(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118354793 A
(43)申请公布日 2024.07.16

(21)申请号 202380014911.7
(22)申请日 2023.04.14
(30)优先权数据
63/336,418 2022.04.29 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.06.03
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/065762 2023.04.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/212483 EN 2023.11.02
(71)申请人 普瑞诺生物科技公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 尚伍雁 赵海涛
(74)专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限责任公司 11287
专利代理师 江泰維
(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书9页 说明书96页
序列表（电子公布） 附图43页

(54)发明名称

用于治疗嗜酸性粒细胞驱动的疾病和病症的方法和组合物

(57)摘要

本公开部分涉及包含抗CD39抗体的组合物，以供在减少嗜酸性粒细胞或功能和/或治疗与不需要的嗜酸性粒细胞活性相关的疾病或疾患的方法中使用。

CN 118354793 A

1.一种用于减少受试者中的嗜酸性粒细胞或嗜酸性粒细胞功能的方法,所述方法包括向所述受试者施用抗CD39抗体或其抗原结合片段,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段包含:

(i)至少一个抗原结合结构域,其在一个位点处结合外切核苷三磷酸二磷酸水解酶-1(CD39),使得所述抗CD39抗体形成稳定的免疫复合物,和

(ii)Fcγ RIIIa结合部分,其结合Fcγ RIIIa受体并赋予所述抗CD39抗体以针对CD39+细胞的:a)抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性和/或b)抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)活性。

2.如权利要求1所述的方法,其中所述嗜酸性粒细胞为CD39+嗜酸性粒细胞。

3.如权利要求1或2所述的方法,其中所述CD39+嗜酸性粒细胞:

(i)共表达选自由以下组成的组的一种或多种细胞表面标志物:CD45、CD11b、Siglec-8、IL-5受体的α亚基(IL-5Rα或CD125)、IL-3受体的α亚基(IL-3Rα或CD123)、IL-4R、IL-9R、IL-13R、IL-14R、ST2(IL-33R)、PIRA、PIRB、L-选择素、EMR1、CCR3(CD193)和CRTh2(CD294);

(ii)为CD45+CD11b+嗜酸性粒细胞;和/或

(iii)为CD45+CD11b+Siglec-8+嗜酸性粒细胞。

4.如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段促进:

(i)当与HCC1739BL细胞孵育时,稳定的免疫复合物的形成,其特征为24小时后所述免疫复合物的损失小于30%,任选地其中使用荧光标记的二次抗体通过荧光强度来检测所述免疫复合物的形成;

(ii)CD39+嗜酸性粒细胞的耗竭;

(iii)结合至具有选自图30中所列的CD39氨基酸表位序列的组的序列的CD39表位;和/或

(iv)以与结合至CD39的单克隆抗体克隆A1非竞争性或仅部分竞争性的方式结合至CD39。

5.如权利要求4所述的方法,其中所述CD39抗体或其抗原结合片段经由ADCC介导的杀伤和/或ADCP介导的杀伤促进CD39+嗜酸性粒细胞的耗竭。

6.如权利要求4所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段以由所述CD39+嗜酸性粒细胞摄取并对其有毒的抗体-药物缀合物形式促进CD39+嗜酸性粒细胞的耗竭。

7.如权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述Fcγ RIIIa结合部分选自由以下组成的组:Fc结构域、结合至Fcγ RIIIa的抗体或其片段和Fcγ RIIIa结合肽。

8.如权利要求1至7中任一项所述的方法,其中所述抗原结合结构域选自由以下组成的组:Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv或单链Fv(scFv)、Fav、dsFv、sc(Fv)2、Fde、sdFv、单结构域抗体(dAb)和双抗体片段,任选地其中所述抗原结合结构域为包含SEQ ID NO:40的序列的scFV。

9.如权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或抗原结合片段为单克隆的。

10.如权利要求1至9中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段具有VH结构域,其具有可由在严格条件下与SEQ ID NO.1的核酸杂交的核酸编码的氨基酸序列;和VL结构域,其具有可由在严格条件下与SEQ ID NO.3的核酸杂交的核酸编码的氨基酸序列。

11.如权利要求1至10中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段包含具有与SEQ ID NO.2、6、10、14、18、22、26、42、46、50或54的CDR至少60％相同的CDR的重链和具有与SEQ ID NO.4、8、12、16、20、24、28、44、48、52或56的CDR至少60％相同的CDR的轻链。

12.如权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO.2、6、10、14、18、22、26、42、46、50或54至少60％相同的可变重(VH)链和与SEQ ID NO.4、8、12、16、20、24、28、44、48、52或56至少60％相同的可变轻(VL)链。

13.如权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段包含:

(i)重链可变结构域,其包含具有与SEQ ID NO.29至少80％相同的氨基酸序列的互补决定区(CDR)H1、具有与SEQ ID NO.30至少80％相同的氨基酸序列的CDRH2和具有与SEQ ID NO.31至少80％相同的氨基酸序列的CDRH3;以及

(ii)轻链可变结构域,其包含具有与SEQ ID NO.32至少80％相同的氨基酸序列的CDRL1、具有与SEQ ID NO.33至少80％相同的氨基酸序列的CDRL2和具有与SEQ ID NO.34至少80％相同的氨基酸序列的CDRL3。

14.如权利要求13所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段包含

(i)重链可变结构域,其包含具有SEQ ID NO:29的序列的CDRH1、具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDRH2和具有SEQ ID NO:31的序列的CDRH3;以及

(ii)轻链可变结构域,其包含具有SEQ ID NO:32的序列的CDRL1、具有SEQ ID NO:33的序列的CDRL2和具有SEQ ID NO:34的序列的CDRL3。

15.如权利要求14所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段包含:

(i)包含SEQ ID NO:2的序列的重链可变结构域;和

(ii)包含SEQ ID NO:4的序列的轻链可变结构域。

16.如权利要求15所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段包含:

(i)包含SEQ ID NO:36的序列的重链;和

(ii)包含SEQ ID NO:38的序列的轻链。

17.如权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段包含重链,其具有选自由SEQ ID NO.6、10、14、18、22、26、42、46、50和54的CDR组成的组的CDR;和轻链,其具有选自由SEQ ID NO.8、12、16、20、24、28、44、48、52和56的CDR组成的组的CDR;以及人框架序列,以形成具有能够特异性结合人CD39的抗原结合位点的人源化重链和轻链。

18.如权利要求1至17中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段包含IgG1或IgG3同型的Fc结构域。

19.如权利要求1至18中任一项所述的方法,其中所述Fc结构域为人的。

20.如权利要求1至19中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段为低岩藻糖基化的或无岩藻糖基化的。

21.如权利要求1至20中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段为人的或人源化的。

22.如权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段为

双特异性的,包含至少一个用于嗜酸性粒细胞抗原的额外抗原结合位点。

23.如权利要求22所述的方法,其中所述额外抗原结合位点结合至选自由以下组成的组的下列靶标中的一者或多者:Siglec-8、IL-5Rα(CD125)、IL-3Rα(CD123)、IL-4R、IL-9R、IL-13R、IL-14R、ST2(IL-33R)、PIRA、PIRB、L-选择素、EMR1、CCR3(CD193)和CRTh2(CD294)。

24.如权利要求22所述的方法,其中所述额外抗原结合位点结合在活化的嗜酸性粒细胞上上调的抗原。

25.如权利要求22所述的方法,其中所述额外抗原结合位点结合至CD3、CD4、γδTCR、CD9、CD28、CD29、CD40、CD44、CD45、CD45RO、CD48、CD58、CD63(溶酶体相关膜蛋白3)、CD66b(CEACAM8)、CD66e(CEACAM5)、CD67、CD69、CD80、CD86、C5αR(CD88)、CD101、CD122、CD137(肿瘤坏死因子受体超家族成员9,由淋巴细胞活化所诱导,4-1BB)、CD274(程序性死亡配体1)、α_{IIb}整合素(CD41)、α2整合素(CD49b)、α4整合素(CD49d)、αL整合素(CD11a)、αM整合素(CD11b)、αX整合素(CD11c)、αD整合素、β2整合素(CD18)、氨基肽酶N(CD13)、FcαRI(CD89)、FcγRIII(CD16)、FcγRII(CD32)、FcεRII(CD23)、粒细胞单核细胞群落刺激因子Rα(CD116)、HLA-DR、细胞间粘附分子-1(CD54)、白介素(IL)-2Rα(CD25)、IL-17RA、IL-17RB、半乳凝素-3、神经肽S受体、P-选择素糖蛋白配体-1(CD162)、脑信号蛋白7A(CD108)、胸腺基质淋巴细胞生成素蛋白受体(TSLPR)、活化的αM整合素、活化的β1整合素(CD29)、活化的β2整合素、活化的FcγRII或活化的CRTh2(CD294)。

26.如权利要求1至25中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段减少嗜酸性粒细胞。

27.如权利要求1至26中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段减少$CD39^{高}$可诱导和/或活化的嗜酸性粒细胞,任选地其中所述$CD39^{高}$可诱导和/或活化的嗜酸性粒细胞i)存在于诸如哮喘、血管炎、皮炎或鼻窦炎的病理状态中;和/或ii)位于选自由血液、骨髓、病变和/或其组合组成的组的空间中。

28.如权利要求1至27中任一项所述的方法,其中适合用所述抗CD39抗体治疗的嗜酸性粒细胞相关疾病是根据$CD39^{高}$可诱导和/或活化的嗜酸性粒细胞在选自由血液、骨髓、病变和/或其组合组成的组的空间中的存在来确定的。

29.如权利要求1至28中任一项所述的方法,其中所述受试者患有涉及不需要的嗜酸性粒细胞活性的疾病或疾患。

30.如权利要求29所述的方法,其中所述不需要的嗜酸性粒细胞活性是由嗜酸性粒细胞的异常活化或过于丰富引起的。

31.如权利要求29或30所述的方法,其中所述疾病或疾患为炎症性病症或自体免疫疾病。

32.如权利要求31所述的方法,其中所述炎症性病症为胃肠道炎症性病症。

33.如权利要求32所述的方法,其中所述胃肠道炎症性病症为嗜酸性粒细胞性食管炎和/或克罗恩氏病。

34.如权利要求33所述的方法,其中所述方法还包括向所述受试者施用一种或多种选自由以下组成的组的剂:糖皮质激素、白三烯拮抗剂、肥大细胞稳定剂、免疫调节剂和质子泵抑制剂(PPI)。

35.如权利要求31所述的方法,其中所述炎症性病症为慢性炎症性疾患。

36.如权利要求35所述的方法,其中所述慢性炎症性疾患选自由以下组成的组:类风湿性关节炎(RA)、自体免疫疾患、炎症性肠病、非愈合伤口、多发性硬化症、癌症、动脉粥样硬化、血管炎、舍格伦氏病、糖尿病、红斑狼疮、哮喘、纤维化疾病、UV损伤和牛皮癣。

37.如权利要求36所述的方法,其中所述纤维化疾病选自由以下组成的组:肺纤维化、肝纤维化、心脏病、关节纤维化、杜普伊特伦挛缩、瘢痕瘤纤维化、纵隔纤维化、骨髓纤维化、肾源性全身性纤维化、腹膜后纤维化和硬皮病。

38.如权利要求37所述的方法,其中所述肺纤维化为囊性纤维化、特发性肺纤维化或进行性大块纤维化。

39.如权利要求37所述的方法,其中所述肝纤维化为肝纤维化、肝硬化或原发性胆汁性肝硬化。

40.如权利要求37所述的方法,其中所述心脏病为心房纤维化、心内膜心肌纤维化或陈旧性心肌梗死。

41.如权利要求36所述的方法,其中所述炎症性肠病为溃疡性结肠炎或克罗恩氏病。

42.如权利要求29或30所述的方法,其中所述疾病或疾患为炎症性或阻塞性气道疾病。

43.如权利要求42所述的方法,其中所述炎症性或阻塞性气道疾病选自由以下组成的组:哮喘、急性肺损伤(ALI)、成人/急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、慢性阻塞性肺、气道或肺部疾病(COPD、COAD或COLD)、肺气肿、因其他药物疗法引起的气道高反应性恶化、支气管炎和尘肺病。

44.如权利要求29或30所述的方法,其中所述疾病或疾患为皮肤的炎症性或过敏性疾患。

45.如权利要求44所述的方法,其中所述皮肤的炎症性或过敏性疾患选自由以下组成的组:牛皮癣、接触性皮炎、特应性皮炎、斑秃、多形性红斑、疱疹样皮炎、硬皮病、白癜风、超敏性血管炎、荨麻疹、大疱性类天疱疮、红斑狼疮、全身性红斑狼疮、寻常型天疱疮、落叶型天疱疮、副肿瘤天疱疮、获得性大疱性表皮松解症和寻常痤疮。

46.如权利要求29或30所述的方法,其中所述疾病或疾患为肺部炎症性疾病、中轴型脊椎关节病、原发性胆汁性胆管炎、过敏性鼻炎、慢性肺病、过敏或嗜酸性粒细胞增多症。

47.如权利要求29或30所述的方法,其中所述疾病或疾患为药物诱发的嗜酸性粒细胞增多症,诸如继发于免疫检查点抑制剂(ICI)疗法和/或包括但不限于以下的其他药物的嗜酸性粒细胞哮喘和高嗜酸性粒细胞病症:抗疟剂(例如乙胺嘧啶和氨苯砜)、青霉素、糖肽、头孢菌素、磺酰胺、四环素(尤其是米诺环素)、呋喃妥因、抗结核病疗法、ACE抑制剂、色氨酸、抗惊厥剂(例如苯妥英、卡马西平和苯巴比妥)、NSAID、金、H_2-受体拮抗剂、质子泵抑制剂、氨基水杨酸盐和氯磺丙脲。

48.如权利要求29或30所述的方法,其中所述疾病或疾患涉及呼吸系统、消化系统、心血管系统、内分泌系统、皮肤系统、骨骼肌系统或神经系统,或者为非肿瘤血液系统疾病。

49.如权利要求1至30中任一项所述的方法,其中所述疾病或疾患为组织移植物排斥。

50.如权利要求49所述的方法,其中所述组织移植物为自体的或同种异体的。

51.如权利要求1至50中任一项所述的方法,其中所述受试者为哺乳动物。

52.如权利要求51所述的方法,其中所述哺乳动物为人或啮齿动物。

53.如权利要求1至52中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段与

一种或多种药学上可接受的赋形剂、缓冲剂或溶液一起向所述受试者施用。

54.如权利要求1至53中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段以0.01至10mg/kg的剂量向所述受试者施用,任选地其中通过连续缓释递送平台提供给药以避免/限制抗体介导的靶标胞吞(或抗原性调节或抗原剃除)以获得最佳的ADCC介导和/或ADCP介导的嗜酸性粒细胞耗竭功效。

55.如权利要求1至54中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段每天一次或多次、每周三次、每周两次、每周一次、每两周一次、每三周一次或每四周一次向所述受试者施用,任选地其中所述施用每周一次。

56.如权利要求1至55中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段向所述受试者施用持续至少2至6个治疗周期的持续时间,或每月向所述受试者施用以供终生使用。

57.如权利要求1至56中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段经由胃肠外施用、粘膜下水凝胶施用、肺部或局部应用向所述受试者施用,其中所述胃肠外施用是通过皮下、静脉内或肌内施用来进行。

58.一种治疗受试者中与不需要的嗜酸性粒细胞活性相关的疾病或疾患的方法,所述方法包括向所述受试者施用抗CD39抗体或其抗原结合片段,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段包含:

(i)至少一个抗原结合结构域,其在一个位点处结合外切核苷三磷酸二磷酸水解酶-1(CD39),使得所述抗CD39抗体形成稳定的免疫复合物,和

(ii)Fcγ RIIIa结合部分,其结合Fcγ RIIIa受体并赋予所述抗CD39抗体以针对CD39+细胞的:a)抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性和/或b)抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)活性。

59.如权利要求58所述的方法,其中所述与不需要的嗜酸性粒细胞活性相关的疾病或疾患由以下引起:1)异常活化或嗜酸性粒细胞增多症,2)炎症性病症,和/或3)药物诱发的嗜酸性粒细胞增多症。

60.如权利要求58或59所述的方法,其中所述嗜酸性粒细胞活性来自CD39+嗜酸性粒细胞,任选地其中所述CD39+嗜酸性粒细胞:

(i)共表达选自由以下组成的组的一种或多种细胞表面标志物:CD45、CD11b、Siglec-8、IL-5受体的α亚基(IL-5Rα或CD125)、IL-3受体的α亚基(IL-3Rα或CD123)、IL-4R、IL-9R、IL-13R、IL-14R、ST2(IL-33R)、PIRA、PIRB、L-选择素、EMR1、CCR3(CD193)和CRTh2(CD294);

(ii)为CD45+CD11b+嗜酸性粒细胞;和/或

(iii)为CD45+CD11b+Siglec-8+嗜酸性粒细胞。

61.如权利要求58至60中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段促进:

(i)当与HCC1739BL细胞孵育时,稳定的免疫复合物的形成,其特征为24小时后所述免疫复合物的损失小于30%,任选地其中使用荧光标记的二次抗体通过荧光强度来检测所述免疫复合物的形成;

(ii)CD39+嗜酸性粒细胞的耗竭;

(iii)结合至具有选自图30中所列的CD39氨基酸表位序列的组的序列的CD39表位;和/或

(iv)以与结合至CD39的单克隆抗体克隆A1非竞争性或仅部分竞争性的方式结合至CD39。

62.如权利要求61所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段经由ADCC介导的杀伤和/或ADCP介导的杀伤促进CD39+嗜酸性粒细胞的耗竭。

63.如权利要求61所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段以由所述CD39+嗜酸性粒细胞摄取并对其有毒的抗体-药物缀合物形式促进CD39+嗜酸性粒细胞的耗竭。

64.如权利要求58至63中任一项所述的方法,其中所述Fcγ RIIIa结合部分选自由以下组成的组:Fc结构域、结合至Fcγ RIIIa的抗体或其片段和Fcγ RIIIa结合肽。

65.如权利要求58至64中任一项所述的方法,其中所述抗原结合结构域选自由以下组成的组:Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv或单链Fv(scFv)、Fav、dsFv、sc(Fv)2、Fde、sdFv、单结构域抗体(dAb)和双抗体片段,任选地其中所述抗原结合结构域为包含SEQ ID NO:40的序列的scFV。

66.如权利要求58至65中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或抗原结合片段为单克隆的。

67.如权利要求58至66中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段具有VH结构域,其具有可由在严格条件下与SEQ ID NO.1的核酸杂交的核酸编码的氨基酸序列;和VL结构域,其具有可由在严格条件下与SEQ ID NO.3的核酸杂交的核酸编码的氨基酸序列。

68.如权利要求58至67中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段包含重链,其具有与SEQ ID NO.2、6、10、14、18、22、26、42、46、50和54的CDR至少60%相同的CDR;和轻链,其具有与SEQ ID NO.4、8、12、16、20、24、28、44、48、52或56的CDR至少60%相同的CDR。

69.如权利要求58至68中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO.2、6、10、14、18、22、26、42、46、50或54至少60%相同的可变重(VH)链和与SEQ ID NO.4、8、12、16、20、24、28、44、48、52或56至少60%相同的可变轻(VL)链。

70.如权利要求58至69中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段包含:

(i)重链可变结构域,其包含具有与SEQ ID NO.29至少80%相同的氨基酸序列的互补决定区(CDR)H1、具有与SEQ ID NO.30至少80%相同的氨基酸序列的CDRH2和具有与SEQ ID NO.31至少80%相同的氨基酸序列的CDRH3;以及

(ii)轻链可变结构域,其包含具有与SEQ ID NO.32至少80%相同的氨基酸序列的CDRL1、具有与SEQ ID NO.33至少80%相同的氨基酸序列的CDRL2和具有与SEQ ID NO.34至少80%相同的氨基酸序列的CDRL3。

71.如权利要求70所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段包含

(i)重链可变结构域,其包含具有SEQ ID NO:29的序列的CDRH1、具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDRH2和具有SEQ ID NO:31的序列的CDRH3;以及

(ii)轻链可变结构域,其包含具有SEQ ID NO:32的序列的CDRL1、具有SEQ ID NO:33的序列的CDRL2和具有SEQ ID NO:34的序列的CDRL3。

72.如权利要求71所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段包含:

(i)包含SEQ ID NO:2的序列的重链可变结构域;和

(ii)包含SEQ ID NO:4的序列的轻链可变结构域。

73.如权利要求72所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段包含:

(i)包含SEQ ID NO:36的序列的重链;和

(ii)包含SEQ ID NO:38的序列的轻链。

74.如权利要求58至73中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段包含重链,其具有选自由SEQ ID NO.6、10、14、18、22、26、42、46、50和54的CDR组成的组的CDR;和轻链,其具有选自由SEQ ID NO.8、12、16、20、24、28、44、48、52和56的CDR组成的组的CDR;以及人框架序列,以形成具有能够特异性结合人CD39的抗原结合位点的人源化重链和轻链。

75.如权利要求58至74中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段包含IgG1或IgG3同型的Fc结构域。

76.如权利要求58至75中任一项所述的方法,其中所述Fc结构域为人的。

77.如权利要求58至76中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段为低岩藻糖基化的或无岩藻糖基化的。

78.如权利要求58至77中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段为人的或人源化的。

79.如权利要求58至78中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段为双特异性的,包含至少一个用于嗜酸性粒细胞抗原的额外抗原结合位点。

80.如权利要求79所述的方法,其中所述额外抗原结合位点结合至选自由以下组成的组的下列靶标中的一者或多者:Siglec-8、IL-5Rα(CD125)、IL-3Rα(CD123)、IL-4R、IL-9R、IL-13R、IL-14R、ST2(IL-33R)、PIRA、PIRB、L-选择素、EMR1、CCR3(CD193)和CRTh2(CD294)。

81.如权利要求79或80所述的方法,其中所述额外抗原结合位点结合在活化的嗜酸性粒细胞上上调的抗原。

82.如权利要求79至81中任一项所述的方法,其中所述额外抗原结合位点结合至CD3、CD4、γδTCR、CD9、CD28、CD29、CD40、CD44、CD45、CD45RO、CD48、CD58、CD63(溶酶体相关膜蛋白3)、CD66b(CEACAM8)、CD66e(CEACAM5)、CD67、CD69、CD80、CD86、C5αR(CD88)、CD101、CD122、CD137(肿瘤坏死因子受体超家族成员9,由淋巴细胞活化所诱导,4-1BB)、CD274(程序性死亡配体1)、α_{IIb}整合素(CD41)、α2整合素(CD49b)、α4整合素(CD49d)、αL整合素(CD11a)、αM整合素(CD11b)、αX整合素(CD11c)、αD整合素、β2整合素(CD18)、氨基肽酶N(CD13)、FcαRI(CD89)、FcγRIII(CD16)、FcγRII(CD32)、FcεRII(CD23)、粒细胞单核细胞群落刺激因子Rα(CD116)、HLA-DR、细胞间粘附分子-1(CD54)、白介素(IL)-2Rα(CD25)、IL-17RA、IL-17RB、半乳凝素-3、神经肽S受体、P-选择素糖蛋白配体-1(CD162)、脑信号蛋白7A(CD108)、胸腺基质淋巴细胞生成素蛋白受体(TSLPR)、活化的αM整合素、活化的β1整合素(CD29)、活化的β2整合素、活化的FcγRII或活化的CRTh2(CD294)。

83.如权利要求58至82中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段减少嗜酸性粒细胞。

84.如权利要求58至83中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段减少$CD39^{高}$可诱导和/或活化的嗜酸性粒细胞,任选地其中所述$CD39^{高}$可诱导和/或活化的嗜

酸性粒细胞i)存在于诸如哮喘、血管炎、皮炎或鼻窦炎的病理状态中;和/或ii)位于选自由血液、骨髓、病变和/或其组合组成的组的空间中。

85.如权利要求58至84中任一项所述的方法,其中适合用所述抗CD39抗体治疗的嗜酸性粒细胞相关疾病是根据$CD39^{高}$可诱导和/或活化的嗜酸性粒细胞在选自由血液、骨髓、病变和/或其组合组成的组的空间中的存在来确定的。

86.如权利要求59至85中任一项所述的方法,其中所述炎症性病症为胃肠道炎症性病症。

87.如权利要求86所述的方法,其中所述胃肠道炎症性病症为嗜酸性粒细胞性食管炎和/或克罗恩氏病。

88.如权利要求87所述的方法,其中所述方法还包括向所述受试者施用一种或多种选自由以下组成的组的剂:糖皮质激素、白三烯拮抗剂、肥大细胞稳定剂、免疫调节剂和质子泵抑制剂(PPI)。

89.如权利要求59至85中任一项所述的方法,其中所述炎症性病症为慢性炎症性疾患。

90.如权利要求89所述的方法,其中所述慢性炎症性疾患选自由以下组成的组:类风湿性关节炎(RA)、自体免疫疾患、炎症性肠病、非愈合伤口、多发性硬化症、癌症、动脉粥样硬化、血管炎、舍格伦氏病、糖尿病、红斑狼疮、哮喘、纤维化疾病、UV损伤和牛皮癣。

91.如权利要求90所述的方法,其中所述纤维化疾病选自由以下组成的组:肺纤维化、肝纤维化、心脏病、关节纤维化、杜普伊特伦挛缩、瘢痕瘤纤维化、纵隔纤维化、骨髓纤维化、肾源性全身性纤维化、腹膜后纤维化和硬皮病。

92.如权利要求91所述的方法,其中所述肺纤维化为囊性纤维化、特发性肺纤维化或进行性大块纤维化。

93.如权利要求91所述的方法,其中所述肝纤维化为肝纤维化、肝硬化或原发性胆汁性肝硬化。

94.如权利要求91所述的方法,其中所述心脏病为心房纤维化、心内膜心肌纤维化或陈旧性心肌梗死。

95.如权利要求90所述的方法,其中所述炎症性肠病为溃疡性结肠炎或克罗恩氏病。

96.如权利要求59至85中任一项所述的方法,其中所述炎症性病症为炎症性或阻塞性气道疾病。

97.如权利要求96所述的方法,其中所述炎症性或阻塞性气道疾病选自由以下组成的组:哮喘、急性肺损伤(ALI)、成人/急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、慢性阻塞性肺、气道或肺部疾病(COPD、COAD或COLD)、肺气肿、因其他药物疗法引起的气道高反应性恶化、支气管炎和尘肺病。

98.如权利要求59至85中任一项所述的方法,其中所述炎症性病症为皮肤的炎症性或过敏性疾患。

99.如权利要求98所述的方法,其中所述皮肤的炎症性或过敏性疾患选自由以下组成的组:牛皮癣、接触性皮炎、特应性皮炎、斑秃、多形性红斑、疱疹样皮炎、硬皮病、白癜风、超敏性血管炎、荨麻疹、大疱性类天疱疮、红斑狼疮、全身性红斑狼疮、寻常型天疱疮、落叶型天疱疮、副肿瘤天疱疮、获得性大疱性表皮松解症和寻常痤疮。

100.如权利要求59至85中任一项所述的方法,其中所述炎症性病症为急性和慢性痛

风、慢性痛风性关节炎、牛皮癣、牛皮癣性关节炎、类风湿性关节炎、幼年型类风湿性关节炎、全身性幼年特发性关节炎(SJIA)、隐热蛋白相关周期性综合征(CAPS)或骨关节炎。

101.如权利要求58至85中任一项所述的方法,其中所述疾病或疾患为药物诱发的嗜酸性粒细胞增多症,诸如继发于免疫检查点抑制剂(ICI)疗法和/或包括但不限于以下的其他药物的嗜酸性粒细胞哮喘和高嗜酸性粒细胞病症:抗疟剂(例如乙胺嘧啶和氨苯砜)、青霉素、糖肽、头孢菌素、磺酰胺、四环素(尤其是米诺环素)、呋喃妥因、抗结核病疗法、ACE抑制剂、色氨酸、抗惊厥剂(例如苯妥英、卡马西平和苯巴比妥)、NSAID、金、H_2-受体拮抗剂、质子泵抑制剂、氨基水杨酸盐和氯磺丙脲。

102.如权利要求58至101中任一项所述的方法,其中所述受试者为哺乳动物。

103.如权利要求102所述的方法,其中所述哺乳动物为人或啮齿动物。

104.如权利要求58至103中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段与一种或多种药学上可接受的赋形剂、缓冲剂或溶液一起向所述受试者施用。

105.如权利要求58至104中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段以0.01至10mg/kg的剂量向所述受试者施用,任选地其中通过连续缓释递送平台提供给药以避免/限制抗体介导的靶标胞吞(或抗原性调节或抗原剃除)以获得最佳的ADCC介导和/或ADCP介导的嗜酸性粒细胞耗竭功效。

106.如权利要求58至105中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段每天一次或多次、每周三次、每周两次、每周一次、每两周一次、每三周一次或每四周一次向所述受试者施用,任选地其中所述施用每周一次。

107.如权利要求58至106中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段向所述受试者施用持续至少2至6个治疗周期的持续时间,或每月向所述受试者施用以供长期使用。

108.如权利要求58至107中任一项所述的方法,其中所述抗CD39抗体或其抗原结合片段经由胃肠外施用或粘膜下水凝胶施用、肺部或局部应用向所述受试者施用,其中所述胃肠外施用是通过皮下、静脉内或肌内施用来进行。

109.如权利要求58至108中任一项所述的方法,其中所述方法还包括向所述受试者施用至少一种额外治疗剂。

110.如权利要求109中任一项所述的方法,其中所述至少一种额外治疗剂为抗炎剂,任选地其中所述抗炎剂选自由以下组成的组:非类固醇抗炎药物(NSAIDS)、皮质类固醇、白三烯调节剂和细胞因子途径阻断剂。

111.如权利要求110所述的方法,其中在施用所述抗CD39抗体或其抗原结合片段之前、同时和/或之后施用所述至少一种额外治疗剂。

用于治疗嗜酸性粒细胞驱动的疾病和病症的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年4月29日提交的美国临时申请序列号63/336,418的优先权权益;所述申请的完整内容以引用方式全部并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本说明书包含以XML格式以电子方式提交的序列表。序列表XML以引用方式并入本文。所述XML文件创建于2023年4月7日,名为PNC-00325_SL.xml并且大小为86,881字节。

背景技术

[0005] 最近的研究显示,嗜酸性粒细胞也参与若干稳态过程,包括代谢、组织重塑和发育、神经元调节、上皮和微生物组调节以及免疫调节,表明这些细胞可在健康人的代谢调节和器官功能中发挥关键作用。

[0006] 嗜酸性粒细胞在身体的免疫反应中发挥稳态作用。这些细胞参与对抗一些寄生虫、细菌和病毒感染以及某些癌症,并且在炎症性病症和疾病(包括哮喘、鼻窦炎、嗜酸性粒细胞性胃肠道病症和嗜酸性粒细胞增多症综合征)中发挥病理作用。

[0007] 嗜酸性粒细胞疾病的治疗传统上是通过使用糖皮质激素达成非特异性嗜酸性粒细胞衰减来实现的。然而,靶向嗜酸性粒细胞成熟因子诸如白介素(IL)-5和IL-5受体或IL-4/IL-13的若干新颖生物疗法最近已获准用于临床。尽管生物疗法取得了成功,但一些嗜酸性粒细胞性炎症性疾病患者可能无法充分控制症状,强调需要进一步研究患者特征(诸如合并症和其他过程)在推动疾病持续活动中的作用。

[0008] 例如,食管炎症病症诸如嗜酸性粒细胞性食管炎(EoE)越来越多地在儿童和成人中诊断出,所述疾病的特征为食管中的高嗜酸性粒细胞含量以及基底带状增生。所述疾病的许多方面仍不清楚,包括其病因、自然病程和最佳疗法。EoE影响所有年龄组,但最常见的为介于20与50岁之间的受试者。EoE的症状通常与胃食管反流病(GERD)的症状相似,并且包括呕吐、吞咽困难、疼痛和食物嵌塞。所述疾病很痛苦,导致难以吞咽,并使患者容易患上其他并发症。EoE经常被误诊为GERD,致使对EoE患者的适当治疗遭到延误。目前,没有任何局部施用的抗炎药物被批准用于治疗与胃肠道上部炎症相关的疾患,特别是食管炎症性疾患,诸如EoE。尽管使用皮质类固醇诸如泼尼松龙(prednisolone)的全身治疗是有效的,但这些治疗与以下显著不良反应相关,诸如下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴的抑制(如反映在唾液皮质醇水平上)、免疫功能的普遍抑制,并且尤其是在儿童中,由长期全身暴露引起的令人不安的副作用包括生长迟缓。

[0009] 此外,据报导一些药物会引起嗜酸性粒细胞增多症,即所谓的“药物诱发的嗜酸性粒细胞增多症”。例如,免疫检查点抑制剂(ICI)为若干癌症的新的护理标准。然而,ICI也与频繁且可能危及器官或生命的免疫相关不良事件(irAE)有关,这些不良事件通常类似于自体免疫或炎症性疾患,包括嗜酸性粒细胞哮喘和高嗜酸性粒细胞病症。据报导会产生严重反应的与药物诱发的嗜酸性粒细胞增多症相关的其他药物包括但不限于抗疟剂(例如乙胺嘧啶和氨苯砜)、青霉素、糖肽、头孢菌素、磺酰胺、四环素(尤其是米诺环素

(minocycline))、呋喃妥因(nitrofurantoin)、抗结核病疗法、ACE抑制剂、色氨酸、抗惊厥剂(例如苯妥英(phenytoin)、卡马西平(carbamazepine)和苯巴比妥(phenobarbitone)、NSAID、金、H_2-受体拮抗剂、质子泵抑制剂、氨基水杨酸盐和氯磺丙脲。

发明内容

[0010] 嗜酸性粒细胞可调节局部免疫和炎症反应,并且它们在血液和组织中的积累与若干炎症性和传染性疾病有关。因此,靶向嗜酸性粒细胞的疗法可有助于控制多种疾病,包括特应性病症,诸如哮喘和过敏,以及主要与嗜酸性粒细胞无关的疾病,诸如自体免疫和恶性肿瘤。本发明涉及嗜酸性粒细胞靶向治疗剂。

[0011] 本发明是基于以下观察结果:嗜酸性粒细胞表达CD39并且可以用靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂来靶向以便全身或局部(或两者)降低嗜酸性粒细胞水平和/或嗜酸性粒细胞功能,所述耗竭剂是诸如ADCC(抗体依赖性细胞毒性)感受态和/或ADCP(抗体依赖性细胞吞噬作用)感受态抗CD39抗体或靶向CD39的细胞毒性药物缀合物。因此,这些靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂具有广泛用途,可用作疾病治疗的一部分,在这些疾病中嗜酸性粒细胞的异常活化或过于丰富为病理学的一部分,包括例如炎症性或自体免疫疾病和全身或局部嗜酸性粒细胞增多症或药物诱发的嗜酸性粒细胞增多症。还预期用作供预防组织移植物(自体或同种异体)排斥用的治疗措施的一部分。

[0012] 除本文所述的PEO22抗体外,目前抗CD39抗体的临床应用在肿瘤学领域中并且集中在抑制CD39的外切核苷酸酶活性,目标是降低与所述蛋白质相关的酶活性的肿瘤内水平,并且由此降低免疫抑制剂腺苷的肿瘤内水平。那些抗体已选择为不具有任何CD39依赖性细胞耗竭活性,即,有目的地选择抗体以不包括ADCC和/或ADCP功能。同样,这些先前技术抗体的目的在于能够抑制CD39的酶活性而不杀死表达CD39的细胞,并且在使用那些抗体的形式中,不会具有在本方法和制剂中预期使用的抗体的嗜酸性粒细胞耗竭水平。

[0013] 然而,在本发明的上下文中,利用保留ADCC和/或ADCP功能的抗CD39抗体的发明方法和制剂的那些版本使得当与嗜酸性粒细胞结合时,导致ADCC介导和/或ADCP介导的那些细胞的清除。例如,此类抗CD39抗体针对CD39可为单价或多价(包括二价)的。然而,本发明还提供双特异性抗体,其除了一个或多个CD39结合部分之外,还包括与由嗜酸性粒细胞表达的一个或多个细胞表面表位结合的额外结合部分。

[0014] 提供多个实施方案,其可应用于本发明所涵盖的任何方面和/或与本文所述的任何其他实施方案组合。例如,在一个方面中,提供抗CD39抗体或其抗原结合片段,其包含(i)至少一个抗原结合结构域,其在一个位点处结合外切核苷三磷酸二磷酸水解酶-1(CD39),使得抗CD39抗体形成稳定的免疫复合物,和(ii)Fc γ RIIIa结合部分,其结合Fc γ RIIIa受体并赋予抗CD39抗体以针对CD39+细胞的ADCC和/或ADCP活性。

[0015] 进一步提供多个实施方案,其可应用于本发明的任何方面和/或与本文所述的任何其他实施方案组合。例如,在一个实施方案中,嗜酸性粒细胞为CD39+嗜酸性粒细胞。在一些实施方案中,CD39+嗜酸性粒细胞(i)共表达一种或多种选自由以下组成的组的细胞表面标志物:CD45、CD11b、Siglec-8、IL-5受体的α亚基(IL-5Rα或CD125)、IL-3受体的α亚基(IL-3Rα或CD123)、IL-4R、IL-9R、IL-13R、IL-14R、ST2(IL-33R)、配对免疫球蛋白样受体A(PIRA)、配对免疫球蛋白样受体B(PIRB)、L-选择素、含有粘蛋白样激素受体的EGF样模块

(EMR)1、CCR3(CD193)和在2型辅助T细胞上表达的趋化受体(CRTh2,也称为DP2,2型前列腺素D2受体或CD294);(ii)为CD45+CD11b+嗜酸性粒细胞;和/或(iii)为CD45+CD11b+Siglec-8+嗜酸性粒细胞。在一些实施方案中,抗CD39抗体或其抗原结合片段促进:(i)当与HCC1739BL细胞孵育时,稳定的免疫复合物的形成,其特征为24小时后免疫复合物损失小于40%,或24小时后小于35%、小于30%、小于25%、小于20%、小于15%或甚至小于10%,任选地其中使用荧光标记的二次抗体通过荧光强度来检测免疫复合物的形成(例如,仅仅为了说明,与抗CD39抗体形成的免疫复合物的稳定性可通过将抗CD39单克隆抗体(mAb)(例如,2μg/mL或更高)与HCC1739BL细胞孵育不同时间并且接着通过荧光结合的二次抗体检测免疫复合物的存在来确定);(ii)CD39+嗜酸性粒细胞的耗竭;(iii)结合至具有选自图30中所列的CD39氨基酸表位序列的组的序列的CD39表位;和/或(iv)以与结合至CD39的单克隆抗体克隆A1非竞争性或仅部分竞争性的方式结合至CD39。在一些实施方案中,抗CD39抗体或其抗原结合片段经由ADCC介导的杀伤和/或ADCP介导的杀伤促进CD39+嗜酸性粒细胞的耗竭。在一些实施方案中,抗CD39抗体或其抗原结合片段以由CD39+嗜酸性粒细胞摄取并对其有毒的抗体-药物缀合物形式促进CD39+嗜酸性粒细胞的耗竭。

[0016] 在另一个实施方案中,Fcγ RIIIa结合部分选自由以下组成的组:Fc结构域、结合至Fcγ RIIIa的抗体或其片段和Fcγ RIIIa结合肽。

[0017] 在仍另一个实施方案中,抗原结合结构域选自由以下组成的组:Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv或单链Fv(scFv)、Fav、dsFv、sc(Fv)2、Fde、sdFv、单结构域抗体(dAb)和双抗体片段和/或其中抗CD39抗体或抗原结合片段为单克隆的。在一些实施方案中,抗原结合结构域为包含SEQ ID NO:40的序列的scFV。

[0018] 在另一个实施方案中,抗CD39抗体或其抗原结合片段具有VH结构域,其氨基酸序列可由SEQ ID No.1的核酸序列或在严格条件下与SEQ ID No.1的核酸杂交的核酸编码;和VL结构域,其氨基酸序列可由SEQ ID No.3的核酸序列或在严格条件下与SEQ ID No.3的核酸杂交(诸如在45℃下在6x氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中杂交,并在50-65℃下在0.2x SSC/0.1%SDS中洗涤)的核酸编码。在仍另一个实施方案中,抗CD39抗体或其抗原结合片段包含重链,其具有与SEQ ID No.2、6、10、14、18、22、26、42、46、50或54的CDR至少60%相同(例如,至少65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高)的CDR;和轻链,其具有与SEQ ID No.4、8、12、16、20、24、28、44、48、52或56的CDR至少60%相同(例如,至少65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高)的CDR。在仍另一个实施方案中,抗CD39抗体或其抗原结合片段包含可变重(VH)链,其与SEQ IDNo.2、6、10、14、18、22、26、42、46、50或54至少60%相同(例如,至少65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高);和可变轻(VL)链,其与SEQ ID No.4、8、12、16、20、24、28、44、48、52或56至少60%相同(例如,至少65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高)。在另一个实施方案中,抗CD39抗体或其抗原结合片段包含:(i)重链,其具有与SEQ ID No.29至少80%相同(例如,至少81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、

97％、98％、99％或更高)的CDR1氨基酸序列,与SEQ ID No.30至少80％(例如,至少81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更高)相同的CDR2氨基酸序列,和与SEQ ID No.31至少80％相同(例如,至少81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更高)的CDR3氨基酸序列;以及(ii)轻链,其具有与SEQ ID No.32至少80％相同(例如,至少81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更高)的CDR1氨基酸序列,与SEQ ID No.33至少80％相同(例如,至少81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更高)的CDR2氨基酸序列,和与SEQ ID No.34至少80％相同(例如,至少81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更高)的CDR3氨基酸序列。在仍另一个实施方案中,抗CD39抗体或其抗原结合片段包含重链,其具有选自由SEQ ID No.6、10、14、18、22、26、42、46、50和54的CDR组成的组的CDR;轻链,其具有选自由SEQ ID No.8、12、16、20、24、28、44、48、52和56的CDR组成的组的CDR;以及人框架序列,以形成具有能够特异性结合人CD39的抗原结合位点的人源化重链和轻链。在仍另一个实施方案中,抗CD39抗体或其抗原结合片段包含(i)重链可变结构域,其包含具有SEQ ID NO:29的序列的CDRH1、具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的CDRH2和具有SEQ ID NO:31的序列的CDRH3;以及(ii)轻链可变结构域,其包含具有SEQ ID NO:32的序列的CDRL1、具有SEQ ID NO:33的序列的CDRL2和具有SEQ ID NO:34的序列的CDRL3。在另一个实施方案中,抗CD39抗体或其抗原结合片段包含重链,其具有选自由SEQ ID NO.6、10、14、18、22、26、42、46、50和54的CDR组成的组的CDR;和轻链,其具有选自由SEQ ID NO.8、12、16、20、24、28、44、48、52和56的CDR组成的组的CDR;以及人框架序列,以形成具有能够特异性结合人CD39的抗原结合位点的人源化重链和轻链。

[0019] 在又一个实施方案中,抗CD39抗体或其抗原结合片段包含IgG1或IgG3同型的Fc结构域,任选地其中Fc结构域为人的。在另一个实施方案中,抗CD39抗体或其抗原结合片段为低岩藻糖基化或无岩藻糖基化的。

[0020] 在仍另一个实施方案中,抗CD39抗体或其抗原结合片段为人的或人源化的。

[0021] 在又一个实施方案中,抗CD39抗体或其抗原结合片段为双特异性的,包含至少一个用于嗜酸性粒细胞抗原的额外抗原结合位点。

[0022] 在某些实施方案中,本发明提供双特异性抗体,其既结合至CD39也结合至选自由以下组成的组的嗜酸性粒细胞表面标志物:Siglec-8、IL-5受体的α亚基(IL-5Rα或CD125)、IL-3受体的α亚基(IL-3Rα或CD123)、IL-4R、IL-9R、IL-13R、IL-14R、ST2(IL-33R)、PIRA、PIRB、L-选择素、EMR1、CCR3(CD193)和CRTh2(CD294),并且优选地引起嗜酸性粒细胞耗竭,诸如通过ADCC介导和/或ADCP介导的杀伤或以优先由嗜酸性粒细胞摄取并对其有毒的抗体-药物缀合物形式。

[0023] 在其他实施方案中,双特异性抗体是由针对抗原的结合结构域产生的,这些抗原在活化的嗜酸性粒细胞(或在病变中所见的嗜酸性粒细胞)上上调,其中双特异性抗体针对不同抗原(CD39和第二抗原,两者均在嗜酸性粒细胞上表达)的亲合力提供了选择性。使用本发明的CD39结合物产生双特异性物的示例性抗原包括CD3、CD4、γδTCR、CD9、CD28、CD29、

CD40、CD44、CD45、CD45RO、CD48、CD58、CD63(溶酶体相关膜蛋白3)、CD66b(CEACAM8)、CD66e(CEACAM5)、CD67、CD69、CD80、CD86、C5αR(CD88)、CD101、CD122、CD137(肿瘤坏死因子受体超家族成员9,由淋巴细胞活化所诱导,4-1BB)、CD274(程序性死亡配体1)、α_{IIb}整合素(CD41)、α2整合素(CD49b)、α4整合素(CD49d)、αL整合素(CD11a)、αM整合素(CD11b)、αX整合素(CD11c)、αD整合素、β2整合素(CD18)、氨基肽酶N(CD13)、FcαRI(CD89)、Fcγ RIII(CD16)、Fcγ RII(CD32)、FcεRII(CD23)、粒细胞单核细胞群落刺激因子Rα(CD116)、HLA-DR、细胞间粘附分子-1(CD54)、白介素(IL)-2Rα(CD25)、IL-17RA、IL-17RB、半乳凝素-3、神经肽S受体、P-选择素糖蛋白配体-1(CD162)、脑信号蛋白(Semaphorin)7A(CD108)、胸腺基质淋巴细胞生成素蛋白受体(TSLPR)、活化的αM整合素、活化的β1整合素(CD29)、活化的β2整合素、活化的Fcγ RII和活化的CRTh2(CD294)。所述双特异性物结合至嗜酸性粒细胞并优选地引起嗜酸性粒细胞耗竭,诸如通过ADCC介导和/或ADCP介导的杀伤或以优先由嗜酸性粒细胞摄取并对其有毒的抗体-药物缀合物形式。在一些实施方案中,抗CD39抗体或其抗原结合片段减少嗜酸性粒细胞。在一些实施方案中,抗CD39抗体或其抗原结合片段减少$CD39^{高}$可诱导和/或活化的嗜酸性粒细胞,任选地其中$CD39^{高}$可诱导和/或活化的嗜酸性粒细胞i)存在于诸如哮喘、血管炎、皮炎或鼻窦炎的病理状态中;和/或ii)位于选自由血液、骨髓、病变和/或其组合组成的组的空间中。在一些实施方案中,适合用抗CD39抗体治疗的嗜酸性粒细胞相关疾病是根据$CD39^{高}$可诱导和/或活化的嗜酸性粒细胞在选自由血液、骨髓、病变和/或其组合组成的组的空间中的存在来确定的。

[0024] 在另一方面中,提供药物制剂,其包含治疗有效量的至少一种本文所述的抗CD39抗体或其抗原结合片段和一种或多种药学上可接受的赋形剂、缓冲剂或溶液。例如,药物制剂可用于降低嗜酸性粒细胞水平、活性和/或功能,并且适合向具有炎症性疾患或组织移植物(仅用于说明)的受试者施用,所述药物制剂包含有效量的抗CD39抗体或其抗原结合片段以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、缓冲剂或溶液,其中向受试者施用抗CD39抗体造成CD39+嗜酸性粒细胞的数量和/或功能减少。

[0025] 在另一方面中,本文描述一种通过耗竭CD39+嗜酸性粒细胞使得嗜酸性粒细胞参与疾病或疾患的方法,其包括向患有不需要的嗜酸性粒细胞疾患的受试者施用有效量的抗CD39抗体或其抗原结合片段的药物组合物,其中施用抗CD39抗体或其抗原结合片段造成CD39+嗜酸性粒细胞的数量和/或功能减少。

[0026] 在某些实施方案中,靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂可用作治疗患有以纤维化为特征的炎症性病症或自体免疫疾病的患者的一部分,包括:肺纤维化,诸如囊性纤维化、特发性肺纤维化、进行性大块纤维化;肝纤维化,诸如肝硬化、原发性胆汁性肝硬化;心脏病,诸如心房纤维化、心肌内膜纤维化、陈旧性心肌梗死;关节纤维化;杜普伊特伦挛缩(Dupuytren's contracture);瘢痕瘤纤维化;纵隔纤维化;骨髓纤维化;肾源性全身性纤维化;腹膜后纤维化;和硬皮病。

[0027] 在一些实施方案中,受试者患有涉及不需要的嗜酸性粒细胞活性的疾病或疾患。不需要的嗜酸性粒细胞活性可能是由嗜酸性粒细胞的异常活化或过于丰富引起的。在一些实施方案中,所述疾病或疾患为炎症性病症或自体免疫疾病,诸如胃肠道炎症性病症,诸如嗜酸性粒细胞性食管炎和/或克罗恩氏病(Crohn's disease)。在一些实施方案中,所述方法还包括向受试者施用一种或多种选自由以下组成的组的剂:糖皮质激素、白三烯拮抗剂、

肥大细胞稳定剂、免疫调节剂和质子泵抑制剂(PPI)。在一些实施方案中,炎症性病症为慢性炎症性疾患。在一些实施方案中,慢性炎症性疾患选自由以下组成的组:类风湿性关节炎(RA)、自体免疫疾患、炎症性肠病、非愈合伤口、多发性硬化症、癌症、动脉粥样硬化、血管炎、舍格伦氏病(Sjogren's disease)、糖尿病、红斑狼疮、哮喘、纤维化疾病、UV损伤和牛皮癣。在一些实施方案中,纤维化疾病选自由以下组成的组:肺纤维化、肝纤维化、心脏病、关节纤维化、杜普伊特伦挛缩、瘢痕瘤纤维化、纵隔纤维化、骨髓纤维化、肾源性全身性纤维化、腹膜后纤维化和硬皮病。在一些实施方案中,肺纤维化为囊性纤维化、特发性肺纤维化或进行性大块纤维化。在一些实施方案中,肝纤维化为肝纤维化、肝硬化或原发性胆汁性肝硬化。在一些实施方案中,心脏病为心房纤维化、心肌内膜纤维化或陈旧性心肌梗死。在一些实施方案中,炎症性肠病为溃疡性结肠炎或克罗恩氏病。在一些实施方案中,所述疾病或疾患为炎症性或阻塞性气道疾病。在一些实施方案中,炎症性或阻塞性气道疾病选自由以下组成的组:哮喘、急性肺损伤(ALI)、成人/急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、慢性阻塞性肺、气道或肺部疾病(COPD、COAD或COLD)、肺气肿、因其他药物疗法引起的气道高反应性恶化、支气管炎和尘肺病。在一些实施方案中,所述疾病或疾患为皮肤的炎症性或过敏性疾患。在一些实施方案中,皮肤的炎症性或过敏性疾患选自由以下组成的组:牛皮癣、接触性皮炎、特应性皮炎、斑秃、多形性红斑、疱疹样皮炎、硬皮病、白癜风、超敏性血管炎、荨麻疹、大疱性类天疱疮、红斑狼疮、全身性红斑狼疮、寻常型天疱疮、落叶型天疱疮、副肿瘤天疱疮、获得性大疱性表皮松解症和寻常痤疮。在一些实施方案中,所述疾病或疾患为肺部炎症性疾病、中轴型脊椎关节病、原发性胆汁性胆管炎、过敏性鼻炎、慢性肺病、过敏或嗜酸性粒细胞增多症。

[0028] 在某些实施方案中,靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂可用作药物诱发的嗜酸性粒细胞增多症的治疗的一部分,诸如继发于ICI疗法和/或包括但不限于以下的其他药物的嗜酸性粒细胞哮喘和高嗜酸性粒细胞病症:抗疟剂(例如乙胺嘧啶和氨苯砜)、青霉素、糖肽、头孢菌素、磺酰胺、四环素(尤其是米诺环素)、呋喃妥因、抗结核病疗法、ACE抑制剂、色氨酸、抗惊厥剂(例如苯妥英、卡马西平和苯巴比妥)、NSAID、金、H_2-受体拮抗剂、质子泵抑制剂、氨基水杨酸盐和氯磺丙脲。

[0029] 在某些实施方案中,靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂可用作炎症性肠病诸如溃疡性结肠炎和克罗恩氏病的治疗的一部分。

[0030] 在某些实施方案中,靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂可用作以下疾病的治疗的一部分:特应性皮炎、血管炎、嗜酸性粒细胞性食管炎、过敏性鼻炎(包括季节性鼻炎)、哮喘、慢性肺病(包括慢性阻塞性肺病)和过敏(例如花生过敏),特别是哮喘。

[0031] 在一些实施方案中,所述疾病或疾患涉及呼吸系统、消化系统、心血管系统、内分泌系统、皮肤系统、骨骼肌系统或神经系统,或者为非肿瘤血液系统疾病。在一些实施方案中,所述疾病或疾患为组织移植物排斥。

[0032] 在一些实施方案中,组织移植物为自体的或同种异体的。在一些实施方案中,受试者为哺乳动物,诸如人或啮齿动物。在一些实施方案中,将抗CD39抗体或其抗原结合片段与一种或多种药学上可接受的赋形剂、缓冲剂或溶液一起向受试者施用。在一些实施方案中,抗CD39抗体或其抗原结合片段以0.01至10mg/kg的剂量向受试者施用,任选地其中通过连续缓释递送平台提供给药以避免/限制抗体介导的靶标胞吞(target cytosis)(或抗原性

调节(antigenic modulation)或抗原剃除(antigen shaving))以获得最佳的ADCC介导和/或ADCP介导的嗜酸性粒细胞耗竭功效。在一些实施方案中,将抗CD39抗体或其抗原结合片段每天一次或多次、每周三次、每周两次、每周一次、每两周一次、每三周一次或每四周一次向受试者施用,任选地其中所述施用每周一次。在一些实施方案中,将抗CD39抗体或其抗原结合片段向受试者施用持续至少2至6个治疗周期的持续时间,或每月向受试者施用以供终生使用。在一些实施方案中,抗CD39抗体或其抗原结合片段经由胃肠外施用、粘膜下水凝胶施用、肺部或局部应用向受试者施用,其中胃肠外施用是通过皮下、静脉内或肌内施用来进行。

附图说明

[0033] 本专利申请文件含有至少一张以彩色绘制的图式。带有彩色图的本专利或专利申请公开的副本将在请求并支付必要费用之后由专利局提供。

[0034] 图1显示无岩藻糖基化PEONP22和PEOAF22对应物对CD39^{高}HCC1739BL细胞呈现出的ADCC活性(NK细胞毒性)高于其亲代完全岩藻糖基化克隆PEOWT22。使用完全人抗CD39单克隆抗体PEOWT22,采用两种不同的经由化学修饰的无岩藻糖基化方法来产生其ADCC增强的对应物PEOAF22和PEONP22,而未进行基因修饰。为了评估它们的ADCC概况,将靶细胞(CFSE标记的HCC1739BL,即Epstein-Barr二氏病毒(EBV)转化的人B类淋巴母细胞系)用连续稀释的人IgG1同型对照抗体(KLH-hIgG1)或PEOWT22、PEOAF22或PEONP22在37℃下在5%CO_2中孵育30分钟。接着将细胞与NK-92-CD16 V/V效应细胞(E:T=1:8)在37℃下共培养6小时。通过流式细胞术分析靶细胞死亡,并由$CFSE^+P/I^+$细胞的百分比(%)确定细胞毒性。

[0035] 图2显示IgG1 Fc级分赋予抗体以ADCC活性。hCD39 Ref抗体与本领域中的抗体共享抗原结合位点。然而,当前实施例中使用的Ref抗体是用专门设计为具有ADCC功能的Fc部分生成的。因此,hCD39 Ref抗体和PEOWT22均含有相同的ADCC感受态的人IgG1Fc级分。NK对HCC1739BL细胞的细胞毒性如图1所述执行,并确定hCD39 Ref和PEOWT22的ADCC细胞杀伤概况。注意到,hCD39Ref和PEOWT22具有相似的ADCC活性概况。

[0036] 图3显示进一步优化的无岩藻糖基化对应物PEO22发挥的ADCC活性高于PEONP22。PEO22为通过优化亲代克隆PEOWT22的无岩藻糖基化过程而进一步ADCC增强的版本。NK对HCC1739BL细胞的细胞毒性如图1所述执行,并确定PEO22和PEONP22的ADCC细胞杀伤概况。

[0037] 图4显示PEOWT22引发的ADCC活性对高度表达人CD39的细胞具有选择性。表达不同水平人CD39的各种Raji细胞系,包括Raji细胞(Raji-hCD39neg)、高度表达人CD39的hCD39转染的Raji细胞(Raji-hCD39hi)或表达低水平人CD39的hCD39转染的Raji细胞(Raji-hCD39lo),用作靶细胞,并且用连续稀释的PEOWT22在37℃下在5%CO_2中预孵育30分钟。此后,将效应细胞(稳定表达荧光素酶和hCD16a-158V的Jurkat细胞)添加至培养物(E:T=6:1)中并孵育6小时。ADCC活性由荧光素酶活性相对于背景的增加(RLU)来指示。RLU:相对发光单位。

[0038] 图5显示PEOWT22不对CD39低的正常内皮细胞(HUVEC)发挥ADCC活性,提示其全身副作用的可能性较低。人黑色素瘤细胞(SK-MEL-28;内源性表达中等水平的CD39)和人脐静脉内皮细胞(HUVEC;内源性表达低水平的CD39)均用作靶细胞,并用连续稀释的PEOWT22在37℃下在5%CO_2中预孵育30分钟。此后,将效应细胞(即稳定表达荧光素酶和hCD16a-158V

的Jurkat细胞)添加至培养物(E:T＝6:1)中并孵育6小时。ADCC活性由荧光素酶活性相对于背景的增加来指示。RLU:相对发光单位。

[0039] 图6显示大多数人/兔嵌合抗人CD39单克隆抗体靶向与参考抗人CD39单克隆抗体克隆A1相同的表位:使用HCC1739BL细胞的表位竞争测定。将HCC1739BL细胞用一组18种抗人CD39单克隆抗体(人/兔嵌合克隆;未结合,2μg/mL)在4℃下孵育30分钟,接着洗涤并用PE结合的小鼠抗人CD39单克隆抗体(克隆A1)在4℃下染色30分钟。接着通过流式细胞术分析细胞并检测PE中值荧光强度(MFI)。用培养基代替嵌合抗体孵育的细胞用作对照。

[0040] 图7显示不竞争克隆A1的相同表位的人/兔嵌合抗体具有高ADCC活性。HCC1739BL细胞用作靶细胞,并在37℃下于5％CO_2中用连续稀释的嵌合抗体预孵育30分钟。此后,将效应细胞(即稳定表达荧光素酶和hCD16a-158V的Jurkat细胞)添加至培养物(E:T＝6:1)中并孵育6小时。ADCC活性由荧光素酶活性相对于背景的增加来指示。RLU:相对发光单位。注意到,在这些高ADCC克隆中,仅PEO23抗体竞争克隆A1的相同表位(参见图6)。

[0041] 图8显示完全竞争克隆A1的相同表位的人/兔嵌合抗体具有低或无ADCC活性。Luc-报告基因ADCC测定如上文图7中所述进行。PEO18充当阳性对照。

