

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391918** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.10.18

(22) Дата подачи заявки
2021.12.29

(51) Int. Cl. *A61K 31/519* (2006.01)
A61K 31/4375 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ ИНГИБИТОРЫ A2A/A2B, ИНГИБИТОРЫ PD-1/PD-L1 И АНТИТЕЛА АНТИ-CD73

(31) **63/131,659**

(32) **2020.12.29**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/065472**

(87) **WO 2022/147092 2022.07.07**

(71) Заявитель:
ИНСАЙТ КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:

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

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

(57) Описаны комбинированные варианты терапии, включающие введение ингибитора CD73, ингибитора аденозинового рецептора A2A или A2B и ингибитора PD-1/PD-L1. Описанные варианты комбинированной терапии применимы при лечении заболеваний, связанных с активностью аденозиновых рецепторов и/или CD73, и/или PD-1/PD-L1, включая, например, рак, воспалительные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания и нейродегенеративные заболевания. Также описаны антитела к CD73, ингибиторы PD-1/PD-L1 и ингибиторы A2A/A2B.

A1

202391918

202391918

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578865EA/023

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ, ВКЛЮЧАЮЩАЯ ИНГИБИТОРЫ A2A/A2B, ИНГИБИТОРЫ PD-1/PD-L1 И АНТИТЕЛА АНТИ-CD73

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

В данном документе описаны комбинированные виды терапии, включающие ингибитор A2A/A2B, ингибитор PD-1/PD-L1, антитело анти-CD73, и способы их применения для лечения таких заболеваний, как рак.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Кластер дифференцировки 73 (CD73) представляет собой мембранный белок, связанный с гликозилфосфатидилинозитолом (GPI), который катализирует превращение внеклеточного аденозинмонофосфата (AMP) в аденозин. Он функционирует как гомодимер, может выделяться и проявляет активность в кровотоке как растворимый белок. В дополнение к своей ферментативной функции CD73 также является молекулой клеточной адгезии и играет роль в регуляции переноса лейкоцитов. Известно, что уровни CD73 повышаются из-за повреждения тканей или гипоксических состояний, а ряд солидных опухолей имеют повышенные уровни CD73. Повышенная регуляция CD73 в опухоли способствует обогащению микроокружения опухоли аденозином, что оказывает многочисленные проопухолевые и иммунодепрессивные эффекты.

Аденозин представляет собой внеклеточную сигнальную молекулу, которая может модулировать иммунные ответы через многие типы иммунных клеток. Аденозин был впервые признан физиологическим регулятором тонуса коронарных сосудов Drury и Szent-György (Sachdeva, S. и Gupta, M. Saudi Pharmaceutical Journal, 2013, 21, 245-253), однако еще в 1970 году Sattin и Rall продемонстрировали, что аденозин регулирует функцию клетки посредством заполнения специфических рецепторов на поверхности клетки (Sattin, A. и Rall, T.W., 1970. Mol. Pharmacol. 6, 13-23; Hasko, G., et al., 2007, Pharmacol. Ther. 113, 264-275).

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

помощью других фосфатаз, таких как щелочная фосфатаза или простатоспецифическая фосфатаза.

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

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

Рецепторы A2B высоко экспрессируются в желудочно-кишечном тракте, мочевом пузыре, легких и тучных клетках (Antonoli, L. et al., *Nature Reviews Cancer*, 2013, 13, 842-857). Рецептор A2B, хотя структурно тесно связан с рецептором A2A и способен активировать аденилатциклазу, функционально отличается. Было высказано предположение, что этот подтип может использовать системы передачи сигнала, отличные от аденилатциклазы (Livingston, M. et al., *Inflamm. Res.*, 2004, 53, 171-178). Среди всех аденозиновых рецепторов, аденозиновый рецептор A2B представляет собой рецептор с низкой аффинностью, который, как полагают, остается молчащим в физиологических условиях и активируется вследствие повышенных внеклеточных уровней аденозина (Ryzhov, S. et al. *Neoplasia*, 2008, 10, 987-995). Активация аденозинового рецептора A2B может стимулировать аденилатциклазу и фосфолипазу C за счет активации белков Gs и Gq, соответственно. Также описано связывание с митоген-активированными протеинкиназами (Borrmann, T. et al., *J. Med. Chem.*, 2009, 52(13), 3994-4006).

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

В опухолях этот путь захватывается опухолевым микроокружением и блокирует противоопухолевую способность иммунной системы, способствуя прогрессированию рака. В опухолевом микроокружении аденозин в основном генерируется из внеклеточного АТФ

двумя эктонуклеотидазами CD39 и CD73. Множество типов клеток могут генерировать аденозин, экспрессируя CD39 и CD73. К ним относятся опухолевые клетки, Т-эффекторные клетки, Т-регуляторные клетки, ассоциированные с опухолью макрофаги, клетки-супрессоры миелоидного происхождения (MDSC), эндотелиальные клетки, ассоциированные с раком фибробласты (CAF) и мезенхимальные стромальные/стволовые клетки (MSC). Кроме того, гипоксия и воспаление, условия, характерные для микроокружения опухоли, индуцируют экспрессию CD39 и CD73, что приводит к увеличению продукции аденозина. В результате уровень аденозина в солидных опухолях выше по сравнению с нормальными физиологическими условиями.

A2A в основном экспрессируется на лимфоидных клетках, включая Т-эффекторные клетки, Т-регуляторные клетки и естественные клетки-киллеры (NK). Блокирование рецептора A2A может предотвратить нижерасположенные иммуносупрессивные сигналы, которые временно инактивируют Т-клетки. Рецепторы A2B в основном экспрессируются на клетках моноцитного происхождения, включая дендритные клетки, ассоциированные с опухолью макрофаги, клетки-супрессоры миелоидного происхождения (MDSC) и мезенхимальные стромальные/стволовые клетки (MSC). Блокирование рецептора A2B в доклинических моделях может подавлять рост опухоли, блокировать метастазирование и повышать презентацию опухолевых антигенов.

С точки зрения профиля безопасности блокирования ADORA2A/ADORA2B (A2A/A2B), мыши с нокаутом рецепторов A2A и A2B (KO) являются жизнеспособными, не демонстрируют аномалий роста и являются фертильными (Allard, B. et al. *Current Opinion in Pharmacology*, 2016, 29, 7-16). Мыши A2A KO демонстрировали повышенные уровни провоспалительных цитокинов только после введения липополисахаридов (LPS) без признаков воспаления на исходном уровне (Antonioli, L. et al., *Nature Reviews Cancer*, 2013, 13, 842-857). Мыши A2B KO демонстрировали нормальное количество тромбоцитов, эритроцитов и лейкоцитов, но повышенные уровни маркеров воспаления на исходном уровне, например, TNF-альфа и IL-6 (Antonioli, L. et al., *Nature Reviews Cancer*, 2013, 13, 842-857). Дальнейшее повышение продукции TNF-альфа и IL-6 наблюдали после введения LPS. У мышей A2B KO также наблюдали повышенное содержание молекул сосудистой адгезии, которые опосредуют воспаление, а также адгезию/выворачивание лейкоцитов; усиленную активацию тучных клеток; повышенную чувствительность к IgE-опосредованной анафилаксии и повышенную утечку из сосудов и приток нейтрофилов при гипоксии (Antonioli, L. et al., *Nature Reviews Cancer*, 2013, 13, 842-857).

Некоторые пациенты с раком имеют плохой долгосрочный прогноз и/или устойчивы к одному или большему количеству видов лечения, обычно применяемым в данной области. Таким образом, сохраняется потребность в эффективных методах лечения рака с повышенной эффективностью и улучшенными профилями безопасности для этой трудно поддающейся лечению популяции пациентов.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящей заявке, *среди прочего*, предлагается способ лечения рака у субъекта,

включающий введение указанному субъекту следующих агентов:

- (i) ингибитор A2A/A2B;
- (ii) ингибитор PD-1/PD-L1; и
- (iii) ингибитор CD73 человека.

В настоящей заявке дополнительно предлагаются способы лечения рака у субъекта, включающие введение указанному субъекту следующих агентов:

- (i) ингибитор PD-1/PD-L1; и
- (ii) ингибитор CD73 человека.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На ФИГ. 1 продемонстрировано ингибирование опухолевого роста (TGI) у гуманизованных мышей-хозяев, несущих аденокарциноматозную опухоль молочной железы человека MDA-MB-231, с применением методов лечения, описанных в Примере 1.

На ФИГ. 2 продемонстрирован анализ выживаемости гуманизованных мышей-хозяев, несущих аденокарциноматозную опухоль молочной железы человека MDA-MB-231, с применением методов лечения, описанных в Примере 1.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящей заявке предлагается способ лечения рака у субъекта, включающий введение указанному субъекту следующих агентов:

- (i) ингибитор A2A/A2B;
- (ii) ингибитор PD-1/PD-L1; и
- (iii) ингибитор CD73 человека.

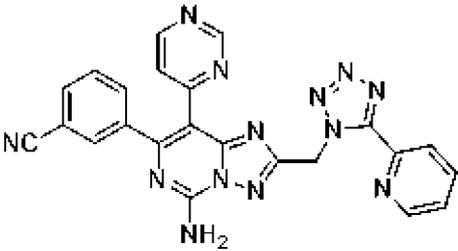
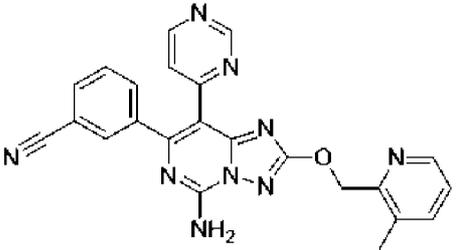
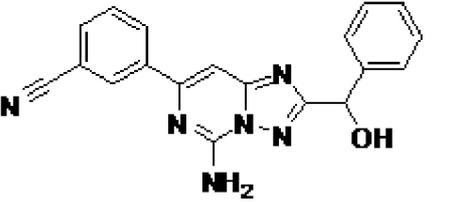
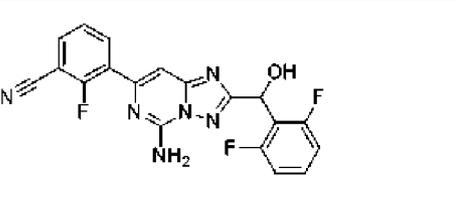
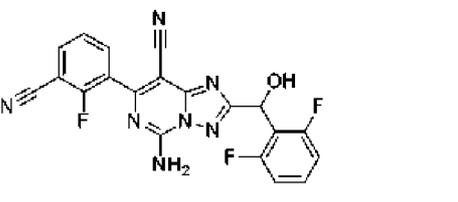
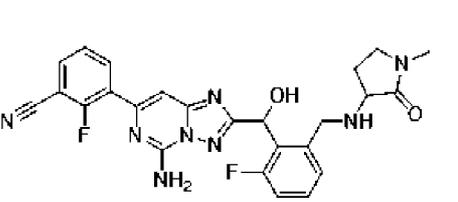
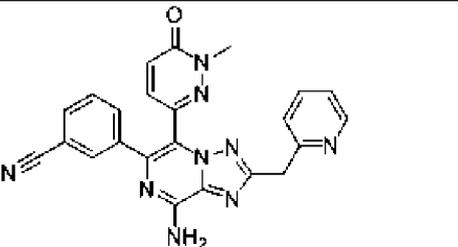
В настоящей заявке дополнительно предлагается а способ лечения рака у субъекта, включающий введение указанному субъекту следующих агентов:

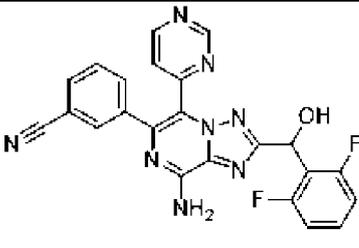
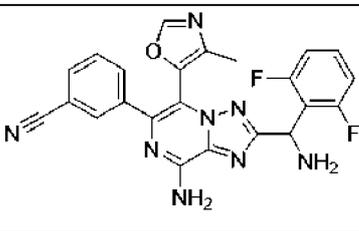
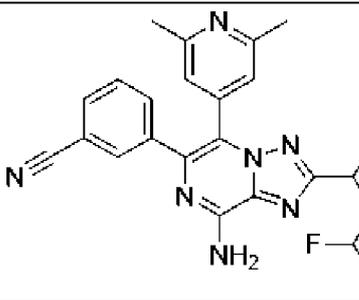
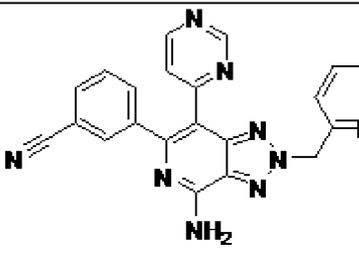
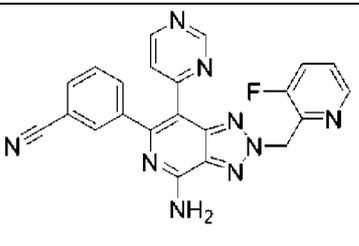
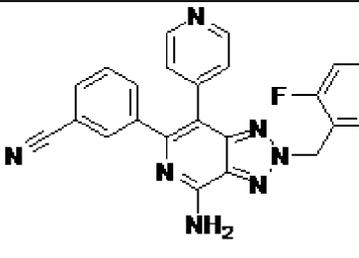
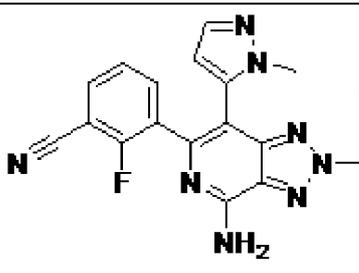
- (i) ингибитор PD-1/PD-L1; и
- (ii) ингибитор CD73 человека.

Ингибиторы аденозиновых рецепторов A2A/A2B

Аденозиновый путь является критически важным иммуносупрессивным путем, который защищает ткани от чрезмерных иммунных реакций (Antonioli, L. et al. *Nature Review Cancer*. 2013, 13, 842-857; *Inflamm. Res*. 2004, 53: 171-178; Allard, et al. *Current Opinion in Pharmacology* 2016, 29:7). Иммуносупрессивная активность аденозина опосредована двумя рецепторами, связанными с G-белком (GPCR), известными как A2A и A2B; оба рецептора экспрессируются на многих типах иммунных клеток, включая Т-клетки, естественные клетки-киллеры, макрофаги, дендритные клетки, тучные клетки и клетки-супрессоры миелоидного происхождения (*Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013, 21:245; *Frontiers in Immunology*. 2019, 10:925; *J Clin Invest*. 2017, 127(3):929; *Neoplasia*. 2008, 10: 987; *Neoplasia*. 2013, 15:1400). Сообщалось, что вследствие высокого уровня продукции аденозина, наблюдаемого в микроокружении опухоли, противоопухолевый потенциал иммунной системы подавляется, что приводит к прогрессированию рака.

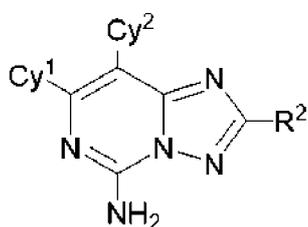
Типовая аминокислотная последовательность белка аденозинового рецептора A2A человека (номер доступа GenBank NP_001265428) является следующей:

3В	3-(5-Амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-1Н-тетразол-1-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил	
4	3-(5-Амино-2-((3-метилпиридин-2-ил)метокси)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил	
5	3-(5-Амино-2-(гидрокси(фенил)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил	
6	3-(5-Амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрил	
7	5-Амино-7-(3-циано-2-фторфенил)-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-8-карбонитрил	
8	3-(5-Амино-2-((2-фтор-6-(((1-метил-2-оксопирролидин-3-ил)амино)метил)фенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрил	
9	3-(8-Амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил	

10	3-(8-Амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-5-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5- <i>a</i>]пиразин-6-ил)бензонитрил	
11	3-(8-амино-2-(амино(2,6-дифторфенил)метил)-5-(4-метилоксазол-5-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5- <i>a</i>]пиразин-6-ил)бензонитрил	
12	3-(8-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-5-(2,6-диметилпиридин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5- <i>a</i>]пиразин-6-ил)бензонитрил	
13	3-(4-амино-2-(пиридин-2-илметил)-7-(пиримидин-4-ил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5- <i>c</i>]пиримидин-6-ил)бензонитрил	
14	3-(4-амино-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-7-(пиримидин-4-ил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5- <i>c</i>]пиридин-6-ил)бензонитрил	
15	3-(4-амино-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-7-(пиридин-4-ил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5- <i>c</i>]пиридин-6-ил)бензонитрил	
16	3-(4-амино-7-(1-метил-1Н-пиразол-5-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5- <i>c</i>]пиридин-6-ил)-2-фторбензонитрил	

17	7-(1-((5-Хлорпиридин-3-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-3-метил-9-пентил-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-он	
18	3-Метил-7-(1-((5-метилпиридин-3-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-9-пентил-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-он	
19	3-Метил-9-пентил-7-(1-(тиено[3,2-b]пиридин-6-илметил)-1H-пиразол-4-ил)-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-он	
20	7-(1-((2-(2-(диметиламино)ацетил)-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-6-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-3-метил-9-пентил-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-он	
21A	3-(2-((5-(1H-пиразол-1-ил)-2H-тетразол-2-ил)метил)-5-амино-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-c]пиримидин-7-ил)бензонитрил	
21B	3-(2-((5-(1H-пиразол-1-ил)-1H-тетразол-1-ил)метил)-5-амино-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-c]пиримидин-7-ил)бензонитрил	

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



(I),

или его фармацевтически приемлемую соль, где

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

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления соединения по формуле (I), Sy^2 представляет собой пиримидинил.

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

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

В некоторых вариантах осуществления соединения по формуле (I) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(5-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. Соединение 2, Таблица 1).

В некоторых вариантах осуществления соединения по формуле (I) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-2H-тетразол-2-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. Соединение 3A, Таблица 1).

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

ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. Соединение 3В, Таблица 1).

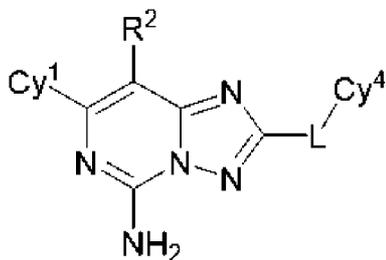
В некоторых вариантах осуществления соединение по формуле (I) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(5-Амино-2-((3-метилпиримидин-2-ил)метокси)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. Соединение 4, Таблица 1).

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

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

Описание синтеза и характеристик соединений по формуле (I) можно найти в публикациях WO 2019/168847 и US 62/891,685, обе из которых полностью включены в данный документ посредством ссылки.

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



(II)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

R^2 выбран из H и CN;

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

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

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

каждый R^8 независимо выбран из галогена, C_{1-6} алкила, C_{1-6} галогеналкила, C_{2-4} алкенила, C_{2-4} алкинила, фенила, C_{3-7} циклоалкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, фенила- C_{1-3} алкила, C_{3-7} циклоалкила- C_{1-3} алкила, (5-6-членный

гетероарил)-C₁₋₃алкила и (4-7-членный гетероциклоалкила)-C₁₋₃алкила, при этом каждый из C₁₋₆ алкила, C₂₋₄ алкенила, C₂₋₄ алкинила, фенила, C₃₋₇циклоалкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, фенила-C₁₋₃алкила, C₃₋₇циклоалкила-C₁₋₃алкила, (5-6-членный гетероарил)-C₁₋₃алкила и (4-7-членный гетероциклоалкил)-C₁₋₃алкила из R⁸ необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8A};

каждый R^{8A} независимо выбран из галогена, C₁₋₆ алкила, 5-6-членного гетероарила, 4-7-членного гетероциклоалкила, CN, OR^{a81} и NR^{c81}R^{d81}, при этом каждый C₁₋₆ алкил, 5-6-членного гетероарила и 4-7-членный гетероциклоалкила из R^{8A} необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8B};

каждый R^{a81}, R^{c81} и R^{d81} независимо выбран из H, C₁₋₆ алкила и 4-7-членного гетероциклоалкила, при этом каждый из C₁₋₆ алкила и 4-7-членного гетероциклоалкила из R^{a81}, R^{c81} и R^{d81} необязательно замещен 1, 2 или 3 независимо выбранными заместителями R^{8B};

каждый R^{8B} независимо выбран из галогена и C₁₋₃ алкила; и

каждый R^{8D} независимо выбран из OH, CN, галогена, C₁₋₆ алкила и C₁₋₆ галогеналкила.

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

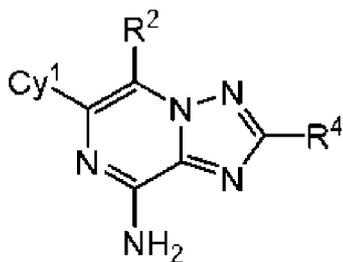
В некоторых вариантах осуществления соединение по формуле (II) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(5-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. Соединение 6, Таблица 1).

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

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

Описание синтеза и характеристик соединений по формуле (II) можно найти в публикации WO 2019/222677, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

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



(III)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

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

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

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

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

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

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

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

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

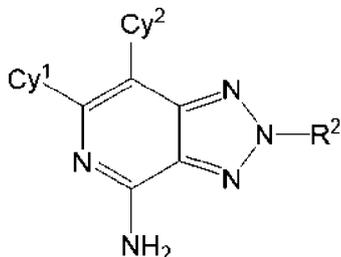
В некоторых вариантах осуществления соединение по формуле (III) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(8-амино-2-(амино(2,6-дифторфенил)метил)-5-(4-метилоксазол-5-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. Соединение 11, Таблица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

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

12, Таблица 1).

Описание синтеза и характеристик соединений по формуле (III) можно найти в публикации PCT/US2019/040496, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

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



(IV)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

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

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

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

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

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

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

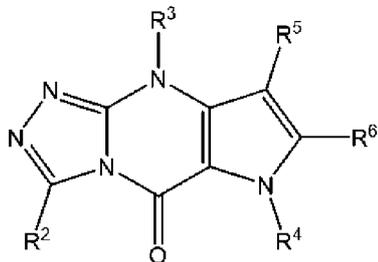
В некоторых вариантах осуществления соединение по формуле (IV) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(4-амино-2-((3-фторпиримидин-2-ил)метил)-7-(пиримидин-4-ил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиримидин-6-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. Соединение 14, Таблица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

В некоторых вариантах осуществления соединение по формуле (IV) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(4-амино-2-((3-фторпиримидин-2-ил)метил)-7-(пиримидин-4-ил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиримидин-6-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. Соединение 15, Таблица 1).

В некоторых вариантах осуществления соединение по формуле (IV) или его фармацевтически приемлемая соль представляет собой 3-(4-амино-7-(1-метил-1H-пиразол-5-ил)-2-(пиримидин-2-илметил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиримидин-6-ил)-2-фторбензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль (см. Соединение 16, Таблица 1).

Описание синтеза и характеристик соединений по формуле (IV) можно найти в публикации US 62/798,180, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

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



(V)

или его фармацевтически приемлемую соль, где

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

R^3 выбран из H и C_{1-6} алкила;

R^4 выбран из H и C_{1-6} алкила;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Описание синтеза и характеристик соединений по формуле (V) можно найти в публикации US-2019-0337957, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

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

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

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

В некоторых случаях ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или A2B представляет собой AZD4635 (6-(2-хлор-6-метилпиридин-4-ил)-5-(4-фторфенил)-1,2,4-триазин-3-амин).

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

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

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

В контексте данного документа термин «около» применительно к измеримому значению, такому как количество, доза, временная продолжительность и т.п., означает, что он охватывает отклонения $\pm 10\%$. В определенных вариантах осуществления термин «около» может включать отклонения в $\pm 5\%$, $\pm 1\%$ или $\pm 0,1\%$ от указанного значения и любые отклонения между этими значениями, поскольку такие отклонения подходят для выполнения описанных способов.

В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе соединение

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

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

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

В контексте данного документа фраза «необязательно замещенный» означает незамещенный или замещенный. Заместители выбраны независимо, и замещение может быть в любом химически доступном положении. В контексте данного документа термин «замещенный» означает, что атом водорода удален и заменен заместителем. Один двухвалентный заместитель, *например*, оксо, может замещать два атома водорода. Следует понимать, что замещение в указанном атоме ограничено валентностью.

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

В определениях термин « C_{n-m} » указывает диапазон, который включает конечные точки, где *n* и *m* являются целыми числами и указывают количество атомов углерода. Примеры включают C_{1-3} , C_{1-4} , C_{1-6} и т.п.

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

В контексте данного документа термин « C_{n-m} алкокси», используемый отдельно или в комбинации с другими терминами, относится к группе по формуле -O-алкил, в которой алкильная группа имеет от *n* до *m* атомов углерода. Примеры алкоксигрупп включают,

помимо прочего, метокси, этокси, пропокси (например, *n*-пропокси и изопропокси), бутокси (например, *n*-бутокси и *трет*-бутокси) и т.п.

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

В контексте данного документа термин «галоген» или «галоген» относится к F, Cl, Br или I. В некоторых вариантах осуществления изобретения галоген представляет собой F, Cl или Br. В некоторых вариантах осуществления галоген представляет собой F или Cl. В некоторых вариантах осуществления галоген представляет собой F. В некоторых вариантах осуществления галоген представляет собой Cl.

В контексте данного документа термин «C_{n-m} галогеналкил», используемый отдельно или в комбинации с другими терминами, относится к алкильной группе, имеющей от одного атома галогена до 2s+1 атомов галогена, которые могут быть одинаковыми или разными, где «s» представляет собой количество атомов углерода в алкильной группе, где алкильная группа имеет от *n* до *m* атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления фторирована только галогеналкильная группа. В некоторых вариантах осуществления алкильная группа имеет от 1 до 6, от 1 до 4 или от 1 до 3 атомов углерода. Примеры галогеналкильных групп включают CF₃, C₂F₅, CHF₂, CH₂F, CCl₃, CHCl₂, C₂Cl₅ и т. п.

В контексте данного документа «циклоалкил» относится к неароматическим циклическим углеводородам, включая циклизированные алкильные и алкенильные группы. Циклоалкильные группы могут включать моно- или полициклические (например, имеющие 2 конденсированных кольца) группы, спироциклы и кольца с мостиковыми связями (например, бициклоалкильная группа с мостиковыми связями). Образующие кольцо атомы углерода циклоалкильной группы могут быть необязательно замещены оксо или сульфидо (например, C(O) или C(S)). В определение циклоалкила также включены фрагменты, которые имеют одно или большее количество ароматических колец, конденсированных (т.е. имеющих общую связь) с циклоалкильным кольцом, например, бензо- или тиенильные производные циклопентана, циклогексана и т.п. Циклоалкильная группа, содержащая конденсированное ароматическое кольцо, может быть присоединена через любой кольцообразующий атом, включая кольцообразующий атом конденсированного ароматического кольца. Циклоалкильные группы могут содержать 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 образующих кольцо атомов углерода (т. е., C₃₋₁₀). В некоторых вариантах осуществления циклоалкил представляет собой C₃₋₁₀ моноциклический или бициклический циклоалкил. В

некоторых вариантах осуществления циклоалкил представляет собой C_{3-7} моноциклический циклоалкил. В некоторых вариантах осуществления циклоалкил представляет собой C_{4-7} моноциклический циклоалкил. В некоторых вариантах осуществления циклоалкил представляет собой C_{4-10} спироцикл или циклоалкил с мостиковыми связями (*например*, бициклоалкильную группу с мостиковыми связями). Примеры циклоалкильных групп включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, циклогептил, циклопентенил, циклогексенил, циклогексадиенил, циклогептатриенил, норборнил, норпинил, норкарнил, кубан, адамантан, бицикло[1.1.1]пентил, бицикло[2.1.1]гексил, бицикло[2.2.1]гептанил, бицикло[3.1.1]гептанил, бицикло[2.2.2]октанил, спиро[3.3]гептанил и т. п. В некоторых вариантах осуществления циклоалкил представляет собой циклопропил, циклобутил, циклопентил или циклогексил.

В контексте данного документа термин «гетероарил» относится к моноциклическому или полициклическому (например, имеющему 2 конденсированных кольца) ароматическому гетероциклу, имеющему по меньшей мере один гетероатомный член кольца, выбранный из N, O, S и В. В некоторых вариантах осуществления гетероарильное кольцо имеет 1, 2, 3 или 4 гетероатомных члена кольца, независимо выбранных из N, O, S и В. В некоторых вариантах осуществления любой образующий кольцо N в гетероарильном фрагменте может представлять собой N-оксид. В некоторых вариантах осуществления гетероарил представляет собой 5-10-членный моноциклический или бициклический гетероарил, имеющий 1, 2, 3 или 4 гетероатомных члена кольца, независимо выбранных из N, O, S и В. В некоторых вариантах осуществления гетероарил представляет собой 5-10-членный моноциклический или бициклический гетероарил, имеющий 1, 2, 3 или 4 гетероатомных члена кольца, независимо выбранных из N, O и S. В некоторых вариантах осуществления гетероарил представляет собой 5-6 моноциклический гетероарил, содержащий 1 или 2 гетероатомных члена кольца, независимо выбранных из N, O, S и В. В некоторых вариантах осуществления гетероарил представляет собой 5-6 моноциклический гетероарил, содержащий 1 или 2 гетероатомных члена кольца, независимо выбранных из N, O и S. В некоторых вариантах осуществления гетероарильная группа содержит 3-10, 4-10, 5-10, 5-7, 3-7 или 5-6 образующих кольцо атомов. В некоторых вариантах осуществления, гетероарильная группа содержит от 1 до 4 образующих кольцо гетероатомов, от 1 до 3 образующих кольцо гетероатомов, от 1 до 2 образующих кольцо гетероатомов или 1 образующий кольцо гетероатом. В случае если гетероарильная группа содержит более одного гетероатомного члена кольца, то гетероатомы могут быть одинаковыми или разными. Примеры гетероарильных групп включают, помимо прочего, тиенил (или тиофенил), фурил (или фуранил), пирролил, имидазолил, тиазолил, оксазолил, пиразолил, изотиазолил, изоксазолил, 1,2,3-триазолил, тетразолил, 1,2,3-тиадиазолил, 1,2,3-оксадиазолил, 1,2,4-триазолил, 1,2,4-тиадиазолил, 1,2,4-оксадиазолил, 1,3,4-триазолил, 1,3,4-тиадиазолил, 1,3,4-оксадиазолил и 1,2-дигидро-1,2-азaborин, пиридинил, пиримидинил, пиразинил, пиридазинил, азолил, триазолил, тиадиазолил, хинолинил,

изохинолинил, индолил, бензотиофенил, бензофуранил, бензизоксазолил, имидазо[1,2-b]тиазолил, пуринил, триазинил, тиено[3,2-b]пиридинил, имидазо[1,2-a]пиридинил, 1,5-нафтиридинил, 1H-пиразоло[4,3-b]пиридинил, триазоло[4,3-a]пиридинил, 1H-пирроло[3,2-b]пиридинил, 1H-пирроло[2,3-b]пиридинил, пиразоло[1,5-a]пиридинил, индазолил и тому подобное.

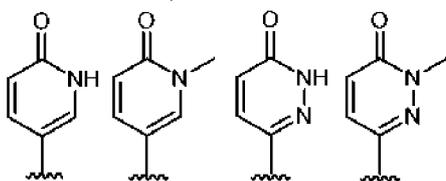
В контексте данного документа термин «гетероциклоалкил» относится к моноциклическим или полициклическим гетероциклам, имеющим по меньшей мере одно неароматическое кольцо (насыщенное или частично ненасыщенное кольцо), где один или большее количество образующих кольцо атомов углерода гетероциклоалкила заменены гетероатомом, выбранным из N, O, S и В и при этом образующие кольцо атомы углерода и гетероатомы гетероциклоалкильной группы могут быть необязательно замещены одним или большим количеством из оксо или сульфидо (например, C(O), S(O), C(S) или S(O)₂, и т. д.). Когда образующий кольцо атом углерода или гетероатом гетероциклоалкильной группы необязательно замещен одним или большим количеством из оксо или сульфидов, O или S указанной группы являются *дополнительными* к количеству образующих кольцо атомов, указанных в данном документе (например, 1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил представляет собой 6-членную гетероциклоалкильную группу, в которой атом углерода, образующий кольцо, замещен оксогруппой, и при этом 6-членная гетероциклоалкильная группа дополнительно замещена метильной группой). Гетероциклоалкильные группы включают моноциклические и полициклические (например, имеющие 2 конденсированных кольца) системы. В гетероциклоалкил входят моноциклические и полициклические 3-10, 4-10, 5-10, 4-7, 5-7 или 5-6 членные гетероциклоалкильные группы. Гетероциклоалкильные группы могут также включать спироциклы и мостиковые кольца (*например*, 5-10-членное мостиковое бигетероциклоалкильное кольцо, имеющее один или большее количество образующих кольцо атомов углерода, замененных гетероатомом, независимо выбранным из N, O, S и В). Гетероциклоалкильная группа может быть присоединена через образующий кольцо атом углерода или образующий кольцо гетероатом. В некоторых вариантах осуществления гетероциклоалкильная группа содержит от 0 до 3 двойных связей. В некоторых вариантах осуществления гетероциклоалкильная группа содержит от 0 до 2 двойных связей.

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

В некоторых вариантах осуществления гетероциклоалкильная группа содержит от 3 до 10 образующих кольцо атомов, от 4 до 10 образующих кольцо атомов, от 3 до 7 образующих кольцо атомов или от 5 до 6 образующих кольцо атомов. В некоторых

вариантах осуществления гетероциклоалкильная группа имеет от 1 до 4 гетероатомов, от 1 до 3 гетероатомов, от 1 до 2 гетероатомов или 1 гетероатом. В некоторых вариантах осуществления гетероциклоалкил представляет собой моноциклический 4-6-членный гетероциклоалкил, имеющий 1 или 2 гетероатома, независимо выбранных из N, O, S и B, и имеющий один или большее количество окисленных членов кольца. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетероциклоалкил представляет собой моноциклический или бициклический 5-10 членный гетероциклоалкил, имеющий 1, 2, 3 или 4 гетероатома, независимо выбранных из N, O, S и B, и имеющий один или большее количество окисленных членов кольца. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетероциклоалкил представляет собой моноциклический или бициклический 5-10 членный гетероциклоалкил, имеющий 1, 2, 3 или 4 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и имеющий один или большее количество окисленных членов кольца. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетероциклоалкил представляет собой моноциклический 5-6 членный гетероциклоалкил, имеющий 1, 2, 3 или 4 гетероатома, независимо выбранных из N, O и S, и имеющий один или большее количество окисленных членов кольца.

Примеры гетероциклоалкильных групп включают пирролидин-2-он (или 2-оксопирролидинил), 1,3-изоксазолидин-2-он, пиранил, тетрагидропиран, оксетанил, азетидинил, морфолино, тиоморфолино, пиперазинил, тетрагидрофуранил, тетрагидротиенил, пиперидинил, пирролидинил, изоксазолидинил, изотиазолидинил, пиразолидинил, оксазолидинил, тиазолидинил, имидазолидинил, азепанил, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин, бензазапен, азабицикло[3.1.0]гексанил, диазабицикло[3.1.0]гексанил, оксобицикло[2.1.1]гексанил, азабицикло[2.2.1]гептанил, диазабицикло[2.2.1]гептанил, азабицикло[3.1.1]гептанил, диазабицикло[3.1.1]гептанил, азабицикло[3.2.1]октанил, диазабицикло[3.2.1]октанил, оксобицикло[2.2.2]октанил, азабицикло[2.2.2]октанил, азаадамантил, диазаадамантил, оксоадамантил, азаспиро[3.3]гептанил, диазаспиро[3.3]гептанил, оксо-азаспиро[3.3]гептанил, азаспиро[3.4]октанил, диазаспиро[3.4]октанил, оксо-азаспиро[3.4]октанил, азаспиро[2.5]октанил, диазаспиро[2.5]октанил, азаспиро[4.4]нонанил, диазаспиро[4.4]нонанил, оксо-азаспиро[4.4]нонанил, азаспиро[4.5]деканил, диазаспиро[4.5]деканил, оксо-азаспиро[4.4]нонанил, оксо-дигидропиридазинил, оксо-2,6-дiazаспиро[3.4]октанил, оксогексагидропирроло[1,2-a]пиразинил, 3-оксопиперазинил, оксопирролидинил, оксопиридинил и тому подобное. Например, гетероциклоалкильные группы включают следующие группы (с замещением N-метилом и без него):



В контексте данного документа термин «C_{o-p} циклоалкил-C_{n-m} алкил-» относится к

группе по формуле циклоалкил-алкилен-, в которой циклоалкил имеет от o до p атомов углерода, а алкиленовая связывающая группа имеет от n до m атомов углерода.

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

В контексте данного документа термин «гетероарил- C_{n-m} алкил-» относится к группе по формуле гетероарил-алкилен-, в которой алкиленовая связывающая группа имеет от n до m атомов углерода.

В контексте данного документа термин «гетероциклоалкил- C_{n-m} алкил-» относится к группе по формуле гетероциклоалкил-алкилен-, в которой алкиленовая связывающая группа имеет от n до m атомов углерода.

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

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

В контексте данного документа термин «независимо выбран из» означает, что каждое появление переменной или заместителя независимо выбирается в каждом случае из применимого перечня.

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

Разделение рацемических смесей соединений может быть осуществлено любым из

многочисленных способов, известных в данной области техники. Пример способа включает фракционную перекристаллизацию с использованием хиральной разделительной кислоты, которая является оптически активной солеобразующей органической кислотой. Подходящими разделяющими средствами для способов фракционной перекристаллизации являются, например, оптически активные кислоты, такие как D и L формы винной кислоты, диацетилвинной кислоты, дибензоилвинной кислоты, миндальной кислоты, яблочной кислоты, молочной кислоты или различных оптически активных камфорсульфоновых кислот, таких как β -камфорсульфоновая кислота. Другие разделяющие агенты, подходящие для способов фракционной кристаллизации, включают стереоизомерно чистые формы α -метилбензиламина (*например*, формы *S* и *R* или диастереомерно чистые формы), 2-фенилглицин, норэфедрин, эфедрин, N-метилэфедрин, циклогексилэтиламин, 1,2-диаминоциклогексан и тому подобное.

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

Предлагаемые в данном документе соединения также включают таутомерные формы. Таутомерные формы возникают в результате перестановки одинарной связи с соседней двойной связью вместе с сопутствующей миграцией протона. Таутомерные формы включают прототропные таутомеры, которые являются состояниями изомерного протонирования, имеющими одинаковую эмпирическую формулу и общий заряд. Примеры прототропных таутомеров включают пары кетон-енол, пары амид-имидная кислота, пары лактам-лактим, пары енамин-имин и кольцевые формы, где протон может занимать два или более положений гетероциклической системы, например, 1H- и 3H-имидазол, 1H-, 2H- и 4H-1,2,4-триазол, 1H- и 2H-изоиндол, 2-гидроксипиридин и 2-пиридон и 1H- и 2H-пиразол. Таутомерные формы могут находиться в равновесии или быть стерически заблокированы в одной форме посредством соответствующего замещения.

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

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

В некоторых вариантах осуществления соединения, представленные в данном документе, или их соли по существу выделены. Под фразой «по существу выделены» подразумевается, что соединение по меньшей мере частично или в значительной степени отделено от окружающей среды, в которой оно было образовано или обнаружено. Частичное разделение может включать, например, композицию, обогащенную соединениями, представленными в данном документе. Существенное разделение может включать композиции, содержащие по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около

60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 97% или по меньшей мере около 99% по массе соединений, представленных в настоящем изобретении, или их солей. Способы выделения соединений и их солей широко применяются в данной области техники.

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

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

Настоящая заявка также включает в себя фармацевтически приемлемые соли соединений, описанных в данном документе. В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемые соли» относится к производным описанных соединений, в которых исходное соединение модифицировано путем преобразования существующего кислотного или основного фрагмента в его солевую форму. Примеры фармацевтически приемлемых солей включают, помимо прочего, соли минеральных или органических кислот основных остатков, таких как амины; щелочные или органические соли кислотных остатков, таких как карбоновые кислоты; и т. п. Фармацевтически приемлемые соли по настоящему изобретению включают обычные нетоксичные соли исходного соединения, образованные, например, из нетоксичных неорганических или органических кислот. Фармацевтически приемлемые соли по настоящему изобретению могут быть синтезированы из исходного соединения, которое содержит основную или кислотную составляющую, с помощью обычных химических методов. Обычно такие соли могут быть получены приведением в контакт свободных кислотных или основных форм этих соединений со стехиометрическим количеством подходящего основания или кислоты в воде или в органическом растворителе, или в их смеси; как правило, предпочтительны неводные среды, такие как эфир, этилацетат, спирты (например, метанол, этанол, изопропанол или бутанол) или ацетонитрил (ACN). Перечни подходящих солей можно найти в публикациях *Remington's Pharmaceutical Science*, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418 и *Journal of Pharmaceutical Science*, 66, 2 (1977), каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Соединения по настоящему изобретению, включая их соли, могут быть получены с помощью известных методов органического синтеза и могут быть синтезированы в соответствии с любым из многочисленных возможных путей синтеза.

Реакции получения соединений, описанные в данном документе, могут быть проведены в подходящих растворителях, которые могут быть легко выбраны специалистом в области органического синтеза. Подходящие растворители могут быть по существу нереакционноспособными по отношению к исходным веществам (реагентам), промежуточным продуктам или продуктам при температурах, при которых проводят реакции, *например*, температурах, которые могут варьироваться от температуры замораживания растворителя до температуры кипения растворителя. Данная реакция может быть проведена в одном растворителе или в смеси более чем одного растворителя. В зависимости от конкретной стадии реакции квалифицированный специалист может выбрать подходящие растворители для конкретной стадии реакции.

Получение описанных в данном документе соединений может включать введение и снятие защитных групп с различных химических групп. Необходимость в введении и снятии защитных групп и выбор соответствующих защитных групп может быть легко установлена специалистом данной области техники. Химические характеристики защитных групп можно найти, например, в публикации T. W. Greene и P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Ed., Wiley & Sons, Inc., New York (1999), которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Реакции можно контролировать любым подходящим способом, известным в данной области техники. Например, образование продукта можно контролировать с помощью спектроскопических средств, таких как спектроскопия ядерного магнитного резонанса (*например*, ^1H или ^{13}C), инфракрасная спектроскопия, спектрофотометрия (*например*, UV-видимая), масс-спектрометрия или хроматографические способы, такие как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), жидкостная хроматография/масс-спектрометрия (ЖХМС) или тонкослойная хроматография (TLC). Соединения могут быть очищены специалистами в данной области различными методами, включая высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) («*Preparative LC-MS Purification: Improved Compound Specific Method Optimization*» Karl F. Blom, et al. *J. Comb. Chem.* 2004, 6(6), 874-883, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки) и хроматографию на силикагеле с нормальной фазой.

Соединения, описанные в данном документе, могут модулировать активность одного или большего количества различных рецепторов, связанных с G-белком (GPCR), включая, например, A2A/A2B. Термин «модулировать» относится к способности увеличивать или уменьшать активность одного или большего количества представителей семейства A2A/A2B. Соответственно, соединения, описанные в данном документе, можно применять в способах модулирования A2A/A2B путем приведения в контакт A2A/A2B с любым одним или большим количеством соединений или композиций, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению могут действовать как ингибиторы одного или обоих из A2A и A2B. В дополнительных вариантах осуществления соединения, описанные в данном документе, можно применять для модулирования активности A2A/A2B у индивидуума, нуждающегося

в модулировании рецептора, путем введения модулирующего количества соединения, описанного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления модулирование представляет собой ингибирование.

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления одно или большее количество соединений применяют в комбинации с другим антагонистом GPCR для ингибирования активности одного GPCR (например, A2A или A2B).

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

Ингибиторы PD-1/PD-L1

Иммунная система играет важную роль в контроле и устранении заболеваний, таких как рак. Однако раковые клетки часто развивают стратегии избегания или подавления иммунной системы, чтобы способствовать своему росту. Одним из таких механизмов является изменение экспрессии костимулирующих и коингибирующих молекул, экспрессируемых на иммунных клетках (Postow et al., *J. Clinical Oncology* 2015, 1-9). Было доказано, что блокировка передачи сигналов ингибирующей иммунной контрольной точки, такой как PD-1, является многообещающим и эффективным способом лечения.

Белок запрограммированной гибели-1 («PD-1», также известный как «CD279») представляет собой мембранный белок типа I с молекулярной массой около 31 кДа, представитель расширенного CD28/CTLA-4 семейства регуляторов Т-клеток, который в целом негативно регулирует иммунные ответы (Ishida, Y. et al. (1992) *EMBO J.* 11:3887-3895; публикации патентов США №№ 2007/0202100; 2008/0311117; и 2009/00110667; публикации патентов США №№ 6,808,710; 7, 101,550; 7,488,802; 7,635,757; и 7,722,868; публикация РСТ № WO 01/14557).

PD-1 экспрессируется на активированных Т-клетках, В-клетках и моноцитах (Agata, Y. et al. (1996) *Int. Immunol.* 8(5):765-772; Yamazaki, T. et al. (2002) *J. Immunol.* 169:5538-5545) и на низких уровнях в Т-клетках-естественных киллерах (NK) (Nishimura, H. et al. (2000) *J. Exp. Med.* 191:891-898; Martin-Orozco, N. et al. (2007) *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298).

Внеклеточная область PD-1 состоит из одного домена иммуноглобулина (Ig)V с 23% идентичностью с эквивалентным доменом в CTLA-4 (Martin-Orozco, N. et al. (2007) *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298). За внеклеточным доменом IgV следует трансмембранная область и внутриклеточный хвост. Внутриклеточный хвост содержит два сайта фосфорилирования, расположенные в ингибиторном мотиве тирозинового иммунорецептора и переключающем мотиве тирозинового иммунорецептора, что предполагает, что PD-1 негативно регулирует сигналы TCR (Ishida, Y. et al. (1992) *EMBO J.* 11:3887-3895; Blank, C. et al. (2006) *Immunol. Immunother.* 56(5): 739-745).

PD-1 опосредует ингибирование иммунной системы путем связывания с B7-H1 и B7-DC (Flics, D.B. et al. (2007) *J. Immunother.* 30(3):251-260; Патенты США №№ 6,803, 192; 7,794,710; публикации патентных заявок США №№ 2005/0059051; 2009/0055944; 2009/0274666; 2009/0313687; публикации РСТ №№ WO 01/39722; WO 02/086083).

Аминокислотная последовательность белка PD-1 человека (номер доступа Genbank NP_005009):

MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSN
TSESFVLNWyRMSpsNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRN
DSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVVGG
LLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTP
EPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID
NO:1).

PD-1 имеет два лиганда, PD-L1 и PD-L2 (Parry et al., *Mol Cell Biol* 2005, 9543-9553; Latchman et al., *Nat Immunol* 2001, 2, 261-268), которые различаются по своим профилям экспрессии. Белок PD-L1 будет иметь повышенную регуляцию в макрофагах и дендритных клетках в ответ на обработку липополисахаридом и GM-CSF, а также на Т-клетках и В-клетках при передаче сигналов рецепторами Т-клеток и В-клеток. PD-L1 также высоко экспрессируется почти на всех опухолевых клетках, и экспрессия еще больше увеличивается после введения IFN- γ (Iwai et al., *PNAS* 2002, 99(19):12293-7; Blank et al., *Cancer Res* 2004, 64(3):1140-5). Фактически, было продемонстрировано, что статус экспрессии PD-L1 в опухоли имеет прогностическое значение при множественных типах опухолей (Wang et al., *Eur J Surg Oncol* 2015; Huang et al., *Oncol Rep* 2015; Sabatier et al., *Oncotarget* 2015, 6(7): 5449-5464). Экспрессия PD-L2, напротив, более ограничена и осуществляется в основном дендритными клетками (Nakae et al., *J Immunol* 2006, 177:566-73). Лигирование PD-1 с его лигандами PD-L1 и PD-L2 в Т-клетках продуцирует сигнал, который ингибирует выработку IL-2 и IFN- γ , а также пролиферацию клеток, индуцируемую при активации Т-клеточного рецептора (Carter et al., *Eur J Immunol* 2002, 32(3):634-43; Freeman et al., *J Exp Med* 2000, 192(7):1027-34). Указанный механизм включает рекрутинг фосфатаз SHP-2 или SHP-1 для ингибирования передачи сигналов Т-клеточного рецептора, такой как фосфорилирование Syk и Lck (Sharpe et al., *Nat Immunol* 2007, 8, 239-245). Активация сигнальной оси PD-1 также ослабляет фосфорилирование активационной петли PKC- θ , которая необходима для активации путей NF- κ B и AP1, а также для выработки цитокинов, таких как IL-2, IFN- γ и TNF (Sharpe et al., *Nat Immunol* 2007, 8, 239-245; Carter et al., *Eur J Immunol* 2002, 32(3):634-43; Freeman et al., *J Exp Med* 2000, 192(7):1027-34).

