность *pelB* (Lei et al., J. Bacteriol., 169: 4379 (1987)) в качестве сигнальной последовательности для секреции антитела. Для бактериальной экспрессии можно применять способы с использованием хлорида кальция или способы электропорации для введения вектора экспрессии в бактериальную клетку.

Если антитело должно экспрессироваться в клетках животных, таких как клетки CHO, COS и NIH3T3, вектор экспрессии включает в себя промотор, необходимый для экспрессии в указанных клетках, например, промотор SV40 (Mulligan et al., Nature, 277: 108 (1979)), промотор MMLV-LTR, промотор EF1 α (Mizushima et al., Nucleic Acids Res., 18: 5322 (1990)) или промотор CMV. В дополнение к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноглобулин или его домен, рекомбинантные векторы экспрессии могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации), и гены селективируемых маркеров. Ген селективируемого маркера облегчает отбор клеток-хозяев, в которые был введен данный вектор (см., например, патенты США Nos. 4399216, 4634665 и 5179017). Например, ген селективируемого маркера, как правило, придает устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, клетке-хозяину, в которую был введен данный вектор. Примеры векторов с селективируемыми маркерами включают в себя pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV и pOP13.

В одном варианте осуществления антитела продуцируются в клетках млекопитающих. Предлагаемые в качестве примера клетки-хозяева млекопитающих для экспрессирования антитела включают клетки яичника китайского хомячка (клетки CHO) (в том числе клетки dhfr- CHO, описанные в Urlaub and Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, используемые с селективируемым маркером DHFR, например, как описано в Kaufman and Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), эмбриональные клетки почки человека 293 (например, 293, 293E, 293T), клетки COS, клетки NIH3T3, линии лимфоцитарных клеток, например, клетки миеломы NS0 и клетки SP2, и клетки трансгенного животного, например, трансгенного млекопитающего. Например, клетка

является эпителиальной клеткой молочной железы.

В иллюстративной системе для экспрессии антител рекомбинантный вектор экспрессии, кодирующий как тяжелую цепь антитела, так и легкую цепь антитела к CD73 (например, CL25, HzCL25, 3-F03, 3-F03_411 или 3-F03_413), вводят в клетки dhfr-CHO путем трансфекции, опосредованной фосфатом кальция. В пределах рекомбинантного вектора экспрессии каждый из генов тяжелой и легкой цепей антитела функционально связан с регуляторными элементами энхансера/промотора (например, полученными из SV40, CMV, аденовируса и т.п., такими как регуляторный элемент энхансера CMV/промотора AdMLP или регуляторный элемент энхансера SV40/промотора AdMLP) для обеспечения высоких уровней транскрипции генов. Рекомбинантный вектор экспрессии также несет ген DHFR, который делает возможным селекцию клеток CHO, которые были трансфицированы вектором с использованием селекции/амплификации с помощью метотрексата. Отобранные трансформированные клетки-хозяева культивируют, чтобы сделать возможной экспрессию тяжелой и легкой цепей антитела, и выделяют антитело из культуральной среды.

Антитела также могут продуцироваться трансгенным животным. Например, в патенте США № 584992 описан способ экспрессирования антитела в молочной железе трансгенного млекопитающего. Конструируют трансген, который содержит специфический по отношению к молоку промотор и нуклеиновые кислоты, кодирующие представляющее интерес антитело и сигнальную последовательность для секреции. Молоко, вырабатываемое самками таких трансгенных млекопитающих, содержит в себе представляющее интерес секретируемое антитело. Антитело можно выделить из молока или, для некоторых применений, использовать непосредственно. Также представлены животные, содержащие одну или большее число нуклеиновых кислот, описанных в данном документе.

Антитела согласно данному изобретению можно выделять из внутренней среды или из внешней среды (например, культуральной среды) клетки-хозяина и очищать до по существу чистых и гомогенных антител. Для выделения и очистки антител можно применять способы выделения и очистки, обычно применяемые для очистки антител, без ограничения каким-либо конкретным способом. Антитела можно выделять и очищать посредством соответствующего выбора и комбинирования, например, колоночной хроматографии, фильтрации, ультрафильтрации, высаливания, осаждения растворителем, экстракции растворителем, дистилляции, иммунопреципитации, электрофореза в ДСН-полиакриламидном геле, изoeлектрического фокусирования, диализа и перекристаллизации. Хроматография включает в себя, например, аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, гель-фильтрацию, обращенно-фазовую хроматографию и адсорбционную хроматографию (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Хроматографию можно осуществлять с использованием жидкофазной хроматографии, такой как

высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и быстрая жидкостная хроматография белка (БЖХБ). Колонки, применяемые для аффинной хроматографии, включают в себя колонку с белком А и колонку с белком G. Примеры колонок для использования с белком А включают в себя Hyper D, POROS и Sepharose FF (GE Healthcare Biosciences). Данное изобретение также включает в себя антитела, которые являются высокоочищенными с использованием указанных способов очистки.

Полинуклеотиды, векторы экспрессии и клетки

В данном изобретении также представлены полинуклеотиды и векторы, кодирующие антитело к CD73 или его часть (например, VH, VL, HC или LC), описанную в данном документе. Полинуклеотиды согласно данному изобретению могут быть в форме РНК или в форме ДНК. В некоторых случаях полинуклеотид представляет собой ДНК. В некоторых случаях полинуклеотид представляет собой комплементарную ДНК (кДНК). В некоторых случаях полинуклеотид представляет собой РНК.

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH любого из антител, описанных в данном документе (см., например, таблицы 1, 2, 3 и 5). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL любого из антител, описанных в данном документе (см., например, таблицы 1, 2, 3 и 5). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует тяжелую цепь, содержащую VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH любого из антител, описанных в данном документе (см., например, таблицы 1, 2, 3 и 5). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует легкую цепь, содержащую VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL любого из антител, описанных в данном документе (см., например, таблицы 1, 2, 3 и 5). В некоторых случаях полинуклеотид функционально связан с промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH любого из антител, описанных в данном документе (см., например, таблицы 1, 2, 3 и 5); и (ii) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид содержит VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL любого из антител, описанных в данном документе (см., например, таблицы 1, 2, 3 и 5). В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид содержит тяжелую цепь, содержащую VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH любого из антител, описанных в данном документе (см., например, таблицы 1, 2, 3 и 5); и (ii) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид содержит легкую цепь, содержащую VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL любого из антител, описанных в данном документе (см., например, таблицы 1, 2, 3 и 5). В некоторых случаях первая нуклеиновая кислота функционально связана с первым промотором и вторая нуклеиновая кислота функционально связана со вторым промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует VH из CL25 или из его варианта (например, из его гуманизированной версии - HzCL25). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22. В некоторых случаях полинуклеотид функционально связан с промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует VL из CL25 или из его варианта (например, из его гуманизированной версии - HzCL25). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23. В некоторых случаях полинуклеотид функционально связан с промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид содержит VH из CL25 или из его варианта (например, из его гуманизированной версии - HzCL25); и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид содержит VL из CL25 или из его варианта (например, из его гуманизированной версии - HzCL25). В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, по

меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84; и (ii) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81. В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид включает аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84; и (ii) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид включает аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81. В некоторых случаях первая нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность, указанную в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 22, 26 и 82-84, и вторая нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность, указанную в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 23, 27, 80 и 81. В некоторых случаях первая нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22, и вторая нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23. В некоторых случаях первая нуклеиновая кислота функционально связана с первым промотором и вторая нуклеиновая кислота функционально связана со вторым промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует тяжелую цепь из CL25 или из его варианта (например, из его гуманизированной версии - HzCL25). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 24. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 24. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24. В некоторых случаях полинуклеотид содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 89. В некоторых случаях полинуклеотид функционально связан с промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует легкую цепь из CL25 или из его варианта (например, из его гуманизированной версии - HzCL25). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 25. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 25. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25. В некоторых случаях полинуклеотид содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 90. В некоторых случаях полинуклеотид функционально связан с промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует тяжелую цепь из CL25 или из его варианта (например, из его гуманизированной версии - HzCL25) и легкую цепь из CL25 или из его варианта (например, из его гуманизированной версии - HzCL25). В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 24; и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид включает аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 25. В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид включает аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 24; и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид включает аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 25. В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24; и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25. В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, содержащую

последовательность, указанную в SEQ ID NO: 89; и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 90. В некоторых случаях первая нуклеиновая кислота функционально связана с первым промотором и вторая нуклеиновая кислота функционально связана со вторым промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует VH из 3-F03 или из его варианта (например, из 3-F03_411 или 3-F03_413). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 62. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 63. В некоторых случаях полинуклеотид функционально связан с промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует VL из 3-F03 или из его варианта (например, из 3-F03_411 или 3-F03_413). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61. В некоторых случаях полинуклеотид функционально связан с промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид содержит VH из 3-F03 или из его варианта (например, из 3-F03_411 или 3-F03_413); и (ii) вторую нуклеиновую

кислоту, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид содержит VL из 3-F03 или из его варианта (например, из 3-F03_411 или 3-F03_413). В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый полипептид, где первый полипептид включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88, и (ii) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй полипептид, где второй полипептид включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый полипептид, где первый полипептид включает аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88; и (ii) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй полипептид, где второй полипептид включает аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В некоторых случаях первая нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 32, 60, 62, 63, 67-69, 77 и 85-88, а вторая нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 61, 64 и 65. В некоторых случаях первая нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 62, и вторая нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61. В некоторых случаях первая нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 63, и вторая нуклеиновая кислота кодирует аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61. В некоторых случаях первая нуклеиновая кислота функционально связана с первым промотором и вторая нуклеиновая кислота функционально связана со вторым промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует тяжелую цепь из 3-F03 или из его варианта (например, из 3-F03_411 или 3-F03_413). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 30, 33 и 66. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную

последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 30, 33 и 66. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из последовательностей с SEQ ID NO: 30, 33 и 66. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33. В некоторых случаях полинуклеотид содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 91. В некоторых случаях полинуклеотид содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 93. В некоторых случаях полинуклеотид функционально связан с промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует легкую цепь из 3-F03 или из его варианта (например, из 3-F03_411 или 3-F03_413). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97% или на 100% идентична аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31. В некоторых случаях полинуклеотид содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 92. В некоторых случаях полинуклеотид функционально связан с промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует тяжелую цепь из 3-F03 или из его варианта (например, из 3-F03_411 или 3-F03_413) и легкую цепь из 3-F03 или из его варианта (например, из 3-F03_411 или 3-F03_413). В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, где первый полипептид включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в любой из SEQ ID NO: 30, 33 и 66, и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, где второй полипептид включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 31. В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый

полипептид, где первый полипептид включает аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 30, 33 и 66, и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, где второй полипептид включает аминокислотную последовательность, имеющую одну или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 31. В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, где первый полипептид включает аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 30, 33 и 66, и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, где второй полипептид включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31. В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30; и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31. В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33; и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31. В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 91; и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 92. В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 93; и (ii) вторую нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, указанную в SEQ ID NO: 92. В некоторых случаях первая нуклеиновая кислота функционально связана с первым промотором и вторая нуклеиновая кислота функционально связана со вторым промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид, описанный в данном документе, является выделенным.

В данном изобретении также представлены векторы, кодирующие антитела к CD73 или их части (например, VH, VL, HC или LC), описанные в данном документе. В данном изобретении также представлены векторы экспрессии, содержащие один или большее число полинуклеотидов, описанных в данном документе. Различные типы векторов экспрессии известны в данной области техники и описаны в данном документе (например, см. раздел «Способы получения антител» выше).

В данном изобретении также представлены клетки, содержащие антитела к CD73, описанные в данном документе. В данном изобретении также представлены клетки,

содержащие один или большее число полинуклеотидов, описанных в данном документе. В данном изобретении также представлены клетки, содержащие один или большее число векторов экспрессии, описанных в данном документе. Различные типы клеток известны в данной области техники и описаны в данном документе (например, см. раздел «Способы получения антител» выше).

Антитела к CD73 с измененным гликозилированием

Различные гликоформы могут оказывать существенное влияние на свойства терапевтического средства, включая фармакокинетику, фармакодинамику, взаимодействие с рецепторами и тканеспецифическое нацеливание (Graddis et al., 2002, Curr Pharm Biotechnol. 3: 285-297). В частности, для антител структура олигосахарида может влиять на свойства, относящиеся к устойчивости к протеазам, на опосредованный рецептором FcRn период полужизни антитела в сыворотке крови, фагоцитоз и обратную связь с антителом, в дополнение к эффекторным функциям антитела (например, связывание с комплексом C1 комплемента, что индуцирует комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ, англ. «CDC»), и связывание с рецепторами FcγR, которые отвечают за модуляцию пути антиген-зависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ, англ. «ADCC»)) (Nose and Wigzell, 1983; Leatherbarrow and Dwek, 1983; Leatherbarrow et al., 1985; Walker et al., 1989; Carter et al., 1992, PNAS, 89: 4285-4289).

Соответственно, другие средства модуляции эффекторной функции антител включает в себя изменение гликозилирования константной области антитела. Измененное гликозилирование включает в себя, например, уменьшение или увеличение числа гликозилированных остатков, изменение профиля или расположения гликозилированных остатков, а также изменение структуры (структур) углеводной части. Олигосахариды, обнаруженные в IgG человека, влияют на степень их эффекторной функции (Raju, T.S. BioProcess International April 2003. 44-53); микрогетерогенность олигосахаридов IgG человека может влиять на биологические функции, такие как КЗЦ и АЗКЦ, связывание с различными Fc-рецепторами и связывание с белком Clq (Wright A. & Morrison SL. TIBTECH 1997, 15 26-32; Shields et al. J Biol Chem. 2001 276(9):6591-604; Shields et al. J Biol Chem. 2002; 277(30):26733-40; Shinkawa et al. J Biol Chem. 2003 278(5):3466-73; Umana et al. Nat Biotechnol. 1999 Feb; 17(2): 176-80). Например, способность IgG связывать Clq и активировать каскад комплемента может зависеть от присутствия, отсутствия или модификации углеводной части, расположенной между двумя доменами CH2 (которая обычно закреплена на Asn297) (Ward and Ghetie, Therapeutic Immunology 2: 77-94 (1995)). Следовательно, в некоторых случаях антитело к CD73 содержит замещение Asn297Ala относительно константной области дикого типа.

Сайты гликозилирования в Fc-содержащем полипептиде, например, антителе, таком как антитело IgG, можно идентифицировать с помощью стандартных методик. Идентификация сайта гликозилирования может быть экспериментальной или основанной на анализе последовательности, или на данных моделирования. Были описаны консенсусные мотивы, то есть аминокислотные последовательности, распознаваемые

различными гликозилтрансферазами. Например, консенсусный мотив для мотива N-связанного гликозилирования часто представляет собой NXT или NXS, где X может представлять собой любую аминокислоту, кроме пролина. Также был описан ряд алгоритмов для определения местоположения потенциального мотива гликозилирования. Соответственно, для идентификации потенциальных сайтов гликозилирования в антителе или Fc-содержащем фрагменте последовательность антитела исследуют, например, с использованием общедоступных баз данных, таких как веб-сайт, предоставляемый Центром анализа биологических последовательностей (см. NetNGlyc services для прогнозирования N-связанных сайтов гликозилирования и NetOGlyc services для прогнозирования O-связанных сайтов гликозилирования).

Исследования *in vivo* подтвердили снижение эффекторной функции агликозилированных антител. Например, агликозильное антитело к CD8 не способно истощать клетки, несущие CD8, у мышей (Isaacs, 1992 J. Immunol. 148: 3062) и агликозильное антитело к CD3 не индуцируют синдром высвобождения цитокинов у мышей или людей (Boyd, 1995, см. выше; Friend, 1999 Transplantation 68:1632). Агликозилированные формы антитела к CD73 также обладают сниженной эффекторной функцией.

Важно отметить, что, хотя удаление гликанов в домене CH2, по-видимому, оказывает значительное влияние на эффекторную функцию, другие функциональные и физические свойства антитела остаются неизменными. В частности, было показано, что удаление гликанов не влияло существенным образом на период полужизни в сыворотке крови и связывание с антигеном (Nose, 1983, см. выше; Tao, 1989, см. выше; Dorai, 1991, см. выше; Hand, 1992, см. выше; Hobbs, 1992 Mol. Immunol. 29:949).

Антитела к CD73 согласно данному изобретению можно модифицировать или изменять с целью обеспечения повышенной (-ых) или сниженной (-ых) эффекторной (-ых) функции (функции) (по сравнению со вторым CD73-специфическим антителом). Способы изменения сайтов гликозилирования антител описаны, например, в патентных документах US 6350861 и US 5714350, WO 05/18572 и WO 05/03175; указанные способы можно применять для получения антител к CD73 согласно данному изобретению с измененным, сниженным или отсутствующим гликозилированием.

Аденозиновый рецептор A2A/A2B

Аденозиновый рецептор A2A является рецептором с высокой аффинностью, тогда как A2B является рецептором с низкой аффинностью. Аденозин и его агонисты могут действовать через один или оба из этих рецепторов и могут модулировать активность аденилатциклазы, фермента, ответственного за повышение уровня циклического АМФ (цАМФ). Различные рецепторы оказывают различное стимулирующее и ингибирующее действие на этот фермент. Повышенные внутриклеточные концентрации цАМФ могут подавлять активность иммунных и воспалительных клеток.

Аденозиновый рецептор A2A может передавать сигналы на периферии и в ЦНС, при этом агонисты исследуются как ковоспалительные препараты, а антагонисты

исследуются для нейродегенеративных заболеваний. В большинстве типов клеток подтип A2A подавляет уровень внутриклеточного кальция, тогда как A2B усиливает его. Рецептор A2A обычно подавляет воспалительную реакцию иммунных клеток. A2A в основном экспрессируется на лимфоидных клетках, включая Т-эффекторные клетки, Т-регуляторные клетки и естественные киллеры.

Аденозиновый рецептор A2B является рецептором с низкой аффинностью. Рецепторы A2B в высокой степени экспрессируются в желудочно-кишечном тракте, мочевом пузыре, легких и тучных клетках. Рецептор A2B, хотя структурно тесно связан с рецептором A2A и способен активировать аденилатциклазу, функционально отличается. Было высказано предположение, что этот подтип может использовать системы передачи сигнала, отличные от аденилатциклазы. Среди всех аденозиновых рецепторов рецептор A2B представляет собой рецептор с низкой аффинностью, который, как полагают, остается молчаливым в физиологических условиях и активируется вследствие повышенных внеклеточных уровней аденозина. Активация аденозинового рецептора A2B может стимулировать аденилатциклазу и фосфолипазу C за счет активации белков Gs и Gq, соответственно. Также описано связывание с митоген-активированными протеинкиназами. Рецепторы A2B в основном экспрессируются на клетках, происходящих из моноцитов, включая дендритные клетки, опухолевые макрофаги, супрессивные клетки миелоидного происхождения (MDSC) и мезенхимные стромальные/стволовые клетки (MSC).

Иллюстративная аминокислотная последовательность белка аденозинового рецептора A2A человека (номер доступа GenBank NP_001265428):

MPIMGSSVYITVELAIAVLAILGNVLVCWAVWLNSNLQNVNTNYFVVSLAAADIA
VGVLAIPFAITISTGFCAACHGCLFIACFVLVLTQSSIFSLLAIAIDRYIAIRIPLRYNGLVTG
TRAKGIIAICWVLSFAIGLTPMLGWNNCGQPKEGKNHSQGCQVACLFEDVVPMPNY
MVYFNFFACVLVPLLLMLGVYLRIFLAARRQLKQMESQPLPGERARSTLQKEVHAAKS
LAIIVGLFALCWLPPLHIINCFTFFCPDCSHAPLWLMYLAIVLSHTNSVVPFIYAYRIREFR
QTFRKIIRSHVLRQQEPFKAAGTSARVLAAHGSDGEQVSLRLNGHPPGVWANGSAPHPE
RRPNGYALGLVSGGSAQESQGNTGLPDVELLSHELKGVCPPEPPGLDDPLAQDGAGVS
(SEQ ID NO:94).

Иллюстративная аминокислотная последовательность белка аденозинового рецептора A2B человека (номер доступа GenBank NP_000667):

MLLETQDALYVALELVIAALSVAGNVLVCAAVGTANTLQTPTNYFLVSLAAD
VAVGLFAIPFAITISLGFCTDFYGCLFLACFVLVLTQSSIFSLLAVAVDRYLAICVPLRYKS
LVTGTRARGVIAVLWVLAFGIGLTPFLGWNSKDSATNNCTEPWDGTTNESCCLVKCLFE
NVVPMSYMVYFNFFGCVLPPLIMLVYIKIFLVACRQLQRTELMDHSRTTLQREIHAAK
SLAMIVGIFALCWLPVHAVNCVTLFQPAQGKNKPKWAMNMAILLSHANSVVPPIVYAY
RNRDFRYTFHKIISRYLLCQADVKSNGQAGVQPALGVGL (SEQ ID NO:95).

Ингибиторы аденозинового рецептора A2A/A2B

В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B представляет собой

соединение, выбранное из таблицы 6, или его фармацевтически приемлемую соль.

Таблица 6.

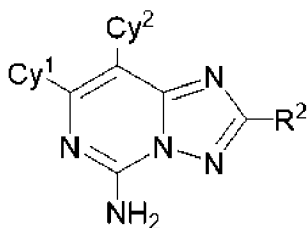
Соед. №	Название	Структура
1	3-(5-амино-2-(пиридин-2-илметил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил	
2	3-(5-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил	
3А	3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-2Н-тетразол-2-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло [1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил	
3В	3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-1Н-тетразол-1-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил	
4	3-(5-амино-2-((3-метилпиридин-2-ил)метокси)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил	

5	3-(5-амино-2-(гидрокси(фенил)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил	
6	3-(5-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрил	
7	5-амино-7-(3-циано-2-фторфенил)-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-8-карбонитрил	
8	3-(5-амино-2-((2-фтор-6-(((1-метил-2-оксопирролидин-3-ил)амино)метил)фенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрил	
9	3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазин-6-ил)бензонитрил	
10	3-(8-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-5-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазин-6-ил)бензонитрила	
11	3-(8-амино-2-(амино(2,6-дифторфенил)метил)-5-(4-метилоксазол-5-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазин-6-ил)бензонитрила	

12	3-(8-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-5-(2,6-диметилпиридин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила	
13	3-(4-амино-2-(пиридин-2-илметил)-7-(пиримидин-4-ил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил	
14	3-(4-амино-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-7-(пиримидин-4-ил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил	
15	3-(4-амино-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-7-(пиридин-4-ил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил	
16	3-(4-амино-7-(1-метил-1Н-пиразол-5-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с] пиридин-6-ил)-2-фторбензонитрил	
17	7-(1-((5-хлорпиридин-3-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-3-метил-9-пентил-6,9-дигидро-5Н-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-а]пиримидин-5-он	

18	3-метил-7-(1-((5-метилпиридин-3-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-9-пентил-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-он	
19	3-метил-9-пентил-7-(1-(тиено[3,2-b]пиридин-6-илметил)-1H-пиразол-4-ил)-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-он	
20	7-(1-((2-(2-(диметиламино)ацетил)-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-6-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-3-метил-9-пентил-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-он	
21A	3-(2-((5-(1H-пиразол-1-ил)-2H-тетразол-2-ил)метил)-5-амино-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил	
21B	3-(2-((5-(1H-пиразол-1-ил)-1H-тетразол-1-ил)метил)-5-амино-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил	

В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B представляет собой соединение Формулы (I):



(I),

или его фармацевтически приемлемую соль, где

Cy^1 представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

Cy^2 представляет собой 5-6-членный гетероарил или 4-7-членный гетероциклоалкил, где каждый из 5-6-членного гетероарила или 4-7-членного гетероциклоалкила Cy^2 необязательно замещен 1, 2 или 3 группами, каждая из которых независимо выбрана из C_{1-3} алкила, C_{1-3} алкокси, NH_2 , $NH(C_{1-3}$ алкил) и $N(C_{1-3}$ алкил)₂;

R^2 выбран из фенил- C_{1-3} алкил-, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкил-, (5-7-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил-, (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкил- и OR^{a2} , где каждый из фенил- C_{1-3} алкил-, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкил-, (5-7-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил- и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкил- из R^2 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^C ;

R^{a2} представляет собой (5-7-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил-, необязательно замещенный 1 или 2 независимо выбранными заместителями R^C ;

каждый R^C независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, C_6 арила, 5-7-членного гетероарила, (4-7-членного гетероциклоалкила)- C_{1-3} алкила, OR^{a4} и $NR^{c4}R^{d4}$, и

каждый R^{a4} , R^{c4} , и R^{d4} независимо выбран из H и C_{1-6} алкила.

В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (I) Cy^2 представляет собой пиримидинил.

В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (I) R^2 выбран из пиридин-2-илметила, (2,6-дифторфенил)(гидроксид)метила, (5-(пиридин-2-ил)-1H-тетразол-1-ил)метила, (3-метилпиридин-2-ил)метокси и (5-(1H-пиразол-1-ил)-1H-тетразол-1-ил)метила.

В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(5-амино-2-(пиридин-2-илметил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. соединение 1, таблицу 6).

В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(5-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидроксид)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемая соль (см. соединение 2, таблицу 6).

В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-2H-тетразол-2-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-

ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. соединение 3А, таблицу 6).

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-1Н-тетразол-1-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. соединение 3В, таблицу 6).

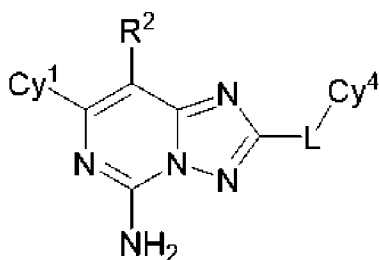
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(5-амино-2-((3-метилпиридин-2-ил)метокси)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. соединение 4, таблицу 6).

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(2-((5-(1Н-пиразол-1-ил)-2Н-тетразол-2-ил)метил)-5-амино-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. соединение 21А, таблицу 6).

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(2-((5-(1Н-пиразол-1-ил)-1Н-тетразол-1-ил)метил)-5-амино-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. соединение 21В, таблицу 6).

Синтез и описание соединений формулы (I) можно найти в документах WO 2019/168847 и US 62/891685, оба из которых полностью включены в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2В представляет собой соединение Формулы (II):



(II)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

R^2 выбран из H и CN;

Cy^1 представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

L представляет собой C_{1-3} алкилен, где указанный алкилен необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8D} ;

Cy^4 выбран из фенила, циклогексила, пиридила, пирролидинонила и имидазолила,

где каждый фенил, циклогексил, пиридил, пирролидинонил и имидазолил необязательно замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из R^{8D} и R^8 ;

R^8 независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, C_{1-6} галогеналкила, C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, фенила, C_{3-7} циклоалкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, фенил- C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкила, (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкила и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкила, где каждый из C_{1-6} алкила, C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, фенил, C_{3-7} циклоалкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, фенил- C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкила, (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкила и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкила R^8 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8A} ;

каждый R^{8A} независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, CN, OR^{a81} и $NR^{c81}R^{d81}$, где каждый из C_{1-3} алкила, 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила R^{8A} необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8B} ;

каждый R^{a81} , R^{c81} и R^{d81} независимо выбран из H, C_{1-6} алкила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где каждый из C_{1-6} алкила и 4-7-членного гетероциклоалкила R^{a81} , R^{c81} и R^{d81} необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8B} ;

каждый R^{8B} независимо выбран из галогена и C_{1-3} алкила; и

R^{8D} независимо выбран из OH, CN, галогена, C_{1-6} алкила и C_{1-6} галогеналкила.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(5-амино-2-(гидрокси(фенил)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. соединение 5, таблицу 6).

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(5-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4] триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. соединение 6, таблицу 6).

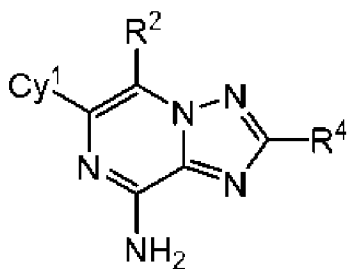
В некоторых вариантах осуществления соединение Формулы (II) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 5-амино-7-(3-циано-2-фторфенил)-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-8-карбонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. соединение 7, таблицу 6).

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (II) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(5-амино-2-((2-фтор-6-(((1-метил-2-оксопирролидин-3-ил)амино)метил)фенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. соединение 8, таблицу 6).

Синтез и характеристика соединений формулы (II) можно найти в WO 2019/222677, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B представляет собой

соединение Формулы (III):



(III)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

Cy¹ представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

R² выбран из 5-6 членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где каждый из 5-6 членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила из R² необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{2A};

каждый R^{2A} независимо выбран из D, галогена, C₁₋₆ алкила и C₁₋₆ галогеналкила;

R⁴ выбран из фенил-C₁₋₃ алкил-, C₃₋₇ циклоалкил-C₁₋₃ алкил-, (5-6-членный гетероарил)-C₁₋₃ алкил- и (4-7-членный гетероциклоалкил)-C₁₋₃ алкила, где каждый из фенил-C₁₋₃ алкил-, C₃₋₇ циклоалкил-C₁₋₃ алкил-, (5-6-членный гетероарил)-C₁₋₃ алкил- и (4-7-членный гетероциклоалкил)-C₁₋₃ алкил- из R⁴ необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{4A};

каждый R^{4A} независимо выбран из галогена, C₁₋₆ алкила, C₁₋₆ галогеналкила, CN, OR^{a41} и NR^{c41}R^{d41}; и

каждый R^{a41}, R^{c41} и R^{d41} независимо выбран из H и C₁₋₆ алкила.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (III) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. соединение 9, таблицу 6).

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (III) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(8-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-5-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. соединение 10, таблицу 6).

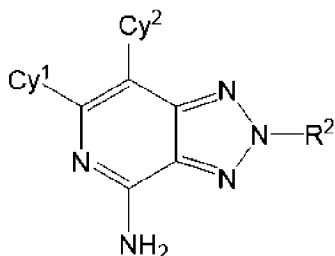
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (III) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(8-амино-2-(амино(2,6-дифторфенил)метил)-5-(4-метилоксазол-5-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. соединение 11, таблицу 6).

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (III) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(8-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-5-(2,6-диметилпиридин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-

а]пиразин-6-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. соединение 12, таблицу 6).

Синтез и описание соединений формулы (III) можно найти в документе PCT/US 2019/040496, который полностью включен в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B представляет собой соединение Формулы (IV):



(IV)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

Cy¹ представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

Cy² выбран из 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где каждый из 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила Cy² необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R⁶;

каждый R⁶ независимо выбран из галогена, C₁₋₆ алкила и C₁₋₆ галогеналкила;

R² представляет собой фенил-C₁₋₃ алкил- или (5-6-членный гетероарил)-C₁₋₃ алкил-, где каждый из фенил-C₁₋₃ алкил- и (5-6-членный гетероарил)-C₁₋₃ алкил- из R² необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{2A}; и

каждый R^{2A} независимо выбран из галогена, C₁₋₆ алкила и C₁₋₆ галогеналкила.

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (IV) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(4-амино-2-(пиридин-2-илметил)-7-(пиримидин-4-ил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. соединение 13, таблицу 6).

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (IV) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(4-амино-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-7-(пиримидин-4-ил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. соединение 14, таблицу 6).

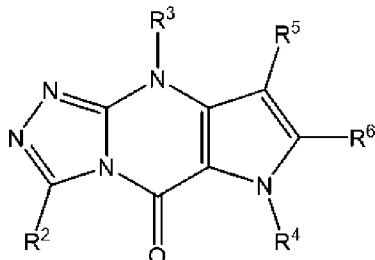
В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (IV) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(4-амино-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-7-(пиридин-4-ил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. соединение 15, таблицу 6).

В следующих вариантах осуществления соединение формулы (IV) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(4-амино-7-(1-метил-1H-пиразол-5-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)-2-фторбензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. соединение 16, таблицу 6).

6).

Синтез и характеристика соединений формулы (IV) можно найти в патенте США 62/798180, который полностью включен в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B представляет собой соединение формулы (V):



(V)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

R^2 выбран из H, D, галогена, C_{1-6} алкила и C_{1-6} галогеналкила;

R^3 выбран из H и C_{1-6} алкила;

R^4 выбран из H и C_{1-6} алкила;

R^5 выбран из H, галогена, CN, C_{1-6} алкила;

R^6 выбран из фенила, C_{3-7} циклоалкила, 5-7-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где указанные фенил, C_{3-7} циклоалкил, 5-7-членный гетероарил и 4-7-членный гетероциклоалкил из R^6 необязательно замещены 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^A ;

каждый R^A независимо выбран из (5-10-членного гетероарил)- C_{1-3} алкил- и (4-10-членного гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкил-, где каждый (5-10-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил- и (4-10-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкил- из R^A необязательно замещен 1 или 2 независимо выбранными заместителями R^B ;

каждый R^B независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила и $C(O)R^{b26}$;

R^{b26} независимо выбран из H и C_{1-3} алкила, где C_{1-3} алкил из R^{b26} необязательно замещен 1 или 2 независимо выбранными заместителями R^C .

каждый R^C независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, CN, OR^{a36} и $NR^{c36}R^{d36}$; и

каждый R^{a36} , R^{c36} и R^{d36} независимо выбран из H и C_{1-6} алкила.

В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (V) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 7-(1-((5-хлорпиридин-3-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-3-метил-9-пентил-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-он или его фармацевтически приемлемую соль (см. соединение 17, таблицу 6).

В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (V) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-метил-7-(1-((5-метилпиридин-3-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-9-пентил-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-он или его фармацевтически приемлемую соль (см. соединение 18, таблицу 6).

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (V) или его фармацевтически приемлемую соль представляет собой 3-метил-9-пентил-7-(1-(тиено[3,2-b]пиридин-6-илметил)-1H-пиразол-4-ил)-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-он или его фармацевтически приемлемую соль его (см. соединение 19, таблицу 6).

В некоторых вариантах осуществления соединение формулы (V) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 7-(1-((2-(2-(диметиламино)ацетил)-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-6-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-3-метил-9-пентил-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-он или его фармацевтически приемлемую соль (см. соединение 20, таблицу 6).

Синтез и описание соединений формулы (V) можно найти в документе US-2019-0337957, который полностью включен в данный документ посредством ссылки.

Используемый в данном документе термин «около» применительно к измеримому значению, такому как количество, дозировка, временная продолжительность и т.п., означает, что он охватывает вариации $\pm 10\%$. В определенных вариантах осуществления «около» может включать отклонения в пределах $\pm 5\%$, $\pm 1\%$ или $\pm 0,1\%$ от указанного значения и любые отклонения между ними, поскольку такие отклонения подходят для выполнения раскрытых способов.

В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе соединение представляет собой (S)-энантиомер соединения или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой (R)-энантиомер соединения или его фармацевтически приемлемую соль.

Кроме того, следует понимать, что определенные признаки настоящего изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть предоставлены в комбинации в одном варианте осуществления. Напротив, различные признаки настоящего изобретения, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть предоставлены отдельно или в любой подходящей подкомбинации.

Термин «n-членный», где n представляет собой целое число, обычно описывает количество образующих кольцо атомов в фрагменте, где количество образующих кольцо атомов равно n. Например, пиперидинил является примером 6-членного гетероциклоалкильного кольца, пиразолил является примером 5-членного гетероарильного кольца, пиридил является примером 6-членного гетероарильного кольца и 1,2,3,4-тетрагидро-нафталин является примером 10-членной циклоалкильной группы.

Используемая в данном документе фраза «необязательно замещенный» означает незамещенный или замещенный. Заместители выбраны независимо, и замещение может быть в любом химически доступном положении. Используемый в данном документе термин «замещенный» означает, что атом водорода удален и заменен заместителем. Один двухвалентный заместитель, например, оксо, может заменять два атома водорода. Следует понимать, что замещение на указанном атоме ограничено валентностью.

В контексте данного документа фразу «каждую переменную независимо выбирают из» означает практически то же, что и «в каждом случае «переменную» выбирают из».

В определениях термин «C_{n-m}» указывает диапазон, который включает конечные точки, где *n* и *m* являются целыми числами и указывают количество атомов углерода. Примеры включают C₁₋₃, C₁₋₄, C₁₋₆ и т.п.

В контексте данного документа термин «C_{n-m} алкил», используемый отдельно или в комбинации с другими терминами, относится к насыщенную углеводородной группе, которая может быть линейной или разветвленной, имеющей от *n* до *m* атомов углерода. Примеры алкильных фрагментов включают, но не ограничиваются ими, химические группы, такие как метил (Me), этил (Et), *n*-пропил (*n*-Pr), изопропил (изо-Pr), *n*-бутил, *трет*-бутил, изобутил, *втор*-бутил; высшие гомологи, такие как 2-метил-1-бутил, *n*-пентил, 3-пентил, *n*-гексил, 1,2,2-триметилпропил и т.п. В некоторых вариантах реализации, алкильная группа содержит от 1 до 6 атомов углерода, от 1 до 4 атомов углерода, от 1 до 3 атомов углерода или от 1 до 2 атомов углерода.

В контексте данного документа термин «C_{n-m} алкокси», используемый отдельно или в комбинации с другими терминами, относится к группе формулы -O-алкил, в которой алкильная группа имеет от *n* до *m* атомов углерода. Примеры алкоксигрупп включают, но не ограничиваются ими, метокси, этокси, пропокси (например, *n*-пропокси и изопропокси), бутокси (например, *n*-бутокси и *трет*-бутокси) и т.п.

Используемый в данном документе термин «арил», используемый отдельно или в сочетании с другими терминами, относится к ароматической углеводородной группе, которая может быть моноциклической или полициклической (например, имеющей 2, 3 или 4 кольца). Термин «C_{n-m} арил» относится к арильной группе, имеющей от *n* до *m* кольцевых атомов углерода. Арильные группы включают, например, фенил, нафтил, антраценил, фенантренил, инданил, инденил и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления изобретения арильная группа содержит от 5 до 10 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления арильная группа представляет собой фенил или нафтил. В некоторых вариантах осуществления арил представляет собой фенил (т.е. C₆ арил).

Используемый в данном документе термин «галоген» относится к F, Cl, Br или I. В некоторых вариантах осуществления галоген представляет собой F, Cl или Br. В некоторых вариантах осуществления галоген представляет собой F или Cl. В некоторых вариантах осуществления галоген представляет собой F. В некоторых вариантах осуществления галоген представляет собой Cl.

В контексте данного документа термин «C_{n-m} галогеналкил», используемый отдельно или в комбинации с другими терминами, относится к алкильной группе, имеющей от одного атома галогена до 2*s*+1 атомов галогена, которые могут быть одинаковыми или разными, где «*s*» представляет собой количество атомов углерода в алкильной группе, где алкильная группа имеет от *n* до *m* атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления фторирована только галогеналкильная группа. В некоторых

вариантах осуществления, алкильная группа имеет от 1 до 6, от 1 до 4 или от 1 до 3 атомов углерода. Примеры галогеналкильных групп включают CF_3 , C_2F_5 , CHF_2 , CH_2F , CCl_3 , CHCl_2 , C_2Cl_5 и т.п.

В контексте данного документа «циклоалкил» относится к неароматическим циклическим углеводородам, включая циклизированные алкильные и алкенильные группы. Циклоалкильные группы могут включать моно- или полициклические (например, имеющие 2 конденсированных кольца) группы, спироциклы и мостиковые кольца (например, мостиковая бициклоалкильная группа). Образующие кольцо атомы углерода циклоалкильной группы могут быть необязательно замещены оксо или сульфидо (например, $\text{C}(\text{O})$ или $\text{C}(\text{S})$). В определение циклоалкила также включены фрагменты, которые имеют одно или более ароматических колец, конденсированных (*m.e.* имеющих общую связь) с циклоалкильным кольцом, например, бензо- или тиенильные производные цикlopentана, циклогексана и т.п. Циклоалкильная группа, содержащая конденсированное ароматическое кольцо, может быть присоединена через любой кольцообразующий атом, включая кольцообразующий атом конденсированного ароматического кольца. Циклоалкильные группы могут содержать 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 атомов углерода, образующих кольцо (т. е. C_{3-10}). В некоторых вариантах осуществления циклоалкил представляет собой C_{3-10} моноциклический или бициклический циклоалкил. В некоторых вариантах осуществления циклоалкил представляет собой C_{3-7} моноциклический циклоалкил. В некоторых вариантах осуществления, циклоалкил представляет собой C_{4-7} моноциклический циклоалкил. В некоторых вариантах осуществления, циклоалкил представляет собой C_{4-10} спироцикл или мостиковый циклоалкил (например, мостиковую бициклоалкильную группу). Примеры циклоалкильных групп включают циклопропил, циклобутил, цикlopентил, циклогексил, циклогептил, цикlopентенил, циклогексенил, циклогексадиенил, циклогептатриенил, норборнил, норпинил, норкарнил, кубан, адамантан, бицикло[1.1.1]пентил, бицикло[2.1.1]гексил, бицикло[2.2.1]гептанил, бицикло[3.1.1]гептанил, бицикло[2.2.2]октанил, спиро[3.3]гептанил и т.п. В некоторых вариантах осуществления циклоалкил представляет собой циклопропил, циклобутил, цикlopентил или циклогексил.

В контексте данного документа «гетероарил» относится к моноциклическому или полициклическому (например, имеющему 2 конденсированных кольца) ароматическому гетероциклу, имеющему по меньшей мере один гетероатомный член кольца, выбранный из N, O, S и В. В некоторых вариантах осуществления гетероарильное кольцо имеет 1, 2, 3 или 4 гетероатомных члена кольца, независимо выбранных из N, O, S и В. В некоторых вариантах осуществления любой образующий кольцо N в гетероарильном фрагменте может представлять собой N-оксид. В некоторых вариантах осуществления, гетероарил представляет собой 5-10-членный моноциклический или бициклический гетероарил, имеющий 1, 2, 3 или 4 члена кольца гетероатома, независимо выбранных из N, O, S и В. В некоторых вариантах осуществления, гетероарил представляет собой 5-10-членный моноциклический или бициклический гетероарил, имеющий 1, 2, 3 или 4 члена кольца

гетероатома, независимо выбранных из N, O и S. В некоторых вариантах осуществления, гетероарил представляет собой 5-6 моноциклический гетероарил, содержащий 1 или 2 гетероатомных члена кольца, независимо выбранных из N, O, S и V. В некоторых вариантах осуществления, гетероарил представляет собой 5-6 моноциклический гетероарил, содержащий 1 или 2 гетероатомных члена кольца, независимо выбранных из N, O и S. В некоторых вариантах осуществления гетероарильная группа содержит 3-10, 4-10, 5-10, 5-7, 3-7 или 5-6 образующих кольцо атомов. В некоторых вариантах осуществления, гетероарильная группа содержит от 1 до 4 образующих кольцо гетероатомов, от 1 до 3 образующих кольцо гетероатомов, от 1 до 2 образующих кольцо гетероатомов или 1 образующий кольцо гетероатом. В случае если гетероарильная группа содержит более одного гетероатомного члена кольца, то гетероатомы могут быть одинаковыми или разными. Примеры гетероарильных групп включают, но не ограничиваются ими, тиенил (или тифенил), фурил (или фуранил), пирролил, имидазолил, тиазолил, оксазолил, пиразолил, изотиазолил, изоксазолил, 1,2,3-триазолил, тетразолил, 1,2,3-тиадиазолил, 1,2,3-оксадиазолил, 1,2,4-триазолил, 1,2,4-тиадиазолил, 1,2,4-оксадиазолил, 1,3,4-триазолил, 1,3,4-тиадиазолил, 1,3,4-оксадиазолил и 1,2-дигидро-1,2-азаборин, пиридинил, пиримидинил, пиразинил, пиридазинил, азолил, триазолил, тиадиазолил, хинолинил, изохинолинил, индолил, бензотифенил, бензофуранил, бензизоксазолил, имидазо[1,2-b]тиазолил, пуринил, триазинил, тиено[3,2-b]пиридинил, имидазо[1,2-a]пиридинил, 1,5-нафтиридинил, 1H-пиразоло[4,3-b]пиридинил, триазоло[4,3-a]пиридинил, 1H-пирроло[3,2-b]пиридинил, 1H-пирроло[2,3-b]пиридинил, пиразоло[1,5-a]пиридинил, индазолил и тому подобное.

