

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045378**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.21

(21) Номер заявки
202090551

(22) Дата подачи заявки
2018.11.15

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
A61K 31/282 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) УСИЛЕНИЕ ЭФФЕКТА ОТ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТА (АТФ)

(31) 62/586,224; 62/686,149; 62/733,175

(32) 2017.11.15; 2018.06.18; 2018.09.19

(33) US

(43) 2021.02.01

(86) PCT/EP2018/081364

(87) WO 2019/096900 2019.05.23

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

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

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A1-2018167267

WO-A1-2017089334

WO-A1-2016073845

WO-A1-2017157948

MICHAUD MICKAEL ET AL.: "Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice", SCIENCE (NEW YORK, N.Y.), 16 DEC 2011, vol. 334, no. 6062, 16 December 2011 (2011-12-16), pages 1573-1577, XP002788131, ISSN: 1095-9203, the whole document, page 1576, right-hand column - page 1577, left-hand column, line 3 & MICHAUD MICKAEL ET AL.: "Supporting Online Material for Autophagy-Dependent Anticancer Immune Responses Induced by Chemotherapeutic Agents in Mice", Science Magazine (online), 16 December 2011 (2011-12-16), Retrieved from the Internet: URL: <http://science.sciencemag.org/content/sci/suppl/2011/12/14/334.6062.1573.DC1/Michaud.SOM.pdf> [retrieved on 2019-01-18]

BONNEFOY NATHALIE ET AL.: "CD39: A complementary target to immune checkpoints to counteract tumor-mediated immunosuppression", ONCOIMMUNOLOGY MAY 2015, vol. 4, no. 5, May 2015 (2015-05), page e1003015, XP002788132, ISSN: 2162-4011, the whole document

BASTID JEREMY ET AL.: "Inhibition of CD39 enzymatic function at the surface of tumor cells alleviates their immunosuppressive activity", CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH, MAR 2015, vol. 3, no. 3, March 2015 (2015-03), pages 254-265, XP002788133, ISSN: 2326-6074, the whole document, page 258, page 259, right-hand column

(57) Изобретение относится к способам применения соединений, которые ингибируют ферментативную активность растворимого CD39 человека, при лечении рака для усиления активности агента или терапии, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток и/или гибель опухолевых клеток.

B1**045378****045378****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Заявка на данное изобретение испрашивает приоритет по предварительным заявкам США № 62/586,224, поданной 15 ноября 2017 г, 62/686,149, поданной 18 июня 2018 г, и 62/733,175, поданной 19 сентября 2018 г; все из которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылки, включая любые чертежи.

Ссылка на перечень последовательностей

Заявка на данное изобретение подана вместе с перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей представлен в виде файла с названием "CD39-8_ST25", созданного 14 ноября 2018 г, размер которого составляет 64 КБ. Информация, представленная в электронном виде в перечне последовательностей, полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к применению агентов, нейтрализующих CD39, для лечения рака.

Уровень техники

NTPDase 1 (эктонуклеозид трифосфат дифосфогидролаза 1), также известная как CD39/ENTPD1 или CD39 сосудов, функционирует совместно с другим ферментом CD73 (экто-5'-нуклеотидаза) для гидролиза внеклеточного аденозинтрифосфата (АТФ) и аденозиндифосфата (АДФ) с образованием аденозина, который связывается с аденозиновыми рецепторами и ингибирует ответы Т-клеток и естественных клеток-киллеров (NK-клеток), тем самым подавляя иммунную систему. Генерация аденозина в пути CD73/CD39 признана основным механизмом регуляторной иммуносупрессивной функции Т-клеток (регуляторных Т-клеток, Treg). CD39 имеет два трансмембранных домена вблизи N- и C-концевых областей, короткие цитоплазматические N- и C-концевые участки и большой внеклеточный домен, содержащий активный сайт. Однако, хотя CD39 обычно заякорен в мембране двумя трансмембранными доменами на двух концах молекулы, недавно стало также известно, что растворимую каталитически активную форму CD39 можно обнаружить в циркуляции у человека и мыши (Yegutkin et al., (2012), FASEB J. 26(9):3875-3883).

Было показано, что лучевая терапия и некоторые химиотерапевтические агенты вызывают специфический иммунный ответ, приводящий к иммуногенной гибели раковых клеток (Martins et al. 2009, Cell Cycle, 8(22):3723-3728). Противоопухолевый иммунный ответ, вызванный такими способами терапии, зависит от способности дендритных клеток (ДК) презентировать антиген из умирающих раковых клеток и примировать опухолеспецифичные цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ). Для обеспечения ЦТЛ-ответа ДК должны поглотить антигены из стрессированных или умирающих клеток, приобрести способность процессировать антигены на стадии их созревания и презентировать антигенные пептиды, связанные с молекулами МНС (major histocompatibility complex) в контексте ко-стимулирующих сигналов и цитокинов, которые стимулируют дифференцировку/активацию специфических ЦТЛ.

Тем не менее остается необходимость в повышении эффективности современных методов лечения, предназначенных для уничтожения раковых клеток, включая лучевую терапию и химиотерапевтические агенты.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение берет свое начало, *inter alia*, из обнаружения того, что антитела, которые нейтрализуют АТФазную активность белка CD39 в присутствии значимых концентраций АТФ, способны обратить иммуносупрессивный эффект CD39 в дендритных клетках (ДК) в присутствии экзогенно добавленного АТФ. Кроме того, антитела способны индуцировать или увеличивать пролиферацию Т-клеток, совместно культивируемых с ДК. Способность снижать CD39-опосредованное ингибирование активации ДК дает преимущества в применении антител в сочетании с агентами или способами лечения, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, в частности, агентами или способами лечения, которые вызывают иммуногенную гибель раковых клеток, например агентами или способами лечения, которые вызывают гибель опухолевых клеток (*inter alia*, химиотерапевтические агенты, лучевая терапия). Хотя высвобождение АТФ потенциально может быть иммуногенным и способствовать активации ДК, АТФ также может быть подвержен катаболизму за счет CD39, что, в свою очередь, подавляет иммуногенный эффект от внеклеточного АТФ. Кроме того, во время химиотерапии повышение уровня АТФ связано с повышенной экспрессией CD39 на поверхности ДК. В обогащенной АТФ микро-среде опухоли инфильтрирующие ДК могут способствовать распаду АТФ путем модулирования экспрессии CD39, что, в свою очередь, снижает уровень иммуногенной смертности опухолевых клеток, вызванной химиотерапией. Таким образом, применение в сочетании с анти-CD39 антителами позволяет усилить иммуногенный эффект агентов или способов лечения, которые вызывают гибель (например, апоптоз или некроз) опухолевых клеток.

Соответственно, в одном аспекте настоящего изобретения предложены улучшенные способы усиления противоопухолевого иммунного ответа посредством применения антител, которые связываются с CD39 и нейтрализуют CD39 в присутствии АТФ, в сочетании с агентом или терапией, которые вызывают гибель опухолевых клеток, например агент или терапия, которые способны вызывать внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, агент или терапия, которые вызывают иммуногенную гибель

раковых клеток. В одном аспекте настоящего изобретения предложены улучшенные способы усиления противоопухолевого иммунного ответа посредством применения антител, которые способны связываться с CD39 и нейтрализовать CD39 в присутствии АТФ, в сочетании со средством, вызывающим гибель опухолевых клеток, например средством, вызывающим апоптоз и/или внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток. В одном варианте реализации настоящего изобретения агент или терапия (или средство), которые способны вызвать внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, включают антрациклин, оксалиплатин, цисплатин, рентгеновские лучи, ингибитор ПАРП (поли(АДФ-рибоза)полимеразы), таксан, антрациклин, ДНК-повреждающий агент, камптотецин, эпотилон, митомицин, комбретастатин, алкалоид барвинка, азотистый иприт, майтанзиноид, калихеамицин, дуокармицин, тубулизин, доластатин, ауристатин, энедин, аматоксин, пирролбензодиазепин, этиленимин, радиоактивный изотоп, терапевтический белок или пептидный токсин, или антитело, которое связывает антиген, экспрессируемый опухолевой клеткой, и которое опосредует антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ). В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело, которое способно связываться с CD39 и нейтрализовать CD39, способно нейтрализовать активность как растворимого белка внеклеточного домена CD39 (sCD39), так и мембранно-связанного белка CD39 (memCD39). Как показано в данном документе, антитела, которые способны обратить иммуносупрессивный эффект CD39 в дендритных клетках (ДК) в присутствии экзогенно добавленного АТФ, также характеризуются способностью нейтрализовать активность как растворимого белка внеклеточного домена CD39 (sCD39), так и мембранно-связанного белка CD39 (memCD39). Примечательно, что антитело BY40, которое не способно обратить иммуносупрессивный эффект CD39 в дендритных клетках (ДК) в присутствии экзогенно добавленного АТФ, также не способно нейтрализовать АТФазную активность растворимого белка внеклеточного домена CD39 (sCD39) и оказывает более низкий максимальный ингибирующий эффект на АТФазную активность мембранно-связанного белка CD39 (memCD39).

Не желая быть связанными какой-либо теорией, авторы настоящего изобретения полагают, что антитела, которые нейтрализуют мембранно-связанный CD39 на поверхности клетки, действуют путем ингибирования движения доменов мембранно-связанного CD39 (memCD39), однако, не оказывают такой эффект на активность растворимого белка CD39 (sCD39). Сообщается, что memCD39 встречается в виде гомомультимеров (например, тетрамеров и/или других мультимеров, помимо мономерных форм), тогда как sCD39 является мономером, а также что трансмембранные домены в memCD39 динамически движутся, что лежит в основе их функциональной связи с активным сайтом (Schulte am Esch et al. 1999, Biochem. 38(8):2248-58). Антитела, которые блокируют только memCD39, могут распознавать CD39 за пределами активного сайта фермента и предотвращать мультимеризацию, не блокируя мономерную форму CD39. Блокирование мультимеризации может снизить активность фермента, и, как сообщалось, мультимеризация CD39 существенно повышает АТФазную активность. И наоборот, антитела, которые также блокируют sCD39, могут мешать субстрату CD39 и ингибировать мономерную форму фермента. Такие антитела могут также предотвращать мультимеризацию memCD39, обеспечивая тем самым второй механизм ингибирования ферментативной активности CD39. В присутствии АТФ (например, как в среде опухоли) частичное ингибирование CD39 путем предотвращения мультимеризации без блокирования sCD39 может привести к наличию остаточного АМФ в количестве, достаточном для предотвращения обнаруживаемого аддитивного эффекта на активацию ДК. Следовательно, антитела, которые связывают и ингибируют АТФазную активность мономерного и/или растворимого CD39 (например, мономерного sCD39), можно выгодно применить для достижения большей нейтрализации активности CD39 у индивидуума путем нейтрализации как мембранно-связанного, так и растворимого белка CD39 (внеклеточного домена белка в растворе).

В одном аспекте настоящего изобретения предложен агент, который связывает CD39 и ингибирует ферментативную (АТФазную активность) активность белка CD39 человека для применения в лечении рака, где агент, который связывается с CD39, вводят в сочетании с агентом, который вызывает внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, необязательно агентом, вызывающим гибель опухолевых клеток, необязательно индуцируя апоптоз и/или некроз. В другом аспекте настоящего изобретения предложен агент, который вызывает внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, необязательно агент, который вызывает гибель опухолевых клеток, необязательно индуцируя апоптоз и/или некроз, для применения в лечении рака, где агент, который вызывает внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, вводят в сочетании с агентом, который связывается с CD39 и ингибирует ферментативную (АТФазную активность) активность белка CD39 человека.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложен способ лечения или профилактики рака у индивидуума, причем указанный способ включает введение индивидууму (а) агента, который связывается с белком CD39 и ингибирует АТФазную активность белка CD39, и (b) агента, который способен вызывать внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложен способ усиления противоопухолевого эффекта антитела, которое способно связываться с CD39 и ингибировать АТФазную активность CD39 в присутствии экзогенно добавленного АТФ, причем указанный способ включает введение такого агента или терапии, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток и/или

гибель опухолевых клеток.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложен способ лечения рака у индивидуума, имеющего слабый иммунный ответ или которому поставили диагноз слабого иммунного ответа на лечение агентом или лечение, которое вызывает внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток и/или гибель опухолевых клеток (в отсутствие комбинированного лечения анти-CD39 антителом), при этом данный способ включает введение индивидууму антитела, которое способно связываться с CD39 и ингибировать АТФазную активность CD39 в присутствии экзогенно добавленного АТФ.

В одном варианте реализации настоящего изобретения агент, который способен вызывать внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, непосредственно вызывает апоптоз опухолевых клеток. В одном варианте реализации настоящего изобретения агент, который способен вызывать внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, непосредственно вызывает некроз опухолевых клеток. В одном варианте реализации настоящего изобретения агент включает цитотоксический агент, который непосредственно вызывает гибель опухолевых клеток, необязательно химиотерапевтический агент, применяемый в лечении рака. В одном варианте реализации настоящего изобретения агент содержит истощающее антитело. В одном варианте реализации настоящего изобретения агент содержит иммуноконъюгат, содержащий антитело, которое специфически связывается с белком, экспрессируемым опухолевой клеткой, и цитотоксическое средство. В одном варианте реализации настоящего изобретения агент включает антитело, которое специфически связывается с белком, экспрессируемым опухолевой клеткой, и которое не конъюгировано с цитотоксическим средством (например, "голое" антитело). Необязательно антитело способно непосредственно вызывать апоптоз опухолевых клеток.

В одном варианте реализации настоящего изобретения агент, который связывается с CD39 и ингибирует АТФазную активность белка CD39 человека, способен нейтрализовать АТФазную активность CD39 в присутствии экзогенно добавленного АТФ.

В одном варианте реализации настоящего изобретения агент, который связывается с CD39 и ингибирует АТФазную активность белка CD39 человека, способен нейтрализовать АТФазную активность растворимого белка внеклеточного домена CD39 человека. Необязательно, агент способен нейтрализовать АТФазную активность растворимого белка внеклеточного домена CD39 человека в присутствии экзогенно добавленного АТФ, где, необязательно, АТФ добавлен в концентрации 20 мкМ. Анализы могут быть, например, такими, как показано в приведенных в настоящем документе примерах, например анти-CD39 антитело инкубируют в планшетах с растворимым рекомбинантным белком CD39 человека в течение 1 ч при 37°C, перед тем, как добавить реагент CTG (CellTiter Glo) в планшеты добавляют 20 мкМ АТФ в течение 30 дополнительных минут при 37°C, количество испускаемого света определяют количественно с помощью люминометра Enspire™ после короткого инкубационного периода в 5 мин в темноте.

Необязательно, антитело способно вызывать снижение АТФазной активности белка внеклеточного домена CD39 человека в растворе более чем на 50%, необязательно более чем на 60, 70, 75 или 80%.

В одном варианте реализации настоящего изобретения агент, который связывается с CD39, будет обеспечивать снижение АТФазной активности растворимого белка CD39 человека по меньшей мере на 50, 60, 70, 75, 80 или 90% (например, при оценке описанными в настоящем документе способами), необязательно дополнительно в концентрации, совместимой с введением антитела человеку.

В одном варианте реализации настоящего изобретения агент, который связывается с CD39 и ингибирует АТФазную активность белка CD39 человека, способен повышать экспрессию маркера активации на клеточной поверхности в происходящих из моноцитов дендритных клетках (moDC), когда такие moDC инкубируют *in vitro* с антителом и АТФ, где концентрация экзогенно добавленного АТФ необязательно составляет 0,125, 0,25 или 0,5 мМ.

В одном варианте реализации настоящего изобретения агент, который связывается с CD39 и ингибирует АТФазную активность белка CD39 человека, способен связываться и нейтрализовать АТФазную активность белка CD39 человека на поверхности клетки. В одном варианте реализации настоящего изобретения агент способен усиливать активацию дендритных клеток в присутствии АТФ. В одном варианте реализации настоящего изобретения агент способен повышать экспрессию маркера активации на клеточной поверхности в происходящих из моноцитов дендритных клетках, когда такие moDC инкубируют *in vitro* с антителом и АТФ. Необязательно, АТФ представляет собой АТФ, экзогенно добавляемый в концентрации 0,125, 0,25 или 0,5 мМ. Необязательно, увеличение экспрессии маркера активации на клеточной поверхности оценивают путем инкубации moDC в присутствии АТФ в течение 24 ч и анализа экспрессии на клеточной поверхности CD80, CD83 и/или HLA-DR на поверхности moDC методом проточной цитометрии. Необязательно, увеличение экспрессии маркера на клеточной поверхности составляет по меньшей мере 40, 50, 75 или 80% по сравнению с отрицательным контролем (например, средой).

В одном аспекте любого варианта реализации настоящего изобретения агент, который ингибирует или нейтрализует АТФазную активность белка CD39, представляет собой или содержит антитело или фрагмент антитела, связывающие белок CD39 (например, моноспецифическое антитело, биспецифическое или мультиспецифическое антитело).

Комбинированное применение агентов будет полезно для стимулирования адаптивного иммунного ответа против опухоли путем увеличения количества доступного АТФ в микроокружении опухоли. Сле-

довательно, эти антитела будут полезны для реверсирования иммуносупрессивного эффекта CD39 на активность дендритных и/или Т-клеток. В одном варианте реализации настоящего изобретения описанные способы применяют для повышения или усиления противоопухолевого иммунитета, снижения иммуносупрессии, усиления адаптивного противоопухолевого иммунного ответа или активации и/или усиления активности ДК, Т-клеток, инфильтрирующих опухоль и/или опухолеспецифических Т-клеток у индивидуума.

В одном аспекте любого варианта реализации настоящего изобретения белок sCD39 может быть охарактеризован как лишенный двух трансмембранных доменов (т.е. трансмембранных доменов вблизи N- и C-концевых областей), обнаруженных в мембранно-связанном CD39. В одном варианте реализации настоящего изобретения sCD39 представляет собой немембранно-связанный белок sCD39, обнаруживаемый в кровотоке, например, у человека. В одном варианте реализации настоящего изобретения sCD39 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 (необязательно дополнительно содержащей C-концевой маркер (метку) или другую аминокислотную последовательность, полученную не из CD39), например, белка sCD39, полученного в примерах, приведенных в данном описании. В одном варианте реализации настоящего изобретения белок, антитело или фрагмент антитела ингибируют или нейтрализуют АТФазную активность SCD39 при инкубации с sCD39 в растворе, например, в соответствии со способами, раскрытыми в данном документе. В одном варианте реализации настоящего изобретения белок, антитело или фрагмент антитела специфически связываются с белком CD39 человека как в растворимой (белок внеклеточного домена), так и в мембранно-связанной форме.

В одном аспекте любого варианта реализации настоящего изобретения индивидуум может быть определен как человек.

В одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело вводят в терапевтически эффективном количестве.

В одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело вводят индивидууму, имеющему рак, в количестве и с частотой, достаточными для нейтрализации активности CD39 (sCD39 и/или memCD39) на периферии и/или внутри микросреды опухоли. В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело вводят в количестве и с частотой, достаточными для уменьшения катаболизма АТФ в микросреде опухоли. Необязательно, антитело вводят в количестве и с частотой, достаточными для обеспечения постоянного ингибирования активности CD39 (sCD39 и/или memCD39) на периферии и/или внутри микросреды опухоли и/или непрерывного уменьшения катаболизма АТФ в микросреде опухоли в течение периода времени между двумя последовательными введениями агента, способного вызвать внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток.

В одном варианте реализации настоящего изобретения агент, способный вызывать внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, вводят в терапевтически эффективном количестве. В одном варианте реализации настоящего изобретения агент, способный индуцировать внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, вводят индивидууму, имеющему рак, в количестве и с частотой, достаточными для того, чтобы вызвать гибель, апоптоз и/или некроз опухолевых клеток. В одном варианте реализации настоящего изобретения агент, способный вызывать внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, вводят индивидууму, имеющему рак, в количестве и с частотой, достаточными для индуцирования внеклеточного высвобождения АТФ в микросреде опухоли.

В одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело и агент, способный вызывать внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, вводят каждый по меньшей мере в течение одного цикла применения, причем цикл применения включает по меньшей мере первый и второй (и, необязательно, 3-, 4-, 5-, 6-, 7- и/или 8-й или более) раз введения анти-CD39 антитела и агента, способного вызывать внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток.

В одном варианте реализации настоящего изобретения рак представляет собой лейкоз, глиому, или глиобластому, или рак мочевого пузыря, молочной железы, толстой кишки, пищевода, почек, печени, легких, яичников, матки, предстательной железы, поджелудочной железы, желудка, шейки матки, щитовидной железы, головы и шеи (плоскоклеточный рак головы и шеи), а также кожи (например, меланомы). В одном варианте реализации настоящего изобретения рак представляет собой прогрессирующую и/или рефрактерную солидную опухоль. В одном варианте реализации настоящего изобретения рак представляет собой прогрессирующую и/или рефрактерную солидную опухоль. В одном ограничивающем варианте реализации настоящего изобретения рак (например, прогрессирующая рефрактерная солидная опухоль) выбран из группы, состоящей из немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), рака почек, аденокарциномы поджелудочной железы или пищевода, рака молочной железы, почечно-клеточного рака (ПКР), меланомы, колоректального рака и рака яичников (и, необязательно, еще одного типа рака, описанного в данном документе).

В некоторых необязательных аспектах настоящего изобретения анти-CD39 агент можно применять в лечении рака у индивидуума, имеющего рак или опухоль, характеризующиеся иммуносупрессией, необязательно отсутствием или недостаточным иммунным инфильтратом в опухолях, необязательно отсутствием или недостаточным противоопухолевым иммунитетом.

В некоторых необязательных аспектах настоящего изобретения способы лечения, описанные в на-

стоящем документе, могут применяться для лечения рака у индивидуума с плохим прогнозом заболевания, в частности, плохим прогнозом ответа на лечение противораковым средством, например агентом, способным вызывать внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, цитотоксическим средством, химиотерапевтическим средством или агентом, который ингибирует ферментативную активность CD39. Индивидуум с плохим прогнозом заболевания, например, подвержен более высокому риску прогрессирования данного заболевания на основании одного или нескольких прогностических факторов. В одном варианте реализации настоящего изобретения прогностический(е) фактор(ы) включает(ют) наличие или отсутствие мутаций в одном или более генах. В одном варианте реализации настоящего изобретения прогностический(е) фактор(ы) включает(ют) уровень (уровни) экспрессии одного или более генов или белков, или типовые ингибирующие или активирующие рецепторы на иммунных эффекторных клетках. В одном варианте реализации настоящего изобретения прогностический(е) фактор(ы) включает(ют) присутствие (например, количество) клеток в кровотоке или в опухолевой среде, экспрессирующих CD39, и/или уровни экспрессии CD39 на поверхности клеток в кровотоке или в опухолевой среде; в одном варианте реализации настоящего изобретения клетки представляют собой опухолевые клетки; в одном варианте реализации настоящего изобретения клетки представляют собой лейкоциты, например, В-клетки, регуляторные Т-клетки (Трег); в одном варианте реализации настоящего изобретения клетки представляют собой дендритные клетки. Повышенная экспрессия CD39 и/или повышенное количество экспрессирующих CD39 клеток могут указывать на то, что у индивидуума плохой прогноз ответа на лечение антителом, нейтрализующим CD39.

В любом аспекте настоящего изобретения индивидуум может представлять собой индивидуума, который не отвечает на лечение, или у которого был частичный или неполный ответ на лечение агентом, способным вызывать внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, или у которого случился рецидив заболевания или заболевание прогрессировало после лечения агентом, способным вызывать внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен анти-CD39 агент для применения в лечении рака у индивидуума, который не отвечает на лечение, или у которого был частичный или неполный ответ на лечение агентом, способным вызывать внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, или чье заболевание рецидивировало или прогрессировало после лечения агентом, способным вызывать внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток. В одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 агент применяют в сочетании с терапией (например, агентом), способной вызывать внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток. Необязательно, анти-CD39 агент способен связывать и ингибировать АТФазную активность CD39 в присутствии АТФ и/или способен связываться с растворимым белком внеклеточного домена CD39 человека и ингибировать АТФазную активность растворимого белка внеклеточного домена CD39 человека.

В одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 агент конкурирует за связывание с эпитопом или детерминантой на CD39 с антителом I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 или I-399. В одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 агент конкурирует за связывание с CD39 с антителом, имеющим тяжелую и легкую цепи в SEQ ID NO: 37 и 38 соответственно. Агент может представлять собой, например, человеческое или гуманизированное анти-CD39 антитело. В одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело представляет собой антитело, содержащее области CDR тяжелой цепи из тяжелой цепи SEQ ID NO: 37 и области CDR легкой цепи из легкой цепи SEQ ID NO: 37 соответственно. В одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело включает тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60, 70, 75, 80, 85 или 90% идентичную аминокислотной последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 37, а также легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 60, 70, 75, 80, 85 или 90% идентичную аминокислотной последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 38 соответственно.

В некоторых необязательных аспектах настоящего изобретения индивидуумы могут быть идентифицированы как подходящие для лечения CD39-нейтрализующим агентом и агентом, способным вызывать внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, путем оценки того, слабо ли пациент отвечает (имеет ли плохой прогноз ответа) на терапию противораковым средством (например, композицией, содержащей цитотоксическое соединение, химиотерапевтическое средство, источающее антитело). Пациента со слабым ответом можно лечить комбинацией из CD39-нейтрализующего агента и агента, способного вызывать внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток.

В некоторых необязательных аспектах настоящего изобретения пациенты могут быть идентифицированы как подходящие для лечения CD39-нейтрализующим агентом путем оценки наличия внеклеточного АТФ в образце опухоли (например, опухолевой ткани и/или прилегающей к опухоли ткани), необязательно, где предварительно определенная концентрация АТФ указывает на то, что индивидуум подходит для лечения анти-CD39 агентом, необязательно, где концентрация внеклеточного АТФ составляет по меньшей мере 0,01, 0,02, 0,05, 0,125, 0,25 или 0,5 мМ.

В других вариантах реализации настоящего изобретения способы лечения, описанные в настоящем документе, можно применять в сочетании с любыми другими подходящими способами лечения. В одном

варианте реализации настоящего изобретения способы лечения, описанные в настоящем документе, дополнительно включают введение индивидууму агента, необязательно антитела, нейтрализующего ингибирующую активность PD-1 человека. В одном варианте реализации настоящего изобретения способы лечения, описанные в настоящем документе, дополнительно включают введение индивидууму агента, необязательно антитела, нейтрализующего 5'-эктонуклеотидазную активность белка CD73 человека.

В других вариантах реализации настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции и наборы, а также способы их применения. В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение, которое нейтрализует АТФазную активность полипептида CD39 человека, и агент, способный вызывать внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток. В одном варианте реализации настоящего изобретения предложен набор, содержащий соединение, которое нейтрализует ингибирующую активность полипептида CD39 человека, и агент, способный вызывать внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток.

В других вариантах реализации настоящего изобретения предложены способы прогнозирования или оценки эффективности/пригодности противоракового средства для комбинированного применения с антителом, которое способно связываться с растворимым белком внеклеточного домена CD39 человека и ингибировать АТФазную активность растворимого белка внеклеточного домена CD39 человека, причем данные способы включают определение или оценку (например, *in vitro*), вызывает ли противораковое средство внеклеточное высвобождение АТФ из клеток (например, опухолевых клеток), где определение, что противораковое средство вызывает внеклеточное высвобождение АТФ из клеток (например, опухолевых клеток), указывает на то, что это средство можно применять в лечении рака в сочетании с указанным антителом, которое способно связываться с растворимым белком внеклеточного домена CD39 человека и ингибировать АТФазную активность растворимого белка внеклеточного домена CD39 человека. Определение или оценка того, вызывает ли противораковое средство внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, может включать, например, приведение клеток (например, опухолевых клеток) в контакт со средством *in vitro* и оценку внеклеточного высвобождения АТФ.

