(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109476740 A
(43)申请公布日 2019.03.15

(21)申请号 201780026552.1

(22)申请日 2017.03.03

(30)优先权数据
62/303,985 2016.03.04 US
62/305,378 2016.03.08 US
62/341,220 2016.05.25 US
62/363,703 2016.07.18 US
62/431,987 2016.12.09 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.10.29

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/020714 2017.03.03

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/152085 EN 2017.09.08

(71)申请人 百时美施贵宝公司
地址 美国新泽西州

(72)发明人 B·C·巴恩哈特 A·J·科尔曼 N·伦贝格 A·P·山尼克 M·斯里维森 K·A·海宁 M·雷 E·世嘉 A·古迪诺夫 M·朱尔-昆克尔 G·陈 J·S·萨克 R·Y·黄 M·J·柯贝特 小约瑟夫·E·迈尔斯 L·施维瑞 S·V·哈切尔 R·阿图拉 H·黄 P·张 E·J·希尔特 M·N·海德里克

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 封新琴

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)

权利要求书6页 说明书226页 附图131页

(54)发明名称

利用抗CD73抗体的联合治疗

(57)摘要

提供了利用抗CD73抗体与免疫肿瘤学作用剂(比如抗PD-1抗体)联合用于肿瘤(例如,晚期实体瘤)的临床治疗的方法。

CN 109476740 A

1.一种治疗癌症的方法,包括向患有癌症的受试者施用治疗有效量的CD73拮抗剂和免疫肿瘤学作用剂,其中所述受试者具有表达CD73的肿瘤。

2.一种治疗受试者中的表达CD73的肿瘤的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的CD73拮抗剂和免疫肿瘤学作用剂。

3.权利要求1或2的方法,其中CD73在肿瘤细胞的膜上表达。

4.权利要求1-3中任一项的方法,其中所述肿瘤包含表达所述免疫肿瘤学作用剂的靶标的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

5.权利要求1-4中任一项的方法,其中所述癌症或肿瘤选自下组:肺腺癌、甲状腺癌、胰腺癌、子宫内膜癌、结肠腺癌、肺鳞状细胞癌、头颈部鳞状细胞癌和卵巢腺癌。

6.一种确定患有癌症的受试者是否会对抗CD73拮抗剂治疗有反应的方法,其包括确定受试者肿瘤中CD73的水平,其中肿瘤中高水平的CD73表明受试者可能对抗CD73拮抗剂治疗有反应。

7.一种确定患有癌症的受试者是否对抗CD73拮抗剂和PD-1拮抗剂治疗有反应的方法,其包括确定受试者的肿瘤中CD73的水平以及该肿瘤的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)中的PD-1的水平,其中肿瘤中高水平的CD73和TIL中高水平的PD-1表明受试者可能对抗CD73拮抗剂和抗PD-1拮抗剂治疗有反应。

8.权利要求7的方法,其中通过确定CD8+T细胞、CD4+FoxP3-T细胞、或CD4+FoxP3+T细胞上的PD-1水平来测量TIL中的PD-1水平,并且如果在这些细胞类型中的一种或多种上的PD-1水平高,那么受试者可能对抗CD73拮抗剂和抗PD-1拮抗剂治疗有反应。

9.权利要求1-6中任一项的方法,其中CD73拮抗剂是抗CD73抗体或其抗原结合部分。

10.权利要求1-9中任一项的方法,其中免疫肿瘤学作用剂选自下组:PD-1拮抗剂、PD-L1拮抗剂、CTLA-4拮抗剂和LAG-3拮抗剂

11.权利要求10的方法,其中免疫肿瘤学作用剂是抗体或其抗原结合部分。

12.权利要求11的方法,其中免疫肿瘤学作用剂是抗PD-1抗体或其抗原结合部分。

13.权利要求12的方法,其中抗PD-1抗体或其抗原结合部分包含:分别包含在SEQ ID NO:383-385中列出的序列的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3;以及分别包含在SEQ ID NO:386-388中列出的序列的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3。

14.权利要求13的方法,其中抗PD-1抗体或其抗原结合部分包含分别在SEQ ID NO:381和382中列出的重链可变区序列和轻链可变区序列。

15.权利要求9的方法,其中抗CD73抗体或其抗原结合部分展现以下性质中的一项或多项:

(1)结合人CD73,例如珠子结合的(可溶性)人二聚体人CD73同种型1和2,例如以10nM或更小(例如,0.01nM至10nM)的K_D结合,例如通过BIACORE®SPR分析所测量;

(2)与膜结合的人CD73结合,例如以1nM或更小(例如,0.01nM至1nM)的EC_{50}结合;

(3)与食蟹猴CD73结合,例如与膜结合的食蟹猴CD73结合,例如以10nM或更小(例如,0.01nM至10nM)的EC_{50}结合;

(4)抑制人CD73酶活性,例如以10nM或更小的EC50抑制;

(5)抑制食蟹猴CD73酶活性,例如以10nM或更小的EC50抑制;

(6)以10nM或更小的EC50抑制Calu6细胞中的内源(细胞)人CD73酶活性;

(7)抑制体内人CD73酶活性；

(8)内化到细胞中，例如抗体介导的(或依赖性)CD73内化到细胞中，例如以小于1小时、30分钟或10分钟的$T_{1/2}$和/或至少70％、80％或90％的Ymax内化；

(9)结合人CD73上的构象表位，例如氨基酸序列(SEQ ID NO:1)内包括氨基酸残基FTKVQQIRRAEPNVLLLDA(SEQ ID NO:96)和/或LYLPYKVLPVGDEVVG(SEQ ID NO:97)的全部或一部分的不连续表位；

(10)在任一方向或两个方向上与CD73.4-1、CD73.4-2、CD73.3、11F11-1、11F11-2、4C3-1、4C3-2、4C3-3、4D4、10D2-1、10D2-2、11A6、24H2、5F8-1、5F8-2、6E11和/或7A11竞争结合人CD73；和

(11)以与CD73.4相似的模式与人CD73相互作用，如通过X射线晶体学所确定的。

16.权利要求9的方法，其中抗CD73抗体或其抗原结合部分包含与分别选自下组的重链和轻链可变区氨基酸序列至少85％、至少90％、至少95％、至少98％或100％相同的重链和轻链可变区：

(a)SEQ ID NO:4和8；

(b)SEQ ID NO:4和12；

(c)SEQ ID NO:16和20；

(d)SEQ ID NO:16和24；

(e)SEQ ID NO:16和28；

(f)SEQ ID NO:32和36；

(g)SEQ ID NO:40和44；

(h)SEQ ID NO:40和48；

(i)SEQ ID NO:52和56；

(j)SEQ ID NO:60和64；

(k)SEQ ID NO:68和72；

(l)SEQ ID NO:68和76；

(m)SEQ ID NO:80和84；

(n)SEQ ID NO:88和92；

(o)SEQ ID NO:135和8；以及

(p)SEQ ID NO:135和12。

17.权利要求16的方法，其中抗CD73抗体包含：包含在SEQ ID NO:135中列出的氨基酸序列的重链可变区，和包含在SEQ ID NO:8中列出的氨基酸序列的轻链可变区。

18.权利要求16的方法，其中抗CD73抗体包含：包含在SEQ ID NO:135中列出的氨基酸序列的重链可变区，和包含在SEQ ID NO:12中列出的氨基酸序列的轻链可变区。

19.权利要求9的方法，其中抗CD73抗体或其抗原结合部分包含：

(a)分别包含SEQ ID NO:5、6和7的重链CDR1、CDR2和CDR3序列，以及分别包含SEQ ID NO:9、10和11的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；

(b)分别包含SEQ ID NO:5、6和7的重链CDR1、CDR2和CDR3序列，以及分别包含SEQ ID NO:13、14和15的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；

(c)分别包含SEQ ID NO:17、18和19的重链CDR1、CDR2和CDR3序列，以及分别包含SEQ

ID NO:21、22和23的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；

(d)分别包含SEQ ID NO:17、18和19的重链CDR1、CDR2和CDR3序列，以及分别包含SEQ ID NO:25、26和27的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；

(e)分别包含SEQ ID NO:17、18和19的重链CDR1、CDR2和CDR3序列，以及分别包含SEQ ID NO:29、30和31的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；

(f)分别包含SEQ ID NO:33、34和35的重链CDR1、CDR2和CDR3序列，以及分别包含SEQ ID NO:37、38和39的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；

(g)分别包含SEQ ID NO:41、42和43的重链CDR1、CDR2和CDR3序列，以及分别包含SEQ ID NO:45、46和47的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；

(h)分别包含SEQ ID NO:41、42和43的重链CDR1、CDR2和CDR3序列，以及分别包含SEQ ID NO:49、50和51的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；

(i)分别包含SEQ ID NO:53、54和55的重链CDR1、CDR2和CDR3序列，以及分别包含SEQ ID NO:57、58和59的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；

(j)分别包含SEQ ID NO:61、62和63的重链CDR1、CDR2和CDR3序列，以及分别包含SEQ ID NO:65、66和67的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；

(k)分别包含SEQ ID NO:69、70和71的重链CDR1、CDR2和CDR3序列，以及分别包含SEQ ID NO:73、74和75的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；

(l)分别包含SEQ ID NO:69、70和71的重链CDR1、CDR2和CDR3序列，以及分别包含SEQ ID NO:77、78和79的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；

(m)分别包含SEQ ID NO:81、82和83的重链CDR1、CDR2和CDR3序列，以及分别包含SEQ ID NO:85、86和87的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；或

(n)分别包含SEQ ID NO:89、90和91的重链CDR1、CDR2和CDR3序列，以及分别包含SEQ ID NO:93、94和95的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

20.权利要求19的方法，其中抗CD73抗体或其抗原结合部分包含：分别包含SEQ ID NO:5、6和7的重链CDR1、CDR2和CDR3序列，以及分别包含SEQ ID NO:9、10和11的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

21.权利要求19的方法，其中抗CD73抗体包含：分别包含SEQ ID NO:5、6和7的重链CDR1、CDR2和CDR3序列，以及分别包含SEQ ID NO:13、14和15的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

22.权利要求19的方法，其中抗CD73抗体或其抗原结合部分包含与分别选自下组的重链和轻链序列的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％、或100％相同的重链和轻链序列：

(a)分别为SEQ ID NO:100和101；

(b)分别为SEQ ID NO:100和102；

(c)分别为SEQ ID NO:103和104；

(d)分别为SEQ ID NO:103和105；

(e)分别为SEQ ID NO:103和106；

(f)分别为SEQ ID NO:107和108；

(g)分别为SEQ ID NO:109和110；

(h)分别为SEQ ID NO:109和111；

(i)分别为SEQ ID NO:112和113；

(j)分别为SEQ ID NO:114和115；

(k)分别为SEQ ID NO:116和117；

(l)分别为SEQ ID NO:116和118；

(m)分别为SEQ ID NO:119和120；

(n)分别为SEQ ID NO:121和122；

(o)分别为SEQ ID NO:133和101;以及

(p)分别为SEQ ID NO:133和102。

23.权利要求22的方法,其中抗CD73抗体包含:包含在SEQ ID NO:133或189中列出的氨基酸序列的重链、和包含在SEQ ID NO:101中列出的氨基酸序列的轻链。

24.权利要求22的方法,其中抗CD73抗体包含:包含在SEQ ID NO:133或189中列出的氨基酸序列的重链、和包含在SEQ ID NO:102中列出的氨基酸序列的轻链。

25.权利要求9和15-24中任一项的方法,其中抗CD73抗体包含无效应子的Fc。

26.权利要求9和15-25中任一项的方法,其中抗CD73抗体选自下组:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其变体。

27.权利要求9和15-26中任一项的方法,其中抗CD73抗体包含修饰的重链恒定区,其从N端到C端依次包含:人CH1结构域、人铰链结构域、人CH2结构域和人CH3结构域。

28.权利要求27的方法,其中修饰的恒定区包含不同同种型的至少2个结构域,所述同种型选自下组同种型:IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

29.权利要求27或28的方法,其中修饰的恒定区包含人IgG2CH1结构域,并且CH2、CH3和铰链结构域中的至少一个不是IgG2同种型。

30.权利要求29的方法,其中IgG2CH1结构域包含SEQ ID NO:124的氨基酸序列。

31.权利要求27-30中任一项的方法,其中修饰的恒定区包含人IgG2铰链结构域,所述人IgG2铰链结构域例如降低半胱氨酸结合的异质性。

32.权利要求31的方法,其中铰链结构域相对于野生型人IgG2铰链结构域(SEQ NO 136)在C219处包含氨基酸取代。

33.权利要求32的方法,其中铰链结构域包含SEQ ID NO:123的氨基酸序列。

34.权利要求27-33中任一项的方法,其中修饰的恒定区包含降低或消除效应子功能的人IgG1CH2结构域。

35.权利要求34的方法,其中CH2结构域相对于野生型人IgG1CH2结构域(SEQ ID NO:137)包含氨基酸取代A330S和P331S。

36.权利要求35的方法,其中CH2结构域包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列。

37.权利要求27-36中任一项的方法,其中修饰的恒定区包含人IgG1CH3结构域。

38.权利要求37的方法,其中CH3结构域包含SEQ ID NO:128的氨基酸序列。

39.权利要求9和15-38中任一项的方法,其中抗CD73抗体或其抗原结合部分是人抗体或人源化抗体。

40.权利要求9和15-39中任一项的方法,其中CDR区中的甲硫氨酸残基被不受氧化的氨基酸残基置换。

41.一种用于治疗人类患者中的实体瘤的方法,所述方法包括向患者施用有效量的下

述每一种：

(a)CD73拮抗剂，和

(b)免疫肿瘤学作用剂，

其中抗CD73抗体和免疫肿瘤学作用剂施用每周一次、每2周一次、每3周一次或每4周一次，或其中抗CD73抗体施用每周一次，而免疫肿瘤学作用剂施用每2周一次、每3周一次或每4周一次。

42.权利要求41的方法，其中CD73拮抗剂是权利要求15-40中任一项提及的CD73抗体。

43.权利要求41的方法，其中抗CD73抗体和免疫肿瘤学作用剂在同一天施用。

44.权利要求41-43中任一项的方法，其中抗CD73抗体和免疫肿瘤学作用剂配制为适用于静脉内施用。

45.权利要求41-44中任一项的方法，其中抗CD73抗体和免疫肿瘤学作用剂分开配制。

46.权利要求41-44中任一项的方法，其中抗CD73抗体和免疫肿瘤学作用剂配制在一起。

47.权利要求41-44中任一项的方法，其中在施用免疫肿瘤学作用剂之前施用抗CD73抗体。

48.权利要求41-44中任一项的方法，其中在施用免疫肿瘤学作用剂之后施用抗CD73抗体。

49.权利要求41-44中任一项的方法，其中抗CD73抗体和免疫肿瘤学作用剂同时施用。

50.权利要求41-49中任一项的方法，其中免疫肿瘤学作用剂选自下组：PD-1拮抗剂、PD-L1拮抗剂、CTLA-4拮抗剂和LAG-3拮抗剂。

51.权利要求50的方法，其中免疫肿瘤学作用剂是PD-1拮抗剂。

52.权利要求51的方法，其中PD-1拮抗剂抗PD-1抗体或其抗原结合部分。

53.权利要求52的方法，其中抗PD-1抗体含有包含SEQ ID NO:383中列出的序列的重链可变区CDR1、包含SEQ ID NO:384中列出的序列的重链可变区CDR2、包含SEQ ID NO:385中列出的序列的重链可变区CDR3、包含SEQ ID NO:386中列出的序列的轻链可变区CDR1、包含SEQ ID NO:387中列出的序列的轻链可变区CDR2、和包含SEQ ID NO:388中列出的序列的轻链可变区CDR3。

54.权利要求52或53的方法，其中抗PD-1抗体包含分别包含在SEQ ID NO:381和382中列出的序列的重链可变区和轻链可变区。

55.权利要求41-54中任一项的方法，其中治疗产生选自下组的至少一种疗效：肿瘤尺寸的减小、转移灶数目随时间的减少、完全缓解、部分缓解、和疾病稳定。

56.一种用于治疗人类患者中的实体瘤的试剂盒，所述试剂盒包括：

(a)一剂抗CD73抗体，所述抗体包含具有SEQ ID NO:135中列出的序列的重链可变区的CDR1、CDR2、和CDR3结构域，以及具有SEQ ID NO:8或12中列出的序列的轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3结构域；

(b)一剂免疫肿瘤学作用剂，所述免疫肿瘤学作用剂是抗PD-1抗体，其包含具有SEQ ID NO:381中列出的序列的重链可变区的CDR1、CDR2、和CDR3结构域，以及具有SEQ ID NO:382中列出的序列的轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3结构域；和

(c)关于使用在权利要求41-55的方法中的抗CD73抗体和免疫肿瘤学作用剂的说明书。

57.一种用于确定受试者血细胞中抗人CD73抗体对人CD73受体占有率的方法，其包括从受试者获得全血样品，并且使用抗人IgG1Fc抗体和T细胞和/或B细胞的标志物进行流式细胞术。

58.权利要求57的方法，其中流式细胞术是直接检测测定。

59.权利要求57的方法，其中T细胞和/或B细胞的标志物是$CD8^+$T细胞的标志物或$B19^+$B细胞的标志物。

60.权利要求57-59中任一项的方法，其中流式细胞术在从受试者获得血液样品后48小时内进行。

61.权利要求57-60中任一项的方法，其中抗人IgG1Fc抗体是IS1112E.E.23.30。

62.权利要求57-61中任一项的方法，其包括从受试者获得全血样品，并且使用抗人IgG1Fc抗体和$CD8^+$T细胞和/或$B19^+$B细胞的标志物进行流式细胞术，其中从受试者获得血液样品后48小时内进行流式细胞术。

63.一种抗体，其与人CD73结合并且包含修饰的重链区。

64.权利要求63的抗体，其中修饰的重链区包含SEQ ID NO:162-169、180-183、267-282、300-347和391-454中列出的氨基酸序列或其变体，其中所述变体在一个或多个氨基酸中存在差异，所述一个或多个氨基酸不是SEQ ID NO:162-169、180-183、267-282、300-347和391-454分别相比于其各自对应的野生型IgG1、IgG2或IgG4序列存在差异的氨基酸。

利用抗CD73抗体的联合治疗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年12月9日提交的美国临时申请No.62/431987,2016年7月18日提交的62/363703,2016年5月25日提交的62/341220,2016年3月8日提交的62/305378以及2016年3月4日提交的62/303985的优先权。贯穿本说明书全文中引证的任何专利、专利申请、和参考文献的内容都通过提述完整并入本文。

[0003] 背景

[0004] 分化簇73(CD73),也称为胞外-5″-核苷酸酶(胞外-5′NT,EC 3.1.3.5),是一种糖基磷脂酰肌醇(GPI)连接的细胞表面酶,在大多数组织中发现,但特别是在内皮细胞和造血细胞亚群中表达(Resta等人,Immunol Rev 1998;161:95-109和Colgan等人,Prinergic Signal 2006;2:351-60)。已知CD73催化细胞外核苷一磷酸去磷酸化成为核苷,如腺苷。腺苷是一种被广泛研究的信号分子,其通过包括A1、A2A、A2B和A3在内的几种受体介导其生物学效应。已经表明腺苷可调节许多癌症的增殖和迁移,并通过调节抗肿瘤T细胞而具有免疫抑制作用(Zhang等人,Cancer Res 2010;70:6407-11)。

[0005] 据报道,CD73在许多不同的癌症中表达,包括结肠癌、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、膀胱癌、白血病、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、黑色素瘤、甲状腺癌、食道癌、前列腺癌和乳腺癌(Jin等人,Cancer Res 2010;70:2245-55和Stagg等人,PNAS 2010;107:1547-52)。而且,CD73在癌症中的表达与增加的增殖、迁移、新血管形成、侵袭性、转移和更短的患者生存相关。也有人提出CD73活性可作为甲状腺乳头状癌的预后标志物。虽然已经表明CD73可调节肿瘤细胞上的细胞-细胞和细胞-基质相互作用,但CD73的表达和活性也与T细胞反应降低有关,并且有人提出其涉及抗药性(Spychala等人,Pharmacol Ther 3000;87:161-73)。因此,CD73可以直接和间接地调节癌症进展,这突出了其作为新的治疗靶标的潜力。

[0006] 鉴于针对诸如癌症的疾病的改进策略的持续需要,通过多种机制调节肿瘤进展的方法、以及调节CD73活性的方法是高度期望的。

[0007] 概述

[0008] 本文中提供的方法总体上涉及癌症患者,例如患有表达CD73的实体瘤(例如,晚期实体瘤)的患者的治疗。因此,本文中提供了治疗癌症的方法,其包括向患有癌症的受试者施用治疗有效量的CD73拮抗剂和免疫肿瘤学作用剂,其中所述受试者患有表达CD73的肿瘤。

[0009] 本文中还提供了治疗受试者中的表达CD73的肿瘤的方法,包括向受试者施用治疗有效量的CD73拮抗剂和免疫肿瘤学作用剂(例如,抗PD-1拮抗剂,例如抗体)。