В контексте данного документа «гетероциклоалкил» относится к моноциклическим или полициклическим гетероциклам, имеющим по меньшей мере одно неароматическое кольцо (насыщенное или частично ненасыщенное кольцо), где один или более образующих кольцо атомов углерода гетероциклоалкила заменены гетероатомом, выбранным из N, O, S и V и причем образующие кольцо атомы углерода и гетероатомы гетероциклоалкильной группы могут быть необязательно замещены одним или более оксо или сульфидо (например, C(O), S(O), C(S) или S(O)₂, и т. д.). Когда образующий кольцо атом углерода или гетероатом гетероциклоалкильной группы необязательно замещен одним или более оксо или сульфидами, O или S указанной группы являются дополнительными к количеству образующих кольцо атомов, указанных в данном документе (например, 1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил представляет собой 6-членную гетероциклоалкильную группу, в которой атом углерода, образующий кольцо, замещен оксогруппой, и причем 6-членная гетероциклоалкильная группа дополнительно замещена метильная группа). Гетероциклоалкильные группы включают моноциклические и полициклические (например, имеющие 2 конденсированных кольца) системы. В гетероциклоалкил входят моноциклические и полициклические 3-10, 4-10, 5-10, 4-7, 5-7 или 5-6 членные гетероциклоалкильные группы. Гетероциклоалкильные группы могут также включать спироциклы и мостиковые кольца (например, 5-10-членное мостиковое

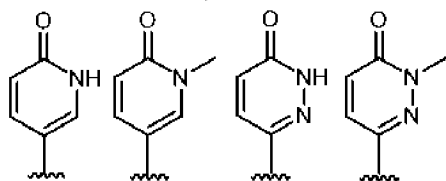
бигетероциклоалкильное кольцо, имеющее один или более образующих кольцо атомов углерода, замененных гетероатомом, независимо выбранным из N, O, S и V). Гетероциклоалкильная группа может быть присоединена через кольцообразующий атом углерода или кольцообразующий гетероатом. В некоторых вариантах осуществления, гетероциклоалкильная группа содержит от 0 до 3 двойных связей. В некоторых вариантах осуществления, гетероциклоалкильная группа содержит от 0 до 2 двойных связей.

В определение гетероциклоалкила также включены фрагменты, которые имеют одно или более ароматических колец, конденсированных (*m.e.* имеющих общую связь) с неароматическим гетероциклическим кольцом, например, бензо- или тиенильные производные пиперидина, морфолина, азепина и т.д. Гетероциклоалкильная группа, содержащая конденсированное ароматическое кольцо, может быть присоединена через любой образующий кольцо атом, включая образующий кольцо атом конденсированного ароматического кольца.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гетероциклоалкильная группа содержит от 3 до 10 атомов, образующих кольцо, от 4 до 10 атомов, образующих кольцо, от 3 до 7 атомов, образующих кольцо, или от 5 до 6 атомов, образующих кольцо. В некоторых вариантах осуществления, гетероциклоалкильная группа содержит от 1 до 4 гетероатомов, от 1 до 3 гетероатомов, от 1 до 2 гетероатомов или 1 гетероатом. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетероциклоалкил представляет собой моноциклический 4-6 членный гетероциклоалкил, имеющий 1 или 2 гетероатома, независимо выбранных из N, O, S и V, и имеющий один или более окисленных членов кольца. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетероциклоалкил представляет собой моноциклический или бициклический 5-10 членный гетероциклоалкил, имеющий 1, 2, 3 или 4 гетероатома, независимо выбранных из N, O, S и V, и имеющий один или более окисленных членов кольца. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетероциклоалкил представляет собой моноциклический или бициклический 5-10 членный гетероциклоалкил, имеющий 1, 2, 3 или 4 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и имеющий один или более окисленных членов кольца. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетероциклоалкил представляет собой моноциклический 5-6 членный гетероциклоалкил, имеющий 1, 2, 3 или 4 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и имеющий один или более окисленных членов кольца.

Примеры гетероциклоалкильных групп включают пирролидин-2-он (или 2-оксопирролидинил), 1,3-изоксазолидин-2-он, пиранил, тетрагидропиран, оксетанил, азетидинил, морфолино, тиоморфолино, пиперазинил, тетрагидрофуранил, тетрагидротиенил, пиперидинил, пирролидинил, изоксазолидинил, изотиазолидинил, пиразолидинил, оксазолидинил, тиазолидинил, имидазолидинил, азепанил, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин, бензазапен, азабицикло[3.1.0]гексанил, диазабицикло[3.1.0]гексанил, оксобицикло[2.1.1]гексанил, азабицикло[2.2.1]гептанил, диазабицикло[2.2.1]гептанил, азабицикло[3.1.1]гептанил, диазабицикло[3.1.1]гептанил,

азабицикло[3.2.1]октанил, диазабицикло[3.2.1]октанил, оксобицикло[2.2.2]октанил, азабицикло[2.2.2]октанил, азаадамантанил, диазаадамантанил, оксоадамантанил, азаспиро[3.3]гептанил, диазаспиро[3.3]гептанил, оксо-азаспиро[3.3]гептанил, азаспиро[3.4]октанил, диазаспиро[3.4]октанил, оксо-азаспиро[3.4]октанил, азаспиро[2.5]октанил, диазаспиро[2.5]октанил, азаспиро[4.4]нонанил, диазаспиро[4.4]нонанил, оксо-азаспиро[4.4]нонанил, азаспиро[4.5]деканил, диазаспиро[4.5]деканил, диазаспиро[4.4]нонанил, оксо-диазаспиро[4.4]нонанил, оксо-дигидропиридазинил, оксо-2,6-диазаспиро[3.4]октанил, оксогексагидропирроло[1,2-а]пиразинил, 3-оксопиперазинил, оксопирролидинил, оксопиридинил и тому подобное. Например, гетероциклоалкильные группы включают следующие группы (с замещением N-метилом и без него):



В контексте данного документа термин «C_{o-p} циклоалкил-C_{n-m} алкил-» относится к группе формулы циклоалкил-алкилен-, в которой циклоалкил имеет от o до p атомов углерода, а алкиленовая связывающая группа имеет от n до m атомов углерода.

Используемый в данном документе термин «C_{o-p} арил-C_{n-m} алкил-» относится к группе формулы арил-алкилен-, в которой арил имеет от o до p атомов углерода, а алкиленовая связывающая группа имеет от n до m атомов углерода.

Используемый в данном документе термин «гетероарил-C_{n-m} алкил-» относится к группе формулы гетероарил-алкилен-, в которой алкиленовая связывающая группа имеет от n до m атомов углерода.

Используемый в данном документе термин «гетероциклоалкил-C_{n-m} алкил-» относится к группе формулы гетероциклоалкил-алкилен-, в которой алкиленовая связывающая группа имеет от n до m атомов углерода.

В определенных местах определения или варианты реализации относятся к конкретным кольцам (например, азетидиновому кольцу, пиридиновому кольцу и т.д.). Если не указано иное, эти кольца могут быть присоединены к любому члену кольца при условии, что валентность атома не превышена. Например, азетидиновое кольцо может быть присоединено в любом положении кольца, тогда как пиридин-3-ильное кольцо присоединено в 3-м положении.

Используемый в данном документе термин «оксо» относится к атому кислорода (т.е.=O) в качестве двухвалентного заместителя, образующему карбонильную группу, когда он присоединен к углероду (например, C=O или C(O)), или присоединен к гетероатому азот или сера, образующим нитрозо, сульфинильную или сульфонильную группу.

Используемый в данном документе термин «независимо выбран из» означает, что каждое появление переменной или заместителя независимо выбирается в каждом случае

из применимого списка.

Описанные в данном документе соединения могут быть асимметричными (например, иметь один или более стереоцентров). Все стереоизомеры, такие как энантиомеры и диастереомеры, предназначены, если не указано иное. Соединения по данному изобретению, которые содержат асимметрично замещенные атомы углерода, могут быть выделены в оптически активных или рацемических формах. Способы получения оптически активных форм из оптически неактивных исходных материалов известны в данной области техники, такие как разделение рацемических смесей или стереоселективный синтез. Многие геометрические изомеры олефинов, двойные связи C=N и т.п. также могут присутствовать в соединениях, описанных в данном документе, и все такие стабильные изомеры рассматриваются в данном изобретении. *Цис*- и *транс*-геометрические изомеры соединений по данному изобретению описаны и могут быть выделены как смесь изомеров или как отдельные изомерные формы. В некоторых вариантах осуществления соединение имеет (R)-конфигурацию. В некоторых вариантах осуществления соединение имеет (S)-конфигурацию. Формулы (например, формула (I), (II) и т. д.), предложенные в данном документе, включают стереоизомеры соединений.

Разделение рацемических смесей соединений можно проводить любым из многочисленных способов, известных в данной области техники. Пример способа включает фракционную перекристаллизацию с использованием хиральной расщепляющей кислоты, которая представляет собой оптически активную солеобразующую органическую кислоту. Подходящими разделяющими агентами для методов фракционной перекристаллизации являются, например, оптически активные кислоты, такие как D и L формы винной кислоты, диацетилвинной кислоты, дибензоилвинной кислоты, миндальной кислоты, яблочной кислоты, молочной кислоты или различных оптически активных камфорсульфоновых кислот, таких как β -камфорсульфоновая кислота. Другие разделяющие агенты, подходящие для методов фракционной кристаллизации, включают стереоизомерно чистые формы α -метилбензиламина (например, формы S и R или диастереомерно чистые формы), 2-фенилглицин, норэфедрин, эфедрин, N-метилэфедрин, циклогексилэтиламин, 1,2-диаминоциклогексан и тому подобное.

Разделение рацемических смесей также может быть проведено элюированием на колонке, заполненной оптически активным разделяющим агентом (например, динитробензоилфенилглицином). Подходящий состав элюирующего растворителя может определить специалист в данной области техники.

Предлагаемые в данном документе соединения также включают таутомерные формы. Таутомерные формы возникают в результате перестановки одинарной связи с соседней двойной связью вместе с сопутствующей миграцией протона. Таутомерные формы включают в себя прототропные таутомеры, которые являются состояниями изомерного протонирования, имеющими ту же эмпирическую формулу и общий заряд. Примеры прототропных таутомеров включают пары кетон-енол, пары амид-имидная кислота, пары лактам-лактим, пары енамин-имин и кольцевые формы, где протон может

занимать два или более положений гетероциклической системы, например, 1Н- и 3Н-имидазол, 1Н-, 2Н- и 4Н-1,2,4-триазол, 1Н- и 2Н-изоиндол, 2-гидроксипиридин и 2-пиридон и 1Н- и 2Н-пиразол. Таутомерные формы могут быть в равновесии или стерически заблокированы в одну форму посредством соответствующего замещения.

Все соединения и их фармацевтически приемлемые соли могут находиться вместе с другими веществами, такими как вода и растворители (например, гидраты и сольваты), или могут быть выделены.

В некоторых вариантах осуществления, получение соединений может включать добавление кислот или оснований для воздействия, например, на катализ желаемой реакции или образование солевых форм, таких как кислотно-аддитивные соли.

В некоторых вариантах осуществления соединения, представленные в данном документе, или их соли по существу выделены. Под «по существу выделены» подразумевается, что соединение по меньшей мере частично или в значительной степени отделено от окружающей среды, в которой оно было образовано или обнаружено. Частичное разделение может включать, например, композицию, обогащенную соединениями, представленными в данном документе. Существенное разделение может включать композиции, содержащие по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 97% или по меньшей мере около 99% по массе соединений, представленных в данном документе, или их солей. Способы выделения соединений и их солей широко используются в данной области техники.

Термин «соединение», в контексте данного документа, включает все стереоизомеры, геометрические изомеры, таутомеры и изотопы изображенных структур. Подразумевается, что соединения, идентифицированные в данном документе по названию или структуре как одна конкретная таутомерная форма, включают другие таутомерные формы, если не указано иное.

Фраза «фармацевтически приемлемый» используется в данном документе для обозначения тех соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые, в рамках здравого медицинского заключения, подходят для использования в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соизмеримых с разумным соотношением польза/риск.

Данная заявка также включает в себя фармацевтически приемлемые соли соединений, описанных в данном документе. В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемые соли» относится к производным описанных соединений, в которых исходное соединение модифицировано путем преобразования существующего кислотного или основного фрагмента в его солевую форму. Примеры фармацевтически приемлемых солей включают, но не ограничиваются ими, соли минеральных или органических кислот с основными остатками, такими как амины; щелочные или

органические соли кислотных остатков, таких как карбоновые кислоты; и тому подобное. Фармацевтически приемлемые соли по данному изобретению включают обычные нетоксичные соли исходного соединения, образованные, например, из нетоксичных неорганических или органических кислот. Фармацевтически приемлемые соли по настоящему изобретению могут быть синтезированы из исходного соединения, которое содержит основной или кислотный фрагмент, с помощью обычных химических методов. Обычно такие соли могут быть получены приведением в контакт свободных кислотных или основных форм этих соединений со стехиометрическим количеством подходящего основания или кислоты в воде или в органическом растворителе, или в их смеси; как правило, предпочтительны неводные среды, такие как эфир, этилацетат, спирты (например, метанол, этанол, изопропанол или бутанол) или ацетонитрил (ACN). Перечни подходящих солей можно найти в публикациях Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418 и Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977), каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Описанные в данном документе соединения, включая их соли, могут быть получены с использованием известных методов органического синтеза и могут быть синтезированы в соответствии с любым из многочисленных возможных путей синтеза.

Реакции получения соединений, описанные в данном документе, могут быть проведены в подходящих растворителях, которые могут быть легко выбраны специалистом в области органического синтеза. Подходящие растворители могут практически не вступать в реакцию с исходными материалами (реагентами), промежуточными соединениями или продуктами при температурах, при которых проводят реакции, например, температурах, которые могут находиться в диапазоне от температуры замерзания растворителя до температуры кипения растворителя. Данная реакция может быть проведена в одном растворителе или в смеси более чем одного растворителя. В зависимости от конкретной стадии реакции квалифицированный специалист может выбрать подходящие растворители для конкретной стадии реакции.

Получение описанных в данном документе соединений может включать защиту и снятие защиты различных химических групп. Специалист в данной области техники может легко определить необходимость защиты и снятия защиты, а также выбор подходящих защитных групп. Химию защитных групп можно найти, например, в T. W. Greene and P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Ed., Wiley & Sons, Inc., New York (1999), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Ход реакций можно контролировать в соответствии с любым подходящим способом, известным в данной области техники. Например, образование продукта можно контролировать с помощью спектроскопических средств, таких как спектроскопия ядерного магнитного резонанса (например, ^1H или ^{13}C), инфракрасная спектроскопия, спектрофотометрия (например, УФ-видимая), масс-спектрометрия или

хроматографические способы, такие как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), жидкостная хроматография/масс-спектрометрия (ЖХМС) или тонкослойная хроматография (ТСХ). Соединения могут быть очищены специалистами в данной области различными способами, включая высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) (*“Preparative LC-MS Purification: Improved Compound Specific Method Optimization”* Karl F. Blom, et al. J. Combi. Chem. 2004, 6(6), 874-883, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки) и нормально-фазовую хроматографию на силикагеле.

Соединения, описанные в данном документе, могут модулировать активность одного или более различных сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR), включая, например, A2A/A2B. Термин «модулировать» относится к способности увеличивать или уменьшать активность одного или более членов семейства A2A/A2B. Соответственно, соединения, описанные в данном документе, можно использовать в способах модулирования A2A/A2B путем приведения в контакт A2A/A2B с любым одним или более соединениями или композициями, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению могут действовать как ингибиторы одного или обоих из A2A и A2B. В дополнительных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, можно использовать для модулирования активности A2A/A2B у индивида, нуждающегося в модулировании рецептора, путем введения модулирующего количества соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления модулирование представляет собой ингибирование.

Учитывая, что на рост и выживание раковых клеток влияют множественные сигнальные пути, настоящее изобретение применимо для лечения болезненных состояний, характеризующихся мутантами, устойчивыми к лекарственным средствам. Кроме того, в комбинации можно использовать различные ингибиторы GPCR, проявляющие различное предпочтение в отношении GPCR, активность которых они модулируют. Этот подход может оказаться очень эффективным при лечении болезненных состояний за счет воздействия на несколько сигнальных путей, снижения вероятности возникновения лекарственной устойчивости в клетке и снижения токсичности при лечении заболеваний.

GPCR, с которыми соединения по настоящему изобретению связываются и/или модулируют (например, ингибируют), включают любой член семейства A2A/A2B.

В некоторых вариантах осуществления для ингибирования активности одного GPCR (например, A2A) используется более одного соединения, описанного в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления более одного соединения, описанного в данном документе, используют для ингибирования более чем одного GPCR, такого как по меньшей мере два GPCR (например, A2A и A2B).

В некоторых вариантах осуществления одно или более соединений используют в комбинации с другим антагонистом GPCR для ингибирования активности одного GPCR

(например, A2A или A2B).

Описанные в данном документе ингибиторы A2A/A2B могут быть селективными. Под «селективным» подразумевается, что соединение связывается с GPCR или ингибирует его с большей аффинностью или эффективностью, соответственно, по сравнению с по меньшей мере одним другим GPCR. В некоторых вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, являются селективными ингибиторами A2A или A2B. В некоторых вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, являются селективными ингибиторами A2A (например, по сравнению с A2B). В некоторых вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, являются селективными ингибиторами A2B (например, по сравнению с A2A). В некоторых вариантах осуществления селективность может быть по меньшей мере около 2-кратной, 5-кратной, 10-кратной, по меньшей мере около 20-кратной, по меньшей мере около 50-кратной, по меньшей мере около 100-кратной, по меньшей мере около 200-кратной, по меньшей мере около 500-кратной или по меньшей мере около 1000-кратной. Селективность может быть измерена способами, общепринятыми в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления селективность можно тестировать по биохимической аффинности в отношении каждого GPCR. В некоторых вариантах осуществления селективность описанных в данном документе соединений можно определить с помощью клеточных анализов, связанных с конкретной активностью A2A/A2B.

В контексте настоящего документа, термин «контактирование» относится к объединению указанных фрагментов в системе *in vitro* или в системе *in vivo*. Например, «приведение в контакт» A2A/A2B с соединением, описанным в данном документе, включает введение соединения по настоящему изобретению индивиду или пациенту, такому как человек, с A2A/A2B, а также, например, введение соединения, описанного в данном документе, в образец, содержащий клеточный или очищенный препарат, содержащий A2A/A2B.

Дополнительные ингибиторы аденозинового рецептора A2A и/или A2B

Другие ингибиторы аденозинового рецептора A2A и/или A2B, применимые в комбинации с ингибитором CD73 в описанных в данном документе способах, известны в данной области техники.

В некоторых случаях ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или A2B представляет собой CPI-444 (также называемый в данном документе как «соединение В»; 7-(5-метилфуран-2-ил)-3-[[6-[(3S)-оксолан-3-ил]оксиметил]пиридин-2-ил]метил]триазоло[4,5-d]пиримидин-5-амин).

В некоторых случаях ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или A2B представляет собой AB928 (3-[2-амино-6-[1-[[6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-2-ил]метил]триазол-4-ил]пиримидин-4-ил]-2-метилбензонитрил).

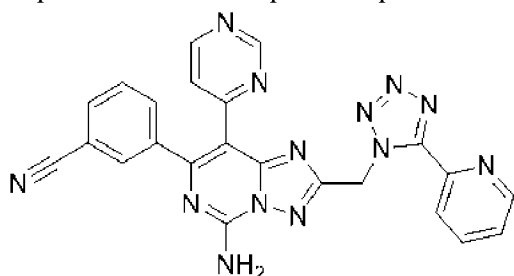
В некоторых случаях ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или A2B представляет собой AZD4635 (6-(2-хлор-6-метилпиридин-4-ил)-5-(4-фторфенил)-1,2,4-

триазин-3-амин).

В некоторых случаях ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или A2B представляет собой NIR-178 (5-бром-2,6-ди(1H-пиразол-1-ил)пиримидин-4-амин).

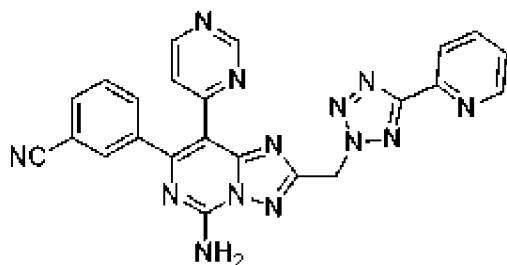
В некоторых случаях ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или A2B представляет собой EOS100850.

В некоторых случаях ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или A2B представляет собой соединение, его фармацевтически приемлемую соль или его стереоизомер, описанные в публикации заявки на патент США № 2019/0292188, который полностью включен в данный документ посредством ссылки. В некоторых случаях ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или A2B содержит или состоит из



(3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-1H-тетразол-1-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила), или его фармацевтически приемлемой соли, или его стереоизомера.

В некоторых случаях ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или A2B содержит или состоит из



(3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-2H-тетразол-2-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила), или его фармацевтически приемлемой соли, или его стереоизомера.

Меченые агенты и методы анализа

Другой аспект настоящего изобретения относится к меченым агентам (т. е. меченым ингибиторам CD73 и ингибиторам аденозинового рецептора A2A и/или A2B) по настоящему изобретению (радиомеченым, флуоресцентно-меченым и т. д.), которые могут быть полезны не только в методах визуализации, но также и в анализах, как *in vitro*, так и *in vivo*, для локализации и количественного определения рецепторов CD73 или A2A и/или A2B в образцах тканей, включая человека, и для идентификации CD73 или антагонистов A2A и/или A2B путем ингибирования связывания меченого соединения. Замещение одного или более атомов соединений по настоящему описанию также может быть пригодным при создании дифференцированного ADME (адсорбция, распределение,

метаболизм и выведение.) Соответственно, настоящее изобретение включает анализы аденозиновых рецепторов (например, A2A и/или A2B), которые содержат такие меченые или замещенные соединения.

Настоящее изобретение дополнительно включает меченые изотопами агенты по данному изобретению. «Изотопно-» или «радиоактивно меченный» агент представляет собой соединение согласно данному изобретению, в котором один или более атомов заменены или замещены атомом, имеющим атомную массу или массовое число, отличное от атомной массы или массового числа, обычно встречающегося в природе (т.е., встречающийся в природе). Подходящие радионуклиды, которые могут быть включены в агенты по настоящему изобретению включают, без ограничений, ^2H (также обозначаемый как D для дейтерия), ^3H (также обозначаемый как T для трития), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{18}F , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{82}Br , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I и ^{131}I . Например, один или более атомов водорода в агенте по настоящему изобретению могут быть заменены атомами дейтерия (например, один или более атомов водорода C_{1-6} алкильной группы формулы (I) могут быть необязательно заменены атомами дейтерия, например $-\text{CD}_3$ может служить заменой $-\text{CH}_3$). В некоторых вариантах осуществления изобретения алкильные группы в любой из описанных формул, например, формулы (I), могут быть пердейтерированы.

Один или более составляющих атомов представленных в данном документе агентов могут быть заменены или замещены изотопами атомов в природном или неприродном количестве. В некоторых вариантах осуществления соединения включает по меньшей мере один атом дейтерия. Например, один или более атомов водорода в представленном в данном документе соединении могут быть заменены или замещены дейтерием (например, один или более атомов водорода C_{1-6} алкильной группы могут быть заменены атомами дейтерия, например $-\text{CD}_3$, полученной при замещении $-\text{CH}_3$). В некоторых вариантах осуществления агент включает два или более атомов дейтерия. В некоторых вариантах осуществления агент включает 1-2, 1-3, 1-4, 1-5 или 1-6 атомов дейтерия. В некоторых вариантах осуществления все атомы водорода в агенте могут быть заменены или замещены атомами дейтерия.

В некоторых вариантах осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 атомов водорода, присоединенных к атомам углерода любых алкильных, алкенильных, алкинильных, арильных, фенильных, циклоалкильных, гетероциклоалкильных или гетероарильных заместителей или $-\text{C}_{1-6}$ алкиловых-, алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых связывающих групп, как описано в данном документе, каждый необязательно, заменен атомом дейтерия.

Синтетические методы включения изотопов в органические соединения известны в данной области техники (Deuterium Labeling in Organic Chemistry by Alan F. Thomas (New York, N.Y., Appleton-Century-Crofts, 1971; The Renaissance of H/D Exchange by Jens Atzrodt, Volker Derdau, Thorsten Fey and Jochen Zimmermann, Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 7744-7765; The Organic Chemistry of Isotopic Labelling by James R. Hanson, Royal Society of Chemistry, 2011). Меченые изотопами агенты могут быть использованы в различных

исследованиях, таких как ЯМР-спектроскопия, эксперименты по метаболизму и/или анализы.

Замена на более тяжелые изотопы, такие как дейтерий, может обеспечить определенные терапевтические преимущества, обусловленные большей метаболической стабильностью, например, повышенным временем полужизни *in vivo* или необходимостью меньших дозировок, и, следовательно, может быть предпочтительной в некоторых обстоятельствах. (См., например, A. Kerekes et. al. *J. Med. Chem.* 2011, 54, 201-210; R. Xu et. al. *J. Label Compd. Radiopharm.* 2015, 58, 308-312). В частности, замена в одном или более участках метаболизма может дать одно или более терапевтических преимуществ.

Радионуклид, который включен в настоящие радиоактивно меченые агенты, будет зависеть от конкретного применения этого радиоактивно меченого агента. Например, для *in vitro* маркировки аденозинового рецептора и конкурентного анализа подходящими могут быть агенты, содержащие ^3H , ^{14}C , ^{82}Br , ^{125}I , ^{131}I или ^{35}S . Для целей радиовизуализации подходящими могут быть ^{11}C , ^{18}F , ^{125}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br или ^{77}Br .

Понятно, что «радиоизотопно-меченый» или «меченый» агент представляет собой агент, который содержит по меньшей мере один радионуклид. В некоторых вариантах осуществления изобретения радионуклид выбран из группы, состоящей из ^3H , ^{14}C , ^{125}I , ^{35}S и ^{82}Br .

Настоящее изобретение может дополнительно включать методы синтеза для включения радиоизотопов в агенты по изобретению. Синтетические способы включения радиоизотопов в органические соединения и антитела хорошо известны в данной области техники, и обычный специалист в данной области техники легко поймет способы, применимые для соединений и антител по настоящему изобретению.

Меченый агент по данному изобретению может быть использован в скрининговом анализе для идентификации/оценки агентов. Например, вновь синтезированный или идентифицированный агент (т.е. тестируемый агент), который помечен, можно оценить на предмет его способности связываться с аденозиновым рецептором или CD73, отслеживая изменение его концентрации при контакте с аденозиновым рецептором или CD73, соответственно, путем отслеживания мечения. Например, для тестируемого агента (помеченного) можно оценить его способность уменьшать связывание другого агента, который, как известно, связывается с аденозиновым рецептором или CD73 (т.е. стандартным агентом). Соответственно, способность тестируемого агента конкурировать со стандартным агентом за связывание с аденозиновым рецептором или CD73 прямо коррелирует с его аффинностью связывания. И наоборот, в некоторых других скрининговых тестах стандартный агент помечен, а тестируемый агент не помечен. Соответственно, за концентрацией меченого стандартного агента наблюдают для того, чтобы оценить конкурирование между стандартным агентом и исследуемым агентом и таким образом определить относительную связывающую способность исследуемого агента.

Комбинированная терапия и показания

Ингибиторы CD73 по настоящему изобретению могут модулировать активность CD73. Соответственно, ингибиторы CD73, описанные в данном документе, могут быть использованы в способах ингибирования CD73 путем приведения в контакт CD73 с любым одним или более антителами или их композициями, описанными в данном документе. Аналогично, ингибиторы A2A и/или A2B по настоящему изобретению могут модулировать активность аденозинового рецептора A2A и/или A2B. Соответственно, ингибиторы, соли или стереоизомеры аденозинового рецептора A2A и/или A2B, описанные в данном документе, можно использовать в способах ингибирования аденозинового рецептора A2A и/или A2B путем приведения в контакт аденозинового рецептора A2A и/или A2B, соответственно, с любым одним или более рецепторами A2A и/или ингибиторами аденозинового рецептора A2B или их композициями, описанными в данном документе. Ингибиторы CD73 по настоящему изобретению и ингибиторы аденозинового рецептора A2A и/или A2B по настоящему изобретению могут действовать синергически, например, для лечения заболевания или нарушения, например, злокачественного новообразования. Соответственно, ингибиторы CD73, описанные в данном документе, можно использовать в комбинации с ингибиторами аденозинового рецептора A2A и/или A2B, описанными в данном документе, в способах ингибирования CD73 и аденозинового рецептора A2A и/или A2B путем приведения в контакт CD73 с любым одним или более ингибиторами CD73 или их композициями, описанными в данном документе, и путем приведения в контакт аденозинового рецептора A2A и/или A2B с любым одним или более ингибиторами аденозинового рецептора A2A и/или A2B или их композициями, описанными в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы CD73 и ингибиторы аденозиновых рецепторов A2A и/или A2B можно использовать в комбинации в способах ингибирования: (i) активности CD73 у индивида/пациента, нуждающегося в ингибировании, и (ii) активность аденозинового рецептора A2A и/или A2B у индивида/пациента, нуждающегося в ингибировании, путем введения эффективного количества ингибитора CD73, описанного в данном документе, и ингибитора аденозинового рецептора A2A и/или A2B, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления модулирование представляет собой ингибирование. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт происходит *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт происходит *ex vivo* или *in vitro*.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способам лечения заболевания или нарушения, связанного с CD73 и/или аденозиновым рецептором A2A, и/или A2B, у индивида (например, пациента) путем введения индивиду, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества или дозы одного или более ингибиторов CD73 по настоящему изобретению или их фармацевтических композиций и терапевтически эффективного количества или дозы одного или более ингибиторов аденозиновых рецепторов A2A и/или A2B по настоящему изобретению или их

фармацевтических композиций. CD73-ассоциированное заболевание или нарушение может включать в себя любое заболевание, нарушение или патологическое состояние, которые прямо или косвенно связаны с экспрессией или активностью CD73, включая сверхэкспрессию и/или аномальные уровни активности. Заболевание или нарушение, ассоциированное с аденозиновым рецептором A2A и/или A2B, может включать любое заболевание, нарушение или патологическое состояние, которое прямо или косвенно связано с экспрессией или активностью аденозинового рецептора A2A и/или A2B, включая сверхэкспрессию и/или аномальные уровни активности. Заболевание или нарушение, ассоциированное с CD73 и/или аденозиновым рецептором A2A и/или A2B, может включать любое заболевание, нарушение или патологическое состояние, которое прямо или косвенно связано с экспрессией или активностью CD73 и/или аденозинового рецептора A2A и/или A2B, включая сверхэкспрессию и/или аномальные уровни активности CD73, и/или аденозинового рецептора A2A и/или A2B.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способам лечения заболевания или нарушения (например, злокачественного новообразования) у индивида (например, пациента) путем введения индивиду, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества или дозы одного или более ингибиторов CD73 по настоящему изобретению или его фармацевтической композиции и терапевтически эффективного количества или дозы одного или более ингибиторов аденозинового рецептора A2A и/или A2B по настоящему изобретению или его фармацевтической композиции, при этом заболевание или нарушение характеризуется высокоаденозиновым профилем. В данной области техники известны способы определения того, что заболевание или нарушение имеют высокоаденозиновый профиль. Например, анализ экспрессии генов в опухолевой ткани можно проводить с использованием определенной панели генов, чувствительных к аденозину.

Ингибиторы CD73 и ингибиторы аденозинового рецептора A2A и/или A2B по настоящему изобретению применимы в комбинации для лечения заболеваний, связанных с активностью CD73, и/или аденозинового рецептора A2A и/или A2B, включая, например, злокачественное новообразование, воспалительные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, нейродегенеративные заболевания, иммуномодулирующие нарушения, заболевания центральной нервной системы и диабет.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CD73 человека содержит:

(а) антитело, содержащее переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR) 1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO: 1);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO: 2); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFDY (SEQ ID NO: 3); и

содержащее вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO: 4);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO: 5); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO: 6);

(b) антитело, которое связывается с CD73 человека в эпитопе в пределах аминокислот 40-53 SEQ ID NO:70;

(c) антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; или

(d) антитело, содержащее домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GFTFSSYD (SEQ ID NO: 34);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность MSYDGSNK (SEQ ID NO: 35) или MSYEGSNK (SEQ ID NO: 40); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ATEIAAKGDY (SEQ ID NO: 36); и

антитело, содержащее домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO: 37);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AAS (SEQ ID NO: 38); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39);

(e) антитело, которое связывается с CD73 человека в эпитопе в пределах аминокислот 386-399 и 470-489 из SEQ ID NO: 70;

(f) антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31;

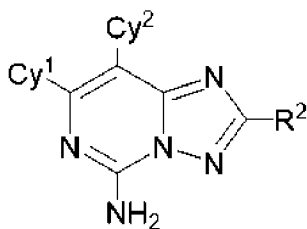
(g) антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31;

(h) антитело, выбранное из группы, состоящей из 11E1, Medi9447, CPI-006 и BMS-986179; или

(i) ингибитор, выбранный из группы, состоящей из СВ-708 и АВ680.

В некоторых вариантах реализации ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или аденозинового рецептора A2B (A2A/A2B) содержит соединение:

(a) Формулы (I):



(I),

или его фармацевтически приемлемую соль, где

Cy¹ представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

Cy² представляет собой 5-6-членный гетероарил или 4-7-членный гетероциклоалкил, где каждый из 5-6-членного гетероарила или 4-7-членного гетероциклоалкила Cy² необязательно замещен 1, 2 или 3 группами, каждая из которых независимо выбрана из C₁₋₃ алкила, C₁₋₃ алкокси, NH₂, NH(C₁₋₃ алкил) и N(C₁₋₃ алкил)₂;

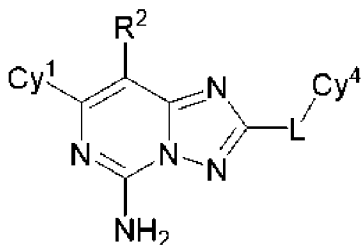
R² выбран из фенил-C₁₋₃ алкил-, C₃₋₇ циклоалкил-C₁₋₃ алкил-, (5-7-членный гетероарил)-C₁₋₃ алкил-, (4-7-членный гетероциклоалкил)-C₁₋₃ алкил- и OR^{a2}, где каждый из фенил-C₁₋₃ алкил-, C₃₋₇ циклоалкил-C₁₋₃ алкил-, (5-7-членный гетероарил)-C₁₋₃ алкил- и (4-7-членный гетероциклоалкил)-C₁₋₃ алкил- из R² необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^C;

R^{a2} представляет собой (5-7-членный гетероарил)-C₁₋₃ алкил-, необязательно замещенный 1 или 2 независимо выбранными заместителями R^C;

каждый R^C независимо выбран из галогена, C₁₋₆ алкила, C₆ арила, 5-7-членного гетероарила, (4-7-членного гетероциклоалкила)-C₁₋₃ алкила, OR^{a4} и NR^{c4}R^{d4}, и

каждый R^{a4}, R^{c4} и R^{d4} независимо выбран из H и C₁₋₆ алкила;

(b) Формулы (II):



(II)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

R² выбран из H и CN;

Cy¹ представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

L представляет собой C₁₋₃ алкилен, где указанный алкилен необязательно замещен

1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8D} ;

Su^4 выбран из фенила, циклогексила, пиридила, пирролидинонила и имидазолила, где каждый фенил, циклогексил, пиридил, пирролидинонил и имидазолил необязательно замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из R^{8D} и R^8 ;

каждый R^8 независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, C_{1-6} галогеналкила, C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, фенила, C_{3-7} циклоалкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, фенил- C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкила, (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкила и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкила, где каждый из C_{1-6} алкила, C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, фенила, C_{3-7} циклоалкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, фенил- C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкила, (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкила и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкила R^8 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8A} ;

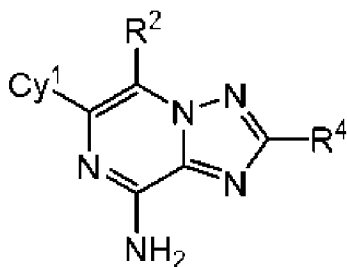
каждый R^{8A} независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, CN, OR^{a81} и $NR^{c81}R^{d81}$, где каждый из C_{1-3} алкила, 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила R^{8A} необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8B} ;

каждый R^{a81} , R^{c81} и R^{d81} независимо выбран из H, C_{1-6} алкила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где каждый из C_{1-6} алкила и 4-7-членного гетероциклоалкила R^{a81} , R^{c81} и R^{d81} необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8B} ;

каждый R^{8B} независимо выбран из галогена и C_{1-3} алкила; и

каждый R^{8D} независимо выбран из OH, CN, галогена, C_{1-6} алкила и C_{1-6} галогеналкила;

(с) Формулы (III):



(III)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

Su^1 представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

R^2 выбран из 5-6 членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где каждый из 5-6 членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила из R^2 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{2A} ;

каждый R^{2A} независимо выбран из D, галогена, C_{1-6} алкила и C_{1-6} галогеналкила;

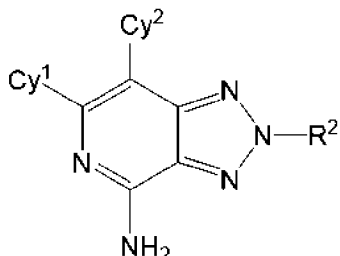
R^4 выбран из фенил- C_{1-3} алкил-, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкил-, (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил- и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкила, где каждый из

фенил- C_{1-3} алкил-, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкил-, (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил- и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкил- из R^4 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{4A} ;

каждый R^{4A} независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a41} и $NR^{c41}R^{d41}$; и

каждый R^{a41} , R^{c41} и R^{d41} независимо выбран из H и C_{1-6} алкила; или

(d) Формулы (IV):



(IV)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

Cy^1 представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

Cy^2 выбран из 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где каждый из 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила Cy^2 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^6 ;

каждый R^6 независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила и C_{1-6} галогеналкила;

R^2 представляет собой фенил- C_{1-3} алкил- или (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил-, где каждый из фенил- C_{1-3} алкил- и (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил- из R^2 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{2A} ; и

каждый R^{2A} независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила и C_{1-6} галогеналкила.

или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CD73 человека содержит:

(а) антитело, содержащее переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR) 1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO: 1);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO: 2); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFDY (SEQ ID NO: 3); и

содержащее переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO: 4);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO: 5); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO: 6);

(b) антитело, которое связывается с CD73 человека в эпитопе в пределах аминокислот 40-53 SEQ ID NO:70;

(c) антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; или

(d) антитело, содержащее домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GFTFSSYD (SEQ ID NO: 34);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность MSYDGSNK (SEQ ID NO: 35) или MSYEGSNK (SEQ ID NO: 40); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ATEIAAKGDY (SEQ ID NO: 36); и

антитело, содержащее домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO: 37);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AAS (SEQ ID NO: 38); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39);

(e) антитело, которое связывается с CD73 человека в эпитопе в пределах аминокислот 386-399 и 470-489 из SEQ ID NO: 70;

(f) антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31;

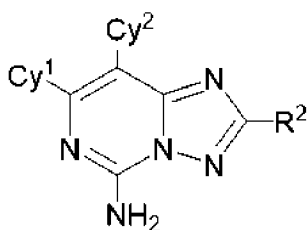
(g) антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31;

(h) антитело, выбранное из группы, состоящей из 11E1, Medi9447, CPI-006 и BMS-986179; или

(i) ингибитор, выбранный из группы, состоящей из CB-708 и AB680; и

ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или аденозинового рецептора A2B (A2A/A2B) включает соединение:

(a) Формулы (I):



(I),

или его фармацевтически приемлемую соль, где

Cy¹ представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

Cy² представляет собой 5-6-членный гетероарил или 4-7-членный гетероциклоалкил, где каждый из 5-6-членного гетероарила или 4-7-членного гетероциклоалкила Cy² необязательно замещен 1, 2 или 3 группами, каждая из которых независимо выбрана из C₁₋₃ алкила, C₁₋₃ алкокси, NH₂, NH(C₁₋₃ алкил) и N(C₁₋₃ алкил)₂;

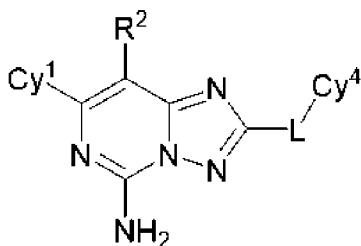
R² выбран из фенил-C₁₋₃ алкил-, C₃₋₇ циклоалкил-C₁₋₃ алкил-, (5-7-членный гетероарил)-C₁₋₃ алкил-, (4-7-членный гетероциклоалкил)-C₁₋₃ алкил- и OR^{a2}, где каждый из фенил-C₁₋₃ алкил-, C₃₋₇ циклоалкил-C₁₋₃ алкил-, (5-7-членный гетероарил)-C₁₋₃ алкил- и (4-7-членный гетероциклоалкил)-C₁₋₃ алкил- из R² необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^C;

R^{a2} представляет собой (5-7-членный гетероарил)-C₁₋₃ алкил-, необязательно замещенный 1 или 2 независимо выбранными заместителями R^C;

каждый R^C независимо выбран из галогена, C₁₋₆ алкила, C₆ арила, 5-7-членного гетероарила, (4-7-членного гетероциклоалкила)-C₁₋₃ алкила, OR^{a4} и NR^{c4}R^{d4}, и

каждый R^{a4}, R^{c4} и R^{d4} независимо выбран из H и C₁₋₆ алкила;

(b) Формулы (II):



(II)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

R² выбран из H и CN;

Cy¹ представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

L представляет собой C₁₋₃ алкилен, где указанный алкилен необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8D};

Cy⁴ выбран из фенила, циклогексила, пиридила, пирролидинонила и имидазолила, где каждый фенил, циклогексил, пиридил, пирролидинонил и имидазолил необязательно замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из R^{8D} и R⁸;

каждый R^8 независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, C_{1-6} галогеналкила, C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, фенила, C_{3-7} циклоалкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, фенил- C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкила, (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкила и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкила, где каждый из C_{1-6} алкила, C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, фенила, C_{3-7} циклоалкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, фенил- C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкила, (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкила и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкила R^8 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8A} ;

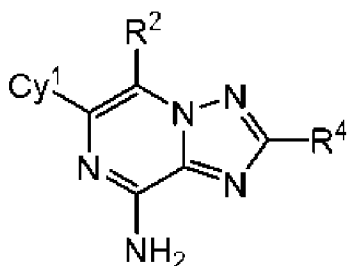
каждый R^{8A} независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, CN, OR^{a81} и $NR^{c81}R^{d81}$, где каждый из C_{1-3} алкила, 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила R^{8A} необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8B} ;

каждый R^{a81} , R^{c81} и R^{d81} независимо выбран из H, C_{1-6} алкила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где каждый из C_{1-6} алкила и 4-7-членного гетероциклоалкила R^{a81} , R^{c81} и R^{d81} необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8B} ;

каждый R^{8B} независимо выбран из галогена и C_{1-3} алкила; и

каждый R^{8D} независимо выбран из OH, CN, галогена, C_{1-6} алкила и C_{1-6} галогеналкила;

(с) Формулы (III):



(III)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

Cy^1 представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

R^2 выбран из 5-6 членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где каждый из 5-6 членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила из R^2 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{2A} ;

каждый R^{2A} независимо выбран из D, галогена, C_{1-6} алкила и C_{1-6} галогеналкила;

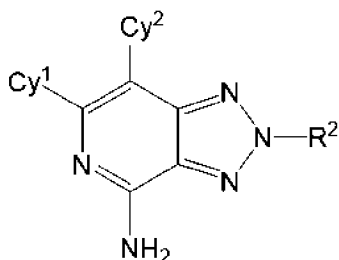
R^4 выбран из фенил- C_{1-3} алкил-, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкил-, (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил- и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкила, где каждый из фенил- C_{1-3} алкил-, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкил-, (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил- и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкил- из R^4 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{4A} ;

каждый R^{4A} независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, C_{1-6} галогеналкила, CN,

OR^{a41} и $NR^{c41}R^{d41}$, и

каждый R^{a41} , R^{c41} и R^{d41} независимо выбран из H и C_{1-6} алкила; или

(d) Формулы (IV):



(IV)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

Cy^1 представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

Cy^2 выбран из 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где каждый из 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила Cy^2 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^6 ;

каждый R^6 независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила и C_{1-6} галогеналкила;

R^2 представляет собой фенил- C_{1-3} алкил- или (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил-, где каждый из фенил- C_{1-3} алкил- и (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил- из R^2 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{2A} ; и

каждый R^{2A} независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила и C_{1-6} галогеналкила.