Эти аспекты более полно описаны в описании изобретения согласно настоящей заявке, а дополнительные аспекты, признаки и преимущества станут понятны из описания изобретения, предложенного в данном документе.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показан репрезентативный результат скрининга, показывающий антитела I-397, I-398 и I-399 в сравнении с антителом I-394, которое является положительным контролем.

На фиг. 2А показано, что антитела BY40, I-394, I-395 и I-396 ингибируют связанный с клеточной мембраной CD39, причем I-394 и I-395 демонстрируют большую активность во всех концентрациях, а также большее максимальное ингибирование клеточного CD39 по сравнению с BY40.

На фиг. 2В показано, что антитела I-395 и I-396 ингибируют растворимый CD39 по сравнению с антителами отрицательного контроля (BY40) и положительного контроля (I-394).

На фиг. 3А показано положение остатков, мутировавших в мутантных формах 5 (M5), 15 (M15) и 19 (M19) на поверхности белка CD39.

На фиг. 2В показаны результаты связывания разных антител с мутантами 5, 15 и 19.

На фиг. 4 показано связывание антитела I-394 с клетками, экспрессирующими CD39 человека, по данным проточной цитометрии. I-394 связывает клетки, экспрессирующие CD39 человека (CHO-huCD39), клетки, экспрессирующие CD39 яванской макаки (CHO-cyCD39), и клетки лимфомы Рамоса, но не клетки, экспрессирующие CD39 мыши (CHO-moCD39).

На фиг. 5 показано, что антитело I-394 обладает высокой способностью блокировать ферментативную активность CD39 в опухолевых клетках (лимфомы Рамоса), в клетках, экспрессирующих CD39 человека (CHO-huCD39), и в клетках, экспрессирующих CD39 яванской макаки (CHO-cyCD39), согласно оценке определения количества единиц люминесценции, пропорционального количеству присутствующего АТФ.

На фиг. 6 показано, что антитело I-394 обладает высокой способностью блокировать ферментативную активность растворимого рекомбинантного белка CD39 человека, согласно оценке определения количества единиц люминесценции, пропорционального количеству присутствующего АТФ.

На фиг. 7 показано, что антитело I-394 связывается с CD39 человека, но не с одной из изоформ CD39-L1, -L2, -L3 или -L4 человека, как оценили методом иммуноферментного твердофазного анализа (ELISA).

На фиг. 8 показана процедура эксперимента по оценке влияния АТФ-опосредованной активации ДК на активацию CD4 Т-клеток. АТФ-активированные ДК промыли и затем инкубировали с аллогенными CD4 Т-клетками (в соотношении 1 моDC/4 Т-клетки) для проведения реакции смешанных лимфоцитов (РСЛ) в течение 5 дней. Активацию и пролиферацию Т-клеток анализировали через экспрессию CD25 и с помощью набора CellTrace™ Violet для проточной цитометрии.

На фиг. 9 показана экспрессия HLA-DR на моDC.

На фиг. 10 показана экспрессия CD83 на моDC.

Фиг. 9 и 10 показывают, что анти-CD39 блокирующее антитело I-394 и химические ингибиторы

CD39 приводят к активации моDC в концентрациях 0,125, 0,25 или 0,5 мМ. Однако анти-CD39 антитело ВУ40 или анти-CD73 антитела не были способны стимулировать АТФ-индуцированную активацию дендритных клеток (ДК), дав повод предположить, что антитела не способны блокировать ферментативную активность в достаточной мере, чтобы избежать катаболизма АТФ. Обозначения в направлении сверху вниз соответствуют столбцам на графиках слева направо.

На фиг. 11 показана экспрессия CD25, показывающая, что моDC, активированные в присутствии АТФ, способны вызывать активацию и пролиферацию Т-клеток в анализе РСЛ; усиление АТФ-опосредованной активации моDC анти-CD39 блокирующим антителом I-394 приводило к повышению пролиферации и активации Т-клеток. Обозначения в направлении сверху вниз соответствуют столбцам на графиках слева направо.

На фиг. 12 показаны рост опухоли и выживаемость у мышей, получавших контрольный ФСБ на 5-й день после приживления опухолевых клеток (одна группа) или проходивших химиотерапию оксалиплатином (две группы). Параллельно одной группе мышей, получавших оксалиплатин, дважды в неделю вводили анти-CD39 антитело, причем терапия анти-CD39 антителом начиналась всего за один день до терапии оксалиплатином (День 4). Это гарантировало то, что оксалиплатин вызовет высвобождение АТФ в опухолевой среде, где CD39 уже присутствовал и был полностью ингибирован, и, таким образом, обеспечивало оптимальную профилактику расщепления АТФ внутриопухолевым CD39.

На фиг. 13 показан рост опухоли и выживаемость у мышей, получавших на 5-й день после приживления опухолевых клеток либо контрольный ФСБ (одна группа), анти-CD39 антитело, оксалиплатин, либо комбинацию из оксалиплатина и анти-CD39 антитела. Инъекцию оксалиплатина повторяли спустя одну неделю после первой инъекции оксалиплатина и затем снова через один день после терапии антителом I-394, чтобы обеспечить оптимальное ингибирование расщепления АТФ.

Подробное описание

Определения.

Используемые в данном описании формы единственного числа (в англоязычной версии заявки выражаемые артиклями "a" или "an") могут означать один или более. Используемые в формуле изобретения формы единственного числа, в сочетании со словом "содержащий"/"включающий"/"состоящий из", могут означать один или более чем один. Используемый в данном документе термин "другой"/"еще один" может означать по меньшей мере второй или более.

Там, где используется "содержащий"/"включающий", этот термин можно необязательно заменить на "состоящий по существу из" или "состоящий из".

CD39 человека, также известный как NTPdase1, ENTPD1, ATPDase и сосудистая АТФ-дифосфогидролаза, проявляет АТФазную активность. CD39 представляет собой мембранно-связанный белок, который гидролизует внеклеточные АТФ и АДФ до АМФ, который затем превращается в аденозин под действием другого фермента, 5'-нуклеотидазы. Аминокислотная последовательность цепи зрелых полипептидов CD39 человека доступна в базе генетических данных Genbank под номером доступа P49961. Ее полное описание включено в настоящий документ посредством ссылки и представляет собой следующую последовательность:

```
MEDTKESNVK TFCSKNILAI LGFSSIIAVI ALLAVGLTQN KALPENVKYG IVLDAGSSHT
SLYIYKWPAE KENDTGVVHQ VEECRVKGPG ISKFVQKVNE IGIYLTDCME RAREVIPRSQ
HQETPVYLGTA TAGMRLLRME SEELADRVLD VVERSLSNYP FDFQGARIIT GQEEGAYGWI
TINYLLGKFS QKTRWFSlVP YETNNQETFG ALDLGGASTQ VTFVPQNQTI ESPDNALQFR
LYGKDYNVYT HSFLCYGKDQ ALWQKLAKDI QVASNEILRD PCFHPGYKKV VNVSDLYKTP
CTKRFEMLTP FQQFEIQGIG NYQQCHQSIL ELFNTSYCPY SQCAFNGIFL PPLQGDFGAF
SAFYFVMKFL NLTSEKVSQE KVTEMMKKFC AQPWBEIKTS YAGVKEKYLK EYCFSGTYIL
SLLLQGYHFT ADSWEHIHFI GKIQGS DAW TLGYMLNLTN MIPAEQPLST PLSHSTYVFL
MVLFSVLVLT VAIIGLLIFH KPSYFWKDMV (SEQ ID NO: 1).
```

В контексте настоящего изобретения "ингибировать", "ингибирующий", "нейтрализовать" или "нейтрализующий" при ссылке на полипептид CD39 (например, "нейтрализовать CD39", "нейтрализовать активность CD39" или "нейтрализовать ферментативную активность CD39" и т.д.) относится к процессу, где АТФ-гидролизная (АТФазная) активность CD39 ингибируется. Это включает, в частности, ингибирование CD39-опосредованного образования АМФ и/или АДФ, т.е. ингибирование CD39-опосредованного катаболизма АТФ в АМФ и/или АДФ. Это можно определить, например, посредством клеточного анализа, с помощью которого можно измерить способность испытуемого соединения ингибировать конверсию АТФ в АМФ и/или АДФ, прямо или косвенно. Например, так, как описано в настоящем документе, можно оценить исчезновение АТФ и/или образование АМФ. В одном варианте реализации настоящего изобретения препарат антитела вызывает по меньшей мере 60%-ное снижение конверсии АТФ в АМФ, по меньшей мере 70%-ное снижение конверсии АТФ в АМФ или по меньшей мере 80%- или 90%-ное снижение конверсии АТФ в АМФ, ссылаясь, например, на анализы, описанные в настоящем документе (например, исчезновение АТФ и/или образование АМФ).

"ЕС₅₀" в отношении агента и конкретной активности (например, связывания с клеткой, ингибирования

ния ферментативной активности, активации или ингибирования иммунной клетки) означает эффективную концентрацию агента на 50% от его максимального ответа или эффекта в отношении такой активности. "ЕС₁₀₀" в отношении агента и конкретной активности означает эффективную концентрацию агента, которая обеспечивает по существу его максимальный отклик в отношении такой активности.

Используемый в данном документе термин "антитело" означает поликлональные и моноклональные антитела. В зависимости от типа константного домена в тяжелых цепях, антитела относятся к одному из пяти основных классов: IgA (иммуноглобулин A), IgD (иммуноглобулин D), IgE (иммуноглобулин E), IgG (иммуноглобулин G) и IgM (иммуноглобулин M). Некоторые из них дополнительно подразделяются на подклассы или изотипы, такие как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и т.д. Типовая структурная единица иммуноглобулина (антитела) содержит тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, где каждая пара имеет одну "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50-70 кДа). N-конец каждой цепи определяет вариабельную область приблизительно от 100 до 110 или более аминокислот, которая в первую очередь отвечает за распознавание антигена.

Термины "вариабельная область легкой цепи" (V_L) и "вариабельная область тяжелой цепи" (V_H) относятся к этим легким и тяжелым цепям соответственно. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются "альфа", "дельта", "эпсилон", "гамма" и "мю" соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. IgG - типовой класс антител, применяемых в настоящем изобретении, так как они являются наиболее распространенными антителами в плане физиологии и потому что их легче всего получить в лабораторных условиях. Антитело, необязательно, представляет собой моноклональное антитело. К антителам относятся, в частности, гуманизированные, химерные, человеческие или иным образом подходящие для человека антитела. "Антитела" также включают любой фрагмент или производное любого из описанных в настоящем документе антител.

Термин "специфически связывается с" означает, что антитело может связываться, предпочтительно в конкурентном анализе связывания, с партнером по связыванию, например, CD39, по оценке с использованием либо рекомбинантных форм белков, эпитопов, либо нативных белков, присутствующих на поверхности выделенных клеток-мишеней. Конкурентные анализы связывания и другие способы определения специфического связывания хорошо известны в данной области техники. Например, связывание можно обнаружить с помощью радиоактивных меток, физических методов, таких как масс-спектрометрия, или с помощью прямых или непрямых флуоресцентных меток, обнаруживаемых посредством, например, цитофлуорометрического анализа (например, FACS_{CAN}). Связывание в объеме выше количества, наблюдаемого с контрольным неспецифическим агентом, указывает на то, что агент связывается с мишенью.

Когда говорят, что антитело "конкурирует" с конкретным моноклональным антителом, это означает, что антитело конкурирует с моноклональным антителом в анализе связывания с использованием либо рекомбинантных молекул (например, CD39), либо молекул, экспрессируемых на поверхности (например, CD39). Например, если в ходе анализа связывания испытываемое антитело снижает степень связывания антитела, имеющего тяжелую цепь SEQ ID NO: 3 и легкую цепь SEQ ID NO: 4, с полипептидом CD39 или клеткой, экспрессирующей CD39, то, соответственно, говорят, что антитело "конкурирует" с таким антителом.

Термин "аффинность" в контексте настоящей заявки означает силу связывания антитела с эпитопом. Аффинность антитела определяется константой диссоциации K_d как $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$, где $[Ab-Ag]$ - молярная концентрация комплекса антитело-антиген, $[Ab]$ - молярная концентрация несвязанного антитела, а $[Ag]$ - молярная концентрация несвязанного антигена. Константа аффинности K_a определяется как $1/K_d$. Информацию о способах определения аффинности моноклональных антител можно найти в следующих работах: Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988; Coligan et al., Eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y. (1992, 1993) и Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601 (1983). Данные работы полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. Одним стандартным способом определения аффинности моноклональных антител, хорошо известным в данной области техники, является скрининг с применением поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (например, анализ с помощью ППР и аналитического устройства BIAcore™).

В контексте данного описания "детерминанта" обозначает область взаимодействия или связывания на полипептиде.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте и представляет собой область или участок на поверхности антигена, с которой связывается антитело. Эпитоп белка может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании, а также аминокислотные остатки, которые эффективно блокируются специфическим антигенсвязывающим антителом или пептидом, т.е. аминокислотные остатки в области узнавания антитела. Именно самая простая форма или наименьшая структурная область на поверхности сложной молекулы антигена может сочетаться, например, с антителом или рецептором. Эпитопы могут быть линейными или конформационными/структурными.

Термин "линейный эпитоп" означает эпитоп, состоящий из аминокислотных остатков, которые примыкают к линейной последовательности аминокислот (первичная структура).

Термин "конформационный или структурный эпитоп" означает эпитоп, состоящий из аминокислотных остатков, которые не все являются смежными и, таким образом, представляют собой отдельные части линейной последовательности аминокислот, которые сближаются друг с другом при изгибании молекулы (вторичные, третичные и/или четвертичные структуры). Конформационный эпитоп зависит от трехмерной структуры. Поэтому термин "конформационный" часто используют взаимозаменяемо с термином "структурный".

Термин "истощать" или "истощающий" в отношении опухолевых клеток означает процесс, способ или соединение, которые приводят к уничтожению, устранению, лизису или вызывают такое уничтожение, устранение или лизис, оказывая таким образом отрицательное влияние на количество таких опухолевых клеток, присутствующих в образце или у субъекта.

Термин "интернализация", используемый взаимозаменяемо с термином "внутриклеточная интернализация", относится к молекулярным, биохимическим и клеточным событиям, связанным с процессом перемещения/транслокации молекулы с внеклеточной поверхности клетки на внутриклеточную поверхность клетки. Процессы, ответственные за внутриклеточную интернализацию молекул, хорошо известны и могут включать, помимо прочего, интернализацию внеклеточных молекул (таких как гормоны, антитела и небольшие органические молекулы); мембранно-связанные молекулы (такие как рецепторы клеточной поверхности); и комплексы мембраноассоциированных молекул, связанных с внеклеточными молекулами (например, лиганд, связанный с трансмембранным рецептором, или антитело, связанное с мембраноассоциированной молекулой). Таким образом, термин "вызывающий и/или усиливающий интернализацию" включает события, при которых инициируется внутриклеточная интернализация и/или увеличивается скорость и/или степень внутриклеточной интернализации.

Термин "агент" используется в данном документе для обозначения химического соединения, смеси химических соединений, биологической макромолекулы или экстракта из биологических материалов. Термин "терапевтический агент" означает биологически активный агент.

Для целей настоящего изобретения "гуманизированное" или "человеческое" антитело означает антитело, в котором константная и переменная каркасная область одного или более иммуноглобулинов человека слиты со связывающей областью, например, CDR, иммуноглобулина животного происхождения. Такие антитела предназначены для поддержания специфичности связывания нечеловеческого антитела, из которого получены области связывания, и для предотвращения иммунной реакции на нечеловеческое антитело. Такие антитела можно получить из трансгенных мышей или других животных, которые были выведены специально для получения специфических человеческих антител в ответ на иммунизацию антигеном (см., например, работы Green et al. (1994), Nature Genet, 7:13; Lonberg et al. (1994), Nature, 368:856; Taylor et al. (1994), Int. Immun. 6:579, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки). Полностью человеческое антитело также можно получить известными в данной области методами генетической или хромосомной трансфекции, а также с помощью технологии фагового дисплея (см., например, McCafferty et al. (1990), Nature, 348:552-553). Человеческие антитела можно также генерировать активированными *in vitro* В-клетками (см., например, патенты США № 5567610 и 5229275, которые полностью включены посредством ссылки).

"Химерное антитело" представляет собой молекулу антитела, в которой (а) константная область или ее часть изменена или заменена таким образом, что сайт связывания антигена (переменная область) связан с константной областью другого или измененного класса, эффекторной функции и/или вида, или совершенно другой молекулой, которая придает химерному антителу новые свойства, например фермент, токсин, гормон, фактор роста, лекарственное средство и т.д.; или (b) переменная область или ее часть изменена или заменена переменной областью, имеющей другую или измененную антигенную специфичность.

Термин "гиперпеременная область" в настоящем документе означает аминокислотные остатки антитела, которые отвечают за связывание с антигеном. Гиперпеременная область обычно содержит аминокислотные остатки из "определяющей комплементарности области (определяющего комплементарного участка)" или "CDR" (например, остатки 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в переменной домене легкой цепи и 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в переменной домене тяжелой цепи; Kabat et al. 1991) и/или остатков из "гиперпеременной петли" (например, остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в переменной домене легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в переменной домене тяжелой цепи; Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 1987; 196:901-917) или аналогичной системы для определения незаменимых аминокислот, ответственных за связывание с антигеном. Как правило, нумерация аминокислотных остатков в этой области выполняется способом, описанным выше в работе Кабата и соавторов. Такие фразы, как "позиция по Кабату", "нумерация остатков переменной области, как у Кабата" и "по Кабату" в настоящем документе, относятся к этой системе нумерации для переменных доменов тяжелой цепи или переменных доменов легкой цепи. Используя систему нумерации Кабата, фактическая линейная последовательность аминокислот пептида может содержать меньше аминокислот или дополнительные аминокислоты в соответствии местом вставки в каркасную область или CDR-область ва-

риабельного домена или их сокращением. Например, переменный домен тяжелой цепи может включать одну аминокислотную вставку (остаток 52a по Кабату) после остатка 52 CDR H2, а также вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b, 82c и т.д. по Кабату) после остатка 82 каркасной области тяжелой цепи. Номенклатуру остатков по Кабату для конкретного антитела можно определить путем совмещения последовательности антитела со "стандартной" пронумерованной последовательностью Кабата в областях гомологии.

Под "каркасными" или "КО" (FR) остатками в данном документе подразумевается область переменного домена антитела, за исключением тех областей, которые определены как CDR. Каждая каркасная область переменного домена антитела может дополнительно подразделяться на смежные области, разделенные CDR (FR1, FR2, FR3 и FR4).

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

Термины "выделенный", "очищенный" или "биологически чистый" относятся к материалу, который существенно или по существу не содержит компонентов, которые обычно сопровождают его в том виде, в котором он находится в естественном состоянии. Чистоту и однородность обычно определяют методами аналитической химии, такими как электрофорез в полиакриламидном геле или высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Белок, который является преобладающим видом, присутствующим в препарате, по существу очищен.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Эти термины применяют к аминокислотным полимерам, в которых один или более аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический миметик соответствующей природной аминокислоты, а также к встречающимся и не встречающимся в природе аминокислотным полимерам.

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

В контексте данного описания термин "антитело, которое связывается с полипептидом или эпитопом" обозначает антитело, которое связывается с указанной детерминантой со специфичностью и/или аффинностью.

Термин "идентичность" или "идентичный", при использовании в отношении последовательностей двух или более полипептидов, означает степени сходства между последовательностями полипептидов, которая определяется по количеству совпадений между цепочками двух или более аминокислотных остатков. "Идентичностью" измеряют процент идентичных совпадений между меньшей из двух или более последовательностей при выравнивании разрывов (если есть) с помощью конкретной математической модели или компьютерной программы (т.е. "алгоритмов"). Идентичность родственных полипептидов можно легко рассчитать известными методами. Такие методы включают, помимо прочего, методы, описанные в следующих работах: *Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data, Part 1*, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; а также Carillo et al., *SIAM J. Applied Math.* 48, 1073 (1988).

Способы определения идентичности предназначены для определения наибольшего соответствия между исследуемыми последовательностями. Способы определения идентичности описаны в общедоступных компьютерных программах. Способы компьютерного определения идентичности между двумя последовательностями включают пакет программ GCG, включая GAP (Devereux et al., *Nucl. Acid. Res.* 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN и FASTA (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215, 403-410 (1990)). Получить доступ к программе BLASTX можно в Национальном центре биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information, NCBI) и из других источников (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al.). Также для определения идентичности можно применить хорошо известный алгоритм Смита-Уотермана.

Агенты, ингибирующие CD39.

Агент, который связывается с CD39 и ингибирует CD39 для применения согласно настоящему изобретению, может представлять собой антигенсвязывающий домен или белок, содержащий такой домен, необязательно, антитело или фрагмент антитела, который связывается с белком CD39 и ингибирует или нейтрализует АТФазную активность белка CD39, например, растворимого белка CD39 (sCD39), мономерного белка CD39, мембранно-связанного белка CD39 (memCD39), к примеру, экспрессируемого на поверхности клетки.

В одном варианте реализации настоящего изобретения белок sCD39 представляет собой белок CD39 без двух трансмембранных доменов (т.е. трансмембранных доменов вблизи N- и C-концевых областей), которые есть в мембранно-связанном CD39. В одном варианте реализации настоящего изобретения sCD39 представляет собой немембранно-связанный белок SCD39, циркулируемый в кровотоке, например, человека. В одном варианте реализации настоящего изобретения sCD39 содержит или состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 (которая, необязательно, дополнительно содержит C-концевую метку или другую аминокислотную последовательность, полученную не из CD39). В одном варианте реализации настоящего изобретения белок, антитело или фрагмент антитела ингибирует АТФазную активность SCD39 при инкубации с SCD39 в растворе, например, в соответствии со способами, раскрытыми в данном документе. В одном варианте реализации настоящего изобретения белок, антитело или фрагмент антитела специфически связываются с белком CD39 человека как в растворимой (белок внеклеточного домена), так и в мембранно-связанной форме.

В одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело не увеличивает или не вызывает внутриклеточную интернализацию или, в более общем случае, понижающую модуляцию, экспрессируемого на клеточной поверхности CD39, и/или ингибирующая активность такого антитела по отношению к CD39 не зависит от CD39.

В одном аспекте настоящего изобретения анти-CD39 антитело способно (а) ингибировать ферментативную активность мембранно-связанного белка CD39 (например, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1), экспрессируемого на поверхности клеток, и (b) ингибировать ферментативную активность растворимого белка CD39 (например, белка CD39, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, белка CD39 без своих трансмембранных доменов).

В одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело по существу не связывается (например, через свой домен Fc) с рецепторами Fcγ (например, CD16, CD32a, CD32b, CD64) и/или C1q человека и/или по существу не направляет АЗКЦ и/или КЗЦ в отношении клетки, экспрессирующей CD39. Необязательно, антитело сохраняет домен Fc (например, изотипа IgG человека) и продолжает связываться с FcRn человека.

В одном варианте реализации настоящего изобретения нейтрализующие CD39 антитела могут характеризоваться способностью вызывать снижение АТФазной активности полипептида SCD39 и/или мономерного полипептида CD39, необязательно вызывая сокращение образования АМФ из растворимого мономерного белка CD39 человека, например, белка CD39, состоящего из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 по меньшей мере на 50, 60, 70, 80 или 90%.

В одном варианте реализации настоящего изобретения нейтрализующие CD39 антитела могут характеризоваться способностью вызывать снижение АТФазной активности клеток CD39, необязательно вызывая сокращение образования АМФ в клетке, экспрессирующей CD39 по меньшей мере на 50, 60, 70, 80 или 90%. В одном варианте реализации настоящего изобретения CD39-нейтрализующие антитела могут характеризоваться значением EC₅₀ для ингибирования АТФазной активности (например, EC₅₀ для ингибирования генерации АМФ клеткой, экспрессирующей CD39) CD39, экспрессируемого клеткой, не более 1 мкг/мл, необязательно не более 0,5 мкг/мл, необязательно не более 0,2 мкг/мл.

В одном варианте реализации настоящего изобретения нейтрализующие CD39 антитела могут характеризоваться способностью вызывать увеличение экспрессии маркера активации на клеточной поверхности в происходящих из моноцитов дендритных клетках человека (moDC), когда такие moDC инкубируют *in vitro* с антителом и АТФ, где АТФ необязательно представляет собой экзогенно добавленный АТФ, и где АТФ необязательно добавлен в концентрации 0,125, 0,25 или 0,5 mM.

Антигенсвязывающее соединение можно получить так, как описано далее в настоящем документе. При этом на любой стадии можно оценить его способность ингибировать ферментативную активность CD39, в частности блокировать АТФазную активность SCD39 и снижать продуцирование АДФ и АМФ (и вместе с CD73, аденозина) растворимым белком CD39 и, необязательно, клеткой, экспрессирующей CD39, а также, в свою очередь, восстанавливать АТФ-опосредованную активацию активности дендритных клеток и/или пролиферацию Т-клеток.

Ингибирующую активность (например, потенциал усиления иммунитета) антитела также можно оценить, например, посредством анализа при обнаружении исчезновения (гидролиза) АТФ и/или образования АМФ.

Способность антитела ингибировать растворимый рекомбинантный белок CD39 человека можно проверить путем определения наличия АТФ после инкубации исследуемого антитела с растворимым белком CD39 (например, белком CD39, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2,

как в примере 1, необязательно дополнительно включающий метку для очистки или другую функциональную или нефункциональную аминокислотную последовательность, не являющуюся производной от CD39). См. раздел "Примеры". Если описывать вкратце, то АТФ можно количественно определить при помощи набора CellTiter Glo™ (Promega) в ходе анализа, где исследуемое антитело в диапазоне доз инкубируют с растворимым рекомбинантным белком CD39 человека, описанным в разделе "Примеры", в течение 1 ч при 37°C. Перед тем, как добавить реагент CTG, 20 мкМ АТФ добавляют на планшеты для дополнительной инкубации в течение 30 мин при 37°C. Испускаемый свет количественно определяют с помощью люминометра Enspire™ после короткого инкубационного периода в 5 мин в темноте.

Способность антитела ингибировать клетки, экспрессирующие белок CD39, можно проверить путем определения наличия АТФ после инкубации испытуемого антитела с клетками (например, клетками Рамоса, клетками, трансфицированными CD39 и т.д.). См. раздел "Примеры". Клетки можно инкубировать в течение 1 ч при 37°C вместе с исследуемыми антителами. Затем клетки дополнительно инкубируют с добавлением 20 мкМ АТФ в течение 1 ч при 37°C. Планшеты центрифугируют в течение 2 мин при 400 g, после чего клеточный супернатант переносят на микропланшет (в белые лунки) для люминесцентного анализа. CTG добавляют к супернатанту и измеряют количественно испускаемый свет после 5-минутной инкубации в темноте с использованием люминометра Enspire™. Эффективность анти-CD39 антител определяют путем сравнения испускаемого света в присутствии антитела с АТФ (максимальное излучение света) и антитела с АТФ и клетками (минимальное излучение света).

Снижение гидролиза АТФ в АМФ, и/или повышение АТФ, и/или сокращение образования АМФ в присутствии антитела указывают на то, что антитело ингибирует CD39. В одном варианте реализации настоящего изобретения препарат антитела способен вызывать по меньшей мере 60%-ное снижение ферментативной активности полипептида CD39, экспрессируемого клеткой, предпочтительно антитело вызывает по меньшей мере 70, 80 или 90%-ное снижение ферментативной активности полипептида CD39 в клетке согласно оценке методом определения наличия АТФ с помощью CellTiter Glo™ (Promega) после инкубации клеток, экспрессирующих полипептид CD39 (например, клетки Рамоса), с испытуемым антителом, например, как в примере 1.