[0010] 在某些实施方案中,待治疗的受试者患有在肿瘤细胞的膜上表达CD73的肿瘤。在某些实施方案中,肿瘤包含表达免疫学药剂靶标(例如PD-1)的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。在某些实施方案中,待治疗的受试者患有在肿瘤细胞上表达CD73并且在TIL上表达免疫肿瘤学作用剂靶标(例如PD-1或PD-L1)的肿瘤。在某些实施方案中,癌症或肿瘤选自下组:肺腺癌、甲状腺癌、胰腺癌、子宫内膜癌、结肠腺癌、肺鳞状细胞癌、头颈部鳞状细胞癌和卵巢腺癌。

[0011] 本文中还提供了确定患有癌症的受试者是否会对抗CD73拮抗剂治疗有反应的方法，其包括确定受试者肿瘤中CD73的水平，其中肿瘤中CD73的存在表明受试者可能对抗CD73拮抗剂治疗有反应。

[0012] 本文中还提供了确定患有癌症的受试者是否会对抗CD73拮抗剂和免疫肿瘤学作用剂(immune-oncology agent)治疗有反应的方法，包括确定受试者的肿瘤中CD73的水平，以及肿瘤的TIL中的免疫肿瘤学作用剂(例如，检查点抑制剂或共刺激蛋白)靶标的水平，其中肿瘤中CD73的存在和TIL中免疫肿瘤学作用剂靶标的存在表明受试者可能对抗CD73拮抗剂和所述免疫肿瘤学作用剂治疗有反应。

[0013] 在某些实施方案中，通过确定CD8+ T细胞、CD4+FoxP3-T细胞或CD4+FoxP3+ T细胞上的肿瘤免疫靶标水平来量度TIL中的肿瘤免疫靶标水平，并且如果在这些细胞类型中的一种或多种上检测到肿瘤免疫靶标表达，那么受试者可能对用抗CD73拮抗剂和免疫肿瘤学作用剂治疗有反应。

[0014] 本文中还提供了确定患有癌症的受试者是否对用抗CD73拮抗剂和PD-1拮抗剂治疗有反应的方法，其包括确定受试者的肿瘤中CD73的水平和在肿瘤的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)中的PD-1的水平，其中肿瘤中CD73的存在和TIL中PD-1的存在表明受试者可能对用抗CD73拮抗剂和抗PD-1拮抗剂治疗有反应。

[0015] 在某些实施方案中，通过确定在CD8+ T细胞、CD4+ FoxP3- T细胞或CD4+ FoxP3+ T细胞上的PD-1水平来量度TIL中的PD-1水平，并且如果在这些细胞类型中的一种或多种上检测到PD-1表达，那么受试者可能对用抗CD73拮抗剂和抗PD-1拮抗剂治疗有反应。

[0016] 本文中还提供了用于确定受试者血细胞中抗人CD73抗体对人CD73受体占有率的方法，其包括从受试者获得全血样品，并且使用抗人IgG1 Fc抗体和T细胞和/或B细胞标志物进行流式细胞术。在某些实施方案中，流式细胞术是直接检测测定法。在某些实施方案中，T细胞和/或B细胞标志物是CD8+ T细胞的标志物或B19+B细胞的标志物。在某些实施方案中，在从受试者获得血液样品后48小时内进行流式细胞术。在某些实施方案中，抗人IgG1 Fc抗体是IS1112E.E.23.30。

[0017] 在某些实施方案中，用于确定受试者血细胞中抗人CD73抗体对人CD73受体占有率的方法包括从受试者获得全血样品，并且使用抗人IgG1 Fc抗体和$CD8^+$ T细胞和/或$B19^+$ B细胞的标志物进行流式细胞术，其中从受试者获得血液样品后48小时内进行流式细胞术。

[0018] 本文中提供了癌症的联合治疗，比如联合施用抗CD73拮抗剂和免疫肿瘤学作用剂。在某些实施方案中，在本文所述方法中使用的CD73拮抗剂是抗CD73抗体或其抗原结合部分。在某些实施方案中，免疫肿瘤学作用剂选自下组：PD-1拮抗剂、PD-L1拮抗剂、CTLA-4拮抗剂、LAG-3拮抗剂或本文所述的其他物质。在某些实施方案中，免疫肿瘤学作用剂是抗体或其抗原结合部分，比如抗PD-1抗体(例如，包含分别包含在SEQ ID NO:383-385中列出的序列的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3和包含分别包含在SEQ ID NO:386-388中列出的序列的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3，或包含分别在SEQ ID NO:381和382中列出的重链和轻链可变区序列的抗PD-1抗体)。可以与抗CD73抗体一起施用的示例性抗PD-1抗体是纳武单抗(OPDIVO®;BMS-936558)。

[0019] 在某些实施方案中，在本文所述方法中使用的抗CD73抗体或其抗原结合部分展现一种或多种以下性质：(1)与人CD73例如珠子结合的人二聚体人CD73同种型1和2结合，例

如，K_D为10nM或更小(例如，0.01nM至10nM)，例如，正如通过BIACORE®SPR分析测量的；(2)与膜结合的人CD73结合，例如EC_{50}为1nM或更小(例如，0.01nM至1nM)；(3)与食蟹猴CD73结合，例如与膜结合的食蟹猴CD73结合，例如，EC_{50}为10nM或更小(例如，0.01nM至10nM)；(4)抑制人CD73酶活性，例如EC_{50}为10nM或更小；(5)抑制食蟹猴CD73酶活性，例如EC_{50}为10nM或更小；(6)抑制Calu6细胞中的内源(细胞)人CD73酶活性，EC_{50}为10nM或更小；(7)体内抑制人CD73酶活性；(8)内化(例如，抗体介导的(或依赖性)CD73内化)进入细胞，例如$T_{1/2}$小于1小时、30分钟或10分钟和/或Ymax为至少70％、80％或90％；(9)结合人CD73上的构象表位，例如氨基酸序列(SEQ ID NO:1)内的不连续表位，其包括氨基酸残基FTKVQQIRRAEPNVLLLDA(SEQ ID NO:96)和/或LYLPYKVLPVGDEVVG(SEQ ID NO:97)的全部或部分；(10)与CD73.4-1、CD73.4-2、CD73.3、11F11-1、11F11-2、4C3-1、4C3-2、4C3-3、4D4、10D2-1、10D2-2、11A6、24H2、5F8-1、5F8-2、6E11和/或7A11在任一方向或两个方向上竞争结合人CD73；和(11)以与CD73.4相似的模式与人CD73相互作用，如通过X射线晶体学确定的。

[0020] 在某些实施方案中，抗CD73抗体或其抗原结合部分包含与分别选自下组的重链和轻链可变区氨基酸序列至少85％、至少90％、至少95％、至少98％或100％相同的重链和轻链可变区：(a)SEQ ID NO:4和8；(b)SEQ ID NO:4和12；(c)SEQ ID NO:16和20；(d)SEQ ID NO:16和24；(e)SEQ ID NO:16和28；(f)SEQ ID NO:32和36；(g)SEQ ID NO:40和44；(h)SEQ ID NO:40和48；(i)SEQ ID NO:52和56；(j)SEQ ID NO:60和64；(k)SEQ ID NO:68和72；(l)SEQ ID NO:68和76；(m)SEQ ID NO:80和84；(n)SEQ ID NO:88和92；(o)SEQ ID NO:135和8；和(p)SEQ ID NO:135和12。

[0021] 在某些实施方案中，抗CD73抗体或其抗原结合部分包含：(a)分别包含SEQ ID NO:5、6和7的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别包含SEQ ID NO:9、10和11的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；(b)分别包含SEQ ID NO:5、6和7的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别包含SEQ ID NO:13、14和15的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；(c)分别包含SEQ ID NO:17、18和19的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别包含SEQ ID NO:21、22和23的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；(d)分别包含SEQ ID NO:17、18和19的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别包含SEQ ID NO:25、26和27的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；(e)分别包含SEQ ID NO:17、18和19的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别包含SEQ ID NO:29、30和31的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；(f)分别包含SEQ ID NO:33、34和35的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别包含SEQ ID NO:37、38和39的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；(g)分别包含SEQ ID NO:41、42和43的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别包含SEQ ID NO:45、46和47的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；(h)分别包含SEQ ID NO:41、42和43的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别包含SEQ ID NO:49、50和51的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；(i)分别包含SEQ ID NO:53、54和55的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别包含SEQ ID NO:57、58和59的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；(j)分别包含SEQ ID NO:61、62和63的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别包含SEQ ID NO:65、66和67的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；(k)分别包含SEQ ID NO:69、70和71的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别包含SEQ ID NO:73、74和75的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；(l)分别包含SEQ ID NO:69、70和71的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别包含SEQ ID NO:77、78和79的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；(m)分别包含SEQ ID NO:81、82和83的重链CDR1、CDR2和CDR3序列和分别包含SEQ ID NO:85、86和87的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列；或(n)分别包含SEQ ID NO:89、90和91的重链CDR1、CDR2和CDR3序列

和分别包含SEQ ID NO:93、94和95的轻链CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0022] 在某些实施方案中,抗CD73抗体或其抗原结合部分包含与选自下组的重链和轻链序列的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%相同的重链和轻链序列:(a)分别为SEQ ID NO:100和101;(b)分别为SEQ ID NO:100和102;(c)分别为SEQ ID NO:103和104;(d)分别为SEQ ID NO:103和105;(e)分别为SEQ ID NO:103和106;(f)分别为SEQ ID NO:107和108;(g)分别为SEQ ID NO:109和110;(h)分别为SEQ ID NO:109和111;(i)分别为SEQ ID NO:112和113;(j)分别为SEQ ID NO:114和115;(k)分别为SEQ ID NO:116和117;(l)分别为SEQ ID NO:116和118;(m)分别为SEQ ID NO:119和120;(n)分别为SEQ ID NO:121和122;(o)分别为SEQ ID NO:133和101;和(p)分别为SEQ ID NO:133和102。

[0023] 在某些实施方案中,抗CD73抗体包含无效应子的Fc。在某些实施方案中,抗CD73抗体选自下组:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4或其变体。

[0024] 在某些实施方案中,抗CD73抗体包含修饰的重链恒定区,其从N到C端依次包含人CH1结构域、人铰链结构域、人CH2结构域和人CH3结构域。在某些实施方案中,修饰的恒定区包含不同同种型的至少2个结构域,所述同种型选自下组同种型:IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在某些实施方案中,修饰的恒定区包含人IgG2 CH1结构域,并且CH2、CH3和铰链结构域中的至少一个不是IgG2同种型。在某些实施方案中,IgG2 CH1结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:124。在某些实施方案中,修饰的恒定区包含例如降低半胱氨酸结合的异质性的人IgG2铰链结构域。在某些实施方案中,铰链结构域包含相对于野生型人IgG2铰链结构域(SEQ NO 136)在C219或C220处的氨基酸取代。在某些实施方案中,铰链结构域包含氨基酸序列SEQ ID NO:123。在某些实施方案中,修饰的恒定区包含效应子功能降低或消除了效应子功能的人IgG1 CH2结构域。在某些实施方案中,CH2结构域包含相对于野生型人IgG1 CH2结构域(SEQ ID NO:137)的氨基酸取代A330S和P331S,或包含氨基酸序列SEQ ID NO:125。在某些实施方案中,修饰的恒定区包含人IgG1 CH3结构域,比如氨基酸序列SEQ ID NO:128。

[0025] 在某些实施方案中,抗CD73抗体或其抗原结合部分是人抗体或人源化抗体。

[0026] 在某些实施方案中,抗CD73抗体的CDR区中的甲硫氨酸残基被不受氧化的氨基酸残基置换。

[0027] 在某些实施方案中,抗CD73抗体和免疫肿瘤学作用剂配制为静脉内施用。在某些实施方案中,抗CD73抗体和免疫肿瘤学作用剂分开配制。在某些实施方案中,抗CD73抗体在施用免疫肿瘤学作用剂之前施用。在某些实施方案中,抗CD73抗体在施用免疫肿瘤学作用剂之后施用。在某些实施方案中,抗CD73抗体和免疫肿瘤学作用剂同时施用。

[0028] 本文中还提供了用于治疗人类患者中的实体瘤的药盒,所述药盒包含:(a)一个剂量的抗CD73抗体,其包含具有在SEQ ID NO:135中列出的序列的重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3结构域,和具有在SEQ ID NO:8或12中列出的序列的轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3结构域;(b)一个剂量的免疫肿瘤学作用剂,其中所述免疫肿瘤学作用剂是抗PD-1抗体,其包含具有在SEQ ID NO:381中列出的重链可变区的CDR1、CDR2和CDR3结构域,和具有在SEQ ID NO:382中列出的序列的轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3结构域,比如纳武单抗(BMS-936558);和(c)关于在本文所述方法中使用所述抗CD73抗体和免疫肿瘤学作用剂的说明书。

[0029] 附图简述

[0030] 图1A显示了CD73.4-1人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:237)和氨基酸序列(SEQ ID NO:135)。标示了CDR1(SEQ ID NO:5)、CDR2(SEQ ID NO:6)和CDR3(SEQ ID NO:7)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0031] 图1B显示了CD73.4-1人单克隆抗体的轻链可变区(VK1)的核苷酸序列(SEQ ID NO:140)和氨基酸序列(SEQ ID NO:8)。标示了CDR1(SEQ ID NO:9)、CDR2(SEQ ID NO:10)和CDR3(SEQ ID NO:11)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0032] 图2A显示了CD73.4-2人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:237)和氨基酸序列(SEQ ID NO:135)。标示了CDR1(SEQ ID NO:5)、CDR2(SEQ ID NO:6)和CDR3(SEQ ID NO:7)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0033] 图2B显示了CD73.4-2人单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:141)和氨基酸序列(SEQ ID NO:12)。标示了CDR1(SEQ ID NO:13)、CDR2(SEQ ID NO:14)和CDR3(SEQ ID NO:15)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0034] 图3A显示了11F11-1人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:139)和氨基酸序列(SEQ ID NO:4)。标示了CDR1(SEQ ID NO:5)、CDR2(SEQ ID NO:6)和CDR3(SEQ ID NO:7)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0035] 图3B显示了11F11-1人单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:140)和氨基酸序列(SEQ ID NO:8)。标示了CDR1(SEQ ID NO:9)、CDR2(SEQ ID NO:10)和CDR3(SEQ ID NO:11)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0036] 图4A显示了11F11-2人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:139)和氨基酸序列(SEQ ID NO:4)。标示了CDR1(SEQ ID NO:5)、CDR2(SEQ ID NO:6)和CDR3(SEQ ID NO:7)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0037] 图4B显示了11F11-2人单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:141)和氨基酸序列(SEQ ID NO:12)。标示了CDR1(SEQ ID NO:13)、CDR2(SEQ ID NO:14)和CDR3(SEQ ID NO:15)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0038] 图5A显示了4C3-1人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:142)和氨基酸序列(SEQ ID NO:16)。标示了CDR1(SEQ ID NO:17)、CDR2(SEQ ID NO:18)和CDR3(SEQ ID NO:19)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0039] 图5B显示了4C3-1人单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:143)和氨基酸序列(SEQ ID NO:20)。标示了CDR1(SEQ ID NO:21)、CDR2(SEQ ID NO:22)和CDR3(SEQ ID NO:23)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0040] 图6A显示了4C3-2人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:142)和氨基酸序列(SEQ ID NO:16)。标示了CDR1(SEQ ID NO:17)、CDR2(SEQ ID NO:18)和CDR3(SEQ ID NO:19)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0041] 图6B显示了4C3-2人单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:144)和氨基酸序列(SEQ ID NO:24)。标示了CDR1(SEQ ID NO:25)、CDR2(SEQ ID NO:26)和CDR3(SEQ ID NO:27)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0042] 图7A显示了4C3-3人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:142)和氨基酸序列(SEQ ID NO:16)。标示了CDR1(SEQ ID NO:17)、CDR2(SEQ ID NO:18)和CDR3

(SEQ ID NO:19)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0043] 图7B显示了4C3-3人单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:145)和氨基酸序列(SEQ ID NO:28)。标示了CDR1(SEQ ID NO:29)、CDR2(SEQ ID NO:30)和CDR3(SEQ ID NO:31)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0044] 图8A显示了4D4-1人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:146)和氨基酸序列(SEQ ID NO:32)。标示了CDR1(SEQ ID NO:33)、CDR2(SEQ ID NO:34)和CDR3(SEQ ID NO:35)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0045] 图8B显示了4D4-1人单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:147)和氨基酸序列(SEQ ID NO:36)。标示了CDR1(SEQ ID NO:37)、CDR2(SEQ ID NO:38)和CDR3(SEQ ID NO:39)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0046] 图9A显示了10D2-1人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:148)和氨基酸序列(SEQ ID NO:40)。标示了CDR1(SEQ ID NO:41)、CDR2(SEQ ID NO:42)和CDR3(SEQ ID NO:43)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0047] 图9B显示了10D2-1人单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:149)和氨基酸序列(SEQ ID NO:44)。标示了CDR1(SEQ ID NO:45)、CDR2(SEQ ID NO:46)和CDR3(SEQ ID NO:47)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0048] 图10A显示了10D2-2人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:148)和氨基酸序列(SEQ ID NO:40)。标示了CDR1(SEQ ID NO:41)、CDR2(SEQ ID NO:42)和CDR3(SEQ ID NO:43)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0049] 图10B显示了10D2-2人单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:150)和氨基酸序列(SEQ ID NO:48)。标示了CDR1(SEQ ID NO:49)、CDR2(SEQ ID NO:50)和CDR3(SEQ ID NO:51)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0050] 图11A显示了11A6-1人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:151)和氨基酸序列(SEQ ID NO:52)。标示了CDR1(SEQ ID NO:53)、CDR2(SEQ ID NO:54)和CDR3(SEQ ID NO:55)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0051] 图11B显示了11A6-1人单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:152)和氨基酸序列(SEQ ID NO:56)。标示了CDR1(SEQ ID NO:57)、CDR2(SEQ ID NO:58)和CDR3(SEQ ID NO:59)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0052] 图12A显示了24H2-1人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:153)和氨基酸序列(SEQ ID NO:60)。标示了CDR1(SEQ ID NO:61)、CDR2(SEQ ID NO:62)和CDR3(SEQ ID NO:63)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0053] 图12B显示了24H2-1人单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:154)和氨基酸序列(SEQ ID NO:64)。标示了CDR1(SEQ ID NO:65)、CDR2(SEQ ID NO:66)和CDR3(SEQ ID NO:67)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0054] 图13A显示了5F8-1人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:155)和氨基酸序列(SEQ ID NO:68)。标示了CDR1(SEQ ID NO:69)、CDR2(SEQ ID NO:70)和CDR3(SEQ ID NO:71)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0055] 图13B显示了5F8-1人单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:156)和氨基酸序列(SEQ ID NO:72)。标示了CDR1(SEQ ID NO:73)、CDR2(SEQ ID NO:74)和CDR3

(SEQ ID NO:75)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0056] 图14A显示了5F8-2人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:155)和氨基酸序列(SEQ ID NO:68)。标示了CDR1(SEQ ID NO:69)、CDR2(SEQ ID NO:70)和CDR3(SEQ ID NO:71)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0057] 图14B显示了5F8-2人单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:157)和氨基酸序列(SEQ ID NO:76)。标示了CDR1(SEQ ID NO:77)、CDR2(SEQ ID NO:78)和CDR3(SEQ ID NO:79)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0058] 图15A显示了5F8-3人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:155)和氨基酸序列(SEQ ID NO:68)。标示了CDR1(SEQ ID NO:69)、CDR2(SEQ ID NO:70)和CDR3(SEQ ID NO:71)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0059] 图15B显示了5F8-3人单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:242)和氨基酸序列(SEQ ID NO:238)。标示了CDR1(SEQ ID NO:239)、CDR2(SEQ ID NO:240)和CDR3(SEQ ID NO:241)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0060] 图16A显示了6E11-1人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:158)和氨基酸序列(SEQ ID NO:80)。标示了CDR1(SEQ ID NO:81)、CDR2(SEQ ID NO:82)和CDR3(SEQ ID NO:83)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0061] 图16B显示了6E11-1人单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:159)和氨基酸序列(SEQ ID NO:84)。标示了CDR1(SEQ ID NO:85)、CDR2(SEQ ID NO:86)和CDR3(SEQ ID NO:87)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0062] 图17A显示了7A11-1人单克隆抗体的重链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:160)和氨基酸序列(SEQ ID NO:88)。标示了CDR1(SEQ ID NO:89)、CDR2(SEQ ID NO:90)和CDR3(SEQ ID NO:91)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0063] 图17B显示了7A11-1人单克隆抗体的轻链可变区的核苷酸序列(SEQ ID NO:161)和氨基酸序列(SEQ ID NO:92)。标示了CDR1(SEQ ID NO:93)、CDR2(SEQ ID NO:94)和CDR3(SEQ ID NO:95)区并且标明了V、D和J种系来源。

[0064] 图18显示了抗CD73抗体CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f的重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:189)，及其可变区、CDR1、2和3、CH1、铰链、CH2和CH3结构域。

[0065] 图19显示了在25℃下600、200、66.7、22.2、7.4和2.5nM人CD73-his(粗线)或cyno-CD73-his(细线)与捕获在固定的蛋白A表面上的CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f结合的SPR传感图数据。

[0066] 图20A1和20A2显示了具有所示重链恒定区的11F11、CD73.4和CD73.10抗体与人CD73阳性Calu6细胞(人肺腺癌细胞系)的结合。

[0067] 图20B1和20B2显示了具有所示重链恒定区的11F11、CD73.4和CD73.10抗体与人CD73阴性DMS114细胞(小细胞肺癌细胞系)的结合。