или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CD73 включает антитело, содержащее домен VH, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и домен VL, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:23, и ингибитор аденозинового рецептора A2a и/или A2B включает соединение 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пиразин-6-ил)бензонитрил.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CD73 включает антитело, содержащее тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:25, и ингибитор аденозинового рецептора A2a и/или A2B включает соединение 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пиразин-6-ил)бензонитрил.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CD73 включает антитело, содержащее домен VH, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:62, и домен VL, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, и ингибитор аденозинового рецептора A2a и/или A2B включает соединение 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-

(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CD73 включает антитело, содержащее тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:30, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:31, и ингибитор аденозинового рецептора A2a и/или A2B включает соединение 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CD73 включает антитело, содержащее домен VH, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:63, и домен VL, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:61, и ингибитор аденозинового рецептора A2a и/или A2B включает соединение 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CD73 включает антитело, содержащее тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:33, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:31, и ингибитор аденозинового рецептора A2a и/или A2B включает соединение 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил.

Основываясь на неотъемлемой роли CD73 и аденозиновых рецепторов A2A и/или A2B во многих иммуносупрессивных механизмах, комбинированная терапия может стимулировать иммунную систему для подавления прогрессирования опухоли. Ингибиторы CD73 и ингибиторы аденозинового рецептора A2A и/или A2B можно использовать в комбинации для лечения, необязательно в дополнительной комбинации с другими видами терапии, рака мочевого пузыря, рака легкого (например, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), метастазов в легких), меланомы (например, метастатической меланомы), рака молочной железы, рака шейки матки, рака яичников, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака предстательной железы, рака почки, рака кожи, рака щитовидной железы, рака печени (например, гепатоцеллюлярной карциномы), рака матки, рака головы и шеи (например, плоскоклеточного рака головы и шеи) и почечно-клеточного рака. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения рак предстательной железы представляет собой метастатическую кастрационно-резистентную карциному предстательной железы (мККПЖ, англ. «mCRPC»). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения колоректальный рак представляет собой колоректальную карциному (КК, англ. «CRC»).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения заболевание или нарушение представляет собой рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого), меланому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, плоскоклеточную

карциному органов головы и шеи, рак предстательной железы, рак печени, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак мочевого пузыря, рак кожи, рак матки, рак почки, рак желудка или саркому. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения саркома представляет собой опухоль Аскина, гроздевидную саркому, хондросаркому, саркому Юинга, злокачественную гемангиоэндотелиому, злокачественную шванному, остеосаркому, альвеолярную мягкотканную саркому, ангиосаркому, филлоидную цистосаркому, возвышающуюся дерматофибросаркому, десмоидную опухоль, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, эпителиоидную саркому, внескелетную хондросаркому, внескелетную остеосаркому, фибросаркому, гастроинтестинальную стромальную опухоль (ГИСО, англ. «GIST»), гемангиоперицитому, гемангиосаркому, саркому Капоши, лейомиосаркому, липосаркому, лимфангиосаркому, лимфосаркому, злокачественную опухоль оболочек периферических нервов (ЗООПН, англ. «MPNST»), нейрофибросаркому, рабдомиосаркому, синовиальную саркому или недифференцированную плеоморфную саркому.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения заболевание или нарушение представляет собой рак головы и шеи (например, плоскоклеточный рак головы и шеи), колоректальный рак, рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ)), меланому, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак печени (например, гепатоцеллюлярную карциному) или почечно-клеточную карциному.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения заболевание или нарушение представляет собой мезотелиому или аденокарциному. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения заболевание или нарушение представляет собой мезотелиому. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения заболевание или нарушение представляет собой аденокарциному.

СКМП (супрессорные клетки миелоидного происхождения, англ. «MDSC») представляют собой гетерогенную группу иммунокомпетентных клеток миелоидного происхождения (семейство клеток, происходящих из стволовых клеток костного мозга). Численность СКМП усиленно увеличивается в патологических ситуациях, таких как хронические инфекции и онкологические заболевания, в результате измененного кроветворения. СКМП отличаются от других типов миелоидных клеток тем, что они обладают сильной иммуносупрессивной активностью, а не иммуностимулирующими свойствами. Подобно другим миелоидным клеткам, СКМП взаимодействуют с другими типами иммунокомпетентных клеток, включая Т-клетки, дендритные клетки, макрофаги и естественные клетки-киллеры, чтобы регулировать их функции. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соединения и т. д., описанные в данном документе, можно применять в способах, относящихся к раковой ткани (например, опухолям) с высокой инфильтрацией СКМП, включая солидные опухоли с высоким базальным уровнем макрофагов и/или инфильтрации СКМП.

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы CD73 и ингибиторы аденозинового рецептора A2A и/или A2B по настоящему изобретению можно

использовать в комбинации для лечения воспаления легких, включая индуцированный блеомицином легочный фиброз и повреждение, связанное с дефицитом аденозиндезаминазы.

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы CD73 и ингибиторы аденозинового рецептора A2A и/или A2B по настоящему изобретению можно использовать в комбинации для лечения воспалительного заболевания, такого как аллергические реакции (например, аллергические реакции, зависящие от CD73 и/или аденозинового рецептора A2A, и/или A2B) и другие иммунные реакции, связанные с CD73 и/или аденозиновым рецептором A2A и/или A2B. Другие воспалительные заболевания, которые можно лечить комбинацией ингибиторов CD73 и ингибиторов аденозиновых рецепторов A2A и/или A2B по настоящему изобретению, включают респираторные заболевания, сепсис, реперфузионное повреждение и тромбоз.

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы CD73 и ингибиторы аденозинового рецептора A2A и/или A2B по настоящему изобретению можно применять в комбинации для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца (инфаркт миокарда, стенокардия, сердечная недостаточность), цереброваскулярное заболевание (инсульт, транзиторная ишемическая атака), заболевание периферических артерий, аортальный атеросклероз и аневризма. Атеросклероз является основным этиологическим фактором многих типов сердечно-сосудистых заболеваний. Атеросклероз начинается в подростковом возрасте с липидных полосок, которые в зрелом возрасте прогрессируют до бляшек и, наконец, приводят к тромботическим явлениям, которые вызывают закупорку сосудов, что приводит к клинически значимой морбидности и смертности.

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы CD73 и ингибиторы аденозинового рецептора A2A и/или A2B по настоящему изобретению можно применять в комбинации для лечения нарушений двигательной активности; патологии, вызванной дегенерацией стриатонигральной дофаминовой системы; и болезни Паркинсона; некоторых мотивационных симптомов депрессии.

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы CD73 и ингибиторы аденозинового рецептора A2A и/или A2B по настоящему изобретению можно использовать в комбинации для лечения диабета и родственных связанных с ним нарушений, таких как инсулинорезистентность. Диабет влияет на продуцирование аденозина и экспрессию рецепторов аденозина A2B (A2BR), которые стимулируют продуцирование ИЛ-6 и ЦРБ, инсулинорезистентность и связь между однонуклеотидными полиморфизмами (ОНП, англ. «SNP») гена A2BR (ОНП ADORA2B) и маркерами воспаления. Повышенный уровень передачи сигналов A2BR при диабете может частично повышать инсулинорезистентность за счет повышения провоспалительных медиаторов. Селективные ингибиторы CD73 могут быть полезны для лечения инсулинорезистентности.

Термины «индивид», или «пациент», или «субъект», употребляемые

взаимозаменяемо, относятся к любому животному, включая млекопитающих, предпочтительно - к мышам, крысам, другим грызунам, кроликам, собакам, кошкам, свиньям, крупному рогатому скоту, овцам, лошадям или приматам, и наиболее предпочтительно - к человеку (т. е. к субъекту-человеку).

Фраза «терапевтически эффективное количество» относится к количеству активного антитела или фармацевтического агента, которое вызывает биологический или лекарственный ответ в ткани, системе, животном, индивидууме или человеке, который является желаемым для исследователя, ветеринара, врача или другого клинициста.

При употреблении в контексте данного документа термин «лечение» относится к одному или большему числу из: (1) ингибирования заболевания; например, ингибирования заболевания, патологического состояния или нарушения у индивида, который ощущает или проявляет патологию или симптоматику заболевания, патологического состояния или нарушения (т. е. прекращение дальнейшего развития патологии и/или симптоматики); и (2) ослабления заболевания; например, ослабления заболевания, патологического состояния или нарушения у индивида, который ощущает или проявляет патологию или симптоматику заболевания, патологического состояния или нарушения (т. е. обратное развитие патологии и/или симптоматики), такого как уменьшение тяжести заболевания.

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы CD73 и ингибиторы аденозинового рецептора A2A и/или A2B по настоящему изобретению полезны в комбинации для предотвращения или снижения риска развития любого из заболеваний, упомянутых в данном документе; например, предотвращение или снижение риска развития заболевания, патологического состояния или нарушения у индивида, который может быть предрасположен к заболеванию, патологическому состоянию или нарушению, но еще не испытывает или не проявляет патологию или симптоматику заболевания.

Фармацевтические композиции

Ингибиторы CD73 и ингибиторы аденозинового рецептора A2A и/или A2B, описанные в данном документе, могут быть составлены в виде фармацевтических композиций для введения субъекту, например, для лечения нарушения, описанного в данном документе. В некоторых случаях фармацевтическая композиция содержит ингибитор CD73 в качестве единственного агента. В некоторых случаях фармацевтическая композиция содержит ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или A2B в качестве единственного агента. В некоторых случаях фармацевтическая композиция содержит ингибитор CD73 и ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или A2B.

Как правило, фармацевтическая композиция включает в себя фармацевтически приемлемый носитель. При употреблении в контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый носитель» обозначает все возможные растворители, дисперсионные среды, покрытия оболочкой, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие всасывание агенты и т. п., являющиеся

физиологически совместимыми. Композиция может включать в себя фармацевтически приемлемую соль, например, соль присоединения кислоты или соль присоединения основания (см., например, работу Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19).

Приготовление фармацевтический состав относится к хорошо известной области техники, и более подробно описано, например, в Gennaro (ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th Ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727); и Kibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 3rd ed. (2000) (ISBN: 091733096X).

Фармацевтические композиции могут иметь различные формы. К ним относятся, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории. Предпочтительная форма может зависеть от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Как правило, композиции для агентов, описанных в данном документе, представлены в форме растворов для инъекций или инфузий.

Композицию можно составить в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для стабильного хранения при высокой концентрации. Стерильные инъекционные растворы можно получать путем включения агента, описанного в данном документе, в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или с комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, в случае необходимости, с последующей стерилизацией фильтрацией. В общем случае дисперсии получают путем включения агента, описанного в данном документе, в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка, которые приводят к получению порошка агента, описанного в данном документе, вместе с любым дополнительным активным ингредиентом из его ранее стерильно-профильтрованного раствора. Надлежащую текучесть раствора можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию агента, замедляющего всасывание, например, моностеаратных солей и желатина.

В определенных вариантах осуществления ингибитор CD73 и/или ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или A2B может быть получен с носителем, который защитит соединение от быстрого высвобождения, как в случае состава с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки.

Можно применять биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфиры и полимолочная кислота. Многие способы получения таких составов запатентованы или общеизвестны. См., напр., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York (1978).

Введение

Ингибитор CD73 и ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или A2B можно вводить субъекту, например субъекту, нуждающемуся в этом, например, субъекту-человеку, различными способами. В некоторых случаях ингибитор CD73 и ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или A2B вводят субъекту одним и тем же путем. В некоторых случаях ингибитор CD73 и ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или A2B вводят субъекту разными путями. Для многих применений способ введения является одним из следующих: внутривенная (в/в) инъекция или инфузия, подкожная (п/к) инъекция, внутривентрикулярная (в/б) или внутримышечная (в/м) инъекция. Также возможно применение внутрисуставной доставки. Также можно применять другие способы парентерального введения. Примеры таких способов включают в себя: внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, транстрахеальную, подкожную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, а также эпидуральную и интратеральную инъекции. В некоторых случаях введение может быть пероральным.

Путь и/или способ введения ингибитора CD73 или ингибитора аденозинового рецептора A2A и/или A2B также могут быть адаптированы для конкретного случая, например, путем наблюдения за субъектом, например, с помощью томографической визуализации, например, для визуализации опухоли.

Каждый из ингибитора CD73 и ингибитора аденозинового рецептора A2A и/или A2B можно вводить в виде фиксированной дозы или в дозе, равной мг/кг массы пациента. Доза также может быть выбрана для снижения или предотвращения выработки антител к ингибитору CD73 или ингибитору аденозинового рецептора A2A и/или A2B. Схемы введения доз корректируют для обеспечения желаемого ответа, например, терапевтического ответа или комбинированного терапевтического эффекта. Как правило, дозы ингибитора CD73 и ингибитора аденозинового рецептора A2A и/или A2B можно использовать для обеспечения субъекта агентом в биодоступных количествах.

Единичная дозированная форма, или «фиксированная доза», или «единичная доза», при употреблении в контексте данного документа относятся к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для подлежащих лечению субъектов; каждая единица содержит predetermined количество активного соединения, рассчитанное так, чтобы оказывать необходимый терапевтический эффект, вместе с необходимым фармацевтическим носителем и, необязательно, вместе с другим агентом. Можно вводить одну или множество доз. Альтернативно или дополнительно антитело и/или ингибитор можно вводить путем непрерывной инфузии.

Ниже приведены примеры практического применения данного изобретения. Их не следует рассматривать как ограничивающие объем данного изобретения каким-либо образом.

ПРИМЕРЫ

Нижеследующие примеры представлены для лучшей иллюстрации заявляемого изобретения и не должны истолковываться как ограничивающие объем данного изобретения. В той мере, в которой упоминаются конкретные материалы, они служат лишь в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения данного изобретения. Специалист в данной области техники может разработать эквивалентные средства или реагенты, не прибегая к изобретательским способностям и не отклоняясь от объема данного изобретения.

Пример А: Активность ингибиторов A2A/A2B

I. Анализ меченого Tag-lite® A2A методом HTRF

Анализы проводили в черных 384-луночных полистирольных планшетах с низким объемом (Greiner 784076-25) в конечном объеме 10 мкл. Тестируемые соединения вначале последовательно разбавляли в ДМСО и прибавляли 100 нл в лунки планшета до прибавления других компонентов реакции. Конечная концентрация ДМСО составляла 1%. Клетки, меченые Tag-lite® аденозином A2A (CisBio C1TT1A2A) разбавляли 1:5 в буфере Tag-lite (CisBio LABMED) и центрифугировали 1200 g в течение 5 минут. Осадок ресуспендировали в объеме, в 10,4 раза превышающем исходный объем клеточной суспензии в буфере Tag-lite, и добавляли флуоресцентный лиганд, антагонист аденозинового рецептора A2A Red (CisBio L0058RED), в конечной концентрации 12,5 нМ. 10 мкл смеси клеток и лиганда добавляли в лунки для анализа и инкубировали при комнатной температуре в течение 45 минут перед чтением на планшет-ридере PHERAstar FS (BMG Labtech) с оптическим модулем HTRF 337/620/665. Рассчитывали процент связывания флуоресцентного лиганда; где 100 нМ контрольного антагониста A2A ZM 241385 (Tocris 1036) замещает лиганд на 100%, а 1% ДМСО имеет замещение 0%. Данные % связывания по сравнению с логарифмом концентрации ингибитора соответствовали модели конкурентного связывания с одним сайтом (GraphPad Prism, версия 7.02), где константа лиганда=12,5 нМ и лиганд K_d=1,85 нМ. Данные K_i, полученные с помощью этого метода, показаны в таблице 7.

II. Анализ циклического АМФ GS аденозинового рецептора A2B

Стабильно трансфицированные клетки HEK-293, экспрессирующие человеческий аденозиновый рецептор A2B (Perkin Elmer), поддерживали в культуральной среде MEM с 10% FBS и 100 мкг/мл генетицина (Life Technologies). За 18-24 часа до анализа генетицин удаляли из культуры. Набор Cisbio cAMP-GS Dynamic, использующий технологию FRET (флуоресцентный резонансный перенос энергии), использовали для измерения накопления цАМФ в клетках. Соединения по настоящему изобретению в подходящей концентрации смешивали с 10000 клеток/лунка в 96-луночных белых планшетах с половинным объемом лунок (Perkin Elmer) в течение 30 мин при комнатной температуре, осторожно встряхивая.

Агонист NECA (R&D Technologies) в концентрации 12 нМ добавляли в каждую лунку на 60 мин при комнатной температуре при осторожном встряхивании. Реагенты для обнаружения, меченный d2 цАМФ (акцептор) и криптант анти-цАМФ (донор) прибавляли в каждую лунку в течение 60 мин при осторожном встряхивании при комнатной температуре. Планшеты считывали на Pherastar (BMG Labtech), рассчитывали соотношение флуоресценции 665/620 и определение EC₅₀ выполняли путем подбора кривой процента контроля по сравнению с логарифмом концентрации соединения с использованием GraphPad Prism. Данные EC₅₀, полученные с помощью этого метода, показаны в таблице 7.

Таблица 7. Данные A_{2A}_Ki (пример A(I)) и данные A_{2B}_сАМР_EC₅₀ (пример A(II)) представлены ниже.

Соед. №	A _{2A} _Ki (нМ)	A _{2B} _сАМР_EC ₅₀ (нМ)
1	†	†
2	†	†
3	†	†
4	†	†
5	†	†
6	†	†
7	†	†
8	†	††
9	†	†
10	†	†
11	†	†
12	†	††
13	†	†
14	†	†
15	†	†
16	†	†
17	†	††
18	†	†
19	†	†
20	†	†
21	†	†

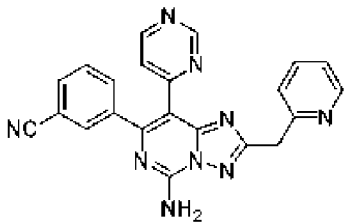
† указывает на A_{2A}_Ki или A_{2B}_сАМР_EC₅₀ ≤ 10 нМ,

†† указывает на A_{2A}_Ki или A_{2B}_сАМР_EC₅₀ > 10 нМ, но ≤ 100 нМ,

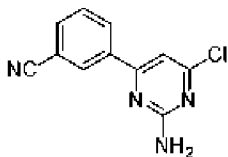
††† указывает на $A_{2A_K_i}$ или $A_{2B_cAMP_EC_{50}} > 100$ нМ, но ≤ 1 мкМ,

†††† указывает на $A_{2A_K_i}$ или $A_{2B_cAMP_EC_{50}}$ больше 1 мкМ.

Пример А1: Синтез 3-(5-амино-2-(пиридин-2-илметил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил) бензонитрила (соединение 1)

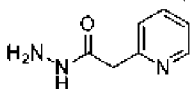


Стадия 1: 3-(2-амино-6-хлорпиримидин-4-ил)бензонитрил



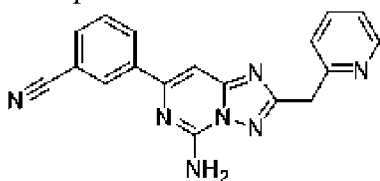
Смесь 4,6-дихлорпиримидин-2-амин (2,5 г, 15,2 ммоль), (3-цианофенил)бороновой кислоты (2,02 г, 13,7 ммоль), тетраakis(трифенилфосфин)палладия(0) (1,06 г, 0,92 ммоль) и карбонат натрия (3,23 г, 30,5 ммоль) в 1,4-диоксане (60 мл) и воду (5 мл) дегазировали азотом, затем полученную смесь нагревали и перемешивали при 60°C в течение двух дней. После охлаждения до комнатной температуры (к.т.) смесь концентрировали, разбавляли водой и экстрагировали ДХМ (30 мл x 3). Объединенные органические слои сушили над $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали. Полученный остаток очищали с помощью флеш-хроматографии на колонке с силикагелем с элюированием 8% EtOAc в дихлорметане с получением желаемого продукта. ЖХ/МС, теор. для $C_{11}H_8ClN_4$ ($M+H$)⁺: 231,0. Эксп.: 231,0.

Стадия 2: 2-(пиридин-2-ил)ацетогидразид



Гидразин (4,15 мл, 132 ммоль) добавляли к этанольному (66 мл) раствору метил-2-(пиридин-2-ил)ацетата (10 г, 66,2 ммоль) при комнатной температуре. Смесь нагревали и перемешивали при 85°C в течение 4 часов, а затем охлаждали до комнатной температуры. При отстаивании образовалось белое твердое вещество, которое было собрано путем фильтрации и использовано на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ/МС, теор. для $C_7H_{10}N_3O$ ($M+H$)⁺: 152,1. Эксп.: 152,0.

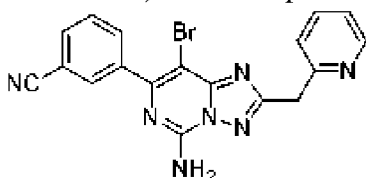
Стадия 3: 3-(5-амино-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил



2-(пиридин-2-ил)ацетогидразид (2,62 г, 17,34 ммоль) добавляли к этанольному (35

мл) раствору 3-(2-амино-6-хлорпиримидин-4-ил)бензонитрила (4,00 г, 17,34 ммоль) при комнатной температуре. После нагревания и перемешивания с обратным холодильником в течение 2 ч реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали. Полученный остаток переносили в N, O-бис(триметилсилил)ацетамид (20 мл) и перемешивали при 120°C в течение 7 часов. Затем смесь охлаждали до комнатной температуры, выливали на лед и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Полученное твердое вещество собирали фильтрованием и помещали в 20 мл 1 н. раствора HCl. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, фильтруют и водный слой нейтрализуют добавлением насыщенного раствора NaHCO₃. Образовавшийся осадок собирали фильтрованием и сушили с получением желаемого продукта в виде коричневого твердого вещества. ЖХ/МС, теор. для C₁₈H₁₄N₇ (M+H)⁺: 328,1; эксп. 328,1.

Стадия 4: 3-(5-амино-8-бром-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил



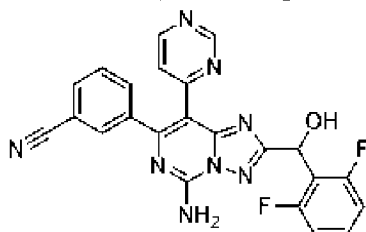
К смеси 3-(5-амино-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила (2 г, 6,11 ммоль) в ДМФА (12 мл) при -30°C порциями добавляли NBS (1,09 г, 6,11 ммоль). Реакционной смеси давали медленно нагреться до 0 °C, в результате чего получился гомогенный раствор. После перемешивания при 0°C в течение 1 ч реакционную смесь разбавляли насыщенным раствором NaHCO₃ и полученное твердое вещество собирали путем фильтрования. Затем твердое вещество очищали с помощью флеш-хроматографии на колонке с силикагелем, элюируя от 0 до 10% MeOH в ДХМ, с получением желаемого продукта. ЖХ/МС, теор. для C₁₈H₁₃BrN₇ (M+H)⁺: 406,0; эксп. 406,0.

Стадия 5: 3-(5-амино-2-(пиридин-2-илметил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил

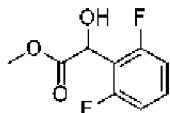
Pd(Ph₃P)₄ (284 мг, 0,246 ммоль) добавляли к смеси 4-(трибутилстаннил)пиримидина (1090 мг, 2,95 ммоль), 3-(5-амино-8-бром-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила (1000 мг, 2,46 ммоль) и хлорида меди(I) (244 мг, 2,46 ммоль) в 1,4-диоксане (12 мл). Реакционную смесь продували N₂ и перемешивали при 80°C в течение 7 часов. Полученную смесь охлаждали до комнатной температуры, концентрировали, разбавляли ДХМ (50 мл) и промывали насыщенным раствором NH₄OH. Органический слой сушили над Na₂SO₄, концентрировали и очищали с помощью препаративной ЖХ-МС (pH 2, ацетонитрил/вода с ТФУ) с получением продукта в виде соли ТФУ. ЖХ/МС, теор. для C₂₂H₁₆N₉ (M+H)⁺: 406,2; эксп. 406,2. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО) δ 8,95 (с, 1H), 8,83 (д, J=5,3 Гц, 1H), 8,59 (д, J=5,1 Гц, 1H), 7,96 (м, 1H), 7,88 (д, J=5,1 Гц, 1H), 7,82 (д, J=7,6 Гц, 1H), 7,76 (с, 1H), 7,60-

7,53 (м, 2H), 7,53-7,48 (м, 1H), 7,48-7,42 (м, 1H), 4,49 (с, 2H).

Пример А2: Синтез 3-(5-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидроксиметил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила (соединения 2)



Стадия 1: Метил 2-(2,6-дифторфенил)-2-гидроксиацетат

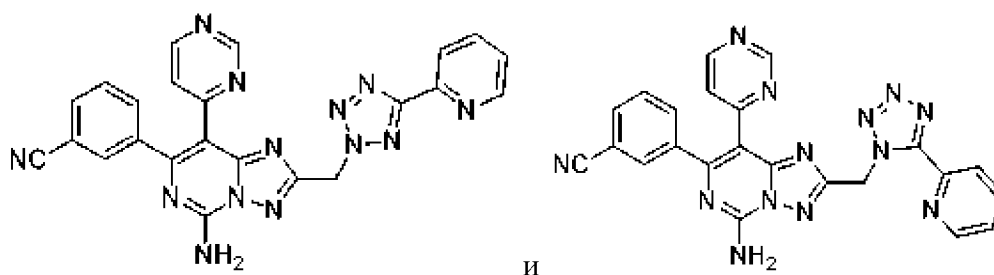


Концентрированную серную кислоту (1,42 мл, 27 ммоль) добавляли к метанольному (45 мл) раствору 2,6-дифторминдальной кислоты (5 г, 27 ммоль) при 0 °С. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов до концентрирования. К полученной взвеси добавляли насыщенный раствор NaHCO_3 (30 мл). Полученную смесь экстрагировали ДХМ (3×20 мл). Объединенные органические слои промывали водой, сушили над Mg_2SO_4 , фильтровали и концентрировали с получением неочищенного продукта, который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ/МС, теор. для $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{NO}_3$ ($\text{M}+\text{H}+\text{MeCN}$)⁺: $m/z=244,1$; эксп. 244,2.

Стадия 2: 3-(5-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидроксиметил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил

Это соединение было получено с использованием процедур, аналогичных описанным для примера А1, с использованием метил-2-(2,6-дифторфенил)-2-гидроксиацетата вместо метил-2-(пиридин-2-ил)ацетата на стадии 2. Два энантиомера разделяли хиральной СФХ с использованием колонки Phenomenex Lux Cellulose-1 (21,2×250 мм, размер частиц 5 мкм), элюируя изократной подвижной фазой 25% MeOH в CO_2 со скоростью потока 80 мл/мин. Пик 1 был выделен и дополнительно очищен с помощью препаративной ЖХ-МС (pH=2, MeCN/вода с ТФУ) с получением желаемого продукта в виде соли ТФУ. ЖХ/МС, теор. для $\text{C}_{23}\text{H}_{15}\text{F}_2\text{N}_8\text{O}$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺: $m/z=457,1$; эксп. 457,1. ^1H ЯМР (500 МГц, ДМСО) δ 8,94 (д, $J=1,3$ Гц, 1H), 8,81 (д, $J=5,2$ Гц, 1H), 7,85 (дд, $J=5,3$, 1,4 Гц, 1H), 7,81 (дт, $J=7,4$, 1,5 Гц, 1H), 7,76 (т, $J=1,7$ Гц, 1H), 7,55 (дт, $J=7,8$, 1,5 Гц, 1H), 7,49 (т, $J=7,8$ Гц, 1H), 7,44 (тт, $J=8,4$, 6,4 Гц, 1H), 7,09 (т, $J=8,3$ Гц, 2H), 6,27 (с, 1H).

Пример А3: Синтез 3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-2H-тетразол-2-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила (соединения 3А) и 3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-1H-тетразол-1-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила (соединения 3В)



Стадия 1: 3-(5-амино-2-(гидроксиметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил

2-гидроксиацетогидразид (2,34 г, 26,01 ммоль) добавляли к этанольному (35 мл) раствору 3-(2-амино-6-хлорпиримидин-4-ил)бензонитрила (4,00 г, 17,34 ммоль) (пример А1, стадия 1) при комнатной температуре. После нагревания и перемешивания с обратным холодильником в течение 2 ч реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали. Полученный остаток переносили в N, O-бис(триметилсилил)ацетамид (20 мл) и перемешивали при 120°C в течение 7 часов. Затем смесь охлаждали до комнатной температуры, выливали на лед и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Полученное твердое вещество собирали фильтрованием и помещали в 20 мл 1 н. раствора HCl. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, фильтруют и водный слой нейтрализуют добавлением насыщенного раствора NaHCO₃. Образовавшийся осадок собирали фильтрованием и сушили с получением желаемого продукта в виде коричневого твердого вещества. ЖХ/МС, теор. для C₁₃H₁₁N₆O (M+H)⁺: 267,1; эксп. 267,1.

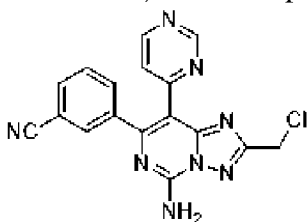
Стадия 2: 3-(5-амино-8-бром-2-(гидроксиметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил

К смеси 3-(5-амино-2-(гидроксиметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила (1,0 г, 3,76 ммоль) в ДМФА (12 мл) при -30°C порциями добавляли NBS (0,67 г, 3,76 ммоль). Реакционной смеси давали медленно нагреться до 0 °C, в результате чего получился гомогенный раствор. После перемешивания при 0°C в течение 1 ч реакционную смесь разбавляли насыщенным раствором NaHCO₃, искомый продукт собирали путем фильтрования и сушили. ЖХ/МС, теор. для C₁₃H₁₀BrN₆O (M+H)⁺: 345,0; эксп. 345,0.

Стадия 3: 3-(5-амино-2-(гидроксиметил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил

Тетракис(трифенилфосфин)палладий(0) (0,067 г, 0,058 ммоль) был добавлен к смеси 4-(трибутилстаннил)пиримидина (0,321 г, 0,869 ммоль), 3-(5-амино-8-бром-2-(гидроксиметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила (0,20 г, 0,579 ммоль), CsF (0,176 г, 1,159 ммоль) и йодида меди(I) (0,022 г, 0,116 ммоль) в 1,4-диоксане (5,0). Реакционную смесь продували N₂ и перемешивали при 80°C в течение 7 часов. Полученную смесь охлаждали до комнатной температуры, концентрировали и очищали при помощи колоночной флеш-хроматографии, элюируя от 0% до 10% метанола в ДХМ, с получением продукта. ЖХ/МС, теор. для C₁₇H₁₃N₈O (M+H)⁺: 345,1; эксп. 345,1.

Стадия 4: 3-(5-амино-2-(хлорметил)-8-(пириимидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пириимидин-7-ил)бензонитрил



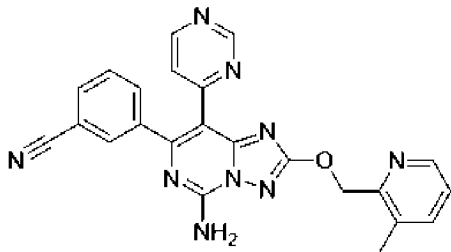
К смеси 3-(5-амино-2-(гидроксиметил)-8-(пириимидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пириимидин-7-ил)бензонитрила (0,1 г, 0,290 ммоль) в ацетонитриле (10 мл) добавляли тионилхлорид (0,212 мл, 2,90 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч, концентрируют и очищают с помощью флеш-хроматографии, элюируя от 0% до 5% метанола в ДХМ, с получением продукта. ЖХ/МС, теор. для $C_{17}H_{12}ClN_8$ ($M+H$)⁺: 363,1; эксп. 363,1.

Стадия 5: Смесь 3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-2Н-тетразол-2-ил)метил)-8-(пириимидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пириимидин-7-ил)бензонитрила (соединения 3А) и 3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-1Н-тетразол-1-ил)метил)-8-(пириимидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пириимидин-7-ил)бензонитрила (соединения 3В)

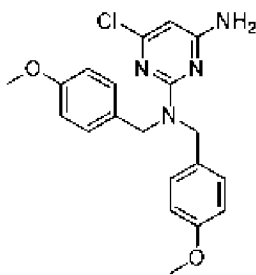
Смесь 3-(5-амино-2-(хлорметил)-8-(пириимидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пириимидин-7-ил)бензонитрила (10 мг, 0,028 ммоль), 2-(1Н-тетразол-5-ил)пиридин (8,1 мг, 0,055 ммоль) и Cs_2CO_3 (20,7 мг, 0,064 ммоль) в ДМФ (1 мл) перемешивали при 100°C в течение 10 мин. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, разбавляли метанолом (4 мл) и очищали с помощью препаративной ЖХ-МС (рН 2, ацетонитрил/вода с ТФУ) с получением продукта в виде соли ТФУ. ЖХ/МС, теор. для $C_{23}H_{16}N_{13}$ ($M+H$)⁺: 474,2; эксп. 474,2.

Соединение 3А: 1H ЯМР (500 МГц, ДМСО) δ 8,99 (д, $J=1,4$ Гц, 1H), 8,85 (д, $J=5,3$ Гц, 1H), 8,80-8,71 (м, 1H), 8,71-8,39 (б, 2H), 8,18 (д, $J=7,7$, 1,1 Гц, 1H), 8,04 (т, $J=7,8$, 1,8 Гц, 1H), 7,85 (м, 2H), 7,80-7,76 (м, 1H), 7,62-7,55 (м, 2H), 7,53 (т, $J=7,8$ Гц, 1H), 6,39 (с, 2H).

Пример А4: Синтез 3-(5-амино-2-((3-метилпиридин-2-ил)метокси)-8-(пириимидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пириимидин-7-ил)бензонитрила (соединения 4)

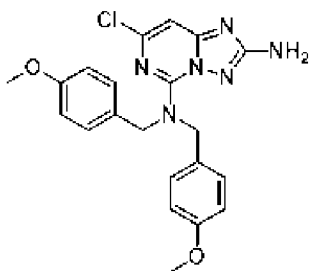


Стадия 1: 6-хлор- N^2, N^2 -бис(4-метоксибензил)пириимидин-2,4-диамин



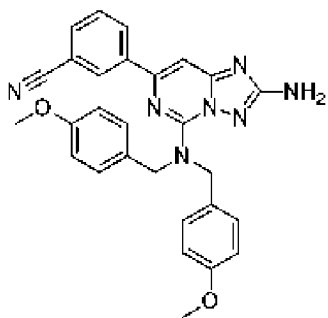
К раствору 2,6-дихлорпиримидин-4-амин (5,0 г, 31 ммоль) в 2-пропанол (31 мл) добавляли **N, N-диизопропилэтиламин** (6,4 мл, 37 ммоль) и бис(4-метоксибензил)амин (7,9 г, 31 ммоль). Полученный раствор перемешивали при 100°C в течение 16 ч, охлаждали до комнатной температуры, разбавляли водой (100 мл) и экстрагировали EtOAc (100 мл). Органический слой промывали водой и соляным раствором, сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали с получением неочищенного продукта, который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ/МС, теор. для $C_{20}H_{22}ClN_4O_2$ ($M+H$)⁺: 385,1; эксп. 385,1.

Стадия 2: 7-хлор-N⁵,N⁵-бис(4-метоксибензил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-2,5-диамин



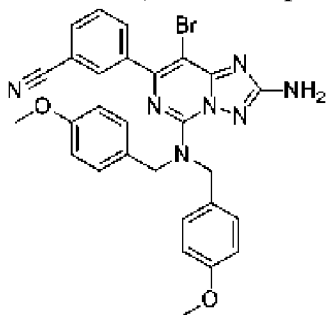
O-этилкарбоизотиоцианатидат (3,1 мл, 26 ммоль) добавляли к 1,4-диоксановому (5,0 мл) раствору 6-хлор-N²,N²-бис(4-метоксибензил)пиримидин-2,4-диамина (1,0 г, 2,6 ммоль) при комнатной температуре. Затем реакционную смесь перемешивали при 90°C в течение ночи, охлаждали до комнатной температуры и концентрировали. Полученный материал растворяли в метаноле (12 мл) и этаноле (12 мл) и добавляли **N, N-диизопропилэтиламин** (0,91 мл, 5,2 ммоль), а затем гидрохлорид гидросиламина (0,54 г, 7,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 45°C в течение 2 ч, охлаждали до комнатной температуры и концентрировали. Полученный материал помещали в EtOAc, промывали водой, сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали. Неочищенный материал затем очищали с помощью хроматографии на силикагеле, элюируя от 0% до 50% EtOAc в гексане, с получением продукта. ЖХ/МС, теор. для $C_{21}H_{22}ClN_6O_2$ ($M+H$)⁺: 425,1; эксп. 425,2.

Стадия 3: 3-(2-амино-5-(бис(4-метоксибензил)амино)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил



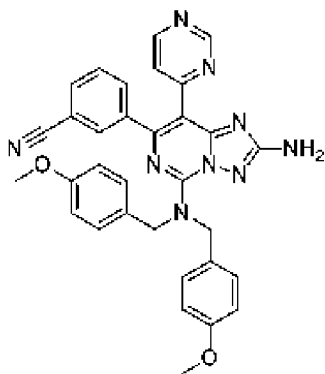
Хлор(2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-три-изопропил-1,1'-бифенил)(2'-амино-1,1'-бифенил-2-ил)палладий(II) (330 мг, 0,42 ммоль) добавляли к смеси (3-цианопенил)бороновой кислоты (460 мг, 3,2 ммоль), 7-хлор-N⁵,N⁵-бис(4-метоксибензил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-2,5-диамина (890 мг, 2,1 ммоль) и карбоната натрия (890 мг, 8,4 ммоль) в 1,4-диоксане (8,8 мл) и воде (1,8 мл). Смесь продували N₂ и перемешивали при 95 °С в течение ночи. Реакционную смесь затем охлаждали до комнатной температуры, концентрировали и очищали с помощью хроматографии на силикагеле, элюируя от 0% до 50% EtOAc в ДХМ, с получением желаемого продукта. ЖХ/МС, теор. для C₂₈H₂₆N₇O₂ (M+H)⁺: 492,2; эксп. 492,2.

Стадия 4: 3-(2-амино-5-(бис(4-метоксибензил)амино)-8-бром-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил



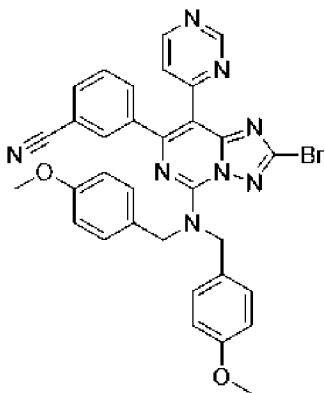
К раствору 3-(2-амино-5-(бис(4-метоксибензил)амино)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила (330 мг, 0,66 ммоль) в ДМФ (1,4 мл) медленно добавляли NBS (120 мг, 0,66 ммоль) при 0°C. Затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут перед добавлением воды (10 мл). Полученное твердое вещество собирали фильтрованием и сушили с получением желаемого продукта. ЖХ/МС, теор. для C₂₈H₂₅BrN₇O₂ (M+H)⁺: m/z=570,1; эксп. 570,2.

Стадия 5: 3-(2-амино-5-(бис(4-метоксибензил)амино)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил



Смесь 3-(2-амино-5-(бис(4-метоксибензил)амино)-8-бром-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила (350 мг, 0,61 ммоль), 4-(трибутилстаннил)пиримидина (210 мкл, 0,67 ммоль), тетраakis(трифенилфосфин)палладия (0) (70 мг, 0,060 ммоль), йодида меди (I) (23 мг, 0,12 ммоль) и цезия фторида (180 мг, 1,2 ммоль) в диоксане (4,7 мл) нагревали и перемешивали при 140°C в течение 30 мин в микроволновом реакторе. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через слой целита (промывая ДХМ) и концентрировали. Полученный материал очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле, элюируя смесью 0-20% MeOH/ДХМ, с получением желаемого продукта. ЖХ/МС, теор. для $C_{32}H_{28}N_9O_2$ (M+H)⁺: m/z=570,2; эксп. 570,3.

Стадия 6: 3-(5-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-бром-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил



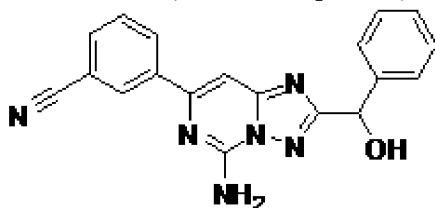
К смеси бромида меди (II) (91 мг, 0,407 ммоль) и трет-бутилнитрита (0,054 мл, 0,407 ммоль) в ацетонитриле (3 мл) в атмосфере азота при 50 °C по каплям добавляли 3-(2-амино-5-(бис(4-метоксибензил)амино)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил (100 мг, 0,203 ммоль) в ацетонитриле (3 мл). Смесь перемешивали при 50°C в течение 2 часов. После охлаждения до комнатной температуры добавляли 1 н. водный раствор NH_4OH (20 мл) и смесь трижды экстрагировали CH_2Cl_2 (20 мл). Объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Неочищенный материал очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле, элюируя смесью 50-100% этилацетат/гексан, с получением желаемого продукта. ЖХ/МС, теор. для $C_{32}H_{26}BrN_8O_2$ (M+H)⁺: m/z=633,1; эксп. 633,2.