В одном варианте реализации настоящего изобретения препарат антитела способен вызывать по меньшей мере 60%-ное снижение ферментативной активности растворимого рекомбинантного полипептида CD39, предпочтительно по меньшей мере 70, 80 или 90%-ное снижение ферментативной активности растворимого рекомбинантного полипептида CD39, согласно оценке методом определения наличия АТФ с помощью CellTiter Glo™ (Promega) после инкубации растворимого рекомбинантного полипептида CD39 с испытуемым антителом, например, как в примере 1.

В одном примере предложен способ получения или идентификации *in vitro* анти-CD39 антитела или антигенсвязывающего домена, который можно применять в настоящем изобретении (например, в комбинации с агентом, который вызывает высвобождение АТФ из опухолевых клеток) и который включает следующие этапы:

- (a) обеспечение множества антител, которые связываются с полипептидом CD39 человека;
- (b) приведение каждого из антител в контакт с происходящими из моноцитов дендритными клетками человека (moDC) в присутствии АТФ, при этом, необязательно, АТФ представляет собой экзогенно добавленный АТФ; и
- (c) выбор такого антитела со стадии (b), которое приводит к увеличению экспрессии маркера активности на клеточной поверхности в moDC.

Необязательно, в любом варианте реализации настоящего изобретения нейтрализующее анти-CD39 антитело связывается с антигенной детерминантой, присутствующей как на SCD39, так и на CD39, экспрессируемом на поверхности клетки (memCD39).

Необязательно, в любом варианте реализации настоящего изобретения нейтрализующее анти-CD39 антитело конкурирует за связывание с эпитопом на CD39, связанном с антителом I-394 (например, которое конкурирует за связывание с эпитопом на полипептиде CD39 с антителом, имеющим CDR в тяжелой и легкой цепях или вариабельные области, идентичные любой из I-394).

Необязательно, в любом варианте реализации настоящего изобретения нейтрализующее анти-CD39 антитело связывается с одним и тем же эпитопом и/или конкурирует за связывание с полипептидом CD39 с моноклональным антителом I-394 (например, которое конкурирует за связывание с полипептидом CD39 с антителом, имеющим CDR в тяжелой и легкой цепях или вариабельные области, идентичные I-394). В одном варианте реализации настоящего изобретения нейтрализующее анти-CD39 антитело связывается с одним и тем же эпитопом и/или конкурирует за связывание с полипептидом CD39 с антителом, имеющим области V_H и V_L последовательностей SEQ ID NO: 3 и 4 соответственно.

Необязательно, в любом варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело связывается с эпитопом, содержащим один, два или три аминокислотных остатка, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков на CD39, связанных с I-394.

Необязательно, в любом варианте реализации настоящего изобретения связывающая молекула (например, анти-CD39 антитело) содержит вариабельный домен тяжелой цепи (V_H), содержащий CDR1, 2 и

3 легкой цепи, как в настоящем документе описано, а также переменный домен легкой цепи (V_L), содержащий CDR1, 2 и 3 тяжелой цепи, как в настоящем документе описано, или аминокислотную последовательность, в которой CDR-область (или ряд CDR тяжелой и/или легкой цепи) по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 или 95% идентична перечисленным CDR (или указанному ряду CDR тяжелой и/или легкой цепи). В одном аспекте любого из вариантов реализации настоящего изобретения антитело может содержать тяжелую цепь, включающую три CDR переменной области тяжелой цепи (V_H) антитела I-394, и легкую цепь, включающую три CDR переменной области легкой цепи (V_L) антитела I-394.

Необязательно, в любом варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело содержит домен Fc, который модифицирован (по сравнению с доменом Fc дикого типа того же изотипа) для уменьшения связи между доменом Fc и полипептидами CD16A, CD16B, CD32A, CD32B и/или CD64 человека, где, необязательно, антитело содержит (i) тяжелую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 3, и (ii) легкую цепь, содержащую CDR 1, 2 и 3 переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 4. В одном аспекте настоящего изобретения домен Fc модифицирован (по сравнению с доменом Fc дикого типа того же изотипа) для уменьшения связи между доменом Fc и полипептидом C1q человека. В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело содержит аминокислотный заменитель в константной области тяжелой цепи в любом одном, двух, трех, четырех, пяти или более остатках, выбранных из группы, состоящей из 220, 226, 229, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 243, 264, 268, 297, 298, 299, 309, 310, 318, 320, 322, 327, 330 и 331 (нумерация Кабата). В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело имеет аминокислотный заменитель в константной области тяжелой цепи в любых трех, четырех, пяти или более остатках, выбранных из группы, состоящей из 234, 235, 237, 322, 330 и 331. В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело содержит домен Fc, содержащий аминокислотную последовательность, показанную ниже.

В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело содержит константную область или домен Fc тяжелой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную ниже, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 95 или 99% ей идентичную, но сохраняющую аминокислотные остатки в позициях № 234, 235 и 331 согласно нумерации Кабата (подчеркнуты):

```
A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S
C D K T H T C P P C P A P E A E G G P S V F L F P P K P K D T L M I
S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A
K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
K V S N K A L P A S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R
E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (SEQ ID NO: 44)
```

В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело содержит константную область или домен Fc тяжелой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную ниже, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 95 или 99% ей идентичную, но сохраняющую аминокислотные остатки в позициях № 234, 235 и 331 согласно нумерации Кабата (подчеркнуты):

```
A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S
C D K T H T C P P C P A P E F E G G P S V F L F P P K P K D T L M I
S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A
K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
K V S N K A L P A S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R
E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (SEQ ID NO: 45)
```

В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело содержит константную область или домен Fc тяжелой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную ниже, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 95 или 99% ей идентичную, но сохраняющую аминокислотные остатки в позициях № 234, 235, 237, 330 и 331 согласно нумерации Кабата

(подчеркнуты):

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P
 E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
 V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S
 C D K T H T C P P C P A P E A E G A P S V F L F P P K P K D T L M I
 S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A
 K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
 K V S N K A L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R
 E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N
 N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F
 S C S V M H E A L H N N Y T Q K S L S L S P G K (SEQ ID NO: 46)

В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело содержит константную область или домен Fc тяжелой цепи, содержащие аминокислотную последовательность, представленную ниже, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 95 или 99% ей идентичную, но сохраняющую аминокислотные остатки в позициях № 234, 235, 237 и 331 согласно нумерации Кабата (подчеркнуты):

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P
 E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
 V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S
 C D K T H T C P P C P A P E A E G A P S V F L F P P K P K D T L M I
 S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A
 K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
 K V S N K A L P A S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R
 E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N
 N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F
 S C S V M H E A L H N N Y T Q K S L S L S P G K (SEQ ID NO: 47)

В одном аспекте настоящего изобретения анти-CD39 антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 или I-399. В одном варианте реализации настоящего изобретения антитела связываются с эпитопом CD39, который, по меньшей мере частично, перекрывается или включает по меньшей мере один остаток в эпитопе, связанном с антителом I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 или I-399. Остатки, связанные с антителом, могут быть указаны как присутствующие на поверхности полипептида CD39, например, в полипептиде CD39, экспрессируемом на поверхности клетки.

Связывание анти-CD39 антитела с клетками, трансфицированными мутантами CD39, можно измерить и сравнить со способностью анти-CD39 антитела связываться с полипептидом CD39 дикого типа (например, SEQ ID NO: 1). Ослабление связи между анти-CD39 антителом и мутантным полипептидом CD39 (например, мутантом, указанным в таблице) означает, что имеет место снижение аффинности связывания (например, согласно показателям измерений, произведенных такими известными способами, как FACS-анализ клеток, экспрессирующих конкретного мутанта, или анализ связывания с мутантными полипептидами с применением систем Bioscore) и/или снижение общей способности связывания анти-CD39 антитела (о чем свидетельствует, например, снижение V_{max} на графике зависимости концентрации анти-CD39 антитела от концентрации полипептида). Значительное ослабление связывания указывает на то, что мутировавший остаток непосредственно участвует в процессе связывания с анти-CD39 антителом или находится в непосредственной близости от связывающего белка, когда анти-CD39 антитело уже связано с CD39.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения значительное ослабление связывания означает, что аффинность связывания и/или потенциал связывания между анти-CD39 антителом и мутантным полипептидом CD39 снижается более чем на 40%, более чем на 50%, более чем на 55%, более чем на 60%, более чем на 65%, более чем на 70%, более чем на 75%, более чем на 80%, более чем на 85%, более чем на 90% или более чем на 95% относительно степени связывания антитела с полипептидом CD39 дикого типа. В определенных вариантах реализации настоящего изобретения связывание снижается ниже определяемых пределов. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения значительное ослабление связывания подтверждается, когда связывание анти-CD39 антитела с мутантным полипептидом CD39 составляет менее 50% (например, менее 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 или 10%) от связывания, наблюдаемого между анти-CD39 антителом и полипептидом CD39 дикого типа.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитела проявляют значительно более низкую силу связывания с мутантным полипептидом CD39, в котором остаток в сегменте,

включающем аминокислотный остаток, связанный с антителами I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 или I-399, заменен другой аминокислотой.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения заявлены анти-CD39 антитела (например, отличные от I-394), которые связываются с эпитопом на CD39, связанным с антителом I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 или I-399.

В одном аспекте настоящего изобретения антитело связывается с эпитопом на CD39, содержащем аминокислотный остаток (например, один, два или три остатка), выбранный из группы, состоящей из R138, M139 и E142 (по отношению к SEQ ID NO: 1).

В одном аспекте настоящего изобретения анти-CD39 антитело демонстрирует пониженную степень связывания (например, по существу полную потерю связывания) с полипептидом CD39, имеющим мутацию в одном, двух или трех остатках, выбранных из группы, состоящей из R138, M139 и E142 (по отношению к SEQ ID NO: 1), по сравнению с полипептидом CD39 дикого типа (полипептид CD39 из SEQ ID NO: 1); необязательно, мутантный полипептид CD39 имеет следующие мутации: R138A, M139A и E142K. В одном необязательном аспекте настоящего изобретения антитело не имеет потери связывания ни с одним из мутантных полипептидов CD39 из таблицы, кроме мутанта 19. В другом необязательном аспекте настоящего изобретения анти-CD39 антитело демонстрирует пониженную степень связывания (необязательно уменьшенное, но не полная по существу потеря связывания; или, необязательно, по существу полная потеря связывания) с полипептидом CD39, имеющим мутацию в одном, двух, трех или четырех остатках, выбранных из группы, состоящей из Q96, N99, E143 и R147 (по отношению к SEQ ID NO: 1) по сравнению с полипептидом CD39 дикого типа (полипептид CD39 из SEQ ID NO: 1); необязательно, мутантный полипептид CD39 имеет следующие мутации: Q96A, N99A, E143A и R147E.

В одном аспекте настоящего изобретения антитело связывается с эпитопом на CD39, содержащем аминокислотный остаток (например, один, два, три или четыре остатка), выбранный из группы, состоящей из Q96, N99, E143 и R147 (по отношению к SEQ ID NO: 1). В одном аспекте настоящего изобретения антитело обладает пониженной степенью связывания (например, по существу, полной потерей связывания) с мутантным полипептидом CD39, содержащим мутацию в 1, 2, 3 или 4 остатках, выбранных из группы, состоящей из Q96, N99, E143 и R147 (по отношению к SEQ ID NO: 1), в каждом случае относительно степени связывания антитела с полипептидом CD39 дикого типа, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте настоящего изобретения антитело связывается с эпитопом на CD39, содержащем (а) аминокислотный остаток (например, один, два или три остатка), выбранный из группы, состоящей из R138, M139 и E142 (по отношению к SEQ ID NO: 1), и (b) аминокислотный остаток (например, один, два, три или четыре остатка), выбранный из группы, состоящей из Q96, N99, E143 и R147.

В одном аспекте настоящего изобретения анти-CD39 антитело демонстрирует пониженную степень (например, по существу полную потерю) связывания как с (а) полипептидом CD39, имеющим мутацию в одном, двух, трех или четырех остатках, выбранных из группы, состоящей из Q96, N99, E143 и R147 (по отношению к SEQ ID NO: 1), так и с (b) полипептидом CD39, имеющим мутацию в одном, двух или трех остатках, выбранных из группы, состоящей из R138, M139 и E142 (по отношению к SEQ ID NO: 1), в каждом случае по сравнению с полипептидом CD39 дикого типа (полипептид CD39 из SEQ ID NO: 1). Необязательно, мутантный полипептид CD39 по пункту (а) имеет следующие мутации: Q96A, N99A, E143A и R147E. Необязательно, мутантный полипептид CD39 по пункту (b) имеет следующие мутации: R138A, M139A и E142K. Необязательно антитело не имеет потери связывания ни с одним из мутантных полипептидов CD39 из таблицы, кроме мутантов 5 и 19.

В одном аспекте настоящего изобретения антитело связывается с эпитопом на CD39, содержащем аминокислотный остаток (например, один, два, три или четыре остатка), выбранный из группы, состоящей из K87, E100 и D107 (по отношению к SEQ ID NO: 1).

В одном аспекте настоящего изобретения анти-CD39 антитело демонстрирует пониженную степень связывания (например, по существу полную потерю связывания) с полипептидом CD39, имеющим мутацию в одном, двух, трех или четырех остатках, выбранных из группы, состоящей из K87, E100 и D107 (по отношению к SEQ ID NO: 1), по сравнению с полипептидом CD39 дикого типа (полипептид CD39 из SEQ ID NO: 1); необязательно, мутантный полипептид CD39 имеет следующие мутации: K87A, E100A и D107A. Необязательно, антитело не имеет потери связывания ни с одним из мутантных полипептидов CD39 из таблицы, кроме мутанта 15.

В одном аспекте настоящего изобретения антитело связывается с эпитопом на CD39, содержащем аминокислотный остаток (например, один, два, три или четыре остатка), выбранный из группы, состоящей из N371, L372, E375, K376 и V377 (по отношению к SEQ ID NO: 1).

В одном аспекте настоящего изобретения анти-CD39 антитело демонстрирует пониженную степень (например, по существу полную потерю) связывания с полипептидом CD39, имеющим мутацию в одном, двух, трех, четырех или пяти остатках, выбранных из группы, состоящей из N371, L372, E375, K376 и V377 (по отношению к SEQ ID NO: 1), по сравнению с полипептидом CD39 дикого типа (полипептид CD39 из SEQ ID NO: 1); необязательно, мутантный полипептид CD39 имеет следующие мутации: N371K, L372K, E375A, K376G и V377S и вставку валина между остатками 376 и 377. Необязательно,

антитело не имеет потери связывания с любым из мутантных полипептидов CD39 из таблицы, кроме мутанта 11.

Анти-CD39 антитело может, например, содержать HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность DYNMH (SEQ ID NO: 5) или последовательность по меньшей мере из 4 смежных аминокислот, где, необязательно, одна или более из этих аминокислот может быть заменена другой аминокислотой; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность YIVPLNGGSTFNQKFKG (SEQ ID NO: 6) или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот, где, необязательно, одна или более из этих аминокислот может быть заменена другой аминокислотой; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность GGTRFAY (SEQ ID NO: 7) или последовательность по меньшей мере из 4, 5 или 6 смежных аминокислот, где, необязательно, одна или более из этих аминокислот может быть заменена другой аминокислотой; LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность RASESVDNFGVFSFMY (SEQ ID NO: 8) или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот, где, необязательно, одна или более из этих аминокислот может быть заменена другой аминокислотой; область LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность GASNQGS (SEQ ID NO: 9) или последовательность по меньшей мере из 4, 5 или 6 смежных аминокислот, где, необязательно, одна или более из этих аминокислот может быть заменена другой аминокислотой; и/или область LCDR3 I-394, содержащую аминокислотную последовательность QQTKEVPYT (SEQ ID NO: 10) или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7 или 8 смежных аминокислот, где, необязательно, одна или более из этих аминокислот может быть удалена или заменена другой аминокислотой. Позиции CDR-областей могут быть в соответствии с нумерацией Кабата.

Примером анти-CD39 антитела с парой V_H и V_L , которое ингибирует ферментативную активность белка sCD39 человека, является антитело I-394, аминокислотная последовательность вариательной области тяжелой цепи которого приведена ниже (SEQ ID NO: 3), и аминокислотная последовательность вариательной области легкой цепи которого тоже приведена ниже (SEQ ID NO: 4). CDR-области в SEQ ID NO: 3 и 4 подчеркнуты согласно нумерации Кабата. Необязательно, V_H и V_L содержат (например, модифицированы для включения) акцепторные каркасные области человека. В одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело содержит V_H CDR1, CDR2 и/или CDR3 (например, согласно нумерации Кабата) вариательной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело содержит V_L CDR1, CDR2 и/или CDR3 (например, согласно нумерации Кабата) вариательной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

I-394 V_H :

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYNMHVWKQSHGRTLEWIGYIVPLNGGSTF
NQKFKGRATLTVNTSSRTAYMELRSLTSEDSAAYYCARGGTRFAYWGQGLTVTVSA (SEQ
ID NO: 3).

I-394 V_L :

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNFGVFSFMYWFQKQPGQPPLLIYGASNQGS
VPAFRFGSGSGTDFSLNIHPMEADDTAMFYCQQTKEVPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:
4).

Другим примером анти-CD39 антитела с парой V_H и V_L в соответствии с настоящим изобретением является антитело I-395, аминокислотная последовательность вариательной области тяжелой цепи которого указана ниже (SEQ ID NO: 11), и аминокислотная последовательность вариательной области легкой цепи которого также указана ниже (SEQ ID NO: 12). CDR-области в SEQ ID NO: 11 и 12 подчеркнуты в соответствии с нумерацией Кабата. Необязательно, V_H и V_L содержат (например, модифицированы для включения) акцепторные каркасные области человека. В одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело содержит V_H CDR1, CDR2 и/или CDR3 (например, согласно нумерации Кабата) вариательной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11. В одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело содержит V_L CDR1, CDR2 и/или CDR3 (например, согласно нумерации Кабата) вариательной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12.

I-395 V_H :

EVQLQQSGPELVKPGASVRMSCKASGYTFTDYNMHVWKKNHGKGLEWIGYINPNNGGTT
YNQKFKGKATLTVNTSSKTAYMELRSLTSEDSAVYYCTRGGTRFASWGQGLTVTVSA
(SEQ ID NO: 11).

I-395 V_L :

NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASEVDNYGISFMYWFQKQPGQPPLLIYAASQTQSG
VPAFRFGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMFYCQQSKEVPFTFGSGKLEIK (SEQ ID NO:
12).

Анти-CD39 антитело может, например, содержать HCDR1 из I-395, содержащую аминокислотную последовательность DYNMH (SEQ ID NO: 13) или последовательность по меньшей мере из 4 смежных аминокислот, где, необязательно, одна или более из этих аминокислот может быть заменена другой

аминокислотой; HCDR2 из I-395, содержащую аминокислотную последовательность YINPNNGGTTYNQKFKG (SEQ ID NO: 14) или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот, где, необязательно, одна или более из этих аминокислот может быть заменена другой аминокислотой; HCDR3 из I-395, содержащий аминокислотную последовательность GGTRFAS (SEQ ID NO: 15) или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6 смежных аминокислот, где, необязательно, одна или более из этих аминокислот может быть заменена другой аминокислотой; LCDRI-область I-395, содержащую аминокислотную последовательность RASESVDNYGISFMY (SEQ ID NO: 16) или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот, где, необязательно, одна или более из этих аминокислот может быть заменена другой аминокислотой; LCDR2-область I-395, содержащую аминокислотную последовательность AASTQGS (SEQ ID NO: 17) или последовательность по меньшей мере из 4, 5 или 6 смежных аминокислот, где, необязательно, одна или более из этих аминокислот может быть заменена другой аминокислотой; и/или LCDR3-область I-395, содержащую аминокислотную последовательность QQSKEVPFT (SEQ ID NO: 18) или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7 или 8 смежных аминокислот, где, необязательно, одна или более из этих аминокислот может быть удалена или заменена другой аминокислотой. Позиции CDR-областей могут быть в соответствии с нумерацией Кабата.

Другим примером анти-CD39 антитела с парой V_H и V_L в соответствии с настоящим изобретением является антитело I-396, аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи которого указана ниже (SEQ ID NO: 19), и аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи которого также указана ниже (SEQ ID NO: 20). CDR-области в SEQ ID NO: 19 и 20 подчеркнуты в соответствии с нумерацией Кабата. Необязательно, V_H и V_L содержат (например, модифицированы для включения) акцепторные каркасные области человека. В одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело содержит V_H CDR1, CDR2 и/или CDR3 (например, согласно нумерации Кабата) варибельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. В одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело содержит V_L CDR1, CDR2 и/или CDR3 (например, согласно нумерации Кабата) варибельной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

I-396 V_H :

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCLVSGFNIK**DTYIN**WVKQRPEQGLEWIG**RIDPANGNTKYD**
PKFQGKATMTSDTSSNTAYLHLSLTSDSSAVYYCAR**WGYDDEEADYFDS**WGQGTTLT
 V (SEQ ID NO: 19).

I-396 V_L :

DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS**RASESVDNYGISFMN**WFQQKPGQPPKLLI**AASNQGS**
 VPARFSGSGSGTDFSLNIPMEEVDAAMYF**CHQSKEVPWT**FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:
 20).

Анти-CD39 антитело может, например, содержать HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность DTYIN (SEQ ID NO: 21) или последовательность по меньшей мере из 4 смежных аминокислот, где, необязательно, одна или более из этих аминокислот может быть заменена другой аминокислотой; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность RIDPANGNTKYDPKFQG (SEQ ID NO: 22) или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот, где, необязательно, одна или более из этих аминокислот может быть заменена другой аминокислотой; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность WGYDDEEADYFDS (SEQ ID NO: 23) или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот, где, необязательно, одна или более из этих аминокислот может быть заменена другой аминокислотой; LCDR1-область, содержащую аминокислотную последовательность RASESVDNYGISFMN (SEQ ID NO: 24) или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот, где, необязательно, одна или более из этих аминокислот может быть заменена другой аминокислотой; область LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность AASNQGS (SEQ ID NO: 25) или последовательность по меньшей мере из 4, 5 или 6 смежных аминокислот, где, необязательно, одна или несколько из этих аминокислот может быть заменена другой аминокислотой; и/или LCDR3-область I-396, содержащую аминокислотную последовательность HQSKEVPWT (SEQ ID NO: 26) или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7 или 8 смежных аминокислот, где, необязательно, одна или более из этих аминокислот может быть удалена или заменена другой аминокислотой. Позиции CDR-областей могут быть в соответствии с нумерацией Кабата.

Другим примером анти-CD39 антитела с парой V_H и V_L в соответствии с настоящим изобретением является антитело I-399, аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи которого указана ниже (SEQ ID NO: 27), и аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи которого также указана ниже (SEQ ID NO: 28). CDR-области в SEQ ID NO: 27 и 28 подчеркнуты в соответствии с нумерацией Кабата. Необязательно, V_H и V_L содержат (например, модифицированы для включения) акцепторные каркасные области человека. В одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело содержит V_H CDR1, CDR2 и/или CDR3 (например, согласно нумерации Каба-

та) вариабельной области тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27. В одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело содержит V_L CDR1, CDR2 и/или CDR3 (например, согласно нумерации Кабата) вариабельной области легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

I-399 VH:

PVQLQQPGAEVMPGASVKLSCKASGYTFTSFWMNWMRQRPQGGLWIGFIDPSDFYTN
SNQRFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGDFGWYFDVWGTGTSVTVSS
(SEQ ID NO: 27).

I-399 VL:

EIVLTQSPPTMTSSPGKITFTCSASSSINSNYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNLASGVPTRF
SGSGSGTSYSLTIGTMEAEDVATYYCQQGSSLPRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 28).

Анти-CD39 антитело может, например, содержать HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SFWMN (SEQ ID NO: 29) или последовательность по меньшей мере из 4 смежных аминокислот, где, необязательно, одна или более из этих аминокислот может быть заменена другой аминокислотой; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность EIDPSDFYTN SNQRFKG (SEQ ID NO: 30) или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот, где, необязательно, одна или более из этих аминокислот может быть заменена другой аминокислотой; HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность GDFGWYFDV (SEQ ID NO: 31) или последовательность по меньшей мере из 4, 5 или 6 смежных аминокислот, где, необязательно, одна или более из этих аминокислот может быть заменена другой аминокислотой; область LCDR1, содержащая аминокислотную последовательность SASSSINSNYLH (SEQ ID NO: 32) или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 смежных аминокислот, где, необязательно, одна или более из этих аминокислот может быть заменена другой аминокислотой; область LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность RTSNLAS (SEQ ID NO: 33) или последовательность по меньшей мере из 4, 5 или 6 смежных аминокислот, где, необязательно, одна или более из этих аминокислот может быть заменена другой аминокислотой; и/или LCDR3-область I-399, содержащую аминокислотную последовательность QQGSSLPRT (SEQ ID NO: 34) или последовательность по меньшей мере из 4, 5, 6, 7 или 8 смежных аминокислот, где, необязательно, одна или более из этих аминокислот может быть удалена или заменена другой аминокислотой. Положения CDR могут соответствовать нумерации Кабата.

В любом из антител I-394, I-395, I-396 и I-399 последовательности HCDR1, 2, 3 и LCDR1, 2, 3 (каждая CDR-область независимо или все CDR) могут быть указаны в соответствии с системой нумерации Кабата (как указано в последовательностях V_H и V_L путем подчеркивания), системой нумерации Чотиа, системой нумерации IMGT или любой другой подходящей системой нумерации.

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

В другом аспекте настоящего изобретения анти-CD39 соединение содержит домен V_H , аминокислотная последовательность которого по меньшей мере приблизительно на 60, 70 или 80%, необязательно по меньшей мере приблизительно на 85, 90, 95, 97, 98 или 99%, идентична аминокислотной последовательности домена V_H антитела, раскрытого в данном документе. В другом аспекте настоящего изобретения анти-CD39 антитело содержит домен V_L , аминокислотная последовательность которого по меньшей мере приблизительно на 60, 70 или 80%, необязательно по меньшей мере приблизительно на 85, 90, 95, 97, 98 или 99%, идентична аминокислотной последовательности домена V_L антитела, раскрытого в данном документе.

Необязательно, в любом варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело можно охарактеризовать как функционально-консервативный вариант любого из антител, его тяжелых и/или легких цепей, CDR или вариабельных областей, описанных в данном документе. "Функционально-консервативные варианты" представляют собой варианты, в которых данный аминокислотный остаток в белке или ферменте был изменен без изменения общей конформации и функций полипептида, включая, помимо прочего, замену аминокислоты на аминокислоту, имеющую аналогичные свойства (такие как, например, полярность, потенциал водородного связывания, кислотные, основные, гидрофобные, ароматические свойства и т.п.). Аминокислоты, отличные от тех, которые указаны как консервативные, могут различаться по белку таким образом, что процентное сходство белка или аминокислотной последовательности между любыми двумя белками с аналогичной функцией может варьироваться и составлять, например, от 70 до 99%, как определено в соответствии со схемой сопоставления, например, кластерным методом, где сходство основано на алгоритме MEGALIGN. "Функционально-консервативный вариант" также включает полипептид, аминокислотная последовательность которого идентична по меньшей мере на 60%, как определено алгоритмами BLAST или FASTA, предпочтительно по меньшей мере на 75%, более предпочтительно по меньшей мере на 85%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 90% и даже более предпочтительно по меньшей мере на 95% и который обладает такими же или по существу

аналогичными свойствами или функциями, что и нативный или родительский белок (например, тяжелые или легкие цепи, или CDR, или переменные области), с которыми его сравнивают. В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело включает переменную область тяжелой цепи, которая является функционально-консервативным вариантом переменной области тяжелой цепи антитела I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 или I-399, а также переменную область легкой цепи, которая является функционально-консервативным вариантом переменной области легкой цепи антитела I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 или I-399 соответственно. В одном варианте реализации настоящего изобретения антитело включает тяжелую цепь, которая является функционально-консервативным вариантом переменной области тяжелой цепи антитела I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 или I-399, слитого с константной областью тяжелой цепи человека, раскрытой в данном документе, необязательно, константной областью любой из SEQ ID NO: 44-47, а также легкую цепь, которая является функционально-консервативным вариантом переменной области легкой цепи соответствующего антитела I-394, I-395, I-396, I-397, I-398 или I-399, слитого с константной областью легкой цепи каппа человека.