[0068] 图20C1和20C2显示了具有所示重链恒定区的11F11、CD73.4和CD73.10抗体与食蟹猴CD73阳性CHO细胞的结合。

[0069] 图20D1和20D2显示了具有所示重链恒定区的11F11、CD73.4和CD73.10抗体与食蟹猴CD73阴性CHO-K1细胞的结合。

[0070] 图20E显示了标示抗体与来自供体D1和D2的T细胞的结合。

[0071] 图20F显示了标示抗体与来自供体D1和D2的T细胞的结合。

[0072] 图20G显示了^{125}-I标记的CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f与人B细胞的结合。

[0073] 图20H显示了^{125}-I标记的CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f与人Calu-6细胞的结合。

[0074] 图20I显示了^{125}-I标记的CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f与CHO-食蟹猴CD73细胞的结合。

[0075] 图21A1和21A2显示了具有所示重链恒定区的抗CD73抗体11F11、CD73.4和CD73.10对珠子结合的人CD73酶活性的抑制。所有抗体均抑制人CD73酶活性。

[0076] 图21B1和21B2显示了具有所示重链恒定区的抗CD73抗体11F11、CD73.4和CD73.10对珠子结合的食蟹猴CD73酶活性的抑制。所有抗体均抑制了食蟹猴CD73酶活性。

[0077] 图22A1和22A2显示了具有所示重链恒定区的11F11、CD73.4和CD73.10抗体对人CD73阳性Calu6细胞中的CD73酶活性抑制。所有抗体均抑制了这些细胞中的CD73酶活性。

[0078] 图22B1和22B2显示了具有所示重链恒定区的11F11、CD73.4和CD73.10抗体对人CD73阴性DMS-114细胞中的CD73酶抑制。

[0079] 图22C显示了使用Calu-6和HEK/A2R细胞的cAMP测定法所确定的11F11和11F11 F(ab')$_2$片段对内源CD73活性的抑制的EC50和Ymax值。图22C还显示了在Calu-6内化测定法中11F11和F(ab')$_2$片段的EC50和Ymax值。该图显示11F11 Fab片段在这两种测定法中无活性。

[0080] 图22D显示了通过LC/MS/MS测量的用11F11或4C3抗体处理的Calu6细胞产生腺苷的时间过程,表明11F11抗体的CD73酶抑制比4C3抗体发生更快。

[0081] 图22E显示了用指示剂量的CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f或对照抗体处理的Calu-6肿瘤中CD73酶活性的定量。

[0082] 图23A显示了通过以下抗体的CD73的抗体介导的内化的动力学:具有4C3Vk1轻链(“3-Vh-hHC-IgG1.1f/4C3Vk1”)的11F11、4C3、6D11、CD73.3-IgG1.1f;具有11F11 Vk2轻链(“4-Vh-hHC-IgG2-C219S/11F11-Vk2”)的CD73.4-IgG2CS、CD73.10-IgG2CS(“CD73.10-Vh-hHC-IgG2-C219S”)、CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f(“CD73.10-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f”)以及在H2228细胞中的CD73.10-IgG1.1f(“CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f”)抗体。相比于其他IgG1同种型的测试抗体,11F11(其为IgG2同种型)、CD73.4-IgG2CS、CD73.10-IgG2CS和CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f抗体被更快且更高程度地内化。

[0083] 图23B显示了与图23A所示相同抗体的抗体在HCC15细胞(非小细胞肺癌细胞系)中介导的CD73内化的动力学,显示了与获自H2228细胞(非小细胞肺癌细胞系)的结果相似的结果。

[0084] 图23C显示了与图23A和23B中所示相同抗体以及CD73.11-IgG2CS(“11-Vh-hVC-IgG2-C219S”)在Calu6细胞中的抗体介导的CD73内化的动力学,显示了与获自H2228和HCC15细胞的结果相似的结果。

[0085] 图23D显示了与图23C所示相同抗体在NCI-2030细胞(非小细胞肺癌细胞系)中的抗体介导的CD73内化的动力学,显示了与获自H2228、HCC15和Calu6细胞的结果相似的结果。

[0086] 图23E显示了通过流式细胞术测量的标示抗体在Calu6细胞中的抗体介导的CD73内化的动力学。

[0087] 图23F显示了通过流式细胞术测量的标示抗体在NCI-H292细胞(粘液表皮样肺癌细胞系)中的抗体介导的CD73内化的动力学,但细胞与抗体第一次温育之后未洗出抗体。

[0088] 图23G显示了在用标示抗体处理的Calu6细胞中内化的CD73的百分比,显示了标示抗体在Calu6细胞中随时间推移的抗体介导的CD73内化。

[0089] 图23H显示了在用标示抗体处理的NCI-H292细胞中内化的CD73的百分比,显示了在NCI-H292细胞中标示抗体随时间推移的抗体介导的CD73内化。

[0090] 图23I显示了在用标示抗体处理的SNU-C1细胞(结肠癌细胞系)中内化的CD73的百分比,显示了标示抗体在SNU-C1细胞中随时间推移的抗体介导的CD73内化。

[0091] 图23J显示了在用标示抗体处理的NCI-H1437细胞(非小细胞肺癌细胞系)中内化的CD73的百分比,显示了标示抗体在NCI-H1437细胞中随时间推移的抗体介导的CD73内化。

[0092] 图23K显示了在用标示抗体处理的Calu6细胞中随时间推移的内化的CD73的百分比,显示了标示抗体在Calu6细胞中随时间推移的抗体介导的CD73内化。

[0093] 图23L显示了在用标示抗体处理的NCI-H292细胞中随时间推移的内化的CD73的百分比,显示了标示抗体在Calu6细胞中随时间推移的抗体介导的CD73内化。

[0094] 图23M显示了用5μg/ml的标示抗体处理0、5、15或30分钟的Calu6细胞表面上的CD73水平。

[0095] 图24A显示了用对照抗体治疗动物后4天从动物收获并且针对CD73酶活性进行染色的异种移植肿瘤切片。切片显示出指示CD73酶活性的深棕色。

[0096] 图24B显示了用11F11抗体治疗动物后1天从动物收获并且针对CD73酶活性进行染色的异种移植肿瘤切片。相对于图24A中所示的对照肿瘤切片,切片显示出的棕色显著较浅,表明早至治疗开始后1天CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f即对CD73酶活性体内抑制。

[0097] 图24C显示了用CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f治疗动物后2天从动物收获并针对CD73酶活性进行染色的异种移植肿瘤切片。相对于图24A中所示的对照肿瘤切片以及相对于在用CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f治疗动物后1天的肿瘤切片,切片显示出的棕色显著较浅,表明早至治疗开始后至少2天CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f即对CD73酶活性的体内抑制。

[0098] 图24D显示了用CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f治疗动物后3天从动物收获并且针对CD73酶活性进行染色的异种移植肿瘤切片。相对于图24A中所示的对照肿瘤切片,切片显示出的棕色显著较浅,表明早至治疗开始后至少3天CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f即对CD73酶活性的体内抑制。

[0099] 图24E显示了用CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f治疗动物后7天从动物收获并且针对CD73酶活性进行染色的异种移植肿瘤切片。相对于图24A中所示的对照肿瘤切片,切片显示出的棕色显著较浅,表明早至治疗开始后至少7天CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f即对CD73酶活性的体内抑制。

[0100] 图24F显示了在用对照(非CD73)抗体或用1mg/kg、3mg/kg或10mg/kg CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f治疗的异种移植小鼠的SNUC1肿瘤中人CD73酶活性的时间过程,显示抗CD73抗体有效降低了异种移植小鼠肿瘤中的CD73酶活性。

[0101] 图24G显示了在抗体施用后不同时间用10mg/kg、20mg/kg或30mg/kg的抗小鼠CD73抗体治疗的小鼠的MC38肿瘤中CD73的抑制水平。

[0102] 图25A显示了在来自荷有同源4T1肿瘤和对照mIgG的Balb/c小鼠的对照肿瘤切片

中的小鼠CD73酶活性的水平。

[0103] 图25B显示了用抗小鼠CD73抗体TY23皮下治疗的荷有同源4T1肿瘤的Balb/c小鼠的肿瘤切片(4T1,第1-7天),表明TY23在体内抑制了CD73酶抑制。

[0104] 图26A显示了通过流式细胞术确定的抗CD73抗体4C3、7A11、6E11、5F8、4C3、11F11和11A6对4C3的交叉阻断的水平。

[0105] 图26B显示了通过流式细胞术确定的抗CD73抗体4C3、7A11、6E11、5F8、4C3、11F11和11A6对11F11的交叉阻断的水平。

[0106] 图27A显示了人CD73的氨基酸序列(SEQ ID NO:283)和与CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f相互作用的区域(以深灰色表示)。相互作用越强,灰色越深。

[0107] 图27B显示了二聚体人CD73蛋白和CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f之间的相互作用的模型。

[0108] 图28A显示了人CD73和11F11Fab'片段之间的相互作用的晶体学模型。

[0109] 图28B显示了具有11F11的两种人CD73复合物的复合结构的模型。

[0110] 图28C显示了人CD73和11F11抗体之间的相互作用的模型。

[0111] 图28D显示了11F11和人CD73之间的相互作用的模型。

[0112] 图29A显示了人CD73和抗体复合物的SEC-MALS数据。“CD73.4杂合体”是指CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f。

[0113] 图29B显示了人CD73和抗体复合物的DLS数据。

[0114] 图30A显示了hCD73-his与含有不同恒定区的CD73.4抗体的复合物的SEC色谱图数据,显示了IgG2铰链和CH1结构域对抗体/抗原复合物大小的影响。

[0115] 图30B显示了hCD73-his与含有不同恒定区的CD73.4抗体的复合物的DLS数据,显示了IgG2铰链和CH1结构域对抗体/抗原复合物大小的影响。

[0116] 图30C显示了hCD73-his与含有不同恒定区的CD73.4抗体的复合物的MALS数据,显示了IgG2铰链和CH1结构域对抗体/抗原复合物大小的影响。

[0117] 图30D显示了衍生自图30C中的MALS测定的质量的hCD73-his/mAb复合物的示意性模型。

[0118] 图30E显示了更高阶的复合物受到CH1区的影响。直方图显示了每个构建体的峰1和峰2(如曲线图中所示)下的面积%。

[0119] 图31显示了在加入每种所示抗体之后1、4或21小时的抗体介导的CD73内化的百分比。以21小时(左侧)、4小时(中间)和1小时(右侧)的顺序显示每种抗体的条形。

[0120] 图32A显示了hCD73-his与含有不同恒定区序列的16种不同的CD73.4抗体的1:1摩尔复合物的SEC色谱图数据的叠加。

[0121] 图32B显示了图32A的色谱图的11-19.5分钟的色谱图数据的展开,其中指示了4种不同的洗脱种类。

[0122] 图32C显示了针对16种不同的抗体/CD73-his复合物绘制的图32B的峰2的UV色谱信号区的百分比。数据按照峰面积增加的顺序从左到右排序。

[0123] 图33显示了抗体与抗his抗体Fab捕获的FcγR-his蛋白的结合。假定mAb:FcγR结合化学计量1:1,将结合反应作为理论Rmax的百分比绘出。各抗体的条形按照幻灯片底部的颜色图例提供的顺序显示。

[0124] 图34显示了抗体与抗his抗体Fab捕获的FcgR-his蛋白的结合。假定mAb:FcγR结合化学计量1:1,将结合反应作为理论Rmax的百分比绘出。各抗体的条形按照幻灯片底部的颜色图例提供的顺序显示。

[0125] 图35显示了各种抗CD73抗体的VH和VL序列的比对。VH和VL CDR1、CDR2和CDR3序列为粗体。

[0126] 图36A显示了在0(“4deg”)、15、30、60和120分钟后内化到Calu-6细胞中的抗体11F11、6E11和4C3的EEA1共定位系数(从左到右显示)。

[0127] 图36B显示了在0(“4deg”)、15、30、60和120分钟后内化到Calu-6细胞中的抗体11F11、6E11和4C3的Rab7共定位系数(从左到右显示)。

[0128] 图36C显示了在0(“4deg”)、15、30、60和120分钟后内化到Calu-6细胞中的抗体11F11、6E11和4C3的Lamp-1共定位系数(从左到右显示)。

[0129] 图37A显示了通过在TMA切片上用mAb 1D7的免疫组织化学(IHC)确定的在指示肿瘤的细胞质、细胞膜或两者中的CD73表达水平。图中列出的肿瘤,从左到右为,甲状腺癌(n＝16)、胰腺癌(n＝10)、子宫内膜癌(n＝9)、肝细胞癌或综合(n＝17)、头颈部鳞状细胞癌(n＝15)、肾细胞癌(n＝16)、结肠腺癌(n＝49)、胃腺癌(n＝17)、非小细胞肺癌(n＝45)、卵巢腺癌(n＝18)、前列腺腺癌(n＝17)、膀胱癌(n＝20)、食道鳞状细胞癌(n＝10)、乳腺癌(n＝52)和淋巴瘤(n＝15)。每种癌症类型的第一列(左)代表平均综合肿瘤CD73评分;每种癌症类型的第二列(中间)代表平均肿瘤细胞质CD73评分;每种肿瘤类型的第三列(右)代表平均肿瘤细胞的膜CD73评分。

[0130] 图37B显示了在指示肿瘤的细胞膜中的CD73表达水平。该图对应于图36A,但仅显示细胞膜上CD73的水平。图中列出的肿瘤,从左到右为,甲状腺癌(n＝16)、肝细胞癌或综合(n＝17)、头颈部鳞状细胞癌(n＝15)、胰腺癌(n＝10)、结肠腺癌(n＝49)、子宫内膜癌(n＝9)、非小细胞肺癌(n＝45)、肾细胞癌(n＝16)、胃腺癌(n＝17)、卵巢腺癌(n＝18)、前列腺腺癌(n＝17)、膀胱癌(n＝20)、食道鳞状细胞癌(n＝10)、淋巴瘤(n＝15)和乳腺癌(n＝52)。

[0131] 图38A显示了通过在完整肿瘤切片上用mAb D7F9A的免疫组织化学(IHC)确定的在多个肿瘤类型的肿瘤的细胞质中和细胞表面上的CD73表达。

[0132] 图38B显示了在指示肿瘤的细胞膜中的CD73表达水平。该图对应于图37A,但仅显示细胞膜上CD73的水平。

[0133] 图39A-39H显示了通过在完整肿瘤切片上的免疫组织化学(IHC)确定的在图38A中所示肿瘤类型的个体肿瘤的细胞表面上的CD73表达。

[0134] 图40A-40F显示了通过流式细胞术确定的具有结肠腺癌(“结肠”)、肾细胞癌(“肾脏”)和肺腺癌(“肺”)的受试者的肿瘤和血液中CD8+ T细胞、CD4+FoxP3-和CD4+FoxP3+ T细胞上PD-1的频率。对于图40A-40F中的每一者,从左到右的条形对应于患有结肠腺癌、肾细胞癌和肺腺癌的受试者。图40A显示了在血液CD8+ T细胞中PD-1的频率。图40B显示了在肿瘤CD8+ T细胞中PD-1的频率。图40C显示了在血液CD4+FoxP3-细胞中PD-1的频率。图40D显示了在肿瘤CD4+FoxP3-细胞中PD-1的频率。图40D显示了在血液CD4+FoxP3+细胞中PD-1的频率。图40F显示了在肿瘤CD4+FoxP3+细胞中PD-1的频率。

[0135] 图41A-41D显示了用5mg/kg、10mg/kg和20mg/kg的替代小鼠抗CD73抗体(mIgG1)或10mg/kg的对照小鼠IgG1抗体治疗的小鼠中的MC38肿瘤生长。

[0136] 图42A-42D显示了用10mg/kg的抗PD-1抗体或10mg/kg的抗PD-1抗体与5mg/kg、10mg/kg或20mg/kg替代小鼠抗CD73抗体(mIgG1)联合治疗的小鼠中的MC38肿瘤生长。

[0137] 图43显示了在来自图42A-42D实验的小鼠中的中位MC38肿瘤生长。

[0138] 图44显示了来自图42A-42D实验的小鼠的生存曲线。

[0139] 图45A-45D显示了抗CD73抗体和抗PD-1抗体的联合在未分期CT26癌症模型中的抗肿瘤作用。

[0140] 图46显示了测试的用于直接检测受体占有率测定形式的三种不同的抗人IgG1-PE抗体的剂量依赖性。

[0141] 图47显示了从正常健康志愿者收集的全血的CD73抗体的剂量反应。描绘了本文所述CD73抗体对具有来自三个健康供体的系列浓度的B细胞上CD73的受体占有率的百分比。

[0142] 图48显示了荧光强度测定精度结果。在来自三个健康供体的全血中掺入不同浓度的CD73抗体。显示了总受体水平(实心符号)和被CD73抗体结合的受体水平(空心符号)。

[0143] 图49显示了推导的受体占有率测定精度结果。在来自三个健康供体的全血样品中掺入不同浓度的CD73抗体,进行三次重复分析。

[0144] 图50显示了收集用于CD73受体占有率测定的全血样品的收集后稳定性。用不同浓度的CD73抗体处理全血样品,并在收集后0、24、48和72小时进行分析。

[0145] 图51显示了质量控制范围和性能。将CD-Chex®Normal的CD19+ B细胞(上)和CD8+ T细胞(下)上的总CD73表达分析五次,以建立95%置信区间。

[0146] 图52A-52J显示了用IgG1和含有IgG2.C219S恒定区的抗CD73(CD73.4)抗体形成的抗原-抗体复合物类型的差异。小图A-E显示了CD73+含有IgG1的抗CD73抗体的选定类别平均值,其中区段可能鉴定为抗体或CD73二聚体(图A和图B)。分散的分支密度是Fc结构域并且在类别平均值中通常是无序的,而Fab可以通过它们的特征双峰形状和大小加以鉴定。在Fab结合位点处的其余密度也是双峰状的,且大约为85Å直径,表明它是CD73二聚体(图A和图B)。复合物的其他变化形式也存在于样品中并且也显示出各种构象(C-E)。小图F-J显示了CD73和含有IgG2.C219S的选定类别平均值,其中区段可能鉴定为IgG2.C219S或CD73二聚体。Fab可以通过它们的特征双峰形状和大小来鉴定。在Fab结合位点处的其余密度是CD73二聚体。不能清楚地描绘线性多聚体区段,但其表明含有IgG2.C219S的抗体和CD73如何形成观察到的串状结构。小图H-J显示了来自串状结构的手动选择的平均值。比对似乎集中在IgG2.C219S的Fab臂上,但是不可能进行更详细的解释。含有IgG1的CD73.4抗体和含有IgG2.C219S的抗体分别称为“IgG1”和“IgG2”。

[0147] 图53显示了患者肿瘤样品中的人CD73酶抑制,如深(棕色)染色的水平所证明。“筛选”是指在向患者施用抗CD73抗体之前的肿瘤样品,“给药后”或“用药后”是指在向患者施用抗CD73抗体之后的肿瘤样品。

[0148] 图54显示了在加入每种所示抗体之后1、4或21小时的抗体介导的CD73内化的百分比。以21小时(左侧)、4小时(中间)和1小时(右侧)的顺序显示每种抗体的条形。上面的虚线代表具有IgG2的CH1和铰链的抗体的内化的平均百分比,下面的虚线代表具有IgG1的CH1和铰链的抗体的内化的平均百分比。

[0149] 图55A和图55B显示了图54中描绘的内化百分比,为分别针对1小时和4小时时间点的单独图表。

[0150] 发明详述

[0151] 本文中描述了与CD73特异性地结合且由此降低CD73活性(“拮抗剂抗CD73抗体”)的分离的抗体,尤其是单克隆抗体,例如人单克隆抗体。在某些实施方案中,本文所述抗体衍生自特定的重链和轻链种系序列和/或含有包含特定氨基酸序列的特定结构特征,比如CDR区。本文中提供了分离的抗体、制造这样的抗体的方法、包含这样的抗体的免疫缀合物和双特异性分子以及经配制为含有所述抗体的药物组合物。本文中还提供了单独地或与其他治疗剂(例如,抗体)和/或癌症疗法联合使用所述抗体以降低肿瘤生长的方法。因此,本文所述抗CD73抗体可用于多种治疗应用中的治疗,包括(例如)抑制肿瘤生长、抑制转移和增强针对肿瘤的免疫应答。

[0152] 定义

[0153] 为了更易于理解本说明,首先对某些术语进行了定义。其他定义在整个详细说明中进行阐述。

[0154] 如本文中使用的术语“分化簇73”或“CD73”是指能够将细胞外5′单磷酸核苷转化为核苷,即单磷酸腺苷(AMP)转化为腺苷的酶(核苷酸酶)。通常发现CD73为通过糖基磷脂酰肌醇(GPI)连接锚定于细胞膜的二聚体,其具有胞外酶活性并在信号转导中起作用。CD73的主要功能是将细胞外核苷酸(例如5′-AMP)转化为腺苷,一种高度免疫抑制的分子。因此,胞外-5′-核苷酸酶催化嘌呤和嘧啶-核糖核苷单磷酸和脱氧核糖核苷单磷酸去磷酸化成为相应的核苷。虽然CD73具有广泛的底物特异性,但偏好嘌呤核糖核苷。