Несколько наборов данных из доклинических исследований на животных демонстрируют, что PD-1 и его лиганды негативно регулируют иммунные ответы. Было продемонстрировано, что у мышей с дефицитом PD-1 развивается волчаночноподобный гломерулонефрит и дилатационная кардиомиопатия (Nishimura et al., *Immunity* 1999, 11:141-151; Nishimura et al., *Science* 2001, 291:319-322). С помощью модели хронической инфекции LCMV было продемонстрировано, что взаимодействие PD-1/PD-L1 ингибирует активацию, распространение и приобретение эффекторных функций вирус-специфических CD8 Т-клеток (Barber et al., *Nature* 2006, 439, 682-7). В совокупности эти данные свидетельствуют в пользу разработки терапевтического подхода, направленного на блокирование PD-1-опосредованного ингибирующего сигнального каскада с целью повышения или "спасения" Т-клеточного ответа. Соответственно, существует потребность в новых методах блокирования белково-белкового взаимодействия PD-1/PD-L1 и, таким образом, лечения рака у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой соединение, выбранное из ниволумаба (OPDIVO®, BMS-936558, MDX1106 или МК-34775), пембролизумаба (KEYTRUDA®, МК-3475, SCH-900475, ламбролизумаба, регистрационный номер CAS 1374853-91-4), атезолизумаба (Tecentriq®, регистрационный номер CAS 1380723-44-3), дурвалумаба, авелумаба (Bavencio®), цемиплимаба, AMP-224,

AMP-514/MEDI-0680, атезолизумаба, авелумаба, BGB-A317, BMS936559, дурвалумаба, JTX-4014, SHR-1210, пидилизумаба (CT-011), REGN2810, BGB-108, BGB-A317, SHR-1210 (HR-301210, SHR1210 или SHR-1210), BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736, MSB0010718C, MDX1105-01, и одного или большего количества блокаторов PD-1/PD-L1, описанных в патентах США №№ 7,488,802, 7,943,743, 8,008,449, 8,168,757, 8,217,149, или публикациях №№ WO 03042402, WO 2008/156712, WO 2010/089411, WO 2010/036959, WO 2011/066342, WO 2011/159877, WO 2011/082400, WO 2011/161699, WO 2017/070089, WO 2017/087777, WO 2017/106634, WO 2017/112730, WO 2017/192961, WO 2017/205464, WO 2017/222976, WO 2018/013789, WO 2018/04478, WO 2018/119236, WO 2018/119266, WO 2018/119221, WO 2018/119286, WO 2018/119263, WO 2018/119224, WO 2019/191707 и WO 2019/217821, и любых их комбинаций. Описание каждого из предшествующих патентов, заявок и публикаций полностью включено в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 выбирают из соединения, описанного в WO 2018/119266, такого как, например,

(S)-1-((7-хлор-2-(2'-хлор-3'-(5-(((2-гидроксиэтил)амино)метил)пиколамидо)-2-метил-[1,1'-бифенил]-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пиперидин-2-карбоновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль;

(S)-1-((7-хлор-2-(3'-(7-хлор-5-(((S)-3-гидроксипирролидин-1-ил)метил)бензо[d]оксазол-2-ил)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль;

(R)-1-((7-циано-2-(3'-(3-(((R)-3-гидроксипирролидин-1-ил)метил)-1,7-нафтиридин-8-иламино)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль;

(S)-1-((2-(2'-хлор-3'-(1,5-диметил-4,5,6,7-тетрагидро-1H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-карбоксамидо)-2-метилбифенил-3-ил)-7-цианобензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль;

(R)-1-((7-циано-2-(2,2'-диметил-3'-(4,5,6,7-тетрагидротиазоло[5,4-с]пиридин-2-ил)бифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль;

(R)-1-((7-циано-2-(3'-(5-(2-(диметиламино)ацетил)-5,6-дигидро-4H-пирроло[3,4-d]тиазол-2-ил)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль; а также

1-((7-циано-2-(3'-(5-(2-(диметиламино)ацетил)-5,6-дигидро-4H-пирроло[3,4-d]тиазол-2-ил)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пиперидин-4-карбоновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой (R)-1-((7-циано-2-(3'-(3-(((R)-3-гидроксипирролидин-1-ил)метил)-1,7-нафтиридин-8-иламино)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновую кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль. Описание синтеза и характеристик (R)-1-((7-циано-2-(3'-(3-(((R)-3-гидроксипирролидин-1-ил)метил)-1,7-

нафтиридин-8-иламино)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновой кислоты можно найти в публикации WO 2018/119266, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 выбирают из следующих соединений:

(R)-1-((7-циано-2-(3'-(3-(((R)-3-гидроксипирролидин-1-ил)метил)-1,7-нафтиридин-8-иламино)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновая кислота, соль бромистоводородной кислоты;

(R)-1-((7-циано-2-(3'-(3-(((R)-3-гидроксипирролидин-1-ил)метил)-1,7-нафтиридин-8-иламино)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновая кислота, соль щавелевой кислоты;

(R)-1-((7-циано-2-(3'-(3-(((R)-3-гидроксипирролидин-1-ил)метил)-1,7-нафтиридин-8-иламино)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновая кислота, соль соляной кислоты;

(R)-1-((7-циано-2-(3'-(3-(((R)-3-гидроксипирролидин-1-ил)метил)-1,7-нафтиридин-8-иламино)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновая кислота, соль L-винной кислоты;

(R)-1-((7-циано-2-(3'-(3-(((R)-3-гидроксипирролидин-1-ил)метил)-1,7-нафтиридин-8-иламино)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновая кислота, соль малоновой кислоты; и

(R)-1-((7-циано-2-(3'-(3-(((R)-3-гидроксипирролидин-1-ил)метил)-1,7-нафтиридин-8-иламино)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновая кислота, соль фосфорной кислоты.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 выбирают из соединения, описанного в WO 2018/119224, такого как, например,

(S)-1-((2-(2'-хлор-3'-(1,5-диметил-4,5,6,7-тетрагидро-1H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-карбоксамидо)-2-метилбифенил-3-ил)-7-цианобензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль;

(R)-1-((2-(2'-хлор-3'-(6-изопропил-4,5,6,7-тетрагидро-2H-пиразоло[3,4-с]пиридин-2-ил)-2-метилбифенил-3-ил)-7-цианобензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль;

(S)-N-(2-хлор-3'-(5-(2-гидроксипропил)-1-метил-4,5,6,7-тетрагидро-1H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-карбоксамидо)-2'-метилбифенил-3-ил)-5-изопропил-1-метил-4,5,6,7-тетрагидро-1H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-карбоксамид или его фармацевтически приемлемая соль;

цис-4-((2-(2'-дихлор-3'-(1-метил-5-(тетрагидро-2H-пиран-4-ил)-4,5,6,7-тетрагидро-1H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-карбоксамидо)-[1,1'-бифенил]-3-ил)карбамоил)-1-метил-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)метил)циклогексан-1-карбоновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль;

транс-4-(2-(2-((2,2'-дихлор-3'-(5-(2-гидроксиэтил)-1-метил-4,5,6,7-тетрагидро-1H-

имидазо[4,5-с]пиридин-2-карбоксамидо)-[1,1'-бифенил]-3-ил)карбамоил)-1-метил-1,4,6,7-тетрагидро-5Н-имидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)этил)циклогексан-1-карбоновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль;

транс-4-(2-(2-((2-Хлор-2'-метил-3'-(1-метил-4,5,6,7-тетрагидро-1Н-имидазо[4,5-с]пиридин-2-карбоксамидо)-[1,1'-бифенил]-3-ил)карбамоил)-1-метил-1,4,6,7-тетрагидро-5Н-имидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)этил)циклогексан-1-карбоновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль; а также

цис-4-((2-(2-хлор-3'-(5-(2-(этил(метил)амино)ацетил)-5,6-дигидро-4Н-пирроло[3,4-d]тиазол-2-ил)-2'-метилбифенил-3-ил)карбамоил)-1-метил-6,7-дигидро-1Н-имидазо[4,5-с]пиридин-5(4Н)-ил)метил)циклогексан-1-карбоновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 выбирают из соединения, описанного в WO 2019/191707, такого как, например,

(R)-1-((7-циано-2-(3'-(7-((3-гидрокси-пирролидин-1-ил)метил)-2-метилпиридо[3,2-d]пиримидин-4-иламино)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пиперидин-4-карбоновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль;

(R)-1-((7-циано-2-(3'-(7-(((S)-1-гидроксипропан-2-иламино)метил)-2-метилпиридо[3,2-d]пиримидин-4-иламино)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль;

(R)-1-((7-циано-2-(3'-(2-(дифторметил)-7-((3-гидрокси-пирролидин-1-ил)метил)пиридо[3,2-d]пиримидин-4-иламино)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пиперидин-4-карбоновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль;

(R)-1-((7-циано-2-(3'-(2-(дифторметил)-7-((3-гидрокси-пирролидин-1-ил)метил)пиридо[3,2-d]пиримидин-4-иламино)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)-N, N-диметилпиперидин-4-карбоксамид или его фармацевтически приемлемая соль;

(R)-1-((7-циано-2-(3'-(2-циклопропил-7-(((R)-3-гидрокси-пирролидин-1-ил)метил)пиридо[3,2-d]пиримидин-4-иламино)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль; а также

(R)-1-((7-циано-2-(3'-(3-(((R)-3-гидрокси-пирролидин-1-ил)метил)-6-метил-1,7-нафтиридин-8-иламино)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 выбирают из соединения, описанного в WO 2019/217821, такого как, например,

4-(2-(2-((2,2'-дихлор-3'-(1-метил-4,5,6,7-тетрагидро-1Н-имидазо[4,5-с]пиридин-2-карбоксамидо)-[1,1'-бифенил]-3-ил)карбамоил)-1-метил-1,4,6,7-тетрагидро-5Н-имидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)этил)бицикло[2.2.1]гептан-1-карбоновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль;

4-(2-(2-((3'-(5-((1H-пиразол-3-ил)метил)-1-метил-4,5,6,7-тетрагидро-1H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-карбоксамидо)-2,2'-дихлор-[1,1'-бифенил]-3-ил)карбамоил)-1-метил-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)этил)бицикло[2.2.1]гептан-1-карбоновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль;

(R)-4-(2-(2-((2,2'-дихлор-3'-(5-(2-гидроксипропил)-1-метил-4,5,6,7-тетрагидро-1H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-карбоксамидо)-[1,1'-бифенил]-3-ил)карбамоил)-1-метил-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)этил)бицикло[2.2.1]гептан-1-карбоновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль;

4,4'-((((2,2'-дихлор-[1,1'-бифенил]-3,3'-диил)бис(азандиил))бис(карбонил))бис(1-метил-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-2,5-диил))бис(этан-2,1-диил))бис(бицикло[2.2.1]гептан-1-карбоновая кислота) или ее фармацевтически приемлемая соль;

4-(2-(2-((2-хлор-2'-метил-3'-(1-метил-4,5,6,7-тетрагидро-1H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-карбоксамидо)-[1,1'-бифенил]-3-ил)карбамоил)-1-метил-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)этил)бицикло[2.2.1]гептан-1-карбоновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль;

4-(2-(2-((2,2'-диметил-3'-(1-метил-4,5,6,7-тетрагидро-1H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-карбоксамидо)-[1,1'-бифенил]-3-ил)карбамоил)-1-метил-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)этил)бицикло[2.2.1]гептан-1-карбоновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль;

4-(2-(2-((3'-(5-(транс-4-карбокси-4-метилциклогексил)-1-метил-4,5,6,7-тетрагидро-1H-имидазо[4,5-с]пиридин-2-карбоксамидо)-2,2'-дихлор-[1,1'-бифенил]-3-ил)карбамоил)-1-метил-1,4,6,7-тетрагидро-5H-имидазо[4,5-с]пиридин-5-ил)этил)бицикло[2.2.1]гептан-1-карбоновая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой гуманизованное антитело.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой пембролизумаб.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой ниволумаб.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой атезолизумаб.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с PD-1 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с PD-1 человека, представляет собой гуманизованное антитело.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой ретифанлимаб (*m.e.* MGA-012).

Ретифанлимаб представляет собой гуманизованное моноклональное антитело IgG4, которое связывается с PD-1 человека. См. mAb 7(1.2) hPD-1 в патенте США №:

10,577,422, который полностью включен в данный документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности тяжелых и легких цепей зрелого ретифанлимаба приведены ниже. Определяющие комплементарность области (CDR) 1, 2 и 3 переменного домена тяжелой цепи (VH) и переменного домена легкой цепи (VL) приведены в указанном порядке от N до C-конца зрелых последовательностей VL и VH, подчеркнуты и выделены жирным шрифтом. Антитело, состоящее из зрелой тяжелой цепи (SEQ ID NO:2) и зрелой легкой цепи (SEQ ID NO:3), приведенных ниже, называется ретифанлимаб.

Зрелая тяжелая цепь ретифанлимаба (HC)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT**SYWMN**WVRQAPGQGLEWIG**VIH**
PSDSETWLDQKFKDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARE**EHYGTSPFAYW**
 GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP
 APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
 RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID NO:2)

Зрелая легкая цепь ретифанлимаба (LC)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**RASESVDNYGMSFMNWF**QQKPGQPPKLLI**HA**
ASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISILEPEDFAVYFC**QQSKEVPY**TFGGGTKVEIKRTV
 AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
 DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:3)

Переменный домен тяжелой цепи (VH) ретифанлимаба имеет следующую аминокислотную последовательность:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT**SYWMN**WVRQAPGQGLEWIG**VIH**
PSDSETWLDQKFKDRVTITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARE**EHYGTSPFAYW**
 GQGTLVTVSS (SEQ ID NO:4)

Переменный домен легкой цепи (VL) ретифанлимаба имеет следующую аминокислотную последовательность:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**RASESVDNYGMSFMNWF**QQKPGQPPKLLI**HA**
ASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISILEPEDFAVYFC**QQSKEVPY**TFGGGTKVEIK
 (SEQ ID NO:5)

Аминокислотные последовательности VH CDR ретифанлимаба приведены ниже:

CDR1 VH: SYWMN (SEQ ID NO:6);

CDR2 VH: VIHPSDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO:7);

CDR3 VH: EHYGTSPFAY (SEQ ID NO:8)

Аминокислотные последовательности VL CDR ретифанлимаба приведены ниже:

CDR1 VL: RASESVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO:9);

CDR2 VL: AASNQGS (SEQ ID NO:10); и

CDR3 VL: QQSKEVPYT (SEQ ID NO:11).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с PD-1 человека, при этом указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий VH определяющую комплементарность область (CDR) 1, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность SYWMN (SEQ ID NO:6);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность VHPDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO: 7); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность EHYGTSPFAY (SEQ ID NO: 8); и

при этом антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность RASESVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO: 9);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AASNQGS (SEQ ID NO: 10); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSKEVPYT (SEQ ID NO:11).

Антитела анти-CD73

CD73 (также известный как «5'-нуклеотидаза» и «экто-5'-нуклеотидаза») представляет собой димерный фермент (EC:3.1.3.5), который функционирует как гомодимер, связанный GPI связью с внешней поверхностью плазматической мембраны. CD73 может поддаваться шеддингу и активен в кровотоке как растворимый белок. CD73 катализирует превращение внеклеточного АМР в аденозин. Ферментативная активность CD73 требует связывания субстрата в открытой конформации CD73. После связывания субстрата CD73 претерпевает большое конформационное изменение с открытой на закрытую конформацию для превращения АМР в аденозин (см., например, публикацию Кнарр et al., 2012, *Structure*, 20(12):2161-73). CD73 также функционирует как молекула клеточной адгезии и играет роль в регуляции транспорта лейкоцитов.

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

Типовая аминокислотная последовательность зрелого белка CD73 человека (аминокислоты 27-549 в GenBank, номер доступа NP_002517):

WELTILHTNDVHSRLEQTSSESSKCVNASRCMGGVARLFTKVQQIRRAEPNVLL

LDAGDQYQGTIWFTVYKGAEVAHF MNALRYDAMALGNHEFDNGVEGLIEPLLKEAKF
 PILSANIKAKGPLASQISGLYLPYKVLVPGDEVVGVVGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEIT
 ALQPEVDKCLKTLNVNKIIALGHSGFEMDKLIAQKVRGVDVVVGGHSNTFLYTGNNPPSKE
 VPAGKYPFIVTSDDGRKVPVVQAYAFGKYLGYLKIEFDERGNVISSHGPNILLNSSIPEDP
 SIKADINKWRIKLDNYSTQELGKTIVYLDGSSQSCRFRECNMGNLICDAMINNNLRHTDE
 MFWNHVSMCILNNGGIRSPIDERNNGTITWENLAAVLPFGGTFDLVQLKGSTLKKAFEH
 SVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDL SRKPGDRVVKLDVLCTKCRVPSYDPLKMDEVYK
 VILPNFLANGGDGFQMIKDELLRHDSGDQDINVVSTYISKMKVIYPAVEGRIKFS (SEQ
 ID NO:70).

Типовая аминокислотная последовательность зрелого белка CD73 мыши (аминокислоты 29-551 в GenBank, номер доступа NP_035981):

WELTILHTNDVHSRLEQTSDDSTKCLNASLCVGGVARLFTKVQQIRKEEPNVLFL
 DAGDQYQGTIWFTVYKGLEVAHF MNILGYDAMALGNHEFDNGVEGLIDPLLRNVKFI
 LSANIKARGPLAHQISGLFLPSKVLSVGGDEVVGVVGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEISAL
 QPEVDKCLKTLNVNKIIALGHSGFEMDKLIAQKVRGVDIVVGGHSNTFLYTGNNPPSKEVP
 AGKYPFIVTADDGRQVPVVQAYAFGKYLGYLKVFEFDDKGNVITSYGNPILLNSSIPEDA
 TIKADINQWRIKLDNYSTQELGRTIVYLDGSTQTCRFRECNMGNLICDAMINNNLRHPD
 EMFWNHVSMCIVNNGGIRSPIDEKNNGTITWENLAAVLPFGGTFDLVQLKGSTLKKAFE
 HSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDINRKPWNRVVQLEVLCTKCRVPIYEPLMDKVYK
 VTLPSYLANGGDGFQMIKDELLKHDSGDQDISVVSEYISKMKVVYPAVEGRIKFS (SEQ
 ID NO:71).

Типовая аминокислотная последовательность белка CD73 зрелого яванского макака:

WELTILHTNDVHSRLEQTSSESSKCVNASRCMGGVARLFTKVQQIRRAEPNVLL
 LDAGDQYQGTIWFTVYKGAEVAHF MNALRYDAMALGNHEFDNGVEGLIEPLLKEAKF
 PILSANIKAKGPLASQISGLYLPYKVLVPGDEVVGVVGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEIT
 ALQPEVDKCLKTLNVNKIIALGHSGFETDKLIAQKVRGVDVVVGGHSNTFLYTGNNPPSKE
 VPAGKYPFIVTSDDGRKVPVVQAYAFGKYLGYLKIEFDERGNVISSHGPNILLNSSIPEDP
 SIKADINKWRIKLDNYSTQELGKTIVYLDGSSQSCRFRECNMGNLICDAMINNNLRHAD
 EMFWNHVSMCILNNGGIRSPIDERNNGTITWENLAAVLPFGGTFDLVQLKGSTLKKAFE
 HSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDL SRKPGDRVVKLDVLCTKCRVPSYDPLKMDEIYK
 VILPNFLANGGDGFQMIKDELLRHDSGDQDINVVSTYISKMKVIYPAVEGRIKFS (SEQ
 ID NO:72).

В этом изобретении предлагаются антитела анти-CD73, которые можно применять в комбинации с ингибитором аденозинового рецептора A2A и/или A2B и ингибитором PD-1/PD-L1 для лечения заболеваний, *например*, рака. В этом изобретении дополнительно предлагаются антитела анти-CD73, которые можно применять в комбинации с ингибитором PD-1/PD-L1 для лечения заболеваний, *например*, рака. Эти антитела анти-CD73 могут связывать CD73 человека.

В некоторых случаях эти антитела связывают CD73 человека и CD73 яванского макака. В некоторых случаях эти антитела связывают CD73 человека и CD73 яванского

макака, но не связывают CD73 мыши. Такие антитела анти-CD73 включают последовательности моноклонального антитела анти-CD73, CL25, и его гуманизованную версию, HzCL25 (*m.e.* ANTIBODY Y), при этом его гуманизованная версия связывается с высокой аффинностью с CD73 как человека, так и яванского макака, и характеризуется неопределяемым связыванием с CD73 мыши.

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

Антитело HzCL25 (m.e. ANTIBODY Y)

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

HzCL25 был сконструировано из химерной версии антитела CL25 мыши.

В Таблице 2, приведенной ниже, показаны аминокислотные последовательности HzCL25 CDR в соответствии с нумерацией IMGT. В приведенной ниже Таблице 2 также показаны аминокислотные последовательности зрелых VH, VL, тяжелой цепи и легкой цепи HzCL25.

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

	IMGT
CDR1 VH	GYTFTSYG (SEQ ID NO:16)
CDR2 VH	IYPGSGNT (SEQ ID NO:17)
CDR3 VH	ARYDYLGSSYGFDY (SEQ ID NO:18)
CDR1 VL	QDVSTA (SEQ ID NO:19)
CDR2 VL	SAS (SEQ ID NO:20)
CDR3 VL	QQHYNTPYT (SEQ ID NO:21)
VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFTSYGLSWVRQMPGKGLEWM GEIYPGSGNTYYNEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCA

	RYDYLGSSYGFDYWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO:22)
VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYS ASYRYSQVDFRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYNTPYTFGG GTKLEIK (SEQ ID NO:23)
Тяжелая цепь	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYTFTSYGLSWVRQMPGKGLEWM GEIYPGSGNTYYNEKFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCA RYDYLGSSYGFDYWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG (SEQ ID NO:24)
Легкая цепь	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPKLLIYS ASYRYSQVDFRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYNTPYTFGG GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:25)

Антитела анти-CD73 могут охватывать CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, и CDR1 VL, CDR2 VL, а также CDR3 VL антитела HzCL25. В некоторых случаях антитело анти-CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH антитела HzCL25 (см. Таблицу 2). В некоторых случаях антитело анти-CD73 содержит VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL антитела HzCL25 (см. Таблицу 2). В некоторых случаях антитело анти-CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH антитела HzCL25 (см. Таблицу 2), и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL антитела HzCL25 (см. Таблицу 2). В некоторых случаях антитела анти-CD73 могут иметь, например, 1, 2 или 3 замены в одной или большем количестве (т.е. 1, 2, 3, 4, 5 или 6) из шести CDR антитела HzCL25. В некоторых случаях антитела: (i) ингибируют клеточный CD73 (например, снижение активности клеточного CD73 по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем); и/или (ii) ингибируют растворимый CD73 (например, снижение активности растворимого CD73 по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере

мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем); и/или (iii) связывают CD73 человека или яванского макака в открытой конформации с высокой аффинностью (например, $K_D \leq 0,5$ нМ), но не связывают в значительной степени CD73 мыши в открытой конформации; и/или (iv) связывают CD73 человека или яванского макака в закрытой конформации с высокой аффинностью (например, $K_D \leq 0,5$ нМ), но не связывают в значительной степени CD73 мыши в закрытой конформации; и/или (v) связываются с эпитопом в пределах аминокислот 40-53 из SEQ ID NO: 70 (т. е. в пределах TKVQQIRRAEPNVL (SEQ ID NO: 76)); и/или (vi) снижают AMP-опосредованную супрессию пролиферации Т-клеток (например, снижение пролиферации Т-клеток по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем); и/или (vii) снижают уровни CD73 на клеточной поверхности (например, на раковых клетках, например, на раковых клетках меланомы, например, по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем); и/или (viii) уменьшают рост опухоли (например, опухолей меланом, например, по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем); и/или (ix) снижают уровни свободного CD73 на поверхности клеток (например, раковых клеток, например, раковых клеток меланомы, например, по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 99% или на 100% по сравнению с изотипическим контролем).

В определенных вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VH антитела HzCL25 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:22). В определенных вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат VH, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH антитела HzCL25 (т.е. аминокислотные

последовательности, указанные в SEQ ID NO: 16-18, соответственно), при этом VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VH антитела HzCL25 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:22). В определенных вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат VH, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22. В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с тяжелой цепью антитела HzCL25 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:24). В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат тяжелую цепь, содержащую VL содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH антитела HzCL25 (т.е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 16-18, соответственно), при этом VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VH антитела HzCL25 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:22), при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с тяжелой цепью антитела HzCL25 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:24). В определенных вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:24. В определенных вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VL антитела HzCL25 (т.е.

мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VH антитела HzCL25 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:22), и (ii) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VL антитела HzCL25 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:23). В определенных вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат: (i) VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH антитела HzCL25 (т.е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 16-18 соответственно), при этом VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VH антитела HzCL25 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:22), и (ii) VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL антитела HzCL25 (т.е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 19-21 соответственно), при этом VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VL антитела HzCL25 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:23). В определенных вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат: VH, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, и (ii) VL, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:23. В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат: (i) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с тяжелой цепью антитела HzCL25 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:24), и (ii) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере

97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с легкой цепью антитела HzCL25 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:25). В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат: (i) тяжелую цепь, содержащую VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH антитела HzCL25 (т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 16-18 соответственно), при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с тяжелой цепью антитела HzCL25 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:24), и (ii) легкую цепь, содержащую VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL HzCL25 (т.е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 19-21 соответственно), при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с легкой цепью антитела HzCL25 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:25). В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат: (i) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:24, и (ii) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25.

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

В некоторых вариантах осуществления VH антитела HzCL25 связан с константной областью тяжелой цепи, содержащей домен CH1 и шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления VH антитела HzCL25 связан с константной областью тяжелой цепи, содержащей домен CH3. В некоторых вариантах осуществления в домене CH3 отсутствует С-концевой аминокислотный остаток лизина (К). В некоторых вариантах осуществления домен CH3 содержит С-концевой аминокислотный остаток лизина (К). В определенных вариантах осуществления VH антитела HzCL25 связан с константной областью тяжелой цепи, содержащей домен CH1, шарнирную область, домен CH2 и домен CH3 из IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления в домене CH3 из IgG1 человека отсутствует С-концевой аминокислотный остаток лизина (К). В некоторых

вариантах осуществления домен СН3 из IgG1 человека содержит С-концевой аминокислотный остаток лизина (К). В определенных вариантах осуществления такое антитело содержит одну или большее количество дополнительных мутаций в константной области тяжелой цепи, которые повышают стабильность антитела. В определенных вариантах осуществления константная область тяжелой цепи включает замены, которые модифицируют свойства антитела (например, уменьшают связывание с рецептором Fc, увеличивают или уменьшают гликозилирование антитела, уменьшают связывание с C1q). В определенных вариантах осуществления константная область тяжелой цепи включает аланин в положении аспарагина-297 (N297, согласно нумерации EU) константной области тяжелой цепи для снижения эффекторной функции.

В определенных вариантах осуществления антитело анти-CD73 представляет собой антитело IgG. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG1. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG4. В другом варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG2. В определенных вариантах осуществления антитело анти-CD73 содержит константную область тяжелой цепи, в которой отсутствует один или большее количество аминокислотных остатков лизина (К) по сравнению с константной областью тяжелой цепи дикого типа. Например, в определенных вариантах осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи, в которой отсутствует С-концевой аминокислотный остаток лизина (К) домена СН3 константной области тяжелой цепи.

Антитело 3-F03

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

В Таблице 3, приведенной ниже, показаны аминокислотные последовательности CDR антитела 3-F03 в соответствии с нумерацией IMGT. В Таблице 3, приведенной ниже, также показаны аминокислотные последовательности зрелых VH, VL, тяжелой цепи и легкой цепи антитела 3-F03.

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

	IMGT
CDR1 VH	GFTFSSYD (SEQ ID NO:34)
CDR2 VH	MSYDGSNK (SEQ ID NO:35)
CDR3 VH	ATEIAAKGDY (SEQ ID NO:36)
CDR1 VL	QGISNY (SEQ ID NO:37)
CDR2 VL	AAS (SEQ ID NO:38)
CDR3 VL	QQSYSTPH (SEQ ID NO:39)

	IMGT
VH	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVA VMSYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCA TEIAAKGDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:60)
VL	IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAA STLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTR LEIK (SEQ ID NO:61)
HC	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVA VMSYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCA TEIAAKGDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKLSLSL SPGK (SEQ ID NO:66)
LC	IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAA STLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPHFGQGTR LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:31)

В данном документе также описаны варианты антитела 3-F03. Антитело 3-F03_411 идентично 3-F03, за исключением того, что тяжелая цепь антитела 3-F03_411 (i) содержит N-концевой глутамат (E), отсутствующий в 3-F03, и (ii) не включает присутствующий C-концевой лизин в 3-F03. В Таблице 4, приведенной ниже, показаны аминокислотные последовательности зрелых VH, VL, тяжелой цепи и легкой цепи антитела 3-F03_411. Антитело 3-F03_413 идентично 3-F03_411, за исключением того, что оно содержит глутамат (E) в положении H53 VH по Kabat (положение 54 SEQ ID NO: 60) вместо аспарагиновой кислоты (D). В Таблице 5, приведенной ниже, показаны аминокислотные последовательности CDR антитела 3-F03_413 в соответствии с нумерацией IMGT, Chothia, AbM, Kabat и Contact. В Таблице 5, приведенной ниже, показаны аминокислотные последовательности зрелых VH, VL, тяжелой цепи и легкой цепи антитела 3-F03_413.

Таблица 4. Аминокислотные последовательности HC и LC антитела 3-F03_411

	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGL

	EWVAVMSYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAE DTAVYYCATEIAAKGDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:62)
VL	IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLI YAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQSYSTPH FGQGTRLEIK (SEQ ID NO:61)
Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGL EWVAVMSYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAE DTAVYYCATEIAAKGDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWFYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:30)
Легкая цепь	IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLI YAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQSYSTPH FGQGTRLEIKRTVAAPS FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN FYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:31)

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

	IMG T
CDR1 VH	GFTFSSYD (SEQ ID NO:34)
CDR2 VH	MSYEGSNK (SEQ ID NO:40)
CDR3 VH	ATEIAAKGDY (SEQ ID NO:36)
CDR1 VL	QGISNY (SEQ ID NO:37)
CDR2 VL	AAS (SEQ ID NO:38)
CDR3 VL	QQSYSTPH (SEQ ID NO:39)
VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGL EWVAVMSYEGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAE DTAVYYCATEIAAKGDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:63)
VL	IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLI YAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQSYSTPH

	IMGT
	FGQGTRLEIK (SEQ ID NO:61)
HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGL EWVAVMSYEGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMNSLRAE DTAVYYCATEIAAKGDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKLSLSPG (SEQ ID NO:33)
LC	IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKAPKLLI YAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPH FGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:31)

Антитела анти-CD73 могут охватывать CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, а также CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL антитела 3-F03 или антитела 3-F03_413. В некоторых случаях антитело анти-CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH антитела 3-F03 (см. Таблицу 3). В некоторых случаях антитело анти-CD73 содержит VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL антитела 3-F03 (см. Таблицу 3). В некоторых случаях антитело анти-CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH антитела 3-F03 (см. Таблицу 3), и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL антитела 3-F03 (см. Таблицу 3). В некоторых случаях антитело анти-CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH антитела 3-F03_413 (см. Таблицу 5). В некоторых случаях антитело анти-CD73 содержит VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL антитела 3-F03_413 (см. Таблицу 5). В некоторых случаях антитело анти-CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH антитела 3-F03_413 (см. Таблицу 5), и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL антитела 3-F03_413 (см. Таблицу 5). В некоторых случаях антитела анти-CD73 могут иметь, например, 1, 2 или 3 замены в одной или большем количестве (т.е. 1, 2, 3, 4, 5 или 6) из шести CDR антитела 3-F03 или 3-F03_413. В некоторых случаях эти антитела: (i) ингибируют клеточный CD73 (например, снижение активности клеточного CD73 по меньшей мере на 10%; по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей

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

В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VH 3-F03_411 или 3-F03_413 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:62 или 63 соответственно). В определенных вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH, и CDR3 VH антитела 3-F03_411 (см. Таблицу 3, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34-36 соответственно), при этом VH содержит аминокислотную

последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VH антитела 3-F03_411 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:62). В определенных вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH антитела 3-F03_413 (см. Таблицу 5, *например*, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34, 40 и 36 соответственно), при этом VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VH антитела 3-F03_411 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:63). В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат VH, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:62. В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат VH, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:63. В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с тяжелой цепью антитела 3-F03_411 или 3-F03_F13 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:30 или 33 соответственно). В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат тяжелую цепь, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH, и CDR3 VH антитела 3-F03_411 (см. Таблицу 3, *например*, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34-36 соответственно), при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с тяжелой цепью антитела 3-F03_411 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:30). В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат тяжелую цепь, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH, и CDR3 VH антитела 3-F03_413 (см. Таблицу 5, *например*, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34, 40 и 36

соответственно), при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с тяжелой цепью антитела 3-F03_413 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:33). В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:30. В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:33. В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VL 3-F03_411 или 3-F03_413 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:61). В определенных вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL антитела 3-F03_411 или 3-F03_413 (см. Таблицу 3, *например*, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39 соответственно), при этом VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VL антитела 3-F03_411 или 3-F03_413 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:61). В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат VL, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:61. В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с легкой цепью антитела 3-F03_411 или 3-F03_413 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL антитела 3-F03_411 или 3-F03_413 (см. Таблицу 5, *например*, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO:

37-39 соответственно), при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с легкой цепью антитела 3-F03_411 или 3-F03_413 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:31. В определенных вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VH антитела 3-F03_411 или 3-F03_413 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO: 62 или 63 соответственно), и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VL антитела 3-F03_411 или 3-F03_413 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:61). В определенных вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат: (i) VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH антитела 3-F03_411 (см. Таблицу 3, *например*, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34-36 соответственно), при этом VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VH антитела 3-F03 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:62), и (ii) VL, содержащий VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL антитела 3-F03_411 (см. Таблицу 3, *например*, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39 соответственно), при этом VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%

или 100% идентичности с VL антитела 3-F03 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:61). В определенных вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат: (i) VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH антитела 3-F03_413 (см. Таблицу 5, *например*, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34, 40 и 36 соответственно), при этом VH содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VH антитела 3-F03_413 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:63), и (ii) VL, содержащий VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL антитела 3-F03_413 (см. Таблицу 5, *например*, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39 соответственно), при этом VL содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с VL антитела 3-F03_413 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:61). В некоторых вариантах осуществления антитело анти-CD73 содержит: (i) VH, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:62, и (ii) VL, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:61. В некоторых вариантах осуществления антитело анти-CD73 содержит: (i) VH, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:63, и (ii) VL, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:61. В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с тяжелой цепью антитела 3-F03_411 или 3-F03_413 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO: 30 или 33), и аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с легкой цепью антитела 3-F03_411 или 3-F03_413 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления

антитела анти-CD73 содержат: (i) тяжелую цепь, содержащую CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH антитела 3-F03_411 (см. Таблицу 3, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34-36 соответственно), при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с тяжелой цепью антитела 3-F03_411 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:30), и (ii) легкую цепь, содержащую VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL антитела 3-F03_411 (см. Таблицу 3, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39 соответственно), при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с легкой цепью антитела 3-F03 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 содержат: (i) тяжелую цепь, содержащую VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH антитела 3-F03_413 (см. Таблицу 5, например, в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 34, 40 и 36 соответственно), при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с тяжелой цепью антитела 3-F03 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:33), и (ii) легкую цепь, содержащую VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL антитела 3-F03_413 (см. Таблицу 5, *например* в соответствии с определением IMGT, т. е. аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37-39 соответственно), при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичности с легкой цепью антитела 3-F03_413 (т.е. аминокислотная последовательность, указанная в SEQ ID NO:31). В некоторых вариантах осуществления антитело анти-CD73 содержит: (i) тяжелую цепь,

содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:30, и (ii) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления антитело анти-CD73 содержит: (i) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:33, и (ii) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31.

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

В некоторых вариантах осуществления VH антитела 3-F03 (или его варианта, *например*, 3-F03_411 или 3-F03_413) связан с константной областью тяжелой цепи, содержащей домен CH1 и шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления VH антитела 3-F03 (или его варианта, *например*, 3-F03_411 или 3-F03_413) связан с константной областью тяжелой цепи, содержащей домен CH3. В некоторых вариантах осуществления в домене CH3 отсутствует С-концевой аминокислотный остаток лизина (К). В некоторых вариантах осуществления домен CH3 содержит С-концевой аминокислотный остаток лизина (К). В определенных вариантах осуществления VH антитела 3-F03 (или его варианта, *например*, 3-F03_411 или 3-F03_413) связан с константной областью тяжелой цепи, содержащей домен CH1, шарнирную область, домен CH2 и домен CH3 из IgG1 человека. В некоторых вариантах осуществления в домене CH3 из IgG1 человека отсутствует С-концевой аминокислотный остаток лизина (К). В некоторых вариантах осуществления домен CH3 из IgG1 человека содержит С-концевой аминокислотный остаток лизина (К). В определенных вариантах осуществления такое антитело содержит одну или большее количество дополнительных мутаций в константной области тяжелой цепи, которые повышают стабильность антитела. В определенных вариантах осуществления константная область тяжелой цепи включает замены, которые модифицируют свойства антитела (*например*, уменьшают связывание с рецептором Fc, увеличивают или уменьшают гликозилирование антитела, уменьшают связывание с C1q). В определенных вариантах осуществления константная область тяжелой цепи включает аланин (А) в положении аспарагина-297 (N297, согласно нумерации EU) константной области тяжелой цепи для снижения эффекторной функции.

В определенных вариантах осуществления антитело анти-CD73 представляет собой

антитело IgG. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG1. В другом варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG4. В третьем варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG2. В определенных вариантах осуществления антитело анти-CD73 содержит константную область тяжелой цепи, в которой отсутствует один или большее количество аминокислотных остатков лизина (K) по сравнению с константной областью тяжелой цепи дикого типа. Например, в определенных вариантах осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи, в которой отсутствует С-концевой аминокислотный остаток лизина (K) домена CH3 константной области тяжелой цепи.

Дополнительные антитела анти-CD73 и ингибиторы

В настоящем изобретении предлагаются дополнительные антитела анти-CD73 и ингибиторы CD73, которые можно применять в комбинации с ингибитором аденозинового рецептора A2A и/или A2B при лечении заболеваний, *например*, рака. В настоящем изобретении также предлагаются дополнительные антитела анти-CD73 и ингибиторы CD73, которые можно применять в комбинации с ингибитором аденозинового рецептора A2A и/или A2B и/или в комбинации с ингибитором PD-1/PD-L1 при лечении заболеваний, *например*, рака. В настоящем изобретении также предлагаются дополнительные антитела анти-CD73 и ингибиторы CD73, которые можно применять в комбинации с ингибитором PD-1/PD-L1 при лечении заболеваний, *например*, рака.

Другие антитела анти-CD73, применимые в комбинации с ингибитором аденозинового рецептора A2A и/или A2B в способах, описанных в данном документе, известны в данной области техники. Другие антитела анти-CD73, применимые в комбинации с ингибитором аденозинового рецептора A2A и/или A2B и/или в комбинации с ингибитором PD-1/PD-L1 при лечении заболеваний с помощью способов, описанных в данном документе, известны в данной области техники. Другие антитела анти-CD73, применимые в комбинации с ингибитором PD-1/PD-L1 для лечения заболеваний с помощью способов, описанных в данном документе, известны в данной области техники. См., *например*, патенты США №№ 9,090,697, 9,388,249, 9,605,080, 9,938,356, 10,100,129 и 10,287,362, публикации патентных заявок США №№ 2004/0142342, 2007/0009518, 2011/0300136, 2018/0009899, 2018/0030144, 2018/0237536, 2018/0264107, 2019/0031766, 2019/0225703, 2019/0077873, и 2019/0256598, а также публикации международных патентных заявок №№ WO 2004/079013, WO 2011/089004, WO 2014/153424, WO 2017/100670, WO 2001/080884, WO 2018/110555, WO 2018/137598, WO 2018/187512, WO 2018/215535, WO 2018/237173, WO 2019/170131, WO 2019/173692 и WO 2019/173291, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

В некоторых случаях антитело анти-CD73 содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH домена VH, содержащего аминокислотную последовательность EIQLQQSGPELVKPGASVKVSKASGYAFTSYNMYWVKQSHGKSLEWIGYIDPYNGGT SYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCARGYGNYKAWFAYWGQGT LVTVSA (SEQ ID NO:100), и VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL домена VL,

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

Фрагменты антител

В некоторых вариантах осуществления антитело анти-CD73 представляет собой фрагмент антитела. Фрагменты антител, описанных в данном документе (например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc и Fv), можно получить путем протеолитического расщепления интактных антител. Например, фрагменты антител можно получить путем обработки целого антитела ферментом, таким как папаин, пепсин или плазмин. В результате расщепления целых антител папаином получают фрагменты F(ab)₂ или Fab; в результате расщепления целых антител пепсином получают F(ab')₂ или Fab'; и в результате расщепления целых антител плазмином получают фрагменты Fabc.

В альтернативном варианте, фрагменты антител могут быть получены рекомбинантным путем. Например, можно сконструировать нуклеиновые кислоты, кодирующие представляющие интерес фрагменты антител, ввести их в экспрессионный вектор и экспрессировать в подходящих клетках-хозяевах. См., например, публикации Co, M.S. et al., *J. Immunol.*, 152:2968-2976 (1994); Better, M. и Horwitz, A.H., *Methods in Enzymology*, 178:476-496 (1989); Plueckthun, A. и Skerra, A., *Methods in Enzymology*, 178:476-496 (1989); Lamoyi, E., *Methods in Enzymology*, 121:652-663 (1989); Rousseaux, J. et al., *Methods in Enzymology*, (1989) 121:663-669 (1989); а также Bigd, R.E. et al., *TIBTECH*, 9:132-137 (1991)). Фрагменты антител могут экспрессироваться и секретироваться из *E. coli*, что позволяет легко получать большие количества этих фрагментов. Фрагменты антител можно выделять из фаговых библиотек антител. В альтернативном варианте, фрагменты Fab'-SH можно непосредственно выделять из *E. coli* и химически связывать с образованием фрагментов F(ab)₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). В соответствии с другим подходом фрагменты F(ab')₂ можно выделять непосредственно из рекомбинантной культуры клеток-хозяев. Фрагменты Fab и F(ab')₂ с продленным периодом полужизни *in vivo*, содержащие остатки эпитопа связывания рецептора реутилизации, описаны, например, в патенте США № 5,869,046.

Минитела

В некоторых случаях антитело анти-CD73 представляет собой минитело. Минитела антител анти-CD73 включают диатела, одноцепочечные (scFv) и одноцепочечные (Fv)₂ (sc(Fv)₂). Минитела антител анти-PD-1 включают диатела, одноцепочечные (scFv) и одноцепочечные (Fv)₂ (sc(Fv)₂).

«Диатело» представляет собой двухвалентное минитело, сконструированное путем слияния генов (см., например, публикацию Holliger, P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90:6444-6448 (1993); EP 404,097; WO 93/11161). Диатела представляют собой димеры, состоящие из двух полипептидных цепей. VL и VH домен каждой полипептидной цепи диатела связаны посредством линкера. Число аминокислотных остатков, которые образуют собой линкер, может составлять от 2 до 12 остатков (например, 3-10 остатков или пять, или около пяти остатков). Линкеры полипептидов в диателах, как правило, слишком коротки, чтобы позволить VL и VH связываться друг с другом. Таким образом, VL и VH, кодируемые

в одной и той же полипептидной цепи, не могут образовывать одноцепочечный фрагмент варибельной области, а вместо этого образуют димер с другим одноцепочечным фрагментом варибельной области. В итоге, диатело имеет два антигенсвязывающих сайта.

scFv представляет собой одноцепочечное полипептидное антитело, полученное путем связывания VH и VL посредством линкера (см., например, публикации Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85:5879-5883 (1988); и Plickthun, «The Pharmacology of Monoclonal Antibodies» Vol.113, Ed Resenburg and Moore, Springer Verlag, New York, pp.269-315, (1994)). Порядок связывания VH и VL конкретно не ограничивается, и они могут располагаться в любом порядке. Примеры расположений включают: [VH] линкер [VL]; или [VL] линкер [VH]. Варибельный домен тяжелой цепи и варибельный домен легкой цепи в scFv могут быть получены из любого антитела анти-CD73, описанного в данном документе. V-область H-цепи и V-область L-цепи в scFv могут быть получены из любого антитела анти-PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе.

sc(Fv)₂ представляет собой минитело, в котором два VH и два VL связаны посредством линкера с образованием одной цепи (Hudson, et al., *J. Immunol. Methods*, (1999) 231: 177-189 (1999)). sc(Fv)₂, например, может быть получен путем связывания scFv посредством линкера. sc(Fv)₂ по настоящему изобретению включают антитела, предпочтительно, в которых два VH и два VL расположены в следующем порядке: VH, VL, VH и VL ([VH] линкер [VL] линкер [VH] линкер [VL]), начиная с N-конца одноцепочечного полипептида; однако порядок двух VH и двух VL не ограничивается указанным выше расположением, и они могут располагаться в любом порядке.

Биспецифические антитела

В некоторых случаях антитело анти-CD73 представляет собой биспецифическое антитело. Биспецифические антитела представляют собой антитела, обладающие специфичностью связывания по меньшей мере с двумя разными эпитопами. Типовые биспецифические антитела могут связывать два различных эпитопа белка CD73. Другие такие антитела могут комбинировать сайт связывания CD73 с сайтом связывания для другого белка. Типовые биспецифические антитела могут связывать два различных эпитопа белка PD-1. Другие такие антитела могут комбинировать сайт связывания PD-1 с сайтом связывания для другого белка. Биспецифические антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или их форм с низкой молекулярной массой (например, биспецифические антитела F(ab')₂, биспецифические антитела sc(Fv)₂, биспецифические антитела диатела).

Традиционная продукция полноразмерных биспецифических антител основана на совместной экспрессии двух пар тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, при этом две цепи обладают различной специфичностью (Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Согласно другому подходу варибельные домены антител с желаемой специфичностью связывания сливаются с последовательностями константных доменов иммуноглобулина. ДНК, кодирующие слияния тяжелой цепи иммуноглобулина и, если желательно, легкой

цепи иммуноглобулина, вставляют в отдельные экспрессионные векторы и котрансфицируют в подходящую клетку-хозяина. Это обеспечивает большую гибкость в регулировке соотношений трех полипептидных фрагментов. Однако возможно вставить кодирующие последовательности для двух или всех трех полипептидных цепей в один экспрессионный вектор, когда экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных соотношениях приводит к высоким выходам.

Согласно другому подходу, описанному в патенте США № 5,731,168, граница взаимодействия между парой молекул антител может быть сконструирована так, чтобы максимально увеличить процент гетеродимеров, извлекаемых из культуры рекомбинантных клеток. Предпочтительная граница взаимодействия содержит по меньшей мере часть домена СН3. В этом способе одна или большее количество небольших боковых цепей аминокислот от границы взаимодействия первой молекулы антитела заменяются более крупными боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). Компенсирующие «впадины» идентичного или сходного размера с большой боковой цепью (цепями) создаются на границе взаимодействия второй молекулы антитела путем замены больших боковых цепей аминокислот на более мелкие (например, аланин или треонин). Это обеспечивает механизм увеличения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры.

Биспецифические антитела включают сшитые или «гетероконъюгированные» антитела. Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть связано с авидином, а другое - с биотином. Гетероконъюгированные антитела можно получить с помощью любых удобных способов сшивания.

Технология "диатела" обеспечивает альтернативный механизм получения биспецифических фрагментов антител. Фрагменты содержат VH, соединенный с VL посредством линкера, который слишком короткий, чтобы сделать возможным спаривание между двумя доменами в одной цепи. Соответственно, домены VH и VL одного фрагмента вынуждены соединяться с комплементарными доменами VL и VH другого фрагмента, тем самым образуя два сайта связывания антигена.

Поливалентные антитела

В некоторых случаях антитело анти-CD73 представляет собой поливалентное антитело. Поливалентное антитело может быть интернализировано (и/или катаболизировано) клеткой, экспрессирующей антиген, с которым связываются антитела, быстрее, чем бивалентное антитело. Антитела, описанные в данном документе, могут быть мультивалентными антителами с тремя или большим количеством антигенсвязывающих сайтов (*например*, четырехвалентными антителами), которые можно легко получить путем рекомбинантной экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидные цепи антитела. Поливалентное антитело может содержать домен димеризации и три или большее количество антигенсвязывающих сайтов. Типовой домен димеризации содержит (или состоит из) Fc-область или шарнирную область. Поливалентное антитело может содержать (или состоять из) от трех до около восьми (*например*, четырех) антигенсвязывающих

сайтов. Поливалентное антитело необязательно содержит по меньшей мере одну полипептидную цепь (*например*, по меньшей мере две полипептидные цепи), при этом полипептидная цепь содержит два или большее количество переменных доменов. Например, полипептидная цепь(и) могут содержать $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$, где VD1 представляет собой первый переменный домен, VD2 представляет собой второй переменный домен, Fc представляет собой полипептидную цепь Fc-области, X1 и X2 представляют собой аминокислотный или пептидный спейсер, и n равно 0 или 1.

Конъюгированные антитела

В некоторых случаях антитело анти-CD73 представляет собой конъюгированное антитело. Антитела, описанные в настоящем документе, могут быть конъюгированными антителами, которые связаны с различными молекулами, включая высокомолекулярные вещества, такие как полимеры (*например*, полиэтиленгликоль (PEG), полиэтиленимин (PEI), модифицированный посредством PEG (PEI-PEG), полиглутаминовая кислота (PGA) (сополимеры N-(2-гидроксипропил)метакриламида (HPMA)), гиалуроновая кислота, радиоактивные материалы (*например*, ^{90}Y , ^{131}I), флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества, гаптены, ферменты, хелаты металлов, лекарственные средства и токсины (*например*, кальхеамицин, экзотоксин A *Pseudomonas*, рицин (*например*, дегликозилированная цепь A рицина)).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения для улучшения цитотоксического действия антител анти-CD73 и, следовательно, их терапевтической эффективности, антитела конъюгируют с высокотоксичными веществами, включая радиоизотопы и цитотоксические агенты. В одном варианте осуществления настоящего изобретения для улучшения цитотоксического действия антител анти-PD-1 и, следовательно, их терапевтической эффективности, антитела конъюгируют с высокотоксичными веществами, включая радиоизотопы и цитотоксические агенты. Эти конъюгаты могут избирательно доставлять токсическую нагрузку к целевому участку (т.е. к клеткам, экспрессирующим антиген, распознаваемый антителом), в то время как клетки, которые не распознаются антителом, сохраняются. Чтобы свести к минимуму токсичность, конъюгаты обычно разрабатывают на основе молекул с коротким периодом полужизни в сыворотке (таким образом, используют мышиные последовательности и изоформы IgG3 или IgG4).

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-CD73 является модифицированным посредством фрагмента, который улучшает его стабилизацию и/или удержание в системе циркуляции, *например*, в крови, сыворотке или других тканях, *например*, по меньшей мере, в 1,5, 2, 5, 10 или 50 раз. Например, антитело анти-CD73 может быть связано (*например*, конъюгировано) с полимером, *например*, по существу неантигенным полимером, таким как полиалкиленоксид или полиэтиленоксид. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело анти-PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент являются модифицированными посредством фрагмента, который улучшает его стабилизацию и/или удержание в системе циркуляции,

например, в крови, сыворотке или других тканях, *например*, по меньшей мере, в 1,5, 2, 5, 10 или 50 раз. Например, антитело анти-PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть связанными (*например*, конъюгированными) с полимером, *например*, по существу неантигенным полимером, таким как полиалкиленоксид или полиэтиленоксид. Пригодные полимеры будут значительно варьировать в зависимости от веса. Можно применять полимеры, имеющие средний молекулярный вес начиная от около 200 до 35 000 дальтон (или от около 1 000 до около 15 000, и от 2 000 до около 12 500). Например, антитело анти-CD73, антитело анти-PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, могут быть конъюгированы с водорастворимым полимером, *например*, гидрофильным поливиниловым полимером, *например*, поливиниловым спиртом или поливинилпирролидоном. Примеры таких полимеров включают гомополимеры полиалкиленоксида, такие как полиэтиленгликоль (PEG) или полипропиленгликоли, полиоксиэтиленированные полиолы, их сополимеры и их блок-сополимеры, при условии, что водорастворимость блок-сополимеров сохраняется. Дополнительные пригодные полимеры включают полиоксиалкилены, такие как полиоксиэтилен, полиоксипропилен и блок-сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена; полиметакрилаты; карбомеры; и разветвленные или неразветвленные полисахариды.

Вышеописанные конъюгированные антитела могут быть получены путем проведения химических модификаций антител или их форм с более низкой молекулярной массой, описанных в данном документе. Способы модификации антител хорошо известны в данной области техники (см., например, US 5,057,313 и US 5,156,840).

Полинуклеотиды, векторы и клетки

В настоящем изобретении также предлагаются полинуклеотиды и векторы, кодирующие антитело анти-CD73 или его часть (например, VH, VL, HC или LC), описанные в данном документе. Полинуклеотиды по настоящему изобретению могут быть в форме РНК или в форме ДНК. В некоторых случаях полинуклеотид представляет собой ДНК. В некоторых случаях полинуклеотид представляет собой комплементарную ДНК (кДНК). В некоторых случаях полинуклеотид представляет собой РНК.

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH, и CDR3 VH любого антитела, описанного в данном документе (см. *например*, Таблицы 3, 4 и 6). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL любого антитела, описанного в данном документе (см. *например*, Таблицы 3, 4 и 6). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует тяжелую цепь, содержащую VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH, и CDR3 VH любого антитела, описанного в данном документе (см. *например*, Таблицы 3, 4 и 6). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует легкую цепь, содержащую VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL любого антитела, описанного в данном документе (см. *например*, Таблицы 3, 4 и 6). В некоторых случаях полинуклеотид функционально связан с промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид

содержит VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH любого антитела, описанного в данном документе (см. *например*, Таблицы 3, 4 и 6); и (ii) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй полипептид, при этом второй полипептид содержит VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL любого антитела, описанного в данном документе (см. *например*, Таблицы 3, 4 и 6) В некоторых случаях полинуклеотид содержит: (i) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый полипептид, при этом первый полипептид содержит тяжелую цепь, содержащую VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH любого антитела, описанного в данном документе (см. *например*, Таблицы 3, 4 и 6); и (ii) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую второй полипептид, при этом первый полипептид содержит легкую цепь, содержащую VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL любого антитела, описанного в данном документе (см. *например*, Таблицы 3, 4 и 6) В некоторых случаях первая нуклеиновая кислота функционально связана с первым промотором, а вторая нуклеиновая кислота функционально связана со вторым промотором.

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

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует VL CL25 или его вариант (*например*, его гуманизованную версию, *например*, HzCL25). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:23. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (*например*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:23. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:23. В некоторых случаях полинуклеотид функционально связан с промотором.

В некоторых случаях полинуклеотид кодирует VH антитела 3-F03 или его варианта (*например*, 3-F03_411 или 3-F03_413). В некоторых случаях полинуклеотид кодирует

полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или 100% идентичности с аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO:62 или 63. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую одно или большее число (*например*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) аминокислотных замещений, добавлений и/или удалений относительно аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:62 или 63. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:62. В некоторых случаях полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:63. В некоторых случаях полинуклеотид функционально связан с промотором.

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

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, описанный в данном документе, является выделенным.

В настоящем изобретении также предлагаются экспрессионные векторы, кодирующие антитела анти-CD73 или их части (*например*, VH, VL, HC и/или LC), описанные в данном документе. В настоящем изобретении также предлагаются экспрессионные векторы содержащие один или большее количество описанных в данном документе полинуклеотидов. Различные типы экспрессионных векторов известны в данной области техники и описаны в данном документе (*например*, см. раздел этого документа «Способы получения антител»).

В настоящем изобретении также предлагаются клетки, содержащие антитела анти-CD73, описанные в данном документе. В настоящем изобретении также предлагаются клетки, содержащие один или большее количество описанных в данном документе полинуклеотидов. В настоящем изобретении также предлагаются клетки, содержащие один или большее количество описанных в данном документе экспрессионных векторов. Различные типы клеток известны в данной области техники и описаны в данном документе (*например*, см. раздел этого документа «Способы получения антител»).

Антитела анти-CD73 с измененным гликозилированием

Различные гликоформы могут сильно влиять на свойства терапевтического агента, включая фармакокинетику, фармакодинамику, взаимодействие с рецепторами и тканеспецифическое воздействие (Graddis et al., 2002, *Curr Pharm Biotechnol.* 3: 285-297). В частности, для антител, структура олигосахаридов может влиять на свойства, связанные с устойчивостью к протеазам, период полужизни антитела в сыворотке, опосредованный рецептором FcRn, фагоцитоз и обратную связь антител, в дополнение к эффекторным функциям антитела (*например*, связывание с комплексом комплемента C1, который индуцирует CDC, и связывание с рецепторами FcγR, которые отвечают за модулирование пути ADCC) (Nose and Wigzell, 1983; Leatherbarrow and Dwek, 1983; Leatherbarrow et al., 1985; Walker et al., 1989; Carter et al., 1992, *PNAS*, 89: 4285-4289).

Соответственно, еще один способ модуляции эффекторной функции антител включает изменение гликозилирования константной области антитела. Изменение гликозилирования включает, например, уменьшение или увеличение количества гликозилированных остатков, изменение в структуре и расположении гликозилированных остатков, а также изменение в структуре(ах) сахара. Олигосахариды, обнаруженные в IgG человека, влияют на степень их эффекторной функции (Raju, T.S. *BioProcess International* April 2003. 44-53); микрогетерогенность олигосахаридов IgG человека может влиять на биологические функции, такие как CDC и ADCC, связывание с различными рецепторами Fc и связывание с белком C1q (Wright A. & Morrison SL. *TIBTECH* 1997, 15 26-32; Shields et al. *J Biol Chem.* 2001 276(9):6591-604; Shields et al. *J Biol Chem.* 2002; 277(30):26733-40; Shinkawa et al. *J Biol Chem.* 2003 278(5):3466-73; Umana et al. *Nat Biotechnol.* 1999 Feb; 17(2): 176-80). Например, способность IgG связывать C1q и активировать каскад реакций комплемента может зависеть от присутствия, отсутствия или модификации углеводного фрагмента, расположенного между двумя доменами CH2 (который обычно закреплен на Asn297) (Ward and Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2:77-94 (1995)). Таким образом, в некоторых случаях антитело анти-CD73 содержит замену Asn297Ala относительно константной области дикого типа.