Производство/получение антител.

Анти-CD39 антитела можно получить любым из множества способов, известных в данной области. Обычно их получают путем иммунизации не относящегося к человеку животного, например мыши, иммуногеном, содержащим полипептид CD39, соответственно, или путем скрининга генотеки на наличие доменов связывания с полипептидом CD39. Полипептид CD39 может содержать полную длину последовательности полипептида CD39 человека, соответственно, или его фрагмента или производного, как правило, иммуногенного фрагмента, т.е. части полипептида, содержащей эпитоп, экспонированный на поверхности клеток, экспрессирующих полипептид CD39. Такие фрагменты обычно содержат по меньшей мере приблизительно 7 последовательных аминокислот в последовательности зрелого полипептида, еще более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 10 последовательных аминокислот. Фрагменты, как правило, по существу получены из внеклеточного домена рецептора. В одном варианте реализации настоящего изобретения иммуноген содержит полипептид CD39 человека дикого типа в липидной мембране, как правило, на поверхности клетки. В конкретном варианте реализации настоящего изобретения иммуноген содержит интактные клетки, в частности интактные клетки человека, необязательно подвергнутые какой-либо обработке или лизису. В другом варианте реализации настоящего изобретения полипептид представляет собой рекомбинантный полипептид CD39.

Иммунизация не относящегося к человеку млекопитающего антигеном может быть осуществлена любым способом, хорошо известным в данной области для стимуляции выработки антител у мыши (см., например, работы E. Harlow and D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988), полное описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки). Иммуноген суспендируют или растворяют в буфере, необязательно с адъювантом, таким как полный или неполный адъювант Фрейнда. Способы определения количества иммуногена, типов буферов и количества адъюванта хорошо известны специалистам в данной области и не являются ограничивающими. Эти параметры могут быть разными для разных иммуногенов, но их легко установить.

Аналогично, область и частота иммунизации, достаточные для стимуляции выработки антител, также хорошо известны в данной области. В типичном протоколе иммунизации не относящимся к человеку животным внутрибрюшинно вводят антиген в 1-й день и снова приблизительно через неделю. За этим следуют повторные инъекции антигена приблизительно 20-го дня, необязательно вместе с адъювантом, таким как неполный адъювант Фрейнда. Вторичные инъекции выполняют внутривенно и могут повторять в течение нескольких дней подряд. За этим, на 40-й день, следует бустер-инъекция внутривенно или внутрибрюшинно, как правило, без адъюванта. Соблюдение данного протокола приводит к производству антиген-специфических антителопродуцирующих В-клеток приблизительно через 40 дней. Другие протоколы также могут быть использованы при условии, что они приводят к продуцированию В-клеток, экспрессирующих антитело, направленное на антиген, используемый для иммунизации.

Чтобы получить моноклональные антитела, спленоциты выделяют из иммунизированного не относящегося к человеку млекопитающего и затем встраивают в immortalized клетки с целью образования продуцирующей антитела гибридомы. Получение спленоцитов из не относящегося к человеку млекопитающего хорошо известно в данной области и обычно включает удаление селезенки у анестезированного не относящегося к человеку млекопитающего, разрезание ее на мелкие кусочки и выдавливание спленоцитов из капсулы селезенки через нейлоновую сетку клеточного сита в соответствующий буфер для получения суспензии отдельных клеток. Клетки промывают, центрифугируют и ресуспендируют в буфере, который лизирует любые эритроциты. Раствор снова центрифугируют и оставшиеся в виде осадка лимфоциты, наконец, ресуспендируют в свежем буфере.

После того, как лимфоциты выделили и поместили в суспензию отдельных клеток, их можно объединять с бессмертной клеточной линией. Как правило, это линия клеток миеломы мыши, хотя в данной области техники известны многие другие линии бессмертных клеток, используемые для получения гибридом. Линии мышинной миеломы включают, помимо прочего, линии, полученные из мышинных опухолей MOPC-21 и MPC-11, доступные в центре Salk Institute Cell Distribution Center, г. Сан-Диего, США, а также клетки X63 Ag8653 и SP-2, доступные в Американской коллекции типовых культур, г. Роквилл,

штат Мэриленд, США. Слияние осуществляют с использованием полиэтиленгликоля или тому подобного. Полученные в результате гибридомы затем выращивают в селективных средах, которые содержат одно или более веществ, которые ингибируют рост или выживание неслитых родительских клеток миеломы. Например, если в родительских клетках миеломы отсутствует гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза (HGPRT или HPRT), то среда для культивирования гибридом, как правило, включает гипоксантин, аминоптерин и тимидин (ГАТ-среда), которые предотвращают рост HGPRT-дефицитных клеток.

Гибридомы обычно выращивают на фидерном слое макрофагов. Макрофаги предпочтительно берут от одноплетных не относящихся к человеку млекопитающих, используемых для получения спленоцитов, и, как правило, за несколько дней до посева гибридом примиряют неполным адьювантом Фрейнда или т.п. Способы слияния описаны в работе Goding "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", p. 59-103 (Academic Press, 1986), которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Клеткам дают возможность расти в селекционной среде в течение времени, достаточного для образования колоний и выработки антител, обычно от 7 до 14 дней.

Затем колонии гибридом анализируют на продуцирование антител, которые специфически связываются с генными продуктами полипептида CD39. Анализ обычно представляет собой иммуоферментный анализ с колориметрическим методом детекции, хотя можно применять любой метод анализа, который можно адаптировать к лункам, в которых выращивают гибридомы. Другие виды анализа включают радиоиммуноанализ или флуоресцентную сортировку клеток. Лунки, подходящие для желаемого получения антител, исследуют на наличие одной или более колоний. Если присутствует более одной колонии, то клетки можно повторно клонировать и выращивать, чтобы гарантировать, что только одна клетка даст начало колонии, которая будет продуцировать требуемое антитело. Обычно антитела также тестируют на способность связываться с полипептидами CD39, например, клетками, экспрессирующими CD39.

Гибридомы, в отношении которых подтвердилось, что они продуцируют моноклональное антитело, можно выращивать в больших количествах в подходящей среде, такой как DMEM или RPMI-1640. Альтернативно, клетки гибридомы можно выращивать *in vivo* в виде асцитных опухолей у животного.

После достаточного роста для получения желаемого моноклонального антитела питательную среду, содержащую моноклональное антитело (или асцитическую жидкость), отделяют от клеток, и очищают присутствующее в ней моноклональное антитело. Очистку, как правило, осуществляют с помощью гелеэлектрофореза, диализа, хроматографии с использованием белка А или белка G, сефарозы, или антитела к Ig мыши, связанного с твердой подложкой, как, например, агарозные или сефарозные гранулы (все это описано, например, в руководстве по очистке антител Antibody Purification Handbook, Biosciences, публикация № 18-1037-46, Edition AC, которое настоящим включено в настоящий документ посредством ссылки).

Связанное антитело обычно элюируют из колонок с белком А/Г с использованием буферов с низким рН (глициновые или ацетатные буферы с рН 3,0 или ниже) с немедленной нейтрализацией антителосодержащих фракций. Эти фракции объединяют, подвергают диализу и концентрируют по мере необходимости.

Единственную видимую колонию из положительных лунок обычно повторно клонируют и повторно анализируют, чтобы убедиться, что обнаруживается и продуцируется только одно моноклональное антитело.

Антитела также можно получить путем отбора комбинаторных библиотек иммуноглобулинов, как описано, например, в работе Ward et al. Nature, 341 (1989), p. 544, полное описание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Идентификация одного или более антител, которые связываются с интересующим антигеном, т.е. CD39, в частности или по существу, с той же областью, детерминантой или эпитопом, что и моноклональное антитело I-394, I-395, I-396 или I-399, может быть легко проведена с использованием любого из множества иммунологических скрининговых анализов, в ходе которых можно оценить конкуренцию антител. Обычно многие такие анализы практикуются и хорошо известны в данной области (см., например, патент США № 5660827, выданный 26 августа 1997 г., который специально включен в настоящий документ посредством ссылки).

Например, если испытуемые антитела, которые необходимо проанализировать, получены от разных животных или даже имеют другой Ig-изотип, можно применить простой конкурентный анализ, где контрольные (I-394, I-395, I-396 или I-399) и испытуемые антитела смешивают (или предварительно адсорбируют) и наносят на образец, содержащий полипептиды CD39. Протоколы, основанные на вестерн-блоттинге и анализе с использованием систем BIACORE, подходят для таких конкурентных анализов.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предварительно смешивают контрольные антитела (например, I-394, I-395, I-396 или I-399), например, с различным количеством испытуемых антител (например, в соотношении приблизительно 1:10 или приблизительно 1:100) за некоторое время до нанесения на образец антигена CD39. В других вариантах реализации настоящего изобретения контрольные антитела и испытуемые антитела в разном количестве можно просто смешивать во время экспозиции образца антигена CD39. До тех пор, пока можно отличить связанные от свободных антител (на-

пример, методом разделения или промывания для удаления свободных антител), а также I-394 от испытуемых антител (например, используя видоспецифические или изотип-специфические вторичные анти-тела, или путем специфической маркировки I-394, I-395, I-396 или I-399 детектируемой меткой), можно определить, снижают ли испытуемые антитела степень связывания I-394, I-395, I-396 или I-399 с антигенами. Связывание (меченых) контрольных антител в отсутствие полностью нерелевантного антитела может служить высокой контрольной величиной. Низкое контрольное значение можно получить путем инкубации меченых (I-394, I-395, I-396 или I-399) антител с немечеными антителами точно такого же типа (I-394, I-395, I-396 или I-399), в ходе которой возникнет конкуренция и ослабнет связывание меченых антител. В тестовом анализе значительное снижение реактивности меченых антител в присутствии испытуемого антитела указывает на то, что испытуемое антитело "вступает в перекрестную реакцию" или конкурирует с меченым антителом (I-394, I-395, I-396 или I-399). Можно выбрать любое испытуемое антитело, которое ослабляет связывание I-394, I-395, I-396 или I-399 с антигенами CD39 по меньшей мере приблизительно на 50%, например, по меньшей мере приблизительно на 60% или более предпочтительно по меньшей мере приблизительно на 80 или 90% (например, приблизительно 65-100%), при любом соотношении I-394, I-395, I-396 или I-399 к испытуемому антителу от 1:10 до 1:100. В одном варианте реализации настоящего изобретения такое испытуемое антитело будет ослаблять связывание I-394, I-395, I-396 или I-399 с антигеном CD39 по меньшей мере приблизительно на 90% (например, приблизительно на 95%).

Конкуренцию также можно оценить, например, с помощью проточной цитометрии. При таком анализе клетки, несущие данный полипептид CD39, можно сначала инкубировать, например, вместе с I-394, а затем с испытуемым антителом, меченым флуорохромом или биотином. Считается, что антитело конкурирует с I-394, если связывание, возникшее в ходе предварительной инкубации с предельным количеством I-394, составляет приблизительно 80%, предпочтительно приблизительно 50%, приблизительно 40% или менее (например, приблизительно 30, 20 или 10%) от степени связывания (измеренного методом флуоресценции) антитела с I-394 без предварительной инкубации. Альтернативно, считается, что антитело конкурирует с I-394, если связывание с меченым (флуорохромом или биотином) антителом I-394 на клетках, предварительно инкубированных с предельным количеством испытуемого антитела, составляет приблизительно 80%, предпочтительно приблизительно 50%, приблизительно 40% или менее (например, приблизительно 30, 20 или 10%) от степени связывания без предварительной инкубации с испытуемым антителом.

Определение того, связывается ли антитело в области эпитопа, можно проводить способами, известными специалисту в данной области. В качестве примера таких способов картирования/характеризации можно привести определение области эпитопа для анти-CD39 антитела методом "отпечатка подошвы" с использованием химической модификации экспонированных аминов/карбоксилатов в соответствующем белке CD39. Конкретным примером такого метода "отпечатка подошвы" является водородно-дейтериевый обмен, детектируемый с помощью масс-спектрометрии (HXMS), в ходе которого происходит водородно-дейтериевый обмен между амидными протонами в ходе взаимодействия рецептор-белок и лиганд-белок, связывание и обратный обмен, при этом основные амидные группы, участвующие в связывании с белками, защищены от обратного обмена и, следовательно, останутся дейтерированными. На этой стадии соответствующие области можно идентифицировать с помощью пептического протеолиза, быстрого ВЭЖХ-разделения на микроколонках и/или масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением. См., например, Ehring H. *Analytical Biochemistry*, Vol. 267(2), p. 252-259 (1999), Engen, J.R. and Smith, D.L. (2001), *Anal. Chem.* 73, 256A-265A. Другим примером подходящей методики идентификации эпитопов является ядерно-магнитный резонанс (ЯМР) с картированием эпитопов, где, как правило, сравнивается положение сигналов в двумерных ЯМР-спектрах свободного антигена и комплекса антиген-антигенсвязывающий пептид, как, например, антитело. Обычно антиген селективно изотопно метят ^{15}N , поэтому в ЯМР-спектре видны только сигналы, соответствующие антигену, и никаких сигналов от антигенсвязывающего пептида. Сигналы антигена от аминокислот, участвующих во взаимодействии с антигенсвязывающим пептидом, обычно меняют свое положение в спектре комплекса по сравнению со спектром свободного антигена, и таким образом можно идентифицировать аминокислоты, участвующие в связывании. См., например, Ernst Schering Res. Found Workshop. 2004; (44):149-67; Huang et al., *Journal of Molecular Biology*, Vol. 281(1), p. 61-67 (1998); и Saito and Patterson, *Methods*. June 1996; 9(3):516-24.

Картирование/характеризацию эпитопа также можно выполнить с помощью масс-спектрометрии. См., например, Downard, J. *Mass Spectrom.* Апрель 2000; 35(4):493-503 и Kiselar and Downard, *Anal. Chem.* 1 May, 1999; 71(9):1792-1801. Методики расщепления протеазой также могут оказаться полезными в контексте картирования и идентификации эпитопов. Относящиеся к антигенной детерминанте области/последовательности можно определить путем расщепления протеазой, например используя трипсин в соотношении приблизительно 1:50 относительно CD39, или расщепления o/n при pH 7-8 с последующим масс-спектрометрическим анализом для идентификации пептидов. Пептиды, защищенные от расщепления трипсином анти-CD39 связывающим веществом, можно впоследствии идентифицировать путем сравнения образцов, подвергнутых расщеплению трипсином, и образцов, инкубированных вместе с ан-

тителом, а затем подвергнутых расщеплению, например, трипсином (таким образом, обнаруживая область узнавания связывающего вещества). Другие ферменты, такие как химотрипсин, пепсин и т.д., также, или альтернативно, могут быть использованы в аналогичных способах характеристики эпитопов. Кроме того, ферментативное расщепление может оказаться быстрым способом анализа того, находится ли потенциальная антигенная детерминантная последовательность в пределах области полипептида CD39, которая не подвергается поверхностному воздействию и, соответственно, скорее всего, не имеет отношения к иммуногенности/антигенности.

Сайт-направленный мутагенез является еще одним методом определения эпитопа для связывания. Например, при "аланиновом сканировании" каждый остаток в белковом сегменте заменяют остатком аланина и определяют последствия для аффинности связывания. Если мутация приводит к значительному снижению аффинности связывания, значит она, скорее всего, участвует в связывании. Моноклональные антитела, специфичные к структурным эпитопам (т.е. антитела, которые не связываются с несвернутым белком), можно использовать для подтверждения того, что замена на аланин не влияет на общую свертываемость белка. См., например, Clackson and Wells, *Science* 1995; 267:383-386 и Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93:1-6.

Электронную микроскопию также можно использовать для определения области узнавания эпитопа. Например, Ванг и соавторы (Wang et al., *Nature*, 1992; 355:275-278) применяли криоэлектронную микроскопию, реконструировали трехмерное изображение и прибегали к рентгеновской кристаллографии для определения физического отпечатка Fab-фрагмента на поверхности капсида нативного вируса мозаики вигны.

Другие виды безмаркерного анализа для оценки эпитопов включают поверхностный плазмонный резонанс (ППР, BIACORE) и рефлектометрическую интерференционную спектроскопию (РИС). См., например, Fagerstam et al., *Journal of Molecular Recognition*, 1990; 3:208-14; Nice et al., *J. Chromatogr.* 1993; 646:159-168; Leipert et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998; 37:3308-3311; Kroger et al., *Biosensors and Bioelectronics*, 2002; 17:937-944.

Следует также отметить, что антитело, связывающееся с тем же или по существу тем же эпитопом, что и антитело, можно идентифицировать посредством одного или более конкурентных анализов, описанных в настоящем документе в качестве примеров.

Как правило, анти-CD39 антитело, предложенное в настоящем документе, аффинно к соответствующему полипептиду CD39 в диапазоне от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^{11} M^{-1} (например, от приблизительно 10^8 до приблизительно 10^{10} M^{-1}). Например, в конкретном аспекте настоящего изобретения предложено анти-CD39 антитело, которое имеет среднюю константу диссоциации (K_D) менее $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ относительно CD39 согласно, например, результатам ППР (проведенного, например, на аналитическом устройстве BIAcore™). В более конкретном иллюстративном аспекте настоящего изобретения предложены анти-CD39 антитела с K_D от приблизительно 1×10^{-8} до приблизительно $1 \times 10^{-10} \text{ M}$ или от приблизительно 1×10^{-9} до приблизительно $1 \times 10^{-11} \text{ M}$ относительно CD39 соответственно. В одном варианте реализации настоящего изобретения связывание представляет собой моновалентное связывание. В одном варианте реализации настоящего изобретения связывание представляет собой бивалентное связывание.

Антитела могут характеризоваться, например, средним значением K_d не более чем (то есть, лучшей аффинностью, чем) приблизительно 100, 60, 10, 5 или 1 нмоль, предпочтительно субнаномоль или, необязательно, не более чем приблизительно 500, 200, 100 или 10 пмоль. K_d можно определить, например, путем иммобилизации рекомбинантно продуцируемых белков CD39 человека на поверхности чипа с последующим нанесением испытуемого в растворе антитела. В одном варианте реализации настоящего изобретения способ дополнительно включает этап отбора антител из пункта (b), которые способны конкурировать за связывание с CD39 с антителом I-394.

В одном аспекте любого из вариантов реализации настоящего изобретения антитела, полученные в соответствии с описанными способами, представляют собой моноклональные антитела. В другом аспекте настоящего изобретения не относящееся к человеку животное, используемое для получения антител в соответствии с описанными в настоящем документе способами, является млекопитающим, например грызуном, быком, свиньей, птицей, верблюдом, лошастью, кроликом, козой или овцой.

ДНК, кодирующая антитело, которое связывается с эпитопом, присутствующим на поверхности полипептида CD39, выделяют из гибридомы и помещают в соответствующий вектор экспрессии для трансфекции в подходящего хозяина. Хозяина затем используют для рекомбинантного получения антитела или его вариантов, например гуманизированной версии этого моноклонального антитела, активных фрагментов антитела, химерных антител, включающих антигенсвязывающую часть антитела, или версий, содержащих его детектируемое количество.

ДНК, кодирующая моноклональные антитела по настоящему изобретению, например, антитело I-394, может быть легко выделена и секвенирована с использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антител мыши). После выделения ДНК может быть помещена в экс-

прессионные векторы, которые затем трансфицируются в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки почки обезьяны, трансформированные вирусом SV-40 (COS), клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки миеломы, которые иначе не продуцируют белок иммуноглобулина, для синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. Как описано в другом месте настоящего документа, такие последовательности ДНК могут быть модифицированы для любой из множества целей, например для гуманизации антител, получения фрагментов или производных или для модификации последовательности антитела, например, в сайте связывания с антигеном с тем, чтобы оптимизировать специфичность связывания с антителом. В одном варианте реализации настоящего изобретения предложена выделенная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела, а также рекомбинантную клетку-хозяина, содержащую (например, в своем геноме) такую нуклеиновую кислоту. Рекомбинантная экспрессия в бактериях ДНК, кодирующей антитело, хорошо известна в данной области (см., например, Skerka et al., *Curr. Opin. in Immunol.*, 5, p. 256 (1993) и Pluckthun, *Immunol.* 130, p. 151 (1992).

Фрагменты и производные антител (которые охватываются термином "антитело" или "антитела" согласно тому, как они используются в настоящем документе, если не указано иное или явно не противоречит контексту) можно получить известными в данной области способами. "Фрагменты" включают часть интактного антитела, как правило, сайт связывания или вариабельную область антигена. К фрагментам антитела относятся фрагменты Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ и Fv; диатела; любой фрагмент антитела, который представляет собой полипептид, имеющий первичную структуру, состоящую из одной непрерывной последовательности смежных аминокислотных остатков (так называемый в настоящем документе "одноцепочечный фрагмент антитела" или "одноцепочечный полипептид"), включая помимо прочего (1) одноцепочечные молекулы Fv, (2) одноцепочечные полипептиды, содержащие только один вариабельный домен легкой цепи, или ее фрагмент, который содержит три CDR вариабельного домена легкой цепи, без ассоциированного фрагмента тяжелой цепи, и (3) одноцепочечные полипептиды, имеющие только одну вариабельную область тяжелой цепи или ее фрагмент, содержащий три CDR вариабельной области тяжелой цепи, без ассоциированного фрагмента легкой цепи; а также мультиспецифические (например, биспецифические) антитела, образованные из фрагментов антител. А также, помимо прочего, нанотело, доменное антитело, однодоменное антитело или "dAb".

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

В одном аспекте настоящего изобретения агент представляет собой фрагмент антитела, включающий константный домен, выбранный из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В одном аспекте настоящего изобретения агент представляет собой фрагмент антитела, выбранный из фрагмента Fab, фрагмента Fab', фрагмента Fab'-SH, фрагмента F(ab)₂, фрагмента F(ab')₂, фрагмента Fv, Ig тяжелой цепи (Ig ламы или верблюда), фрагмента Vhh, однодоменного Fv и одноцепочечного фрагмента антитела. В одном аспекте настоящего изобретения агент представляет собой молекулу, полученную из синтетического или полусинтетического антитела, выбранную из scFV, dsFV, мини-антитела, диатела, триатела, каппа-тела, IgNAR; а также мультиспецифическое антитело. В одном аспекте настоящего изобретения антитело находится в по меньшей мере частично очищенной форме. В одном аспекте настоящего изобретения антитело находится в по существу изолированной/выделенной форме.

Анти-CD39, как, например, антитело, может быть включено в фармацевтическую композицию в концентрации от 1 до 500 мг/мл, где указанная композиция имеет pH от 2,0 до 10,0. Композиция может дополнительно содержать буферную систему, консервант(ы), регулятор(ы) тоничности, хелатор(ы), стабилизаторы и поверхностно-активные вещества. В одном варианте реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция представляет собой водную композицию, т.е. композицию, содержащую воду. Такая композиция, как правило, представляет собой раствор или суспензию. В другом варианте реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция представляет собой водный раствор.

Термин "водная композиция" определяется как композиция, содержащая по меньшей мере 50 мас.% воды. Аналогично, термин "водный раствор" определяется как раствор, содержащий по меньшей мере 50 мас.% воды, а термин "водная суспензия" определяется как суспензия, содержащая по меньшей мере 50 мас.% воды.

В другом варианте реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция представляет собой лиофилизированную композицию, к которой врач или пациент перед применением добавляет растворители и/или разбавители.

В другом варианте реализации настоящего изобретения фармацевтическая композиция представляет собой сухую композицию (например, лиофилизированную или высушенную распылением), готовую для применения без какого-либо предварительного разбавления.

В другом аспекте настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит водный раствор такого антитела и буфер, где антитело присутствует в концентрации от 1 мг/мл или больше и где указанная композиция имеет pH от приблизительно 2,0 до приблизительно 10,0.

В другом варианте реализации настоящего изобретения pH композиции находится в диапазоне, выбранном из от приблизительно 2,0 до приблизительно 10,0, от приблизительно 3,0 до приблизительно

9,0, от приблизительно 4,0 до приблизительно 8,5, от приблизительно 5,0 до приблизительно 8,0 и от приблизительно 5,5 до приблизительно 7,5.

В другом варианте реализации настоящего изобретения буфер выбран из группы, состоящей из ацетата натрия, карбоната натрия, цитрата, глицилглицина, гистидина, глицина, лизина, аргинина, дигидрофосфата натрия, динатрийфосфата, фосфата натрия, а также трис-(гидроксиметил)аминометана, бисина, трицина, яблочной кислоты, сукцината, малеиновой кислоты, фумаровой кислоты, винной кислоты, аспарагиновой кислоты или их смесей. Каждый из этих буферов представляет собой альтернативный вариант реализации настоящего изобретения.

В другом варианте реализации настоящего изобретения композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый консервант. В другом варианте реализации настоящего изобретения композиция дополнительно содержит изотонический агент. В другом варианте реализации настоящего изобретения композиция также содержит хелатор. В дополнительном варианте реализации настоящего изобретения композиция дополнительно содержит стабилизатор. В другом варианте реализации настоящего изобретения композиция дополнительно содержит поверхностно-активное вещество. Для удобства сделана ссылка на работу Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19-е изд., 1995.

В пептидной фармацевтической композиции по настоящему изобретению могут присутствовать и другие ингредиенты. Такие дополнительные ингредиенты могут включать смачивающие агенты, эмульгаторы, антиоксиданты, наполнители, регуляторы тоничности, хелаторы, ионы металлов, масляные носители, белки (например, сывороточный альбумин человека, желатин или белки) и цвиттерион (например, аминокислоту, такую как бетаин, таурин, аргинин, глицин, лизин и гистидин). Такие дополнительные ингредиенты, конечно, не должны неблагоприятно влиять на общую стабильность фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

Введение фармацевтических композиций по настоящему изобретению может осуществляться несколькими путями, например, внутривенно. Подходящие композиции из антител также можно определить путем изучения опыта с другими уже разработанными терапевтическими моноклинальными антителами. Было показано, что некоторые моноклональные антитела эффективны в клинических ситуациях, например, Ритуксан (ритуксимаб), Герцептин (трастузумаб), Ксолар (омализумаб), Бексар (тозитумомаб), Кампат (алемтузумаб), Зевалин, Онколим и другие подобные препараты могут использоваться с антителами по настоящему изобретению.

Также предложены наборы, которые содержат фармацевтическую композицию, содержащую анти-CD39 антитело, а также агент, который вызывает высвобождение АТФ из опухолевых клеток, и фармацевтически приемлемый носитель в терапевтически эффективном количестве, подобранном для применения в предыдущих способах. Наборы, необязательно, также могут содержать инструкции, например, содержащие график применения, что позволит пользователю (например, врачу, медсестре или пациенту) применять содержащуюся в наборе композицию к пациенту, имеющему рак (например, солидную опухоль). В комплект также может входить шприц.

Необязательно, наборы содержат несколько однодозовых упаковок фармацевтических композиций, каждая из которых содержит эффективное количество анти-CD39 антитела или агента, который вызывает высвобождение АТФ из опухолевых клеток для однократного введения по способам, описанным выше. Инструменты или устройства, необходимые для введения фармацевтической композиции (композиций), также могут входить в набор. Например, в набор может входить один или несколько предварительно заполненных шприцев, содержащих некоторое количество анти-CD39 антитела и агента, который вызывает высвобождение АТФ из опухолевых клеток.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложен набор для лечения рака у пациента-человека, который включает:

(а) дозу анти-CD39 антитела, которая нейтрализует активность sCD39, где, необязательно, антитело содержит гипервариабельную область (например, домены CDR1, CDR2 и CDR3) вариабельной области тяжелой цепи антитела I-394, и гипервариабельную область (например, домены CDR1, CDR2 и CDR3) вариабельной области легкой цепи антитела I-394;

(b) дозу агента, который вызывает высвобождение АТФ из опухолевых клеток; и

(с) необязательно, инструкции по применению анти-CD39 антитела и агента, который вызывает высвобождение АТФ из опухолевых клеток в любом из способов, описанных в настоящем документе.