[0042] 图9显示具有高ADCC活性的抗体在细胞膜上形成稳定的免疫复合物,而具有低或无ADCC活性的抗体则不会。将具有高、低ADCC活性和无ADCC活性的示例性抗人CD39抗体(2μg/mL)与HCC1739BL细胞在37℃下在5％CO_2中孵育24小时或在4℃下孵育20分钟,接着在4℃下进行二次抗体染色(抗人IgG(Fc特异性),Alexa Fluor® 488)持续30分钟。接着洗涤细胞并通过流式细胞术来分析。AF488 MFI在20分钟与24小时处理之间的差异代表细胞膜上人CD39的损失,这是按照材料和方法中所述计算的。注意到,克隆PEO26(低ADCC活性)以及克隆PEO27、PEO28和PEO29(无ADCC活性)在孵育24小时后不会在细胞膜上形成稳定的免疫复合物(例如,CD39的损失大于40％),而克隆PEONP22、PEO19、PEO20、PEO21(高ADCC活性)则形成稳定的抗体-抗原免疫复合物(例如,CD39的损失低于30％)。Hu/Ra:人/兔嵌合抗体;hIgG1:人源化兔抗体,IgG1同型。

[0043] 图10显示健康小鼠血液和骨髓中粒细胞亚群的百分比。从健康的h(人)CD39KI小鼠收集血液和骨髓(BM)样品,并通过流式细胞术来分析。粒细胞被门控为嗜酸性粒细胞(EO)($CD45^+CD11b^+SSC^{高}Siglec\text{-}F^+$)、嗜中性粒细胞(Neu)($CD45^+CD11b^+Ly\text{-}6G^+$)和嗜碱性粒细胞(Baso)($CD45^+SSC^{低}CD200R3^+Fc\varepsilon R1\alpha^+$)。计算各细胞亚型的百分比并表示为$CD45^+CD11b^+$细胞的百分比(％)。n＝8只小鼠/性别。

[0044] 图11显示嗜酸性粒细胞为在小鼠细胞膜上表达最高CD39水平的粒细胞亚群,CD39为小鼠粒细胞中嗜酸性粒细胞的高度选择性表型生物标志物。通过流式细胞术分析健康hCD39KI小鼠的血液和BM在粒细胞细胞表面上的人CD39(hCD39)表达。显示与同型对照相比各亚群的hCD39表达水平。注意到,CD39在嗜酸性粒细胞上的表达比嗜中性粒细胞高得多,而嗜碱性粒细胞几乎不表达所述蛋白,CD39表达水平排序:嗜酸性粒细胞>嗜中性粒细胞>嗜碱性粒细胞。n＝8只小鼠。

[0045] 图12显示与其低ADCC对应物PEOWT22相比,ADCC增强的PEO22呈现出更高的血液嗜酸性粒细胞耗竭效应。将健康的hCD39KI小鼠用盐水或1mg/kg的PEO22或PEOWT22(ADCC活性排序:PEO22>PEOWT22)i.p.处理两次(在第0天和第2天)。在第0天(处理前)和第3天在粒细胞收获末期收集血液样品并通过流式细胞术来分析。注意到,PEO22和PEOWT22抗体均能够

选择性地耗竭EO,而不会减少Neu量;并且此类体内EO耗竭效应与其体外ADCC活性呈正相关,PEO22>PEOWT22。n=1只小鼠/组。

[0046] 图13显示PEO22选择性地耗竭健康hCD39KI小鼠中的血液和骨髓嗜酸性粒细胞。将健康的hCD39KI小鼠每两天用盐水或PEO22(1mg/kg)i.p.处理,总共4个剂量。在最后一次给药后一天收集血液和BM样品,并通过流式细胞术来分析。注意到,尽管减少了嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞CD39膜表达,但PEO22会耗竭嗜酸性粒细胞而非嗜中性粒细胞。n=4-8只小鼠/组。ns:非显著的;*p<0.05;***p<0.001****p<0.0001,相对于对照盐水组(未配对、t检验、单尾)。

[0047] 图14显示嗜酸性粒细胞在哮喘小鼠中明显增加。在最后一次OVA(i.n.)攻击后一天,从嗜酸性粒细胞哮喘hCD39KI小鼠收集血液和BM样品,并通过流式细胞术来分析。将从健康动物获得的数据用作比较参考。n=8只小鼠/组。**p<0.01,相对于健康动物(未配对、t检验、单尾)。

[0048] 图15显示PEO22选择性地耗竭哮喘hCD39KI小鼠中的嗜酸性粒细胞。将哮喘hCD39KI小鼠每两天用盐水或PEO22(1mg/kg)i.p.处理,总共四个剂量。在最后一次给药后一天收集血液和BM样品,并通过流式细胞术来分析。注意到,PEO22处理后,在两个隔室中的嗜酸性粒细胞CD39表达也急剧下降。n=8只小鼠/组。*p<0.05;**p<0.01;****p<0.0001,相对于盐水对照组(未配对、t检验、单尾)。

[0049] 图16显示PEO22选择性地耗竭哮喘hCD39KI小鼠中的$CD39^{高}$嗜酸性粒细胞亚群。将哮喘hCD39KI小鼠每两天用盐水或PEO22(1mg/kg)i.p.处理,总共4个剂量。在最后一次给药后一天收集血液和BM样品,并通过流式细胞术来分析。从健康小鼠获得的数据用作比较参考。注意到,大多数嗜酸性粒细胞在健康小鼠中是$CD39^{高}$的,它们为"可诱导的",即响应于日常环境攻击;并且PEO22处理将哮喘小鼠中的EO绝对数量恢复至与健康小鼠相同的水平,并将EO亚群从$CD39^{高}$转为$CD39^{低}$。n=8只小鼠/组。****p<0.0001,相对于盐水对照组(未配对、t检验、单尾)。

[0050] 图17显示PEO22显著耗竭哮喘hCD39KI小鼠肺中的嗜酸性粒细胞并改善疾病严重程度。将哮喘hCD39KI小鼠每两天用盐水或PEO22(1mg/kg)i.p.处理,总共4个剂量。在最后一次给药后一天收集肺样品并通过病理学来分析。注意到,PEO22处理组显示出主要在支气管周围和血管周围区域的局灶性嗜酸性粒细胞性炎症的显著改善,这是盐水对照组中出现的OVA诱发的哮喘的特征性体征。n=8只小鼠/组。图片是在100X(比例尺100μm)和400X(比例尺10μm)下拍摄的。显示每组一只动物的代表性图像。实心星号突出了嗜酸性粒细胞浸润的血管周围区域;白色星号指示嗜酸性粒细胞浸润的血管壁区域,在PEO22处理组的两个区域均观察到肺浸润性嗜酸性粒细胞的显著减少。

[0051] 图18显示PEO22改善哮喘hCD39KI小鼠的肺部嗜酸性粒细胞性血管炎。将哮喘hCD39KI小鼠每两天用盐水或PEO22(1mg/kg)i.p.处理,总共4个剂量。在最后一次给药后一天收集肺样品并通过病理学来分析。注意到,与盐水对照组相比,PEO22处理组显示出血管壁内嗜酸性粒细胞数量和活性降低的迹象。n=8只小鼠/组。图片是在100X(比例尺100μm)和400X(比例尺10μm)下拍摄的。显示每组一只动物的代表性图像。实心星号突出了嗜酸性粒细胞浸润的血管周围区域;白色星号指示嗜酸性粒细胞浸润的血管壁。

[0052] 图19显示$CD39^{高}$在表型和功能上限定哮喘小鼠中活化的嗜酸性粒细胞亚群。在最

后一次OVA(i.n.)攻击后一天收集来自哮喘hCD39KI小鼠的血液和BM样品,并通过流式细胞术分析嗜酸性粒细胞生物标志物,包括先前报导的活化标志物。注意到,高度表达CD39的EO细胞(CD39^{高}亚型)代表哮喘小鼠的血液和骨髓中的绝大多数EO亚群。n=10只小鼠/组。

[0053] 图20显示IL-5Rα不为小鼠粒细胞中嗜酸性粒细胞的选择性生物标志物,如健康小鼠和哮喘小鼠中所示。通过流式细胞术分析在最后一次OVA(i.n.)攻击后一天收集的来自哮喘hCD39KI小鼠的血液和BM样品在粒细胞上的IL-5Rα表达。将来自健康小鼠的数据平行用于比较。注意到,嗜中性粒细胞而非嗜酸性粒细胞是在健康小鼠和哮喘小鼠的血液和BM中高度表达IL-5Rα的粒细胞亚群。n=8只小鼠/组。

[0054] 图21显示在小鼠皮炎中血液嗜酸性粒细胞明显增多。如材料和方法中详述,对hCD39KI小鼠进行特应性皮炎模型诱导。在最后一次OVA攻击后两天收集血液样品,并通过流式细胞术来分析。将来自健康动物的数据用作比较参考。n=5-8只小鼠/组。**p<0.01,相对于健康小鼠(未配对、t检验、单尾)

[0055] 图22显示PEO22减少皮肤组织浸润性嗜酸性粒细胞并改善皮炎的特征性体征,即表皮增生、角化过度、坏死角质形成细胞和炎性浸润。将经受皮炎模型诱导的hCD39KI小鼠用盐水或PEO22(1mg/kg)i.p.处理,总共三个剂量。在最后一次给药后两天收集皮肤样品并通过病理学来分析。在皮炎模型中n=8只小鼠/组。图片是在400X(比例尺10μm)下拍摄的。显示每组一只动物的代表性图像。平行说明健康小鼠的皮肤病理作为比较参考。实心星号指示嗜酸性粒细胞浸润的局部炎症区域,在PEO22处理组中注意到皮肤组织炎症的明显减少。

[0056] 图23显示PEO22选择性地耗竭小鼠嗜酸性粒细胞性鼻窦炎中的血液嗜酸性粒细胞。将如材料和方法中所详述经受嗜酸性粒细胞性鼻窦炎模型诱导的hCD39KI小鼠每两天用盐水或PEO22(3mg/kg)i.p.处理,总共四个剂量。在最后一次给药后一天收集血液样品,并通过流式细胞术来分析。将来自健康动物的数据用作比较参考。注意到,与健康小鼠相比,鼻窦炎模型中的血液EO细胞显著增加,而血液EO细胞在PEO22处理组中减少。在鼻窦炎模型中n=5只小鼠/组。**p<0.01,相对于各自的组(单向ANOVA,接着为Tukey多重比较检验)。

[0057] 图24显示PEO22减少以嗜酸性粒细胞为主(嗜酸性粒细胞性鼻窦炎的发病机制)的鼻腔上皮下浸润性炎性细胞,并改善局部病变。将经受嗜酸性粒细胞性鼻窦炎模型诱导的hCD39KI小鼠每两天用盐水或PEO22(3mg/kg)i.p.处理,总共四个剂量。在最后一次给药后一天收集鼻腔样品并通过病理学来分析。n=5只小鼠/组。鼻腔始终在II级取样(经由第一腭脊吻侧的切牙乳突),并且病理图像集中在鼻中隔上。图片是在100X(比例尺100μm)和400X(比例尺10μm)下拍摄的。显示每组一只动物的代表性图像。实心星号指示以嗜酸性粒细胞为主的上皮下浸润性炎性细胞。

[0058] 图25显示人血液中粒细胞亚群的百分比。通过流式细胞术分析健康人血液样品。粒细胞被门控为嗜酸性粒细胞(EO)(CD45+SSC^{高}Siglec-8^{+})、嗜中性粒细胞(Neu)(CD45^{+}SSC^{高}Siglec-8^{-})和嗜碱性粒细胞(Baso)(CD45^{+}SSC^{低}HLA-DR^{-}IL-3Rα^{+})。计算各细胞亚型的百分比并表示为CD45^{+}SSC^{高}(EO和Neu)的百分比(%)和CD45^{+}SSC^{低}(Baso)的百分比(%)。

[0059] 图26显示嗜酸性粒细胞为在人细胞膜上表达最高CD39水平的粒细胞亚群,CD39为人粒细胞中嗜酸性粒细胞的高度选择性表型生物标志物。通过流式细胞术分析健康人血液

样品在粒细胞细胞表面上的hCD39表达。显示与同型对照相比各亚型的hCD39表达水平。注意到,CD39在嗜酸性粒细胞上的表达比嗜中性粒细胞高得多,而嗜碱性粒细胞几乎不表达所述蛋白,CD39表达水平排序:嗜酸性粒细胞>嗜中性粒细胞>嗜碱性粒细胞。

[0060] 图27显示与健康小鼠一样,大多数嗜酸性粒细胞在健康人中是$CD39^{高}$的。基于通过流式细胞术分析的hCD39表达进一步细分健康人的血液嗜酸性粒细胞。注意到,绝大多数嗜酸性粒细胞在健康人中为$CD39^{高}$可诱导亚型。

[0061] 图28显示与其低ADCC对应物PEOWT22相比,ADCC增强的PEO22呈现出对人嗜酸性粒细胞的ADCC活性增加。将分离的人EO靶细胞与连续稀释的PEOWT22或PEO22在37℃下于5%CO_2中孵育30分钟。接着将细胞与分离和活化的人NK效应细胞(E:T=1:5)在37℃下共培养6小时。通过流式细胞术分析靶细胞死亡,并由$7\text{-}AAD^{+}$EO细胞的百分比(%)确定细胞毒性。

[0062] 图29显示PEO22对人嗜酸性粒细胞呈现出ADCP活性。将紫色标记的人EO靶细胞与同型对照(10μg/mL)或PEO22(1或10μg/mL)在37℃下于5%CO_2中孵育30分钟。接着将细胞与人巨噬细胞效应细胞(E:T=3:1)在37℃下共培养6小时。收集附着的巨噬细胞并通过流式细胞术来分析,并且ADCP由$Pacific\ Blue^{+}$(EO吞噬)巨噬细胞的百分比(%)确定。将单独与ADCP培养基一起孵育的巨噬细胞用作吞噬作用测定中的阴性对照。

[0063] 图30显示构形表位绘图和主要推定表位候选物的列表。

具体实施方式

[0064] I.概述

[0065] 由于其病理生理学的异质性,炎症性疾病的有效治疗通常具有挑战性。对潜在疾病机制的了解正在提高,并且现在很清楚嗜酸性粒细胞在广泛的炎症性疾病中发挥着复杂的病理生理作用,包括在2型炎症性疾病中的核心作用。

[0066] 嗜酸性粒细胞为分化的粒细胞的子集,其在外周血中循环并在几种身体组织中存在。除了它们在蠕虫免疫和过敏中的传统相关性外,嗜酸性粒细胞在许多稳态和病理情况中逐渐被赋予重要作用。例如,在过敏中,嗜酸性粒细胞牵涉于特应性皮炎、过敏性鼻炎和哮喘的发病机制中。它们也在根本上参与自体免疫病症,诸如嗜酸性粒细胞性食管炎、嗜酸性粒细胞性胃肠炎、急性和慢性嗜酸性粒细胞性肺炎以及嗜酸性粒细胞性肉芽肿病伴多血管炎(一种罕见的血管炎)。此外,继发性(或反应性)嗜酸性粒细胞增多症也可由诸如ICI的药物诱发/引起。

[0067] 本发明至少部分基于以下发现:某些CD39靶向剂,诸如ADCC感受态和/或ADCP感受态抗CD39抗体能够选择性地靶向并消融表达CD39的嗜酸性粒细胞,并且因此引起全身和/或位于靶组织(诸如炎症或病变部位或嗜酸性粒细胞产生部位-骨髓)中的嗜酸性粒细胞数量的减少。由此产生的CD39+嗜酸性粒细胞数量和/或功能的减少可导致组织炎症表型的变化。

[0068] 因此,在一些方面中,本发明涉及靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂。术语"靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂"是指特异性结合至嗜酸性粒细胞表面上的CD39并诱导嗜酸性粒细胞死亡的任何剂(例如,抗体、小分子、适体等)。在一些实施方案中,靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂为抗CD39抗体,诸如ADCC感受态和/或ADCP感受态抗CD39抗体。

[0069] 为了说明使用抗CD39抗体作为靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂的实例,可选择用

于本发明方法中的抗体能够与CD39形成更稳定的免疫复合物以产生更强的ADCC杀伤功效。本发明人已观察到,不能与CD39形成稳定免疫复合物的抗体会导致CD39从表面减少,但是经由增加的CD39脱落(抗原性调节)或胞吞作用(内化)的机制,并且在能够通过抗体依赖性细胞毒性消融CD39表达细胞方面没有相同的功效。不受理论束缚,进一步认为使用抗CD39抗体作为靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂的实例,可选择用于本发明方法中的抗体能够与CD39形成更稳定的免疫复合物以产生更强的ADCP杀伤功效。ADCP为另一个主要的Fc效应子功能,其机制是抗体调理的靶细胞激活巨噬细胞表面上的Fcγ R(诸如细胞上的本文所述的Fcγ RIIIa受体,诸如在NK细胞上表达并赋予NK细胞以ADCC杀伤功能的那些)以诱导吞噬作用,从而导致靶细胞的内化和降解,最终杀死靶细胞。治疗性单克隆抗体的低岩藻糖基化或无岩藻糖基化已经证明会导致增强的Fcγ RIIIa受体结合和后续NK细胞的ADCC介导的靶细胞耗竭活性,以及巨噬细胞的ADCP介导的靶细胞耗竭(参见本文中的图1、图3、图12、图13、图15-图18、图22-图24、图28和图29;以及Dagher等人,2022,Eur.Respir.J.59:2004306;其中在两种实验设置中的靶细胞均为嗜酸性粒细胞)。

[0070] 某些优选的抗CD39单克隆抗体的示例性特征(所述特征被教导不在文献中所述的治疗性抗CD39抗体中使用)总结如下。

[0071] 主题抗体经由Fcγ RIIIa受体依赖性活性(例如ADCC和/或ADCP)减少CD39+嗜酸性粒细胞群。

[0072] 作为实例,图1和图3显示克隆PEOWT22(一种完全人抗CD39单克隆抗体)通过使用岩藻糖基化抑制剂(PEOAF22)或通过优化产生过程(PEONP22和PEO22)实现的减少的岩藻糖基化(即低岩藻糖基化或无岩藻糖基化)在体外显著提高其针对CD39+细胞的ADCC活性,ADCC活性排序:PEO22>PEONP22>PEOWT22。当在体外ADCC测定中使用人NK细胞(作为效应细胞)和人嗜酸性粒细胞(作为靶细胞)时,此类现象也是有效的,即与其完全岩藻糖基化对应物PEOWT22(EC50=3.03E-03μg/mL)相比,PEO22显示出针对嗜酸性粒细胞的显著增强的NK细胞毒性(EC50=2.94E-04μg/mL)(图28)。此外,PEO22也在使用人巨噬细胞(作为效应细胞)和人嗜酸性粒细胞(作为靶细胞)的体外吞噬作用测定中显示出针对嗜酸性粒细胞的ADCP活性(图29)。如所预期的,所有这些体外靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭活性与无岩藻糖基化抗体PEO22在体内的抗嗜酸性粒细胞活性增强同时发生(图12、图13、图15-图18和图22-图24)。

[0073] $CD39^{高}$在表型和/或功能上限定可诱导和/或活化的嗜酸性粒细胞亚群。

[0074] 嗜酸性粒细胞具有异质性,并且存在不同的嗜酸性粒细胞亚群,即常驻于各种组织中的嗜酸性粒细胞和可诱导嗜酸性粒细胞,此可对嗜酸性粒细胞靶向疗法的功效产生影响。嗜酸性粒细胞亚群的表征为嗜酸性粒细胞研究的重要目标。因此,值得通过膜表面标志物对不同嗜酸性粒细胞亚群进行表型分型,以区分稳态嗜酸性粒细胞与炎性嗜酸性粒细胞,由此开发更安全、更具选择性和更有效的疗法来治疗与不需要的嗜酸性粒细胞活性相关的疾病或疾患,即,生物制剂的治疗干预完全耗竭组织和循环嗜酸性粒细胞,或反之亦然,维持最小比例的嗜酸性粒细胞,特别是驻留在组织中或呈稳态的那些,因此可能产生非常不同的影响,特别是在考虑长期施用这些疗法时。同样,使用可诱导嗜酸性粒细胞(例如,循环嗜酸性粒细胞、器官特异性嗜酸性粒细胞)的真正生物标志物也可帮助在不断增加的生物制剂治疗设备中选择最佳的嗜酸性粒细胞靶向方法。然而,嗜酸性粒细胞亚型在人中

尚未完全表征。(Messnil等人,2016,J.Clin.Invest.126:3279-3295;Kanda等人,2021,Allergol.Int.70(1):9-18;Lombardi等人,2022,Curr.Res.Immunol.3:42-53)。

[0075] 在此,显示1)几乎所有嗜酸性粒细胞均表达CD39(嗜酸性粒细胞为CD39+);并且2)$CD39^{高}$在表型和/或功能上限定可诱导和/或活化的嗜酸性粒细胞,它们占小鼠和人中的嗜酸性粒细胞的绝大多数。

[0076] 作为实例,图16显示,基于通过流式细胞术分析的细胞表面CD39表达水平,嗜酸性粒细胞可在表型上分为健康小鼠和哮喘小鼠中的两个不同亚群,即$CD39^{高}$与$CD39^{低}$。此外,这些$CD39^{高}$嗜酸性粒细胞呈现出"可诱导"功能性状,对炎症诱导有反应并在此后扩增,即在哮喘小鼠中观察到外周血和骨髓中$CD39^{高}$嗜酸性粒细胞亚群数量的增加(图16);同时伴随肺部浸润性嗜酸性粒细胞数量增加(例如,主要在支气管周围和血管周围区域的局灶性嗜酸性粒细胞性炎症,伴有血管炎(图17和图18);所有均与疾病严重程度增加呈正相关(图17和图18)。此类现象也见于特应性皮炎和嗜酸性粒细胞性鼻窦炎小鼠模型中(图22和图24)。更重要地,在人血液中也观察到类似的嗜酸性粒细胞的CD39表达谱(图25-图27),意味着靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂(诸如本发明中的主题抗CD39抗体)具有良好的临床可转化性。

[0077] 值得注意的是,绝大多数嗜酸性粒细胞在稳态条件下是$CD39^{高}$可诱导亚型(诸如健康小鼠和健康人),即80-90%$CD39^{高}$相对于10-20%$CD39^{低}$(图16和图27)。在诸如哮喘的嗜酸性粒细胞相关疾病(EAD)中,这些$CD39^{高}$的嗜酸性粒细胞会扩增并增加(图16),提示$CD39^{高}$的嗜酸性粒细胞易于"诱导"并对炎症诱导有反应;并且$CD39^{高}$为"活化的"嗜酸性粒细胞的选择性表型和/或功能生物标志物,此为EAD的发病机制。

[0078] 与CD39不同,其他先前报导的EAD中"活化的"嗜酸性粒细胞的表型生物标志物,诸如CD49b和CD101,被称为对嗜酸性粒细胞"上调",不能(或至少比CD39的程度小得多)将活化的嗜酸性粒细胞亚群与其稳态对应物区分开(图19)。作为另一个实例,FASENRA®(贝那利珠单抗(Benralizumab))为人源化IgG1抗IL-5Rα单克隆抗体,出于ADCC增强,其被无岩藻糖基化以耗竭嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞,其为首个且唯一的直接结合在嗜酸性粒细胞表面处的抗嗜酸性粒细胞生物制剂并且被批准用于嗜酸性粒细胞哮喘(可在万维网的fasenrahcp.com处获得)。然而,在嗜酸性粒细胞哮喘中,IL-5R$\alpha^{高}$的嗜酸性粒细胞亚群仅占嗜酸性粒细胞的一小部分,即血液中约占20%,并且骨髓中少于50%(图19);此外,嗜中性粒细胞确实比嗜酸性粒细胞表达更高水平的IL-5Rα(Kanda等人,2021,Allergol.Int.70(1):9-18-图3;和本文的图20)。因此,靶向IL-5Rα的嗜酸性粒细胞耗竭剂(诸如贝那利珠单抗)的耗竭活性确实缺乏嗜酸性粒细胞选择性。

[0079] 这些数据表明$CD39^{高}$充当EAD中可诱导和/或活化的嗜酸性粒细胞亚型的真正表型和/或功能生物标志物,进一步证明靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂治疗与不需要的嗜酸性粒细胞活性相关的疾病或疾患的高选择性和潜在高功效。在另一方面中,本文中数据也提示$CD39^{高}$嗜酸性粒细胞作为生物标志物的潜在临床效用,有助于对EAD患者进行分层。

[0080] 主题抗CD39抗体的ADCC活性对$CD39^{高}$细胞,例如$CD39^{高}$可诱导和/或活化的嗜酸性粒细胞具有选择性。

[0081] 作为实例,图4和图5显示,PEOWT22的ADCC活性在体外对$CD39^{高}$细胞(即图4中的Raji-hCD39hi细胞和图5中的SK-MEL-28细胞)具有选择性。

[0082] 作为图16所示的进一步实例,PEO22能够在体内选择性地靶向并消融$CD39^{高}$的可诱

导和活化的嗜酸性粒细胞;结果造成诸如嗜酸性粒细胞哮喘的EAD中这些CD39^{高}的嗜酸性粒细胞数量的全身性减少(图16)。同时,在哮喘、血管炎、特应性皮炎和嗜酸性粒细胞性鼻窦炎小鼠模型中,通过PEO22处理的病理损伤中组织浸润性嗜酸性粒细胞的数量也显著减少(图17、图18、图22和图24)。由此产生的CD39^{高}的嗜酸性粒细胞亚群数量和/或功能的减少造成组织炎症性表型的改善以及疾病严重程度的降低(图17、图18、图22和图24)。

[0083] 作为图12和图13中所示的另外实例,相比之下,表达比嗜酸性粒细胞低得多的CD39水平的嗜中性粒细胞(图11)未由体内PEO22处理耗竭。

[0084] 总之,此功能性状应赋予主题抗体以特异性,从而避免全身副作用,由此应得到更安全、高度选择性和更有效的抗CD39抗体来治疗EAD,与不需要的嗜酸性粒细胞活性相关的疾病或疾患。

[0085] 抗CD39抗体与抗原在靶细胞膜上形成稳定免疫复合物赋予抗体以高ADCC活性。

[0086] 作为图9中所示的实例,使用选自以下三组的抗体检查靶细胞表面上抗体-抗原免疫复合物的稳定性:ADCC高(即PEONP22、hCD39Ref和人/兔嵌合克隆PEO19、PEO20、PEO21和PEO25)、ADCC低(人/兔嵌合克隆PEO26)或ADCC阴性(人/兔嵌合克隆PEO27、PEO28和PEO29)。可以清楚地看到此类免疫复合物的稳定性与抗体的ADCC活性之间存在强烈的正相关,即抗体-抗原免疫复合物越稳定,抗体的ADCC活性越高。

[0087] 抗CD39抗体的不同表位与抗体的ADCC活性直接相关。

[0088] 作为一个实例,通过比较主题人/兔嵌合抗hCD39抗体与可商购获得的抗hCD39单克隆抗体克隆A1的表位,图6-图8显示以与克隆A1非竞争性或仅部分竞争性结合至CD39的方式结合至CD39的抗CD39抗体极有可能包含高ADCC活性,例如,除PEO23外,六种ADCC高抗体中有五种(PEO18、PEO19、PEO20、PEO21和PEO24)均呈现出此类性状(图6和图7)。相比之下,ADCC低(PEO26、PEO30、PEO31和PEO32)和ADCC阴性(PEO27、PEO28、PEO29、PEO33、PEO34、PEO35、PEO36和PEO37)组中的所有抗体均显示与克隆A1完全重叠的表位(图6和图8)。

[0089] 在某些实施方案中,并非专注于直接抑制CD39 NTP酶活性,例如,在现有技术的肿瘤学应用中,抗CD39治疗抗体专注于此(Perrot等人,2019,Cell Reports 27:2411-2425;Li等人,2019,Cancer Discovery9(12):1754-1773;和WO/2017/089334),可用于本发明中的抗CD39抗体(无论是否抑制NTP酶活性)可以专门设计为具有含有lgG1 Fc结构域的人恒定区。此设计赋予Fcγ RIIIa受体依赖性细胞活性,例如,针对CD39+细胞的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)和(任选地)补体依赖性细胞毒性(CDC)。因此,此类细胞活性导致CD39+嗜酸性粒细胞的消融和减少。

[0090] 在某些实施方案中,已显示由本发明所涵盖的某些抗体结合至CD39上的表位,这些抗体与单克隆抗体克隆A1非竞争性或仅部分竞争性结合至CD39。

[0091] II.定义

[0092] 为了便于理解本发明,下面定义一些术语和短语。

[0093] “CD39”,也称为“分化簇39”、“外切核苷三磷酸二磷酸水解酶-1”或(基因)“ENTPD1”和(蛋白质)“NTPDase1”为位于细胞表面上的外切核苷酸酶,具有面向细胞外的催化位点,其催化三磷酸和二磷酸核苷的γ-和β-磷酸残基水解为单磷酸核苷衍生物(酶条目:EC 3.6.1.5),诸如水解P2受体配体,诸如ATP、ADP、UTP和UDP(Junger等人,2011,Nat.Rev.Immunol.11:201-212)。代表性人NTPDase1蛋白质序列在UniProtKB条目“P49961

(ENTP1_HUMAN)”中提供,并且所述酶的代表性人编码序列在GenBank登录号S73813中提供。

[0094] 代表性人CD39 cDNA和蛋白质序列为本领域中熟知的并且可由国家生物技术信息中心(NCBI)公开获得。例如,已知至少七种人CD39转录物变体,其编码六种不同的人CD39同功型。人CD39同功型1可在登录号NM_001776.5和NP_001767.3下获得。转录物变体代表最长的转录物并编码同功型1。人CD39同功型2可在登录号NM_001098175.1和NP_001091645.1下获得,其使用替代5’外显子而非转录物变体1,由此产生不同的5’非翻译区(UTR)并使得翻译在替代起始密码子处起始,从而产生更长且不同的N末端。人CD39同功型3可在登录号NM_001164178.1和NP_001157650.1下获得,其使用替代5’外显子而非转录物变体1,由此产生不同的5’UTR并使得翻译在替代起始密码子处起始,从而产生更长且不同的N末端。人CD39同功型4可在登录号NM_001164179.1和NP_001157651.1下获得,其与转录物变体1相比,使用替代的框内剪接位点,从而产生更短的同功型。人CD39同功型5可在登录号NM_001164181.1和NP_001157653.1下获得,其使用5’区域中的替代外显子,由此产生不同的5’UTR和在相对于转录物变体1的下游起始密码子处的翻译起始,从而产生更短的同功型。人CD39同功型6可在登录号NM_001164182.1和NP_001157654.1下获得,其缺乏替代外显子,由此产生不同的5’UTR并使得翻译在相对于转录物变体1的下游起始密码子处起始,从而产生更短的同功型。人CD39同功型6也由另一转录物变体编码,可在登录号NM_001164183.1和NP_001157655.1下获得,其缺乏两个替代内部外显子,由此产生不同的5’UTR并使得翻译在相对于转录物变体1的下游起始密码子处起始,从而产生更短的同功型。

[0095] CD39异种同源物在除人以外的生物体中的核酸和多肽序列是熟知的并且包括例如小鼠CD39(NM_009848.3和NP_033978.1)、大鼠CD39(NM_022587.1和NP_072109.1)、奶牛CD39(NM_174536.2和NP_776961.1)、青蛙CD39(NM_001006795.1和NP_001006796.1)和斑马鱼CD39(NM_001003545.1和NP_001003545.1)。

[0096] CD39的广泛糖基化与其细胞表面表达和活性相关,由此糖基化残基的缺失或向不可糖基化残基的突变导致CD39活性显著降低(参见,例如,大鼠CD39的N末端处可糖基化残基73、中间的残基333和/或C末端处的残基429和/或458或其异种同源物中的相应残基的缺失或突变(Wu等人,2005,Mol.Biol.Cell.16:1661-1672))。类似地,ACR 1-5中任何一者或多者的腺苷三磷酸双磷酸酶保守区(ACR)中保守残基的突变导致CD39活性降低(Schulte am Esch等人,1999,Biochem.38:2248-2258;Yang等人,2001,Biochem.40:3943-4940;Wang和Guidotti,1998,J.Biol.Chem.273:11392-11399)。

[0097] CD39活性的调节(例如,降低)可以许多方式测量(例如,根据本文所述的措施,包括使用对照、比率、与基线的比较等)。例如,与在测试剂存在下的外切核苷酸酶水平相比,CD39活性调节剂可降低外切核苷酸酶的催化活性或总体CD39活性。在一个实施方案中,通过分析样品中腺苷的浓度来确定CD39活性。可随时间评估浓度。在另一个实施方案中,将ATP添加至测试样品中,并测定或评估剩余ATP、AMP或腺苷的浓度。在本上下文中,调节诸如降低可意谓1%、5%、10%>、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、120%、150%、200%、500%、1000%或更多降低。在一个实施方案中,随时间检测所述增加。

[0098] 在某些实施方案中,诸如嗜酸性粒细胞的细胞呈现出高水平的基因(例如,CD39)或其他感兴趣的生物标志物(例如,称为SSC的流式细胞术侧向散射)的表达。在一个实施方

案中,本文所述的任何测定基因或其他生物标志物的表达水平的方法可用于确定高水平。例如,定义CD39^{高}嗜酸性粒细胞的代表性非限制性方法包括在本文示例性材料和方法中所述的基于抗体的流式细胞术测定下,使用如表1-3中所列的检测抗体,诸如使用Cytek® Aurora流式细胞仪分析血液(或血液衍生物)或骨髓,诸如从健康或哮喘hCD39KI小鼠(获自Purinomia Animal Facility)获得的血液或骨髓或从健康人供体获得的血液。

[0099] 在某些实施方案中,CD39^{高}嗜酸性粒细胞可被鉴定为嗜酸性粒细胞,其除了表达嗜酸性粒细胞特征性的标志物和/或具有嗜酸性粒细胞的功能特征外,也以足够高的水平表达CD39,使得通过流式细胞术,具有至少10^3的CD39检测抗体荧光强度,例如,诸如使用在本文示例性材料和方法中所述的基于抗体的流式细胞术测定,使用表1-3中所列的检测抗体,诸如使用Cytek®Aurora流式细胞仪所检测。

[0100] 在一些实施方案中,CD39^{高}细胞群(诸如嗜酸性粒细胞)包含如此的细胞群,其中至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多或介于两者之间的任何范围(包括端值),诸如60-99%、65-95%、70-90%、70-80%等,表达高水平的CD39(例如,仅仅为了说明,在此特定流式细胞术测定下CD39检测抗体荧光强度为至少10^3,诸如至少10^4、10^5、10^6、10^7或介于两者之间的任何范围(包括端值),诸如10^3-10^7、10^4-10^6、10^3-10^6等)。在一些实施方案中,CD39^{低}细胞群(诸如嗜酸性粒细胞)包含如此的细胞群,其中少于41%、40%、39%、38%、37%、36%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或甚至更低或介于两者之间的任何范围(包括端值),诸如4-41%、10-35%、15-25%等,表达低水平的CD39(例如,仅仅为了说明,在此特定流式细胞术测定下CD39检测抗体荧光强度小于10^3,诸如小于10^3、10^2、10^1、10^0或介于两者之间的任何范围(包括端值),诸如小于10^0-10^3、10^1-10^2、10^1-10^3等)。在一些实施方案中,CD39^{高}细胞诸如CD45+CD11b+CD39^{高}Siglec-8+嗜酸性粒细胞(其同于小鼠中的CD45+CD11b+CD39^{高}Siglec-F+嗜酸性粒细胞)占总群体(诸如CD45+CD11b+Siglec-8+CD39+嗜酸性粒细胞群体)的60-99%或介于两者之间的任何范围(包括端值),诸如60-95%、60-80%、70-80%、75-80%等。

[0101] 在某些实施方案中,诸如嗜酸性粒细胞的细胞为“可诱导和/或活化的”嗜酸性粒细胞。在一个实施方案中,本文所述的任何测定基因或其他生物标志物的表达水平的方法可用于确定细胞亚型。例如,定义“可诱导和/或活化的”嗜酸性粒细胞的代表性非限制性方法包括在本文示例性材料和方法中所述的基于抗体的流式细胞术测定下,使用如表1-3中所列的检测抗体,诸如使用Cytek® Aurora流式细胞仪分析血液(或血液衍生物)或骨髓,诸如从健康或哮喘hCD39KI小鼠(获自Purinomia Animal Facility)获得的血液或骨髓或从健康人供体获得的血液。在一些实施方案中,“可诱导和/或活化的”嗜酸性粒细胞:i)存在于诸如哮喘、血管炎、皮炎或鼻窦炎的病理状态中;和/或ii)位于选自由血液、骨髓、病变和/或其组合组成的组的空间中。在一些实施方案中,“可诱导和/或活化的”嗜酸性粒细胞为CD39^{高}嗜酸性粒细胞群。在一些实施方案中,“可诱导和/或活化的”嗜酸性粒细胞为CD45+CD11b+CD39^{高}Siglec-8+嗜酸性粒细胞群(其同于小鼠中的CD45+CD11b+CD39^{高}Siglec-F+嗜酸性粒细胞)。在一些实施方案中,“可诱导和/或活化的”嗜酸性粒细胞为CD45+CD11b+CD39^{高}Siglec-8^{高}嗜酸性粒细胞群。

[0102] “CD39抗体”(替代地,“抗CD39抗体”)是指选择性结合至NTPDase1蛋白的一个或多

个表位的抗体,并且包括单互补位抗体以及双互补位和其他多互补位形式的抗体。

[0103] 在一些实施方案中,“免疫复合物”(也称为抗原-抗体复合物或抗原结合抗体)可指代经由抗原(例如在诸如细胞的介质上表达,或单独表达)与抗体的结合形成的组合物。当满足以下条件时,可形成“稳定的免疫复合物”:24小时后抗原与抗体之间的相互作用损失少于40%的免疫复合物,24小时后少于35%、少于30%、少于25%、少于20%、少于15%或少于10%,或介于两者之间的任何范围(包括端值),诸如40%-35%、35%-30%、30%-25%、25%-20%、20%-15%、15%-10%等(例如,当将抗体与表达抗原的细胞诸如HCC1739BL细胞一起孵育时)。在一些实施方案中,使用荧光标记的二次抗体,通过荧光强度检测免疫复合物的形成(例如,仅仅为了说明,可通过以下步骤来确定与抗CD39抗体形成的免疫复合物的稳定性:将抗CD39单克隆抗体(mAb)(例如,2μg/mL或更高)与HCC1739BL细胞一起孵育不同时间,接着通过荧光结合的二次抗体检测免疫复合物的存在)。

[0104] a.抗体和其他多肽

[0105] 如本文所用,术语“抗体”是指经由至少一个抗原结合位点识别并特异性结合靶标的免疫球蛋白分子,所述靶标是诸如蛋白质、多肽、肽、碳水化合物、多核苷酸、脂质或任何前述的组合,其中抗原结合位点通常在免疫球蛋白分子的可变区内。如本文所用,所述术语涵盖完整的多克隆抗体、完整的单克隆抗体、抗体片段(诸如Fab、Fab’、F(ab’)2和Fv片段)、单链Fv(scFv)抗体(限制条件为那些片段已被格式化以包含Fc或其他Fcγ RIII结合结构域)、多特异性抗体、双特异性抗体、单特异性抗体、单价抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、包含抗体的抗原结合位点的融合蛋白(被格式化以包含Fc或其他Fcγ RIII结合结构域)和包含抗原结合位点的任何其他修饰的免疫球蛋白分子,只要抗体呈现出所需的生物活性即可。

[0106] 如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”是指抗体中保留与抗原(例如,人CD39)特异性结合的能力的一个或多个片段。已显示,抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段执行。术语抗体(例如,本文所述的抗CD39抗体)的“抗原结合部分”内所涵盖的结合片段的实例包括(i)Fab片段,即由V_L、V_H、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii)F(ab’)$_2$片段,即包含在铰链区处通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)由V_H和CH1结构域组成的Fd片段;(iv)由抗体单臂的V_L和V_H结构域组成的Fv片段,(v)由V_H结构域组成的dAb片段(Ward等人,1989,Nature 341:544-546);和(vi)分离的互补决定区(CDR)或(vii)两个或更多个分离的CDR的组合,它们可任选地通过合成接头接合。此类单链抗体也意欲涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”内。这些和其他潜在构建体描述于Chan和Carter(2010)Nat.Rev.Immunol.10:301中。使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段,并且以与完整抗体相同的方式筛选片段的效用。抗原结合部分可通过重组DNA技术或通过完整免疫球蛋白的酶促或化学裂解产生。

[0107] 术语抗体的“可变区”是指抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区,单独或以组合形式。通常,重链和轻链的可变区各由四个框架区(FR)和三个互补决定区(CDR)(也称为“高变区”)组成。每条链中的CDR通过框架区紧密保持在一起,并与来自另一条链的CDR一起,有助于形成抗体的抗原结合位点。存在至少两种确定CDR的技术:(1)基于跨物种序列变异性的方法(即Kabat等人,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,National Institutes of Health,Bethesda Md.);和(2)基于抗原-抗体复合物的结晶

学研究的方法(Al Lazikani等人,1997,J.Mol.Biol.273:927-948)。此外,本领域有时使用这两种方法的组合来确定CDR。

[0108] 虽然抗体基于它们的重链恒定结构域(分别称为α、δ、ε、γ和μ)的特性可为五种主要免疫球蛋白类别中的任一种:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,或其亚类(同型)(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2),但优选的CD39抗体为IgG1和IgG3同型,以便最有效地结合FcγRIII(即,Kd为10^{-7}或更小)。

[0109] 在某些实施方案中,抗体为"低岩藻糖基化的"并且甚至可为"无岩藻糖基化的"。"低岩藻糖基化"抗体制剂是指少于50%的寡糖链含有α-1,6-岩藻糖的抗体制剂。通常,少于约40%、少于约30%、少于约20%、少于约10%、或少于5%或少于1%的寡糖链在"低岩藻糖基化"抗体制剂中含有α-1,6-岩藻糖。"无岩藻糖基化"抗体在附接至IgG重链的CH2结构域的碳水化合物中缺少α-1,6-岩藻糖。

[0110] 如本文所用,术语"单克隆抗体"是指对特定表位呈现单一结合特异性和亲和力的抗体或其中所有抗体均对特定表位呈现单一结合特异性和亲和力的抗体组合物。通常,此类单克隆抗体将衍生自编码所述抗体的单一细胞或核酸,并且将在不故意引入任何序列改变的情况下繁殖。因此,术语"人单克隆抗体"是指具有衍生自人生殖是免疫球蛋白序列的可变区和任选的恒定区的单克隆抗体。在一个实施方案中,人单克隆抗体是由杂交瘤产生的,例如,通过将获自转基因或转染色体非人动物(例如,具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组的转基因小鼠)的B细胞融合至永生化细胞而获得。

[0111] 如本文所用,术语"人源化抗体"是指非人(例如,鼠类)抗体的形式,所述抗体为特异性免疫球蛋白链、嵌合免疫球蛋白或其片段,其包含最少非人序列。通常,人源化抗体为其中CDR的残基被来自非人物种(例如,小鼠、大鼠、兔或仓鼠)的CDR的残基替换的具有所需特异性、亲和力和/或结合能力的人免疫球蛋白。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架区残基被来自非人物种的抗体中的相应残基替换。人源化抗体可通过在Fv框架区和/或替换的非人残基内取代额外残基来进一步修饰,以改进并优化抗体特异性、亲和力和/或结合能力。人源化抗体可包含可变结构域,其含有对应于非人免疫球蛋白的所有或实质上所有CDR,而所有或实质上所有框架区为人免疫球蛋白序列的那些框架区。在一些实施方案中,可变结构域包含人免疫球蛋白序列的框架区。在一些实施方案中,可变结构域包含人免疫球蛋白共有序列的框架区。人源化抗体也可包含免疫球蛋白恒定区或结构域(Fc)的至少一部分,通常为人免疫球蛋白的恒定区或结构域。人源化抗体通常被视为不同于嵌合抗体。

[0112] 如本文所用,术语"人抗体"是指由人产生的抗体或使用本领域已知的任何技术制得的具有与由人产生的抗体相对应的氨基酸序列的抗体。

[0113] 如本文所用,术语"嵌合抗体"是指其中免疫球蛋白分子的氨基酸序列衍生自两个或更多个物种的抗体。通常,轻链和重链的可变区对应于衍生自一个哺乳动物物种(例如,小鼠、大鼠、兔等)的具有所需特异性、亲和力和/或结合能力的抗体的可变区,而恒定区与来自另一物种(通常为人)的抗体中的序列同源,以避免在所述物种中引发免疫反应。

[0114] "Fc受体"或"FcR"为结合至免疫球蛋白的Fc区的受体。结合至IgG抗体的FcR包含FcγR家族的受体,包括这些受体的对偶基因变体和替代剪接形式。FcγR家族由三种活化性受体(小鼠中的FcγRI、FcγRIII和FcγRIV;人中的FcγRIA、FcγRIIA和FcγRIIIA)和一种抑制性受体(FcγRIIB)组成。

[0115] “Fc γ RIII结合部分”为肽、蛋白质、核酸或其他部分,当其与抗CD39抗体的抗原结合位点结合时,能够结合至Fc γ RIII(CD16),并任选地介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和/或抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。含有IgG1和IgG3同型的CH2和CH3结构域的重链Fc片段为Fc γ RIII结合部分。

[0116] 术语“表位”和“抗原决定位”在本文中可互换使用,并且是指能够由特定抗体识别并特异性结合的抗原部分。当抗原为多肽时,表位可由连续氨基酸与通过蛋白质的三级折叠并列的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位(也称为线性表位)通常在蛋白质变性后保留,而由三级折叠形成的表位(也称为构形表位)通常在蛋白质变性后丢失。表位通常包括至少3个,并且更通常至少5、6、7或8-10个呈独特空间构形的氨基酸。

[0117] 如本文所用,术语“特异性结合至”或“对…具有特异性”是指可测量和可再现的相互作用,诸如靶标与抗体之间的结合,其在存在异质分子(包括生物分子)群的情况下决定靶标的存在。例如,特异性结合至靶标(其可为表位)的抗体为与结合至其他靶标相比以更大的亲和力、亲合力、更容易和/或更长的持续时间结合此靶标的抗体。在一个实施方案中,抗体与不相关靶标的结合程度小于抗体与靶标结合的约10%,如例如通过放射免疫测定(RIA)所测量。在某些实施方案中,特异性结合至靶标的抗体具有小于或等于1μM、100nM、10nM、1nM或甚至0.1nM的解离常数(Kd)。在某些实施方案中,抗体特异性结合至蛋白质上的表位,所述表位在来自不同物种的蛋白质中是保守的。在另一个实施方案中,特异性结合可包括但不要求排他性结合。

[0118] 术语“多肽”和“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用并且是指具有任何长度的氨基酸的聚合物。聚合物可为线性或分支的,它可包含修饰的氨基酸,并且它可由非氨基酸中断。所述术语也涵盖天然修饰的或通过干预修饰的氨基酸聚合物;所述干预是例如二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其他操纵或修饰,诸如与标记组分结合。所述定义也包括例如含有一种或多种氨基酸类似物(包括例如非天然氨基酸)以及本领域已知的其他修饰的多肽。应理解,因为本发明所涵盖的多肽可基于抗体或免疫球蛋白超家族的其他成员,所以在某些实施方案中,多肽可作为单链或相关链存在。

[0119] 在两个或更多个核酸或多肽的上下文中,术语“相同的”或“同一性”百分比是指如此的两个或更多个序列或子序列:它们当比较和比对(如有必要,则引入缺口)以实现最大对应时(不考虑将任何保守氨基酸取代作为序列同一性的一部分)是相同的或具有特定百分比的相同核苷酸或氨基酸残基。同一性百分比可使用序列比较软件或算法或通过目视检查来测量。可用于获得氨基酸或核苷酸序列比对的各种算法和软件是本领域中熟知的。它们包括但不限于BLAST、ALIGN、Megalign、BestFit、GCG Wisconsin Package和其变型。在一些实施方案中,本发明所涵盖的两个核酸或多肽当比较和比对以实现最大对应时(如使用序列比较算法或通过目视检查所测量)实质上相同,意味着它们具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%,并且在一些实施方案中至少95%、96%、97%、98%、99%的核苷酸或氨基酸残基同一性。在一些实施方案中,同一性存在于至少约10个残基、至少约20个残基、至少约40-60个残基、至少约60-80个残基长度或其间任何整数值的氨基酸序列的区域上。在一些实施方案中,同一性存在于比60-80个残基更长的区域上,诸如至少约80-100个残基,并且在一些实施方案中,序列在所比较的序列(诸如靶蛋白或抗体的编码区)全长上实质上相同。在一些实施方案中,同一性存在于至少约10个碱基、至少约20个碱基、至

少约40-60个碱基、至少约60-80个碱基长度或其间任何整数值的核苷酸序列的区域上。在一些实施方案中,同一性存在于比60-80个碱基更长的区域上,诸如至少约80-1000个碱基或更多,并且在一些实施方案中,序列在所比较的序列(诸如编码感兴趣的蛋白质的核苷酸序列)全长上实质上相同。

[0120] "保守氨基酸取代"为其中一个氨基酸残基被具有相似侧链的另一氨基酸残基替换的取代。具有相似侧链的氨基酸残基家族已在本领域中得到普遍定义,包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、β-分支侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。例如,用苯丙氨酸取代酪氨酸为保守取代。通常,本发明所涵盖的多肽、可溶性蛋白质和/或抗体的序列中的保守取代不会消除含有氨基酸序列的多肽、可溶性蛋白质或抗体与靶标结合位点的结合。鉴定不消除结合的氨基酸保守取代的方法是本领域中熟知的。

[0121] "分离的"多肽、可溶性蛋白质、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物为呈未见于自然界中的形式的多肽、可溶性蛋白质、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物。分离的多肽、可溶性蛋白质、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物包括已被纯化至它们不再处于它们在自然界中所见形式的程度的那些。在一些实施方案中,分离的多肽、可溶性蛋白质、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物为实质上纯的。

[0122] 如本文所用,术语"实质上纯的"是指至少50%纯(即不含污染物)、至少90%纯、至少95%纯、至少98%纯或至少99%纯的材料。

[0123] 如本文所用,术语"融合蛋白"或"融合多肽"是指由包含至少两个基因的核苷酸序列的核酸分子表达的杂合蛋白。

[0124] 如本文所用,术语"接头"或"接头区"是指插入第一多肽(例如,抗CD39抗体)与第二多肽(例如,Fc或其他Fc γ RIII结合部分;scFV、Vhh结构域等,结合不同蛋白质以生成维持针对CD39的二价性的双特异性抗体形式)之间的接头。在一些实施方案中,接头为肽接头。接头不应不利地影响多肽的表达、分泌或生物活性。优选地,接头不具有抗原性并且不引起免疫反应。

[0125] b.治疗

[0126] 如本文所用,术语"有效量"是指提供治疗或预防益处的量。

[0127] 如本文所用,术语"治疗"是指受试者改变临床疾病过程的行为,其可为预防性的或干预性的以改变临床病理过程。所述术语包括但不限于预防疾病的发生或复发、减轻症状、减少任何疾病的直接或间接病理后果、预防转移、减缓疾病进展速率、改善或缓解疾病、和改善预后。

[0128] 术语"受试者"是指任何动物(例如,哺乳动物),包括但不限于人、非人灵长类动物、犬科动物、猫科动物、啮齿动物等,其将成为特定治疗的接受者。通常,术语"受试者"与"患者"在本文中可互换使用,是指人受试者。

[0129] 如本文所用,术语"激动剂"和"激动的"是指或描述能够直接或间接地实质上诱导、激活、促进、提高或增强靶标和/或途径的生物活性的治疗部分。术语"激动剂"在本文中用于包括部分或完全诱导、激活、促进、提高或增强蛋白质或其他感兴趣靶标的活性的任何

剂。

[0130] 如本文所用,术语“拮抗剂”和“拮抗的”是指或描述能够直接或间接、部分或完全阻断、抑制、降低或中和靶标和/或途径的生物活性的治疗部分。术语“拮抗剂”在本文中用于包括部分或完全阻断、抑制、降低或中和蛋白质或其他感兴趣靶标的活性的任何剂。

[0131] 如本文所用,术语“调节(modulation)”和“调节(modulate)”是指生物活性的变化或改变。调节包括但不限于刺激活性或抑制活性。调节可为活性的提高或活性的降低、结合特征的变化、或与蛋白质、途径、系统或其他感兴趣生物靶标的活性相关的生物学、功能或免疫学特性的任何其他变化。

[0132] 如本文所用,术语“免疫反应”包括来自先天性免疫系统和适应性免疫系统的反应。它包括细胞介导免疫反应和/或体液免疫反应。它包括T细胞和B细胞反应,以及来自免疫系统的其他细胞诸如自然杀伤(NK)细胞、单核细胞、巨噬细胞等的反应。

[0133] 术语“药学上可接受的”是指由联邦政府或州政府的监管机构批准或可批准的或列于美国药典(U.S.Pharmacopeia)或其他公认药典中用于包括人的动物的物质。

[0134] 术语“药学上可接受的赋形剂、载剂或佐剂”或“可接受的药物载剂”是指可与至少一种本公开的剂一起向受试者施用的赋形剂、载剂或佐剂,并且它们不会破坏所述剂的药理活性,并且当以足以产生治疗效果的剂量施用时是无毒的。通常,本领域技术人员和U.S.FDA将药学上可接受的赋形剂、载剂或佐剂视为任何制剂的无活性成分。

[0135] 术语“有效量”或“治疗有效量”或“治疗效果”是指有效“治疗”受试者诸如哺乳动物的疾病或病症的抗CD39抗体的量。

[0136] 术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”或“治疗(to treat)”或“减轻(alleviating)”或“减轻(alleviate)”是指(1)治愈、减缓、减轻已诊断的病理状态或病症的症状和/或阻止其进展的治疗措施,和(2)预防或减缓靶病理状态或病症的发展的预防或防治措施。因此,那些需要治疗者包括那些已经患有所述病症者;那些容易患上所述病症者;以及那些要预防所述病症者。

[0137] c.杂项

[0138] 应理解,在本文中用语言“包含”描述实施方案之处,也提供用“由...组成”和/或“基本上由...组成”方面描述的类似实施方案。还应理解,在本文中用语言“基本上由...组成”描述实施方案之处,还提供用“由...组成”方面描述的类似实施方案。

[0139] 如本文所用,提及“约”或“大约”值或参数包括(并描述)针对所述值或参数的实施方案。例如,提及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0140] 如在本文中诸如“A和/或B”的短语中使用的术语“和/或”旨在包括A和B两者;A或B;A(单独);以及B(单独)。同样,如在诸如“A、B和/或C”的短语中使用的术语“和/或”旨在涵盖以下各实施方案:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);以及C(单独)。

[0141] III.抗CD39抗体

[0142] a.单克隆抗体

[0143] 可用于本发明的方法和药物制剂中的抗CD39抗体可为单克隆抗体。可使用杂交瘤方法制备单克隆抗体,诸如Kohler和Milstein,1975,Nature 256:495中所述的那些方法。在杂交瘤方法中,小鼠、仓鼠或其他合适的宿主动物通常用免疫剂免疫以引发产生或能够

产生将特异性结合至免疫剂的抗体的淋巴细胞。替代地,可在体外对淋巴细胞进行免疫。在一些实施方案中,单克隆抗体,例如兔单克隆抗体,可使用单B细胞克隆技术产生,诸如Rashidian和Lloyd,2020,Methods Mol.Biol.2070:423-441中所述的那些技术,所述文献的内容以引用方式全部并入本文。

[0144] 免疫剂通常包括CD39多肽或其融合蛋白。通常,如果需要人来源的细胞,则使用外周血淋巴细胞("PBL"),或者如果需要非人哺乳动物来源,则使用脾细胞或淋巴结细胞。接着使用合适的融合剂(诸如聚乙二醇)将淋巴细胞与永生化细胞系融合以形成杂交瘤细胞(Goding,Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,Academic Press,(1986)第59-103页)。永生化细胞系通常为转化的哺乳动物细胞,特别是啮齿动物、牛和人来源的骨髓瘤细胞。通常,使用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。杂交瘤细胞可在合适的培养基中培养,所述培养基优选地含有一种或多种抑制未融合的永生化细胞生长或存活的物质。例如,如果亲代细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT),则用于杂交瘤的培养基通常将包含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷("HAT培养基"),所述物质会阻止HGPRT缺陷细胞的生长。

[0145] 优选的永生化细胞系为那些有效融合、支持所选抗体产生细胞稳定高水平表达抗体并且对培养基诸如HAT培养基敏感的细胞系。更优选的永生化细胞系为鼠类骨髓瘤细胞系,其可例如从Salk Institute Cell Distribution Center,San Diego,Calif.和美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),Manassas,Va.获得。人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也已经描述用于产生人单克隆抗体(Kozbor等人,1984,J.Immunol.133:3001;Brodeur等人,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,Marcel Dekker,Inc.,New York,(1987)第51-63页)。

[0146] 接着可分析培养杂交瘤细胞的培养基中是否存在针对所述多肽的单克隆抗体。优选地,由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性通过免疫沉淀或通过体外结合测定,诸如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)来测定。此类技术和测定为本领域中已知的。单克隆抗体的结合亲和力可例如通过Munson和Pollard,1980,Anal.Biochem.107:220的Scatchard分析来测定。

[0147] 在鉴定所需的杂交瘤细胞后,可通过限制稀释程序对克隆进行次克隆,并通过标准方法(Goding,同上)来生长。适合此目的的培养基包括例如杜氏改性伊戈氏培养基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)和RPMI-1640培养基。替代地,杂交瘤细胞可在哺乳动物体内作为腹水生长。

[0148] 由次克隆分泌的单克隆抗体可通过常规免疫球蛋白纯化程序,诸如蛋白A-Sepharose、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析或亲和色谱从培养基或腹水中分离或纯化。

[0149] 单克隆抗体也可通过重组DNA方法,诸如美国专利号4,816,567中所述的那些方法制得。编码本发明所涵盖的单克隆抗体的DNA可易于使用常规程序(例如,通过使用能够特异性结合至编码鼠类抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)分离和测序。本发明所涵盖的杂交瘤细胞用作此类DNA的优选地来源。分离后,可将DNA置于表达载体中,接着将其转染至宿主细胞,诸如猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或不另外产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞中,以实现单克隆抗体在重组宿主细胞中的合成。也可修饰DNA,例如,通过用人重链和轻链恒定结构域的编码序列取代同源鼠类序列(美国专利号4,816,567;Morrison等人,

同上)或通过将非免疫球蛋白多肽的全部或一部分编码序列共价接合至免疫球蛋白编码序列。此类非免疫球蛋白多肽可取代本发明所涵盖的抗体的恒定结构域,或者可取代本发明所涵盖的抗体的一个抗原结合位点的可变结构域以生成嵌合二价抗体。

[0150] b.人和人源化抗体

[0151] 本发明所涵盖的抗CD39抗体可还包括人源化抗体或人抗体。非人(例如,鼠类)抗体的人源化形式为嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(例如Fv、Fab、Fab'、$F(ab')_2$或抗体的其他抗原结合物序列),其含有衍生自非人免疫球蛋白的最小序列。人源化抗体包括其中来自接受者的互补决定区(CDR)的残基被来自非人物种(供体抗体),诸如小鼠、大鼠或兔的CDR的残基替换的具有所需特异性、亲和力和能力的人免疫球蛋白(接受者抗体)。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架残基被相应的非人残基替换。人源化抗体也可包含既不见于接受者抗体中也不见于输入的CDR或框架序列中的残基。一般而言,人源化抗体将包含实质上所有的至少一个且通常两个可变结构域,其中所有或实质上所有CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些并且所有或实质上所有FR区为人免疫球蛋白共有序列的那些。人源化抗体最佳也将包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常为人免疫球蛋白的恒定区(Jones等人,1986,Nature 321:522-525;Riechmann等人,1988,Nature 332:323-329;和Presta,1992,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596)。

[0152] 用于人源化非人抗体的方法为本领域中熟知的。通常,人源化抗体具有从非人来源引入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常是称为"输入"残基,它们通常取自"输入"可变结构域。人源化可基本上按照Winter和同事(Jones等人,1986,Nature321:522-525;Riechmann等人,1988,Nature 332:323-327;Verhoeyen等人,1988,Science 239:1534-1536)的方法,通过用啮齿动物CDR或CDR序列取代人抗体的相应序列来进行。因此,此类"人源化"抗体为嵌合抗体(美国专利号4,816,567),其中实质上少于完整的人可变结构域已由来自非人物种的相应序列取代。实际上,人源化抗体通常为人抗体,其中一些CDR残基和可能一些FR残基由来自啮齿动物抗体中的类似位点的残基取代。