Стадия 7: 3-(5-амино-2-((3-метилтиридин-2-ил)метокси)-8-(пиримидин-4-ил)-

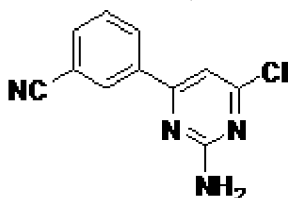
[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил

Суспензию гидроксида натрия (60% в минеральном масле, 3,8 мг, 0,095 ммоль), 3-(5-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-бром-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила (20 мг, 0,032 ммоль) и (3-метилпиримидин-2-ил)метанола (9,1 мкл, 0,095 ммоль) в 1,4-диоксане (1 мл) нагревали и перемешивали при 110°C в атмосфере азота в течение ночи. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, концентрировали и добавляли ТФУ (1,0 мл). Затем полученную смесь перемешивали при 110°C в течение 30 минут, охлаждали до комнатной температуры, разбавляли ацетонитрилом, фильтровали и очищали с помощью препаративной ЖХ-МС (рН 2, ацетонитрил/вода с ТФУ) с получением желаемого продукта в виде соли ТФУ. ЖХ/МС, теор. для $C_{23}H_{18}N_9O$ (M+H)⁺: m/z=436,2; эксп. 436,2. ¹H ЯМР (600 МГц, ДМСО) δ 8,97 (д, J=1,4 Гц, 1H), 8,88 (д, J=5,2 Гц, 1H), 8,58-8,52 (м, 1H), 7,97 (д, J=7,8 Гц, 1H), 7,88 (дд, J=5,4, 1,4 Гц, 1H), 7,85 (дт, J=7,5, 1,5 Гц, 1H), 7,78 (т, J=1,8 Гц, 1H), 7,60-7,54 (м, 2H), 7,53 (т, J=7,8 Гц, 1H), 5,69 (с, 2H), 2,48 (с, 3H).

Пример A5: Синтез 3-(5-амино-2-(гидрокси(фенил)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила (соединения 5)



Стадия 1: 3-(2-амино-6-хлорпиримидин-4-ил)бензонитрил



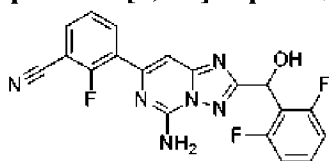
Смесь 4,6-дихлорпиримидин-2-амин (2,5 г, 15,24 ммоль), (3-цианопенил)бороновой кислоты (2,016 г, 13,72 ммоль), тетраakis(трифенилфосфин)палладия(0) (1,057 г, 0,915 ммоль) и карбонат натрия (3,23 г, 30,5 ммоль) в 1,4-диоксане (60 мл) и воду (5 мл) дегазировали азотом, затем полученную смесь нагревали при 60°C в течение двух дней. После охлаждения до комнатной температуры (к. т.) смесь концентрировали, затем разбавляли водой и экстрагировали дихлорметаном (ДХМ, 3×30 мл). Объединенные органические слои сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью флеш-хроматографии на колонке с силикагелем с использованием 8% этилацетата (EtOAc) в дихлорметане с получением желаемого продукта. ЖХ/МС, теор. для $C_{11}H_8ClN_4$ (M+H)⁺: 231,0. Эксп.: 231,0.

Стадия 2: 3-(5-амино-2-(гидрокси(фенил)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил

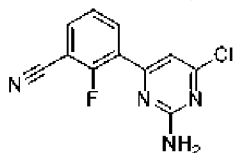
Раствор 3-(2-амино-6-хлорпиримидин-4-ил)бензонитрила (100 мг, 0,434 ммоль) и 2-

гидрокси-2-фенилацетогидразида (108 мг, 0,650 ммоль) в этаноле (2 мл) нагревали и перемешивали при 95°C в течение 3 часов. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь концентрировали досуха, помещали в N, O-бис(триметилсилил)ацетамид (1 мл) и перемешивали при 120°C в течение 7 часов. Полученную смесь охлаждали до комнатной температуры, выливали на лед и перемешивали в течение 1 часа. Полученную суспензию трижды экстрагировали ДХМ. Объединенные органические слои сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток растворяли в метаноле (MeOH) и очищали с помощью препаративной ЖХ-МС (pH 2, ацетонитрил/вода с ТФУ) с получением продукта в виде соли ТФУ. ЖХ/МС, теор. для C₁₉H₁₅N₆O (M+H)⁺: 343,1; эксп. 343,1.

Пример А6: Синтез 3-(5-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрила (соединения 6)

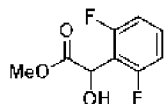


Стадия 1: 3-(2-амино-6-хлорпиримидин-4-ил)-2-фторбензонитрил



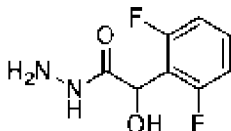
К раствору 3-бром-2-фторбензонитрила (18,3 г, 91 ммоль) в ТГФ (60 мл), охлажденному до 0 °С, добавляли комплекс i-PrMgCl LiCl (70,4 мл, 91 ммоль) в ТГФ (1,3 М) в течение 20 мин. Смесь перемешивали при 0°C в течение 50 мин, затем при 0°C добавляли хлорид цинка (48,1 мл, 91 ммоль) в 2-МеТНФ (1,9 М). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 25 мин, после чего одной порцией добавляли 4,6-дихлорпиримидин-2-амин (10 г, 61,0 ммоль). Раствор перемешивали в течение 10 мин. К смеси добавляли тетраakis(трифенилфосфин)палладий (1,41 г, 1,22 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. По завершении к реакционному раствору добавляли силикагель с 2,4,6-тримеркаптоотриазинном (2 г). Смесь перемешивали в течение 1 ч и фильтровали. Твердое вещество промывали этилацетатом до тех пор, пока желаемый продукт полностью не элюировался (по данным ЖХ-МС). Фильтрат промывали насыщенным раствором хлорида аммония и водой. Органические слои концентрировали с получением неочищенного продукта. К неочищенному материалу добавляли воду и полученный осадок собирали путем фильтрации и сушили в токе азота. Неочищенный материал вывозили без дополнительной очистки. ЖХ/МС, теор. для C₁₁H₇ClFN₄ (M+H)⁺: m/z=249,0; эксп. 249,0.

Стадия 2: Метил 2-(2,6-дифторфенил)-2-гидроксиацетат



Концентрированную серную кислоту (1,4 мл, 27 ммоль) добавляли к метанольному (45 мл) раствору 2,6-дифторминдальной кислоты (5,0 г, 27 ммоль) при 0 °С. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов до концентрирования. К полученной суспензии добавляли насыщенный раствор NaHCO_3 . Полученную смесь экстрагировали ДХМ. Объединенные органические слои промывали водой, сушили над MgSO_4 , фильтровали и концентрировали с получением неочищенного продукта, который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ/МС, теор. для $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{NO}_3$ ($\text{M}+\text{H}+\text{MeCN}$)⁺: $m/z=244,1$; эксп. 244,2.

Стадия 3: 2-(2,6-дифторфенил)-2-гидроксиацетогидразид

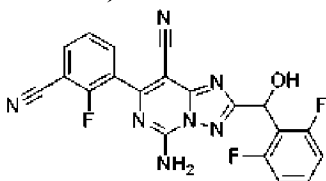


Гидразин (3,0 мл, 96 ммоль) добавляли к этанольному (90 мл) раствору метил-2-(2,6-дифторфенил)-2-гидроксиацетата (10,8 г, 53 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при 100°C в течение 2 часов, охлаждали до комнатной температуры, концентрировали и использовали на следующем этапе без дополнительной очистки. ЖХ/МС, теор. для $\text{C}_8\text{H}_9\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺: 203,1; эксп. 203,2.

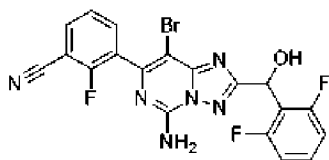
Стадия 4: 3-(5-Амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрил

Указанное в заголовке соединение получали, используя процедуры, аналогичные описанным для примера А5, стадии 2, с использованием 3-(2-амино-6-хлорпиримидин-4-ил)-2-фторбензонитрила вместо 3-(2-амино-6-хлорпиримидин-4-ил)бензонитрила и с 2-(2,6-дифторфенил)-2-гидроксиацетогидразидом вместо 2-гидрокси-2-фенилацетогидразида. Два энантиомера разделяли с помощью хиральной СФХ с использованием колонки Phenomenex (R, R)-Whelk-O1 (21,2×250 мм, размер частиц 5 мкм), элюируя изократной подвижной фазой 15% MeOH в CO_2 со скоростью потока 85 мл/мин. Время удерживания первого и второго пиков составляло 3,8 мин и 5,3 мин, соответственно. После концентрирования второй пик очищали с помощью препаративной ЖХ-МС (pH=2, MeCN/вода с ТФУ) с получением желаемого продукта в виде соли ТФУ. ЖХ/МС, теор. для $\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺: 397,1; эксп. 397,1.

Пример А7: Синтез 5-амино-7-(3-циано-2-фторфенил)-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-8-карбонитрила (соединения 7)



Стадия 1: 3-(5-амино-8-бром-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрил



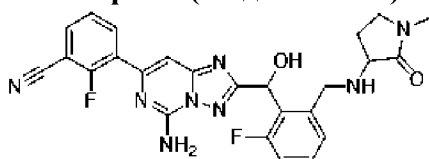
Это соединение получали, используя процедуры, аналогичные описанным для примера А1, стадии 4, с 3-(5-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрилом (из примера А6) вместо 3-(5-амино-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила.

ЖХ/МС, теор. для $C_{19}H_{11}BrF_3N_6O$ ($M+H$)⁺: 475,0; эксп. 475,0.

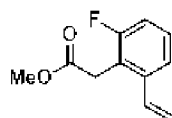
Стадия 2: 5-амино-7-(3-циано-2-фторфенил)-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-8-карбонитрил

Смесь 3-(5-амино-8-бром-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрил (0,12 г, 0,25 ммоль), $ZnCN_2$ (0,060 г, 0,51 ммоль) и $tBuXPhos$ Pd G3 (0,020 г, 0,025 ммоль) в 1,4-диоксане (0,63 мл) и воде (0,63 мл) продували N_2 и перемешивали при 100°C в течение 1 часа. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь разбавляли насыщенным раствором $NaHCO_3$, и органические вещества экстрагировали $EtOAc$ (3х). Объединенные органические слои сушили над $MgSO_4$ и концентрировали. Два энантиомера разделяли с помощью хиральной ВЭЖХ с использованием колонки Phenomenex Lux Cellulose-4 (21,2×250 мм, размер частиц 5 мкм), элюируя изократной подвижной фазой 60% $EtOH$ в гексане со скоростью потока 20 мл/мин. Время удерживания первого и второго пиков составляло 4,9 мин и 7,2 мин, соответственно. После концентрирования первый пик очищали препаративной ЖХ-МС (pH 2, ацетонитрил/вода с ТФУ) с получением желаемого продукта в виде соли ТФУ. ЖХ/МС, теор. для $C_{20}H_{11}F_3N_7O$ ($M+H$)⁺: 422,1; эксп. 422,1.

Пример А8: Синтез 3-(5-амино-2-((2-фтор-6-(((1-метил-2-оксопирролидин-3-ил)амино)метил)фенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрила (соединения 8)



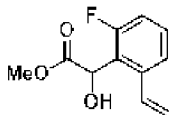
Стадия 1: Метил 2-(2-фтор-6-винилфенил)ацетат



Смесь метил 2-(2-бром-6-фторфенил)ацетата (6,0 г, 24 ммоль), фосфата калия трехосновного (15,5 г, 73 ммоль), ацетата палладия (II) (0,55 г, 2,4 ммоль) и $SPhos$ (1,0 г, 2,4 ммоль) добавляли в сосуд высокого давления объемом 500 мл. Затем добавляли 4,4,5,5-тетраметил-2-винил-1,3,2-диоксаборолан (6,4 мл, 36 ммоль) в диоксане (150 мл) и воду (15 мл), реакционную смесь продували N_2 и перемешивали при 80°C в течение 16

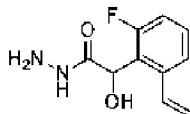
часов. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, концентрировали и экстрагировали EtOAc (x3). Объединенные органические слои сушат над MgSO_4 , концентрируют и очищают с помощью колоночной хроматографии (от 0 до 50% EtOAc в ДХМ). ЖХ/МС, теор. для $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{FO}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 195,1; эксп. 195,1.

Стадия 2: Метил 2-(2-фтор-6-винилфенил)-2-гидроксиацетат



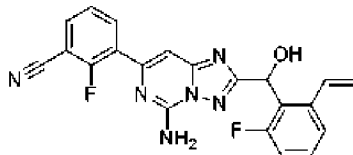
Метил 2-(2-фтор-6-винилфенил)ацетат (2,5 г, 12,9 ммоль) растворяли в ТГФ (130 мл) и охлаждали до -78°C . Добавляли по каплям LDA (16,7 мл, 16,7 ммоль) в ТГФ (1,0 М) и полученный раствор перемешивали при -78°C в течение 30 мин. Затем по каплям добавляли 9,9-диметилтетрагидро-4Н-4а,7-метанобензо[с][1,2]оксазирен[2,3-Ь]изотиазол-3,3-диоксид (4,7 г, 20,6 ммоль) в ТГФ (0,5 м). Через 30 мин при -78°C реакционную смесь нагревали до 0°C и перемешивали в течение 1 часа. Реакцию гасили насыщенным раствором NH_4Cl . Водный слой экстрагировали ДХМ (3X). Объединенные органические слои сушили над безводным Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии, элюируя 0-50% этилацетатом в гексане, с получением желаемого продукта. ЖХ/МС, теор. для $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{FO}_3\text{Na}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$: 233,1; эксп. 233,1.

Стадия 3: 2-(2-фтор-6-винилфенил)-2-гидроксиацетогидразид



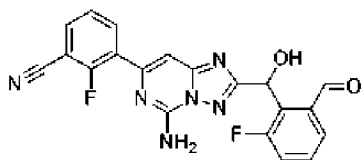
Это соединение получали, используя процедуры, аналогичные описанным для примера А6, стадии 3, с использованием метил-2-(2-фтор-6-винилфенил)-2-гидроксиацетата вместо метил-2-(2,6-дифторфенил)-2-гидроксиацетата. ЖХ/МС, теор. для $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{FN}_2\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 211,1; эксп. 211,1.

Стадия 4: 3-(5-амино-2-((2-фтор-6-винилфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]тимидин-7-ил)-2-фторбензонитрил



Это соединение получали, используя процедуры, подобные описанным для примера А6, стадии 4, с использованием 2-(2-фтор-6-винилфенил)-2-гидроксиацетогидразида вместо 2-(2,6-дифторфенил)-2-гидроксиацетогидразида. ЖХ/МС, теор. для $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 405,1; эксп. 405,1.

Стадия 5: 3-(5-амино-2-((2-фтор-6-формилфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]тимидин-7-ил)-2-фторбензонитрил

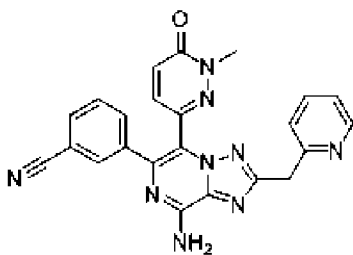


Четырехокись осмия в воде (4% мас./мас., 0,36 мл, 0,12 ммоль) добавляли к ТГФ (18 мл) и водному (4,6 мл) раствору 3-(5-амино-2-((2-фтор-6-винилфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрил (930 мг, 2,30 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 5 мин при комнатной температуре и затем добавляли периодат натрия (2,5 г, 11,5 ммоль). После перемешивания в течение 1 часа смесь разбавляли метабисульфитом натрия в насыщенном водном растворе. NaHCO_3 (5% мас./мас., 20 мл) и экстрагировали EtOAc (x3). Объединенные органические слои сушили над MgSO_4 и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный материал очищали с помощью колоночной хроматографии, элюируя от 0 до 100% этилацетата в гексанах, с получением желаемого продукта. ЖХ/МС, теор. для $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺: 407,1; эксп. 407,1.

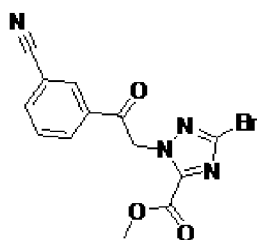
Стадия 6: 3-(5-амино-2-((2-фтор-6-(((1-метил-2-оксопирролидин-3-ил)амино)метил)фенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрил

Раствор 3-амино-1-метилпирролидин-2-она (63 мг, 0,55 ммоль) и 3-(5-амино-2-((2-фтор-6-формилфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрила (150 мг, 0,37 ммоль) перемешивали при 40°C в течение 2 ч в 1,2-дихлорэтаноле (1,9 мл). Затем добавляли триацетоксиборгидрид натрия (160 мг, 0,74 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов. Реакционную смесь разбавляли насыщенным раствором NaHCO_3 и органические слои экстрагировали EtOAc (3x). Объединенные органические слои сушили над MgSO_4 и концентрировали. Диастереомеры разделяли с помощью хиральной ВЭЖХ с использованием колонки Phenomenex Lux Cellulose-4 (21,2×250 мм, размер частиц 5 мкм), элюируя изократной подвижной фазой 45% EtOH в гексане со скоростью потока 20 мл/мин. Время удерживания первого и второго пиков составляло 14,9 мин и 17,5 мин, соответственно. После концентрирования второй пик дополнительно разделяли с помощью хиральной ВЭЖХ с использованием колонки Phenomenex Lux Cellulose-1 (21,2×250 мм, размер частиц 5 мкм), элюируя изократной подвижной фазой 30% EtOH в гексане со скоростью потока 20 мл/мин. Время удерживания первого и второго пиков составляло 11,0 мин и 15,5 мин, соответственно. После концентрирования первый пик очищали с помощью препаративной ЖХ-МС (pH=2, MeCN/вода с ТФУ) с получением желаемого продукта в виде соли ТФУ. ЖХ/МС, теор. для $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{F}_2\text{N}_8\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺: 505,2; эксп. 505,2.

Пример А9: Синтез 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила (соединения 9)

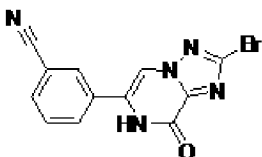


Стадия 1: Метил-3-бром-1-(2-(3-цианофенил)-2-оксоэтил)-1H-1,2,4-триазол-5-карбоксилат



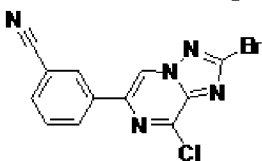
К раствору метил 3-бром-1H-1,2,4-триазол-5-карбоксилата (5,0 г, 24,3 ммоль), 3-(2-бромацетил)бензонитрила (5,44 г, 24,3 ммоль) в ДМФА (100 мл) добавляли карбонат калия (3,35 г, 24,3 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 2 часов. Затем реакционную смесь разбавляли водой и ДХМ. Органический слой отделяли, промывали солевым раствором, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Полученный остаток очищали с помощью флеш-хроматографии с получением целевого продукта в виде белого твердого вещества (5,2 г, 61%). ЖХ/МС, теор. для C₁₃H₁₀BrN₄O₃ (M+H)⁺: m/z=349,0; эксп. 349,0.

Стадия 2: 3-(2-Бром-8-оксо-7,8-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пирозин-6-ил)бензонитрил



Метил 3-бром-1-(2-(3-цианофенил)-2-оксоэтил)-1H-1,2,4-триазол-5-карбоксилат (10,5 г, 30,1 ммоль) растворяли в уксусной кислоте (100 мл) и добавляли ацетат аммония (23,18 г, 301 ммоль). Смесь перемешивали при 110 °С в течение 12 часов. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь разбавляли водой. Образовавшийся осадок собирали фильтрованием, промывали водой и сушили в вакууме, получая продукт (8,4 г, 88%). ЖХ/МС, теор. для C₁₂H₇BrN₅O (M+H)⁺: m/z=316,0; эксп. 316,0.

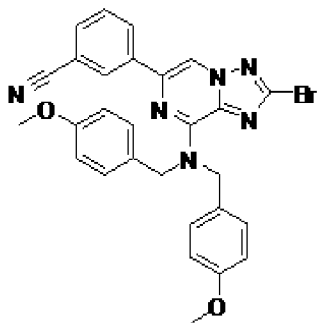
Стадия 3: 3-(2-Бром-8-хлор-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пирозин-6-ил)бензонитрил



Смесь 3-(2-бром-8-оксо-7,8-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пирозин-6-ил)бензонитрила (8,4 г, 26,6 ммоль) и POCl₃ (49,5 мл, 531 ммоль) перемешивали при

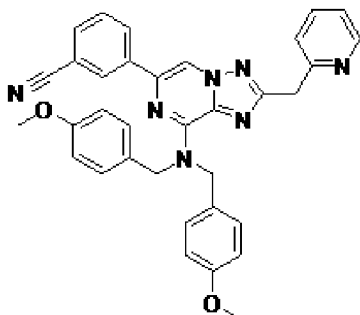
110°C в течение ночи. После охлаждения до комнатной температуры, реакционную смесь медленно прибавляли в колбу, содержащую лед и гидрокарбонат натрия. Полученный осадок собирали, промывали водой и сушили с получением продукта (8,8 г, 99%). ЖХ/МС, теор. для $C_{12}H_6BrClN_5$ ($M+H$)⁺: $m/z=333,9$; эксп. 334,0.

Стадия 4. 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-бром-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил



Смесь 3-(2-бром-8-хлор-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила (8,99 г, 26,9 ммоль), бис(4-метоксибензил)амин (10,37 г, 40,3 ммоль) и DIPEA (9,4 мл, 53,7 ммоль) в ДМФ (134 мл) перемешивали при 85°C в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли водой. Образовавшийся осадок собирали фильтрованием и сушили, получая продукт (14,1 г, 94%). ЖХ/МС, теор. для $C_{28}H_{24}BrN_6O_2$ ($M+H$)⁺: $m/z=555,1$; эксп. 555,1.

Стадия 5: 3-(8-(Бис(4-метоксибензил)амино)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил

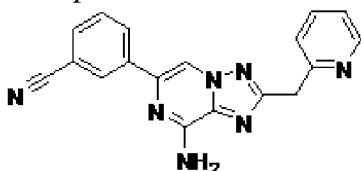


К раствору 2-метилпиридина (0,050 г, 0,540 ммоль) в ТГФ (0,5 мл) прибавляли 2,5 М *n*-бутиллитий (0,216 мл, 0,540 ммоль) при -78° С. Полученный раствор перемешивали при той же температуре в течение 1 ч перед тем, как прибавляли 1,9 М хлорид цинка в 2-метилтетрагидрофуране (0,284 мл, 0,540 ммоль), и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин.

Из сосуда для микроволновой обработки, загруженного 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-бром-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрилом (0,15 г, 0,270 ммоль), ацетатом палладия (1,1 мг, 4,7 мкмоль) и 2'-(дициклогексилфосфино)-*N,N,N',N'*-тетраметилбифенил-2,6-диамином (4,1 мг, 9,5 мкмоль) откачивали воздух и обратно наполняли азотом. Затем в реакционный сосуд добавляли ТГФ (2,0 мл) и толуол (0,5 мл). Смесь охлаждали до 0°C и медленно добавляли с помощью шприца цинковый реагент, приготовленный на предыдущей стадии. Реакционную смесь затем перемешивали

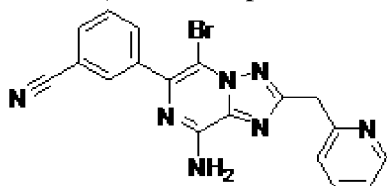
при 60°C в течение ночи, охлажденную до комнатной температуры и разделяли между этилацетатом и раствором NH_4Cl . Слои разделяли, и водный слой экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические фазы слои промывали водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над MgSO_4 и концентрировали. Полученный остаток очищали с помощью флеш-хроматографии с получением продукта (0,11 г, 71%). ЖХ/МС, теор. для $\text{C}_{34}\text{H}_{30}\text{N}_7\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}^+$): $m/z=568,2$; эксп. 568,3.

Стадия 6. 3-(8-амино-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрил



Смесь 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрила (110 мг, 0,194 ммоль) и ТФУ (746 мкл, 9,69 ммоль) перемешивали при 80°C в течение 30 мин, охлаждали до комнатной температуры и концентрировали. Полученный остаток очищали с помощью препаративной ЖХ-МС (рН 2) с получением продукта в виде белого твердого вещества (соль ТФУ) (57 мг, 90%). ЖХ/МС, теор. для $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_7$ ($\text{M}+\text{H}^+$): $m/z=328,1$; эксп. 328,1.

Стадия 7. 3-(8-амино-5-бром-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрил



К раствору 3-(8-амино-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрила (соль ТФУ) (35 мг, 0,079 ммоль) в ДМФ (0,5 мл)/ДХМ (0,5 мл) добавляли NBS (14,1 мг, 0,079 ммоль). Реакционную смесь затем перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа и концентрировали с получением неочищенного продукта, который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ/МС, теор. для $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{BrN}_7$ ($\text{M}+\text{H}^+$): $m/z=406,0$; эксп. 406,0.

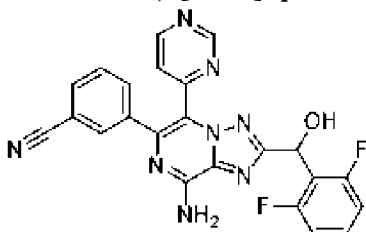
Стадия 8. 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрил

Смесь 6-хлор-2-метилпиримидин-3(2H)-она (30 мг, 0,21 ммоль), бис(пинаколато)дибора (53 мг, 0,21 ммоль), хлор(2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил)[2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладия(II) (15,7 мг, 0,02 ммоль) (XPhos Pd G2) и ацетата калия (61,7 мг, 0,63 ммоль) в 1,4-диоксане (1 мл) перемешивали при 100°C в течение 1 ч. 3-(8-амино-5-бром-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрил (10 мг, 0,025 ммоль), карбонат цезия (37,6 мг, 0,116 ммоль) и воду (0,2 мл) затем прибавляли к реакционной смеси. Полученную смесь нагревали при 90°C в течение 1 ч. Смесь концентрировали и очищали с помощью препаративной ЖХ-

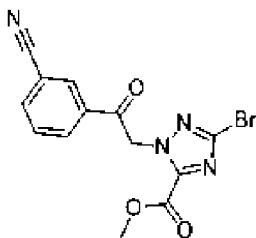
МС (рН 2, ацетонитрил/вода с ТФУ) с получением желаемого продукта в виде соли ТФУ. ЖХ/МС, теор. для $C_{23}H_{18}N_9O$ ($M+H$)⁺: 436,2; эксп. 436,2.

¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО) δ 8,66-8,62 (д, J=5,1 Гц, 1H), 8,09-8,02 (д, J=1,8 Гц, 1H), 7,88-7,85 (т, J=1,8 Гц, 1H), 7,85-7,81 (м, 3H), 7,78-7,72 (д, J=9,6 Гц, 1H), 7,66-7,51 (м, 4H), 7,10-7,06 (д, J=9,6 Гц, 1H), 4,59-4,48 (с, 2H), 3,53-3,43 (с, 3H).

Пример А10: Синтез 3-(8-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-5-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила (соединения 10)

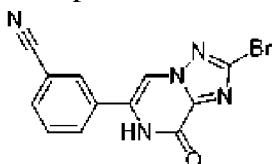


Стадия 1: Метил-3-бром-1-(2-(3-цианофенил)-2-оксоэтил)-1H-1,2,4-триазол-5-карбоксилат



К раствору метил 3-бром-1H-1,2,4-триазол-5-карбоксилата (5,0 г, 24,3 ммоль), 3-(2-бромацетил)бензонитрила (5,44 г, 24,3 ммоль) в ДМФА (100 мл) добавляли карбонат калия (3,35 г, 24,3 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение 2 часов. Затем реакционную смесь разбавляли водой и ДХМ. Органический слой отделяли, промывали солевым раствором, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Полученный остаток очищали с помощью флеш-хроматографии с получением целевого продукта в виде белого твердого вещества (5,2 г, 61%). ЖХ/МС, теор. для $C_{13}H_{10}BrN_4O_3$ ($M+H$)⁺: m/z=349,0; эксп. 349,0.

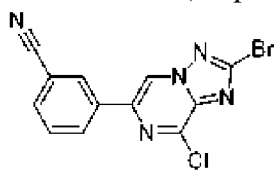
Стадия 2: 3-(2-Бром-8-оксо-7,8-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил



Метил 3-бром-1-(2-(3-цианофенил)-2-оксоэтил)-1H-1,2,4-триазол-5-карбоксилат (10,5 г, 30,1 ммоль) растворяли в уксусной кислоте (100 мл) и добавляли ацетат аммония (23,18 г, 301 ммоль). Смесь перемешивали при 110 °С в течение 12 часов. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь разбавляли водой. Образовавшийся осадок собирали фильтрованием, промывали водой и сушили в вакууме, получая продукт (8,4 г, 88%). ЖХ/МС, теор. для $C_{12}H_7BrN_5O$ ($M+H$)⁺: m/z=316,0; эксп.

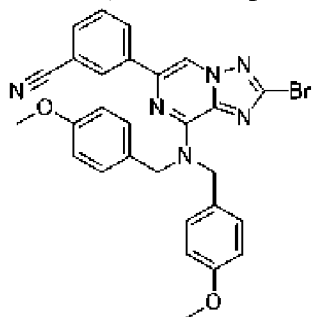
316,0.

Стадия 3: 3-(2-Бром-8-хлор-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрил



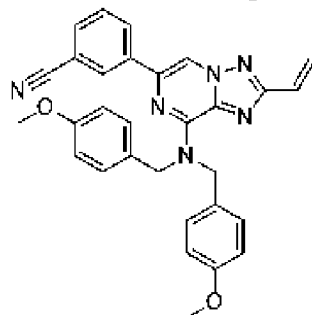
Смесь 3-(2-бром-8-оксо-7,8-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрила (8,4 г, 26,6 ммоль) и POCl_3 (49,5 мл, 531 ммоль) перемешивали при 110°C в течение ночи. После охлаждения до комнатной температуры, реакционную смесь медленно прибавляли в колбу, содержащую лед и гидрокарбонат натрия. Полученный осадок собирали путем фильтрации, промывали водой и сушили с получением продукта (8,8 г, 99%). ЖХ/МС, теор. для $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{BrClN}_5$ ($\text{M}+\text{H}^+$): $m/z=336,0$; эксп. 336,0.

Стадия 4: 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-бром-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрил



Смесь 3-(2-бром-8-хлор-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрила (8,99 г, 26,9 ммоль), бис(4-метоксибензил)амин (10,37 г, 40,3 ммоль) и DIPEA (9,4 мл, 53,7 ммоль) в ДМФ (134 мл) перемешивали при 65°C в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли водой. Образовавшийся осадок собирали фильтрованием и сушили, получая продукт (14,1 г, 94%). ЖХ/МС, теор. для $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{BrN}_6\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}^+$): $m/z=555,1$; эксп. 555,1.

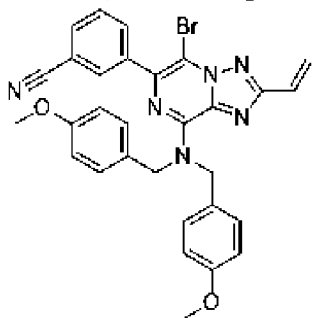
Стадия 5: 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-винил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрил



Смесь 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-бром-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрила (10,0 г, 18,0 ммоль), 4,4,5,5-тетраметил-2-винил-1,3,2-диоксаборолана (3,88 г, 25,2 ммоль), трехосновного фосфата калия (9,55 г, 45,0 ммоль) и хлор(2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил)[2-(2'-амино-1,1'-

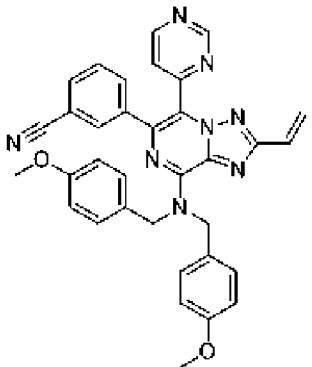
бифенил)]палладия(II) (567 мг, 0,72 ммоль) в 1,4-диоксане (200 мл) и воду (50 мл) перемешивали при 85°C в течение 2 часов. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и удаляли большую часть 1,4-диоксана. Полученный осадок собирали путем фильтрации, промывали водой и сушили с получением неочищенного продукта (9,1 г), который использовали непосредственно на следующей стадии. ЖХ/МС, теор. для $C_{30}H_{27}N_6O_2$ (M+H)⁺: m/z=503,2; эксп. 503,1.

Стадия 6. 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-5-бром-2-винил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрил



К раствору 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-винил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрила (717 мг, 1,43 ммоль) в 10 мл дихлорметана, добавляли 1-бромпиirroлидин-2,5-дион (254 мг, 1,43 ммоль) при 0 °C. Полученную смесь перемешивали в течение 4 часов и очищали непосредственно на колонке с силикагелем с получением желаемого продукта (780 мг, 94%). ЖХ/МС, теор. для $C_{30}H_{26}BrN_6O_2$ (M+H)⁺: m/z=581,1; эксп. 581,2.

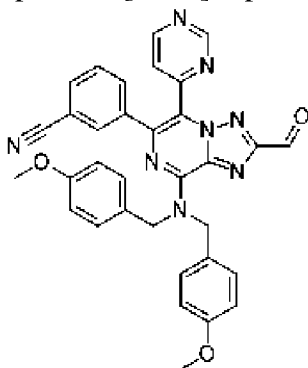
Стадия 7: 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-5-(тиримидин-4-ил)-2-винил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрил



Смесь 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-5-бром-2-винил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрила (260 мг, 0,45 ммоль), 4-(трибутилстаннил)пиримидина (215 мг, 0,58 ммоль), хлорида лития (28,4 мг, 0,67 ммоль), хлорида меди (I) (67 мг, 0,67 ммоль) и тетраakis(трифенилфосфин)палладия (0) (52 мг, 0,045 ммоль) в ТГФ (5 мл) перемешивали при 90°C в течение 45 минут. Реакционную смесь погасили водой и экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические слои концентрировали и очищали на колонке с силикагелем с получением желаемого продукта (176 мг, 67%). ЖХ/МС, теор. для $C_{34}H_{29}N_8O_2$ (M+H)⁺: m/z=581,2; эксп. 581,1.

Стадия 8: 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-формил-5-(тиримидин-4-ил)-

[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил) бензонитрил



Смесь 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-5-(пиримидин-4-ил)-2-винил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил (176 мг, 0,3 ммоль), оксида осмия(VIII) (3 мг в 0,3 мл воды, 0,015 ммоль) и периодата натрия (292 мг, 1,36 ммоль) в ТГФ/воде (1:1, 6 мл) перемешивали при 65°C в течение 1 часа. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические слои концентрировали и очищали колонкой с силикагелем с получением желаемого продукта (130 мг, 74%). ЖХ/МС, теор. для $C_{33}H_{27}N_8O_3$ ($M+H$)⁺: $m/z=583,2$; эксп. 583,2.

Стадия 9: 3-(8-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-5-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил

Приготовление реактива Гриньяра: К раствору 1,3-дифтор-2-йодбензола (142 мг, 0,6 ммоль) в тетрагидрофуране (1 мл) добавляли раствор изопропилмагнийхлорида (296 мкл, 2 М) при -10 °С. Полученную смесь перемешивали в течение 1 часа и использовали непосредственно на следующей стадии.

К раствору 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-формил-5-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила (120 мг, 0,2 ммоль) в ТГФ (2 мл), добавляли свежеприготовленный реактив Гриньяра с предыдущей стадии при -10 °С. Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин, гасили раствором хлорида аммония (4 мл) и экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические слои концентрировали в вакууме. Полученный материал растворяли в ТФУ (5 мл) и перемешивали при 80°C в течение 20 мин. Реакционную смесь затем охлаждали до комнатной температуры, концентрировали и подщелачивали прибавлением водного раствора $NaHCO_3$.

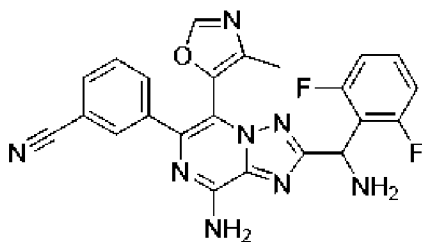
Неочищенный материал очищали непосредственно на колонке с силикагелем с получением желаемого продукта (60 мг, 64%) в виде рацемической смеси. Продукт затем разделяли хиральной ВЭЖХ, используя хиральную колонку (Phenomenex Lux 5 мкм Cellulose-4, 21,2×250 мм) и систему растворителей 75% EtOH в смеси гексанов (20 мл/мин).

Пик 2 был выделен и дополнительно очищен с помощью препаративной ЖХ/МС (pH=2, ацетонитрил/вода с ТФУ) с получением желаемого продукта в виде соли ТФУ. ЖХ/МС, теор. для $C_{23}H_{15}F_2N_8O$ ($M+H$)⁺: $m/z=457,1$; эксп. 457,0.

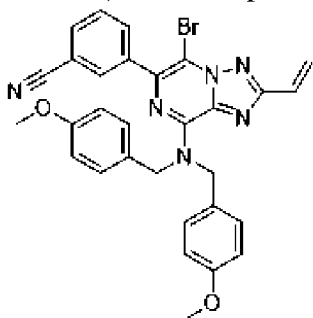
¹H ЯМР (600 МГц, DMSO-d₆) δ 9,14 (д, J=1,3 Гц, 1H), 8,95 (д, J=5,2 Гц, 1H), 7,90

(дд, $J=5,2, 1,4$ Гц, 1H), 7,88 (с, 1H), 7,78 (дт, $J=7,6, 1,4$ Гц, 1H), 7,74 (т, $J=1,4$ Гц, 1H), 7,54 (дт, $J=7,9, 1,3$ Гц, 1H), 7,51-7,40 (м, 2H), 7,09 (т, $J=8,4$ Гц, 2H), 6,27 (с, 1H).

Пример A11: Синтез 3-(8-амино-2-(амино(2,6-дифторфенил)метил)-5-(4-метилоксазол-5-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила (соединения 11)

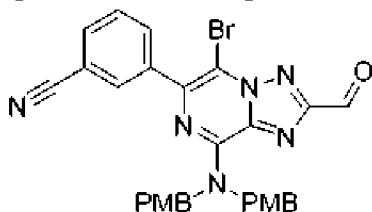


Стадия 1: 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-5-бром-2-винил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил



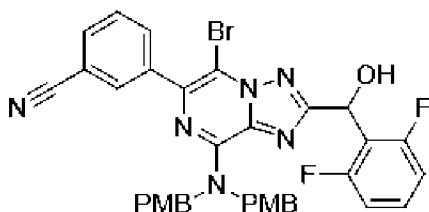
К раствору 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-винил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила (пример A10, стадия 5; 241 мг, 0,48 ммоль) в DCM (5 мл) добавляли NBS (84,6 мг, 0,48 ммоль). Реакционную смесь затем перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа и концентрировали с получением неочищенного продукта, который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХ/МС, теор. для $C_{30}H_{26}BrN_6O_2$ ($M+H$)⁺: $m/z=581,1$; эксп. 581,1.

Стадия 2: 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-5-бром-2-формил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил



Смесь 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-5-бром-2-винил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила (174 мг, 0,3 ммоль), оксида осмия(VIII) (3 мг в 0,3 мл воды, 0,015 ммоль) и периодата натрия (292 мг, 1,36 ммоль) в ТГФ/воде (1:1, 6 мл) перемешивали при 65 °С в течение 1 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические слои концентрировали, и очищали колонкой с силикагелем с получением желаемого продукта. ЖХ/МС, теор. для $C_{29}H_{24}N_6O_3Br$ ($M+H$)⁺: $m/z=583,1$; эксп. 583,1.

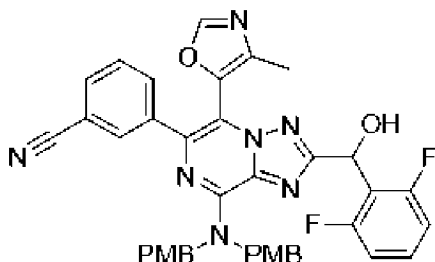
Стадия 3: 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-5-бром-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил



Приготовление реактива Гриньяра: К раствору 1,3-дифтор-2-йодбензола (142 мг, 0,6 ммоль) в тетрагидрофуране (1 мл) добавляли раствор изопропилмагнийхлорида (296 мкл, 2 М) при -10°C . Полученную смесь перемешивали в течение 1 часа и использовали непосредственно на следующей стадии.

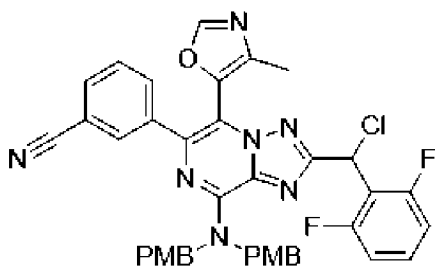
К раствору 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-5-бром-2-формил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила (120 мг, 0,2 ммоль) в ТГФ (2 мл), добавляли свежеприготовленный реактив Гриньяра с предыдущей стадии при -10°C . Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин, гасили раствором хлорида аммония (4 мл) и экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические слои концентрировали в вакууме и очищали колонкой с силикагелем с получением желаемого продукта в виде рацемической смеси. ЖХ/МС, теор. для $\text{C}_{35}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_3\text{BrF}_2$ $(\text{M}+\text{H})^+$: $m/z=697,1$; эксп. 697,1.

Стадия 4: 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-5-(4-метилоксазол-5-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил



Смесь 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-5-бром-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила (382 мг, 0,55 ммоль), 4-метил-5-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)оксазола (137 мг, 0,65 ммоль), дициклогексил(2',4',6'-триизопропилбифенил-2-ил)фосфин-(2'-аминобифенил-2-ил)(хлор)палладия (1:1) (17 мг, 21,6 мкмоль) и Cs_2CO_3 (356 мг, 1,09 ммоль) в 1,4-диоксане (2 мл) и воде (200 мкл) продували N_2 и нагревали при 95°C в течение 7 часов. Смесь концентрировали и очищали с помощью флеш-хроматографии с получением желаемого продукта в виде бесцветного масла. ЖХ/МС, теор. для $\text{C}_{39}\text{H}_{32}\text{N}_7\text{O}_4\text{F}_2$ $(\text{M}+\text{H})^+$: 700,2; эксп. 700,2.

Стадия 5: 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-(хлор(2,6-дифторфенил)метил)-5-(4-метилоксазол-5-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил

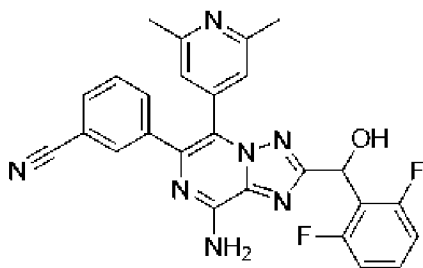


К раствору 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-5-(4-метилоксазол-5-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила (201 мг, 0,29 ммоль) в 2 мл дихлорметана, добавляли тионилхлорид (105 мкл, 1,435 ммоль) при комнатной температуре. Полученную смесь перемешивали в течение 4 часов, концентрировали и использовали на следующей стадии без какой-либо дополнительной очистки. ЖХ/МС, теор. для $C_{39}H_{31}N_7O_3ClF_2$ $(M+H)^+$: $m/z=718,2$; эксп. 718,2.

Стадия 6: 3-(8-амино-2-(амино(2,6-дифторфенил)метил)-5-(4-метилоксазол-5-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила

К раствору 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-(хлор(2,6-дифторфенил)метил)-5-(4-метилоксазол-5-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила (40 мг, 0,084 ммоль) в 1 мл ДМСО прибавляли раствор аммиака (1 мл). Смесь нагревали в микроволновом режиме при 100°C в течение 10 ч, затем разбавляли водой и экстрагировали EtOAc. Объединенные органические фазы слои промывали водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над $MgSO_4$ и концентрировали. Полученный остаток растворяли в ТФУ (1 мл) и перемешивали при 80°C в течение 20 мин. Реакционную смесь затем охлаждали до комнатной температуры, концентрировали и подщелачивали прибавлением водн. раствора $NaHCO_3$. Неочищенный материал непосредственно очищали на колонке с силикагелем с получением желаемого продукта в виде рацемической смеси. Продукт затем разделяли хиральной ВЭЖХ, используя хиральную колонку (АМ-1) и систему растворителей 45% EtOH в смеси гексанов (20 мл/мин). Пик 1 выделяли и дополнительно очищали, используя препаративную ЖХ/МС (pH=2, ацетонитрил/вода с ТФУ), с получением желаемого продукта в виде соли ТФУ. ЖХ/МС, теор. для $C_{23}H_{17}F_2N_8O$ $(M+H)^+$: $m/z=459,1$; эксп. 459,0.