Диагностика, прогнозирование и лечение злокачественных образований.

В данном документе описаны способы, применяемые для диагностики, прогнозирования, мониторинга, лечения и профилактики рака у индивидуума путем использования анти-CD39 антител для усиления активности агента, который вызывает внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток.

Внеклеточный АТФ высвобождается из опухолевых клеток в случае стресса (механического, гипотонического или гипоксического) или в случае гибели клеток. Некроз способствует пассивному высвобождению АТФ посредством высвобождения общего клеточного содержимого, тогда как апоптоз способствует высвобождению АТФ путем активации каспаз 3 и 9, которые расщепляют и активируют панексин-1 (транспортер АТФ). К агентам, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, могут относиться химиотерапия, лучевая терапия и, в общем, агенты, которые вызывают

апоптоз и, следовательно, способствуют высвобождению АТФ. Было показано, что агенты, которые индуцируют внеклеточное высвобождение АТФ, вызывают иммуногенную гибель клеток. Например, значительное высвобождение АТФ может быть вызвано антрациклинами, оксалиплатином, цисплатином, рентгеновскими лучами, ингибитором ПАРП, таксанами, антрациклинами, ДНК-повреждающими агентами, камптотецинами, эпотилонами, митомицинами, комбретастатинами, алкалоидами барвинка, азотистыми ипритами, майтанзиноидами, калихеамицинами, дуокармицинами, тубулизинами, доластатинами, ауристатинами, энединидами, аматоксинами, пирролбензодиазепинами, этилениминами, радиоактивными изотопами, терапевтическими белками или пептидами, а также токсинами или их фрагментами.

АТФ также может высвобождаться посредством введения вместе с истощающими антителами, которые связываются с антигенами, экспрессируемыми на поверхности раковых клеток (например, опухолевый антиген), например, антителами, связанными с химиотерапевтическим агентом, который вызывает высвобождение АТФ, антителами, которые способны медирировать апоптоз, или антителами, которые направляют АЗКЦ к раковым клеткам (например, когда антитело имеет домен Fc изотипа IgG1 человека для медиации АЗКЦ).

Антрациклины включают, например, даунорубин, доксорубин, эпирубин или идарубин, необязательно их липосомальные формулы, например, липосомальный даунорубин, такой как DaunoXome™ или Vuxeos™ или CPX-351 (комбинация цитарабина и даунорубина). Антрациклины широко используются для лечения солидных и гематологических злокачественных образований, включая, например, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) и саркому Капоши. Доксорубин и его производное, эпирубин, применяются при раке молочной железы, солидных опухолях у детей, саркоме мягких тканей и агрессивной лимфоме. Даунорубин применяется для лечения острых лимфобластных или миелобластных лейкозов, а его производное, идарубин, применяется при множественной миеломе, неходжкинских лимфомах и раке молочной железы. Неморубин применяется для лечения гепатоцеллюлярной карциномы, а пиксантрон - для терапии второй линии неходжкинских лимфом. Сабарубин (Sabarubicin) применяется для лечения немелкоклеточного рака легких, гормонорезистентного метастатического рака предстательной железы и рака яичников, устойчивого к действию таксана или препаратов на основе платины. Валрубин применяется для местного лечения рака мочевого пузыря.

Препараты на основе платины включают, например, оксалиплатин, цисплатин, карбоплатин, недаплатин, фенантриплатин, пикоплатин, сатраплатин.

Таксаны включают, например, паклитаксел (Таксол) и доцетаксел (Таксотер).

Повреждающие ДНК агенты включают, например, интеркалирующие ДНК агенты, к примеру, агент, который внедряется в структуру ДНК клетки и связывается с ДНК, тем самым вызывая повреждение ДНК (например, даунорубин). Соединения включают ингибиторы топоизомеразы, химические соединения, которые блокируют действие топоизомеразы (топоизомеразы I и II). Такие соединения используются для терапии широкого спектра солидных опухолей и гематологических злокачественных образований, особенно лимфом. Ингибиторы топоизомеразы I включают камптотецины, например иринотекан (одобрен для лечения рака толстой кишки), топотекан (одобрен для лечения рака яичников и легких), камптотecin, ламелларин D, инденоизохинолин, индимитекан. Другие камптотецины включают силатекан, коситекан, экзатекан, луртотекан, гиматекан, белотекан и рубитекан. Ингибиторы топоизомеразы II включают, например, этопозид (VP-16), тенипозид, доксорубин, даунорубин, митоксантрон, амсакрин, эллиптицины, ауринтрикарбоновую кислоту, а также NU-331, хинолон, синтезированный из каннабидиола.

Известно, что ингибиторы ПАРП меняют тип гибели клеток с некроза на каспазо-независимый апоптоз в раковых клетках. Ингибирование ПАРП приводит к увеличению числа внутриклеточного АТФ, что, в свою очередь, приводит к внеклеточному высвобождению АТФ при апоптозе. Семейство ферментов поли(АДФ-рибозо)полимеразы (ПАРП) трансформирует НАД⁺ (никотинамидадениндинуклеотид) в никотинамид и АДФ-рибозу с образованием длинных и разветвленных (АДФ-рибозных) полимеров на остатках глутаминовой кислоты ряда акцепторных белков, обычно ассоциированных с хроматином. ПАРП-1, наиболее распространенная ПАРП, представляет собой ядерный фермент, который катализирует образование поли(АДФ-рибозы) на целевых белках с использованием НАД⁺ в качестве субстрата. Ингибиторы ПАРП обычно содержат в качестве ключевых фармакофоров бензоксазолные или бензамидные фрагменты, также сообщалось о различных производных бензамида. К одобренным ингибиторам ПАРП, которые можно применять в соответствии с настоящим изобретением, относятся Олапариб (AZD-2281, Lynparza® от Astra Zeneca, одобрен для лечения рака яичников, также эффективен против рака молочной железы, рака простаты и колоректального рака), Рукапариб (PF-01367338, Rubraca® от Clovis Oncology, одобрен для лечения рака яичников), Нирапариб (MK-4827, Zejula® от Tesaro, одобрен для лечения эпителиального рака яичников, рака яичников, рака маточных труб и первичного рака брюшины). Также к ингибиторам ПАРП, которые можно применять в соответствии с настоящим изобретением, относятся Талазопариб (Talazoparib, BMN-673, BioMarin Pharmaceutical Inc., Pfizer) против гематологических, а также прогрессирующих или рецидивирующих солидных опухолей, Велипариб (Veliparib,

ABT-888, разработанный компанией AbbVie) против рака яичников, трижды негативного рака молочной железы, немелкоклеточного рака легких, меланомы, CEP 9722 против немелкоклеточного рака легких, E7016 (разработано компанией Eisai) против меланомы, а также Памипариб (Pamiparib, BGB-290), разработанный компанией Beigene для лечения различных солидных опухолей.

Эпотилоны включают, например, эпотилон В и его различные аналоги, например иксабепилон (BMS-247550) одобрен для лечения рака молочной железы. Алкалоиды барвинка включают, например, винбластин, винкристин, виндезин и винорелбин. Азотистые иприты включают, например, циклофосфамид, хлорамбуцил, урамустин, ифосфамид, мелфалан и бендамустин. Майтанзиноиды включают, например, ансамитосин (Ansamitocin) или мертанзин (DM1), или DM4, разработанные компанией Immunogen Inc.

Агенты могут быть в любой подходящей конфигурации или лекарственной форме, включая, например, в виде свободного соединения или в виде части конъюгата, в лекарственной форме с наночастицами, в капсуле (например, в липосоме), в каждом случае, необязательно, также в комбинации с дополнительными фармацевтически активными агентами. Для удобства агенты можно конъюгировать с нацеливающим фрагментом, таким как иммуноконъюгат. Термины "иммуноконъюгат" и "конъюгат на основе антитела" используются взаимозаменяемо и относятся к антигенсвязывающему агенту, например к антителосвязывающему белку или антителу, конъюгированному с другим фрагментом (например, цитотоксическому веществу, химиотерапевтическому средству, которое вызывает высвобождение АТФ, как описано в данном документе). Иммуноконъюгат, содержащий антигенсвязывающий агент, конъюгированный с цитотоксическим веществом, также может называться "конъюгат антитело-лекарственный препарат" или "КАЛП".

Хотя описанные в настоящем документе схемы и способы лечения особенно полезны для лечения солидных опухолей, описанные схемы и способы лечения также можно использовать применительно к различным гематологическим раковым заболеваниям. Способы и композиции по настоящему изобретению применяются, например, для лечения различных видов рака и других пролиферативных заболеваний, включая, помимо прочего, рак, в том числе рак мочевого пузыря, молочной железы, толстой кишки, почек, печени, легких, яичников, матки, предстательной железы, поджелудочной железы, желудка, шейки матки, щитовидной железы, головы и шеи (плоскоклеточный рак головы и шеи), кожи (например, меланома); гематобласты лимфоидного происхождения, включая лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, В-клеточная лимфома, Т-клеточная лимфома, лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома, волосатоклеточный лейкоз и лимфома Беркитта, множественная миелома; гематобласты миелоидного происхождения, включая острый и хронический миелолейкоз, промиелоцитарный лейкоз и миелодиспластический синдром; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому, рабдомиосаркому; другие опухоли, включая меланому, семиному, тератоканциному, нейробластому и глиому; опухоли центральной и периферической нервной системы, включая астроцитому, нейробластому, глиому и невриному; опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; и другие опухоли, включая меланому, пигментную ксеродерму, кератоакантому, семиному и фолликулярный рак щитовидной железы.

Комбинированная терапия для лечения рака, предлагаемая в настоящем документе, включает применение нейтрализующего анти-CD39 агента (например, антитела) и агента, который вызывает внеклеточное высвобождение АТФ, для лечения субъектов, страдающих раком. В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено анти-CD39 антитело и терапия (например, агент), которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ, для использования в комбинации для лечения субъектов, имеющих солидную опухоль (например, солидную опухоль, прогрессирующую рефрактерную солидную опухоль), или субъектов, имеющих гематологическую опухоль. В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено анти-CD39 антитело (например, имеющее дополнительные характеристики, описанные в настоящем документе) для применения в лечении индивидуума, имеющего рак, где лечение включает введение индивидууму анти-CD39 антитела в комбинации со средством для стимулирования апоптоза в раковых клетках (например, чтобы вызвать внеклеточное высвобождение АТФ в раковых клетках). В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено анти-CD39 антитело (например, имеющее дополнительные характеристики, описанные в настоящем документе) для применения в лечении индивидуума, имеющего рак, где лечение включает введение индивидууму анти-CD39 антитела в комбинации с фармацевтической композицией, содержащей (а) средство (например, агент или терапевтическое средство) для стимулирования апоптоза раковых клеток и (б) фармацевтически приемлемый носитель. В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено анти-CD39 антитело (например, имеющее дополнительные характеристики, описанные в настоящем документе) для применения в лечении индивидуума, имеющего рак, где лечение включает введение индивидууму анти-CD39 антитела в комбинации с фармацевтической композицией, содержащей (а) средство (например, агент или терапевтическое средство) для стимулирования внеклеточного высвобождения АТФ в раковых клетках и (б) фармацевтически приемлемый носитель. В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено анти-CD39 антитело для применения в комбинации с препаратом на основе платины (например,

оксалиплатин, цисплатин, карбоплатин, недаплатин, фенантриплатин, пикоплатин, сатраплатин или комбинированная терапия, включающая препарат на основе платины) для лечения индивидуума, имеющего солидную опухоль. В одном варианте реализации настоящего изобретения солидная опухоль представляет собой рак легких, плоскоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, рак яичников, карциному, плоскоклеточный рак головы и шеи, колоректальный рак, рак уротелия, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак желудка, рак пищевода или рак молочной железы. В одном варианте реализации настоящего изобретения комбинированная терапия, включающая препарат на основе платины, представляет собой фолфокс (FOLFOX, фолиновая кислота, 5-фторурацил и оксалиплатин). В одном варианте реализации настоящего изобретения комбинированная терапия, включающая препарат на основе платины, включает также карбоплатин и таксан (например, паклитаксел).

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено анти-CD39 антитело для применения в комбинации с препаратом на основе таксана (например, паклитаксел (Taxol™) или доцетаксел (Taxotere™)) для лечения индивидуума, имеющего солидную опухоль, например, рак яичников, рак молочной железы.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено анти-CD39 антитело для применения в комбинации с гемцитабином для лечения индивидуума, имеющего солидную опухоль, например рак яичников.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено анти-CD39 антитело для применения в сочетании с препаратом на основе антрациклина (например, даунорубицином, доксорубицином, эпирубицином или идарубицином) для лечения индивидуума, имеющего солидную опухоль, например, рак яичников, рак молочной железы, немелкоклеточный рак легких, колоректальный рак, рак предстательной железы, саркому мягких тканей или рак мочевого пузыря. В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено анти-CD39 антитело для применения в комбинации с препаратом на основе антрациклина (например, даунорубицином, доксорубицином, эпирубицином или идарубицином) для лечения индивидуума, имеющего гематологическую опухоль, например острый миелоцитарный лейкоз (ОМЛ), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ), хронический миелолейкоз (ХМЛ), лимфому, острый лимфобластный лейкоз, миелобластный лейкоз, множественную миелому или неходжкинскую лимфому.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено анти-CD39 антитело для применения в комбинации с ингибитором ПАРП (например, ингибитором ПАРП-1, олапарибом, рупарацином, нирапарибом, талазопарибом, велипарибом, CEP 9722, E7016 или памипарибом) для лечения индивидуума, имеющего солидную опухоль, например эпителиальный рак, рак яичников, рак молочной железы, рак предстательной железы, колоректальный рак, рак маточных труб, перитонеальный рак, рак легких, немелкоклеточный рак легких или меланому.

Комбинированное лечение, описанное в данном документе, может быть особенно эффективным при лечении рака, характеризующегося высокой экспрессией CD39 (с/без предварительного этапа оценки экспрессии или уровней CD39 у индивидуума), включая, в частности, рак яичников, рак желудка и рак пищевода.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено анти-CD39 антитело для применения в комбинации с препаратом на основе платины (например, карбоплатином) и, необязательно, в комбинации с гемцитабином для лечения индивидуума, имеющего рак яичников.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено анти-CD39 антитело для применения в комбинации с препаратом на основе платины (например, оксалиплатином), необязательно, где анти-CD39 антитело применяется в комбинации с FOLFOX (фолиновая кислота, 5-фторурацил и оксалиплатин) для лечения индивидуума, имеющего рак желудка или рак пищевода.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено анти-CD39 антитело для применения в комбинации с препаратом на основе платины (например, карбоплатином) и, необязательно, в комбинации с таксаном (например, паклитакселом) для лечения индивидуума, имеющего немелкоклеточный рак легких (НМРЛ), необязательно, где НМРЛ представляет собой плоскоклеточный рак легких.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено анти-CD39 антитело для применения в комбинации с FOLFOX.

В одном варианте реализации настоящего изобретения солидная опухоль представляет собой рак яичников и индивидуума лечат анти-CD39 антителом в комбинации с оксалиплатином или карбоплатином, необязательно дополнительно в комбинации с гемцитабином. Необязательно, в любом варианте реализации настоящего изобретения рак яичников представляет собой рак яичников, резистентный к действию препаратов на основе платины. Индивидуума, имеющего платинорезистентный рак яичников, можно, например, охарактеризовать как имеющего рак, который прогрессировал, рецидивировал или не отвечал на предшествующую терапию препаратом на основе платины, который не содержит анти-CD39 антитело. В другом варианте реализации настоящего изобретения рак яичников можно охарактеризовать как рак яичников, чувствительный к действию препаратов на основе платины.

Комбинированная терапия, включающая анти-CD39 антитело, может быть эффективно применена в усилении эффекта агента или терапии, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ из опухо-

левых клеток и/или гибель опухолевых клеток. Это может оказаться полезно, например, в отношении индивидуума, имеющего рак (например, рак легких, рак яичников, колоректальный рак, рак желудка, рак пищевода), который резистентен к агенту или терапии, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток и/или гибель опухолевых клеток. Индивидуум, имеющий рак, который резистентен к агенту или терапии, может, например, быть охарактеризован как имеющий рак, который прогрессировал, рецидивировал или не отвечал на предшествующее лечение таким агентом или терапией (или лечебный режим, включающий такой агент или терапию, где режим не включает анти-CD39 антитело).

Например, индивидуума, имеющего рак (например, рак молочной железы, рак яичников, колоректальный рак, рак желудка, рак пищевода), который устойчив к действию определенного вида агента или терапии, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток (например, таксан, препараты на основе платины, ингибитор ПАРП или комбинированная терапия, включающая перечисленное), можно лечить анти-CD39 антителом в комбинации с указанным видом агентом или терапией, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток. Например, в одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело можно использовать в комбинации с таксаном для лечения индивидуума, имеющего резистентный к таксану рак. В другом примере анти-CD39 антитело можно применять в комбинации с препаратом на основе платины для лечения индивидуума, имеющего рак, резистентный к препарату на основе платины. В другом примере анти-CD39 антитело можно применять в комбинации с ингибитором ПАРП для лечения индивидуума, имеющего резистентный к ингибитору ПАРП рак.

В другом варианте реализации настоящего изобретения индивидуума, имеющего рак, который является резистентным к определенному виду агенту или терапии, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток (например, таксан, препарат на основе платины, ингибитор ПАРП или комбинированная терапия, включающая перечисленное), можно лечить анти-CD39 антителом в комбинации с другим видом агентом или терапией, вызывающими внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток. Например, в одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело можно применять в комбинации с таксаном для лечения индивидуума, имеющего резистентный к платине рак. В другом варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело можно применять в комбинации с препаратом на основе платины для лечения индивидуума, имеющего резистентный к таксану рак. В другом варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело можно применять в комбинации с ингибитором ПАРП для лечения индивидуума, имеющего резистентный к таксану и/или платине рак.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело, которое способно связываться с растворимым белком внеклеточного домена CD39 человека и ингибировать АТФазную активность растворимого белка внеклеточного домена CD39 человека для применения в лечении или профилактике рака у индивидуума, где лечение включает следующее:

а) определение, имеет ли индивидуум плохой прогноз ответа на лечение агентом, который вызывает внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, и

б) после определения, что у индивидуума плохой прогноз ответа на лечение агентом, который вызывает внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, введение индивидууму антитела, которое способно связываться с белком CD39 человека и ингибировать АТФазную активность белка CD39 человека в присутствии экзогенно добавленного АТФ.

Необязательно, индивидуум имеет рак, резистентный к платине, таксану или ингибитору ПАРП. Необязательно, этап определения у индивидуума плохого прогноза ответа на лечение агентом, который вызывает внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, включает оценку, характеризуются ли иммунные эффекторские клетки в биологическом образце, взятом у индивидуума, одним или более маркерами супрессии и/или истощения иммунной системы, где наличие или и/или повышенный уровень иммунных эффекторских клеток, характеризующихся одним или более маркерами супрессии и/или истощения иммунной системы, указывает на плохой прогноз ответа на лечение агентом, который вызывает внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток.

Преимущество применения анти-CD39 антитела для усиления эффекта от агента или терапии, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток и/или гибель опухолевых клеток, также можно использовать для достижения улучшенных результатов у индивидуума, имеющего рак (например, рак легких, рак яичников, колоректальный рак, рак желудка, рак пищевода), который чувствителен (например, спрогнозирован или определен как чувствительный) к агенту или терапии, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток и/или гибель опухолевых клеток. Например, в одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело можно применять в комбинации с таксаном для лечения индивидуума, имеющего таксаночувствительный рак. В другом примере анти-CD39 антитело можно применять в комбинации с препаратом на основе платины для лечения индивидуума, имеющего рак, чувствительный к платине. В другом примере анти-CD39 антитело можно применять в комбинации с ингибитором ПАРП для лечения индивидуума, имеющего чувствительный к ингибитору ПАРП рак.

В соответствии с настоящим изобретением адъюнктивное или комбинированное применение (одновременное введение) включает одновременное введение соединений в одинаковой или разных дозированных формах или раздельное введение соединений (например, последовательное введение). Таким образом, анти-CD39 антитело и агент, который вызывает внеклеточное высвобождение АТФ, можно одновременно вводить в составе одной композиции. Альтернативно, анти-CD39 антитело и агент, который вызывает внеклеточное высвобождение АТФ, могут быть предназначены для раздельного введения и вводиться параллельно или последовательно.

Пациента, имеющего рак, можно лечить с помощью анти-CD39 агента и агента, который вызывает внеклеточное высвобождение АТФ с/без предварительного этапа детекции с целью оценки АТФазной активности опухолевых клеток, опухолевого АТФ (например, внутриопухолевой концентрации АТФ) и/или экспрессии CD39 на клетках. Необязательно, способы лечения могут включать этап обнаружения нуклеиновой кислоты или полипептида CD39 в биологическом образце опухоли (например, на поверхности опухоли или инфильтрирующей опухоль клетке), взятом у индивидуума.

Необязательно, способы лечения могут включать этап обнаружения нуклеиновой кислоты или полипептида CD39 в биологическом образце, взятом у индивидуума. К биологическим образцам относятся любая подходящая биологическая жидкость (например, сыворотка, лимфа, кровь), образец клеток или образец ткани. Любое определение, что клетки в биологическом образце (например, раковые клетки, лимфоциты, к примеру, регуляторные Т-клетки, В-клетки, Т-клетки) экспрессируют CD39 на высоком уровне, или что большое количество клеток в образце является CD39-положительными, или демонстрируют высокую степень окрашивания анти-CD39 антителом (по сравнению с образцом сравнения), может указывать на то, что у индивидуума - рак, который лучше всего лечить агентом, который ингибирует CD39 в комбинации с агентом, который вызывает высвобождение АТФ из опухолевых клеток. В одном варианте реализации настоящего изобретения способы лечения могут включать этап обнаружения нуклеиновой кислоты или полипептида CD39 в биологическом образце опухоли (например, на поверхности инфильтрирующей опухоль клетки), взятом у индивидуума.

В предложенных способах лечения анти-CD39 антитело и агент или терапия, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ, можно вводить отдельно, вместе или последовательно, или в виде "коктейля" (при необходимости). В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения агент или терапия, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ, вводят до введения анти-CD39 антитела. В предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело вводят до или одновременно с введением агента или терапии, вызывающих внеклеточное высвобождение АТФ. В одном предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело вводят одновременно или за 0-15 дней до курса или цикла лечения агентом или терапией, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ. Например, анти-CD39 антитело можно вводить приблизительно за 0-15 дней до введения агента или терапии, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело вводят по меньшей мере за 1, 12, 24 или 48 ч до введения агента или терапии, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело вводят по меньшей мере за 1, 12, 24 или 48 ч до введения агента или терапии, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ, но не более чем за 1 неделю до введения агента или терапии, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело вводят в период между 0 и 48 ч или между 1 и 48 ч до введения агента или терапии, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело вводят в период от приблизительно 30 мин до приблизительно 2 недель, от приблизительно 30 мин до приблизительно 1 недели, от приблизительно 1 ч до приблизительно 2 недель, от приблизительно 1 ч до приблизительно 1 недели, от приблизительно 1 до приблизительно 2 ч, от приблизительно 2 до приблизительно 4 ч, от приблизительно 4 до приблизительно 6 ч, от приблизительно 6 до приблизительно 8 ч, от приблизительно 8 ч до 1 дня, от приблизительно 24 или 48 ч до приблизительно 5, 6 или 7 дней, от приблизительно 1 ч до приблизительно 5, 6 или 7 дней, от приблизительно 1 ч до приблизительно 15 дней, от приблизительно 24 или 48 ч до приблизительно 15 дней, от приблизительно 3 до 7 дней или от приблизительно 1 за 5 дней до введения агента или терапии, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело вводят одновременно с агентом или терапией, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ. В некоторых предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения агент или терапию, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ, вводят по меньшей мере дважды в течение 15 дней или приблизительно двух недель после введения анти-CD39 антитела. В других вариантах реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело вводят после агента или терапии, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело вводят от приблизительно 30 мин до приблизительно 2 недель, от приблизительно 30 мин до приблизительно 1 недели, от приблизительно 1 до приблизительно 2 ч, от приблизительно 24, 36 или 48 ч, от приблизительно 1 до приблизительно 2 ч, от приблизительно 2 до приблизительно 4 ч, от приблизительно 4 до приблизительно 6 ч, от приблизительно 6 до

приблизительно 8 ч, от приблизительно 8 ч до 1 дня или от приблизительно 1 до приблизительно 2, 3, 4 или 5 дней после введения агента или терапии, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ.

Агент или терапия, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ, можно применять в таких количествах и схемах лечения, которые обычно используются для этого агента или терапии в моно-терапии конкретного заболевания или состояния.

Пример подходящего количества анти-CD39 антитела - от 1 до 20 мг/кг массы тела. В одном варианте реализации настоящего изобретения указанное количество вводят индивидууму еженедельно, каждые две недели, ежемесячно или каждые два месяца.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложен способ лечения человека, имеющего рак, который состоит по меньшей мере из одного цикла применения эффективного количества анти-CD39 антитела по настоящему изобретению и эффективного количества агента или терапевтического средства, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ. В одном варианте реализации настоящего изобретения цикл представляет собой период в восемь недель или менее (например, 2, 4, 8 недель). В одном варианте реализации настоящего изобретения для каждого из по меньшей мере одного цикла применяют одну, две, три или четыре дозы анти-CD39 антитела, необязательно, в дозировке 1-20 мг/кг массы тела. В одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело вводят путем внутривенной инфузии. В одном варианте реализации настоящего изобретения для каждого из по меньшей мере одного цикла применяют одну, две, три или четыре дозы агента или терапевтического средства, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ.

Как показано в настоящем документе, самые сильные противоопухолевые ответы наблюдались, когда повторное применение химиотерапевтического средства в присутствии насыщающих концентраций анти-CD39 антитела позволяло накапливать АТФ и подавлять выработку аденозина в течение стандартного двухнедельного периода, необходимого для инициации эффективного противоопухолевого иммунного ответа. Соответственно, в одном предпочтительном варианте реализации настоящего изобретения лечение согласно настоящему изобретению включает по меньшей мере два последовательных введения агента или терапии, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ.

В одном варианте реализации настоящего изобретения агент или терапия, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ, вводят по меньшей мере дважды в течение 15 дней или приблизительно двух недель после введения анти-CD39 антитела. Анти-CD39 антитело можно применять в количестве и/или по графику, так что концентрации анти-CD39 антитела в кровотоке и/или интересующей ткани (например, опухолевой ткани) ингибируют АТФазную активность CD39 (например, в концентрации, которая насыщает белок CD39) при каждом из двух последовательных введениях агента или терапии, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ. Например, в одном предпочтительном терапевтическом режиме анти-CD39 антитело вводят одновременно или по меньшей мере за 1-48 ч до введения химиотерапевтического средства, вызывающего высвобождение АТФ. В одном предпочтительном терапевтическом режиме анти-CD39 антитело вводят по меньшей мере, за 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дней до введения химиотерапевтического средства, вызывающего высвобождение АТФ.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело, которое способно связываться с белком CD39 человека (NTPDase1) и ингибировать АТФазную активность белка CD39 человека в случае применения в лечении опухоли у человека, причем данное лечение включает введение индивидууму эффективного количества как анти-CD39 антитела, так и агента или терапевтического средства, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, причем агент или терапевтическое средство, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, вводят по меньшей мере дважды (например, при первом и втором последовательном введении) и где анти-CD39 антитело вводят в количестве и/или по графику, эффективным для достижения и/или поддержания насыщающей концентрации анти-CD39 антитела в период между указанными двумя введениями агента или терапевтического средства, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток. Анти-CD39 антитело можно вводить, например, один или два раза.