[0153] 也可使用本领域已知的各种技术产生人抗体,所述技术包括噬菌体展示文库(Hoogenboom和Winter,1991,J.Mol.Biol.227:381;Marks等人,1991,J.Mol.Biol.222:581)和酵母显示(Chao等人,2006,Nat.Protoc.1(2):755-68)。Cole等人和Boerner等人的技术也可用于制备人单克隆抗体(Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,第77页(1985)和Boerner等人,1991,J.Immunol.147(1):86-95)。类似地,可通过以下方式来制得人抗体:将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物(例如其中内源性免疫球蛋白基因已部分或完全不活化的小鼠)中。攻击后,观察到人抗体的产生,此与在所有方面中人中所见的非常相似,包括基因重排、组装和抗体谱。此方法描述于例如美国专利号5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,661,016;以及以下科学出版物中:Marks等人,1992,Bio/Technology 10:779-783;Lonberg等人,1994,Nature 368:856-859;Morrison,1994,Nature 368:812-13;Fishwild等人,1996,Nature Biotechnology 14:845-51;Neuberger,1996,Nature Biotechnology14:826;Lonberg和Huszar,1995,Intern.Rev.Immunol.13:65-93。

[0154] 也可使用如上所述的已知选择和/或诱变方法使抗体亲和力成熟。优选的亲和力成熟抗体具有为制备成熟抗体的起始抗体(通常为鼠类、人源化或人)五倍、更优选10倍、甚

至更优选20或30倍大的亲和力。

[0155] c.双特异性抗体

[0156] 本文所述的抗CD39抗体包括双特异性分子。抗CD39抗体或其抗原结合部分可被衍生化或连接至另一功能性分子,例如另一肽或蛋白质(例如另一抗体或受体的配体)以生成结合至至少两个不同结合位点或靶分子的双特异性分子。本文所述的抗体实际上可被衍生化或连接至多于一种其他功能性分子以生成结合至多于两个不同结合位点和/或靶分子的多特异性分子;此类多特异性分子也旨在由本文所用的术语“双特异性分子”涵盖。为了生成本文所述的双特异性分子,本文所述的抗体可被功能性连接(例如,通过化学偶联、基因融合、非共价缔合或其他方式)至一个或多个其他结合分子,诸如另一抗体、抗体片段、肽或结合模拟物,从而产生双特异性分子。

[0157] 因此,本文提供双特异性分子,其包含至少一种对CD39的第一结合特异性和对第二靶表位的第二结合特异性。在其中双特异性分子为多特异性的本文所述的一个实施方案中,所述分子可还包括第三结合特异性。

[0158] 在某些实施方案中,本发明提供双特异性抗体,其既结合至CD39也结合至选自由以下组成的组的嗜酸性粒细胞表面抗原:Siglec-8、IL-5Rα(CD125)、IL-3Rα(CD123)、IL-4R、IL-9R、IL-13R、IL-14R、ST2(IL-33R)、PIRA、PIRB、L-选择素、EMR-1、CCR3(CD193)和CRTh2(CD294),并且优选地引起嗜酸性粒细胞耗竭,诸如通过ADCC介导和/或ADCP介导的杀伤或以优先由嗜酸性粒细胞摄取并对其有毒的抗体-药物缀合物形式。

[0159] 在其他实施方案中,双特异性抗体是由针对抗原的结合结构域产生的,这些抗原在活化的嗜酸性粒细胞(或在病变中所见的嗜酸性粒细胞)上上调,其中双特异性抗体针对不同抗原(CD39和第二抗原,两者均在嗜酸性粒细胞上表达)的亲合力提供了选择性。使用本发明的CD39结合物产生双特异性物的示例性抗原包括CD3、CD4、γδTCR、CD9、CD28、CD29、CD40、CD44、CD45、CD45RO、CD48、CD58、CD63(溶酶体相关膜蛋白3)、CD66b(CEACAM8)、CD66e(CEACAM5)、CD67、CD69、CD80、CD86、C5αR(CD88)、CD101、CD122、CD137(肿瘤坏死因子受体超家族成员9,由淋巴细胞活化所诱导,4-1BB)、CD274(程序性死亡配体1)、α_{IIb}整合素(CD41)、α2整合素(CD49b)、α4整合素(CD49d)、αL整合素(CD11a)、αM整合素(CD11b)、αX整合素(CD11c)、αD整合素、β2整合素(CD18)、氨基肽酶N(CD13)、FcαRI(CD89)、FcγRIII(CD16)、FcγRII(CD32)、FcεRII(CD23)、粒细胞单核细胞群落刺激因子Rα(CD116)、HLA-DR、细胞间粘附分子-1(CD54)、白介素(IL)-2Rα(CD25)、IL-17RA、IL-17RB、半乳凝素-3、神经肽S受体、P-选择素糖蛋白配体-1(CD162)、脑信号蛋白7A(CD108)、胸腺基质淋巴细胞生成素蛋白受体(TSLPR)、活化的αM整合素、活化的β1整合素(CD29)、活化的β2整合素、活化的FcγRII和活化的CRTh2(CD294)。所述双特异性物结合至嗜酸性粒细胞并优选地引起嗜酸性粒细胞耗竭,诸如通过ADCC介导和/或ADCP介导的杀伤或以优先由嗜酸性粒细胞摄取并对其有毒的抗体-药物缀合物形式。

[0160] 在一个实施方案中,本文所述的双特异性分子包含至少一种抗体或其抗体片段(包括例如Fab、Fab’、$F(ab')_2$、Fv或单链Fv)作为结合特异性。抗体也可为轻链或重链二聚体或其任何最小片段,诸如Fv或单链(scFv)构建体。

[0161] 双特异性分子与其特定靶标的结合可使用本领域公认的方法来确认,诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、FACS分析、生物测定(例如,生长抑制)或蛋白质

印迹测定。这些测定各自通常通过使用对感兴趣的复合物具有特异性的标记试剂(例如,抗体)来检测特别感兴趣的蛋白质-抗体复合物的存在。

[0162] 用于制备双特异性抗体的方法为本领域中已知的。传统上,双特异性抗体的重组产生是基于两个免疫球蛋白重链/轻链对的共表达,其中两条重链具有不同的特异性(Milstein和Cuello,1983,Nature305:537-539)。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(四源杂交瘤(quadromas))产生十种不同抗体分子的潜在混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。正确分子的纯化通常通过亲和色谱步骤完成。类似程序公开于1993年5月13日公开的WO 93/08829和Traunecker等人,1991,EMBO J.10:3655-3659中。

[0163] 可将具有所需结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变结构域与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。融合优选地用免疫球蛋白重链恒定结构域进行,包含铰链、CH2和CH3区中的至少一部分。含有轻链结合所必需的位点的第一重链恒定区(CH1)优选地存在于至少一个融合物中。将编码免疫球蛋白重链融合物和(如果需要)免疫球蛋白轻链的DNA插入单独的表达载体中,并共转染至合适的宿主生物体中。有关生成双特异性抗体的更多详情,参见例如Suresh等人,1986,Methods in Enzymology 121:210。

[0164] 根据WO 96/27011中描述的另一方法,一对抗体分子之间的界面可被工程化以最大化从重组细胞培养物中回收的异二聚体的百分比。优选的界面包含抗体恒定结构域的至少一部分CH3区。在此方法中,来自第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链被较大侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)替换。通过用较小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换大的氨基酸侧链,在第二抗体分子的界面上生成与大侧链相同或相似大小的补偿“空腔”。此提供一种机制,用于提高异二聚体的产率,超过其他不需要的终产物,诸如同二聚体。

[0165] 双特异性抗体可被制备成全长抗体或抗体片段(例如,$F(ab')_2$双特异性抗体)。文献中已描述了由抗体片段生成双特异性抗体的技术。例如,可使用化学键联来制备双特异性抗体。Brennan等人,1985,Science 229:81描述一种程序,其中完整抗体被蛋白水解裂解以生成$F(ab')_2$片段。这些片段在二硫醇复合剂亚砷酸钠存在下还原,以使邻位二硫醇稳定并防止分子间二硫化物形成。接着将生成的Fab'片段转化为硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。Fab'-TNB衍生物中的一种随后通过用巯基乙胺还原而重新转化为Fab'-硫醇,并与等摩尔量的另一Fab'-TNB衍生物混合以形成双特异性抗体。所产生的双特异性抗体可用作酶的选择性固定化剂。

[0166] Fab'片段可直接从大肠杆菌中回收并化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby等人,1992,J.Exp.Med.175:217-225描述完全人源化双特异性抗体$F(ab')_2$分子的产生。各Fab'片段单独由大肠杆菌分泌,并在体外进行定向化学偶联以形成双特异性抗体。

[0167] 还已描述了直接从重组细胞培养物中制备和分离双特异性抗体片段的各种技术。例如,已使用亮氨酸拉链产生双特异性抗体(Kostelny等人,1992,J.Immunol.148(5):1547-1553)。来自Fos和Jun蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合连接至两种不同抗体的Fab'部分。抗体同二聚体在铰链区被还原形成单体,接着再氧化形成抗体异二聚体。此方法还可用于产生抗体同二聚体。Hollinger等人,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448描述的“双抗体”技术提供了一种制备双特异性抗体片段的替代机制。所述片段包含通过接头与轻链可变结构域(V_L)相连的重链可变结构域(V_H),所述接头太短以致于无法在同一链上的两个结构域之间配对。因此,一个片段的V_H和V_L结构域被迫与另一片段的互补V_L和V_H结构

域配对,从而形成两个抗原结合位点。还报导了通过使用单链Fv(sFv)二聚体制备双特异性抗体片段的另一种策略。参见Gruber等人,1994,J.Immunol.152:5368。

[0168] 预期具有超过二价的抗体。作为一个非限制性实例,可以制备三特异性抗体。参见,例如Tutt等人,1991,J.Immunol.147:60。

[0169] d.异源结合抗体

[0170] 异源结合抗体还在本发明的范围内。异源结合抗体由两个共价接合的抗体构成。例如,已提出此类抗体将免疫系统细胞靶向不需要的细胞(美国专利号4,676,980),并用于治疗HIV感染(WO 91/00360;WO 92/200373;EP 03089)。预期可使用合成蛋白质化学中的已知方法(包括那些涉及交联剂的方法)在体外制备抗体。例如,可使用二硫键交换反应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。用于此目的的合适试剂的实例包括亚氨基硫醇盐和甲基-4-巯基丁酰亚氨酸酯以及例如在美国专利号4,676,980中公开的那些。

[0171] e.效应子功能工程化

[0172] 可能需要关于效应子功能修饰本发明所涵盖的抗体,以便进一步提高例如抗CD39抗体在耗竭嗜酸性粒细胞中的有效性。例如,可将半胱氨酸残基引入Fc区中,从而允许在此区域形成链间二硫键。由此生成的同二聚抗体可具有改善的内化能力、增强的补体介导的细胞杀伤、改善的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和/或改善的抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。参见Caron等人,1992,J.Exp Med.176:1191-1195和Shopes,1992,J.Immunol.,148:2918-2922。

[0173] f.代表性抗CD39抗体序列

[0174] 在某些实施方案中,抗CD39抗体为完全人抗体,诸如由人抗体文库生成的。示例性完全人抗CD39抗体为克隆PEOWT22,其重链和轻链可变结构域(VH和VL)序列提供如下:

[0175]

	核酸序列	氨基酸序列
VH结构域	SEQ ID No.1(VH)	SEQ ID No.2(VH)
VL结构域	SEQ ID No.3(VL)	SEQ ID No.4(VL)

[0176] 对于PEOWT22克隆,VH和VL结构域各自的CDR为:

[0177]

	CDR1	CDR2	CDR3
VH	SEQ ID No.29	SEQ ID No.30	SEQ ID No.31
VL	SEQ ID No.32	SEQ ID No.33	SEQ ID No.34

[0178] 利用上述VH和VL结构域的示例性全长抗体和示例性单链抗体(scFV)的序列提供如下:

[0179]

	核酸序列	氨基酸序列
全长重链	SEQ ID No.35	SEQ ID No.36
全长轻链	SEQ ID No.37	SEQ ID No.38
scFV	SEQ ID No.39	SEQ ID No.40

[0180] 在一些实施方案中,抗CD39抗体或其抗原结合片段包含至少一个重链可变结构域,其与SEQ ID No.2至少60%相同并且甚至更优选与SEQ ID No.2至少65%、70%、75%、80%、85%或甚至90%相同,并且能够特异性结合人CD39。

[0181] 在一些实施方案中,抗CD39抗体或其抗原结合片段包含至少一个轻链可变结构

域,其与SEQ ID No.4至少60%相同并且甚至更优选与SEQ ID No.4至少65%、70%、75%、80%、85%或甚至90%相同,并且能够特异性结合人CD39。

[0182] 在某些实施方案中,抗CD39抗体为人源化抗体,其包含VH结构域,所述VH结构域具有与SEQ ID No.29、30和31所示的VH结构域的CDR以及SEQ ID No.32、33和34所示的相应VL结构域的CDR相关的人框架序列。CDR优选地相同,但可在各CDR上相差1、2或3个氨基酸,只要所得抗体特异性结合人CD39即可。

[0183] 在某些实施方案中,抗CD39抗体的重链和轻链具有可由核酸编码的可变结构域,所述核酸与SEQ ID No.1(VH)和SEQ ID No.3(VL)所示的VH和VL结构域(相应)编码序列相同或在严格条件下(诸如在45℃下6x氯化钠/柠檬酸钠(SSC),和在50-65℃下在0.2x SSC/0.1%SDS中洗涤)与所述序列杂交。

[0184] 在一些实施方案中,抗CD39抗体在兔中生成,并且这些抗体的重链和轻链的可变结构域为兔序列,而恒定结构域为人序列。兔抗CD39抗体的VH和VL结构域的示例性序列为:

[0185]

克隆	核酸序列	氨基酸序列	CDR序列
PEO18	SEQ ID No. 5 (VH) SEQ ID No. 7 (VL)	SEQ ID No. 6 (VH) SEQ ID No. 8 (VL)	SEQ ID No. 6 (VH) CDRs CDR1: GFSLSAYG CDR2: IYSSGRT CDR3: ARSRAGISSGDGFDS SEQ ID No. 8 (VL) CDRs CDR1: QNIYSN CDR2: RAS CDR3: QQGFDSSNIDNT
PEO19	SEQ ID No. 9 (VH) SEQ ID No. 11 (VL)	SEQ ID No. 10 (VH) SEQ ID No. 12 (VL)	SEQ ID No. 10 (VH) CDRs CDR1: GFSLSKSI CDR2: IGSSGST CDR3: ARGLLYSGNKS SEQ ID No. 12 (VL) CDRs CDR1: QSVLLNNQ CDR2: DAS CDR3: LGGYSGNLYA
PEO20	SEQ ID No. 13 (VH) SEQ ID No. 15 (VL)	SEQ ID No. 14 (VH) SEQ ID No. 16 (VL)	SEQ ID No. 14 (VH) CDRs CDR1: GFSLSSYA CDR2: INSYGTT CDR3: ARGDSYGSGVGLGL SEQ ID No. 16 (VL) CDRs CDR1: QNIYSN CDR2: RAS CDR3: QQGFSSNNVDNT
PEO21	SEQ ID No. 17 (VH) SEQ ID No. 19 (VL)	SEQ ID No. 18 (VH) SEQ ID No. 20 (VL)	SEQ ID No. 18 (VH) CDRs CDR1: GFSLSSYA CDR2: ISSSGST CDR3: ARDRVIYSIGPYYFNL SEQ ID No. 20 (VL) CDRs CDR1: EIIYSN CDR2: GAS CDR3: QQSFSSNNVGNI
PEO23	SEQ ID No. 21 (VH)	SEQ ID No. 22 (VH)	SEQ ID No. 22 (VH) CDRs CDR1: GFSLSTHA

[0186]

	SEQ ID No. 23 (VL)	SEQ ID No. 24 (VL)	CDR2: TYASGRT CDR3: ARNGADETFYYFDL SEQ ID No. 24 (VL) CDRs CDR1: QNINTW CDR2: RAS CDR3: QQYDASINIDNA
PEO24	SEQ ID No. 25 (VH) SEQ ID No. 27 (VL)	SEQ ID No. 26 (VH) SEQ ID No. 28 (VL)	SEQ ID No. 26 (VH) CDRs CDR1: GIDLSSNA CDR2: IRNNDIT CDR3: ARGGGSYSIVFWNL SEQ ID No. 28 (VL) CDRs CDR1: ERIYSN CDR2: YAS CDR3: QQGYSNNNVDNT
PEO25	SEQ ID No. 41 (VH) SEQ ID No. 43 (VL)	SEQ ID No. 42 (VH) SEQ ID No. 44 (VL)	SEQ ID No. 42 (VH) CDRs CDR1: GIDLSNNA CDR2: IRSSGST CDR3: ARGGGSYSIVFWNL SEQ ID No. 44 (VL) CDRs CDR1: ERIYSN CDR2: YTS CDR3: QQGYSSSNVDNT

[0187] 在一些实施方案中,在兔中生成抗CD39抗体,接着通过CDR移植将其人源化。兔抗CD39抗体的VH和VL结构域的示例性序列为:

[0188]

克隆	核酸序列	氨基酸序列	CDR 序列
人源化 PEO20	SEQ ID No. 45 (VH) SEQ ID No. 47 (VL)	SEQ ID No. 46 (VH) SEQ ID No. 48 (VL)	SEQ ID No. 46 (VH) CDRs CDR1: GFSLSSYA CDR2: INSYGTT CDR3: ARGDSYGSGVGLGL SEQ ID No. 48 (VL) CDRs CDR1: QNIYSN CDR2: RAS CDR3: QQGFSSNNVDNT
人源化 PEO19	SEQ ID No. 49 (VH) SEQ ID No. 51 (VL)	SEQ ID No. 50 (VH) SEQ ID No. 52 (VL)	SEQ ID No. 50 (VH) CDRs CDR1: GFSLSKSI CDR2: IGSSGST CDR3: ARGLLYSGNKS SEQ ID No. 52 (VL) CDRs CDR1: QSVLLNNQ CDR2: DAS CDR3: LGGYSGNLYA
人源化 PEO21	SEQ ID No. 53 (VH) SEQ ID No. 55 (VL)	SEQ ID No. 54 (VH) SEQ ID No. 56 (VL)	SEQ ID No. 54 (VH) CDRs CDR1: GFSLSSYA CDR2: ISSSGST CDR3: ARDRVIYSIGPYYFNL

[0189]

			SEQ ID No. 56 (VL) CDRs CDR1: EIIYSN CDR2: GAS CDR3: QQSFSSNNVGNI

[0190] 在一些实施方案中,本文提供的抗CD39抗体促进:(i)当与HCC1739BL细胞孵育时,稳定的免疫复合物的形成,其特征为24小时后免疫复合物损失小于30%,任选地其中使用荧光标记的二次抗体通过荧光强度来检测免疫复合物的形成;(ii)针对CD39+细胞的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和/或抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)活性;(iii)CD39+嗜酸性粒细胞的耗竭;(iv)结合至具有选自图30中所列的CD39氨基酸表位序列的组的序列的CD39表位(例如,结合一个或多个线性或构形CD39表位,诸如选自由以下组成的组:1)IYLTDCMERAR,2)LRMESEELADR,3)RVKGPGISKFV,4)DCMERAREVIPR,5)LTDCMERAREVIPR,6)SLSNYPFDFQGAR,7)CRVKGPGISKF,8)GAYGWITINYLLGKFSQK,9)ILRDPCFHPGYKK和其任何组合,诸如RVKGPGISKFV与DCMERAREVIPR、LTDCMERAREVIPR与SLSNYPFDFQGAR、或CRVKGPGISKF、GAYGWITINYLLGKFSQK和ILRDPCFHPGYKK的任何组合);和/或(v)以与结合至CD39的单克隆抗体克隆A1非竞争性或仅部分竞争性的方式结合至CD39。

[0191] 上述代表性抗CD39抗体序列根据序列标识号对应如下:

[0192] SEQ ID No.1(克隆PEOWT22 vH核酸序列)

```
gag gtg caa ctg gtg gag tct ggg gga ggt gtg gta agg cct ggg ggg        48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat        96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

gct atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg       144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

gca gtt ata tca tat gat gta agc aat aaa tac tac gca gac tcc gtg       192
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Val Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
```

[0193]

```
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat       240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt       288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcg aga tct tac tac tac tac tac ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg       336
Ala Arg Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

acc acg gtc acc gtc tcc tca                                          357
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115
```

[0194] SEQ ID No.2(克隆PEOWT22 vH氨基酸序列)

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Val Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
```

[0195]

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
        115
```

[0196] SEQ ID No.3(克隆PEOWT22 vL结构域核酸序列)

```
gat gtt gtg atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga          48
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agg tac          96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Tyr
            20                  25                  30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc         144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gtc agg ttc agt ggc         192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Val Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag cca         240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80

gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag ttt ggt agg tca cct cgg         288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Gly Arg Ser Pro Arg
                85                  90                  95

acg ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa                            321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

[0197]

[0198] SEQ ID No.4(克隆PEOWT22 vL结构域氨基酸序列)

```
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Tyr
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45
```

[0199]

```
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Val Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Gly Arg Ser Pro Arg
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

[0200] SEQ ID No.5(克隆PE018 vH结构域核酸序列)

```
cag tca gtg aag gag gcc ggg ggt cgc ctg gta acg cct gga gga tcc   48
Gln Ser Val Lys Glu Ala Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Gly Ser
1               5                  10                  15

ctg aca ctc acc tgc aca gtc tct gga ttc tcc ctc agt gcg tat gga   96
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr Gly
            20                  25                  30

ata agt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag gga ctg gaa tgg atc gga  144
Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
        35                  40                  45

atc att tat agt agt ggt agg act tac tac gcg aac tgg gcg aaa ggc  192
Ile Ile Tyr Ser Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
    50                  55                  60
```

[0201]

```
cga ttc acc atc tcc aaa acc tcg tcg acc acg gtg gat ctg aaa atg  240
Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met
65                  70                  75                  80

acc agt ctg aca acc gag gac acg gcc gcc tat ttc tgt gcc aga tca  288
Thr Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Phe Cys Ala Arg Ser
                85                  90                  95

cgg gct ggt att agt agt ggt gat ggt ttt gat tcc tgg ggc cca ggc  336
Arg Ala Gly Ile Ser Ser Gly Asp Gly Phe Asp Ser Trp Gly Pro Gly
            100                 105                 110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca                                     357
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

[0202] SEQ ID No.6(克隆PE018 vH结构域氨基酸序列)

```
Gln Ser Val Lys Glu Ala Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Gly Ser
1               5                   10                  15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ala Tyr Gly
            20                  25                  30

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
        35                  40                  45

Ile Ile Tyr Ser Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
    50                  55                  60
```

[0203]

```
Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met
65                  70                  75                  80

Thr Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Ala Tyr Phe Cys Ala Arg Ser
                85                  90                  95

Arg Ala Gly Ile Ser Ser Gly Asp Gly Phe Asp Ser Trp Gly Pro Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

[0204] SEQ ID No.7(克隆PE018 vL结构域核酸序列)

```
gcc ctt gtg atg acc cag act cca tcc tcc gtg tct gca gct gtg gga
48
Ala Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1               5                   10                  15

ggc aca gtc acc atc aat tgc cag gcc agt cag aac att tac agc aat
96
Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Ser Asn
            20                  25                  30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg cag cgt ccc cag ctc ctg atc
144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Gln Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tac agg gca tcc act ctg gca tct ggg gtc cca tcg cgg ttc aaa ggc
192
```

[0205]

```
Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
    50                  55                  60

agt gca tct ggg aca gaa tac act ctc acc atc agc ggt gtg cag tgt
240
Ser Ala Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys
65                  70                  75                  80

gac gat gct gcc act tac tat tgt caa cag ggt ttt gat agt agt aac
288

Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Phe Asp Ser Ser Asn
                85                  90                  95

att gat aat act ttc ggc gga ggg acc gag gtg gtg gtc aca
330
Ile Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Thr
            100                 105                 110
```

[0206] SEQ ID No.8(克隆PE018 vL结构域氨基酸序列)

```
Ala Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1               5                  10                  15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Ser Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Gln Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
    50                  55                  60

Ser Ala Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys
65                  70                  75                  80

Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Phe Asp Ser Ser Asn
                85                  90                  95

Ile Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Thr
            100                 105                 110
```

[0207]

[0208] SEQ ID No.9(克隆PE019 vH结构域核酸序列)

```
cag tcg gtg gag gag tcc ggg ggt cgc ctg gtc acg cct ggg aca cac        48
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr His
1               5                  10                  15

ctg aca ctc acc tgc aca gtc tct gga ttc tcc ctc agt aag agt ata        96
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys Ser Ile
            20                  25                  30

ata agt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gaa tac atc gga       144
Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
        35                  40                  45

atc att ggt agt agt ggt agc aca tac tac gcg aac tgg gcg aaa ggc       192
Ile Ile Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
    50                  55                  60
```

[0209]

```
cga ttc acc atc tcc aaa acc tcg tcg acc acg gtg gat ctg aga atg       240
Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu Arg Met
65                  70                  75                  80

acc agt ctg aca ccc gag gac acg gcc acc tat ttc tgt gcc aga gga       288
Thr Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly
                85                  90                  95

ctt ctt tat tct ggt aat aaa tcg tgg ggc ccg ggc acc ctg gtc acc       336
Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Lys Ser Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr
            100                 105                 110

gtc tcc tca                                                          345
Val Ser Ser
        115
```

[0210] SEQ ID No.10(克隆PE019 vH结构域氨基酸序列)

```
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr His
1               5                  10                  15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys Ser Ile
            20                  25                  30

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
        35                  40                  45

Ile Ile Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
    50                  55                  60
```

[0211]

```
Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu Arg Met
65                  70                  75                  80

Thr Ser Leu Thr Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly
                85                  90                  95

Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Lys Ser Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr
            100                 105                 110

Val Ser Ser
        115
```

[0212] SEQ ID No.11(克隆PE019 vL结构域核酸序列)

```
gcc att gat atg acc cag act cca tcc tcc gtg tct gca gct gtg gga
48
Ala Ile Asp Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1               5                  10                  15

ggc aca gtc acc atc aac tgc cag tcc agt cag agt gtt tta ctg aac
96
Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Leu Leu Asn
            20                  25                  30

aac caa tta tcc tgg ttt cag cag aaa cca ggg cag cct ccc aag ctc
144
Asn Gln Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
        35                  40                  45

ctg atc tat gat gca tcc act ctg gaa tct ggg gtc cca tct cgg ttc
192
Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
    50                  55                  60

aca ggc agt gga tct ggg aca cag ttc act ctc acc atc agc gac ctg
240
Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu
65                  70                  75                  80

gag tgt gac gat gct gcc act tac tat tgt tta ggc ggt tat agt ggg
288
Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Ser Gly
                85                  90                  95

aac ctt tat gct ttc ggc gga ggg acc gag gtg cta gtc aaa
330
Asn Leu Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Leu Val Lys
            100                 105                 110
```

[0213]

[0214] SEQ ID No.12(克隆PE019 vL结构域氨基酸序列)

```
Ala Ile Asp Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
1               5                  10                  15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Leu Leu Asn
            20                  25                  30

Asn Gln Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
        35                  40                  45

Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
    50                  55                  60

Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu
65                  70                  75                  80

Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Ser Gly
                85                  90                  95

Asn Leu Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Leu Val Lys
            100                 105                 110
```

[0215]

[0216] SEQ ID No.13(克隆PE020 vH结构域核酸序列)

```
cag tcg gtg gag gag tcc ggg ggt cgc ctg gtc acg cct ggg aca ccc        48
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1               5                   10                  15

ctg aca ctc acc tgc aca gtc tct gga ttc tcc ctc agt agc tat gca        96
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
            20                  25                  30

ata agt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctc gaa tat atc gcg       144
Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Ala
        35                  40                  45

atc att aat agt tat ggt acc aca tac tac gcg agc tgg gcg aaa ggc       192
Ile Ile Asn Ser Tyr Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
    50                  55                  60
```

[0217]

```
cga gtc acc atc tcc aaa acc tcg agc acg gtg gat ctg aaa atc tcc       240
Arg Val Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Val Asp Leu Lys Ile Ser
65                  70                  75                  80

agt ccg aca acc gag gac acg gcc acc tat ttc tgt gcc aga ggc gat       288
Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Asp
                85                  90                  95

agt tat ggt agt ggt gtt ggt ttg ggc ttg tgg ggc cca ggc acc ctg       336
Ser Tyr Gly Ser Gly Val Gly Leu Gly Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu
            100                 105                 110

gtc acc gtc tcc tca                                                   351
Val Thr Val Ser Ser
        115
```

[0218] SEQ ID No.14(克隆PE020 vH结构域氨基酸序列)

```
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1               5                   10                  15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
            20                  25                  30

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Ala
        35                  40                  45

Ile Ile Asn Ser Tyr Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
    50                  55                  60
```

[0219]

```
Arg Val Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Val Asp Leu Lys Ile Ser
65                  70                  75                  80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Asp
                85                  90                  95

Ser Tyr Gly Ser Gly Val Gly Leu Gly Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu
            100                 105                 110

Val Thr Val Ser Ser
        115
```

[0220] SEQ ID No.15(克隆PE020 vL结构域核酸序列)

```
gcc tat gat atg acc cag act cca gcc tct gtg gag gta gct gtg gga
48
Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly
1               5                   10                  15

ggc aca gtc acc atc aag tgc cag gcc agt cag aac att tac agc aat
96
Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Ser Asn
            20                  25                  30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg cag cgt ccc aag ctc ctg atc
144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tac agg gca tcc agt ctg gca tct ggg gtc ccg tcg cgg ttc agt ggc
192
Tyr Arg Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agt gga tct ggg aca gag ttc act ctc acc atc agc ggt gtg cag tgt
240
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys
65                  70                  75                  80

gac gat gct gcc act tac tac tgt caa cag ggt ttt agt agt aat aat
288
Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Phe Ser Ser Asn Asn
                85                  90                  95

gtt gat aat act ttc ggc gga ggg acc gag gtg gtg gtc aaa
330
Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
            100                 105                 110
```

[0221]

[0222] SEQ ID No.16(克隆PE020 vL结构域氨基酸序列)

```
Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly
1               5                   10                  15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Ser Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
```

[0223]

```
Tyr Arg Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys
65                  70                  75                  80

Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Phe Ser Ser Asn Asn
                85                  90                  95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
            100                 105                 110
```

[0224] SEQ ID No.17(克隆PE021 vH结构域核酸序列)

```
cag tcg gtg gag gag tcc ggg ggt cgc ctg gtc acg cct ggg aca ccc        48
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1               5                  10                  15

ctg aca ctc acc tgc acc gtc tcc gga ttc tcc ctc agt agc tat gca        96
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
            20                  25                  30

atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gaa tac atc gga       144
Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
        35                  40                  45

atc att agt agt agt ggt agc aca tac tac gcg agc tgg gcg aaa ggc       192
Ile Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
    50                  55                  60
```

[0225]

```
cga ttc acc atc tcc aaa acc tcg acc acg gtg gat ctg aaa atc tcc       240
Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Ser
65                  70                  75                  80

agt ccg aca acc gag gac acg gcc acc tat ttc tgt gcc aga gat cgt       288
Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Arg
                85                  90                  95

gtt att tat agt att ggt ccg tat tat ttt aat ttg tgg ggc cca ggc       336
Val Ile Tyr Ser Ile Gly Pro Tyr Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Pro Gly
            100                 105                 110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca                                           357
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

[0226] SEQ ID No.18(克隆PE021 vH结构域氨基酸序列)

```
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1               5                  10                  15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
            20                  25                  30

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
        35                  40                  45

Ile Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
    50                  55                  60
```

[0227]

```
Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Ser
65                  70                  75                  80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Arg
                85                  90                  95

Val Ile Tyr Ser Ile Gly Pro Tyr Tyr Phe Asn Leu Trp Gly Pro Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

[0228] SEQ ID No.19(克隆PE021 vL结构域核酸序列)

```
gcc tat gat atg acc cag act cca tcc tcc gtg tct gca act gtg gga
48
Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Thr Val Gly
1               5                  10                  15

ggc aca gtc acc atc aat tgc cag gcc agt gag atc att tat agc aat
96
Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Ser Asn
            20                  25                  30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg cag cct ccc aag ctc ctg atc
144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tat ggc gca tcc act ctg gca tct ggg gtc cca tcg cgg ttc aaa ggc
192
Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
    50                  55                  60

agt gga tct ggg aca gag tac act ctc acc atc agc gac ctg cag tgt
240
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Gln Cys
65                  70                  75                  80

gac gat gct gcc act tac tac tgt caa cag agt ttt agt agt aat aat
288
Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Ser Ser Asn Asn
                85                  90                  95

gtt ggg aat att ttc ggc gga ggg acc gag gtg gtg gtc aaa
330
Val Gly Asn Ile Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
            100                 105                 110
```

[0229]

[0230] SEQ ID No.20(克隆PE021 vL结构域氨基酸序列)

```
Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Thr Val Gly
1               5                  10                  15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Ser Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Gln Cys
65                  70                  75                  80

Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Ser Ser Asn Asn
                85                  90                  95

Val Gly Asn Ile Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
            100                 105                 110
```

[0231]

[0232] SEQ ID No.21(克隆PE023 vH结构域核酸序列)

```
cag tcg gtg gag gag tcc ggg ggt cgc ctg gtc acg cct ggg aca ccc          48
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1               5                   10                  15

ctg aca ctc acc tgc aca gcc tct gga ttc tcc ctc agt acc cat gca          96
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr His Ala
            20                  25                  30

ata aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gaa tgg atc ggg         144
Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
        35                  40                  45

atc act tat gct agt ggt agg aca tat tac gcg agc tgg gcg aaa ggc         192
Ile Thr Tyr Ala Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
    50                  55                  60
```

[0233]

```
cga ttc acc atc tcc aaa acc tcg acc acg gtg gat ctg aaa atc acc         240
Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
65                  70                  75                  80

agt ccg aca acc gag gac acg gcc acc tat ttc tgt gcc aga aat ggg         288
Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asn Gly
                85                  90                  95

gct gat gaa aca ttt tac tac ttt gac ttg tgg ggc cca ggc acc ctg         336
Ala Asp Glu Thr Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu
            100                 105                 110

gtc acc gtc tcc tca                                                    351
Val Thr Val Ser Ser
        115
```

[0234] SEQ ID No.22(克隆PE023 vH结构域氨基酸序列)

```
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1               5                   10                  15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr His Ala
            20                  25                  30

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
        35                  40                  45

Ile Thr Tyr Ala Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
    50                  55                  60
```

[0235]

```
Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
65                  70                  75                  80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asn Gly
                85                  90                  95

Ala Asp Glu Thr Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu
            100                 105                 110

Val Thr Val Ser Ser
        115
```

[0236] SEQ ID No.23(克隆PE023 vL结构域核酸序列)

```
gcc tat gat atg acc cag act cca gcc tcc gtg gag gca gct gtg gga
48
Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Ala Ala Val Gly
1               5                  10                  15

ggc aca gtc acc atc aag tgc cag gcc agt cag aat att aat act tgg
96
Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Asn Thr Trp
            20                  25                  30

tta tcc tgg tat cag cag aag gca ggg cag cct ccc aag ctc ctg atc
144
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tac agg gca tcc act ctg gca tct ggg gtc tca tcg cgg ttc aaa ggc
192
Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
    50                  55                  60

agt gga tct ggg aca cag ttc act ctc acc atc agc ggc gtg gag tgt
240

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys
65                  70                  75                  80

gcc gat gct gcc act tac tac tgt caa caa tat gat gct agt att aat
288
Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ala Ser Ile Asn
                85                  90                  95

att gat aat gct ttc ggc gga ggg acc gag gtg gtg gtc aaa
330
Ile Asp Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
            100                 105                 110
```

[0237]

[0238] SEQ ID No.24(克隆PE023 vL结构域氨基酸序列)

```
Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Ala Ala Val Gly
1               5                  10                  15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Asn Thr Trp
            20                  25                  30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys
65                  70                  75                  80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ala Ser Ile Asn
                85                  90                  95

Ile Asp Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
            100                 105                 110
```

[0239]

[0240] SEQ ID No.25(克隆PE024 vH结构域核酸序列)

```
cag tcg gtg gag gag tcc ggg ggt cgc ctg gtc acg cct ggg aca ccc   48
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1               5                  10                  15

ctg aca ctc acc tgc aca gtc tct gga atc gac ctc agt agc aat gca   96
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Asn Ala
            20                  25                  30

atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gaa tat atc gga  144
Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
        35                  40                  45

att att agg aat aat gat atc aca tac tac gcg agc tgg gcg aaa ggc  192
Ile Ile Arg Asn Asn Asp Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
    50                  55                  60
```

[0241]

```
cga ttc acc atc tcc aaa acc tcg acc acg gtg gat ctg ata atc acc  240
Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Ile Ile Thr
65                  70                  75                  80

agt ccg aca acc gag gac acg gcc acc tat ttc tgt gcc aga ggg ggt  288
Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly
                85                  90                  95

ggt tct tac agt att gtc ttc tgg aac tta tgg ggc cca ggc acc ctg  336
Gly Ser Tyr Ser Ile Val Phe Trp Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu
            100                 105                 110

gtc acc gtc tcc tca                                             351
Val Thr Val Ser Ser
        115
```

[0242] SEQ ID No.26(克隆PE024 vH结构域氨基酸序列)

```
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1               5                  10                  15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Asn Ala
            20                  25                  30

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
        35                  40                  45

Ile Ile Arg Asn Asn Asp Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
    50                  55                  60
```

[0243]

```
Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Ile Ile Thr
65                  70                  75                  80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly
                85                  90                  95

Gly Ser Tyr Ser Ile Val Phe Trp Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu
            100                 105                 110

Val Thr Val Ser Ser
        115
```

[0244] SEQ ID No.27(克隆PEO24 vL结构域核酸序列)

```
gcc tat gat atg acc cag act cca gcc tct gtg gag gta gct gtg gga
48
Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly
1               5                   10                  15

ggc aca gtc acc atc aat tgc cag gcc agt gag agg att tat agc aat
96
Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Arg Ile Tyr Ser Asn
            20                  25                  30

tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg cag cgt ccc aaa ctc ctg atc
144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tat tat gca tcc act ctg gca tct ggg gtc tca tcg cgg ttc aaa ggc
192
Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
    50                  55                  60

agt gga tct ggg aca cag ttc act ctc acc atc agc ggc gtg cag tgt
240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys
65                  70                  75                  80

gcc gat gct gcc act tac tac tgt cag cag ggt tat agt aat aat aat
288
Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ser Asn Asn Asn
                85                  90                  95

gtt gac aat act ttc ggc gga ggg acc gag gtg gtg gtc aga
330
Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Arg
            100                 105                 110
```

[0245]

[0246] SEQ ID No.28(克隆PEO24 vL结构域氨基酸序列)

```
Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly
1               5                   10                  15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Arg Ile Tyr Ser Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys
65                  70                  75                  80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ser Asn Asn Asn
                85                  90                  95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Arg
            100                 105                 110
```

[0247]

[0248] SEQ ID No.29(克隆PEOWT22 vH结构域CDR1氨基酸序列)

[0249]
```
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1               5
```

[0250] SEQ ID No.30(克隆PEOWT22 vH结构域CDR2氨基酸序列)

[0251]
```
Ile Ser Tyr Asp Val Ser Asn Lys
1               5
```

[0252] SEQ ID No.31(克隆PEOWT22 vH结构域CDR3氨基酸序列)

[0253]
```
Ala Arg Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1               5                   10
```

[0254] SEQ ID No.32(克隆PEOWT22 vL结构域CDR1氨基酸序列)

[0255]
```
Gln Ser Ile Ser Arg Tyr
1               5
```

[0256] SEQ ID No.33(克隆PEOWT22 vL结构域CDR2氨基酸序列)

[0257]
```
Asp Ala Ser
1
```

[0258] SEQ ID No.34(克隆PEOWT22 vL结构域CDR3氨基酸序列)

[0259]
```
Gln Gln Phe Gly Arg Ser Pro Arg Thr
1               5
```

[0260] SEQ ID No.35(克隆PEOWT22全长vH链核酸序列)

```
gag gtg caa ctg gtg gag tct ggg gga ggt gtg gta agg cct ggg ggg          48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat          96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

gct atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg         144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
```

[0261]
```
gca gtt ata tca tat gat gta agc aat aaa tac tac gca gac tcc gtg         192
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Val Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat         240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt         288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

gcg aga tct tac tac tac tac tac ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg         336
Ala Arg Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
```

```
                100                 105                 110

acc acg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc act aag ggc cca tcc gtg ttc        384
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125

cca ctg gca ccc tct agt aag agc aca tct ggg ggt act gcc gct ctg        432
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

gga tgt ctg gtg aag gat tac ttc cca gag cca gtc acc gtg tcc tgg        480
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

aac agc ggg gcc ctg act tcc ggt gtc cat acc ttt cca gct gtg ctg        528
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

cag tca tcc ggc ctg tac agc ctg agc tct gtg gtc acc gtc ccc agt        576
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

tca tcc ctg gga aca cag act tat atc tgc aac gtg aat cac aag cca        624
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

tcc aat aca aaa gtc gac aag aaa gtg gaa ccc aag agc tgt gat aaa        672
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

[0262] acc cat aca tgc ccc cct tgt cct gct cca gag ctg ctg gga gga cca  720
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

tcc gtg ttc ctg ttt cca ccc aag cct aaa gac act ctg atg att tct        768
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

cga acc ccc gaa gtc aca tgc gtg gtc gtg gac gtg tcc cac gag gat        816
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

cct gaa gtc aag ttc aac tgg tac gtg gat ggc gtc gag gtg cat aat        864
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

gcc aag aca aaa cca cga gag gaa cag tac aac agt acc tat cgt gtc        912
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

gtg tca gtc ctg aca gtg ctg cac cag gac tgg ctg aac ggg aag gaa        960
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

tat aag tgc aaa gtg agc aat aag gca ctg ccc gcc cct atc gag aaa       1008
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

aca att tct aag gct aaa gga cag cct agg gaa cca cag gtg tac act       1056
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350
```

```
ctg cct cca tca cgg gac gag ctg aca aag aac cag gtc agt ctg act       1104
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

tgt ctg gtg aaa ggg ttc tat cct tct gat atc gcc gtg gag tgg gaa       1152
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

agt aat ggt cag cca gag aac aat tac aag acc aca ccc cct gtc ctg       1200
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400
```

[0263]

```
gac tct gat ggg agt ttc ttt ctg tat tcc aag ctg acc gtg gat aaa       1248
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

agc cgg tgg cag cag ggt aat gtc ttt agt tgt tca gtg atg cac gag       1296
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

gca ctg cac aat cac tac acc cag aaa tca ctg tca ctg tca cca ggt       1344
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        435                 440                 445

aaa tga                                                              1350
Lys
```

[0264] SEQ ID No.36(克隆PEOWT22全长vH链氨基酸序列)

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Val Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
```

[0265]

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
        115                 120                 125
```

```
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240
```

[0266]

```
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365
```

```
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415
```

[0267]

```
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
        435                 440                 445

Lys
```

[0268] SEQ ID No.37(克隆PEOWT22全长vL链核酸序列)

```
gat gtt gtg atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga          48
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agg tac          96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Tyr
            20                  25                  30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc         144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gtc agg ttc agt ggc         192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Val Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag cca         240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80

gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag ttt ggt agg tca cct cgg         288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Gly Arg Ser Pro Arg
                85                  90                  95

acg ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa cga act gtg gct gca         336
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga         384
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc         432
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140
```

[0269]

```
aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag        480
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc        528
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac        576
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc        624
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

ttc aac agg gga gag tgt tag                                           645
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

[0270]

[0271] SEQ ID No.38(克隆PEOWT22全长vL链氨基酸序列)

```
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Tyr
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Val Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80
```

[0272]

```
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Gly Arg Ser Pro Arg
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160
```

```
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190
```

[0273]

```
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

[0274] SEQ ID No.39(克隆PEOWT22 scFv核酸序列)

```
gat gtt gtg atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga          48
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agg tac          96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Tyr
            20                  25                  30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc         144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gtc agg ttc agt ggc         192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Val Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag cca         240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80
```

[0275]

```
gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag ttt ggt agg tca cct cgg         288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Gly Arg Ser Pro Arg
                85                  90                  95

acg ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa ggc gga tcc tct agg         336
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser Ser Arg
            100                 105                 110

tca agt tcc agc ggc ggc ggt ggc agc gga ggc ggc ggt gag gtg caa         384
Ser Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln
        115                 120                 125

ctg gtg gag tct ggg gga ggt gtg gta agg cct ggg ggg tcc ctg aga         432
Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Arg
    130                 135                 140

ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat gct atg cac         480
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His
145                 150                 155                 160
```

```
tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca gtt ata        528
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile
                165                 170                 175

tca tat gat gta agc aat aaa tac tac gca gac tcc gtg aag ggc cga        576
Ser Tyr Asp Val Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
            180                 185                 190

ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat ctg caa atg        624
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
        195                 200                 205
```

[0276]

```
aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aga tct        672
Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser
    210                 215                 220

tac tac tac tac tac ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc        720
Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
225                 230                 235                 240

acc gtc tcc tca                                                       732
Thr Val Ser Ser
```

[0277] SEQ ID No.40(克隆PEOWT22 scFv氨基酸序列)

```
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Tyr
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Val Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
```

[0278]

```
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Gly Arg Ser Pro Arg
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser Ser Arg
            100                 105                 110

Ser Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln
        115                 120                 125

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly Ser Leu Arg
    130                 135                 140
```

```
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met His
145                 150                 155                 160

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile
                165                 170                 175

Ser Tyr Asp Val Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
            180                 185                 190
```

[0279]

```
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
        195                 200                 205

Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser
    210                 215                 220

Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
225                 230                 235                 240

Thr Val Ser Ser
```

[0280] SEQ ID No.41(克隆PE025 vH结构域核酸序列)

```
cag tcg gtg gag gag tcc ggg ggt cgc ctg gtc acg cct ggg aca ccc        48
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1               5                   10                  15

ctg aca ctc acc tgc aca gtc tct gga atc gac ctc agt aac aat gca        96
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Asn Ala
            20                  25                  30

atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gaa tat atc gga       144
Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
        35                  40                  45

atc att agg agt agt ggt agt aca tat tac gcg aac tgg gca aaa ggc       192
Ile Ile Arg Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
    50                  55                  60
```

[0281]

```
cgg ttc acc atc tcc aaa acc tcg acc acg gtg gat ctg ata atc acc       240
Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Ile Ile Thr
65                  70                  75                  80

agt ccg aca acc gag gac acg gcc acc tat ttc tgt gcc aga ggg ggt       288
Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly
                85                  90                  95

ggt tct tac agt att gtc ttc tgg aac ttg tgg ggc cca ggc acc ctg       336
Gly Ser Tyr Ser Ile Val Phe Trp Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu
            100                 105                 110

gtc acc gtc tcc tca                                                   351
Val Thr Val Ser Ser
        115
```

[0282] SEQ ID No.42(克隆PE025 vH结构域氨基酸序列)

```
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
1               5                   10                  15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Asn Asn Ala
            20                  25                  30

Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
        35                  40                  45

Ile Ile Arg Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
    50                  55                  60
```

[0283]

```
Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Ile Ile Thr
65                  70                  75                  80

Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly
                85                  90                  95

Gly Ser Tyr Ser Ile Val Phe Trp Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu
            100                 105                 110

Val Thr Val Ser Ser
        115
```

[0284] SEQ ID No.43(克隆PE025 vL结构域核酸序列)

```
gcc tat gat atg acc cag act cca gcc tct gtg gag gta gct gtg gga
48
Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly
1               5                   10                  15

ggc aca gtc acc atc aat tgc cag gcc agt gag agg att tat agc aat
96
Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Arg Ile Tyr Ser Asn
            20                  25                  30
```

[0285]

```
tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg cag cgt ccc aag ctc ctg atc
144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

tat tat aca tcc act ctg gca tct ggg gtc tca tcg cgg ttc aaa ggc
192
Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
    50                  55                  60

agt gga tct ggg aca cag ttc act ctc acc atc agc ggc gtg gag tgt
240
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys
```

```
65                  70                  75                  80

gcc gat gct gcc act tac tac tgt caa cag ggt tat agt agt agt aat
288
Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ser Ser Ser Asn
                85                  90                  95

gtt gac aat act ttc ggc gga ggg acc gag gtg gtg gtc aaa ggt
333
Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Gly
            100                 105                 110
```

[0286]

[0287] SEQ ID No.44(克隆PE025 vL结构域氨基酸序列)

```
Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly
1               5                  10                  15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Arg Ile Tyr Ser Asn
            20                  25                  30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Tyr Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys
65                  70                  75                  80

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ser Ser Ser Asn
                85                  90                  95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Gly
            100                 105                 110
```

[0288]

[0289] SEQ ID No.45(人源化PE020 vH结构域核酸序列)

```
ggc gag cag cag ctg gtg gag agc ggc gga ggc ctg gtg cag cct gga        48
Gly Glu Gln Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1               5                  10                  15

gga agc ctg agg ctg agc tgc gcc gtg tcc ggc ttc agc ctg agc agc        96
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser
            20                  25                  30
```

[0290]

```
tac gcc atc agc tgg gtg agg cag gcc ccc gga aag ggc ctg gag tac       144
Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr
        35                  40                  45

atc gcc atc atc aac agc tac ggc acc acc tac tac gcc agc tgg gcc       192
Ile Ala Ile Ile Asn Ser Tyr Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
```

```
    50                  55                  60

aag ggc aga gtg acc atc tcc aag gat tcc tcc aag aac acc gtg tac        240
Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

ctg cag atg ggc tcc ctg aga gcc gag gat atg gcc gtg tac ttt tgc        288
Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Phe Cys
                85                  90                  95

gcc aga ggc gat tcc tac ggc tcc ggc gtg ggc ctg ggc ctg tgg gga        336
Ala Arg Gly Asp Ser Tyr Gly Ser Gly Val Gly Leu Gly Leu Trp Gly
            100                 105                 110

cct gga acc ctg gtg aca gtg tcc tcc                                    363
Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

[0291]

[0292] SEQ ID No.46(人源化PEO20 vH结构域氨基酸序列)

```
Gly Glu Gln Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1               5                   10                  15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser
            20                  25                  30

Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr
        35                  40                  45

Ile Ala Ile Ile Asn Ser Tyr Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
    50                  55                  60
```

[0293]

```
Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Phe Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Gly Asp Ser Tyr Gly Ser Gly Val Gly Leu Gly Leu Trp Gly
            100                 105                 110

Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

[0294] SEQ ID No.47(人源化PEO20 vL结构域核酸序列)

```
gga gac tac cag atg aca cag tcc cct agc acc ctg tcc gcc tcc gtg         48
Gly Asp Tyr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val
1               5                   10                  15
```

[0295]

```
ggc gac aga gtg aca atc acc tgt cag gcc tcc cag aat atc tac agc         96
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Ser
```

```
                20                  25                  30

aat ctg gcc tgg tac cag cag aag cct ggc aag agg ccc aag ctg ctg        144
Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Arg Pro Lys Leu Leu
        35                  40                  45

atc tac aga gcc agc tcc ctg gcc tcc ggc gtg cca tct aga ttt tcc        192
Ile Tyr Arg Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
    50                  55                  60
```

[0296]

```
ggc tcc ggc agc ggc aca gag ttt acc ctg aca atc agc agc ctg cag        240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65                  70                  75                  80

ccc gat gat ttc gcc acc tac tac tgt cag cag ggc ttc agc agc aat        288
Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Phe Ser Ser Asn
                85                  90                  95

aat gtg gac aat aca ttt ggc ggc ggc aca aag gtg gag atc aag            333
Asn Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

[0297] SEQ ID No.48(人源化PE020 vL结构域氨基酸序列)

```
Gly Asp Tyr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val
1               5                   10                  15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Ser
            20                  25                  30

Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Arg Pro Lys Leu Leu
        35                  40                  45
```

[0298]

```
Ile Tyr Arg Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65                  70                  75                  80

Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Phe Ser Ser Asn
                85                  90                  95

Asn Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

[0299] SEQ ID No.49(人源化PE019 vH结构域核酸序列)

```
ggc gag cag cag ctg gtg gag agc ggc gga ggc ctg gtg cag cct gga         48
Gly Glu Gln Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1               5                   10                  15
```

[0300]

```
gga agc ctg agg ctg agc tgc gcc gtg tcc ggc ttt tcc ctg agc aag         96
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys
```

```
                20                  25                  30

agc atc atc agc tgg gtg agg cag gcc cct ggc aag ggc ctg gag tac        144
Ser Ile Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr
        35                  40                  45

atc ggc atc atc ggc agc agc ggc tcc acc tac tac gcc aac tgg gcc        192
Ile Gly Ile Ile Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala
    50                  55                  60

aag ggc aga ttc aca atc tcc aag gac tcc tcc aag aat acc gtg tac        240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

ctg cag atg ggc tcc ctg agg gcc gag gat atg gcc gtg tac ttt tgt        288
Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Phe Cys
                85                  90                  95

gcc aga ggc ctg ctg tac tcc ggc aat aag tcc tgg ggc ccc ggc aca        336
Ala Arg Gly Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Lys Ser Trp Gly Pro Gly Thr
            100                 105                 110

ctg gtg acc gtg agc tcc                                               354
Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

[0301]

[0302] SEQ ID No.50(人源化PE019 vH结构域氨基酸序列)

```
Gly Glu Gln Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1               5                   10                  15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys
            20                  25                  30

Ser Ile Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr
        35                  40                  45

Ile Gly Ile Ile Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala
    50                  55                  60
```

[0303]

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Phe Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Gly Leu Leu Tyr Ser Gly Asn Lys Ser Trp Gly Pro Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

[0304] SEQ ID No.51(人源化PE019 vL结构域核酸序列)

```
ggc gac atc gtg atg acc cag tcc ccc gat tcc ctg gcc gtg tcc ctg          48
Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
1               5                   10                  15

ggc gag aga gcc aca atc aat tgt cag tcc tcc cag agc gtg ctg ctg          96
Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Leu Leu
            20                  25                  30

aac aat cag ctg tcc tgg ttc cag cag aag cct ggc cag cct ccc aag         144
Asn Asn Gln Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
        35                  40                  45

ctg ctg atc tac gac gcc tcc aca ctg gag tcc ggc gtg ccc gat agg         192
Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
    50                  55                  60

ttc agc ggc tcc ggc agc ggc acc gac ttt acc ctg acc atc tcc agc         240
Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
65                  70                  75                  80

ctg cag gcc gag gat gtg gcc gtg tac tac tgc ctg ggc ggc tac agc         288
Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Ser
                85                  90                  95

ggc aac ctg tac gcc ttt ggc ggc ggc acc aag gtg gag atc aag             333
Gly Asn Leu Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

[0305]

[0306] SEQ ID No.52(人源化PE019 vL结构域氨基酸序列)

```
Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
1               5                   10                  15

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Leu Leu
            20                  25                  30

Asn Asn Gln Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
        35                  40                  45

Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
    50                  55                  60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
65                  70                  75                  80

Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Tyr Ser
                85                  90                  95

Gly Asn Leu Tyr Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

[0307]

[0308] SEQ ID No.53(人源化PE021 vH结构域核酸序列)

```
ggc gag cag cag ctg gtg gag tcc ggc gga ggc ctg gtg cag cca gga          48
Gly Glu Gln Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1               5                   10                  15

gga agc ctg agg ctg tcc tgt gcc gtg agc ggc ttc tcc ctg agc tcc          96
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser
            20                  25                  30

tac gcc atg agc tgg gtg agg cag gcc ccc gga aag ggc ctg gag tac         144
Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr
        35                  40                  45

atc ggc atc atc agc agc agc ggc agc aca tac tac gcc agc tgg gcc         192
Ile Gly Ile Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
    50                  55                  60
```

[0309]

```
aag ggc agg ttc aca atc agc aag gat tcc tcc aag aat aca gtg tac         240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

ctg cag atg ggc tcc ctg agg gcc gag gac atg gcc gtg tac ttc tgt         288
Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Phe Cys
                85                  90                  95

gcc aga gac agg gtc atc tat tcc atc ggc cct tac tac ttc aac ctg         336
Ala Arg Asp Arg Val Ile Tyr Ser Ile Gly Pro Tyr Tyr Phe Asn Leu
            100                 105                 110

tgg ggc ccc ggc aca ctg gtg aca gtg tcc agc                            369
Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

[0310] SEQ ID No.54(人源化PE021 vH结构域氨基酸序列)

```
Gly Glu Gln Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1               5                   10                  15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser
            20                  25                  30

Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr
        35                  40                  45

Ile Gly Ile Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala
    50                  55                  60
```

[0311]

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Phe Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Asp Arg Val Ile Tyr Ser Ile Gly Pro Tyr Tyr Phe Asn Leu
            100                 105                 110

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

[0312] SEQ ID No.55(人源化PE021 vL结构域核酸序列)

```
ggc gat tac cag atg aca cag tcc ccc tcc tcc ctg agc gcc tcc gtg          48
Gly Asp Tyr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1               5                   10                  15

gga gat agg gtg acc atc aca tgc cag gcc agc gag atc atc tac agc          96
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Ser
            20                  25                  30

aat ctg gcc tgg tac cag cag aag ccc ggc aag ccc ccc aag ctg ctg         144
Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu
        35                  40                  45

atc tac ggc gcc tcc aca ctg gcc agc ggc gtg cct agc aga ttc agc         192
Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
    50                  55                  60

ggc agc ggc tcc ggc acc gat tac acc ctg aca atc tcc agc ctg cag         240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65                  70                  75                  80

cct gag gat ttt gcc aca tac tac tgt cag cag tcc ttc agc tcc aat         288
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Ser Ser Asn
                85                  90                  95

aac gtg ggc aac atc ttc ggc ggc ggc aca aag gtg gag atc aag             333
Asn Val Gly Asn Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

[0313]

[0314] SEQ ID No.56(人源化PE021 vL结构域氨基酸序列)

```
Gly Asp Tyr Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1               5                   10                  15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile Tyr Ser
            20                  25                  30

Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu
        35                  40                  45

Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65                  70                  75                  80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Ser Ser Asn
                85                  90                  95

Asn Val Gly Asn Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

[0315]

[0316] 为了用于人患者,希望将这些抗体人源化,用人恒定区替换重链和轻链的恒定区,以及用人抗体框架区替换可变区的框架区。在一些实施方案中,抗CD39抗体或其抗原结合片段为兔抗体的人源化形式。

[0317] 在一些实施方案中,抗CD39抗体或其抗原结合片段包含至少一个重链可变结构域,其与SEQ ID No.2、6、10、14、18、22、26、42、46、50或54至少60%相同,并且甚至更优选与SEQ ID No.2、6、10、14、18、22、26、42、46、50或54至少65%、70%、75%、80%、85%或甚至

90％相同,并且能够特异性结合人CD39。

[0318] 在一些实施方案中,抗CD39抗体或其抗原结合片段包含至少一个轻链可变结构域,其与SEQ ID No.4、8、12、16、20、24、28、44、48、52或56至少60％相同,并且甚至更优选与SEQ ID No.4、8、12、16、20、24、28、44、48、52或56至少65％、70％、75％、80％、85％或甚至90％相同,并且能够特异性结合人CD39。

[0319] 在某些实施方案中,嵌合抗体为人源化抗体。通常,非人抗体被人源化以降低对人的免疫原性,同时保留亲代非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中HVR,例如CDR(或其部分)衍生自非人抗体,而FR(或其部分)衍生自人抗体序列。人源化抗体任选地还将包含人恒定区的至少一部分。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,衍生出HVR残基的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或提高抗体的特异性或亲和力。