[0155] CD73也被称为胞外-5′核酸酶(胞外-5′NT,EC 3.1.3.5)。术语“CD73”包括由细胞天然表达的CD73的任何变体或同种型。因此,本文所述抗体可与来自除了人以外的物种的CD73(例如,食蟹猴CD73)交叉反应。或者,抗体对人CD73可以是特异的,并且与其他物种可能不展现出任何交叉反应性。CD73或其任何变体和同种型可以分离自天然表达它们的细胞或组织,或使用本领域熟知的技术和/或本文所述技术以重组方式产生。

[0156] 已经鉴定了人CD73的两个同种型,两者共有相同的N端和C端部分。同种型1(登录号NP_002517.1;SEQ ID NO:1)代表最长的蛋白质,由574个氨基酸和9个外显子组成。同种型2(登录号NP_001191742.1;SEQ ID NO:2)编码较短的蛋白质,其由524个氨基酸组成,缺乏氨基酸404-453。同种型2缺乏一个供替代的(alternate)框内外显子,因而仅具有8个外显子,但具有相同的N-和C-端序列的转录物。

[0157] 食蟹猴(cyno)CD73蛋白质序列如SEQ ID NO:3所示。食蟹猴(cynomolgus)和食蟹猴(cyno)这两个术语指的都是食蟹猴(Macaca fascicularis)这一物种,两者在本说明书全文中可互换使用。

[0158] 如本文中使用的,术语“程序性死亡1”、“细胞程序性死亡1”、“蛋白PD-1”、“PD-1”、“PD1”、“PDCD1”、“hPD-1”和“hPD-I”可互换使用,包括人PD1的变体、同种型、物种同源物、以及与PD1具有至少一个共同表位的类似物。完整的PD-1序列可以通过GenBank登录号U64863找到。

[0159] 如本文中使用的术语“抗体”可以包括全抗体及其任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或单链。在一个实施方案中,“抗体”是指包含由二硫键互连的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白或其抗原结合部分。每条重链包含重链可变区(在本文中缩写为V_H)和重链恒定区。在某些天然存在的IgG、IgD和IgA抗体中,重链恒定区包含三个结构域CH1、

CH2和CH3。在某些天然存在的抗体中，每条轻链包含轻链可变区(在本文中缩写为V_L)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域CL。V_H区和V_L区可以进一步细分为高变区，称为互补决定区(CDR)，互补决定区与更为保守的被称为框架区(FR)的区域间隔。V_H和V_L各自由3个CDR和4个FR组成，按下列顺序从氨基端到羧基端排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q))结合。

[0160] 抗体的重链可含有或不含末端赖氨酸(K)、或末端甘氨酸和赖氨酸(GK)。因此，本文中提供的任何重链序列和重链恒定区序列可以以GK或G结尾，或缺乏K或GK，而不管序列的最后一个氨基酸是什么。这是因为在抗体表达过程中末端赖氨酸、有时是甘氨酸和赖氨酸，会被切割掉。

[0161] 抗体一般以高亲和力与其同源抗原特异性结合，反映在解离常数(K_D)上为10^{-7}到10^{-11}M或更小。大于约10^{-6}M的任何K_D通常被认为指示非特异性结合。如本文中使用的，与抗原“特异性结合”的抗体是指以高亲和力与抗原及基本上相同的抗原结合的抗体，高亲和力意味着K_D为10^{-7}M或更小、优选地10^{-8}M或更小、甚至更优选地$5x10^{-9}$M或更小、最优选地在10^{-8}M和10^{-10}M之间或更小，但是不会以高亲和力与无关抗原结合。如果一种抗原相对于给定抗原展现出高度的序列同一性，例如如果它相对于给定抗原的序列展现出至少80％、至少90％、至少97％、或至少99％或更高的序列同一性，则该抗原与给定抗原“基本上相同”。作为举例，与人CD73特异性结合的抗体也可以与来自某些非人灵长类物种(例如，食蟹猴)的CD73交叉反应，但是不会与来自其他物种的CD73、或除CD73之外的抗原交叉反应。

[0162] 免疫球蛋白可来自公知的同种型中的任一者，包括但不限于IgA、分泌型IgA、IgG和IgM。IgG同种型在某些物种中分成亚类：在人类中为IgG1、IgG2、IgG3和IgG4，在小鼠中为IgG1、IgG2a、IgG2b和IgG3。在某些实施方案中，本文所述抗CD73抗体为人IgG1或IgG2亚型。免疫球蛋白(例如，人IgG1)存在若干同种异型，这些同种异型以至多很少的氨基酸而彼此不同。作为举例，“抗体”可以包括天然存在和非天然存在的抗体；单克隆和多克隆抗体；嵌合和人源化抗体；人和非人抗体；全合成抗体；以及单链抗体。

[0163] 如本文中使用的，术语抗体的“抗原结合部分是指保留与抗原(例如，人CD73)特异性结合能力的抗体的一个或多个片段。已经显示，抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段来执行。术语抗体(例如，本文所述抗CD73抗体)的“抗原结合部分”所涵盖的结合片段的实例包括：(i)Fab片段，由V_L、V_H、CL和CH1结构域组成的单价片段；(ii)F(ab″)2片段，包含通过铰链区的二硫键连接的两个Fab片段的二价片段；(iii)Fd片段，由V_H和CH1结构域组成；(iv)Fv片段，由抗体单臂的V_L和V_H结构域组成；(v)dAb片段(Ward等人，(1989)Nature 341:544-546)，其由V_H结构域组成；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，它们可以任选地通过合成接头连接。此外，尽管Fv片段的两个结构域V_L和V_H由单独的基因编码，但可使用重组方法通过合成接头将它们连接，使它们能够以单个蛋白链的形式产生，其中V_L区和V_H区配对形成单价分子(称作单链Fv(scFv)；参见，例如，Bird等人，(1988)Science 242:423-426；和Huston等人，(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883)。这样的单链抗体预期也包括在术语抗体的“抗原结合部分”内。这些和其他潜在的构建体描述于Chan&Carter(2010)Nat.Rev.Immunol.10:301。使用本领域技术人员已知的常

规技术获得这些抗体片段，并以与完整抗体相同的方式筛选片段的实用性。抗原结合部分可以通过重组DNA技术产生、或通过完整免疫球蛋白的酶切割或化学切割产生。

[0164] “双特异性”或“双功能抗体”是具有两个不同的重链/轻链对、产生具有针对不同抗原的特异性的两个抗原结合位点的人工杂合抗体。双特异性抗体可以通过多种方法产生，包括杂交瘤融合或Fab′片段的连接。参见，例如，Songsivilai&Lachmann，Clin.Exp.Immunol.79:315-321(1990);Kostelny等人，J.Immunol.148,1547-1553(1992)。

[0165] 如本文中使用的，术语“单克隆抗体”是指对特定表位展示单一结合特异性和亲和力的抗体，或其中所有抗体都对特定表位展示单一结合特异性和亲和力的抗体组合物。通常，这样的单克隆抗体将衍生自单细胞或编码抗体的核酸，并且将在未有意引入任何序列改变的情况下增殖。因此，术语“人单克隆抗体”指具有衍生自人种系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，人单克隆抗体由杂交瘤产生，例如，通过使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细胞与永生化细胞融合而获得。

[0166] 如本文中使用的，术语“重组人抗体”包括所有通过重组手段制备、表达、创建或分离的人抗体，例如(a)从针对人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体的动物(例如，小鼠)或从此类动物制备的杂交瘤分离的抗体，(b)从被转化而表达该抗体的宿主细胞，例如从转染瘤分离的抗体，(c)从重组、组合人抗体文库分离的抗体，和(d)通过任何其他涉及将人免疫球蛋白基因序列与其他DNA序列剪接的方法而制备、表达、创建或分离的抗体。这样的重组人抗体包含这样的可变区和恒定区，它们利用特定的人种系免疫球蛋白序列并且由种系基因编码，但包括在例如抗体成熟期间发生的后续重排和突变。如本领域中已知的(参见，例如，Lonberg(2005)Nature Biotech.23(9):1117-1125)，可变区含有由不同的基因编码的抗原结合结构域，这些基因发生重排以形成对外来抗原特异的抗体。除了重排之外，可以进一步通过多个单氨基酸改变(称为体细胞突变或超突变)修饰可变区，以增加抗体与外来抗原的亲和力。恒定区会进一步响应于抗原而改变(即，同种型转换)。因此，响应于抗原的编码轻链和重链免疫球蛋白多肽的经过重排和体细胞突变的核酸序列与原始的种系序列可以不相同，但是基本上相同或者相似(即，具有至少80％同一性)。

[0167] “人”抗体(HuMAb)是指具有如下可变区的抗体，其中框架区和CDR区都衍生自人种系免疫球蛋白序列。此外，如果抗体含有恒定区，则恒定区也衍生自人种系免疫球蛋白序列。本文所述抗体可以包括并非由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如，通过体外随机诱变或定点诱变或者通过体内体细胞突变引入的突变)。然而，如本文中使用的，术语“人抗体”不意图包括这样的抗体：其中源自另一个哺乳动物物种种系例如小鼠的CDR序列被移植到人框架序列上。术语“人”抗体和“全人”抗体可作为同义词使用。

[0168] “人源化”抗体是指这样的抗体，其中非人抗体CDR结构域外部的一些、大多数或全部氨基酸被衍生自人免疫球蛋白的相应氨基酸代替。在人源化抗体形式的一个实施方案中，CDR结构域外部的一些、大多数或全部氨基酸被来自人免疫球蛋白的氨基酸代替，而一个或多个CDR区域内的一些、大多数或全部氨基酸没有改变。氨基酸的少量添加、缺失、插入、取代或修饰也允许的，只要它们不会消除抗体结合特定抗原的能力即可。“人源化”抗体保留与原始抗体相似的抗原特异性。

[0169] “嵌合抗体”是指这样的抗体：其中可变区衍生自一个物种而恒定区衍生自另一个

物种,比如这样的抗体:其中可变区衍生自小鼠抗体而恒定区衍生自人抗体。

[0170] “修饰的重链恒定区”是指包含恒定结构域CH1、铰链、CH2和CH3的重链恒定区,其中一个或多个恒定结构域来自不同的同种型(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)。在某些实施方案中,修饰的恒定区包括人IgG2 CH1结构域以及与人IgG1 CH2结构域和人IgG1 CH3结构域融合的人IgG2铰链。在某些实施方案中,这样的修饰恒定区还包括相对于野生型氨基酸序列的在一个或多个结构域内的氨基酸修饰。

[0171] 当在本文中将抗体称为“CD73.3”或“CD73.4”而未指示恒定区的同一性时,除非另外指明,其指的是具有本文所述任何恒定区的分别具有CD73.3或CD73.4的可变区的抗体。

[0172] 如本文中使用的,“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE抗体)。

[0173] “同种异型”是指特定同种型组内的天然存在的变体,所述变体有少数氨基酸不同(例如,参见Jefferis等人(2009)mAbs 1:1)。本文所述抗体可属于任何同种异型。

[0174] 除非本文中另有说明,所有氨基酸编号的依据是Kabat系统的EU索引(Kabat,E.A.等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH公开号91-3242)。

[0175] 短语“识别抗原的抗体”和“对抗原特异的抗体”在本文中可与术语“与抗原特异性地结合的抗体”互换使用。

[0176] 如本文中使用的“分离的抗体”意指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,与CD73特异性地结合的分离的抗体基本上不含与除CD73以外的抗原特异性地结合的抗体)。然而,与CD73的表位特异性结合的分离的抗体可与来自不同物种的其他CD73蛋白具有交叉反应性。

[0177] 如本文中使用的,“抑制CD73”的抗体是指抑制CD73的生物学功能和/或酶功能的抗体。这些功能包括,例如,抗体抑制CD73酶活性的能力,例如CD73调节的腺苷产生或cAMP产生的减少。

[0178] 如本文中使用的,“内化”的抗体是指在与细胞表面抗原结合后穿过细胞膜的抗体。内化包括抗体介导的受体(例如CD73)内化。在一些实施方案中,抗体以等于约10分钟或更短的$T_{1/2}$的速率“内化”到表达CD73的细胞中。

[0179] “效应子功能”是指抗体Fc区与Fc受体或配体的相互作用或因其产生的生物化学事件。示例性的“效应子功能”包括Clq结合、补体依赖性细胞毒作用(CDC)、Fc受体结合、FcγR介导的效应子功能(比如ADCC和抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP))和细胞表面受体(例如,B细胞受体;BCR)的下调。这样的效应子功能通常需要Fc区与结合结构域(例如,抗体可变结构域)联合。

[0180] “Fc受体”或“FcR”是与免疫球蛋白的Fc区结合的受体。与IgG抗体结合的FcR包括FcγR家族的受体,包括这些受体的等位基因变体和可变剪接形式。FcγR家族由三种活化性受体(小鼠中为FcγRI、FcγRIII和FcγRIV;人类中为FcγRIA、FcγRIIA和FcγRIIIA)及一种抑制性受体(FcγRIIB)组成。表1中总结了人FcγR的各种性质。大多数先天效应细胞类型共表达一或多种活化性FcγR和抑制性FcγRIIB,而小鼠和人类中的自然杀伤(NK)细胞选择性地表达一种活化性Fc受体(小鼠中为FcγRIII,人类中为FcγRIIIA)而不表达抑制性FcγRIIB。人IgG1与大部分人Fc受体结合,且就其结合的活化性Fc受体的类型而言

被认为等同于鼠IgG2a。

[0181] 表1.人FcγR的性质

[0182]

Fcγ	等位基因变体	对人IgG的亲和力	同种型优先性	细胞分布
FcγRI	未描述	高(K_D 约10 nM)	IgG1=3>4>>2	单核细胞、巨噬细胞、活化的嗜中性粒细胞、树突状细胞?
FcγRIIA	H131	低至中等	IgG1>3>2>4	嗜中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、树突细胞、血小板
	R131	低	IgG1>3>4>2	
FcγRIIIA	V158	中等	IgG1=3>>4>2	NK细胞、单核细胞、巨噬细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、树突细胞?
	F158	低	IgG1=3>>4>2	
FcγRIIB	I232	低	IgG1=3=4>2	B细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、肥大细胞
	T232	低	IgG1=3=4>2	

[0183] “铰链”、“铰链结构域”或“铰链区”或“抗体铰链区”是指重链恒定区中将CH1结构域与CH2结构域连接的结构域，其包括铰链的上部、中间及下部部分(Roux等人，J.Immunol.1998 161:4083)。铰链提供在抗体的结合区与效应子区之间的不同程度的柔性，并且还提供在两个重链恒定区之间的分子间二硫键键合的位点。如本文中使用的，对于所有IgG同种型而言，铰链始于Glu216且止于Gly237(Roux等人，1998 J Immunol 161:4083)。野生型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4铰链的序列示于表2和表37中。

[0184] 表2.

[0185] 铰链区氨基酸

[0186]

[0187]

Ig类型	C 端 C_H1*(SEQ ID NO)	上铰链(SEQ ID NO)	中部铰链(SEQ ID NO)	下铰链(SEQ ID NO)
IgG1	VDKRV (284)	EPKSCDKTHT (286)	CPPCP (290)	APELLGG (298)
IgG2	VDKTV (285)	ERK	CCVECPPCP (291)	APPVAG (299)
IgG3 (17-15-15-15)	VDKRV (284)	ELKTPLGDTTHT (287)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)$_3$ (292)	APELLGG (298)
IgG3 (17-15-15)	VDKRV (284)	ELKTPLGDTTHT (287)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)$_2$ (293)	APELLGG (298)
IgG3 (17-15)	VDKRV (284)	ELKTPLGDTTHT (287)	CPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)$_1$ (294)	APELLGG (298)
IgG3 (15-15-15)	VDKRV (284)	EPKS (288)	CDTPPPCPRCP (EPKSCDTPPPCPRCP)$_2$ (295)	APELLGG (298)
IgG3 (15)	VDKRV (284)	EPKS (288)	CDTPPPCPRCP (296)	APELLGG (298)
IgG4	VDKRV (284)	ESKYGPP (289)	CPSCP (297)	APEFLGG (298)

[0188] *CH1结构域的C端氨基酸序列。

[0189] 术语“铰链”包括野生型铰链(如在表2和37中列出的那些)以及其变体(例如,非天然存在的铰链或修饰的铰链)。例如,术语“IgG2铰链”包括如表2中所示的野生型IgG2铰链以及具有1、2、3、4、5、1-3、1-5、3-5和/或至多5、4、3、2或1个突变(例如,取代、缺失或添加)的变体。示例性IgG2铰链变体包括其中1、2、3或全部4个半胱氨酸(C219、C220、C226及C229)变为另一个氨基酸的IgG2铰链。在特定实施方案中,IgG2包含C219S取代。IgG2铰链还可以包含在C220处的取代或在C219和C220处的取代。IgG2铰链可以包含取代,所述取代将单独地或与重链或轻链的其他区域中的一个或多个取代一起引起抗体采取形式A或B(参见,例如Allen等人,(2009)Biochemistry 48:3755)。在某些实施方案中,铰链是包含来自至少两个同种型的序列的杂合铰链。例如,铰链可包含来自一个同种型的上部、中间或下铰链,且铰链的其余部分来自一个或多个其他同种型。例如,铰链可以是IgG2/IgG1铰链,且可包含,例如,IgG2的上部和中间铰链以及IgG1的下铰链。铰链可具有效应子功能或丧失效应子功能。例如,野生型IgG1的下铰链提供效应子功能。

[0190] 术语“CH1结构域”是指重链恒定结构域中将可变结构域与铰链连接的重链恒定区。如本文中使用的,CH1结构域始于A118且止于V215。术语“CH1结构域”包括野生型CH1结构域(例如,对于IgG1,具有SEQ ID NO:98;对于IgG2,具有SEQ ID NO:124)以及其变体(例如,非天然存在的CH1结构域或修饰的CH1结构域)。例如,术语“CH1结构域”包括野生型CH1结构域以及其具有1、2、3、4、5、1-3、1-5、3-5个和/或至多5、4、3、2或1个突变(例如,取代、缺失或添加)的变体。示例性CH1结构域包括具有改变抗体的生物活性(比如ADCC、CDC或半衰期)的突变的CH1结构域。本文中提供了影响抗体的生物活性的CH1结构域的修饰。CH1结构域可以包含取代C131S,所述取代可以引起IgG2抗体或包含IgG2抗体的至少一部分(比如铰链和/或铰链和CH1)的抗体采取B形式,其与抗体的A形式相反。

[0191] 术语“CH2结构域”是指重链恒定结构域中将铰链与CH3结构域连接的重链恒定区。如本文中使用的,CH2结构域始于P238且止于K340。术语“CH2结构域”包括野生型CH2结构域(例如,对于IgG1,具有SEQ ID NO:137;表37)以及其变体(例如,非天然存在的CH2结构域或修饰的CH2结构域)。例如,术语“CH2结构域”包括野生型CH2结构域以及其具有1、2、3、4、5、1-3、1-5、3-5个和/或至多5、4、3、2或1个突变(例如,取代、缺失或添加)的变体。示例性CH2结构域包括具有改变抗体的生物活性(比如ADCC、CDC或半衰期)的突变的CH2结构域。在某

些实施方案中，CH2结构域包含降低效应子功能的取代A330S/P331S。本文中提供了影响抗体的生物活性的CH2结构域的其他修饰。

[0192] 术语“CH3结构域”是指重链恒定结构域中位于CH2结构域C端的重链恒定区。如本文中使用的，CH3结构域始于G341且止于K447。术语“CH3结构域”包括野生型CH3结构域(例如，对于IgG1，具有SEQ ID NO:138;表37)以及其变体(例如，非天然存在的CH3结构域或修饰的CH3结构域)。例如，术语“CH3结构域”包括野生型CH3构域以及其具有1、2、3、4、5、1-3、1-5、3-5个和/或至多5、4、3、2或1个突变(例如，取代、缺失或添加)的变体。示例性CH3结构域包括具有改变抗体的生物活性(比如ADCC、CDC或半衰期)的突变的CH3结构域。本文中提供了影响抗体的生物活性的CH3结构域的修饰。

[0193] “CL结构域”是指轻链的恒定结构域。术语“CL结构域”包括野生型CL结构域及其变体，例如包含C214S的变体。

[0194] “天然序列Fc区”或“天然序列Fc”包含与自然界中发现的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人Fc区包括天然序列人IgG1 Fc区;天然序列人IgG2 Fc区;天然序列人IgG3 Fc区;和天然序列人IgG4 Fc区以及其天然存在的变体。天然序列Fc包括Fc的各种同种异型(例如，参见Jefferis等人(2009)mAbs 1:1)。

[0195] 术语“表位”或“抗原决定簇”是指免疫球蛋白或抗体与其特异性地结合的抗原(例如，CD73)上的位点。在蛋白质抗原内的表位可由蛋白质的连续氨基酸形成(通常是线性表位)，或者由通过蛋白质的三级折叠而并置的非连续氨基酸形成(通常是构象表位)。由连续氨基酸形成的表位在暴露于变性溶剂时通常会但不总是保留，而通过三级折叠形成的表位在用变性溶剂处理时通常会丧失。表位一般包括处于独特空间构象的至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸。用于确定什么表位被给定抗体结合的方法(即，表位作图)是本领域熟知的，并且包括，例如，免疫印迹测定法和免疫沉淀测定法，其中测试了重叠或连续肽(例如，来自CD73)与给定抗体(例如，抗CD73抗体)的反应性。确定表位空间构象的方法包括本领域和本文中描述的那些技术，例如，X射线晶体学、2维核磁共振和HDX-MS(参见，例如，Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology，Vol.66，G.E.Morris，Ed.(1996))。