В одном варианте реализации настоящего изобретения два введения агента или терапевтического средства, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, разделены двумя неделями или менее (например, применяются ежедневно, еженедельно, через две недели). В одном варианте реализации настоящего изобретения агент или терапевтическое средство, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, вводят по меньшей мере 2, 3 или 4 раза в течение двухнедельного периода. В одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело можно вводить в количестве, которое приводит к концентрации, которая является по меньшей мере минимальной концентрацией, необходимой для того, чтобы по существу полностью (например, на 90%, 95%) заполнить (насытить) белок CD39.

В одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело можно вводить в количестве, которое приводит к концентрации, которая по меньшей мере является минимальной концентрацией, необходимой для того, чтобы практически полностью (например, на 90, 95%) заполнить (насытить) антитело белка CD39 между указанными двумя введениями агента или терапевтического средства, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток.

Типовые протоколы лечения человека анти-CD39 антителом включают, например, введение пациенту эффективного количества как анти-CD39 антитела, так и агента или терапевтического средства, вызывающего внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, где способ включает по меньшей мере один цикл применения, при котором вводят по меньшей мере одну дозу анти-CD39 антитела и две дозы агента или терапевтического средства, вызывающего внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, где две дозы агента или терапевтического средства, вызывающего внеклеточное высвобождение АТФ, вводятся с интервалом в две недели или менее. В одном варианте реализации настоящего изобретения цикл применения составляет от 2 до 8 недель. В одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело можно применять в количестве и/или по графику таким образом, чтобы концентрация анти-CD39 антитела в кровотоке и/или интересующей ткани (например, опухолевой ткани) ингибировала АТФазную активность CD39. Необязательно, анти-CD39 антитело вводят в количестве, которое обеспечивает концентрацию, при которой достигается практически полное (например, на 90, 95%) заполнение (насыщение) CD39. В одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело вводят одновременно или за 1-48 ч до введения агента или терапевтического средства, вызывающего внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток.

В одном варианте реализации настоящего изобретения предложено антитело, которое способно связываться с белком CD39 человека (NTPDase1) и ингибировать АТФазную активность белка CD39 человека для применения в лечении опухоли у человека, где лечение включает введение индивидууму (а) анти-CD39 антитела в количестве и по графику, эффективных для достижения и/или поддержания насыщающей концентрации анти-CD39 антитела в течение по меньшей мере одной недели, необязательно по меньшей мере двух недель (например, двух, трех, четырех недель или более), и (b) агента или терапевтического средства, вызывающего внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, где анти-CD39 антитело вводят одновременно или за 1-48 ч до введения агента или терапевтического средства, вызывающего внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток. Необязательно, агент или терапевтическое средство, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, вводят по меньшей мере два раза в течение двухнедельного периода после введения анти-CD39 антитела, например агент или терапевтическое средство, которые вызывают внеклеточное высвобождение АТФ из опухолевых клеток, можно вводить не реже одного раза в неделю.

В любом варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело можно применять в количестве, которое обеспечивает концентрацию, которая является по меньшей мере минимальной концентрацией, необходимой для того, чтобы практически полностью (например, на 90, 95%) заполнить (насытить) антитело белка CD39 в течение одной недели. В одном варианте реализации настоящего изобретения анти-CD39 антитело можно применять в количестве, которое обеспечивает концентрацию, которая является по меньшей мере минимальной концентрацией, необходимой для того, чтобы по существу полностью (например, на 90, 95%) заполнить (насытить) антитело белка CD39 в течение двух недель.

Композиции с анти-CD39 антителами в комбинации с агентом или терапевтическим средством, вызывающим внеклеточное высвобождение АТФ, можно необязательно комбинировать (дополнительно комбинировать) с лечением одним или более другими видами терапии или терапевтическими средствами, включая агенты, обычно используемые для конкретной терапевтической цели, для которой применяют антитело. Дополнительное терапевтическое средство обычно вводят в количествах и по графику, обычно используемых для этого средства в монотерапии для конкретного заболевания или состояния, которое лечат. В одном варианте реализации настоящего изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой агент (например, антитело), который ингибирует оси CTLA-4 или PD-1 (т.е. ингибирует PD-1 или PD-L1). Антитела, которые связываются с CTLA-4, PD1 или PD-L1, можно использовать, например, в дозах и/или с частотой, с которыми такие агенты используют в качестве монотерапии, например, как описано ниже. В одном варианте реализации настоящего изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой агент (например, антитело), который связывается с белком CD73 человека и нейтрализует 5'-эктонуклеотидазную активность белка CD73 человека (например, растворимого белка CD73, белка CD73, экспрессируемого клеткой). CD73 человека, также известный как экто-5'-нуклеотидаза, 5'-рибонуклеотид-фосфогидролаза, EC 3.1.3.5, кодируемый геном NT5E, демонстрирует 5'-нуклеотидазную, в частности, АМФ-, НАД- и НМН-нуклеозидазную активность. CD73 катализирует превращение пуриновых 5'-моонуклеотидов в нуклеозиды при нейтральном pH, при этом предпочтительным субстратом является АМФ. Фермент состоит из димера из 2 идентичных субъединиц по 70 кДа, связанных гликозил-фосфатидилинозитоловым якорем с внешней поверхностью плазматической мембраны. Аминокислотная последовательность белка-предшественника (мономера) CD73 человека, включая сигнальную последовательность в районе аминокислот 1-26, показана в Genbank под номером доступа NP 002517 и полностью включена в настоящий документ посредством ссылки:

MCPRAARAPA TLLLALGAVL WPAAGAWELT ILHTNDVHSR LEQTSSESSK CVNASRCMGG
 VARLFTKVQQ IRRAPENVLL LDAGDQYQGT IWFTVYKGAE VAHFMNALRY DAMALGNHEF
 DNGVEGLIEP LLKEAKFPIL SANIKAKGPL ASQISGLYLP YKVLPGDEV VGIVGYTSKE
 TPFLSNPGTN LVFEDEITAL QPEVDKLKTL NVNKIIALGH SGFEMDKLIA QKVRGVDVVV
 GGHSNTFLYT GNPPSKEVPA GKYPFIVTSD DGRKVPVQA YAFGKYLGYL KIEFDERGNV
 ISSHGNPILL NSSIPEDPSI KADINKWRIK LDNYSTQELG KTIVYLDGSS QSCRFRECNM
 GNLICDAMIN NNLRHTDEMF WNHVSMCILN GGGIRSPIDE RNNGTITWEN LAAVLPFGGT
 FDLVQLKGST LKKAHEHSVH RYGQSTGEFL QVGGIHVVYD LSRKPGDRVV KLDVLCTKCR
 VPSYDPLKMD EVYKVLPNF LANGGDGFQM IKDELLRHDS GDQDINNVST YISKMKVIYP
 AVEGRIKFST GSHCHGSFSL IFLSLWAVIF VLYQ (SEQ ID NO: 48).

В контексте настоящего документа термины "ингибировать", "ингибирующий", "нейтрализовать" или "нейтрализующий" в отношении полипептида CD73 (например, "нейтрализовать CD73", "нейтрализовать активность CD73" или "нейтрализовать ферментативную активность CD73" и т.д.) относятся к процессу, в котором активность 5'-нуклеотидазы (5'-эктонуклеотидазы) CD73 ингибируется. Это включает, в частности, ингибирование CD73-опосредованного образования аденозина, т.е. ингибирование CD73-опосредованного катаболизма АМФ в аденозин. Это можно определить, например, посредством бесклеточного анализа, которым измеряют способность испытуемого соединения ингибировать конверсию АМФ в аденозин, прямо или опосредованно. В одном варианте реализации настоящего изобретения препарат на основе антитела вызывает по меньшей мере 50%-ное снижение конверсии АМФ в аденозин, по меньшей мере 70%-ное снижение конверсии АМФ в аденозин или по меньшей мере 80%-ное снижение конверсии АМФ в аденозин, если ссылаться, например, на описанные в настоящем документе анализы.

Примеры

Способы.

Образование мутантных форм CD39.

Мутантные формы CD39 были получены посредством ПЦР. Амплифицированные последовательности тестировали на агарозном геле и очищали с помощью набора Macherey Nagel PCR Clean-Up Gel Extraction (№ 740609). Очищенные ПЦР продукты, полученные для каждого мутанта, затем лигировали в вектор экспрессии с помощью системы ClonTech InFusion. Векторы, содержащие мутированные последовательности, получали в виде мини-препов (Miniprep) и секвенировали. После секвенирования векторы, содержащие мутированные последовательности, получали в виде миди-препов (Midiprep) с использованием системы Promega PureYield™ Plasmid Midiprep System. Клетки HEK293T выращивали в среде, модифицированной по способу Дульбекко, (DMEM) (Invitrogen), трансфицировали векторами с использованием Липофектамина 2000 производства компании Invitrogen и инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 48 ч перед тем, как тестировать на экспрессию трансгена. Мутантные формы трансфицировали в клетках HEK293T, как показано в таблице. Аминокислотные мутации-мишени в таблице показаны с использованием нумерации SEQ ID NO: 1.

Мутант	Замены					
1	V77G	H79Q	Q444K	G445D		
2A	V81S	E82A	R111A	V115A		
2B	E110A	R113T	E114A			
3	R118A	S119A	Q120K	Q122H	E123A	
4	D150A	E153S	R154A	S157K	N158A	L278F
5	Q96A	N99A	E143A	R147E		
6	K188R	Замена остатков 190-207 на линкер KTPGGG				
7	A273S	N275A	I277S	R279A		
8	S294A	K298G	K303A	E306A	T308K	Q312A
9	K288E	K289A	V290A	E315R		
10A	Q354A	D356S	E435A	H436Q		
10B	H428A	T430A	A431D	D432A		
11	N371K	L372K	E375A	K376G	Вставка 377V	V377S
12	K388N	Q392K	P393S	E396A		
13	A402P	G403A	K405A	E406A		
15	K87A	E100A	D107A			
16	Q323A	Q324A	Q327A	E331K		
17	N334A	S336A	Y337G	N346A		
18	Q228A	I230S	D234A	Q238A		
19	R138A	M139A	E142K			

Клонирование, производство и очистка растворимого CD39 человека.

Молекулярная биология.

Белок CD39 человека клонировали из кДНК МКПК (моноклеарных клеток периферической крови) человека с использованием следующих праймеров:

TACGACTCACAAGCTTGCCGCCACCATGGAAGATACAAAGGAGTC (SEQ ID NO: 35) (прямой праймер) и

CCGCCCCGACTCTAGATCACTTGTGTCATCGTCATCTTTGTAATCGACATAGGTGGAGTGGGAGAG (SEQ ID NO: 36) (обратный праймер).

Очищенный продукт ПЦР затем клонировали в вектор экспрессии с использованием системы клонирования InFusion. Маркер M2 (FLAG-маркер, подчеркнутый в SEQ ID NO: 39) добавляли в С-концевую область белка для стадии очистки; понятно, что белок внеклеточного домена CD39 (например, SEQ ID NO: 39) в любом варианте реализации настоящего изобретения может быть необязательно отмечен как не имеющий маркер M2.

Экспрессия и очистка белка CD39 человека.

После валидации клонированной последовательности клетки CHO подвергали нуклеофекции, а продуцирующую популяцию затем субклонировали для получения клеточного клона, продуцирующего белок CD39 человека. Супернатант из клона CD39 человека, выращенного в роллерной установке, собирали и очищали с использованием хроматографической колонки M2 и элюировали с использованием пептида M2. Очищенные белки затем загружали в колонку эксклюзионной хроматографии размера S200. Очищенный белок, соответствующий мономеру, готовили в трис солевом буферном растворе (ТБС) с pH 7,5. Аминокислотная последовательность рекомбинантного белка внеклеточного домена CD39-M2 без маркера M2 была следующей:

```
MEDTKESNVKTFCSKNILAILGFSSIIAVIALAVGLTQNKALPENVKYGIVLDAGSSHTSLYIY
KWPAEKENDTGTVHQQVEECRVKGPISKVFQKVNEIGIYLTDCMERAREVIPRSQHQETPV
YLGATAGMRLLRMESEELADRVLDVVERSLSNYPDFQGARIITGQEEGAYGWITINYLLGK
FSQKTRWFSIVPYETNNQETFGALDLGGASTQVTFVPQNQTIESPDNALQFRLYGKDYNVY
THSFLCYGKDQALWQKLAKDIQVASNEILRDPCHPGYKVVNVSDLYKTPCTKRFEMTLP
FQQFEIQGIGNYQQCHQSILELFNTSYCPYSQCAFNGIFLPLQGDFGAFSAFYFVMKFLNL
TSEKVSQEKVTEMMKKFCAQPWEEIKTSYAGVKEKYLSEYCFSGTYILSLLLQGYHFTADS
WEHIFIGIKIQGSDAGWTLGYMLNLTNMIPAEQLSTPLSHSTYV (SEQ ID NO: 2).
```

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

```
MEDTKESNVKTFCSKNILAILGFSSIIAVIALAVGLTQNKALPENVKYGIVLDAGSSHTSLYIY
KWPAEKENDTGTVHQQVEECRVKGPISKVFQKVNEIGIYLTDCMERAREVIPRSQHQETPV
YLGATAGMRLLRMESEELADRVLDVVERSLSNYPDFQGARIITGQEEGAYGWITINYLLGK
FSQKTRWFSIVPYETNNQETFGALDLGGASTQVTFVPQNQTIESPDNALQFRLYGKDYNVY
THSFLCYGKDQALWQKLAKDIQVASNEILRDPCHPGYKVVNVSDLYKTPCTKRFEMTLP
FQQFEIQGIGNYQQCHQSILELFNTSYCPYSQCAFNGIFLPLQGDFGAFSAFYFVMKFLNL
TSEKVSQEKVTEMMKKFCAQPWEEIKTSYAGVKEKYLSEYCFSGTYILSLLLQGYHFTADS
WEHIFIGIKIQGSDAGWTLGYMLNLTNMIPAEQLSTPLSHSTYVDYKDDDDK
(SEQ ID NO: 39).
```

Ингибирование ферментативной активности растворимого CD39.

Ингибирование антителами ферментативной активности полученного растворимого белка CD39 оценивали с использованием системы CellTiter Glo™ (Promega, № G7571), которая позволяет оценивать гидролиз АТФ посредством использования реагента, который генерирует люминесцентный сигнал, пропорциональный количеству присутствующего АТФ. Таким образом, можно оценить ингибирование гидролиза АТФ, опосредованное растворимым CD39. Вкратце, диапазоны доз анти-CD39 антител от 100 до 6×10^{-3} мкг/мл инкубировали вместе с 400 нг/мл растворимого рекомбинантного белка CD39 человека, имеющего аминокислотную последовательность, описанную в разделе "Способы" (SEQ ID NO: 39), в течение 1 ч при 37°C. 20 мкМ АТФ добавляли в планшеты в течение 30 дополнительных минут при 37°C перед тем, как добавить реагент CTG (CellTiter Glo™). Испускаемый свет количественно определяли с помощью люминометра Enspire™ после короткого инкубационного периода в 5 мин в темноте. Эффективность анти-CD39 антител определяли путем сравнения испускаемого света в присутствии антитела только с АТФ (максимальное излучение света) и АТФ вместе с растворимым белком CD39 (минимальное излучение света).

Ингибирование ферментативной активности клеточного CD39.

Ингибирование антителами ферментативной активности CD39 в клетках, экспрессирующих CD39, оценивали с помощью системы CellTiter Glo™ (Promega, № G7571), которая позволяет оценивать гидролиз АТФ посредством использования реагента, который генерирует люминесцентный сигнал, пропорциональный количеству присутствующего АТФ. Таким образом, анализ был предназначен для оценки ингибирования АТФ, гидролизованного CD39 в супернатанте клеточной культуры. Вкратце, 5×10^4 кле-

ток человеческой лимфомы Рамоса, а также 5×10^3 клеток СНО, экспрессирующих CD39 человека, CD39 яванской макаки и CD39 мыши инкубировали 1 ч при 37°C вместе с анти-CD39 антителами в количестве от 30 до 5×10^{-4} мкг/мл. Затем клетки дополнительно инкубировали с 20 мкМ АТФ в течение 1 ч при 37°C. Планшеты центрифугировали в течение 2 мин при 400 g, после чего 50 мкл клеточного супернатанта перемещали в люминесцентный микропланшет (белые лунки). К супернатанту добавили 50 мкл реагента CellTiter Glo® (CTG) и количественно определяли испускаемый свет после 5-минутной инкубации в темноте с использованием люциметра Enspire™. Эффективность анти-CD39 антител определяли путем сравнения испускаемого света в присутствии антитела с одним лишь АТФ (максимальное излучение света) и АТФ вместе с клетками (минимальное излучение света).

Выработка антител: Иммунизация и скрининг мышей.

Для получения анти-CD39 антител человека мышей Balb/c иммунизировали вышеописанным рекомбинантным белком внеклеточного домена CD39-M2 человека. Мыши сначала получали первичную иммунизацию эмульсией из 50 мкг белка CD39 и полного адьюванта Фрейнда внутрибрюшинно, затем вторую иммунизацию эмульсией из 50 мкг белка CD39 и неполного адьюванта Фрейнда внутрибрюшинно, и, наконец, бустер из 10 мкг белка CD39 внутривенно. Иммунные клетки селезенки слились через 3 дня после введения бустера с иммортализованными В-клетками X63.Ag8.653 и культивировались в присутствии облученных клеток селезенки. Гидридомы высевали в полутвердую среду, содержащую метилцеллюлозу, и растущие клоны отбирали с помощью аппарата Clonepix 2 (от компании Molecular Devices).

Пример 1. Картирование эпитопов известных моноклональных антител, нейтрализующих CD39.

Чтобы понять, как антитела могут ингибировать ферментативную (АТФазную) активность клеточного CD39, авторы настоящего изобретения исследовали эпитопы, связанные с антителами, которые известны тем, что ингибируют АТФазную активность CD39 в клеточных анализах: BY40, раскрытый в РСТ-публикации № WO 2009/095478.

Чтобы определить эпитопы анти-CD39 антител, авторы изобретения разработали мутантные формы CD39, определяемые заменами аминокислот, экспонированных на молекулярной поверхности над поверхностью CD39. Мутантные формы трансфицировали в клетках НЕК-293Т, как показано в таблице, с использованием нумерации SEQ ID NO: 1.

Диапазоны доз I-394 (10 - 2,5 - 0,625 - 0,1563 - 0,0391 - 0,0098 - 0,0024 - 0,0006 мкг/мл) исследовали на 20 полученных мутантах с помощью проточной цитометрии. Антитела BY40 демонстрировали как полную потерю связывания с клетками, экспрессирующими мутант 5 CD39, так и отсутствие потерь связывания с любым другим мутантом. Мутант 5 содержит аминокислотные замены в остатках Q96, N99, E143 и R147. Положение Мутанта 5 на поверхности CD39 показано на фиг. 3А.

Пример 2. Моноклональные антитела известными нейтрализацией CD39 не способны ингибировать АТФазную активность рекомбинантного растворимого белка CD39.

Два антитела (BY40 и BY12), которые из результатов клеточных анализов известны тем, что ингибируют АТФазную активность CD39, оценивали, чтобы определить, способны ли они ингибировать АТФазную активность рекомбинантного растворимого белка CD39. Ингибирование антителами ферментативной активности растворимого белка CD39, полученного, как описано выше, оценивали с использованием CellTiter Glo™ (Promega, №G7571). Ингибирование антителами ферментативной активности клеточного белка CD39 оценивали, как указано выше.

Как и ожидалось, BY40 ингибировал АТФазную активность белка CD39 в клетках. Однако BY40 оказался неспособен ингибировать ферментативную активность растворимого белка CD39. На фиг. 2В показано сравнение BY40 с новыми антителами, идентифицированными в настоящем документе.

Пример 3. Скрининг на предмет обнаружения новых моноклональных антител для блокировки активности sCD39.

Была проведена серия иммунизаций с целью обнаружения антител, которые нейтрализуют АТФазную активность растворимого sCD39. С целью получения анти-huCD39 антител животных иммунизировали рекомбинантным белком внеклеточного домена CD39-M2 человека, описанным выше. Всего было проведено 15 серий иммунизации с применением разных протоколов и разных животных, включая разные линии мыши, крысы и кролика.

В протоколах первоначальной иммунизации первичный скрининг включал анализ супернатанта растущих клонов методом проточной цитометрии с использованием дикого типа СНО-клеток и СНО-клеток, экспрессирующих huCD39. Клетки окрашивали сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеина (CFSE) по 0,1 и 0,005 мкМ соответственно. Для скрининга с помощью проточной цитометрии все клетки были в одинаковой мере смешаны, и присутствие реагирующих антител в супернатантах было выявлено благодаря поликлональному антителу козы против антител мыши, меченному APC. Что касается антител, которые связываются с CD39 человека, супернатанты затем мониторили на предмет ингибирования ферментативной активности растворимого CD39, используя скрининговый анализ, разработанный и описанный выше (см. раздел "Способы").

Результаты показали, что, хотя можно было получить множество специфических CD39-связывающих антител, ни одно из антител любой из этих иммунизаций не продемонстрировало

какого-либо ингибирования ферментативной активности растворимого CD39. Одна возможность состоит в том, что доминантные эпитопы на поверхности CD39 не включают какие-либо эпитопы, подходящим образом расположенные вблизи этого каталитического сайта CD39. Ввиду небольшого количества доступных антител, которые ингибируют клеточный CD39, и известных трудностей в ингибировании каталитических сайтов ферментов с использованием антител отсутствие антител, которые нейтрализуют растворимый CD39, может указывать на то, что невозможно получить антитела, ингибирующие растворимый (внеклеточный домен) CD39. Другие возможности связаны с нефункциональными скрининговыми анализами и/или неправильно свернувшимся или функционирующим растворимым белком CD39, особенно потому, что отсутствие какого-либо антитела, способного ингибировать растворимый CD39, затрудняет валидацию анализов блокирования растворимого CD39.

Ввиду отсутствия антител, способных ингибировать растворимый CD39, была проведена дополнительная иммунизация по протоколу скрининга, предназначенная для получения антител, которые связываются с активным сайтом CD39, как идентифицируется эпитопом антитела BY40. Вкратце, первичный скрининг включал анализ супернатанта растущих клонов с помощью проточной цитометрии с использованием дикого типа CHO-клеток и CHO-клеток, экспрессирующих клеточные линии человеческих CD39, как и в предыдущих иммунизациях, с последующим скринингом на потерю связывания с клетками HEK293T, экспрессирующими мутантную форму 5 CD39, в сравнении с CD39 дикого типа, как показано в таблице. Мутант 5 имеет замены в остатках Q96, N99, E143 и R147. Однако снова результаты показали, что, несмотря на то, что можно было получить множество специфических CD39-связывающих антител, которые показали потерю связывания с мутантом 5, ни одно из антител любой из первоначальных иммунизаций не продемонстрировало какого-либо ингибирования ферментативной активности растворимого CD39.

Пример 4. Идентификация первого антитела, ингибирующего активность растворимого CD39, как части эпитоп-направленного скрининга.

Авторы настоящего изобретения стремились идентифицировать анти-CD39 антитела, которые не связываются с областью Q96, N99, E143 и R147 (определенные мутантом 5), чтобы иметь антитела, которые не конкурируют с антителами, подобными BY40. Такие антитела, которые не должны обладать какой-либо способностью блокировать АТФазную активность CD39, могут использоваться в фармакологических исследованиях антител, ингибирующих клеточный CD39, который связывается с сайтом связывания BY40, например, для обнаружения и количественного определения свободных белков CD39 на поверхности клеток в присутствии BY40 или BY40-подобных антител, которые ингибируют клеточный CD39.

Начиная с результатов иммунизации из примера 3, где гибридомы мониторили на предмет потери связи с мутантом 5 CD39, выбирали такую гибридому, которая не числилась среди тех, которые показали потерю связывания с мутантной формой 5 CD39. Эта гибридома (I-394) была среди более широкой популяции из-за неубедительных данных, указывающих на возможное частичное ослабление связывания с мутантом 5, но не потерю связывания с мутантом 5, поэтому изначально не сохранилась.

В контексте продолжающегося скрининга супернатантов для дальнейших иммунизаций для ингибирования ферментативной активности растворимого CD39 антитело I-394, которое было клонировано и продуцировано, было включено в качестве контроля. Неожиданно, несмотря на то, что антитело I-394 не входит в число клонов, сохраняемых в ходе эпитоп-направленного скрининга, это антитело показало сильное ингибирование ферментативной активности растворимого CD39 в анализе, описанном выше (см. раздел "Способы").

Антитело I-394 получили с константными областями изотипа IgG1 человека с модифицированным Fc-доменом, имеющим мутации L234A/L235E/G237A/A330S/ P331S (нумерация по Кабату), что приводит к отсутствию связывания с Fcγ-рецепторами CD16A, CD16B, CD32A, CD32B и CD64 человека. Вкратце, последовательности V_H и V_K антитела I-394 (вариабельные области V_H и V_K, показанные в SEQ ID NO: 3 и 4 соответственно) клонировали в векторы экспрессии, содержащие константные домены huIgG1, имеющие вышеупомянутое мутации и константный домен huCk соответственно. Два полученных вектора были совместно трансфицированы в клеточную линию CHO. Полученную популяцию клеток использовали для продуцирования антител в среде CHO. Затем антитело очищали с использованием белка А. Аминокислотные последовательности соответствующих вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей I-394 показаны ниже (CDR-области по Кабату подчеркнуты).

Последовательность вариабельного домена тяжелой цепи I-394:

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYNMHVWKQSHGRTLEWIGYIVPLNGGSTFNQKFKGRA

TLTNTSSRTAYMELRSLTSEDSAAAYCARGGTRFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO: 3).

Последовательность вариабельного домена легкой цепи I-394:

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNFGVSMYWFQKPGQPPNLLIYGASNQGSQGVPARFRG

SGSGTDFSLNIHPMEADDTAMYFCQQTKEVPYTFGGGTGLEIK (SEQ ID NO: 4).

Последовательности тяжелой и легкой цепей I-394 с константными областями IgG1 человека с замещениями L234A/L235E/G237A/A330S/P331S (сохраняющими N297-сцепленное гликозилирование) пока-

заны ниже:

Последовательность тяжелой цепи I-394:

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCASGYTFTD**DYNMH**VVKQSHGRTLEWIG**YIVPLNGGSTFNQKFKGRA**
 TLTNTSSRTAYMELRSLTSEDSAAYYCAR**GGTRFAY**WGQGLTVTVSAASTKGPSVFLAPSS
 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC
 NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTI
 SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSF
 FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 37).

Последовательность легкой цепи I-394:

DIVLTQSPASLAVSLGQRATIS**CRASEVDNFGVSFMY**WFQQKPGQPENLLIY**GASNQGS**GVPARFRG
 SGSGTDFSLNIHPMEADDTAMYFC**QQTKEVPYTF**GGGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
 ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVT
 HQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 38).

Антитело I-394 затем испытывали на потерю связывания с мутантами CD39, определяемыми заменами аминокислот, экспонированных на молекулярной поверхности над поверхностью CD39. Мутантов трансфицировали в клетках HEK293T, как показано в таблице, с использованием нумерации SEQ ID NO: 1. Диапазоны доз антител I-394 испытывали на 20 мутантах с помощью проточной цитометрии. Как показано на фиг. 3B, I-394 показал полную потерю связывания с клетками, экспрессирующими мутант 19 CD39. Мутант 19 включает замены в остатках R138, M139 и E142. Таким образом, основной эпитоп I-394 включает один или более (или все) остатков R138, M139 и E142.