[0320] 在某些实施方案中,抗CD39抗体为人源化抗体,其包含VH结构域,所述VH结构域具有与选自SEQ ID No.2、6、10、14、18、22、26、42、46、50或54的VH结构域的CDR以及选自SEQ ID No.4、8、12、16、20、24、28、44、48、52或56的相应VL结构域的CDR相关的人框架序列。CDR优选地相同,但可在各CDR上相差1、2或3个氨基酸,只要所得抗体特异性结合人CD39即可。

[0321] 人源化抗体和其制备方法综述于例如Almagro和Fransson,2008,Front.Biosci.13:1619-1633中,并且进一步描述于例如Riechmann等人,1988,Nature 332:323-329;Queen等人,1989,Proc.Natl Acad.Sci.USA 86:10029-10033;美国专利号5,821,337;7,527,791;6,982,321;和7,087,409;Kashmiri等人,2005,Methods 36:25-34(描述特异性决定区(SDR)移植);Padlan,1991,Mol.Immunol.28:489-498(描述“表面重整(resurfacing)”);Dall'Acqua等人,2005,Methods 36:43-60(描述“FR混排”);以及Osbourn等人,2005,Methods 36:61-68和Klimka等人,2000,Br.J.Cancer 83:252-260(描述了FR混排的“导向选择”方法)中。

[0322] 可用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳拟合”方法选择的框架区(参见,例如Sims等人,1993,J.Immunol.151:2296);从轻链或重链可变区的特定亚组的人抗体的共有序列衍生的框架区(参见,例如Carter等人,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4285;和Presta等人,1993,J.Immunol.151:2623);人成熟(体细胞突变)框架区或人生殖是框架区(参见,例如Almagro和Fransson,2008,Front.Biosci.13:1619-1633);和衍生自筛选FR文库的框架区(参见,例如Baca等人,1997,J.Biol.Chem.272:10678-10684以及Rosok等人,1996,J Biol.Chem.271:22611-22618)。

[0323] 在某些实施方案中,本文提供的抗CD39抗体为人抗体。可使用本领域已知的各种技术来产生人抗体。人抗体一般描述于van Dijk和van de Winkel,2001,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74以及Lonberg,2008,Curr.Opin.Immunol.20:450-459中。

[0324] 例如,可通过向转基因动物施用免疫原来制备人抗体,所述动物已被修饰以响应于抗原攻击产生完整的人抗体或具有人可变区的完整抗体。此类动物通常含有人免疫球蛋白基因座的全部或一部分,其替换内源性免疫球蛋白基因座,或存在于染色体外或随机整合至动物的染色体中。在此类转基因小鼠中,内源性免疫球蛋白基因座通常已不活化。有关从转基因动物获得人抗体的方法的综述,参见Lonberg,2005,Nat.Biotech.23:1117-1125。(还参见,例如美国专利号6,075,181和6,150,584,描述XENOMOUSE技术;美国专利号5,770,

429,描述HuMAB技术;美国专利号7,041,870,描述K-M MOUSE技术;和美国专利申请公开号US2007/0061900,描述VELOCIMOUSE技术。)来自此类动物产生的完整抗体的人可变区可进一步被修饰,例如,通过与不同的人恒定区组合。

[0325] 人抗体还可通过基于杂交瘤的方法制得。已描述了用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系。(参见,例如Kozbor,1984,J.Immunol.133:3001;Brodeur等人,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,第51-63页(Marcel Dekker,Inc.,New York,1987);以及Boerner等人,1991,J.Immunol.147:86。)经由人B细胞杂交瘤技术生成的人抗体还描述于Li等人,2006,Proc.Natl.Acad.Sci USA 103:3557-3562中。额外方法包括例如在以下文献中描述的那些:美国专利号7,189,826(描述由杂交瘤细胞系产生单克隆人IgM抗体)以及Ni,2006,Xiandai Mianyixue,26(4):265-268(描述人-人杂交瘤)。人杂交瘤技术(三源杂交瘤技术(Trioma technology))还描述于以下文献中:Vollmers和Brandlein,2005,Histology and Histopathology 20(3):927-937以及Vollmers和Brandlein,2005,Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology27(3):185-91。

[0326] 人抗体还可通过以下方式来生成:分离选自人衍生噬菌体、酵母或细菌展示文库的Fv克隆可变结构域序列。接着可将此类可变结构域序列与所需的人恒定结构域组合。从抗体文库中选择人抗体的技术描述如下。

[0327] 为了说明,本发明所涵盖的抗CD39抗体可通过筛选具有一种或多种所需活性的抗体的组合文库来分离。例如,本领域中已知多种方法用于生成噬菌体或酵母展示文库并筛选此类文库以寻找具有所需结合特征的抗体。此类方法综述于例如Hoogenboom等人,Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien等人编,Human Press,Totowa,N.J.,2001)中并进一步描述于例如以下文献中:McCafferty等人,1990,Nature 348:552-554;Clackson等人,1991,Nature 352:624-628;Marks等人,1992,J.Mol.Biol.222:581-597;Marks和Bradbury,Methods in Molecular Biology 248:161-175(Lo编,Human Press,Totowa,N.J.,2003);Sidhu等人,2004,J.Mol.Biol.338(2):299-310;Lee等人,2004,J.Mol.Biol.340(5):1073-1093;Fellouse,2004,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472;以及Lee等人,2004,J.Immunol.Methods284(1-2):119-132。

[0328] 作为噬菌体展示方法的一个实例,VH和VL基因谱通过聚合酶链反应(PCR)单独克隆,并在噬菌体文库中随机重组,接着可筛选抗原结合噬菌体,如在Winter等人,1994,Ann.Rev.Immunol.,12:433-455中所述。噬菌体通常展示抗体片段,作为单链Fv(scFv)片段或作为Fab片段。来自免疫来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体,而无需构建杂交瘤。替代地,可克隆原初谱(naive repertoire)(例如,来自人)以提供针对范围广泛的非自体和自体抗原的单一抗体来源,而不进行任何免疫,如由Griffiths等人,1993,EMBO J.12:725-734所述。最后,原初文库还可通过以下操作合成制得:从干细胞克隆未重排的V基因片段,和使用含有随机序列的PCR引物,以编码高度可变的CDR3区并在体外完成重排,如由Hoogenboom和Winter,1992,J.Mol.Biol.227:381-388所述。描述人抗体噬菌体文库的专利公开包括例如:美国专利号5,750,373;以及美国专利公开号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936和2009/0002360。

[0329] 从人抗体文库中分离的抗体或抗体片段在本文中被视为人抗体或人抗体片段。

[0330] Fcγ RIII结合还可通过根据现有技术的方法来增加,例如,通过修饰Fc部分的氨基酸序列或抗体Fc部分的糖基化(参见例如EP2235061)。在某些实施方案中,主题抗体是由以下细胞产生,其中当糖基化时,抗体上少于50%的寡糖链含有α-1,6-岩藻糖。通常,少于约40%、少于约30%、少于约20%、少于约10%、或少于5%或少于1%的寡糖链在"低岩藻糖基化"抗体制剂中含有α-1,6-岩藻糖。"无岩藻糖基化"抗体在附接至IgG重链的CH2结构域的碳水化合物中缺少α-1,6-岩藻糖。Mori等人,2007,Cytotechnology 55(2-3):109-114和Satoh等人,2006,Expert Opin Biol Ther.6:1161-1173涉及用于生成无岩藻糖基化抗体的FUT8(α-1,6-岩藻糖基转移酶)基因敲除CHO株。

[0331] IV.表达载体

[0332] 在某些实施方案中,重组表达载体用于扩增和表达编码本文所述的抗CD39抗体的DNA。例如,重组表达载体可为可复制的DNA构建体,其具有编码抗CD39抗体的多肽链的合成或cDNA衍生的DNA片段,所述片段可操作地连接至衍生自哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因的合适的转录和/或翻译调控元件。转录单位通常包含以下各项的组件:(1)在基因表达中具有调控作用的一个或多个遗传元件,例如转录启动子或增强子,(2)转录成mRNA并翻译成蛋白质的结构或编码序列,以及(3)适当的转录和翻译起始和终止序列。调控元件可包括控制转录的操纵子序列。在宿主中复制的能力通常由复制起点赋予,并且可另外并入促进识别转化体的选择基因。当DNA区在功能上彼此相关时,它们是"可操作地连接"的。例如,如果信号肽(分泌前导序列)的DNA表达为参与多肽分泌之前驱体,则它可操作地连接至多肽的DNA;如果启动子控制序列的转录,则它可操作地连接至编码序列;或者如果核糖体结合位点被定位以允许翻译,则它可操作地连接至编码序列。在一些实施方案中,旨在用于酵母表达系统中的结构元件包括使宿主细胞能够实现所翻译的蛋白质的细胞外分泌的前导序列。在其他实施方案中,当重组蛋白在没有前导序列或转运序列的情况下表达时,它可包括N-末端甲硫氨酸残基。此残基随后可任选地从所表达的重组蛋白上裂解以提供最终产物。

[0333] 表达控制序列和表达载体的选择取决于宿主细胞的选择。可使用广泛多种表达宿主/载体组合。用于真核宿主的有用的表达载体包括例如包含来自SV40、牛乳头瘤病毒、腺病毒和巨细胞病毒的表达控制序列的载体。用于细菌宿主的有用的表达载体包括已知的细菌质粒,诸如来自大肠杆菌的质粒,包括pCR1、pBR322、pMB9和其衍生物,以及更广泛的宿主范围质粒,诸如M13和其他丝状单链DNA噬菌体。

[0334] 用于表达抗CD39抗体(或用作靶标的蛋白质)的多肽链的合适宿主细胞包括原核生物、酵母细胞、昆虫细胞或处于适当启动子控制下的高等真核细胞。原核生物包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如大肠杆菌或芽孢杆菌。高等真核细胞包括建立的哺乳动物来源的细胞系,如下所述。还可使用无细胞翻译系统。用于细菌、真菌、酵母和哺乳动物细胞宿主的适当克隆和表达载体为本领域技术人员所熟知。

[0335] 各种哺乳动物细胞培养系统用于表达重组多肽。重组蛋白在哺乳动物细胞中的表达可为优选的,因为此类蛋白通常正确折叠、适当修饰并具有生物学功能。合适的哺乳动物宿主细胞系的实例包括COS-7(猴肾衍生)、L-929(鼠类成纤维细胞衍生)、C127(鼠类乳房肿瘤衍生)、3T3(鼠类成纤维细胞衍生)、CHO(中国仓鼠卵巢衍生)、HeLa(人宫颈癌衍生)、BHK(仓鼠肾成纤维细胞衍生)和HEK-293(人胚胎肾衍生)细胞系和其变体。哺乳动物表达载体

可包含非转录元件,诸如复制起点、连接至待表达基因的合适的启动子和增强子、和其他5'或3'侧翼非转录序列、以及5'或3'非翻译序列,诸如必需核糖体结合位点、多腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点以及转录终止序列。

[0336] 在昆虫细胞培养系统(例如,杆状病毒)中表达重组蛋白还提供一种用于产生正确折叠和具有生物学功能的蛋白质的稳健方法。用于在昆虫细胞中产生异源蛋白质的杆状病毒系统为本领域技术人员所熟知。

[0337] 在某些实施方案中,多核苷酸包含编码抗体轻链的多核苷酸,所述抗体轻链包含与SEQ ID No.1至少60%相同并且甚至更优选与SEQ ID No.1至少65%、70%、75%、80%、85%或甚至90%相同的可变区,并且能够特异性结合人CD39。

[0338] 在某些实施方案中,多核苷酸包含编码抗体重链的多核苷酸,所述抗体重链包含与SEQ ID No.2至少60%相同并且甚至更优选与SEQ ID No.2至少65%、70%、75%、80%、85%或甚至90%相同的可变区,并且能够特异性结合人CD39。

[0339] V.用于体内递送的所编码的抗CD39抗体

[0340] 用于递送有待在患者中表达的抗CD39抗体的编码序列的治疗载体可为病毒的、非病毒的或物理的。参见,例如Rosenberg等人,1988,Science 242:1575-1578和Wolff等人,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:9011-9014。用于基因疗法中的方法和组合物的讨论包括Eck等人,1996,Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,第九版,Hardman等人编,McGraw-Hill,New York,第5章,第77-101页;Wilson等人,1997,Clin.Exp.Immunol.107(增刊1):31-32;Wivel等人,1998,Hematology/Oncology Clinics of North America,Gene Therapy,S.L.Eck编,12(3):483-501;Romano等人,2000,Stem Cells18:19-39;和其中引用的参考文献。美国专利号6,080,728还提供对广泛多种基因递送方法和组合物的讨论。递送途径包括例如全身施用和原位施用。熟知的病毒递送技术包括使用腺病毒、逆转录病毒、慢病毒、泡沫病毒、单纯疱疹病毒、痘疮病毒和腺相关病毒载体。

[0341] a.病毒载体

[0342] 优选的病毒载体是基于非细胞病变真核病毒,其中非必需基因已经携带编码表位和感兴趣的靶向序列的核酸序列的核酸构建体替换。本发明所涵盖的某些实施方案的优选地病毒为腺病毒和腺相关(AAV)病毒,它们为双链DNA病毒,已被批准用于人基因疗法。此外,优选的耐受载体不包括免疫刺激序列。腺病毒载体

[0343] 一种或多种核酸序列的体内递送的一种说明性方法包括使用腺病毒表达载体。"腺病毒表达载体"意在包括那些含有足以(a)支持构建体包装和(b)表达以有义或反义方向克隆至其中的多核苷酸的腺病毒序列的构建体。当然,在反义构建体的情况下,表达不需要合成基因产物。在一具体实施方案中,递送载体属于可商购获得的细胞色素b5还原酶3(CYB5R3)的ORF,腺病毒载体pAd中的转录变体1,具有C末端Flag和His标签(Vigene Biosciences产品码AH889428)。WIPO专利申请WO/2015/050364还教导具有包含Cyb5r3基因的表达构建体的载体。

[0344] 腺病毒载体具有高度免疫原性,并且因此不太优选地用于施用以通过呈递抗原或在自体免疫疾病的情况下诱导耐受性。然而,这些载体可用于诱导免疫力,例如治疗传染性疾病等,包括例如流感、HBV、HCV和HIV。

[0345] 腺相关病毒载体(AAV)

[0346] 由于AAV的安全性,即基因工程化(重组)不整合至宿主基因组中,因此AAV为递送媒介物的良好选择。同样,AAV不具有致病性,并且与任何疾病无关。病毒编码序列的移除最大限度地减少对病毒基因表达的免疫反应,并且因此,rAAV不会引起炎症反应。根据一个具体实施方案,含有本文所述的包含表位序列的核酸构建体的AAV载体可用于转导APC。

[0347] 通常,包含含有表位的核酸构建体的病毒载体是由编码所需表位的多核苷酸、合适的调控元件和表位表达所必需的介导细胞转导的元件组装而成。在一个实施方案中,使用腺相关病毒(AAV)载体。在更具体的实施方案中,AAV载体为AAV1、AAV6或AAV8。

[0348] 载有由AAV ITR结合的感兴趣的DNA分子的AAV表达载体可通过将所选序列直接插入AAV基因组中来构建,所述AAV基因组已从其中切除主要的AAV开放阅读框("ORF")。可包括在本发明的AAV中的组成型启动子的实例包括但不限于示范的CMV立即早期增强子/鸡β-肌动蛋白(CBA)启动子。

[0349] 对于真核细胞,表达控制序列通常包括启动子、增强子(诸如衍生自免疫球蛋白基因、SV40、巨细胞病毒等的增强子)、以及可包括剪接供体和受体位点的多腺苷酸化序列。多腺苷酸化序列通常插入在转基因序列之后和3'ITR序列之前。在一个实施方案中,可使用牛生长激素polyA。

[0350] 这些和其他常见载体和调控元件的选择为常规的,并且许多此类序列为可用的。参见,例如Sambrook等人和其中引用的参考文献,例如第3.18-3.26页和第16.17-16.27页以及Ausubel等人,1989,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York。当然,并非所有载体和表达控制序列均能同样好地发挥作用来表达本发明的所有转基因。然而,本领域技术人员可在不脱离本发明范围的情况下在这些表达控制序列中进行选择。合适的启动子/增强子序列可由本领域技术人员使用本申请提供的指导来选择。此类选择为例行公事,而非对分子或构建体的限制。

[0351] 逆转录病毒载体

[0352] 在某些实施方案中,病毒载体可为逆转录病毒载体。"逆转录病毒"为具有RNA基因组的病毒。在特定实施方案中,逆转录病毒载体含有病毒基因组的包装和整合所必需的所有顺式作用序列,即,(a)在载体各端处的长末端重复序列(LTR)或其部分;(b)用于负链和正链DNA合成的引物结合位点;和(c)包装信号,其为将基因组RNA并入病毒粒子中所必需的。关于逆转录病毒载体的更多详情可见于以下文献中:Boesen等人,1994,Biotherapy 6:291-302;Clowes等人,1994,J.Clin.Invest.93:644-651;Kiem等人,1994,Blood 83:1467-1473;Salmons和Gunzberg,1993,Human Gene Therapy 4:129-141;Miller等人,1993,Meth.Enzymol.217:581-599;以及Grossman和Wilson,1993,Curr.Opin.in Genetics and Devel.3:110-114。

[0353] "γ逆转录病毒"是指逆转录病毒科的一个属。示例性γ逆转录病毒包括小鼠干细胞病毒、鼠类白血病病毒、猫白血病病毒、猫肉瘤病毒和家禽网状内皮增生症病毒。

[0354] 广泛使用的逆转录病毒载体包括基于以下的那些:鼠类白血病病毒(MuLV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、猿猴免疫缺陷病毒(SIV)、人免疫缺陷病毒(HIV)和其组合(参见,例如Buchscher等人,1992,J.Virol.66:2731-2739;Johann等人,1992,J.Virol.66:1635-1640;Sommerfelt等人,1990,Virol.176:58-59;Wilson等人,1989,J.Virol.63:2374-

2378;Miller等人,1991,J.Virol.65:2220-2224;和PCT/US94/05700)。

[0355] 慢病毒载体是指能够感染分裂和非分裂细胞并通常产生高病毒效价的逆转录病毒属。慢病毒的若干实例包括HIV(人免疫缺陷病毒:包括1型HIV和2型HIV);马传染性贫血病毒;猫免疫缺陷病毒(FIV);牛免疫缺陷病毒(BIV);以及猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。

[0356] 在特定实施方案中,可使用其他逆转录病毒载体。它们包括例如基于人泡沫病毒(HFV)或泡沫病毒属中的其他病毒的载体。泡沫病毒(FVes)为当今已知的最大逆转录病毒并且广泛存在于不同哺乳动物中,包括所有非人灵长类动物,但在人中不存在。此种完全无致病性使FV载体有资格成为人基因疗法的理想基因转移媒介物,并且清楚地将FV载体作为基因递送系统与HIV衍生的载体以及γ逆转录病毒衍生的载体区分开。

[0357] 非细胞病变病毒包括逆转录病毒(例如慢病毒),其生命周期涉及将基因组病毒RNA逆转录成DNA,随后原病毒整合至宿主细胞DNA中。逆转录病毒已被批准用于人基因疗法试验。最有用的为那些复制缺陷的逆转录病毒(即,能够指导所需蛋白质的合成,但不能制造传染性颗粒)。此类遗传改变的逆转录病毒表达载体具有在体内高效转导基因的一般效用。产生复制缺陷型逆转录病毒的标准方案(包括以下步骤:将外源遗传物质并入质粒、转染内衬质粒的包装细胞、通过包装细胞系产生重组逆转录病毒、从组织培养基中收集病毒颗粒和用病毒颗粒感染靶细胞)为本领域技术人员已知。

[0358] 逆转录病毒基因组含有三个基因,即gag、pol和env,分别编码衣壳蛋白、聚合酶和包膜组分。在gag基因上游所见的序列含有将基因组包装成病毒粒子的信号。逆转录病毒载体为基因转移质粒,其中异源核酸驻留于两个逆转录病毒LTR之间。逆转录病毒载体通常含有适当的包装信号,所述信号使逆转录病毒载体或使用逆转录病毒载体作为模板转录的RNA能够包装至适当包装细胞系中的病毒粒子中(参见,例如美国专利号4,650,764)。这两个长末端重复(LTR)序列存在于病毒基因组的5'和3'端。它们含有强启动子和增强子序列,并且还为整合至宿主细胞基因组中所必需的(Coffin,1990)。为了构建逆转录病毒载体,将编码一种或多种感兴趣的寡核苷酸或多核苷酸序列的核酸插入病毒基因组中以替代某些病毒序列,从而产生复制缺陷型病毒。还包括基于慢病毒(例如,一种类型的逆转录病毒)的附加型或非整合型逆转录病毒载体。

[0359] 当需要稳定表达时,慢病毒载体是有用的,但慢病毒载体可具有免疫原性,并且可能具有其他不良影响。因此,尽管慢病毒载体便于研究,但在将其用于人施用时应格外小心,尤其是在需要诱导耐受性而非免疫力的情况下。慢病毒适用于离体工程化T细胞或树突细胞或其他抗原呈递细胞以用于癌症疗法,尽管mRNA电穿孔更安全。然而,最近的两项进展使慢病毒的使用更安全且更易于临床转化。首先,自杀基因与抗原的共表达,其产物在施用药物时变得有功能。一个典型实例为单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-Tk)。表达这些基因的细胞可将药物更昔洛韦(ganciclovir)代谢成诱导细胞死亡的细胞毒性产物。因此,如果一些转导细胞变成恶性,它们可被根除。存在大约十几个此类系统(Duarte等人,2012,Cancer Letters 324:160-170)。其次,现在正在开发非整合型慢病毒载体,因此它们不会致癌(Nightingale等人,2006,Mol.Ther.13:1121-1132)。根据本领域技术人员的判断,这些方法可以用于本发明。

[0360] 用于本文中的合适的逆转录病毒载体描述于例如美国专利号5,399,346和5,252,479;以及WIPO公开WO 92/07573、WO 90/06997、WO 89/05345、WO 92/05266和WO 92/14829

中,所述文献提供关于使用此类逆转录病毒载体将核酸有效引入人细胞中的方法的描述。其他逆转录病毒载体包括例如小鼠乳房肿瘤病毒载体(例如,Shackleford等人,1998,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:9655-9659)、慢病毒等。示例性病毒载体为plentilox-IRES-GFP。

[0361] 可容易适于递送编码抗CD39抗体剂的转基因的额外逆转录病毒递送系统包括(仅用于说明)已公布的PCT申请WO/2010/045002、WO/2010/148203、WO/2011/126864、WO/2012/058673、WO/2014/066700、WO/2015/021077、WO/2015/148683、WO/2017/040815,各申请的说明书和附图均以引用方式并入本文。

[0362] 在某些实施方案中,逆转录病毒为有重组复制能力的逆转录病毒,其包含:编码逆转录病毒GAG蛋白的核酸序列;编码逆转录病毒POL蛋白的核酸序列;编码逆转录病毒包膜的核酸序列;癌逆转录病毒多核苷酸序列,其包含在癌逆转录病毒多核苷酸序列的5'和3'端处的长末端重复(LTR)序列;包含可操作地连接至抗CD39抗体剂的编码序列的内部核糖体进入位点(IRES)的盒,其中所述盒定位于3'LTR的U3区的5'处和编码逆转录病毒包膜的序列的3'处;以及用于在靶细胞中进行逆转录、包装和整合的顺式作用序列。

[0363] 在某些实施方案中,逆转录病毒为有重组复制能力的逆转录病毒,其包含:逆转录病毒GAG蛋白;逆转录病毒POL蛋白;逆转录病毒包膜;逆转录病毒多核苷酸,其包含在逆转录病毒多核苷酸序列的3'端处的长末端重复(LTR)序列、在逆转录病毒多核苷酸的5'端处的启动子序列(所述启动子适合在哺乳动物细胞中表达)、gag核酸结构域、pol核酸结构域和env核酸结构域;包含可操作地连接至异源多核苷酸的抗CD39抗体剂编码序列的盒,其中所述盒定位于3'LTR的5'处并且可操作地连接至编码逆转录病毒包膜的env核酸结构域的3';以及在靶细胞中逆转录、包装和整合所必需的顺式作用序列。

[0364] 在有重组复制能力的逆转录病毒的某些优选地实施方案中,包膜选自以下中的一者:兼嗜性、多嗜性、异嗜性、10A1、GALV、狒狒内源性病毒、RD114、棒状病毒、α病毒、麻疹或流感病毒包膜。

[0365] 在有重组复制能力的逆转录病毒的某些优选地实施方案中,逆转录病毒多核苷酸序列是从选自由以下组成的组的病毒工程化的:鼠类白血病病毒(MLV)、莫洛尼鼠类白血病病毒(MoMLV)、猫白血病病毒(FeLV)、狒狒内源性逆转录病毒(BEV)、猪内源性病毒(PERV)、猫衍生的逆转录病毒RD114、松鼠猴逆转录病毒、异嗜性鼠类白血病病毒相关病毒(XMRV)、家禽网状内皮增生症病毒(REV)或长臂猿白血病病毒(GALV)。

[0366] 在有重组复制能力的逆转录病毒的某些优选地实施方案中,逆转录病毒为γ逆转录病毒。

[0367] 在有重组复制能力的逆转录病毒的某些优选地实施方案中,存在第二盒,其包含第二治疗性蛋白质的编码序列,诸如另一检查点抑制剂多肽、共刺激多肽和/或免疫刺激细胞因子(仅作为实例),例如,在盒的下游。在某些情况下,第二盒可包括可操作地连接至第二治疗性蛋白质的编码序列的内部核糖体进入位点(IRES)或微型启动子或polIII启动子。

[0368] 在有重组复制能力的逆转录病毒的某些优选地实施方案中,它为一种非裂解性、兼嗜性逆转录病毒复制载体,其优选地选择性地感染炎症性组织微环境的细胞并在其中复制。

[0369] 其他病毒载体作为表达构建体

[0370] 其他病毒载体可用作本发明中的表达构建体,用于将寡核苷酸或多核苷酸序列递送至宿主细胞。可使用衍生自病毒,诸如痘疮病毒、脊髓灰质炎病毒和疱疹病毒的载体。它们为各种哺乳动物细胞提供若干有吸引力的特征。还包括B型肝炎病毒。

[0371] b.非病毒载体

[0372] 质粒载体

[0373] 其他载体包括质粒载体。质粒载体已在本领域中广泛描述并且为本领域技术人员所熟知。参见例如上面引用的Sambrook等人,1989。在过去几年中,质粒载体已用作DNA疫苗,用于将抗原编码基因组内递送至细胞。它们在此方面特别有利,因为它们不像许多病毒载体那样存在相同的安全问题。然而,这些具有与宿主细胞兼容的启动子的质粒可以表达由质粒内的核酸编码的肽表位。其他质粒为本领域普通技术人员所熟知。此外,可使用限制酶和连接反应来定制设计质粒,以移除和添加特定的DNA片段。质粒可通过多种胃肠外、粘膜和局部途径递送。例如,DNA质粒可通过肌内、皮内、皮下或其他途径注射。它还可通过鼻内喷雾剂或滴剂、直肠栓剂和经口施用。还可使用基因枪将其施用至表皮或粘膜表面。质粒可在水溶液中给予,在金颗粒上干燥或与另一DNA递送系统缔合,包括但不限于脂质体、树枝状聚合物、蜗壳(cochleate)和微胶囊化。

[0374] 因此,在一个方面中,提供用于表达含有表位的核酸构建体的质粒,其包括表达盒;也称为转录单位。当将质粒置于适合表位表达的环境中时,转录单位将表达多核苷酸,包括编码表位的序列、ETS和MHCII激活序列、或编码表位的序列和分泌信号序列、以及构建体中编码的任何其他序列。转录单位包括转录控制序列,其与细胞免疫反应元件编码序列转录连接。转录控制序列可包括启动子/增强子序列,诸如巨细胞病毒(CMV)启动子/增强子序列。然而,本领域技术人员将认识到,适合在真核细胞中表达的多种其他启动子序列为已知的并且可类似地用于本文所公开的构建体中。核酸产物的表达水平将取决于相关启动子以及相关增强子元件的存在与激活。

[0375] 在某些实施方案中,可将编码所需表位和靶向序列的序列克隆至表达质粒中,所述表达质粒含有用于转录、翻译、RNA稳定性和复制的调控元件(即,包括转录控制序列)。此类表达质粒为本领域中熟知的并且本领域普通技术人员将能够设计具有多核苷酸的适当的表达构建体,所述多核苷酸包括编码细胞免疫反应元件或其片段的序列,使得细胞免疫反应元件可表达。存在合适的表达质粒的许多实例,诸如pCI-neo、pUMVC或pcDNA3,包括序列的多核苷酸可克隆至其中。

[0376] 可发酵大量载有用于表达细胞免疫反应元件或其片段的质粒的细菌宿主,并且质粒可被纯化以供后续使用。当前使用质粒的人临床试验利用此方法(Recombinant DNA Advisory Committee Data Management Report,1994,Human Gene Therapy 6:535-548)。本领域中已知的当前DNA分离方法包括移除脂多糖(内毒素),脂多糖为来自用于繁殖质粒的细菌的污染物。此步骤最佳用于致耐受性DNA疫苗,因为内毒素充当强佐剂并且可产生不希望的免疫刺激。

[0377] 质粒的目的是将核酸序列有效递送至细胞或组织中并在细胞或组织中表达治疗性表位。具体地,质粒的目的可为达成高拷贝数,避免质粒不稳定性的潜在原因,并为质粒选择提供一种手段。至于表达,核酸盒含有核酸在盒内表达所必需的元件。表达包括用质粒有效转录插入的基因、核酸序列或核酸盒。表达产物可为蛋白质、多肽或RNA。核酸序列可包

含在核酸盒中。核酸的表达可为连续的或受调控的。

[0378] 微环

[0379] 本文所述的核酸构建体的实施方案可以微环DNA的形式加工。微环DNA属于已从所有原核载体部分中释放的小(2-4kb)环状质粒衍生物。由于微环DNA载体不含细菌DNA序列,因此它们不太可能被认为是外来的并受到破坏。(典型转基因递送方法涉及含有外来DNA的质粒。)因此,与常规质粒(数天至数周)相比,这些载体可以表达更长时间(数周或数月)。较小尺寸的微环还扩展它们的克隆能力并有利于它们递送至细胞中。用于产生微环DNA的试剂盒为本领域中已知的并且可商购获得的(System Biosciences,Inc.,Palo Alto,Calif.)。关于微环DNA的信息提供于Dietz等人,2013,Vector Engineering and Delivery Molecular Therapy 21(8):1526-1535和Hou等人,2015,Molecular Therapy-Methods& Clinical Development,文章编号:14062doi:10.1038/mtm.2014.62中。有关微环的更多信息提供于Chen等人,2003年9月,Mol.Ther.8(3):495-500中,并且微环DNA载体达成持续表达,反映在活性染色质和转录水平上(Gracey Maniar等人,2013年1月,Mol.Ther.21(1):131-8)。

[0380] 作为在最终获得由核酸编码的产物表达的过程中的初始步骤,是实现细胞对核酸的摄取。细胞对核酸的摄取取决于许多因素,其中之一为核酸接近细胞表面的时间长度。例如,在肌内(i.m.)施用缓冲液中的质粒DNA后,如果按摩肌肉,则观察到基因表达的显著下降,可能是由于DNA直接或经由淋巴管从肌肉中泄漏(Human Gene Therapy 4:151-159(1993))。因此,可能需要用化合物配制核酸,所述化合物会延缓核酸扩散或从细胞摄取核酸所需的位点带走的速率。此外,这些化合物可能适合通过诸如注射的方式向生物体施用,同时保持或恢复增加细胞对核酸的摄取所必需的物理特征。

[0381] 为了实现寡核苷酸或多核苷酸序列的表达,必须将表达构建体递送至细胞中。在本发明所涵盖的某些实施方案中,包含一个或多个寡核苷酸或多核苷酸序列的表达构建体可仅由裸重组DNA或质粒组成。

[0382] 为了引发免疫力,任何类型的DNA疫苗载体优选地被工程化以富含CpG(为了刺激免疫细胞上的TLR9)或相反被工程化以移除CpG,并且在可能的情况下,用GpG基序替换CpG基序(Ho等人,2003,J.Immunol.71(9):4920-6;Ho等人,2005,J.Immunol.175(9):6226-34)。DNA疫苗可被工程化以含有抗原/表位,并且还可含有与抗原共表达的额外基因,以充当佐剂或免疫调节剂(多重启动子载体)。已发现这些DNA疫苗在临床上是安全的,例如在T1D患者中(Roep等人,2013,Sci.Transl.Med.5(191):191ra82)。

[0383] 机械递送系统

[0384] 额外非病毒递送方法包括但不限于可在体外使用的机械递送系统,诸如Woffendin等人,1994,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91(24):11581中所述的方法;沉积光聚合水凝胶材料或使用电离辐射(参见,例如美国专利号5,206,152和WO 92/11033);使用手持式基因转移粒子枪(参见,例如美国专利号5,149,655);以及使用电离辐射来激活转移基因(参见,例如美国专利号5,206,152和WO 92/11033)。递送装置还可为生物兼容的,并且还可为生物可降解的。制剂优选地提供相对恒定水平的活性组分释放。另一方面,可能需要在施用后更快的立即释放速率。使用已知技术,此类组合物的配制完全在本领域普通技术人员的技能内。

[0385] 增强递送的物理方法包括电穿孔(其中高压短脉冲携带核酸穿过膜)、基因枪(其中DNA加载至金颗粒上并迫使达成DNA渗透至细胞中)、声穿孔、磁转染、流体动力递送等,所有这些均为本领域技术人员已知的。DNA还可封装于脂质体、优选地阳离子脂质体、或聚合物囊泡(合成脂质体)中,它们可与细胞膜相互作用并融合或经历胞吞作用以实现DNA转移至细胞中。DNA还可与聚合物(多聚复合物)或与树枝状聚合物形成复合物,后者可将其负载直接释放至细胞的细胞质中。

[0386] 在此方面中有用的说明性载剂包括聚(丙交酯-共-乙交酯)、聚丙烯酸酯、乳胶、淀粉、纤维素、葡聚糖等的微粒。其他说明性延迟释放载剂包括超分子生物载体,其包含非液体亲水核心(例如,交联多糖或寡糖)和任选的包含两亲化合物(诸如磷脂)的外层(参见,例如美国专利号5,151,254和PCT申请WO 94/20078、WO/94/23701和WO 96/06638)。持续释放制剂中所含活性剂的量取决于植入部位、释放速率和预期释放持续时间以及待治疗或预防的疾患性质。

[0387] 生物可降解的微球体(例如,聚乳酸聚乙醇酸酯)可用作组合物的载剂。合适的生物可降解的微球体公开于例如美国专利号4,897,268;5,075,109;5,928,647;5,811,128;5,820,883;5,853,763;5,814,344;5,407,609;和5,942,252中。诸如WO/99 40934和其中引用的参考文献中描述的改善的B型肝炎核心蛋白载剂系统还可用于许多应用。另一个说明性载剂/递送系统采用包含微粒-蛋白质复合物的载剂,诸如美国专利号5,928,647中描述的那些。

[0388] 生物可降解的聚合纳米颗粒促进非病毒核酸转移至细胞中。小(大约200nm)、带正电(大约10mV)的颗粒是由阳离子的可水解降解的聚(β-氨基酯)和质粒DNA的自组装形成。

[0389] 多核苷酸还可通过直接显微注射、临时细胞透化作用(例如阻遏物和/或活化物与细胞透化剂的共施用)、与膜易位肽的融合等来向细胞施用。

[0390] 在本公开的某些特定实施方案中,基因构建体经由电穿孔引入靶细胞中。电穿孔涉及将细胞(或组织)和DNA(或DNA复合物)暴露于高压放电。体内电穿孔为一种基因递送技术,其已成功用于将质粒DNA有效递送至许多不同组织。由质粒编码的基因或cDNA的系统和局部表达可通过施用体内电穿孔获得。体内电穿孔的使用增强靶标炎症组织中的质粒DNA的摄取,造成在炎症组织内表达,并将质粒递送至肌肉组织,导致抗CD39抗体的系统表达(参见例如US8026223)。用于将抗CD39抗体转基因组内电穿孔至细胞中的示例性技术、载体和装置包括PCT公开WO/2017/106795、WO/2016/161201、WO/2016/154473、WO/2016/112359和WO/2014/066655。

[0391] 美国专利号7,245,963描述模块化电极系统和其用于促进将生物分子引入身体或植物中的选定组织的细胞中的用途。模块化电极系统包括多个针电极;皮下注射针;提供从可程序恒流脉冲控制器至多个针电极的导电链路的电连接器;和电源。操作员可以抓住安装在支撑结构上的多个针电极并将它们牢固地插入身体或植物中的选定组织中。接着经由皮下注射针将生物分子递送至选定组织中。可程序恒流脉冲控制器被激活并且将恒流电脉冲施加于多个针电极上。所施加的恒流电脉冲有助于将生物分子引入多个电极之间的细胞中。美国专利号7,245,963的全部内容特此以引用方式并入。

[0392] 美国专利公开2005/0052630描述一种电穿孔装置,其可用于有效促进将生物分子引入身体或植物中选定组织的细胞中。电穿孔装置包括电动装置(“EKD装置”),其操作由软

件或韧体指定。EKD装置根据用户对脉冲参数的控制和输入,在阵列中的电极之间产生一系列可程序恒流脉冲模式,并允许储存和采集电流波形数据。电穿孔装置还包括具有针电极阵列的可更换电极盘、用于注射针的中央注射通道和可移除的引导盘(参见,例如美国专利公开2005/0052630,其特此以引用方式并入)。

[0393] 美国专利号7,245,963和美国专利公开号2005/0052630中描述的电极阵列和方法不仅适于深入渗透至组织(诸如肌肉)中,而且适于其他组织或器官。由于电极阵列的配置,注射针(用于递送所选生物分子)还完全插入靶器官中,并且注射在由电极预先划定的区域中垂直于靶组织进行。

[0394] 通常,体内细胞电穿孔所需的电场通常与体外细胞所需的电场大小相似。在一个实施方案中,电场的大小范围为大约10V/cm至约1500V/cm,优选地为约300V/cm至1500V/cm并且优选地为约1000V/cm至1500V/cm。替代地,较低的场强(约10V/cm至100V/cm,并且更优选约25V/cm至75V/cm)下,脉冲长度较长。例如,当标称电场为约25-75V/cm时,脉冲长度优选地为约10毫秒。

[0395] 脉冲长度可为约10s至约100ms。可以有任何所需数量的脉冲,通常为每秒1至100个脉冲。脉冲组之间的延迟可为任何所需时间,诸如一秒。波形、电场强度和脉冲持续时间还可视取决于细胞类型和有待经由电穿孔进入细胞的分子类型。

[0396] 还涵盖合并有电化学阻抗谱法(“EIS”)的电穿孔装置。此类装置提供有关体内的实时信息,特别是炎症组织电穿孔效率,以允许优化条件。合并有EIS的电穿孔装置的实例可见于例如WO2016/161201中,所述文献特此以引用方式并入。

[0397] 还可通过等离子体电穿孔(也称为雪崩转染(avalanche transfection))来增强本发明所涵盖的非病毒递送载体的摄取。简言之,微秒放电在电极表面产生空化微泡。同与常规电穿孔相关的扩散介导的转运相比,由坍塌的微泡与磁场相结合产生的机械力有助于提高跨细胞膜的转运效率。等离子体电穿孔技术描述于美国专利号7,923,251和8,283,171中。本领域还可用于体内转化细胞(Chaiberg等人,2006,Investigative Ophthalmology& Visual Science 47:4083-4090;Chaiberg等人,美国专利号8,101 169,颁布于2012年1月24日)。

[0398] 还预期其他替代电穿孔技术。还可使用冷等离子体进行体内质粒递送。等离子体为物质的四种基本状态之一,其他三种状态分别为固态、液态和气态。等离子体为未结合的正和负粒子的电中性介质(即,等离子体的总电荷大致为零)。等离子体可通过加热气体或使其经受强电磁场(以激光或微波发生器施加)产生。这会减少或增加电子数量,产生称为离子的带正电或负电的粒子(Luo等人,1998,Phys.Plasma5:2868-2870),并伴有分子键的解离(如果存在)。

[0399] 冷等离子体(即非热等离子体)是通过将脉冲高压信号传送至合适的电极而产生的。冷等离子体装置可采用气体喷射装置或电介质阻挡放电(DBD)装置的形式。低温等离子体由于在相对较低气体温度下提供等离子体而引起了极大的热情与关注。在此类温度下提供等离子体是多种应用的兴趣所在,包括伤口愈合、抗细菌过程、各种其他医学疗法和灭菌。如前所述,冷等离子体(即非热等离子体)是通过将脉冲高压信号传送至合适的电极而产生的。冷等离子体装置可采用气体喷射装置、电介质阻挡放电(DBD)装置或多频高谐波电源的形式。

[0400] 电介质阻挡放电装置依靠不同的过程来产生冷等离子体。电介质阻挡放电(DBD)装置包含至少一个由介电层覆盖的导电电极。电返回路径由可由经历冷等离子体处理的靶基板提供的接地或通过为电极提供内置接地而形成。电介质阻挡放电装置的能量可由高压电源提供,诸如上文所提及的。更一般地,能量以脉冲DC电压形式输入电介质阻挡放电装置以形成等离子体放电。借助于介电层,放电与导电电极分离,并且减少电极蚀刻和气体加热。脉冲DC电压的振幅和频率可以变化,以实现不同的操作状态。合并有此类冷等离子体产生原理的任何装置(例如,DBD电极装置)落在本发明所涵盖的各种实施方案的范围内。

[0401] 在某些说明性实施方案中,使用电穿孔装置递送编码本发明所涵盖的抗CD39抗体剂的转基因构建体,所述电穿孔装置包括:施用器;从所述施用器延伸的多个电极,所述电极与覆盖区域相联;与电极电通信的电源,所述电源被配置以向覆盖区域内的细胞产生一个或多个电穿孔信号;和耦合至电极的导向构件,其中所述导向构件被配置以调整电极的覆盖区域。电极的至少一部分可以圆锥形布置定位在施用器内。所述一个或多个电穿孔信号可以各自与电场相联。所述装置可还包括耦合至电源和电极的电位计。电位计可被配置成将电场实质上维持在预定范围内。

[0402] 所述一个或多个电穿孔信号可以各自与电场相联。所述装置可还包括耦合至电源和电极的电位计。电位计可被配置成将电场维持在预定范围内,以便实质上防止覆盖区域内的细胞的永久性损伤和/或实质上使疼痛减至最低。例如,电位计可被配置成将电场维持在约1300V/cm。

[0403] 电源可向第一电极提供第一电信号并向第二电极提供第二电信号。第一电信号与第二电信号可组合以产生具有拍频的波。第一电信号和第二电信号可各自具有单极波形和双极波形中的至少一者。第一电信号可具有第一频率和第一振幅。第二电信号可具有第二频率和第二振幅。第一频率可与第二频率不同或相同。第一振幅可与第二振幅不同或相同。

[0404] 在某些实施方案中,本发明提供一种用于治疗患有炎症性疾患或患有嗜酸性粒细胞增多症的受试者的方法,所述方法包括:用有效剂量的编码抗CD39抗体的质粒注射炎症组织(或邻近组织);和向靶组织施用电穿孔疗法。在某些实施方案中,电穿孔疗法还包括在约100微秒至约20毫秒的脉冲宽度上施用至少一个约200V/cm至约1500V/cm的电压脉冲。

[0405] 在某些实施方案中,质粒(或第二电穿孔质体)进一步编码至少一种或多种额外免疫抑制生物制剂,诸如阿达木单抗(adalimumab)、赛妥珠单抗(certolizumab)、依那西普(etanercept)、戈利木单抗(golimumab)、英夫利昔单抗(infliximab)、利生珠单抗(risankizumab)和优特克单抗(ustekinumab)。

[0406] 用于递送编码抗CD39抗体的核酸构建体的脂质和聚阳离子分子

[0407] 外来核酸(包括mRNA)的脂质介导的核酸递送和表达在体外和体内均非常成功。基于脂质的非病毒制剂提供腺病毒基因疗法的一种替代方法。目前的体内脂质递送方法使用皮下、皮内、肺、胃肠道、粘膜下、滑膜内、鞘内或颅内注射。脂质制剂的进步提高了体内基因转移的效率(参见PCT申请WO 98/07408)。例如,由等摩尔比率的1,2-双(油酰氧基)-3-(三甲基铵基)丙烷(DOTAP)与胆固醇构成的脂质制剂可显著增强全身性体内基因转移。DOTAP:胆固醇脂质制剂形成称为“三明治脂质体”的独特结构。据报导,此制剂将DNA“夹在”内陷的双层或“花瓶”结构之间。这些脂质结构的有益特征包括正p、胆固醇的胶体稳定性、二维核酸包装和提高的血清稳定性。

[0408] 阳离子脂质体技术是基于两亲性脂质的能力,即具有带正电的头基和疏水性脂质尾,由此结合至带负电的DNA或RNA并形成通常通过胞吞作用进入细胞的颗粒。一些阳离子脂质体还含有中性共脂质,认为其可增强哺乳动物细胞对脂质体的摄取。类似地,其他聚阳离子诸如聚-l-赖氨酸和聚乙烯亚胺通过电荷相互作用与核酸复合,并有助于DNA或RNA缩合成纳米颗粒,所述纳米颗粒随后成为胞内体介导的摄取的受质。这些阳离子-核酸复合物技术中的几种已开发为潜在的临床产物,包括与质粒DNA(pDNA)、寡脱氧核苷酸和各种形式的合成RNA形成的复合物。

[0409] 本文所公开的核酸构建体可与用于增强细胞摄取的聚阳离子分子缔合。核酸构建体与聚阳离子分子的复合还有助于包装构建体,使其尺寸减小,据信此有助于细胞摄取。一旦在胞内体中,复合物便会因较低的pH值而解离,并且聚阳离子分子可破坏胞内体的膜,以促进DNA在降解前逃逸至细胞质中。初步数据显示,当与聚阳离子分子聚赖氨酸或聚乙烯亚胺复合时,相较于DC,核酸构建体实施方案具有增强的SC摄取。

[0410] 可用于与核酸构建体复合的聚阳离子分子的一个实例包括细胞穿透肽(CPP),实例包括聚赖氨酸(如上所述)、聚精氨酸和Tat肽。细胞穿透肽(CPP)为可结合至DNA的小肽,并且一旦释放,便会穿透细胞膜以促进DNA从胞内体逃逸至细胞质。CPP的另一个实例属于27个残基的嵌合肽,称为MPG,不久前显示它以稳定方式结合ss-和ds-寡核苷酸,产生非共价复合物,所述复合物保护核酸免于被DNA酶降解并在体外有效地将寡核苷酸递送至细胞(Mahapatro等人,2011,JNanobiotechnol 9:55)。当检查不同的肽:DNA比率以及10:1和5:1的比率(分别为150nm和1um)时,复合物形成约150nm至1um的小颗粒。另一种CPP属于修饰的四肽(含有胍基羰基吡咯(GCP)基团的四赖氨酸(TL-GCP)),据报导它以高亲和力结合至6.2kb质粒DNA,产生700-900nm的带正电的聚集体(Li等人,2015,Agnew Chem Int Ed Enl,54(10):2941-4)。RNA还可由所述聚阳离子分子复合以用于体内递送。

[0411] 可与本文所述的核酸构建体复合的聚阳离子分子的其他实例包括可作为JETPRIME®和In Vivo JET(Polypus-transfection,S.A.,Illkirch,France)可商购获得的聚阳离子聚合物。

[0412] VI.使用方法和药物组合物

[0413] 本发明所涵盖的抗CD39抗体可用于多种应用,包括但不限于治疗性治疗方法,诸如用于炎症性疾病和病症以及通常以嗜酸性粒细胞增多症为特征的疾患的疗法。在某些实施方案中,本文所述的抗CD39抗体可用于不活化或以其他方式减少嗜酸性粒细胞介导的炎症和免疫反应方面以及全身或局部嗜酸性粒细胞增多症或药物诱发的嗜酸性粒细胞增多症。

[0414] 一般而言,“嗜酸性粒细胞”涵盖一类造血细胞。在某些实施方案中,本发明所涵盖的嗜酸性粒细胞(i)为CD39+嗜酸性粒细胞;(ii)共表达选自由以下组成的组的一种或多种细胞表面标志物:CD45、CD11b、Siglec-8、IL-5受体的α亚基(IL-5Rα或CD125)、IL-3受体的α亚基(IL-3Rα或CD123)、IL-4R、IL-9R、IL-13R、IL-14R、ST2(IL-33R)、PIRA、PIRB、L-选择素、EMR1、CCR3(CD193)和CRTh2(CD294);(iii)为CD45+CD11b+嗜酸性粒细胞;和/或(iv)为CD45+CD11b+Siglec-8+嗜酸性粒细胞。

[0415] 在某些实施方案中,主题靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂可用于治疗胃肠道炎症性病症。本公开提供施用包含靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂的药物组合物以治疗、预防、

改善或延迟与胃肠道炎症性病症相关的症状和/或炎症的方法。在一些实施方案中,胃肠道炎症性病症在食管中。在一些实施方案中,胃肠道炎症性病症为嗜酸性粒细胞性食管炎。在一些实施方案中,患者呈现出食管功能和形态的实质改善,包括食管沟减少、食管局灶性狭窄减少、食管直径增加、食管顺应性提高、食管体可舒张性增加、吞咽更容易、水肿减少、血管分布改善、环减少、渗出液减少或不存在、和/或不存在狭窄。

[0416] 为了说明,靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂可用作嗜酸性粒细胞性食管炎(EoE)治疗的一部分,EoE为一种过敏/免疫疾患,同时受试者患有食管炎症和/或肿胀,影响患者吞咽食物的能力,从而导致营养不良和发育停滞。通常,嗜酸性粒细胞未见于食管中,但在EoE中,这些细胞会积聚并产生肿胀,从而缩小食管的内径,使吞咽和进食变得非常困难。患者经常会经历食物嵌塞的情况,即食物会滞留在患者的食管中,这可能需要紧急治疗。由于吞咽困难和害怕食物嵌塞,许多EoE患者只吃软食,诸如酸奶、汤和冰沙。在EoE的严重病例中,患者接受胃肠外营养(例如,静脉内喂养),这可以提供所需的营养物,但会限制患者活动,并可能导致导管部位的感染增加。

[0417] 在某些实施方案中,本发明提供施用包含靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂的药物组合物以治疗与嗜酸性粒细胞性食管炎相关的症状和/或炎症的方法。药物组合物可局部递送至食管,包括通过粘膜下注射以及全身递送,仅用于说明。在核酸编码的靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂的情况下,可将核酸转染至包括嗜酸性粒细胞浸润部分的食管组织或其附近的组织中。

[0418] 在某些实施方案中,靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂可为包括以下的治疗的一部分:一种或多种糖皮质激素、白三烯拮抗剂、肥大细胞稳定剂、免疫调节剂、质子泵抑制剂(PPI)。

[0419] 在一个实施方案中,根据本公开的抗体或其抗原结合片段或制剂用于治疗慢性炎症性疾患,其中所述疾患与不适当的炎症相关。此类疾患包括但不限于类风湿性关节炎(RA)、自体免疫疾患、炎症性肠病、非愈合伤口、多发性硬化症、癌症、动脉粥样硬化、血管炎、舍格伦氏病、糖尿病、红斑狼疮(包括全身性红斑狼疮)、哮喘、纤维化疾病(包括肝纤维化)、肺纤维化、和UV损伤和牛皮癣。

[0420] 在某些实施方案中,靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂可为慢性炎症性疾病或病症治疗的一部分。慢性炎症为与上述许多疾病相关的使人衰弱的严重疾患,并且特征为感染或损伤部位的持续炎症,或来源不明的持续炎症,或与免疫反应改变有关,诸如自体免疫疾病。

[0421] 因此,在一个实施方案中,靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂用于治疗慢性炎症性疾患,其中所述疾患与任何同不适当的炎症相关的疾患有关。此类疾患包括但不限于类风湿性关节炎(RA)、自体免疫疾患、炎症性肠病、非愈合伤口、多发性硬化症、癌症、动脉粥样硬化、血管炎、舍格伦氏病、糖尿病、红斑狼疮(包括全身性红斑狼疮)、哮喘、纤维化疾病(包括肝纤维化)、肺纤维化、UV损伤和牛皮癣。

[0422] 在某些实施方案中,靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂用于治疗选自中轴型脊椎关节病、原发性胆汁性胆管炎和过敏的疾患,所述过敏是例如食物过敏,诸如花生过敏或花粉过敏。

[0423] 根据本发明的靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂可用于治疗炎症性或阻塞性气道

疾病,导致例如以下方面的减轻:组织损伤、气道炎症、支气管高反应性、重塑或疾病进展。本发明适用的炎症性或阻塞性气道疾病包括任何类型或起因的哮喘,包括内源性(非过敏性)哮喘和外源性(过敏性)哮喘、轻度哮喘、中度哮喘、重度哮喘、支气管炎性哮喘、运动诱发的哮喘、职业性哮喘和细菌感染后诱发的哮喘。哮喘的治疗还应理解为包括对受试者的治疗,所述受试者例如小于4岁或5岁,呈现出喘息症状并被诊断或可诊断为“喘息婴儿”,即一种已确立的主要医学关注的患者类别并且现在常被确定为初期或早期哮喘患者。

[0424] 治疗哮喘的预防功效将由以下来证明:例如急性哮喘症状发作或支气管收缩发作的频率或严重程度降低、肺功能改善或气道高反应性改善。其可进一步由对其他对症疗法的需求减少来证明,诸如用于或旨在限制或中止症状发作的疗法,例如抗炎药或支气管扩张药。哮喘的预防益处在容易“晨降(morning dipping)”的受试者中尤其明显。“晨降”为一种公认的哮喘综合征,对相当大比例的哮喘患者而言是常见的并且以哮喘发作为特征,例如在凌晨约4点至6点之间,即通常与任何先前施用的对症哮喘疗法相距很远的时间。

[0425] 本发明的靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂可用于本发明适用的其他炎症性或阻塞性气道疾病和疾患,所述疾病和疾患包括急性肺损伤(ALI)、成人/急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、慢性阻塞性肺、气道或肺部疾病(COPD、COAD或COLD),包括慢性支气管炎或与其相关的呼吸困难、肺气肿以及因其他药物疗法(特别是其他吸入药物疗法)所致的气道高反应性恶化。本发明还适用于治疗任何类型或起因的支气管炎,包括但不限于急性、花生性、卡他性(catarrhal)、格鲁布性(croupus)、慢性或结核性支气管炎。本发明适用的其他炎症性或阻塞性气道疾病包括任何类型或起因的尘肺病(一种炎症性、通常是职业性的肺病,经常伴有慢性或急性气道阻塞,并且由反复吸入粉尘引起),包括例如矾土沉着病、炭末沉着症、石棉沉着病、石硝沉着病、驼鸟毛尘肺(ptilosis)、铁质沉着病、硅粉沉着病、烟草末沉着病和棉屑沉着病。

[0426] 关于它们的抗炎活性,特别是与抑制嗜酸性粒细胞活性有关,本发明的靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂还可用于治疗嗜酸性粒细胞相关病症,例如,嗜酸性粒细胞增多症,特别是嗜酸性粒细胞相关的气道病症(例如,涉及肺组织的病态嗜酸性粒细胞浸润),包括高嗜酸性粒细胞病症(因为它影响气道和/或肺),以及例如由洛夫勒综合征(Loffler’s syndrome)引起或伴随的气道嗜酸性粒细胞相关病症、嗜酸性粒细胞性肺炎、寄生虫(特别是后生动物)感染(包括热带嗜酸性粒细胞增多症)、支气管肺曲菌病、结节性多动脉炎(包括Churg-Strauss二氏综合征)、嗜酸性粒细胞性肉芽肿病和由药物反应引起的影响气道的嗜酸性粒细胞相关病症。

[0427] 本发明的靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂还可用于治疗皮肤的炎症性或过敏性疾患,例如牛皮癣、接触性皮炎、特应性皮炎、斑秃、多形性红斑、疱疹样皮炎、硬皮病、白癜风、超敏性血管炎、荨麻疹、大疱性类天疱疮、红斑狼疮、全身性红斑狼疮、寻常型天疱疮、落叶型天疱疮、副肿瘤天疱疮、获得性大疱性表皮松解症、寻常痤疮和其他炎症性或过敏性皮肤疾患。

[0428] 本发明的靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂也可用于治疗其他疾病或疾患,诸如具有炎症性组分的疾病或疾患,例如治疗眼部疾病和疾患,诸如眼过敏、结膜炎、干燥性角膜结膜炎和春季结膜炎;累和鼻子的疾病,包括过敏性鼻炎;以及涉及自体免疫反应或具有自体免疫组分或病因的炎症性疾病,包括自体免疫血液病症(例如,溶血性贫血、再生障碍性

贫血、纯红细胞性贫血和特发性血小板减少症)、全身性红斑狼疮、类风湿性关节炎、多发性软骨炎、硬皮病、魏格纳肉芽肿病(Wegener granulomatosis)、皮肌炎、慢性活动性肝炎、重症肌无力、史蒂文-约翰逊综合征(Steven-Johnson syndrome)、特发性口炎、自体免疫炎症性肠病(例如溃疡性结肠炎和克罗恩氏病)、肠躁综合征、腹腔疾病、牙周炎、透明膜病、肾脏疾病、肾小球疾病、酒精性肝病、多发性硬化症、内分泌性眼病、格雷夫氏病(Grave's disease)、结节病、肺泡炎、慢性过敏性肺炎、多发性硬化症、原发性胆汁性肝硬化、葡萄膜炎(前部和后部)、舍格伦氏综合征、干燥性角膜结膜炎和春季角膜结膜炎、间质性肺纤维化、牛皮癣性关节炎、全身性幼年特发性关节炎、隐热蛋白相关周期性综合征、肾炎、血管炎、憩室炎、间质性膀胱炎、肾小球性肾炎(伴或不伴肾病综合征,例如包括特发性肾病综合征或微小病变肾病)、慢性肉芽肿病、子宫内膜异位症、钩端螺旋体病、肾病、青光眼、视网膜疾病、衰老、头痛、疼痛、复杂区域疼痛综合征、心脏肥大、肌肉萎缩、分解代谢紊乱、肥胖、胎儿发育迟缓、高胆固醇血症、心脏病、慢性心脏衰竭、间皮瘤、无汗性外胚层发育不良、白塞氏病(Behcet's disease)、色素失禁症、佩吉特氏病(Paget's disease)、胰脏炎、遗传性周期性发热综合征、哮喘(过敏性和非过敏性、轻度、中度、重度、支气管炎性和运动诱发的)、急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征、嗜酸性粒细胞增多症、超敏反应、过敏反应、鼻窦炎、眼部过敏、二氧化硅诱发的疾病、COPD(损伤、气道炎症、支气管高反应性、重塑或疾病进展的减轻)、肺病、囊性纤维化、酸诱发的肺损伤、肺动脉高压、多发性神经病、白内障、与全身性硬化症相关的肌肉炎症、包涵体肌炎、重症肌无力、甲状腺炎、艾迪生病(Addison's disease)、扁平苔藓、1型糖尿病或2型糖尿病、阑尾炎、特应性皮炎、哮喘、过敏、睑缘炎、细支气管炎、支气管炎、滑囊炎、宫颈炎、胆管炎、胆囊炎、慢性移植物排斥、结肠炎、结膜炎、克罗恩氏病、膀胱炎、泪腺炎、皮炎、皮肌炎、脑炎、心内膜炎、子宫内膜炎、肠炎、小肠结肠炎、上髁炎、附睾炎、筋膜炎、纤维组织炎、胃炎、胃肠炎、Henoch-Schonlein二氏紫癜病、肝炎、化脓性汗腺炎、免疫球蛋白A肾病、间质性肺病、喉炎、乳房炎、脑膜炎、脊髓炎、心肌炎、肌炎、肾炎、卵巢炎、睾丸炎、骨炎、耳炎、胰脏炎、腮腺炎、心包炎、腹膜炎、咽炎、胸膜炎、静脉炎、肺炎(pneumonitis)、肺炎(pneumonia)、多发性肌炎、直肠炎、前列腺炎、肾盂肾炎、鼻炎、输卵管炎、鼻窦炎、口腔炎、滑膜炎、肌腱炎、扁桃体炎、溃疡性结肠炎、葡萄膜炎、阴道炎、血管炎或外阴炎。