Сайты гликозилирования в полипептиде содержащем Fc, например, в антителе, таком как антитело IgG, могут быть идентифицированы с помощью стандартных методик. Идентификация сайта гликозилирования может быть экспериментальной или основываться на анализе последовательности или данных моделирования. Были описаны консенсусные мотивы, которые являются аминокислотной последовательностью, распознаваемой различными гликозилтрансферазами. Например, консенсусный мотив для мотива N-связанного гликозилирования часто является NXT или NXS, где X может быть любой аминокислотой, кроме пролина. Также были описаны несколько алгоритмов для обнаружения потенциального мотива гликозилирования. Соответственно, для идентификации потенциальных сайтов гликозилирования в пределах антитела или Fc-содержащего фрагмента, последовательность антитела изучается, например, с помощью общедоступных баз данных, таких как веб-сайт, предоставленный Center for Biological

Sequence Analysis (см. сервисы NetNGlyc для прогнозирования сайтов N-связанного гликозилирования и сервисы NetOGlyc для прогнозирования сайтов O-связанного гликозилирования).

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

Важно отметить, что в то время как удаление гликанов в домене CH2, по-видимому, оказывает существенное влияние на эффекторную функцию, другие функциональные и физические свойства антител остаются неизменными. В частности, было продемонстрировано, что удаление гликанов практически не влияет на период полужизни в сыворотке и связывание с антигеном (Nose, 1983 выше; Tao, 1989 выше; Dorai, 1991 выше; Нанд, 1992 выше; Hobbs, 1992 *Mol. Immunol.* 29:949).

Антитела анти-CD73 по настоящему изобретению могут быть модифицированы или изменены для проявления повышенной или пониженной эффекторной функции (функций) (по сравнению со вторым CD73-специфическим антителом). Способы изменения сайтов гликозилирования антител описаны, *например*, в US 6,350,861 и US 5,714,350, WO 05/18572 и WO 05/03175; эти способы можно применять для получения антител анти-CD73 по настоящему изобретению с измененным, сниженным гликозилированием или без него.

Способы получения антител

Антитела анти-CD73

Антитела могут продуцироваться в бактериальных или эукариотических клетках. Некоторые антитела, *например*, Fab, могут продуцироваться в бактериальных клетках, *например*, клетках *E. coli*. Антитела также могут продуцироваться в эукариотических клетках, таких как трансформированные клеточные линии (например, CHO, 293E, COS). Кроме того, антитела (например, scFvs) могут экспрессироваться в дрожжевых клетках, таких как *Pichia* (см., *например*, публикацию Powers et al., *J Immunol Methods.* 251:123-35 (2001)), *Hansenula* или *Saccharomyces*. Для получения представляющего интерес антитела, конструируют полинуклеотид, кодирующий антитело, вводят его в экспрессионный вектор и затем экспрессируют его в подходящих клетках-хозяевах. Для приготовления рекомбинантного экспрессионного вектора, трансфекции клеток-хозяев, отбора трансформантов, культивирования клеток-хозяев и выделения антитела применяются стандартные методы молекулярной биологии.

Если антитело должно быть экспрессировано в бактериальных клетках (*например*, *E. coli*), экспрессионный вектор должен иметь характеристики, позволяющие осуществлять амплификацию вектора в бактериальных клетках. Кроме того, если такую *E. coli*, как JM109, DH5 α , HB101 или XL1-Blue, применяют в качестве хозяина, вектор должен иметь

промотор, например, промотор lacZ (Ward et al., 341:544-546 (1989), промотор araB (Better et al., Science, 240:1041-1043 (1988)) или промотор T7, который может обеспечить эффективную экспрессию в *E. coli*. Примеры подобных векторов включают, например, векторы серий M13, векторы серий pUC, pBR322, pBluescript, pCR-Script, pGEX-5X-1 (Pharmacia), «систему QIAexpress» (QIAGEN), pEGFP и pET (когда применяют этот экспрессионный вектор, хозяин предпочтительно, экспрессирует BL21 РНК-полимеразу T7). Для экспрессии антител вектор экспрессии может содержать сигнальную последовательность. Для продуцирования в периплазму *E. coli*, сигнальную последовательность *pelB* (Lei et al., *J. Bacteriol.*, 169:4379 (1987)) можно применять в качестве сигнальной последовательности для секреции антител. Для бактериальной экспрессии можно применять способы с использованием хлорида кальция или способы электропорации для введения экспрессионного вектора в бактериальную клетку.

Если антитело должно экспрессироваться в клетках животных, таких как клетки CHO, COS и NIH3T3, экспрессионный вектор включает промотор, необходимый для экспрессии в этих клетках, например, промотор SV40 (Mulligan et al., *Nature*, 277:108 (1979)), промотор MMLV-LTR, промотор EF1 α (Mizushima et al., *Nucleic Acids Res.*, 18:5322 (1990)), или промотор CMV. В дополнение к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноглобулин или его домен, рекомбинантные экспрессионные векторы могут нести дополнительные последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (*например*, точки начала репликации), и селективируемые маркерные гены. Селективируемый маркерный ген облегчает отбор клеток-хозяев, в которые был введен вектор (см., *например*, патенты США №№ 4,399,216, 4,634,665 и 5,179,017). Например, селективируемый маркерный ген обычно придает устойчивость по отношению к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат, клетке-хозяину, в которую был введен вектор. Примеры векторов с селективируемыми маркерами включают pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV и pOP13.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антитела вырабатываются в клетках млекопитающих. Примеры клеток-хозяев млекопитающих для экспрессии антитела включают яичник китайского хомячка (клетки CHO) (включая клетки *dhfr*⁻ CHO, описанные в публикации Urlaub и Chasin (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, применяемые с DHFR селективируемым маркером, *например*, как описано в публикации Kaufman и Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), эмбриональные клетки 293 почки человека (*например*, 293, 293E, 293T), клетки COS, клетки NIH3T3, лимфоцитарные клеточные линии, *например*, клетки миеломы NS0 и клетки SP2, и клетку от трансгенного животного, *например*, трансгенного млекопитающего. Например, клетка может представлять собой эпителиальную клетку молочной железы.

В типовой системе для экспрессии антител, рекомбинантный вектор экспрессии кодирующий обе, тяжелую и легкую, цепи антитела анти-CD73 (*например*, CL25, HzCL25, 3-F03, 3-F03_411 или 3-F03_413) введен в клетки *dhfr*⁻ CHO посредством трансфекции, опосредованной фосфатом кальция. В типовой системе для экспрессии антител,

рекомбинантный экспрессионный вектор кодирующий обе, тяжелую и легкую, цепи антитела анти-PD-1 (например, ретифанлимаб), введен в клетки *dhfr* CHO посредством трансфекции, опосредованной фосфатом кальция. В пределах рекомбинантного вектора экспрессии каждый из генов тяжелой и легкой цепи антитела функционально связан с регуляторными элементами энхансера/промотора (*например*, полученными из SV40, CMV, аденовируса и подобного, такими как регуляторный элемент энхансера CMV/промотора AdMLP или регуляторный элемент энхансера SV40/промотора AdMLP) для управления высокими уровнями транскрипции генов. Рекомбинантный экспрессионный вектор также несет ген *DHFR*, который делает возможным селекцию клеток CHO, которые были трансфицированы вектором с помощью селекции/амплификации с применением метотрексата. Отобранные трансформированные клетки-хозяева культивируют, чтобы сделать возможной экспрессию тяжелой и легкой цепей антитела, и выделяют антитело из культуральной среды.

Антитела также могут продуцироваться в организме трансгенных животных. Например, в патенте США № 5,849,992 описан способ экспрессии антитела в молочной железе трансгенного млекопитающего. Конструируют трансген, который содержит специфический по отношению к молоку промотор и нуклеиновые кислоты, кодирующие представляющее интерес антитело и сигнальную последовательность для секреции. Молоко, вырабатываемое самками таких трансгенных млекопитающих, содержит в себе представляющее интерес секретлируемое антитело. Антитело может быть очищено от молока или использовано непосредственно для некоторых применений. Также предлагаются животные, содержащие одну или большее количество нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе.

Антитела по настоящему раскрытию могут выделяться внутрь или наружу (например, в среде) клетки-хозяина и очищены до по существу чистых и гомогенных антител. Для выделения и очистки антител могут быть использованы способы выделения и очистки, обычно применяемые для очистки антител, и не ограниченные каким-либо конкретным способом. Антитела могут быть выделены и очищены посредством соответствующего выбора и комбинирования, например, колоночной хроматографии, фильтрации, ультрафильтрации, высаливания, осаждения растворителями, экстракции растворителями, дистилляции, иммунопреципитации, электрофореза в SDS-полиакриламидном геле, изоэлектрического фокусирования, диализа и перекристаллизации. Хроматография включает, например, аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, гель-фильтрацию, обращенно-фазовую хроматографию и адсорбционную хроматографию (Strategies for Protein Purification and Characterization:: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Хроматография может быть проведена с помощью жидкофазной хроматографии, такой как ВЭЖХ и FPLC. Колонки, применяемые для аффинной хроматографии, включают колонку с белком А и колонку с белком G. Примеры колонок с белком А включают Hyper д, POROS и Sepharose FF (GE Healthcare

Biosciences). Настоящее изобретение также включает антитела, которые являются высокоочищенными с помощью указанных способов очистки.

Антитела анти-PD-1

Антитела анти-PD-1, такие как ретифанлимаб, могут быть получены, например, путем получения и экспрессии синтетических генов, которые кодируют перечисленные аминокислотные последовательности, или путем мутации генов человеческой зародышевой линии с получением гена, который кодирует указанные аминокислотные последовательности. Кроме того, указанное антитело и другие антитела анти-PD-1 могут быть получены, *например*, с помощью одного или большего количества из следующих способов.

Гуманизированные антитела могут быть получены путем замены последовательностей вариабельной области Fv, которые непосредственно не участвуют в связывании антигена, на эквивалентные последовательности из вариабельных областей Fv человека. Широко применяемые способы получения гуманизированных антител описаны в публикации Morrison, S. L., *Science*, 229:1202-1207 (1985), Oi et al., *BioTechniques*, 4:214 (1986), и в публикациях US 5,585,089; US 5,693,761; US 5,693,762; US 5,859,205; а также US 6,407,213. Данные способы включают выделение, обработку и экспрессию последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют все или часть вариабельных областей Fv иммуноглобулина по меньшей мере из одной тяжелой или легкой цепи. Источники такой нуклеиновой кислоты хорошо известны специалистам в данной области техники и, например, могут быть получены из гибридомы, продуцирующей антитело против заданной мишени, как описано выше, из генов иммуноглобулина зародышевой линии или из синтетических конструкций. Рекомбинантную ДНК, кодирующую гуманизированное антитело, можно затем клонировать в соответствующий экспрессионный вектор.

Последовательности зародышевой линии человека, например, описаны в публикациях Tomlinson, I.A. et al., *J. Mol. Biol.*, 227:776-798 (1992); Cook, G. P. et al., *Immunol. Today*, 16: 237-242 (1995); Chothia, D. et al., *J. Mol. Bio.* 227:799-817 (1992); и Tomlinson et al., *EMBO J.*, 14:4628-4638 (1995). Каталог V BASE содержит исчерпывающий каталог последовательностей вариабельных областей иммуноглобулинов человека (составленный Tomlinson, I.A. et al. Центр исследований белков MRC, Кембридж, Великобритания). Такие последовательности можно применять в качестве источника последовательности человека, например, для каркасных областей и CDR. Также можно применять консенсусные каркасные области человека, *например*, как описано в патенте США № 6,300,064.

Также можно применять и другие способы гуманизации антител. Например, другие способы могут учитывать трехмерную структуру антитела, положения каркаса, которые находятся в трехмерной близости к детерминантам связывания, и иммуногенные пептидные последовательности. См., *например*, WO 90/07861; патенты США №№ 5,693,762; 5,693,761; 5,585,089; 5,530,101; и 6,407,213; Tempest et al. (1991) *Biotechnology*

9:266-271. Еще один способ называется «гуманизация» и описан, например, в U.S. 2005-008625.

Антитело может включать Fc-область человека, *например*, Fc-область дикого типа или Fc-область, которая включает одно или большее количество изменений. В одном варианте осуществления настоящего изобретения константная область является измененной, *например*, мутированной, для модификации свойств антитела (*например*, для увеличения или уменьшения одной или большего количества из следующих свойств: связывание рецептора Fc, гликозилирование антитела, количество остатков цистеина, функцию эффекторной клетки или функцию комплемента). Например, константная область IgG1 человека может быть мутирована на одном или большем количестве остатков, *например*, на одном или большем количестве остатков 234 и 237 (на основании нумерации Kabat). Антитела могут иметь мутации в области CH2 тяжелой цепи, которые уменьшают или изменяют эффекторную функцию, *например*, связывание рецептора Fc и активацию комплемента. Например, антитела могут иметь мутации, такие как описанные в патентах США № 5,624,821 и 5,648,260. Антитела также могут иметь мутации, которые стабилизируют дисульфидную связь между двумя тяжелыми цепями иммуноглобулина, такие как мутации в шарнирной области IgG4, как описано в данной области техники (*например*, Angal et al. (1993) *Mol. Immunol.* 30:105-08). См. также, *например*, публикацию U.S. 2005-0037000.

Антитела анти-PD-1 могут быть в форме полноразмерных антител или в форме низкомолекулярных форм (*например*, биологически активных фрагментов антител или минител) антител анти-PD-1, *например*, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, dAb, scFv и sc(Fv)₂. Другие антитела анти-PD-1, охватываемые данным изобретением, включают однодоменное антитело (sdAb), содержащее одну переменную цепь, такую как, VH или VL, или ее биологически активный фрагмент. См., *например*, публикации Moller et al., *J. Biol. Chem.*, 285(49): 38348-38361 (2010); Harmsen et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77(1):13-22 (2007); U.S. 2005/0079574 and Davies et al. (1996) *Protein Eng.*, 9(6):531-7. Как и целое антитело, sdAb способно избирательно связываться со специфическим антигеном. С молекулярной массой всего 12-15 кДа, sdAb гораздо меньше, чем обычное антитело и даже меньше, чем фрагменты Fab и одноцепочечные переменные фрагменты.

В настоящем изобретении предлагаются композиции, содержащие смесь антитела анти-PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента и одного или большего количества его кислотных вариантов, *например*, при этом количество кислотных вариантов составляет менее чем около 80%, 70%, 60%, 60%, 50%, 40%, 30%, 30%, 20%, 10%, 5% или 1%. Также предлагаются композиции, содержащие антитело анти-PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие по меньшей мере один сайт дезамидирования, при этом pH композиции составляет от около 5,0 до около 6,5, так что, *например*, по меньшей мере около 90% антител анти-PD-1 являются не дезамидированными (т.е. менее чем около 10% антител являются дезамидированными). В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения менее чем около 5%, 3%, 2% или 1% антител являются дезамидированными.

Значение рН может составлять от 5,0 до 6,0, например, 5,5 или 6,0. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения значение рН составляет 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 или 6,5.

«Кислотный вариант» представляет собой вариант представляющего интерес полипептида, который является более кислотным (например, как определено катионообменной хроматографией), чем представляющий интерес полипептид. Примером кислотного варианта является дезамидированный вариант.

«Дезамидированный» вариант полипептидной молекулы представляет собой полипептид, в котором один или большее количество остатков аспарагина исходного полипептида были преобразованы в аспартат, т.е. нейтральный амид боковой цепи был преобразован в остаток с общим кислотным свойством.

Термин «смесь» в контексте данного документа применяется в отношении композиции, содержащей антитело анти-PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, и означает присутствие как желаемого антитела к PD-1, так и его антигенсвязывающего фрагмента, а также одного или большего количества его кислотных вариантов. Кислотные варианты могут включать преимущественно дезамидированное антитело анти-PD-1, с небольшими количествами других кислотных вариантов.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения аффинность связывания (K_D), скорость ассоциации (K_D on) и/или скорость диссоциации (K_D off) антитела, которое было мутировано для устранения дезамидирования, аналогичны таковым для антитела дикого типа, *например*, с разницей менее чем около 5 раз, 2 раза, 1 раз (100%), 50%, 30%, 20%, 10%, 5%, 3%, 2% или 1%.

Доза и введение

Антитела анти-CD73, ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или A2B и ингибитор PD-1/PD-L1, описанные в данном документе, можно вводить субъекту, *например*, субъекту, нуждающемуся в этом, например, субъекту-человеку, различными способами. В некоторых случаях антитела анти-CD73, ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или A2B и ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту одним и тем же путем. В некоторых случаях антитела анти-CD73 и ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту одним и тем же путем. В некоторых случаях антитела анти-CD73, ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или A2B и ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту разными путями. В некоторых случаях антитела анти-CD73 и ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту разными путями. Для многих применений способ введения является одним из следующих: внутривенная инъекция или инфузия (IV), подкожная инъекция (SC), внутривентральная (IP) или внутримышечная инъекция. Кроме того, можно применять внутрисуставное введение. Также можно применять другие способы парентерального введения. Примерами таких способов являются: внутриартериальная, интратекальная, интракапсулярная, внутриорбитальная, внутрисердечная, внутрикожная, транстрахеальная, субкутикулярная, внутрисуставная, субкапсулярная, субарахноидальная, интраспинальная, эпидуральная и интрастернальная инъекции. В некоторых случаях введение можно осуществлять

перорально.

Путь и/или способ введения антител анти-CD73, ингибитора аденозинового рецептора A2A и/или A2B и ингибитора PD-1/PD-L1 также можно адаптировать для каждого отдельного случая, например, путем наблюдения за субъектом, например, с помощью томографической визуализации, например, для визуализации опухоли. Путь и/или способ введения антител анти-CD73 и ингибитора PD-1/PD-L1 также можно адаптировать для каждого отдельного случая, *например*, путем наблюдения за субъектом, *например*, с помощью томографической визуализации, *например*, для визуализации опухоли.

Каждый из следующих агентов: антитело анти-CD73, ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или A2B и ингибитор PD-1/PD-L1, можно вводить в виде фиксированной дозы или в дозе, рассчитанной в мг/кг веса пациента. Например, при двойном комбинированном лечении, каждый из следующих агентов: антитело анти-CD73 и ингибитор PD-1/PD-L1, можно вводить в виде фиксированной дозы или в дозе, рассчитанной в мг/кг веса пациента. Доза также может быть выбрана так, чтобы уменьшить или избежать продуцирования антител против антител анти-CD73, ингибитора аденозинового рецептора A2A и/или A2B и/или ингибитора PD-1/PD-L1. Схему введения можно корректировать для обеспечения желаемого ответа, например, терапевтического ответа или комбинаторного терапевтического эффекта. Как правило, дозы антител анти-CD73, ингибитора аденозинового рецептора A2A и/или A2B и ингибитора PD-1/PD-L1 можно применять для обеспечения субъекта агентами в биодоступных количествах. Например, можно вводить дозы в диапазоне 0,1-100 мг/кг, 0,5-100 мг/кг, 1 мг/кг-100 мг/кг, 0,5-20 мг/кг, 0,1-10 мг/кг или 1-10 мг/кг. Также можно применять другие дозы.

В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73, ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или A2B и ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту одновременно. В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 и ингибитор PD-1/PD-L1 вводят одновременно.

В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73, ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или A2B и ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту последовательно. В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 и ингибитор PD-1/PD-L1 вводят последовательно.

В контексте данного документа стандартная лекарственная форма или «фиксированная доза» или «постоянная доза» относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных дозировок для субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с необходимым фармацевтическим носителем и, необязательно, в сочетании с другим агентом. Можно вводить одну или множество доз. Альтернативно или дополнительно антитела и/или ингибиторы можно вводить путем непрерывной инфузии. Примеры фиксированных доз включают 375 мг, 500 мг и 750 мг.

Ингибиторы аденозиновых рецепторов A2A/A2B

В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе от около 0,1 мг до около 1000 мг в пересчете на свободное основание. В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе от около 1 мг до около 500 мг в пересчете на свободное основание. В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе от около 5 мг до около 250 мг в пересчете на свободное основание. В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе от около 10 мг до около 100 мг в пересчете на свободное основание.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе, выбранной из около 0,5 мг, около 1 мг, около 5 мг, около 10 мг, около 15 мг, около 20 мг, около 25 мг, около 30 мг, около 35 мг, около 40 мг, около 45 мг, около 50 мг, около 55 мг, около 60 мг, около 65 мг, около 70 мг, около 75 мг, около 80 мг, около 85 мг, около 90 мг, около 95 мг, около 100 мг, около 105 мг, около 110 мг, около 115 мг, около 120 мг, около 125 мг, около 130 мг, около 135 мг, около 140 мг, около 145 мг, около 150 мг, около 155 мг, около 160 мг, около 165 мг, около 170 мг, около 175 мг, около 180 мг, около 185 мг, около 190 мг, около 195 мг, около 200 мг, около 205 мг, около 210 мг, около 215 мг, около 220 мг, около 225 мг, около 230 мг, около 235 мг, около 240 мг, около 245 мг, около 250 мг, около 255 мг, около 260 мг, около 265 мг, около 270 мг, около 275 мг, около 280 мг, около 285 мг, около 290 мг, около 295 мг, около 300 мг, около 305 мг, около 310 мг, около 315 мг, около 320 мг, около 325 мг, около 330 мг, около 335 мг, около 340 мг, около 345 мг, около 350 мг, около 355 мг, около 360 мг, около 365 мг, около 370 мг, около 375 мг, около 380 мг, около 385 мг, около 390 мг, около 395 мг, около 400 мг, около 405 мг, около 410 мг, около 415 мг, около 420 мг, около 425 мг, около 430 мг, около 435 мг, около 440 мг, около 445 мг, около 450 мг, около 455 мг, около 460 мг, около 465 мг, около 470 мг, около 475 мг, около 480 мг, около 485 мг, около 490 мг, около 495 мг, около 500 мг, около 505 мг, около 510 мг, около 515 мг, около 520 мг, около 525 мг, около 530 мг, около 535 мг, около 540 мг, около 545 мг, около 550 мг, около 555 мг, около 560 мг, около 565 мг, около 570 мг, около 575 мг, около 580 мг, около 585 мг, около 590 мг, около 595 мг, около 600 мг, около 605 мг, около 610 мг, около 615 мг, около 620 мг, около 625 мг, около 630 мг, около 635 мг, около 640 мг, около 645 мг, около 650 мг, около 655 мг, около 660 мг, около 665 мг, около 670 мг, около 675 мг, около 680 мг, около 685 мг, около 690 мг, около 695 мг, около 700 мг, около 705 мг, около 710 мг, около 715 мг, около 720 мг, около 725 мг, около 730 мг, около 735 мг, около 740 мг, около 745 мг, около 750 мг, около 755 мг, около 760 мг, около 765 мг, около 770 мг, около 775 мг, около 780 мг, около 785 мг, около 790 мг, около 795 мг, около 800 мг, около 805 мг, около 810 мг, около 815 мг, около 820 мг, около 825 мг, около 830 мг, около 835 мг, около 840 мг, около 845 мг, около 850 мг, около 855 мг, около 860 мг, около 865 мг, около 870 мг, около 875 мг, около 880 мг,

около 885 мг, около 890 мг, около 895 мг, около 900 мг, около 905 мг, около 910 мг, около 915 мг, около 920 мг, около 925 мг, около 930 мг, около 935 мг, около 940 мг, около 945 мг, около 950 мг, около 955 мг, около 960 мг, около 965 мг, около 970 мг, около 975 мг, около 980 мг, около 985 мг, около 990 мг, около 995 мг и около 1000 мг в пересчете на свободное основание. В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе в диапазоне от около 0,1 мг до около 500 мг в пересчете на свободное основание или в любой дозе между этими значениями. В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе в диапазоне от около 1 мг до около 100 мг в пересчете на свободное основание или в любой дозе между этими значениями. В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B вводят субъекту в дозе от около 0,1 мг до около 500 мг в пересчете на свободное основание, при этом ингибитор A2A/A2B вводят один раз в день или через день.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту один раз в день, через день, один раз в неделю или через любые промежутки времени между этими значениями. В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту один раз в день. В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту через день. В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту один раз в неделю.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе от около 1 мг до около 50 мг 1 раз в день.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе от около 1 мг до около 50 мг 2 раза в день.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе около 10 мг 1 раз в день.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе около 10 мг 2 раза в день.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе около 40 мг 1 раз в день.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор A2A/A2B или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе около 40 мг 2 раза в день.

В некоторых вариантах осуществления каждую из доз вводят в виде разовой дозы один раз в день. В некоторых вариантах осуществления каждую из доз вводят в виде разовой пероральной дозы один раз в день.

В некоторых вариантах осуществления предложенные способы включают введение первой дозы ингибитора A2A/A2B или его фармацевтически приемлемой соли, как

определено в данном документе, и второй дозы ингибитора A2A/A2B или его фармацевтически приемлемой соли, при этом вторая доза превышает первую дозу (*т. е.* указанный способ включает повышение дозы ингибитора A2A/A2B или его фармацевтически приемлемой соли, такого как Соединение 9).

В некоторых вариантах осуществления указанный способ включает повышение дозы ингибитора A2A/A2B или его фармацевтически приемлемой соли, когда ингибитор A2A/A2B или его фармацевтически приемлемая соль вводят субъекту в комбинации с ингибитором PD-1/PD-L1 и антитела анти-CD73 или его антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления указанный способ включает повышение дозы Соединения 9, когда указанное Соединение 9 вводят субъекту в комбинации с ингибитором PD-1/PD-L1 (*например*, ретифанлимабом) и в комбинации с антителом анти-CD73, или его антигенсвязывающим фрагментом (*например*, ANTIBODY Y).

Ингибитор PD-1/PD-L1

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе от около 0,1 мг до около 1000 мг в пересчете на свободное основание. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе от около 1 мг до около 500 мг в пересчете на свободное основание. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе от около 5 мг до около 250 мг в пересчете на свободное основание. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе от около 10 мг до около 100 мг в пересчете на свободное основание.

Композиция может содержать от около 1 мг/мл до 100 мг/мл или от около 10 мг/мл до 100 мг/мл, или от около 50 до 250 мг/мл, или от около 100 до 150 мг/мл или от около 100 до 250 мг/мл ингибитора PD-1/PD-L1 (*например*, антитела анти-PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента).

Ингибитор PD-1/PD-L1 (*например*, антитело анти-PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент) можно вводить в дозе, например, с периодическим интервалом в течение периода времени (курса лечения) достаточного для того, чтобы охватить по меньшей мере 2 дозы, 3 дозы, 5 доз, 10 доз или более, например, один или два раза в день, или от одного до четырех раз в неделю, или предпочтительно еженедельно, раз в две недели (каждые две недели), каждые три недели, ежемесячно, например, в течение от около 1 до 12 недель, предпочтительно от 2 до 8 недель, более предпочтительно от около 3 до 7 недель и еще более предпочтительно в течение около 4, 5 или 6 недель. Факторы, которые могут влиять на дозу и сроки, необходимые для эффективного лечения субъекта, включают, например, тяжесть заболевания или нарушения, состав, путь доставки, предшествующее лечение, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и другие имеющиеся заболевания. Кроме того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством соединения может включать однократное лечение или, предпочтительно,

может включать серию курсов лечения.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе, выбранной из около 0,5 мг, около 1 мг, около 5 мг, около 10 мг, около 15 мг, около 20 мг, около 25 мг, около 30 мг, около 35 мг, около 40 мг, около 45 мг, около 50 мг, около 55 мг, около 60 мг, около 65 мг, около 70 мг, около 75 мг, около 80 мг, около 85 мг, около 90 мг, около 95 мг, около 100 мг, около 105 мг, около 110 мг, около 115 мг, около 120 мг, около 125 мг, около 130 мг, около 135 мг, около 140 мг, около 145 мг, около 150 мг, около 155 мг, около 160 мг, около 165 мг, около 170 мг, около 175 мг, около 180 мг, около 185 мг, около 190 мг, около 195 мг, около 200 мг, около 205 мг, около 210 мг, около 215 мг, около 220 мг, около 225 мг, около 230 мг, около 235 мг, около 240 мг, около 245 мг, около 250 мг, около 255 мг, около 260 мг, около 265 мг, около 270 мг, около 275 мг, около 280 мг, около 285 мг, около 290 мг, около 295 мг, около 300 мг, около 305 мг, около 310 мг, около 315 мг, около 320 мг, около 325 мг, около 330 мг, около 335 мг, около 340 мг, около 345 мг, около 350 мг, около 355 мг, около 360 мг, около 365 мг, около 370 мг, около 375 мг, около 380 мг, около 385 мг, около 390 мг, около 395 мг, около 400 мг, около 405 мг, около 410 мг, около 415 мг, около 420 мг, около 425 мг, около 430 мг, около 435 мг, около 440 мг, около 445 мг, около 450 мг, около 455 мг, около 460 мг, около 465 мг, около 470 мг, около 475 мг, около 480 мг, около 485 мг, около 490 мг, около 495 мг, около 500 мг, около 505 мг, около 510 мг, около 515 мг, около 520 мг, около 525 мг, около 530 мг, около 535 мг, около 540 мг, около 545 мг, около 550 мг, около 555 мг, около 560 мг, около 565 мг, около 570 мг, около 575 мг, около 580 мг, около 585 мг, около 590 мг, около 595 мг, около 600 мг, около 605 мг, около 610 мг, около 615 мг, около 620 мг, около 625 мг, около 630 мг, около 635 мг, около 640 мг, около 645 мг, около 650 мг, около 655 мг, около 660 мг, около 665 мг, около 670 мг, около 675 мг, около 680 мг, около 685 мг, около 690 мг, около 695 мг, около 700 мг, около 705 мг, около 710 мг, около 715 мг, около 720 мг, около 725 мг, около 730 мг, около 735 мг, около 740 мг, около 745 мг, около 750 мг, около 755 мг, около 760 мг, около 765 мг, около 770 мг, около 775 мг, около 780 мг, около 785 мг, около 790 мг, около 795 мг, около 800 мг, около 805 мг, около 810 мг, около 815 мг, около 820 мг, около 825 мг, около 830 мг, около 835 мг, около 840 мг, около 845 мг, около 850 мг, около 855 мг, около 860 мг, около 865 мг, около 870 мг, около 875 мг, около 880 мг, около 885 мг, около 890 мг, около 895 мг, около 900 мг, около 905 мг, около 910 мг, около 915 мг, около 920 мг, около 925 мг, около 930 мг, около 935 мг, около 940 мг, около 945 мг, около 950 мг, около 955 мг, около 960 мг, около 965 мг, около 970 мг, около 975 мг, около 980 мг, около 985 мг, около 990 мг, около 995 мг и около 1000 мг в пересчете на свободное основание. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе в диапазоне от около 0,1 мг до около 500 мг в пересчете на свободное основание или в любой дозе между ними. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе в диапазоне от около 1 мг до около 100 мг в пересчете на свободное основание или в любой дозе между ними.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту в дозе от около 1 мг/кг до около 10 мг/кг. В некоторых вариантах реализации ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту в дозе около 2 мг/кг, около 3 мг/кг, около 4 мг/кг, около 5 мг/кг, около 6 мг./кг, около 7 мг/кг, около 8 мг/кг, около 9 мг/кг или около 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту в дозе от около 200 мг до около 1000 мг. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту в дозе около 200 мг, около 225 мг, около 250 мг, около 275 мг, около 300 мг, около 325 мг, около 350 мг, около 375 мг, около 400 мг, около 425 мг, около 450 мг, около 475 мг, около 500 мг, около 525 мг, около 550 мг, около 575 мг, около 600 мг, около 625 мг, около 650 мг, около 675 мг, около 700 мг, около 725 мг, около 750 мг, около 775 мг, около 800 мг, около 825 мг, около 850 мг, около 875 мг, около 900 мг, около 925 мг, около 950 мг. около 975 мг или около 1000 мг.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту один раз в день, через день, один раз в неделю или через любые промежутки времени между ними. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту один раз в день. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту через день. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту один раз в неделю.

В некоторых вариантах осуществления каждую из доз вводят в виде разовой дозы один раз в день. В некоторых вариантах осуществления каждую из доз вводят в виде разовой пероральной дозы один раз в день.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту каждые две недели, каждые три недели или каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту ежемесячно или ежеквартально. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту внутривенно.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту в дозе 1 мг/кг 1 раз каждые 2 недели.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту в дозе 3 мг/кг 1 раз каждые 2 недели.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту в дозе 3 мг/кг 1 раз каждые 4 недели.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту в дозе 10 мг/кг 1 раз каждые 2 недели.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту в дозе 10 мг/кг 1 раз каждые 4 недели.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту в дозе 200 мг/кг 1 раз каждые 3 недели.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту в дозе 250 мг/кг 1 раз каждые 3 недели.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту в

дозе 375 мг/кг 1 раз каждые 3 недели.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту в дозе 500 мг/кг 1 раз каждые 4 недели.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту в дозе 750 мг/кг 1 раз каждые 4 недели.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой ретифанлимаб. В некоторых вариантах осуществления ретифанлимаб вводят субъекту в дозе от около 250 мг до около 850 мг. В некоторых вариантах осуществления ретифанлимаб вводят субъекту в дозе от около 375 мг до около 850 мг. В некоторых вариантах осуществления ретифанлимаб вводят субъекту в дозе от около 450 мг до около 850 мг. В некоторых вариантах осуществления ретифанлимаб вводят субъекту в дозе от около 500 мг до около 750 мг. В некоторых вариантах осуществления ретифанлимаб вводят субъекту в дозе около 500 мг. В некоторых вариантах осуществления ретифанлимаб вводят субъекту в дозе около 750 мг. В некоторых вариантах осуществления ретифанлимаб вводят субъекту один раз в четыре недели. В некоторых вариантах осуществления ретифанлимаб вводят субъекту внутривенно.

В некоторых вариантах осуществления ретифанлимаб вводят субъекту в дозе 1 мг/кг 1 раз каждые 2 недели.

В некоторых вариантах осуществления ретифанлимаб вводят субъекту в дозе 3 мг/кг 1 раз каждые 2 недели.

В некоторых вариантах осуществления ретифанлимаб вводят субъекту в дозе 3 мг/кг 1 раз каждые 4 недели.

В некоторых вариантах осуществления ретифанлимаб вводят субъекту в дозе 10 мг/кг 1 раз каждые 2 недели.

В некоторых вариантах осуществления ретифанлимаб вводят субъекту в дозе 10 мг/кг 1 раз каждые 4 недели.

В некоторых вариантах осуществления ретифанлимаб вводят субъекту в дозе 200 мг/кг 1 раз каждые 3 недели.

В некоторых вариантах осуществления ретифанлимаб вводят субъекту в дозе 250 мг/кг 1 раз каждые 3 недели.

В некоторых вариантах осуществления ретифанлимаб вводят субъекту в дозе 375 мг/кг 1 раз каждые 3 недели.

В некоторых вариантах осуществления ретифанлимаб вводят субъекту в дозе 500 мг/кг 1 раз каждые 4 недели.

В некоторых вариантах осуществления ретифанлимаб вводят субъекту в дозе 750 мг/кг 1 раз каждые 4 недели.

В некоторых вариантах осуществления ретифанлимаб вводят субъекту в дозе от около 100 мг до около 1000 мг 1 раз каждые 4 недели.

В некоторых вариантах осуществления предложенные способы включают введение первой дозы ингибитора PD-1/PD-L1, как определено в данном документе, и второй дозы

ингибитора PD-1/PD-L1, при этом вторая доза превышает первую дозу (*т. е.* указанный способ включает повышение дозы ингибитора PD-1/PD-L1, такого как ретифанлимаб).

В некоторых вариантах осуществления указанный способ включает повышение дозы ингибитора PD-1/PD-L1, когда ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту в комбинации с ингибитором A2A и/или A2B, и/или в комбинации с антителом анти-CD73 или его антигенсвязывающим фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления указанный способ включает повышение дозы ингибитора PD-1/PD-L1, когда ингибитор PD-1/PD-L1 вводят субъекту в комбинации с антителом анти-CD73 или его антигенсвязывающим фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления указанный способ включает повышение дозы ретифанлимаба, когда указанный ретифанлимаб вводят субъекту в комбинации с ингибитором A2A и/или A2B, и/или в комбинации с антителом анти-CD73 или его антигенсвязывающим фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления указанный способ включает повышение дозы ретифанлимаба, когда указанный ретифанлимаб вводят субъекту в комбинации с антителом анти-CD73 или его антигенсвязывающим фрагментом (*например*, ANTIBODY Y).

Антитела анти-CD73

В некоторых вариантах осуществления антитело анти-CD73 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в дозе от около 0,1 мг до около 1000 мг. В некоторых вариантах осуществления антитело анти-CD73 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в дозе от около 0,1 мг до около 500 мг. В некоторых вариантах осуществления антитело анти-CD73 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в дозе от около 0,1 мг до около 100 мг. В некоторых вариантах осуществления антитело анти-CD73 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в дозе от около 1 мг до около 100 мг. В некоторых вариантах осуществления антитело анти-CD73 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в дозе от около 50 мг до около 100 мг.

Композиция может содержать от около 1 мг/мл до 100 мг/мл или от около 10 мг/мл до 100 мг/мл, или от около 50 до 250 мг/мл, или от около 100 до 150 мг/мл или от около 100 до 250 мг/мл антитела анти-CD73 (*например*, антитела анти-CD73 или его антигенсвязывающего фрагмента). В некоторых вариантах осуществления композиция содержит 50 мг/мл антитела анти-CD73 (*например*, антитела анти-CD73 или его антигенсвязывающего фрагмента).

Дозу антитела анти-CD73 можно вводить, *например*, с периодическим интервалом в течение периода времени (курса лечения) достаточного для того, чтобы охватить по меньшей мере 2 дозы, 3 дозы, 5 доз, 10 доз или более, *например*, один или два раза в день, или от одного до четырех раз в неделю, или предпочтительно еженедельно, раз в две недели (каждые две недели), каждые три недели, ежемесячно, *например*, в течение от около 1 до 12 недель, предпочтительно от 2 до 8 недель, более предпочтительно от около 3 до 7 недель

и еще более предпочтительно в течение около 4, 5 или 6 недель. Факторы, которые могут влиять на дозу и сроки, необходимые для эффективного лечения субъекта, включают, например, тяжесть заболевания или нарушения, состав, путь доставки, предшествующее лечение, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и другие имеющиеся заболевания. Кроме того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством соединения может включать однократное лечение или, предпочтительно, может включать серию курсов лечения.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1/PD-L1 или его фармацевтически приемлемую соль вводят субъекту в дозе, выбранной из около 0,5 мг, около 1 мг, около 5 мг, около 10 мг, около 15 мг, около 20 мг, около 25 мг, около 30 мг, около 35 мг, около 40 мг, около 45 мг, около 50 мг, около 55 мг, около 60 мг, около 65 мг, около 70 мг, около 75 мг, около 80 мг, около 85 мг, около 90 мг, около 95 мг, около 100 мг, около 105 мг, около 110 мг, около 115 мг, около 120 мг, около 125 мг, около 130 мг, около 135 мг, около 140 мг, около 145 мг, около 150 мг, около 155 мг, около 160 мг, около 165 мг, около 170 мг, около 175 мг, около 180 мг, около 185 мг, около 190 мг, около 195 мг, около 200 мг, около 205 мг, около 210 мг, около 215 мг, около 220 мг, около 225 мг, около 230 мг, около 235 мг, около 240 мг, около 245 мг, около 250 мг, около 255 мг, около 260 мг, около 265 мг, около 270 мг, около 275 мг, около 280 мг, около 285 мг, около 290 мг, около 295 мг, около 300 мг, около 305 мг, около 310 мг, около 315 мг, около 320 мг, около 325 мг, около 330 мг, около 335 мг, около 340 мг, около 345 мг, около 350 мг, около 355 мг, около 360 мг, около 365 мг, около 370 мг, около 375 мг, около 380 мг, около 385 мг, около 390 мг, около 395 мг, около 400 мг, около 405 мг, около 410 мг, около 415 мг, около 420 мг, около 425 мг, около 430 мг, около 435 мг, около 440 мг, около 445 мг, около 450 мг, около 455 мг, около 460 мг, около 465 мг, около 470 мг, около 475 мг, около 480 мг, около 485 мг, около 490 мг, около 495 мг, около 500 мг, около 505 мг, около 510 мг, около 515 мг, около 520 мг, около 525 мг, около 530 мг, около 535 мг, около 540 мг, около 545 мг, около 550 мг, около 555 мг, около 560 мг, около 565 мг, около 570 мг, около 575 мг, около 580 мг, около 585 мг, около 590 мг, около 595 мг, около 600 мг, около 605 мг, около 610 мг, около 615 мг, около 620 мг, около 625 мг, около 630 мг, около 635 мг, около 640 мг, около 645 мг, около 650 мг, около 655 мг, около 660 мг, около 665 мг, около 670 мг, около 675 мг, около 680 мг, около 685 мг, около 690 мг, около 695 мг, около 700 мг, около 705 мг, около 710 мг, около 715 мг, около 720 мг, около 725 мг, около 730 мг, около 735 мг, около 740 мг, около 745 мг, около 750 мг, около 755 мг, около 760 мг, около 765 мг, около 770 мг, около 775 мг, около 780 мг, около 785 мг, около 790 мг, около 795 мг, около 800 мг, около 805 мг, около 810 мг, около 815 мг, около 820 мг, около 825 мг, около 830 мг, около 835 мг, около 840 мг, около 845 мг, около 850 мг, около 855 мг, около 860 мг, около 865 мг, около 870 мг, около 875 мг, около 880 мг, около 885 мг, около 890 мг, около 895 мг, около 900 мг, около 905 мг, около 910 мг, около 915 мг, около 920 мг, около 925 мг, около 930 мг, около 935 мг, около 940 мг, около 945 мг, около 950 мг, около 955 мг, около 960 мг, около 965 мг, около 970 мг, около 975 мг, около 980 мг, около 985 мг, около 990 мг, около 995 мг, около 1000 мг, около 1100 мг, около 1200

В некоторых вариантах осуществления антитело анти-CD73 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в дозе 1500 мг 1 раз каждые 4 недели.

В некоторых вариантах осуществления предложенные способы включают введение первой дозы антитела анти-CD73 или его антигенсвязывающего фрагмента, как определено в данном документе, и второй дозы антитела анти-CD73 или его антигенсвязывающего фрагмента, при этом вторая доза превышает первую дозу (*m.e.* указанный способ включает повышение дозы антитела анти-CD73 или его антигенсвязывающего фрагмента, такого как ANTIBODY Y).

В некоторых вариантах осуществления указанный способ включает повышение дозы антитела анти-CD73 или его антигенсвязывающего фрагмента, когда антитело анти-CD73 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации с ингибитором A2A и/или A2B и/или в комбинации с ингибитором PD-1/PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления указанный способ включает повышение дозы антитела анти-CD73 или его антигенсвязывающего фрагмента, когда антитело анти-CD73 или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту в комбинации с ингибитором PD-1/PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления указанный способ включает повышение дозы ANTIBODY Y, когда указанное ANTIBODY Y вводят субъекту в комбинации с ингибитором A2A и/или A2B и/или в комбинации с ингибитором PD-1/PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления указанный способ включает повышение дозы ANTIBODY Y, когда указанное ANTIBODY Y вводят субъекту в комбинации с ингибитором PD-1/PD-L1.

Способы применения

Антитела анти-CD73 по настоящему изобретению могут модулировать активность CD73. Соответственно, антитела анти-CD73, описанные в данном документе, можно применять в способах ингибирования CD73 путем приведения в контакт CD73 с любым одним или большим количеством антител или их композиций, описанных в данном документе. Ингибиторы A2A и/или A2B по настоящему изобретению могут модулировать активность аденозинового рецептора A2A и/или A2B. Соответственно, ингибиторы аденозинового рецептора A2A и/или A2B, соли или стереоизомеры, описанные в данном документе, можно применять в способах ингибирования аденозинового рецептора A2A и/или A2B путем приведения в контакт указанного аденозинового рецептора A2A и/или A2B, соответственно с любым одним или большим количеством ингибиторов аденозинового рецептора A2A и/или A2B или их композициями, описанными в данном документе. Аналогично, ингибиторы PD-1/PD-L1 по настоящему изобретению могут модулировать активность PD-1/PD-L1. Соответственно, ингибиторы PD-1/PD-L1, соли или стереоизомеры, описанные в данном документе, можно применять в способах ингибирования PD-1/PD-L1 путем приведения в контакт PD-1/PD-L1, соответственно с любым одним или большим количеством ингибиторов PD-1/PD-L1 или их композициями, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления приведение в

контакт осуществляют *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления изобретение приведение в контакт осуществляют *ex vivo* или *in vitro*.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способам лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с CD73, аденозиновым рецептором A2A и/или A2B и/или PD-1/PD-L1, у индивидуума (например, пациента) путем введения индивидууму, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества или дозы одного или большего количества антител анти-CD73 по настоящему изобретению, или их фармацевтической композиции, терапевтически эффективного количества или дозы одного или большего количества ингибиторов аденозинового рецептора A2A и/или A2B по настоящему изобретению, или их фармацевтической композиции, и терапевтически эффективного количества одного или большего количества ингибиторов PD-1/PD-L1 по настоящему изобретению, или их фармацевтической композиции.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способам лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с CD73, и/или PD-1/PD-L1, у индивидуума (например, пациента) путем введения индивидууму, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества или дозы одного или большего количества антител анти-CD73 по настоящему изобретению, или их фармацевтической композиции, и терапевтически эффективного количества одного или большего количества ингибиторов PD-1/PD-L1 по настоящему изобретению, или их фармацевтической композиции.

Заболевание или нарушение, ассоциированное с CD73, может включать любое заболевание, нарушение или патологическое состояние, которое прямо или косвенно связано с экспрессией или активностью CD73, включая уровни сверхэкспрессии и/или аномальной активности. Заболевание или нарушение, ассоциированное с аденозиновым рецептором A2A и/или A2B, может включать в себя любое заболевание, нарушение или патологическое состояние, которое прямо или косвенно связано с экспрессией или активностью аденозинового рецептора A2A и/или A2B, включая уровни сверхэкспрессии и/или аномальной активности. Заболевание или нарушение, ассоциированное с PD-1/PD-L1, может включать любое заболевание, нарушение или патологическое состояние, которое прямо или косвенно связано с экспрессией или активностью PD-1/PD-L1, включая уровни сверхэкспрессии и/или аномальной активности.

Заболевание или нарушение, ассоциированное с CD73- и/или аденозиновым рецептором A2A и/или A2B, и/или PD-1/PD-L1, может включать любое заболевание, нарушение или патологическое состояние, которое прямо или косвенно связано с экспрессией или активностью CD73 и /или аденозинового рецептора A2A и/или A2B, и/или PD-1, и/или PD-L1, включая сверхэкспрессию и/или аномальные уровни активности CD73 и/или аденозинового рецептора A2A и/или A2B, и/или PD-1 и/или PD-L1.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способам лечения заболевания или нарушения (*например*, рака) у индивидуума (*например*, пациента) путем введения индивидууму, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества или дозы одного или большего количества антител анти-CD73 по настоящему изобретению

или их фармацевтической композиции, терапевтически эффективного количества или дозы одного или большего количества ингибиторов аденозинового рецептора A2A и/или A2B по настоящему изобретению, или их фармацевтической композиции, и терапевтически эффективного количества одного или большего количества ингибиторов PD-1/PD-L1 по настоящему изобретению, или их фармацевтической композиции, при этом заболевание или нарушение имеет высокую сигнатуру аденозина. В данной области известны способы определения того, что заболевание или нарушение имеет высокую сигнатуру аденозина. Например, анализ экспрессии генов в опухолевой ткани можно проводить с использованием определенной панели генов, чувствительных к аденозину.

Антитела анти-CD73, ингибиторы аденозинового рецептора A2A и/или A2B, а также ингибиторы PD-1/PD-L1 по настоящему изобретению могут действовать синергически, *например*, для лечения заболевания или нарушения, *например*, рака. Например, при двойном комбинированном лечении, антитела анти-CD73 и ингибиторы PD-1/PD-L1 по настоящему изобретению могут действовать синергически, *например*, для лечения заболевания или нарушения, *например*, рака. Соответственно, антитела анти-CD73, ингибиторы аденозинового рецептора A2A и/или A2B, а также ингибиторы PD-1/PD-L1, описанные в данном документе, можно применять в комбинации в способах ингибирования CD73, аденозинового рецептора A2A и/или A2B, и/или PD-1/PD-L1 путем приведения в контакт CD73 с любым одним или большим количеством антител анти-CD73 или их композициями, описанными в данном документе, путем приведения в контакт аденозинового рецептора A2A и/или A2B с любым одним или большим количеством ингибиторов аденозинового рецептора A2A и/или A2B или их композициями, описанными в данном документе, и путем приведения в контакт PD-1/PD-L1 с любым одним или большим количеством ингибиторов PD-1/PD-L1 или их композициями, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 и ингибиторы PD-1/PD-L1, описанные в данном документе, можно применять в комбинации в способах ингибирования CD73 и/или PD-1/PD-L1 путем приведения в контакт CD73 с любым одним или большим количеством антител анти-CD73, или их композициями, описанными в данном документе, и приведение в контакт PD-1/PD-L1 с любым одним или большим количеством ингибиторов PD-1/PD-L1, или их композициями, описанными в данном документе

Антитела анти-CD73, ингибиторы аденозинового рецептора A2A и/или A2B, а также ингибиторы PD-1/PD-L1 по настоящему изобретению применимы в комбинации для лечения заболеваний, связанных с активностью CD73 и/или аденозинового рецептора A2A и/или A2B, и/или PD-1/PD-L1, включая, например, рак, воспалительные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, нейродегенеративные заболевания, иммуномодулирующие нарушения, заболевания центральной нервной системы и диабет. Антитела анти-CD73 и ингибиторы PD-1/PD-L1 по настоящему изобретению применимы в комбинации для лечения заболеваний, связанных с активностью CD73 и/или PD-1/PD-L1, включая, например, рак, воспалительные заболевания, сердечно-сосудистые заболевания,

нейродегенеративные заболевания, иммуномодулирующие нарушения, заболевания центральной нервной системы и диабет.

Основываясь на важной роли CD73, аденозиновых рецепторов A2A и/или A2B и/или PD-1/PD-L1 во многих механизмах иммуносупрессии, комбинированная терапия может стимулировать иммунную систему для подавления прогрессирования опухоли. Антитела анти-CD73, ингибиторы аденозинового рецептора A2A и/или A2B, а также и ингибиторы PD-1/PD-L1 можно применять в комбинации для лечения, необязательно в дополнительной комбинации с другими видами терапии, рака мочевого пузыря, рака легких (*например*, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), метастазы в легкие), меланомы (*например*, метастатическая меланома), рака молочной железы (*например*, аденокарцинома молочной железы), рака шейки матки, рака яичников, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака предстательной железы, рака почки, рака кожи, рака щитовидной железы, рака печени (*например*, гепатоцеллюлярная карцинома), рака матки, рака головы и шеи (*например*, плоскоклеточная карцинома головы и шеи) и почечно-клеточной карциномы.

Примеры видов рака, которые поддаются лечению с помощью способов и схем лечения по настоящему изобретению, включают, помимо прочего, рак костей, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или интраокулярную злокачественную меланому, рак матки, рак яичников, рак прямой кишки, рак заднепроходной области, рак желудка, рак яичка, рак матки, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, рак эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рак пищевода, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак уретры, рак полового члена, хронические или острые лейкозы, включая острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфолейкоз, солидные опухоли детского возраста, лимфоцитарную лимфому, рак мочевого пузыря, рак почки или уретры, карциному почечной лоханки, новообразование центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, опухолевый ангиогенез, опухоль оси позвоночника, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, виды рака, вызванные окружающей средой, включая виды рака, вызванные асбестом, и комбинации указанных видов рака. Способы по настоящему изобретению также применимы для лечения метастатических раковых заболеваний, особенно метастатических раковых заболеваний, которые экспрессируют PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления раковые заболевания, поддающиеся лечению с помощью способов по настоящему изобретению, включают меланому (*например*, метастатическая злокачественная меланома), рак почек (*например*, светлоклеточная карцинома), рак предстательной железы (*например*, гормонорезистентная аденокарцинома предстательной железы), рак молочной железы (*например*, аденокарцинома молочной

железы), рак толстой кишки, рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого и мелкоклеточный рак легкого), плоскоклеточный рак головы и шеи, уротелиальный рак (например, мочевого пузыря) и рак с высокой микросателлитной нестабильностью (MSIhigh). Кроме того, раскрытие включает рефрактерные или рецидивирующие злокачественные новообразования, рост которых может быть подавлен с использованием способов раскрытия.

В некоторых вариантах осуществления раковые заболевания, поддающиеся лечению с помощью способов по настоящему изобретению, включают, помимо прочего, солидные опухоли (например, рак простаты, рак толстой кишки, рак пищевода, рак эндометрия, рак яичников, рак матки, рак почек, рак печени, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак молочной железы (*например*, аденокарцинома молочной железы), рак легкого, рак головы и шеи, рак щитовидной железы, глиобластома, саркому, рак мочевого пузыря и т. д.), гематологические раковые заболевания (например, лимфома, лейкоз, такой как острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелогенный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), хронический миелогенный лейкоз (CML), диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (DLBCL), лимфома мантийных клеток, неходжкинская лимфома (включая фолликулярную лимфому, включая рецидивирующую или рефрактерную NHL или рецидивирующую фолликулярную лимфому), лимфома Ходжкина или множественная миелома), а также комбинации указанных видов раковых заболеваний.