[0196] 术语“表位定位”是指鉴定在涉及抗体-抗原识别的抗原上的分子决定簇的过程。

[0197] 术语“与相同表位结合”指两种或更多种抗体时，意思是通过给定的方法，确定各抗体与相同的氨基酸残基区段结合。确定抗体与本文所述抗体是否结合“CD73上的相同表位”的技术包括，例如，表位定位方法，例如抗原:抗体复合物的晶体的x射线分析，其提供表位的原子解析，以及氢/氘交换质谱(HDX-MS)。其他方法监测抗体与抗原片段(例如蛋白水解片段)或与抗原的突变变异形式的结合，其中由于抗原序列内氨基酸残基的修饰导致的结合丧失经常被认为是表位组分的指示(例如丙氨酸扫描诱变-Cunningham&Wells(1985)Science 244:1081)。另外，还可以使用表位定位的计算组合方法。这些方法依赖于感兴趣的抗体从组合噬菌体展示肽文库中亲和分离特异性短肽的能力。

[0198] “与另一抗体竞争结合靶标”的抗体是指抑制(部分或完全地)另一抗体与靶标结合的抗体。可使用已知的竞争实验(例如像实施例中描述的那些)确定两个抗体是否彼此竞争结合靶标，即，一个抗体是否抑制另一抗体与靶标的结合及其抑制程度。在某些实施方案中，抗体与另一抗体竞争结合靶标且使另一抗体与靶标的结合抑制至少10％、20％、30％、

40％、50％、60％、70％、80％、90％或100％。抑制或竞争的程度可取决于哪个抗体是“阻断抗体”(即,先与靶标一起温育的冷抗体)而不同。竞争测定法可如下所述进行:例如,Harlow和David Lane编辑的Cold Spring Harb Protoc;2006;doi:10.1101/pdb.prot4277或“Using Antibodies”的第11章,Harlow和David Lane编辑,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY,USA 1999。竞争性抗体结合相同的表位、重叠表位或相邻表位(例如,如通过空间位阻所证明)。

[0199] 其他的竞争性结合测定法包括:固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定(参见Stahli等人,Methods in Enzymology 9:242(1983));固相直接生物素-亲和素EIA(参见Kirkland等人,J.Immunol.137:3614(1986));固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定(参见Harlow和Lane,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press(1988));使用I-125标记物的固相直接标记RIA(参见Morel等人,Mol.Immunol.25(1):7(1988));固相直接生物素-亲和素EIA(Cheung等人,Virology 176:546(1990));和直接标记RIA(Moldenhauer等人,Scand.J.Immunol.32:77(1990))。

[0200] 如本文中使用的,术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”、和“特异性地结合”是指抗体与预定抗原而不与其他抗原上的表位结合。一般来说,抗体(i)在通过(例如)在BIACORE®2000表面等离子体共振仪中使用预定抗原(例如,重组人CD73)作为分析物和抗体作为配体的表面等离子体共振(SPR)技术、或抗体与抗原阳性细胞的结合的Scatchard分析进行测定时,以约小于10^{-7}M、比如约小于10^{-8}M、10^{-9}M或10^{-10}M或甚至更小的平衡解离常数(K_D)结合,及(ii)结合预定抗原的亲和力较其与预定抗原或密切相关抗原以外的非特异性抗原(例如,BSA、酪蛋白)的结合亲和力大至少两倍。因此,除非另外指明,“与人CD73特异性地结合”的抗体是指以10^{-7}M或更小,例如约小于10^{-8}M、10^{-9}M或10^{-10}M或甚至更小的K_D与可溶性或细胞结合的人CD73结合的抗体。“与食蟹猴CD73交叉反应”的抗体是指以10^{-7}M或更小,例如小于10^{-8}M、10^{-9}M或10^{-10}M或甚至更小的K_D与食蟹猴CD73的结合的抗体。在某些实施方案中,不与来自非人物种的CD73交叉反应的抗体在标准结合测定中基本上未显示可检测出的针对这些蛋白质的结合。

[0201] 如本文中使用的,术语“kassoc”或“k_a”意指特定的抗体-抗原相互作用的结合速率常数,而如本文中使用的,术语“kdis”或“k_d”意指特定的抗体-抗原相互作用的解离速率常数。如本文中使用的,术语“K_D”是指平衡解离常数,其从k_d与k_a的比值(即,k_d/k_a)获得,并表示为摩尔浓度(M)。可使用本领域确立的方法确定抗体的K_D值。用于确定抗体K_D的优选方法是借助于使用表面等离子体共振,优选地使用诸如Biacore®表面等离子体共振系统的生物传感器系统或流式细胞术和Scatchard分析。

[0202] 在使用抗体或其抗原结合片段的体外或体内测定的背景下,术语“EC50”是指抗体或其抗原结合部分诱导出最大反应的50％(即,最大反应与基线之间的半程)的反应时的浓度。

[0203] 由抗体(例如,抗CD73抗体)介导的抗体或受体(例如CD73)的“内化速率”可以例如表示为内化的$T_{1/2}$,例如,如实施例中所示。通过将抗体的重链恒定区改变为修饰的重链恒定区,例如含有IgG2铰链和IgG2 CH1结构域的重链恒定区,抗CD73抗体的内化速率可以增强或增加至少10％、30％、50％、75％、2倍、3倍、5倍或更多,从而导致$T_{1/2}$降低至少10％、

30％、50％、75％、2倍、3倍、5倍或更多。例如，修饰的重链恒定区不是具有10分钟的$T_{1/2}$，而是可以增加内化速率，由此将$T_{1/2}$降低到5分钟(即，内化速率增加两倍或$T_{1/2}$降低两倍)。“$T_{1/2}$”被定义为实现最大内化的一半的时间，从将抗体添加至细胞使时开始测量。最大内化水平可以是在曲线平台处的内化水平，所述曲线代表针对抗体浓度绘制的内化。修饰的重链恒定区可以使抗体的最大内化水平增加至少10％、30％、50％、75％、2倍、3倍、5倍或更多。另一种比较不同抗体(例如，具有修饰的重链恒定区的抗体和没有修饰的重链恒定区的相同抗体)的内化效能的方法是比较它们在给定抗体浓度(例如，100nM)或在给定时间(例如，2分钟、5分钟、10分钟或30分钟)的内化水平。比较内化水平也可以通过比较内化的EC_{50}水平来完成。一种抗体的内化水平可以相对于给定(参考)抗体(例如，本文所述抗体，例如11F11或CD73.4-IgG2CS-IgG1或CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f)的内化水平来定义，并且，可以表示为用给定(参考)抗体获得的值的百分比。与这些方法中的任何一种相比，内化程度可以增强至少10％、30％、50％、75％、2倍、3倍、5倍或更多。

[0204] 如本文中使用的适用于客体的术语“天然存在”是指这样的事实，即所述客体可以在自然界中找到。例如，可以从自然界的来源分离，但是尚未在实验室中被人有意修饰的、存在于生物(包括病毒)中的多肽或多核苷酸序列是天然存在的。

[0205] “多肽”是指包含至少两个连续连接的氨基酸残基的链，链的长度没有上限。蛋白质中的一个或多个氨基酸残基可含有修饰，例如但不限于，糖基化、磷酸化或二硫键。“蛋白质”可包含一个或多个多肽。

[0206] 如本文中使用的，术语“核酸分子”意图包括DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链或双链的，并且可以是cDNA。在某些实施方案中，DNA分子不包括天然存在的DNA分子。

[0207] 还提供了在本文所述SEQ ID NO中列出的序列的“保守序列修饰”，即，不消除由核苷酸序列编码或含有氨基酸序列的抗体与抗原的结合的核苷酸和氨基酸序列修饰。这样的保守序列修饰包括保守核苷酸和氨基酸取代、以及核苷酸及氨基酸添加和缺失。例如，可通过本领域已知的标准技术(例如定点诱变和PCR介导的诱变)向本文所述SEQ ID NO中引入修饰。保守序列修饰包括保守氨基酸取代，其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基置换。本领域中已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如，赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如，天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(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、色氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(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)、具有β分支侧链的氨基酸(例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)及具有芳香族侧链的氨基酸(例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此，抗CD73抗体中的预测的非必需氨基酸残基优选被来自相同侧链家族的其他氨基酸残基置换。鉴定不消除抗原结合的核苷酸和氨基酸保守取代的方法是本领域熟知的(例如，参见Brummell等人，Biochem.32:1180-1187(1993)；Kobayashi等人，Protein Eng.12(10):879-884(1999)；和Burks等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:412-417(1997))。

[0208] 或者，在另一个实施方案中，可以例如通过饱和诱变沿着抗CD73抗体编码序列的全部或一部分随机引入突变，并且可以筛选所得的修饰的抗CD73抗体的提高的结合活性。

[0209] 对于核酸而言，术语“实质同源性”表明，两个核酸或它们的指定序列在最佳比对和比较时有至少约80％的核苷酸、通常至少约90％至95％且更优选至少约98％至99.5％的

核苷酸相同，其中适当插入或缺失核苷酸。或者，当多个区段在选择性杂交条件下将会与链的互补物杂交时，存在实质同源性。

[0210] 对于多肽而言，术语“实质同源性”表明，两个多肽或它们的指定序列在最佳比对和比较时有至少约80％的氨基酸、通常至少约90％至95％且更优选至少约98％至99.5％的氨基酸相同，其中适当插入或缺失氨基酸。

[0211] 两个序列之间的同一性百分比是在所述序列被最佳比对时所述序列所共有的相同位置的数目的函数(即，同源性％＝相同位置#/总位置#x100)，其中确定的最佳比对考虑到空位的数目和每个空位的长度，这是为了最佳比对这两个序列需要引入的。序列的比较和两个序列之间同一性百分比的确定可以使用数学算法来完成，如下文的非限制性实施例所述。

[0212] 可以使用GCG软件包(可在http://www.gcg.com获得)中的GAP程序，使用NWSgapdna.CMP矩阵，空位权重40、50、60、70、或80，长度权重1、2、3、4、5、或6，确定两个核苷酸序列之间的同一性百分比。也可以使用纳入ALIGN程序(2.0版)中的E.Meyers和W.Miller(CABIOS，4:11-17(1989))的算法，使用PAM120权重残基表、空位长度罚分12、和空位罚分4，确定两个核苷酸或氨基酸序列之间的同一性百分比。另外，可以使用纳入GCG软件包(可在http://www.gcg.com获得)中的GAP程序中的Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol.(48):444-453(1970))算法，使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵，空位权重16、14、12、10、8、6、或4，长度权重1、2、3、4、5、或6，确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比。

[0213] 本文所述核酸和蛋白质序列可以进一步用作“查询序列”针对公共数据库进行搜索，以便例如鉴定相关序列。可以使用Altschul等人，(1990)J.Mol.Biol.215:403-10的NBLAST和XBLAST程序(2.0版)进行这样的搜索。可以用NBLAST程序以得分＝100、字长＝12进行BLAST核苷酸搜索，以获得与本文所述核酸分子同源的核苷酸序列。可以用XBLAST程序以得分＝50、字长＝3进行BLAST蛋白质搜索，以获得与本文所述蛋白质分子同源的氨基酸序列。出于比较的目的，为了获得带空位的比对，可以如Altschul等人，(1997)Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402所述利用带空位的BLAST。当利用BLAST和带空位的BLAST程序时，可以使用对应程序(例如，XBLAST和NBLAST)的默认参数。参见www.ncbi.nlm.nih.gov.

[0214] 核酸可存在于全细胞中，存在于细胞溶解物中，或以部分纯化或基本上纯的形式存在。当通过标准技术将核酸与其他细胞组分或其他污染物(例如其他细胞核酸(例如染色体的其他部分)或蛋白质)纯化分离时，核酸是“分离的”或“使得基本上纯的”，所述标准技术包括碱/SDS处理、CsCl显带法、柱色谱法、琼脂糖凝胶电泳和本领域熟知的其他方法。参见，F.Ausubel等人编辑，Current Protocols in Molecular Biology，Greene Publishing and Wiley Interscience，New York(1987)。

[0215] 可根据标准技术使核酸(例如cDNA)突变以提供基因序列。对于编码序列，这些突变可以根据需要影响氨基酸序列。具体地说，构思了与天然V、D、J、恒定、开关序列、以及本文所述的其他这类序列基本上同源、或衍生自这些序列的DNA序列。

[0216] 如本文中使用的术语“载体”意指能够转运与其连接的另一核酸的核酸分子。一种类型的载体为“质粒”，其指的是另外的DNA区段可连接到其中的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体，其中可以将另外的DNA区段连接到病毒基因组中。某些载体(例如，具

有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)能够在其中引入它们的宿主细胞中自主复制。其他载体(例如,非附加型哺乳动物载体)可以在引入到宿主细胞中之后整合到所述宿主细胞的基因组中,由此与宿主基因组一起复制。而且,某些载体能够指导与其可操作连接的基因的表达。这样的载体在本文中称为“重组表达载体”(或者简单地称为“表达载体”)。一般而言,用于重组DNA技术中的表达载体常常为质粒形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可互换地使用,因为质粒是最常用的载体形式。然而,还包括具有等同功能的其他形式的表达载体,比如病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0217] 如本文中使用的术语“重组宿主细胞”(或简称为“宿主细胞”)意指这样的细胞,所述细胞包含非天然存在于所述细胞中的核酸,并且可以是其中已引入重组表达载体的细胞。应当理解,这样的术语不仅意指特定的受试细胞,还意指此类细胞的后代。由于突变或环境影响而在后续世代中可能发生一些修饰,事实上这样的后代可能与亲本细胞不同,但是仍然包括在本文中使用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0218] 如本文中使用的,术语“抗原”是指任何天然或合成的免疫原性物质,比如蛋白质、肽或半抗原。抗原可以是CD73或其片段。

[0219] “免疫应答”是指脊椎动物内针对外来物质的生物应答,所述应答保护生物抵抗这些物质和由它们引起的疾病。免疫应答由免疫系统的细胞(例如,T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、树突细胞或嗜中性粒细胞)及由这些细胞中的任一者或肝产生的可溶性大分子(包括抗体、细胞因子和补体)的作用介导,其导致侵入病原体的脊椎动物身体、病原体感染的细胞或组织、癌性或其他异常细胞、或在自身免疫或病理性炎症的情况下的正常人细胞或组织的选择性靶向、结合、损伤、破坏和/或消除。免疫应答或反应包括例如T细胞(例如,效应T细胞)或Th细胞(比如CD4+或CD8+ T细胞)的活化或抑制或Treg细胞的抑制。

[0220] “免疫调制剂”或“免疫调节剂”是指可能涉及调制、调节或修饰免疫应答的作用剂,例如信号转导通路的组分。“调制”、“调节”或“修饰”免疫应答指免疫系统的细胞或这些细胞(例如,效应T细胞)的活性的任何改变。这样的调制包括免疫系统的刺激或抑制,其可表现为各种细胞类型的数目的增加或减少、这些细胞的活性的增加或降低、或可在免疫系统内发生的任何其他变化。已经鉴定了抑制性和刺激性免疫调制剂,其中一些在肿瘤微环境中可具有增强的功能。免疫调制剂可以位于T细胞的表面上。“免疫调制性靶标”或“免疫调节性靶标”是被某种物质、作用剂、模块、化合物或分子靶向结合,且其活性通过所述结合而被改变的免疫调制剂。免疫调制性靶标包括例如细胞表面上的受体(“免疫调制性受体”)和受体配体(“免疫调制性配体”)。

[0221] 刺激免疫应答或免疫系统的能力提高可以来自T细胞共刺激受体的激动剂活性增强和/或抑制性受体的拮抗剂活性增强。可以在测量免疫应答的测定法中,例如在测量细胞因子或趋化因子释放、细胞溶解活性(在靶细胞上直接测定或经由检测CD107a或颗粒酶间接测定)以及增殖方面的变化的测定法中,通过EC50或最大活性水平的倍数增加来反映刺激免疫应答或免疫系统的能力提高。刺激免疫应答或免疫系统活性的能力可增强至少10%、30%、50%、75%、2倍、3倍、5倍或更多。

[0222] 术语“免疫疗法”是指通过包括诱导、增强、抑制或以其他方式修饰免疫应答在内的方法治疗罹患疾病或处于患上疾病或遭受疾病复发风险的受试者。

[0223] “免疫刺激疗法”或“免疫刺激性疗法”是指引起受试者中的免疫应答增加(诱导或增强)以便例如治疗癌症的疗法。

[0224] “增强内源性免疫应答”意指增加受试者中现有的免疫应答的有效性或效力。这种有效性和效力的增加可通过例如克服抑制内源性宿主免疫应答的机制或通过刺激增强内源性宿主免疫应答的机制来实现。

[0225] “效应T”(“T_{eff}”)细胞指具有细胞溶解活性的T细胞(例如,CD4+和CD8+ T细胞)以及T辅助(Th)细胞,其分泌细胞因子且激活和指导其他免疫细胞,但不包括调节性T细胞(Treg细胞)。

[0226] 如本文中使用的,术语“连接”是指两个或更多个分子的缔合。连接可以是共价或非共价的。连接也可以是遗传的(即,重组融合)。这样的连接可以使用多种本领域公认的技术来实现,比如化学缀合和重组蛋白生产。

[0227] 如本文中使用的,“给药”或“施用”是指使用本领域技术人员已知的各种方法和递送系统中的任何一种将包含治疗剂的组合物以物理方式引入到受试者中。本文所述抗体的优选给药途径包括静脉内、腹膜内、肌内、皮下、脊柱或其他肠胃外给药途径(例如通过注射或输注)。如本文中使用的短语“肠胃外给药”是指通常通过注射而不是肠内和局部给药的给药方式,包括但不限于静脉内、腹膜内、肌内、动脉内、鞘内、淋巴管内、病灶内、囊内、眶内、心内、皮内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注、以及体内电穿孔。或者,本文所述抗体可经由非肠胃外途径施用,比如局部、表皮或粘膜施用途径,例如鼻内、经口、阴道、直肠、舌下或局部。还可以例如一次、多次、和/或经一个或多个延长的时期进行给药。

[0228] 如本文中使用的术语“T细胞介导的应答”是指由T细胞(包括效应T细胞(例如,CD8+细胞)和辅助T细胞(例如,CD4+细胞))介导的应答。T细胞介导的应答包括例如T细胞细胞毒性和增殖。

[0229] 如本文中使用的术语“细胞毒性T淋巴细胞(CTL)应答”指由细胞毒性T细胞诱导的免疫应答。CTL应答主要由CD8+ T细胞介导。

[0230] 如本文中使用的,术语“抑制”或“阻断”(例如,提及抑制/阻断CD73结合或活性)可互换使用,并且涵盖部分和完全抑制/阻断。

[0231] 如本文中使用的,“癌症”是指以体内异常细胞的不受控制的生长为特征的广泛的疾病。不受调节的细胞分裂可以导致恶性肿瘤或细胞的形成,所述恶性肿瘤或细胞侵袭邻近组织并且可能通过淋巴系统或血流转移到身体的远处部位。

[0232] 如本文中使用的术语“治疗”是指为了逆转、减轻、改善、抑制、或减缓或预防与疾病相关的症状进展、发展、严重性或复发、并发症、病症或生化标记而对受试者进行的或施用活性剂的任何类型的干预或过程。预防是指向没有患病的受试者给药,以防止疾病发生或如果疾病发生则将其影响降低至最低限度。

[0233] “血液恶性肿瘤”包括淋巴瘤、白血病、骨髓瘤或淋巴恶性肿瘤以及脾和淋巴结的癌症。示例性淋巴瘤包括B细胞淋巴瘤和T细胞淋巴瘤。B细胞淋巴瘤包括霍奇金淋巴瘤和大部分非霍奇金淋巴瘤。B细胞淋巴瘤的非限制性实例包括弥漫性大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织淋巴瘤、小细胞淋巴细胞性淋巴瘤(与慢性淋巴细胞白血病重叠)、套细胞淋巴瘤(MCL)、伯基特淋巴瘤(Burkitt′s lymphoma)、纵膈大B细胞淋巴瘤、瓦尔登斯

特伦巨球蛋白血症、结内边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区淋巴瘤、血管内大B细胞淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿病。T细胞淋巴瘤的非限制性实例包括结外T细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤和血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤。血液恶性肿瘤还包括白血病，例如但不限于继发性白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病和急性淋巴母细胞白血病。血液恶性肿瘤进一步包括骨髓瘤，例如但不限于多发性骨髓瘤和冒烟型多发性骨髓瘤。术语“血液恶性肿瘤”涵盖其他血液和/或B细胞-或T细胞-相关的癌症。