[0429] 在一些实施方案中,可根据本发明的方法治疗的炎症性疾病为皮肤疾病。在一些实施方案中,炎症性皮肤疾病选自接触性皮炎、特应性皮炎、斑秃、多形性红斑、疱疹样皮炎、硬皮病、白癜风、超敏性血管炎、荨麻疹、大疱性类天疱疮、寻常型天疱疮、落叶型天疱疮、副肿瘤天疱疮、获得性大疱性表皮松解症和其他炎症性或过敏性皮肤疾患。

[0430] 在一些实施方案中,可根据本发明方法治疗的炎症性疾病选自急性和慢性痛风、慢性痛风性关节炎、牛皮癣、牛皮癣性关节炎、类风湿性关节炎、幼年型类风湿性关节炎、全身性幼年特发性关节炎(SJIA)、隐热蛋白相关周期性综合征(CAPS)和骨关节炎。

[0431] 在某些实施方案中,本发明的靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂也可用于治疗药物诱发的嗜酸性粒细胞增多症,诸如继发于ICI疗法和/或包括但不限于以下的其他药物的嗜酸性粒细胞哮喘和高嗜酸性粒细胞病症:抗疟剂(例如乙胺嘧啶和氨苯砜)、青霉素、糖肽、头孢菌素、磺酰胺、四环素(尤其是米诺环素)、呋喃妥因、抗结核病疗法、ACE抑制剂、色氨酸、抗惊厥剂(例如苯妥英、卡马西平和苯巴比妥)、NSAID、金、H_2-受体拮抗剂、质子泵抑制

剂、氨基水杨酸盐和氯磺丙脲。

[0432] 本发明提供组合物,其包含靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂,诸如本文所述的抗CD39抗体。本发明也提供药物组合物,其包含本文所述的抗CD39抗体和药学上可接受的媒介物。在一些实施方案中,药物组合物可用于免疫疗法。在一些实施方案中,药物组合物可用于炎症性疾病和/或自体免疫疾病。在一些实施方案中,药物组合物可用于治疗人患者。

[0433] 通过将本发明所涵盖的纯化剂与药学上可接受的媒介物(例如,载剂或赋形剂)组合来制备制剂以供储存和使用。本领域技术人员通常认为药学上可接受的载剂、赋形剂和/或稳定剂为制剂或药物组合物的非活性成分。

[0434] 在一些实施方案中,抗CD39抗体被冻干和/或以冻干形式储存。在一些实施方案中,包含本文所述的抗CD39抗体的制剂被冻干。

[0435] 合适的药学上可接受的媒介物包括但不限于无毒缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;盐类,诸如氯化钠;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂,诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵、氯化六羟季铵、苯扎氯铵、苄索氯铵、苯酚、丁醇或苯甲醇、对羟基苯甲酸烷基酯诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯、儿茶酚、间苯二酚、环己醇、3-戊醇和间甲酚;低分子量多肽(例如,少于约10个氨基酸残基);蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;碳水化合物,诸如单糖、二糖、葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖类,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐相对离子,诸如钠;金属复合物,诸如锌-蛋白质复合物;以及非离子表面活性剂,诸如TWEEN或聚乙二醇(PEG)。(Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第22版,2012,Pharmaceutical Press,London.)。

[0436] 本发明所涵盖的药物组合物可以多种方式施用以用于局部或全身治疗。施用可为通过表皮或透皮贴剂、软膏剂、洗剂、乳膏剂、凝胶剂、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和散剂的局部施用;通过吸入或吹入散剂或气溶胶的肺部施用,包括通过雾化器、气管内和鼻内;经口;或胃肠外,包括静脉内、动脉内、间质内、皮下、腹膜内、肌内(例如,注射或输注)或颅内(例如,鞘内或脑室内)和滑膜内。

[0437] 治疗性制剂可呈单位剂型。此类制剂包括片剂、丸剂、胶囊、散剂、颗粒剂、在水或非水介质中的溶液或悬浮液、或栓剂。在诸如片剂的固体组合物中,主要活性成分与药物载剂混合。常规压片成分包括玉米淀粉、乳糖、蔗糖、山梨醇、滑石粉、硬脂酸、硬脂酸镁、磷酸二钙或树胶以及稀释剂(例如水)。它们可用于形成固体预配制组合物,所述组合物含有本发明所涵盖的化合物或其无毒药学上可接受的盐的均匀混合物。接着将固体预配制组合物细分为上述类型的单位剂型。可对制剂或组合物的片剂、丸剂等进行包衣或以其他方式混合以提供具有延长作用优点的剂型。例如,片剂或丸剂可包含由外部组分覆盖的内部组合物。此外,这两种组分可由肠溶层隔开,所述肠溶层起到抵抗崩解的作用,并允许内部组分完整地通过胃或延迟释放。多种材料可用于此类肠溶层或包衣,此类材料包括一些聚合酸和聚合酸与诸如虫胶、鲸蜡醇和乙酸纤维素的材料的混合物。

[0438] 抗CD39抗体也可包埋在微胶囊中。此类微胶囊例如通过凝聚技术或通过界面聚合来制备,例如分别在胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)或巨乳液中的羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊,如

Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第22版,2012,Pharmaceutical Press,London中所述。

[0439] 在某些实施方案中,药物制剂包括与脂质体复合的抗CD39抗体。产生脂质体的方法为本领域技术人员已知。例如,一些脂质体可通过用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物反相蒸发而生成。脂质体可经由确定孔径的过滤器挤出,以产生具有所需直径的脂质体。

[0440] 在某些实施方案中,可产生包含抗CD39抗体的持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有抗CD39抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,其中基质呈成型制品的形式(例如,薄膜或微胶囊)。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶诸如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇)、聚丙交酯、L-谷氨酸与7-L-谷氨酸乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如LUPRON DEPOT(由乳酸-乙醇酸共聚物和乙酸亮丙瑞林构成的可注射微球)、蔗糖乙酸异丁酸酯和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0441] 在某些实施方案中,除了施用抗CD39抗体之外,所述方法或治疗还包括施用至少一种额外免疫反应刺激剂。在一些实施方案中,额外免疫反应刺激剂包括但不限于群落刺激因子(例如,粒细胞-巨噬细胞群落刺激因子(GM-CSF)、巨噬细胞群落刺激因子(M-CSF)、粒细胞群落刺激因子(G-CSF)、干细胞因子(SCF))、白介素(例如IL-1、IL2、IL-3、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18)、检查点抑制剂、阻断免疫抑制功能的抗体(例如抗CTLA-4抗体、抗CD28抗体、抗CD3抗体)、toll样受体(例如TLR4、TLR7、TLR9)或B7家族的成员(例如,CD80、CD86)。可在施用抗CD39抗体之前、同时和/或之后施用额外免疫反应刺激剂。也提供包含抗CD39抗体和免疫反应刺激剂的药物组合物。在一些实施方案中,免疫反应刺激剂包含1、2、3或更多种免疫反应刺激剂。

[0442] 在某些实施方案中,除了施用抗CD39抗体之外,所述方法或治疗还包括施用至少一种额外治疗剂。可在施用抗CD39抗体之前、同时和/或之后施用额外治疗剂。也提供包含抗CD39抗体和额外治疗剂的药物组合物。在一些实施方案中,至少一种额外治疗剂包含1、2、3或更多种额外治疗剂。

[0443] 两种或更多种治疗剂的组合疗法通常使用通过不同作用机制发挥作用的剂,但并非必需的。使用具有不同作用机制的剂的组合疗法可能会产生相加或协同效应。组合疗法可允许比单一疗法中使用的每种剂更低的剂量,从而减少毒副作用和/或增加抗CD39抗体的治疗指数。在一些实施方案中,组合疗法包含抑制免疫激活或抑制免疫刺激信号的治疗剂,或者可为促进炎症损伤部位的正常组织再生的剂。

[0444] 在某些实施方案中,本发明提供一种治疗炎症性疾病、病症或疾患的方法,其通过向有需要的患者施用靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂和一种或多种额外治疗剂来进行。此类额外治疗剂可为小分子或重组生物剂,并且包括例如对乙酰氨基酚、非类固醇抗炎药物(NSAIDS)诸如阿司匹林、伊布洛芬、萘普生、依托度酸(etodolac,Lodine®)和塞来昔布,秋水仙碱(Colcrys®),皮质类固醇诸如泼尼松、泼尼松龙、甲泼尼松龙、氢化可的松等,丙磺舒,异嘌呤醇,非布索坦(febuxostat,Uloric®),柳氮磺胺吡啶(Azulfidine®),抗疟剂诸如羟氯喹(Plaquenil®)和氯喹(Aralen®)、甲氨蝶呤(Rheumatrex®)、金盐诸如硫葡萄糖金(Solganal®)、硫苹果酸金(Myochrysine®)和金诺芬(auranofin,Ridaura®),D-青

霉胺(Depen®或Cuprimine®),硫唑嘌呤(Imuran®),环磷酰胺(Cytoxan®),苯丁酸氮芥(Leukeran®),环孢素(Sandimmune®),来氟米特(leflunomide,Arava®)和"抗TNF"剂诸如依那西普(etanercept,Enbrel®)、英夫利昔单抗(infliximab,Remicade®)、戈利木单抗(golimumab,Simponi®)、赛妥珠单抗(certolizumab pegol,Cimzia®)和阿达木单抗(adalimumab,Humira®),"抗-IL-1"剂诸如阿那白滞素(anakinra,Kineret®)和利洛西普(rilonacept,Arcalyst®)、卡纳单抗(canakinumab,Ilaris®),"抗Jak"抑制剂诸如托法替尼(tofacitinib),抗体诸如利妥昔单抗(rituximab,Rituxan®),"抗T细胞"剂诸如阿巴西普(abatacept,Orencia®),"抗IL-6"剂诸如托珠单抗(tocilizumab,Actemra®),双氯芬酸,可的松,透明质酸(Synvisc®或Hyalgan®),单克隆抗体诸如他尼珠单抗(tanezumab),抗凝剂诸如肝素(Calcinparine®或Liquaemin®)和华法林(Coumadin®),止泻剂诸如苯乙啶(Lomotil®)和洛哌丁胺(loperamide,Imodium®),胆汁酸结合剂诸如消胆胺、阿洛司琼(alosetron,Lotronex®)、鲁比前列酮(lubiprostone,Amitiza®),泻药诸如镁乳、聚乙二醇(MiraLax®)、Dulcolax®、Correctol®和Senokot®,抗胆碱剂或抗痉挛剂诸如双环胺(Bentyl®)、Singulair®,β-2激动剂诸如沙丁胺醇(Ventolin®HFA、Proventil®HFA)、左沙丁胺醇(Xopenex®)、间丙肾上腺素(Alupent®)、乙酸吡布特罗(pirbuterol acetate,Maxair®)、硫酸特布他林(terbutaline sulfate,Brethaire®)、昔萘酸沙美特罗(salmeterol xinafoate,Serevent®)和福莫特罗(formoterol,Foradil®),抗胆碱能剂诸如溴化异丙托铵(Atrovent®)和噻托溴铵(tiotropium,Spiriva®),吸入性皮质类固醇诸如二丙酸倍氯米松(Beclovent®、Qvar®和Vanceril®)、丙酮特安皮质醇(Azmacort®)、莫美他松(mometasone,Asthmanex®)、布地奈德(budesonide,Pulmocort®)和氟尼缩松(flunisolide,Aerobid®)、Afviar®、Symbicort®、Dulera®、色甘酸钠(Intal®),甲基黄嘌呤诸如茶碱(Theo-Dur®、Theolair®、Slo-bidt、Uniphyl®、Theo-24®)和氨茶碱,IgE抗体诸如奥马珠单抗(omalizumab,Xolair®),核苷逆转录酶抑制剂诸如齐多夫定(zidovudine,Retrovir®)、阿巴卡韦(abacavir,Ziagen®)、阿巴卡韦/拉米夫定(abacavir/lamivudine,Epzicom®)、阿巴卡韦/拉米夫定/齐多夫定(Trizivir®)、去羟肌苷(didanosine,Videx®)、恩曲他滨(emtricitabine,Emtriva®)、拉米夫定(Epivir®)、拉米夫定/齐多夫定(Combivir®)、司他夫定(stavudine,Zerit®)和扎西他滨(zalcitabine,Hivid®),非核苷逆转录酶抑制剂诸如地拉韦定(delavirdine,Rescriptor®)、依非韦伦(efavirenz,Sustiva®)、奈韦拉平(nevairapine,Viramune®)和依曲韦林(etravirine,Intelence®),核苷酸逆转录酶抑制剂诸如替诺福韦(tenofovir,Viread®),蛋白酶抑制剂诸如安普那韦(amprenavir,Agenerase®)、阿扎那韦

(atazanavir,Reyataz®)、地瑞那韦(darunavir,Prezista®)、福沙那韦(fosamprenavir,Lexiva®)、茚地那韦(indinavir,Crixivan®)、洛匹那韦(lopinavir)和利托那韦(ritonavir,Kaletra®)、奈非那韦(nelfinavir,Viracept®)、利托那韦(ritonavir,Norvir®)、沙奎那韦(saquinavir,Fortovase®或Invirase®)和替拉那韦(tipranavir,Aptivus®),进入抑制剂诸如恩夫韦地(enfuvirtide,Fuzeon®)和马拉韦罗(maraviroc,Selzentry®),整合酶抑制剂诸如雷特格韦(raltegravir,Isentress®)、多柔比星(doxorubicin,Hydrodaunorubicin®)、长春新碱(Oncovin®)、硼替佐米(bortezomib,Velcade®)和地塞米松(Decadron®)与来那度胺(lenalidomide,Revlimid®)的组合,或其任何组合。

[0445] 在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗痛风的方法,其包括向有需要的患者施用靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂和一种或多种选自以下的额外治疗剂:非类固醇抗炎药物(NSAIDS)诸如阿司匹林、伊布洛芬、萘普生、依托度酸(Lodine®)和塞来昔布,秋水仙碱(Colcrys®),皮质类固醇诸如泼尼松、泼尼松龙、甲泼尼松龙、氢化可的松等,丙磺舒,异嘌呤醇和非布索坦(Uloric®)。

[0446] 在另一个实施方案中,本发明提供一种治疗类风湿性关节炎的方法,其包括向有需要的患者施用靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂和一种或多种选自以下的额外治疗剂:非类固醇抗炎药物(NSAIDS)诸如阿司匹林、伊布洛芬、萘普生、依托度酸(Lodine®)和塞来昔布,皮质类固醇诸如泼尼松、泼尼松龙、甲泼尼松龙、氢化可的松等,柳氮磺吡啶(Azulfidine®),抗疟剂诸如羟氯喹(Plaquenil®)和氯喹(Aralen®),甲氨蝶呤(Rheumatrex®),金盐诸如硫葡萄糖金(Solganal®)、硫苹果酸金(Myochrysine®)和金诺芬(Ridaura®),D-青霉胺(Depen®或Cuprimine®),硫唑嘌呤(Imuran®),环磷酰胺(Cytoxan®),苯丁酸氮芥(Leukeran®),环孢菌素(Sandimmune®),来氟米特(Arava®)和“抗TNF”剂诸如依那西普(Enbrel®)、英夫利昔单抗(Remicade®)、戈利木单抗(Simponi®)、赛妥珠单抗(Cimzia®)和阿达木单抗(Humira®),“抗IL-1”剂诸如阿那白滞素(Kineret®)和利洛西普(Arcalyst®),抗体诸如利妥昔单抗(Rituxan®),“抗T细胞”剂诸如阿巴西普(Orencia®)和“抗IL-6”剂诸如托珠单抗(Actemra®)。

[0447] 在一些实施方案中,本发明提供一种治疗骨关节炎的方法,其包括向有需要的患者施用靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂和一种或多种选自以下的额外治疗剂:对乙酰氨基酚,非类固醇抗炎药物(NSAIDS)诸如阿司匹林、伊布洛芬、萘普生、依托度酸(Lodine®)和塞来昔布,双氯芬酸,可的松,透明质酸(Synvisc®或Hyalgan®)和单克隆抗体诸如他尼珠单抗。

[0448] 在一些实施方案中,本发明提供一种治疗狼疮的方法,其包括向有需要的患者施用靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂和一种或多种选自以下的额外治疗剂:对乙酰氨基酚,

非类固醇抗炎药物(NSAIDS)诸如阿司匹林、伊布洛芬、萘普生、依托度酸(Lodine®)和塞来昔布,皮质类固醇诸如泼尼松、泼尼松龙、甲泼尼松龙、氢化可的松等,抗疟剂诸如羟氯喹(Plaquenil®)和氯喹(Aralen®),环磷酰胺(Cytoxan®),甲氨蝶呤(Rheumatrex®),硫唑嘌呤(Imuran®)和抗凝剂诸如肝素(Calcinparine®或Liquaemin®)和华法林(Coumadin®)。

[0449] 在一些实施方案中,本发明提供一种治疗炎症性肠病的方法,其包括向有需要的患者施用靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂和一种或多种选自以下的额外治疗剂:氨水杨酸(Asacol®),柳氮磺胺吡啶(Azulfidine®),止泻剂诸如地芬诺酯(Lomotil®)和洛哌丁胺(Imodium®),胆汁酸结合剂诸如消胆胺、阿洛司琼(Lotronex®)、鲁比前列酮(Amitiza®),泻药诸如镁乳、聚乙二醇(MiraLax®)、Dulcolax®、Correctol®和Senokot®,以及抗胆碱能剂或抗痉挛剂诸如双环胺(Bentyl®),抗TNF疗法,类固醇和抗生素诸如Flagyl或塞普沙辛(ciprofloxacin)。

[0450] 在一些实施方案中,本发明提供一种治疗哮喘的方法,其包括向有需要的患者施用靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂和一种或多种选自以下的额外治疗剂:Singulair®,β-2激动剂诸如沙丁胺醇(Ventolin®HFA、Proventil®HFA)、左旋沙丁胺醇(Xopenex®)、间丙肾上腺素(Alupent®)、乙酸吡布特罗(Maxair®)、硫酸特布他林(Brethaire®)、昔萘酸沙美特罗(Serevent®)和福莫特罗(Foradil®),抗胆碱能剂诸如溴化异丙托铵(Atrovent®)和噻托溴铵(Spiriva®),吸入性皮质类固醇诸如泼尼松、泼尼松龙、二丙酸倍氯米松(Beclovent®、Qvar®和Vanceril®)、曲安奈德(Azmacort®)、莫米松(Asthmanex®)、布地奈德(Pulmocort®)、氟尼缩松(Aerobid®)、Afviar®、Symbicort®和Dulera®,色甘酸钠(Intal®),甲基黄嘌呤诸如茶碱(Theo-Dur®、Theolair®、Slo-bidt、Uniphyl®、Theo-24®)和氨茶碱,以及IgE抗体诸如奥马珠单抗(Xolair®)。

[0451] 在一些实施方案中,本发明提供一种治疗COPD的方法,其包括向有需要的患者施用靶向CD39的嗜酸性粒细胞耗竭剂和一种或多种选自以下的额外治疗剂:β-2激动剂诸如沙丁胺醇(Ventolin®HFA、Proventil®HFA)、左旋沙丁胺醇(Xopenex®)、间丙肾上腺素(Alupent®)、乙酸吡布特罗(Maxair®)、硫酸特布他林(Brethaire®)、昔萘酸沙美特罗(Serevent®)和福莫特罗(Foradil®),抗胆碱能剂诸如溴化异丙托铵(Atrovent®)和噻托溴铵(Spiriva®),甲基黄嘌呤诸如茶碱(Theo-Dur®、Theolair®、Slo-bidt、Uniphyl®、Theo-24®)和氨茶碱,吸入性皮质类固醇诸如泼尼松、泼尼松龙、二丙酸倍氯米松(Beclovent®、Qvar®和Vanceril®)、曲安奈德(Azmacort®)、莫米松(Asthmanex®)、布地奈德(Pulmocort®)、氟尼缩松(Aerobid®)、Afviar®、Symbicort®和Dulera®。

[0452] 对于疾病的治疗,抗CD39抗体的适当剂量取决于以下因素:有待治疗疾病的类型、疾病的严重程度和过程、疾病的反应性、所施用的抗CD39抗体是用于预防性抑或治疗性目

的、先前疗法、患者的临床病史等等，一切均由主治医师决定。抗CD39抗体可施用一次或在持续数天至数月的一系列治疗中施用，或直至实现治愈或达成疾病状态的减轻。最佳给药时间表可根据患者体内药物积聚的测量值计算得出，并且会根据单个剂的相对效力而变化。主治医师可确定最佳剂量、给药方法和重复率。在某些实施方案中，剂量为0.01μg至100mg/kg体重、0.01μg至10mg/kg体重、0.1μg至100mg/kg体重、0.1μg至10mg/kg体重、1μg至100mg/kg体重、1μg至10mg/kg体重、0.01mg至100mg/kg体重、0.01mg至50mg/kg体重、0.01mg至25mg/kg体重、0.01mg至10mg/kg体重、0.01mg至5mg/kg体重、0.1mg至100mg/kg体重、0.1mg至50mg/kg体重、0.1mg至25mg/kg体重、0.1mg至10mg/kg体重、0.1mg至5mg/kg体重、1mg至100mg/kg体重、1mg至50mg/kg体重、1mg至25mg/kg体重、1mg至10mg/kg体重、或1mg至5mg/kg体重。在某些实施方案中，抗CD39抗体的剂量为约0.01mg至约10mg/kg体重。在一些实施方案中，抗CD39抗体的剂量为约0.01mg/kg体重。

[0453] 在一些实施方案中，抗CD39抗体的剂量为约0.025mg/kg体重。在一些实施方案中，抗CD39抗体的剂量为约0.05mg/kg体重。在一些实施方案中，抗CD39抗体的剂量为约0.1mg/kg体重。在一些实施方案中，抗CD39抗体的剂量为约0.25mg/kg体重。在一些实施方案中，抗CD39抗体的剂量为约0.5mg/kg体重。在一些实施方案中，抗CD39抗体的剂量为约1mg/kg体重。在一些实施方案中，抗CD39抗体的剂量为约1.5mg/kg体重。在一些实施方案中，抗CD39抗体的剂量为约2mg/kg体重。在一些实施方案中，抗CD39抗体的剂量为约2.5mg/kg体重。在一些实施方案中，抗CD39抗体的剂量为约5mg/kg体重。在一些实施方案中，抗CD39抗体的剂量为约7.5mg/kg体重。在一些实施方案中，抗CD39抗体的剂量为约10mg/kg体重。在一些实施方案中，抗CD39抗体的剂量为约25mg/kg体重。在一些实施方案中，剂量为本文所述的剂量限定的范围，诸如0.025mg/kg至25mg/kg体重，或介于两者之间的任何范围，诸如2-25mg/kg体重、5-10mg/kg等。在某些实施方案中，剂量可每天一次或多次、每周三次、每周两次、每周、每月或每年给予。在某些实施方案中，抗CD39抗体是每周一次、每两周一次、每三周一次或每四周一次给予的。

[0454] 在一些实施方案中，抗CD39抗体可以初始较高“负荷”剂量施用，接着为一个或多个较低剂量。在一些实施方案中，施用频率也可改变。在一些实施方案中，给药方案可包含施用初始剂量，接着每周一次、每两周一次、每三周一次或每月一次施用额外剂量(或“维持”剂量)。例如，给药方案可包含施用初始负荷剂量，接着为例如初始剂量的一半的每周维持剂量。在一些实施方案中，给药方案可包含施用初始负荷剂量，接着每隔一周施用维持剂量，例如初始剂量的一半。在一些实施方案中，给药方案可包含施用三个初始剂量持续3周，接着例如每隔一周施用相同量的维持剂量。

[0455] 如本领域技术人员所知，任何治疗剂的施用均可能导致副作用和/或毒性。在一些情况下，副作用和/或毒性如此的严重以致无法以治疗有效剂量施用特定剂。在一些情况下，必须停止药物疗法，并尝试使用其他剂。然而，同一治疗类别中的许多剂通常呈现出相似的副作用和/或毒性，意味着患者必须停止疗法或者可能会遭受与治疗剂相关的令人不快的副作用。

[0456] 在一些实施方案中，给药时间表可限于特定次数的施用或“周期”。在一些实施方案中，施用抗CD39抗体2、3、4、5、6、7、8个或更多个周期。例如，抗CD39抗体每2周施用一次，共6个周期，抗CD39抗体每3周施用一次，共6个周期，抗CD39抗体每2周施用一次，共4个周

期,抗CD39抗体每3周施用一次,共4个周期等等。本领域技术人员可以决定并随后修改给药时间表。

[0457] 因此,本发明提供向受试者施用本文所述的抗CD39抗体的方法,其包括使用间歇给药策略来施用一种或多种剂,这可以减少与施用抗CD39抗体、抗炎剂等相关的副作用和/或毒性。在一些实施方案中,用于治疗人受试者中与不需要的嗜酸性粒细胞活性相关的疾病或疾患的方法包括向受试者施用治疗有效剂量的抗CD39抗体以及治疗有效剂量的抗炎剂,其中根据间歇给药策略施用一种或两种剂。在一些实施方案中,间歇给药策略包含向受试者施用初始剂量的抗CD39抗体,并且大约每2周一次施用后续剂量的抗CD39抗体。在一些实施方案中,间歇给药策略包含向受试者施用初始剂量的抗CD39抗体,并且大约每3周一次施用后续剂量的抗CD39抗体。在一些实施方案中,间歇给药策略包含向受试者施用初始剂量的抗CD39抗体,并且大约每4周一次施用后续剂量的抗CD39抗体。在一些实施方案中,使用间歇给药策略施用抗CD39抗体并且每周施用抗炎剂。

[0458] VII.抗CD39抗体缀合物

[0459] 本文所公开的抗CD39抗体也可结合至细胞毒性部分。在一些实施方案中,本文所公开的双特异性抗CD39抗体结合至细胞毒性部分以进一步提高特异性。

[0460] 在某些实施方案中,抗CD39抗体(例如,本文所述的双特异性抗CD39抗体)能够通过结合至或缔合至细胞毒性部分的抗体的内化在表达CD39的细胞(例如,嗜酸性粒细胞)中诱导细胞毒性。细胞毒性部分可例如选自由以下组成的组:紫杉醇;细胞松弛素B;短杆菌肽D;溴化乙锭;吐根素;丝裂霉素;依托泊苷;替诺泊苷;长春新碱;长春碱;秋水仙碱;多柔比星;柔红霉素;二羟基蒽二酮;微管蛋白抑制剂,诸如美登素或其类似物或衍生物;抗有丝分裂剂,诸如单甲基瑞奥西汀(auristatin)E或F或其类似物或衍生物;尾海兔素10或15或其类似物;伊立替康或其类似物;米托蒽醌;光神霉素;放线菌素D;1-去氢睾酮;糖皮质激素;普鲁卡因;丁卡因;利多卡因;普萘洛尔;嘌呤霉素;加利车霉素(calicheamicin)或其类似物或衍生物;抗代谢剂,诸如甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪、羟基脲、天冬酰胺酶、吉西他滨或克拉屈滨;烷化剂,诸如氮芥、噻替哌、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)、洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链佐霉素、达卡巴嗪(DTIC)、丙卡巴肼、丝裂霉素C;铂衍生物,诸如顺铂或卡铂;倍癌霉素(duocarmycin)A、倍癌霉素SA、雷查霉素(rachelmycin)(CC-1065)或其类似物或衍生物;抗生素,诸如更生霉素、博来霉素、柔红霉素、多柔比星、伊达比星、光神霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、普卡霉素、蒽霉素(AMC);吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓类(PDB);白喉毒素和相关分子,诸如白喉A链和其活性片段和杂合分子;蓖麻毒素,诸如蓖麻毒素A或去糖基化蓖麻毒素A链毒素;霍乱毒素;志贺样毒素,诸如SLT I、SLT II、SLT IIV、LT毒素、C3毒素、志贺毒素、百日咳毒素、破伤风毒素、大豆Bowman-Birk蛋白酶抑制剂、假单胞菌外毒素、芦荟素、皂草素、莫迪素、白明胶、皂荚素A链、莫迪素A链、α-八叠球菌素、油桐蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白诸如PAPI、PAPII和PAP-S、苦瓜抑制剂、姜黄素、巴豆素、皂草抑制剂、白树毒素、丝林霉素(mitogellin)、局限曲霉素、酚霉素和伊诺霉素毒素;核糖核酸酶(RNA酶);DNA酶I、葡萄球菌肠毒素A;美洲商陆抗病毒蛋白;白喉毒素;以及假单胞菌内毒素。

[0461] 在一个实施方案中,抗CD39抗体(例如,本文所述的双特异性抗CD39抗体)结合至瑞奥西汀或其肽类似物、衍生物或前药。瑞奥西汀已显示干扰微管动力学、GTP水解以及核

和细胞分裂(Woyke等人,2001,Antimicrob.Agents and Chemother.45(12):3580-3584)并具有抗癌(US5663149)和抗真菌活性(Pettit等人,1998,Antimicrob.Agents and Chemother.42:2961-2965)。例如,瑞奥西汀E可与对乙酰基苯甲酸或苯甲酰戊酸反应,分别产生AEB和AEVB。其他典型的瑞奥西汀衍生物包括AFP、MMAF(单甲基瑞奥西汀F)和MMAE(单甲基瑞奥西汀E)。合适的瑞奥西汀和瑞奥西汀类似物、衍生物和前药以及用于将瑞奥西汀结合至Ab的合适的接头描述于例如美国专利号5,635,483、5,780,588和6,214,345以及国际专利申请公开WO02088172、WO2004010957、WO2005081711、WO2005084390、WO2006132670、WO03026577、WO200700860、WO207011968和WO205082023中。

[0462] 在另一个实施方案中,抗CD39抗体(例如,本文所述的双特异性抗CD39抗体)结合至吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓(PDB)或其类似物、衍生物或前药。合适的PDB和PDB衍生物以及相关技术描述于例如Sagnou等人,2000,Bioorg Med Chem Lett 10(18):2083-2086;Antonow等人,2008,Cancer J 14(3):154-169;Howard等人,2009,Bioorg Med Chem Lett 19:6463-6466;以及Hartley等人,2010,Cancer Res 70(17):6849-6858中。

[0463] 在另一个实施方案中,抗CD39抗体(例如,本文所述的双特异性抗CD39抗体)结合至选自由以下组成的组的细胞毒性部分:蒽环抗生素、美登素、加利车霉素、倍癌霉素、雷查霉素(CC-1065)、尾海兔素10、尾海兔素15、伊立替康、单甲基瑞奥西汀E、单甲基瑞奥西汀F、PDB或其任何类似物、衍生物或前药。

[0464] 在一个特定实施方案中,抗CD39抗体(例如,本文所述的双特异性抗CD39抗体)结合至蒽环抗生素或其类似物、衍生物或前药。在另一个特定实施方案中,抗CD39抗体(例如,本文所述的双特异性抗CD39抗体)结合至美登素或其类似物、衍生物或前药。在另一个特定实施方案中,抗CD39抗体(例如,本文所述的双特异性抗CD39抗体)结合至加利车霉素或其类似物、衍生物或前药。在另一个特定实施方案中,抗CD39抗体(例如,本文所述的双特异性抗CD39抗体)结合至倍癌霉素或其类似物、衍生物或前药。在另一个特定实施方案中,抗CD39抗体(例如,本文所述的双特异性抗CD39抗体)结合至雷查霉素(CC-1065)或其类似物、衍生物或前药。在另一个特定实施方案中,抗CD39抗体(例如,本文所述的双特异性抗CD39抗体)结合至尾海兔素10或其类似物、衍生物或前药。在另一个特定实施方案中,抗CD39抗体(例如,本文所述的双特异性抗CD39抗体)结合至尾海兔素15或其类似物、衍生物或前药。在另一个特定实施方案中,抗CD39抗体(例如,本文所述的双特异性抗CD39抗体)结合至单甲基瑞奥西汀E或其类似物、衍生物或前药。在另一个特定实施方案中,抗CD39抗体(例如,本文所述的双特异性抗CD39抗体)结合至单甲基瑞奥西汀F或其类似物、衍生物或前药。在另一个特定实施方案中,抗CD39抗体(例如,本文所述的双特异性抗CD39抗体)结合至吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓或其类似物、衍生物或前药。在另一个特定实施方案中,抗CD39抗体(例如,本文所述的双特异性抗CD39抗体)结合至伊立替康或其类似物、衍生物或前药。

[0465] VIII.药物组合物

[0466] 本发明所涵盖的抗CD39抗体、抗体片段、核酸或载体可被配置成组合物,尤其是药物组合物。此类组合物包含治疗或预防有效量的本发明所涵盖的抗CD39抗体、抗体片段、核酸或载体以及合适的载剂,例如药学上可接受的剂。通常,本发明所涵盖的抗CD39抗体、抗体片段、核酸或载体在配制成药物组合物之前被充分纯化以向动物施用。

[0467] 用于本发明的药物组合物中的药学上可接受的剂包括载剂、赋形剂、稀释剂、抗氧化剂、防腐剂、着色剂、调味剂和稀释剂、乳化剂、悬浮剂、溶剂、填充剂、增容剂、缓冲液、递送媒介物、张力剂、共溶剂、润湿剂、复合剂、缓冲剂、抗微生物剂和表面活性剂。

[0468] 中性缓冲盐水或与血清白蛋白混合的盐水为示例性适当的载剂。药物组合物可包含抗氧化剂,诸如抗坏血酸;低分子量多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、双糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖醇,诸如甘露醇或山梨醇;成盐相对离子,诸如钠;和/或非离子表面活性剂,诸如Tween、普朗尼克(pluronics)或聚乙二醇(PEG)。还举例而言,合适的张力增强剂包括碱金属卤化物(优选地氯化钠或氯化钾)、甘露醇、山梨醇等。合适的防腐剂包括苯扎氯铵、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯已定(chlorhexidine)、山梨酸等。过氧化氢也可用作防腐剂。合适的共溶剂包括甘油、丙二醇和PEG。合适的复合剂包括咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮、β-环糊精或羟丙基-β-环糊精。合适的表面活性剂或润湿剂包括山梨糖醇酯、聚山梨醇酯诸如聚山梨醇酯80、氨丁三醇(tromethamine)、卵磷脂、胆固醇、泰洛沙泊(tyloxapal)等。缓冲液可为常规缓冲液,诸如乙酸盐、硼酸盐、柠檬酸盐、磷酸盐、碳酸氢盐或Tris-HCl。乙酸盐缓冲液的pH值约为4-5.5,并且Tris缓冲液的pH值约为7-8.5。另外的药剂列于Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,A.R.Gennaro编,Mack Publishing Company,1990中。

[0469] 所述组合物可呈液体形式或冻干或冷冻干燥形式,并且可包括一种或多种冻干保护剂、赋形剂、表面活性剂、高分子量结构添加剂和/或增容剂(参见,例如美国专利号6,685,940;6,566,329;和6,372,716)。在一个实施方案中,纳入冻干保护剂,其为非还原糖,诸如蔗糖、乳糖或海藻糖。一般纳入的冻干保护剂的量使得在重构时所得制剂将为等渗的,尽管高渗或稍微低渗制剂也可为合适的。此外,冻干保护剂的量应足以防止冻干时蛋白质不可接受量的降解和/或聚集。预冻干制剂中糖类(例如蔗糖、乳糖、海藻糖)的示例性冻干保护剂浓度为约10mM至约400mM。在另一个实施方案中,纳入表面活性剂,例如像非离子表面活性剂和离子表面活性剂,诸如聚山梨醇酯(例如,聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80);泊洛沙姆(例如泊洛沙姆188);聚(乙二醇)苯基醚(例如Triton);十二烷基硫酸钠(SDS);月桂硫酸钠;辛基糖苷钠;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-或硬脂基-磺基甜菜碱;月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-或硬脂基-肌氨酸;亚油基-、肉豆蔻基-或鲸蜡基-甜菜碱;月桂酰胺丙基-、椰油酰胺丙基-、亚油酰胺丙基-、肉豆蔻酰胺丙基-、棕榈酰胺丙基-或异硬脂酰胺丙基-甜菜碱(例如,月桂酰胺丙基);肉豆蔻酰胺丙基-、棕榈酰胺丙基-或异硬脂酰胺丙基-二甲胺;甲基椰油酰基牛磺酸钠或甲基油酰基牛磺酸二钠;以及MONAQUAT™系列(Mona Industries,Inc.,Paterson,NJ.)、聚乙二醇、聚丙二醇和乙二醇与丙二醇的共聚物(例如,普朗尼克、PF68等)。可存在于预冻干制剂中的表面活性剂的示例性量为约0.001-0.5%。高分子量结构添加剂(例如填充剂、粘合剂)可包括例如阿拉伯胶、白蛋白、海藻酸、磷酸钙(二元)、纤维素、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、微晶纤维素、葡聚糖、糊精、葡萄糖结合剂、蔗糖、tylose、预糊化淀粉、硫酸钙、直链淀粉、甘氨酸、膨润土、麦芽糖、山梨醇、乙基纤维素、磷酸氢二钠、磷酸二钠、焦亚硫酸氢二钠、聚乙烯醇、明胶、葡萄糖、瓜尔豆胶、液体葡萄糖、压缩糖、镁硅酸铝、麦芽糖糊精、聚环氧乙烷、聚甲

基丙烯酸酯、聚维酮、海藻酸钠、黄芪胶、微晶纤维素、淀粉和玉米蛋白。高分子量结构添加剂的示例性浓度为0.1重量％至10重量％。在其他实施方案中,可包括增容剂(例如,甘露醇、甘氨酸)。

[0470] 组合物可适用于胃肠外施用。示例性组合物适合于通过熟练技术人员可用的任何途径注射或输注至动物中,诸如关节内、皮下、静脉内、肌内、腹膜内、脑内(实质内)、脑室内、肌内、眼内、动脉内或病灶内途径。胃肠外制剂通常为无菌的、无热原的等渗水溶液,任选地含有药学上可接受的防腐剂。

[0471] 非水性溶剂的实例为丙二醇、聚乙二醇、植物油诸如橄榄油以及可注射的有机酯诸如油酸乙酯。水性载剂包括水、酒精性/水溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。胃肠外媒介物包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏液或不挥发油。静脉内媒介物包括流体和营养素补充剂、电解质补充剂,诸如基于林格氏右旋糖的那些补充剂等。也可存在防腐剂和其他添加剂,例如像抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体等。一般参见Remington'sPharmaceutical Science,第16版,Mack编,1980,其以引用方式并入本文。

[0472] 本文所述的药物组合物可被配置用于以提供产物的局部浓度(例如推注、储库效应)和/或在特定局部环境中稳定性或半衰期增加的方式进行受控或持续递送。组合物可包括本发明所涵盖的抗CD39抗体、抗体片段、核酸或载体与聚合化合物(诸如聚乳酸、聚乙醇酸等)的微粒制剂以及剂诸如生物可降解基质、可注射微球、微胶囊颗粒、微胶囊、生物可蚀性颗粒珠、脂质体和可植入递送装置的制剂,后者提供活性剂的受控或持续释放,然后可作为储库注射剂递送。配制此类持续或受控递送手段的技术为已知的,并且已开发了多种聚合物并将其用于药物的受控释放和递送。此类聚合物通常为生物可降解的和生物兼容的。由于捕获生物活性蛋白剂(例如抗体)所涉及的温和和水性条件,可需要聚合物水凝胶(包括通过对映异构聚合物或多肽片段与具有温度或pH敏感特性的水凝胶复合所形成的那些聚合物水凝胶)以提供药物储库效应。参见,例如,PCT申请公开WO 93/15722中对用于递送药物组合物的受控释放多孔聚合微粒的描述。

[0473] 用于此目的的合适的材料包括聚丙交酯(参见,例如美国专利3,773,919)、聚-(a-羟基羧酸)诸如聚-D-(-)-3-羟基丁酸的聚合物(EP 133,988A)、L-谷氨酸与γ乙基-L-谷氨酸酯的共聚物(Sidman等人,1983,Biopolymers 22:547-556)、聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)(Langer等人,1981,J.Biomed.Mater.Res.15:167-277和Langer等人,1982,Chem.Tech.12:98-105)、乙烯乙酸乙烯酯或聚-D(～)～3-羟基丁酸。其他生物可降解的聚合物包括聚(内酯)、聚(缩醛)、聚(原酸酯)和聚(原碳酸酯)。持续释放组合物也可包括脂质体,其可通过本领域已知的若干方法中的任一种来制备(参见,例如Eppstein等人,1985,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:3688-92)。载剂本身或其降解产物应对靶组织无毒,并且不应进一步加重疾患。此可通过在靶病症的动物模型中进行常规筛选来确定,或者如果没有此类模型,则在正常动物中进行。用于持续释放的重组蛋白的微胶囊化已成功地用以下各项来操作:人生长激素(rhGH)、干扰素-(rhIFN--)、白介素-2和MNrgp120(Johnson等人,1996,Nat.Med.2:795-799;Yasuda等人,1993,Biomed.Ther.27:1221-1223;Hora等人,1990,Bio/Technologv.8:755-758;Cleland等人,"Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems",

Vaccine Design:The Subunit and Adjuvant Approach,Powell和Newman编,(Plenum Press:New York,1995),第439-462页;WO 97/03692、WO 96/40072、WO 96/07399;以及美国专利号5,654,010)。这些蛋白质的持续释放制剂是使用聚乳酸-共-乙醇酸(PLGA)聚合物开发的,因为它具有生物兼容性和广泛的生物可降解特性。PLGA、乳酸和乙醇酸的降解产物在人体内可快速清除。此外,此聚合物的可降解性可取决于其分子量和组成。Lewis等人,"Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer",M.Chasin和R.Langer(编),Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems(Marcel Dekker:New York,1990),第1-41页。持续释放组合物的另外实例包括例如EP 58,48IA、美国专利号3,887,699、EP 158,277A、加拿大专利号1176565;Sidman等人,1983,Biopolymers 22:547;Langer等人,1982,Chem.Tech.12:98;Sinha等人,2003,J.Control.Release 90:261;Zhu等人,2000,Nat.Biotechnol.18:24;以及Dai等人,2005,Colloids Surf B Biointerfaces41:117。

[0474] 生物粘附聚合物也预期用于本发明所涵盖的组合物中或与其一起使用。生物粘附剂为合成和天然存在的材料,能够长时间粘附在生物受质上。例如,卡波姆(Carbopol)和聚卡波非(polycarbophil)均为聚(丙烯酸)的合成交联衍生物。基于天然存在的物质的生物粘附剂递送系统包括例如透明质酸,也称为玻糖醛酸。透明质酸为天然存在的粘多糖,由D-葡萄糖醛酸和N-乙酰基-D-葡萄糖胺的残基组成。透明质酸见于脊椎动物的细胞外组织基质中,包括结缔组织,以及滑液和眼睛的玻璃体液和房水。透明质酸的酯化衍生物已用于生产生物兼容性和生物可降解的递送用的微球(参见,例如Cortivo等人,1991,Biomaterials 12:727-730;欧洲公开号517,565;国际公开号WO 96/29998;Ilium等人,1994,J.Controlled ReI.29:133-141)。本发明所涵盖的示例性含透明质酸的组合物包含透明质酸酯聚合物,其量为约0.1%至约40%(w/w)透明质酸聚合物的IL-1/3结合抗体或片段。生物可降解和非生物可降解的聚合基质均可用于递送本发明所涵盖的组合物,并且此类聚合基质可包括天然或合成聚合物。生物可降解的基质为优选的。释放的时间段是基于聚合物的选择。通常,最理想的释放时间范围介于几小时与三至十二个月之间。可用于形成生物可降解递送系统的示例性合成聚合物包括:乳酸与乙醇酸的聚合物、聚酰胺、聚碳酸酯、聚亚烷基、聚亚烷基二醇、聚烯化氧、聚对苯二甲酸烷二酯、聚乙烯醇、聚乙烯醚、聚乙烯酯、聚乙烯卤化物、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙交酯、聚硅氧烷、聚酸酐、聚氨酯和其共聚物、聚(丁酸)、聚(戊酸)、烷基纤维素、羟烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯、硝基纤维素、丙烯酸酯与甲基丙烯酸酯的聚合物、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丁基甲基纤维素、乙酸纤维素、丙酸纤维素、乙酸丁酸纤维素、邻苯二甲酸乙酸纤维素、羧乙基纤维素、三乙酸纤维素、硫酸钠盐纤维素、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚(甲基丙烯酸乙酯)、聚(甲基丙烯酸丁酯)、聚(甲基丙烯酸异丁酯)、聚(甲基丙烯酸己酯)、聚(甲基丙烯酸异癸酯)、聚(甲基丙烯酸月桂酯)、聚(甲基丙烯酸苯酯)、聚(丙烯酸甲酯)、聚(丙烯酸异丙酯)、聚(丙烯酸异丁酯)、聚(丙烯酸十八烷酯)、聚乙烯、聚丙烯、聚(乙二醇)、聚(环氧乙烷)、聚(对苯二甲酸乙二酯)、聚(乙烯醇)、聚乙酸乙烯酯、聚氯乙烯、聚苯乙烯和聚乙烯吡咯烷酮。示例性天然聚合物包括海藻酸盐和其他多糖(包括葡聚糖和纤维素)、胶原蛋白、其化学衍生物(取代、添加化学基团,例如烷基、亚烷基、羟基化、氧化和本领域技术人员常规进行的其他修饰)、白蛋白和其他亲水性蛋白质、玉米蛋白和其他谷醇溶蛋白以及疏水性蛋白质、其共聚

物和混合物。通常,这些材料通过酶促水解或在体内暴露于水中、通过表面或整体侵蚀而降解。聚合物任选地呈水凝胶形式(参见,例如WO 04/009664;WO 05/087201;Sawhney等人,1993,Macromolecules 26:581-587),其可吸收高达其重量约90%的水并且进一步任选地与多价离子或其他聚合物交联。

[0475] 递送系统也包括非聚合物系统,其为脂质,包括固醇类,诸如胆固醇、胆固醇酯和脂肪酸或中性脂肪,诸如甘油单酯、甘油二酯和甘油三酯;水凝胶释放系统;硅橡胶系统;基于肽的系统;蜡涂层;使用常规粘合剂和赋形剂的压缩片剂;部分融合的植入物;等。具体实例包括但不限于:(a)侵蚀系统,其中产物以基质内的形式包含在内,诸如美国专利号4,452,775;4,675,189;和5,736,152中所述的那些;和(b)扩散系统,其中产物以受控速率从聚合物中渗透,诸如美国专利号3,854,480;5,133,974;和5,407,686中所述。含有产物的脂质体可通过已知方法制备,诸如(DE 3,218,121;Epstein等人,1985,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:3688-3692;Hwang等人,1980,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4030-4034;EP 52,322;EP 36,676;EP 88,046;EP 143,949;EP 142,641;日本专利申请83-118008;美国专利号4,485,045和4,544,545;以及EP 102,324)。

[0476] 替代地或另外地,可经由将本发明所涵盖的抗CD39抗体、抗体片段、核酸或载体已在其上吸收或包裹的膜、海绵或其他适当材料植入受影响区域来局部施用组合物。在使用植入装置的情况下,所述装置可植入任何合适的组织或器官中,并且本发明所涵盖的抗CD39抗体、抗体片段、核酸或载体的递送可经由推注、或经由连续施用、或经由导管使用连续输注直接通过所述装置。

[0477] 包含本发明所涵盖的抗CD39抗体、抗体片段、核酸或载体的药物组合物可被配置用于吸入,例如作为干粉。吸入溶液也可被配置于液化推进剂中用于气溶胶递送。在另一种制剂中,溶液可被雾化。用于肺部施用的另外的药物组合物包括例如在PCT申请公开WO 94/20069中描述的那些,所述公开内容公开了化学修饰的蛋白质的肺部递送。对于肺部递送,粒度应适合于递送至远端肺。例如,粒度可为1μm至5μm;然而,可使用更大的颗粒,例如,如果各颗粒均为相当多孔的话。

[0478] 含有本发明所涵盖的抗CD39抗体、抗体片段、核酸或载体的某些制剂可经口施用。以此方式施用的制剂可与或不与常用于混合固体剂型诸如片剂和胶囊的那些载剂一起配制。例如,胶囊可被设计成在生物利用度最大化和系统前降解最小化时在胃肠道中释放制剂的活性部分。可以包括另外的剂以促进选择性结合剂的吸收。也可使用稀释剂、调味剂、低熔点蜡、植物油、润滑剂、悬浮剂、片剂崩解剂和粘合剂。

[0479] 另一种制剂可包括有效量的本发明所涵盖的抗CD39抗体、抗体片段、核酸或载体与适合于制造片剂的无毒赋形剂的混合物。通过将片剂溶解在无菌水或另一种适当的媒介物中,可以制备单位剂型的溶液。合适的赋形剂包括但不限于惰性稀释剂,诸如碳酸钙、碳酸钠或碳酸氢钠、乳糖或磷酸钙;或粘合剂,诸如淀粉、明胶或阿拉伯胶;或润滑剂,诸如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石粉。

[0480] IX.示例性材料和方法

[0481] 试剂

[0482] 除非另有说明,否则所有化学试剂均购自Sigma-Aldrich(St.Louis,MO),细胞培养基购自Life Technologies(Carlsbad,CA),细胞培养耗材购自CELLTREAT®

Scientific Products(Shirley,MA),并且商用抗体购自Biolegend(San Diego,CA)。二次抗体Alexa Fluor® 488结合的AffiniPure驴抗人IgG(Fc特异性)(#709-545-098)获自Jackson ImmunoResearch(West Grove,PA),Bio-Glo™(#G7941)获自Promega(Madison,WI),2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖(#MD06089)获自BIOSYNTH Carbosynth(Gardner,MA),并且人重组IL-2(#78036.1)和人重组IL-15(#78218)获自STEMCELL Technologies(Cambridge,MA)。

[0483] 使用ExpiCHO™表达系统试剂盒(#A29133;Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA),通过瞬时转染产生抗人CD39参考抗体(hCD39 Ref),并且所获得的抗体序列与公布的相同(Perrot等人,Cell Reports 27:2411-2425(2019))。hCD39 Ref抗体与完全人抗CD39单克隆抗体(PEOWT22)均含有相同的ADCC感受态人IgG1 Fc部分。hCD39 Ref抗体与本领域的抗体共享抗原结合位点。然而,与当前实施例中使用的Ref抗体不同,所述现有技术抗体是用Fc部分生成的,所述Fc部分专门设计为具有废除的ADCC功能(即,据教导已生成以特异性结合CD39并抑制NTP酶活性而不调用CD39依赖性ADCC细胞杀伤)。

[0484] 细胞培养

[0485] Epstein-Barr二氏病毒(EBV)转化的人B类淋巴母细胞HCC1739BL细胞(ATCC#CRL-2334)、Raji细胞(Raji-hCD39neg)和人CD39稳定转染的Raji细胞(表达高水平的hCD39的Raji-hCD39hi和表达低水平的hCD39的Raji-hCD39lo)在补充有10%FBS、1%青霉素-链霉素的RPMI-1640中培养。人黑色素瘤细胞(SK-MEL-28,ATCC#HTB-72)在EMEM加10%FBS、1%青霉素-链霉素中生长。人自然杀伤细胞(NK-92-CD16 V/V)(ATCC#PTA-6967)在含有IL-2(10ng/ml)的MEM-Alpha培养基中培养。人脐静脉内皮细胞(HUVEC),单一供体,EGM™-2(Lonza#C2517A,Basel,Switzerland)在EGM™内皮细胞生长培养基BulletKit(Lonza#CC3124)中生长。所有细胞系均维持在37℃、5%CO_2气氛和100%湿度下的培养烧瓶中,Jurkat细胞/NFAT-luc+Fc γ RIIIA(Promega#G7011)则例外,其在用于实验之前在37℃的水浴中解冻。

[0486] 完全人抗CD39抗体的产生、无岩藻糖基化和优化

[0487] 在不存在(PEOWT22,抗CD39抗体的亲代完全岩藻糖基化形式)或存在岩藻糖基化抑制剂2-脱氧-2-氟-L-岩藻糖(PEOAF22,抗CD39抗体的无岩藻糖基化形式)下,使用FreeStyle™293-F细胞(Thermo Fisher Scientific#R79007),通过瞬时转染产生完全人抗CD39抗体。抗体ADCC活性排序为:PEOAF22>PEOWT22。

[0488] 优化的对应物PEONP22和PEO22(抗CD39抗体的无岩藻糖基化形式)是由稳定转染亲代PEOWT22质粒的CHO细胞产生的,使用化学修饰的细胞培养基用于提高ADCC活性。抗体ADCC活性排序为:PEO22>PEONP22>PEOWT22。

[0489] 在任一无岩藻糖基化过程中均未采用基因修饰。

[0490] NK细胞介导的抗体依赖性细胞毒性(ADCC:NK细胞毒性测定)

[0491] 将HCC1739BL靶细胞在37℃下于水浴中用CFSE(0.025μM)预标记5分钟。用1X DPBS洗涤两次后,将细胞在有或无单克隆抗体的含4%超低IgG FBS(Thermo Fisher Scientific#A3381901)的MEM-Alpha培养基(Thermo Fisher Scientific#32561037)中在37℃、5%CO_2下孵育30分钟。接着将靶细胞与NK-92-CD16 V/V效应细胞以E:T=1:8的比率在37℃、5%CO_2下共培养6小时。孵育后,将细胞在室温下用碘化丙啶(P/I)(200ng/mL)染色

10分钟,并通过Cytek™Aurora流式细胞仪(Cytek Biosciences)分析靶细胞死亡。结果表示为细胞毒性百分比(%),代表$CFSE^+P/I^+$细胞的百分比(%)。

[0492] 对于人嗜酸性粒细胞(EO)的NK细胞杀伤测定,首先根据制造商方案,使用EasySep™直接人NK细胞分离试剂盒(STEMCELL Technologies#19665)从健康人血液中分离NK细胞。接着洗涤NK细胞,将其重悬于生长培养基(RPMI-1640+10%FBS+10%马血清+10ng/ml IL-2+10ng/ml IL-15)中,并在37℃、5%CO_2下孵育24小时。次日,根据制造商说明,使用EasySep™直接人嗜酸性粒细胞分离试剂盒(STEMCELL Technologies#19656)从健康人血液中分离EO细胞。接着洗涤分离的EO细胞,将其重悬于ADCC培养基(RPMI-1640+4%超低IgG FBS)中,并与连续稀释的单克隆抗体在37℃、5%CO_2下孵育30分钟。随后将靶EO细胞与效应NK细胞在37℃、5%CO_2下以E:T=3:1的比率共培养6小时。孵育后,将细胞在室温下用7-AAD(1:20)染色5分钟,并通过Cytek™Aurora流式细胞仪(Cytek Biosciences)分析靶细胞死亡。结果表示为细胞毒性百分比(%),代表$7\text{-}AAD^+$EO细胞的百分比(%)。

[0493] 抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)测定

[0494] 根据制造商方案,首先使用EasySep™直接人单核细胞分离试剂盒(STEMCELL Technologies#19669)从健康人血液中分离人单核细胞。接着洗涤单核细胞,将其重悬于生长/分化培养基(RPMI-1640+10%FBS+10%马血清+5%人血清+50ng/ml M-CSF)中,并在37℃、5%CO_2下孵育7天以促进巨噬细胞分化。7天后,洗涤从健康人血液中新鲜分离的EO细胞,用Tag-it Violet(5mM)(BioLegend#425101)标记,重悬于ADCP培养基(RPMI-1640+4%超低IgG FBS+50ng/ml M-CSF)中,并与同型对照(10μg/mL)或PEO22(1或10μg/mL)在37℃、5%CO_2下孵育30分钟。将紫色标记的EO靶细胞洗涤两次,并与巨噬细胞效应细胞以E:T=1:5的比率在37℃、5%CO_2下共培养6小时。孵育后,移出、洗涤并通过流式细胞术分析附着的巨噬细胞。紫色荧光染料(Pacific Blue通道)呈阳性的巨噬细胞代表ADCP诱导-EO吞噬。单独用ADCP培养基孵育的巨噬细胞用作阴性对照。

[0495] NFAT荧光素酶报告基因Jurkat系统(Luc-报告基因ADCC测定)

[0496] 将附着的靶细胞(内源性表达中等水平的CD39的SK-MEL-28人黑色素瘤细胞或内源性表达低水平的CD39的HUVEC细胞)接种于96孔板($8X10^3$个细胞/100μL/孔)(BRANDplates#781965)中并使其生长24小时,同时在实验前立即接种悬浮靶细胞(HCC1739BL)($5X10^5$个细胞/mL)。接着用ADCC测定缓冲液(补充有4%超低IgG FBS的DMEM或RPMI-1640培养基)洗涤细胞两次,并与连续稀释的单克隆抗体在37℃下孵育30分钟。随后将效应细胞(Jurkat细胞/NFAT-luc+Fcγ RIIIA;$3X10^6$个细胞/mL)添加至孔中,并将混合物(E:T=6:1)在37℃下孵育6小时。最后将Bio-Glo™添加至孔中,并使用Synergy™Neo2 Multi-Mode Reader(BioTeK Instruments Inc.)在5、15和30分钟时读取发光值。ADCC活性由荧光素酶活性相对于背景的增加来指示。

[0497] 表位竞争测定

[0498] 将未结合的抗人CD39单克隆抗体(人/兔嵌合克隆;2μg/mL)与HCC1739BL细胞(1×10^5个细胞)在4℃下孵育30分钟。接着用细胞染色缓冲液洗涤细胞两次,并用PE结合的小鼠抗人CD39单克隆抗体克隆A1(0.25μg/mL,Biolegend#328208)在4℃下染色30分钟。随后将细胞洗涤两次并通过Cytek™Aurora流式细胞仪来分析。检测PE中值荧光强度(MFI),并通过FCS 30Express 7软件(De Novo Software)分析数据。用培养基代替嵌合抗体孵育的细胞

用作对照。

[0499] 稳定的免疫复合物测定

[0500] 将HCC1739BL细胞(5X10^{5}个细胞/mL)与抗人CD39单克隆抗体(2μg/mL)一起孵育或在37℃、5%CO_2下留置不处理24小时。次日,将未处理的细胞暴露于同一组单克隆抗体(2μg/mL),但在4℃下暴露20分钟以获得CD39表达的基础水平。接着用细胞染色缓冲液洗涤细胞两次,并用抗人IgG(Fc特异性)Alexa Fluor®488(1:2000)在4℃下染色30分钟,接着再洗涤两次并用多聚甲醛(PFA,2%)在室温下固定10分钟。最后,将细胞洗涤两次并通过Cytek™Aurora流式细胞仪(Cytek Biosciences)来分析。检测Alexa Fluor® 488(AF488)MFI,并通过FCS Express 7软件(De Novo Software)分析数据。24小时后细胞膜上丢失的人CD39的百分比被计算为:[(20min MFI-24h MFI/20min MFI)]X100。

[0501] 构形表位绘图

[0502] 这是使用Pepscan(Lelystad,The Netherlands)的专属CLIPS技术完成的。

[0503] 动物

[0504] C57BL6人CD39敲入(hCD39KI)小鼠从Beth Israel Deaconess Medical Center获得许可,并在Purinomia Biotech,Inc.的特定的无病原体动物饲养箱中繁殖和圈养。所有小鼠均饲养在温度可控的房间内,有12小时交替的暗光循环。

[0505] 在安乐死后使用8-12周龄的雄性和雌性小鼠评估健康hCD39KI小鼠的血液和骨髓粒细胞概况。如下所述加工并分析样品。

[0506] 健康hCD39KI小鼠中的抗体施用

[0507] 对于图12:为了分析PEO22和其低ADCC对应物(PEOWT22)对血液粒细胞的体内影响,8-12周龄的雄性健康hCD39KI小鼠在第0天和第2天接受无菌0.9%盐水或1mg/kg PEO22或PEOWT22(i.p.)。在第0天(抗体注射前)经由侧静脉切口收集血液样品,并在第3天终末期收获时经由腔静脉收集血液样品。如下所述加工并分析样品。