В некоторых вариантах осуществления раковые заболевания, поддающиеся лечению с помощью способов по настоящему изобретению, включают, помимо прочего, холангиокарциному, рак желчных протоков, тройное отрицательное рак молочной железы, рабдомиосаркому, мелкоклеточный рак легких, лейомиосаркому, гепатоцеллюлярную карциному, саркому Юинга, рак мозга, опухоль головного мозга, астроцитому, нейробластома, нейрофибром, базальноклеточную карциному, хондросаркому, эпителиоидную саркому, рак глаза, рак маточных труб, рак желудочно-кишечного тракта, стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта, лейкемию волосатых клеток, рак кишечника, рак островковых клеток, рак ротовой полости, рак горла, рак гортани, рак губы, мезотелиому, рак шеи, рак полости носа, рак глаза, меланому глаза, рак таза, рак прямой кишки, почечно-клеточную карциному, рак слюнной железы, рак синуса, рак позвоночника, рак языка, канальцевую карциному, рак уретры и рак мочеочника.

В некоторых вариантах осуществления рак выбирают из рака легкого (например, немелкоклеточный рак легкого), меланомы, рака поджелудочной железы, рака молочной железы (*например*, аденокарцинома молочной железы), рака предстательной железы, рака печени, рака толстой кишки, рака эндометрия, рака мочевого пузыря, рака кожи, рака матки, рака яичников, рака головы или шеи, рака щитовидной железы, рака почек, рака желудка и саркомы. В некоторых вариантах осуществления рак выбирают из острого лимфобластного лейкоза, острого миелогенного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелогенного лейкоза, диффузной крупноклеточной В-клеточной

лимфомы, мантийно-клеточной лимфомы, неходжкинской лимфомы, лимфомы Ходжкина, множественной миеломы, истинной полицитемии, эссенциальной тромбоцитемии, хронического миелогенного лейкоза, миелофиброза, первичного миелофиброза, истинной постполицитемии/эссенциального тромбоцитемического миелофиброза, постэссенциального тромбоцитемического миелофиброза и постполицитемического истинного миелофиброза. В некоторых вариантах осуществления рак выбирают из меланомы, рака эндометрия, рака легкого, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы, рака мочевого пузыря, рака молочной железы (*например*, аденокарцинома молочной железы) и рака поджелудочной железы.

В некоторых вариантах осуществления рак выбирают из рака мочевого пузыря, рака легкого (*например*, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), мелкоклеточный рак легкого или метастазы в легкие), меланомы (*например*, метастатическая меланома), рака молочной железы (*например*, аденокарцинома молочной железы), рака шейки матки, рака яичников, рака толстой кишки, рака прямой кишки, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака пищевода, рака предстательной железы, рака почки, рака кожи, рака щитовидной железы, рака печени, рака матки, рака головы и шеи, почечно-клеточной карциномы, рака эндометрия, рака анального канала, холангиокарциномы, рака ротовой полости, немеланомного рака кожи и карциномы из клеток Меркеля.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рак простаты представляет собой метастатическую кастрационно-резистентную карциному предстательной железы (mCRPC).

В некоторых вариантах осуществления колоректальный рак представляет собой колоректальную карциному (CRC).

В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение представляет собой рак легкого (*например*, немелкоклеточный рак легкого), меланому, рак поджелудочной железы, рак молочной железы (*например*, аденокарцинома молочной железы), плоскоклеточный рак головы и шеи, рак предстательной железы, рак печени, рак толстой кишки, рак эндометрия, рак мочевого пузыря, рак кожи, рак матки, рак почки, рак желудка или саркому. В некоторых вариантах осуществления саркома представляет собой опухоль Аскина, гроздевидную саркому, хондросаркому, саркому Юинга, злокачественную гемангиоэндотелиому, злокачественную шванному, остеосаркому, альвеолярную мягкотканную саркому, ангиосаркому, филлоидную кистосаркому, взрывающую дерматофибросаркому, десмоидную опухоль, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, эпителиоидную саркому, внескелетную хондросаркому, внескелетную остеосаркому, фибросаркому, гастроинтестинальную стромальную опухоль (GIST), гемангиоперицитому, гемангиосаркому, саркому Капоши, лейомиосаркому, липосаркому, лимфангиосаркому, лимфосаркому, злокачественную опухоль периферических нервных оболочек (MPNST), нейрофибросаркому, рабдомиосаркому, синовиальную саркому или недифференцированную плеоморфную саркому.

В некоторых вариантах реализации заболевание или нарушение представляет собой

рак головы и шеи (*например*, плоскоклеточная карцинома головы и шеи), колоректальный рак, рак легкого (*например*, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC)), меланому, рак яичников, мочевого пузыря, печени рак (*например*, *гепатоцеллюлярная карцинома*) или почечно-клеточную карциному.

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

MDSC (клетки-супрессоры миелоидного происхождения) представляют собой гетерогенную группу иммунных клеток миелоидной линии (семейство клеток, происходящих из стволовых клеток костного мозга). MDSC сильно размножаются при патологических состояниях, таких как хронические инфекции и рак, в результате измененного кроветворения. MDSC отличаются от других типов миелоидных клеток, в которых они обладают сильной иммуносупрессивной активностью, а не иммуностимулирующими свойствами. Подобно другим миелоидным клеткам, MDSC взаимодействуют с другими типами иммунных клеток, включая Т-клетки, дендритные клетки, макрофаги и естественные клетки-киллеры, чтобы регулировать их функции. В некоторых вариантах осуществления соединения и т. д., описанные в данном документе, можно применять в способах, связанных с раковой тканью (*например*, опухолями) с высокой инфильтрацией MDSC, включая солидные опухоли с высоким базальным уровнем инфильтрации макрофагами и/или MDSC. В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия, описанная в данном документе, может применяться в способах, связанных с раковой тканью (*например*, опухолями) с опухолью или опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами (TIL), которые экспрессируют PD-1 или PD-L1.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак шеи и головы, рак легкого, рак яичников, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, рак желудка, рак желудочно-пищеводного тракта (*например*, рак желудочно-пищеводного соединения), рак анального канала, рак печени или рак поджелудочной железы.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак шеи и головы, рак легкого, рак яичников, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, колоректальный рак или рак поджелудочной железы.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой плоскоклеточную карциному шеи и головы (SCCNH), немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак яичников, кастрационно-резистентный рак предстательной железы (CRPC), трижды негативный рак молочной железы (TNBC), рак мочевого пузыря, метастатический колоректальный рак (mCRC), аденокарциному протоков поджелудочной железы (PDAC), рак желудка/желудочно-пищеводного соединения (GEJ), гепатоцеллюлярную карциному (HCC) или плоскоклеточную карциному анального канала (SCAC).

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой плоскоклеточную

карциному шеи и головы (SCCNH), немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак яичников, кастрационно-резистентный рак предстательной железы (CRPC), трижды негативный рак молочной железы (TNBC), рак мочевого пузыря, метастатический колоректальный рак (mCRC) или рак поджелудочной железы.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC), немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), колоректальный рак (например, рак толстой кишки), меланому, рак яичников, рак мочевого пузыря, почечно-клеточную карциному, рак печени или гепатоцеллюлярную карциному.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак шеи и головы.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой плоскоклеточную карциному шеи и головы (SCCNH).

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак легкого.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC).

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак яичников.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой кастрационно-резистентный рак предстательной железы (CRPC).

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой трижды негативный рак молочной железы (TNBC).

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак мочевого пузыря.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой колоректальный рак.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой метастатический колоректальный рак (mCRC).

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак поджелудочной железы.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак желудка.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гастрозофагеальный рак.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак желудочно-пищеводного соединения (GEJ).

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гепатоцеллюлярную карциному (HCC).

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой аденокарциному протоков поджелудочной железы (PDAC).

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой плоскоклеточную карциному анального канала (SCAC).

В некоторых вариантах осуществления рак выбирают из рака мочевого пузыря, рака молочной железы (*например*, аденокарцинома молочной железы), рака шейки матки, рака толстой кишки, рака прямой кишки, колоректального рака, рака анального канала, рака эндометрия, рака почки, рака ротовой полости, рака головы и шеи, рака печени, меланомы, мезотелиомы, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, немеланомного рака кожи, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, саркомы, рака щитовидной железы, почечно-клеточной карциномы и карциномы из клеток Меркеля.

В некоторых вариантах осуществления рак выбирают из рака мочевого пузыря, рака молочной железы (*например*, аденокарцинома молочной железы), рака шейки матки, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака анального канала, рака эндометрия, рака почки, рака ротовой полости, рака головы и шеи, рака печени, меланомы, мезотелиомы, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, немеланомного рака кожи, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, саркомы, рака щитовидной железы и карциномы из клеток Меркеля.

В некоторых вариантах осуществления рак выбирают из меланомы, рака эндометрия, рака легких, рака почки, рака мочевого пузыря, рака молочной железы (*например*, аденокарцинома молочной железы), рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, рака головы и шеи, колоректального рака, рака яичников, рака печени или почечно-клеточной карциномы.

В некоторых вариантах осуществления рак выбирают из рака, выбранного из меланомы, рака эндометрия, рака легкого, рака почки, рака мочевого пузыря, рака молочной железы (*например*, аденокарцинома молочной железы), рака поджелудочной железы и рака толстой кишки.

В некоторых вариантах осуществления рак выбирают из рака эндометрия, рака анального канала и холангиокарциномы.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой опухоль, которая демонстрирует высокие уровни аденозина в микроокружении опухоли. Эти опухоли могут быть обогащены сигнатурой экспрессии генов или обогащены высокими уровнями экспрессии CD73 и/или других щелочных фосфатаз, включая неспецифическую для тканей щелочную фосфатазу (т.е. TNAP и PAP).

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак толстой кишки. В некоторых вариантах рак представляет собой меланому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак эндометрия. В некоторых вариантах осуществления рак эндометрия - представляет собой эндометриоидную аденокарциному. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак легкого. В некоторых вариантах осуществления рак легкого выбирают из немелкоклеточного рака легкого и мелкоклеточного рака легкого. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой почечно-клеточную карциному. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой уротелиальную карциному. В некоторых вариантах осуществления рак

представляет собой рак мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак молочной железы представляет собой аденокарциному молочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак молочной железы представляет собой трижды негативный рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак поджелудочной железы представляет собой аденокарциному протоков поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой саркому. В некоторых вариантах осуществления саркому выбирают из опухолей, представляющих опухоль Аскина, гроздевидную саркому, хондросаркому, саркому Юинга, злокачественную гемангиоэндотелиому, злокачественную шванному, остеосаркому, альвеолярную мягкотканную саркому, ангиосаркому, филлоидную кистосаркому, взрывающую дерматофибросаркому, десмоидную опухоль, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, эпителиоидную саркому, внескелетную хондросаркому, внескелетную остеосаркому, фибросаркому, гастроинтестинальную стромальную опухоль (GIST), гемангиоперицитому, гемангиосаркому, саркому Капоши, лейомиосаркому, липосаркому, лимфангиосаркому, лимфосаркому, злокачественную опухоль периферических нервных оболочек (MPNST), нейрофибросаркому, рабдомиосаркому, синовиальную саркому и недифференцированную плеоморфную саркому.

В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73, ингибиторы аденозинового рецептора A2A и/или A2B, а также ингибиторы PD-1/PD-L1 согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации для лечения воспаления легких, включая индуцированный блеомицином легочный фиброз и поражение, связанное с дефицитом аденозиндезаминазы. В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 и ингибиторы PD-1/PD-L1 согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации для лечения воспаления легких, включая индуцированный блеомицином легочный фиброз и поражение, связанное с дефицитом аденозиндезаминазы.

В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73, ингибиторы аденозинового рецептора A2A и/или A2B, а также ингибиторы PD-1/PD-L1 согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации для лечения воспалительного заболевания, такого как аллергические реакции (*например*, аллергические реакции, зависящие от CD73 и/или аденозинового рецептора A2A и/или A2B, и/или PD-1/PD-L1) и другие иммунные реакции, связанные с CD73 и/или аденозиновым рецептором A2A и/или A2B, и/или PD-1/PD-L1. Другие воспалительные заболевания, которые можно лечить с помощью комбинации антител анти-CD73, ингибиторов аденозинового рецептора A2A и/или A2B, а также ингибиторов PD-1/PD-L1 согласно настоящему изобретению, включают респираторные нарушения, сепсис, реперфузионное поражение и тромбоз.

В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 и ингибиторы PD-1/PD-L1 согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации для лечения воспалительного заболевания, такого как аллергические реакции (*например*, аллергические

реакции, зависящие от CD73 и/или PD-1/PD-L1) и другие иммунные реакции, связанные с CD73 и/или PD-1/PD-L1. Другие воспалительные заболевания, которые можно лечить с помощью комбинации антител анти-CD73 и ингибиторов PD-1/PD-L1 согласно настоящему изобретению, включают респираторные нарушения, сепсис, реперфузионное поражение и тромбоз.

В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73, ингибиторы аденозинового рецептора A2A и/или A2B, а также ингибиторы PD-1/PD-L1 согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца (инфаркт миокарда, стенокардия, сердечная недостаточность), цереброваскулярное заболевание (инсульт, транзиторная ишемическая атака), заболевание периферических артерий и атеросклероз аорты и аневризма. Атеросклероз является основным этиологическим фактором многих типов сердечно-сосудистых заболеваний. Атеросклероз начинается в подростковом возрасте с липидных полосок, которые в зрелом возрасте прогрессируют до бляшек и, наконец, развиваются тромботические явления, которые вызывают закупорку сосудов, что приводит к клинически значимой заболеваемости и смертности.

В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73, а также ингибиторы PD-1/PD-L1 согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца (инфаркт миокарда, стенокардия, сердечная недостаточность), цереброваскулярное заболевание (инсульт, транзиторная ишемическая атака), заболевание периферических артерий и атеросклероз аорты и аневризма. Атеросклероз является основным этиологическим фактором многих типов сердечно-сосудистых заболеваний. Атеросклероз начинается в подростковом возрасте с липидных полосок, которые в зрелом возрасте прогрессируют до бляшек и, наконец, развиваются тромботические явления, которые вызывают закупорку сосудов, что приводит к клинически значимой заболеваемости и смертности.

В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73, ингибиторы аденозинового рецептора A2A и/или A2B, а также ингибиторы PD-1/PD-L1 согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации для лечения нарушений двигательной активности; дефицита, вызванного дегенерацией стриатонигральной дофаминовой системы; болезни Паркинсона; и некоторых мотивационных симптомов депрессии.

В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 и ингибиторы PD-1/PD-L1 согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации для лечения нарушений двигательной активности; дефицита, вызванного дегенерацией стриатонигральной дофаминовой системы; болезни Паркинсона; и некоторых мотивационных симптомов депрессии.

В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73, ингибиторы аденозинового рецептора A2A и/или A2B, а также ингибиторы PD-1/PD-L1 согласно

настоящему изобретению можно применять в комбинации для лечения диабета и связанных с ним нарушений, таких как резистентность к инсулину. Диабет влияет на продукцию аденозина и экспрессию аденозиновых рецепторов A2B (A2BR), которые стимулируют продукцию IL-6 и CRP, резистентность к инсулину и связь между однонуклеотидными полиморфизмами гена A2BR (ADORA2B SNP) и воспалительными маркерами. Повышенная передача сигналов A2BR при диабете может частично повышать резистентность к инсулину за счет повышения уровня провоспалительных медиаторов. Селективные ингибиторы CD73 могут быть полезны для лечения резистентности к инсулину.

В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73 и ингибиторы PD-1/PD-L1 согласно настоящему изобретению можно применять в комбинации для лечения диабета и связанных с ним нарушений, таких как резистентность к инсулину.

В некоторых вариантах осуществления настоящей заявки дополнительно предлагается способ лечения рака, выбранного из рака мочевого пузыря, рака молочной железы (*например*, аденокарцинома молочной железы), рака шейки матки, рака толстой кишки, рака прямой кишки, колоректального рака, рака анального канала, рака эндометрия, рака почки, рака ротовой полости, рака головы и шеи, рака печени, меланомы, мезотелиомы, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, немеланомного рака кожи, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, саркомы, рака щитовидной железы, почечно-клеточной карциномы и карциномы из клеток Меркеля у субъекта, включающий введение указанному субъекту следующих агентов:

(i) ингибитор A2A/A2B, который представляет собой 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль;

(ii) ингибитор PD-1/PD-L1, который представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с PD-1 человека, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность SYWMN (SEQ ID NO: 6);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность VHPDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO: 7); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность EHYGTSPFAY (SEQ ID NO: 8); и

при этом антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность RASESVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO: 9);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AASNQGS (SEQ ID NO:

10); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSKEVPYТ (SEQ ID NO:11); и

(iii) антитело, которое связывается с CD73 человека, при этом антитело, которое связывается с CD73 человека:

(а) содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO:16);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO:17); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFDY (SEQ ID NO:18); и

содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO:19);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO:20); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO:21);

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

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

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

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

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

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

при этом антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL, при этом:

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

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

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

(e) связывается с CD73 человека в эпитопе в пределах аминокислот 386-399 и 470-

489 SEQ ID NO:70;

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

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

В некоторых вариантах осуществления настоящей заявки предлагается способ лечения рака молочной железы (*например*, аденокарциномы молочной железы) у субъекта, включающий введение указанному субъекту следующих агентов:

(i) ингибитор A2A/A2B, который представляет собой 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль;

(ii) ингибитор PD-1/PD-L1, который представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с PD-1 человека, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность SYWMN (SEQ ID NO:6);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность VHPDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO: 7); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность EHYGTSPFAY (SEQ ID NO: 8); и

при этом антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность RASEVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO: 9);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AASNQGS (SEQ ID NO: 10); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSKEVPYT (SEQ ID NO:11); и

(iii) антитело, которое связывается с CD73 человека, при этом антитело, которое связывается с CD73 человека:

(a) содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO:16);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID

NO:17); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFDY (SEQ ID NO:18); и

содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO:19);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO:20); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO:21);

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

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

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

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

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

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

при этом антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL, при этом:

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

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

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления настоящей заявки дополнительно

предлагается способ лечения рака, выбранного из рака мочевого пузыря, рака молочной железы (*например*, аденокарцинома молочной железы), рака шейки матки, рака толстой кишки, рака прямой кишки, колоректального рака, рака анального канала, рака эндометрия, рака почки, рака ротовой полости, рака головы и шеи, рака печени, меланомы, мезотелиомы, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, немеланомного рака кожи, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, саркомы, рака щитовидной железы, почечно-клеточной карциномы и карциномы из клеток Меркеля у субъекта, включающий введение указанному субъекту следующих агентов:

- (i) ингибитор A2A/A2B, который представляет собой 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль;
- (ii) ингибитор PD-1/PD-L1, который представляет собой ретифанлимаб; и
- (iii) антитело, которое связывается с CD73 человека и представляет собой ANTIBODY Y.

В некоторых вариантах осуществления настоящей заявки предлагается способ лечения рака молочной железы (*например*, аденокарциномы молочной железы) у субъекта, включающий введение указанному субъекту следующих агентов:

- (i) ингибитор A2A/A2B, который представляет собой 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль;
- (ii) ингибитор PD-1/PD-L1, который представляет собой ретифанлимаб; и
- (iii) антитело, которое связывается с CD73 человека и представляет собой ANTIBODY Y.

В некоторых вариантах осуществления настоящей заявки дополнительно предлагается способ лечения рака, выбранного из рака мочевого пузыря, рака молочной железы (*например*, аденокарцинома молочной железы), рака шейки матки, рака толстой кишки, рака прямой кишки, колоректального рака, рака анального канала, рака эндометрия, рака почки, рака ротовой полости, рака головы и шеи, рака печени, меланомы, мезотелиомы, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, немеланомного рака кожи, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, саркомы, рака щитовидной железы, почечно-клеточной карциномы и карциномы из клеток Меркеля у субъекта, включающий введение указанному субъекту следующих агентов:

- (i) ингибитор A2A/A2B, который представляет собой 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль;
- (ii) ингибитор PD-1/PD-L1, который представляет собой (R)-1-((7-циано-2-(3'-(3-(((R)-3-гидроксипирролидин-1-ил)метил)-1,7-нафтиридин-8-иламино)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновую кислоту или

ее фармацевтически приемлемую соль; и

(iii) антитело, которое связывается с CD73 человека, при этом антитело, которое связывается с CD73 человека:

(a) содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO:16);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO:17); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFDY (SEQ ID NO:18); и

содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO:19);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO:20); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO:21);

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

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

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

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

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

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

при этом антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL, при этом:

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

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

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

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

(f) связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с

антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31; или

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

В некоторых вариантах осуществления настоящей заявки предлагается способ лечения рака молочной железы (*например*, аденокарциномы молочной железы) у субъекта, включающий введение указанному субъекту следующих агентов:

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

(ii) ингибитор PD-1/PD-L1, который представляет собой (*R*)-1-((7-циано-2-(3'-(3-(((*R*)-3-гидроксипирролидин-1-ил)метил)-1,7-нафтиридин-8-иламино)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[*d*]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновую кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль; и

(iii) антитело, которое связывается с CD73 человека, при этом антитело, которое связывается с CD73 человека:

(а) содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO:16);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO:17); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFDY (SEQ ID NO:18); и

содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO:19);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO:20); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYТ (SEQ ID NO:21);

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

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

(d) содержит домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:
CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GFTFSSYD (SEQ ID NO:34);

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

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

при этом антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL, при этом:

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

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

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления настоящей заявки дополнительно предлагается способ лечения рака, выбранного из рака мочевого пузыря, рака молочной железы (*например*, аденокарцинома молочной железы), рака шейки матки, рака толстой кишки, рака прямой кишки, колоректального рака, рака анального канала, рака эндометрия, рака почки, рака ротовой полости, рака головы и шеи, рака печени, меланомы, мезотелиомы, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, немеланомного рака кожи, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, саркомы, рака щитовидной железы, почечно-клеточной карциномы и карциномы из клеток Меркеля у субъекта, включающий введение указанному субъекту следующих агентов:

(i) ингибитор A2A/A2B, который представляет собой 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль;

(ii) ингибитор PD-1/PD-L1, который представляет собой (R)-1-((7-циано-2-(3'-(3-(((R)-3-гидроксипирролидин-1-ил)метил)-1,7-нафтиридин-8-иламино)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновую кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль; и

(iii) антитело, которое связывается с CD73 человека и представляет собой ANTIBODY Y.

В некоторых вариантах осуществления настоящей заявки предлагается способ лечения рака молочной железы (*например*, аденокарциномы молочной железы) у субъекта, включающий введение указанному субъекту следующих агентов:

(i) ингибитор A2A/A2B, который представляет собой 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазин-6-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль;

(ii) ингибитор PD-1/PD-L1, который представляет собой (R)-1-((7-циано-2-(3'-(3-(((R)-3-гидроксипирролидин-1-ил)метил)-1,7-нафтиридин-8-иламино)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновую кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль; и

(iii) антитело, которое связывается с CD73 человека и представляет собой ANTIBODY Y.

В некоторых вариантах осуществления настоящей заявки дополнительно предлагается способ лечения рака, выбранного из рака шеи и головы, рака легких, рака яичников, рака предстательной железы, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака, рака желудка, рака желудочно-пищеводного соединения, рака анального канала, рака печени или рака поджелудочной железы, у субъекта, включающий введение указанному субъекту следующих агентов:

(i) ингибитор PD-1/PD-L1, который представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с PD-1 человека, при этом указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность SYWMN (SEQ ID NO:6);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность VIHPDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO: 7); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность EHYGTSPFAY (SEQ ID NO: 8); и

при этом антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность RASESVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO: 9);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AASNQGS (SEQ ID NO: 10); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSKEVPYT (SEQ ID NO:11); и

(ii) антитело, которое связывается с CD73 человека, при этом антитело, которое связывается с CD73 человека:

(a) содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO:16);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO:17); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFY (SEQ ID NO:18); и

содержит вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO:19);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO:20); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO:21);

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

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

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

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

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

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

при этом антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL, при этом:

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

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

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления настоящей заявки предлагается способ лечения рака, выбранного из плоскоклеточной карциномы шеи и головы (SCCNH), немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака яичников, кастрационно-резистентного рака предстательной железы (CRPC), трижды негативного рака молочной железы (TNBC), рака мочевого пузыря, метастатического колоректального рака (mCRC), аденокарциномы протоков поджелудочной железы (PDAC), рака желудка-пищеводного соединения (GEJ), гепатоцеллюлярной карциномы (HCC) или плоскоклеточной карциномы анального канала (SCAC), у субъекта, включающий введение указанному субъекту следующих агентов:

(i) ингибитор PD-1/PD-L1, который представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с PD-1 человека, при этом указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность SYWMN (SEQ ID NO:6);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность VIHPSDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO: 7); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность EHYGTSPFAY (SEQ ID NO: 8); и

при этом антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность RASESVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO: 9);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AASNQGS (SEQ ID NO: 10); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSKEVPYT (SEQ ID NO:11); и

(ii) антитело, которое связывается с CD73 человека, при этом антитело, которое связывается с CD73 человека:

(a) содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO:16);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO:17); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFDY (SEQ ID NO:18); и

содержит вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO:19);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO:20); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO:21);

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

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

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

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

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

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

при этом антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL, при этом:

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

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

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления настоящей заявки дополнительно предлагается способ лечения рака, выбранного из рака шеи и головы, рака легких, рака яичников, рака предстательной железы, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака, рака желудка, рака желудочно-пищеводного соединения, рака

анального канала, рака печени и рака поджелудочной железы, у субъекта, включающий введение указанному субъекту следующих агентов:

- (i) ингибитор PD-1/PD-L1, который представляет собой ретифанлимаб; и
- (ii) антитело, которое связывается с CD73 человека и представляет собой ANTIBODY Y.

В некоторых вариантах осуществления настоящей заявки предлагается способ лечения рака, выбранного из плоскоклеточной карциномы шеи и головы (SCCNH), немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака яичников, кастрационно-резистентного рака предстательной железы (CRPC), трижды негативного рака молочной железы (TNBC), рака мочевого пузыря, метастатического колоректального рака (mCRC) и рака поджелудочной железы, у субъекта, включающий введение указанному субъекту следующих агентов:

- (i) ингибитор PD-1/PD-L1, который представляет собой ретифанлимаб; и
- (ii) антитело, которое связывается с CD73 человека и представляет собой ANTIBODY Y.

В некоторых вариантах осуществления настоящей заявки дополнительно предлагается способ лечения рака, выбранного из рака шеи и головы, рака легких, рака яичников, рака предстательной железы, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака и рака поджелудочной железы, у субъекта, включающий введение указанному субъекту следующих агентов:

- (i) ингибитор PD-1/PD-L1, который представляет собой (R)-1-((7-циано-2-(3'-(3-(((R)-3-гидроксипирролидин-1-ил)метил)-1,7-нафтиридин-8-иламино)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновую кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль; и

- (ii) антитело, которое связывается с CD73 человека, при этом антитело, которое связывается с CD73 человека:

(a) содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO:16);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO:17); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFY (SEQ ID NO:18); и

содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO:19);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO:20); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID

NO:21);

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

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

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

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

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

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

при этом антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL, при этом:

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

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

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления настоящей заявки предлагается способ лечения рака, выбранного из плоскоклеточной карциномы шеи и головы (SCCNH), немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака яичников, кастрационно-резистентного рака предстательной железы (CRPC), трижды негативного рака молочной железы (TNBC), рака мочевого пузыря, метастатического колоректального рака (mCRC), аденокарциномы протоков поджелудочной железы (PDAC), рака желудочно-пищеводного соединения (GEJ), гепатоцеллюлярной карциномы (HCC) или плоскоклеточной карциномы анального канала (SCAC), у субъекта, включающий введение указанному субъекту следующих агентов:

(i) ингибитор PD-1/PD-L1, который представляет собой (R)-1-((7-циано-2-(3'-(3-(((R)-3-гидроксипирролидин-1-ил)метил)-1,7-нафтиридин-8-иламино)-2,2'-

диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновую кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль; и

(ii) антитело, которое связывается с CD73 человека, при этом антитело, которое связывается с CD73 человека:

(a) содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO:16);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO:17); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFY (SEQ ID NO:18); и

содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO:19);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO:20); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO:21);

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

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

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

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

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

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

при этом антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL, при этом:

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

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

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

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

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

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

В некоторых вариантах осуществления настоящей заявки дополнительно предлагается способ лечения рака, выбранного из рака шеи и головы, рака легких, рака яичников, рака предстательной железы, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака, рака желудка, рака желудочно-пищеводного соединения, рака анального канала, рака печени и рака поджелудочной железы, у субъекта, включающий введение указанному субъекту следующих агентов:

(i) ингибитор PD-1/PD-L1, который представляет собой (R)-1-((7-циано-2-(3'-(3-(((R)-3-гидроксипирролидин-1-ил)метил)-1,7-нафтиридин-8-иламино)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновую кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль; и

(ii) антитело, которое связывается с CD73 человека и представляет собой ANTIBODY Y.

В некоторых вариантах осуществления настоящей заявки предлагается способ лечения рака, выбранного из плоскоклеточной карциномы шеи и головы (SCCNH), немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака яичников, кастрационно-резистентного рака предстательной железы (CRPC), трижды негативного рака молочной железы (TNBC), рака мочевого пузыря, метастатического колоректального рака (mCRC), аденокарциномы протоков поджелудочной железы (PDAC), рака желудочно-пищеводного соединения (GEJ), гепатоцеллюлярной карциномы (HCC) или плоскоклеточной карциномы анального канала (SCAC), у субъекта, включающий введение указанному субъекту следующих агентов:

(i) ингибитор PD-1/PD-L1, который представляет собой (R)-1-((7-циано-2-(3'-(3-(((R)-3-гидроксипирролидин-1-ил)метил)-1,7-нафтиридин-8-иламино)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновую кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль; и

(ii) антитело, которое связывается с CD73 человека и представляет собой ANTIBODY Y.

В некоторых вариантах осуществления введения ингибитора PD-1/PD-L1 и антитела, которое связывается с CD73 человека, рак представляет собой рак шеи и головы, рак легкого, рак яичников, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, колоректальный рак или рак поджелудочной железы.

В некоторых вариантах осуществления введения ингибитора PD-1/PD-L1 и антитела, которое связывается с CD73 человека, рак представляет собой плоскоклеточную

карциному головы и шеи (HNSCC), немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), колоректальный рак, меланому, рак яичников, рак мочевого пузыря, почечно-клеточную карциному или гепатоцеллюлярную карциному.

В некоторых вариантах осуществления введения ингибитора PD-1/PD-L1 и антитела, которое связывается с CD73 человека, рак представляет собой рак шеи и головы.

В некоторых вариантах осуществления введения ингибитора PD-1/PD-L1 и антитела, которое связывается с CD73 человека, рак представляет собой плоскоклеточную карциному шеи и головы (SCCNH).

В некоторых вариантах осуществления введения ингибитора PD-1/PD-L1 и антитела, которое связывается с CD73 человека, рак представляет собой рак легкого.

В некоторых вариантах осуществления введения ингибитора PD-1/PD-L1 и антитела, которое связывается с CD73 человека, рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC).

В некоторых вариантах осуществления введения ингибитора PD-1/PD-L1 и антитела, которое связывается с CD73 человека, рак представляет собой рак яичников.

В некоторых вариантах осуществления введения ингибитора PD-1/PD-L1 и антитела, которое связывается с CD73 человека, рак представляет собой рак предстательной железы.

В некоторых вариантах осуществления введения ингибитора PD-1/PD-L1 и антитела, которое связывается с CD73 человека, рак представляет собой кастрационно-резистентный рак предстательной железы (CRPC).

В некоторых вариантах осуществления введения ингибитора PD-1/PD-L1 и антитела, которое связывается с CD73 человека, рак представляет собой рак молочной железы.

В некоторых вариантах осуществления введения ингибитора PD-1/PD-L1 и антитела, которое связывается с CD73 человека, рак представляет собой трижды негативный рак молочной железы (TNBC).

В некоторых вариантах осуществления введения ингибитора PD-1/PD-L1 и антитела, которое связывается с CD73 человека, рак представляет собой рак мочевого пузыря.

В некоторых вариантах осуществления введения ингибитора PD-1/PD-L1 и антитела, которое связывается с CD73 человека, рак представляет собой колоректальный рак.

В некоторых вариантах осуществления введения ингибитора PD-1/PD-L1 и антитела, которое связывается с CD73 человека, рак представляет собой метастатический колоректальный рак (mCRC).

В некоторых вариантах осуществления введения ингибитора PD-1/PD-L1 и антитела, которое связывается с CD73 человека, рак представляет собой рак поджелудочной железы.

В некоторых вариантах осуществления введения ингибитора PD-1/PD-L1 и

антитела, которое связывается с CD73 человека, рак представляет собой рак желудка.

В некоторых вариантах осуществления введения ингибитора PD-1/PD-L1 и антитела, которое связывается с CD73 человека, рак представляет собой гастроэзофагеальный рак.

В некоторых вариантах осуществления введения ингибитора PD-1/PD-L1 и антитела, которое связывается с CD73 человека, рак представляет собой рак желудочно-пищеводного соединения (GEJ).

В некоторых вариантах осуществления введения ингибитора PD-1/PD-L1 и антитела, которое связывается с CD73 человека, рак представляет собой гепатоцеллюлярную карциному (HCC).

В некоторых вариантах осуществления введения ингибитора PD-1/PD-L1 и антитела, которое связывается с CD73 человека, рак представляет собой аденокарциному протоков поджелудочной железы (PDAC).

В некоторых вариантах осуществления введения ингибитора PD-1/PD-L1 и антитела, которое связывается с CD73 человека, рак представляет собой плоскоклеточную карциному анального канала (SCAC).

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

Термины «индивидуум» или «пациент» или «субъект», применяемые взаимозаменяемо, относятся к любому животному, включая млекопитающих, предпочтительно мышам, крысам, другим грызунам, кроликам, собакам, котам, свиньям, крупному рогатому скоту, овцам, лошадям или приматам и наиболее предпочтительно людям (т.е. к субъекту-человеку).

В контексте данного документа фраза «терапевтически эффективное количество» относится к количеству активного соединения или фармацевтического агента, которое вызывает биологический или лекарственный ответ, который требуется в ткани, системе, животном, индивидууме или человеке исследователем, ветеринаром, врачом или другим клиницистом.

В контексте данного документа термин «лечение» относится к одному или большему количеству из (1) ингибирования заболевания; например, ингибирования заболевания, патологического состояния или нарушения у индивидуума, который испытывает или демонстрирует патологию или симптоматику заболевания, патологического состояния или нарушения (т.е. прекращение дальнейшего развития патологии и/или симптоматики); и (2) ослабления заболевания; например, ослабления заболевания, патологического состояния или нарушения у индивидуума, который

испытывает или демонстрирует патологию или симптоматику заболевания, патологического состояния или нарушения (т.е. обратное развитие патологии и/или симптоматики), такого как уменьшение тяжести заболевания.

В контексте данного документа под термином «введение дозы 1 раз в день» понимают дозу, вводимую субъекту один раз в день. Под термином «введение дозы через день» понимают дозу, вводимую субъекту один раз каждый второй день. Под термином «введение дозы 1 раз в неделю» понимают дозу, вводимую субъекту один раз в неделю. Под термином «введение дозы 1 раз в две недели» понимают дозу, вводимую субъекту один раз в две недели. Под термином «введение дозы 1 раз в три недели» понимают дозу, вводимую субъекту один раз в три недели. Под термином «введение дозы 1 раз в четыре недели» понимают дозу, вводимую субъекту один раз в четыре недели.

В некоторых вариантах осуществления антитела анти-CD73, ингибиторы аденозинового рецептора A2A и/или A2B, а также ингибиторы PD-1/PD-L1 по настоящему изобретению являются пригодными в комбинации для предотвращения или снижения риска развития любого из заболеваний, упомянутых в данном документе; например, предотвращения или снижения риска развития заболевания, патологического состояния или нарушения у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, патологическому состоянию или нарушению, но еще не испытывает или не демонстрирует патологию или симптоматику заболевания.

Фармацевтические композиции и составы

Антитела анти-CD73, ингибиторы аденозинового рецептора A2A и/или A2B, а также ингибиторы PD-1/PD-L1, описанные в данном документе, могут быть составлены в виде фармацевтических композиций для введения субъекту, например, для лечения нарушения, описанного в данном документе. В некоторых случаях фармацевтическая композиция содержит антитело анти-CD73 в качестве отдельного агента. В некоторых случаях фармацевтическая композиция содержит ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или A2B в качестве отдельного агента.

В некоторых случаях фармацевтическая композиция содержит ингибитор PD-1/PD-L1 в качестве отдельного агента. В некоторых случаях фармацевтическая композиция содержит одно или большее количество антител анти-CD73, ингибиторов аденозинового рецептора A2A и/или A2B, а также ингибиторов PD-1/PD-L1, описанных в данном документе. В некоторых случаях фармацевтическая композиция содержит одно или большее количество антител анти-CD73 и ингибиторов PD-1/PD-L1, описанных в данном документе.

При применении соединений по данному изобретению в качестве фармацевтических средств, их можно вводить в форме фармацевтических композиций. Эти композиции можно получить при помощи способов, хорошо известных в области фармации, и можно вводить различными путями в зависимости от того, желательно локальное или системное лечение, и от области, подвергаемой лечению. Введение может быть местным (в том числе трансдермальное, эпидермальное, через глаз и в слизистые оболочки, включая

интраназальную, вагинальную и ректальную доставку), пульмональным (*например*, путем ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, в том числе с помощью небулайзера; интратрахеальным или интраназальным), пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенное, внутриартериальное, подкожное, внутривнутрибрюшинное внутримышечное введение или инъекцию, или инфузию; или внутривнутричерепное, например, интратекальное или внутривнутрижелудочковое введение. Парентеральное введение может осуществляться в виде единичной болюсной дозы или, например, непрерывно с помощью перфузионного насоса. Фармацевтические композиции и составы для местного введения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, крема, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Необходимыми или желательными могут быть традиционные фармацевтические носители, водные, порошковые или масляные основы, загустители и т. п.

Фармацевтическая композиция может включать «терапевтически эффективное количество» средства, описанного в данном документе. Такие эффективные количества могут быть определены на основании действия вводимого средства или комбинаторного эффекта средств, если применяют более одного средства. Терапевтически эффективное количество агента также может варьироваться в зависимости от таких факторов, как течение заболевания, возраст, пол и масса тела индивидуума и способность соединения вызывать желаемый ответ у индивидуума, например, улучшение по меньшей мере одного параметра нарушения, или улучшение по меньшей мере одного симптома нарушения. Терапевтически эффективное количество также является таким, в котором любые токсичные или вредные эффекты композиции перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами.

Как правило, фармацевтическая композиция включает фармацевтически приемлемый носитель. В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми. Композиция может включать фармацевтически приемлемую соль, например, кислотно-аддитивную соль или щелочно-аддитивную соль (см, *например*, публикацию Berge, S.M., et al. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19).

Фармацевтический состав относится к хорошо известному уровню техники, который дополнительно описан, например, в публикациях Gennaro (ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systemc, 7th Ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727); и Kibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 3rd ed. (2000) (ISBN: 091733096X).

Фармацевтические композиции могут быть в различных формах. Эти формы включают в себя, например, жидкие, полутвердые и твердые дозированные формы, такие

как жидкие растворы (*например*, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории. Предпочтительная форма может зависеть от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Как правило, композиции для агентов, которые описаны в данном документе, существуют в форме инъекций или растворов для инфузий.

Композиция может быть составлена в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для стабильного хранения при высокой концентрации. Стерильные растворы для инъекций могут быть изготовлены путем включения агента, описанного в данном документе, в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. В общем случае, дисперсии готовят путем включения агента, описанного в данном документе, в стерильную несущую среду, которая содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций, предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка, в результате которых получают порошок агента, описанного в данном документе, плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из его раствора, предварительно простерилизованного фильтрованием. Надлежащую текучесть раствора можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Продленную абсорбцию инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию агента, который замедляет абсорбцию, например, моностеаратных солей и желатина.

Настоящее изобретение также включает в себя фармацевтические композиции, которые содержат в качестве активного ингредиента соединение по данному описанию или его фармацевтически приемлемую соль в сочетании с одним или большим количеством фармацевтически приемлемых носителей (вспомогательных веществ). В некоторых вариантах осуществления композиция пригодна для местного введения. Для приготовления композиций по настоящему изобретению один или большее количество активных ингредиентов обычно смешивают со вспомогательным веществом, разбавляют вспомогательным веществом или включают в такой носитель в форме, например, капсулы, саше, бумажного пакета или другого контейнера. Если вспомогательное вещество служит разбавителем, оно может быть твердым, полутвердым или жидким материалом, который служит средой-носителем, носителем или средой для активного ингредиента. Таким образом, композиции могут находиться в форме таблеток, драже, порошков, пастилок, саше, крахмальных капсул, настоев, суспензий, эмульсий, растворов, сиропов, аэрозолей (твердых или в жидкой среде), мазей, содержащих, например, до 10% по массе активного соединения, мягких и твердых желатиновых капсул, суппозиториев, стерильных инъекционных растворов и стерильных упакованных порошков.

При приготовлении состава один или большее количество активных ингредиентов

можно размалывать с получением частиц подходящего размера перед объединением с другими ингредиентами. Если активное соединение по существу нерастворимо, его можно размалывать до размера частиц менее 200 меш. Если активное соединение по существу растворимо в воде, размер частиц можно регулировать размалыванием, чтобы обеспечить по существу однородное распределение в составе, *например*, около 40 меш.

Соединения по данному изобретению можно размалывать с использованием известных процедур помола, таких как мокрый помол, для получения размера частиц, подходящего для формирования таблеток и составов других типов. Мелкоизмельченные (в форме наночастиц) препараты соединений по настоящему изобретению можно получать с помощью способов, известных в данной области техники, например, см., международную заявку № WO 2002/000196.

Некоторые примеры подходящих вспомогательных веществ включают лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, крахмалы, гуммиарабик, фосфат кальция, альгинаты, трагакант, желатин, силикат кальция, микрокристаллическую целлюлозу, поливинилпирролидон, целлюлозу, воду, сироп и метилцеллюлозу. Составы могут дополнительно содержать смазывающие агенты, такие как тальк, стеарат магния и минеральное масло; смачивающие агенты; эмульгирующие и суспендирующие агенты; консерванты, такие как метил- и пропилгидроксibenзоаты; подсластители и ароматизаторы. Композиции по настоящему изобретению могут быть составлены так, что будут обеспечивать быстрое, замедленное или отсроченное высвобождение активного ингредиента после введения пациенту с помощью процедур, известных в данной области техники.

Композиции могут быть составлены в виде единичной лекарственной формы. Термин «единичные лекарственные формы» относится к физически дискретным единицам, пригодным в качестве разовых дозировок для субъектов-людей и других млекопитающих, при этом каждая единица содержит заранее заданное количество активного материала, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в ассоциации с подходящим фармацевтическим вспомогательным веществом.

Для получения твердых композиций, таких как таблетки, главный активный ингредиент смешивают с фармацевтическим вспомогательным веществом для образования твердой предварительно составленной композиции, содержащей гомогенную смесь соединения по настоящему изобретению. Если указано, что эти предварительно составленные композиции гомогенные, то активный ингредиент, как правило, диспергирован равномерно по всей композиции, так что композицию легко можно разделить на равно эффективные единичные лекарственные формы, такие как таблетки, драже и капсулы. Затем твердую предварительную композицию состава делят на единичные лекарственные формы описанного выше типа.

Таблетки или драже по настоящему изобретению могут быть покрыты или составлены иным путем для получения лекарственной формы, обладающей преимуществом пролонгированного действия. Например, таблетка или драже может

содержать внутренний компонент дозы и внешний компонент дозы, при этом последний находится в форме оболочки над первым. Два компонента могут разделяться энтеросолюбильным слоем, который препятствует разложению в желудке и позволяет внутреннему компоненту попадать интактным в двенадцатиперстную кишку или высвободиться отсрочено. Для таких энтеросолюбильных слоев или покрытий можно применять различные материалы; такие материалы содержат ряд полимерных кислот и смеси полимерных кислот с такими материалами, как шеллак, цетиловый спирт и ацетат целлюлозы.

Жидкие формы, в которые могут быть включены соединения и композиции по настоящему изобретению, для перорального введения или путем инъекции включают водные растворы, пригодным образом ароматизированные сиропы, водные или масляные суспензии и ароматизированные эмульсии с пищевыми маслами, такими как хлопковое масло, сезамовое масло, кокосовое масло или арахисовое масло, а также настои и подобные фармацевтические среды-носители.

Композиции для ингаляции или инсуффляции включают растворы и суспензии в фармацевтически приемлемых водных или органических растворителях или их смесях и порошки. Жидкие или твердые композиции могут содержать подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, описанные *выше*. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят в дыхательные пути через рот или нос для локального или системного эффекта. Композиции можно распылять с использованием инертных газов. Распыленные растворы можно вдыхать непосредственно из устройства для распыления, или устройство для распыления можно присоединить к маске для лица, палатке или дыхательному аппарату с периодически создаваемым положительным давлением. Растворы, суспензии или порошковые композиции можно вводить перорально или через нос, используя устройства, которые доставляют состав соответствующим образом.

Составы для местного применения могут содержать один или большее количество традиционных носителей. В некоторых вариантах осуществления мази могут содержать воду и один или большее количество гидрофобных носителей, выбранных из, например, жидкого парафина, алкилового эфира полиоксиэтилена, пропиленгликоля, белого вазелина и т. п. Композиции-носители кремов могут быть на основе воды в комбинации с глицерином и одним или большим количеством других компонентов, *например*, глицеринмоностеаратом, PEG-глицеринмоностеаратом и цетилстеариловым спиртом. Гели могут быть составлены с применением изопропилового спирта и воды, предпочтительно в комбинации с другими компонентами, такими как глицерин, гидроксипропилцеллюлоза и т. п. В некоторых вариантах осуществления составы для местного применения содержат по меньшей мере около 0,1, по меньшей мере около 0,25, по меньшей мере около 0,5, по меньшей мере около 1, по меньшей мере около 2 или по меньшей мере около 5 масс. % соединения по настоящему изобретению. Составы для местного применения могут быть упакованы в подходящие тубы, например, вместимостью 100 г, которые необязательно могут содержать инструкцию по лечению выбранного симптома, *например*, псориаза или

другого патологического состояния кожи.

Количество соединения или композиции, вводимое пациенту, будет варьировать в зависимости от того, что вводят, цели введения, как, например, профилактика или терапия, состояния пациента, способа введения и т. п. Для терапевтических применений композиции можно вводить пациенту, уже страдающему от заболевания, в количестве, достаточном для лечения или по меньшей мере частичного ослабления симптомов заболевания или его осложнений. Эффективные дозы будут зависеть от состояния заболевания, подлежащего лечению, а также от решения лечащего врача в зависимости от таких факторов, как тяжесть заболевания, возраст, масса, общее состояние пациента и т. п.

Композиции, вводимые пациенту, могут находиться в форме фармацевтических композиций, описанных выше. Эти композиции могут быть стерилизованы обычными методиками стерилизации или могут быть подвергнуты стерилизующей фильтрации. Водные растворы могут быть упакованы для применения как есть или лиофилизированы, при этом лиофилизированный состав объединяют со стерильным водным носителем перед введением. Значение рН препаратов соединений обычно составляет от 3 до 11, более предпочтительно, от 5 до 9 и наиболее предпочтительно от 7 до 8. Следует учитывать, что применение некоторых из вышеупомянутых вспомогательных веществ, носителей или стабилизаторов приведет к образованию фармацевтических солей.

Терапевтическая дозировка соединения по данному изобретению может варьироваться в соответствии, например, с конкретным применением, для которого осуществляется лечение, способом введения соединения, состоянием здоровья и патологическим состоянием пациента и заключением лечащего врача. Доля или концентрация соединения по настоящему изобретению в фармацевтической композиции может варьироваться в зависимости от ряда факторов, в том числе дозы, химических характеристик (например, гидрофобности) и пути введения. Например, соединения по данному изобретению могут предоставляться в водном физиологическом буферном растворе, содержащем от около 0,1 до около 10% масс./об. соединения, для парентерального введения.

Композиции по настоящему изобретению могут дополнительно включать один или большее количество дополнительных фармацевтических агентов, таких как химиотерапевтическое, стероидное, противовоспалительное соединение или иммунодепрессант, примеры которых перечислены в данном документе.

В определенных вариантах осуществления антитела анти-CD73, ингибитор аденозинового рецептора A2A и/или A2B, и/или ингибитор PD-1/PD-L1 могут быть составлены с носителем, который будет защищать соединение от быстрого высвобождения, таким как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно применять биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиортоэфир и полимолочная кислота. Многие способы изготовления таких лекарственных средств запатентованы или общеизвестны. См.,

например, публикацию *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York (1978).

Меченые соединения и способы анализа

Настоящее изобретение дополнительно включает изотопно меченые соединения по настоящему изобретению. «Изотопно-» или «радио-меченое» соединение представляет собой соединение по настоящему изобретению, в котором один или большее количество атомов заменены или замещены атомом, имеющим атомную массу или массовое число, отличные от атомной массы или массового числа, обычно обнаруживаемых в природе (т. е., встречающихся в природе). Подходящие радионуклиды, которые могут быть включены в соединения по настоящему изобретению включают, помимо прочего, ^2H (также обозначенный как D для дейтерия), ^3H (также обозначенный как T для тритиума), ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{18}F , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{82}Br , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{77}Br , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I и ^{131}I . Например, один или большее количество атомов водорода в соединении по данному изобретению могут быть заменены атомами дейтерия (например, один или большее количество атомов водорода алкильной группы соединения, описанного в данном документе, могут быть необязательно замещены атомами дейтерия, например, $-\text{CD}_3$ замещает $-\text{CH}_3$).

Один или большее количество составляющих атомов представленных в данном документе соединений могут быть заменены или замещены изотопами атомов в природном или неприродном количестве. В некоторых вариантах осуществления соединение содержит по меньшей мере один атом дейтерия. В некоторых вариантах осуществления соединение включает два или большее количество атомов дейтерия. В некоторых вариантах осуществления соединения включает 1-2, 1-3, 1-4, 1-5 или 1-6 атомов дейтерия. В некоторых вариантах осуществления все атомы водорода в соединении могут быть заменены или замещены атомами дейтерия.

В некоторых вариантах осуществления 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 атомов водорода, присоединенных к атомам углерода описанных в данном документе соединений, необязательно заменены атомами дейтерия.

Методы синтеза для включения изотопов в органические соединения известны в данной области техники (*Deuterium Labeling in Organic Chemistry* by Alan F. Thomas (New York, N.Y., Appleton-Century-Crofts, 1971; *The Renaissance of H/D Exchange* by Jens Atzrodt, Volker Derdau, Thorsten Fey and Jochen Zimmermann, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 7744-7765; *The Organic Chemistry of Isotopic Labelling* by James R. Hanson, Royal Society of Chemistry, 2011). Меченые изотопами соединения можно применять в различных исследованиях, таких как ЯМР-спектроскопия, эксперименты по метаболизму и/или количественные анализы.

Замещение более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий, может обеспечить определенные терапевтические преимущества, обусловленные большей метаболической стабильностью, например, увеличенным *in vivo* периодом полураспада или уменьшенными требованиями к дозировке, и, следовательно, может быть предпочтительным в некоторых условиях (см., например, публикации A. Kerekes et. al. *J. Med. Chem.* 2011, 54, 201-210; R.

Xu et. al. *J. Label Compd. Radiopharm.* 2015, 58, 308-312). В частности, замена в одном или большем количестве участках метаболизма может обеспечить одно или большее количество терапевтических преимуществ.

Радионуклид, который включен в настоящие радиоактивно меченые соединения, будет зависеть от конкретного применения этого радиоактивно меченого соединения. Например, для *in vitro* мечения A2A/A2B и конкурентного анализа подходящими могут быть соединения, содержащие ^3H , ^{14}C , ^{82}Br , ^{125}I , ^{131}I или ^{35}S . Для целей радиовизуализации подходящими могут быть ^{11}C , ^{18}F , ^{125}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I , ^{75}Br , ^{76}Br или ^{77}Br .

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

Настоящее изобретение может дополнительно включать синтетические способы введения радиоизотопов в соединения по настоящему изобретению. Способы синтеза для включения радиоизотопов в органические соединения хорошо известны в данной области техники, и обычный специалист в данной области техники легко поймет способы, применимые для соединений по настоящему изобретению.

Меченое соединение по настоящему изобретению может применяться в скрининговом анализе для идентификации/оценки агентов. Например, вновь синтезированный или идентифицированный агент (*m. e.* исследуемый агент), который является меченым, можно оценить на предмет его способности связывать аденозиновый рецептор, CD73 или PD-1/PD-L1, наблюдая изменение его концентрации при контакте с аденозиновым рецептором, CD73 или PD-1/PD-L1, соответственно, посредством отслеживания мечения. Например, тестируемый агент (меченый) можно оценить на предмет его способности снижать связывание другого агента, о котором известно, что он связывается с аденозиновым рецептором, CD73 или PD-1/PD-L1 (*m. e.* стандартный агент). Соответственно, способность исследуемого агента конкурировать со стандартным агентом за связывание с аденозиновым рецептором, CD73 или PD-1/PD-L1, прямо коррелирует с его аффинностью связывания. И наоборот, в некоторых других скрининговых исследованиях помечен стандартный агент, а исследуемый агент не помечен. Соответственно, за концентрацией меченого стандартного агента наблюдают для того, чтобы оценить конкурентное связывание между стандартным агентом и исследуемым агентом и таким образом определить относительную аффинность связывания исследуемого агента.