[0234] 术语“有效剂量”或“有效药量”被定义为足以实现或者至少部分实现期望效果的量。药物或治疗剂的“治疗有效量”或“治疗有效剂量”是药物的在单独或与其他治疗剂联合使用时能够促进疾病消退的任何量，其中疾病消退的证据是疾病症状的严重程度降低、疾病无症状期的频率或持续时间增加、或防止由于疾病痛苦导致的损害或失能。关于实体瘤，有效量包括足以引起肿瘤缩小和/或降低肿瘤的生长速率(比如抑制肿瘤生长)或防止或延缓其他不需要的细胞增殖的量。在某些实施方案中，有效量为足以延缓肿瘤发展的量。在某些实施方案中，有效量为足以防止或延缓肿瘤复发的量。可按一次或多次给药的形式给予有效量。有效量的药物或组合物可以：(i)减少癌细胞的数目；(ii)减小肿瘤大小；(iii)在一定程度上抑制、延缓、减慢并可阻止癌细胞浸润到外周器官中；(iv)抑制，即，在一定程度上减慢并可阻止肿瘤转移；(v)抑制肿瘤生长；(vi)防止或延缓肿瘤的出现和/或复发；和/或(vii)在一定程度上减轻与癌症相关的一种或多种症状。在一个例子中，“有效量”为在临床上证明影响癌的显著减小或癌(如，晚期实体瘤)的进展减慢的联合的抗CD73抗体的量和免疫肿瘤学作用剂(例如抗PD-1抗体)的量。

[0235] 如本文中使用的术语“固定剂量”、“单一剂量”和“单一固定的剂量”可互换使用，并指的是不考虑患者的重量和体表面积(BSA)而向患者给予的剂量。因此，固定剂量或单一剂量并非提供为mg/kg剂量，而是药剂(例如，抗CD73抗体和/或免疫肿瘤学作用剂)的绝对量。

[0236] 如本文中使用的，“基于体表面积(BSA)的剂量”是指针对个体患者的体表面积(BSA)调整过的剂量(例如，抗CD73抗体和/或抗PD-1抗体的剂量)。基于BSA的剂量可被提供为mg/kg体重。已经公开了得出BSA而无需直接测量的各种计算法，最为广泛使用的是Du Bois公式(参见Du Bois D,Du Bois EF(Jun 1916)Archives of Internal Medicine 17(6):863-71;和Verbraecken,J.等人,(Apr 2006).Metabolism-Clinical and Experimental 55(4):515-24)。其他的示例性BSA公式包括Mosteller公式(Mosteller RD.N Engl J Med.,1987;317:1098)、Haycock公式(Haycock GB等人,J Pediatr 1978,93:62-66)、Gehan和George公式(Gehan EA,George SL,Cancer Chemother Rep 1970,54:225-235)、Boyd公式(Current,JD(1998),The Internet Journal of Anesthesiology 2(2);和Boyd,Edith(1935),University of Minnesota.The Institute of Child Welfare,Monograph Series,No.x.London:Oxford University Press)、Fujimoto公式(Fujimoto S等人,Nippon Eiseigaku Zasshi 1968;5:443-50)、Takahira公式(Fujimoto S等人,Nippon Eiseigaku Zasshi 1968;5:443-50)、以及Schlich公式(Schlich E等人,ErnährungsUmschau 2010;57:178-183)。

[0237] 如本文中使用的，“免疫肿瘤学作用剂”是指刺激或增强或上调人受试者中的免疫

应答的作用剂，并且包括例如免疫细胞例如T细胞上的抑制性受体的拮抗剂，以及免疫细胞例如T细胞上的刺激性受体的激动剂。本文中例如在标题为“联合治疗”的部分进一步描述了示例性免疫肿瘤学作用剂。

[0238] 药物的“预防有效量”或“预防有效剂量”是在向具有疾病发生风险或正在遭受疾病复发的受试者单独给药或与其他治疗剂联合给药时抑制疾病发生或复发的药物的量。治疗剂或预防剂促进疾病消退或抑制疾病发生或复发的能力可以使用多种技术人员已知的方法进行评估，例如在临床试验期间的人类受试者中，在预测在人体内效力的动物模型系统中，或者通过在体外测定法中测定药剂的活性。

[0239] 作为举例，抗癌剂是在受试者体内减慢癌症进展或促进癌症消退的药物。在优选的实施方案中，药物的治疗有效量促进癌症消退直至癌症消除。“促进癌症消退”是指有效量的药物单独给药或与抗肿瘤剂联合给药导致肿瘤生长降低或大小变小、肿瘤坏死、至少一种疾病症状的严重程度降低、疾病无症状期的频率和持续时间增加、防止由于疾病痛苦导致的损害或失能、或者以其他方式缓解患者的疾病症状。药理有效性是指药物促进患者体内癌症消退的能力。生理安全性是指由于药物施用导致的毒性或其他的细胞、器官和/或生物体水平上的不良生理效应(不良作用)的可接受低水平。

[0240] 作为肿瘤治疗的实例，相对于未治疗的受试者，治疗有效量或治疗有效剂量的药物优选抑制细胞生长或肿瘤生长的至少约20％，更优选地至少约40％，甚至更优选地至少约60％，并且还更优选地至少约80％。在最优选的实施方案中，治疗有效量或剂量的药物完全抑制细胞生长或肿瘤生长，即，优选地抑制细胞生长或肿瘤生长的100％。化合物抑制肿瘤生长的能力可以使用下文描述的测定法进行评价。或者，组合物的这种特性可以通过检验所述化合物抑制细胞生长的能力加以评价，这种抑制可以通过本领域技术人员已知的测定法进行体外测量。在本文所述的其他优选的实施方案中，肿瘤消退可以观察到，并且可能持续的时期为至少约20天，更优选地至少约40天，或甚至更优选地至少约60天。

[0241] 术语“患者”和“受试者”是指接受预防性或治疗性治疗的任何人或非人动物。例如，本文所述方法和组合物可用于治疗患有癌症(比如晚期实体瘤)的受试者或患者。术语“非人动物”包括所有脊椎动物，例如哺乳动物和非哺乳动物，如非人灵长类动物、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

[0242] 在以下小节中进一步详细描述本文所述的各个方面。

[0243] I.抗CD73抗体

[0244] 本文中描述了抗体，例如全人抗体，其以特定的功能特征或性质为特征，并且例如当所述抗体与免疫肿瘤学作用剂联合使用时用于治疗癌症。例如，所述抗体特异性地结合人CD73。另外，抗体可与来自一种或多种非人灵长类动物的CD73(如食蟹猴CD73)交叉反应。

[0245] 除了与可溶性和/或膜结合的人CD73特异性地结合以外，本文所述抗体展现以下功能性质中的一者或多者：

[0246] (a)抑制CD73酶活性(可溶性或膜结合)，导致腺苷产生减少；

[0247] (b)与食蟹猴CD73结合；

[0248] (c)到细胞例如肿瘤细胞中的抗体介导的CD73内化；和

[0249] (d)与包含人CD73的氨基酸65-83和157-172的构象表位结合。

[0250] 优选地，抗CD73抗体以高亲和力，例如以10^{-7}M或更小、10^{-8}M或更小、10^{-9}M或更小、

10^{-10}M或更小、10^{-11}M或更小、10^{-12}M或更小、10^{-12}M至10^{-7}M、10^{-11}M至10^{-7}M、10^{-10}M至10^{-7}M、10^{-9}M至10^{-7}M或10^{-10}M至10^{-8}M的K_D与人CD73(二聚体,在一些实施方案中是单体的;同种型1或2)结合。在某些实施方案中,如通过BIACORE®SPR分析所测定,抗CD73抗体例如以10^{-7}M或更小、10^{-8}M或更小、10^{-9}M(1nM)或更小、10^{-10}M或更小、10^{-12}M至10^{-7}M、10^{-11}M至10^{-7}M、10^{-10}M至10^{-7}M、10^{-9}M至10^{-7}M、10^{-8}M至10^{-7}M或10^{-10}M至10^{-8}M的K_D与可溶性人CD73结合。在某些实施方案中,例如,正如本文中进一步描述所测定,抗CD73抗体以小于1nM的EC50与结合的(例如,细胞膜结合的,例如Calu6细胞)人CD73结合。在某些实施方案中,例如,正如通过流式细胞术和Scatchard图所测定,抗CD73抗体例如以10^{-7}M或更小、10^{-8}M或更小、10^{-9}M(1nM)或更小、10^{-10}M或更小、10^{-12}M至10^{-7}M、10^{-11}M至10^{-8}M、10^{-10}M至10^{-8}M、10^{-9}M至10^{-8}M、10^{-11}M至10^{-9}M、10^{-10}M至10^{-8}M或10^{-10}M至10^{-9}M的K_D与结合的人CD73(例如,细胞膜结合的人CD73)结合。在某些实施方案中,抗CD73抗体以10^{-7}M或更小、10^{-8}M或更小、10^{-9}M(1nM)或更小、10^{-10}M或更小、10^{-12}M至10^{-7}M、10^{-11}M至10^{-7}M、10^{-10}M至10^{-7}M、10^{-10}M至10^{-8}M或10^{-8}M至10^{-7}M的K_D与可溶性人CD73结合,并且例如以10^{-7}M或更小、10^{-8}M或更小、10^{-9}M(1nM)或更小、10^{-10}M或更小、10^{-12}M至10^{-7}M、10^{-11}M至10^{-8}M、10^{-10}M至10^{-8}M、10^{-9}M至10^{-8}M、10^{-11}M至10^{-9}M或10^{-10}M至10^{-9}M的K_D或EC_{50}与结合的人CD73(例如,细胞膜结合的人CD73)结合。

[0251] 抗CD73 Ab,比如本文所述的Ab,正如通过Scatchard所测定的,可以0.1nM或更小的K_D与人B细胞结合,以1nM或更小的K_D与人Calu-6细胞结合,和/或以1nM或更小的K_D与食蟹猴CD73-CHO细胞结合。

[0252] 在某些实施方案中,例如,正如本文中进一步描述所测定的,抗CD73抗体以高亲和力与食蟹猴CD73结合,例如,以0.1nM至10nM的EC50比如小于1nM的EC50与表达食蟹猴CD73的CHO细胞结合。

[0253] 在某些实施方案中,正如例如在实施例中测量的,本文所述抗CD73抗体还与食蟹猴CD73结合,例如,与膜结合的食蟹猴CD73结合,例如以100nM或更小、10nM或更小、1nM或更小、100nM至0.01nM、100nM至0.1nM、100nM至1nM、或10nM至0.1nM的EC_{50}与表达食蟹猴CD73的CHO细胞结合。

[0254] 在某些实施方案中,例如正如通过SEC测定的,抗CD73抗体的至少90%、95%、98%或99%是单体的。抗CD73抗体还可具有与本文所述抗体的生物物理特性相似或在其范围内的生物物理特性。

[0255] 在某些实施方案中,抗CD73抗体抑制人和/或食蟹猴CD73的酶活性,例如,正如在CD73珠结合测定中测定的,或正如在细胞例如Calu6、SKMEL24或H292细胞中测定的,或正如在体内测定例如异种移植肿瘤模型中测定的,例如正如在实施例中进一步描述。抗CD73抗体可具有至少与本文所述抗体的抑制活性相似或在其范围内的抑制活性。例如,抗CD73抗体可以小于10nM或小于5nM或在1nM至10nM或5nM至10nM范围内的EC_{50}抑制人CD73(例如,与固体结合的CD73)酶活性(腺苷产生)。抗CD73抗体可以小于10nM或小于1nM或在0.1nM至10nM、0.1nM至1nM或0.1nM至0.5nM的范围内的EC_{50}抑制人CD73在细胞(例如Calu6细胞)上的活性。

[0256] 在某些实施方案中,正如例如在高含量内化测定中或通过FACS或流式细胞术所测定的,抗CD73抗体通过与其结合的细胞而被内化(并介导CD73内化),如进一步在实施例中描述。抗CD73抗体可具有至少与实施例中描述的抗体的内化特征相似或在其范围内的内化

特征(EC50、$T_{1/2}$和Ymax)及到达平台时间(time to plateau)。在某些实施方案中,抗CD73抗体在一个或多个细胞系(例如在实施例中列出的那些)中具有小于1小时,比如小于30分钟、小于15分钟、小于12分钟、小于10分钟、小于7分钟或甚至小于5分钟的内化$T_{1/2}$,正如例如在高含量内化测定(描述于实施例6A中)中所测定的。在某些实施方案中,抗CD73抗体在10小时或更短、6小时或更短、5小时或更短、4小时或更短、3小时或更短、2小时或更短、1小时或更短之内,例如在10分钟至10小时、10分钟至6小时、1小时至10小时或1小时至6小时的范围内达到最大的抗CD73抗体介导的内化,正如例如使用高含量内化测定(例如描述于实施例6A中)、或使用流式细胞术(例如描述于实施例6B中)所测定的。抗CD73抗体介导的CD73最大内化水平可为至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更高,其取决于细胞类型。例如,正如在实施例中所述的高含量内化测定中所测量的,在Calu6细胞中抗CD73抗体介导的CD73内化的EC_{50}可小于10nM,例如为0.1nM至10nM或1nM至10nM或1nM至5nM,且Ymax为至少90%或至少95%。

[0257] 在某些实施方案中,抗CD73抗体在内化到细胞中之后与内体标志物共定位。例如,抗CD73抗体,例如11F11,在Calu-6细胞与抗CD73抗体接触的15分钟、30分钟、60分钟和/或120分钟之内与所述细胞中的内体标志物EEA1、Rab7和/或Lamp-1共定位。

[0258] 抗CD73抗体,例如具有IgG2铰链、IgG2 CH1结构域或IgG2铰链和IgG2 CH1结构域的抗体,可以介导如在高含量内化测定中测量的下列CD73内化特征,例如正如实施例6A中所述:

[0259] -EC_{50}为10nM或更小、5nM或更小、1nM或更小、或0.1nM至10nM或0.1nM至1nM;在Calu6细胞中的Ymax(最大内化百分比)至少为90%、95%或98%,且在Calu6细胞中的$T_{1/2}$小于30分钟或小于10分钟;

[0260] -在人细胞(例如,Calu6细胞、HCC44细胞、H2030细胞、H2228细胞、HCC15细胞、SKLU1细胞、SKMES1细胞或SW900细胞)中的$T_{1/2}$小于30分钟或小于10分钟。

[0261] 抗CD73抗体,例如具有IgG2铰链、IgG2 CH1结构域或IgG2铰链和IgG2 CH1结构域的抗体,可以介导如通过流式细胞术测量的下列CD73内化特征,例如正如实施例6B中所述:

[0262] -在Calu6细胞中1小时或更短的$T_{1/2}$和至少70%的Ymax;

[0263] -在NCI-H292细胞中30分钟或更短的$T_{1/2}$和至少70%的Ymax;

[0264] -在SNUC1细胞中2小时或更短的$T_{1/2}$和至少30%的Ymax;和/或

[0265] -在NCI-H1437细胞中30分钟或更短的$T_{1/2}$和至少60%的Ymax。

[0266] 在某些实施方案中,抗CD73抗体为bin1抗体,即其与11F11、而不与4C3竞争结合人CD73。

[0267] 在某些实施方案中,抗CD73抗体与表位例如人CD73的N端部分中的构象表位,例如位于人CD73的氨基酸65-83(SEQ ID NO:96)内的表位结合,例如通过正如实施例中进一步描述的HDX-MS所测定。在某些实施方案中,抗CD73抗体与人CD73的氨基酸157-172(SEQ ID NO:97)或位于人CD73的氨基酸157-172(SEQ ID NO:97)内的表位结合,正如通过例如HDX-MS所测定。或者,抗CD73抗体与表位例如人CD73的N端部分中的不连续表位结合,正如通过例如HDX-MS所测定。

[0268] 在某些实施方案中,抗CD73抗体与人CD73的氨基酸65-83和氨基酸157-172,或与人CD73同种型1或2的氨基酸65-83和氨基酸157-172(即氨基酸序列FTKVQQIRRAEPNVLLLDA

(SEQ ID NO:96)和LYLPYKVLPVGDEVVG(SEQ ID NO:97))内的表位结合,正如通过例如HDX-MS所测定。在某些实施方案中,抗CD73抗体与人CD73的氨基酸65-83和氨基酸157-172的全部或一部分结合,正如通过例如HDX-MS所测定。在某些实施方案中,抗CD73抗体与糖基化和非糖基化人CD73两者结合。在某些实施方案中,抗CD73抗体仅与糖基化CD73而不与非糖基化CD73结合。

[0269] 抗CD73抗体可与包含本文所述的CDR或可变区(例如,CD73.4-1、CD73.4-2、CD73.3、11F11-1、11F11-2、4C3-1、4C3-2、4C3-3、4D4、10D2-1、10D2-2、11A6、24H2、5F8-1、5F8-2、6E11和/或7A11的那些)的抗CD73抗体竞争结合CD73(或抑制其结合)。在某些实施方案中,抗CD73抗体将CD73.4-1、CD73.4-2、CD73.3、11F11、4C3、4D4、10D2、11A6、24H2、5F8、6E11和/或7A11与人CD73的结合抑制至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在某些实施方案中,CD73.4-1、CD73.4-2、CD73.3、11F11-1、11F11-2、4C3-1、4C3-2、4C3-3、4D4、10D2-1、10D2-2、11A6、24H2、5F8-1、5F8-2、6E11和/或7A11将抗CD73抗体与人CD73的结合抑制至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在某些实施方案中,抗CD73抗体将CD73.4-1、CD73.4-2、CD73.3、11F11-1、11F11-2、4C3-1、4C3-2、4C3-3、4D4、10D2-1、10D2-2、11A6、24H2、5F8-1、5F8-2、6E11和/或7A11与人CD73的结合抑制至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%,并且CD73.4-1、CD73.4-2、CD73.3、11F11-1、11F11-2、4C3-1、4C3-2、4C3-3、4D4、10D2-1、10D2-2、11A6、24H2、5F8-1、5F8-2、6E11和/或7A11将抗CD73抗体与人CD73的结合抑制至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%(例如,在两个方向上竞争)。可如例如本文中(例如实施例中)进一步描述来进行竞争实验。

[0270] 在某些实施方案中,抗CD73抗体抑制CD73酶活性和/或在细胞中内化而无需多价交联,正如例如通过无需FcR结合所确定。

[0271] 在某些实施方案中,抗CD73抗体具有表3中列出的1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或11个特征。

[0272] 表3:抗CD73抗体的潜在特征

[0273] (1)与人CD73(例如珠子结合的人二聚体人CD73同种型1和2)结合,例如以10nM或更小(例如,0.01nM至10nM)的K_D,例如正如通过BIACORE®SPR分析所测量;

[0274] (2)与膜结合的人CD73结合,例如以1nM或更小(例如,0.01nM至1nM)的EC_{50};

[0275] (3)与食蟹猴CD73结合,例如与膜结合的食蟹猴CD73结合,例如以10nM或更小(例如,0.01nM至10nM)的EC_{50};

[0276] (4)抑制人CD73酶活性,例如以10nM或更小的EC50;

[0277] (5)抑制食蟹猴CD73酶活性,例如以10nM或更小的EC50;

[0278] (6)以10nM或更小的EC50抑制Calu6细胞中的内源(细胞)人CD73酶活性;

[0279] (7)体内抑制人CD73酶活性;

[0280] (8)内化到细胞中,例如抗体介导的(或依赖性)CD73内化,例如以小于1小时、30分钟或10分钟的$T_{1/2}$和/或至少70%、80%或90%的Ymax;

[0281] (9)与人CD73上的构象表位,例如氨基酸序列(SEQ ID NO:1)内包括氨基酸残基FTKVQQIRRAEPNVLLLDA(SEQ ID NO:96)和/或LYLPYKVLPVGDEVVG(SEQ ID NO:97)的全部或一部分的不连续表位结合;

[0282] (10)在任一方向或两个方向上与CD73.4-1、CD73.4-2、CD73.3、11F11-1、11F11-2、4C3-1、4C3-2、4C3-3、4D4、10D2-1、10D2-2、11A6、24H2、5F8-1、5F8-2、6E11和/或7A11竞争结合人CD73;和

[0283] (11)以与CD73.4相似的模式与人CD73相互作用,如通过X射线晶体学所确定。

[0284] 在某些实施方案中,抗CD73抗体与可溶性CD73,例如可溶性人CD73(例如,可溶性血清CD73)结合。在某些实施方案中,抗CD73抗体抑制可溶性人CD73的酶活性。在某些实施方案中,抗CD73抗体与膜结合的和可溶性的CD73蛋白结合,并且任选地抑制膜结合的和可溶性的CD73蛋白的酶活性。与可溶性人CD73的结合和与膜结合的CD73的结合可以处于相同的KD范围,例如如本文中进一步描述的那样。可溶性人CD73的酶活性抑制和与膜结合的CD73的酶活性抑制可以处于相同的活性范围,例如如本文中进一步描述的那样。

[0285] 应理解,如根据本领域已知和本文所述的方法确定的,展现这些功能性质中的一者或多者(例如,生物化学、免疫化学、细胞、生理学或其他生物活性等)的抗体活性,是指特定活性相对于在抗体不存在时(例如,或在具有不相关特异性的对照抗体存在时)观察到的活性具有统计学显著性的差异。在某些实施方案中,本文中公开的抗CD73抗体使所测量的参数(例如,肿瘤体积、肿瘤转移、腺苷水平、cAMP水平)减小所测量的参数的至少10%,更优选减小至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%,并且在某些优选实施方案中减小92%、94%、95%、97%、98%或99%以上。相反,本文中公开的抗CD73抗体使所测量参数增加至少10%,比如至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%(即2倍)、3倍、5倍或10倍。