В отличие от предыдущего антитела BY40, которое теряет связывание с мутантом 5 и обладает способностью ингибировать клеточный CD39, но не растворимый CD39, антитело I-394 теряет связь с соседним мутантом 19, при этом сильно ослабляя связывание с мутантом 5 (но некоторое остаточное связывание с мутантом 5 остается). Интересно, что остатки мутанта 19 находятся в непосредственной близости или рядом с остатками мутанта 5, так что по сравнению с BY40 I-394 может представлять сдвиг в позиции эпитопа. Таким образом, антитело I-394 представляет собой новый ценный эпитоп для анти-CD39 антител, который позволяет ингибировать активность АТФазы растворимого белка CD39. Оно также обеспечивает специфический положительный контроль, который позволяет валидировать и проводить скрининговые анализы для выявления дополнительных антител, нейтрализующих АТФазную активность растворимого белка CD39.

Пример 5. Не эпитоп-направленный скрининг моноклональных антител, нейтрализующих растворимый CD39.

На основании результатов примера 4, показывающих, что опосредованное антителами ингибирование растворимого CD39 возможно, комбинации разных иммунизации с использованием различных протоколов из примера 3 были пересмотрены с целью обнаружения антител, нейтрализующих АТФазную активность растворимого CD39.

Затем оценили различные подходы к скринингу на предмет ингибирования АТФазы. В одном эксперименте антитело I-394 использовали для выделения супернатантов из гибридом для иммунизации из примера 3, которые оказались отрицательными в плане способности ингибировать АТФазную активность растворимого CD39. Добавление I-394 к супернатанту не восстановило способность отрицательных супернатантов ингибировать АТФазную активность CD39. Антитело I-394 затем очищали от отрицательного супернатанта с использованием гранул, покрытых белком А, в результате чего авторы настоящего изобретения наблюдали, что очищенное антитело I-394 снова стало способно ингибировать АТФазную активность и восстанавливаться.

С учетом вышеизложенных результатов были разработаны новые протоколы иммунизации и скрининга, где растущие клоны из новых и прошлых серий иммунизации подвергали скринингу с помощью проточной цитометрии с использованием дикого типа CHO-клеток и CHO-клеток, экспрессирующих CD39 человека, без оценки ингибирования активности растворимого CD39 или АТФазной активности клеточного CD39 и без нарушения скрининга эпитопов. В то время как данные относительно потери связывания с мутантом 5 или 19 были доступны для некоторых гибридом, такие данные не использовались для отбора клонов, а сохранялись только в целях сохранения гибридом для клонирования в случае отрицательных результатов в анализе блокировки АТФазной активности. Гибридомы, которые связываются с CD39, отбирали и клонировали, а затем очищали с использованием белка А в соответствии со следующим протоколом:

- к 300 мкл гибридомного супернатанта добавили 10 мкл гранул белка А;
- довели с помощью NaCl до конечной концентрации 1,5М;
- вращали пробирки в течение 3-4 ч при 4°C;
- центрифугировали в течение 1 мин при 1500 об/мин;

слили супернатант и три раза промывали с использованием 1 мл ТБС;
 слили весь ТБС после третьей промывки;
 добавили 50 мкл цитрата 0,1 М с pH 3, гомогенизировали и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин;
 центрифугировали гранулы в течение 1 мин при 1500 об/мин;
 собрали 50 мкл элюента и быстро добавили 450 мкл ТБС;
 хранили при 4°C.

Полученные антитела затем подвергали скринингу в ходе сравнительного анализа на способность ингибировать АТФазную активность CD39 в такой же степени, как в случае с I-394. Способы анализа, применявшиеся для ингибирования ферментативной активности растворимого и клеточного CD39, были такими же, как описано выше (см. раздел "Способы"). Удивительно, что среди типичных антител, полученных таким способом, некоторые продемонстрировали ингибирование растворимого CD39 (а также ингибирование клеточного CD39).

На фиг. 1 показан репрезентативный результат скрининга, показывающий антитела I-397, I-398 и I-399 по сравнению с антителом I-394 с положительным контролем. Аналогичным образом, антитела I-395 и I-396 из различных серий иммунизации ингибировали ферментативную активность растворимого белка CD39.

На фиг. 2А и 2В показаны результаты для антител I-395 и I-396, где было доступно большее количество антител для дополнительных испытаний на нейтрализацию как растворимого, так и клеточного CD39. На фиг. 2А показано, что по сравнению с антителами BY40 и I-394 антитела I-395 и I-396 ингибируют CD39, связанный с клеточной мембраной, причем как I-394, так и I-395 демонстрируют большую активность и максимальное ингибирование клеточного CD39 по сравнению с BY40. На фиг. 2В показано, что антитела I-395 и I-396 ингибируют растворимый CD39 по сравнению с антителами BY40 и I-394. Хотя BY40 не ингибирует растворимый CD39 при любой концентрации, все антитела I-394, I-395 и I-396 ингибируют растворимый CD39, при этом I-394 показывает наибольшую активность, затем идет I-395 и затем I-396 с наименьшей активностью.

Полученные результаты повышают вероятность того, что благодаря фактору(ам) в супернатантах гибридомы АТФ быстро гидролизуетеся как в ходе анализа клеточной культуры, так и в ходе анализа растворимого CD39, так что при обычном скрининге антител сигнал АТФ не обнаружится. Растворимым фактором может быть CD39 или какой-либо другой фермент, например, продуцируемый партнером по слиянию.

Затем антитела клонировали с такой модификацией, чтобы иметь константные области с Fc-доменом IgG1 человека с мутациями L234A/L235E/G237A/A330S/P331S (EU-нумерация по Кабату), что приводит к отсутствию связывания с Fcγ-рецепторами CD16A, CD16B, CD32A, CD32B и CD64 человека, так же, как показано для I-394. Полученные антитела затем можно титровать и затем более детально оценивать их активность, как описано в примерах 7-9 (титрование, ингибирование активности АТФазы), чтобы определить EC₅₀ и IC₅₀ для ранжирования антител в соответствии с их активностью.

Пример 6. Картирование эпитопов моноклональных антител, нейтрализующих растворимый CD39.

Как показано в примере 4, антитело I-394 показало полную потерю связывания с клетками, экспрессирующими мутант 19 CD39, но не потеряло связь с мутантом 5. Чтобы определить эпитопы других анти-CD39 антител из примера 5, их испытывали на потерю связывания с рядом мутантов CD39, приведенных в примере 1 и таблице. Мутантов трансфицировали в клетках HEK-293T, как показано в таблице, с использованием нумерации SEQ ID NO: 1. Испытуемые антитела в диапазоне доз (10^{-2,5} - 0,625 - 0,1563 - 0,0391 - 0,0098 - 0,0024 - 0,0006 мкг/мл) анализировали на 20 сгенерированных мутантах с помощью проточной цитометрии.

Результаты показали, что антитела, отобранные в примере 5 по способности ингибировать растворимый CD39, презентировали несколько разных эпитопов. Среди антител, которые продемонстрировали ингибирование растворимого внеклеточного CD39 в примере 5, антитело I-395 является примером антитела, которое показало потерю связывания с мутантом 5, имеющим замены в остатках Q96, N99, E143 и R147, а также потерю связывания с мутантом 19, имеющим замены в остатках R138, M139 и E142. Мутант 19 включает замены в остатках R138, M139 и E142. Таким образом, основной эпитоп на поверхности CD39 I-395 содержит один, два, три или четыре остатка Q96, N99, E143 и R147, а также один, два или три остатка R138, M139 и E142.

Антитело I-398, с другой стороны, является примером антитела, которое показало потерю связывания с мутантом 19, имеющим замены в остатках R138, M139 и E142, но при этом не показало снижения или потери связывания с мутантом 5, имеющим замены в остатках Q96 N99, E143 и R147.

Другие антитела, которые продемонстрировали ингибирование растворимого внеклеточного CD39 в примере 5, имели очень разные эпитопы и не показали потери связывания ни с одним из мутантов 5 или 19, что предполагает, что растворимый CD39 также может быть ингибирован путем связывания с другими сайтами на поверхности растворимого CD39. Для некоторых антител потеря связывания с одним из 20 мутантов из таблицы позволила локализовать сайт связывания на CD39, тогда как для других сайт связывания еще предстояло определить, так как они не потеряли связь ни с одним из 20 мутантов.

Среди антител, ингибирующих АТФазную активность растворимого CD39 в примере 5, антитело I-396 показало потерю связывания с мутантом 15, имеющим замены K87A, E100A и D107A, без потери связывания с любым из других 20 мутантов. Таким образом, основной эпитоп на поверхности CD39 этого антитела содержит один или более (или все) остатков K87, E100 и D107. Антитело I-399 показало потерю связывания с мутантом 11, имеющим замены N371K, L372K, E375A, K376G, V377A и вставку валина между K376 и V377 (называемую в таблице "Вставка 377V"), без потери связывания с любым из 20 других мутантов. Таким образом, основной эпитоп на поверхности CD39 этого антитела содержит один или более (или все) остатков N371, L372, E375, K376 и V377. На фиг. 3А показано положение остатков, мутировавших в мутантах 5 (M5), 15 (M15) и 19 (M19) на поверхности белка CD39. На фиг. 3В показаны результаты связывания разных антител с мутантами 5, 15 и 19.

Таким образом, результаты показывают, что можно получить антитела, которые ингибируют растворимый CD39, к разным эпитопам. Эпитопы включают эпитопы, определяемые одним или более остатками мутанта 19, которые расположены рядом с сайтом связывания BY40 или BY40-подобных антител, которые ингибируют только клеточный CD39, но не растворимый CD39 (который теряет связь с мутантом 5), эпитопы, которые определяются одним или более остатками мутанта 19 и частично мутантом 5, что указывает на возможно меньший сдвиг по сравнению с BY40 или BY40-подобными антителами, эпитопы, определяемые одним или более остатками мутанта 19 и остатками не мутанта 5, а также другие эпитопы, например, которые определяются одним или более остатками мутанта 11 или одним или более остатками мутанта 15, или другими антителами, которые не имеют ослабленного связывания с любым из мутантов 5, 15 или 19, для которых локализацию эпитопов предстоит определить.

Пример 7. Титрование антител на поверхности CD39-экспрессирующих клеток методом проточной цитометрии.

Антитело I-394 тестировали в двух повторных экспериментах на связывание с клетками CHO, экспрессирующими CD39 человека, клетками CHO, экспрессирующими CD39 яванской макаки (*Macaca flavicularis*), клетками CHO, экспрессирующими CD39 мыши, и клетками лимфомы Рамоса человека (ATCC™, № CRL-1596). Клетки инкубировали вместе с различными концентрациями немеченного анти-CD39 антитела, от 30 до 5×10^{-4} мкг/мл, в течение 30 мин при 4°C. После промывки клетки инкубировали со вторичным антителом козы против H + L антитела мыши, меченным маркером, в течение 30 мин при 4°C.

Результаты показаны на фиг. 4. Антитело I-394 связывается с клетками, экспрессирующими CD39 человека (CHO-huCD39), клетками, экспрессирующими CD39 яванской макаки (CHO-cyCD39), и с клетками лимфомы Рамоса, но не с клетками, экспрессирующими CD39 мыши (CHO-moCD39). Антитело I-394 связывалось с клетками Рамоса при EC₅₀ 0,16 и 0,19 мкг/мл в первой и второй сериях экспериментов соответственно. Несколько других анти-CD39 антител показали сопоставимые значения EC₅₀ для связывания с клетками Рамоса.

Пример 8. Определение IC₅₀ для ингибирования клеточной АТФазной активности.

Ингибирование антителом I-394 АТФазной активности CD39 в CD39-экспрессирующих клетках оценивали с применением анализа, используемого для ингибирования ферментативной активности клеточного CD39, как описано выше (в разделе "Способы").

Результаты показаны на фиг. 5. I-394 обладает высокой способностью блокировать ферментативную активность CD39 в опухолевых клетках (Рамоса) и большей эффективностью по сравнению со всеми другими протестированными антителами. I-394 также блокирует ферментативную активность CD39 в клетках, экспрессирующих CD39 человека (CHO-huCD39), и в клетках, экспрессирующих CD39 яванской макаки (CHO-cyCD39). Клетки, экспрессирующие CD39 мыши, (CHO-moCD39), показаны в качестве отрицательного контроля. Расчетное значение IC₅₀ (ингибирование 50% ферментативной активности CD39, экспрессируемого 50000 клетками Рамоса) составляет 0,05 мкг/мл. Максимальное достигнутое ингибирование составляет 81,6%. Изотипический контроль не имел никакого эффекта.

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

Ингибирование антителом I-394 АТФазной активности растворимого белка CD39 оценивали с применением анализов, используемых для ингибирования ферментативной активности растворимого CD39, как описано выше (в разделе "Способы"). Результаты показаны на фиг. 6. I-394 ингибирует ферментативную активность растворимого белка CD39. Антитело BY40 в сравнении не ингибировало ферментативную активность растворимого белка CD39. Расчетное значение IC₅₀ составляет 0,003 мкг/мл. Максимальное достигнутое ингибирование составляет 74,9%.

Пример 10. Титрование методом ELISA на поверхности изоформ CD39-L1, -L2, -L3, -L4.

Антитело I-394 испытывали на связывание с рекомбинантными изоформами CD39 человека (изоформы рек-huCD39), имеющими аминокислотные последовательности, приведенные ниже. Антитело помещали на ночь в 96-луночный планшет в ФСБ 1X в количестве 500 нг/мл или 1 мкг/мл при 4°C. Луночки промывали в ТБС Tween 20 и дополнительно насыщали в течение 2 ч при комнатной температуре в блокирующем буфере ТБС. Первое антитело в диапазоне доз инкубировали в блокирующем буфере ТБС

в течение 2 ч при комнатной температуре. Лунки промывали в ТБС Tween 20. Второе антитело (GAM-HRP или GAN-HRP в блокирующем буфере ТБС) инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и обнаруживали с помощью триметилбензола (ТМБ). Оптическую плотность измеряли на Enspire™ при OD=450 нм.

Аминокислотная последовательность клонированного CD39 человека (васкулярная изоформа):

CD39-L1 человека, также известный как NTPDase2 или ENTPD2:

```
1 MAGKVRSLLP PLLLAAGLA GLLLLCVPTR DVREPPALKY GIVLDAGSSH TSMFIYKWPA
61 DKENDTGIVG QHSSCDVPGG GISSYADNPS GASQSLVGCL EQALQDVPKE RHAGTPLYLG
121 ATAGMRLNL TNPEASTSVL MAVTHTLTQY PFDPRGARIL SGQEEGVFGW VTANYLLENF
181 IKYGVVGRWF RPRKGTLGAM DLGGASTQIT FETTSPAEDR ASEVQLHLYG QHYRVYTHSF
241 LCYGRDQVLQ RLLASALQTH GFHPCWPRGF STQVLLGDVY QSPCTMAQRP QNFNSSARVS
301 LSGSSDPHLC RDLVSGLFSS SSCPFSRCSF NGVFQPPVAG NFVAFSAFFY TVDFLRTSMG
361 LPVATLQQLQ AAANVNCNQT WAQQLLSRGY GFDERAFGGV IFQKKAADTA VGWALGYMLN
421 LTNLIPADPP GLRKGTDFFS WVVLLLLFAS ALAALVLLL RQVHSAKLPS TI
```

(SEQ ID NO: 40).

CD39-L2 человека, также известный как NTPDase6 или ENTPD6:

```
1 MKKGIRYETS RKTSYIFQQP QHGPWQTRMR KISNHGSLRV AKVAYPLGLC VGVFIYVAYI
61 KWHRATATQA FFSITRAAPG ARWGQQAHSF LGTAADGHEV FYGIMFDAGS TGTRVHVQFQ
121 TRPPRETPTL THETFKALKP GLSAYADDVE KSAQGIRELL DVAKQDIPFD FWKATPLVLK
181 ATAGLRLLP EKAQKLLQKV KEVFKASPFV VGDDCVSIMN GTDEGVSAWI TINFLTGSLK
241 TPGGSSVGM L DLGGSTQIA FLPRVEGTQ ASPPGYLTAL RMFNRTYKLY SYSYLGGLM
301 SARLAILGGV EGQPAKDGE LVSPCLSPSF KGEWEHAEVT YRVSGQKAAA SLHELCAARV
361 SEVLQNRVHR TEEVKHVDYF AFSYYDLAA GVGLIDAEKG GSLVVGDFEI AAKYVCTLE
421 TQPQSSPFSC MDLTYVSLLL QEFGFPRSKV LKLTRKIDNV ETSWALGAIF HYIDSLNRQK
481 SPAS
```

(SEQ ID NO: 41).

CD39-L3 человека, также известный как NTPDase3 или ENTPD3:

```
1 MFTVLTRQPC EQAGLKALYR TPTIIALVVL LVSIVVLVSI TVIQIHKQEV LPPGLKYGIV
61 LDAGSSRTTV YVYQWPAEKE NNTGVVSQTF KCSVKSGSIS SYGNNPQDVP RAFEECMQKV
121 KGQVPSHLHG STPIHLGATA GMRLRLQNE TAANEVLESI QSYFKSQFFD FRGAQIISGQ
181 EEGVYGWITA NYLMGNFLEK NLWHMWVHPH GVETTGALDL GGASTQISFV AGEKMDLNTS
241 DIMQVSLYGY VYTLYTHSFQ CYGRNEAEKK FLAMLLQNSP TKNHLTNPCY PRDYSISFTM
301 GHVFDLSLTV DQRPESYNPN DVITFEGTGD PSLCKEKKVAS IFDFKACHDQ ETCSDFGVYQ
361 PKIKGPFVAF AGFYITASAL NLSGSFSLDT FNSSTWNFCS QNWSQLPLLL PKFDEVYARS
421 YCFSANIYH LFNNGYKFE ETWPQIHFEK EVGNSSIAWS LGYMLSLTNQ IPAESPLIRL
481 PIEPPVFGVT LAFFTAALL CLAFLAYLCS ATRRKRHSEH AFDHAVDSD
```

(SEQ ID NO: 42).

CD39-L4 человека, также известный как NTPDase5 или ENTPD5:

```
1 MATSWGTVFF MLVVSCVCSA VSHRNQQTWF EGIFLSSMCP INVSASTLYG IMFDAGSTGT
61 RIHVYTFVQK MPGQLPILEG EVFDSVKPGL SAFVDQPKQG AETVQGLLEV AKDSIPRSHW
121 KKTVPVLKAT AGLRLLPENK AKALLFEVKE IFRKSPFLVP KGSVSIMDGS DEGILAWTV
181 NFLTGLHGH RQETVGTLDL GGASTQITFL PQFEKTLEQT PRGYLTSEF FNSTYKLYTH
241 SYLGFGLKAA RLATLGALET EGTDGHTFRS ACLPRWLEAE WIFGGVKYQY GGNQEGEVGF
301 EPCYAEVLRV VRGKLHQPEE VQRGSFYAFS YYYDRAVDTD MIDYEKGIL KVEDFERKAR
361 EVCDNLENFT SGSPFLCMDL SYTALLKDG FGFADSTVLQ LTKKVNNIET GWALGATFHL
421 LQSLGISH
```

(SEQ ID NO: 43).

I-394 связано с CD39, но не с какой-либо из изоформ CD39-L1, -L2, -L3 или -L4. Изотипические контрольные антитела (IC) не связывались ни с одной молекулой CD39 или CD39-L. Результаты показаны на фиг. 7.

Пример 11. Активация дендритных клеток.

Хотя АТФ обладает провоспалительным действием, считается, что CD39-опосредованный катаболизм АТФ способен нарушать активацию дендритных клеток (ДК), тем самым изменяя, в свою очередь, более широкий адаптивный иммунный ответ на опухолевый антиген. Чтобы оценить, может ли блокирование CD39 с использованием анти-CD39 антител помочь преодолеть CD39-опосредованное изменение активации дендритных клеток (ДК) в присутствии АТФ, авторы настоящего изобретения инкубировали происходящих из моноцитов ДК (moDC) с анти-CD39 антителами в присутствии АТФ.

Вкратце, моноциты человека выделяли из здоровой крови человека и дифференцировали в moDC в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и IL-4 в течение 6 дней. Затем moDC активировали в присутствии АТФ (Sigma, 0,25-1 мМ) в течение 24 ч, активацию ДК оценивали путем анализа экспрессии CD80, CD83 и HLA-DR методом проточной цитометрии. В некоторых случаях moDC предварительно инкубировали в течение 1 ч в присутствии ингибитора CD39: ARL6716 (Tocris, 250 мкМ), ингибитора CD73: APCP (Tocris 50 мкМ), анти-CD39 блокирующего антитела I-394 или BY40 (для BY40 см. WO 2009/095478) или анти-CD73 блокирующих антител. Липосахарид (Invivogen, 10 нг/мл) использовали в качестве положительного контроля. Чтобы оценить конечный результат АТФ-опосредованной активации ДК на активацию CD4 Т-клеток, АТФ-активированные ДК промывали и затем инкубировали с аллогенными CD4 Т-клетками (в соотношении 1 moDC/4 Т-клетки) для проведения реакции смешанных лимфоцитов (РСЛ) в течение 5 дней. Активацию и пролиферацию Т-клеток анализировали по экспрессии CD25 и путем разбавления с помощью набора Cell

Trace Violet методом проточной цитометрии (фиг. 8).

Результаты показаны на фиг. 9-11. В присутствии отрицательного контроля (среды) активация mDC наблюдалась в присутствии 1 мМ АТФ, однако АТФ в количестве 0,125, 0,25 или 0,5 мМ не позволял активировать mDC. Добавление химических ингибиторов CD39, которые, как считается, полностью блокируют ферментативную активность CD39 путем связывания с активным сайтом, приводит к активации mDC при каждой из концентраций 0,125, 0,25 или 0,5 мМ. Однако анти-CD39 антитела, такие как BY40, или анти-CD73 антитела, оказались неспособны стимулировать АТФ-индуцированную активацию дендритных клеток (ДК), что означает, что антитела не способны блокировать ферментативную активность в достаточной степени, чтобы избежать катаболизма АТФ. Удивительно, что анти-CD39 блокирующее антитело I-394 (показано на фигурах в концентрации 10 мкг/мл), которое по существу полностью блокирует АТФазную активность CD39 и, следовательно, может позволять АТФ накапливаться, позволило активировать mDC, что подтверждается результатами оценки экспрессии HLA-DR или CD83 при каждой из концентраций в 0,125, 0,25 или 0,5 мМ (фиг. 9 и 10). Интересно, что mDC, активированные в присутствии АТФ, способны индуцировать лучшую активацию и пролиферацию Т-клеток в ходе РСЛ. Кроме того, усиление АТФ-опосредованной активации mDC с помощью анти-CD39 блокирующего антитела I-394 приводило к более высокой пролиферации и активации Т-клеток (фиг. 11).

Оценка способности ингибиторов CD39 активировать ДК в присутствии АТФ представляет собой способ идентификации и оценки анти-CD39 антител, которые способны достигать высокой степени ингибирования CD39. Кроме того, возможность использования анти-CD39 антител для ослабления иммуносупрессивного эффекта, оказываемого CD39 на ДК, может усилить адаптивный иммунный ответ на антигены, особенно на опухолевые клетки. Кроме того, такие анти-CD39 антитела могут представлять особый интерес при использовании для усиления иммуногенного действия химиотерапевтических агентов. Многочисленные химиотерапевтические агенты, которые вызывают некроз опухолевых клеток, способны индуцировать АТФ; комбинированное применение с анти-CD39 антителами может быть особенно полезным для усиления противоопухолевого ответа в таких условиях.

Пример 12. Комбинированная терапия *in vivo* с анти-CD39 антителами агентов, вызывающих высвобождение АТФ.

1×10^6 опухолевых клеток MCA205 (саркома) мыши подкожно трансплантировали в правый бок мышей, генетически модифицированных для экспрессии CD39 человека (CD39 мыши KI). Мышам (n=9-13) вводили контрольный препарат оксалиплатин (10 мг/кг, внутривенно, в дни 5 и 12 или 14), анти-CD39 антитело I-394 мыши (20 мг/кг для первой инъекции, затем 10 мг/кг, внутривенно, два раза в неделю в течение 3 или 4 недель, начиная с 4-го дня) или их комбинации. Размер опухоли измеряли два раза в неделю с помощью штангенциркуля (L - длина и w - ширина), а объем опухоли рассчитывали по формуле $(L \times w^2)/2$. Мышей умерщвляли, когда объем опухоли превышал 1800 мм³ или когда опухоли были сильно некротизированы. Мышам KI с CD39 человека в день 0 были трансплантированы опухолевые клетки MCA205. Антитело I-394 мыши получили с использованием негликозилированного изотипа IgG1 мыши (с заменой остатка тяжелой цепи № 297 по нумерации Кабата), чтобы предотвратить связывание FcR мыши с комплементом и чтобы единственный наблюдаемый эффект был связан с блокирующим свойством антитела, а не с АЗКЦ- или КЗЦ-лизисом клеток иммуносупрессоров CD39⁺ или эндотелиальных клеток CD39⁺.

В первой серии испытаний мышей лечили на 5-й день после приживления опухолевых клеток либо с помощью контрольного (1 группа) ФСБ, либо химиотерапией оксалиплатином (2 группы). Параллельно одной группе мышей, получавших оксалиплатин, дважды в неделю вводили анти-CD39 антитело, причем терапия анти-CD39 антителом начиналась всего за один день до терапии оксалиплатином (в день 4). Это гарантировало индуцирование оксалиплатином высвобождения АТФ в опухолевой среде, где CD39 уже полностью ингибировался, и, таким образом, обеспечивало оптимальную профилактику деградации АТФ с помощью внутриопухолевого CD39. В этом испытании задержка роста опухоли и выживаемости у мышей могла наблюдаться при комбинации оксалиплатина и группы антител I-394, однако задержка считалась относительно небольшой, несмотря на то, что в этой группе был получен один полный ответ, тогда как полного ответа в контрольной группе или группе с одним оксалиплатином не наблюдалось. Средняя продолжительность выживания при контроле составила 20 дней, оксалиплатине - 25 дней, антителе I-394 в сочетании с оксалиплатином - 31 день. Результаты показаны на фиг. 12.

Во второй серии испытаний (показан один репрезентативный эксперимент из 2) инъекцию оксалиплатина повторяли через одну неделю после первой инъекции оксалиплатина, снова всего через один день после терапии антителом I-394, чтобы обеспечить оптимальное ингибирование деградации АТФ. Антитело I-394, введенное отдельно, оказывало лишь незначительное влияние на рост опухоли и выживаемости у мышей. Оксалиплатин в качестве единственного агента с повторными (дважды) инъекциями действительно вызывал некоторое уменьшение объема опухоли и увеличение выживаемости у мышей. Однако комбинация повторных инъекций оксалиплатина с антителом I-394, вводимым перед оксалиплатином, вызывала регрессию объема опухоли у всех мышей с тремя полными ответами (ПО) по

сравнению с двумя в группе с одним оксалиплатином и шестью частичными ответами против трех ПО в группе с одним оксалиплатином. Комбинация также улучшала выживаемость у мышей через 40 дней после приживления опухоли у 4/13 мышей без опухоли по сравнению с 2/12 в группе, получавшей только оксалиплатин. Результаты показаны на фиг. 13.

Считается, что вторая повторная инъекция оксалиплатина в этой ситуации позволяет накапливать АТФ и аденозин в присутствии анти-CD39 блокирующего антитела в течение стандартного двухнедельного периода, необходимого для назревания эффективного противоопухолевого иммунного ответа. Следовательно, у людей улучшенная схема лечения может включать повторное прохождение химиотерапии по меньшей мере дважды, чтобы достичь наиболее сильного комбинированного эффекта с анти-CD39 блокирующим антителом. Кроме того, анти-CD39 антитело в идеале можно вводить по меньшей мере за 1-48 ч до химиотерапевтического агента, вызывающего высвобождение АТФ, чтобы обеспечить полное ингибирование внутриопухолевого CD39 и полное ингибирование деградации АТФ в аденозин, в момент, когда химиотерапевтический агент вызывает высвобождение АТФ.

Все приведенные в настоящем документе ссылки, включая публикации, заявки на патенты и патенты, полностью включены в данное описание посредством ссылки, как если бы каждая ссылка была приведена индивидуально, конкретно указана для включения в качестве ссылки и была полностью изложена в данном документе (в максимальном объеме, разрешенном законом), независимо от любого отдельно взятого конкретного документа, включенного где-либо еще в настоящем документе.