Пример А12: Синтез 3-(8-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-5-(2,6-диметилпиридин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила (соединения 12)

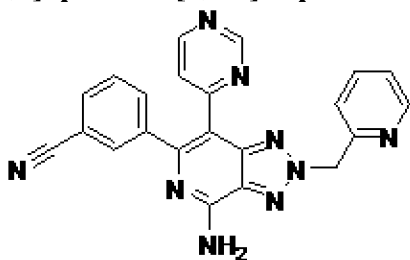


К раствору 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-5-бром-2-((2,6-

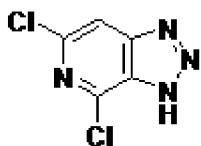
дифторфенил)(гидроксиметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-*a*]пиразин-6-ил)бензонитрила (пример A11, стадия 3; 0,518 г, 0,638 ммоль), 2,6-диметил-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)пиридина (0,346 г, 1,48 ммоль) и дициклогексил(2',4',6'-триизопропилбифенил-2-ил)фосфин-(2'-аминобифенил-2-ил)(хлор)палладия (1:1) (0,058 г, 0,074 ммоль) в диоксане (3,0 мл) и воде (0,60 мл) добавляли трехосновный фосфат калия (0,472 г, 2,23 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 90°C в течение 1 часа. Затем реакционную смесь разбавляли водой и ДХМ. Слои разделяли, водный слой экстрагировали ДХМ, и объединенные органические фракции сушили над $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали. Неочищенный материал растворяли в ТФУ (5 мл) и нагревали до 80°C в течение 20 минут. Реакционную смесь затем охлаждали до комнатной температуры, концентрировали, и подщелачивали прибавлением водного раствора $NaHCO_3$. Неочищенный материал очищали непосредственно на колонке с силикагелем с получением желаемого продукта (257 мг, 72%) в виде рацемической смеси.

Затем продукт разделяли с помощью хиральной ВЭЖХ с использованием хиральной колонки (Phenomenex Lux 5um Cellulose-2, 21,1×250 мм) и системы растворителей 35% EtOH в гексанах (20 мл/мин). Пик 2 выделяли и дополнительно очищали, используя препаративную ЖХ/МС (pH=2, ацетонитрил/вода с ТФУ), с получением желаемого продукта в виде соли ТФУ. ЖХ/МС, теор. для $C_{26}H_{20}F_2N_7O$ (M+H)⁺: m/z=484,2; эксп. 484,2. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ 7,92 (с, 2H), 7,85 (с, 1H), 7,83 (д, J=7,6 Гц, 1H), 7,56 (д, J=8,0 Гц, 1H), 7,53-7,40 (м, 4H), 7,10 (т, J=8,4 Гц, 2H), 6,27 (с, 1H), 2,51 (с, 6H).

Пример A13: Синтез 3-(4-амино-2-(пиридин-2-илметил)-7-(пиримидин-4-ил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-*c*]пиридин-6-ил)бензонитрила (соединения 13)

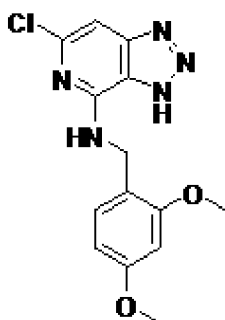


*Стадия 1. 4,6-дихлор-3H-[1,2,3]триазоло[4,5-*c*]пиридин*



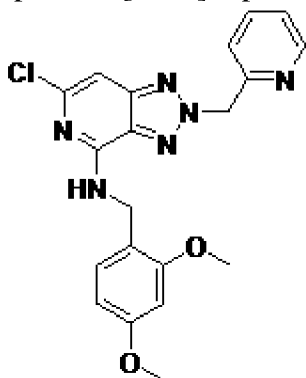
Раствор $NaNO_2$ (3,88 г, 56,2 ммоль) в воде (3 мл) добавляли к раствору 2,6-дихлорпиридин-3,4-диамина (10 г, 56 ммоль) в соляной кислоте, 37% (5 мл) при 0°C. Раствор перемешивали в течение 30 мин. Добавляли воду (20 мл) и белый осадок отфильтровывали, промывали водой и сушили с получением желаемого продукта. ЖХ/МС, теор. для $C_5H_3Cl_2N_4$: 189,0 (M+H)⁺; эксп.: 189,0 (M+H)⁺.

*Стадия 2. 6-хлор-N-(2,4-диметоксибензил)-3H-[1,2,3]триазоло[4,5-*c*]пиридин-4-амин*



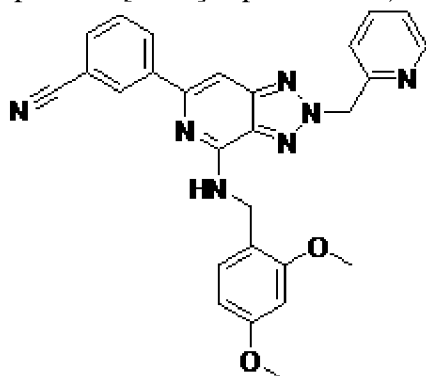
Смесь 4,6-дихлор-3Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридина (600 мг, 3,17 ммоль), (2,4-диметоксифенил)метанамина (0,53 мл, 3,49 ммоль) и триэтиламин (0,53 мл, 3,81 ммоль) в 1,4-диоксане (10 мл) перемешивали при 110 °С в течение 3 дней. Прямая очистка на колонке с силикагелем давала желаемый продукт (875 мг, 86%). ЖХ/МС, теор. для $C_{14}H_{15}ClN_5O_2$: 320,1 (M+H)⁺; эксп.: 320,3 (M+H)⁺.

Стадия 3. 6-хлор-N-(2,4-диметоксибензил)-2-(пиридин-2-илметил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-4-амин



Смесь 6-хлор-N-(2,4-диметоксибензил)-3Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-4-амина (875 мг, 2,74 ммоль), пиридин-2-илметанол (0,317 мл, 3,28 ммоль) и трифенилфосфин (1436 мг, 5,47 ммоль) в ДХМ (20 мл) добавляли диизопропилазодикарбоксилат (0,647 мл, 3,28 ммоль) при 0 °С. Полученную смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 часа. Прямая очистка на колонке с силикагелем давала желаемый продукт (375 мг, выход 33,4%). ЖХ/МС, теор. для $C_{20}H_{20}ClN_6O_2$: 411,1 (M+H)⁺; эксп.: 411,2 (M+H)⁺.

Стадия 4. 3-(4-((2,4-диметоксибензил)амино)-2-(пиридин-2-илметил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил

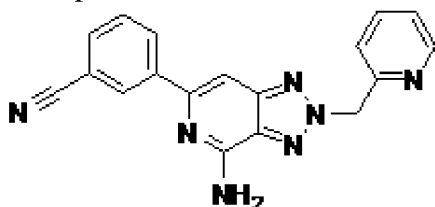


К смеси 6-хлор-N-(2,4-диметоксибензил)-2-(пиридин-2-илметил)-2Н-

[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-4-амина (375 мг, 0,913 ммоль) и

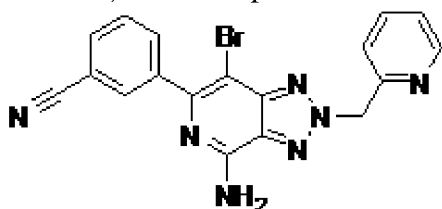
(3-цианофенил)бороновой кислоты (268 мг, 1,825 ммоль) в 1,4-диоксане (10 мл) и воде (1,00 мл) добавляли карбонат цезия (595 мг, 1,825 ммоль). Полученную смесь продували N_2 , а затем добавляли хлор(2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил)[2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладий (II) (71,8 мг, 0,091 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 120 °С под микроволновым излучением в течение 90 мин. Реакцию гасили 20 мл этилацетата и 20 мл воды. Органическую фазу отделяют и водный раствор дважды экстрагируют этилацетатом. Объединенные экстракты сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали на колонке с силикагелем, получая требуемый продукт (300 мг, 68,9%). ЖХ/МС, теор. для $C_{27}H_{24}N_7O_2$: 478,2 (M+H)⁺; эксп.: 478,3 (M+H)⁺.

Стадия 5. 3-(4-амино-2-(пиридин-2-илметил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил



Раствор 3-(4-((2,4-диметоксибензил)амино)-2-(пиридин-2-илметил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрила (300,3 мг, 0,629 ммоль) в ТФУ (5 мл) перемешивали при 100°С в течение 30 мин. ТФУ упаривали при пониженном давлении и затем добавляли 20 мл насыщенного водного раствора $NaHCO_3$ и 20 мл этилацетата. Органическую фазу отделяют и водный раствор дважды экстрагируют этилацетатом. Объединенные экстракты сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали на колонке с силикагелем, получая требуемый продукт (175 мг, 85%). ЖХ/МС, теор. для $C_{18}H_{14}N_7$: 328,1 (M+H)⁺; эксп.: 328,2 (M+H)⁺.

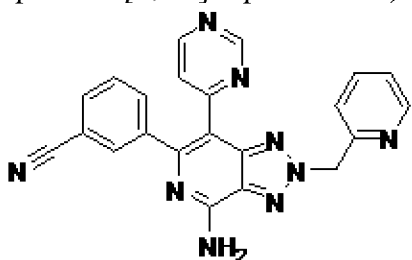
Стадия 6. 3-(4-амино-7-бром-2-(пиридин-2-илметил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил



Смесь 3-(4-амино-2-(пиридин-2-илметил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрила (175 мг, 0,535 ммоль) и 1-бромпирролидин-2,5-диола (100 мг, 0,561 ммоль) в ТГФ (10 мл) перемешивали при 0°С в течение 30 мин, а затем гасили насыщенным водным раствором $NaHCO_3$. Органическую фазу отделяют, сушат над Na_2SO_4 , фильтруют и упаривают при пониженном давлении. Полученный остаток очищали на колонке с силикагелем с получением желаемого продукта (135 мг, 62,2%). ЖХ/МС, теор. для $C_{18}H_{13}BrN_7$: 406,0 (M+H)⁺ и 408,0 (M+H)⁺; эксп.: 406,1 (M+H)⁺ и 408,2

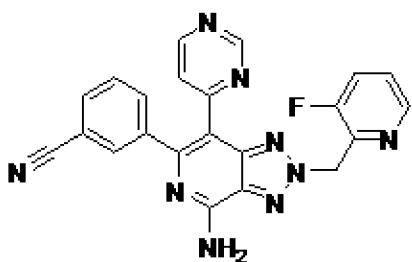
(M+H)⁺.

Стадия 7. 3-(4-амино-2-(пиридин-2-илметил)-7-(пиримидин-4-ил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил

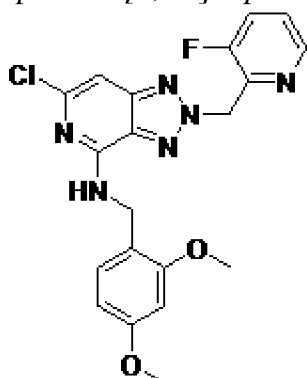


Смесь 3-(4-амино-7-бром-2-(пиридин-2-илметил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрила (182 мг, 0,448 ммоль), 4-(трибутилстаннил)пиримидина (496 мг, 1,344 ммоль) и хлорида меди (I) (53,2 мг, 0,538 ммоль), хлорида лития (22,79 мг, 0,538 ммоль) и тетраakis(трифенилфосфин)палладия (0) (51,8 мг, 0,045 ммоль) в ТГФ (1 мл) сначала продували N₂, а затем нагревали и перемешивали при 90°C в течение 2 часов. Реакционную смесь разбавляли метанолом и очищали препаративной ЖХ-МС (рН=2) с получением желаемого продукта. ЖХ/МС, теор. для C₂₂H₁₆N₉: 406,2 (M+H)⁺; эксп.: 406,2 (M+H)⁺.

Пример A14: Синтез 3-(4-амино-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-7-(пиримидин-4-ил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрила (соединения 14)



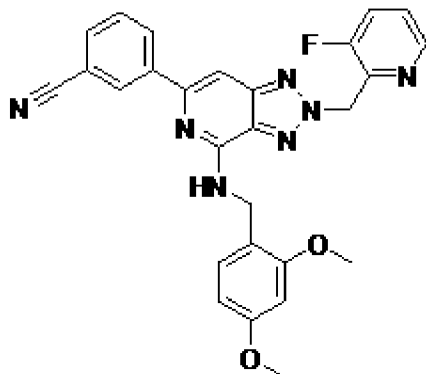
Стадия 1. 6-хлор-N-(2,4-диметоксибензил)-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-4-амин



К смеси 6-хлор-N-(2,4-диметоксибензил)-3Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-4-амин (пример A13, стадия 2; 1000 мг, 3,13 ммоль), (3-фторпиридин-2-ил)метанол (477 мг, 3,75 ммоль) и трифенилфосфин (1641 мг, 6,25 ммоль) в ДХМ (1,7 мл) добавляли диизопропилазодикарбоксилат (739 мкл, 3,75 ммоль) при 0 °С. Реакционную смесь

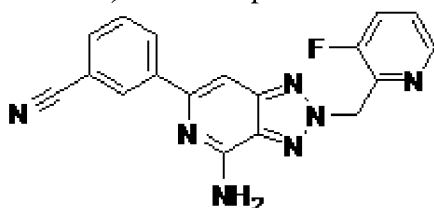
перемешивали при 0°C в течение 1 часа. Прямая очистка на колонке с силикагелем давала желаемый продукт (433 мг, 32%). ЖХ/МС, теор. для $C_{20}H_{19}ClFN_6O_2$: 429,1 (M+H)⁺; эксп.: 429,3 (M+H)⁺.

Стадия 2. 3-(4-((2,4-диметоксибензил)амино)-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил



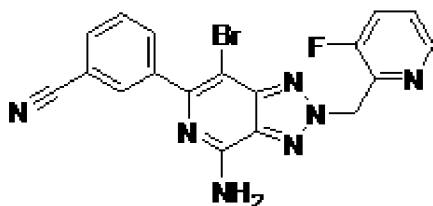
Карбонат цезия (658 мг, 2,019 ммоль) был добавлен к смеси 6-хлор-N-(2,4-диметоксибензил)-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-4-амин (433 мг, 1,010 ммоль) и (3-цианофенил)бороновой кислоты (297 мг, 2,019 ммоль) в 1,4-диоксане (10,0 мл) и воде (1,0 мл). Полученную смесь барботировали N₂ в течение 2 мин и добавляли (SP-4-4)-[2'-амино[1,1'-бифенил]-2-ил]хлор[дициклогексил[2',4',6'-трис(1-метилэтил)[1,1'-бифенил]-2-ил]фосфин]палладий (79 мг, 0,101 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 120°C в течение 1,5 ч в условиях микроволнового излучения. Реакцию гасили 20 мл этилацетата и 20 мл воды. Органическую фазу отделяют и водный раствор дважды экстрагируют этилацетатом. Объединенные экстракты сушили над Na₂SO₄, фильтровали и упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали на колонке с силикагелем, получая требуемый продукт (357 мг, 71%). ЖХ/МС, теор. для $C_{27}H_{23}FN_7O_2$: 496,2 (M+H)⁺; эксп.: 496,3 (M+H)⁺.

Стадия 3. 3-(4-амино-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил



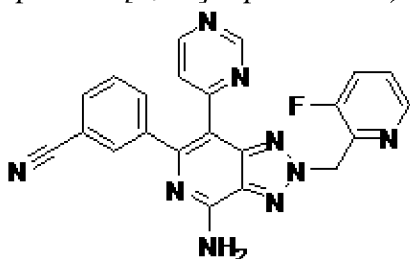
Раствор 3-(4-((2,4-диметоксибензил)амино)-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил (357,3 мг, 0,721 ммоль) в ТФУ (5 мл) перемешивали при 100°C в течение 1 часа. ТФУ выпаривали при пониженном давлении и затем добавляли 20 мл насыщенного водного раствора NaHCO₃ и 20 мл этилацетата. Органическую фазу отделяют и водный раствор дважды экстрагируют этилацетатом. Объединенные экстракты сушили над Na₂SO₄, фильтровали и упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали на колонке с силикагелем, получая требуемый продукт (213 мг, 61%). ЖХ-МС m/z рассчитана для $C_{18}H_{13}FN_7$: 346,1 (M+H)⁺; эксп.: 346,3 (M+H)⁺.

Стадия 4. 3-(4-амино-7-бром-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил



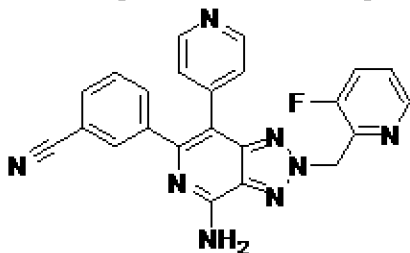
Смесь 3-(4-амино-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрила (213 мг, 0,617 ммоль) и 1-бромпирролидин-2,5-дион (220 мг, 1,234 ммоль) в ТГФ (5 мл) перемешивали при 0 °С в течение 1 часа. Прямая очистка на силикагеле давала желаемый продукт (175 мг, 67%). ЖХ/МС, теор. для $C_{18}H_{12}BrFN_7$: 424,0 (M+H)⁺ и 426,0 (M+H)⁺; эксп.: 424,3 (M+H)⁺ и 426,3 (M+H)⁺.

Стадия 5. 3-(4-амино-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-7-(пиридин-4-ил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил



Смесь 3-(4-амино-7-бром-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрила (220 мг, 0,519 ммоль), 4-(трибутилстаннил)пиримидина (383 мг, 1,037 ммоль) и хлорида меди (I) (61,6 мг, 0,622 ммоль), хлорида лития (26,4 мг, 0,622 ммоль) и тетраakis(трифенилфосфин)палладия(0) (59,9 мг, 0,052 ммоль) в ТГФ (1 мл) сначала продували N_2 , а затем нагревали и перемешивали при 90 °С в течение 2 часов. Реакционную смесь разбавляли метанолом и очищали препаративной ЖХ-МС (pH=2) с получением желаемого продукта. ЖХ/МС, теор. для $C_{22}H_{15}FN_9$: 424,1 (M+H)⁺; эксп.: 424,3 (M+H)⁺. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) м.д. 8,98 (с, 1H), 8,77 (д, J=5,02 Гц, 1H), 8,38 (дд, J1=4,60 Гц, J2=1,32 Гц, 1H), 7,90-8,30 (уш.с, 2H), 7,76-7,89 (м, 3H), 7,66 (дд, J1=5,25 Гц, J2=1,25 Гц, 1H), 7,45-7,58 (м, 3H), 6,25 (с, 2H).

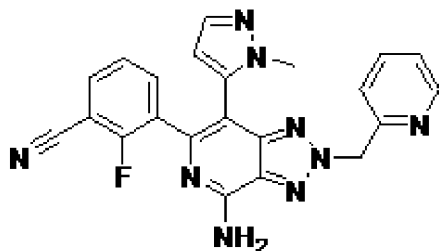
Пример A15: Синтез 3-(4-амино-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-7-(пиридин-4-ил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрила (соединения 15)



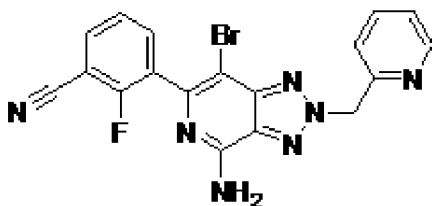
Карбонат цезия (46,1 мг, 0,141 ммоль) добавляли к смеси 3-(4-амино-7-бром-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрила (30 мг, 0,071 ммоль) и пиридин-4-илбороновой кислоты (17,38 мг, 0,141 ммоль) в 1,4-диоксане (2

мл) и воде (0,2 мл). Полученную смесь барботировали N_2 в течение 2 минут и добавляли хлор(2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил)[2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладий (II) (5,56 мг, 7,07 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при 120°C в течение 1,5 ч в условиях микроволнового излучения. Реакционную смесь разбавляли метанолом. Прямая очистка на преп. ВЭЖХ давала желаемый продукт. ЖХ/МС, теор. для $C_{23}H_{16}FN_8$: 423,1 (M+H)⁺; эксп.: 423,3 (M+H)⁺.

Пример A16: Синтез 3-(4-амино-7-(1-метил-1H-пиразол-5-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)-2-фторбензонитрила (соединения 16)

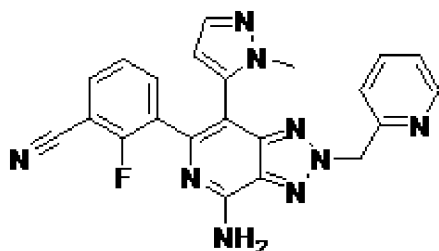


Стадия 1. 3-(4-амино-7-бром-2-(пиридин-2-илметил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)-2-фторбензонитрил



Это соединение было получено в соответствии с аналогичной процедурой из примера A13, стадии 1-стадии 6, с использованием (3-циано-2-фторфенил)бороновой кислоты вместо (3-цианофенил)бороновой кислоты на стадии 4. ЖХ/МС, теор. для $C_{18}H_{12}BrFN_7$: 424,0 (M+H)⁺ и 426,0 (M+H)⁺; эксп.: 424,3 (M+H)⁺ и 426,3 (M+H)⁺.

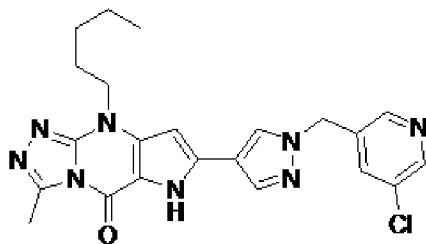
Стадия 2. 3-(4-амино-7-(1-метил-1H-пиразол-5-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)-2-фторбензонитрил



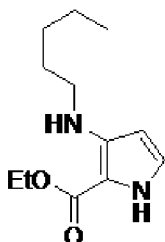
Это соединение получали по методике, аналогичной описанной в примере A15, с использованием (1-метил-1H-пиразол-5-ил)бороновой кислоты вместо пиридин-4-илбороновой кислоты и с использованием 3-(4-амино-7-бром-2-(пиридин-2-илметил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)-2-фторбензонитрила вместо 3-(4-амино-7-бром-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрила. ЖХ/МС, теор. для $C_{22}H_{17}FN_9$: 426,2 (M+H)⁺; эксп.: 426,3 (M+H)⁺.

Пример A17: Синтез 7-(1-((5-хлорпиридин-3-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-3-

метил-9-пентил-6,9-дигидро-5Н-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-а]пиримидин-5-она (соединения 17)

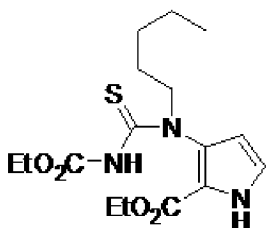


Стадия 1: Этил-3-(пентиламино)-1Н-пиррол-2-карбоксилат



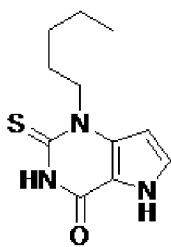
Этил-3-амино-1Н-пиррол-2-карбоксилат (5 г, 32,4 ммоль), пентаналь (3,79 мл, 35,7 ммоль) и цианоборогидрид натрия (2,038 г, 32,4 ммоль) смешивали в метаноле (64,9 мл) при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали с помощью флеш-хроматографии (от 0 до 100% EtOAc в гексанах) с получением желаемого продукта (4,4 г, 61%). ЖХ/МС, теор. для $C_{12}H_{21}N_2O_2$ (M+H): 225,2. Эксп.: 225,1.

Стадия 2: Этил-3-(3-(этоксикарбонил)-1-пентилтиоуреидо)-1Н-пиррол-2-карбоксилат



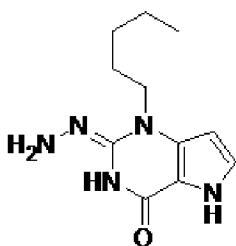
Во флакон загружали этил 3-(пентиламино)-1Н-пиррол-2-карбоксилат (4,4 г, 19,62 ммоль), дихлорметан (39,2 мл) и этоксикарбонилизотиоцианат (2,78 мл, 23,54 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь гасили водой (40 мл) и слои разделяли. Водный слой экстрагировали дихлорметаном (3×40 мл), объединенные органические фракции сушили над $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали. Неочищенный материал использовали на следующей стадии без дополнительной очистки (7,3 г, количественно). ЖХ/МС, теор. для $C_{16}H_{26}N_3O_4S$ (M+H): 356,2. Эксп.: 356,1.

Стадия 3: 1-пентил-2-тиоксо-2,3-дигидро-1Н-пирроло[3,2-d]пиримидин-4(5Н)-он



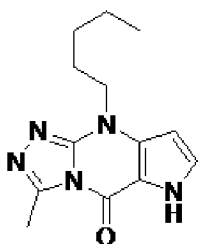
В сосуд для микроволновой обработки загружали этил 3-(3-(этоксикарбонил)-1-пентилтиоуреидо)-1H-пиррол-2-карбоксилат (7,31 г, 20,57 ммоль) и раствор этоксида натрия (21% мас./мас., 8,45 мл, 22,62 ммоль). Сосуд закрывали крышкой и нагревали в микроволновом реакторе в течение 10 минут при 120°C. Реакционную смесь доводили до нейтрального pH добавлением 1M раствора HCl, твердый продукт фильтровали и сушили (3,1 г, 64%). ЖХ/МС, теор. для $C_{11}H_{16}N_3OS$ (M+H): 238,1. Эксп.: 238,1.

Стадия 4: 2-гидразоно-1-пентил-2,3-дигидро-1H-пирроло[3,2-d]пиримидин-4(5H)-он



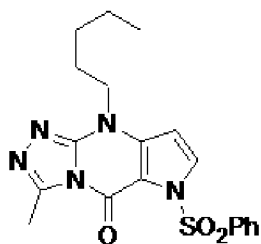
В сосуд загружали 1-пентил-2-тиоксо-2,3-дигидро-1H-пирроло[3,2-d]пиримидин-4(5H)-он (3,13 г, 13,19 ммоль) и гидрат гидразина (20 мл). Реакционную смесь перемешивали при 100°C в течение ночи. Образовавшееся твердое вещество отфильтровывали и промывали водой с получением желаемого продукта (2,2 г, 70%). ЖХ/МС, теор. для $C_{11}H_{18}N_5O$ (M+H): 236,1. Эксп.: 236,1.

Стадия 5: 3-метил-9-пентил-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-он



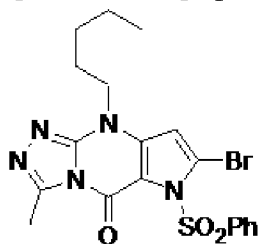
В сосуд добавляли (Е)-2-гидразоно-1-пентил-2,3-дигидро-1H-пирроло[3,2-d]пиримидин-4(5H)-он (4,8 г, 20,40 ммоль), каплю трифторуксусной кислоты и триэтилортоацетат (20 мл). Реакционную смесь нагревали до 110 °C в течение трех часов. Суспензию фильтровали, промывали гексаном и сушили (4,0 г, 76%). ЖХ/МС, теор. для $C_{13}H_{18}N_5O$ (M+H): 260,1. Эксп.: 260,2.

Стадия 6: 3-Метил-9-пентил-6-(фенилсульфонил)-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-он



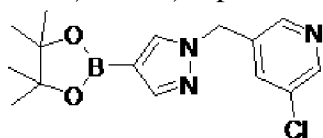
В сосуд загружали 3-метил-9-пентил-6,9-дигидро-5Н-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-а]пиримидин-5-он (со стадии 1) (4 г, 15,43 ммоль), дихлорметан (40 мл), диметиламинопиридин (0,188 г, 1,543 ммоль), триэтиламин (3,23 мл, 23,14 ммоль) и бензолсульфонилхлорид (2,187 мл, 16,97 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение одного часа. Реакционную смесь гасили водой и слои разделяли. Водный слой экстрагировали дихлорметаном (3×40 мл), объединенные органические фракции сушили над MgSO_4 , фильтровали и концентрировали. Неочищенный материал использовали на следующей стадии без дополнительной очистки (6,1 г, количественно). ЖХ/МС, теор. для $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$ (M+H): 400,1. Эксп.: 400,1.

Стадия 7: 7-бром-3-метил-9-пентил-6-(фенилсульфонил)-6,9-дигидро-5Н-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-а]пиримидин-5-он



В сосуд загружали 3-метил-9-пентил-6-(фенилсульфонил)-6,9-дигидро-5Н-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-а]пиримидин-5-он (1 г, 2,503 ммоль), сухой ТГФ (30 мл) и смесь охлаждали до -78°C . По каплям добавляли раствор диизопропиламида лития (1М в гексанах/ТГФ, 3,13 мл, 3,13 ммоль). Реакционную смесь выдерживали при -78°C в течение 1,5 часов. К реакционной смеси по каплям добавляли раствор 1,2-дибром-1,1,2,2-тетрахлорэтана (1,223 г, 3,75 ммоль) в сухом ТГФ (3 мл) и реакционную смесь поддерживали при -78°C еще в течение 1,5 ч. Реакционную смесь гасили насыщ. водн. раствором NH_4Cl (30 мл) и разбавляли дихлорметаном (30 мл). Слои разделяли и водный слой экстрагировали ДХМ (3×30 мл). Объединенные органические фракции сушили над MgSO_4 , фильтровали и концентрировали. Неочищенный остаток очищали с помощью автоматической флеш-хроматографии (от 0 до 100% EtOAc в ДХМ) с получением желаемого продукта (0,84 г, 70%). ЖХ/МС, теор. для $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{BrN}_5\text{O}_3\text{S}$ (M+H): 478,1. Эксп.: 478,1.

Стадия 8: 3-хлор-5-((4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1Н-тиразол-1-ил)метил)пиридин

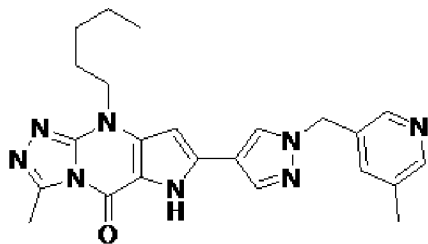


В сосуд загружали 4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1Н-пиразол (0,5 г, 2,58 ммоль), 3-(бромметил)-5- гидробромид хлорпиридина (0,741 г, 2,58 ммоль), карбонат цезия (2,52 г, 7,73 ммоль) и ДМФА (6,44 мл). Реакционную смесь перемешивали при 60°C в течение одного часа. Реакционную смесь гасили водой (10 мл) и разбавляли дихлорметаном (10 мл). Слои разделяли и водный слой экстрагировали дихлорметаном (3×10 мл). Объединенные дихлорметановые экстракты сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали. Очистка с помощью автоматической флеш-хроматографии (от 0 до 100% EtOAc в ДХМ) позволила получить продукт (0,548 г, 67%). ЖХ/МС, теор. для C₁₅H₂₀BClN₃O₂ (M+H): 320,1, 322,1. Эксп.: 320,1, 322,1

Стадия 9: 7-(1-((5-хлорпиридин-3-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-3-метил-9-пентил-6,9-дигидро-5Н-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-а]пиримидин-5-он

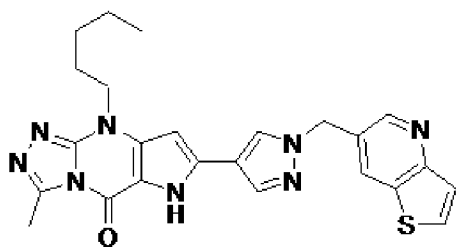
В сосуд загружали 7-бром-3-метил-9-пентил-6-(фенилсульфонил)-6,9-дигидро-5Н-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-а]пиримидин-5-он (0,01 г, 0,021 ммоль), 3-хлор-5-((4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1Н-пиразол-1-ил)метил)пиридин (0,013 г, 0,042 ммоль), хлор(2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил)[2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладий (II) (5,00 мг, 0,006 ммоль) и трехосновный фосфат калия (0,016 г, 0,074 ммоль). Добавляли 1,4-диоксан (0,35 мл) и воду (0,07 мл) и реакционную смесь барботировали газообразным азотом в течение 5 минут, затем перемешивали при 90 °С в течение двух часов. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и добавляли гидроксид натрия (10 мг). Реакционную смесь перемешивали при 40 °С в течение 60 минут. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли ДМФА (5 мл). Очистка с помощью препаративной ВЭЖХ (pH 2, ацетонитрил/вода с ТФУ) позволила получить продукт в виде соли ТФУ (2 мг, 21%). ЖХ/МС, теор. для C₂₂H₂₄ClN₈O (M+H): 451,2, 453,2. Эксп.: 451,2, 453,2.

Пример A18: Синтез 3-метил-7-(1-((5-метилпиридин-3-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-9-пентил-6,9-дигидро-5Н-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-а]пиримидин-5-она (соединения 18)



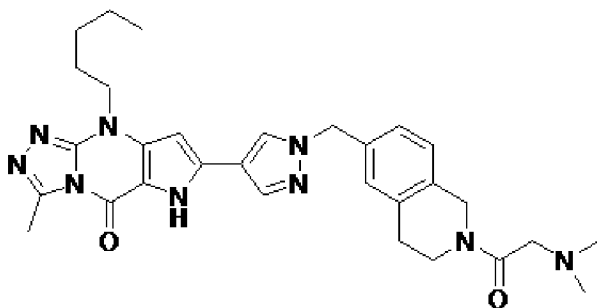
Это соединение было получено с использованием процедур, аналогичных описанным в примере A17, с использованием 3-(бромметил)-5-метилпиридина вместо гидробромид 3-(бромметил)-5-хлорпиридина на стадии 8. ЖХ/МС, теор. для C₂₃H₂₇N₈O (M+H): 431,2. Эксп.: 431,3.

Пример A19: Синтез 3-метил-9-пентил-7-(1-(тиено[3,2-b]пиридин-6-илметил)-1Н-пиразол-4-ил)-6,9-дигидро-5Н-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-а]пиримидин-5-она (соединения 19)

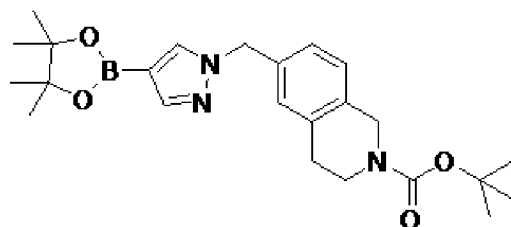


Это соединение было получено с использованием процедур, аналогичных описанным в примере A17, с использованием 6-(бромметил)тиено[3,2-*b*]пиридина вместо 3-(бромметил)-5-хлорпиридин гидробромида на стадии 8. ЖХ/МС, теор. для $C_{24}H_{25}N_8OS$ ($M+H$): 473,2. Эксп.: 473,3.

Пример A20: 7-(1-((2-(2-(диметиламино)ацетил)-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-6-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-3-метил-9-пентил-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-*d*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиримидин-5-он (соединение 20)

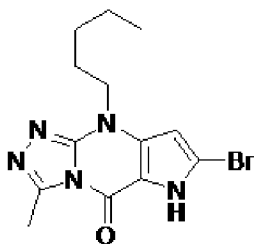


Стадия 1: трет-бутил-6-((4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразол-1-ил)метил)-3,4-дигидроизохинолин-2(1H)-карбоксилат



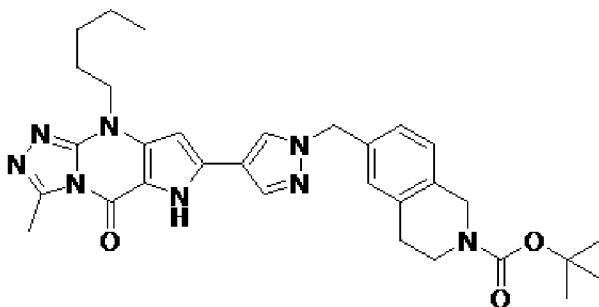
В колбу загружали 4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразол (0,5 г, 2,58 ммоль), трет-бутил-6-(гидроксиметил)-3,4-дигидроизохинолин-2(1H)-карбоксилат (0,339 г, 1,288 ммоль), трифенилфосфин (0,743 г, 2,83 ммоль) и ТГФ (12 мл). Раствор охлаждали до 0°C и по каплям добавляли DIAD (0,601 мл, 3,09 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Смесь разбавляли этилацетатом и промывали водой, сушили и концентрировали. Продукт очищали с помощью колоночной хроматографии, элюируя смесью гексан/EtOAc (макс. EtOAc 60%), с получением продукта. ЖХ/МС, теор. для $C_{24}H_{35}BN_3O_4$ ($M+H$)⁺: $m/z=440,3$; эксп. 440,3.

Стадия 2: 7-бром-3-метил-9-пентил-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-*d*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиримидин-5-он



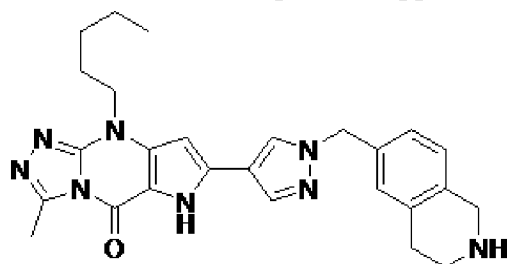
ТВАФ (1,0 М в ТГФ) (2,0 мл, 2,0 ммоль) добавляли к раствору 7-бром-3-метил-9-пентил-6-(фенилсульфонил)-6,9-дигидро-5Н-пирроло[3,2-*d*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиримидин-5-он (0,360 г, 0,753 ммоль) в ТГФ (4,0 мл), а затем реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 1 часа. Растворитель удаляли и продукт очищали с помощью колоночной хроматографии, элюируя смесью CH₂Cl₂/MeOH (макс. MeOH 10%). ЖХ/МС, теор. для C₁₃H₁₇BrN₅O (M+H)⁺: m/z=338,1; эксп. 338,1.

*Стадия 3: трет-бутил 6-((4-(3-метил-5-оксо-9-пентил-6,9-дигидро-5Н-пирроло[3,2-*d*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиримидин-7-ил)-1Н-пиразол-1-ил)метил)-3,4-дигидроизохинолин-2(1Н)-карбоксилат*



Смесь 7-бром-3-метил-9-пентил-6,9-дигидро-5Н-пирроло[3,2-*d*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиримидин-5-она (из примера А20, стадии 2) (0,040 г, 0,118 ммоль), трет-бутил-6-((4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1Н-пиразол-1-ил)метил)-3,4-дигидроизохинолин-2(1Н)-карбоксилата (0,062 г, 0,142 ммоль), аддукт дихлор[1,1'-бис(дициклогексилфосфино)ферроцен]палладий (II) дихлорметана (Pd-127) (8,94 мг, 0,012 ммоль) и фторид цезия (0,090 г, 0,591 ммоль) в *t*-BuOH (1,5 мл)/вода (0,6 мл) вакуумировали и заменяли N₂ 3 раза. Затем реакционную смесь перемешивали при 105°C в течение 2 ч, охлаждали до комнатной температуры, разбавляли этилацетатом, промывали водой, сушили и концентрировали. Продукт очищали с помощью колонки, элюируя CH₂Cl₂/MeOH (макс. MeOH 10%). ЖХ/МС, теор. для C₃₁H₃₉N₈O₃ (M+H)⁺: m/z=571,3; эксп. 571,5.

*Стадия 4: 3-метил-9-пентил-7-(1-((1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-6-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-6,9-дигидро-5Н-пирроло [3,2-*d*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиримидин-5-он*

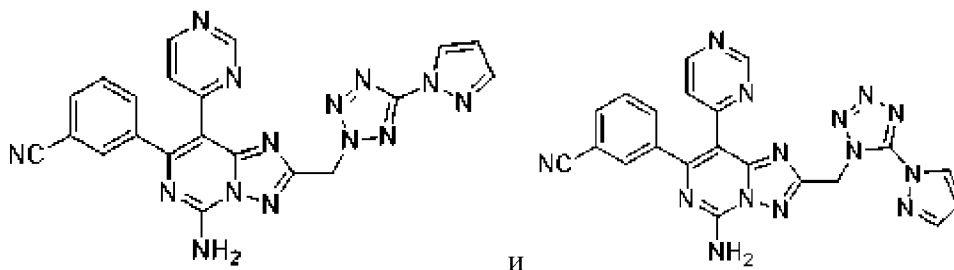


ТФУ (0,5 мл, 6,49 ммоль) добавили к раствору трет-бутил 6-((4-(3-метил-5-оксо-9-пентил-6,9-дигидро-5Н-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-а]пиримидин-7-ил)-1Н-пиразол-1-ил)метил)-3,4-дигидроизохинолин-2(1Н)-карбоксилата (50,0 мг, 0,088 ммоль) в CH_2Cl_2 (0,5 мл), затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем растворитель удаляли, получая неочищенный продукт в виде соли ТФУ. ЖХ/МС, теор. для $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_8\text{O}$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺: $m/z=471,3$; эксп. 471,2.

Стадия 5: 7-(1-((2-(2-(диметиламино)ацетил)-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-6-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-3-метил-9-пентил-6,9-дигидро-5Н-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-а]пиримидин-5-он

Диметилглициноилхлорид (3,10 мг, 0,026 ммоль) добавляли к раствору 3-метил-9-пентил-7-(1-((1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-6-ил)метил)-1Н-пиразол-4-ил)-6,9-дигидро-5Н-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-а]пиримидин-5-она (6,0 мг, 0,013 ммоль) и триэтиламина (8,89 мкл, 0,064 ммоль) в CH_2Cl_2 (0,8 мл) при комнатной температуре и перемешивали в течение 30 мин. Растворитель удаляли, и смесь разбавляли смесью ацетонитрил/вода и очищали препаративной ВЭЖХ (рН 2, ацетонитрил/вода с ТФУ) с получением целевого соединения в виде его соли ТФУ. ЖХ/МС, теор. для $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{N}_9\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺: $m/z=556,3$; эксп. 556,3.

Пример А21. 3-(2-((5-(1Н-пиразол-1-ил)-2Н-тетразол-2-ил)метил)-5-амино-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил (соединение 21А) и 3-(2-((5-(1Н-пиразол-1-ил)-1Н-тетразол-1-ил)метил)-5-амино-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил (соединение 21В)



Смесь указанных в заголовке соединений готовили, используя процедуры, аналогичные описанным для примера А3, с использованием 5-(1Н-пиразол-1-ил)-1Н-тетразола вместо 2-(1Н-тетразол-5-ил)пиридина. Соединение 21А очищали с помощью препаративной ЖХ-МС (рН 2, ацетонитрил/вода с ТФУ) с получением продукта в виде соли ТФУ. ЖХ/МС, теор. для $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{N}_{14}$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺: 463,2; эксп. 463,2.

Пример 1: Получение моноклональных антител к CD73 человека

Для получения моноклональных антител к CD73 человека мышей иммунизировали рекомбинантным белком CD73 человека (SEQ ID NO: 70), содержащим С-концевую гистициновую метку, и выделяли В-клетки из селезенки и лимфатических узлов мышей. Последовательности антител В-клеток определяли с помощью парного секвенирования VH/VL В-клеток 10x Genomics. Пары мышинных VH/VL экспрессировали в виде химер с Fc huIgG1 (SEQ ID NO: 73 и 74) и тестировали на связывание и функциональность. В результате процесса было получено антитело, обозначенное как CL25. В таблице 1,

приведенной выше, показаны аминокислотные последовательности CDR CL25 в соответствии с системами нумерации IMGT, по Chothia, AbM, по Kabat и по Contact, а также зрелые VH, VL, тяжелая цепь и легкая цепь.