Соответственно, другой аспект настоящего изобретения относится к меченым агентам (*m. e.* меченым антителам анти-CD73, ингибиторам аденозиновых рецепторов A2A и/или A2B, а также ингибиторам PD-1/PD-L1) согласно настоящему изобретению (радиомеченым, флуоресцентно-меченым и т. д.), которые могут быть полезны не только в методах визуализации, но также в анализах *in vitro* и *in vivo*, для локализации и количественного определения рецепторов CD73, A2A и/или A2B, и/или PD-1/PD-L1 в образцах тканей, включая ткани человека, и для идентификации антагонистов CD73, A2A

и/или A2B, и/или PD-1/PD-L1 путем ингибирования связывания меченого соединения. Замещение одного или большего количества атомов соединений по настоящему изобретению также может быть пригодно при создании дифференцированного ADME (адсорбция, распределение, метаболизм и выведение). Соответственно, настоящее изобретение включает в себя анализы количественного определения аденозинового рецептора (например, A2A и/или A2B), которые содержат такие меченые или замещенные соединения.

Наборы

Настоящее изобретение также включает фармацевтические наборы, пригодные, например, при лечении или профилактике заболеваний или нарушений, как описано в данном документе, которые включают один или большее количество контейнеров, содержащих фармацевтическую композицию, содержащую терапевтически эффективное количество соединения/антител по настоящему изобретению. Такие наборы могут дополнительно включать, если это желательно, один или большее количество разнообразных компонентов традиционно принятых фармацевтических наборов, таких как, например, контейнеры с одним или большим количеством фармацевтически приемлемых носителей, дополнительных контейнеров и т. п., что будет легко понятно специалистам в данной области техники. Инструкции, либо в виде вкладышей, либо в виде ярлыков с указанием количества вводимых компонентов, руководств по введению и/или руководств по смешиванию компонентов, также могут быть включены в набор.

Настоящее изобретение будет описано более подробно в конкретных примерах. Следующие примеры предлагаются в иллюстративных целях и никоим образом не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Специалисты в данной области техники легко узнают множество не критических параметров, которые могут быть изменены или модифицированы для получения по существу тех же результатов. Следует понимать, что определенные признаки настоящего изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть предоставлены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки вариантов осуществления, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть представлены отдельно или в подходящей субкомбинации.

Различные модификации изобретения, в дополнение к описанным в данном документе, будут очевидны специалистам в данной области техники из вышеприведенного описания. Такие модификации также подпадают под объем прилагаемой по формуле изобретения. Каждая ссылка, цитируемая в данном документе, включая все патенты, патентные заявки и публикации, полностью включена в данное описание посредством ссылки.

ПРИМЕРЫ

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

Пример 1. Противоопухолевая эффективность ANTIBODY Y в комбинации с ретифанлимабом и Соединением 9.

Противоопухолевая эффективность антитела анти-CD73, ANTIBODY Y, в качестве отдельного агента и в комбинации с низкомолекулярным антагонистом рецепторов A2A/A2B, Соединением 9 (3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил, см. Таблицу 1), и/или антитело с анти-PD-1, ретифанлимабом, анализировали на гуманизированной мышеч-хозяине, несущей опухоль аденокарциномы молочной железы человека, MDA-MB-231, высоко экспрессирующую CD73 и имеющую подтвержденный ответ на блокаду PD-1/PD-L1. Самкам мышей с восстановленным CD34+ человека (возраст 29 недель; The Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн) подкожно инокулировали 3×10^6 клеток MDA-MB-231 (ATCC# HTB-26), суспендированных в матригеле (Corning Life Sciences) у выбритый левый бок. На день 7 и затем каждые 3-4 дня опухоли измеряли штангенциркулем и рассчитывали объем опухоли по формуле $\text{Объем} = [L (\text{длинное измерение}) \times W^2 (\text{короткое измерение})] / 2$. На основании этих измерений мышей рандомизировали в 8 групп лечения по 10 мышей в каждой со средним начальным объемом опухоли 180 мм³. Исследуемые агенты готовили и вводили следующим образом: ANTIBODY Y разводили до конечной концентрации 1 мг/мл в фосфатно-солевом буфере и вводили мышам внутривентриально (в/вр) 10 мл/кг в дозе 10 мг/кг каждые 5 дней. Ретифанлимаб (Macrogenics) разводили до 1 мг/мл и вводили внутривентриально каждые 5 дней. Для комбинированного лечения два антитела объединяли в состав до концентрации 1 мг/мл каждого. Пероральный носитель представлял собой 5% N, N-диметилацетамид в 0,5% метилцеллюлозе в 50 мМ цитратном буфере, pH 3,0 (все реагенты получены от Sigma), и его вводили перорально через зонд (п/о) два раза в день (2 р/д). Соединение 9 (Incyte Corporation) составляли в последнем носителе до концентрации 1 мг/мл и вводили перорально, два раза в день, ежедневно по 10 мг/мл, для эффективной дозы 10 мг/кг. Исследовали следующие методы лечения и комбинации:

- 1) носитель и изотипический контроль IgG;
- 2) ретифанлимаб;
- 3) ANTIBODY Y;
- 4) Соединение 9;
- 5) ретифанлимаб+ANTIBODY Y;
- 6) ретифанлимаб +Соединение 9;
- 7) ANTIBODY Y+Соединение 9; и
- 8) ретифанлимаб+ANTIBODY Y+Соединение 9.

Введение дозы начинали на день 7 и продолжали в течение 28 дней до дня 35. Животных продолжали отслеживать индивидуально после завершения дозирования до гуманной конечной точки исследования, которая достигалась, когда объем опухоли превышал или равнялся 10% массы тела мыши.

К дню 35, когда дозирование прекращалось, все комбинации ингибировали рост опухоли лучше, чем входящие в их состав отдельные агенты и носитель. Ингибирование

роста опухоли (TGI), определяемое как (объем опухоли группы лечения 1)/объем опухоли контрольной группы) x 100, анализировали для всего исследования на день 47, последний день перед тем, как некоторые животные прекращали участие в исследовании в его конечной точке. Значимость определяли с помощью непараметрического апостериорного теста (Крускала-Уоллиса). Данные обобщены в Таблице А и на ФИГ. 1.

Таблица А.

<u>День 47, Ингибирование роста опухоли.</u>		
Лечение	Процент TGI	р-значение
Носитель+изотип IgG		
ретифанлимаб	9,57	0,28
ANTIBODY Y	2,20	0,81
Соединение 9	18,42	0,11
ретифанлимаб+ANTIBODY Y	15,64	0,18
ретифанлимаб +Соединение 9	34,58	0,02
ANTIBODY Y+Соединение 9	55,89	< 0,0001
ретифанлимаб+ANTIBODY Y+Соединение 9	66,28	< 0,0001

Мышей отслеживали до достижения ими конечных точек в течение 90 дней для анализа выживаемости. Все комбинации с ANTIBODY Y повышали выживаемость в большей степени, чем с носителем, при медиане выживаемости 62 дня для комбинации с ретифанлимабом, 74 дня для Соединения 9 и 72 дня для комбинации ретифанлимаба, Соединения 9 и ANTIBODY Y по сравнению с контрольной группой с медианой выживаемости 60 дней, как продемонстрировано на ФИГ. 2. Эти данные демонстрируют, что блокада как CD73 с помощью ANTIBODY Y, так и рецепторов A2A/A2B с помощью Соединения 9 обеспечивает улучшенный контроль заболевания и смертность по сравнению с лечением отдельными агентами. Кроме того, лучший контроль роста опухоли наблюдался при тройной комбинации ANTIBODY Y, Соединения 9 и ретифанлимаба.

Пример 2. Фаза 1 открытого многоцентрового исследования ANTIBODY Y в качестве монотерапии или в комбинации с иммунотерапией у участников с распространенными солидными опухолями

I. Цель

Это открытое, нерандомизированное, многоцентровое исследование фазы 1 с повышением дозы и расширением популяции сначала у человека (FIH) для определения безопасности, переносимости, фармакокинетики (PK), фармакодинамики и предварительной эффективности ANTIBODY Y при введении отдельно или в комбинации с Соединением 9 и/или ретифанлимабом у участников со специфическими распространенными солидными опухолями, включая плоскоклеточную карциному головы и шеи (SCCHN) и определенные злокачественные новообразования желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Будут отобраны участники с положительными по CD8 Т-клеткам опухолями,

поскольку эти опухоли с большей вероятностью отвечают на иммунотерапию.

II. Общий дизайн

Фаза 1a будет состоять из увеличения дозы для каждой группы лечения с применением гибридного дизайна. Это позволит оценить безопасность и переносимость следующих исследуемых методов лечения у участников с распространенными солидными опухолями (ограниченными положительной по CD8 Т-клеткам прогрессирующей SCCHN или определенными злокачественными новообразованиями ЖКТ, определяемыми в настоящем документе как колоректальный рак (CRC), рак желудка/желудочно-пищеводного соединения (GEJ), гепатоцеллюлярная карцинома (HCC), аденокарцинома протоков поджелудочной железы (PDAC) или плоскоклеточная карцинома анального канала (SCAC), после когорт с повышением начальной дозы):

Группа лечения A (TGA): ANTIBODY Y в качестве монотерапии

Группа лечения B1 (TGB1): ANTIBODY Y в комбинации с ретифанлимабом

Группа лечения B2 (TGB2): ANTIBODY Y в комбинации с Соединением 9

Группа лечения C (TGC): ANTIBODY Y в комбинации с ретифанлимабом и Соединением 9

После когорт с повышением начальной дозы в каждой из групп лечения, в которые будут включены участники с распространенными солидными опухолями, набор в последующие когорты с повышением дозы будет ограничен участниками с положительной по CD8 Т-клеткам прогрессирующей SCCHN или определенными злокачественными новообразованиями ЖКТ (*т. е.* применяются те же критерии включения, что и для фазы 1b), а биопсия до и во время лечения станет обязательной. Это может произойти до открытия набора на второй уровень дозы или в любое время после этого и будет основываться на появляющихся данных ПК (*т. е.* насыщении таргет-опосредованного распределения лекарственного средства (TMDD)).

Фаза 1b представляет собой применение дозы в расширенной популяции, чтобы лучше охарактеризовать безопасность, переносимость, ПК, фармакодинамические эффекты и предварительную противоопухолевую активность ANTIBODY Y, применяемого в качестве монотерапии или в комбинации с ретифанлимабом и/или Соединением 9 в рекомендуемой дозе для расширения (RDE) при монотерапии и каждого вида из комбинированных терапий в общей сложности приблизительно для поддающихся оценке 120 участников. Участники фазы 1b будут ограничены теми, кто имеет выбранные положительные по CD8 Т-клеткам распространенные SCCHN или определенные злокачественные новообразования ЖКТ (определяемые в данном документе как колоректальный рак (CRC), рак желудочно-пищеводного соединения (GEJ), гепатоцеллюлярная карцинома (HCC), аденокарцинома протоков поджелудочной железы (PDAC) или плоскоклеточная карцинома анального канала (SCAC)).

TGA (монотерапия ANTIBODY Y)

SCCHN: 10 участников

Определенные злокачественные новообразования ЖКТ 10 участников

TGB1 (ANTIBODY Y+ретифанлимаб)

SCCHN: 10 участников

Определенные злокачественные новообразования ЖКТ 10 участников

TGB2 (ANTIBODY Y+Соединение 9)

SCCHN: 20 участников

Определенные злокачественные новообразования ЖКТ: 20 участников

TGC (ANTIBODY Y+ретифанлимаб+Соединение 9)

SCCHN: 20 участников

Определенные злокачественные новообразования ЖКТ: 20 участников

Исследование будет включать 28-дневный период скрининга для определения приемлемости участия, период лечения до 2 лет, визит в конце лечения (ЕОТ), а также визиты последующего наблюдения для мониторинга безопасности через 30 и 90 дней после окончания лечения. Участники, прекратившие исследуемое лечение по причине, отличной от прогрессирования заболевания, будут продолжать оцениваться на предмет состояния своего заболевания на стадии последующего наблюдения, и им следует продолжать проходить оценку опухоли каждые 8 недель в течение первых 12 месяцев, а затем каждые 12 недель после этого до начала новой противоопухолевой терапии, прогрессирования заболевания, смерти, отзыва согласия или окончания исследования, в зависимости от того, что произойдет раньше.

Оценка опухоли будет проводиться на исходном уровне, а затем каждые 8 недель в течение первого года лечения и каждые 12 недель после этого исследователем в центре в соответствии с Критериями оценки ответа при солидных опухолях (RECIST) v1.1. Руководство по критериям оценки иммунного ответа при солидных опухолях (iRECIST) может быть использовано для принятия решения о прекращении исследуемого лечения из-за рентгенологически прогрессирующего заболевания (PD).

Безопасность будет оцениваться с момента подписания участником информированного согласия вплоть до визита последующего наблюдения для мониторинга безопасности через 90 дней после окончания лечения. Данные о безопасности также будут периодически проверяться Комитетом по рассмотрению вопросов безопасности.

Обязательные биопсии перед лечением и во время лечения будут проведены всем участникам, за исключением ранних уровней дозы в каждой из групп лечения в Фазе 1a повышения дозы, как описано выше. Если надлежащий образец опухолевой ткани на момент лечения не может быть получен, участнику будет разрешено продолжить исследование.

В Фазе 1a, в случае получения недостаточного количества парных биоптатов, поддающихся оценке, в уровень дозы могут быть набраны до 6 дополнительных участников.

В Фазе 1b планируется получить не менее 10 парных биоптатов в каждой когорте, поддающихся оценке. В когорту (*например*, SCCHN или определенные злокачественные опухоли ЖКТ) может быть включено до 6 дополнительных участников, если после

первоначального набора участников не будет получено 10 парных образцов, поддающихся оценке.

Опухоли, положительные по CD8 Т-клеткам, являются критерием включения в исследование для всех участников (за исключением тех, кто находится на ранних уровнях дозы в каждой из групп лечения в Фазе 1a повышения дозы). Обязательные биоптаты, полученные у всех участников перед началом лечения, будут проанализированы на наличие CD8+ Т-клеточных лимфоцитов в рамках предварительного скрининга. Предварительный скрининг позволяет провести предварительный отбор участников с опухолями, положительными по CD8 Т-клеткам, вне 28-дневного скринингового периода и до подписания основной формы информированного согласия (ICF) на участие в исследовании. Участники должны будут подписать специальную форму согласия на предварительный скрининг; однако в рамках согласия на предварительный скрининг никакие другие оценки в рамках Протокола проводиться не будут.

Участники TGA-группы Фазы 1a и Фазы 1b с имеющимися архивными тканями могут предоставить эти архивные ткани для проведения предварительного скрининга; однако участникам, отвечающим критериям, необходимо будет провести свежую биопсию в период скрининга для анализа биомаркеров. Эти свежие биопсии во время скрининга необходимы для получения образцов замороженных тканей, необходимых для оценки ферментативной активности CD73.

Парные биоптаты опухоли, собранные в ходе исследования, будут использоваться для демонстрации фармакодинамической активности ANTIBODY Y (на свежих парных биоптатах), оценки изменений в опухоли и ее микроокружении (TME), выявления потенциальных биомаркеров, а также разработки и оценки сигнатуры экспрессии генов, регулируемой аденозином.

III. Фаза 1a - повышение дозы

Открытый гибридный дизайн будет применяться для оценки безопасности и переносимости, а также для определения RDE для группы TGA и групп комбинированного лечения TGB1, TGB2 и TGC у участников с распространенными солидными опухолями (ограниченными участниками с положительной по CD8 Т-клеткам прогрессирующей SCCN или определенными злокачественными новообразованиями ЖКТ (CRC, рак GEJ, НСС, PDAC или SCAC) после когорт с повышением начальной дозы). Подробная информация о каждой группе лечения содержится в соответствующих последующих подразделах.

Повышение дозы начнется с TGA. Решение об открытии набора в когорты с повышением дозы для TGB1, TGB2 и TGC будет основываться на данных наблюдаемой безопасности, переносимости, клинической активности, фармакокинетики и фармакодинамики ANTIBODY Y.

Гибридный статистический дизайн для управления повышением дозы

Гибридный дизайн представляет собой гибрид дизайна модифицированного интервала вероятности токсичности и модели «доза-токсичность» и состоит из 3 стадий.

Стадия 1. Дизайн модифицированного интервала вероятности токсичности (mTPI) (см., *например*, публикацию Ji et al *Clin. Trials*. 2010;7:653-663) с целевым уровнем дозопонижающей токсичности (DLT) p_T , равным 28%, сначала модифицируется для контроля токсичности при передозировке с использованием апостериорной вероятности определения уровня DLT в интервале передозировки ($p_T + \varepsilon_2, 1$) меньше 0,8. Согласно этому правилу, если из 6 участников у 3 наблюдается DLT, что составляет уровень DLT около 50%, то модифицированный mTPI будет гарантировать снижение дозы вместо того, чтобы оставить текущий уровень дозы при высокой частоте наблюдаемой токсичности. В Таблице В приведены правила повышения дозы, основанные на количестве DLT, наблюдаемых в когорте с уровнем дозы, где E=повышение до следующей более высокой дозы; D=снижение до следующей более низкой дозы; DU=текущая доза неприемлемо токсична; S=сохранение текущей дозы. Показатель целевой токсичности p_T : 28%. В качестве априора используется плоский неинформативный априор Beta(1,1) и $\varepsilon_1 = \varepsilon_2 = 0,05$ (см., *например*, публикации Ji et al, *Clin. Trials* 2010, 7:653-663; и Ji et al, *J. Clin. Oncol.* 2013, 31:1785-1791). Граница апостериорной вероятности токсичности: 0,8.

Таблица В.

Участники с по меньшей мере 1 DLT	Количество участников, поддающихся оценке на предмет DLT						
	3	4	5	6	7	8	9
0	E	E	E	E	E	E	E
1	S	S	S	S	E	E	E
2	D	S	S	S	S	S	s
3	DU	DU	D	D	S	S	s
4		DU	DU	DU	DU	D	S
5			DU	DU	DU	DU	DU
6				DU	DU	DU	DU
7					DU	DU	DU
8						DU	DU
9							DU

Стадия 2. Вторая стадия гибридного дизайна заключается в применении модели «доза-токсичность» путем объединения всей наблюдаемой информации о безопасности от всех предыдущих доз с целью оценки показателя DLT для текущего уровня дозы и прогнозирования показателя DLT для следующего уровня дозы в предварительном перечне доз. Расчетный показатель DLT при текущем уровне дозы используется вместе с правилами принятия решений из модифицированного mTPI в Таблице В для комплексного принятия решения о повышении дозы. Если модель «доза-токсичность» неприменима (*например*, DLT не наблюдалась ни в одной протестированной дозе), то на этой стадии никаких

действий не требуется.

Стадия 3. Если решение согласно Таблице В заключается в повышении дозы (E) до следующего уровня дозы в предварительном перечне доз, то прогнозируемый показатель DLT с применением модели «доза-токсичность» из Стадии 2 используется для оценки того, применим ли следующий уровень дозы, путем проверки того, превышает ли прогнозируемый показатель DLT при следующем уровне дозы предварительно заданный целевой показатель DLT. Если прогнозируемый показатель DLT превышает целевой показатель DLT, то следующий уровень дозы в предварительном перечне доз применять нельзя. Вместо этого промежуточная доза из модели «доза-токсичность» будет откалибрована таким образом, чтобы показатель DLT был ниже целевого уровня DLT. Если решение согласно Таблице В заключается в том, чтобы снизить дозу (D) до более низкого уровня дозы в предварительном перечне доз, промежуточная доза из ранее использованной модели «доза-токсичность» будет откалибрована таким образом, чтобы показатель DLT был ниже целевого показателя DLT. Следует обратить внимание, что при выборе промежуточного уровня дозы будет учитываться то, что является клинически и практически осуществимым (например, на основе вариабельности экспозиции у разных участников). Если решение согласно Таблице В заключается в том, чтобы оставить (S) текущую дозу, то для принятия решения используется расчетный показатель DLT при текущей дозе с применением модели «доза-токсичность» из Стадии 2. Если расчетный показатель DLT при текущей дозе превышает предварительно заданный целевой показатель DLT, то принимается решение о снижении дозы (D); в противном случае дозу оставляют прежней (S).

Для каждого уровня дозы требуется минимум 3 поддающихся оценке участника. Однако, в зависимости от коэффициента включения, может быть набрано 3, 4, 5 или 6 участников. В каждой группе лечения примерно 30 поддающихся оценке участников могут получать лечение на стадиях повышения дозы, и процедура повышения дозы может быть остановлена, если число поддающихся оценке участников, получающих лечение при любом уровне дозы, составляет ≥ 9 . Если появляющиеся данные подтверждают снижение неприемлемой дозы (D или DU) до самого низкого уровня дозы, в исследовании оценят данные, чтобы определить, следует ли рассмотреть более низкую дозу (или альтернативную схему).

При добавлении участников к уровню дозы в ответ на решение «Остаться на текущей дозе (S)», количество дополнительных участников, которые должны быть набраны, ограничено, чтобы свести к минимуму воздействие дозы, которая может иметь неприемлемую токсичность (обозначается как «Неприемлемая доза (DU)» в Таблице В). Во-вторых, чтобы определить, сколько еще участников может быть набрано на определенный уровень дозы, можно подсчитать стадии в диагональном направлении (вниз и вправо) от текущей ячейки до первой ячейки, отмеченной DU. Например, если 1 из 3 участников испытал DLT при данном уровне дозы, на этот уровень дозы можно набрать не более 3 дополнительных участников до тех пор, пока не будут доступны дополнительные

данные DLT. Это связано с тем, что этот уровень дозы будет считаться неприемлемо токсичным, если все 3 дополнительных участника испытают DLT (*т.е.* 4 из 6 участников с DLT в Таблице В).

Если DLT не наблюдается во всех предложенных дозах и нет четкого сигнала, связанного с эффективностью, при самой высокой дозе, то процедура повышения дозы может быть продолжена с дополнительными участниками, набранными на уровень более высокой дозы.

В конце процедуры повышения дозы уровни DLT для всех тестируемых уровней дозы будут оцениваться на основе вышеупомянутой модели «доза-токсичность», если она неприменима, или алгоритма смежных нарушителей, если параметрическая модель «доза-токсичность» является неприменимой. Доза с расчетным показателем DLT, наиболее близким к 28%, будет рассматриваться как MTD. Тем не менее, перед принятием решения о дозе (дозах) для перехода в Фазу 1b, будет рассмотрена совокупность имеющихся данных, таких как появляющиеся данные о безопасности, РК, прогрессирующем заболевании (PD) и другая информация о биомаркерах.

Группа лечения А - ANTIBODY Y в качестве монотерапии

Набор у группу с повышением дозы начнется с монотерапии ANTIBODY Y в дозе 70 мг каждые две недели (1 раз каждые 2 недели), вводимой внутривенно (IV) в День 1 и 15 каждого 28-дневного цикла. Период оценки DLT составляет 28 дней, и безопасность и переносимость будут оцениваться, когда поддающиеся оценке участники в когорте уровня дозы преодолеют 28-дневный период DLT перед открытием когорты следующего уровня дозы. Предлагаемая доза (70 мг 1 раз в 2 недели) направлена на минимизацию воздействия субтерапевтических доз ANTIBODY Y на пациентов с раком на поздних стадиях, при этом уравнивая риск безопасности, ассоциированный с неклиническими фармакологическими и токсикологическими профилями. Эта доза была определена с учетом веса доказательств (WOE) всех неклинических данных и считается обеспечивающей приемлемый профиль «риск-польза».

Планируемые уровни доз ANTIBODY Y, которые будут изучаться в этом исследовании, могут включать 70 мг, 250 мг, 750 мг и 1500 мг, но дозы будут выбраны на основе появляющихся данных. Дозы выше 250 мг не увеличивают более чем в три раза. Промежуточные уровни доз могут быть изучены, если они подтверждаются данными по безопасности, РК или фармакодинамическими данными.

Участники должны были получить 2 дозы ANTIBODY Y на уровне, установленном для введения 1 раз в 2 недели, или 1 дозу ANTIBODY Y на уровне, установленном для введения 1 раз в 4 недели в течение 28-дневного периода наблюдения за DLT или должны были иметь DLT для оценки переносимости дозы. Участники, которые считаются непригодными для оценки по причинам, отличным от токсичности, могут быть заменены. Кроме того, при выборе RDE будут учитываться участники с поздними явлениями, связанными с безопасностью, соответствующие определению DLT, или те, у кого наблюдалась непереносимая устойчивая токсичность более низкой степени, которая была

определена как связанная с исследуемым препаратом (*например*, периферическая невропатия 2 степени).

Прерывание введения и/или модификации дозы могут быть осуществлены в зависимости от токсичности. Не следует изменять дозу в течение периода наблюдения за DLT без обсуждения с медицинским монитором. Если уровень дозы считается неприемлемо токсичным, всем участникам, набранным на этот уровень дозы, можно уменьшить дозу до последнего уровня дозы, признанного переносимым.

В общей сложности до 6 дополнительных участников могут быть набраны на любой допустимый уровень дозы для дальнейшего изучения безопасности, фармакокинетики и/или фармакодинамических биомаркеров. Участники, набранные для оценки фармакодинамических биомаркеров, также должны будут предоставить биопсию опухоли до и после лечения и иметь SCCN или определенное злокачественное новообразование ЖКТ.

Схема введения ANTIBODY Y может быть изменен с 1 раз в 2 недели на каждые четыре недели (1 раз в 4 недели) на основании появляющихся фармакокинетических и фармакодинамических данных. Дозировка 1 раз в 4 недели более удобна для участников и хорошо согласуется с дозировкой ретифанлимаба 1 раз в 4 недели для участников, получающих комбинированную терапию, включающую ретифанлимаб (TGB1 и TGC). На каждом уровне дозы сначала будет получать лечение 1 участник, после чего в течение ≥ 24 часов будет ожидаться начало лечения остальных участников.

Группа лечения B1 - ANTIBODY Y+ретифанлимаб

Ретифанлимаб будут вводить в дозе 500 мг внутривенно 1 раз в 4 недели на всех уровнях доз. Выбор дозы ретифанлимаба 500 мг 1 раз в 4 недели был основан на моделировании клинических данных PK первого исследования монотерапии у человека (см., *например*, clinicaltrials.gov, NCT03059823), в котором оценивалась как введение в зависимости от веса в дозах от 1 до 10 мг/кг 1 раз в 2 недели или 1 раз в 4 недели, так и постоянное введение в дозах 375 мг 1 раз в 3 недели, 500 мг 1 раз в 4 недели и 750 мг 1 раз в 4 недели у 219 участников.

Набор в группу TGB1 может начаться после того, как по меньшей мере 2 уровня дозы в группе TGA будут объявлены переносимыми или будет выбрана RDE. Кроме того, имеющиеся данные PK и фармакодинамики, полученные в ходе исследования в группе TGA, будут использованы для руководства о инициации лечения в группе TGB1. Решение об открытии набора в группу TGB1 будет принято по согласованию между медицинским монитором и исследователями. Для обеспечения безопасности комбинированного лечения начальная доза ANTIBODY Y в группе TGB1 будет на 1 уровень дозы ниже или по меньшей мере на 50% меньше (в зависимости от того, что больше), чем самая высокая протестированная переносимая доза ANTIBODY Y в группе TGA на момент открытия группы TGB1.

ANTIBODY Y можно вводить 1 раз в 2 недели или 1 раз в 4 недели в комбинации с ретифанлимабом. Критерии повышения дозы для ANTIBODY Y в группе TGB1 будут

такими же, как и для увеличения дозы монотерапии ANTIBODY Y в группе TGA; то есть дозы выше 250 мг не будут увеличиваться более чем в 3 раза, и можно изучить промежуточные уровни доз (от запланированных уровней доз). На каждом уровне дозы сначала будет получать лечение 1 участник, после чего в течение ≥ 24 часов будет ожидаться начало лечения остальных участников.

Повышение дозы в группе TGB1 будет следовать тому же гибриднему дизайну, что и для группы TGA. Участники должны были получить 2 дозы ANTIBODY Y на уровне, установленном для введения 1 раз в 2 недели, или 1 дозу ANTIBODY Y на уровне, установленном для введения 1 раз в 4 недели, и 1 дозу ретифанлимаба в течение 28-дневного периода наблюдения DLT или должны были иметь DLT для оценки переносимости дозы. Кроме того, при выборе RDE будут учитываться участники с поздними явлениями, связанными с безопасностью, соответствующие определению DLT, или те, у кого наблюдалась непереносимая устойчивая токсичность более низкой степени, которая была определена как связанная с исследуемым препаратом (*например*, периферическая невропатия 2 степени).

Прерывание введения и/или модификации дозы ANTIBODY Y могут быть осуществлены в зависимости от токсичности. Не следует изменять дозу в течение периода наблюдения за DLT без обсуждения с медицинским монитором. Если уровень дозы считается неприемлемо токсичным, всем участникам, набранным на этот уровень дозы, можно уменьшить дозу до последнего уровня дозы, признанного переносимым.

На усмотрение спонсора, в общей сложности до 6 дополнительных участников могут быть набраны на любой допустимый уровень дозы для дальнейшего изучения безопасности, фармакокинетики и/или фармакодинамических биомаркеров. Участники, набранные для оценки фармакодинамических биомаркеров, также должны будут предоставить биопсию опухоли до и после лечения и иметь SCCN или определенное злокачественное новообразование ЖКТ.

Группа лечения B2 - ANTIBODY Y+Соединение 9

Набор в группу TGB2 может начаться после того, как по меньшей мере 2 уровня дозы в группе TGA будут объявлены переносимыми или будет выбрана RDE. Кроме того, имеющиеся данные PK и фармакодинамики, полученные в ходе исследования в группе TGA, будут использованы для руководства о инициации лечения в группе TGB2. Окончательное решение об открытии набора в группу TGB2 будет принято по согласованию между медицинским монитором и исследователями. Для обеспечения безопасности комбинированного лечения применяются следующие правила:

начальная доза ANTIBODY Y в группе TGB2 будет на 1 уровень дозы ниже или по меньшей мере на 50% меньше (в зависимости от того, что больше), чем самая высокая протестированная переносимая доза ANTIBODY Y в группе TGA на момент открытия группы TGB2.

начальная доза Соединения 9 в группе TGB2 будет на 1 уровень дозы ниже или по меньшей мере на 50% меньше (в зависимости от того, что больше), чем самая высокая

протестированная переносимая доза или RDE Соединения 9 в качестве монотерапии.

ANTIBODY Y можно вводить 1 раз в 2 недели или 1 раз в 4 недели в комбинации с Соединением 9. Критерии повышения дозы для ANTIBODY Y в группе TGB2 будут такими же, как и для увеличения дозы монотерапии ANTIBODY Y в группе TGA; то есть дозы ANTIBODY Y выше 250 мг не будут увеличиваться более чем в 3 раза, и можно изучить промежуточные уровни доз (от запланированных уровней доз). Соединение 9 можно вводить раз в день или дважды в день (2 раза в день) в комбинации с ANTIBODY Y. Увеличение дозы Соединения 9 никогда не превысит 100% (*т. е.* 2-кратное увеличение). После того как на предыдущем уровне дозы Соединения 9 у не менее чем 2 участников были отмечены токсические эффекты \geq степени 2, которые с достаточной вероятностью могут быть связаны с лечением в рамках исследования, последующее увеличение дозы Соединения 9 будет ограничено не более чем на 50% в последующих уровнях дозы Соединения 9. На каждом уровне дозы сначала будет получать лечение 1 участник, после чего в течение ≥ 24 часов будет ожидать начало лечения остальных участников.

В группе TGB2 могут быть открыты параллельные уровни доз, в которых доза ANTIBODY Y увеличивается в когорте с одним уровнем дозы, а доза Соединения 9 увеличивается в когорте с другим уровнем дозы. Уровень дозы будет увеличен только для 1 исследуемого препарата. Таким образом, увеличение дозы в группе TGB2 либо для ANTIBODY Y, либо для Соединения 9 будет следовать тому же гибриднему дизайну, что и для группы TGA.

Участники должны были получить 2 дозы ANTIBODY Y на уровне, установленном для дозирования 1 раз в 2 недели, или 1 дозу ANTIBODY Y на уровне, установленном для дозирования 1 раз в 4 недели, и по меньшей мере 75% доз Соединения 9 (*т. е.*, 21 из 28 доз для дозирования 1 раз в день [42 из 56 доз в случае дозирования 2 раз в день]) на уровне, установленном в течение 28-дневного периода наблюдения за DLT, или участники должны были иметь DLT для оценки переносимости дозы. Кроме того, при выборе RDE будут учитываться участники с поздними явлениями, связанными с безопасностью, соответствующие определению DLT, или те, у кого наблюдалась непереносимая устойчивая токсичность более низкой степени, которая была определена как связанная с исследуемым препаратом (*например*, периферическая невропатия 2 степени).

Прерывание введения и/или модификации дозы могут быть осуществлены в зависимости от токсичности. Не следует изменять дозу в течение периода наблюдения за DLT без обсуждения с медицинским монитором. Если уровень дозы считается неприемлемо токсичным, всем участникам, набранным на этот уровень дозы, можно уменьшить дозу до последнего уровня дозы, признанного переносимым.

На усмотрение спонсора, в общей сложности до 6 дополнительных участников могут быть набраны на любой допустимый уровень дозы для дальнейшего изучения безопасности, фармакокинетики и/или фармакодинамических биомаркеров. Участники, набранные для оценки фармакодинамических биомаркеров, также должны будут предоставить биопсию опухоли до и после лечения и иметь SCCHN или определенное

злокачественное новообразование ЖКТ.

Группа лечения С - ANTIBODY Y+Ретифанлимаб+Соединение 9

Инициация включения в тройную комбинированную терапию ANTIBODY Y+Соединение 9+ретифанлимаб в части увеличения дозы исследования может происходить при одном из следующих условий:

После того, как по меньшей мере 2 уровня дозы одной из групп TGB1 или TGB2 были объявлены переносимыми или была выбрана RDE; или

После того, как по меньшей мере 2 уровня дозы ANTIBODY Y в группе TGA в этом исследовании и по меньшей мере 2 уровня дозы «Соединение 9+ретифанлимаб» были объявлены переносимыми, или была выбрана RDE.

Доступные фармакокинетические и фармакодинамические данные из предыдущих когорт и групп лечения будут использоваться для руководства о инициации лечения в группе TGC. Для обеспечения безопасности тройной комбинации применяются следующие правила:

Начальная доза ANTIBODY Y будет на 1 уровень дозы ниже или по меньшей мере на 50% меньше (в зависимости от того, что больше), чем самая высокая тестируемая переносимая доза ANTIBODY Y при применении в качестве монотерапии в комбинации с ретифанлимабом или Соединением 9 (если переносимая доза ANTIBODY Y различается в группах TGB1 и TGB2, начальная доза для триплета будет на 1 уровень дозы ниже или по меньшей мере на 50% меньше, чем более низкая переносимая доза для двойных комбинаций).

Начальная доза Соединения 9 будет на 1 уровень дозы ниже или по меньшей мере на 50% меньше (в зависимости от того, что больше), чем максимально переносимая доза Соединения 9 при введении в комбинации с ANTIBODY Y в группе TGB2 этого исследования или максимально переносимая доза Соединения 9 с ретифанлимабом.

Ретифанлимаб будут вводить в дозе 500 мг внутривенно 1 раз в 4 недели на всех уровнях доз. ANTIBODY Y можно вводить 1 раз в 2 недели или 1 раз в 4 недели в комбинации с Соединением 9 и ретифанлимабом. В этой группе лечения доза ANTIBODY Y и Соединения 9 может быть увеличена. В когорте будет повышена доза только 1 исследуемого препарата, хотя могут быть включены и параллельные когорты. Критерии повышения дозы для ANTIBODY Y в группе TGC будут такими же, как и для увеличения дозы монотерапии ANTIBODY Y в группе TGA; то есть дозы ANTIBODY Y выше 250 мг не будут увеличиваться более чем в 3 раза, и можно изучить промежуточные уровни доз (от запланированных уровней доз). Соединение 9 можно вводить 1 раз в день или 2 раз в день в комбинации с ANTIBODY Y и ретифанлимабом. Критерии повышения дозы для Соединения 9 в группе TGC будут такими же, как и критерии, описанные для Соединения 9 в группе TGB2; то есть увеличение дозы на последующих уровнях дозы Соединения 9 будет до 2 раз до тех пор, пока связанная с лечением токсичность \geq степени 2 не будет наблюдаться по меньшей мере у 2 участников при предыдущем уровне дозы Соединения 9. После обнаружения такой токсичности последующие увеличения дозы будут ограничены

не более чем на 50% при последующем уровне дозы Соединения 9. На каждом уровне дозы сначала будет получать лечение 1 участник, после чего в течение ≥ 24 часов будет ожидать начало лечения остальных участников.

Могут быть открыты параллельные уровни доз, в которых дозу ANTIBODY Y увеличивают в когорте с одним уровнем дозы, а дозу Соединения 9 увеличивают в когорте с другим уровнем дозы, как указано для группы TGB2. Как и в случае с TGB2, уровень дозы будут увеличивать только 1 из исследуемых препаратов: ANTIBODY Y или Соединение 9. Таким образом, увеличение дозы в группе TGC либо для ANTIBODY Y, либо для Соединения 9 будет следовать тому же гибриднему дизайну, что и для группы TGA.

Участники должны были получить (a) 2 дозы ANTIBODY Y на уровне, установленном для дозирования 1 раз в 2 недели, или 1 дозу ANTIBODY Y на уровне, установленном для дозирования 1 раз в 4 недели, (b) 1 дозу ретифанлимаба; и (c) по меньшей мере 75% доз Соединения 9 (*т.е.*, 21 из 28 доз для дозирования 1 раз в день [42 из 56 доз в случае дозирования 2 раз в день]) на уровне, установленном в течение 28-дневного периода наблюдения за DLT, или участники должны были иметь DLT для оценки переносимости дозы. Кроме того, при выборе RDE будут учитываться участники с поздними явлениями, связанными с безопасностью, соответствующие определению DLT, или те, у кого наблюдалась непереносимая устойчивая токсичность более низкой степени, которая была определена как связанная с исследуемым препаратом (например, периферическая невропатия 2 степени).

Прерывание введения и/или модификации дозы могут быть осуществлены в зависимости от токсичности. Не следует изменять дозу в течение периода наблюдения за DLT без обсуждения с медицинским монитором. Если уровень дозы считается неприемлемо токсичным, всем участникам, набранным на этот уровень дозы, можно уменьшить дозу до последнего уровня дозы, признанного переносимым.

В общей сложности до 6 дополнительных участников могут быть набраны на любой допустимый уровень дозы для дальнейшего изучения безопасности, фармакокинетики и/или фармакодинамических биомаркеров. Участники, набранные для оценки фармакодинамических биомаркеров, также должны будут предоставить биопсию опухоли до и после лечения и иметь SCCN или определенное злокачественное новообразование ЖКТ.

Определение рекомендуемой дозы для расширенной популяции (RDE)

RDE для ANTIBODY Y в качестве монотерапии и каждого комбинированного вида лечения (TGB1, TGB2 и TGC) будет определяться путем оценки всех имеющихся данных, включая безопасность, а также фармакокинетические и фармакодинамические данные, из части исследования с повышением дозы в каждой когорте уровня дозы для дальнейшего изучения в части применения дозы в расширенной популяции (Фаза 1b) исследования. Уровень индивидуальной дозы препарата ANTIBODY Y и Соединения 9 в группах комбинированного лечения не должен превышать, но может быть равен RDE для каждого отдельного препарата, применяемого в качестве монотерапии.

IV. Фаза 1b - Доза в расширенной популяции

Расширение популяции предусмотрено для дальнейшего изучения безопасности, переносимости, фармакокинетики, фармакодинамических эффектов и предварительной противоопухолевой активности TGA или в комбинированных группах TGB1, TGB2 и TGC при RDE для монотерапии и каждого из комбинированных видов лечения, определенных в Фазе 1a.

Фаза 1b будет сосредоточена в первую очередь на участниках с положительной по CD8 Т-клеткам опухоли SCCHN и определенными опухолями ЖКТ: CRC, рак GEJ, НСС, PDAC или SCAC, чтобы получить дополнительные данные об исследуемом лечении относительно RDE в этих выбранных типах опухолей. Относительно участников этой популяции существует большая неудовлетворенная медицинская потребность в более поздних линиях терапии, когда варианты SoC были исчерпаны.

После начала набора в когорты с применением доз в расширенной популяции, дальнейший набор участников в пределах определенной когорты (*например*, SCCHN или определенные злокачественные новообразования ЖКТ) в одну из групп лечения будет приостановлен, если (1) > 1 участника из первых 5 участников, набранных в эту когорту, имеет нежелательное явление (АЕ) \geq степени 3, связанное с исследуемым лечением, или (2) > 40% из 5 или большего количества участников, набранных в эту когорту, имеют АЕ \geq степени 3, связанное с исследуемым лечением.

Набор участников в определенную когорту в одну из групп лечения будет приостановлено до тех пор, пока спонсор, исследователи и регулирующие органы (если применимо) не определят соответствующий план действий.

Группа лечения А - ANTIBODY Y в качестве монотерапии

TGA будет включать до 20 участников в 2 опухолеспецифических когортах:

SCCHN: 10 участников

Определенные злокачественные новообразования ЖКТ 10 участников

Дополнительные (специфические для опухоли) когорты могут быть добавлены путем внесения поправок в протокол на основе появляющихся данных.

Группа лечения В1 - ANTIBODY Y+ретифанлимаб

TGB1 будет включать до 20 участников в 2 опухолеспецифических когортах:

SCCHN: 10 участников

Определенные злокачественные новообразования ЖКТ 10 участников

Дополнительные (специфические для опухоли) когорты могут быть добавлены путем внесения поправок в протокол на основе появляющихся данных.

Группа лечения В2 - ANTIBODY Y+Соединение 9

TGB2 будет включать до 40 участников в 2 опухолеспецифических когортах:

SCCHN: 20 участников

Определенные злокачественные новообразования ЖКТ: 20 участников

Дополнительные (специфические для опухоли) когорты могут быть добавлены путем внесения поправок в протокол на основе появляющихся данных.

Группа лечения С - ANTIBODY Y+Ретифанлимаб+Соединение 9

TGC будет включать до 40 участников в 2 опухолеспецифических когортах:

SCCHN: 20 участников

Определенные злокачественные новообразования ЖКТ: 20 участников

Дополнительные (специфические для опухоли) когорты могут быть добавлены путем внесения поправок в протокол на основе появляющихся данных.

Дополнительная терапия

Участники когорты с повышением дозы (Фаза 1a) и когорты с применением дозы в расширенной популяции (Фаза 1b) могут получить дополнительное лечение ретифанлимабом или Соединением 9 следующим образом:

Участники, набранные в группу TGA, могут получить дополнительное лечение Соединением 9 или ретифанлимабом.

Участники, набранные в группу TGB1, могут получить дополняющее лечение Соединением 9.

Участники, набранные в группу TGB2, могут получить дополнительное лечение ретифанлимабом.

Участникам будет разрешено получать дополнительную терапию после по меньшей мере 2 циклов исследуемого лечения в соответствующей группе лечения и при отсутствии объективного ответа (*т. е.* частичного ответа (PR) или полного ответа (CR)) или клинической пользы (*т. е.* стабильного заболевания (SD) (*например*, уменьшение размера опухоли, не отвечающего критериям объективного ответа, и отсутствие ухудшения клинических симптомов)) или после прогрессирования заболевания.

В Фазе 1a дополнительная терапия в группе TGA может быть назначена только в том случае, если 2 уровня дозы в группе TGA были объявлены переносимыми, и повышение дозы для комбинации с соответствующей дозой ANTIBODY Y было объявлено переносимым (*например*, участник, получающий ANTIBODY Y 250 мг 1 раз в 2 недели, может получать ANTIBODY Y 250 мг 1 раз в 2 недели+ретифанлимаб только после того, как уровень дозы ANTIBODY Y 250 мг 1 раз в 2 недели в группе TGB1 был объявлен переносимым). Аналогичным образом, участники групп TGB1 или TGB2 в Фазе 1a также могут получить дополнительное лечение третьим агентом для получения тройной терапии в соответствии с теми же инструкциями, которые описаны выше для группы TGA.

Участникам как Фазы 1a, так и Фазы 1b, которые начинают монотерапию, будет разрешено получить только одну дополнительную терапию (*т. е.* они не могут получить вторую дополнительную терапию для получения тройной терапии). Участники будут проанализированы на безопасность и эффективность в первоначально назначенной группе лечения до начала дополнительной терапии. После начала дополнительной терапии они будут проанализированы как отдельная группа.

V. Исследуемые виды лечения**Таблица С-1.**

Название исследуемого лечения:	ANTIBODY Y
Механизм действия:	Ингибитор CD73
Состав дозы:	Раствор для инфузий
Концентрация(и) разовой дозы /уровень(и) дозы:	50 мг/мл
Инструкции по введению:	<p>Вводят внутривенно в течение 30 минут (-5/+15 мин) с использованием фильтра.</p> <p>При визитах в клинику, когда необходимо ввести и ANTIBODY Y, и ретифанлимаб, ANTIBODY Y следует вводить первым, а затем следует подождать 30 минут перед началом инфузии ретифанлимаба.</p>
Инструкции по введению (продолжение):	
Упаковка и маркировка:	ANTIBODY Y будет поставляться в стеклянном флаконе (50 мг/мл) для одноразового использования. Каждый флакон будет промаркирован в соответствии с требованиями страны.
Хранение:	Необходимо хранить в холодильнике в вертикальном положении и защищать от света. Хранить при температуре от 2°C до 8 °C (36 °F-46 °F).

Таблица С-2.

Название исследуемого лечения:	Ретифанлимаб
Механизм действия:	Ингибитор PD-1
Состав дозы:	Жидкий состав
Концентрация(и) разовой дозы /уровень(и) дозы:	25 мг/мл

Инструкции по введению:	Вводят внутривенно в течение 30 минут (-5/+15 мин) с использованием фильтра.
Инструкции по введению (продолжение):	
Упаковка и маркировка:	Ретифанлимаб будет поставляться в стеклянном флаконе (25 мг/мл) для одноразового использования. Каждый флакон будет промаркирован в соответствии с требованиями страны.
Хранение:	Необходимо хранить в холодильнике в вертикальном положении и защищать от света. Хранить при температуре от 2°C до 8 °C (36 °F-46 °F).

Таблица С-3.

Название исследуемого лечения:	Соединение 9
Механизм действия:	Ингибитор аденозиновых рецепторов A2A/A2B
Состав дозы:	Таблетки с немедленным высвобождением
Концентрация(и) разовой дозы /уровень(и) дозы:	10 мг или 40 мг
Инструкции по введению:	<p>Вводят перорально (п/о) в таблетках по 10 мг и/или 40 мг 1 раз в день утром каждый день каждого 28-дневного цикла. В случае оценки введения два раза в день, вводят два раза в день утром и вечером с интервалом примерно 12 часов в каждый день 28-дневного цикла.</p> <p>Соединение 9 следует вводить с водой, и его можно принимать с пищей или без нее, за исключением дней, когда собираются образцы РК Соединения 9 (TGB2 и TGC) до введения дозы.</p> <p>Если доза 1 раз в день пропущена более чем на 12 часов, то эту дозу следует пропустить, а следующую запланированную дозу следует принять в обычное время (в случае оценки введения доз два раза в день, если утренняя или вечерняя доза пропущена более чем на 4 часа, эту дозу следует пропустить, а следующую</p>

	запланированную дозу следует принять в обычное время). В дни, когда РК -образцы собирают для изучения Соединения 9 (TGB2 и TGC), участники должны не принимать пищу по меньшей мере 2 часа до приема и по меньшей мере 1 час после введения дозы, после чего можно принимать пищу или сделать перекус.
Инструкции по введению (продолжение):	В дни, когда будет вводиться Соединение 9 собирают образцы для оценки РК (TGB2 и TGC), уровня антилекарственного антитела (ADA), образцы цельной крови для оценки заполнения рецепторов и/или плазмы для корреляционных исследований, при этом указанное Соединение 9 следует вводить в клинике после того, как были собраны соответствующие образцы крови/плазмы, собираемые до введения дозы. В дни, когда будут вводиться ANTIBODY Y и ретифанлимаб (если это применимо), Соединение 9 следует принимать перед введением других исследуемых препаратов
Упаковка и маркировка:	Таблетки Соединения 9 будут поставляться во флаконах. Каждый флакон будет промаркирован в соответствии с требованиями страны.
Хранение:	Хранить при комнатной температуре (15 °C-30 °C [59 °F-86 °F]).

VI. Оценка эффективности

Требуется объективная оценка состояния заболевания с помощью системы оценки RECIST v1.1. (*например*, Eisenhauer et al. *Eur. J. Cancer*, 2009, 45:228-247). Оценки эффективности исходного уровня будут проводиться при скрининге, а дальнейшие оценки эффективности будут проводиться на протяжении всего исследования.

Визуализация опухолей по RECIST v1.1

Для участника на протяжении всего исследования должен использоваться один и тот же метод визуализации. Сканирование на исходном уровне должно представлять собой контрастную компьютерную томографию (СТ) или магнитно-резонансную томографию (MRI), за исключением случаев, когда имеется аллергия на контраст или с разрешения медицинского монитора. Когда СТ-компонент позитронно-эмиссионной томографии/СТ использует более высокую энергию и более тонкие срезы, это может быть приемлемо с одобрения медицинского монитора. Визуализация органов грудной клетки, живота и таза необходима для всех участников. Следует проводить дополнительную визуализацию анатомических областей (*например*, головы, шеи, головного мозга), если это применимо к изучаемому злокачественному новообразованию.

СТ- или MRI-сканирования головного мозга будут выполняться при скрининге, если есть признаки или симптомы, указывающие на то, что у участника имеется заболевание

ЦНС.

Исходная оценка при скрининге

Первоначальную визуализацию опухоли необходимо выполнить в пределах 28 дней до введения первой дозы исследуемого препарата. Исследовательская команда центра должна просмотреть предварительные заключения и изображения, чтобы подтвердить наличие у участника поддающегося измерению заболевания в соответствии с RECIST v1.1. Опухолевые очаги, расположенные в ранее облученной области или в области, подвергшейся другой местно-регионарной терапии, не должны быть выбраны в качестве целевых поражений. Участники с одним целевым поражением, которое ранее подвергалось облучению или подвергалось другой местно-регионарной терапии, могут быть включены, если целевое поражение считается измеримым в соответствии с RECIST v1.1 и продемонстрировало увеличение самого короткого диаметра поражения по меньшей мере на 10 мм. Кроме того, рекомендуется, чтобы опухолевые очаги, отобранные для биопсии, *не* выбирались в качестве целевых поражений.

Сканирование, проводимое в рамках рутинного клинического ведения, приемлемо для использования в качестве скринингового сканирования, если оно имеет диагностическое качество и выполнено в пределах 28 дней до введения первой дозы исследуемого препарата.

Оценка ответа заболевания в ходе лечения

Первую оценку визуализации следует проводить через 8 недель после приема первой дозы исследуемого препарата, а затем каждые 8 недель (± 7 дней) в течение первых 12 месяцев. После 12 месяцев исследуемого лечения частота визуализации может быть снижена до каждые 12 недель (± 14 дней). Оценки визуализации могут выполняться чаще, если для этого существуют клинические показания. Визуализация должна проводиться по календарным дням и *не* должна откладываться из-за задержек в начале цикла.

Ответ (CR или PR) должен быть подтвержден визуализацией по меньшей мере через 4 недели после первоначального документирования ответа.

Прогрессирование заболевания должно быть подтверждено по меньшей мере через 4 недели, но не более чем через 8 недель после первого сканирования, указывающего на прогрессирование заболевания у клинически стабильных участников в соответствии с рекомендациями iRECIST. Участники с неподтвержденным прогрессированием заболевания могут продолжать лечение до подтверждения прогрессирования.

Оценка ответа заболевания после лечения

Если участник прекращает прием исследуемого препарата по причинам, отличным от прогрессирования заболевания, оценку визуализации следует продолжать с интервалом, указанным в протоколе, примерно каждые 8 недель (± 7 дней) в течение первых 12 месяцев, а затем каждые 12 недель (± 14 дней) до задокументированного прогрессирования заболевания, начала нового противоопухолевого лечения, отзыва согласия, смерти или окончания исследования, в зависимости от того, что наступит раньше (в течение максимум 2 лет после окончания лечения (EOT)).

VII. Фармакокинетические оценки

Сбор образцов крови

Кровь будут собирать для определения концентраций ANTIBODY Y в сыворотке, концентраций ретифанлимаба в сыворотке и концентраций Соединения 9 в плазме.

Все образцы будут проанализированы с помощью валидированных методов. Образцы крови будут набирать из руки, противоположной месту внутривенной инфузии. Если используется постоянный катетер, жидкость в катетере будет удалена и выброшена перед сбором образца крови для оценки РК.

Время сбора крови для оценки фармакокинетики указано в Таблице D для TGA и TGB1 и в Таблице E для TGB2 и TGC. После взятия перединфузионного/додозового образца для оценки фармакокинетики участники начнут лечение в рамках исследования. Додозовое взятие образца проводят в пределах 30 минут до введения исследуемого препарата.

Для участников, набранных в группы TGB2 или TGC, на визитах для оценки фармакокинетики, во время которых собирают додозовые образцы Соединения 9 (согласно Таблице E), участники должны воздерживаться от приема Соединения 9 до прибытия на визит и не должны употреблять никакой пищи в течение 2 часов до прибытия в исследовательский центр. После отбора додозовых образцов для оценки фармакокинетики и последующего введения Соединения 9, следует воздержаться от приема пищи в течение 1 часа после введения Соединения 9.