[0508] 对于图13:为了分析PEO22对血液和骨髓嗜酸性粒细胞的体内影响,将8-12周龄的雌性健康hCD39KI小鼠每两天用盐水或PEO22(1mg/kg,i.p.)处理,总共4剂。在最后一次给药后一天从安乐死动物中收集血液和骨髓样品,如下所述进行加工和分析。

[0509] 小鼠嗜酸性粒细胞哮喘模型建立和研究设计

[0510] 小鼠嗜酸性粒细胞哮喘模型是如文献(Matsuoka等人,Kurume Medical Journal,65:37-46(2018);Chen等人,Scientific Reports,10:10557(2020))中所述建立的,并进行了修改。研究中使用8-12周龄的雌性hCD39KI小鼠。简言之,在第1天和第7天,所有小鼠均通过施用(i.p.)卵白蛋白(OVA)致敏溶液(100μg OVA与0.1mL氢氧化铝佐剂混合)致敏。对于OVA攻击,将小鼠用异氟醚麻醉并在第11-25天(每天,连续15天)施用(i.n.)40μg/40μL OVA溶液。

[0511] 小鼠在第19、21、23和25天每两天接受盐水或1mg/kg PEO22(i.p.),总共4剂。最后一次给药后一天,用异氟醚麻醉小鼠,并如下所述收集并分析血液、骨髓和肺。

[0512] 小鼠特应性皮炎(AD)模型建立和研究设计

[0513] AD小鼠模型是通过用OVA对粘着剂剥离的皮肤进行反复表皮(EC)攻击来诱导的。为此,在第1天和第7天,8-12周龄的雌性hCD39KI小鼠首先通过i.p.施用OVA溶液(10μg OVA+0.1mL氢氧化铝佐剂)进行OVA致敏。在第14天,用异氟醚麻醉小鼠,对小鼠背部皮肤(直径

约1cm)剃毛,并将组织粘着剂液体(LiquiVet Rapid,Oasis Medical Mettawa)施用于剃毛的皮肤。5分钟后,将粘着斑块连同浅表角质上皮一起移除。接着通过将0.1mg/mL的OVA溶液施用于暴露的皮肤来进行OVA攻击。各小鼠每周两次在同一部位处暴露于OVA溶液攻击,持续五周。在OVA攻击期间向各小鼠皮下给予0.5mL盐水溶液,以防止过敏反应并保持动物水分。

[0514] 在OVA攻击的最后一周,小鼠每两天接受盐水或1mg/kg的PEO22(i.p.),总共三剂。最后一次给药后两天对动物施行安乐死,收集血液和皮肤分别用于流式细胞术和组织学检查。

[0515] 小鼠嗜酸性粒细胞性鼻窦炎模型建立和研究设计

[0516] 嗜酸性粒细胞性鼻窦炎小鼠模型是由OVA致敏和OVA/米曲霉来源的蛋白酶攻击诱导的。为此,在第1天和第7天,8-12周龄的雌性hCD39KI小鼠首先通过皮下施用OVA溶液(10μg OVA+0.1mL氢氧化铝佐剂)进行OVA致敏。对于OVA/蛋白酶攻击,在第14天,用异氟烷麻醉小鼠并施用(i.n.)20μg/20μL OVA/蛋白酶混合物溶液,每周3次,持续6周。

[0517] 在OVA/蛋白酶攻击的最后一周,小鼠每两天接受盐水或3mg/kg的PEO22(i.p.),总共四剂。最后一次给药后一天对动物施行安乐死,收集血液和鼻腔组织分别用于流式细胞术和组织学检查。

[0518] 小鼠骨髓收集、加工和分析

[0519] 收集小鼠股骨并用无菌剪刀剪断四肢。通过将附接至1mL注射器的25G针插入骨骼来冲洗骨髓细胞,所述注射器含有补充有2%FBS(R2缓冲液)的冷RPMI-1640培养基。接着使细胞冲洗液通过70μm滤网,收集于冰上的5mL FACS管中,并在8℃下以3500rpm离心5分钟。移除上清液后,将剩余的细胞重悬于1mL的1X裂解缓冲液(BD Pharm Lyse)中,混合并在冰上避光孵育3分钟。在8℃下以3500rpm离心5分钟后,将细胞重悬于1mL R2缓冲液中,通过70μm滤网并收集至新的1.5mL Eppendorf管中。接着将细胞在8℃下以3500rpm再次离心5分钟,并用1mL R2缓冲液重悬。之后,将50μL细胞悬浮液等分并用0.5μL Fc封闭剂(BD Biosciences#553142)在4℃下封闭10分钟,接着在4℃下进行抗体组染色(表1)持续15分钟。最后,将细胞用R2缓冲液洗涤一次,重悬于100μL R2缓冲液中,在冰上用7-AAD(1:20)染色5分钟,转移至含有400μL R2缓冲液的FACS管中,并通过Cytek Aurora流式细胞仪来分析。各细胞亚群的绝对数量和百分比(%)(表示为与CD45+或CD45+CD11b+细胞相关)以及它们各自的人CD39表达和其他嗜酸性粒细胞表面标志物(表示为平均荧光强度-MFI)通过使用FCS Express 7软件(De Novo Software)来确定。

[0520] 小鼠血液收集、加工和分析

[0521] 对于小鼠终末期血液收集:在用异氟醚气体麻醉动物并进行剖腹手术后,从腔静脉抽取血液样品。

[0522] 对于小鼠非终末期血液收集:在没有麻醉的情况下经由侧静脉切口收集血液样品。

[0523] 将动物血液(200μL)收集至含有1μL 10%EDTA的1.5mL Eppendorf管中并混合。将50μL含EDTA的血液样品转移至新的1.5mL Eppendorf管中,并用0.5μL Fc封闭剂(BD Biosciences#553142)在4℃下孵育10分钟,接着在4℃下进行抗体组染色(表2)持续15分钟。接着使用1mL的1X ACK裂解缓冲液在室温下避光进行红细胞溶解持续10分钟。之后,将

细胞在4℃下以3500rpm离心5分钟,接着进行第二轮红细胞溶解(使用BD Pharm Lyse)。接着用1mL R2缓冲液洗涤白细胞,重悬于100μL R2缓冲液中,并在冰上用7-AAD(1:20)染色5分钟。最后,将细胞转移至含有400μL R2缓冲液的FACS管中,并通过Cytek Aurora流式细胞仪来分析。各粒细胞亚群的绝对数量和百分比(%)(表示为与CD45+或CD45+CD11b+细胞相关)以及它们各自的人CD39表达和其他嗜酸性粒细胞表面标志物(表示为平均荧光强度-MFI)通过使用FCS Express 7软件(De Novo Software)来确定。

[0524] 小鼠组织收集、加工和分析

[0525] 从安乐死的小鼠中取出肺、皮肤和鼻腔,固定至福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)块中,并用H&E(苏木精和曙红)染色以评估组织病理学。

[0526] 人血液加工和分析

[0527] 将来自健康人供体的血液样品用于粒细胞分析。简言之,将50μL样品等分并用2.5μL人Fc封闭剂(Biolegend#422302)在4℃下孵育10分钟,接着在4℃下进行抗体组染色(表3)持续15分钟。接着使用1mL的1X ACK裂解缓冲液在室温下避光进行红细胞溶解持续10分钟。之后,将细胞在4℃下以3500rpm离心10分钟,并用1mL R2缓冲液洗涤一次。接着将白细胞重悬于100μL R2缓冲液中,并在冰上用7-AAD(1:20)染色5分钟。最后,将细胞转移至含有400μL R2缓冲液的FACS管中,并通过Cytek Aurora流式细胞仪来分析。各粒细胞亚群的百分比(%)以及它们各自的人CD39表达(表示为平均荧光强度-MFI)通过使用FCS Express 7软件(De Novo Software)来确定。

[0528] 统计分析

[0529] 结果表示为平均值(±SEM),并使用GraphPad Prism 9(GraphPad Software,San Diego,CA)进行统计分析。

[0530] 表1.用于小鼠骨髓分析的检测抗体

[0531]

名称	供应商/目录号	浓度
大鼠抗小鼠 CD45_Brilliant Violet 510™	BioLegend/103138	1:1000
大鼠抗小鼠/人 CD11b_Alexa Fluor® 700	BioLegend/101222	1:1000
大鼠抗小鼠 Ly-6G_Brilliant Violet 785™	BioLegend/127645	1:1000
大鼠抗小鼠 Ly-6C_Brilliant Violet 605™	BioLegend/128035	1:1000
大鼠抗小鼠Ly-6G和Ly-6C (Gr-1)_ Brilliant Violet 480™	BD BioSciences/746614	1:1000
大鼠抗小鼠 F4/80_PE/Cyanine 5	BioLegend/123112	1:1000
大鼠抗小鼠 CD200R3_PE/Cyanine7	BioLegend/142212	1:500
大鼠抗小鼠 CD138_Brilliant Violet 421™	BioLegend/142523	1:500
大鼠抗小鼠 CD49b (泛 NK 细胞)_PE	Biolegend/108908	1:500
亚美尼亚仓鼠(Armenian Hamster)抗小鼠 CD11c_Pacific Blue™	BioLegend/117322	1:500
大鼠抗小鼠 CD193 (CCR3)_PE	BioLegend/144505	1:500
亚美尼亚仓鼠抗小鼠 FcεRIα_APC	BioLegend/134316	1:500
亚美尼亚仓鼠抗小鼠 FcεRIα_PE/Cyanine7	BioLegend/134318	1:500

兔抗人 CD39 克隆 8C11_Alexa Fluor® 647	Purinomia Biotech Inc./NA	1:500
兔 IgG 同型对照(RbNP15)_Alexa Fluor® 647	eBioscience™/51461682	1:250
大鼠抗小鼠 CD170 (Siglec-F)_Alexa Fluor® 488	BioLegend/155524	1:250
大鼠抗小鼠 CD125 (IL-5Rα)_Brilliant Violet 711™	BD BioSciences/740817	1:250
大鼠抗小鼠 CD101_PE	Invitrogen/12-1011-82	1:250

[0532]

[0533] 表2.用于小鼠血液分析的检测抗体

名称	供应商/目录号	浓度
大鼠抗小鼠 CD45_Brilliant Violet 510™	BioLegend/103138	1:1000
大鼠抗小鼠/人 CD11b_Alexa Fluor® 700	BioLegend/101222	1:1000
大鼠抗小鼠 Ly-6G_Brilliant Violet 785™	BioLegend/127645	1:1000
大鼠抗小鼠 Ly-6C_Brilliant Violet 605™	BioLegend/128035	1:1000
大鼠抗小鼠 Ly-6G 和 Ly-6C (Gr-1)_ Brilliant Violet 480™	BD BioSciences/746614	1:1000
大鼠抗小鼠 CD49b (泛 NK 细胞)_PE	Biolegend/108908	1:500
大鼠抗小鼠 CD200R3_PE/Cyanine7	BioLegend/142212	1:500
亚美尼亚仓鼠抗小鼠 FcεRIα_APC	BioLegend/134316	1:500
大鼠抗小鼠 CD193 (CCR3)_PE	BioLegend/144505	1:500
兔抗人 CD39 克隆 8C11_Alexa Fluor® 647	Purinomia Biotech Inc./NA	1:500
兔 IgG 同型对照(RbNP15)_Alexa Fluor® 647	eBioscience™ 51461682	1:250
大鼠抗小鼠 CD125 (IL-5Rα)_Brilliant Violet 711™	BD BioSciences/740817	1:250
大鼠抗小鼠 CD170 (Siglec-F)_Alexa Fluor® 488	BioLegend/155524	1:250
大鼠抗小鼠 CD101_PE	Invitrogen/12-1011-82	1:250

[0534]

[0535] 表3.用于人血液分析的检测抗体

名称	供应商/目录号	浓度
小鼠抗人 CD45_Brilliant Violet 510™	BioLegend/304036	1:20
小鼠抗人 CD16 (FcγRIII)_FITC	BioLegend/ 360716	1:20
小鼠抗人 CD14_PE-Cyanine5	ThermoFisher Scientific/15-0149-42	1:20
小鼠抗人 CD24_Brilliant Violet 421™	BioLegend/311122	1:20
小鼠抗人 CD123 (IL-3Rα)_Alexa Fluor® 700	BioLegend/306040	1:20
小鼠抗人 HLA-DR_Brilliant Violet 650™	BioLegend/307650	1:20

[0536]

[0537]

小鼠抗人 CD3_PE	BioLegend/981004	1:20
小鼠抗人 CD56 (NCAM)_Brilliant Violet 605™	BioLegend/318334	1:20
小鼠抗人 CD4_Pacfic Blue™	BioLegend/317429	1:20
小鼠抗人 CD193 (CCR3)_Brilliant Violet 711™	BioLegend/310731	1:20
小鼠抗人 Siglec-8_PE/Cyanine7	BioLegend/347111	1:20
小鼠抗人 CD11c_Brilliant Violet 785™	BioLegend/301644	1:20
兔抗人 CD39 克隆 8C11_Alexa Fluor® 647	Purinomia Biotech Inc.	1:500
兔 IgG 同型对照(RbNP15)_Alexa Fluor® 647	eBioscience™ 51461682	1:250

[0538] 以引用方式并入

[0539] 本文提及的所有出版物、专利和专利申请均以引用方式全部并入本文,就如同各单独的出版物、专利或专利申请均专门且单独地指出以引用方式并入一般。在发生冲突的情况下,以本申请(包括本文中的任何定义)为准。

[0540] 也以引用方式全部并入引用与进入公共数据库相关的登录号的任何聚核苷酸和多肽序列,诸如由美国基因组研究院(The Institute for Genomic Research;TIGR)在全球信息网处和/或美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information;NCBI)在全球信息网处所维持的那些数据库。

[0541] 等价物和范围

[0542] 本发明所涵盖的一个或多个实施方案的详情在上面的描述中阐述。尽管上面已描述了优选地材料和方法,但是任何与本文所述的材料和方法相似或等价的材料和方法均可用于实施或测试本发明所涵盖的实施方案。与本发明相关的其他特征、目标和优点从描述中显而易见。除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。在发生冲突的情况下,以上面提供的本描述为准。

[0543] 本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验来确定本文所述的本发明所涵盖的具体实施方案的多种等效物。本发明所涵盖的范围并不旨在限于本文提供的描述,并且此类等效物旨在由所附权利要求书所涵盖。

[0544] 除非有相反的指示或从上下文中可明显看出,否则冠词“一(a/an)”在本文中用于指代所述冠词的一个或多于一个(即,至少一个)语法对象。举例而言,“一种要素”意谓一种要素或多于一种要素。除非有相反的指示或从上下文中可明显看出,否则如果一个、多于一个或所有组成员存在于、用于给定产物或过程中或以其他方式与给定产物或过程相关,则所述组的一个或多个成员之间包含“或”的权利要求或描述被视为满足的。本发明包括如此的实施方案,其中所述组中恰好有一个成员存在于、用于给定产物或过程中或以其他方式与给定产物或过程相关。本发明还包括如此的实施方案,其中多于一个或整个组成员存在于、用于给定产物或过程中或以其他方式与给定产物或过程相关。

[0545] 还应注意,术语“包含”旨在为开放的并且允许但不要求包括额外要素或步骤。当本文使用术语“包含”时,因此还涵盖和公开术语“由……组成”。

[0546] 在给出范围时,端点也包括在内。此外,应当理解,除非另有指示或从上下文和本领域普通技术人员的理解中明显看出,否则表示为范围的值可以假定:除非上下文另外明

确规定,否则在由本发明所涵盖的不同实施方案中,所示范围内的任何具体值或子范围,直至所述范围下限的十分之一单位。

[0547] 此外,应当理解,落在现有技术内的本发明所涵盖的任何特定实施方案可明确地排除在任何一个或多个权利要求之外。由于此类实施方案被视为本领域普通技术人员已知的,所以即使所述排除未在本文中明确阐述,它们也可被排除。本发明所涵盖的组合物的任何特定实施方案(例如,任何抗生素、治疗或活性成分;任何产生方法;任何使用方法等)均可出于任何原因排除在任何一个或多个权利要求之外,无论是否与现有技术的存在相关。

[0548] 应当理解,已使用的词语为描述性词语而非限制性词语,并且可在所附权利要求书的权限内进行改变而不脱离本发明在其更广泛方面所涵盖的真实范围和精神。

[0549] 虽然本发明已相对于几个描述的实施方案以一定长度和一些特殊性进行了描述,但不旨在将其限制于任何此类详情或实施方案或任何特定实施方案,而是应参考所附权利要求书来解释本发明,以便根据现有技术提供对此类权利要求书的最广泛可能的解释,并因此有效地涵盖本发明所涵盖的预期范围。

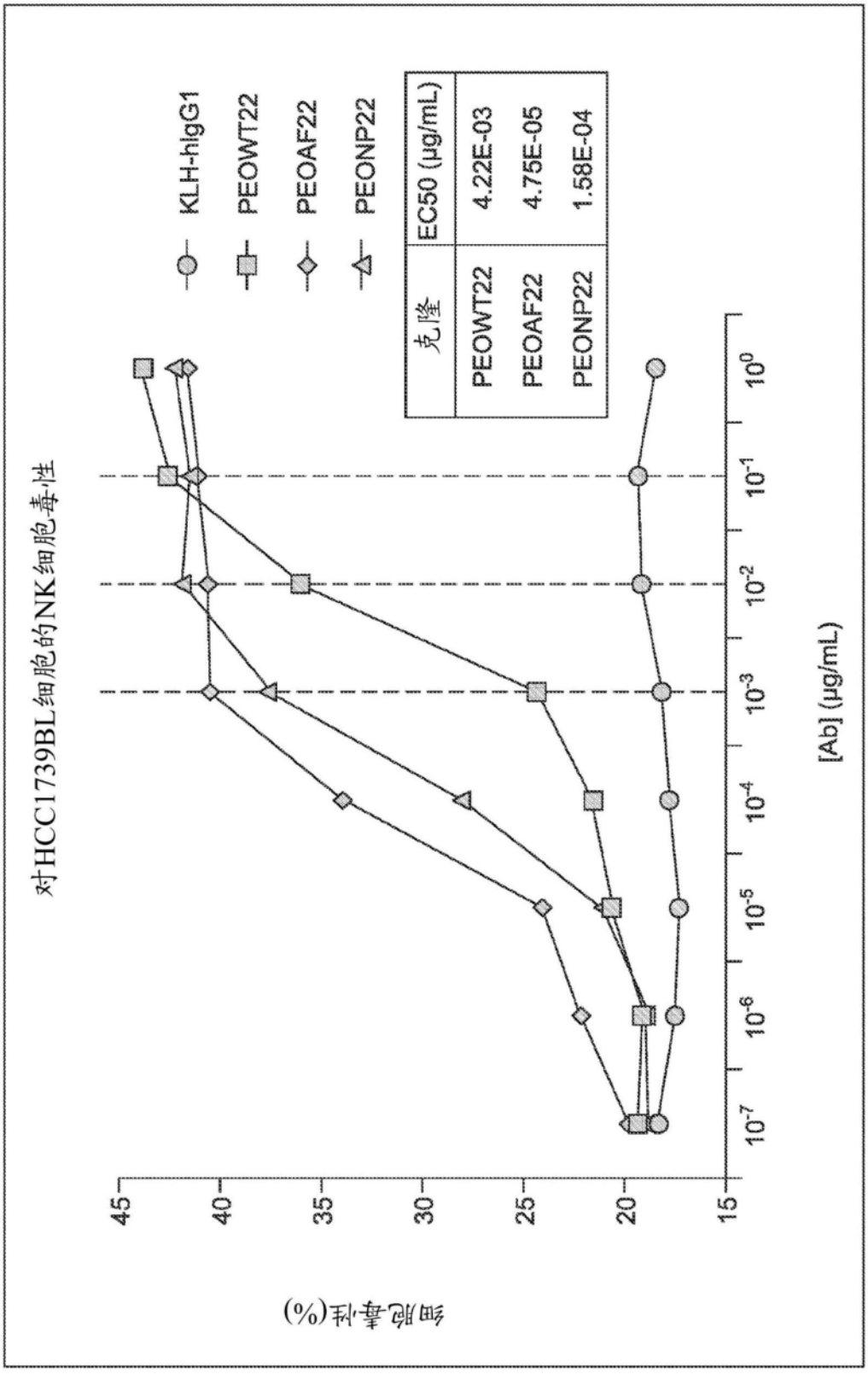

对HCC1739BL细胞的NK细胞毒性
KLH-hIgG1
PEOWT22
PEOAF22
PEONP22
克隆 | EC50 (μg/mL)
PEOWT22 | 4.22E-03
PEOAF22 | 4.75E-05
PEONP22 | 1.58E-04
细胞毒性(%)
45
40
35
30
25
20
15
[Ab] (μg/mL)
10^-7
10^-6
10^-5
10^-4
10^-3
10^-2
10^-1
10^0

图1

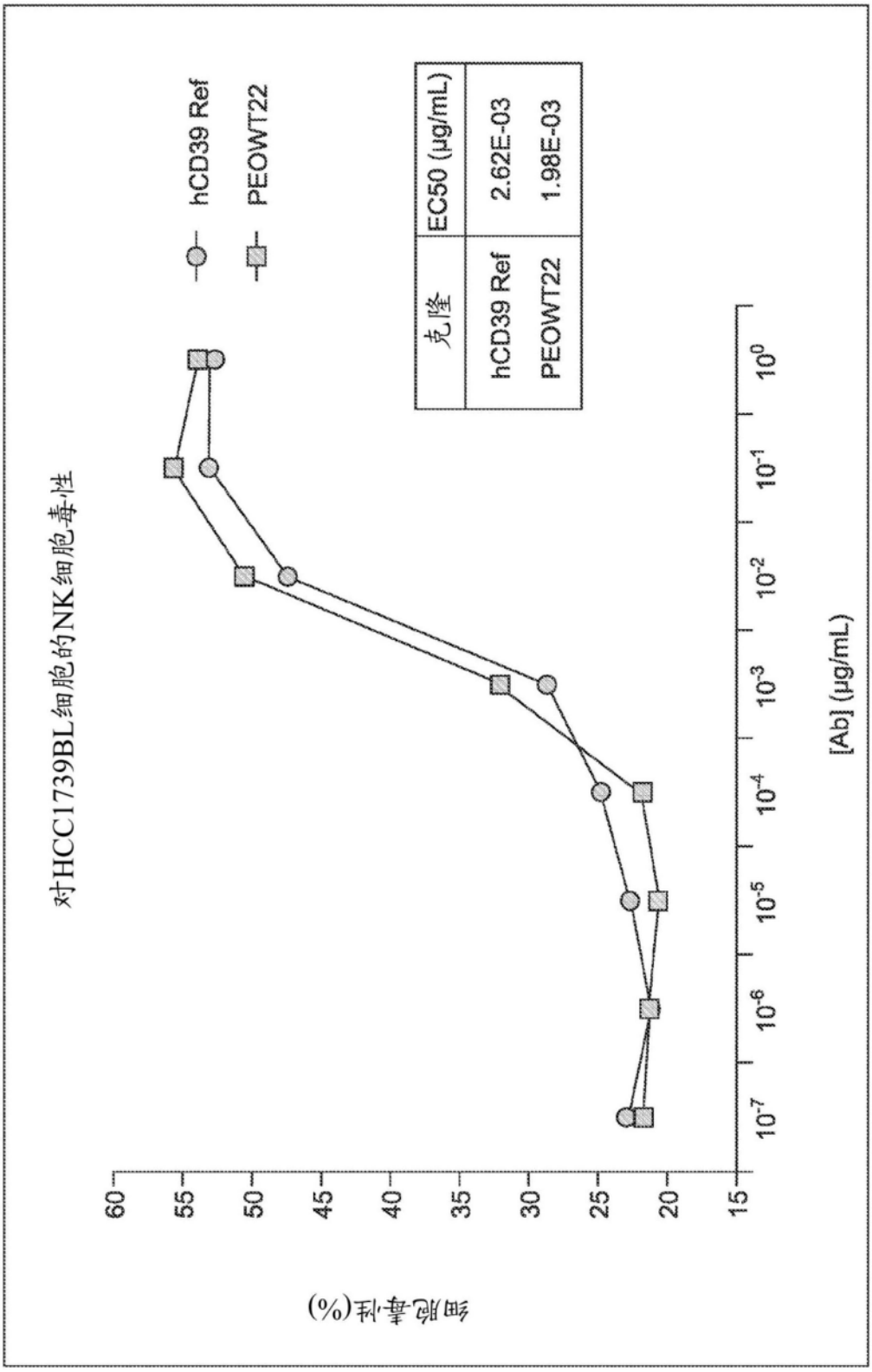

对HCC1739BL细胞的NK细胞毒性
hCD39 Ref
PEOWT22
克隆
EC50 (μg/mL)
hCD39 Ref
2.62E-03
PEOWT22
1.98E-03
细胞毒性(%)
[Ab] (μg/mL)
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10-7
10-6
10-5
10-4
10-3
10-2
10-1
100

图2

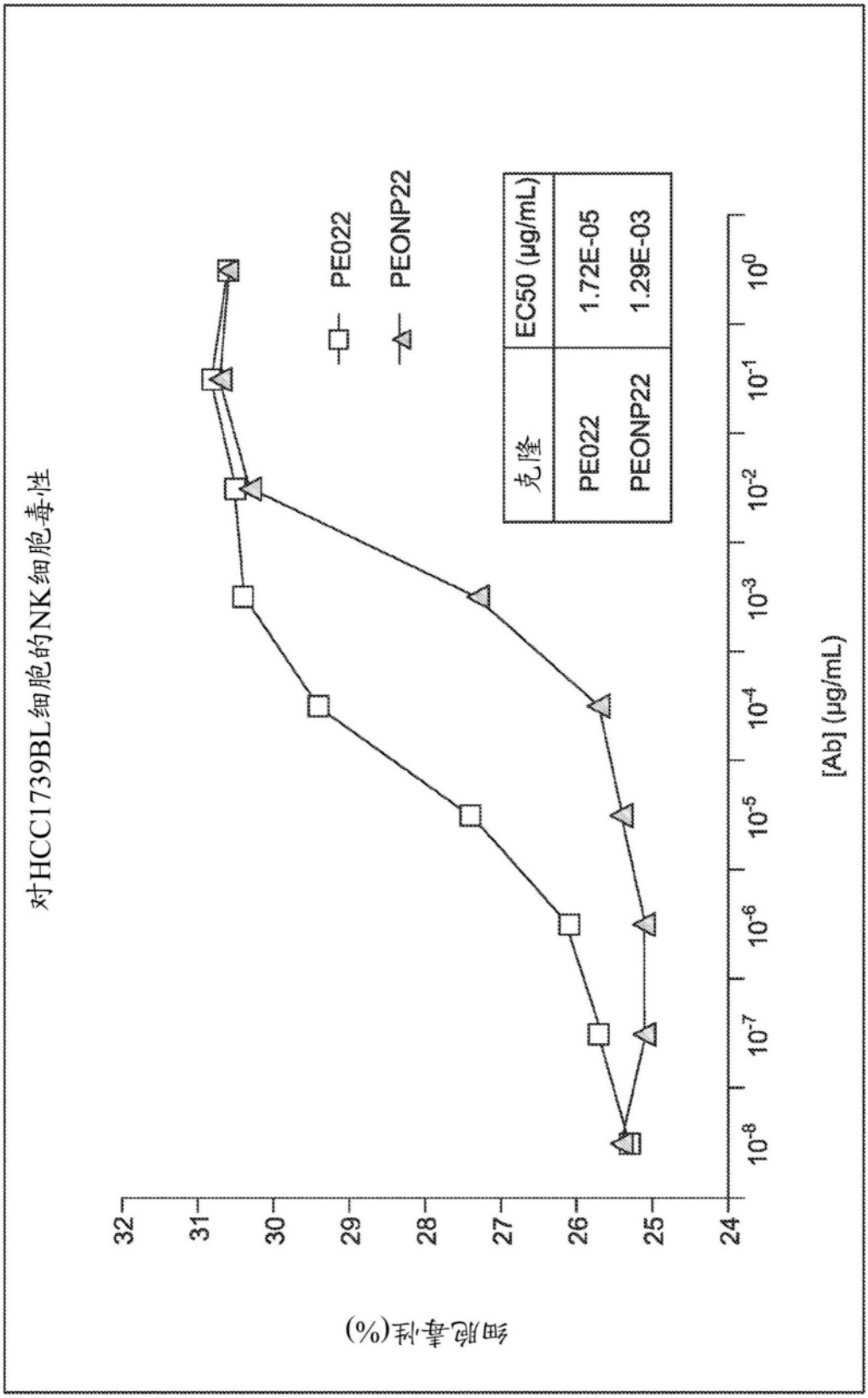

对HCC1739BL细胞的NK细胞毒性
PE022
PEONP22
克隆
EC50 (μg/mL)
PE022
1.72E-05
PEONP22
1.29E-03
细胞毒性(%)
[Ab] (μg/mL)

图3

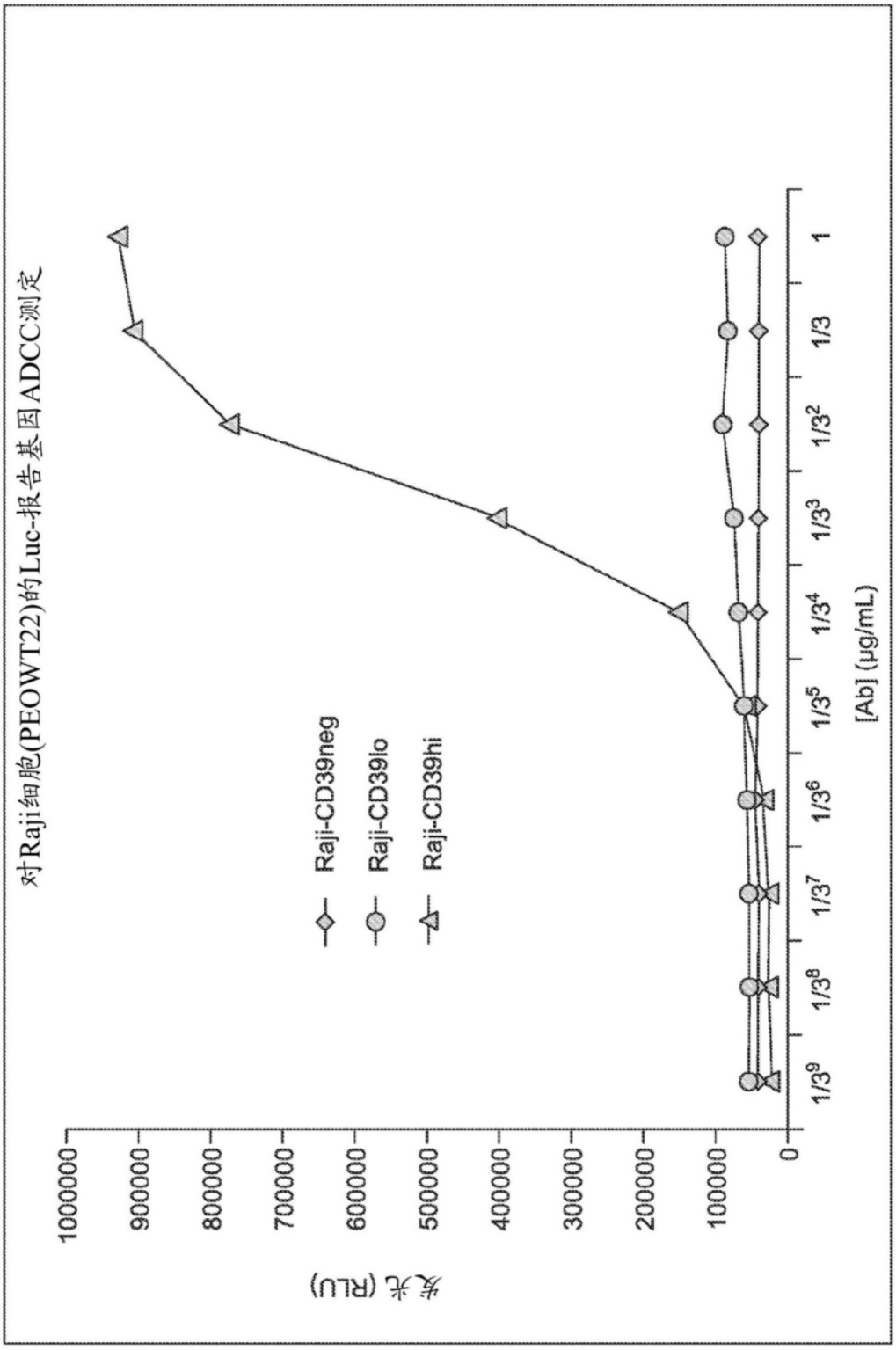

对Raji细胞(PEOWT22)的Luc-报告基因ADCC测定
发光 (RLU)
1000000
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
Raji-CD39neg
Raji-CD39lo
Raji-CD39hi
1/3^9
1/3^8
1/3^7
1/3^6
1/3^5
1/3^4
1/3^3
1/3^2
1/3
1
[Ab] (μg/mL)

图4

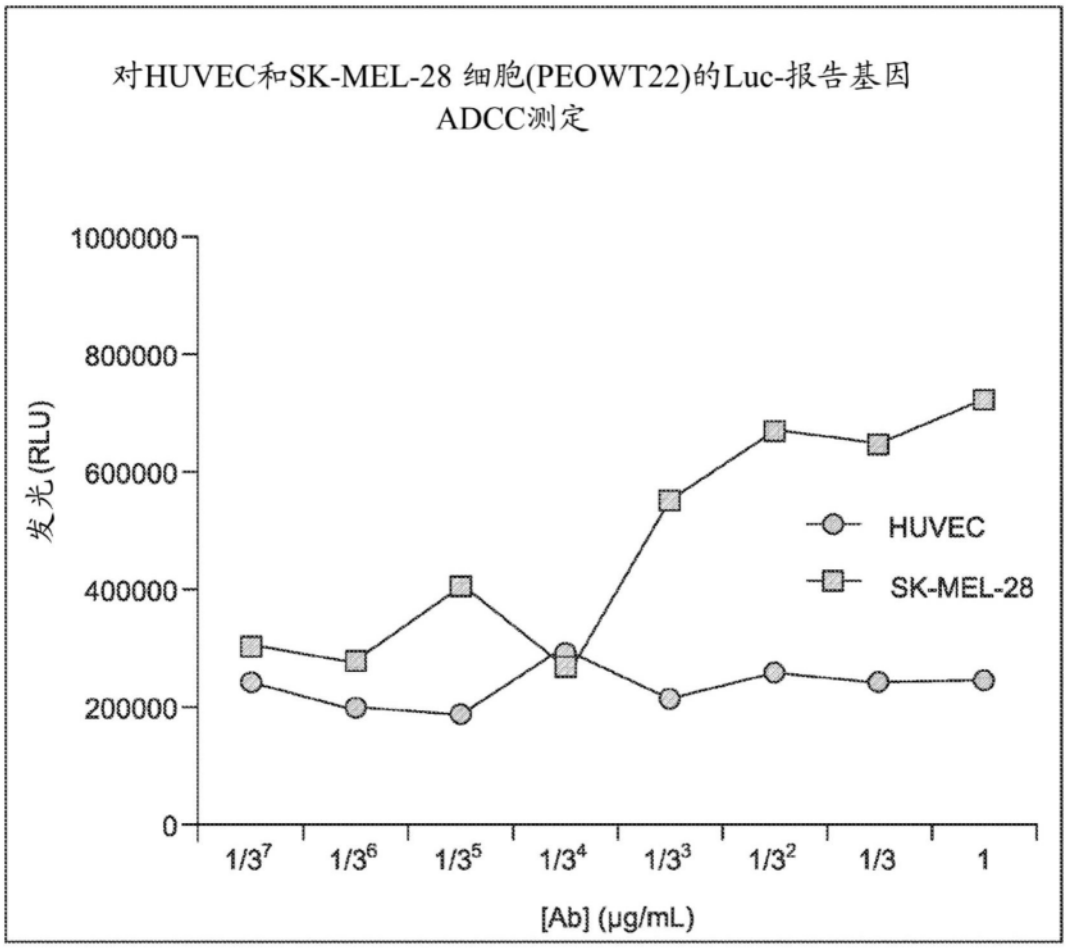

对HUVEC和SK-MEL-28 细胞(PEOWT22)的Luc-报告基因
ADCC测定
发光(RLU)
1000000
800000
600000
400000
200000
0
HUVEC
SK-MEL-28
1/3^7
1/3^6
1/3^5
1/3^4
1/3^3
1/3^2
1/3
1
[Ab] (μg/mL)

图5

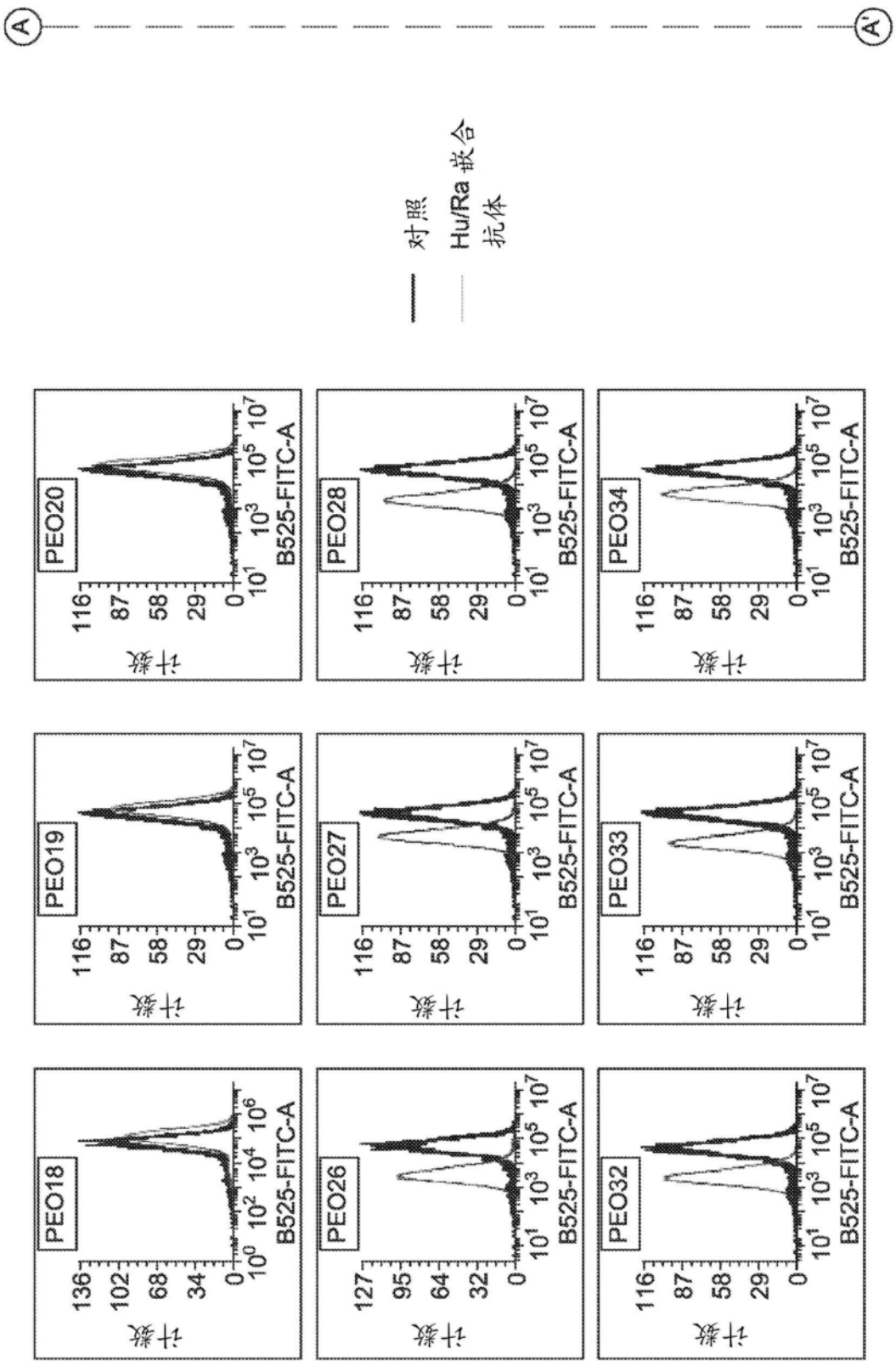

A
A'
对照
Hu/Ra 嵌合抗体
PEO20
PEO19
PEO18
PEO28
PEO27
PEO26
PEO34
PEO33
PEO32
计数
B525-FITC-A

图6

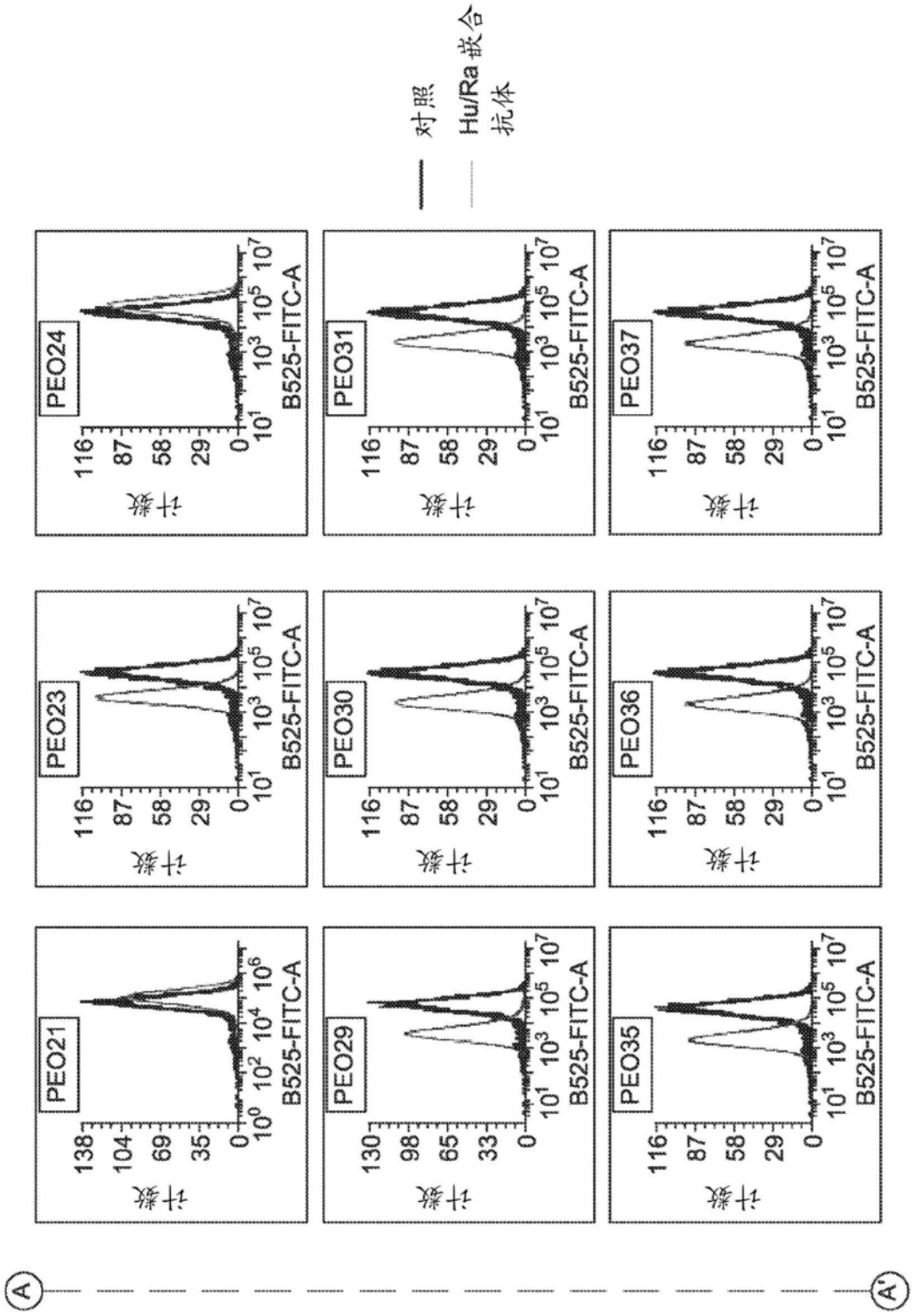

对照
Hu/Ra 嵌合抗体
PEO24
PEO23
PEO21
PEO31
PEO30
PEO29
PEO37
PEO36
PEO35
计数
B525-FITC-A
A
A'

图6(续)

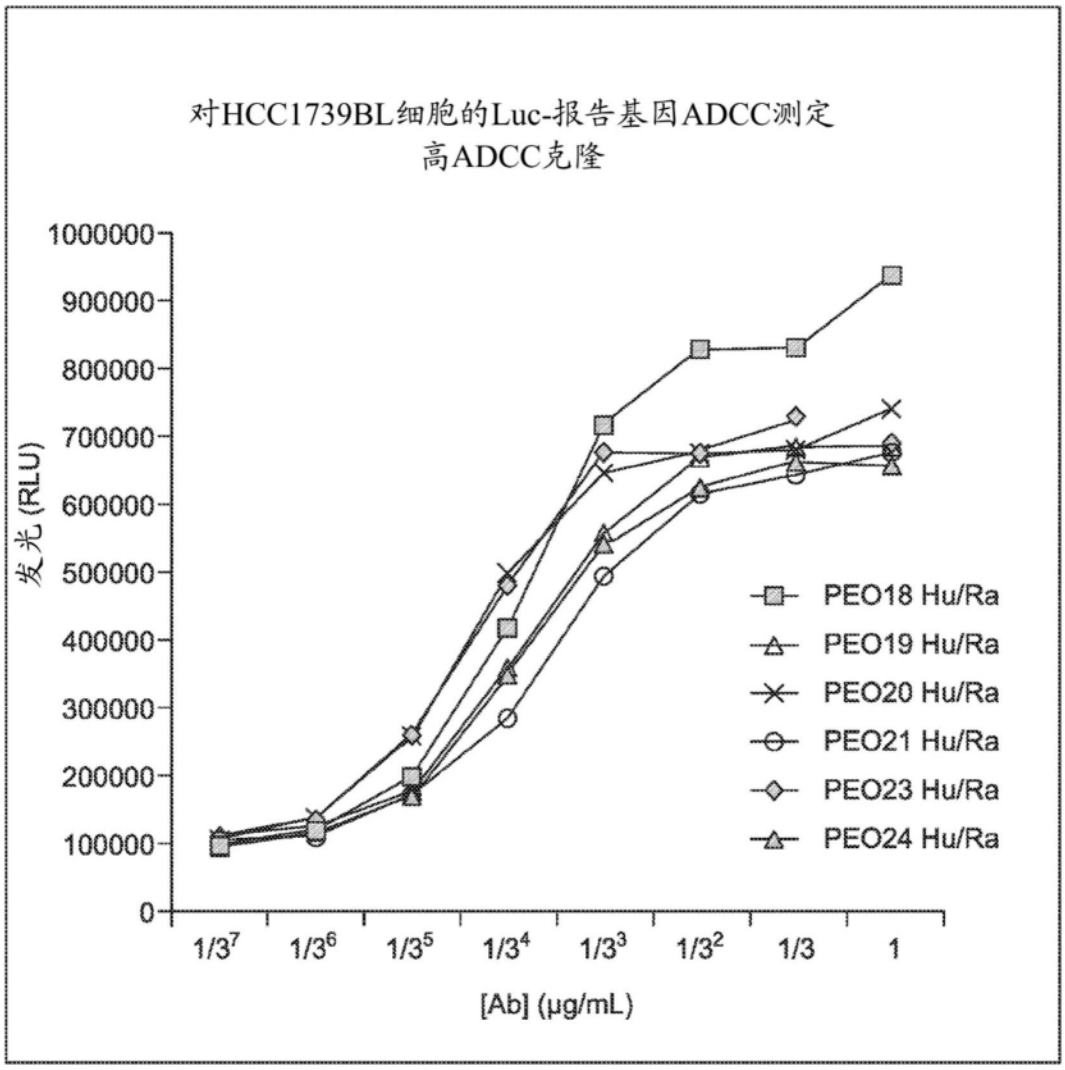

对HCC1739BL细胞的Luc-报告基因ADCC测定
高ADCC克隆
发光 (RLU)
1000000
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
1/3^7
1/3^6
1/3^5
1/3^4
1/3^3
1/3^2
1/3
1
[Ab] (μg/mL)
PEO18 Hu/Ra
PEO19 Hu/Ra
PEO20 Hu/Ra
PEO21 Hu/Ra
PEO23 Hu/Ra
PEO24 Hu/Ra

图7

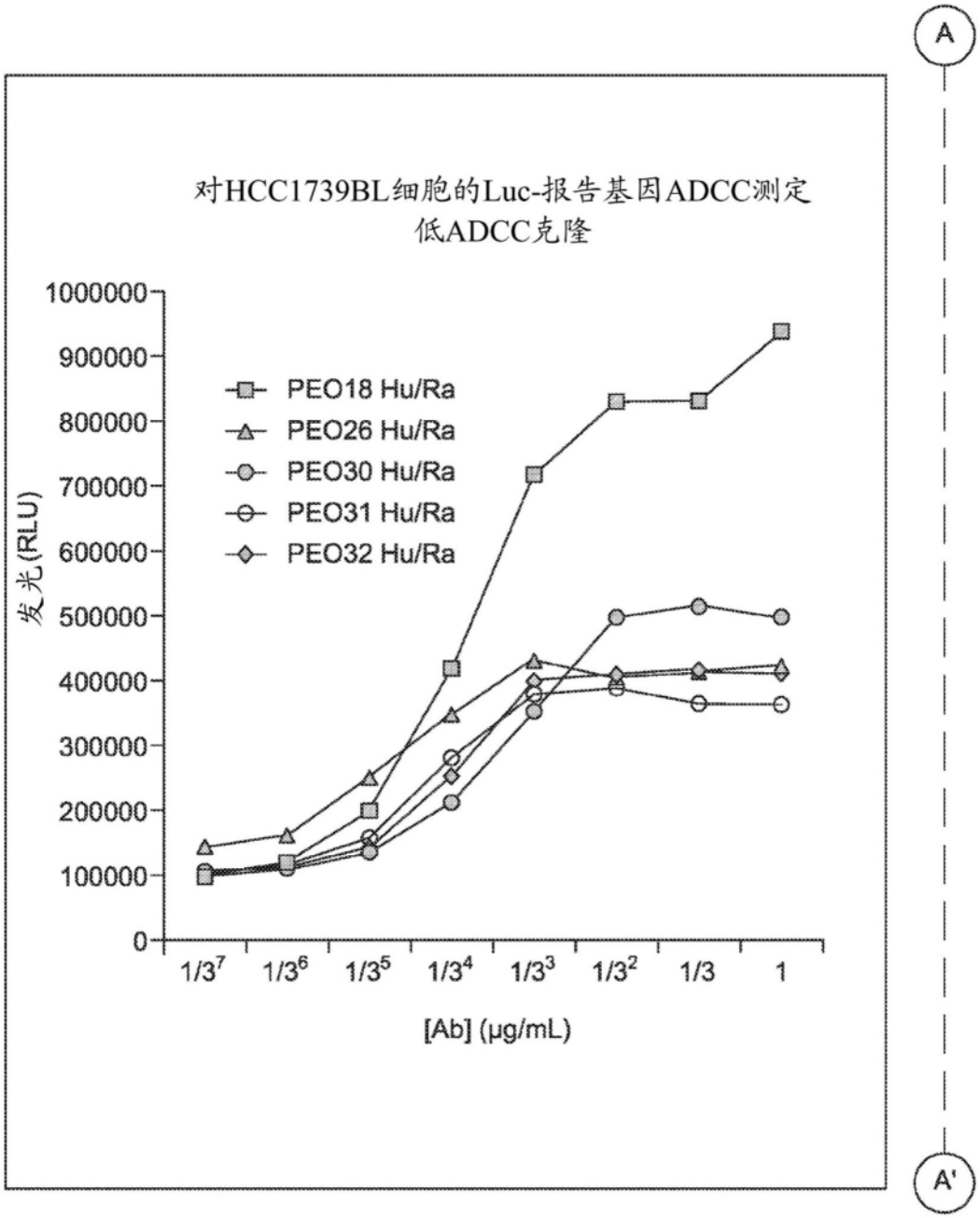

A
对HCC1739BL细胞的Luc-报告基因ADCC测定
低ADCC克隆
发光(RLU)
1000000
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
PEO18 Hu/Ra
PEO26 Hu/Ra
PEO30 Hu/Ra
PEO31 Hu/Ra
PEO32 Hu/Ra
1/3^7
1/3^6
1/3^5
1/3^4
1/3^3
1/3^2
1/3
1
[Ab] (μg/mL)
A'

图8

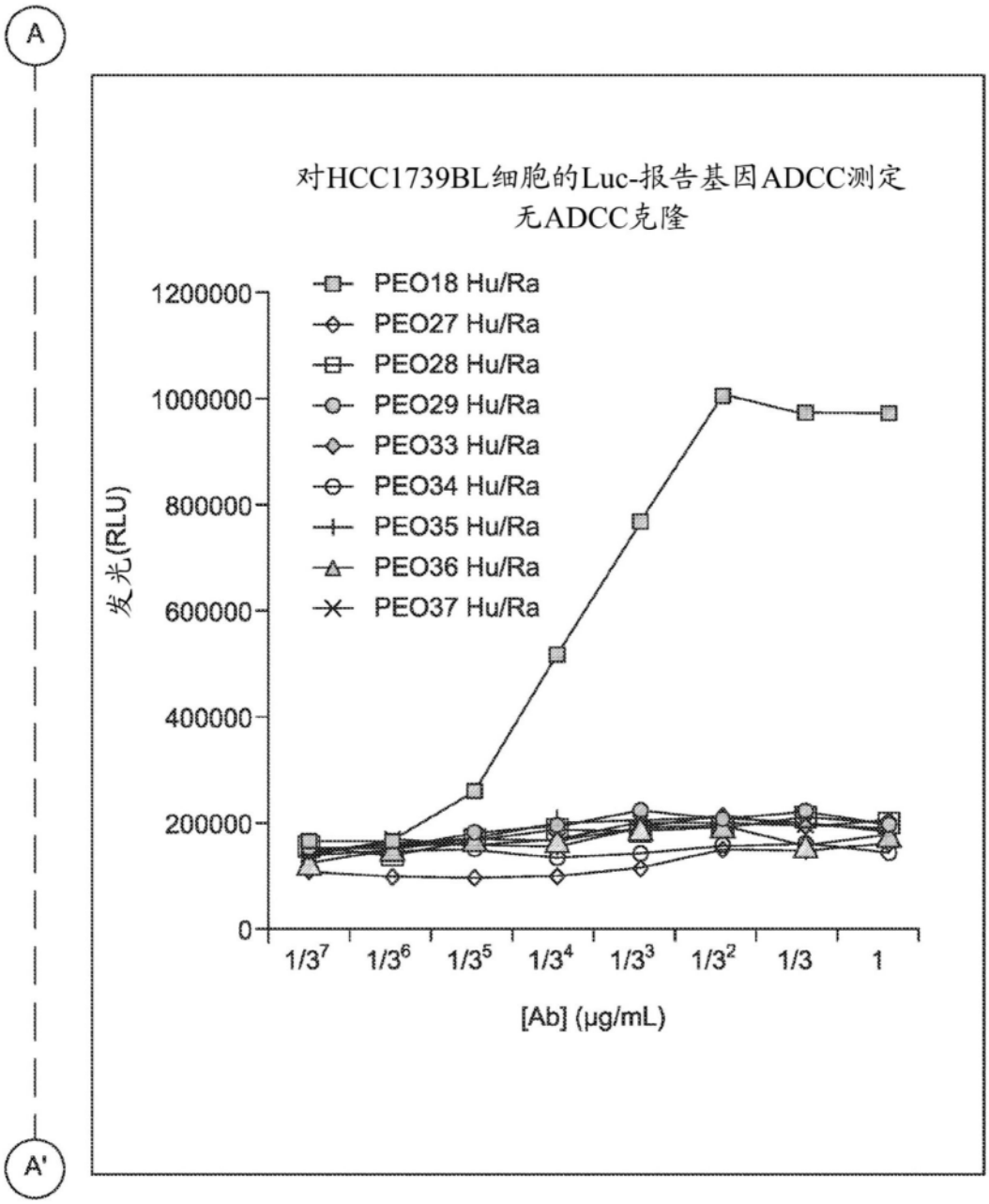

A
A'
对HCC1739BL细胞的Luc-报告基因ADCC测定
无ADCC克隆
PEO18 Hu/Ra
PEO27 Hu/Ra
PEO28 Hu/Ra
PEO29 Hu/Ra
PEO33 Hu/Ra
PEO34 Hu/Ra
PEO35 Hu/Ra
PEO36 Hu/Ra
PEO37 Hu/Ra
发光(RLU)
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
1/3^7
1/3^6
1/3^5
1/3^4
1/3^3
1/3^2
1/3
1
[Ab] (μg/mL)

图8(续)

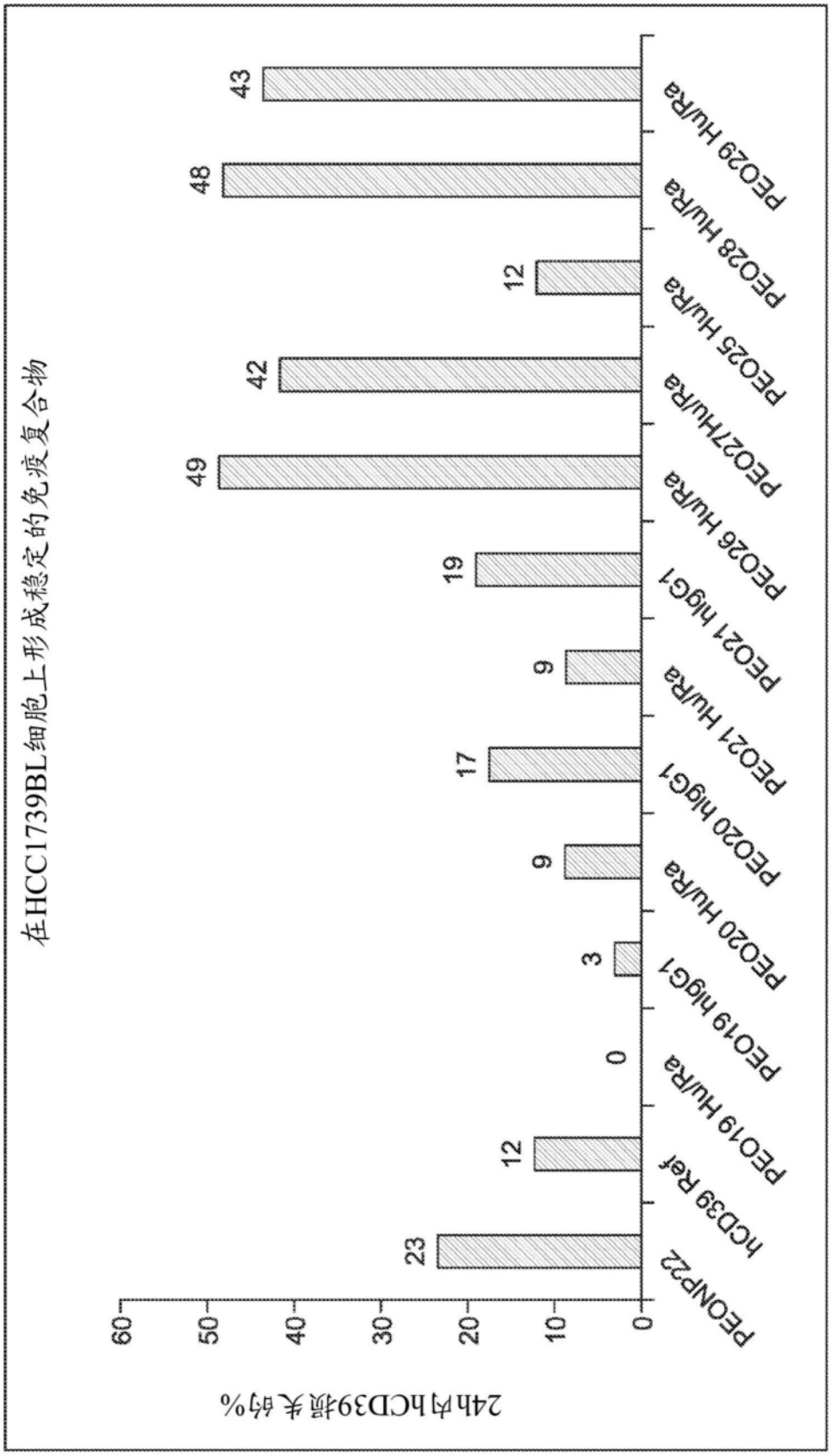

在HCC1739BL细胞上形成稳定的免疫复合物
24h内hCD39损失的%
0
10
20
30
40
50
60
PEONP22
hCD39 Ref
PEO19 Hu/Ra
PEO19 hIgG1
PEO20 Hu/Ra
PEO20 hIgG1
PEO21 Hu/Ra
PEO21 hIgG1
PEO26 Hu/Ra
PEO27Hu/Ra
PEO25 Hu/Ra
PEO28 Hu/Ra
PEO29 Hu/Ra
23
12
0
3
9
17
9
19
49
42
12
48
43