Химерное антитело CL25 (содержащее VH мыши с SEQ ID NO: 26 и VL мыши с SEQ ID NO: 27) гуманизировали для минимизации иммуногенности каркасов антител при сохранении специфической активности. Гуманизацию выполняли путем выравнивания последовательностей VH и VL с генами VH и VK человека по базе данных. CDR (**таблица 1**) из мышинового антитела CL25 прививали к нескольким наивысшим генам VH и VK человека. Последовательности VH и VL иллюстративных гуманизированных антител CL25 изображены на **Фиг. 1А-Фиг. 1С**. Выравнивания VH и VL из CL25 и иллюстративных гуманизированных антител CL25 показаны на **Фиг. 1D** и **Фиг. 1E**, соответственно. Также исследовали несколько каркасных мутаций, присутствующих в CL25 мыши, вместе с мышинными CDR (**Фиг. 1А-Фиг. 1E**). Для дальнейших исследований выбрали гуманизированную версию CL25, имеющую VH с SEQ ID NO: 22 и VL с SEQ ID NO: 23, обозначенную в данном документе как «HzCL25». В **таблице 2**, приведенной выше, показаны аминокислотные последовательности CDR HzCL25 в соответствии с системами нумерации IMGT, по Chothia, AbM, по Kabat и по Contact, а также зрелые VH, VL, тяжелая цепь и легкая цепь.

Пример 2: Связывание моноклональных антител к CD73 человека с CD73 на клеточной поверхности

Для исследования связывания гуманизированных и негуманизированных клонов CL25 с CD73 на клеточной поверхности клетки MDA-MB-231 или A375 промывали и помещали в 96-луночные планшеты в концентрации 5×10^4 клеток/лунку. Клетки окрашивали антителами в указанных концентрациях в течение 30 минут на льду (**Фиг. 2А** и **Фиг. 2В**). Затем клетки промывали и окрашивали козьим вторичным антимышиным антителом, конъюгированным с фикоэритрином (PE), в течение 30 минут на льду. Затем клетки промывали и анализировали методом проточной цитометрии. Средняя геометрическая интенсивность флуоресценции (СГИФ) окрашивания CD73 представлена на графике (**Фиг. 2А** и **Фиг. 2В**). Как CL25, так и HzCL25 продемонстрировало высокую активность связывания с клетками с высоким уровнем поверхностного CD73 (клетки MDA-MB-231) и умеренным уровнем поверхностного CD73 (исследовано на клетках A375).

Пример 3: Ингибирование клеточного CD73, опосредованное моноклональными антителами к CD73 человека

Для измерения способности антитела к CD73 ингибировать активность клеточного CD73 клетки A375 и MDA-MB-231 промывали бессывороточной средой RPMI (ThermoFisher) и высевали в 96-луночные планшеты в концентрации 8×10^4 клеток/лунку для A375 или 1×10^4 клеток/лунку для MDA-MB-231. Клетки инкубировали с указанной концентрацией антител или APCP при 37°C и 5% CO₂ в течение 30 минут (**Фиг. 3А, Фиг. 3В** и **Фиг. 3С**). Затем добавляли аденозинмонофосфат (АМФ) до конечной концентрации

в 100 мкМ и инкубировали клетки еще 3 часа при температуре 37°C с 5% CO₂. Планшеты центрифугировали в течение 1-2 минут при 300 g и переносили по 25 мкл супернатанта в новые 96-луночные планшеты. Применяли анализ АМФ-Glo в соответствии с инструкциями производителя (Promega). В данном анализе относительные единицы люминесценции (ОЕЛ, англ. «RLU») напрямую коррелируют с концентрацией АМФ. Результаты представлены на **Фиг. 3А, Фиг. 3В и Фиг. 3С**.

Как CL25, так и HzCL25 продемонстрировали высокую активность в ингибировании клеточного CD73 в обоих исследованных типах клеток (**Фиг. 3А, Фиг. 3В и Фиг. 3С**). HzCL25 продемонстрировало способность ингибировать клеточный CD73, подобную таковой у CL25 (**Фиг. 3А, Фиг. 3В и Фиг. 3С**).

Пример 4: Ингибирование растворимого CD73, опосредованное моноклональным антителом к CD73 человека

Для измерения способности антител к CD73 ингибировать активность рекомбинантного белка CD73 рекомбинантный CD73 человека (rhuCD73) (SEQ ID NO: 70) добавляли в 96-луночные планшеты в конечной концентрации 0,008 мкг/мл с указанной концентрацией антител (**Фиг. 4**) или аденозин-5'-[α,β-метилен]дифосфата (APCP) и инкубировали при 37°C 5% CO₂ в течение 30 минут. После 30-минутной инкубации добавляли АМР до конечной концентрации 100 мкМ и реакции инкубировали еще 3 часа при 37°C и 5% CO₂. 25 мкл супернатанта переносили в новые 96-луночные планшеты. Применяли анализ АМФ-Glo в соответствии с инструкциями производителя. В данном анализе ОЕЛ напрямую коррелируют с концентрацией АМФ. Результаты представлены на **Фиг. 4**. Как CL25, так и HzCL25 продемонстрировали высокую активность и отсутствие хук-эффекта (**Фиг. 4**). HzCL25 продемонстрировало способность ингибировать клеточный CD73, подобную таковой у CL25 (**Фиг. 4**).

Пример 5: Аффинность связывания

Ферментативная активность CD73 требует связывания субстрата в открытой конформации. После связывания с субстратом CD73 должен претерпеть значительное конформационное изменение от открытой к закрытой конформации, чтобы преобразовать АМФ в аденозин. Связывание антител, которое ингибирует или модулирует указанное конформационное изменение, потенциально снижает скорость превращения АМФ в аденозин.

Для оценки аффинности связывания HzCL25 проводили поверхностный плазмонный резонанс (ППР) с использованием прибора Biacore 8K (GE Healthcare) при 25°C. Рабочий буфер ППР (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА и 0,05% об./об. поверхностно-активного вещества P20, pH 7,4) готовили из 10-кратного буфера HBS-EP (GE Healthcare). Антитела к Fc человека (GE Healthcare) иммобилизовали с помощью аминокислотного связывания во всех шестнадцати проточных ячейках сенсорного чипа CM5 серии S (GE Healthcare). Уровни иммобилизации составляли ~9000 отн. ед. для всех проточных ячеек. Желаемого уровня захвата антитела к CD73 достигали путем пропускания соответствующей концентрации антитела к CD73 через активную проточную ячейку

каждого канала. Нерасщепляющийся аналог АДФ - АРСР (аденозин-5'-(α,β -метилен) дифосфат) - в присутствии Zn^{2+} можно применять для сдвига конформационного равновесия CD73 с открытой конформации на закрытую. Следовательно, рекомбинантный CD73 инкубировали с рабочим буфером для ППР в присутствии 100 мкМ АРСР и 10 мкМ $ZnCl_2$ («закрытый» рабочий буфер для ППР) для изучения связывания антитела к CD73 с CD73 в закрытой конформации. Для достижения этой цели использовали функцию «АВА-введения» в Bioscye 8K. Для открытой конформации последовательность «АВА-введения» начиналась с 60-секундного введения рабочего буфера. Затем вводили серию концентраций CD73 с 3-кратным последовательным разведением, приготовленную из исходного материала CD73 (BPS Bioscience), и рабочий буфер в течение 180 секунд, сразу же после чего вводили рабочий буфер в течение 240 секунд. Для закрытой конформации обычный рабочий буфер для ППР заменяли на «закрытый» рабочий буфер для ППР. Поверхность регенерировали 30-секундным введением 3 М $MgCl_2$. Параметры кинетики связывания и аффинности получали на основе встраивания данных в общую модель связывания 1 к 1. Аффинности связывания, кинетические константы скорости ассоциации и скорости диссоциации с CD73 человека, яванского макака и мыши в открытой или в закрытой конформациях показаны в таблице 8, приведенной ниже. Результаты, представленные в таблице 8, обеспечивают то, что фармакокинетические данные яванского макака будут отражать фармакокинетические данные человека.

Таблица 8: Аффинности связывания, кинетические константы скорости ассоциации и скорости диссоциации с CD73 человека (SEQ ID NO: 70), яванского макака (SEQ ID NO: 72) и мыши (SEQ ID NO: 71) в открытой или закрытой конформациях для указанных антител (Ат).

Антител о	CD73	Открытая			Закрытая		
		k_a (1/М*с))	k_d (1/с)	K_D (М)	k_a (1/М*с)	k_d (1/с)	K_D (М)
CL25	Человек	> 1E+06	3,94E-04	< 3,94E-10	9,03E+05	3,44E-04	3,81E-10
	Яванский макак	> 1E+06	6,58E-04	< 6,58E-10	9,36E+05	4,95E-04	5,29E-10
	Мышь	Нет связывания			Нет связывания		
HzCL25	Человек	> 1E+06	4,49E-04	< 4,49E-10	Не проводили		
	Яванский макак	> 1E+06	4,68E-04	< 4,68E-10	Не проводили		
	Мышь	Нет связывания			Не проводили		

CL25_ hu_8-4	Человек	7,70E+ 05	1,76E-03	2,29E-09	Не проводили
CL25_ hu_8-5	Человек	> 1E+06	9,49E-04	7,18E-10	Не проводили
CL25_ hu_8-6	Человек	7,15E+ 05	1,11E-03	1,55E-09	Не проводили
CL25_ hu_9-4	Человек	3,82E+ 05	2,64E-03	6,90E-09	Не проводили
CL25_ hu_9-5	Человек	5,65E+ 05	1,14E-03	2,02E-09	Не проводили
CL25_ hu_9-6	Человек	4,24E+ 05	9,53E-04	2,25E-09	Не проводили
CL25_ hu_10-4	Человек	8,87E+ 05	1,07E-03	1,20E-09	Не проводили
CL25_ hu_10-6	Человек	5,24E+ 05	9,20E-04	1,75E-09	Не проводили
CL25_ hu_11-4	Человек	6,24E+ 05	1,55E-03	2,48E-09	Не проводили
CL25_ hu_11-5	Человек	7,99E+ 05	1,17E-03	1,46E-09	Не проводили
CL25_ hu_11-6	Человек	5,50E+ 05	1,01E-03	1,84E-09	Не проводили

Пример 6: Картирование эпитопов

Для картирования эпитопа CL25 проводили масс-спектрометрию водородно-дейтериевого обмена (ВДО, англ. «HDX»). CD73 инкубировали в оксиде дейтерия либо отдельно, либо в комплексе с Fab CL25. Дейтериевый обмен проводили при температуре 20°C в течение 0 секунд, 60 секунд, 600 секунд или 3600 секунд. Реакцию обмена останавливали низким pH, а белки расщепляли пепсином/протеазой VIII. Уровни дейтерия в идентифицированных пептидах мониторировали по сдвигу массы в жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС, англ. «LC-MS»). Кривые накопления дейтерия в зависимости от времени обмена для всех пептидов были построены в зависимости от времени. Пептиды со значительным снижением поглощения дейтерия при связывании с Fab определили как эпитопы каждого из антител. Эпитоп, определенный с помощью HDX-MS для CL25, картирован на кристаллической структуре CD73 человека (4H2F.pdb) (Фиг. 5) и представляет собой TKVQQIRRAEPNVL (SEQ ID NO:76) (т.е. аминокислоты 40-53 SEQ ID NO:70).

Пример 7: Уровни CD73 на клеточной поверхности

Для измерения количества CD73 на поверхности клеток после воздействия антителами, клетки MDA-MB-231 ресуспендировали в среде (RPMI-1640 с 10% ЭТС) и высевали в 96-луночные планшеты в концентрации 1×10^5 клеток/лунка. Указанные антитела добавляли в конечной концентрации 10 мкг/мл и планшеты инкубировали при температуре 37°C с 5% CO₂ в течение 24 часов. Клетки извлекали с помощью реактива Versene и переносили в новые 96-луночные планшеты. Клетки промывали и окрашивали неконкурирующим антителом, напрямую конъюгированным с Dy650, в концентрации 10 мкг/мл в течение 30 минут на льду. Клетки промывали и анализировали методом проточной цитометрии. Плотность рецепторов CD73 на клеточной поверхности определяли на основании объема связывания антитела (OCA, англ. «ABC») с использованием гранул Quantum Simply Cellular. Воздействие на клетки с помощью CL25 в течение 24 часов привело к снижению уровней CD73 на клеточной поверхности (Фиг. 6).

Пример 8: Получение моноклонального антитела 3-F03 к CD73 человека

Для получения дополнительных моноклональных антител к CD73 человека проводили несколько циклов отбора из библиотеки одного донора. Библиотеку из около $1,5 \times 10^{12}$ частиц фага обогащали в течение трех циклов пэннинга с использованием 200 нМ биотинилированного CD73 человека (SEQ ID NO: 70). Затем кассеты scFv из данного пула рекомбинировали в вектор дрожжевого дисплея и получили библиотеку из около $5,4 \times 10^7$. Проводили селекцию библиотеки в трех циклах FACS с использованием 100 нМ биотинилированного CD73 мыши (SEQ ID NO: 71). Из конечного продукта селекции получали уникальные последовательности путем секвенирования колоний дрожжей по Сэнгеру. Из указанного пула идентифицировали последовательность scFv 3-F03 дрожжей, которая содержит VH, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 77, и VL, имеющий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 65.

Чтобы сконструировать полноразмерное антитело 3-F03 человека, последовательности scFv 3-F03 дрожжей модифицировали перед клонированием в каркас IgG1 человека, содержащий константную область IgG1 человека, указанную в SEQ ID NO: 75, и константную область легкой цепи каппа человека, указанную в SEQ ID NO: 74. Для получения VH удаляли N-концевой глутамат (E) из SEQ ID NO: 77, а треонин (T) в положении H77 по Kabat из SEQ ID NO: 77 (т. е. положение 78 в SEQ ID NO: 77) замещали аланином (A). Для получения VL удаляли N-концевой аланин (A) из SEQ ID NO: 65. Полученное в результате полноразмерное антитело 3-F03 человека содержит VH и VL, указанные в аминокислотных последовательностях SEQ ID NO: 60 и 61, соответственно. Полученное полноразмерное человеческое антитело 3-F03 содержит тяжелую цепь и легкую цепь, указанные в аминокислотных последовательностях SEQ ID NO: 66 и 31, соответственно. Данное антитело указано в данном документе как «3-F03». В таблице 3, приведенной выше, показаны аминокислотные последовательности CDR 3-F03

в соответствии с системами нумерации IMGT, по Chothia, AbM, по Kabat и по Contact, а также зрелые VH, VL, тяжелая цепь и легкая цепь.

Пример 9: Связывание 3-F03 с CD73 на клеточной поверхности

Связывание 3-F03 с CD73 клеточной поверхности осуществляли, как описано в примере 2 выше. 3-F03 демонстрирует высокую эффективность связывания с клетками с высокими уровнями поверхностного CD73 (MDA-MB-231) и умеренными уровнями CD73 (клетки A375) (Фиг. 7А и Фиг. 7В).

Пример 10: 3-F03-опосредованное ингибирование клеточного CD73

Способность 3-F03 ингибировать активность клеточного CD73 оценивали так, как описано в примере 3, приведенном выше. Результаты представлены на Фиг. 8А и Фиг. 8В.

Клон 3-F03 продемонстрировал максимальное ингибирование клеточного CD73 в обоих тестируемых типах клеток по сравнению с низкомолекулярным ингибитором CD73 APCP (Фиг. 8А и Фиг. 8В).

Пример 11: 3-F03-опосредованное ингибирование растворимого CD73

Способность 3-F03 ингибировать активность рекомбинантного белка CD73 оценивали так, как описано в примере 4, приведенном выше, за исключением того, что использовали 0,025 мкг/мл rhCD73. Результаты представлены на Фиг. 9. Антитело 3-F03 продемонстрировало высокую активность (Фиг. 9). Антитело 3-F03 не имело «хук-эффекта».

Пример 12: Аффинность связывания антител к CD73

Аффинность связывания 3-F03 оценивали так, как описано в примере 5, приведенном выше. Аффинности связывания, кинетические константы скорости ассоциации и скорости диссоциации с CD73 человека, яванского макака и мыши в открытой или в закрытой конформациях показаны в таблице 9, приведенной ниже.

Таблица 9: Аффинности связывания, кинетические константы скорости ассоциации и скорости диссоциации с CD73 человека, яванского макака и мыши в открытой или в закрытой конформациях.

Название образца	CD73	Открытая			Закрытая		
		k_a (1/M*s)	k_d (1/c)	K_D (M)	k_a (1/M*s)	k_d (1/c)	K_D (M)
3-F03	Человек	2,15E+05	7,96E-05	3,70E-10	Нет связывания		
	Яванский макак	3,01E+05	2,21E-04	7,34E-10	Нет связывания		
	Мышь	2,17E+05	3,60E-04	1,66E-09	Нет связывания		

Пример 13: Картирование эпитопов 3-F03

Эпитоп 3-F03 картировали так, как описано в примере 6, приведенном выше. Эпитопы, определенные с помощью HDX-MS для 3-F03, картированы на кристаллической структуре CD73 человека (4H2F.pdb) (Фиг. 10) и представляют собой

AAVLPGGGTFDLVQ (SEQ ID NO: 78) (т. е. аминокислоты 386-399 из SEQ ID NO: 70) и ILPNFLANGGDGFQMIKDEL (SEQ ID NO: 79) (т. е. аминокислоты 470-489 из SEQ ID NO: 70).

Пример 14: Влияние 3-F03 на уровни CD73 на клеточной поверхности

Количество CD73 на клеточной поверхности после обработки 3-F03 оценивали, как описано в примере 7 выше. 3-F03 резко снижало уровень обнаруживаемого CD73 на поверхности клеток по сравнению с антителом изотипического контроля или необработанными клетками (Фиг. 11).

Пример 15: Варианты 3-F03

Последовательности легкой цепи 3-F03 (LC, SEQ ID NO: 66) и тяжелой цепи (HC, SEQ ID NO: 31) использовали для построения модели гомологии. На Фиг. 12А-Фиг. 12J указаны аминокислотные последовательности VH и VL иллюстративных вариантов 3-F03. Антитела, содержащие указанные последовательности VH и VL, содержали константную область тяжелой цепи, указанную в SEQ ID NO: 73, и константную область легкой цепи, указанную в SEQ ID NO: 74. В таблице 10 указаны значения аффинности и кинетики связывания иллюстративных вариантов 3-F03. Ни одна из исследованных мутаций не оказала существенного влияния на связывание с CD73 по технологии Biacore. Все исследованные мутации обладали аффинностью в пределах десятикратной аффинности, продемонстрированной антителом 3-F03, причем большинство из них - в пределах трехкратной аффинности, продемонстрированной антителом 3-F03.

Таблица 10: Аффинность и кинетика связывания по Biacore для вариантов 3-F03. -
=отсутствует

Название образца	Место мутации (нумерация по Kabat)				k_a (1/M*с)	k_d (1/с)	K_D (M)
	VH1 (E или -)	VH53 (D, E или S)	VH77 (A или T)	VL1 (A, D или -)			
3-F03_396	E	D	T	A	1,39E+05	1,78E-04	1,28E-09
3-F03_408	E	D	T	-	1,40E+05	1,86E-04	1,33E-09
3-F03_402	-	D	T	A	1,32E+05	1,84E-04	1,39E-09
3-F03_384	E	D	T	D	1,40E+05	1,98E-04	1,41E-09
3-F03_399	E	D	A	A	1,38E+05	1,97E-04	1,43E-09
3-F03_411	E	D	A	-	1,39E+05	2,04E-04	1,47E-09
3-F03_414	-	D	T	-	1,31E+05	1,98E-04	1,51E-09
3-F03_390	-	D	T	D	1,29E+05	2,12E-04	1,64E-09
3-F03_398	E	E	T	A	9,26E+04	1,59E-04	1,71E-09
3-F03_387	E	D	A	D	1,37E+05	2,38E-04	1,74E-09
3-F03_386	E	E	T	D	9,23E+04	1,64E-04	1,78E-09

3-F03_401	E	E	A	A	9,15E+04	1,67E-04	1,82E-09
3-F03_413	E	E	A	-	9,13E+04	1,71E-04	1,88E-09
3-F03_405	-	D	A	A	1,26E+05	2,39E-04	1,90E-09
3-F03_410	E	E	T	-	9,01E+04	1,76E-04	1,95E-09
3-F03_389	E	E	A	D	9,17E+04	1,89E-04	2,06E-09
3-F03_393	-	D	A	D	1,14E+05	2,39E-04	2,09E-09
3-F03_417	-	D	A	-	1,34E+05	2,84E-04	2,12E-09
3-F03_392	-	E	T	D	8,08E+04	1,80E-04	2,23E-09
3-F03_404	-	E	T	A	8,35E+04	1,89E-04	2,26E-09
3-F03_419	-	E	A	-	8,28E+04	2,00E-04	2,41E-09
3-F03_416	-	E	T	-	9,01E+04	2,21E-04	2,45E-09
3-F03_407	-	E	A	A	8,74E+04	2,35E-04	2,69E-09
3-F03_395	-	E	A	D	7,12E+04	2,10E-04	2,94E-09
3-F03_388	E	S	A	D	1,15E+05	8,68E-04	7,56E-09
3-F03_397	E	S	T	A	6,07E+04	4,89E-04	8,04E-09
3-F03_385	E	S	T	D	6,33E+04	5,38E-04	8,50E-09
3-F03_400	E	S	A	A	6,15E+04	5,29E-04	8,60E-09
3-F03_409	E	S	T	-	6,02E+04	5,46E-04	9,06E-09
3-F03_403	-	S	T	A	5,79E+04	5,41E-04	9,34E-09
3-F03_415	-	S	T	-	5,99E+04	6,06E-04	1,01E-08
3-F03_391	-	S	T	D	5,69E+04	5,84E-04	1,03E-08
3-F03_406	-	S	A	A	7,41E+04	7,65E-04	1,03E-08
3-F03_412	E	S	A	-	5,27E+04	6,38E-04	1,21E-08
3-F03_394	-	S	A	D	4,84E+04	6,30E-04	1,30E-08
3-F03_418	-	S	A	-	5,55E+04	7,99E-04	1,44E-08

Для исследования связывания сконструированных вариантов 3-F03 с CD73 на клеточной поверхности клетки MDA-MB-231 промывали и помещали в 96-луночные планшеты в концентрации 5×10^4 клеток/лунку. Клетки окрашивали антителами в указанных концентрациях в течение 1 часа на льду. Затем клетки промывали и окрашивали козьим вторичным антимышиным антителом, конъюгированным с PE, в течение 30 минут на льду. Затем клетки промывали и анализировали методом проточной цитометрии. СГИФ окрашивания CD73 представлена на графике (Фиг. 13). Каждый из вариантов 3-F03 имел подобный профиль связывания, за исключением 3-F03_417, который продемонстрировал несколько более высокое значение Y_{max} (Фиг. 13). Эти данные подтверждают исследования по технологии Biacore (таблица 10): указанные мутации не привели к существенному изменению связывания CD73 человека для

указанных вариантных клонов.

Чтобы проверить способность вариантов 3-F03 ингибировать активность клеточного CD73, клетки MDA-MB-231 промывали бессывороточной средой RPMI и высевали по 1×10^4 клеток/лунку в 96-луночные планшеты. Клетки инкубировали с антителами или APCP в указанных концентрациях при температуре 37°C с 5% CO₂ в течение 30 минут. Затем добавляли АМФ до конечной концентрации в 100 мкМ и инкубировали клетки еще 3 часа при температуре 37°C с 5% CO₂. Планшеты центрифугировали в течение 1-2 минут при 300 g и переносили по 25 мкл супернатанта в новые 96-луночные планшеты. Применяли анализ АМФ-Glo в соответствии с инструкциями производителя. В данном анализе ОЕЛ напрямую коррелируют с концентрацией АМФ. 3-F03 показало максимальное ингибирование среди вариантов 3-F03 (**Фиг. 14**). Варианты 3-F03_417, 3-F03_411 и 3-F03_413 продемонстрировали немного более низкую активность, чем 3-F03 (**Фиг. 14**). Вариант 3-F03_412 не ингибировал мембранно-связанный CD73 на клетках MDA-MB-231 (**Фиг. 14**).

Пример 16: Антитело к CD73 взаимодействует с ингибитором A2A

Для измерения способности антитела к CD73 и ингибитора A2A обращать вспять опосредованную АМФ супрессию пролиферации Т-клеток первичные CD4⁺ Т-клетки человека очищали от моноклеарных клеток периферической крови (PBMC) с использованием набора для выделения CD4⁺ Т-клеток человека (Miltenyi Biotec). Выделенные CD4⁺ Т-клетки метили карбоксифлуоресцеин-сукцинимидиловым эфиром (CFSE) (BD Biosciences) в концентрации 1 мкМ в соответствии с протоколом производителя. Клетки, меченные CFSE, ресуспендировали в среде RPMI, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки. Около 50000 клеток на лунку добавляли в 96-луночный планшет с круглодонными лунками. Частицы Dynabeads с активатором человеческих Т-клеток CD3/CD28 добавляли к клеточной суспензии в соотношении частицы:клетки 1:1 и инкубировали в течение 1 часа при 37 ° С. Серийные разведения антитела к CD73 (HzCL25, антитело А или антитело В) в присутствии или в отсутствие 0,5 мкМ ингибитора A2A (соединение 9) добавляли в указанные лунки и инкубировали в течение 30 минут при 37 ° С; серийные разведения ингибитора A2A добавляли в указанные лунки в качестве контроля (**Фиг. 16А-Фиг. 16С** и **Фиг. 18А-Фиг. 18С**). В качестве альтернативы в указанные лунки добавляли серийные разведения ингибитора A2A (соединение 9, соединение А или соединение В) в присутствии или в отсутствие 1 мкг/мл антитела к CD73 (HzCL25) и инкубировали в течение 30 минут при 37 ° С; серийные разведения антитела к CD73 добавляли в указанные лунки в качестве контролей (**Фиг. 17А-Фиг. 17С**). Наконец, добавляли АМФ в конечной концентрации 600 мкМ и синхронную культуру инкубировали в течение 4 дней при 37 ° С в инкубаторе. Через 4 дня измеряли продукцию IFN γ (**Фиг. 16А-Фиг. 16С** и **Фиг. 17А-Фиг. 17С**) и пролиферацию CD4⁺ Т-клеток методом проточной цитометрии на основе CFSE с использованием анализатора LSRFORTESSA X-20 (BD Biosciences) (**Фиг. 18А-Фиг. 18С**).

Тяжелая цепь антитела А (VN выделен курсивом):

EIQLQQSGPELVKPGASVKVSCKASGYAFTSYNMYWVKQSHGKSLEWIGYIDPYNGGT
SYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCARGYGNYKAWFAYWGQGTLVTVSA
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:102)

Легкая цепь антитела А (VL выделен курсивом):

DAVMTQTPKFLLSAGDRVITITCKASQSVTNDVAWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGV
PDRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSLSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:103)

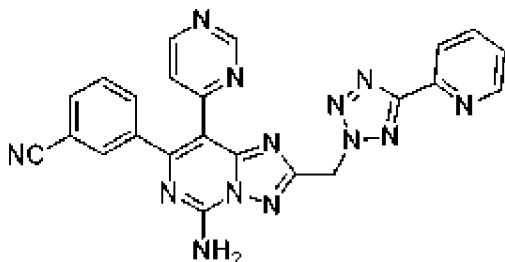
Тяжелая цепь антитела В (VH выделен курсивом):

EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGRT
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGRVDEWGRGTLTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:98)

Легкая цепь антитела В (VL выделен курсивом):

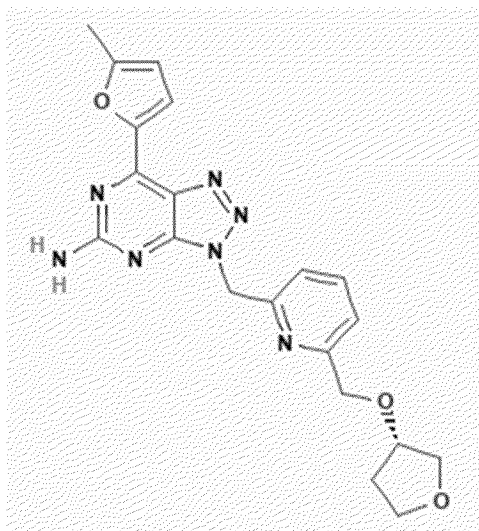
QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLSGV
PDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGKTLTVLGQPKANPTVTL
FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASS
YLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO:99)

Соединение А:



(3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-2H-тетразол-2-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4] триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил).

Соединение В:



(7-(5-метилфуран-2-ил)-3-[[6-[(3S)-оксолан-3-ил]оксиметил]пиридин-2-ил]метил]триазоло[4,5-d]пиримидин-5-амин)

В комбинации с антителом к CD73 ингибитор A2A значительно увеличивал продукцию IFN γ (Фиг. 16А-Фиг. 16С и Фиг. 17А-Фиг. 17С).

В комбинации с антителом к CD73 ингибитор A2A/A2B обратило вспять опосредованную АМФ супрессию пролиферации CD4⁺ Т-клеток зависимым от концентрации образом у нескольких разных доноров-людей (Фиг. 18А-Фиг. 18С).

Пример 17: In vivo комбинация антитела к CD73 и ингибитора A2A уменьшает объем опухоли

Тестировали эффективность in vivo антитела к CD73 в комбинации с ингибитором A2A. Антитело к CD73 HzCL25 или 3-F03_413 суспендировали в 1х фосфатно-солевом буфере (PBS) (Life Technologies) для внутрибрюшинного введения мышам hu-CD34 NSG (Jackson Laboratories). 1хPBS и человеческий IgG1 с нефункциональным Fc, суспендированный в 1хPBS, был включен в это исследование в качестве контроля. Мыши с гуманизированной иммунной системой были приобретены у Jackson Labs (г. Бар Харбор, штат Мэн, США). Кратко, 3-недельные самки мышей NSG/NOD SCID получали однократную дозу облучения, токсичную для предшественников иммунных клеток, а затем «спасались» путем инъекции CD34⁺ клеток из пуповинной крови человека. Данная группа мышей состояла из реципиентов трех различных людей-иммунодоноров, чтобы обеспечить лучшую репрезентативность индивидуальных вариаций иммунного ответа.

Левую боковую область брюха мышей выбривали за сутки до инокуляции 5×10^6 клеток линии рака молочной железы человека MDA-MB-231 (ATCC, г. Манассас, штат Виргиния, США), суспендированными в матригеле (Corning Life Sciences, г. Тьюксбери, штат Массачусетс, США). На 7-й день размеры опухоли измеряли штангенциркулем, а объем оценивали по формуле Объем= [L (наибольшая длина) x W2 (наименьшая длина)]/2. Мыши были рандомизированы на 4 группы по 5 или 6 мышей с опухолями приблизительного среднего объема (~ 200 мм³) и представленности доноров. Опухоли измеряли каждые 5 дней на протяжении всего исследования.

Каждые пять дней, начиная с 8-го дня, мышам внутрибрюшинно вводили (i) 10

мг/кг IgG1 человека и 10 мг/кг носителя; (ii) 10 мг/кг HzCL25; или (iii) 10 мг/кг 3-F03_413. В группах лечения (ii) и (iii) мышам два раза в день (дважды в день) вводили соединение 9. В общей сложности было введено 8 доз антитела (т.е. антитело вводили на 8, 13, 18, 23, 29, 34, 39 и 44 дни, а соединение 9 вводили два раза в день с интервалами 8 и 16 часов), начиная с 8 дня до последнего дня).

У мышей, которым вводили антитело к CD73 в комбинации с ингибитором A2A, наблюдалось статистически значимое замедление роста опухоли (**Фиг. 19А** и **Фиг. 19В**).

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Хотя данное изобретение было изложено в сочетании с его подробным описанием, вышеприведенное описание предназначено для иллюстрации, а не для ограничения объема данного изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации входят в объем следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающий введение субъекту-человеку эффективного количества ингибитора CD73 человека и ингибитора аденозинового рецептора A2A и/или аденозинового рецептора A2B, причем:

(1) ингибитор CD73 человека включает:

(а) антитело, содержащее переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR) 1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO: 1);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO: 2); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFDY (SEQ ID NO: 3); и

содержащее переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO: 4);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO: 5); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO: 6);

(b) антитело, которое связывается с CD73 человека в эпитопе в пределах аминокислот 40-53 SEQ ID NO:70;

(c) антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25; или

(d) антитело, содержащее домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GFTFSSYD (SEQ ID NO: 34);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность MSYDGSNK (SEQ ID NO: 35) или MSYEGSNK (SEQ ID NO: 40); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ATEIAAKGDY (SEQ ID NO: 36); и

антитело, содержащее домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO: 37);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AAS (SEQ ID NO: 38); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39);

(е) антитело, которое связывается с CD73 человека в эпитопе в пределах аминокислот 386-399 и 470-489 из SEQ ID NO: 70;

(f) антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31;

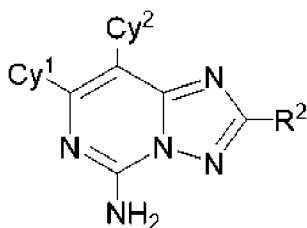
(g) антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31;

(h) антитело, выбранное из группы, состоящей из 11E1, Medi9447, CPI-006 и BMS-986179; или

(i) ингибитор, выбранный из группы, состоящей из CB-708 и AB680; и

(2) ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или аденозинового рецептора A2B (A2A/A2B) включает соединение:

(a) Формулы (I):



(I),

или его фармацевтически приемлемую соль, где

Cy¹ представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

Cy² представляет собой 5-6-членный гетероарил или 4-7-членный гетероциклоалкил, где каждый из 5-6-членного гетероарила или 4-7-членного гетероциклоалкила Cy² необязательно замещен 1, 2 или 3 группами, каждая из которых независимо выбрана из C₁₋₃ алкила, C₁₋₃ алкокси, NH₂, NH(C₁₋₃ алкил) и N(C₁₋₃ алкил)₂;

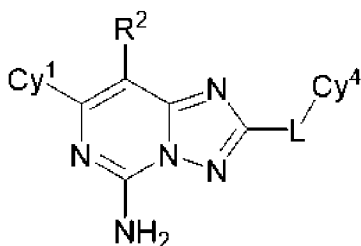
R² выбран из фенил-C₁₋₃ алкил-, C₃₋₇ циклоалкил-C₁₋₃ алкил-, (5-7-членный гетероарил)-C₁₋₃ алкил-, (4-7-членный гетероциклоалкил)-C₁₋₃ алкил- и OR^{a2}, где каждый из фенил-C₁₋₃ алкил-, C₃₋₇ циклоалкил-C₁₋₃ алкил-, (5-7-членный гетероарил)-C₁₋₃ алкил- и (4-7-членный гетероциклоалкил)-C₁₋₃ алкил- из R² необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^C;

R^{a2} представляет собой (5-7-членный гетероарил)-C₁₋₃ алкил-, необязательно замещенный 1 или 2 независимо выбранными заместителями R^C;

каждый R^C независимо выбран из галогена, C₁₋₆ алкила, C₆ арила, 5-7-членного гетероарила, (4-7-членного гетероциклоалкила)-C₁₋₃ алкила, OR^{a4} и NR^{c4}R^{d4}, и

каждый R^{a4} , R^{c4} и R^{d4} независимо выбран из H и C_{1-6} алкила;

(b) Формулы (II):



(II)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

R^2 выбран из H и CN;

Cy^1 представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

L представляет собой C_{1-3} алкилен, где указанный алкилен необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8D} ;

Cy^4 выбран из фенила, циклогексила, пиридила, пирролидинонила и имидазолила, где каждый фенил, циклогексил, пиридил, пирролидинонил и имидазолил необязательно замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из R^{8D} и R^8 ;

каждый R^8 независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, C_{1-6} галогеналкила, C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, фенила, C_{3-7} циклоалкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, фенил- C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкила, (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкила и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкила, где каждый из C_{1-6} алкила, C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, фенила, C_{3-7} циклоалкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, фенил- C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкила, (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкила и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкила R^8 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8A} ;

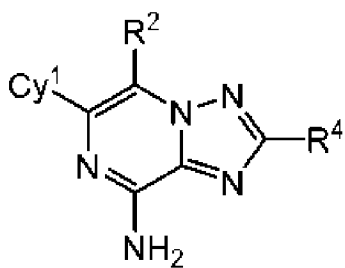
каждый R^{8A} независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, CN, OR^{a81} и $NR^{c81}R^{d81}$, где каждый из C_{1-3} алкила, 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила R^{8A} необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8B} ;

каждый R^{a81} , R^{c81} и R^{d81} независимо выбран из H, C_{1-6} алкила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где каждый из C_{1-6} алкила и 4-7-членного гетероциклоалкила R^{a81} , R^{c81} и R^{d81} необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8B} ;

каждый R^{8B} независимо выбран из галогена и C_{1-3} алкила; и

каждый R^{8D} независимо выбран из OH, CN, галогена, C_{1-6} алкила и C_{1-6} галогеналкила;

(c) Формулы (III):



(III)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

Cy^1 представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

R^2 выбран из 5-6 членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где каждый из 5-6 членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила из R^2 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{2A} ;

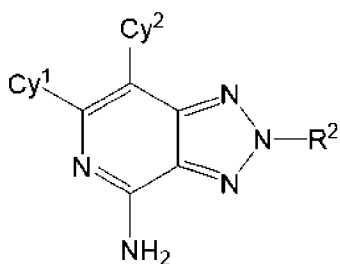
каждый R^{2A} независимо выбран из D, галогена, C_{1-6} алкила и C_{1-6} галогеналкила;

R^4 выбран из фенил- C_{1-3} алкил-, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкил-, (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил- и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкила, где каждый из фенил- C_{1-3} алкил-, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкил-, (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил- и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкил- из R^4 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{4A} ;

каждый R^{4A} независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, C_{1-6} галогеналкила, CN, OR^{a41} и $NR^{c41}R^{d41}$; и

каждый R^{a41} , R^{c41} и R^{d41} независимо выбран из H и C_{1-6} алкила; или

(d) Формулы (IV):



(IV)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

Cy^1 представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

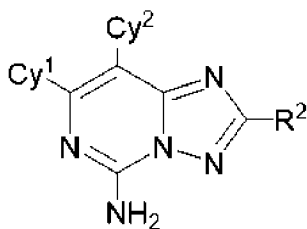
Cy^2 выбран из 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где каждый из 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила Cy^2 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^6 ;

каждый R^6 независимо выбран из галогена, C^{1-6} алкила и C^{1-6} галогеналкила;

R^2 представляет собой фенил- C_{1-3} алкил- или (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил-, где каждый из фенил- C_{1-3} алкил- и (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил- из R^2 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{2A} , и

каждый R^{2A} независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила и C_{1-6} галогеналкила, или его фармацевтически приемлемую соль.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B представляет собой соединение формулы (I):



(I),

или его фармацевтически приемлемую соль, где

Cy^1 представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

Cy^2 представляет собой 5-6-членный гетероарил или 4-7-членный гетероциклоалкил, где каждый из 5-6-членного гетероарила или 4-7-членного гетероциклоалкила Cy^2 необязательно замещен 1, 2 или 3 группами, каждая из которых независимо выбрана из C_{1-3} алкила, C_{1-3} алкокси, NH_2 , $NH(C_{1-3}$ алкил) и $N(C_{1-3}$ алкил) $_2$;

R^2 выбран из фенил- C_{1-3} алкил-, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкил-, (5-7-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил-, (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкил- и OR^{a2} , где каждый из фенил- C_{1-3} алкил-, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкил-, (5-7-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил- и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкил- из R^2 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^C ;

R^{a2} представляет собой (5-7-членный гетероарил)- C_{1-3} алкил-, необязательно замещенный 1 или 2 независимо выбранными заместителями R^C ;

каждый R^C независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, C_6 арила, 5-7-членного гетероарила, (4-7-членного гетероциклоалкила)- C_{1-3} алкила, OR^{a4} и $NR^{c4}R^{d4}$, и

каждый R^{a4} , R^{c4} , и R^{d4} независимо выбран из H и C_{1-6} алкила.

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B выбран из:

3-(5-амино-2-(пиридин-2-илметил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила, или его фармацевтически приемлемой соли;

3-(5-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидроксиметил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила, или его фармацевтически приемлемой соли;

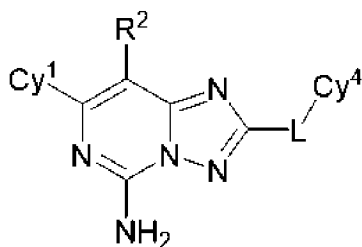
3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-2H-тетразол-2-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли;

3-(5-амино-2-((3-метилпиридин-2-ил)метокси)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли; и

3-(2-((5-(1H-пиразол-1-ил)-1H-тетразол-1-ил)метил)-5-амино-8-(пиримидин-4-ил)-

[1,2,4-триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B представляет собой соединение формулы (II):



(II)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

R^2 выбран из H и CN;

Cy^1 представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

L представляет собой C_{1-3} алкилен, где указанный алкилен необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8D} ;

Cy^4 выбран из фенила, циклогексила, пиридила, пирролидинонила и имидазолила, где каждый фенил, циклогексил, пиридил, пирролидинонил и имидазолил необязательно замещен 1, 2 или 3 заместителями, независимо выбранными из R^{8D} и R^8 ;

каждый R^8 независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, C_{1-6} галогеналкила, C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, фенила, C_{3-7} циклоалкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, фенил- C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкила, (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкила и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкила, где каждый из C_{1-6} алкила, C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, фенила, C_{3-7} циклоалкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, фенил- C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкил- C_{1-3} алкила, (5-6-членный гетероарил)- C_{1-3} алкила и (4-7-членный гетероциклоалкил)- C_{1-3} алкила R^8 необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8A} ;

каждый R^{8A} независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, CN, OR^{a81} и $NR^{c81}R^{d81}$, где каждый из C_{1-3} алкила, 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила R^{8A} необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8B} ;

каждый R^{a81} , R^{c81} и R^{d81} независимо выбран из H, C_{1-6} алкила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где каждый из C_{1-6} алкила и 4-7-членного гетероциклоалкила R^{a81} , R^{c81} и R^{d81} необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8B} ;

каждый R^{8B} независимо выбран из галогена и C_{1-3} алкила; и

каждый R^{8D} независимо выбран из OH, CN, галогена, C_{1-6} алкила и C_{1-6} галогеналкила.