Если не указано иное, то все точные значения, представленные в данном документе, представляют собой соответствующие приблизительные значения (например, все точные значения в примерах, приведенные в отношении конкретного показателя или измерения, могут также рассматриваться как соответствующие приблизительные показания измерения благодаря обозначению "приблизительно", вставленному там, где это целесообразно). Если "приблизительно" используется вместе с числом, то это значит, что также подразумеваются значения в диапазоне $\pm 10\%$ от указанного числа.

Описание в данном документе любого аспекта или варианта реализации настоящего изобретения с использованием таких терминов, как "состоящий из", "имеющий", "включающий" или "содержащий" со ссылкой на компонент или компоненты, предназначено для подтверждения аналогичного аспекта или варианта реализации настоящего изобретения, который "состоит из", "состоит по существу из" или "по существу включает" данный конкретный компонент или компоненты в том случае, если не указано иное или это явно не противоречит контексту (например, композицию, описанную в данном документе как содержащую конкретный компонент, следует понимать также как описание композиции, состоящей из этого компонента в том случае, если не указано иное или это явно не противоречит контексту).

Использование любых и всех примеров или вводных слов перед примером (например, "такой как"), представленных в данном документе, предназначено просто для лучшего освещения настоящего изобретения и не налагает никаких ограничений на объем изобретения, если не заявлено иное. Ни один термин в описании не должен истолковываться как указывающий на какой-либо не заявленный элемент как существенный для реализации настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение антитела, которое способно связываться с белком CD39 (NTPDase1) человека и ингибировать АТФазную активность белка CD39 (NTPDase1) человека, при лечении рака, при этом указанное антитело вводят в комбинации с препаратом на основе платины, и причем указанное антитело содержит HCDR1, содержащий аминокислотную последовательность DYNMH (SEQ ID NO: 5); HCDR2, содержащий аминокислотную последовательность YIVPLNGGSTFNQKFKG (SEQ ID NO: 6); HCDR3, содержащий аминокислотную последовательность GGTRFAY (SEQ ID NO: 7); LCDR1, содержащий аминокислотную последовательность RASESVDNFGVSFMY (SEQ ID NO: 8); LCDR2, содержащий аминокислотную последовательность GASNQQS (SEQ ID NO: 9); и LCDR3, содержащий аминокислотную последовательность QQTKEVPYT (SEQ ID NO: 10).

2. Применение антитела по п.1, отличающееся тем, что указанное антитело способно связываться с растворимым белком внеклеточного домена CD39 человека и ингибировать АТФазную активность растворимого белка внеклеточного домена CD39 человека, при этом необязательно указанное антитело способно вызывать снижение АТФазной активности указанного белка внеклеточного домена CD39 человека в растворе более чем на 70%, при этом указанное антитело ингибирует АТФазную активность растворимого белка внеклеточного домена CD39 человека в присутствии экзогенно добавленного АТФ, при этом необязательно концентрация добавленного АТФ составляет 20 мкМ.

3. Применение антитела по любому из пп.1 или 2, отличающееся тем, что антитело, которое способно связываться с CD39 и ингибировать АТФазную активность CD39 в присутствии экзогенно добавленного АТФ, представляет собой антитело, которое способно вызывать увеличение экспрессии маркера активации на клеточной поверхности в происходящих из моноцитов дендритных клетках (moDC), когда такие moDC инкубируют *in vitro* с указанным антителом и АТФ, необязательно при этом экзогенно добавленный АТФ обеспечивают в концентрации 0,125, 0,25 или 0,5 мМ.

4. Применение антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанный препарат на основе платины представляет собой оксалиплатин, цисплатин, карбоплатин, недаплатин, фенантриплатин, пикоплатин или сатраплатин.

5. Применение антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанный препарат на основе платины, вводят через 1-48 ч после введения указанного антитела, которое способно связываться с CD39 и ингибировать АТФазную активность CD39.

6. Применение антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанный рак представляет собой рак яичника.

7. Применение антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанный рак представляет собой рак желудка или пищевода.

8. Применение антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанный рак представляет собой рак легкого.

9. Применение антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанный рак представляет собой рак толстой кишки.

10. Применение антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанный рак представляет собой рак головы и шеи.

11. Применение антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанный рак представляет собой платинорезистентный рак.

12. Применение антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что антитело, которое нейтрализует АТФазную активность CD39, не связывается с полипептидами CD16, CD32a, CD32b и/или CD64 человека.

13. Применение антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанное антитело имеет ослабленное связывание со следующими полипептидами:

(a) мутантным полипептидом CD39, содержащим мутации: Q96A, N99A, E143A и R147E (по отношению к SEQ ID NO: 1);

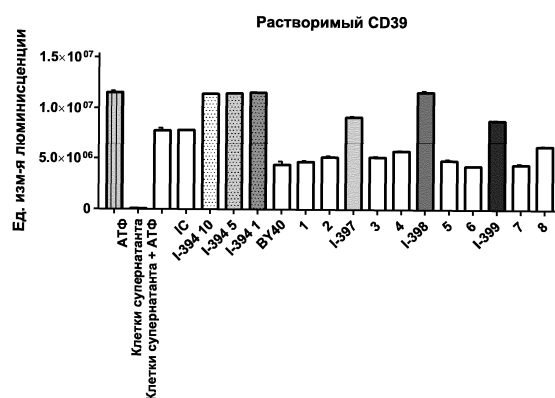
(b) мутантным полипептидом CD39, содержащим мутации: R138A, M139A и E142K (по отношению к SEQ ID NO: 1);

(c) мутантным полипептидом CD39, содержащим мутации: K87A, E100A и D107A (по отношению к SEQ ID NO: 1); и/или

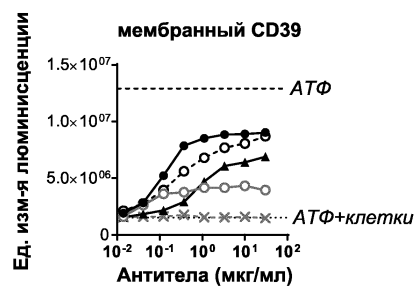
(d) мутантным полипептидом CD39, содержащим мутации: N371K, L372K, E375A, K376G и V377S, и вставку валина между остатками 376 и 377 (по отношению к SEQ ID NO: 1);

в каждом случае, по сравнению со связыванием указанного антитела с полипептидом CD39 дикого типа, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

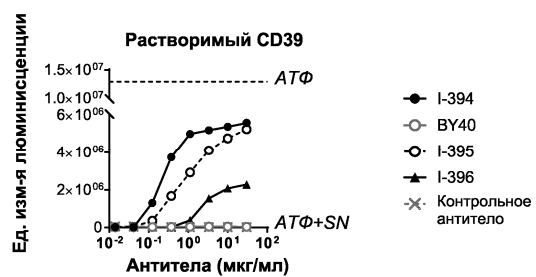
14. Применение антитела по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что указанный препарат на основе платины вводят в виде комбинированной терапии, включающей препарат на основе платины, при этом указанная комбинированная терапия, включающая препарат на основе платины, включает фолиновую кислоту, 5-фторурацил и оксалиплатин.



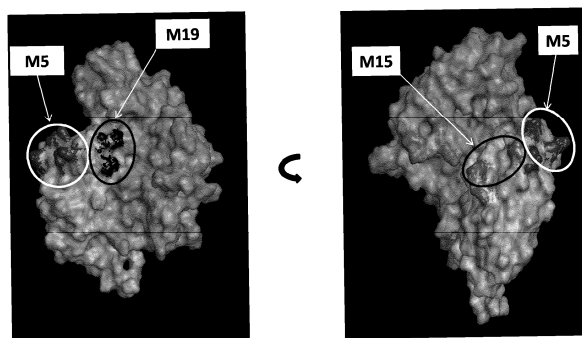
Фиг. 1



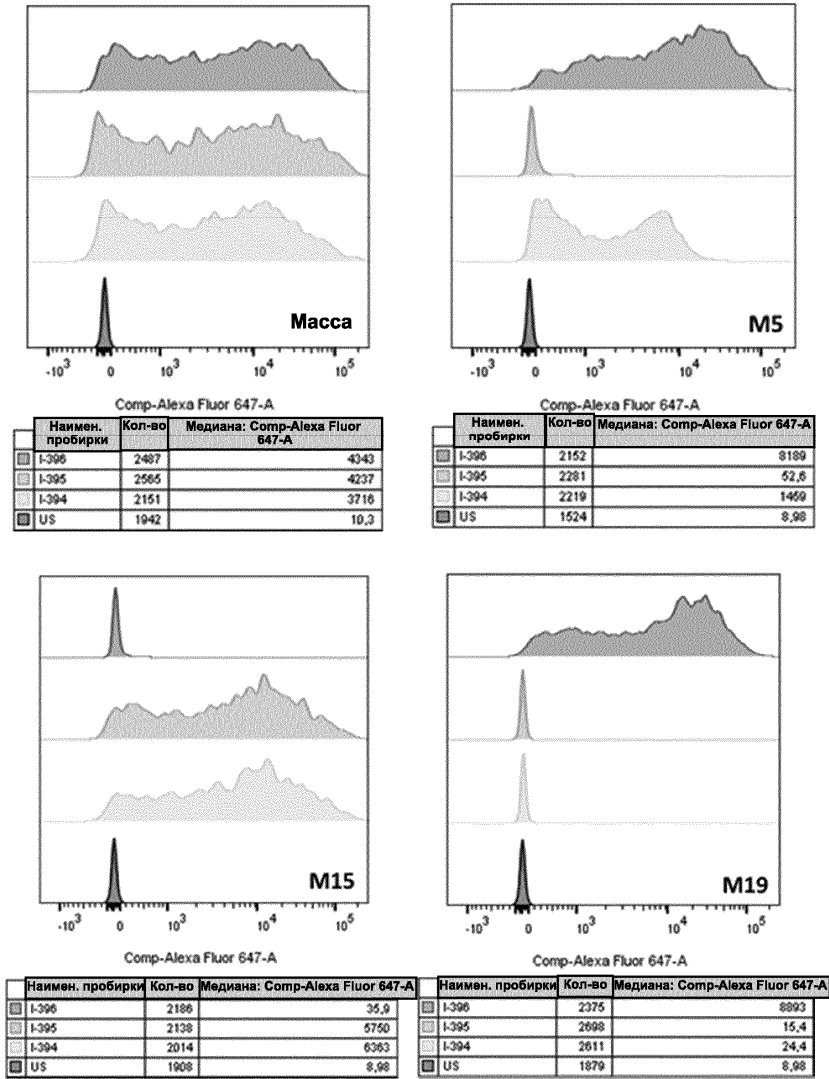
Фиг. 2А



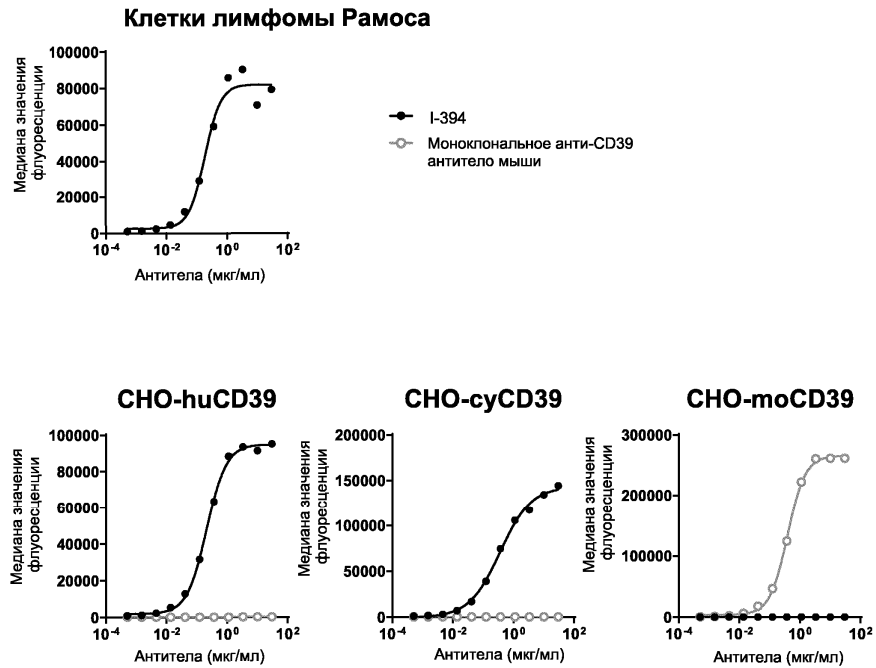
Фиг. 2В



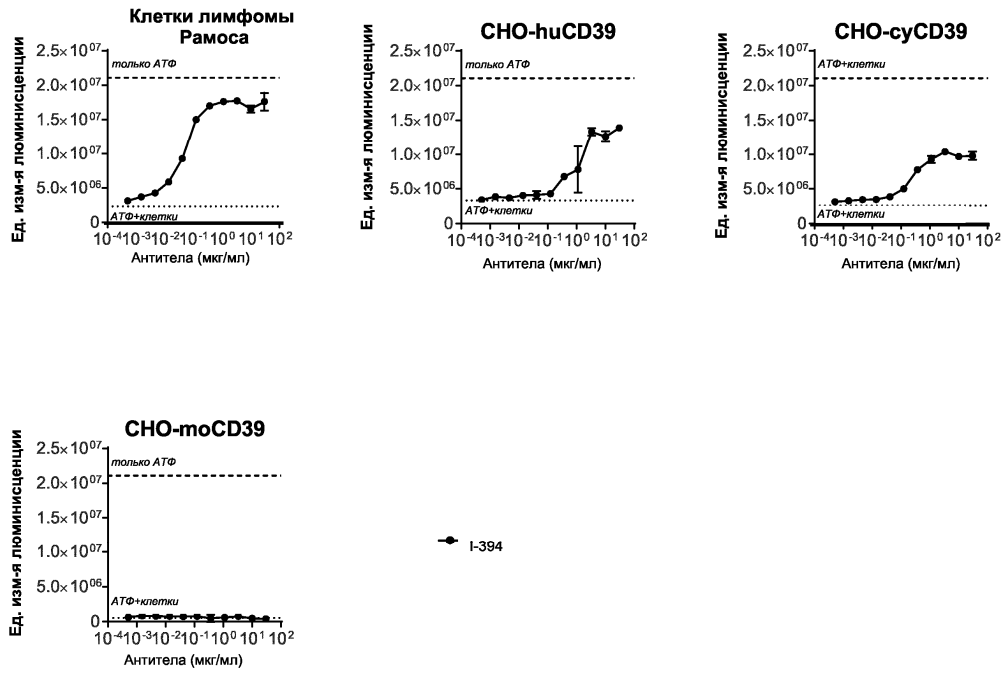
Фиг. 3А



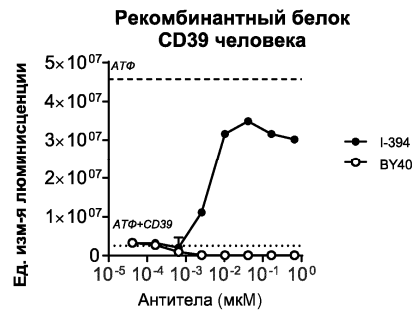
Фиг. 3В



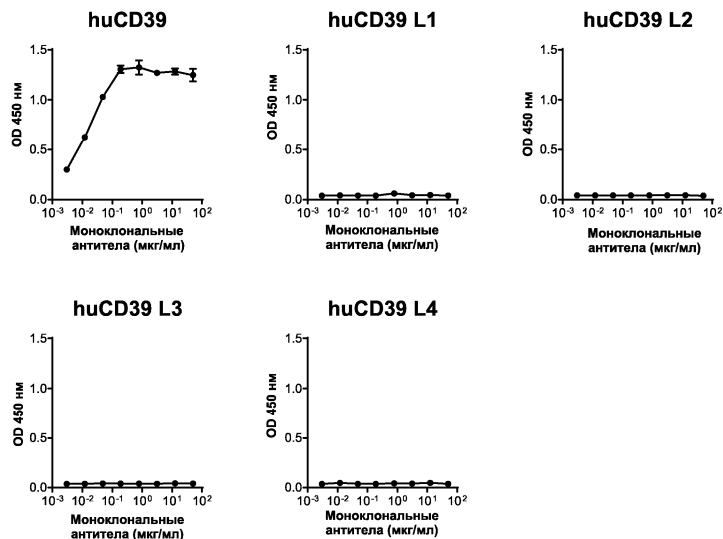
Фиг. 4



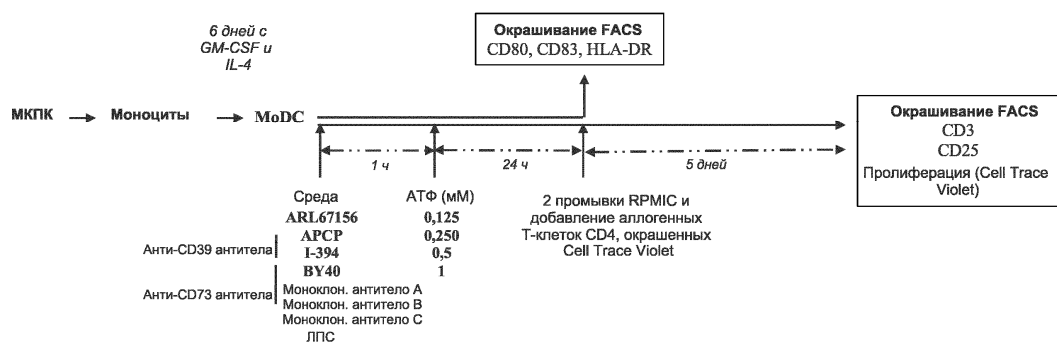
Фиг. 5



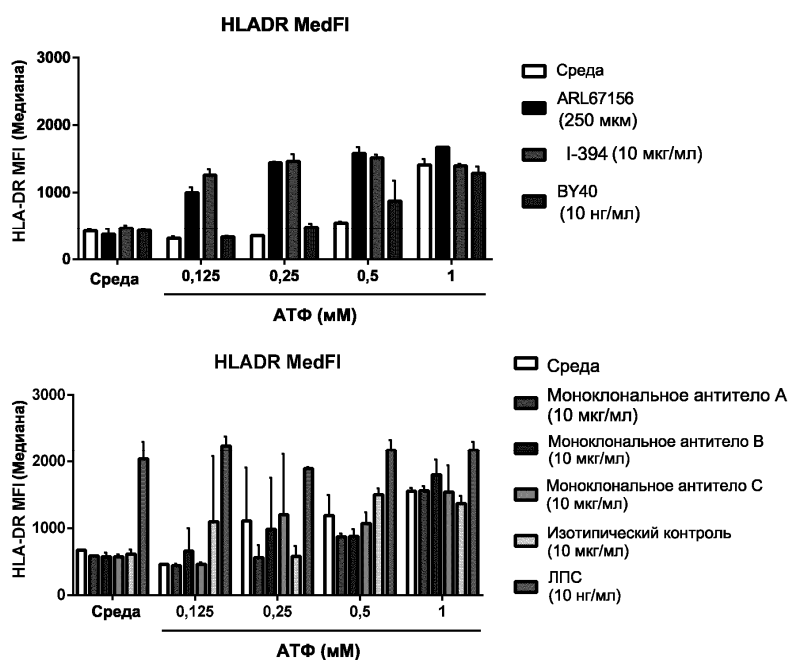
Фиг. 6



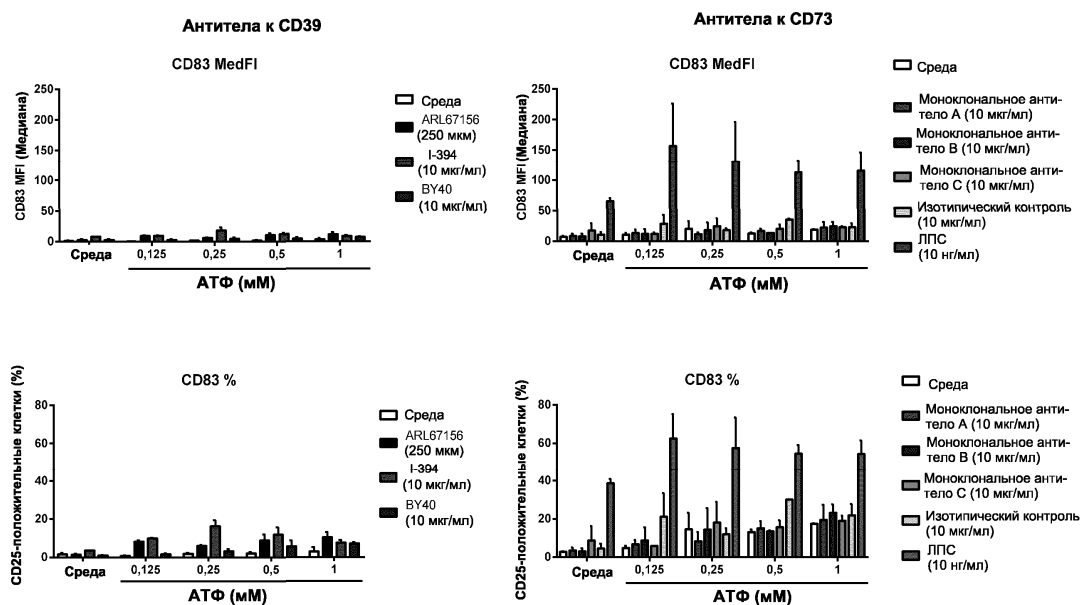
Фиг. 7



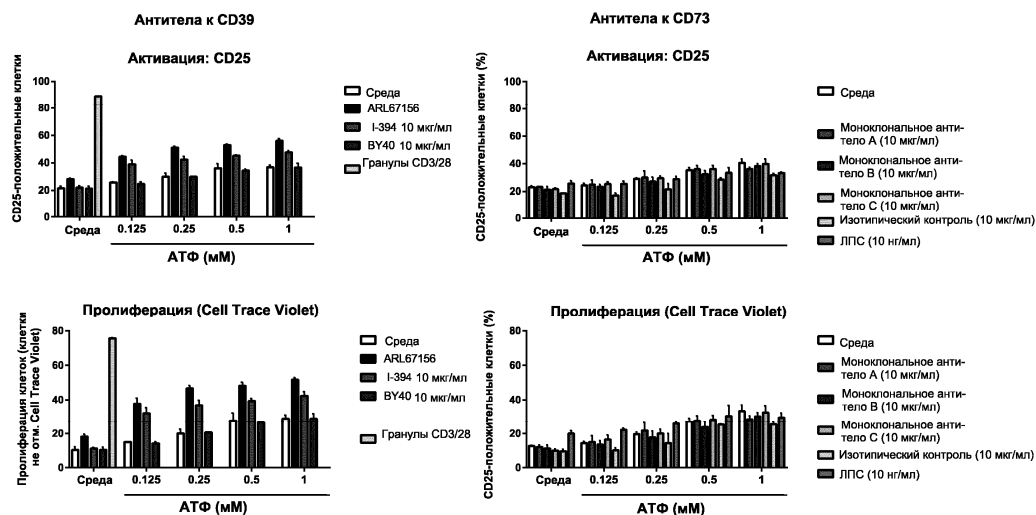
Фиг. 8



Фиг. 9

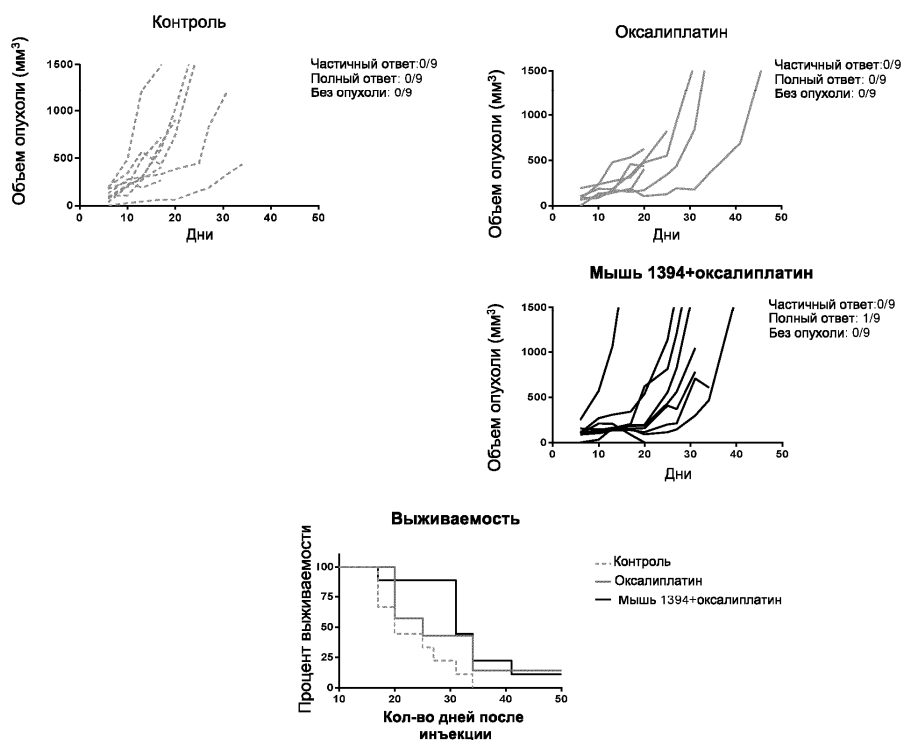


Фиг. 10



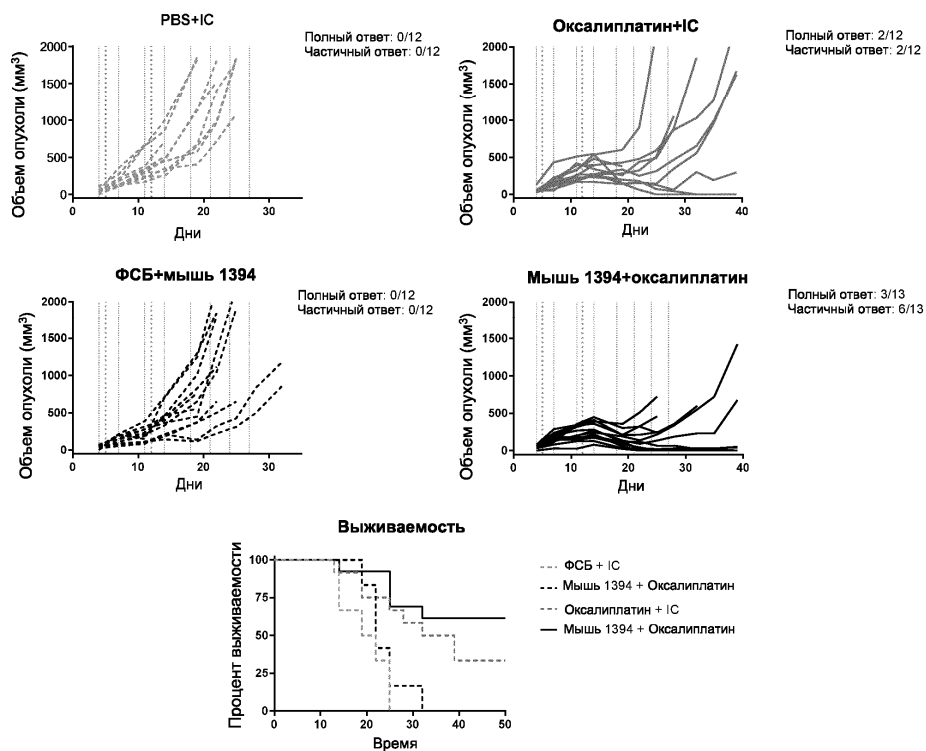
Фиг. 11

Однократная инъекция оксалиплатина в День 5



Фиг. 12

Повторные инъекции оксалиплатина в День 5, День 12



Фиг. 13