图9

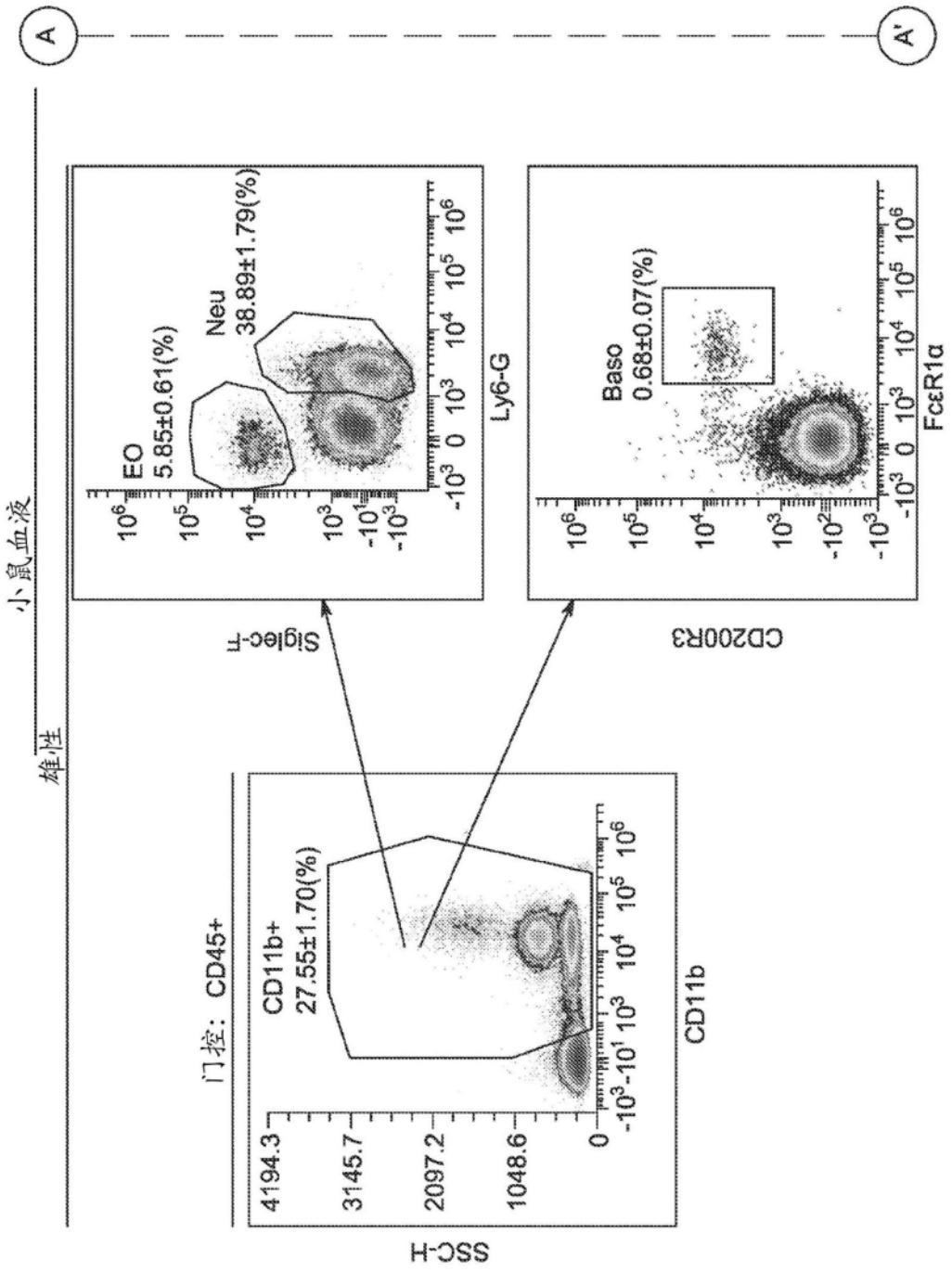

A
A'
小鼠血液
雄性
门控：CD45+
SSC-H
CD11b
CD11b+
27.55±1.70(%)
Siglec-F
Ly6-G
EO
5.85±0.61(%)
Neu
38.89±1.79(%)
CD200R3
FcεR1α
Baso
0.68±0.07(%)

图10

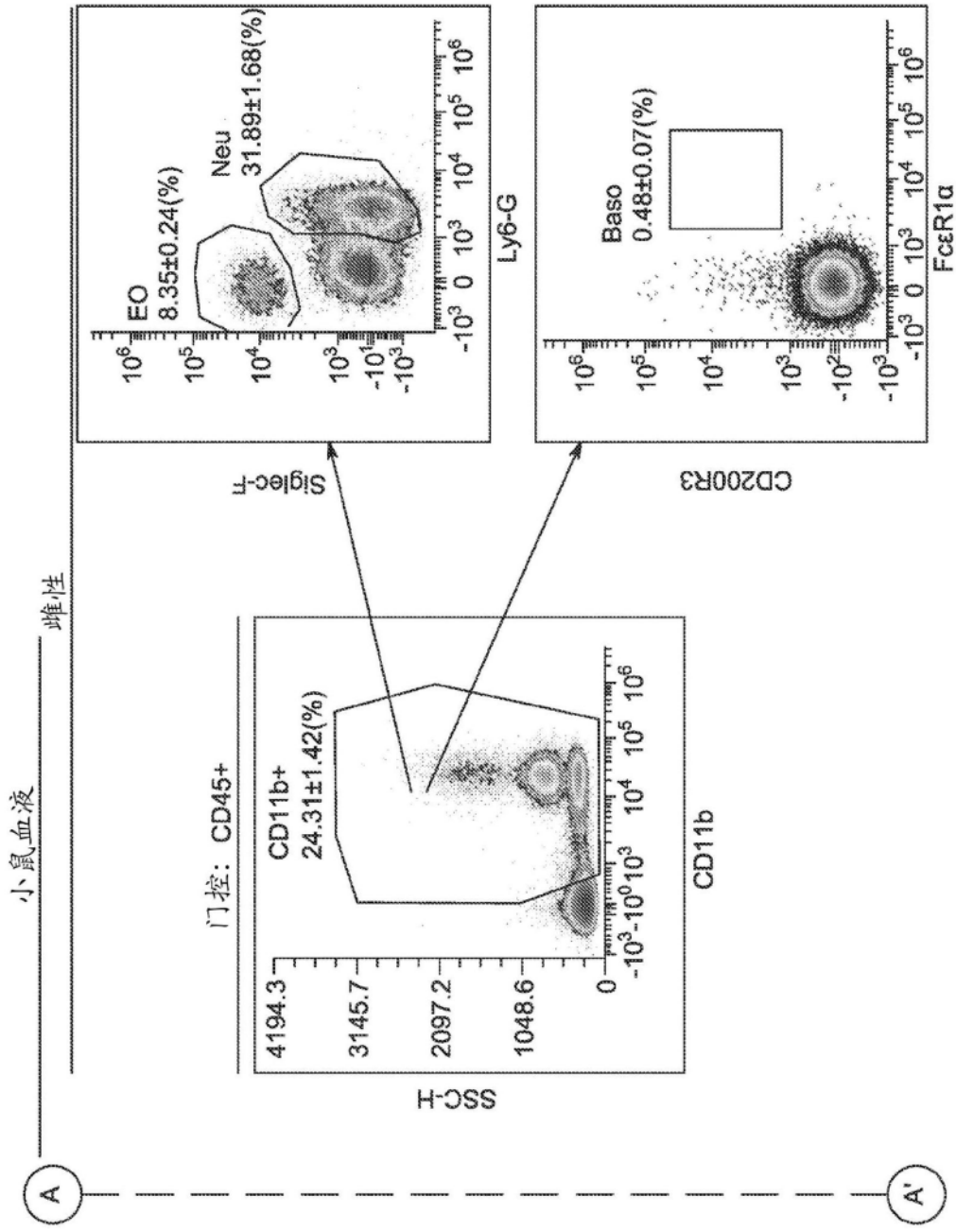

小鼠血液
雌性
A
A'
门控：CD45+
SSC-H
CD11b
CD11b+
24.31±1.42(%)
4194.3
3145.7
2097.2
1048.6
0
Siglec-F
Ly6-G
EO
8.35±0.24(%)
Neu
31.89±1.68(%)
CD200R3
FcεR1α
Baso
0.48±0.07(%)

图10(续)

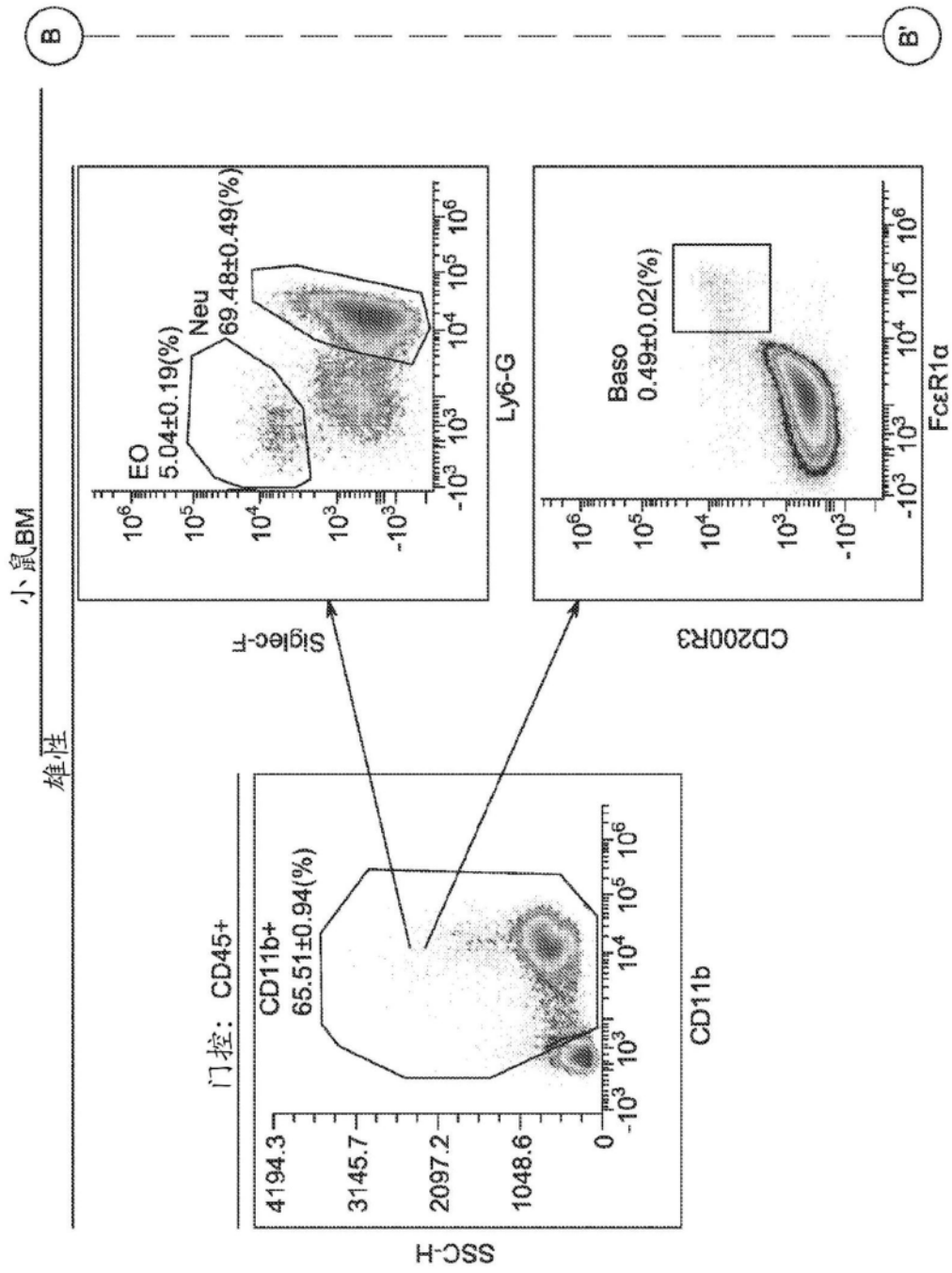

B
B'
小鼠BM
雄性
门控：CD45+
CD11b+
65.51±0.94(%)
SSC-H
CD11b
Siglec-F
EO
5.04±0.19(%)
Neu
69.48±0.49(%)
Ly6-G
CD200R3
Baso
0.49±0.02(%)
FcεR1α

图10(续)

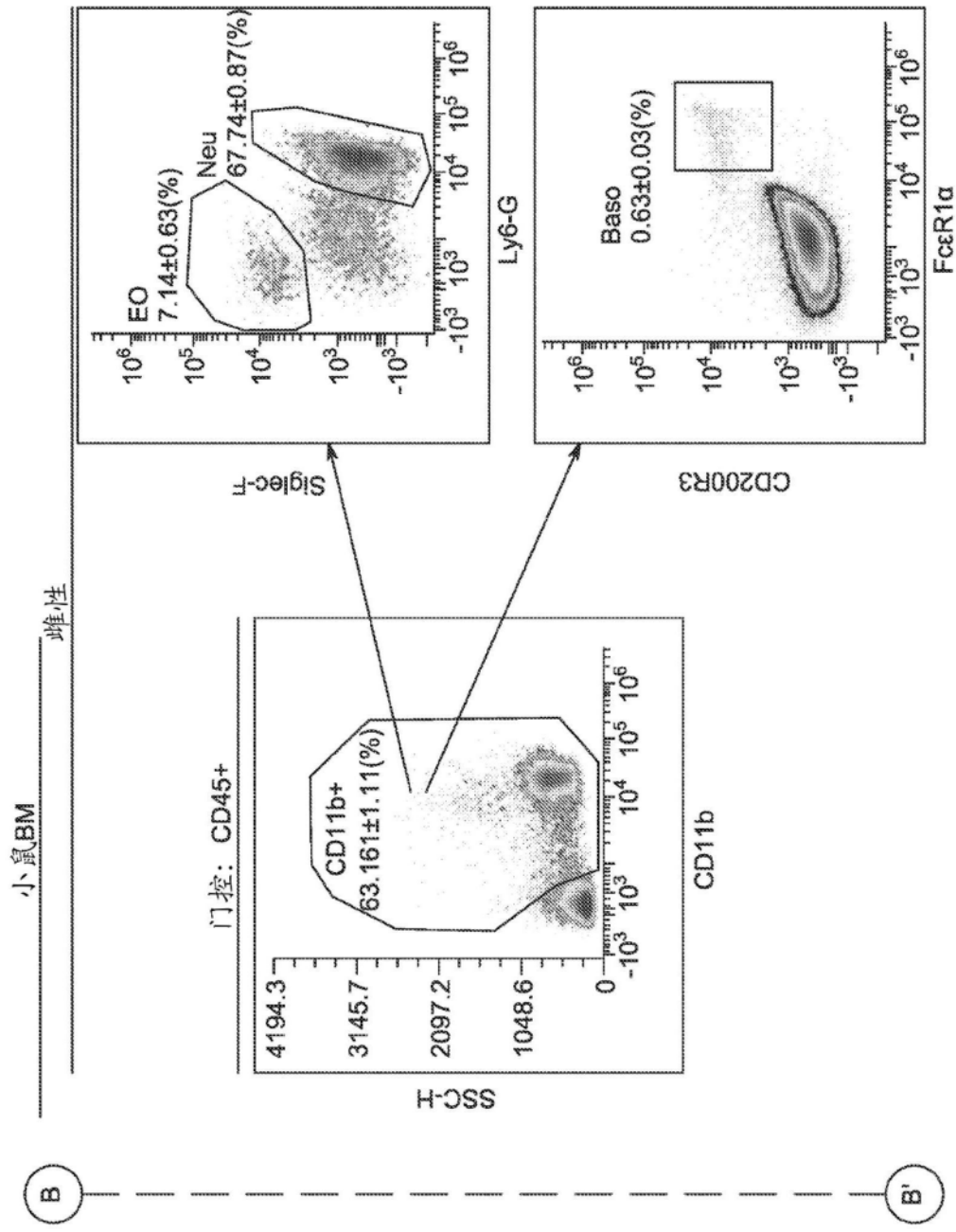

小鼠BM
雌性
门控：CD45+
SSC-H
CD11b
CD11b+
63.161±1.11(%)
Siglec-F
Ly6-G
EO
7.14±0.63(%)
Neu
67.74±0.87(%)
CD200R3
FcεR1a
Baso
0.63±0.03(%)
B
B'

图10(续)1

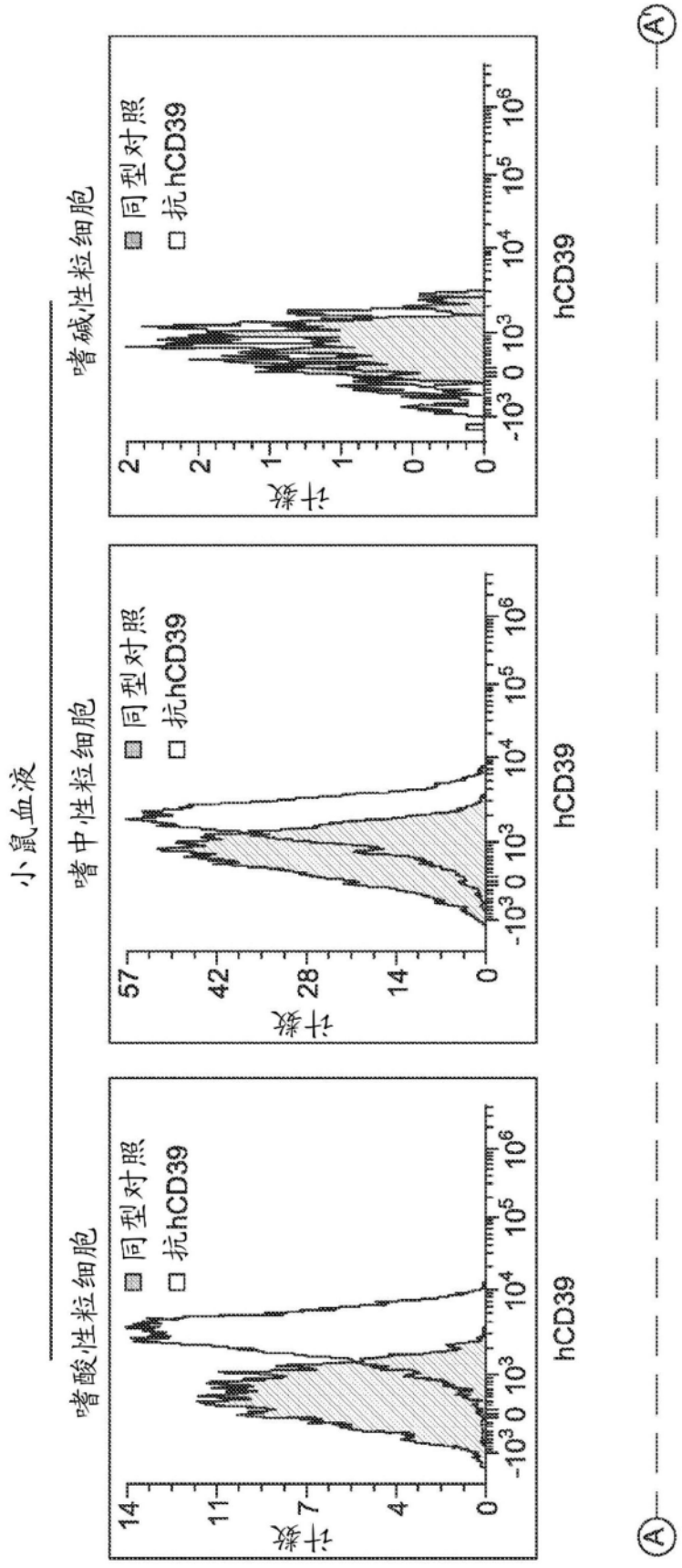


图11

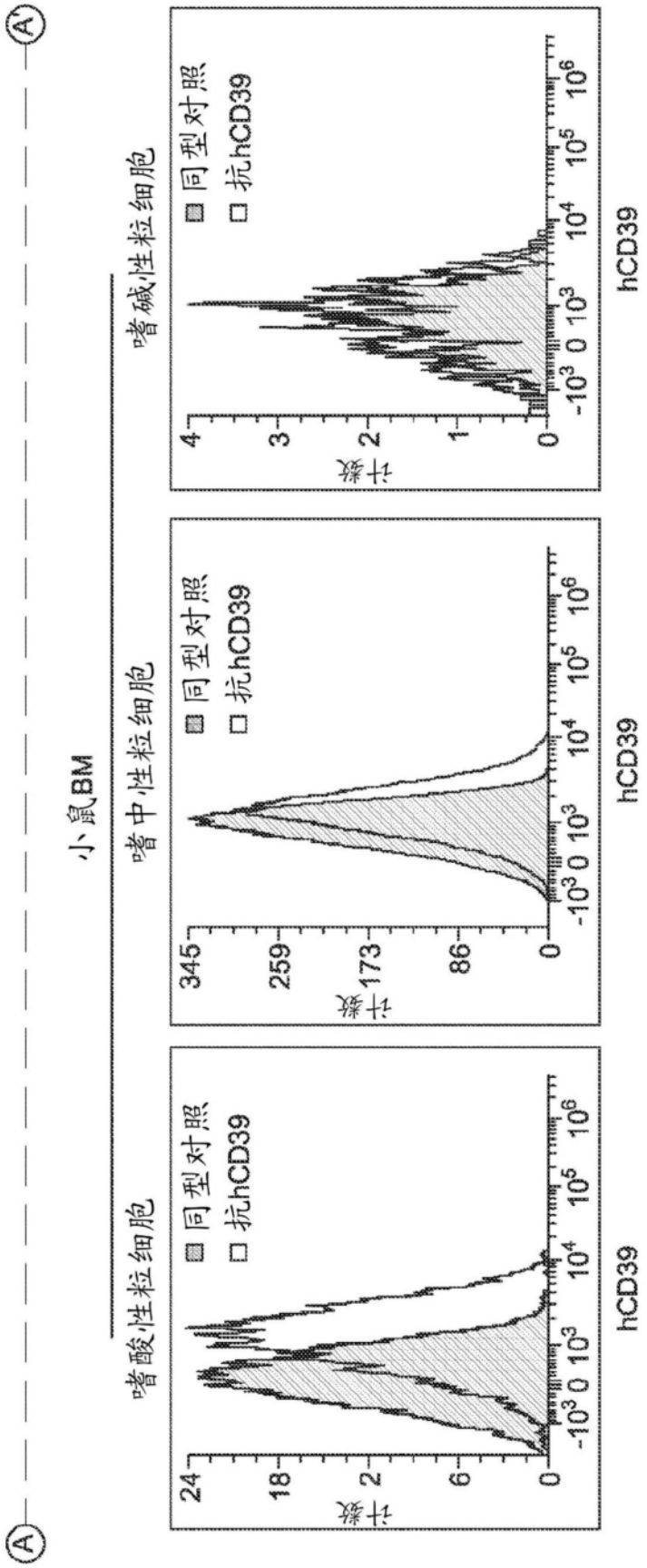


图11(续)

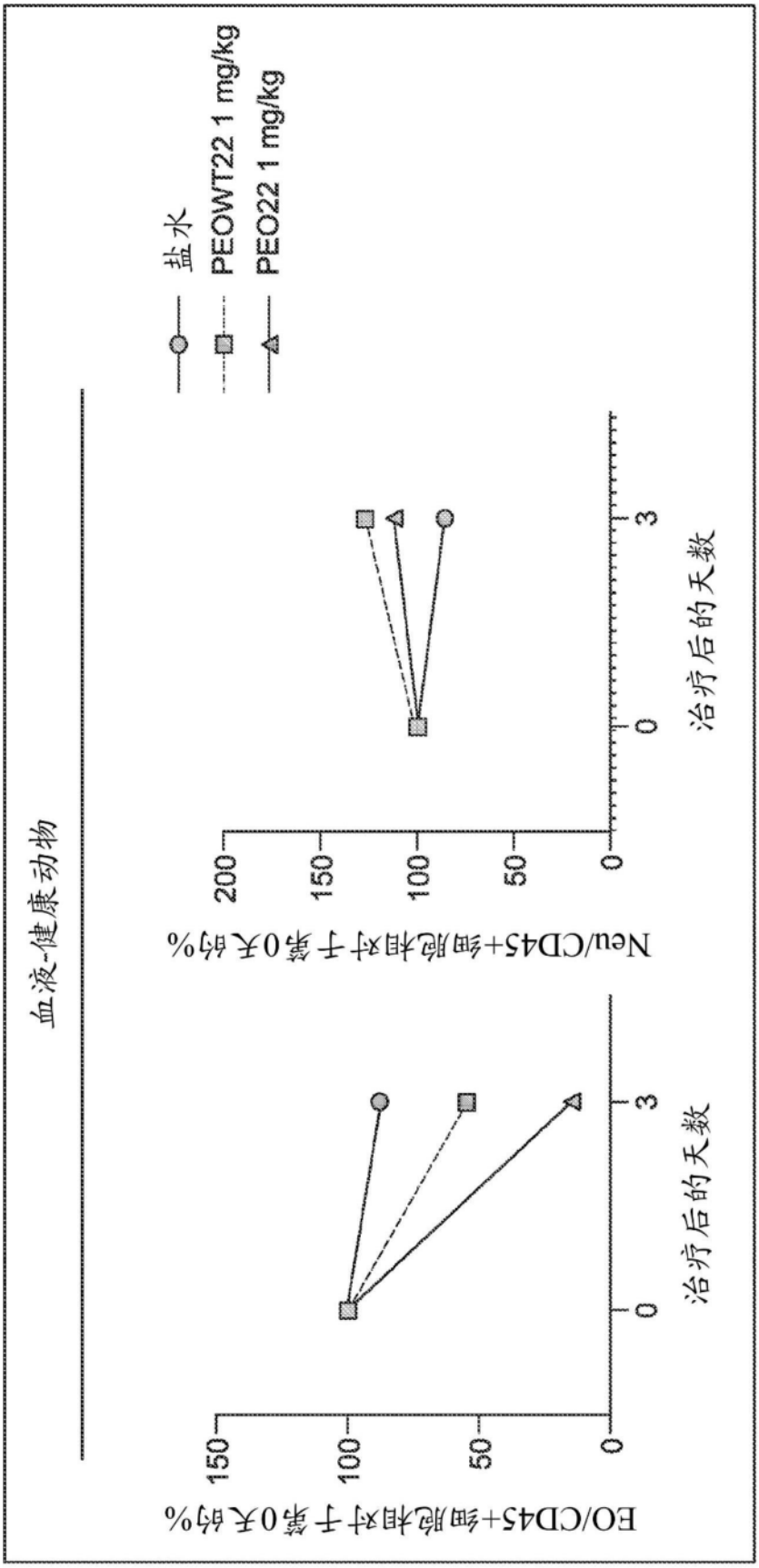

血液-健康动物
盐水
PEOWT22 1 mg/kg
PEO22 1 mg/kg
EO/CD45+细胞相对于第0天的%
Neu/CD45+细胞相对于第0天的%
治疗后的天数
治疗后的天数

图12

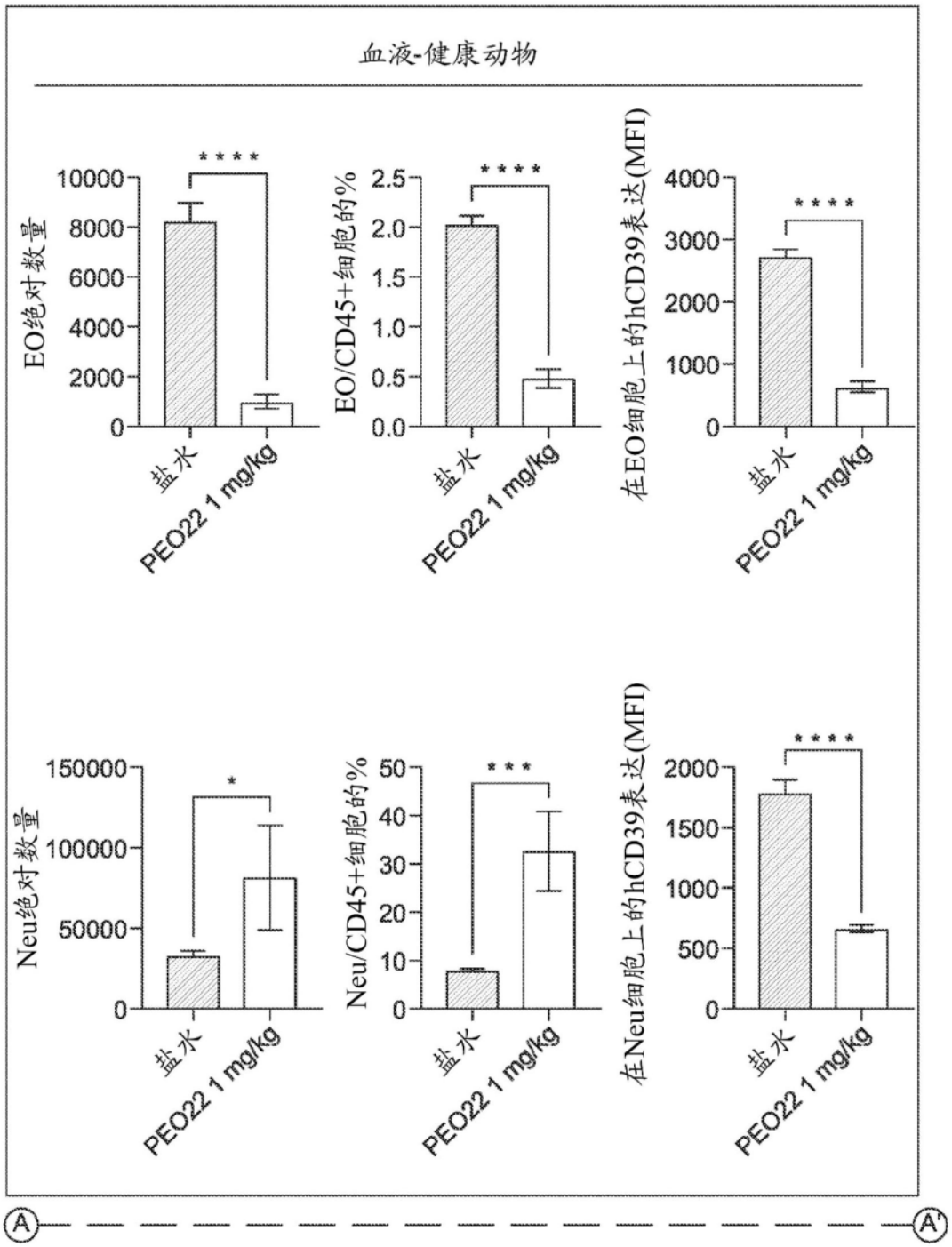

血液-健康动物
EO绝对数量
EO/CD45+细胞的%
在EO细胞上的hCD39表达(MFI)
Neu绝对数量
Neu/CD45+细胞的%
在Neu细胞上的hCD39表达(MFI)
盐水
PEO22 1 mg/kg
A
A'

图13

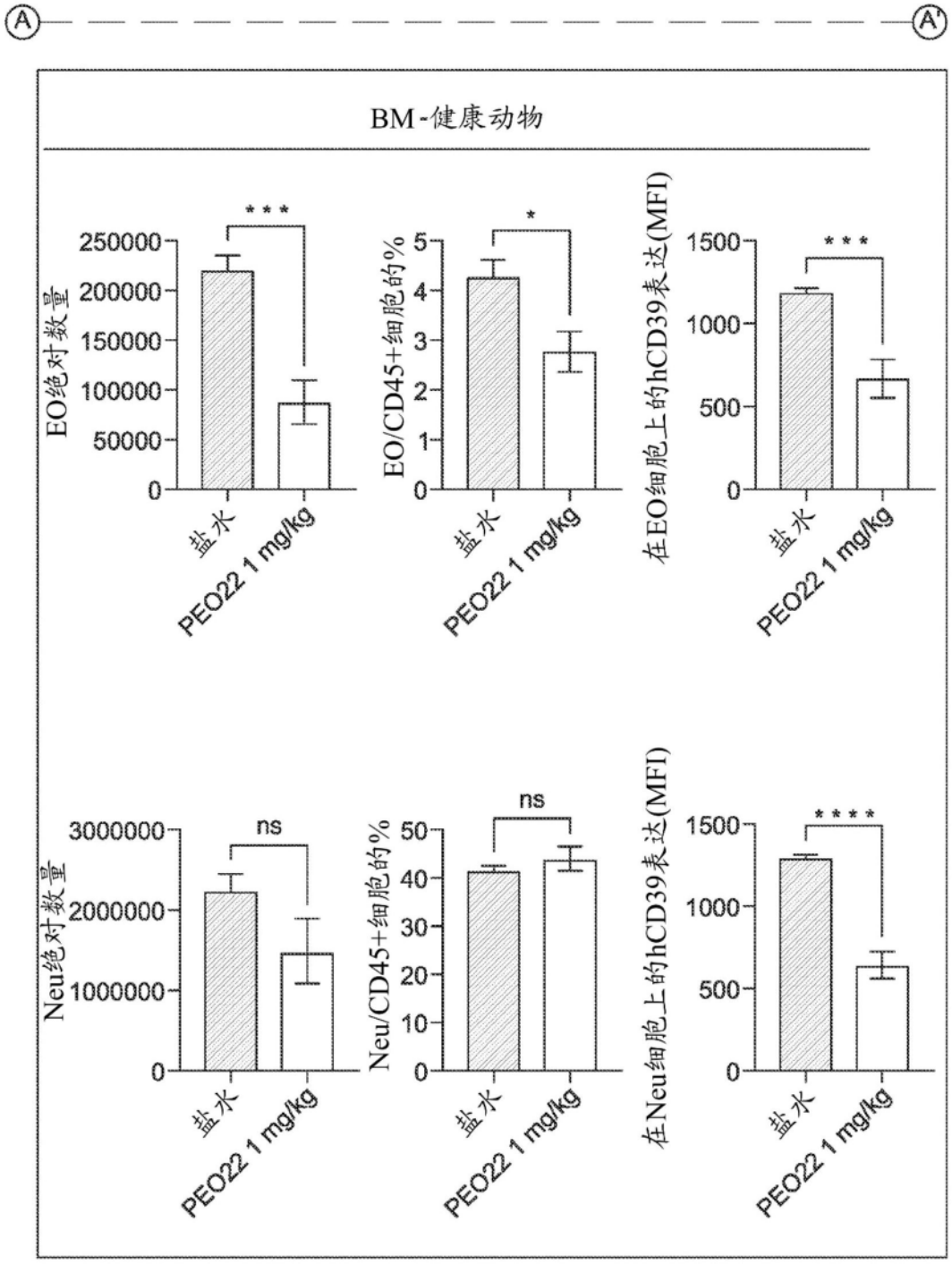

A
A'
BM-健康动物
EO绝对数量
250000
200000
150000
100000
50000
0
***
盐水
PEO22 1 mg/kg
EO/CD45+细胞的%
5
4
3
2
1
0
*
盐水
PEO22 1 mg/kg
在EO细胞上的hCD39表达(MFI)
1500
1000
500
0
***
盐水
PEO22 1 mg/kg
Neu绝对数量
3000000
2000000
1000000
0
ns
盐水
PEO22 1 mg/kg
Neu/CD45+细胞的%
50
40
30
20
10
0
ns
盐水
PEO22 1 mg/kg
在Neu细胞上的hCD39表达(MFI)
1500
1000
500
0
****
盐水
PEO22 1 mg/kg

图13(续)

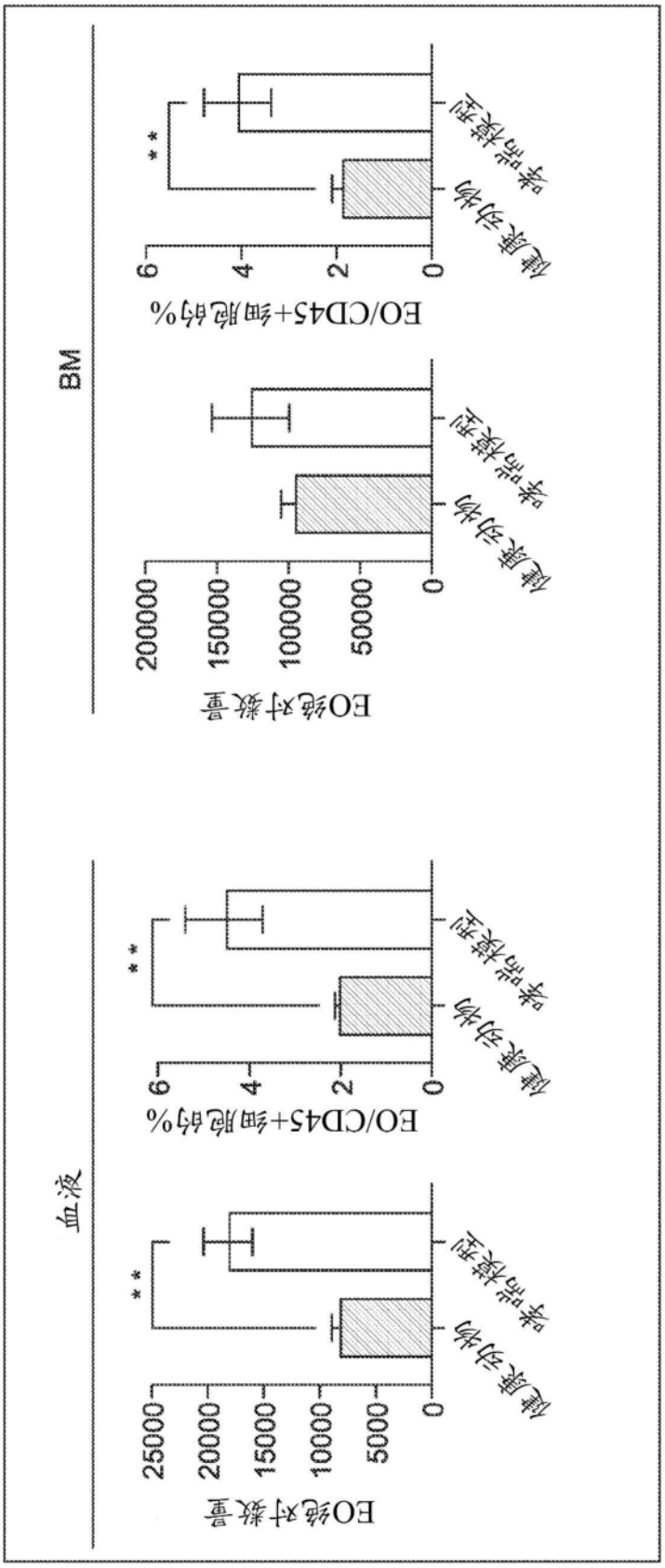


图14

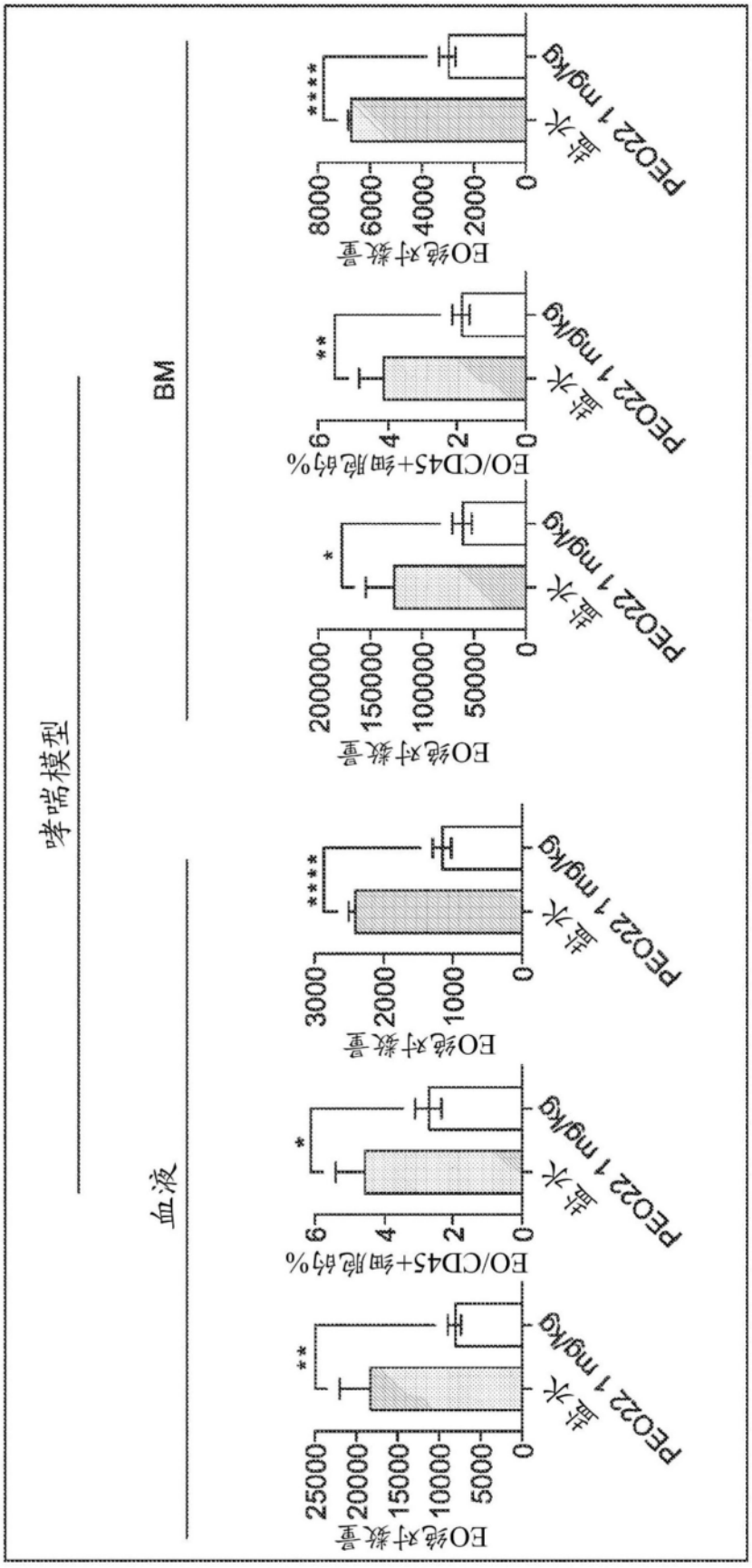


图15

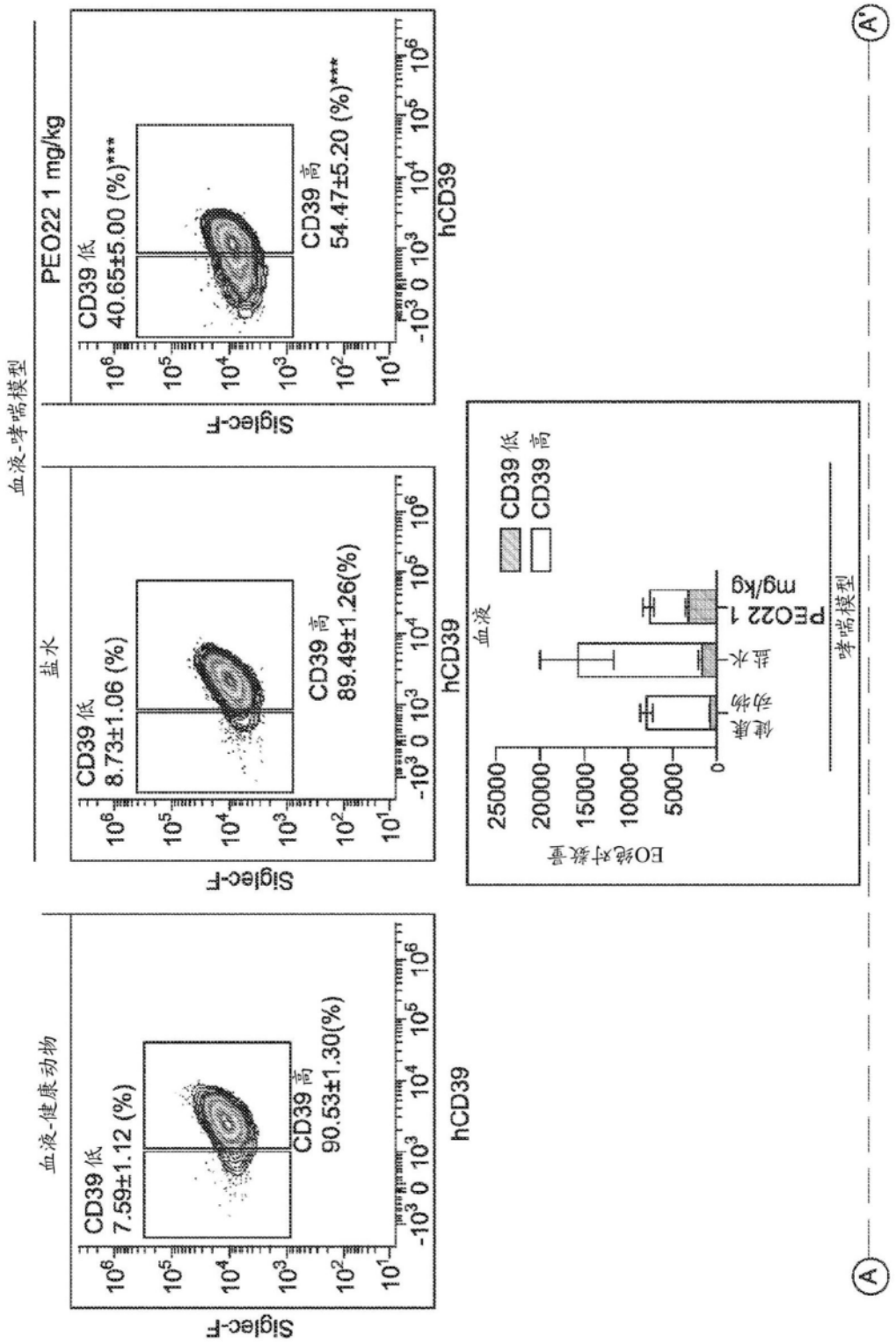

血液-哮喘模型
盐水
PEO22 1 mg/kg
CD39 低
8.73±1.06 (%)
CD39 高
89.49±1.26(%)
CD39 低
40.65±5.00 (%)***
CD39 高
54.47±5.20 (%)***
Siglec-F
hCD39
血液-健康动物
CD39 低
7.59±1.12 (%)
CD39 高
90.53±1.30(%)
血液
CD39 低
CD39 高
EO细胞数量
健康动物
盐水
PEO22 1 mg/kg
哮喘模型
A
A'

图16

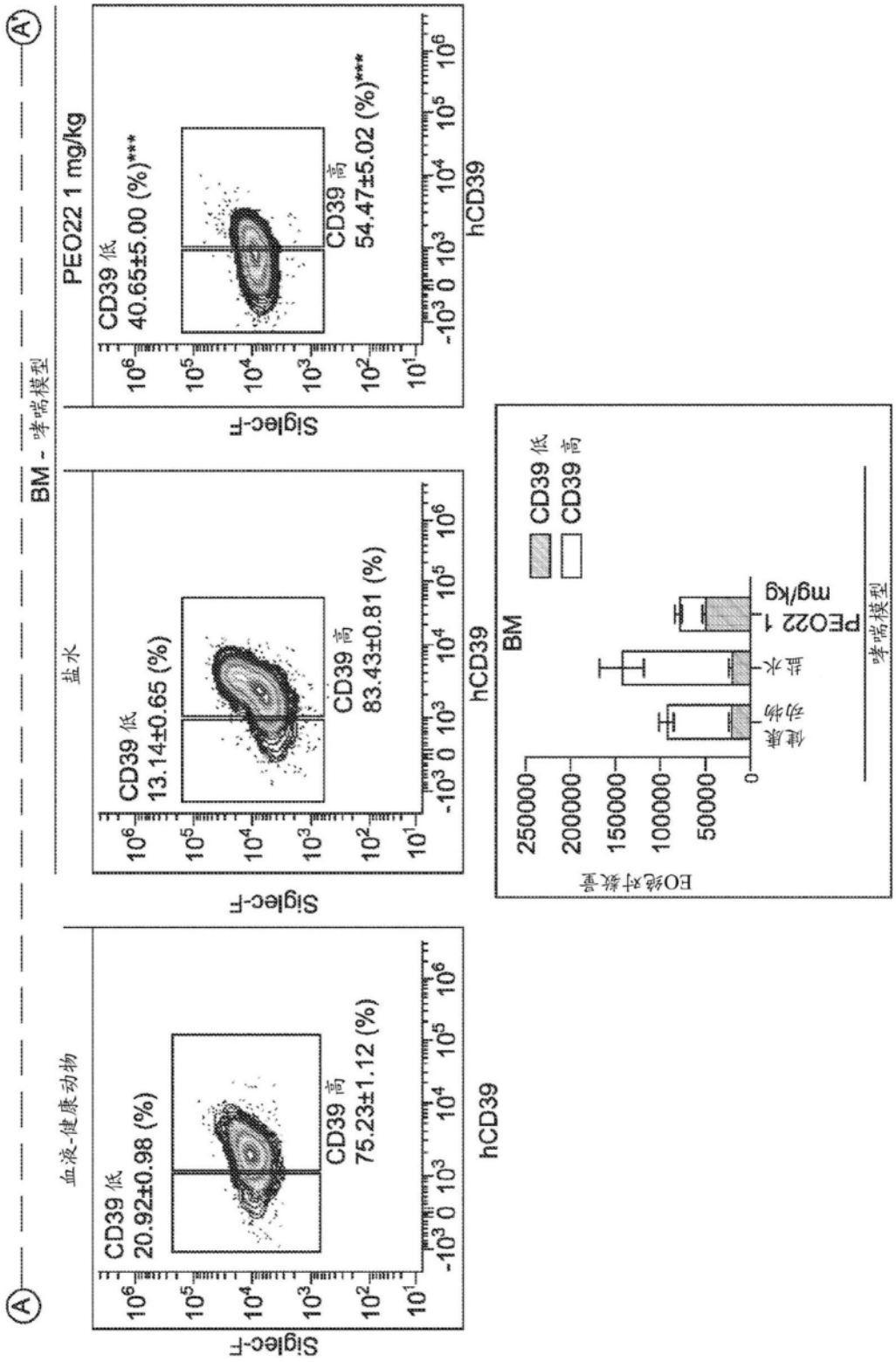

A
A'
血液-健康动物
BM - 哮喘模型
盐水
PEO22 1 mg/kg
CD39 低
20.92±0.98 (%)
CD39 高
75.23±1.12 (%)
CD39 低
13.14±0.65 (%)
CD39 高
83.43±0.81 (%)
CD39 低
40.65±5.00 (%)***
CD39 高
54.47±5.02 (%)***
Siglec-F
hCD39
BM
CD39 低
CD39 高
EO细胞计数量
健康动物
盐水
PEO22 1 mg/kg
哮喘模型

图16(续)

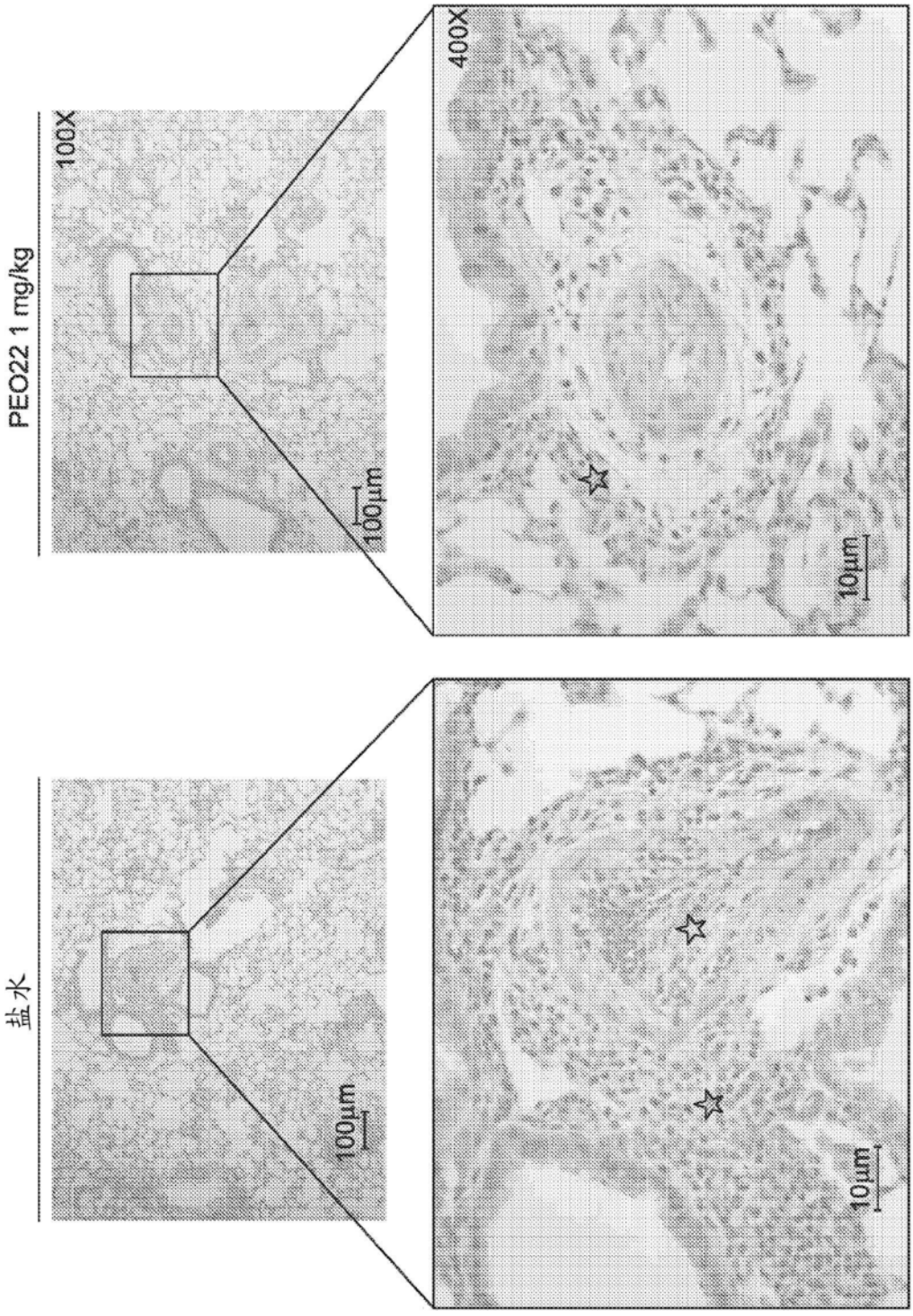


图17

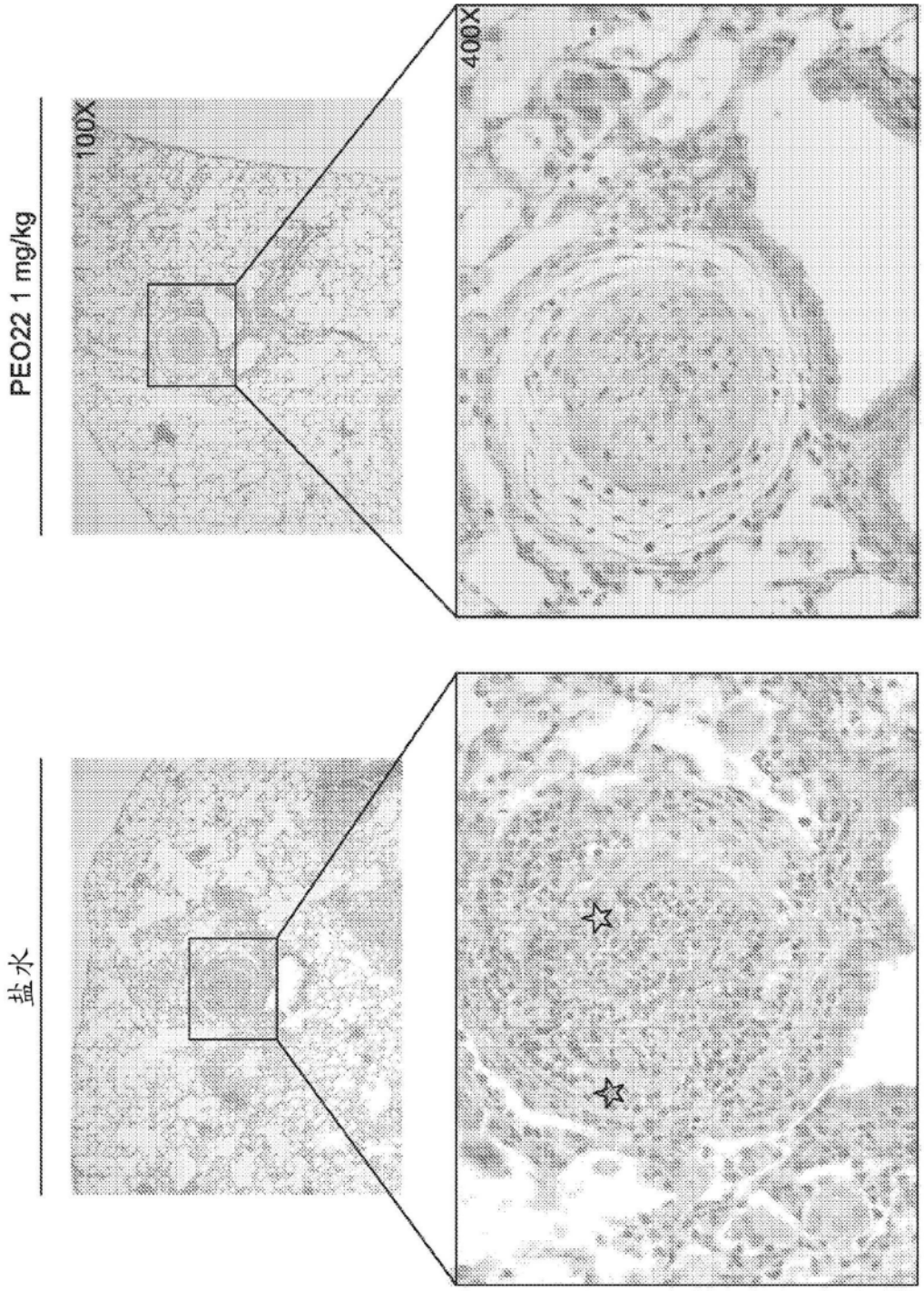


图18

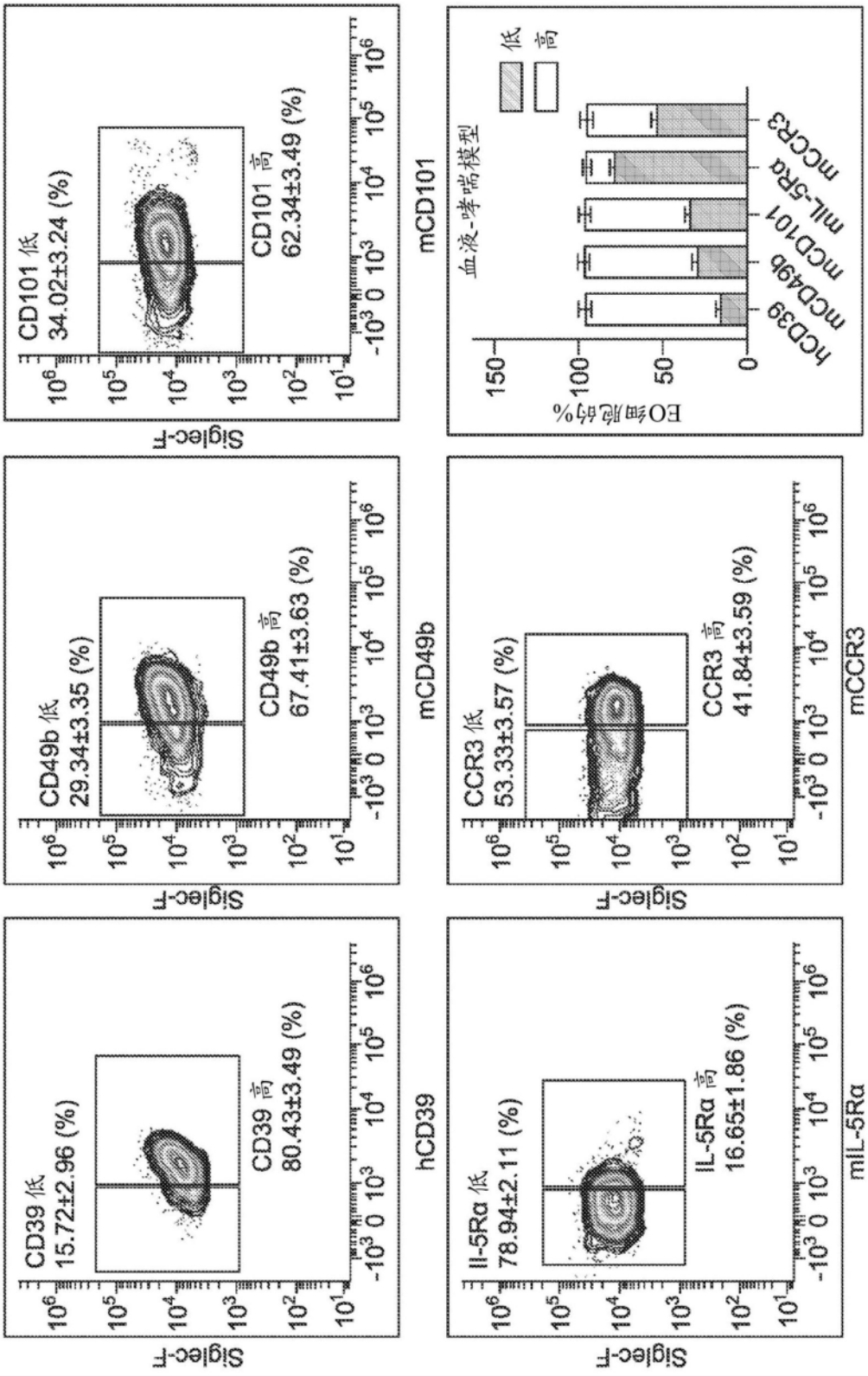

CD101 低
34.02±3.24 (%)
CD101 高
62.34±3.49 (%)
Siglec-F
mCD101
血液-哮喘模型
低
高
EO细胞的%
hCD39
mCD49b
mCD101
mIL-5Ra
mCCR3
CD49b 低
29.34±3.35 (%)
CD49b 高
67.41±3.63 (%)
mCD49b
CCR3 低
53.33±3.57 (%)
CCR3 高
41.84±3.59 (%)
mCCR3
CD39 低
15.72±2.96 (%)
CD39 高
80.43±3.49 (%)
hCD39
Il-5Ra 低
78.94±2.11 (%)
IL-5Ra 高
16.65±1.86 (%)
mIL-5Ra