5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B выбран из:

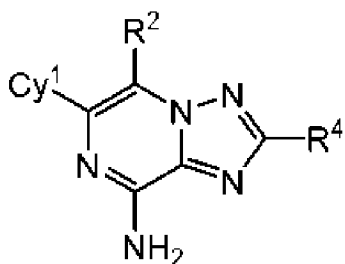
3-(5-амино-2-(гидрокси(фенил)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли;

3-(5-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрила, или его фармацевтически приемлемой соли;

5-амино-7-(3-циано-2-фторфенил)-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-8 карбонитрила или его фармацевтически приемлемой соли; и

3-(5-амино-2-((2-фтор-6-(((1-метил-2-оксопирролидин-3-ил)амино)метил)фенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B представляет собой соединение формулы (III):



(III)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

Cy¹ представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

R² выбран из 5-6 членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где каждый из 5-6 членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила из R² необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{2A};

каждый R^{2A} независимо выбран из D, галогена, C₁₋₆ алкила и C₁₋₆ галогеналкила;

R⁴ выбран из фенил-C₁₋₃ алкил-, C₃₋₇ циклоалкил-C₁₋₃ алкил-, (5-6-членный гетероарил)-C₁₋₃ алкил- и (4-7-членный гетероциклоалкил)-C₁₋₃ алкила, где каждый из фенил-C₁₋₃ алкил-, C₃₋₇ циклоалкил-C₁₋₃ алкил-, (5-6-членный гетероарил)-C₁₋₃ алкил- и (4-7-членный гетероциклоалкил)-C₁₋₃ алкил- из R⁴ необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{4A};

каждый R^{4A} независимо выбран из галогена, C₁₋₆ алкила, C₁₋₆ галогеналкила, CN, OR^{a41} и NR^{c41}R^{d41}; и

каждый R^{a41}, R^{c41} и R^{d41} независимо выбран из H и C₁₋₆ алкила.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B выбран из:

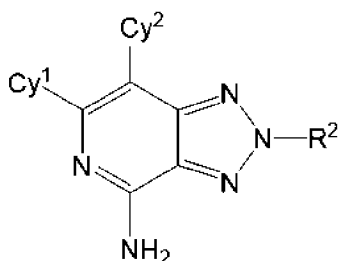
3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила;

3-(8-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-5-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли;

3-(8-амино-2-(амино(2,6-дифторфенил)метил)-5-(4-метилоксазол-5-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли; и

3-(8-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-5-(2,6-диметилпиридин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B представляет собой соединение формулы (IV):



(IV)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

Cy¹ представляет собой фенил, замещенный 1 или 2 заместителями, независимо выбранными из галогена и CN;

Cy² выбран из 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила, где каждый из 5-6-членного гетероарила и 4-7-членного гетероциклоалкила Cy² необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R⁶;

каждый R⁶ независимо выбран из галогена, C₁-₆ алкила и C₁-₆ галогеналкила;

R² представляет собой фенил-C₁-₃ алкил- или (5-6-членный гетероарил)-C₁-₃ алкил-, где каждый из фенил-C₁-₃ алкил- и (5-6-членный гетероарил)-C₁-₃ алкил- из R² необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R²ᴬ; и

каждый R²ᴬ независимо выбран из галогена, C₁-₆ алкила и C₁-₆ галогеналкила.

или его фармацевтически приемлемую соль.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B выбран из:

3-(4-амино-2-(пиридин-2-илметил)-7-(пиримидин-4-ил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли;

3-(4-амино-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-7-(пиримидин-4-ил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли;

3-(4-амино-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-7-(пиридин-4-ил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли; и

3-(4-амино-7-(1-метил-1H-пиразол-5-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)-2-фторбензонитрила или его фармацевтически приемлемой соли.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B представляет

собой 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль.

11. Способ по п. 1, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B представляет собой 3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-2H-тетразол-2-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль.

12. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что ингибитор CD73 человека включает антитело, содержащее:

домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO: 1);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO: 2); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFDY (SEQ ID NO: 3); и

домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO: 4);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO: 5); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO: 6).

13. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что ингибитор CD73 человека включает антитело, которое связывается с CD73 человека в эпитопе в пределах аминокислот 40-53 SEQ ID NO:70.

14. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что ингибитор CD73 человека включает антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25.

15. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что ингибитор CD73 человека включает антитело, содержащее:

домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GFTFSSYD (SEQ ID NO: 34);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность MSYDGSNK (SEQ ID NO: 35) или MSYEGSNK (SEQ ID NO: 40); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ATEIAAKGDY (SEQ ID NO: 36); и

домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO: 37);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AAS (SEQ ID NO: 38); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39).

16. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что ингибитор CD73 человека включает антитело, которое связывается с CD73 человека в эпитопе в пределах аминокислот 386-399 и 470-489 из SEQ ID NO:70.

17. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что ингибитор CD73 человека включает антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31.

18. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что ингибитор CD73 человека включает антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31.

19. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что ингибитор CD73 человека включает антитело, выбранное из группы, состоящей из 11E1, Medi9447, CPI-006 и BMS-986179.

20. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что ингибитор CD73 человека выбран из группы, состоящей из CB-708 и AB680.

21. Способ по п. 12, отличающийся тем, что домен VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22, а домен VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23, и где соединение включает 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил.

22. Способ по п. 12, отличающийся тем, что антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24, а легкая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25, и где соединение включает 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил.

23. Способ по п. 15, отличающийся тем, что домен VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 62, а домен VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61, и где соединение включает 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил.

24. Способ по п. 15, отличающийся тем, что антитело содержит тяжелую цепь и

легкую цепь, при этом тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30, а легкая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31, и где соединение включает 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил.

25. Способ по п. 15, отличающийся тем, что домен VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 63, а домен VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61, и где соединение включает 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил.

26. Способ по п. 15, отличающийся тем, что антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33, а легкая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31, и где соединение включает 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил.

27. Способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом субъекта-человека, включающий введение субъекту-человеку эффективного количества антитела, которое связывается с CD73 человека, и ингибитора аденозинового рецептора A2A и/или аденозинового рецептора A2B, при этом антитело:

(а) содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR) 1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO: 1);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO: 2); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFDY (SEQ ID NO: 3); и

содержит вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO: 4);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO: 5); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO: 6);

(b) связывается с CD73 человека в эпитопе в пределах аминокислот 40-53 SEQ ID NO:70;

(c) связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, включающую аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 25;

(d) содержит домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, где:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GFTFSSYD (SEQ ID NO: 34);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность MSYDGSNK (SEQ ID NO: 35) или MSYEGSNK (SEQ ID NO: 40); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ATEIAAKGDY (SEQ ID NO: 36); и

где антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO: 37);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AAS (SEQ ID NO: 38); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39);

(е) связывается с CD73 человека в эпитопе в пределах аминокислот 386-399 и 470-489 SEQ ID NO:70;

(f) связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31; или

(g) связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что антитело содержит домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO: 1);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO: 2); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFDY (SEQ ID NO: 3); и

где антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO: 4);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO: 5); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO: 6).

29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что домен VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22.

30. Способ по п. 28, отличающийся тем, что антитело содержит тяжелую цепь, и при этом тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24.

31. Способ по п. 28, отличающийся тем, что домен VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23.

32. Способ по п. 28, отличающийся тем, что антитело содержит легкую цепь, и при этом легкая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25.

33. Способ по п. 28, отличающееся тем, что домен VH по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 22, и домен VL по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 23.

34. Способ по п. 28, отличающееся тем, что домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22, и домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23.

35. Способ по п. 28, отличающееся тем, что антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24, и легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25.

36. Способ по п. 27, отличающийся тем, что антитело связывается с CD73 человека в эпитопе в пределах аминокислот 40-53 SEQ ID NO: 70.

37. Способ по п. 27, отличающийся тем, что антитело связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

38. Способ по п. 27, отличающийся тем, что антитело содержит домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GFTFSSYD (SEQ ID NO: 34);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность MSYDGSNK (SEQ ID NO: 35) или MSYEGSNK (SEQ ID NO: 40); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ATEIAAKGDY (SEQ ID NO: 36); и

где антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, где:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO: 37);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AAS (SEQ ID NO: 38); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39).

39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GFTFSSYD (SEQ ID NO: 34);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность MSYDGSNK (SEQ ID NO: 35);

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ATEIAAKGDY (SEQ ID NO: 36);

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO: 37);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AAS (SEQ ID NO: 38); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39).

40. Способ по п. 39, отличающийся тем, что домен VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 62.

41. Способ по п. 39, отличающийся тем, что антитело содержит тяжелую цепь, и при этом тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30.

42. Способ по п. 39, отличающийся тем, что домен VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61.

43. Способ по п. 39, отличающийся тем, что антитело содержит легкую цепь, и при этом легкая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31.

44. Способ по п. 39, отличающийся тем, что домен VH имеет по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 62, и домен VL имеет по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 61.

45. Способ по п. 39, отличающийся тем, что домен VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 62, и домен VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61.

46. Способ по п. 39, отличающийся тем, что антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, и при этом тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30, и легкая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31.

47. Способ по п. 38, отличающийся тем, что:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GFTFSSYD (SEQ ID NO: 34);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность MSYEGSNK (SEQ ID NO: 40);

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ATEIAAKGDY (SEQ ID NO: 36);

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO: 37);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AAS (SEQ ID NO: 38); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPH (SEQ ID NO: 39).

48. Способ по п. 47, отличающийся тем, что домен VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 63.

49. Способ по п. 47, отличающийся тем, что антитело содержит тяжелую цепь, и при этом тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33.

50. Способ по п. 47, отличающийся тем, что домен VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61.

51. Способ по п. 47, отличающийся тем, что антитело содержит легкую цепь, и при этом легкая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31.

52. Способ по п. 47, отличающийся тем, что домен VH имеет по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 63, и домен VL имеет по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 61.

53. Способ по п. 47, отличающийся тем, что домен VH включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 63, и домен VL включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61.

54. Способ по п. 47, отличающийся тем, что антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, и при этом тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33, и легкая цепь включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31.

55. Способ по п. 27, отличающийся тем, что антитело связывается с CD73 человека в эпителии в пределах аминокислот 386-399 и 470-489 SEQ ID NO:70.

56. Способ по п. 27, отличающийся тем, что антитело связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31.

57. Способ по п. 27, отличающийся тем, что антитело связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31.

58. Способ по любому из пп. 27-57, отличающийся тем, что ингибитор выбран из группы, состоящей из:

7-(5-метилфуран-2-ил)-3-[[6-[(3S)-оксолан-3-ил]оксиметил]пиридин-2-ил]метил]триазоло[4,5-d]пиримидин-5-амин,а,

3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-2H-тетразол-2-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила,

3-[2-амино-6-[1-[[6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-2-ил]метил]триазол-4-ил]пиримидин-4-ил]-2-метилбензонитрила,

6-(2-хлор-6-метилпиридин-4-ил)-5-(4-фторфенил)-1,2,4-триазин-3-амин,а, 5-бром-2,6-ди(1H-пиразол-1-ил)пиримидин-4-амин и

EOS100850.

59. Способ по любому из пп. 1-58, отличающийся тем, что злокачественное новообразование характеризуется высокоаденозиновым профилем.

60. Способ по любому из пп. 1-59, отличающийся тем, что злокачественное новообразование представляет собой рак головы и шеи, колоректальный рак, рак легкого, меланому, рак яичника, рак мочевого пузыря, рак печени или почечно-клеточную карциному.

По доверенности

Фиг. 1А**CL25_hu_10-4 VH**

EVQLVQSGAEVKKPAGESLKISCKGSGYTFTSYGLSWVRQMPGKGLEWMGEIYPGSG
NTYYNEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARYDYLGSYGFYWG
AGTTVTVSS (SEQ ID NO:22)

CL25_hu_10-4 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLLYSASYRYS
GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO:80)

H_zCL25 VH

EVQLVQSGAEVKKPAGESLKISCKGSGYTFTSYGLSWVRQMPGKGLEWMGEIYPGSG
NTYYNEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARYDYLGSYGFYWG
AGTTVTVSS (SEQ ID NO:22)

H_zCL25 VL

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYSASYRYS
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO:23)

CL25_hu_10-6 VH

EVQLVQSGAEVKKPAGESLKISCKGSGYTFTSYGLSWVRQMPGKGLEWMGEIYPGSG
NTYYNEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARYDYLGSYGFYWG
AGTTVTVSS (SEQ ID NO:22)

CL25_hu_10-6 VL

AIRMTQSPSSFSASTGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO:81)

CL25_hu_11-4 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGLSWVRQATGQGLEWMGEIYPGSG
NTYYNEKFKGRVTMTANTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARYDYLGSYGFYWG
AGTTVTVSS (SEQ ID NO:82)

CL25_hu_11-4 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLLYSASYRYS
GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO:80)

Фиг. 1В**CL25_hu_11-5_VH**

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTSYGLSWVRQATGQGLEWMGEIYPGSG
NTYYNEKFKGRVTMTANTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARYDYLGSSYGFDYWG
AGTTVTVSS (SEQ ID NO:82)

CL25_hu_11-5_VL

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYSASYRYS
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO:23)

CL25_hu_11-6_VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTSYGLSWVRQATGQGLEWMGEIYPGSG
NTYYNEKFKGRVTMTANTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARYDYLGSSYGFDYWG
AGTTVTVSS (SEQ ID NO:82)

CL25_hu_11-6_VL

AIRMTQSPSSFSASTGDRVITITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO:81)

CL25_hu_8-4_VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTSYGLSWVRQATGQGLEWMGEIYPGSG
NTYYNEKFKGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARYDYLGSSYGFDYWG
AGTTVTVSS (SEQ ID NO:83)

CL25_hu_8-4_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYS
GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO:80)

CL25_hu_8-5_VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTSYGLSWVRQATGQGLEWMGEIYPGSG
NTYYNEKFKGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDVAVYYCARYDYLGSSYGFDYWG
AGTTVTVSS (SEQ ID NO:83)

CL25_hu_8-5_VL

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYSASYRYS
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO:23)

Фиг. 1С

CL25_hu_8-6 VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGLSWVRQATGQGLEWMGEIYPGSG
NTYYNEKFKGRVTMTRNTSISTAYMELSSLRSED TAVYYCARYDYL GSSYGF DYWG
AGTTVTVSS (SEQ ID NO:83)

CL25_hu_8-6 VL

AIRMTQSPSSFSASTGDRV TITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO:81)

CL25_hu_9-4 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSG
NTYYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARYDYL GSSYGF DYWG
AGTTVTVSS (SEQ ID NO:84)

CL25_hu_9-4 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYS
GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO:80)

CL25_hu_9-5 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSG
NTYYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARYDYL GSSYGF DYWG
AGTTVTVSS (SEQ ID NO:84)

CL25_hu_9-5 VL

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYSASYRYS
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO:23)

CL25_hu_9-6 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSG
NTYYNEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARYDYL GSSYGF DYWG
AGTTVTVSS (SEQ ID NO:84)

CL25_hu_9-6 VL

AIRMTQSPSSFSASTGDRV TITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYCQQHYNTPYTFGGGTKLEIK (SEQ
ID NO:81)

Фиг. 1D

```

CL25      QVQLVQSGAELARPGASVKLSKRASGYTFTSYGLSWVKQRTGQGLEWIGEIYPGSGNTYY 60
CL_hu_10-4 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFTSYGLSWVRQMPGKGLEWMGEIYPGSGNTYY 60
HzCL25     EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFTSYGLSWVRQMPGKGLEWMGEIYPGSGNTYY 60
CL25_hu_10-6 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFTSYGLSWVRQMPGKGLEWMGEIYPGSGNTYY 60
CL25_hu_9-4  QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSGNTYY 60
CL25_hu_9-5  QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSGNTYY 60
CL25_hu_9-6  QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYGLSWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSGNTYY 60
CL25_hu_11-4 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGLSWVRQATGQGLEWMGEIYPGSGNTYY 60
CL25_hu_11-5 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGLSWVRQATGQGLEWMGEIYPGSGNTYY 60
CL25_hu_11-6 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGLSWVRQATGQGLEWMGEIYPGSGNTYY 60
CL25_hu_8-4  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGLSWVRQATGQGLEWMGEIYPGSGNTYY 60
CL25_hu_8-5  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGLSWVRQATGQGLEWMGEIYPGSGNTYY 60
CL25_hu_8-6  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGLSWVRQATGQGLEWMGEIYPGSGNTYY 60
          :*** :****: :** *:*:***:*****:*****:*****:*****:*****
          :*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

CL25      NEKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARYDYLGSSYGFDYWGQGTTLTVS 120
CL_hu_10-4 NEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARYDYLGSSYGFDYWGAGTTVTVS 120
HzCL25     NEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARYDYLGSSYGFDYWGAGTTVTVS 120
CL25_hu_10-6 NEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARYDYLGSSYGFDYWGAGTTVTVS 120
CL25_hu_9-4  NEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCARYDYLGSSYGFDYWGAGTTVTVS 120
CL25_hu_9-5  NEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCARYDYLGSSYGFDYWGAGTTVTVS 120
CL25_hu_9-6  NEKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDТАVYYCARYDYLGSSYGFDYWGAGTTVTVS 120
CL25_hu_11-4 NEKFKGRVTMTANTSISTAYMELSSLRSEDТАVYYCARYDYLGSSYGFDYWGAGTTVTVS 120
CL25_hu_11-5 NEKFKGRVTMTANTSISTAYMELSSLRSEDТАVYYCARYDYLGSSYGFDYWGAGTTVTVS 120
CL25_hu_11-6 NEKFKGRVTMTANTSISTAYMELSSLRSEDТАVYYCARYDYLGSSYGFDYWGAGTTVTVS 120
CL25_hu_8-4  NEKFKGRVTMTRNТSISTAYMELSSLRSEDТАVYYCARYDYLGSSYGFDYWGAGTTVTVS 120
CL25_hu_8-5  NEKFKGRVTMTRNТSISTAYMELSSLRSEDТАVYYCARYDYLGSSYGFDYWGAGTTVTVS 120
CL25_hu_8-6  NEKFKGRVTMTRNТSISTAYMELSSLRSEDТАVYYCARYDYLGSSYGFDYWGAGTTVTVS 120
          *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
          *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

CL25      S 120 (SEQ ID NO:26)
CL_hu_10-4 S 121 (SEQ ID NO:22)
HzCL25     S 121 (SEQ ID NO:22)
CL25_hu_10-6 S 121 (SEQ ID NO:22)
CL25_hu_9-4  S 121 (SEQ ID NO:84)
CL25_hu_9-5  S 121 (SEQ ID NO:84)
CL25_hu_9-6  S 121 (SEQ ID NO:84)
CL25_hu_11-4 S 121 (SEQ ID NO:82)
CL25_hu_11-5 S 121 (SEQ ID NO:82)
CL25_hu_11-6 S 121 (SEQ ID NO:82)
CL25_hu_8-4  S 121 (SEQ ID NO:83)
CL25_hu_8-5  S 121 (SEQ ID NO:83)
CL25_hu_8-6  S 121 (SEQ ID NO:83)

```

Фиг. 1Е

```

CL25      DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYNGVPD 60
HzCL25    DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYSASYRYSGVPD 60
CL25_hu_11-5 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYSASYRYSGVPD 60
CL25_hu_8-5  DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYSASYRYSGVPD 60
CL25_hu_9-5  DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYSASYRYSGVPD 60
CL25_hu_10-4 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSGVPS 60
CL25_hu_11-4 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSGVPS 60
CL25_hu_8-4  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSGVPS 60
CL25_hu_9-4  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSGVPS 60
CL25_hu_10-6 AIRMTQSPSSFSASTGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSGVPS 60
CL25_hu_11-6 AIRMTQSPSSFSASTGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSGVPS 60
CL25_hu_8-6  AIRMTQSPSSFSASTGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSGVPS 60
CL25_hu_9-6  AIRMTQSPSSFSASTGDRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYSGVPS 60
          * **** . :.:* *:*.:.*****: ****:*****.***.

```

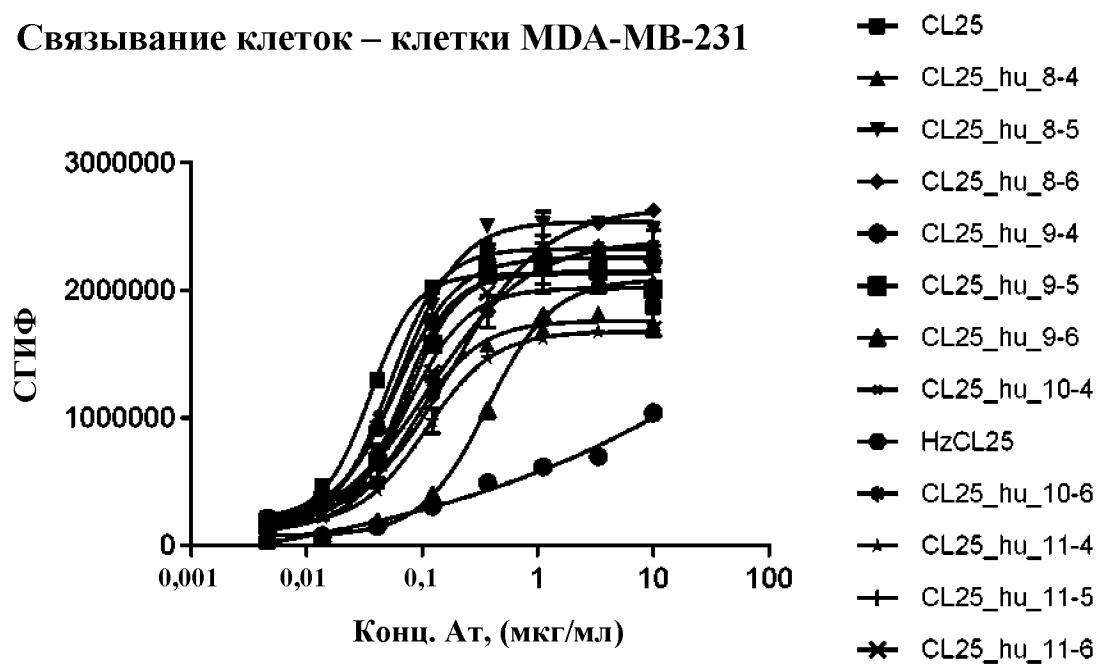
```

CL25      RFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:27)
HzCL25    RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:23)
CL25_hu_11-5 RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:23)
CL25_hu_8-5  RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:23)
CL25_hu_9-5  RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:23)
CL25_hu_10-4 RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:80)
CL25_hu_11-4 RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:80)
CL25_hu_8-4  RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:80)
CL25_hu_9-4  RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:80)
CL25_hu_10-6 RFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:81)
CL25_hu_11-6 RFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:81)
CL25_hu_8-6  RFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:81)
CL25_hu_9-6  RFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYCQOHYNTPYTFGGGTKLEIK 107 (SEQ ID NO:81)
          **:*****:*:***.:* *.*.*****

```

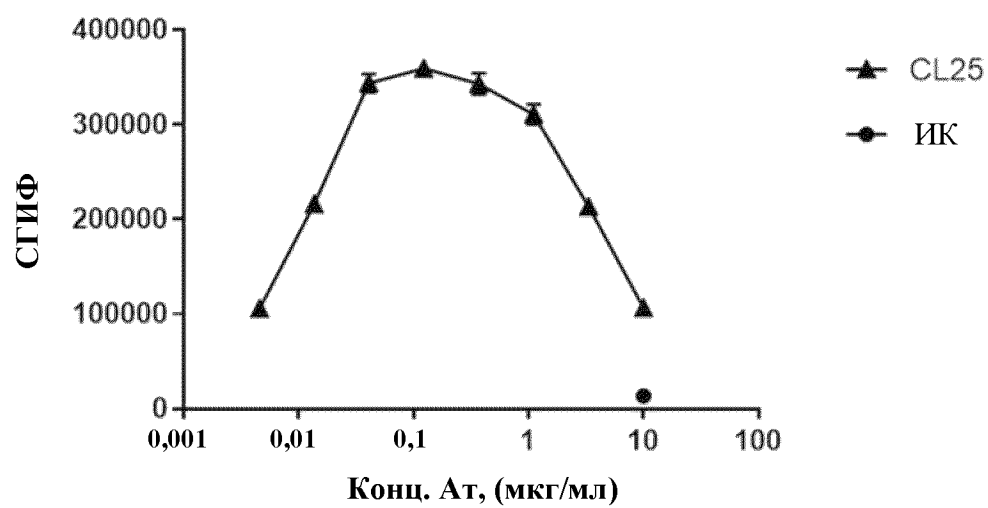
Фиг. 2А

Связывание клеток – клетки MDA-MB-231



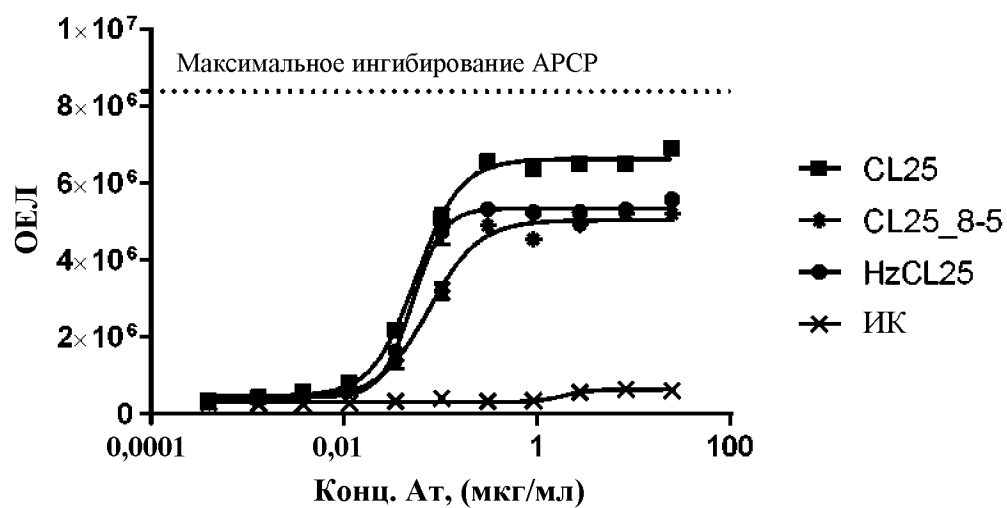
Фиг. 2В

Связывание клеток – клетки A375



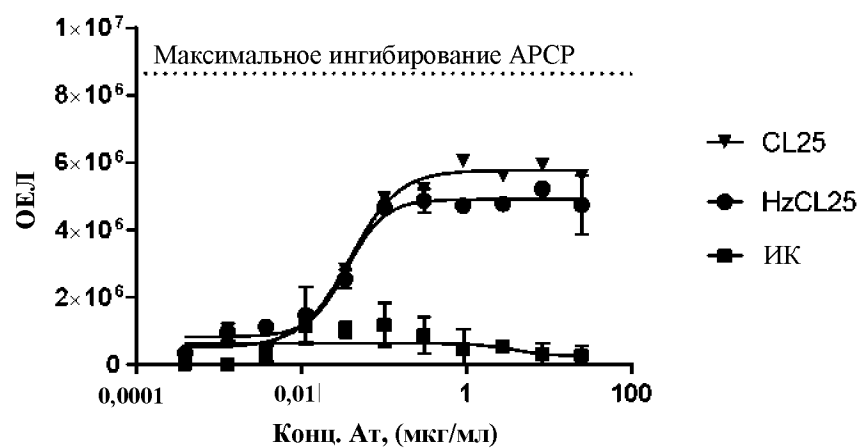
Фиг. 3А

Ингибирование клеточного CD73 – клетки A375



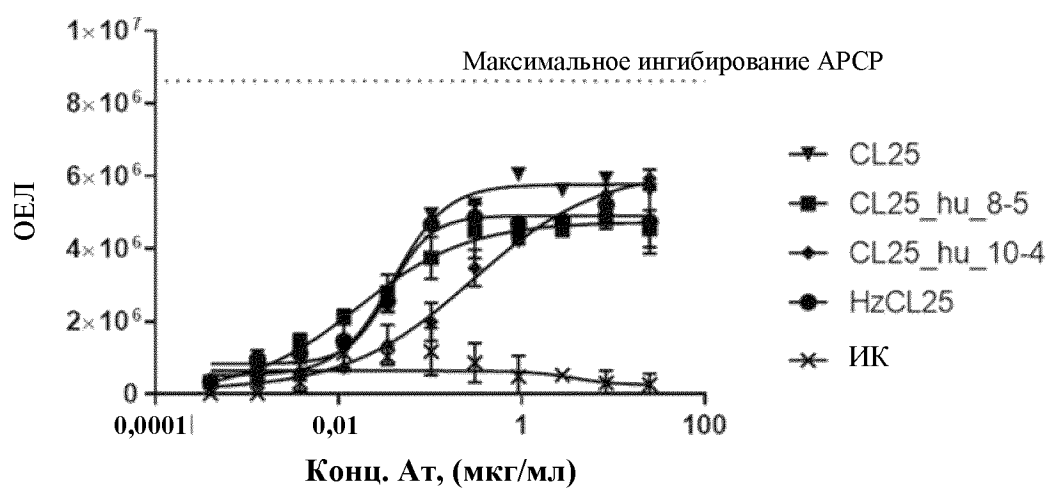
Фиг. 3В

Ингибирование клеточного CD73 – клетки MDA-MB-231



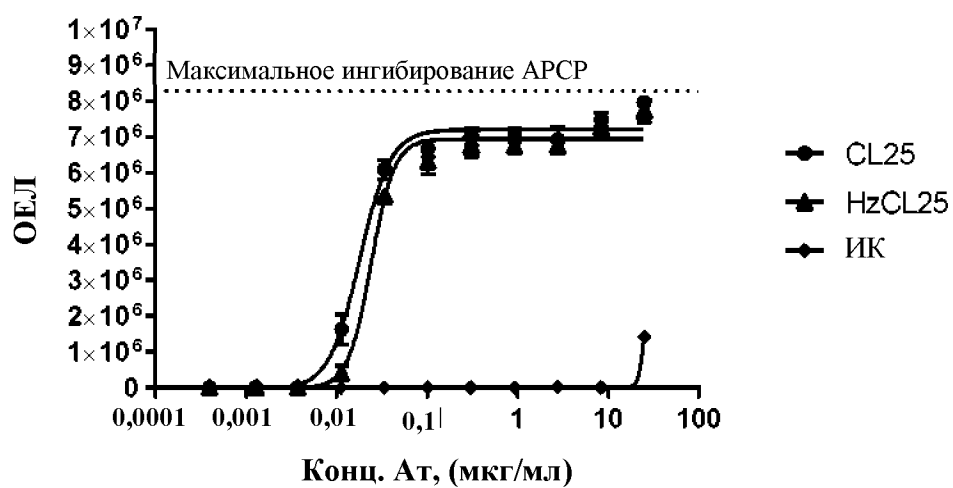
Фиг. 3С

Ингибирование клеточного CD73 – клетки MDA-MB-231

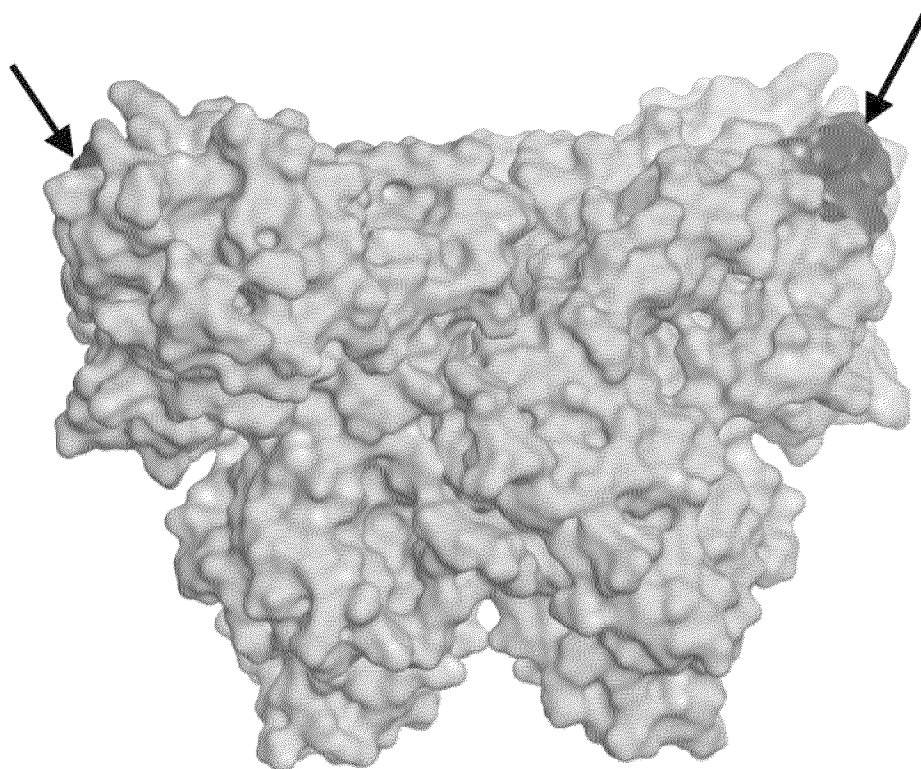


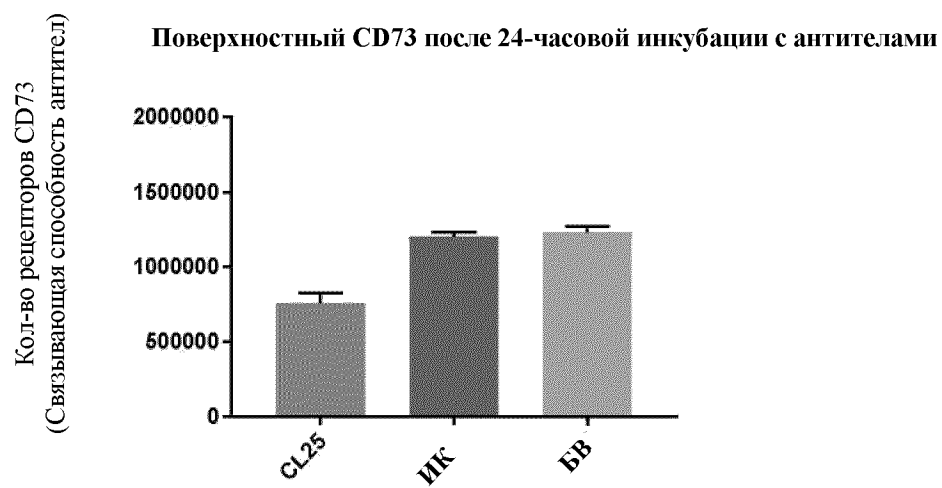
Фиг. 4

Ингибирование рекомбинантного CD73



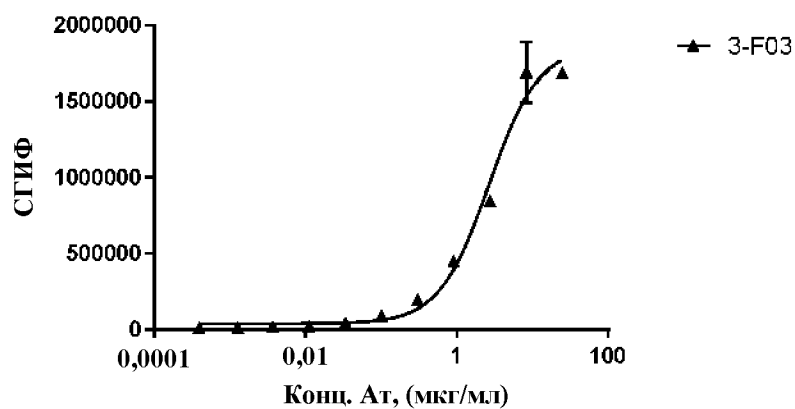
Фиг. 5



Фиг. 6

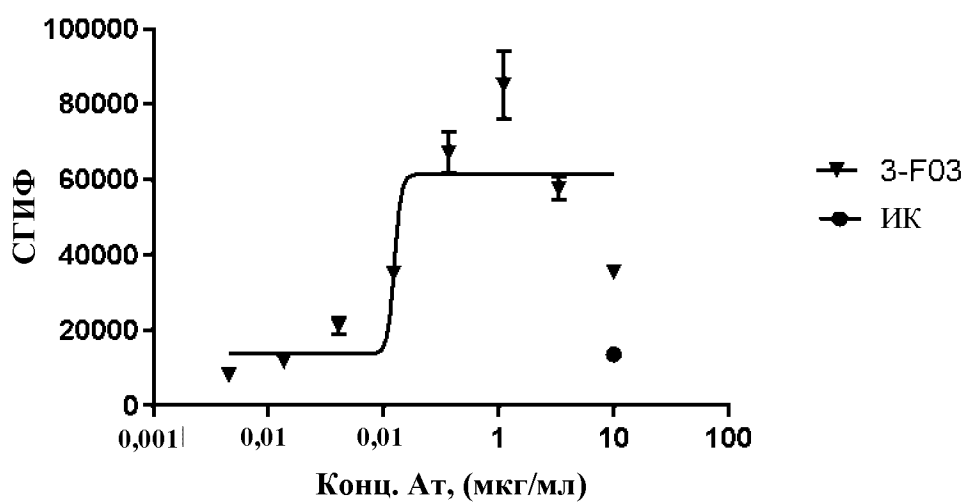
Фиг. 7А

Связывание клеток – клетки MDA-MB-231



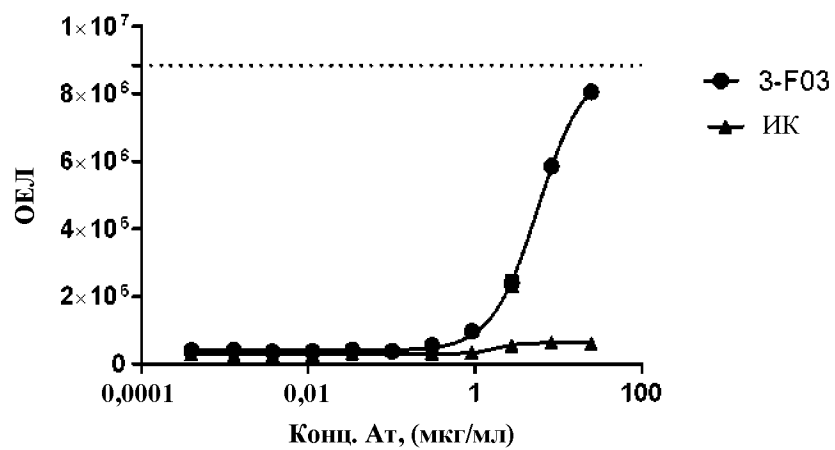
Фиг. 7В

Связывание клеток – клетки A375



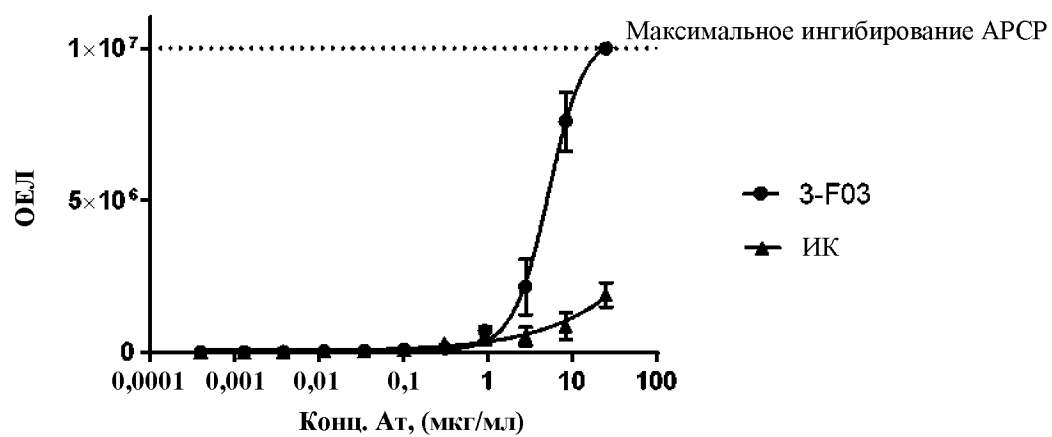
Фиг. 8А

Ингибирование клеточного CD73 – клетки A375



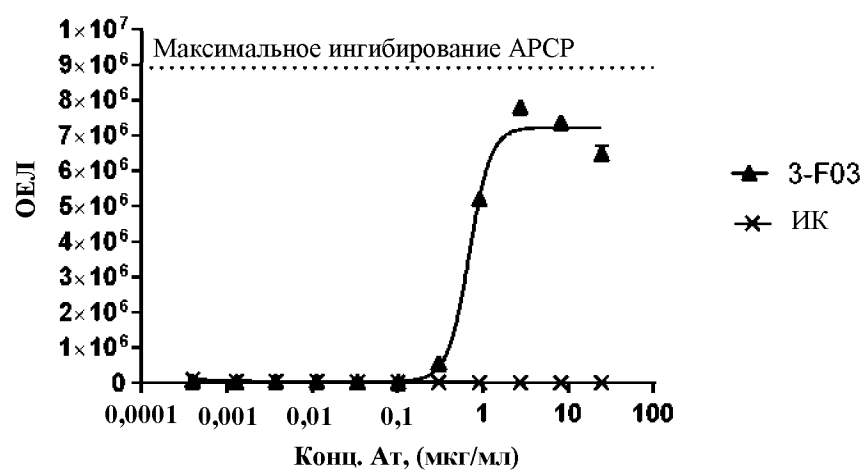
Фиг. 8В

Ингибирование клеточного CD73 – клетки MDA-MB-231

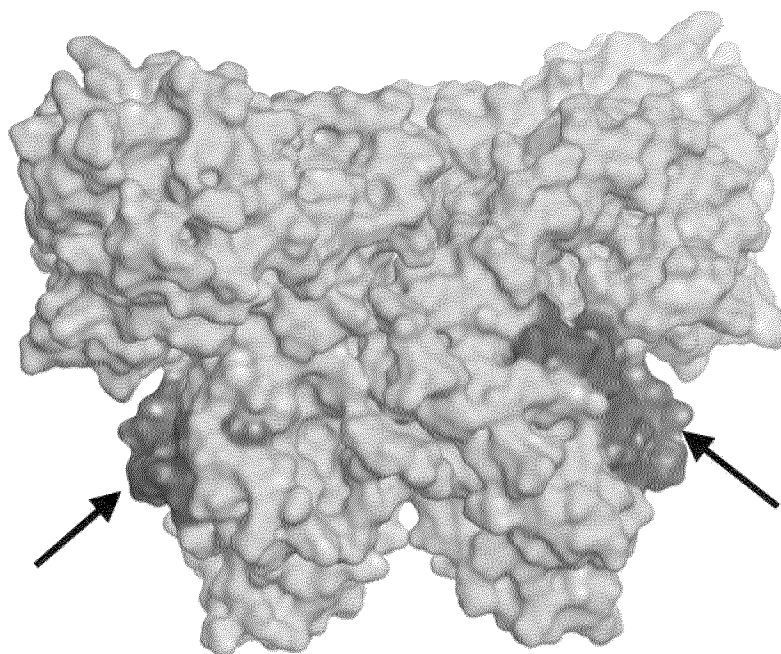


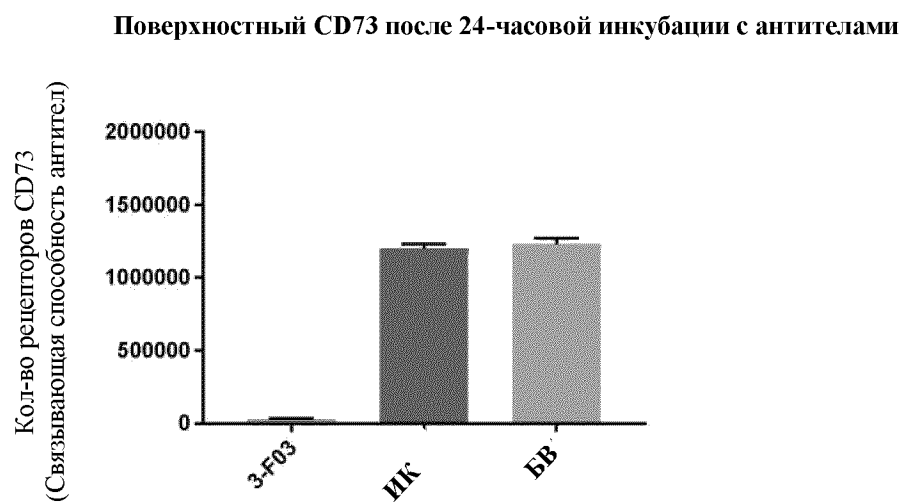
Фиг. 9

Ингибирование рекомбинантного CD73



Фиг. 10



Фиг. 11

Фиг. 12А**3-F03_VH_yeast**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LVTSS (SEQ ID NO:77)

3-F03_VL_yeast

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:65)

3-F03_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LVTSS (SEQ ID NO:60)

3-F03_VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:61)

3-F03_411_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LVTSS (SEQ ID NO:62)

3-F03_411_VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:61)

3-F03_413_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYEGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LVTSS (SEQ ID NO:63)