[0286] 评价抗体对不同物种的CD73的结合能力的标准测定法是本领域已知的,包括例如ELISA、Western印迹和RIA。适合的测定法详细描述于实施例中。还可以通过本领域已知的标准测定法(比如通过BIACORE®SPR分析)评估抗体的结合动力学(例如,结合亲和力)。评价抗体对CD73的功能性质(例如,腺苷产生、肿瘤生长和转移、T细胞抑制)的影响的测定法进一步详细描述于下文和实施例中。

[0287] 在某些实施方案中,抗CD73抗体不是天然抗体或是非天然存在的抗体。例如,抗CD73抗体具有不同于天然存在的抗体的翻译后修饰,例如具有更多、更少或不同类型的翻译后修饰。

[0288] 在某些实施方案中,抗CD73抗体刺激Teff(效应T细胞)功能和/或降低Treg功能,例如通过从T细胞表面去除CD73和/或通过抑制其酶活性来刺激Teff(效应T细胞)功能和/或降低Treg功能。

[0289] 在某些实施方案中,抗CD73抗体至少包含IgG2铰链,并且任选地还包含IgG2 CH1结构域或铰链和/或CH1结构域的片段或衍生物,并且抗体已采取同种型A(例如,参见Allen等人(2009)Biochemistry 48:3755)。在某些实施方案中,抗CD73抗体至少包含IgG2铰链,并且任选地还包含IgG2 CH1结构域或铰链和/或CH1结构域的片段或衍生物,并且抗体已采取同种型B(例如,参见Allen等人(2009)Biochemistry 48:3755)。在某些实施方案中,组合物包含具有同种型A的抗CD73抗体和具有同种型B的抗CD73抗体的混合物。

[0290] 本文中提供这样的抗人CD73抗体,其(i)包含与人CD73上类似于11F11所结合区域的区域结合、但不与类似于4C3所结合区域结合的区域的可变区(即为bin1抗体);(ii)以10nM或更小的Kd与二聚体人CD73(例如,可溶性CD73)结合;(iii)以小于10nM的EC_{50}抑制人

CD73[例如细胞(例如Calu6细胞)上的人CD73]的酶活性(将AMP转化为腺苷);和(iv)介导细胞中的抗体依赖性CD73内化,例如在人细胞(例如,Calu6细胞、H2228细胞、HCC15细胞、H2030细胞、SNUC1细胞)中,T1/2为1小时或更短(或30分钟或更短,或10分钟或更短),Ymax为50%或更大(或60%或更大、70%或更大、80%或更大或90%或更大)。在某些实施方案中,抗体包含IgG2铰链或IgG2铰链及IgG2 CH1结构域。本文中提供的抗人CD73抗体(i)包含与人CD73上类似于11F11所结合区域的区域结合、但不与类似于4C3所结合区域结合的区域的可变区(即为bin1抗体);(ii)以10nM或更小的Kd与二聚体人CD73(例如,可溶性CD73)结合,正如通过SPR(Biacore)测定的;(iii)以小于10nM的EC_{50}抑制人CD73[例如细胞(例如Calu6细胞)上的人CD73]的酶活性(将AMP转化为腺苷);和(iv)介导细胞中的抗体依赖性CD73内化,例如在人Calu6、H2228、HCC15或H2030细胞中,T1/2为30分钟或更短,Ymax为80%或更大,正如使用描述于实施例6A中的高含量内化测定确定的。

[0291] 在优选的实施方案中,本文所述的抗CD73抗体无显著毒性。例如,抗CD73抗体对人的器官(例如肝、肾、脑、肺和心脏中的一者或多者)无显著毒性,正如例如在临床试验中确定的。在某些实施方案中,抗CD73抗体并不显著触发不期望的免疫应答,例如自身免疫或炎症。

[0292] II.示例性抗CD73抗体

[0293] 抗CD73抗体的可变区

[0294] 本文所述的具体抗体是具有抗体11F11-1、11F11-2、4C3-1、4C3-2、4C3-3、4D4、10D2-1、10D2-2、11A6、24H2、5F8-1、5F8-2、6E11、7A11、CD73.3-1、CD73.3-2或CD73.3-3、CD73.4-1和CD73.4-1-2、CD73.4-2、CD73.5-1和CD73.5-2、CD73.6-1和CD73.6-2、CD73.7-1和CD73.7-2、CD73.8-1和CD73.8-2、CD73.9-1和CD73.9-2、CD73.10-1和CD73.10-2以及CD73.11的CDR和/或可变区序列的抗体(例如单克隆抗体),以及与其可变区或CDR序列具有至少80%同一性(例如,至少85%、至少90%、至少95%或至少99%同一性)的抗体。表4列出了每一抗体的VH和VL区CDR的SEQ ID NO以及VH和VL区的SEQ ID NO。如实施例中进一步描述,对于某些重链可存在一条以上的轻链,替代的轻链的SEQ ID NO也提供于下表中。

[0295] 表4:

[0296]

	VH				VL			
	CDR1	CDR2	CDR3	VH	CDR1	CDR2	CDR3	VL
11F11-1	5	6	7	4	9	10	11	8
11F11-2	5	6	7	4	13	14	15	12
4C3-1	17	18	19	16	21	22	23	20
4C3-2	17	18	19	16	25	26	27	24
4C3-3	17	18	19	16	29	30	31	28
4D4-1	33	34	35	32	37	38	39	36
10D2-1	41	42	43	40	45	46	47	44
10D2-2	41	42	43	40	49	50	51	48
11A6-1	53	54	55	52	57	58	59	56
24H2-1	61	62	63	60	65	66	67	64
5F8-1	69	70	71	68	73	74	75	72
5F8-2	69	70	71	68	77	78	79	76
5F8-3	69	70	71	68	239	240	241	238
6E11-1	81	82	83	80	85	86	87	84
7A11-1	89	90	91	88	93	94	95	92
73.3	17	18	19	170	21	22	23	20
73.4-1	5	6	7	135	9	10	11	8
73.4-2	5	6	7	135	13	14	15	12
73.5-1	5	6	7	171	9	10	11	8
73.5-2	5	6	7	171	13	14	15	12
73.6-1	5	6	7	172	9	10	11	8
73.6-2	5	6	7	172	13	14	15	12
73.7-1	5	6	7	173	9	10	11	8
73.7-2	5	6	7	173	13	14	15	12
73.8-1	5	6	7	174	9	10	11	8
73.8-2	5	6	7	174	13	14	15	12
73.9-1	5	6	7	175	9	10	11	8
73.9-2	5	6	7	175	13	14	15	12
73.10-1	5	6	7	176	9	10	11	8
73.10-2	5	6	7	176	13	14	15	12
73.11	33	34	35	177	37	38	39	36

[0297] 本文中提供了包含重链和轻链可变区的分离的抗体或其抗原结合部分，其中重链可变区包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO：4、16、32、40、52、60、68、80、88、135和170-177。

[0298] 还提供了包含重链和轻链可变区的分离的抗体或其抗原结合部分，其中轻链可变区包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO：8、12、20、24、28、36、44、48、56、64、72、76、84、92和238。

[0299] 本文中提供了分离的抗体或其抗原结合部分，其包含：

[0300] (a)分别包含SEQ ID NO：135和8的重链和轻链可变区序列；

[0301] (b)分别包含SEQ ID NO:135和12的重链和轻链可变区序列;

[0302] (c)分别包含SEQ ID NO:4和8的重链和轻链可变区序列;

[0303] (d)分别包含SEQ ID NO:4和12的重链和轻链可变区序列;

[0304] (e)分别包含SEQ ID NO:16和20的重链和轻链可变区序列;

[0305] (f)分别包含SEQ ID NO:16和24的重链和轻链可变区序列;

[0306] (g)分别包含SEQ ID NO:16和28的重链和轻链可变区序列;

[0307] (h)分别包含SEQ ID NO:32和36的重链和轻链可变区序列;

[0308] (i)分别包含SEQ ID NO:40和44的重链和轻链可变区序列;

[0309] (j)分别包含SEQ ID NO:40和48的重链和轻链可变区序列;

[0310] (k)分别包含SEQ ID NO:52和56的重链和轻链可变区序列;

[0311] (l)分别包含SEQ ID NO:60和64的重链和轻链可变区序列;

[0312] (m)分别包含SEQ ID NO:68和72的重链和轻链可变区序列;

[0313] (n)分别包含SEQ ID NO:68和76的重链和轻链可变区序列;

[0314] (o)分别包含SEQ ID NO:68和238的重链和轻链可变区序列;

[0315] (p)分别包含SEQ ID NO:80和84的重链和轻链可变区序列;

[0316] (q)分别包含SEQ ID NO:88和92的重链和轻链可变区序列;

[0317] (r)分别包含SEQ ID NO:170和20的重链和轻链可变区序列;

[0318] (s)分别包含SEQ ID NO:170和24的重链和轻链可变区序列;

[0319] (t)分别包含SEQ ID NO:170和28的重链和轻链可变区序列;

[0320] (u)分别包含SEQ ID NO:171和8的重链和轻链可变区序列;

[0321] (v)分别包含SEQ ID NO:171和12的重链和轻链可变区序列;

[0322] (w)分别包含SEQ ID NO:172和8的重链和轻链可变区序列;

[0323] (x)分别包含SEQ ID NO:172和12的重链和轻链可变区序列;

[0324] (y)分别包含SEQ ID NO:173和8的重链和轻链可变区序列;

[0325] (z)分别包含SEQ ID NO:173和12的重链和轻链可变区序列;

[0326] (a2)分别包含SEQ ID NO:174和8的重链和轻链可变区序列;

[0327] (b2)分别包含SEQ ID NO:174和12的重链和轻链可变区序列;

[0328] (c2)分别包含SEQ ID NO:175和8的重链和轻链可变区序列;

[0329] (d2)分别包含SEQ ID NO:175和12的重链和轻链可变区序列;

[0330] (e2)分别包含SEQ ID NO:176和8的重链和轻链可变区序列;

[0331] (f2)分别包含SEQ ID NO:176和12的重链和轻链可变区序列;或

[0332] (g2)分别包含SEQ ID NO:177和36的重链和轻链可变区序列。

[0333] 抗CD73抗体可包含本文所述的抗CD73抗体(例如,CD73.4-1、CD73.4-2、CD73.3、11F11-1、11F11-2、11F11、4C3-1、4C3-2、4C3-3、4D4、10D2-1、10D2-2、11A6、24H2、5F8-1、5F8-2、5F8-3、6E11和7A11或其组合)的重链和轻链CDR1、CDR2和CDR3。

[0334] 鉴于这些抗体中的每一者都与CD73结合,并且抗原结合特异性主要是由CDR1、2和3区提供的,可以将V_H CDR1、2和3序列与V_L CDR1、2和3序列"混合匹配"(即,可以混合匹配来自不同抗体的CDR,不过每一抗体必须含有V_H CDR1、2和3以及V_L CDR1、2和3),从而产生本文所述的其他抗CD73结合分子。可使用上文和实施例中描述的结合测定法(例如,ELISA)来测

试这些“混合匹配”的抗体的CD73结合。优选地，当混合匹配V_H CDR序列时，来自特定V_H序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列被置换为结构相似的CDR序列。同样，当混合匹配V_L CDR序列时，来自特定V_L序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列优选地被置换为结构相似的CDR序列。对普通技术人员显而易见的是，通过将一个或多个V_H和/或V_L CDR区序列取代为结构相似的序列，可以产生新的V_H和V_L序列，所述结构相似的序列来自本文中公开的单克隆抗体CD73.4-1、CD73.4-2、11F11-1、11F11-2、4C3-1、4C3-2、4C3-3、4D4、10D2-1、10D2-2、11A6、24H2、5F8-1、5F8-2、6E11和/或7A11的CDR序列。可选择具有等效于或优于本文中公开的特定抗体的结合亲和力、生物活性和/或其他特性的“混合匹配”抗体用于本发明方法中。

[0335] 本文中提供了分离的抗体或其抗原结合部分，其包含：

[0336] (a)包含选自下组的氨基酸序列的重链可变区CDR1：SEQ ID NO:5、17、33、41、53、61、69、81和89；

[0337] (b)包含选自下组的氨基酸序列的重链可变区CDR2：SEQ ID NO:6、18、34、42、54、62、70、82和90；

[0338] (c)包含选自下组的氨基酸序列的重链可变区CDR3：SEQ ID NO:7、19、35、43、55、63、71、83和91；

[0339] (d)包含选自下组的氨基酸序列的轻链可变区CDR1：SEQ ID NO:9、13、21、25、29、37、45、49、57、65、73、77、85和93；

[0340] (e)包含选自下组的氨基酸序列的轻链可变区CDR2：SEQ ID NO:10、14、22、26、30、38、46、50、58、66、74、78、86和94；以及

[0341] (f)包含选自下组的氨基酸序列的轻链可变区CDR3：SEQ ID NO:11、15、23、27、31、39、47、51、59、67、75、87和95；

[0342] 其中所述抗体与人CD73特异性地结合。

[0343] 在某些实施方案中，所述抗体包含重链和轻链可变区，其中重链可变区CDR1、CDR2和CDR3区包含SEQ ID NO:5-7；17-19；33-35；41-43；53-55；61-63；69-71；81-83；或89-91；

[0344] 其中所述抗体与人CD73特异性地结合。

[0345] 在某些实施方案中，所述抗体包含重链和轻链可变区，其中轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3区包含：

[0346] (a)SEQ ID NO:9-11；13-15；21-23；25-27；29-31；37-39；45-47；49-51；57-59；65-67；73-75；77-79；85-87；或93-95；

[0347] 其中所述抗体与人CD73特异性地结合。

[0348] 在某些实施方案中，所述抗体包含重链和轻链可变区，其中：

[0349] (a)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:5-7，并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:9-11；

[0350] (b)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:5-7，并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:13-15；

[0351] (c)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:17-19，并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:21-23；

[0352] (d)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:17-19，并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:25-27；

[0353] (e)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:17-19,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:29-31;

[0354] (f)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:33-35,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:37-39;

[0355] (g)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:41-43,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:45-47;

[0356] (h)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:41-43,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:49-51;

[0357] (i)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:53-55,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:57-59;

[0358] (j)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:61-63,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:65-67;

[0359] (k)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:69-71,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:73-75;

[0360] (l)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:69-71,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:77-79;

[0361] (m)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:81-83,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:85-87;或

[0362] (n)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:89-91,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:93-95;

[0363] 其中所述抗体与人CD73特异性地结合,并且任选地具有表3中列出的一个或多个特征,例如抑制AMP去磷酸化和介导受体依赖性CD73内化的能力。

[0364] 在某些实施方案中,所述抗体包含重链和轻链可变区,其中:

[0365] (a)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:5-7组成,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:9-11组成;

[0366] (b)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:5-7组成,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:13-15组成;

[0367] (c)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:17-19组成,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:21-23组成;

[0368] (d)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:17-19组成,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:25-27组成;

[0369] (e)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:17-19组成,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:29-31组成;

[0370] (f)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:33-35组成,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:37-39组成;

[0371] (g)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:41-43组成,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:45-47组成;

[0372] (h)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:41-43组成,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:49-51组成;

[0373] (i)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:53-55组成,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:57-59组成;

[0374] (j)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:61-63组成,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:65-67组成;

[0375] (k)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:69-71组成,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:73-75组成;

[0376] (l)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:69-71组成,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:77-79组成;

[0377] (m)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:81-83组成,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:85-87组成;或

[0378] (n)重链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:89-91组成,并且轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3分别由SEQ ID NO:93-95组成;

[0379] 其中所述抗体与人CD73特异性地结合,并且任选地具有表3中列出的一个或多个特征,例如抑制AMP去磷酸化和介导受体依赖性CD73内化的能力。

[0380] 抗CD73抗体的重链恒定结构域

[0381] 本文所述的抗CD73抗体的重链恒定区可属于任一同种型,例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4或其组合和/或其修饰形式。抗CD73抗体可具有效应子功能、或可具有降低的效应子功能、或没有效应子功能。在某些实施方案中,本文所述的抗CD73抗体包含为所述抗体提供增强的性质的修饰的重链恒定区。如实施例中所显示的,具有IgG2铰链及任选地IgG2 CH1结构域的抗CD73抗体(比如具有11F11抗体的可变区的那些)相对于具有相同可变区但具有非IgG2铰链或CH1的抗体(例如,相对于具有IgG1铰链或IgG1铰链及IgG1 CH1的抗体)更好且更快地被内化。例如,在与细胞膜上的CD73结合后,包含11F11抗体的可变区、并且包含IgG2铰链及任选地IgG2 CH1以及IgG1 CH2及IgG1 CH3结构域的抗体,无论是否具有效应子功能,相对于具有IgG1铰链或IgG1铰链及IgG1 CH1结构域的相同抗体而言,可更高效地被内化到细胞中。如本文中进一步显示的,具有IgG2铰链并且抗体的其余部分属于IgG1同种型的CD73抗体比其中铰链属于IgG1同种型的相同抗体更有效地内化。除IgG2铰链外还具有IgG2 CH1结构域的抗体比其中CH1结构域为IgG1 CH1结构域的相同抗体甚至有效地内化。如本文中进一步显示的,与具有IgG1铰链或IgG1铰链及IgG1 CH1的抗体相比,具有IgG2铰链及任选地IgG2 CH1的抗CD73抗体还形成更大的抗体/抗原复合物。增加的内化似乎与增加的抗体/抗原复合物大小相关。如实施例中进一步描述的,增强的内化似乎与抗体的较高或较低亲和力无关。因此,本文中提供了具有修饰的重链恒定区的抗CD73抗体,所述修饰的重链恒定区介导抗体介导的CD73内化,并且其中具有修饰的重链恒定区的抗体以与具有不同重链恒定区的相同抗体相似的亲和力与CD73结合。

[0382] 在某些实施方案中,CD73抗体包含包括属于IgG2同种型的铰链(“IgG2铰链”)以及CH1、CH2和CH3结构域的修饰的重链恒定区。在某些实施方案中,修饰的重链恒定区包含IgG2铰链以及CH1、CH2和CH3结构域,其中CH1、CH2和CH3结构域中的至少一者不属于IgG2同种型。在某些实施方案中,修饰的重链恒定区包含属于IgG2同种型的铰链、属于IgG2同种型的CH1,其中CH2和CH3结构域中的至少一者不属于IgG2同种型。IgG2铰链可以是野生型IgG2铰链,例如野生型人IgG2铰链(例如,具有SEQ ID NO:136)或其变体,前提是所述IgG2铰链

保留赋予抗体相对于包含非IgG2铰链及任选地非IgG2CH1结构域的相同抗体增强的活性的能力(例如,增加的细胞内化;增强的酶活性抑制;增加的拮抗剂或阻断活性;形成大抗体/抗原交联复合物的能力;增加的刺激或增强免疫应答的能力;和/或增加的抗增殖或抗肿瘤效应)。在某些实施方案中,IgG2铰链变体保留与野生型IgG2铰链相似的刚性或刚度。通过例如计算机建模、电子显微镜、光谱学(比如核磁共振(NMR))、X射线晶体学(B-因子)或沉降速度分析超速离心法(AUC)测量或比较包含铰链的抗体的回转半径,可以确定铰链或抗体的刚性。如果包含铰链的抗体在前一句中所述的测试之一中获得的值与具有不同铰链(例如,IgG1铰链)的相同抗体的值相差小于5%、10%、25%、50%、75%或100%,那么铰链或抗体相对于另一铰链可具有相似或较高的刚性。根据这些测试,通过解释这些测试的结果,本领域技术人员将能够确定铰链或抗体是否分别与另一铰链或抗体具有至少相似的刚性。示例性的人IgG2铰链变体是包含对四个半胱氨酸残基(即,C219、C220、C226和C229)中的一者或多者用其他氨基酸取代的IgG2铰链。半胱氨酸可置换为丝氨酸。示例性的IgG2铰链是包含C219X突变或C220X突变的人IgG2铰链,其中X是除了半胱氨酸外的任何氨基酸。在某些实施方案中,IgG2铰链不包含C219X和C220X取代这两者。在某些实施方案中,IgG2铰链包含C219S或C220S,但不包含C219S和C220S两者。其他可使用的IgG2铰链变体包括包含C220、C226和/或C229取代(例如C220S、C226S或C229S突变(其可与C219S突变组合))的人IgG2铰链。IgG2铰链也可以是这样的IgG2铰链,其中铰链的一部分是另一同种型的铰链(即,其为嵌合铰链或杂合铰链),条件是嵌合铰链的刚性至少与野生型IgG2铰链的刚性相似。例如,IgG2铰链可以是这样的IgG2铰链,其中下铰链(如表2中定义的)属于IgG1同种型,并且是例如野生型IgG1下铰链。

[0383] 如果“杂合”或“嵌合”铰链的一半以上的连续氨基酸来自某种特定的同种型,则称铰链属于所述同种型。例如,具有IgG2的上铰链和中部铰链以及IgG1的下铰链的铰链被视为IgG2铰链。

[0384] 在某些实施方案中,抗CD73抗体包含包括IgG2铰链的修饰的重链恒定区,其包含以下铰链之一:

[0385] ERKCCVECPPCPAPPVAG(SEQ ID NO:348);