Точная дата и время забора крови для оценки фармакокинетики будут записаны вместе с датой и временем приема последней дозы исследуемого препарата Соединения 9 перед взятием крови (если применимо) и временем последнего приема пищи. Участники групп TGB2 и TGC проинструктируют и напомнят о необходимости воздержаться от приема дозы Соединения 9 и пищи в день визита, во время которого будут взяты додозовые образцы РК Соединения 9. Участников проинструктируют и напомнят указать дату и время их предыдущей дозы исследуемого препарата Соединения 9, а также дату и время последнего приема пищи или перекуса.

Корректировки сроков забора крови могут быть осуществлены на основе появляющихся данных фармакокинетики. Дополнительные образцы РК могут быть собраны и оценены во время исследования, если это оправдано (*например*, в случае получения участником ограниченных лекарственных средств или в случае возникновения проблем с безопасностью или передозировкой в ходе исследования).

Таблица D.

Визит в рамках исследования	Время взятия образца
Цикл 1, День 1	До инфузии Сразу после инфузии ANTIBODY Y (≤ 10 мин) ^a Сразу после инфузии ретифанлимаба (≤ 10 мин), если применимо

	Через 6 часов после инфузии (± 1 час) ANTIBODY Y
Цикл 1, День 2	В любой момент
Цикл 1, День 8	В любой момент
Цикл 1, День 15, если по схеме введения ANTIBODY Y 1 раз в 2 недели	До инфузии Сразу после инфузии ANTIBODY Y (≤ 10 мин)
Цикл 1, День 15, если по схеме введения ANTIBODY Y 1 раз в 4 недели	В любой момент
Цикл 1, День 22	В любой момент
Цикл 2, День 1	До инфузии Сразу после инфузии ANTIBODY Y (≤ 10 мин) ^a Сразу после инфузии ретифанлимаба (≤ 10 мин), если применимо
Цикл 2, День 8	В любой момент
День 1 каждого второго цикла, начиная со Дня 1 Цикла 4 (т. е. C4D1, C6D1, C8D1 и т. д.)	До инфузии
Последующий визит для оценки безопасности через 30 дней	В любой момент

^a Образец должен быть собран до начала инфузии ретифанлимаба, если это применимо

Таблица Е.

Визит в рамках исследования	Время взятия образца
Цикл 1, День 1	До инфузии ANTIBODY Y и до введения дозы Соединения 9 Сразу после инфузии ANTIBODY Y (≤ 10 мин) ^a Сразу после инфузии ретифанлимаба (≤ 10 мин), если применимо Через 1 час после введения Соединения 9 (± 15 мин), оценивать будут только Соединение 9 Через 2 часа после введения Соединения 9 (± 15 мин), оценивать будут только Соединение 9

	Через 4 часа после введения Соединения 9 (\pm 30 мин), оценивать будут только Соединение 9 Через 6 часов после инфузии (\pm 1 час) ANTIBODY Y
Цикл 1, День 2	До введения дозы для Соединения 9
Цикл 1, День 8	До введения дозы для Соединения 9
Цикл 1, День 15, если по схеме введения ANTIBODY Y 1 раз в 2 недели	До инфузии и до введения дозы Соединения 9 Сразу после инфузии ANTIBODY Y (\leq 10 мин)
Цикл 1, День 15, если по схеме введения ANTIBODY Y 1 раз в 4 недели	До введения дозы для Соединения 9
Цикл 1, День 22	В любой момент
Цикл 2, День 1	До инфузии и до введения дозы Соединения 9 Сразу после инфузии ANTIBODY Y (\leq 10 мин) ^a Сразу после инфузии ретифанлимаба (\leq 10 мин), если применимо Через 1 час после введения Соединения 9 (\pm 15 мин), оценивать будут только Соединение 9 Через 2 часа после введения Соединения 9 (\pm 15 мин), оценивать будут только Соединение 9 Через 4 часа после введения Соединения 9 (\pm 30 мин), оценивать будут только Соединение 9 Через 6 часов после инфузии (\pm 1 час) ANTIBODY Y
Цикл 2, День 8	В любой момент
Цикл 4, День 1	До инфузии и до введения дозы Соединения 9 Сразу после инфузии ANTIBODY Y (\leq 10 мин) ^a Сразу после инфузии ретифанлимаба (\leq 10 мин), если применимо
День 1 каждого второго цикла, начиная со Дня 1 Цикла 6 (т. е. С6D1, С8D1, С10D1 и т. д.)	До инфузии (в эти моменты времени будут собираться только РК-образцы ANTIBODY Y и ретифанлимаба)
Последующий визит для оценки безопасности через 30	В любой момент

дней	
------	--

^a Образец должен быть собран до начала инфузии ретифанлимаба, если это применимо

Антилекарственные антитела

Образцы крови будут собирать для обнаружения сывороточных антилекарственных антител (ADA) к ANTIBODY Y или ретифанлимабу (если это применимо) в моменты времени, указанные в Таблице F. Образцы крови будут собирать из руки, противоположной месту внутривенной инфузии. Если используется постоянный катетер, жидкость в катетере будет удалена и выброшена перед сбором образца крови для оценки ADA. ADA будут обнаруживать с помощью валидированного анализа. Образцы сыворотки будут скринироваться на наличие антител, связывающихся с ANTIBODY Y или ретифанлимабом (если это применимо), и будет определяться титр подтвержденных положительных образцов. Для верификации стабильности антител и/или дополнительной характеристики иммуногенности могут быть выполнены и другие анализы.

Таблица F.

Визит в рамках исследования	Время взятия образца
Цикл 1, День 1	До инфузии ANTIBODY Y и ретифанлимаба (если это применимо)
Цикл 1, День 8	В любой момент
Цикл 1, День 15, если по схеме введения ANTIBODY Y 1 раз в 2 недели	До инфузии ANTIBODY Y
Цикл 1, День 15, если по схеме введения ANTIBODY Y 1 раз в 4 недели	В любой момент
День 1 каждого второго цикла, начиная со Дня 1 Цикла 2 (т. е. C2D1, C4D1, C6D1 и т. д.)	До инфузии ANTIBODY Y и ретифанлимаба (если это применимо)
Последующий визит для оценки безопасности через 30 дней	В любой момент

VIII. Критерии включения

Участники могут быть включенными в исследование, только если выполняются все следующие критерии.

1. Способность понимать и готовность подписать письменную форму ICF на исследование.
2. Участник мужского или женского пола в возрасте 18 лет и старше включительно

на момент подписания ICF.

3. Должен быть готов и способен соответствовать всем требованиям Протокола, включая все запланированные визиты и процедуры согласно Протоколу.

4. Готовность к биопсии опухоли до и после лечения (основную или эксцизионную).

5. Для участников в группе TGA Фазы 1a и Фазы 1b: Требуется свежая биопсия перед лечением. Архивная фиксированная формалином и залитая в парафин (FFPE) ткань (предпочтительно по меньшей мере 1 блок ткани или по меньшей мере 6 предметных стекол) приемлема для учета в прескрининге для определения статуса CD8+ Т-лимфоцитов, если давность образца ≤ 12 месяцев. Тонкоигольные аспираты неприемлемы. Если участник квалифицируется на основании CD8+ Т-лимфоцитов в архивном образце биопсии, ему все равно потребуется пройти свежую биопсию в процессе скрининга.

6. Для участников в группах TGB1, TGB2 и TGC Фазы 1a и Фазы 1b: Требуется свежая биопсия перед лечением. Тем не менее, архивная ткань FFPE (предпочтительно по меньшей мере 1 блок ткани или 20 предметных стекол или минимум 15 предметных стекол) приемлема, если давность образца ≤ 12 месяцев. Тонкоигольные аспираты неприемлемы.

7. Биопсия опухоли перед лечением будет взята как часть прескрининга.

8. Биопсия не потребуется для участников когорт раннего повышения дозы в каждой из групп лечения в Фазе 1a повышения дозы.

9. Наличие положительных по CD8 Т-клеткам опухолей на основе определения CD8+ Т-лимфоцитов посредством иммуногистохимии (ИНС), выполненной на биопсийной ткани опухоли до лечения. В рамках прескрининга проводится предварительный отбор опухолей, положительных по CD8 Т-клеткам, согласно определению спонсора. Наличие положительных по CD8 Т-клеткам опухолей не потребуется для участников когорт раннего повышения дозы в каждой из групп лечения в Фазе 1a повышения дозы.

10. Статус по шкале Восточной совместной онкологической группы (ECOG) 0 или 1.

11. Поддающееся измерению заболевание в соответствии с RECIST v1.1. Опухолевые очаги, расположенные в ранее облученной области или в области, подвергшейся другой местно-регионарной терапии, могут быть выбраны в качестве целевых поражений только в том случае, если в таких поражениях было продемонстрировано прогрессирование. Рекомендуется, чтобы опухолевые очаги, отобранные для биопсии, не выбирались в качестве целевых поражений.

12. Когорты раннего уровня дозы фазы 1a только в каждой из групп лечения: Участники с распространенными или метастатическими солидными опухолями, у которых наблюдается прогрессирование заболевания после лечения доступными методами, включая терапию анти-PD-(L)1 (если это применимо), которые, как известно, приносят клиническую пользу, или участники, которые не переносят стандартное лечение или не подходят для его назначения. Предыдущая терапия с применением анти-PD-(L)1 не должна была быть прекращена из-за непереносимости. Местнораспространенное заболевание не должно поддаваться резекции с лечебной целью или другим лечебным методам лечения или

процедурам.

13. Участники с SCCHN:

Участники с гистологически или цитологически подтвержденным плоскоклеточной карциномой полости рта, ротоглотки, гортаноглотки или гортани, не поддающейся местной терапии с лечебной целью (хирургическое вмешательство или облучение с химиотерапией или без нее).

Примечание: Исключаются карциномы носоглотки, слюнных желез или неплюскоклеточные опухоли.

Участники должны иметь прогрессирование заболевания после лечения доступными методами, включая терапию анти-PD-(L)1 (отдельно или в составе комбинации), которые, как известно, приносят клиническую пользу, или участники, которые не переносят стандартное лечение или не подходят для его назначения. Предыдущая терапия с применением анти-PD-(L)1 не должна была быть прекращена из-за непереносимости.

14. Участники с определенными злокачественными новообразованиями ЖКТ: Гистологически или цитологически подтвержденный распространенный или метастатический CRC, рак GEJ, HCC, PDAC или SCAC.

Участники должны иметь прогрессирование заболевания после лечения доступными методами, включая терапию анти-PD-(L)1 (если это применимо), которые, как известно, приносят клиническую пользу, или участники, которые не переносят стандартное лечение или не подходят для его назначения. Предыдущая терапия с применением анти-PD-(L)1 не должна была быть прекращена из-за непереносимости.

15. Для участников, которые будут набраны в когорты, включая Соединение 9: Способность проглатывать пероральные лекарственные средства.

16. Готовность избежать беременности или отцовства на основании следующих критериев:

Участники мужского пола с репродуктивным потенциалом должны согласиться принять соответствующие меры предосторожности, чтобы избежать отцовства детей (с вероятностью по меньшей мере 99%), и воздерживаться от донорства спермы с момента скрининга до 190 дней после приема последней дозы исследуемого препарата. Разрешенные методы, эффективность которых в предотвращении беременности составляет по меньшей мере 99%, должны быть доведены до сведения участников и подтверждено их понимание.

Участницы, являющиеся женщинами с детородным потенциалом (WOCBP), должны иметь отрицательный тест на беременность при скрининге (анализ сыворотки крови) и перед приемом первой дозы препарата в День 1 (анализ мочи) и должны согласиться принимать соответствующие меры предосторожности, чтобы избежать беременности (с вероятностью по меньшей мере 99%) и воздерживаться от донорства ооцитов с момента скрининга до 190 дней после приема последней дозы исследуемого препарата. Разрешенные методы, эффективность которых в предотвращении беременности составляет по меньшей мере 99%, должны быть доведены до сведения участников и подтверждено их

понимание.

Участницы женского пола не детородного возраста могут участвовать в исследовании.

IX. Критерии исключения

Участники исключаются из исследования, если применяется любой из следующих критериев.

1. Клинически значимое заболевание сердца, нестабильная стенокардия, острый инфаркт миокарда в пределах 6 месяцев до Цикла 1, День 1, а также застойная сердечная недостаточность класса III или IV по классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации.

2. Анамнез или наличие отклонений на электрокардиограмме (ЭКГ), которые, по мнению исследователя, имеют клиническое значение. Для участников, которые должны быть набраны в когорты, включающие Соединение 9, исключается скрининговый интервал QT, скорректированный по интервалу Fridericia (QTcF) > 450 миллисекунд (мс); в случае, если один скорректированный интервал QT (QTc) составляет > 450 мс, участник может быть включен, если средний QTc для 3 ЭКГ составляет <450 мс.

3. Известные активные метастазы в центральную нервную систему (ЦНС) и/или карциноматозный менингит. Участники, которые ранее получали лечение и имели клинически стабильные метастазы в головной мозг или ЦНС (без признаков прогрессирования по данным визуализации в течение по меньшей мере 4 недель до первой дозы исследуемого препарата и любые неврологические симптомы вернулись к исходному уровню), не имеют признаков новых или увеличивающихся метастазов в головной мозг или отека ЦНС, и им не требовались стероиды в течение по меньшей мере 7 дней до начала исследуемого лечения.

4. Участники с активным или неактивным аутоиммунным заболеванием или синдромом (*например*, ревматоидный артрит, умеренный или тяжелый псориаз, рассеянный склероз, воспалительное заболевание кишечника), которые требуют системного лечения в течение последних 2 лет или которые получают системную терапию аутоиммунного или воспалительного заболевания (*например*, с применением агентов, модифицирующих заболевание, кортикостероидов или иммунодепрессантов). Участники с витилиго или разрешенной детской астмой/атопией, гипотиреозом, стабильным при заместительной гормональной терапии, контролируемой астмой, диабетом I типа, болезнью Грейвса или болезнью Хашимото, или с одобрения медицинского монитора, будут иметь право на участие, если они соответствуют всем другим критериям приемлемости. Заместительная терапия (*например*, тироксин, инсулин или физиологическая кортикостероидная заместительная терапия при недостаточности надпочечников или гипофиза) не считается формой системного лечения и разрешена.

5. Диагноз иммунодефицита или хроническая системная стероидная терапия (в дозах > 10 мг в сутки преднизолона или его эквивалента) или любая другая форма иммуносупрессивной терапии в пределах 7 дней до первой дозы исследуемого препарата.

Допускается применение коротких курсов стероидов с целью профилактики, ингаляционных или местных стероидов или системных кортикостероидов ≤ 10 мг/сут.

6. Известное дополнительное злокачественное новообразование, которое прогрессирует или требует активного лечения, или другое злокачественное новообразование в анамнезе в пределах 2 лет до первой дозы исследуемого препарата, за исключением излеченного базально-клеточной или плоскоклеточной карциномы кожи, поверхностного рака мочевого пузыря, интраэпителиального новообразования предстательной железы, карциномы *in situ* шейки матки, или другое неинвазивное или индолентное злокачественное новообразование, или рак, от которого участник излечился в течение > 1 года после лечения, назначенного с лечебной целью.

7. Участники с лабораторными показателями при скрининге, как указано в Таблице G.

Таблица G.

Лабораторный показатель	Критерий исключения
Гематология	
Тромбоциты	$< 100 \times 10^9/\text{л}$
Гемоглобин	< 9 г/дл или $< 5,6$ ммоль/л <i>Примечание:</i> Для удовлетворения этого критерия допустимо переливание крови.
Абсолютное число нейтрофилов (ANC)	$< 1 \times 10^9/\text{л}$
Печень	
Аланинаминотрансфераза (ALT)	$\geq 2,5 \times$ верхняя граница нормы (ULN) или $\geq 5 \times \text{ULN}$ у участников с метастазами в печень или HCC
Аспаратаминотрансфераза (AST)	$\geq 2,5 \times \text{ULN}$ или $\geq 5 \times \text{ULN}$ у участников с метастазами в печень или HCC
Общий билирубин	$\geq 1,5 \times \text{ULN}$, за исключением случаев, когда конъюгированный билирубин $\leq \text{ULN}$ (конъюгированный билирубин необходимо определять только в том случае, если общий билирубин превышает ULN). Если нет установленной ULN, то прямой билирубин должен составлять $< 40\%$ от общего билирубина.
Щелочная фосфатаза	$\geq 2,5 \times \text{ULN}$ Участники с 1) метастазами в кости и 2)

	отсутствием метастазов в паренхиму печени при скрининговых рентгенографических исследованиях могут быть включены, если уровень щелочной фосфатазы составляет $< 5 \times \text{ULN}$. Участники с 1) метастазами в кости и 2) отсутствием метастазов в паренхиму печени при скрининговых рентгенографических исследованиях могут быть включены, если уровень щелочной фосфатазы составляет $< 5 \times \text{ULN}$, только с разрешения медицинского монитора.
Альбумин	< 3 г/дл
Почки	
Клиренс креатинина сыворотки	< 60 мл/мин по формуле Кокрофта-Голта.
Коагуляция	
Международное нормализованное отношение (INR) или протромбиновое время (PT)	$> 1,5 \times \text{ULN}$, за исключением случаев приема терапевтических антикоагулянтов и стабильного состояния.
Активированное частичное тромбопластиновое время (aPTT)	$> 1,5 \times \text{ULN}$

8. До начала лечения токсические эффекты предшествующей терапии (включая предшествующую иммунотерапию) и/или осложнения после предшествующего хирургического вмешательства не восстановились до \leq степени 1. Исключение составляют участники со стабильными хроническими заболеваниями (\leq степени 2), которые, как ожидается, не разрешатся (например, нейропатия и алопеция), и такие могут быть включены в исследование.

9. Признаки интерстициального заболевания легких, интерстициальное заболевание легких в анамнезе или активный неинфекционный пневмонит.

10. Иммунозависимая токсичность во время предшествующей иммунотерапии, из-за которой рекомендуется прекращение терапии на постоянной основе (в соответствии с этикеткой продукта или согласованными рекомендациями) или любая иммунозависимая токсичность, требующая интенсивной или длительной иммуносупрессии, за исключением эндокринопатии, которая хорошо контролируется заместительной гормональной терапией.

11. Предшествующее лечение любыми препаратами, воздействующими на путь аденозина (например, антагонисты рецептора A2A и/или рецептора A2B, антагонисты анти-CD38, анти-CD39, анти-CD-73/CD73). Участники, которые будут включены в когорту

повышения дозы (Фаза 1a) и получали монотерапию Соединением 9, могут быть допущены к участию в исследовании после одобрения медицинским монитором.

12. Любая предшествующая химиотерапия, биологическая терапия или таргетная терапия для лечения заболевания участника в пределах 5 периодов полужизни или 28 дней (в зависимости от того, что короче) до первой дозы исследуемого препарата. Участники, получающие деносумаб, могут быть допущены к участию в исследовании. Период вымывания после терапии анти-PD-(L)1 не требуется (однако до приема первой дозы исследуемого препарата должен быть завершен по меньшей мере 1 цикл последней предшествующей терапии анти-PD-(L)1). Любая предшествующая лучевая терапия в пределах 28 дней до первой дозы исследуемого препарата. Участники, получившие лучевую терапию, не должны иметь любых токсических эффектов, связанных с облучением, не должны нуждаться в кортикостероидах для этих целей и не должны иметь лучевого пневмонита в результате лечения.

13. Лечение другим исследуемым препаратом или лечение исследуемым препаратом в пределах 5 периодов полужизни или 28 дней (в зависимости от того, что короче) до приема первой дозы исследуемого препарата. В случае, если участник получал какое-либо лечение в связи с признаками или симптомами коронавирусной болезни 2019 (COVID-19), следует обращаться к медицинскому монитору.

14. Для участников, которые будут зачислены в когорты, включающие Соединение 9: сопутствующее лечение сильными ингибиторами или индукторами цитохрома P450 3A4 (CYP3A4). Для включения в исследование пациентов, ранее принимавших сильные индукторы CYP3A4, требуется период "вымывания" в течение ≥ 14 дней перед приемом первой дозы Соединения 9. Для включения в исследование пациентов, ранее принимавших сильные ингибиторы CYP3A4, требуется период "вымывания" в течение ≥ 5 периодов полужизни перед приемом первой дозы Соединения 9.

15. Получение живой вирусной вакцины в пределах 30 дней до введения первой дозы исследуемого препарата. Примерами живых вакцин являются, помимо прочего, следующие: вакцина против кори, паротита, краснухи, ветряной оспы/опоясывающего герпеса, желтой лихорадки, бешенства, болезни, вызываемой бациллой Кальметта-Герена (Calmette-Guérin), и брюшного тифа. Инъекционные вакцины против сезонного гриппа, как правило, представляют собой вакцины с убитым вирусом и разрешены; однако интраназальные противогриппозные вакцины являются живыми аттенуированными вакцинами и не разрешены.

16. Инфекция, требующая парентерального введения антибиотиков, противовирусных или противогрибковых препаратов в пределах 1 недели до приема первой дозы исследуемого препарата.

17. Известная или предполагаемая инфекция тяжелого острого респираторного синдрома, вызванного коронавирусом-2 (SARS-CoV-2) на момент включения в исследование. Участники, не прошедшие скрининг по причине инфицирования SARS-CoV-2, могут быть повторно включены в исследование (т.е. повторно пройти скрининг) после

отрицательного теста на SARS-CoV-2 и клинического выздоровления по оценке исследователя.

18. Активная инфекция, вызванная вирусом гепатита В (HBV) или вирусом гепатита С (HCV), требующая лечения. HBV-DNA и HCV-RNA не должны обнаруживаться. Участники, которые излечились от предшествующей HBV-инфекции (что определяется по отрицательному поверхностному антигену гепатита В (HBsAg), положительным антителам к HBsAg и положительным антителам к сердцевинному (core) антигену вируса гепатита В (антитела анти-HBc). Для участников которые излечились от предшествующей HBV-инфекции, профилактику HBV следует рассматривать по усмотрению исследователя. Следует контролировать реактивацию HBV каждые 3 цикла, выполняя тесты на вирусную нагрузку HBV и серологические тесты на HBsAg. Дополнительные вирусные серологические тесты могут быть выполнены по усмотрению исследователя. В исследовании могут быть включены участники без предшествующей HBV-инфекции в анамнезе, которые были вакцинированы против HBV и имеют положительные антитела против HBsAg в качестве единственного доказательства предшествующего контакта с вирусом. Участники с положительной реакцией на антитела к HCV, получившие и завершившие лечение гепатита С, направленное на эрадикацию вируса, могут участвовать в исследовании, если уровень HCV-RNA гепатита С не определяется. Анализ на антитела к HCV разрешен для скрининга в странах, где HCV-RNA не входит в стандарт медицинской помощи (SoC). В этих случаях участники, положительные по антителам к HCV, будут исключены из исследования.

19. Известное инфицирование HIV (антитела к HIV 1/2).

20. Пересадка органов в анамнезе, включая аллогенную трансплантацию стволовых клеток или терапию CAR-T-клетками.

21. Известная гиперчувствительность или тяжелая реакция на любой компонент исследуемого препарата(ов) или компонентов состава.

22. Для участников, которые должны быть набраны в когорты, включающие Соединение 9: Неспособность проглотить пищу или любое сопутствующее состояние верхних отделов желудочно-кишечного тракта, препятствующее приему пероральных препаратов.

23. Беременные или кормящие грудью.

24. Любое состояние, которое, по мнению исследователя, может помешать полноценному участию в исследовании, включая назначение исследуемого лечения и осуществление необходимых визитов в рамках исследования; представляет значительный риск для участника; или препятствует интерпретации данных исследования.

25. Для исследований, проведенных во Франции: Во Франции исключаются следующие участники: уязвимые группы населения в соответствии со статьей L.1121-6 Кодекса общественного здравоохранения Франции и взрослые, находящиеся под правовой защитой или неспособные выразить свое согласие в соответствии со статьей L.1121-8. Кодекса общественного здравоохранения Франции.

Х. Цели и конечные точки**Таблица Н.**

Цели	Конечные точки
Первичные	
<p>Оценить безопасность, переносимость, DLT и определить RDE препарата ANTIBODY Y в качестве монотерапии и комбинированного лечения ANTIBODY Y с ретифанлимабом и/или Соединением 9 у участников с распространенными солидными опухолями.</p>	<p>DLT АЕ, оцениваемые при физикальном обследовании, оценке изменений жизненных показателей и ЭКГ, а также при клинико-лабораторных исследованиях образцов крови. Влияние на исследуемое лечение, оцениваемое по перерывам в лечении, снижению дозы и отмене исследуемого лечения из-за АЕ.</p>
Вторичные	
<p>Оценить фармакокинетику препарата ANTIBODY Y в качестве монотерапии или в комбинации с ретифанлимабом и/или Соединением 9 у участников с распространенными солидными опухолями.</p>	<p>PK-параметры для препарата ANTIBODY Y, включая максимальную наблюдаемую концентрацию в плазме (C_{max}), t_{max}, концентрацию в конце интервала дозирования (C_{tau}), площадь под кривой «концентрация-время» (AUC), общий клиренс (CL), объем распределения (V_z) и период полужизни ($t_{1/2}$), считаются необходимыми.</p>
<p>Оценить внутриопухолевую фармакодинамическую активность препарата ANTIBODY Y в качестве монотерапии у участников с распространенными солидными опухолями.</p>	<p>Блокада ферментативной активности CD73.</p>
<p>Определить предварительную эффективность препарата ANTIBODY Y в качестве монотерапии или в комбинации с ретифанлимабом и/или Соединением 9 с точки зрения показателя объективного</p>	<p>Объективный ответ: CR или PR, определяемые исследователем по рентгенографической оценке заболевания в соответствии с RECIST v1.1. Контроль заболевания: CR или PR, или</p>

<p>ответа (ORR), показателя контроля заболевания (DCR) и продолжительности ответа (DOR) у участников с выбранными распространенными солидными опухолями.</p>	<p>стабильное заболевание (SD), определяемые исследователем по рентгенографической оценке заболевания в соответствии с RECIST v1.1.</p> <p>Продолжительность ответа: время от самой ранней даты ответа заболевания (CR или PR) до самой ранней даты прогрессирования заболевания, определяемых исследователем по рентгенографической оценке заболевания в соответствии с RECIST v1.1, или смерти по любой причине, если она наступила раньше, чем прогрессирование.</p>
Поисковые	
<p>Оценить фармакокинетику ретифанлимаба в комбинации с ANTIBODY Y (двойная комбинация) или ANTIBODY Y и Соединением 9 (тройная комбинация) у участников с распространенными солидными опухолями.</p>	<p>PK-параметры для ретифанлимаба, включая C_{max}, t_{max}, C_{tau}, AUC, V_z и $t_{1/2}$, считаются необходимыми.</p>
<p>Оценить фармакокинетику Соединения 9 в комбинации с ANTIBODY Y (двойная комбинация) или ANTIBODY Y и ретифанлимабом (тройная комбинация) у участников с распространенными солидными опухолями.</p>	<p>PK-параметры для Соединения 9, включая C_{max}, t_{max}, C_{tau}, AUC, кажущийся общий клиренс (CL/F), кажущийся объем распределения (V_z/F) и $t_{1/2}$, считаются необходимыми.</p>
<p>Изучить биомаркеры, которые являются предикторами фармакологической активности и/или коррелируют с клинической безопасностью или эффективностью.</p>	<p>Аналиты крови и/или опухоли и другие значимые биомаркеры в отношении показателей безопасности и эффективности.</p>
<p>Оценить иммуногенность ANTIBODY Y и ретифанлимаба у участников с распространенными солидными опухолями.</p>	<p>Иммуногенность, определяемая как появление специфических ADA к ANTIBODY Y или ретифанлимабу.</p>

Пример А: Активность ингибиторов A_{2A}/A_{2B}

I. Анализ A_{2A} Tag-lite® HTRF

Анализы проводили в черных полистироловых планшетах малого объема на 384 лунки (Greiner 784076-25) в конечном объеме 10 мкл. Тестируемые соединения вначале последовательно разбавляли в ДМСО и вносили по 100 нл в лунки планшета перед добавлением других компонентов реакции. Конечная концентрация ДМСО составляла 1%. Клетки, меченые Tag-lite® аденозином A_{2A} (CisBio C1TT1A2A) разбавляли 1:5 в буфере Tag-lite (CisBio LABMED) и центрифугировали 1200 g в течение 5 минут. Осадок ресуспендировали в объеме 10,4 X начального объема клеточной суспензии в буфере Tag-lite и прибавляли флуоресцентный лиганд антагониста аденозинового рецептора A_{2A} Red (CisBio L0058RED) в конечной концентрации 12,5 нМ. 10 мкл смеси клеток и лиганда прибавляли в аналитические лунки и инкубировали при комнатной температуре в течение 45 минут перед считыванием на планшет-ридере PHERAstar FS (BMG Labtech) с оптическим модулем HTRF 337/620/665. Рассчитывали процент связывания флуоресцирующего лиганда, при этом 100 нМ контрольного антагониста A_{2A}, ZM 241385 (Tocris 1036) вытесняют лиганд на 100%, а 1% ДМСО - на 0%. Данные % связывания по сравнению с логарифмом концентрации ингибитора соответствовали модели конкурентного связывания с одним сайтом (GraphPad Prism, версия 7.02), где константа лиганда=12,5 нМ и лиганд K_d=1,85 нМ. Данные K_i, полученные этим методом, приведены в Таблице 6.

II. Количественный анализ циклического AMP GS аденозинового рецептора A_{2B}

Стабильно трансфицированные клетки HEK-293, экспрессирующие человеческий аденозиновый рецептор A_{2B} (Perkin Elmer), поддерживали в культуральной среде MEM с 10% FBS и 100 мкг/мл генетицин (Life Technologies). За 18-24 часа до анализа генетицин удаляли из культуры. Набор cisbio cAMP-GS Dynamic, использующий технологию FRET (флуоресцентный резонансный перенос энергии), использовали для измерения накопления cAMP в клетках. Соединения по настоящему изобретению в подходящей концентрации смешивали с 10000 клетками/лунку в 96-луночных белых планшетах с половинным объемом лунок (Perkin Elmer) в течение 30 мин при комнатной температуре, осторожно встряхивая. Агонист NECA (R&D Technologies) в количестве 12 нМ добавляли в каждую лунку на 60 мин при комнатной температуре, осторожно встряхивая. Реагенты для обнаружения, d2-меченный cAMP (акцептор) и криптант анти-cAMP (донор) добавляли в каждую лунку на 60 мин при комнатной температуре, осторожно встряхивая. Планшеты считывали на Pherastar (BMG Labtech), рассчитывали соотношение флуоресценции 665/620, а определение EC₅₀ выполняли путем подбора кривой процента контроля по сравнению с логарифмом концентрации соединения с помощью программы GraphPad Prism. Данные EC₅₀, полученные этим методом, приведены в Таблице 6.

Таблица 6. Данные A_{2A} K_i (Пример А(I)) и данные A_{2B} cAMP EC₅₀ (Пример А(II)) приведены ниже.

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

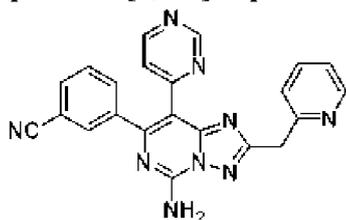
† означает, что A_{2A}_K_i или A_{2B}_cAMP_EC₅₀ ≤ 10 нМ,

†† означает, что A_{2A}_K_i или A_{2B}_cAMP_EC₅₀ > 10 нМ, но ≤ 100 нМ,

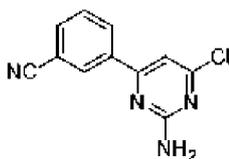
††† означает, что A_{2A}_K_i или A_{2B}_cAMP_EC₅₀ > 100 нМ, но ≤ 1 мкМ,

†††† означает, что A_{2A}_K_i или A_{2B}_cAMP_EC₅₀ составляет более 1 мкМ.

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

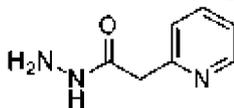


Стадия 1: 3-(2-амино-6-хлортиримидин-4-ил)бензонитрил



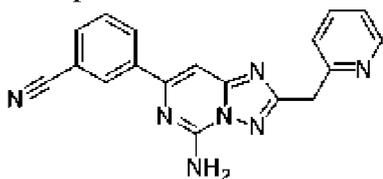
Смесь 4,6-дихлорпиримидин-2-амина (2,5 г, 15,2 ммоль), (3-цианофенил)бороновой кислоты (2,02 г, 13,7 ммоль), тетракис(трифенилфосфин)палладия(0) (1,06 г, 0,92 ммоль) и карбонат натрия (3,23 г, 30,5 ммоль) в 1,4-диоксане (60 мл) и воду (5 мл) дегазировали азотом, затем полученную смесь нагревали и перемешивали при 60 °С в течение двух дней. После охлаждения до комнатной температуры (комн.темп.) смесь концентрировали, разбавляли водой и экстрагировали ДХМ (30 мл x 3). Объединенные органические слои сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали. Образовавшийся остаток очищали с помощью флеш-хроматографии на колонке с силикагелем с элюированием 8% EtOAc в дихлорметане с получением искомого продукта. ЖХМС рассчитано для C₁₁H₈ClN₄ (M+H)⁺: 231,0. Получено 231,0.

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



Гидразин (4,15 мл, 132 ммоль) добавляли к этанольному (66 мл) раствору метил-2-(пиридин-2-ил)ацетата (10 г, 66,2 ммоль) при комнатной температуре. Смесь нагревали и перемешивали при 85°С в течение 4 часов, а затем охлаждали до комнатной температуры. При отстаивании образовывалось белое твердое вещество, которое собирали фильтрованием и использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХМС рассчитано для C₇H₁₀N₃O (M+H)⁺: 152,1; получено 152,0.

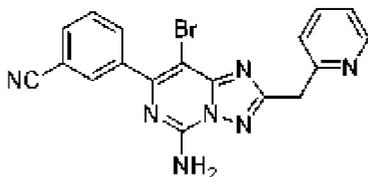
Стадия 3: 3-(5-Амино-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил



2-(пиридин-2-ил)ацетогидразид (2,62 г, 17,34 ммоль) добавляли к этанольному (35 мл) раствору 3-(2-амино-6-хлорпиримидин-4-ил)бензонитрила (4,00 г, 17,34 ммоль) при комнатной температуре. После нагревания и перемешивания с обратным холодильником в течение 2 ч реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали. Образовавшийся остаток переносили в N, O-бис(триметилсилил)ацетамид (20 мл) и перемешивали при 120°С в течение 7 ч. Затем смесь охлаждали до комнатной температуры, выливали на лед и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Образовавшееся твердое вещество собирали фильтрованием и помещали в 20 мл 1 N раствора HCl. Образовавшуюся смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, фильтровали и водный слой нейтрализовали добавлением насыщенного раствора

NaHCO₃. Образовавшийся осадок собирали фильтрованием и сушили с получением искомого продукта в виде коричневого твердого вещества. ЖХМС рассчитано для C₁₈H₁₄N₇ (M+H)⁺: 328,1; обнаружено 328,1.

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

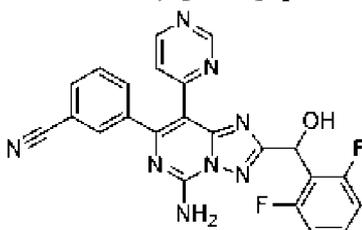


К смеси 3-(5-амино-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила (2 г, 6,11 ммоль) в DMF (12 мл) при -30°C порциями добавляли NBS (1,09 г, 6,11 ммоль). Реакционной смеси давали медленно нагреться до 0 °С, в результате чего получали гомогенный раствор. После перемешивания при 0°C в течение 1 ч реакционную смесь разбавляли насыщенным раствором NaHCO₃ и полученное твердое вещество собирали путем фильтрования. Затем твердое вещество очищали флэш-хроматографией на колонке с силикагелем с элюированием 0-10% MeOH в ДХМ с получением искомого продукта. ЖХМС рассчитано для C₁₈H₁₃BrN₇ (M+H)⁺: 406,0; получено 406,0.

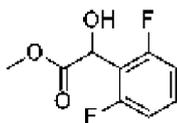
Стадия 5: 3-(5-Амино-2-(пиридин-2-илметил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил

Pd(PPh₃)₄ (284 мг, 0,246 ммоль) добавляли к смеси 4-(трибутилстаннил)пиримидина (1090 мг, 2,95 ммоль), 3-(5-амино-8-бром-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила (1000 мг, 2,46 ммоль) и хлорида меди(I) (244 мг, 2,46 ммоль) в 1,4-диоксане (12 мл). Реакционную смесь продували N₂ и перемешивали при 80°C в течение 7 ч. Образовавшуюся смесь охлаждали до комнатной температуры, концентрировали, разбавляли ДХМ (50 мл) и промывали насыщенным раствором NH₄OH. Органический слой сушили над Na₂SO₄, концентрировали и очищали с помощью препаративной ЖХМС (рН 2, ацетонитрил/вода с ТФУ) с получением продукта в виде соли ТФУ. ЖХМС рассчитано для C₂₂H₁₆N₉ (M+H)⁺: 406,2; получено 406,2. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО) δ 8,95 (с, 1H), 8,83 (д, J=5,3 Гц, 1H), 8,59 (д, J=5,1 Гц, 1H), 7,96 (м, 1H), 7,88 (д, J=5,1 Гц, 1H), 7,82 (д, J=7,6 Гц, 1H), 7,76 (с, 1H), 7,60-7,53 (м, 2H), 7,53-7,48 (м, 1H), 7,48-7,42 (м, 1H), 4,49 (с, 2H).

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



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

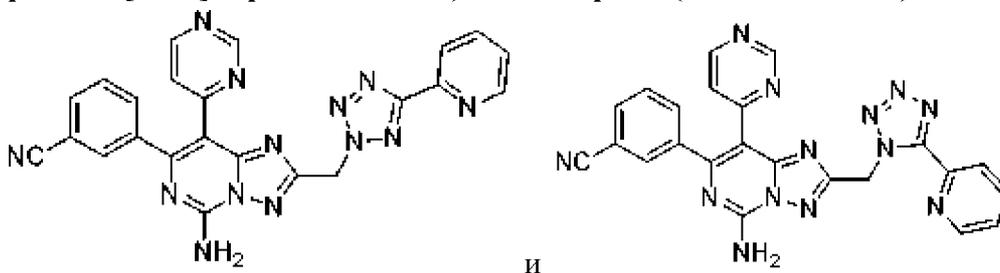


Концентрированную серную кислоту (1,42 мл, 27 ммоль) добавляли к метанольному (45 мл) раствору 2,6-дифторминдальной кислоты (5 г, 27 ммоль) при 0 °С. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч до концентрирования. К образовавшейся взвеси добавляли насыщенный раствор NaHCO_3 (30 мл). Образовавшуюся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

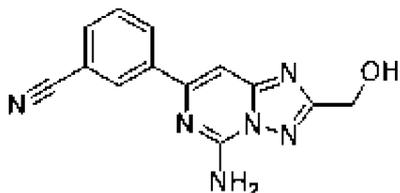
Стадия 2: 3-(5-Амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил

Это соединение было получено с помощью процедур, подобных описанным для Примера А1, с использованием метил-2-(2,6-дифторфенил)-2-гидроксиацетата вместо метил-2-(пиримидин-2-ил)ацетата на стадии 2. Два энантиомера разделяли хиральной SFC с колонкой Phenomenex Lux Cellulose-1 (21,2×250 мм, размер частиц 5 мкм), элюируя изократной подвижной фазой 25% MeOH в CO_2 со скоростью потока 80 мл/мин. Пик 1 выделяли и дополнительно очищали с помощью препаративной ЖХМС (pH=2, ацетонитрил/вода с ТФУ), с получением искомого продукта в виде соли ТФУ. ЖХМС рассчитано для $\text{C}_{23}\text{H}_{15}\text{F}_2\text{N}_8\text{O}$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺: $m/z=457,1$; получено 457,1. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО) δ 8,94 (д, $J=1,3$ Гц, 1H), 8,81 (д, $J=5,2$ Гц, 1H), 7,85 (дд, $J=5,3, 1,4$ Гц, 1H), 7,81 (dt, $J=7,4, 1,5$ Гц, 1H), 7,76 (t, $J=1,7$ Гц, 1H), 7,55 (dt, $J=7,8, 1,5$ Гц, 1H), 7,49 (t, $J=7,8$ Гц, 1H), 7,44 (tt, $J=8,4, 6,4$ Гц, 1H), 7,09 (t, $J=8,3$ Гц, 2H), 6,27 (с, 1H).

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

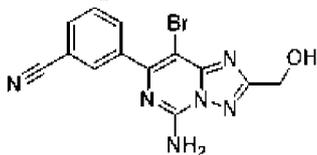


Стадия 1: 3-(5-амино-2-(гидроксиметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил



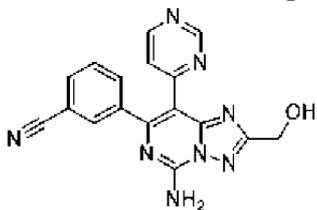
2-Гидроксиацетогидразид (2,34 г, 26,01 ммоль) добавляли к этанольному (35 мл) раствору 3-(2-амино-6-хлорпиримидин-4-ил)бензонитрила (4,00 г, 17,34 ммоль) (Пример А1, Стадия 1) при комнатной температуре. После нагревания и перемешивания с обратным холодильником в течение 2 ч реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и концентрировали. Образовавшийся остаток переносили в *N*, *O*-бис(триметилсилил)ацетамид (20 мл) и перемешивали при 120°C в течение 7 ч. Затем смесь охлаждали до комнатной температуры, выливали на лед и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Образовавшееся твердое вещество собирали фильтрованием и помещали в 20 мл 1 N раствора HCl. Образовавшуюся смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч, фильтровали и водный слой нейтрализовали добавлением насыщенного раствора NaHCO₃. Образовавшийся осадок собирали фильтрованием и сушили с получением искомого продукта в виде коричневого твердого вещества. ЖХМС рассчитано для C₁₃H₁₁N₆O (M+H)⁺: 267,1; обнаружено 267,1.

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



К смеси 3-(5-амино-2-(гидроксиметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила (1,0 г, 3,76 ммоль) в DMF (12 мл) при -30°C порциями добавляли NBS (0,67 г, 3,76 ммоль). Реакционной смеси давали медленно нагреться до 0 °С, в результате чего получали гомогенный раствор. После перемешивания при 0 °С в течение 1 ч реакционную смесь разбавляли насыщенным раствором NaHCO₃, искомым продуктом собирали фильтрованием и сушили. ЖХМС рассчитано для C₁₃H₁₀BrN₆O (M+H)⁺: 345,0; получено 345,0.

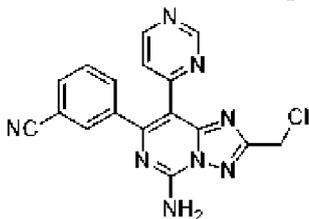
Стадия 3: 3-(5-Амино-2-(гидроксиметил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил



Тетракис(трифенилфосфин)палладий(0) (0,067 г, 0,058 ммоль) добавляли к смеси 4-(трибутилстаннил)пиримидина (0,321 г, 0,869 ммоль), 3-(5-амино-8-бром-2-(гидроксиметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила (0,20 г, 0,579 ммоль), CsF (0,176 г, 1,159 ммоль) и иодида меди(I) (0,022 г, 0,116 ммоль) в 1,4-диоксане (5,0 мл). Реакционную смесь продували N₂ и перемешивали при 80°C в течение 7 ч. Образовавшуюся смесь охлаждали до комнатной температуры, концентрировали и очищали колоночной флэш-хроматографией, элюируя 0%-10% метанолом в ДХМ, с получением искомого

продукта. ЖХМС рассчитано для $C_{17}H_{13}N_8O$ ($M+H$)⁺: 345,1; получено 345,1.

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



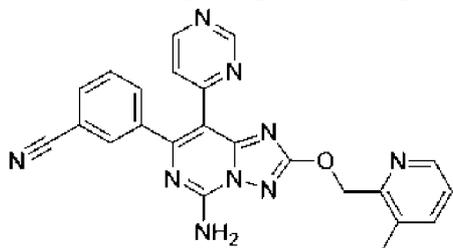
К смеси 3-(5-амино-2-(гидроксиметил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила (0,1 г, 0,290 ммоль) в ацетонитриле (10 мл) добавляли тионилхлорид (0,212 мл, 2,90 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре. в течение 5 ч, концентрировали и очищали флэш-хроматографией, элюируя 0%-5% метанолом в ДХМ с получением искомого продукта. ЖХМС рассчитано для $C_{17}H_{12}ClN_8$ ($M+H$)⁺: 363,1 ; получено 363,1.

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

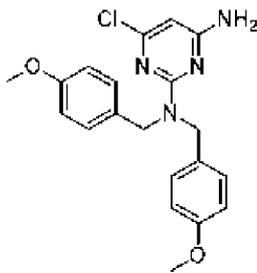
Смесь 3-(5-амино-2-(хлорметил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила (10 мг, 0,028 ммоль), 2-(1Н-тетразол-5-ил)пиримидин (8,1 мг, 0,055 ммоль) и Cs_2CO_3 (20,7 мг, 0,064 ммоль) в DMF (1 мл) перемешивали при 100 °С в течение 10 мин. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной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

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

Пример А4: Синтез 3-(5-Амино-2-((3-метилпиримидин-2-ил)метокси)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила

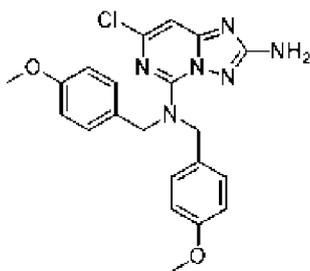


Стадия 1: 6-хлор-N²,N²-бис(4-метоксибензил)пиримидин-2,4-диамин



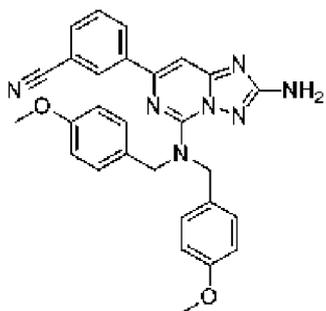
К раствору 2,6-дихлорпиримидин-4-амина (5,0 г, 31 ммоль) в 2-пропанол (31 мл) добавляли *N, N*-диизопропилэтиламин (6,4 мл, 37 ммоль) и бис(4-метоксибензил)амин (7,9 г, 31 ммоль). Образовавшийся раствор перемешивали при 100 °С в течение 16 ч, охлаждали до комнатной температуры, разбавляли водой (100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

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



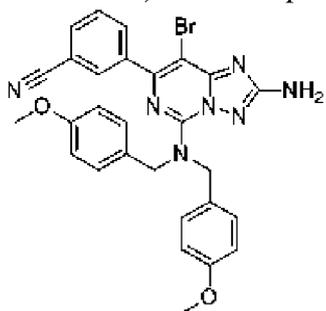
O-этилкарбоизоцианатидат (3,1 мл, 26 ммоль) добавляли к 1,4-диоксановому (5,0 мл) раствору 6-хлор--*N*²,*N*²-бис(4-метоксибензил)пиримидин-2,4-диамина (1,0 г, 2,6 ммоль) при комнатной температуре. Затем реакцию смесь перемешивали при 90°С в течение ночи, охлаждали до комнатной температуры и концентрировали. Образовавшийся материал растворяли в метаноле (12 мл) и этаноле (12 мл) и добавляли *N, N*-диизопропилэтиламин (0,91 мл, 5,2 ммоль), а затем гидрохлорид гидроксилamina (0,54 г, 7,8 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 45 °С в течение 2 ч, охлаждали до комнатной температуры и концентрировали. Образовавшийся материал помещали в EtOAc, промывали водой, сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали. Неочищенный материал затем очищали хроматографией на силикагеле, элюируя 0%-50% EtOAc в гексане с получением искомого продукта. ЖХМС рассчитано для $C_{21}H_{22}ClN_6O_2$ (M+H)⁺: 425,1; получено 425,2.

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



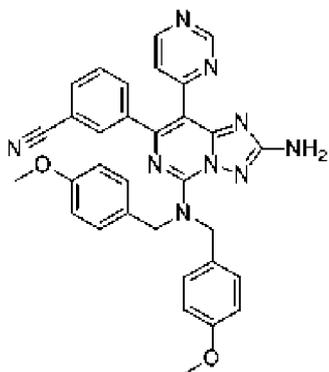
Хлор(2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-три-изопропил-1,1'-бифенил)(2'-амино-1,1'-бифенил-2-ил)палладий(II) (330 мг, 0,42 ммоль) добавляли к смеси (3-цианофенил)бороновой кислоты (460 мг, 3,2 ммоль), 7-хлор- N^5,N^5 -бис(4-метоксибензил)-[1,2,4]триазоло [1,5-*c*]пиримидин-2,5-диамина (890 мг, 2,1 ммоль) и карбоната натрия (890 мг, 8,4 ммоль) в 1,4-диоксане (8,8 мл) и воде (1,8 мл). Смесь продували N_2 и перемешивали при 95°C в течение ночи. Реакционную смесь затем охлаждали до комнатной температуры, концентрировали и очищали хроматографией на силикагеле, элюируя 0%-50% EtOAc в ДХМ с получением искомого продукта. ЖХМС рассчитано для $C_{28}H_{26}N_7O_2$ (M+H)⁺: 492,2; получено 492,2.

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



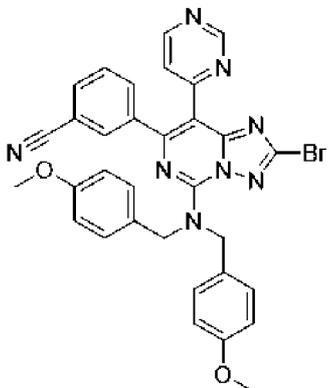
К раствору 3-(2-амино-5-(бис(4-метоксибензил)амино)-[1,2,4]триазоло[1,5-*c*]пиримидин-7-ил)бензонитрила (330 мг, 0,66 ммоль) в DMF (1,4 мл) медленно добавляли NBS (120 мг, 0,66 ммоль) при 0 °C. Затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 минут перед добавлением воды (10 мл). Образовавшееся твердое вещество собирали фильтрованием и сушили, получая искомый продукт. ЖХМС рассчитано для $C_{28}H_{25}BrN_7O_2$ (M+H)⁺: m/z=570,1; получено 570,2.

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



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

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

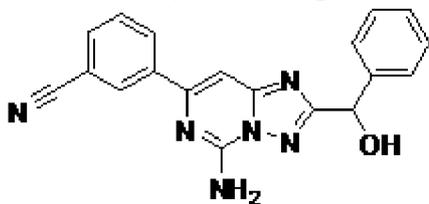


К смеси бромида меди(II) (91 мг, 0,407 ммоль) и *трет*-бутилнитрита (0,054 мл, 0,407 ммоль) в ацетонитриле (3 мл) в атмосфере азота при 50 °С по каплям добавляли 3-(2-амино-5-(бис(4-метоксибензил)амино)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил (100 мг, 0,203 ммоль) в ацетонитриле (3 мл). Смесь перемешивали при 50°С в течение 2 ч. После охлаждения до комнатной температуры добавляли 1 N водный раствор NH₄OH (20 мл) и смесь трижды экстрагировали CH₂Cl₂ (20 мл). Объединенные органические слои сушили над сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюируя смесью 50-100% этилацетат/гексан, с получением искомого продукта. ЖХМС рассчитано для $C_{32}H_{26}BrN_8O_2$ (M+H)⁺: m/z=633,1; получено 633,2.

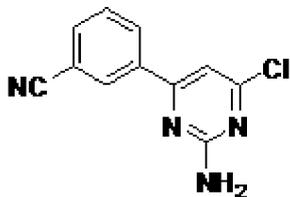
Стадия 7: 3-(5-Амино-2-((3-метилтиридин-2-ил)метокси)-8-(тиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил

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

Пример А5: Синтез 3-(5-Амино-2-(гидрокси(фенил)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила



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



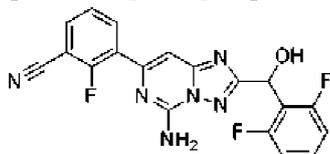
Смесь 4,6-дихлорпиримидин-2-амина (2,5 г, 15,24 ммоль), (3-цианофенил)бороновой кислоты (2,016 г, 13,72 ммоль), тетраakis(трифенилфосфин)палладия(0) (1,057 г, 0,915 ммоль) и карбонат натрия (3,23 г, 30,5 ммоль) в 1,4-диоксане (60 мл) и воду (5 мл) дегазировали азотом, затем полученную смесь нагревали при 60 °С в течение двух дней. После охлаждения до комнатной температуры (комн.темп.) смесь концентрировали, затем разбавляли водой и экстрагировали дихлорметаном (ДХМ, 3×30 мл). Объединенные органические слои сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографией на колонке с силикагелем с использованием 8% этилацетата (EtOAc) в дихлорметане с получением искомого продукта. ЖХМС рассчитано для $C_{11}H_8ClN_4$ (M+H)⁺: 231,0. Получено 231,0.

Стадия 2: 3-(5-Амино-2-(гидрокси(фенил)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил

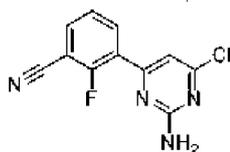
Раствор 3-(2-амино-6-хлорпиримидин-4-ил)бензонитрила (100 мг, 0,434 ммоль) и 2-гидрокси-2-фенилацетогидразида (108 мг, 0,650 ммоль) в этаноле (2 мл) нагревали и

перемешивали при 95°C в течение 3 ч. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь концентрировали досуха, переносили в *N*, *O*-бис(триметилсилил)ацетамид (1 мл) и перемешивали при 120°C в течение 7 ч. Образовавшуюся смесь охлаждали до комнатной температуры, выливали на лед и перемешивали в течение 1 ч. Образовавшуюся суспензию трижды экстрагировали ДХМ. Объединенные органические слои сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали. Остаток растворяли в метаноле (MeOH) и очищали препаративной ЖХМС (рН 2, ацетонитрил/вода с ТФУ) с получением искомого продукта в виде соли ТФУ. ЖХМС рассчитано для C₁₉H₁₅N₆O (M+H)⁺: 343,1; получено 343,1.