3-F03_413_LC

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:61)

Фиг. 12В**3-F03_396_VH**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LVTSS (SEQ ID NO:77)

3-F03_396_VL

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:65)

3-F03_408_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LVTSS (SEQ ID NO:77)

3-F03_408_VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:61)

3-F03_402_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGS
N KY YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LVTSS (SEQ ID NO:85)

3-F03_402_VL

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:65)

3-F03_384_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LVTSS (SEQ ID NO:77)

3-F03_384_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:64)

Фиг. 12С

3-F03_399_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:62)

3-F03_399_VL

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:65)

3-F03_414_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGS
N KYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:85)

3-F03_414_VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:61)

3-F03_390_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGS
N KYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:85)

3-F03_390_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:64)

3-F03_398_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYEGS
N KYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:86)

3-F03_398_VL

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGT
RLEIK (SEQ ID NO:65)

Фиг. 12D**3-F03_387_VH**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMN SLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGL
VTVSS (SEQ ID NO:62)

3-F03_387_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQG ISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ
ID NO:64)

3-F03_386_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYEGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGL
VTVSS (SEQ ID NO:86)

3-F03_386_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQG ISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ
ID NO:64)

3-F03_401_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYEGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMN SLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGL
VTVSS (SEQ ID NO:63)

3-F03_401_VL

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQG ISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ
ID NO:65)

3-F03_410_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYEGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGL
VTVSS (SEQ ID NO:86)

3-F03_410_VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQG ISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ
ID NO:61)

Фиг. 12E**3-F03_389_VH**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYEGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:63)

3-F03_389_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK
(SEQ ID NO:64)

3-F03_392_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYEG
SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:87)

3-F03_392_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK
(SEQ ID NO:64)

3-F03_404_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYEG
SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:87)

3-F03_404_VL

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK
(SEQ ID NO:65)

3-F03_419_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYEG
SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:88)

3-F03_419_VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK
(SEQ ID NO:61)

Фиг. 12F**3-F03_416_VH**

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYEGSN
KYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGLV
TVSS (SEQ ID NO:87)

3-F03_416_VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSG
VPSRFGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ
ID NO:61)

3-F03_407_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYEGSN
KYYADSVKGRFTISRDN SKNLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGLV
TVSS (SEQ ID NO:88)

3-F03_407_VL

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQS
GVPSRFGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ
ID NO:65)

3-F03_395_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYEGSN
KYYADSVKGRFTISRDN SKNLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGLV
TVSS (SEQ ID NO:88)

3-F03_395_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQS
GVPSRFGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ
ID NO:64)

3-F03_388_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYSGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGL
VTVSS (SEQ ID NO:69)

3-F03_388_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQS
GVPSRFGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ
ID NO:64)

Фиг. 12G**3-F03_397_VH**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYSGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LVTSS (SEQ ID NO:68)

3-F03_397_VL

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK
(SEQ ID NO:65)

3-F03_385_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYSGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LVTSS (SEQ ID NO:68)

3-F03_385_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK
(SEQ ID NO:64)

3-F03_400_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYSGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LVTSS (SEQ ID NO:69)

3-F03_400_VL

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK
(SEQ ID NO:65)

3-F03_409_VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYSGS
NKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
LVTSS (SEQ ID NO:69)

3-F03_409_VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK
(SEQ ID NO:61)

Фиг. 12H**3-F03_403_VH**

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYSGSN
KYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGLTV
TVSS (SEQ ID NO:32)

3-F03_403_VL

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ
ID NO:65)

3-F03_415_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYSGSN
KYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGLTV
TVSS (SEQ ID NO:32)

3-F03_415_VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ
ID NO:61)

3-F03_391_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYSGSN
KYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGLTV
TVSS (SEQ ID NO:32)

3-F03_391_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ
ID NO:64)

3-F03_406_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYSGSN
KYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGLTV
TVSS (SEQ ID NO:67)

3-F03_406_VL

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ
ID NO:65)

Фиг. 12I**3-F03_412_VH**

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYSGS
 NKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
 LTVSS (SEQ ID NO:69)

3-F03_412_VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
 TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK
 (SEQ ID NO:61)

3-F03_394_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYSG
 SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
 LTVSS (SEQ ID NO:67)

3-F03_394_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
 TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK
 (SEQ ID NO:64)

3-F03_418_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYSG
 SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
 LTVSS (SEQ ID NO:67)

3-F03_418_VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
 TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK
 (SEQ ID NO:61)

3_F03_417_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGS
 SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGT
 LTVSS (SEQ ID NO:60)

3_F03_417_VL

IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS
 TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK
 (SEQ ID NO:61)

Фиг. 12J**3_F03_393_VH**

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGSN
KYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLR AEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGLV
TVSS (SEQ ID NO:60)

3_F03_393_VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQG ISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ
ID NO:64)

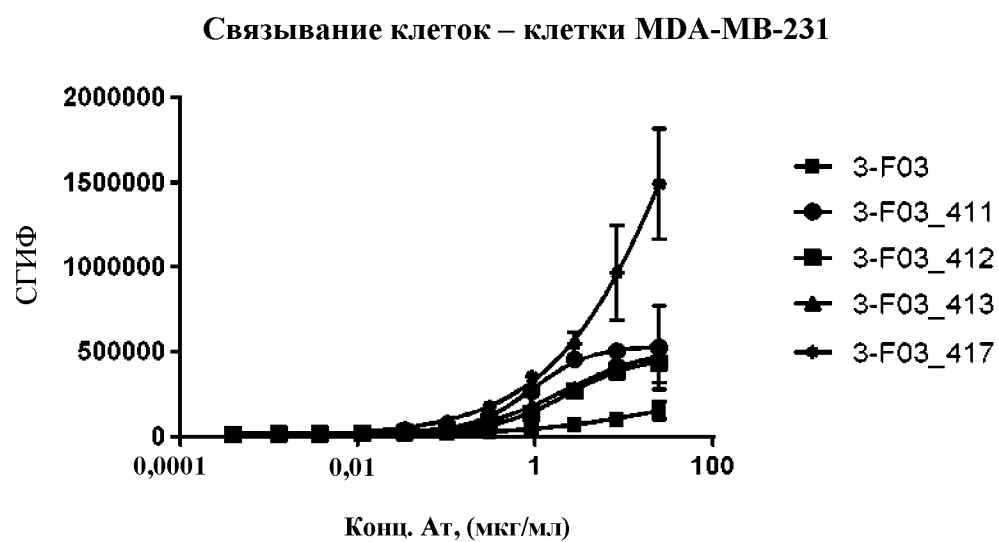
3_F03_405_VH

VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVMSYDGSN
KYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLR AEDTAVYYCATEIAAKGDYWGQGLV
TVSS (SEQ ID NO:60)

3_F03_405_VL

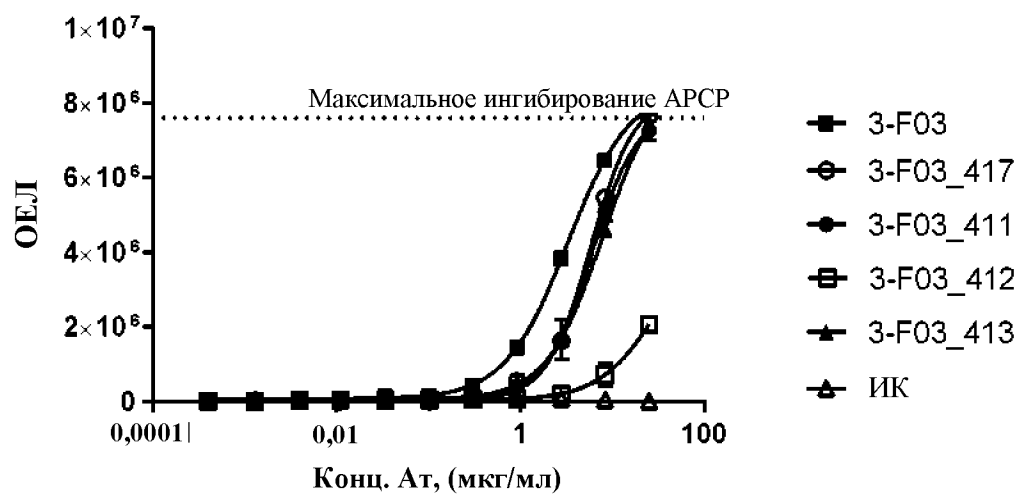
AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQG ISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTRLEIK (SEQ
ID NO:65)

Фиг. 13



Фиг. 14

Ингибирование клеточного CD73 – клетки MDA-MB-231



Фиг. 15**Тяжелая цепь IgG1 человека CH1-шарнир-CH2-CH3 с мутацией N297A**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO:73)

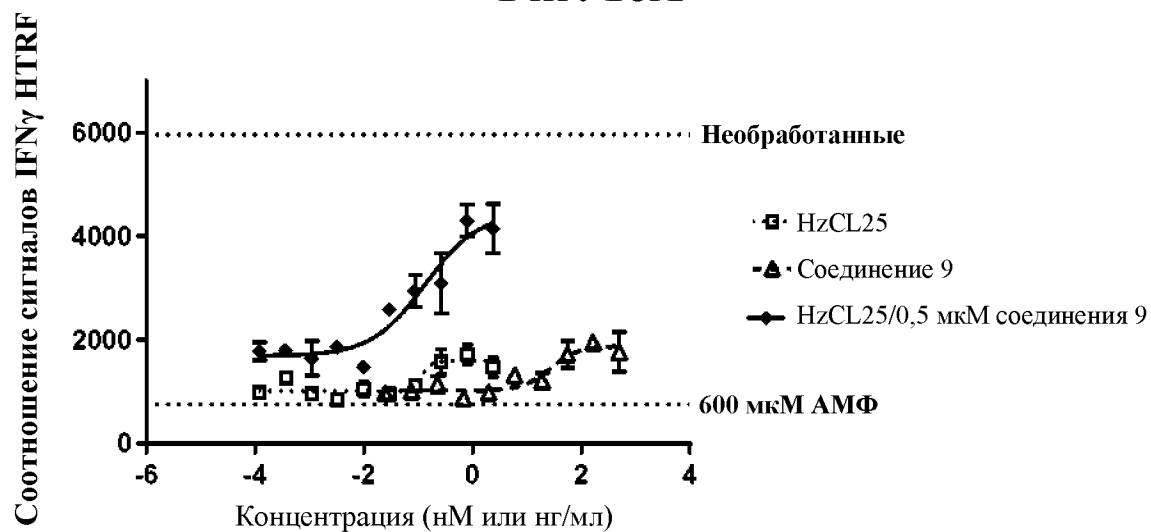
**Тяжелая цепь IgG1 человека CH1-шарнир-CH2-CH3 с мутацией N297A с
С-концевым лизином**

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
ID NO:75)

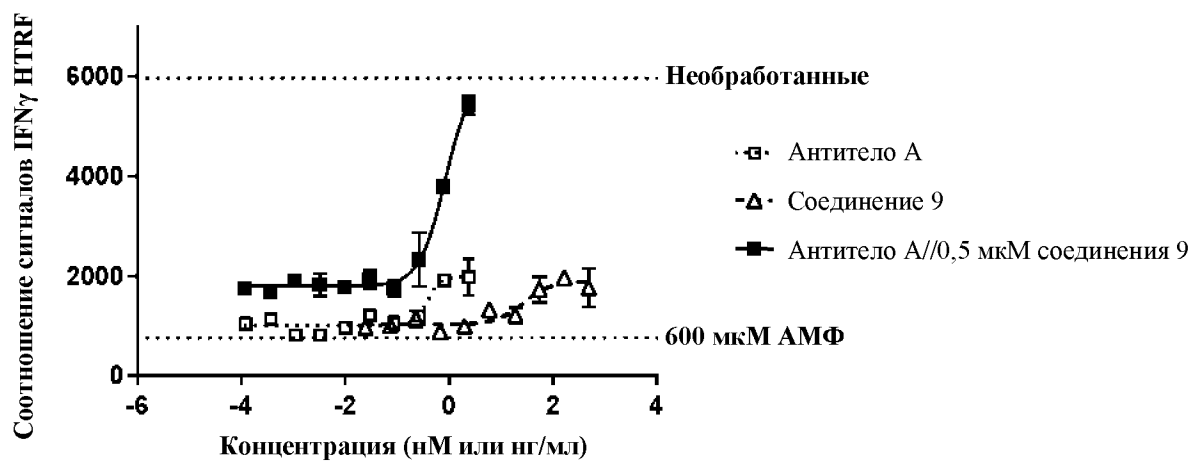
Константная область легкой каппа-цепи человека

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ
ID NO:74)

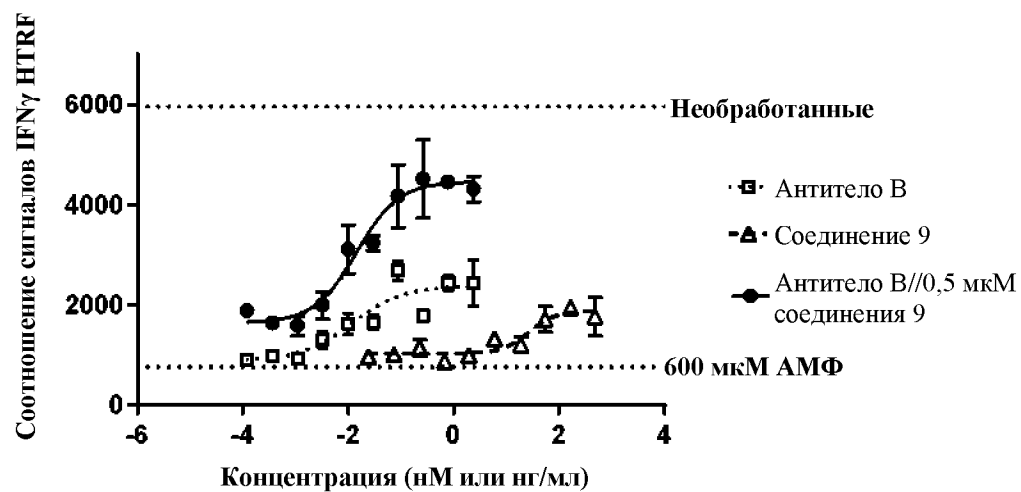
Фиг. 16А



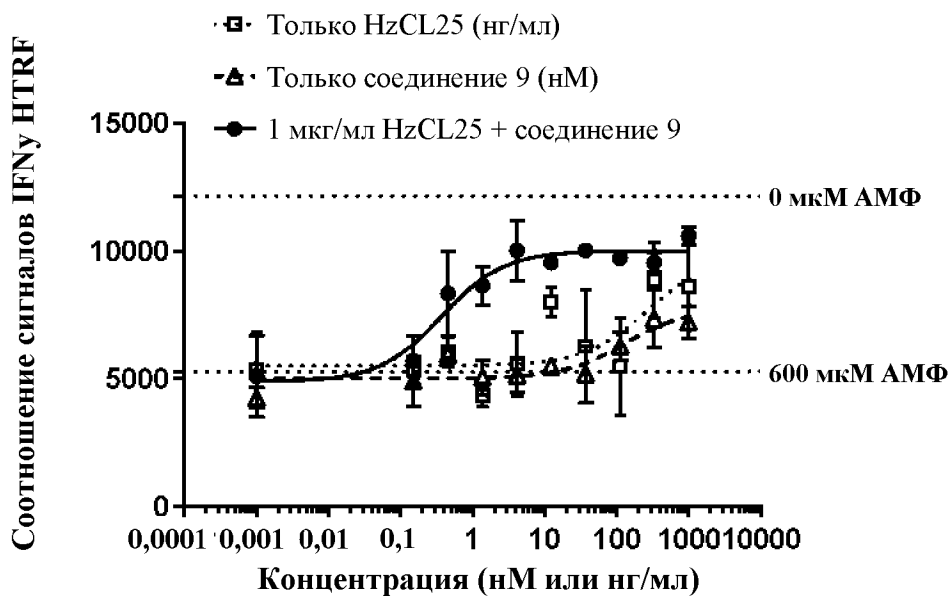
Фиг. 16В



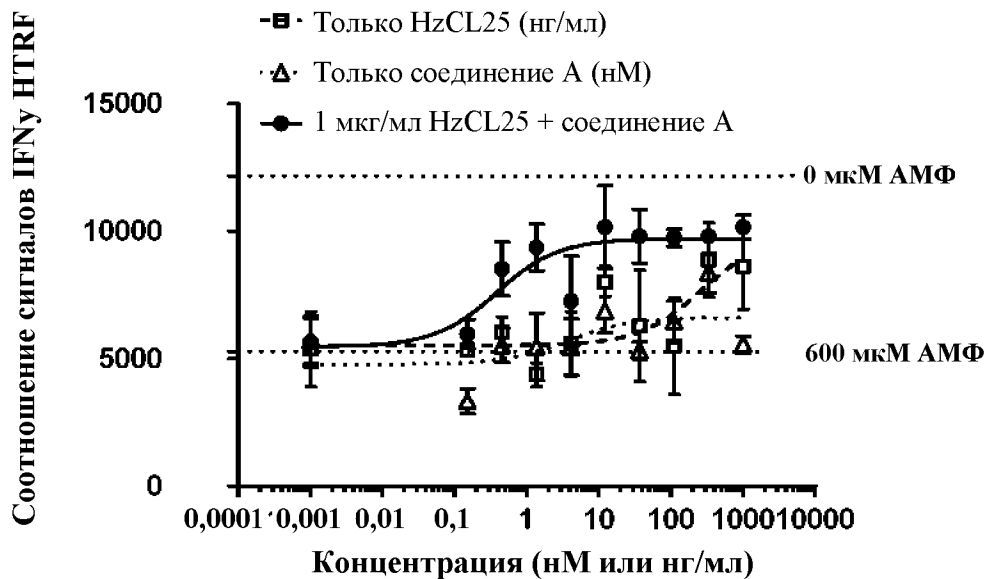
Фиг. 16С



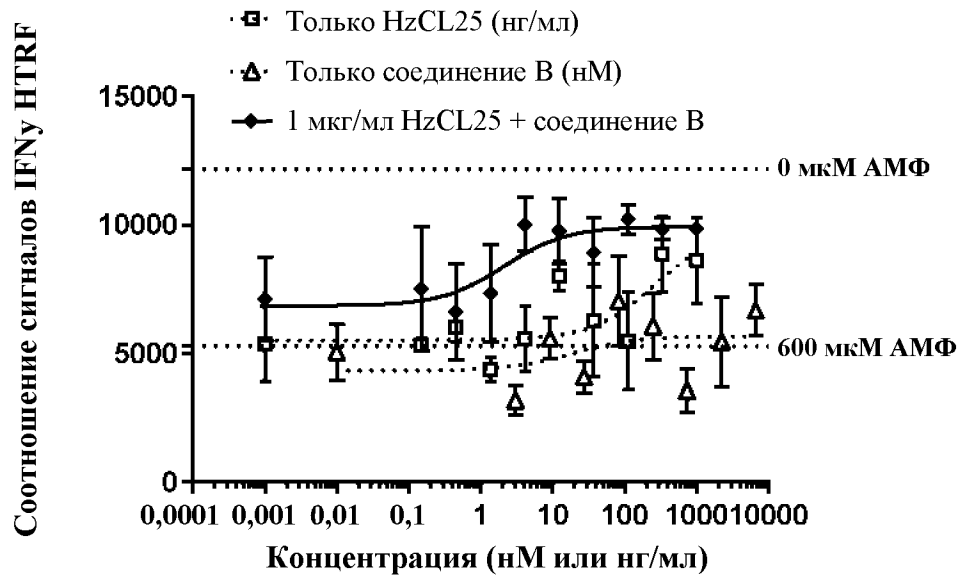
Фиг. 17А



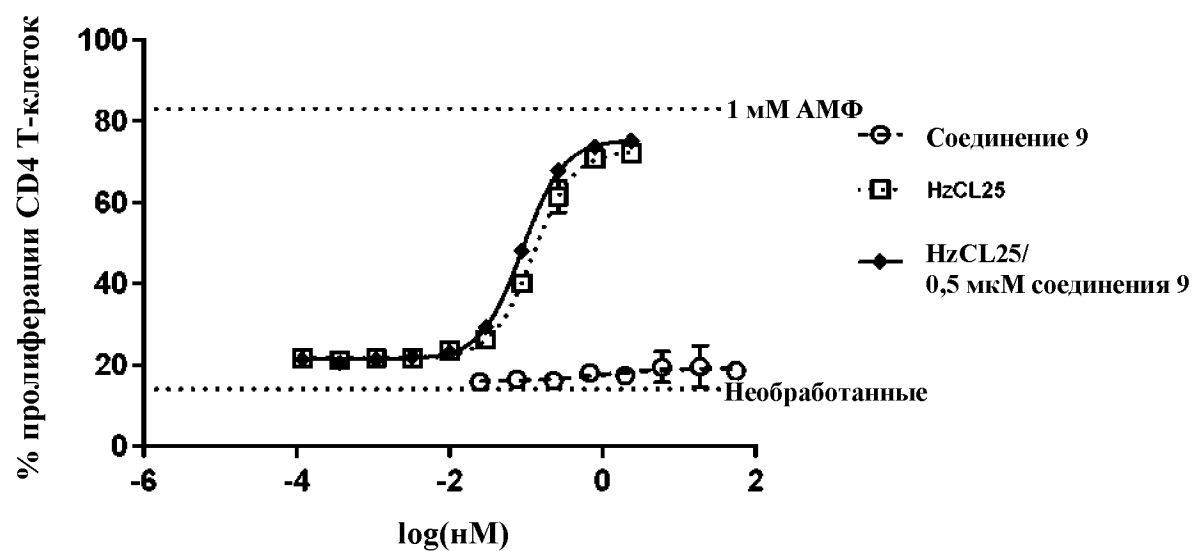
Фиг. 17В



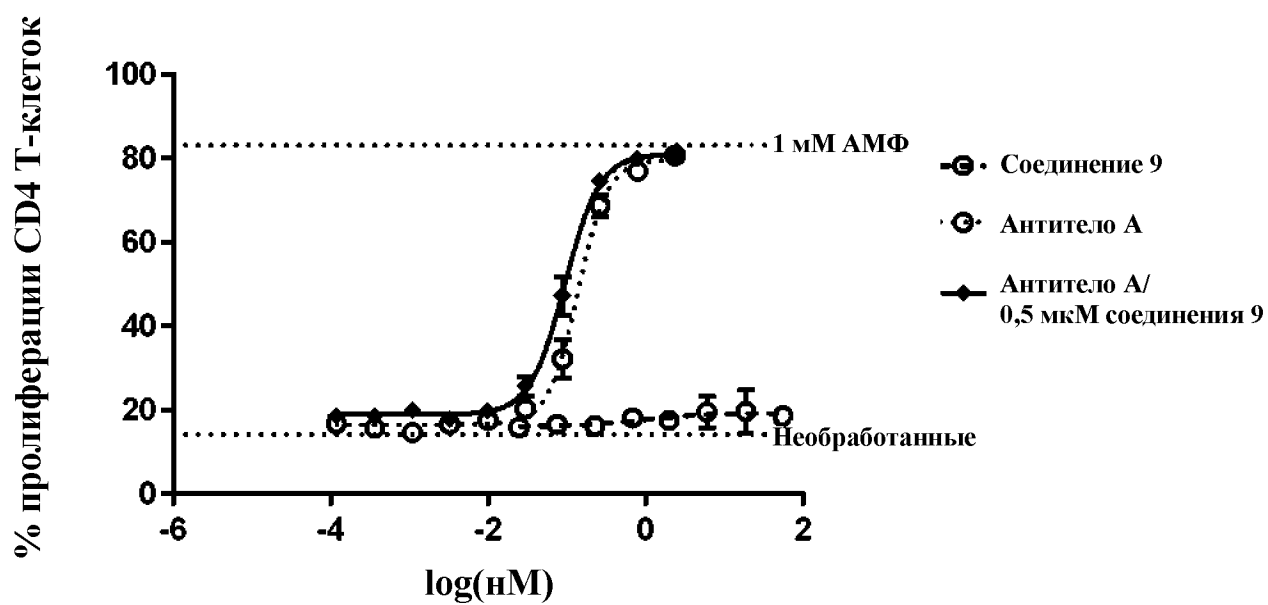
Фиг. 17С



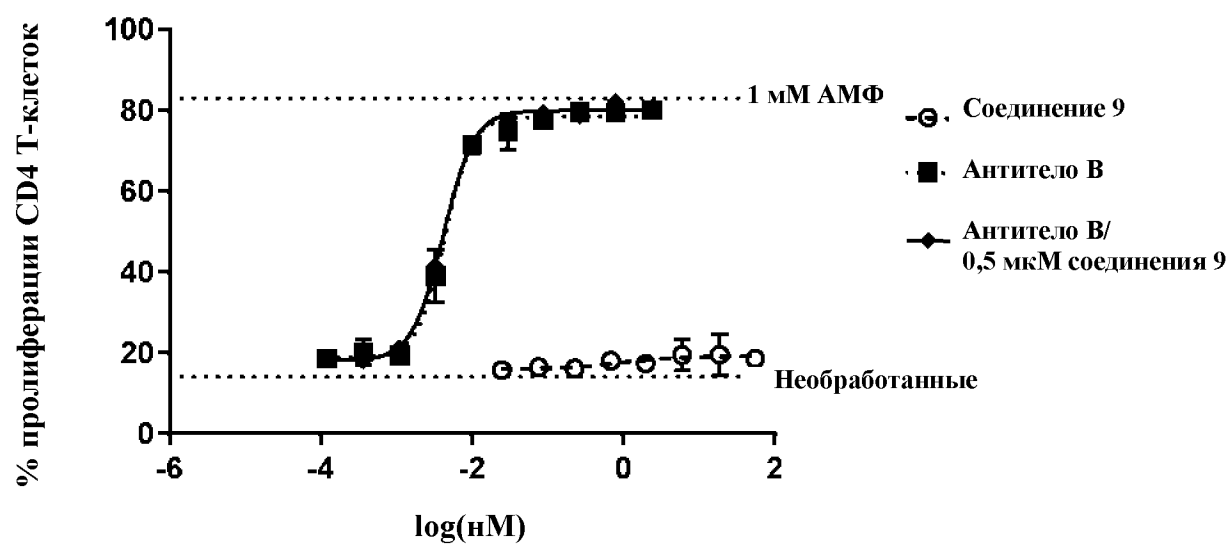
Фиг. 18А



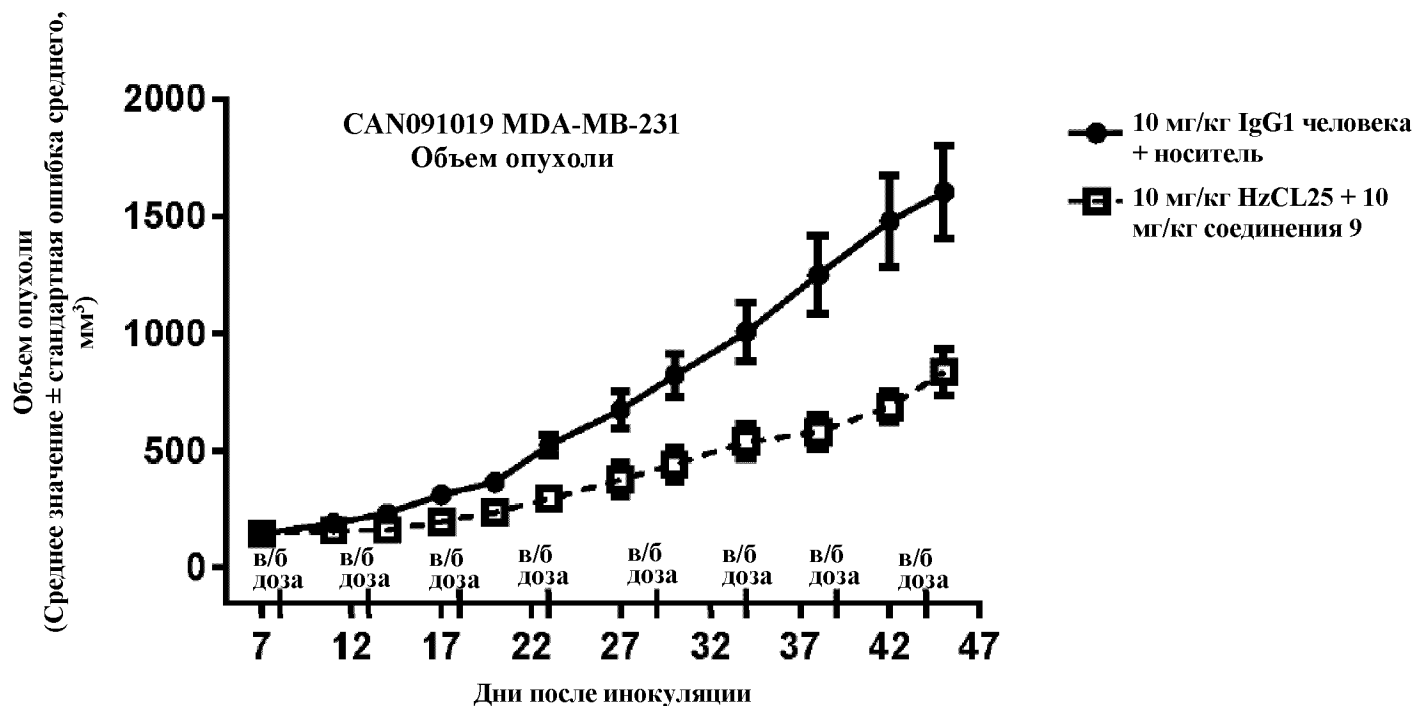
Фиг. 18В



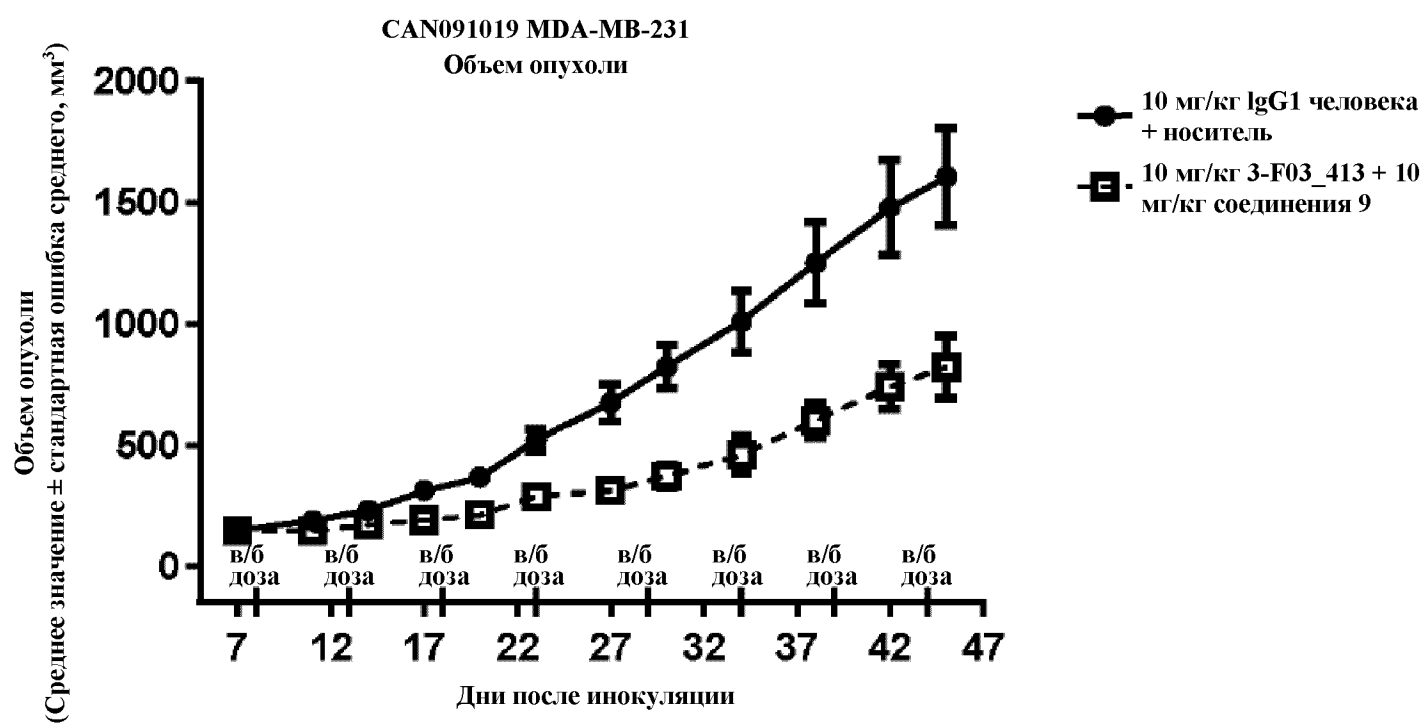
Фиг. 18С



Фиг. 19А



Фиг. 19В



Фиг. 20А**Последовательность ДНК тяжелой цепи HzCL25**

GAAGTGCAGCTCGTGCAGTCCGGAGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGAGAGTCCCTGAAGATC
 AGCTGCAAGGGTTCCGGCTATACATTACCTCCTACGGGCTCAGCTGGGTCAGACAGATG
 CCGGGAAAGGGTCTTGAGTGGATGGGAGAGATCTACCCGGGCTCCGGCAACACCTACTAC
 AACGAAAAGTTCAAGGGCCAGGTACCATTTCCGCCGACAAGTCAATCTCCACCGCTTAC
 CTCCAATGGTCGAGCCTGAAGGCATCGGATACCGCGATGTACTACTGCGCCCGCTACGAC
 TACCTGGGCTCGTCATACGGCTTCGATTACTGGGGGGCGGGAACCTACCGTGAAGTGTGTCC
 TCCGCCCTCCACTAAGGGACCCTCAGTGTTCCTTCCCGGAGCTCCAAGAGCACTTCG
 GCGGAACCGCTGCCCTGGGTTGCCTCGTGAAGGATTACTTCCCGAGCCTGTGACCGTG
 TCCTGGAACCTCCGGGGCCTTGACCAGCGGAGTCCACACCTTCCCGGCCGTGCTGCAATCA
 TCCGGTCTGTACAGTCTGTCTCCGTGGTCACGGTGCCCTCGTCTCACTGGGGACTCAG
 ACTTACATCTGTAACGTGAACCATAAGCCATCGAACACCAAAGTCGACAAACGGGTGGAA
 CCTAAGTCATGCGACAAGACCCACACGTGCCACCTTGCCCCGCCCCCGAGCTCCTGGGG
 GGGCCGAGCGTGTTCTTCTTCCCGCCGAAACCGAAGGACACCCTGATGATCTCGAGGACT
 CCTGAAGTCACTTGCGTGGTTCGTGGACGTGTGCGACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAAT
 TGGTACGTGGACGGAGTCAAGTGCACAACGCTAAGACCAAACCCCGCGAGGAGCAGTAC
 GCAAGCACCTACCGCGTTGTGACGCTGCTACCGTGTGTCATCAGGATTGGCTGAATGGA
 AAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCACCAATTGAAAAGACCATC
 TCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAGCCCCAAGTCTACACTCTGCCGCCGTGAGAGAA
 GAAATGACCAAGAACCAAGTGTCCCTGACTTGTCTGGTCAAGGGCTTCTATCCTTCGGAC
 ATCGCGGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCGGAGAACAATTACAAGACTACGCCACCC
 GTGCTGGACTCTGACGGCTCCTTTTTCTGTATTCCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCCGC
 TGGCAACAGGGAAACGTGTTCAAGCTGCTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCACTAC
 ACCCAGAAGTCCCTGAGCTTGTCCCCTGGT (SEQ ID NO:89)

Последовательность ДНК легкой цепи HzCL25

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCGGATTCACTCGCGGTGTCTTTGGGGGAGAGGGCAACC
 ATTAAGTCAAGGCCTCACAGGATGTGTCCACTGCTGTGCGCTGGTACCAGCAGAAGCCT
 GGGCAGCCGCCCAAGCTGCTGATCTACTCGGCCTCCTACCGCTATTCCGGAGTCCCCGAC
 CGGTTCTCCGGCTCGGGTTCCGGAACTGATTTACCCCTGACAATTTTCGTGCTGCAAGCC
 GAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCCAACAGCATTACAACACTCCTTACACTTTTGGTGGC
 GGAACATAAGCTCGAGATCAAGCGGACGGTGGCAGCTCCGTGAGTGTTCATCTTCCCTCCA
 TCGGACGAACAGCTGAAGTCCGGCACCGCGTCCGTGCTGTGTCTGTTGAACAACCTTCTAC
 CCGCGGGAAGCCAAGGTCCAGTGGAAAGTCGACAACGCGCTGCAGTCCGGAAATAGCCAG
 GAAAGCGTGACCGAACAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGAGCTCAACCTGACC
 CTGAGCAAGGCCGACTATGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAAGGC
 CTGAGCAGCCCAGTGACCAAGTCCTTCAACCGCGGGGAGTGT (SEQ ID NO:90)

Фиг. 20В**Последовательность ДНК тяжелой цепи 3-F03_411**

GAAGTGCAGTTGGTGGAGAGCGGGGGCGGACTGGTGCAGCCGGGGGGGCTCGCTGCG
GCTGTCCTGCGCCGCGTCCGGTTTCACTTTTTCGAGCTACGACATGCACTGGGTCC
GCCAAGCACCCGGGGAAGGGTCTGGAATGGGTGGCCGTGATGTCGTACGACGGCTCC
AACAAAGTACTACGCCGACTCCGTGAAGGGACGGTTCACCATCTCCCGCGACAACAG
CAAGAACGCCCTTTACCTCCAAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTAT
ACTACTGCGCGACCGAGATCGCCGCCAAGGGGGGACTACTGGGGTCAAGGCACTCTG
GTCACCGTGTCCTCCGCCTCCACTAAGGGACCCTCAGTGTTCCCCCTTGCCCCGAG
CTCCAAGAGCACTTCGGGCGGAACCGCTGCCCTGGGTTCGCTCGTGAAGGATTACT
TCCCCGAGCCTGTGACCGTGTCCTGGAACCTCCGGGGCCTTGACCAGCGGAGTCCAC
ACCTTCCCGGCCGTGCTGCAATCATCCGGTCTGTACAGTCTGTCTCCGTGGTCAC
GGTGCCCTCGTCCTCACTGGGGACTCAGACTTACATCTGTAACGTGAACCATAAGC
CATCGAACACCAAAGTCGACAAACGGGTGGAACCTAAGTCATGCGACAAGACCCAC
ACGTGCCCACCTTGCCCCGCCCCCGAGCTCCTGGGGGGGCGAGCGTGTTCTCTCT
CCCGCCGAAACCGAAGGACACCCTGATGATCTCGAGGACTCCTGAAGTCACTTGCG
TGGTCGTGGACGTGTCGCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAATTGGTACGTGGAC
GGAGTCGAAGTGACAACGCTAAGACCAAACCCCGCGAGGAGCAGTACGCAAGCAC
CTACCGCGTTGTCAGCGTGCTCACCGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAATGGAAAGG
AGTACAAGTGCAAAGTGTCACAACAAGGCCCTGCCTGCACCAATTGAAAAGACCATC
TCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAGCCCCAAGTCTACACTCTGCCGCCGTGCGAG
AGAAGAAATGACCAAGAACCAAGTGTCCTGACTTGTCTGGTCAAGGGCTTCTATC
CTTCGGACATCGCGGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCGGAGAACAATTACAAG
ACTACGCCACCCGTGCTGGACTCTGACGGCTCCTTTTTCTGTATTCCAAGCTCAC
CGTGGACAAGAGCCGCTGGCAACAGGGAAACGTGTTTCAGCTGCTCCGTGATGCACG
AAGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCTTGTCCCCTGGT (SEQ
ID NO:91)

Последовательности ДНК легкой цепи 3-F03_411 и 3-F03_413

ATCCAGATGACTCAGTCCCCTTCCTCGTTGTCCGCTTCCGTGGGTGATCGGGTCAC
AATCACTTGCCGGGCCAGCCAGGGAATTTCCAACCTACCTCGCCTGGTACCAGCAGA
AGCCCGGAAAGGCACCGAAGCTGCTGATCTACGCCGCGTCCACTCTGCAATCCGGA
GTGCCTTCTCGGTTCCTCGGGCTCGGGAAGCGGCACCGACTTTACCCTGACCATTAG
CAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCAACCTACTACTGTGAGCAGTCCTACTCAACCC
CTCACTTCGGACAGGGTACTAGACTCGAGATCAAGAGGACTGTGGCCGCGCCGTCG
GTGTTTCATCTTCCCACCCTCGGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCAGCGTGGT
CTGCCTGCTGAACAACCTTCTATCCGCGCGAAGCCAAGGTCCAGTGGAAAGTGGATA
ATGCGCTGCAGAGCGGGAACCTCCCAAGAGTCCGTGACGGAACAGGACTCCAAAGAC
TCCACCTACTCACTGTTCATCCACCCTGACCCTGTCAAAGGCCGACTACGAGAAGCA
TAAGGTCTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAAGGGCTGAGCTCGCCCGTGACCAAGT
CCTTCAACCGGGGCGAATGC (SEQ ID NO:92)

Последовательность ДНК тяжелой цепи 3-F03_413

GAAGTGCAGTTGGTGGAGAGCGGGGGCGGACTGGTGCAGCCGGGGGGCTCGCTGCG
GCTGTCTTGCGCCGCGTCCGGTTTCACTTTTTCGAGCTACGACATGCACTGGGTCC
GCCAAGCACCGGGGAAGGGTCTGGAATGGGTGGCCGTGATGTCGTACGAAGGCTCC
AACAAGTACTACGCCGACTCCGTGAAGGGACGGTTCACCATCTCCCGCGACAACAG
CAAGAACGCCCTTTACCTCCAAATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTAT
ACTACTGCGCGACCGAGATCGCCGCCAAGGGGGACTACTGGGGTCAAGGCACTCTG
GTCACCGTGTCTCTCCGCCTCCACTAAGGGACCCTCAGTGTTCCCCCTTGCCCCGAG
CTCCAAGAGCACTTCGGGCGGAACCGCTGCCCTGGGTTCCTCGTGAAGGATTACT
TCCCCGAGCCTGTGACCGTGTCTTGGAACCTCCGGGGCCTTGACCAGCGGAGTCCAC
ACCTTCCCGGCCGTGCTGCAATCATCCGGTCTGTACAGTCTGTCTCTCCGTGGTCAC
GGTGCCCTCGTCTCTCACTGGGGACTCAGACTTACATCTGTAACGTGAACCATAAGC
CATCGAACACCAAAGTCGACAAACGGGTGGAACCTAAGTCATGCGACAAGACCCAC
ACGTGCCACCTTGCCCCGCCCCCGAGCTCCTGGGGGGGCGAGCGTGTTCTCTTT
CCCGCCGAAACCGAAGGACACCCTGATGATCTCGAGGACTCCTGAAGTCACTTGCG
TGGTCTGTGGACGTGTGCGACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAATTGGTACGTGGAC
GGAGTCGAAGTGCACAACGCTAAGACCAACCCCGCGAGGAGCAGTACGCAAGCAC
CTACCGCGTTGTCAGCGTGCTCACCCTGCTGCATCAGGATTGGCTGAATGGAAAGG
AGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCACCAATTGAAAAGACCATC
TCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAGCCCCAAGTCTACACTCTGCCGCCGTGCGAG
AGAAGAAATGACCAAGAACCAAGTGTCCCTGACTTGTCTGGTCAAGGGCTTCTATC
CTTCGGACATCGCGGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCGGAGAACAATTACAAG
ACTACGCCACCCGTGCTGGACTCTGACGGCTCCTTTTTCTGTATTCCAAGCTCAC
CGTGGACAAGAGCCGCTGGCAACAGGGAAACGTGTTTCAGCTGCTCCGTGATGCACG
AAGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCTTGTCCCCTGGT (SEQ
ID NO:93)