图19

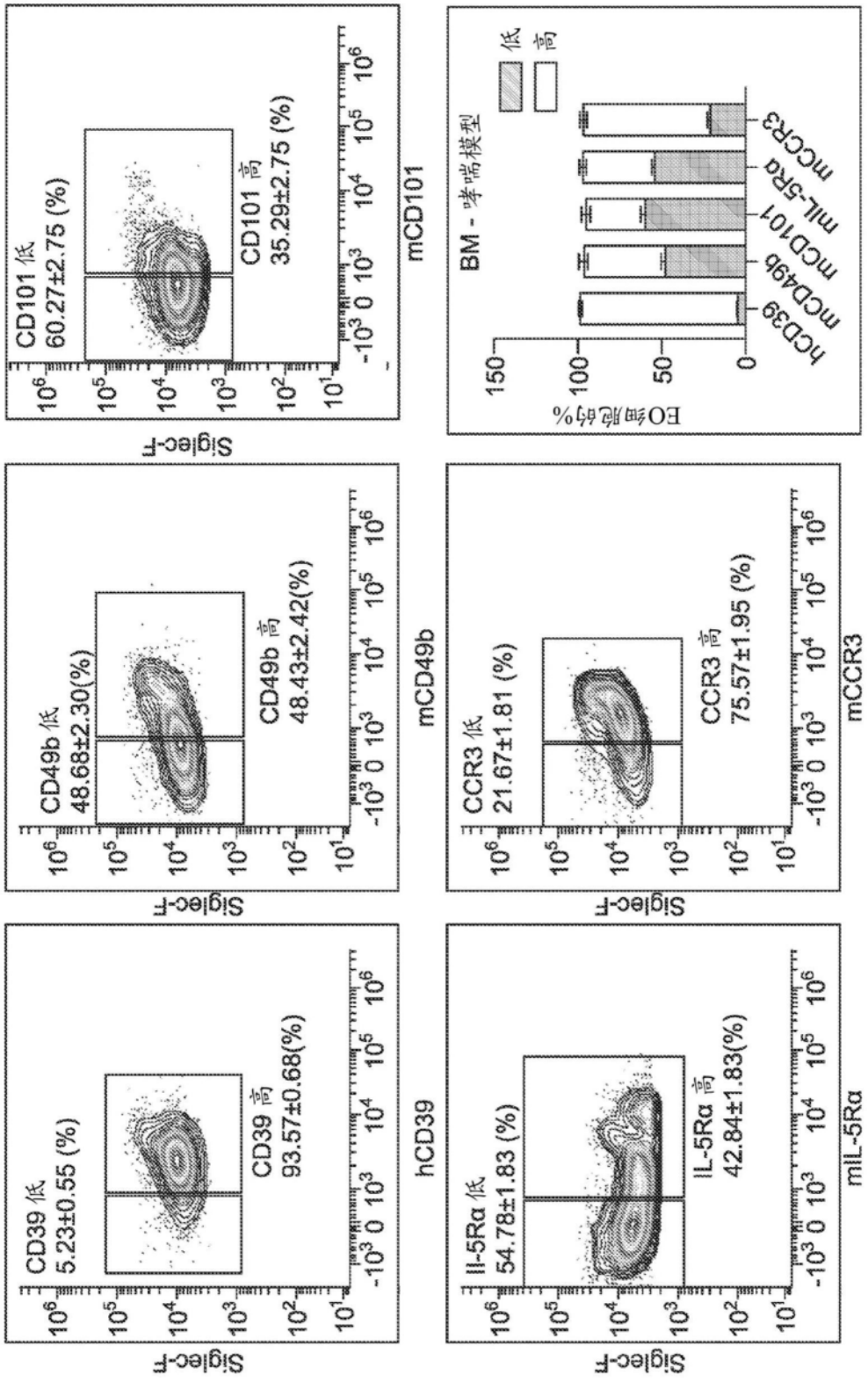

CD101 低
60.27±2.75 (%)
CD101 高
35.29±2.75 (%)
Siglec-F
mCD101
CD49b 低
48.68±2.30(%)
CD49b 高
48.43±2.42(%)
mCD49b
CCR3 低
21.67±1.81 (%)
CCR3 高
75.57±1.95 (%)
mCCR3
CD39 低
5.23±0.55 (%)
CD39 高
93.57±0.68(%)
hCD39
Il-5Ra 低
54.78±1.83 (%)
IL-5Ra 高
42.84±1.83(%)
miL-5Ra
BM - 哮喘模型
低
高
EO细胞的%
hCD39
mCD49b
mCD101
mIL-5Ra
mCCR3

图19(续)

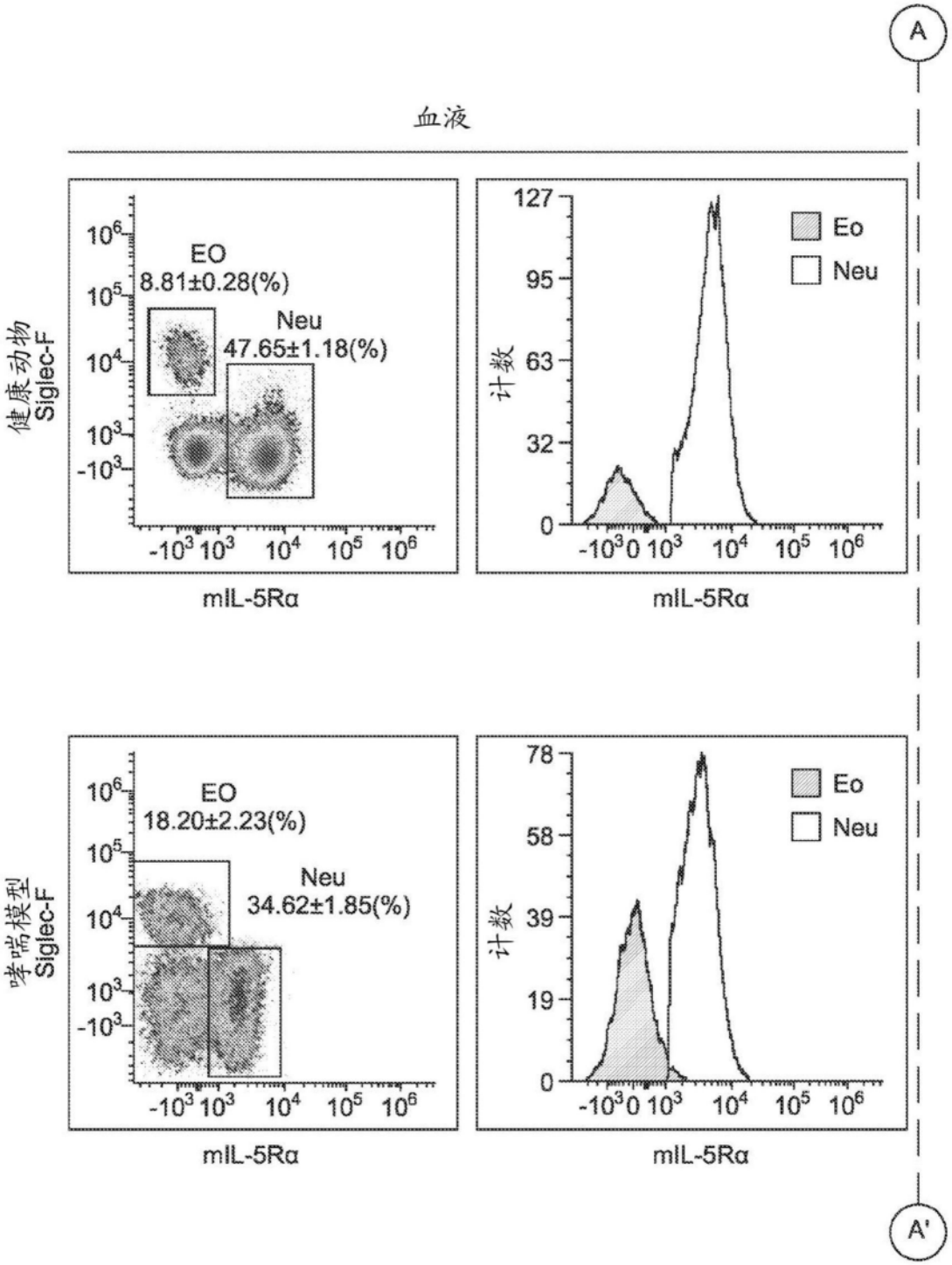

A
血液
健康动物
Siglec-F
EO
8.81±0.28(%)
Neu
47.65±1.18(%)
mIL-5Rα
计数
Eo
Neu
哮喘模型
Siglec-F
EO
18.20±2.23(%)
Neu
34.62±1.85(%)
mIL-5Rα
计数
Eo
Neu
A'

图20

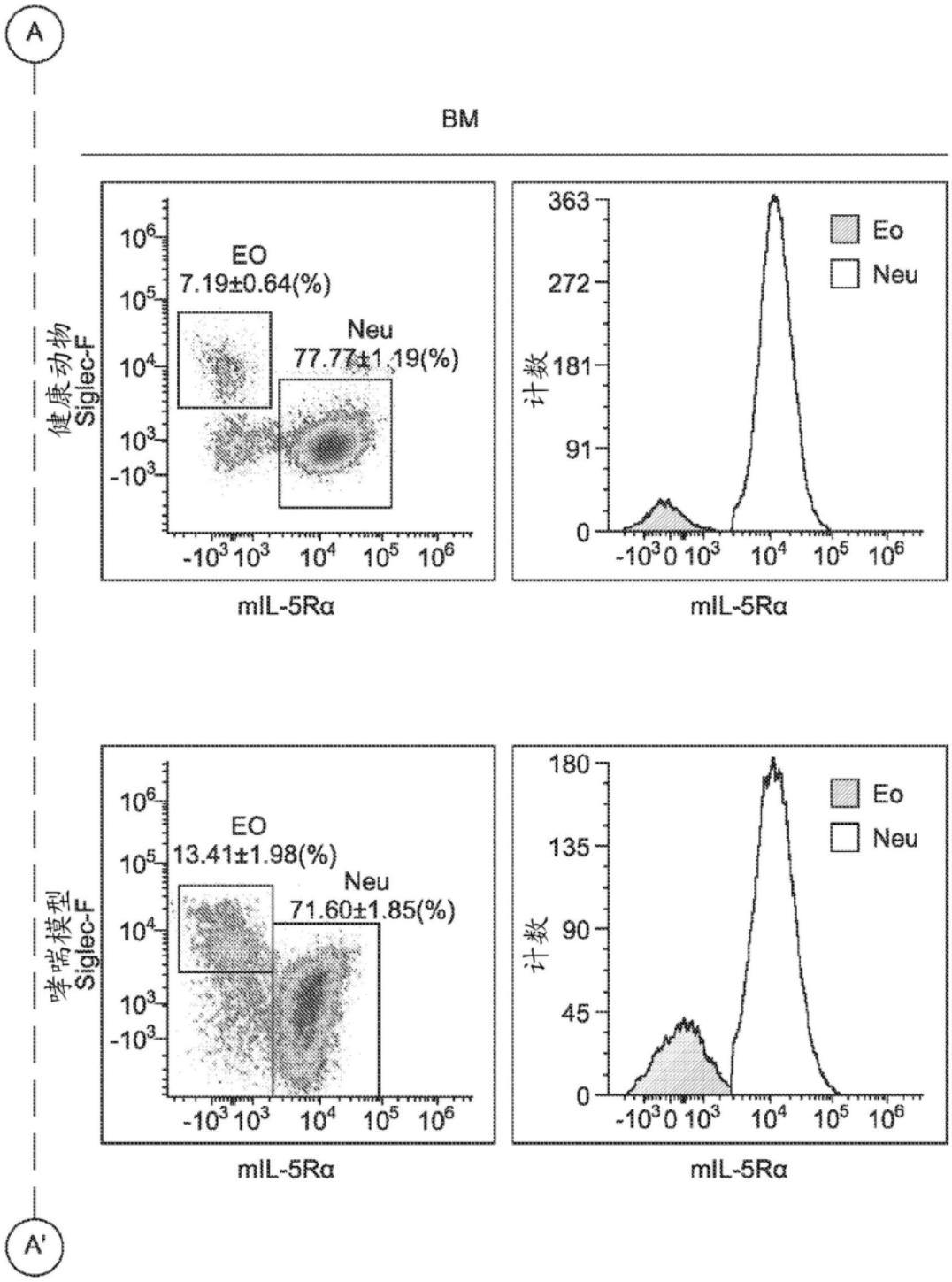

A
BM
健康动物
Siglec-F
EO
7.19±0.64(%)
Neu
77.77±1.19(%)
mIL-5Rα
363
272
181
91
0
计数
Eo
Neu
mIL-5Rα
哮喘模型
Siglec-F
EO
13.41±1.98(%)
Neu
71.60±1.85(%)
mIL-5Rα
180
135
90
45
0
计数
Eo
Neu
mIL-5Rα
A'

图20(续)

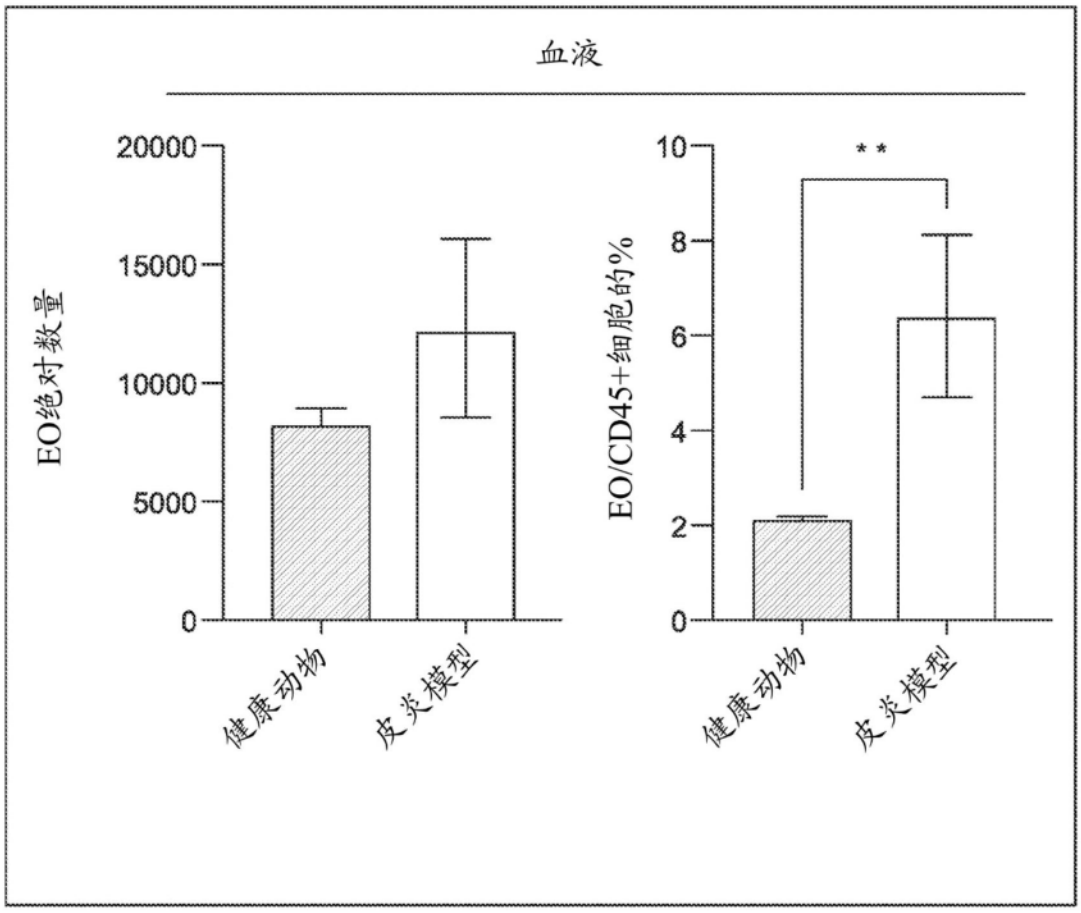

血液
EO绝对数量
20000
15000
10000
5000
0
健康动物
皮炎模型
EO/CD45+细胞的%
10
8
6
4
2
0
**
健康动物
皮炎模型

图21

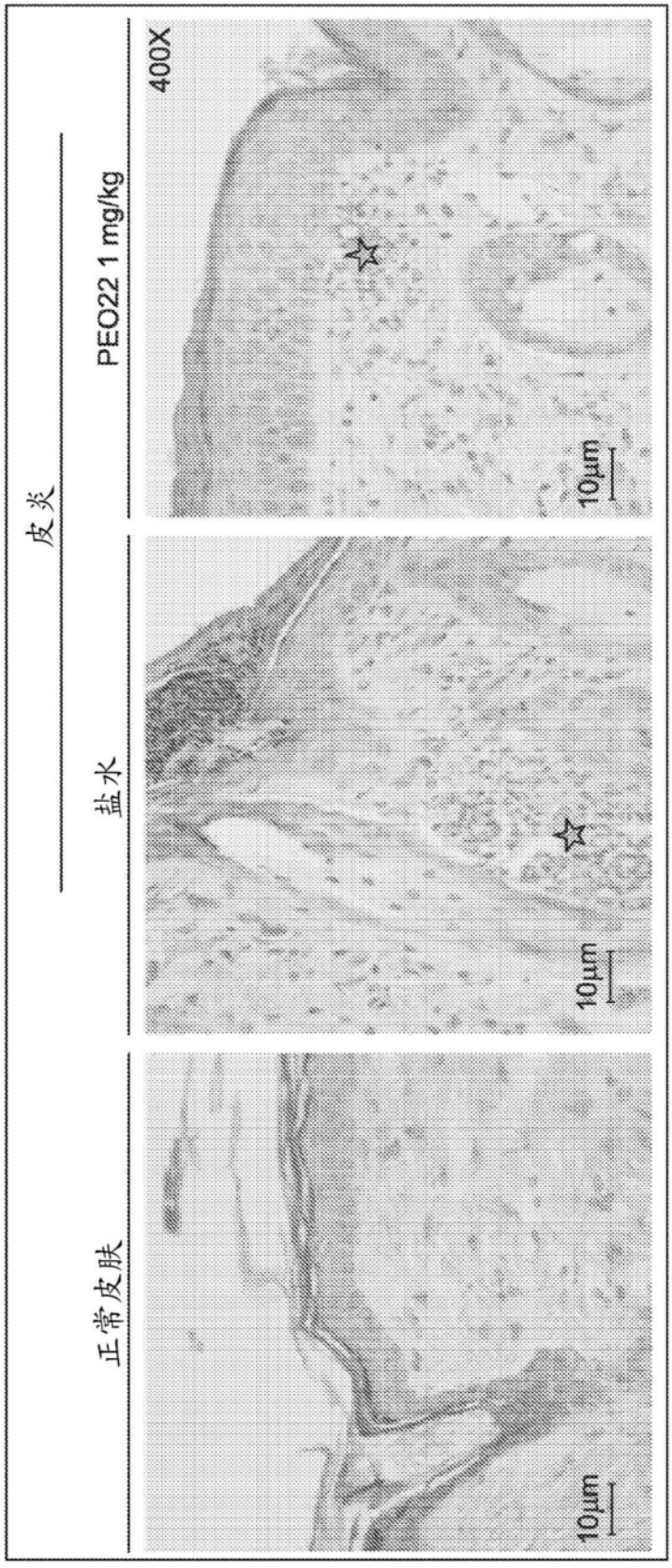


图22

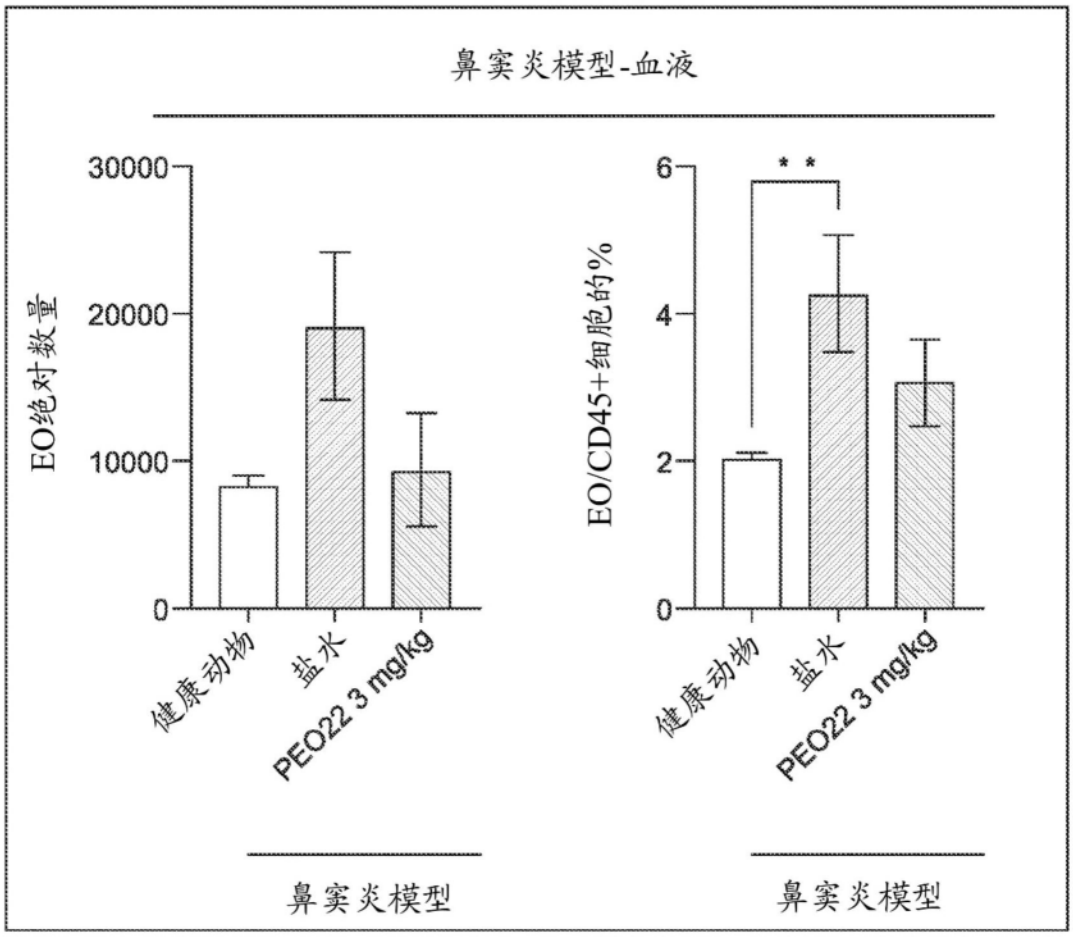

鼻窦炎模型-血液
EO绝对数量
30000
20000
10000
0
健康动物
盐水
PEO22 3 mg/kg
鼻窦炎模型
EO/CD45+细胞的%
6
4
2
0
* *
健康动物
盐水
PEO22 3 mg/kg
鼻窦炎模型

图23

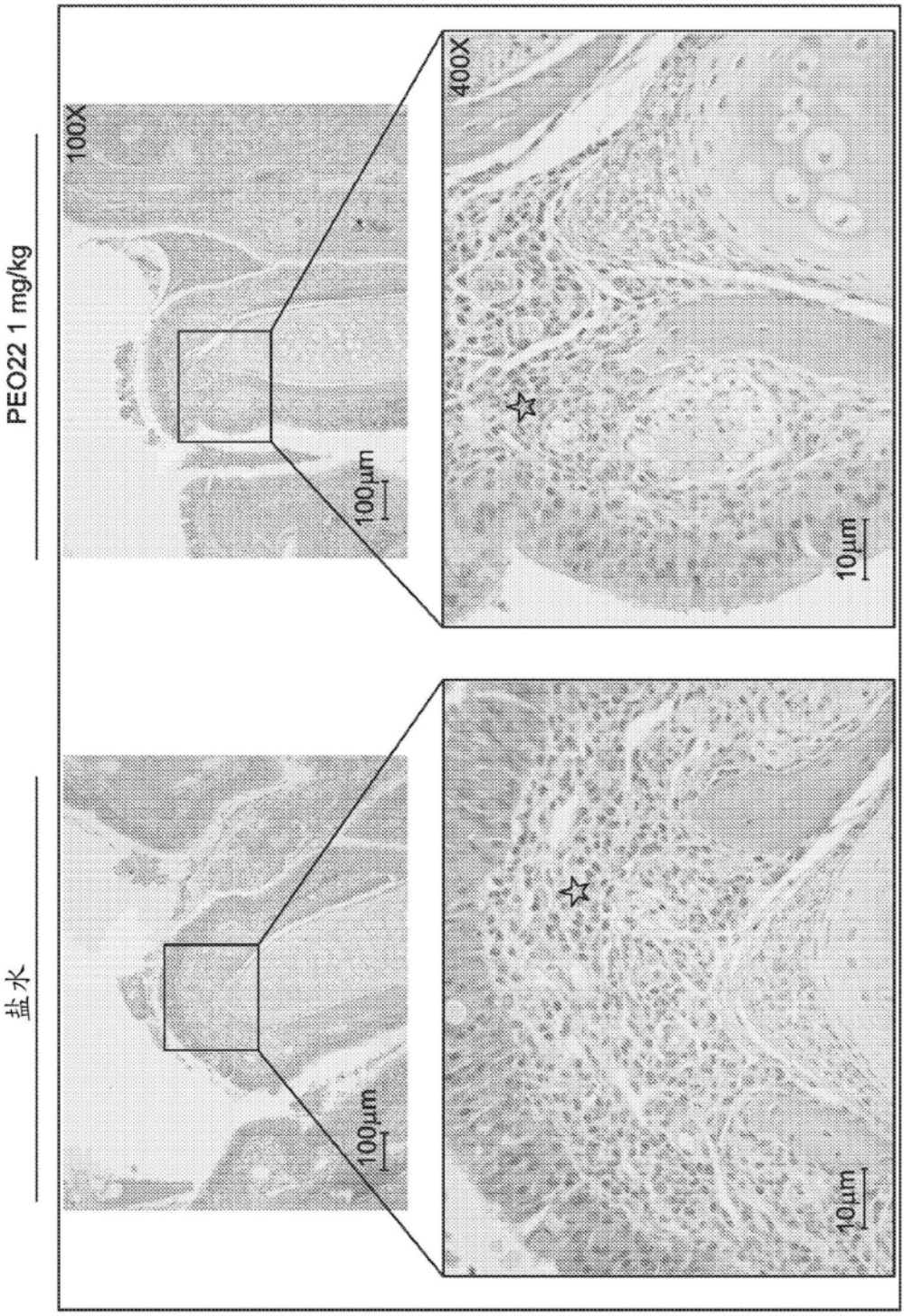


图24

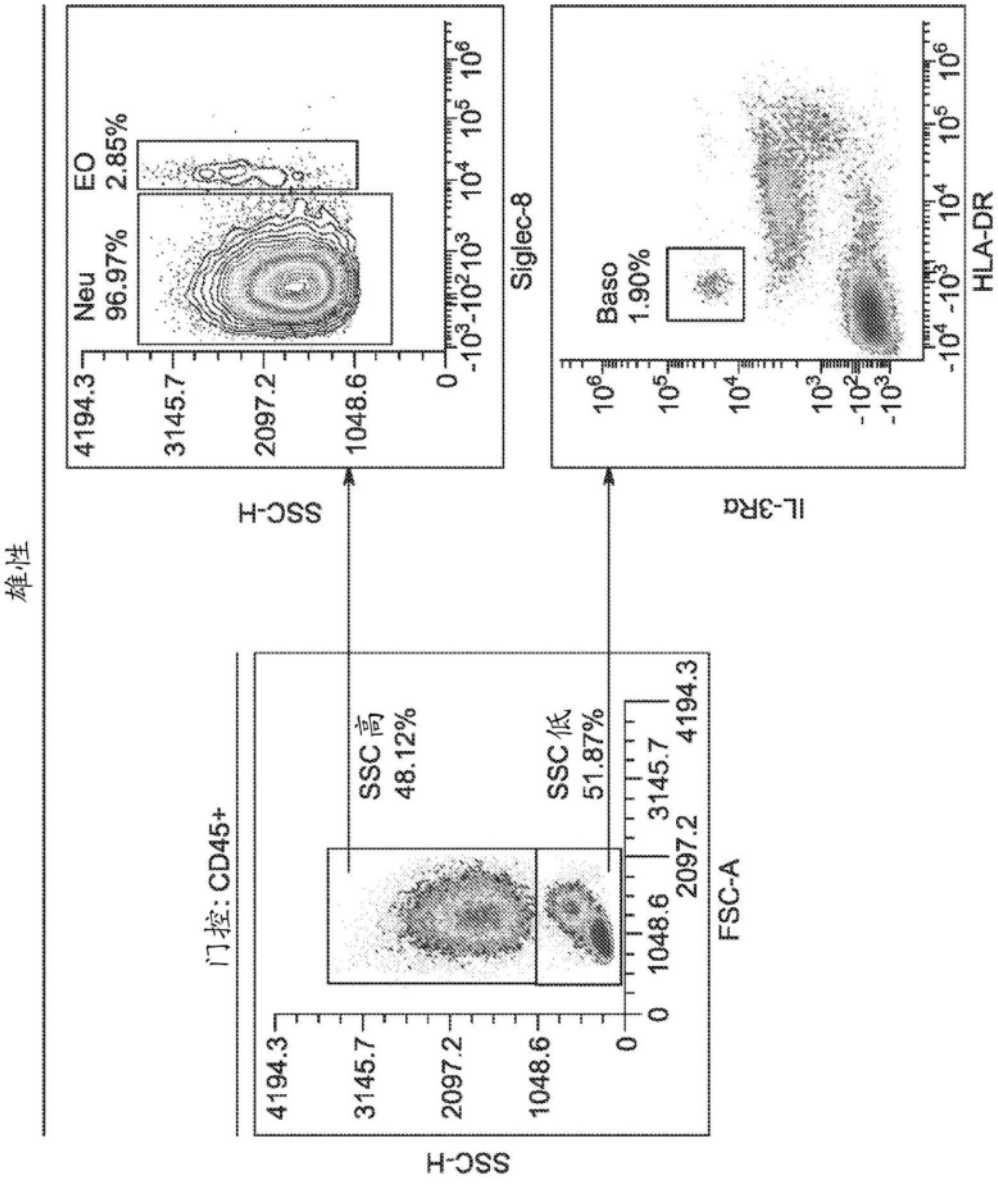

雄性
门控:CD45+
SSC-H
FSC-A
SSC 高
48.12%
SSC 低
51.87%
4194.3
3145.7
2097.2
1048.6
0
SSC-H
Siglec-8
Neu
96.97%
EO
2.85%
IL-3Rα
HLA-DR
Baso
1.90%

图25

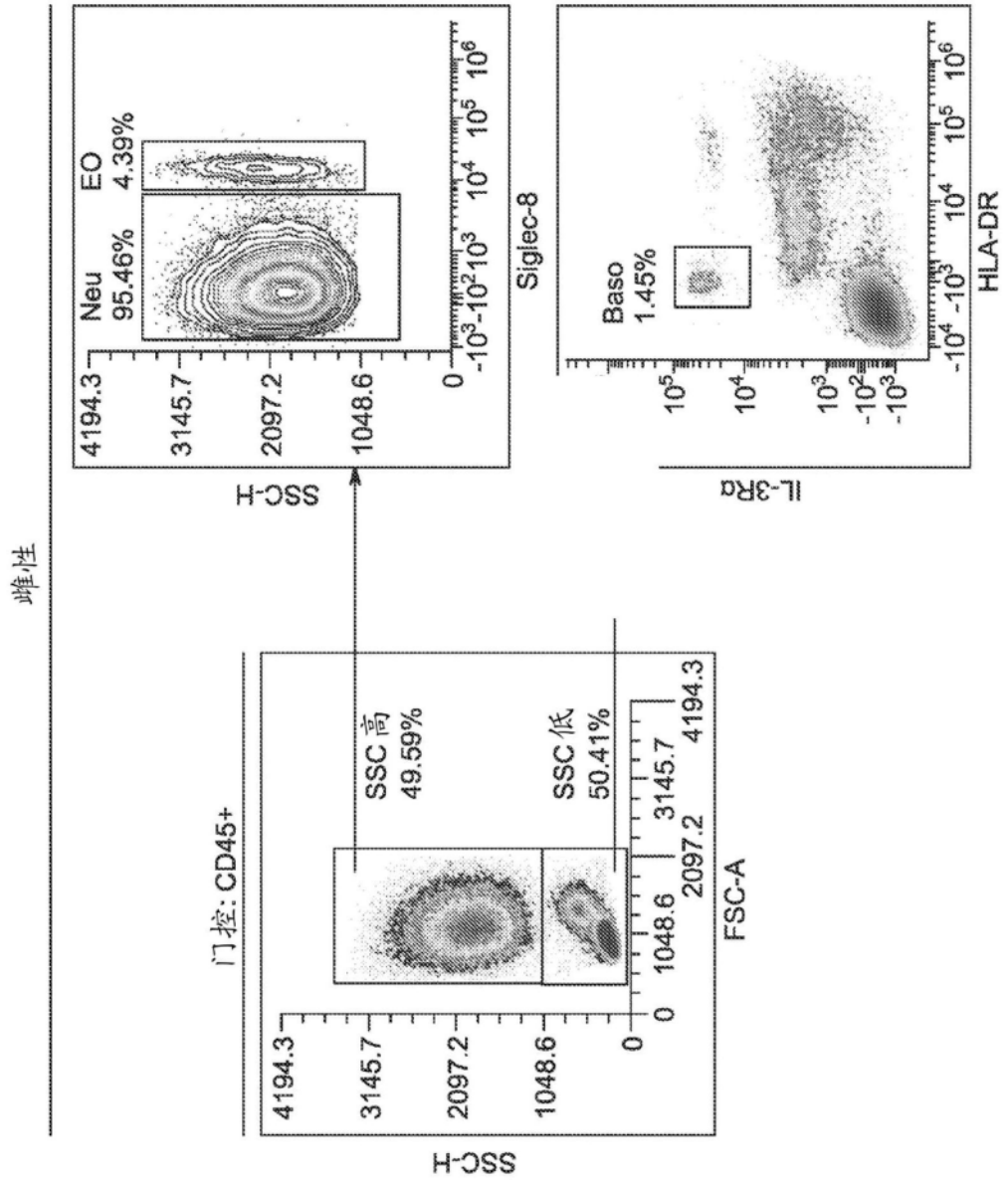

单性
门控: CD45+
SSC-H
FSC-A
SSC 高
49.59%
SSC 低
50.41%
4194.3
3145.7
2097.2
1048.6
0
Siglec-8
Neu
95.46%
EO
4.39%
IL-3Rα
Baso
1.45%
HLA-DR

图25(续)

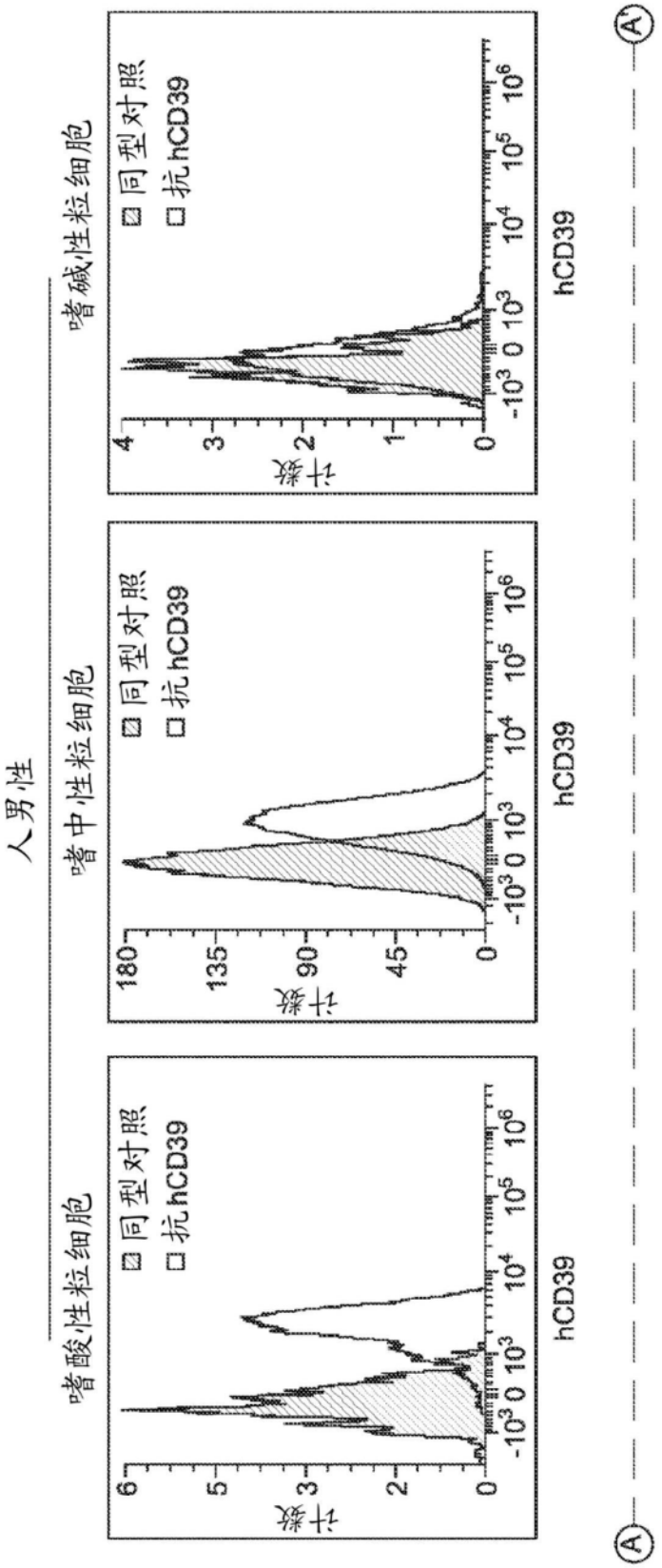


图26

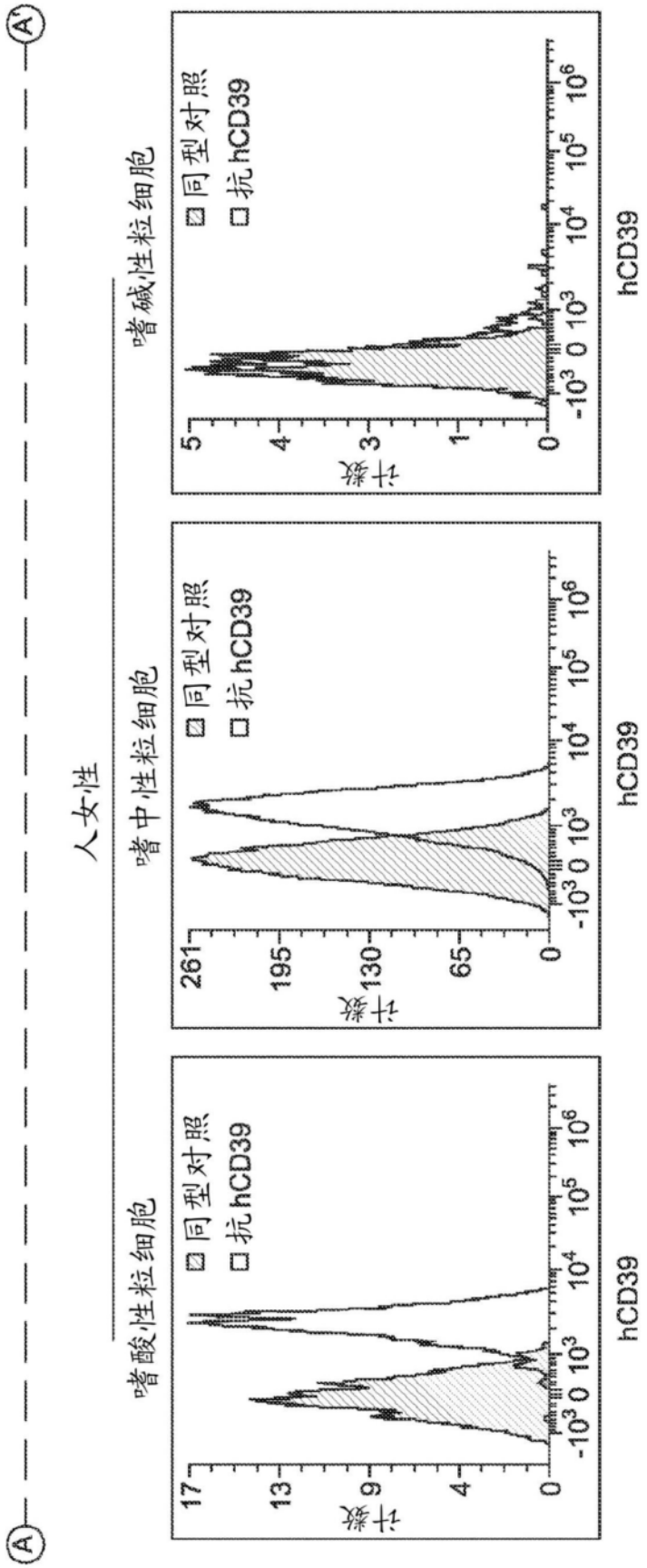


图26(续)

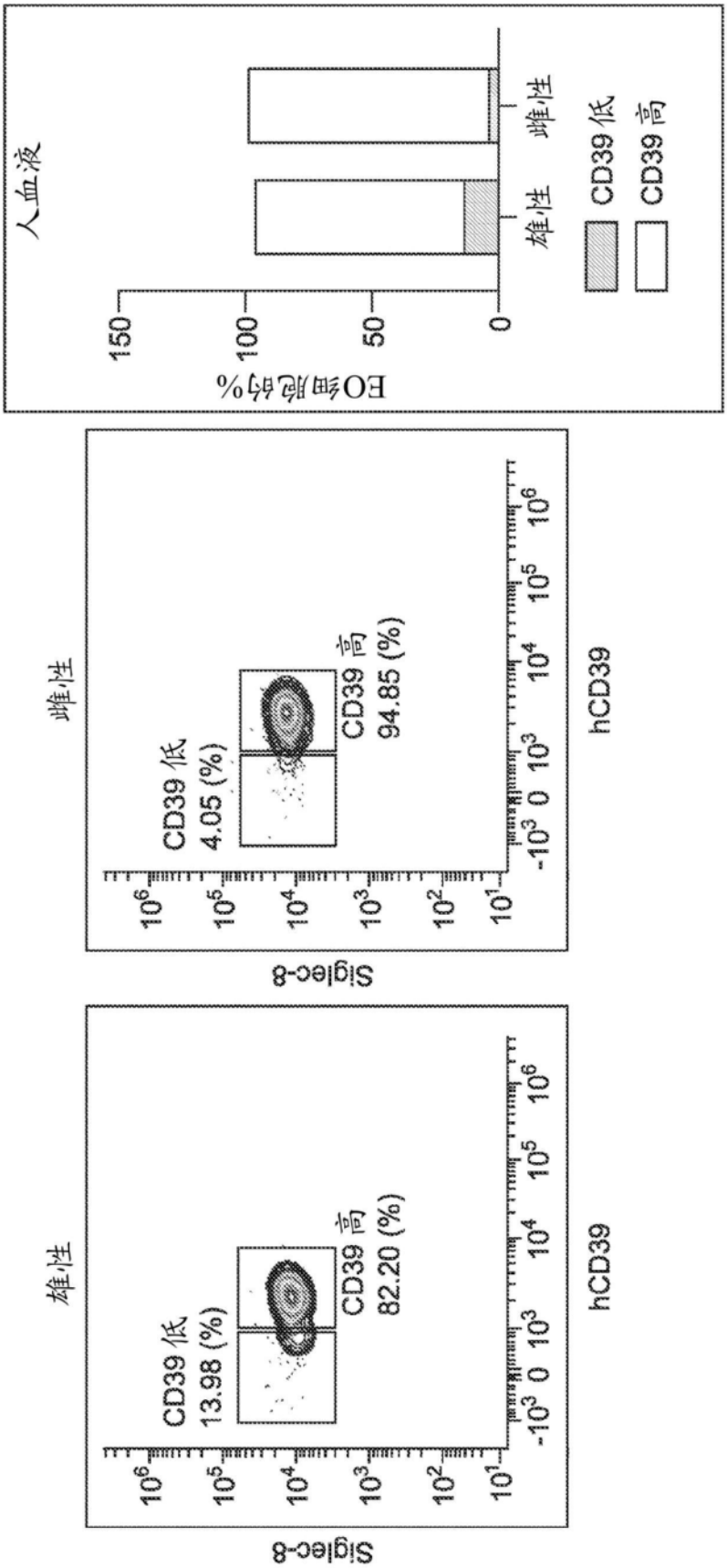

人血液
EO细胞的%
150
100
50
0
雄性
雌性
CD39 低
CD39 高
雌性
CD39 低
4.05 (%)
CD39 高
94.85 (%)
Siglec-8
hCD39
雄性
CD39 低
13.98 (%)
CD39 高
82.20 (%)
Siglec-8
hCD39

图27

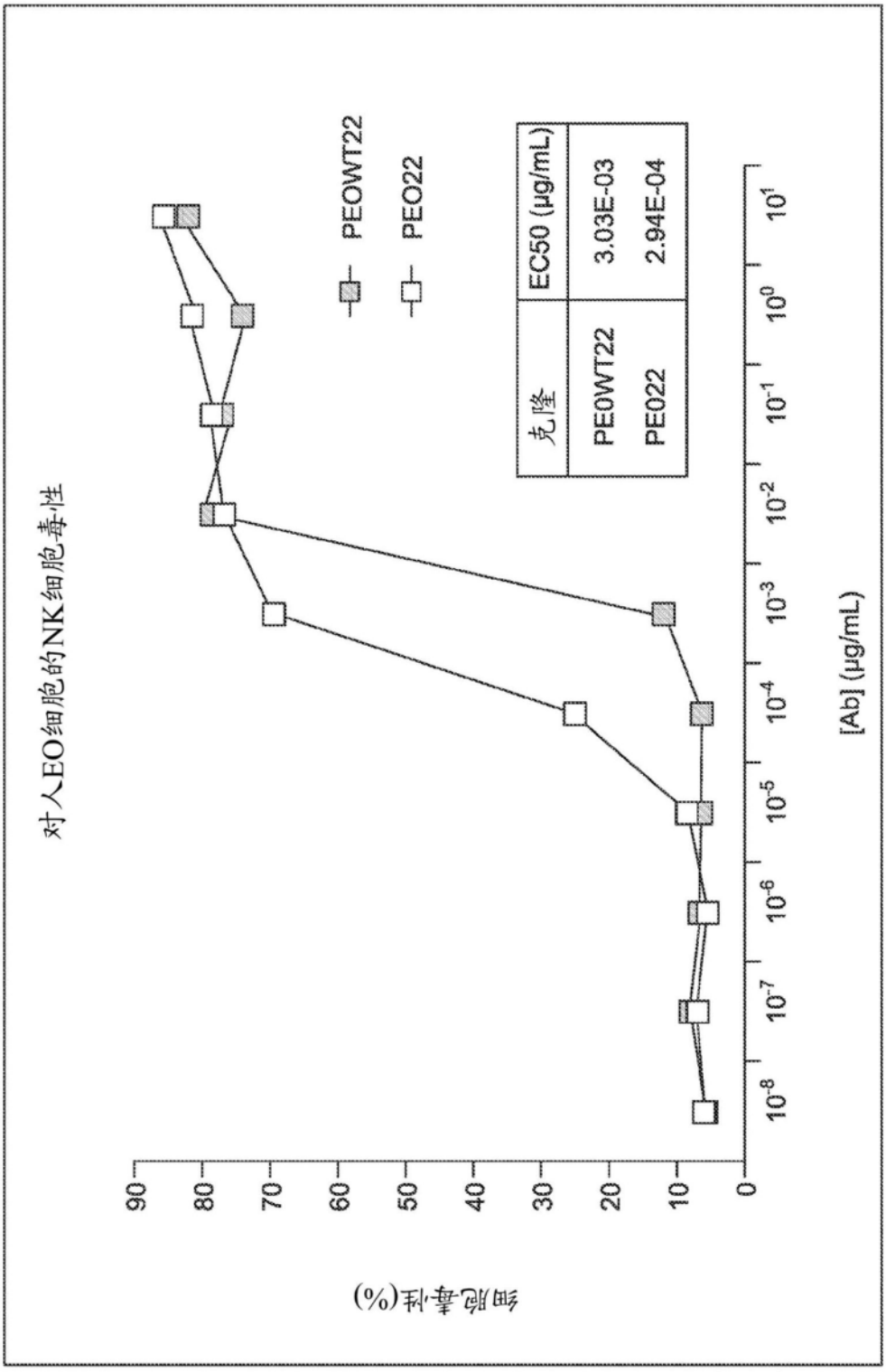

对人EO细胞的NK细胞毒性
PEOWT22
PEO22
克隆
EC50 (μg/mL)
PE0WT22
3.03E-03
PE022
2.94E-04
细胞毒性(%)
[Ab] (μg/mL)

图28

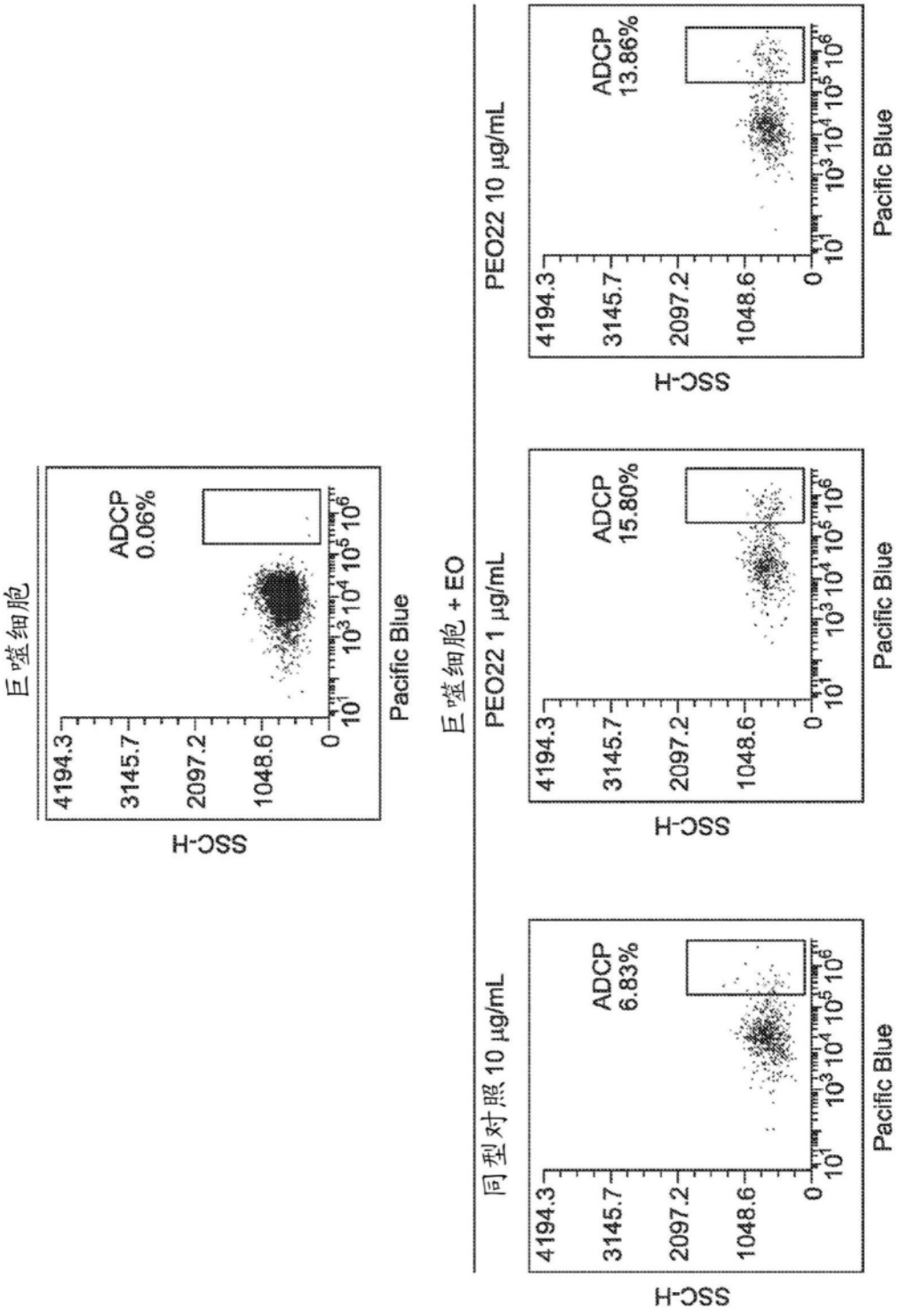

巨噬细胞
巨噬细胞 + EO
同型对照 10 μg/mL
PEO22 1 μg/mL
PEO22 10 μg/mL
ADCP
0.06%
ADCP
6.83%
ADCP
15.80%
ADCP
13.86%
SSC-H
Pacific Blue
4194.3
3145.7
2097.2
1048.6
0

图29

克隆编号	主要表位候选物
PEOWT22	IYLTDCMERAR
PEO19	LRMESEELADR
PEO20	RVKGPGISKFV 和/或 DCMERAREVIPR
PEO21	LTDCMERAREVIPR 和/或 SLSNYPFDFQGAR
PEO23	CRVKGPGISKF 和/或 GAYWITINYLLGKFSQK 和/或 ILRDPCFHPGYKK

代表性参考CD39胞外域序列(aa38-478)
提供的蛋白质序列
CD39序列。
UniprotKB-P49961(ENTPD1- 人)

```
                                                  40          50
                                                LAVGLTQN  KALPENVKYG
        60          70          80          90          100
IVLDAGSSHT  SLYIYKWPAE  KENDTGVVHQ  VEECRVKGPG  ISKFVQKVNE
       110         120         130         140         150
IGIYLTDCME  RAREVIPRSQ  HQETPVYLGA  TAGMRLLRME  SEELADRVLD
       160         170         180         190         200
VVERSLSNYP  FDFQGARIIT  GQEEGAYGWI  TINYLLGKFS  QKTRWFSIVP
       210         220         230         240         250
YETNNQETFG  ALDLGGASTQ  VTFVPQNQTT  ESPDNALQFR  LYGKDYNVYT
       260         270         280         290         300
HSFLCYGKDQ  ALWQKLAKDI  QVASNEILRD  PCFHPGYKKV  VNVSDLYKTP
       310         320         330         340         350
CTKRFEMTLP  FQQFEIQGIG  NYQQCHQSIL  ELFNTSYCPY  SQCAFNGIFL
       360         370         380         390         400
PPLQGDFGAF  SAFYFVMKFL  NLTSEKVSQE  KVTEMMKKFC  AQPWEEIKTS
       410         420         430         440         450
YAGVKEKYLS  EYCFSGTYIL  SLLLQGYHFT  ADSWEHIHFI  GKIQGSDAGW
       460         470         480
TLGYMLNLTN  MIPAEQPLST  PLSHSTYV
```

*为了本报告的目的，在此列出的序列从1开始重新编号。

图30



图30(续)