Пример А6: Синтез 3-(5-Амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-*c*]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрила

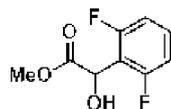


Стадия 1: 3-(2-амино-6-хлорпиримидин-4-ил)-2-фторбензонитрил



К раствору 3-бром-2-фторбензонитрила (18,3 г, 91 ммоль) в ТГФ (60 мл), охлажденному до 0 °С, добавляли комплекс *i*-PrMgCl LiCl (70,4 мл, 91 ммоль) в ТГФ (1,3 М) в течение 20 мин. Смесь перемешивали при 0°C в течение 50 мин, затем при 0°C добавляли хлорид цинка (48,1 мл, 91 ммоль) в 2-МеТГФ (1,9 М). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 25 мин, после чего одной порцией добавляли 4,6-дихлорпиримидин-2-амин (10 г, 61,0 ммоль). Раствор перемешивали в течение 10 мин. К смеси добавляли тетраakis(трифенилфосфин)палладий (1,41 г, 1,22 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. По завершении к реакционному раствору добавляли 2,4,6-тримеркаптопиримидиновый силикагель (2 г). Смесь перемешивали в течение 1 ч и фильтровали. Твердое вещество промывали этилацетатом до тех пор, пока искомый продукт полностью не элюировался (по данным ЖХМС). Фильтрат промывали насыщенным раствором хлорида аммония и водой. Органические слои концентрировали с получением неочищенного продукта. К неочищенному материалу добавляли воду и полученный осадок собирали фильтрованием и сушили в потоке азота. Неочищенный материал использовали далее без дополнительной очистки. ЖХМС рассчитано для C₁₁H₇ClFN₄ (M+H)⁺: m/z=249,0; получено 249,0.

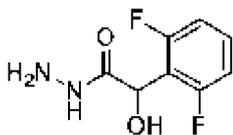
Стадия 2: Метил 2-(2,6-дифторфенил)-2-гидроксиацетат



Концентрированную серную кислоту (1,4 мл, 27 ммоль) добавляли к метанольному

(45 мл) раствору 2,6-дифторминдальной кислоты (5,0 г, 27 ммоль) при 0 °С. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч до концентрирования. К образовавшейся взвеси добавляли насыщенный раствор NaHCO₃. Образовавшуюся смесь экстрагировали ДХМ. Объединенные органические слои промывали водой, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали с получением неочищенного продукта, который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХМС рассчитано для C₁₁H₁₂F₂NO₃ (M+H)⁺: m/z=244,1; получено 244,2.

Стадия 3: 2-(2,6-дифторфенил)-2-гидроксиацетогидразид

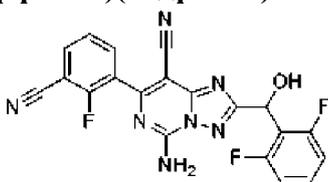


Гидразин (3,0 мл, 96 ммоль) добавляли к этанольному (90 мл) раствору метил-2-(2,6-дифторфенил)-2-гидроксиацетата (10,8 г, 53 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при 100°С в течение 2 ч, охлаждали до комнатной температуры, концентрировали и использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХМС рассчитано для C₈H₉F₂N₂O₂ (M+H)⁺: 203,1; получено 203,2.

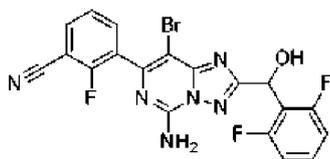
Стадия 4: 3-(5-Амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрил

Указанное в заголовке соединение получали с помощью процедур, аналогичных описанным в Примере А5, Стадия 2, с использованием 3-(2-амино-6-хлорпиримидин-4-ил)-2-фторбензонитрила вместо 3-(2-амино-6-хлорпиримидин-4-ил)бензонитрила и с 2-(2,6-дифторфенил)-2-гидроксиацетогидразидом вместо 2-гидрокси-2-фенилацетогидразида. Два энантиомера разделяли с помощью хиральной SFC с колонкой Phenomenex (R, R)-Whelk-O1 (21,2×250 мм, размер частиц 5 мкм), элюируя изократной подвижной фазой 15% MeOH в CO₂ со скоростью потока 85 мл/мин. Время удерживания первого и второго пиков составляло 3,8 мин и 5,3 мин соответственно. После концентрирования второй пик очищали с помощью препаративной ЖХМС (рН=2, MeCN/вода с ТФУ) с получением искомого продукта в виде соли ТФУ. ЖХМС рассчитано для C₁₉H₁₂F₃N₆O (M+H)⁺: 397,1; получено 397,1.

Пример А7: Синтез 5-Амино-7-(3-циано-2-фторфенил)-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-8-карбонитрила



Стадия 1: 3-(5-Амино-8-бром-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрил

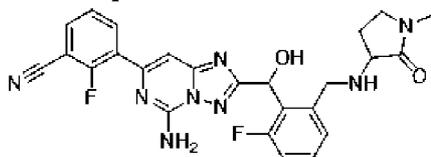


Это соединение получали с помощью процедур, аналогичных описанным в Примере А1, Стадия 4, с 3-(5-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрилом (из Примера А6) вместо 3-(5-амино-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрила. ЖХМС рассчитано для $C_{19}H_{11}BrF_3N_6O$ (M+H)⁺: 475,0; получено 475,0.

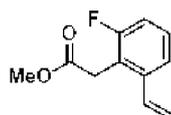
Стадия 2: 5-Амино-7-(3-циано-2-фторфенил)-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-8-карбонитрил

Смесь 3-(5-амино-8-бром-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрил (0,12 г, 0,25 ммоль), $ZnCN_2$ (0,060 г, 0,51 ммоль) и tBuXPhos Pd G3 (0,020 г, 0,025 ммоль) в 1,4-диоксане (0,63 мл) и воде (0,63 мл) продували N_2 и перемешивали при 100°C в течение 1 ч. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь разбавляли насыщенным раствором $NaHCO_3$ и органические вещества экстрагировали EtOAc (3x). Объединенные органические слои сушили над $MgSO_4$ и концентрировали. Два энантиомера разделяли с помощью хиральной ВЭЖХ с колонкой Phenomenex Lux Cellulose-4 (21,2×250 мм, размер частиц 5 мкм), элюируя изократной подвижной фазой 60% EtOH в гексане со скоростью потока 20 мл/мин. Время удерживания первого и второго пиков составляло 4,9 мин и 7,2 мин соответственно. После концентрирования первый пик очищали препаративной ЖХМС (pH 2, ацетонитрил/вода с ТФУ) с получением искомого продукта в виде соли ТФУ. ЖХМС рассчитано для $C_{20}H_{11}F_3N_7O$ (M+H)⁺: 422,1; получено 422,1.

Пример А8: Синтез 3-(5-Амино-2-((2-фтор-6-(((1-метил-2-оксопирролидин-3-ил)амино)метил)фенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрила



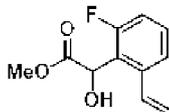
Стадия 1: Метил 2-(2-фтор-6-винилфенил)ацетат



Смесь метил 2-(2-бром-6-фторфенил)ацетата (6,0 г, 24 ммоль), фосфата калия трехосновного (15,5 г, 73 ммоль), ацетата палладия(II) (0,55 г, 2,4 ммоль) и SPhos (1,0 г, 2,4 ммоль) добавляли в сосуд высокого давления объемом 500 мл. Затем добавляли 4,4,5,5-тетраметил-2-винил-1,3,2-диоксаборолан (6,4 мл, 36 ммоль) в диоксане (150 мл) и воду (15 мл), реакционную смесь продували N_2 и перемешивали при 80°C в течение 16 ч. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, концентрировали и

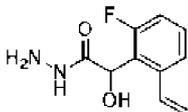
экстрагировали EtOAc (x3). Объединенные органические слои сушили над MgSO₄, концентрировали и очищали колоночной хроматографией (0-50% EtOAc в ДХМ). ЖХМС рассчитано для C₁₁H₁₂FO₂ (M+H)⁺: 195,1; получено 195,1.

Стадия 2: Метил 2-(2-фтор-6-винилфенил)-2-гидроксиацетат



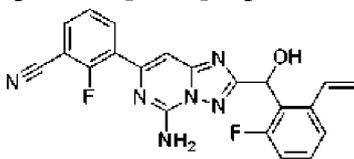
Метил 2-(2-фтор-6-винилфенил)ацетат (2,5 г, 12,9 ммоль) растворяли в ТГФ (130 мл) и охлаждали до -78 °С. Добавляли по каплям LDA (16,7 мл, 16,7 ммоль) в ТГФ (1,0 М) и полученный раствор перемешивали при -78 °С в течение 30 мин. Затем по каплям добавляли 9,9-диметилтетрагидро-4*H*-4*a*,7-метанобензо[*c*][1,2]оксазирен[2,3-*b*]изотиазол-3,3-диоксид (4,7 г, 20,6 ммоль) в ТГФ (0,5 М). Через 30 мин при -78°С реакционную смесь нагревали до 0°С и перемешивали в течение 1 ч. Реакционную смесь гасили насыщенным NH₄Cl. Водный слой экстрагировали ДХМ (3x). Объединенные органические фазы сушили над безводным Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный продукт очищали колоночной хроматографией, элюируя 0-50% этилацетатом в гексанах, с получением искомого продукта. ЖХМС рассчитано для C₁₁H₁₁FO₃Na (M+Na)⁺: 233,1; получено 233,1.

Стадия 3: 2-(2-фтор-6-винилфенил)-2-гидроксиацетогидразид



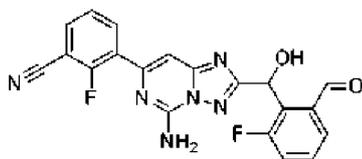
Это соединение получали с помощью процедур, аналогичных описанным в Примере А6, Стадия 3, с использованием метил-2-(2-фтор-6-винилфенил)-2-гидроксиацетата вместо метил-2-(2,6-дифторфенил)-2-гидроксиацетата. ЖХМС рассчитано для C₁₀H₁₂FN₂O₂ (M+H)⁺: 211,1; получено 211,1.

*Стадия 4: 3-(5-Амино-2-((2-фтор-6-винилфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-*c*]тиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрил*



Это соединение получали с помощью процедур, аналогичных описанным в Примере А6, Стадия 4, с использованием метил-2-(2-фтор-6-винилфенил)-2-гидроксиацетогидразида вместо метил-2-(2,6-дифторфенил)-2-гидроксиацетогидразида. ЖХМС рассчитано для C₂₁H₁₅F₂N₆O (M+H)⁺: 405,1; получено 405,1.

*Стадия 5: 3-(5-Амино-2-((2-фтор-6-формилфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-*c*]тиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрил*

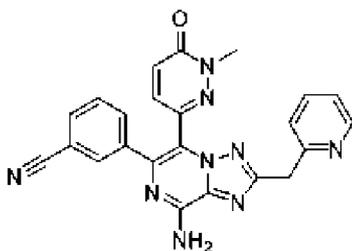


Четырехокись осмия в воде (4% мас./мас., 0,36 мл, 0,12 ммоль) добавляли к ТГФ (18 мл) и водному (4,6 мл) раствору 3-(5-амино-2-((2-фтор-6-винилфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрила (930 мг, 2,30 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 5 мин при комнатной температуре и затем добавляли периодат натрия (2,5 г, 11,5 ммоль). После перемешивания в течение 1 ч смесь разбавляли метабисульфитом натрия в насыщенном водном растворе NaHCO_3 (5% масс./масс., 20 мл) и экстрагировали EtOAc (x3). Объединенные органические слои сушили над MgSO_4 и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный материал очищали колоночной хроматографией, элюируя 0-100% этилацетатом в гексанах, с получением искомого продукта. ЖХМС рассчитано для $\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_2$ (M+H)⁺: 407,1; получено 407,1.

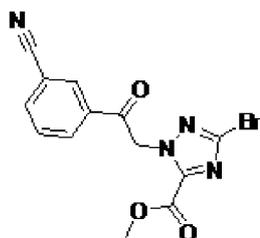
Стадия 6: 3-(5-Амино-2-((2-фтор-6-((1-метил-2-оксопирролидин-3-ил)амино)метил)фенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрил

Раствор 3-амино-1-метилпирролидин-2-она (63 мг, 0,55 ммоль) и 3-(5-амино-2-((2-фтор-6-формилфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрила (150 мг, 0,37 ммоль) перемешивали при 40°C в течение 2 ч в 1,2-дихлорэтаноле (1,9 мл). Затем добавляли триацетоксиборгидрид натрия (160 мг, 0,74 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Реакционную смесь разбавляли насыщенным раствором NaHCO_3 и органические вещества экстрагировали EtOAc (3x). Объединенные органические слои сушили над MgSO_4 и концентрировали. Диастереомеры разделяли с помощью хиральной ВЭЖХ с колонкой Phenomenex Lux Cellulose-4 (21,2×250 мм, размер частиц 5 мкм), элюируя изократной подвижной фазой 45% EtOH в гексане со скоростью потока 20 мл/мин. Время удерживания первого и второго пиков составляло 14,9 мин и 17,5 мин соответственно. После концентрирования второй пик дополнительно разделяли с помощью хиральной ВЭЖХ с колонкой Phenomenex Lux Cellulose-1 (21,2×250 мм, размер частиц 5 мкм), элюируя изократной подвижной фазой 30% EtOH в гексане со скоростью потока 20 мл/мин. Время удерживания первого и второго пиков составляло 11,0 мин и 15,5 мин соответственно. После концентрирования первый пик очищали препаративной ЖХМС (pH=2, MeCN/вода с ТФУ) с получением искомого продукта в виде соли ТФУ. ЖХМС рассчитано для $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{F}_2\text{N}_8\text{O}_2$ (M+H)⁺: 505,2; получено 505,2.

Пример А9: Синтез 3-(8-Амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрила

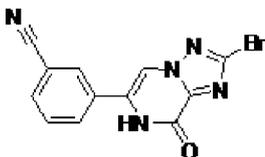


Стадия 1: Метил-3-бром-1-(2-(3-цианофенил)-2-оксоэтил)-1H-1,2,4-триазол-5-карбоксилат



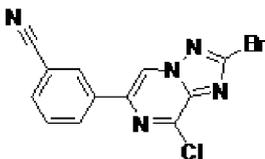
К раствору метил-3-бром-1H-1,2,4-триазол-5-карбоксилата (5,0 г, 24,3 ммоль), 3-(2-бромацетил)бензонитрила (5,44 г, 24,3 ммоль) в DMF (100 мл) добавляли карбонат калия (3,35 г, 24,3 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Реакционную смесь затем разбавляли водой и ДХМ. Органический слой отделяли, промывали соляным раствором, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали. Образовавшийся остаток очищали флэш-хроматографией с получением искомого продукта в виде белого твердого вещества (5,2 г, 61%). ЖХМС рассчитано для C₁₃H₁₀BrN₄O₃ (M+H)⁺: m/z=349,0; получено 349,0.

Стадия 2: 3-(2-Бром-8-оксо-7,8-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пирозин-6-ил)бензонитрил



Метил-3-бром-1-(2-(3-цианофенил)-2-оксоэтил)-1H-1,2,4-триазол-5-карбоксилат (10,5 г, 30,1 ммоль) растворяли в уксусной кислоте (100 мл) и добавляли ацетат аммония (23,18 г, 301 ммоль). Смесь перемешивали при 110°C в течение 12 ч. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь разбавляли водой. Образовавшийся остаток собирали путем фильтровани, промывали водой и сушили в вакууме с получением искомого продукта (8,4 г, 88%). ЖХМС рассчитано для C₁₂H₇BrN₅O (M+H)⁺: m/z=316,0; получено 316,0.

Стадия 3: 3-(2-Бром-8-хлор-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пирозин-6-ил)бензонитрил

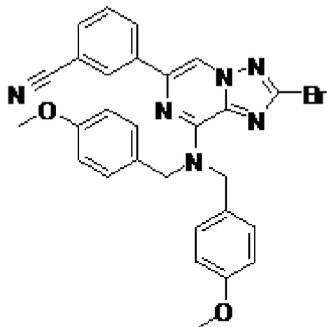


Смесь

3-(2-бром-8-оксо-7,8-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5-a]пирозин-6-

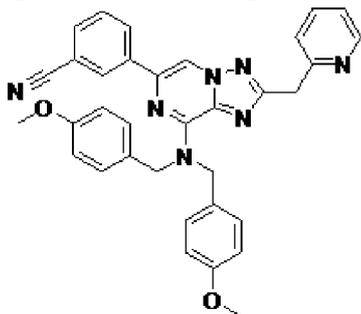
ил)бензонитрила (8,4 г, 26,6 ммоль) и POCl_3 (49,5 мл, 531 ммоль) перемешивали при 110°C в течение ночи. После охлаждения до комнатной температуры, реакционную смесь медленно добавляли в колбу, содержащую лед и гидрокарбонат натрия. Образовавшийся осадок собирали, промывали водой и сушили с получением искомого продукта (8,8 г, 99%). ЖХМС рассчитано для $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{BrClN}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: $m/z=333,9$; получено 334,0.

Стадия 4. 3-(8-(Бис(4-метоксибензил)амино)-2-бром-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил



Смесь 3-(2-бром-8-хлор-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила (8,99 г, 26,9 ммоль), бис(4-метоксибензил)амин (10,37 г, 40,3 ммоль) и DIPEA (9,4 мл, 53,7 ммоль) в DMF (134 мл) перемешивали при 85°C в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли водой. Образовавшийся осадок собирали путем фильтрования и сушили с получением искомого продукта (14,1 г, 94%). ЖХМС рассчитано для $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{BrN}_6\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: $m/z=555,1$; получено 555,1.

Стадия 5: 3-(8-(Бис(4-метоксибензил)амино)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил

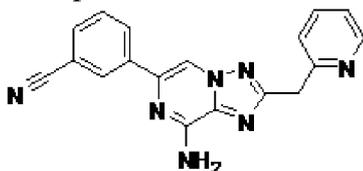


К раствору 2-метилпиридина (0,050 г, 0,540 ммоль) в ТГФ (0,5 мл) добавляли 2,5 М *n*-бутиллитий (0,216 мл, 0,540 ммоль) при -78°C . Образовавшийся раствор перемешивали при той же температуре в течение 1 ч перед тем, как добавить 1,9 М хлорид цинка в 2-метилтетрагидрофуране (0,284 мл, 0,540 ммоль), и полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин.

Из сосуда для микроволнового реактора, загруженного 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-бром-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрилом (0,15 г, 0,270 ммоль), ацетатом палладия (1,1 мг, 4,7 мкмоль) и 2'-(дициклогексилфосфино)-*N,N,N',N'*-тетраметилбифенил-2,6-диамином (4,1 мг, 9,5 мкмоль), откачивали воздух и заполняли его азотом. Затем в реакционный сосуд добавляли ТГФ (2,0 мл) и толуол (0,5 мл). Смесь охлаждали до 0°C и медленно добавляли цинковый реагент, приготовленный на

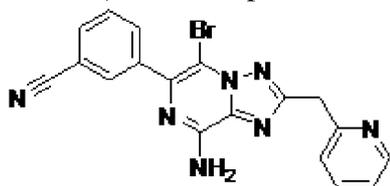
предыдущей стадии, с помощью шприца. Реакционную смесь затем перемешивали при 60°C в течение ночи, охлажденную до комнатной температуры и разделяли между этилацетатом и раствором NH₄Cl. Слои разделяли, и водный слой экстрагировали этилацетатом. Объединенные органические фазы слои промывали водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над MgSO₄ и концентрировали. Образовавшийся остаток очищали флэш-хроматографией с получением искомого продукта (0,11 г, 71%). ЖХМС рассчитано для C₃₄H₃₀N₇O₂ (M+H)⁺: m/z=568,2; получено 568,3.

Стадия 6. 3-(8-Амино-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазин-6-ил)бензонитрил



Смесь 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазин-6-ил)бензонитрила (110 мг, 0,194 ммоль) и ТФУ (746 мкл, 9,69 ммоль) перемешивали при 80°C в течение 30 мин, охлаждали до комнатной температуры и концентрировали. Образовавшийся остаток очищали с помощью препаративной ЖХМС (рН 2) с получением искомого продукта в виде белого твердого вещества (соль ТФУ) (57 мг, 90%). ЖХМС рассчитано для C₁₈H₁₄N₇ (M+H)⁺: m/z=328,1; получено 328,1.

Стадия 7. 3-(8-Амино-5-бром-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазин-6-ил)бензонитрил



К раствору 3-(8-амино-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазин-6-ил)бензонитрила (соль ТФУ) (35 мг, 0,079 ммоль) в DMF (0,5 мл)/DMF (0,5 мл) добавляли NBS (14,1 мг, 0,079 ммоль). Реакционную смесь затем перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч и концентрировали с получением неочищенного продукта, который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХМС рассчитано для C₁₈H₁₃BrN₇ (M+H)⁺: m/z=406,0; получено 406,0.

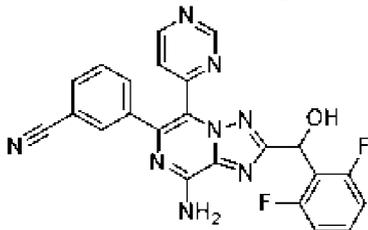
Стадия 8. 3-(8-Амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазин-6-ил)бензонитрил

Смесь 6-хлор-2-метилпиримидин-3(2H)-она (30 мг, 0,21 ммоль), бис(пинаколато)дифлорид бора (53 мг, 0,21 ммоль), хлор(2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил)[2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладия(II) (15,7 мг, 0,02 ммоль) (XPhos Pd G2) и ацетата калия (61,7 мг, 0,63 ммоль) в 1,4-диоксане (1 мл) перемешивали при 100°C в течение 1 ч. Затем добавляли к реакционной смеси добавляли 3-(8-Амино-5-бром-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазин-6-ил)бензонитрил (10 мг, 0,025

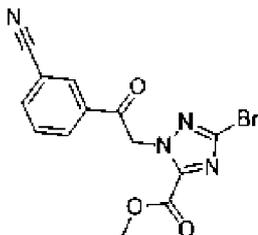
ммоль), карбонат цезия (37,6 мг, 0,116 ммоль) и воду (0,2 мл). Полученную смесь нагревали при 90°C в течение 1 ч. Смесь концентрировали и очищали препаративной ЖХМС (рН 2, ацетонитрил/вода с ТФУ) с получением искомого продукта в виде соли ТФУ. ЖХМС рассчитано для $C_{23}H_{18}N_9O$ (M+H)⁺: 436,2; получено 436,2.

¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО) δ 8,66-8,62 (д, $J=5,1$ Гц, 1H), 8,09-8,02 (д, $J=1,8$ Гц, 1H), 7,88-7,85 (t, $J=1,8$ Гц, 1H), 7,85-7,81 (m, 3H), 7,78-7,72 (д, $J=9,6$ Гц, 1H), 7,66-7,51 (m, 4H), 7,10-7,06 (д, $J=9,6$ Гц, 1H), 4,59-4,48 (с, 2H), 3,53-3,43 (с, 3H).

Пример А10: Синтез 3-(8-Амино-2-((2,6-дифторфенил)гидроксиметил)-5-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила

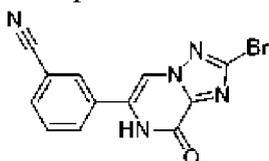


Стадия 1: Метил-3-бром-1-(2-(3-цианофенил)-2-оксоэтил)-1H-1,2,4-триазол-5-карбоксилат



К раствору метил-3-бром-1H-1,2,4-триазол-5-карбоксилата (5,0 г, 24,3 ммоль), 3-(2-бромацетил)бензонитрила (5,44 г, 24,3 ммоль) в DMF (100 мл) добавляли карбонат калия (3,35 г, 24,3 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Реакционную смесь затем разбавляли водой и ДХМ. Органический слой отделяли, промывали соляным раствором, сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали. Образовавшийся остаток очищали флэш-хроматографией с получением искомого продукта в виде белого твердого вещества (5,2 г, 61%). ЖХМС рассчитано для $C_{13}H_{10}BrN_4O_3$ (M+H)⁺: m/z=349,0; получено 349,0.

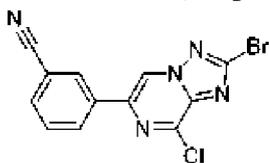
Стадия 2: 3-(2-Бром-8-оксо-7,8-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил



Метил-3-бром-1-(2-(3-цианофенил)-2-оксоэтил)-1H-1,2,4-триазол-5-карбоксилат (10,5 г, 30,1 ммоль) растворяли в уксусной кислоте (100 мл) и добавляли ацетат аммония (23,18 г, 301 ммоль). Смесь перемешивали при 110°C в течение 12 ч. После охлаждения до комнатной температуры реакционную смесь разбавляли водой. Образовавшийся остаток

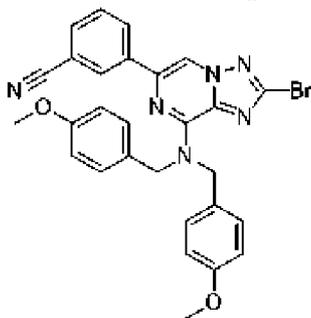
собирали путем фильтровани, промывали водой и сушили в вакууме с получением искомого продукта (8,4 г, 88%). ЖХМС рассчитано для $C_{12}H_7BrN_5O$ ($M+H$)⁺: $m/z=316,0$; получено 316,0.

Стадия 3: 3-(2-Бром-8-хлор-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазин-6-ил)бензонитрил



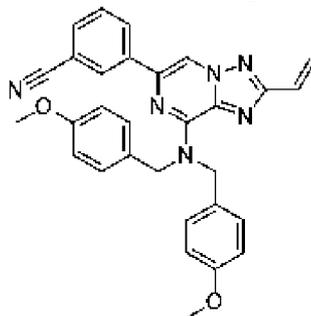
Смесь 3-(2-бром-8-оксо-7,8-дигидро-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазин-6-ил)бензонитрила (8,4 г, 26,6 ммоль) и $POCl_3$ (49,5 мл, 531 ммоль) перемешивали при 110°C в течение ночи. После охлаждения до комнатной температуры, реакционную смесь медленно добавляли в колбу, содержащую лед и гидрокарбонат натрия. Образовавшийся остаток собирали путем фильтрации, промывали водой и сушили с получением продукта (8,8 г, 99%). ЖХМС рассчитано для $C_{12}H_6BrClN_5$ ($M+H$)⁺: $m/z=336,0$; получено 336,0.

Стадия 4: 3-(8-(Бис(4-метоксибензил)амино)-2-бром-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазин-6-ил)бензонитрил



Смесь 3-(2-бром-8-хлор-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазин-6-ил)бензонитрила (8,99 г, 26,9 ммоль), бис(4-метоксибензил)амин (10,37 г, 40,3 ммоль) и DIPEA (9,4 мл, 53,7 ммоль) в DMF (134 мл) перемешивали при 65°C в течение ночи. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли водой. Образовавшийся осадок собирали путем фильтрования и сушили с получением искомого продукта (14,1 г, 94%). ЖХМС рассчитано для $C_{28}H_{24}BrN_6O_2$ ($M+H$)⁺: $m/z=555,1$; получено 555,1.

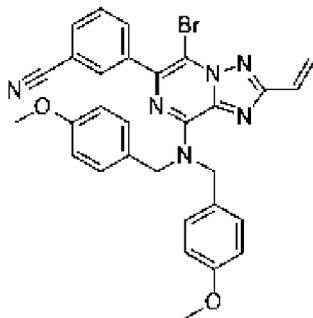
Стадия 5: 3-(8-(Бис(4-метоксибензил)амино)-2-винил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазин-6-ил)бензонитрил



Смесь 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-бром-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазин-6-ил)бензонитрила (10,0 г, 18,0 ммоль), 4,4,5,5-тетраметил-2-винил-1,3,2-диоксаборолана

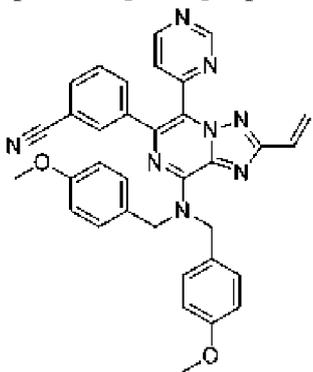
(3,88 г, 25,2 ммоль), трехосновного фосфата калия (9,55 г, 45,0 ммоль) и хлор(2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил)[2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладия(II) (567 мг, 0,72 ммоль) в 1,4-диоксане (200 мл) и воде (50 мл) перемешивали при 85°C в течение 2 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и большую часть 1,4-диоксана удаляли. Образовавшийся осадок собирали путем фильтрации, промывали водой и сушили с получением неочищенного продукта (9,1 г), который использовали непосредственно на следующей стадии. ЖХМС рассчитано для $C_{30}H_{27}N_6O_2$ (M+H)⁺: m/z=503,2; получено 503,1.

Стадия 6. 3-(8-(Бис(4-метоксибензил)амино)-5-бromo-2-винил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрил



К раствору 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-винил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрила (717 мг, 1,43 ммоль) в 10 мл дихлорметана прибавляли 1-бромпирролидин-2,5-дион (254 мг, 1,43 ммоль) при 0 °С. Образовавшуюся смесь перемешивали в течение 4 ч, и непосредственно очищали на колонке с силикагелем с получением искомого продукта (780 мг, 94%). ЖХМС рассчитано для $C_{30}H_{26}BrN_6O_2$ (M+H)⁺: m/z=581,1; получено 581,2.

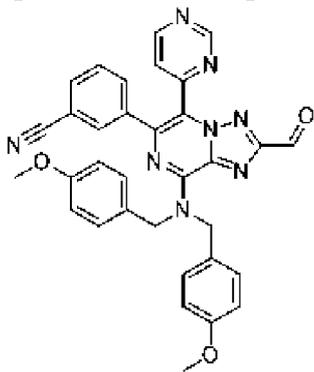
Стадия 7: 3-(8-(Бис(4-метоксибензил)амино)-5-(пиримидин-4-ил)-2-винил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрил



Смесь 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-5-бром-2-винил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрила (260 мг, 0,45 ммоль), 4-(трибутилстаннил)пиримидина (215 мг, 0,58 ммоль), хлорида лития (28,4 мг, 0,67 ммоль), хлорида меди(I) (67 мг, 0,67 ммоль) и тетраakis(трифенилфосфин)палладия(0) (52 мг, 0,045 ммоль) в ТГФ (5 мл) перемешивали при 90°C в течение 45 мин. Реакционную смесь гасили водой и экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические слои концентрировали и очищали колонкой с силикагелем с получением искомого продукта (176 мг, 67%). ЖХМС рассчитано для

$C_{34}H_{29}N_8O_2$ (M+H)⁺: m/z=581,2; получено 581,1.

Стадия 8: 3-(8-(Бис(4-метоксибензил)амино)-2-формил-5-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил



Смесь 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-5-(пиримидин-4-ил)-2-винил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила (176 мг, 0,3 ммоль), оксида осмия (VIII) (3 мг в 0,3 мл воды, 0,015 ммоль) и периодата натрия (292 мг, 1,36 ммоль) в ТГФ/воде (1:1, 6 мл) перемешивали при 65°C в течение 1 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические слои концентрировали и очищали колонкой с силикагелем с получением искомого продукта (130 мг, 74%). ЖХМС рассчитано для $C_{33}H_{27}N_8O_3$ (M+H)⁺: m/z=583,2; получено 583,2.

Стадия 9: 3-(8-Амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-5-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил

Приготовление реактива Гриньяра: К раствору 1,3-дифтор-2-иодбензола (142 мг, 0,6 ммоль) в тетрагидрофуране (1 мл) прибавляли раствор изопропилмагнийхлорида (296 мкл, 2 М) при -10 °С. Образовавшуюся смесь перемешивали в течение 1 ч, и использовали непосредственно на следующей стадии.

К раствору 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-формил-5-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила (120 мг, 0,2 ммоль) в ТГФ (2 мл) добавляли свежеприготовленный реактив Гриньяра с предыдущей стадии при -10 °С. Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин, гасили раствором хлорида аммония (4 мл) и экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические слои концентрировали в вакууме. Образовавшийся материал растворяли в ТФУ (5 мл) и перемешивали при 80°C в течение 20 мин. Реакционную смесь затем охлаждали до комнатной температуры, концентрировали и подщелачивали добавлением водного раствора $NaHCO_3$.

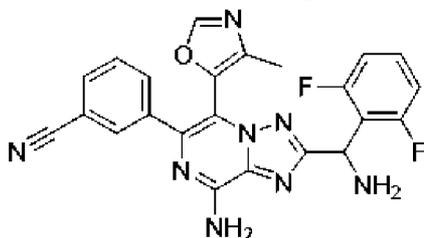
Неочищенный материал непосредственно очищали на колонке с силикагелем с получением искомого продукта (60 мг, 64%) в виде рацемической смеси. Затем продукт разделяли с помощью хиральной ВЭЖХ с использованием хиральной колонки (Phenomenex Lux 5um Cellulose-4, 21,2×250 мм) и системы растворителей 75% EtOH в гексане (20 мл/мин).

Пик 2 выделяли и дополнительно очищали, используя препаративную ЖХМС (pH=2, ацетонитрил/вода с ТФУ), с получением искомого продукта в виде соли ТФУ.

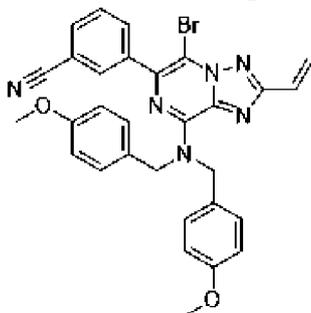
ЖХМС рассчитано для $C_{23}H_{15}F_2N_8O$ ($M+H$)⁺: $m/z=457,1$; получено 457,0.

¹H ЯМР (600 МГц, ДМСО-*d*₆) δ 9,14 (д, $J=1,3$ Гц, 1H), 8,95 (д, $J=5,2$ Гц, 1H), 7,90 (дд, $J=5,2, 1,4$ Гц, 1H), 7,88 (с, 1H), 7,78 (дт, $J=7,6, 1,4$ Гц, 1H), 7,74 (т, $J=1,4$ Гц, 1H), 7,54 (дт, $J=7,9, 1,3$ Гц, 1H), 7,51-7,40 (м, 2H), 7,09 (т, $J=8,4$ Гц, 2H), 6,27 (с, 1H).

Пример А11: Синтез 3-(8-амино-2-(амино(2,6-дифторфенил)метил)-5-(4-метилоксазол-5-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила

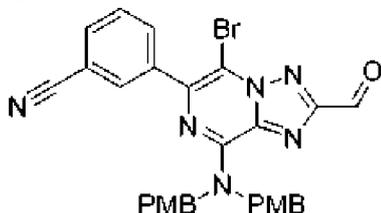


Стадия 1: 3-(8-(Бис(4-метоксибензил)амино)-5-бромо-2-винил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил



К раствору 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-винил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила (Пример А10, Стадия 5; 241 мг, 0,48 ммоль) в ДХМ (5 мл) добавляли NBS (84,6 мг, 0,48 ммоль). Реакционную смесь затем перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч и концентрировали с получением неочищенного продукта, который использовали на следующей стадии без дополнительной очистки. ЖХМС рассчитано для $C_{30}H_{26}BrN_6O_2$ ($M+H$)⁺: $m/z=581,1$; получено 581,1.

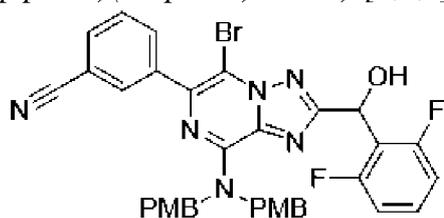
Стадия 2: 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-5-бромо-2-формил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил



Смесь 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-5-бромо-2-винил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила (174 мг, 0,3 ммоль), оксида осмия (VIII) (3 мг в 0,3 мл воды, 0,015 ммоль) и периодата натрия (292 мг, 1,36 ммоль) в ТГФ/воде (1:1, 6 мл) перемешивали при 65°C в течение 1 ч. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические слои концентрировали, и очищали колонкой с силикагелем с получением искомого продукта. ЖХМС рассчитано для

$C_{29}H_{24}N_6O_3Br$ ($M+H$)⁺: $m/z=583,1$; получено 583,1.

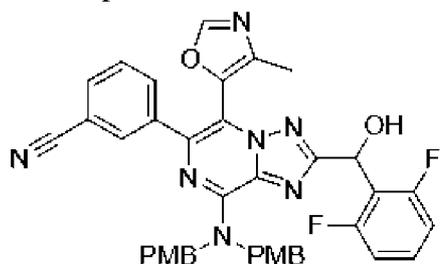
Стадия 3: 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-5-бром-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил



Приготовление реактива Гриньяра: К раствору 1,3-дифтор-2-иодбензола (142 мг, 0,6 ммоль) в тетрагидрофуране (1 мл) прибавляли раствор изопропилмагнийхлорида (296 мкл, 2 М) при -10 °С. Образовавшуюся смесь перемешивали в течение 1 ч, и использовали непосредственно на следующей стадии.

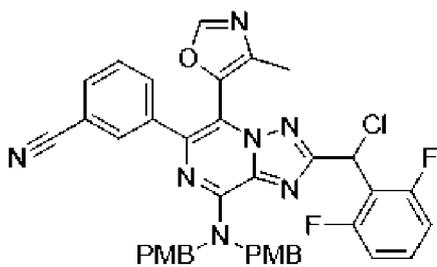
К раствору 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-5-бром-2-формил-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила (120 мг, 0,2 ммоль) в ТГФ (2 мл) свежеполученный реактив Гриньяра с предыдущей стадии прибавляли при -10 °С. Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин, гасили раствором хлорида аммония (4 мл) и экстрагировали дихлорметаном. Объединенные органические слои концентрировали в вакууме и очищали на колонке с силикагелем с получением искомого продукта в виде рацемической смеси. ЖХМС рассчитано для $C_{35}H_{28}N_6O_3BrF_2$ ($M+H$)⁺: $m/z=697,1$; получено 697,1.

Стадия 4: 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-5-(4-метилоксазол-5-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил



Смесь 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-5-бром-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрила (382 мг, 0,55 ммоль), 4-метил-5-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)оксазола (137 мг, 0,65 ммоль), дициклогексил(2',4',6'-триизопропилбифенил-2-ил)фосфин-(2'-аминобифенил-2-ил)(хлор)палладия (1:1) (17 мг, 21,6 мкмоль) и Cs_2CO_3 (356 мг, 1,09 ммоль) в 1,4-диоксане (2 мл) и воде (200 мкл) продували N_2 и нагревали при 95 °С в течение 7 ч. Смесь концентрировали и очищали флэш-хроматографией с получением искомого продукта в виде бесцветного масла. ЖХМС рассчитано для $C_{39}H_{32}N_7O_4F_2$ ($M+H$)⁺: 700,2; получено 700,2.

Стадия 5: 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-(хлор(2,6-дифторфенил)метил)-5-(4-метилоксазол-5-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил

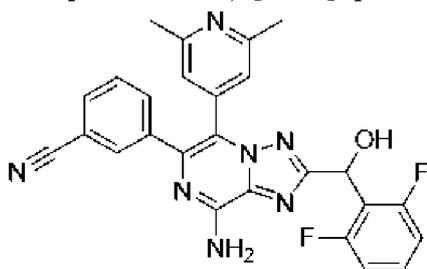


К раствору 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-5-(4-метилоксазол-5-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрила (201 мг, 0,29 ммоль) в 2 мл дихлорметана прибавляли тионилхлорид (105 мкл, 1,435 ммоль) при комнатной температуре. Полученную смесь перемешивали в течение 4 ч, концентрировали и использовали на следующей стадии без любой дополнительной очистки. ЖХМС рассчитано для $C_{39}H_{31}N_7O_3ClF_2$ (M+H)⁺: m/z=718,2; получено 718,2.

Стадия 6: 3-(8-амино-2-(амино(2,6-дифторфенил)метил)-5-(4-метилоксазол-5-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрил

К раствору 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-2-(хлор(2,6-дифторфенил)метил)-5-(4-метилоксазол-5-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрила (40 мг, 0,084 ммоль) в 1 мл ДМСО прибавляли раствор аммиака (1 мл). Смесь нагревали в условиях микроволнового облучения при 100°C в течение 10 ч перед разбавлением водой и экстрагированием с помощью EtOAc. Объединенные органические фазы слои промывали водой и насыщенным водным раствором хлорида натрия, сушили над $MgSO_4$ и концентрировали. Образовавшийся остаток растворяли в ТФУ (1 мл) и перемешивали при 80°C в течение 20 мин. Реакционную смесь затем охлаждали до комнатной температуры, концентрировали и подщелачивали добавлением водн. Раствора $NaHCO_3$. Неочищенный материал непосредственно очищали на колонке с силикагелем с получением желаемого продукта в виде рацемической смеси. Продукт затем разделяли хиральной ВЭЖХ, используя хиральную колонку (АМ-1) и систему растворителей 45% EtOH в смеси гексанов (20 мл/мин). Пик 1 выделяли и дополнительно очищали с помощью препаративной ЖХМС (pH=2, ацетонитрил/вода с ТФУ), с получением искомого продукта в виде соли ТФУ. ЖХМС рассчитано для $C_{23}H_{17}F_2N_8O$ (M+H)⁺: m/z=459,1; получено 459,0.

Пример А12: Синтез 3-(8-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-5-(2,6-диметилпиридин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрила

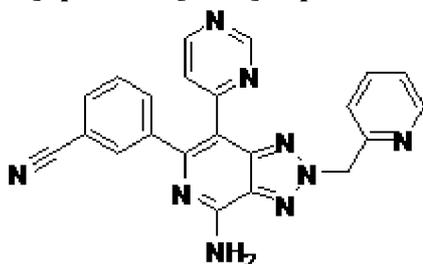


К раствору 3-(8-(бис(4-метоксибензил)амино)-5-бром-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пирозин-6-ил)бензонитрила (Пример А11, Стадия 3; 0,518 г, 0,638 ммоль), 2,6-диметил-4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-

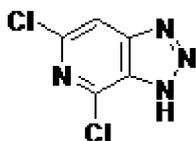
диоксaborолан-2-ил)пиридина (0,346 г, 1,48 ммоль) и дициклогексил(2',4',6'-триизопропипбифенил-2-ил)фосфин-(2'-аминобифенил-2-ил)(хлор)палладия (1:1) (0,058 г, 0,074 ммоль) в диоксане (3,0 мл) и воде (0,60 мл) добавляли трехосновный фосфат калия (0,472 г, 2,23 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 90°C в течение 1 ч. Реакционную смесь затем разбавляли водой и ДХМ. Слои разделяли, водный слой экстрагировали ДХМ, и объединенные органические фракции сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали. Неочищенный материал растворяли в ТФУ (5 мл) и нагревали до 80°C в течение 20 минут. Реакционную смесь затем охлаждали до комнатной температуры, концентрировали, и подщелачивали прибавлением водного раствора NaHCO₃. Неочищенный материал непосредственно очищали на колонке с силикагелем с получением искомого продукта (257 мг, 72%) в виде рацемической смеси.

Затем продукт разделяли с помощью хиральной ВЭЖХ с использованием хиральной колонки (Phenomenex Lux 5um Cellulose-2, 21,1×250 мм) и системы растворителей 35% EtOH в гексане (20 мл/мин). Пик 2 выделяли и дополнительно очищали с помощью препаративной ЖХМС (рН=2, ацетонитрил/вода с ТФУ) с получением искомого продукта в виде соли ТФУ. ЖХМС рассчитано для C₂₆H₂₀F₂N₇O (M+H)⁺: m/z=484,2; получено 484,2. ¹H ЯМР (500 МГц, DMSO-d₆) δ 7,92 (с, 2H), 7,85 (с, 1H), 7,83 (д, J=7,6 Гц, 1H), 7,56 (д, J=8,0 Гц, 1H), 7,53-7,40 (m, 4H), 7,10 (t, J=8,4 Гц, 2H), 6,27 (с, 1H), 2,51 (с, 6H).

Пример A13: Синтез 3-(4-амино-2-(пиридин-2-илметил)-7-(пиримидин-4-ил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрила

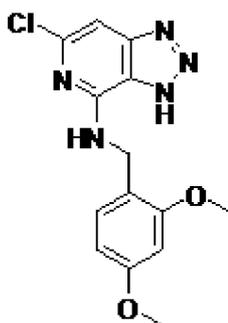


Стадия 1. 4,6-дихлор-3H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин



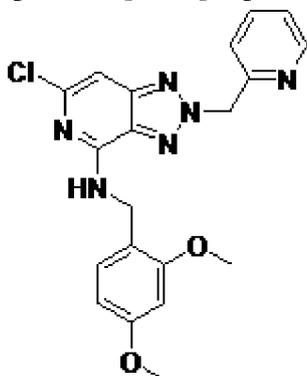
Раствор NaNO₂ (3,88 г, 56,2 ммоль) в воде (3 мл) добавляли к раствору 2,6-дихлорпиридин-3,4-диамина (10 г, 56 ммоль) в соляной кислоте, 37% (5 мл) при 0°C. Раствор перемешивали в течение 30 мин. Добавляли воду (20 мл) и белый осадок отфильтровывали, промывали водой и сушили, получая искомый продукт. ЖХМС рассчитано для C₅H₃Cl₂N₄: 189,0 (M+H)⁺; получено: 189,0 (M+H)⁺.

Стадия 2. 6-хлор-N-(2,4-диметоксибензил)-3H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-4-амин



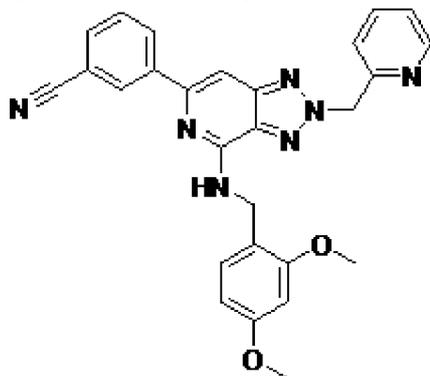
Смесь 4,6-дихлор-3H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридина (600 мг, 3,17 ммоль), (2,4-диметоксифенил)метанамина (0,53 мл, 3,49 ммоль) и триэтиламина (0,53 мл, 3,81 ммоль) в 1,4-диоксане (10 мл) перемешивали при 110 °С в течение 3 дней. После прямой очистки на колонке с силикагелем получали искомый продукт (875 мг, 86%). ЖХМС рассчитано для $C_{14}H_{15}ClN_5O_2$: 320,1 (M+H)⁺; получено: 320,3 (M+H)⁺.

Стадия 3. 6-хлор-N-(2,4-диметоксибензил)-2-(пиридин-2-илметил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-4-амин



Смесь 6-хлор-N-(2,4-диметоксибензил)-3H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-4-амина (875 мг, 2,74 ммоль), пиридин-2 -илметанола (0,317 мл, 3,28 ммоль) и трифенилфосфина (1436 мг, 5,47 ммоль) в ДХМ (20 мл) добавляли диизопропилазодикарбоксилат (0,647 мл, 3,28 ммоль) при 0 °С. Образовавшуюся смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 ч. После прямой очистки на колонке с силикагелем получали искомый продукт (375 мг, выход 33,4%). ЖХМС рассчитано для $C_{20}H_{20}ClN_6O_2$: 411,1 (M+H)⁺; получено: 411,2 (M+H)⁺.

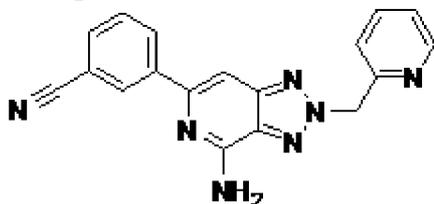
Стадия 4. 3-(4-((2,4-диметоксибензил)амино)-2-(пиридин-2-илметил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил



К смеси 6-хлор-N-(2,4-диметоксибензил)-2-(пиридин-2-илметил)-2H-

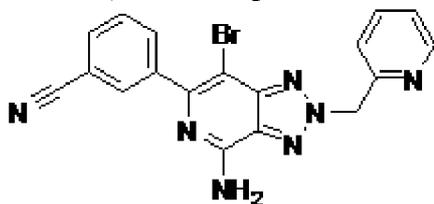
[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-4-амина (375 мг, 0,913 ммоль) и (3-цианофенил)бороновой кислоты (268 мг, 1,825 ммоль) в 1,4-диоксане (10 мл) и воде (1,00 мл) добавляли карбонат цезия (595 мг, 1,825 ммоль). Образовавшуюся смесь продували N_2 , а затем добавляли хлор(2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил)[2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладий(II) (71,8 мг, 0,091 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 120°C под микроволновым облучением в течение 90 мин. Реакцию гасили 20 мл этилацетата и 20 мл воды. Органическую фазу отделяли и водный раствор дважды экстрагировали этилацетатом. Объединенные экстракты сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали на колонке с силикагелем с получением искомого продукта (300 мг, 68,9%). ЖХМС рассчитано для $C_{27}H_{24}N_7O_2$: 478,2 (M+H)⁺; получено: 478,3 (M+H)⁺.

Стадия 5. 3-(4-амино-2-(пиридин-2-илметил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил



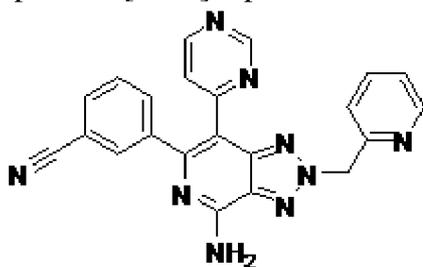
Раствор 3-(4-((2,4-диметоксибензил)амино)-2-(пиридин-2-илметил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрила (300,3 мг, 0,629 ммоль) в ТФУ (5 мл) перемешивали при 100°C в течение 30 мин. ТФУ упаривали при пониженном давлении и затем добавляли 20 мл насыщенного водного раствора $NaHCO_3$ и 20 мл этилацетата. Органическую фазу отделяли и водный раствор дважды экстрагировали этилацетатом. Объединенные экстракты сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали на колонке с силикагелем с получением искомого продукта (175 мг, 85%). ЖХМС рассчитано для $C_{18}H_{14}N_7$: 328,1 (M+H)⁺; получено: 328,2 (M+H)⁺.

Стадия 6. 3-(4-амино-7-бром-2-(пиридин-2-илметил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил



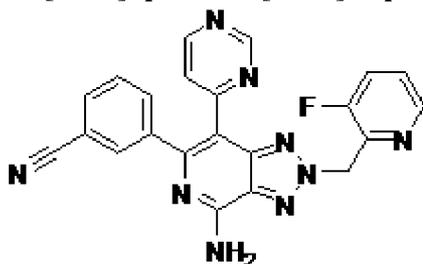
Смесь 3-(4-амино-2-(пиридин-2-илметил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрила (175 мг, 0,535 ммоль) и 1-бромпирролидин-2,5-диона (100 мг, 0,561 ммоль) в ТГФ (10 мл) перемешивали при 0°C в течение 30 мин, а затем гасили насыщенным водным раствором $NaHCO_3$. Органическую фазу отделяли, сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и упаривали при пониженном давлении. Образовавшийся остаток очищали на колонке с силикагелем с получением искомого продукта (135 мг, 62,2%). ЖХМС рассчитано для $C_{18}H_{13}BrN_7$: 406,0 (M+H)⁺ и 408,0 (M+H)⁺; получено: 406,1 (M+H)⁺ и 408,2 (M+H)⁺.

Стадия 7. 3-(4-амино-2-(пиридин-2-илметил)-7-(пириимидин-4-ил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил

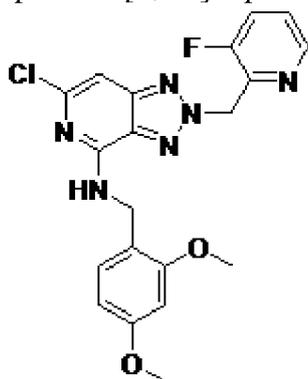


Смесь 3-(4-амино-7-бром-2-(пиридин-2-илметил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрила (182 мг, 0,448 ммоль), 4-(трибутилстаннил)пириимидина (496 мг, 1,344 ммоль) и хлорида меди(I) (53,2 мг, 0,538 ммоль), хлорида лития (22,79 мг, 0,538 ммоль) и тетраakis(трифенилфосфин)палладия(0) (51,8 мг, 0,045 ммоль) в ТГФ (1 мл) сперва продували N_2 , а затем нагревали и перемешивали при $90^\circ C$ в течение 2 ч. Реакционную смесь разбавляли метанолом и очищали препаративной ЖХМС (pH=2), получая искомый продукт. ЖХМС рассчитано для $C_{22}H_{16}N_9$: $406,2 (M+H)^+$; получено: $406,2 (M+H)^+$.

Пример А14: Синтез 3-(4-амино-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-7-(пириимидин-4-ил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрила



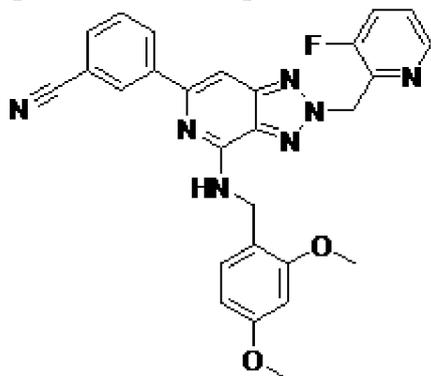
Стадия 1. 6-хлор-N-(2,4-диметоксибензил)-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-4-амин



К смеси 6-хлор-N-(2,4-диметоксибензил)-3Н-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-4-амина (Пример А13, Стадия 2; 1000 мг, 3,13 ммоль), (3-фторпиридин-2-ил)метанола (477 мг, 3,75 ммоль) и трифенилфосфина (1641 мг, 6,25 ммоль) в ДХМ (1,7 мл) добавляли диизопропилазодикарбоксилат (739 мкл, 3,75 ммоль) при $0^\circ C$. Реакционную смесь перемешивали при $0^\circ C$ в течение 1 ч. После прямой очистки на колонке с силикагелем получали искомый продукт (433 мг, 32%). ЖХМС рассчитано для $C_{20}H_{19}ClFN_6O_2$: $429,1$

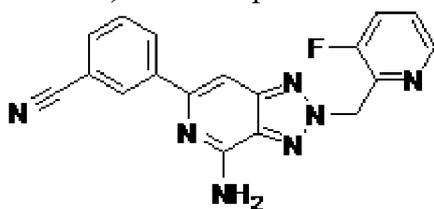
(M+H)⁺; получено: 429.3 (M+H)⁺.

Стадия 2. 3-(4-((2,4-диметоксибензил)амино)-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил



Карбонат цезия (658 мг, 2,019 ммоль) добавляли к смеси 6-хлор-N-(2,4-диметоксибензил)-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-4-амин (433 мг, 1,010 ммоль) и (3-цианофенил)бороновой кислоты (297 мг, 2,019 ммоль) в 1,4-диоксане (10,0 мл) и воде (1,0 мл). Образовавшуюся смесь барботировали N₂ в течение 2 минут и добавляли (SP-4-4)-[2'-Амино[1,1'-бифенил]-2-ил]хлор[дициклогексил[2',4',6'-трис(1-метилэтил)[1,1'-бифенил]-2-ил]фосфин]палладий (79 мг, 0,101 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при 120°C в течение 1,5 ч в условиях микроволнового облучения. Реакцию гасили с помощью 20 мл этилацетата и 20 мл воды. Органическую фазу отделяли и водный раствор дважды экстрагировали этилацетатом. Объединенные экстракты сушили над Na₂SO₄, фильтровали и упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали на колонке с силикагелем с получением искомого продукта (357 мг, 71%). ЖХМС рассчитано для C₂₇H₂₃FN₇O₂: 496,2 (M+H)⁺; получено: 496.3 (M+H)⁺.

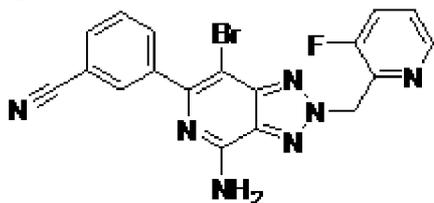
Стадия 3. 3-(4-амино-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил



Раствор 3-(4-((2,4-диметоксибензил)амино)-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитриал (357,3 мг, 0,721 ммоль) в ТФУ (5 мл) перемешивали при 100°C в течение 1 ч. ТФУ упаривали при пониженном давлении и затем добавляли 20 мл насыщенного водного раствора NaHCO₃ и 20 мл этилацетата. Органическую фазу отделяли и водный раствор дважды экстрагировали этилацетатом. Объединенные экстракты сушили над Na₂SO₄, фильтровали и упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали на колонке с силикагелем с получением искомого продукта (213 мг, 61%). ЖХМС m/z рассчитано для C₁₈H₁₃FN₇: 346,1 (M+H)⁺; получено: 346.3 (M+H)⁺.

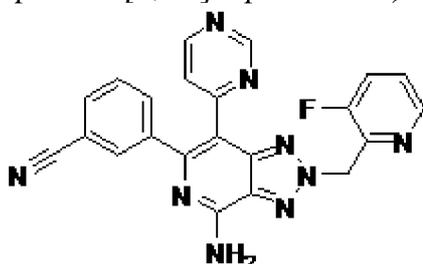
Стадия 4. 3-(4-амино-7-бром-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-2H-

[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил



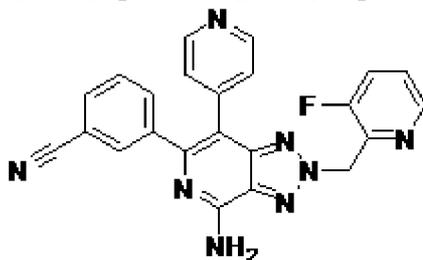
Смесь 3-(4-амино-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрила (213 мг, 0,617 ммоль) и 1-бромпирролидин-2,5-диона (220 мг, 1,234 ммоль) в ТГФ (5 мл) перемешивали при 0 °С в течение 1 ч. После прямой очистки на колонке с силикагелем получали искомый продукт (175 мг, 67%). ЖХМС рассчитано для $C_{18}H_{12}BrFN_7$: 424,0 (M+H)⁺ и 426,0 (M+H)⁺; получено: 424.3 (M+H)⁺ и 426.3 (M+H)⁺.

Стадия 5. 3-(4-амино-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-7-(пиридин-4-ил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил



Смесь 3-(4-амино-7-бром-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрила (220 мг, 0,519 ммоль), 4-(трибутилстаннил)пиримидина (383 мг, 1,037 ммоль) и хлорида меди (I) (61,6 мг, 0,622 ммоль), хлорида лития (26,4 мг, 0,622 ммоль) и тетраakis (трифенилфосфин)палладия(0) (59,9 мг, 0,052 ммоль) в ТГФ (1 мл) сперва продували N_2 , а затем нагревали и перемешивали при 90°С в течение 2 ч. Реакционную смесь разбавляли метанолом и очищали препаративной ЖХМС (pH=2), получая искомый продукт. ЖХМС рассчитано для $C_{22}H_{15}FN_9$: 424,1 (M+H)⁺; получено: 424,3 (M+H)⁺. ¹H ЯМР (500 МГц, ДМСО-*d*₆) ppm 8,98 (с, 1H), 8,77 (д, *J*=5,02 Гц, 1H), 8,38 (дд, *J*₁=4,60 Гц, *J*₂=1,32 Гц, 1H), 7,90-8,30 (bc, 2H), 7,76-7,89 (m, 3H), 7,66 (дд, *J*₁=5,25 Гц, *J*₂=1,25 Гц, 1H), 7,45-7,58 (m, 3H), 6,25 (с, 2H).

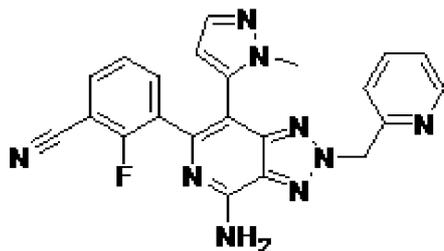
Пример A15: Синтез 3-(4-амино-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-7-(пиридин-4-ил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрила



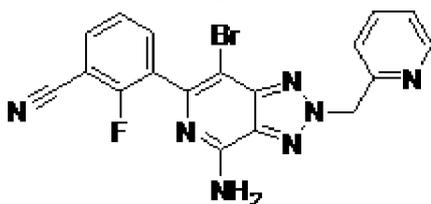
Карбонат цезия (46,1 мг, 0,141 ммоль) добавляли к смеси 3-(4-амино-7-бром-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрила (30 мг, 0,071 ммоль) и пиридин-4-илбороновой кислоты (17,38 мг, 0,141 ммоль) в 1,4-диоксане (2 мл) и воде (0,2 мл). Образовавшуюся смесь продували N_2 в течение 2 мин, а затем добавляли

хлор(2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил)[2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладий(II) (5,56 мг, 7,07 мкмоль) Реакционную смесь перемешивали при 120°C в течение 1,5 ч в условиях микроволнового облучения. Реакционную смесь разводили метанолом. После прямой очистки с помощью препаративной ВЭЖХ получали искомый продукт. ЖХМС рассчитано для C₂₃H₁₆FN₈: 423,1 (M+H)⁺; получено: 423.3 (M+H)⁺.

Пример A16: Синтез 3-(4-амино-7-(1-метил-1H-пиразол-5-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)-2-фторбензонитрила

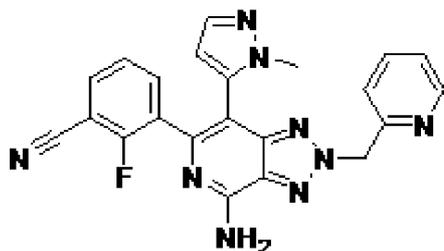


Стадия 1. 3-(4-амино-7-бром-2-(пиридин-2-илметил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)-2-фторбензонитрил



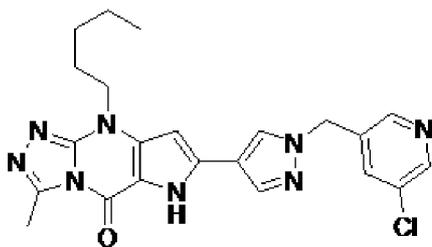
Это соединение получали в соответствии с процедурой, аналогичной описанной в Примере A13, Стадия 1-Стадия 6, с использованием (3-циано-2-фторфенил)бороновой кислоты вместо (3-цианофенил)бороновой кислоты на Стадии 4. ЖХМС рассчитано для C₁₈H₁₂BrFN₇: 424,0 (M+H)⁺ и 426,0 (M+H)⁺; получено: 424,3 (M+H)⁺ и 426,3 (M+H)⁺.

Стадия 2. 3-(4-амино-7-(1-метил-1H-пиразол-5-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)-2-фторбензонитрил

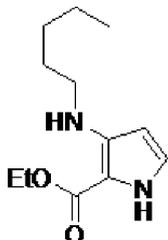


Это соединение получали в соответствии с процедурой, аналогичной описанной в Примере A15, с использованием (1-метил-1H-пиразол-5-ил)бороновой кислоты вместо пиридин-4-илбороновой кислоты и с использованием 3-(4-амино-7-бром-2-(пиридин-2-илметил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)-2-фторбензонитрила вместо 3-(4-амино-7-бром-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрила. ЖХМС рассчитано для C₂₂H₁₇FN₉: 426,2 (M+H)⁺; получено: 426,3 (M+H)⁺.

Пример A17: Синтез 7-(1-((5-Хлорпиридин-3-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-3-метил-9-пентил-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-она

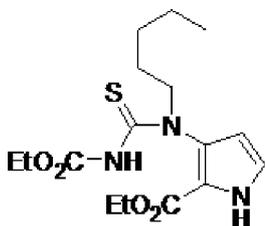


Стадия 1: Этил-3-(пентиламино)-1H-пиррол-2-карбоксилат



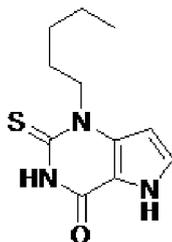
Этил-3-амино-1H-пиррол-2-карбоксилат (5 г, 32,4 ммоль), пентаналь (3,79 мл, 35,7 ммоль) и цианоборогидрид натрия (2,038 г, 32,4 ммоль) смешивали в метаноле (64,9 мл) при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали флэш-хроматографией (0-100% EtOAc в гексанах) с получением искомого продукта (4,4 г, 61%). ЖХМС рассчитано для $C_{12}H_{21}N_2O_2$ (M+H): 225,2; получено 225,1.

Стадия 2: Этил-3-(3-(этоксикарбонил)-1-пентилтиоуреидо)-1H-пиррол-2-карбоксилат



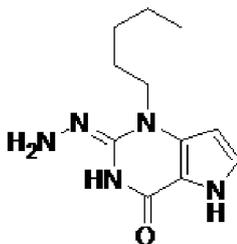
Во флакон загружали этил 3-(пентиламино)-1H-пиррол-2-карбоксилат (4,4 г, 19,62 ммоль), дихлорметан (39,2 мл) и этоксикарбонилизотиоцианат (2,78 мл, 23,54 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционную смесь гасили водой (40 мл) и разделяли слои. Водный слой экстрагировали дихлорметаном (3×40 мл), объединенные органические фракции сушили над $MgSO_4$, фильтровали и концентрировали. Неочищенный материал без дополнительной очистки использовали на следующей стадии (7,3 г, количественно). ЖХМС рассчитано для $C_{16}H_{26}N_3O_4S$ (M+H): 356,2; обнаружено: 356,1.

Стадия 3: 1-пентил-2-тиоксо-2,3-дигидро-1H-пирроло[3,2-d]пиримидин-4(5H)-он



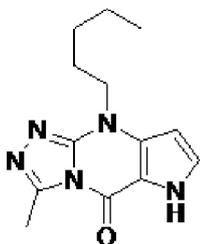
В сосуд для микроволнового реактора загружали этил 3-(3-(этоксикарбонил)-1-пентилтиоуреидо)-1*H*-пиррол-2-карбоксилат (7,31 г, 20,57 ммоль) и раствор этиоксида натрия (21% масс./масс., 8,45 мл, 22,62 ммоль). Сосуд укупоривали и нагревали в микроволновом реакторе в течение 10 минут при температуре 120 градусов Цельсия. Реакционную смесь доводили до нейтрального pH добавлением 1М раствора HCl, твердый продукт фильтровали и сушили (3,1 г, 64%). ЖХМС рассчитано для C₁₁H₁₆N₃OS (M+H): 238,1; получено 238,1.

*Стадия 4: 2-гидразоно-1-пентил-2,3-дигидро-1*H*-пирроло[3,2-*d*]пиримидин-4(5*H*)-он*



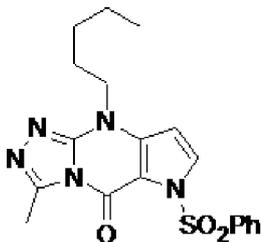
Во сосуд загружали 1-пентил-2-тиоксо-2,3-дигидро-1*H*-пирроло[3,2-*d*]пиримидин-4(5*H*)-он (3,13 г, 13,19 ммоль) и гидрат гидразина (20 мл). Реакционную смесь перемешивали при 100 °С в течение ночи. Образовавшееся твердое вещество отфильтровывали и промывали водой с получением искомого продукта (2,2 г, 70%). ЖХМС рассчитано для C₁₁H₁₈N₅O (M+H): 236,1; получено 236,1.

*Стадия 5: 3-Метил-9-пентил-6,9-дигидро-5*H*-пирроло[3,2-*d*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиримидин-5-он*



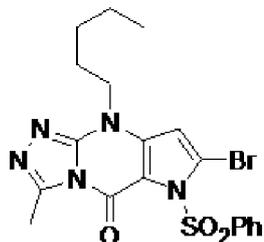
В сосуд загружали (*E*)-2-гидразоно-1-пентил-2,3-дигидро-1*H*-пирроло[3,2-*d*]пиримидин-4(5*H*)-он (4,8 г, 20,40 ммоль), каплю трифторуксусной кислоты и триэтилортоацетат (20 мл). Реакционную смесь нагревали до 110°C в течение трех часов. Суспензию фильтровали, промывали гексаном и сушили (4,0 г, 76%). ЖХМС рассчитано для C₁₃H₁₈N₅O (M+H): 260,1; получено 260,2.

*Стадия 6: 3-Метил-9-пентил-6-(фенилсульфонил)-6,9-дигидро-5*H*-пирроло[3,2-*d*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиримидин-5-он*



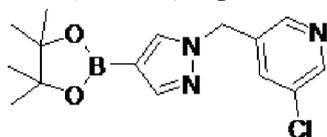
В сосуд загружали 3-метил-9-пентил-6,9-дигидро-5*H*-пирроло[3,2-*d*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиримидин-5-он (со стадии 1) (4 г, 15,43 ммоль), дихлорметан (40 мл), диметиламинопиридин (0,188 г, 1,543 ммоль), триэтиламин (3,23 мл, 23,14 ммоль) и бензолсульфонилхлорид (2,187 мл, 16,97 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Реакционную смесь гасили водой и разделяли слои. Водный слой экстрагировали дихлорметаном (3×40 мл), объединенные органические фракции сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали. Неочищенный материал без дополнительной очистки использовали на следующей стадии (6,1 г, количественно). ЖХМС рассчитано для C₁₉H₂₂N₅O₃S (M+H): 400,1; обнаружено: 400,1.

Стадия 7: 7-бром-3-метил-9-пентил-6-(фенилсульфонил)-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-он



В сосуд загружали 3-метил-9-пентил-6-(фенилсульфонил)-6,9-дигидро-5*H*-пирроло[3,2-*d*][1,2,4]триазоло[4,3-*a*]пиримидин-5-он (1 г, 2,503 ммоль), сухой ТГФ (30 мл) и смесь охлаждали до -78 °С. По каплям добавляли раствор диизопропиламида лития (1М в гексанах/ТГФ, 3,13 мл, 3,13 ммоль). Реакционную смесь выдерживали при -78°С в течение 1,5 ч. К реакционной смеси по каплям добавляли раствор 1,2-дибром-1,1,2,2-тетрахлорэтана (1,223 г, 3,75 ммоль) в сухом ТГФ (3 мл) и реакционную смесь выдерживали при -78°С еще 1,5 ч. Реакционную смесь гасили насыщ. водн. раствором NH₄Cl (30 мл) и разбавляли дихлорметаном (30 мл). Слои разделяли и водный слой экстрагировали ДХМ (3×30 мл). Объединенные органические фракции сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали. Неочищенный остаток очищали с помощью автоматической флэш-хроматографии (0-100% EtOAc в ДХМ) с получением искомого продукта (0,84 г, 70%). ЖХМС рассчитано для C₁₉H₂₁BrN₅O₃S (M+H): 478,1; получено: 478,1.

*Стадия 8: 3-Хлор-5-((4-(4,4,5,5-тетрамethyl-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1*H*-пирозол-1-ил)метил)тиридин*



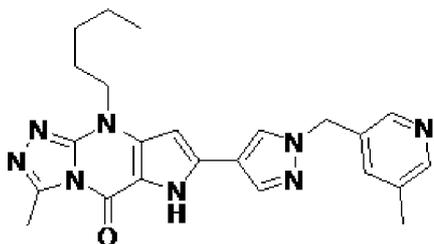
В сосуд загружали 4-(4,4,5,5-тетрамethyl-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1*H*-пирозол (0,5 г, 2,58 ммоль), 3-(бромметил)-5-хлорпиридина гидробромид (0,741 г, 2,58 ммоль), карбонат цезия (2,52 г, 7,73 ммоль) и DMF (6,44 мл). Реакционную смесь перемешивали при 60°С в течение одного часа. Реакционную смесь гасили водой (10 мл) и разбавляли дихлорметаном (10 мл). Слои разделяли и водный слой экстрагировали дихлорметаном (3×10 мл). Объединенные дихлорметановые экстракты сушили над MgSO₄, фильтровали и

концентрировали. После очистки с помощью автоматической флэш-хроматографии (0-100% EtOAc в ДХМ) получали искомый продукт (0,548 г, 67%). ЖХМС рассчитано для $C_{15}H_{20}BClN_3O_2$ (M+H): 320,1, 322,1; получено 320,1, 322,1.

Стадия 9: 7-(1-((5-Хлортиридин-3-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-3-метил-9-пентил-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-он

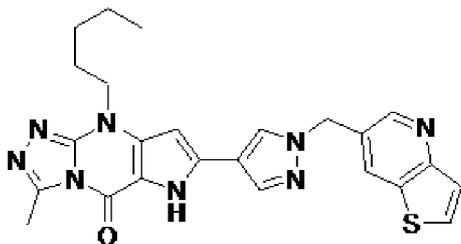
В сосуд загружали 7-бром-3-метил-9-пентил-6-(фенилсульфонил)-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-он (0,01 г, 0,021 ммоль), 3-хлор-5-((4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразол-1-ил)метилпиридин (0,013 г, 0,042 ммоль), хлор(2-дициклогексилфосфино-2',4',6'-триизопропил-1,1'-бифенил)[2-(2'-амино-1,1'-бифенил)]палладий(II) (5,00 мг, 0,006 ммоль) и трехосновный фосфат калия (0,016 г, 0,074 ммоль). Добавляли 1,4-диоксан (0,35 мл) и воду (0,07 мл) и реакционную смесь барботировали газообразным азотом в течение 5 минут, а затем перемешивали при 90 °С в течение двух часов. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и добавляли гидроксид натрия (10 мг). Реакционную смесь перемешивали при 40°С в течение 60 мин. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и разбавляли DMF (5 мл). После очистки препаративной ВЭЖХ (pH 2, ацетонитрил/вода с ТФУ) получали искомый продукт в виде соли ТФУ (2 мг, 21%). ЖХМС рассчитано для $C_{22}H_{24}ClN_8O$ (M+H): 451,2, 453,2; получено 451,2, 453,2.

Пример A18: Синтез 3-Метил-7-(1-((5-метилпиридин-3-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-9-пентил-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-она



Это соединение получали с использованием процедур, аналогичных описанным в Примере A17, с использованием 3-(бромметил)-5-метилпиридина вместо гидробромида 3-(бромметил)-5-хлорпиридина на Стадии 8. ЖХМС рассчитано для $C_{23}H_{27}N_8O$ (M+H): 431,2; получено: 431,3.

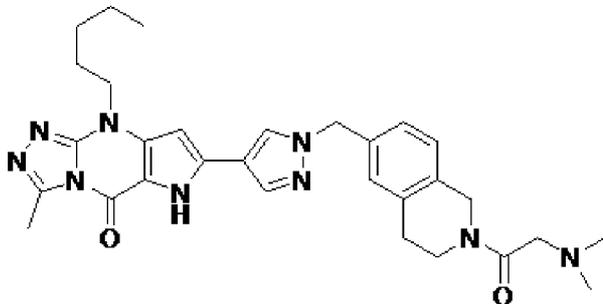
Пример A19: Синтез 3-Метил-9-пентил-7-(1-(тиено[3,2-b]пиридин-6-илметил)-1H-пиразол-4-ил)-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-она



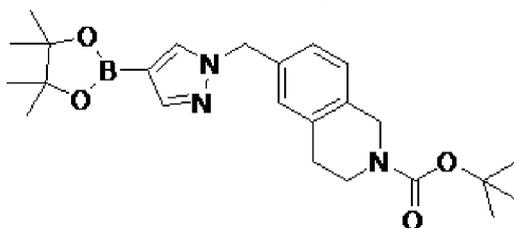
Это соединение получали с использованием процедур, аналогичных описанным в Примере A17, с использованием 6-(бромметил)тиено[3,2-b]пиридина вместо гидробромида

3-(бромметил)-5-хлорпиридина на Стадии 8. ЖХМС рассчитано для $C_{24}H_{25}N_8OS$ (M+H): 473,2. получено: 473,3.

Пример А20: 7-(1-((2-(2-(диметиламино)ацетил)-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-6-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-3-метил-9-пентил-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-он

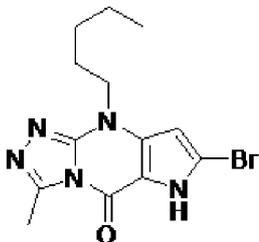


Стадия 1: трет-бутил 6-((4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразол-1-ил)метил)-3,4-дигидроизохинолин-2(1H)-карбоксилат



В сосуд загружали 4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразол (.5 г, 2,58 ммоль), трет-бутил 6-(гидроксиметил)-3,4-дигидроизохинолин-2(1H)-карбоксилат (0,339 г, 1,288 ммоль), трифенилфосфин (0,743 г, 2,83 ммоль) и ТГФ (12 мл). Раствор охлаждали до 0°C и по каплям добавляли DIAD (0,601 мл, 3,09 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Смесь разбавляли этилацетатом и промывали водой, сушили и концентрировали. Продукт очищали колоночной хроматографией, элюируя смесью гексан/EtOAc (макс. EtOAc 60%), с получением искомого продукта. ЖХМС рассчитано для $C_{24}H_{35}BN_3O_4$ (M+H)⁺: m/z=440,3; получено 440,3.

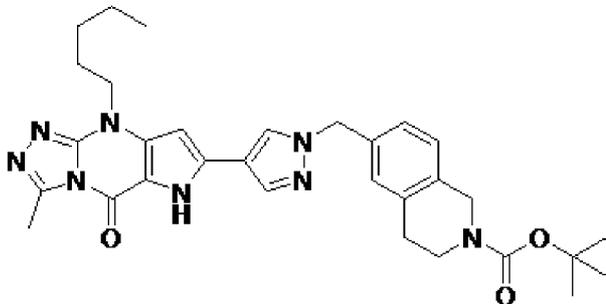
Стадия 2: 7-бром-3-метил-9-пентил-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-он



ТВАФ (1,0 М в ТГФ) (2,0 мл, 2,0 ммоль) добавляли к раствору 7-бром-3-метил-9-пентил-6-(фенилсульфонил)-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-она (0,360 г, 0,753 ммоль) в ТГФ (4,0 мл), а затем реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 1 ч. Растворитель удаляли и продукт очищали

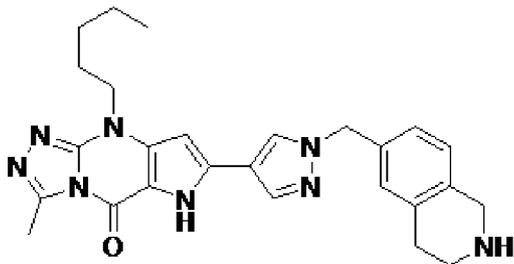
колоночной хроматографией, элюируя смесью $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (макс. MeOH 10%). ЖХМС рассчитано для $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{BrN}_5\text{O}$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺: $m/z=338,1$; получено 338,1.

Стадия 3: трет-бутил 6-((4-(3-метил-5-оксо-9-пентил-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-7-ил)-1H-пиразол-1-ил)метил)-3,4-дигидроизохинолин-2(1H)-карбоксилат



Смесь 7-бром-3-метил-9-пентил-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-она (из Примера А20, Стадия 2) (0,040 г, 0,118 ммоль), *tert*-бутил-6-((4-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксаборолан-2-ил)-1H-пиразол-1-ил)метил)-3,4-дигидроизохинолин-2(1H)-карбоксилата (0,062 г, 0,142 ммоль), дихлор[1,1'-бис(дициклогексилфосфино)ферроцен]палладия(II), аддукта дихлорметана (Pd-127) (8,94 мг, 0,012 ммоль) и фторида цезия (0,090 г, 0,591 ммоль) в *t*-BuOH (1,5 мл)/вода (0,6 мл) вакуумировали и заменяли N_2 3 раза. Затем реакционную смесь перемешивали при 105 °С в течение 2 ч, охлаждали до комнатной температуры, разбавляли этилацетатом, промывали водой, сушили и концентрировали. Продукт очищали колоночной хроматографией, элюируя смесью $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (макс. MeOH 10%). ЖХМС рассчитано для $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{N}_8\text{O}_3$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺: $m/z=571,3$; получено 571,5.

Стадия 4: 3-метил-9-пентил-7-(1-((1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-6-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-он



ТФУ (0,5 мл, 6,49 ммоль) добавляли к раствору *tert*-бутил 6-((4-(3-метил-5-оксо-9-пентил-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-7-ил)-1H-пиразол-1-ил)метил)-3,4-дигидроизохинолин-2(1H)-карбоксилата (50,0 мг, 0,088 ммоль) в CH_2Cl_2 (0,5 мл), затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем растворитель удаляли, получая неочищенный продукт в виде соли ТФУ. ЖХМС рассчитано для $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_8\text{O}$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺: $m/z=471,3$; получено 471,2.

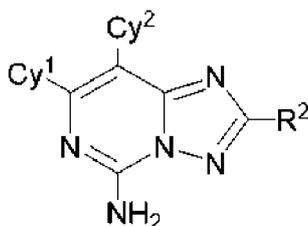
Стадия 5: 7-(1-((2-(2-(диметиламино)ацетил)-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-6-ил)метил)-1H-пиразол-4-ил)-3-метил-9-пентил-6,9-дигидро-5H-пирроло[3,2-d][1,2,4]триазоло[4,3-a]пиримидин-5-он

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту следующих агентов:

- (i) ингибитор A2A/A2B;
- (ii) ингибитор PD-1/PD-L1; и
- (iii) ингибитор CD73 человека.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B представляет собой соединение по формуле (I):



(I)

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

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

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

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

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

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

3. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B выбран из следующих соединений:

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

3-(5-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил;

3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-2H-тетразол-2-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил;

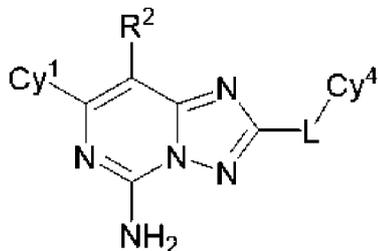
3-(5-амино-2-((3-метилпиридин-2-ил)метокси)-8-(пиримидин-4-ил)-

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

3-(2-((5-(1Н-пиразол-1-ил)-2Н-тетразол-2-ил)метил)-5-амино-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил;

или фармацевтически приемлемой соли любого из вышеупомянутых соединений.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B представляет собой соединение по формуле (II):



(II)

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

R^2 выбран из H и CN;

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

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

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

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

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

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

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

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

5. Способ по п. 1 или п. 4, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B выбран из следующих соединений:

3-(5-амино-2-(гидрокси(фенил)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил;

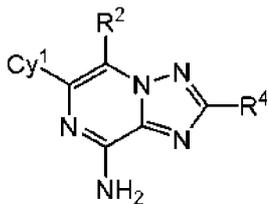
3-(5-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрил;

5-амино-7-(3-циано-2-фторфенил)-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-8-карбонитрил; и

3-(5-амино-2-((2-фтор-6-(((1-метил-2-оксопирролидин-3-ил)амино)метил)фенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрил;

или фармацевтически приемлемой соли любого из вышеупомянутых соединений.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B представляет собой соединение по формуле (III):



(III)

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

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

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

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

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

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

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

7. Способ по п. 1 или п. 6, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B выбран из следующих соединений:

3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиримидин-2-илметил)-

[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил;

3-(8-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-5-(пиримидин-4-ил)-

[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил;

3-(8-амино-2-(амино(2,6-дифторфенил)метил)-5-(4-метилоксазол-5-ил)-

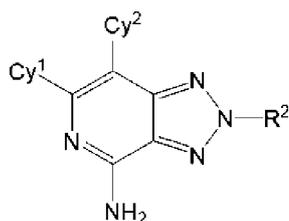
[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил; и

3-(8-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-5-(2,6-диметилпиридин-4-ил)-

[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил;

или фармацевтически приемлемой соли любого из вышеупомянутых соединений.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B представляет собой соединение по формуле (IV):



(IV)

или его фармацевтически приемлемую соль, где:

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

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

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

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

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

или его фармацевтически приемлемой соли.

9. Способ по п. 1 или п. 8, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B выбран из следующих соединений:

3-(4-амино-2-(пиридин-2-илметил)-7-(пиримидин-4-ил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиримидин-6-ил)бензонитрил;

3-(4-амино-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-7-(пиридин-4-ил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил;

3-(4-амино-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-7-(пиридин-4-ил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил; и

3-(4-амино-7-(1-метил-1H-пиразол-5-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-2H-[1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)-2-фторбензонитрил;

или фармацевтически приемлемой соли любого из вышеупомянутых соединений.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B представляет собой

3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль.

11. Способ по п. 1, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B представляет собой 3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-2H-тетразол-2-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло [1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль.

12. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой (R)-1-((7-циано-2-(3'-(3-(((R)-3-гидроксипирролидин-1-ил)метил)-1,7-нафтиридин-8-иламино)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновую кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль.

13. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой пембролизумаб.

14. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой атезолизумаб.

15. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что ингибитор PD-1/PD-L1 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с PD-1 человека, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность SYWMN (SEQ ID NO:6);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность VHPDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO: 7); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность EHYGTSPFAY (SEQ ID NO: 8); и

при этом антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность RASEVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO: 9);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AASNQGS (SEQ ID NO: 10); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSKEVPYT (SEQ ID NO:11).

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4, и домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5.

17. Способ по п. 15, отличающийся тем, что антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3.

18. Способ по п. 15, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с PD-1 человека, представляет собой гуманизованное антитело.

19. Способ по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что ингибитор CD73 человека содержит:

(а) антитело, которое связывается с CD73 человека и содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO:16);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO:17); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFYD (SEQ ID NO:18); и

содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO:19);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO:20); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO:21);

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

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

(d) антитело, которое связывается с CD73 человека и содержит домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

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

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

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

антитело, содержащее домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

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

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

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPH (SEQ ID

NO:39);

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

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

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

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

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

20. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что ингибитор CD73 человека представляет собой антитело, которое связывается с CD73 человека и содержит:

домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO:16);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO:17); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFDY (SEQ ID NO:18); и

домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO:19);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO:20); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO:21).

21. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что ингибитор CD73 человека содержит антитело, которое связывается с CD73 человека в эпитопе в пределах аминокислот 40-53 SEQ ID NO:70.

22. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что ингибитор CD73 человека содержит антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25.

23. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что ингибитор CD73 человека содержит антитело, которое связывается с CD73 человека и содержит:

домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

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

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

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

домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

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

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

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

24. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что ингибитор CD73 человека содержит антитело, которое связывается с CD73 человека в эпителии в пределах аминокислот 386-399 и 470-489 SEQ ID NO:70.

25. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что ингибитор CD73 человека содержит антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31.

26. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что ингибитор CD73 человека содержит антитело, которое связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31.

27. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что ингибитор CD73 человека содержит антитело, выбранное из группы, состоящей из 11E1, Medi9447, CPI-006 и BMS-986179.

28. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что ингибитор CD73 человека выбран из группы, состоящей из CB-708 и AB680.

29. Способ по п. 20, отличающийся тем, что домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22, и домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23.

30. Способ по п. 20, отличающийся тем, что антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25.

31. Способ по п. 23, отличающийся тем, что домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 62, и домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61.

32. Способ по п. 23, отличающийся тем, что антитело содержит тяжелую цепь и

легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31.

33. Способ по п. 23, отличающийся тем, что домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 63, и домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61.

34. Способ по п. 23, отличающийся тем, что антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31.

35. Способ по любому из пп. 1-34, отличающийся тем, что рак выбран из рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака шейки матки, рака толстой кишки, рака прямой кишки, колоректального рака, рака анального канала, рака эндометрия, рака почки, рака ротовой полости, рака головы и шеи, рака печени, меланомы, мезотелиомы, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, немеланомного рака кожи, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, саркомы, рака щитовидной железы, почечно-клеточной карциномы и карциномы из клеток Меркеля.

36. Способ по любому из пп. 1-34, отличающийся тем, что рак выбран из меланомы, рака эндометрия, рака легкого, рака почки, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, рака головы и шеи, колоректального рака, рака яичников, рака печени или почечно-клеточной карциномы.

37. Способ по любому из пп. 1-34, отличающийся тем, что рак представляет собой меланому.

38. Способ по любому из пп. 1-34, отличающийся тем, что рак представляет собой рак молочной железы.

39. Способ лечения рака, выбранного из рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака шейки матки, рака толстой кишки, рака прямой кишки, колоректального рака, рака анального канала, рака эндометрия, рака почки, рака ротовой полости, рака головы и шеи, рака печени, меланомы, мезотелиомы, немелкоклеточного рака легкого, мелкоклеточного рака легкого, немеланомного рака кожи, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, саркомы, рака щитовидной железы, почечно-клеточной карциномы и карциномы из клеток Меркеля у субъекта, включающий введение субъекту следующих агентов:

(i) ингибитор A2A/A2B;

(ii) ингибитор PD-1/PD-L1, который представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с PD-1 человека, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность SYWMN (SEQ ID NO:6);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность VIHPSDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO: 7); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность EHYGTSPFAY (SEQ ID NO: 8); и

при этом антитело содержит вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность RASESVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO: 9);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AASNQGS (SEQ ID NO: 10); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSKEVPYT (SEQ ID NO: 11); и

(iii) антитело, которое связывается с CD73 человека, при этом антитело, которое связывается с CD73 человека:

(а) содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO: 16);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO: 17); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFY (SEQ ID NO: 18); и

содержит вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO: 19);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO: 20); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO: 21);

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

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

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

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

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

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

при этом антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL, при этом:

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

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

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

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

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

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

40. Способ по п. 39, отличающийся тем, что антитело, которое связывается с CD73 человека, содержит домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO:16);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO:17); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFDY (SEQ ID NO:18); и

при этом антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO:19);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO:20); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO:21).

41. Способ по п. 40, отличающийся тем, что домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:22.

42. Способ по п. 40, отличающийся тем, что антитело содержит тяжелую цепь, и при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:24.

43. Способ по п. 40, отличающийся тем, что домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:23.

44. Способ по п. 40, отличающийся тем, что антитело содержит легкую цепь, и при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:25.

45. Способ по п. 40, отличающийся тем, что домен VH по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:22, а домен VL по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO:23.

46. Способ по п. 40, отличающийся тем, что домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22, и домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23.

47. Способ по п. 40, отличающийся тем, что антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25.

48. Способ по п. 39, отличающийся тем, что антитело, которое связывается с CD73 человека, связывается с эпитопом в пределах аминокислот 40-53 SEQ ID NO: 70.

49. Способ по п. 39, отличающийся тем, что антитело связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25.

50. Способ по п. 39, отличающийся тем, что антитело, которое связывается с CD73 человека, содержит домен VH, содержащий CDR1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

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

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

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

при этом антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL, при этом:

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

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

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

51. Способ по п. 50, отличающийся тем, что:

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

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

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ATEIAAKGDY (SEQ ID

NO:36);

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO:37);
CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AAS (SEQ ID NO:38); и
CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPH (SEQ ID

NO:39).

52. Способ по п. 51, отличающийся тем, что домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:62.

53. Способ по п. 51, отличающийся тем, что антитело содержит тяжелую цепь, и при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:30.

54. Способ по п. 51, отличающийся тем, что домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61.

55. Способ по п. 51, отличающийся тем, что антитело содержит легкую цепь, и при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31.

56. Способ по п. 51, отличающийся тем, что домен VH по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 62, а домен VL по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 61.

57. Способ по п. 51, отличающийся тем, что домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 62, а домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61.

58. Способ по п. 51, отличающийся тем, что антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, и при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 30, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31.

59. Способ по п. 50, отличающийся тем, что:

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

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

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

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QGISNY (SEQ ID NO:37);
CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AAS (SEQ ID NO:38); и
CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSYSTPH (SEQ ID

NO:39).

60. Способ по п. 59, отличающийся тем, что домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:63.

61. Способ по п. 59, отличающийся тем, что антитело содержит тяжелую цепь, и при

этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:33.

62. Способ по п. 59, отличающийся тем, что домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61.

63. Способ по п. 59, отличающийся тем, что антитело содержит легкую цепь, и при этом легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31.

64. Способ по п. 59, отличающийся тем, что домен VH по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 63, а домен VL по меньшей мере на 80% идентичен аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 61.

65. Способ по п. 59, отличающийся тем, что домен VH содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 63, а домен VL содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 61.

66. Способ по п. 59, отличающийся тем, что антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, и при этом тяжелая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 33, а легкая цепь содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 31.

67. Способ по п. 39, отличающийся тем, что антитело, которое связывается с CD73 человека, связывается с эпитопом в пределах аминокислот 386-399 и 470-489 SEQ ID NO: 70.

68. Способ по п. 39, отличающийся тем, что антитело связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31.

69. Способ по п. 39, отличающийся тем, что антитело связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31.

70. Способ по любому из пп. 39-69, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B выбран из группы, состоящей из следующих соединений:

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

3-(5-амино-2-((2,6-дифторфенил)гидрокси)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил;

3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-2Н-тетразол-2-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил;

3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-1Н-тетразол-1-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил;

3-(5-амино-2-((3-метилпиридин-2-ил)метокси)-8-(пиримидин-4-ил)-

- [1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил;
 3-(2-((5-(1Н-пиразол-1-ил)-2Н-тетразол-2-ил)метил)-5-амино-8-(пиримидин-4-ил)-
 [1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил;
 3-(2-((5-(1Н-пиразол-1-ил)-1Н-тетразол-1-ил)метил)-5-амино-8-(пиримидин-4-ил)-
 [1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил;
 3-(5-амино-2-(гидрокси(фенил)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-
 ил)бензонитрил;
 3-(5-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-
 с]пиримидин-7-ил)-2-фторбензонитрил;
 5-амино-7-(3-циано-2-фторфенил)-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-
 [1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-8-карбонитрил;
 3-(5-амино-2-((2-фтор-6-((1-метил-2-оксопирролидин-3-
 ил)амино)метил)фенил)(гидрокси)метил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)-2-
 фторбензонитрил;
 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-
 [1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил;
 3-(8-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-5-(пиримидин-4-ил)-
 [1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил;
 3-(8-амино-2-(амино(2,6-дифторфенил)метил)-5-(4-метилоксазол-5-ил)-
 [1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил;
 3-(8-амино-2-((2,6-дифторфенил)(гидрокси)метил)-5-(2,6-диметилпиридин-4-ил)-
 [1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил;
 3-(4-амино-2-(пиридин-2-илметил)-7-(пиримидин-4-ил)-2Н-[1,2,3]триазоло[4,5-
 с]пиримидин-6-ил)бензонитрил;
 3-(4-амино-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-7-(пиридин-4-ил)-2Н-
 [1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил;
 3-(4-амино-2-((3-фторпиридин-2-ил)метил)-7-(пиридин-4-ил)-2Н-
 [1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)бензонитрил; и
 3-(4-амино-7-(1-метил-1Н-пиразол-5-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-2Н-
 [1,2,3]триазоло[4,5-с]пиридин-6-ил)-2-фторбензонитрил;
 или фармацевтически приемлемой соли любого из вышеупомянутых соединений.
71. Способ по любому из пп. 39-69, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B
 выбран из группы, состоящей из следующих соединений:
- 7-(5-метилфуран-2-ил)-3-[[6-[[3S)-оксолан-3-ил]оксиметил]пиридин-2-
 ил]метил]триазоло[4,5-d]пиримидин-5-амин;
 3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-2Н-тетразол-2-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-
 [1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил;
 3-[2-амино-6-[1-[[6-(2-гидроксипропан-2-ил)пиридин-2-ил]метил]триазол-4-
 ил]пиримидин-4-ил]-2-метилбензонитрил; и
 6-(2-хлор-6-метилпиридин-4-ил)-5-(4-фторфенил)-1,2,4-триазин-3-амин;

5-бром-2,6-ди-(1H-пиразол-1-ил)пиримидин-4-амин;

или фармацевтически приемлемой соли любого из вышеупомянутых соединений.

72. Способ по любому из пп. 39-69, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B представляет собой 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиразин-6-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль.

73. Способ по любому из пп. 39-69, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B представляет собой 3-(5-амино-2-((5-(пиридин-2-ил)-2H-тетразол-2-ил)метил)-8-(пиримидин-4-ил)-[1,2,4]триазоло[1,5-с]пиримидин-7-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль.

74. Способ по любому из пп. 39-73, отличающийся тем, что рак выбран из меланомы, рака эндометрия, рака легкого, рака почки, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, рака головы и шеи, колоректального рака, рака яичников, рака печени или почечно-клеточной карциномы.

75. Способ по любому из пп. 39-73, отличающийся тем, что рак представляет собой меланому.

76. Способ по любому из пп. 39-73, отличающийся тем, что рак представляет собой рак молочной железы.

77. Способ лечения рака молочной железы у субъекта, включающий введение субъекту следующих агентов:

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

(ii) ингибитор PD-1/PD-L1, который представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с PD-1 человека, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность SYWMN (SEQ ID NO:6);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность VHPDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO: 7); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность EHYGTSPFAY (SEQ ID NO: 8); и

при этом антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность RASESVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO: 9);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AASNQGS (SEQ ID NO: 10); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSKEVPYT (SEQ ID

NO:11); и

(iii) антитело, которое связывается с CD73 человека, при этом антитело, которое связывается с CD73 человека:

(а) содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO:16);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO:17); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFDY (SEQ ID NO:18); и

содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO:19);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO:20); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO:21);

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

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

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

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

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

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

при этом антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL, при этом:

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

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

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

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

(f) связывается с CD73 человека и конкурирует за связывание с CD73 человека с

антителом, которое имеет тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31; или

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

78. Способ лечения рака молочной железы у субъекта, включающий введение субъекту следующих агентов:

(i) ингибитор A2A/A2B, который представляет собой 3-(8-амино-5-(1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиридазин-3-ил)-2-(пиридин-2-илметил)-[1,2,4]триазоло[1,5-а]пиазин-6-ил)бензонитрил или его фармацевтически приемлемую соль;

(ii) ингибитор PD-1/PD-L1, который представляет собой (R)-1-((7-циано-2-(3'-(3-(((R)-3-гидроксипирролидин-1-ил)метил)-1,7-нафтиридин-8-иламино)-2,2'-диметилбифенил-3-ил)бензо[d]оксазол-5-ил)метил)пирролидин-3-карбоновую кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль; и

(iii) антитело, которое связывается с CD73 человека, при этом антитело, которое связывается с CD73 человека:

(a) содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO:16);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO:17); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFYD (SEQ ID NO:18); и

содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO:19);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO:20); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO:21);

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

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

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

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

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

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

при этом антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL, при этом:

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

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

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

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

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

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

79. Способ по п. 77 или п. 78, отличающийся тем, что рак молочной железы представляет собой аденокарциному молочной железы.

80. Способ по любому из пп. 1-79, отличающийся тем, что рак имеет высокую сигнатуру аденозина.

81. Способ по любому из пп. 1-80, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B вводят субъекту в дозе от около 0,1 мг до около 1000 мг в пересчете на свободное основание.

82. Способ по любому из пп. 1-81, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B вводят субъекту один раз в день, через день или один раз в неделю.

83. Способ по любому из пп. 1-82, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B, ингибитор PD-1/PD-L1 и ингибитор CD73 человека вводят одновременно.

84. Способ по любому из пп. 1-82, отличающийся тем, что ингибитор A2A/A2B, ингибитор PD-1/PD-L1 и ингибитор CD73 человека вводят последовательно.

85. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту следующих агентов:

(i) ингибитор PD-1/PD-L1; и

(ii) ингибитор CD73 человека.

86. Способ лечения рака, выбранного из рака шеи и головы, рака легкого, рака яичников, рака предстательной железы, рака молочной железы, рака мочевого пузыря,

колоректального рака, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, рака анального канала, рака печени или рака поджелудочной железы у субъекта, включающий введение субъекту следующих агентов:

(i) ингибитор PD-1/PD-L1, который представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с PD-1 человека, при этом указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность SYWMN (SEQ ID NO:6);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность VHPDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO: 7); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность EHYGTSPFAY (SEQ ID NO: 8); и

при этом антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность RASESDNYGMSFMNW (SEQ ID NO: 9);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AASNQGS (SEQ ID NO: 10); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSKEVPYT (SEQ ID NO:11); и

(ii) антитело, которое связывается с CD73 человека, при этом антитело, которое связывается с CD73 человека:

(a) содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID NO:16);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID NO:17); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFDY (SEQ ID NO:18); и

содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID NO:19);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO:20); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID NO:21);

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

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

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

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

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

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

при этом антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL, при этом:

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

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

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

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

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

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

87. Способ лечения рака, выбранного из плоскоклеточной карциномы шеи и головы (SCCNH), немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака яичников, кастрационно-резистентного рака предстательной железы (CRPC), трижды негативного рака молочной железы (TNBC), рака мочевого пузыря, метастатического колоректального рака (mCRC), протоковой аденокарциномы поджелудочной железы (PDAC), рака пищеводно-желудочного соединения (GEJ), гепатоцеллюлярной карциномы (HCC) или плоскоклеточной карциномы анального канала (SCAC), у субъекта, включающий введение субъекту следующих агентов:

(i) ингибитор PD-1/PD-L1, который представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с PD-1 человека, при этом указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность SYWMN (SEQ ID NO:6);
CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность
VIHPSDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO: 7); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность EHYGTSPFAY (SEQ ID
NO: 8); и

при этом антитело содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий
CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность
RASESVDNYGMSFMNW (SEQ ID NO: 9);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность AASNQGS (SEQ ID NO:
10); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQSKEVPYT (SEQ ID
NO:11); и

(ii) антитело, которое связывается с CD73 человека, при этом антитело, которое
связывается с CD73 человека:

(a) содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий определяющую
комплементарность область (CDR)1 VH, CDR2 VH и CDR3 VH, при этом:

CDR1 VH содержит аминокислотную последовательность GYTFTSYG (SEQ ID
NO:16);

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность IYPGSGNT (SEQ ID
NO:17); и

CDR3 VH содержит аминокислотную последовательность ARYDYLGSSYGFDY
(SEQ ID NO:18); и

содержит переменный домен легкой цепи (VL), содержащий CDR1 VL, CDR2 VL
и CDR3 VL, при этом:

CDR1 VL содержит аминокислотную последовательность QDVSTA (SEQ ID
NO:19);

CDR2 VL содержит аминокислотную последовательность SAS (SEQ ID NO:20); и

CDR3 VL содержит аминокислотную последовательность QQHYNTPYT (SEQ ID
NO:21);

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

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

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

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

CDR2 VH содержит аминокислотную последовательность MSYDGSNK (SEQ ID

NO:35) или MSYEGSNK (SEQ ID NO:40); и

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

при этом антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL, при этом:

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

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

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

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

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

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

88. Способ лечения рака, выбранного из рака шеи и головы, рака легкого, рака яичников, рака предстательной железы, рака молочной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака, рака желудка, рака пищеводно-желудочного перехода, рака анального канала, рака печени и рака поджелудочной железы у субъекта, включающий введение субъекту следующих агентов:

(i) ингибитор PD-1/PD-L1, который представляет собой ретифанлимаб; и

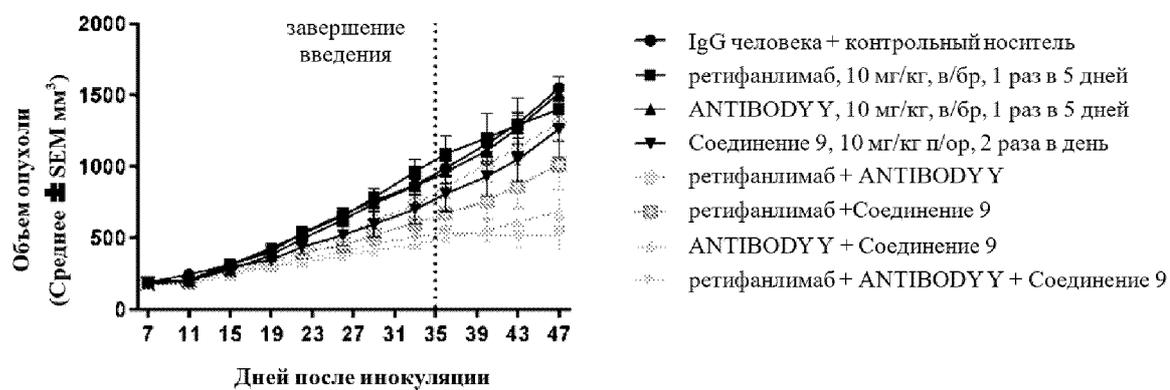
(ii) антитело, которое связывается с CD73 человека и представляет собой ANTIBODY Y.

89. Способ лечения рака, выбранного из плоскоклеточной карциномы шеи и головы (SCCNH), немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака яичников, кастрационно-резистентного рака предстательной железы (CRPC), трижды негативного рака молочной железы (TNBC), рака мочевого пузыря, метастатического колоректального рака (mCRC) и рака поджелудочной железы, у субъекта, включающий введение субъекту следующих агентов:

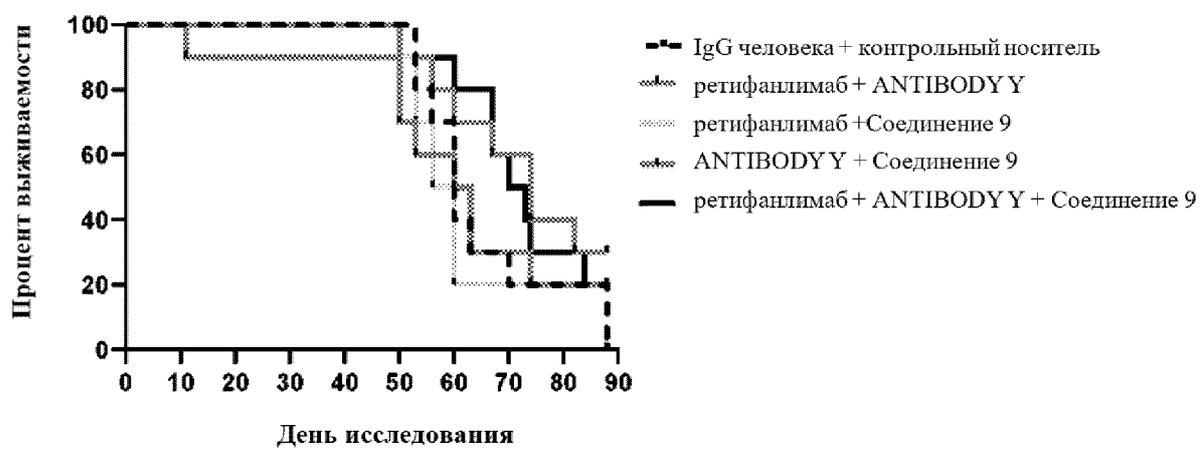
(i) ингибитор PD-1/PD-L1, который представляет собой ретифанлимаб; и

(ii) антитело, которое связывается с CD73 человека и представляет собой ANTIBODY Y.

По доверенности



Фиг. 1



Фиг. 2.