[0386] ERKSCVECPPCPAPPVAG(SEQ ID NO:349);

[0387] ERKCSVECPPCPAPPVAG(SEQ ID NO:350);

[0388] ERKXCVECPPCPAPPVAG(SEQ ID NO:351);

[0389] ERKCXVECPPCPAPPVAG(SEQ ID NO:352);

[0390] ERKCCVECPPCPAPPVAGX(SEQ ID NO:353);

[0391] ERKSCVECPPCPAPPVAGX(SEQ ID NO:354);

[0392] ERKCSVECPPCPAPPVAGX(SEQ ID NO:355);

[0393] ERKXCVECPPCPAPPVAGX(SEQ ID NO:356);

[0394] ERKCXVECPPCPAPPVAGX(SEQ ID NO:357);

[0395] ERKCCVECPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:358);

[0396] ERKSCVECPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:359);

[0397] ERKCCSVECPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:360);

[0398] ERKXCVECPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:361);

[0399] ERKCXVECPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:362)；

[0400] ERKCCVECPPCPAPELLG(SEQ ID NO:363)；

[0401] ERKSCVECPPCPAPELLG(SEQ ID NO:364)；

[0402] ERKCCSVECPPCPAPELLG(SEQ ID NO:365)；

[0403] ERKXCVECPPCPAPELLG(SEQ ID NO:366)；

[0404] ERKCXVECPPCPAPELLG(SEQ ID NO:367)；

[0405] ERKCCVECPPCPAP(SEQ ID NO:368)；

[0406] ERKSCVECPPCPAP(SEQ ID NO:369)；

[0407] ERKCSVECPPCPAP(SEQ ID NO:370)；

[0408] ERKXCVECPPCPAP(SEQ ID NO:371)；或

[0409] ERKCXVECPPCPAP(SEQ ID NO:372)，

[0410] 其中X是除半胱氨酸外的任何氨基酸，

[0411] 或任何上述序列，其中1-5、1-3、1-2或1个氨基酸插入氨基酸残基CVE和CPP之间。在某些实施方案中，插入THT和GGG。

[0412] 在某些实施方案中，铰链包含SEQ ID NO:348、349、350、351或352，其中1、2、3个或全部4个氨基酸P233、V234、A235和G237(对应于C端4个氨基酸“PVAG”(SEQ ID NO:373)缺失或被其他氨基酸取代，例如IgG1铰链ELLG(SEQ ID NO:374)或ELLGG(SEQ ID NO:375)的C端氨基酸。在某些实施方案中，铰链包含SEQ ID NO:348、349、350、351或352，其中V234、A235和G237缺失或被其他氨基酸取代。在某些实施方案中，铰链包含SEQ ID NO:348、349、350、351或352，其中A235和G237缺失或被其他氨基酸取代。在某些实施方案中，铰链包含SEQ ID NO:348、349、350、351或352，其中G237缺失或被其他氨基酸取代。在某些实施方案中，铰链包含SEQ ID NO:348、349、350、351或352，其中V234和A235缺失或被其他氨基酸取代。用IgG1铰链，即(ELLG(SEQ ID NO:374)或ELLGG(SEQ ID NO:375))的相应氨基酸取代IgG2中的PVAG(SEQ ID NO:373)以获得例如上文所示的杂合铰链，从而提供具有IgG2铰链的优点和IgG1铰链的效应子功能的铰链。

[0413] 在某些实施方案中，修饰的重链恒定区包含由上文所示的序列之一(例如SEQ ID NO:348-372中的任一个)组成或基本上由其组成的铰链，并且例如，不包含另外的铰链氨基酸残基。

[0414] 在某些实施方案中，在铰链和CH2结构域之间插入1或1-2或1-3个氨基酸，例如可以添加另外的甘氨酸。

[0415] 在某些实施方案中，抗CD73抗体包含含有IgG1或IgG2恒定区的修饰的重链恒定区，其中铰链包含1-10个氨基酸的缺失。如实施例中所示，缺乏氨基酸残基SCDKTHT(S219、C220、D221、K222、T223、H224和T225;SEQ ID NO:376)的IgG1抗体比具有野生型IgG1恒定区的相同抗体更有效地赋予抗体介导的CD73内化。类似地，在IgG2抗体的背景下，缺乏CCVE氨基酸残基CCVE(C219、C220、V222和E224;SEQ ID NO:377)的IgG2抗体比具有野生型IgG1恒定区的相同抗体更有效地赋予抗体介导的CD73内化。因此，本文中提供了修饰的重链恒定区，其中铰链包含选自IgG1抗体的残基S219、C220、D221、K222、T223、H224和T225的1、2、3、4、5、6个或7个氨基酸残基以及IgG2抗体的残基C219、C220、V222和E224的缺失。

[0416] 在某些实施方案中，修饰的重链恒定区包含CH1结构域，其为IgG1或IgG2同种型的

野生型CH1结构域(分别为“IgG1 CH1结构域”或“IgG2 CH1结构域”)。还可以使用IgG3和IgG4同种型的CH1结构域(分别为“IgG3 CH1结构域”和“IgG2 CH1结构域”)。CH1结构域还可以是野生型CH1结构域的变体,例如野生型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 CH1结构域的变体。CH1结构域的示例性变体包括A114C、T173C和/或C131(例如C131S)。

[0417] CH1结构域,例如IgG2 CH1结构域可以包含取代C131S,所述取代赋予IgG2抗体或具有IgG2 CH1和铰链B型(或构象)的抗体。

[0418] 在某些实施方案中,修饰的重链恒定区包含属于IgG2同种型的CH1结构域。在某些实施方案中,CH1结构域是野生型IgG2 CH1结构域,例如具有以下氨基酸序列:

ASTKGPSVFPLAP**C**S**R**STS**ES**TAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS*NF*GTQTYTCNVDHKP
SNTKVDKTV(SEQ ID NO:378)。在某些实施方案中,CH1结构域是SEQ ID NO:378的变体,并且包含相对于SEQ ID NO:378的1-10、1-5、1-2个或1个氨基酸取代或缺失。如实施例中进一步描述的,本文中已经表明,IgG2CH1结构域或其变体赋予抗CD73抗体相对于IgG1抗体增强的或改变的内化性质,并且当抗体还包含IgG2铰链时甚至赋予更加增强或改变的内化。在某些实施方案中,IgG2 CH1变体不包含在一个或多个以下氨基酸残基处的氨基酸取代或缺失:C131、R133、E137和S138,所述氨基酸残基以粗体显示并在上文所示的SEQ ID NO:378中加下划线。例如,修饰的重链恒定区可以包含IgG2 CH1结构域,其中R133、E137和S138没有一个被其他氨基酸取代或被缺失,或其中C131、R133、E137和S138没有一个被其他氨基酸取代或被缺失。在某些实施方案中,C131被其他氨基酸取代,例如C131S,所述取代触发抗体采取构象B。本文中显示,具有修饰的重链恒定区的构象A和构象B抗体相对于具有IgG1恒定区的相同抗体具有增强的活性。

[0419] 在某些实施方案中,N192和/或F193(在上文所示的SEQ ID NO:378中显示为斜体和加下划线的残基)被其他氨基酸取代,例如用IgG1中的相应氨基酸取代,即,N192S和/或F193L。

[0420] 在某些实施方案中,IgG2 CH1结构域的一个或多个氨基酸残基被IgG4中的相应氨基酸残基取代。例如,N192可以是N192S;F193可以是F193L;C131可以是C131K;和/或T214可以是T214R。

[0421] 抗体可以含有包含IgG2 CH1结构域或其变体和IgG2铰链或其变体的修饰的重链恒定区。铰链和CH1结构域可以是本文所述的任何IgG2铰链和IgG2CH1结构域的组合。在某些实施方案中,IgG2 CH1和铰链包含以下氨基酸序列:

ASTKGPSVFPLAP**C**S**R**STS**ES**TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS*NF*GTQTYTCNVDHKPSNTKVDK
TVERKCCVECPPCPAPPVAG(SEQ ID NO:379),或与其有至多1-10个氨基酸不同的氨基酸序列。氨基酸变体如针对以上铰链和CH1结构域所述。

[0422] 在某些实施方案中,抗体至少包含IgG2铰链,并且任选地还包含IgG2CH1结构域或铰链和/或CH1结构域的片段或衍生物,并且抗体采用(构象)A型(例如,参见Allen等人(2009)Biochemistry 48:3755)。在某些实施方案中,抗CD73抗体至少包含IgG2铰链,并且任选地还包含IgG2 CH1结构域或铰链和/或CH1结构域的片段或衍生物,并且抗体采用B型

(例如,参见Allen等人(2009)Biochemistry 48:3755)。

[0423] 在某些实施方案中,修饰的重链恒定区包含CH2结构域,其为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型的野生型CH2结构域(分别为“IgG1 CH2结构域”、“IgG2 CH2结构域”、“IgG3 CH2结构域”或“IgG4 CH2结构域”)。CH2结构域还可以是野生型CH2结构域的变体,例如野生型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4CH2结构域的变体。CH2结构域的示例性变体包括调节抗体的Fc区的生物活性(比如ADCC或CDC)或调节抗体的半衰期或其稳定性的变体。在一个实施方案中,CH2结构域是具有A330S和P331S突变的人IgG1 CH2结构域,其中CH2结构域相对于没有突变的相同CH2突变具有降低的效应子功能。CH2结构域可以具有增强的效应子功能。CH2结构域可以包含一个或多个以下突变:SE(S267E)、SELF(S267E/L328F)、SDIE(S239D/I332E)、SEFF和GASDALIE(G236A/S239D/A330L/I332E)和/或在以下氨基酸处的一个或多个突变:E233、G237、P238、H268、P271、L328和A330。其他突变进一步在本文中别处陈述。

[0424] 在某些实施方案中,修饰的重链恒定区包含CH3结构域,其为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型的野生型CH3结构域(分别为“IgG1 CH3结构域”、“IgG2 CH3结构域”、“IgG3 CH3结构域”或“IgG4 CH3结构域”)。CH3结构域还可以是野生型CH3结构域的变体,例如野生型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 CH3结构域的变体。CH3结构域的示例性变体包括调节抗体的Fc区的生物活性(比如ADCC或CDC)或调节抗体的半衰期或其稳定性的变体。

[0425] 在某些实施方案中,修饰的重链恒定区包含IgG2同种型的铰链和IgG2同种型的CH1区。IgG2铰链和CH1可以是野生型IgG2铰链和CH1或其变体,条件是它们具有希望的生物活性。在某些实施方案中,修饰的重链恒定区包含含有C219S突变的IgG2铰链和可以是野生型或包含至多1-10、1-5、1-3、1-2或1个氨基酸取代、缺失或添加的IgG2 CH1。修饰的重链恒定区可进一步包含野生型或突变的CH2和CH3结构域。例如,CD73抗体可包含包括IgG2 CH1结构域、可包含C219S的IgG2铰链以及IgG1 CH2和CH3结构域的重链恒定结构域,其中CH2和CH3结构域可以是无效应子的,例如包含突变A330S和P331S。

[0426] 通常,CH1、铰链、CH2或CH3结构域的变体可以包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个突变、和/或至多10、9、8、7、6、5、4、3、2个或1个突变、或1-10个或1-5个突变,或包含与相应野生型结构域(分别为CH1、铰链、CH2或CH3结构域)的氨基酸序列至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,条件是包含特定变体的重链恒定区保留必需的生物活性。

[0427] 表5列出了包含人CH1、铰链、CH2和/或CH3结构域的示例性人重链恒定区,其中每个结构域是为重链恒定区提供期望的生物活性的野生型结构域或其变体。表5中的空白单元格指示结构域存在或不存在,如果存在,则可以属于任一同种型,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。例如,包含表5中的重链恒定区1的抗体是包含至少包含IgG2铰链并且还可包含CH1、CH2和/或CH3结构域的重链恒定区的抗体,并且如果存在的话,则CH1、CH2和/或CH3结构域属于IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。作为理解表5的另一实例,包含重链恒定区8的抗体是含有包含IgG1 CH1结构域、及IgG2铰链、IgG1 CH2结构域并且还可包含或可以不包含CH3结构域的重链恒定区的抗体,CH3结构域若存在则可以属于IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。

[0428] 表5:

[0429]

MHCCR*	CH1	铰链	CH2	CH3
1		IgG2		
2	IgG1	IgG2		
3	IgG2	IgG2		
4		IgG2	IgG1	
5		IgG2	IgG2	
6		IgG2		IgG1
7		IgG2		IgG2
8	IgG1	IgG2	IgG1	
9	IgG1	IgG2	IgG2	
10	IgG2	IgG2	IgG1	
11	IgG2	IgG2	IgG2	
12	IgG1	IgG2		IgG1
13	IgG1	IgG2		IgG2
14	IgG2	IgG2		IgG1
15	IgG2	IgG2		IgG2

[0430]

16		IgG2	IgG1	IgG1
17		IgG2	IgG1	IgG2
18		IgG2	IgG2	IgG1
19		IgG2	IgG2	IgG2
20	IgG1	IgG2	IgG1	IgG1
21	IgG1	IgG2	IgG1	IgG2
22	IgG1	IgG2	IgG2	IgG1
23	IgG1	IgG2	IgG2	IgG2
24	IgG2	IgG2	IgG1	IgG1
25	IgG2	IgG2	IgG1	IgG2
26	IgG2	IgG2	IgG2	IgG1
27	IgG2	IgG2	IgG2	IgG2

[0431] *修饰的重链恒定区

[0432] 在某些实施方案中，相对于包含重链恒定区(不含特定的重链恒定区)的相同抗体或相对于包含IgG1恒定区的相同抗体，包含表5中所示的重链恒定区的抗体具有增强的生物活性。

[0433] 在某些实施方案中，用于提高包含非IgG2铰链和/或非IgG2 CH1结构域的CD73抗体的生物活性的方法包括：提供包含非IgG2铰链和/或非IgG2 CH1结构域的抗CD73抗体，并且分别用IgG2铰链和IgG2 CH1结构域置换非IgG2铰链和非IgG2 CH1结构域。用于提高不包含修饰的重链恒定区的CD73抗体的生物活性的方法可以包括：提供不包含修饰的重链恒定区的抗CD73抗体，并且用修饰的重链恒定区置换其重链恒定区。

[0434] 可以与抗CD73可变区连接的示例性的修饰的重链恒定区(例如本文所述的那些)提供在表6中，其中列出了每个结构域的身份。

[0435] 表6：

[0436]

修饰的重链恒定区	CH1	铰链	CH2	CH3	全MHCCR的SEQ ID NO
IgG1-IgG2-IgG1f	IgG1野生型 SEQ ID NO:98	IgG2/IgG1 SEQ ID NO:178	IgG1野生型 SEQ ID NO:137	IgG1野生型 SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:180

[0437]

IgG1-IgG2-IgG1f2	IgG1野生型 SEQ ID NO:98	IgG2野生型 SEQ ID NO:136	IgG1野生型 SEQ ID NO:137	IgG1野生型 SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:162
IgG1-IgG2CS-IgG1f	IgG1野生型 SEQ ID NO:98	IgG2C219S/IgG1 SEQ ID NO:179	IgG1野生型 SEQ ID NO:137	IgG1野生型 SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:181
IgG1-IgG2CS-IgG1f2	IgG1野生型 SEQ ID NO:98	IgG2 C219S SEQ ID NO:123	IgG1野生型 SEQ ID NO:137	IgG1野生型 SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:163
IgG2-IgG1f	IgG2野生型 SEQ ID NO:124	IgG2/IgG1 SEQ ID NO:178	IgG1野生型 SEQ ID NO:137	IgG1野生型 SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:182
IgG2-IgG1f2	IgG2野生型 SEQ ID NO:124	IgG2野生型 SEQ ID NO:136	IgG1野生型 SEQ ID NO:137	IgG1野生型 SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:164
IgG2CS-IgG1f	IgG2野生型 SEQ ID NO:124	IgG2C219S/IgG1 SEQ ID NO:179	IgG1野生型 SEQ ID NO:137	IgG1野生型 SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:183
IgG2CS-IgG1f2	IgG2野生型 SEQ ID NO:124	IgG2 C219S SEQ ID NO:123	IgG1野生型 SEQ ID NO:137	IgG1野生型 SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:165
IgG1-IgG2-IgG1.1f	IgG1野生型 SEQ ID NO:98	IgG2野生型 SEQ ID NO:136	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:125	IgG1野生型 SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:166
IgG1-IgG2CS-IgG1.1f	IgG1野生型 SEQ ID NO:98	IgG2 C219S SEQ ID NO:123	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:125	IgG1野生型 SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:167
IgG2-IgG1.1f	IgG2野生型 SEQ ID NO:124	IgG2野生型 SEQ ID NO:136	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:125	IgG1野生型 SEQ ID NO:138	SEQ ID NO:168
IgG2CS-IgG1.1f	IgG2野生型 SEQ ID NO:124	IgG2 C219S SEQ ID NO:123	IgG1 A330S/P331S SEQ ID NO:125	IgG1野生型 SEQ ID NO:138	SEQ ID NO: 169

[0438] 在某些实施方案中,抗体包含修饰的重链恒定区,所述修饰的重链恒定区含有包含SEQ ID NO:123、136、178、179或348-372或其变体的IgG2铰链,比如包含这样的氨基酸序列的IgG2铰链,所述氨基酸序列(i)与SEQ ID NO:123、136、178、179或348-372因有1、2、3、4个或5个氨基酸取代、添加或缺失而不同;(ii)与SEQ ID NO:123、136、178、179或348-372因有至多5、4、3、2个或1个氨基酸取代、添加或缺失而不同;(iii)与SEQ ID NO:123、136、178、179或348-372因有1-5、1-3、1-2、2-5个或3-5个氨基酸取代、添加或缺失而不同,和/或(iv)包含与SEQ ID NO:123、136、178、179或348-372至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、

97％、98％或99％相同的氨基酸序列，其中在(i)-(iv)中的任一者中，氨基酸取代可以是保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代；并且其中修饰的重链恒定区相对于另一重链恒定区(例如，包含非IgG2铰链的重链恒定区)或相对于包含非IgG2铰链的相同的修饰的重链恒定区具有增强的生物活性。例如，铰链可以是野生型，或包含C219S、C220S或C219S及C220S取代。

[0439] 在某些实施方案中，抗体包含修饰的重链恒定区，所述修饰的重链恒定区含有包含SEQ ID NO:98的IgG1 CH1结构域或包含SEQ ID NO:124的IgG2CH1结构域、或SEQ ID NO:98或SEQ ID NO:124的变体，所述变体(i)与SEQ ID NO:98或SEQ ID NO:124因有1、2、3、4个或5个氨基酸取代、添加或缺失而不同；(ii)与SEQ ID NO:98或SEQ ID NO:124因有至多5、4、3、2个或1个氨基酸取代、添加或缺失而不同；(iii)与SEQ ID NO:98或SEQ ID NO:1244因有1-5、1-3、1-2、2-5个或3-5个氨基酸取代、添加或缺失而不同，和/或(iv)包含与SEQ ID NO:98或SEQ ID NO:124至少约75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％相同的氨基酸序列，其中在(i)-(iv)中的任一者中，氨基酸取代可以是保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代；并且其中修饰的重链恒定区相对于另一重链恒定区(例如，包含非IgG2铰链或非IgG2铰链及CH1结构域的重链恒定区)或相对于包含非IgG2铰链或非IgG2铰链及CH1结构域的相同的修饰的重链恒定区具有增强的生物活性。IgG2 CH1结构域可包含C131S或其他使得含有IgG2铰链及CH1的抗体采用A或B型的突变。

[0440] 在某些实施方案中，抗体包含修饰的重链恒定区，所述修饰的重链恒定区含有包含SEQ ID NO:137或SEQ ID NO:125、或SEQ ID NO:137或SEQ ID NO:125的变体的IgG1 CH2结构域，所述变体(i)与SEQ ID NO:137或SEQ ID NO:125因有1、2、3、4个或5个氨基酸取代、添加或缺失而不同；(ii)与SEQ ID NO:137或SEQ ID NO:125因有至多5、4、3、2个或1个氨基酸取代、添加或缺失而不同；(iii)与SEQ ID NO:137或SEQ ID NO:125因有1-5、1-3、1-2、2-5个或3-5个氨基酸取代、添加或缺失而不同，和/或(iv)包含与SEQ ID NO:137或SEQ ID NO:125至少约75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％相同的氨基酸序列，其中在(i)-(iv)中的任一者中，氨基酸取代可以是保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代；并且其中修饰的重链恒定区相对于另一重链恒定区(例如，包含非IgG2铰链的重链恒定区)或相对于包含非IgG2铰链的相同的修饰的重链恒定区具有增强的生物活性。

[0441] 在某些实施方案中，抗体包含修饰的重链恒定区，所述修饰的重链恒定区含有包含SEQ ID NO:138、或SEQ ID NO:138的变体的IgG1 CH3结构域，所述变体(i)与SEQ ID NO:138因有1、2、3、4个或5个氨基酸取代、添加或缺失而不同；(ii)与SEQ ID NO:138因有至多5、4、3、2个或1个氨基酸取代、添加或缺失而不同；(iii)与SEQ ID NO:138因有1-5、1-3、1-2、2-5个或3-5个氨基酸取代、添加或缺失而不同，和/或(iv)包含与SEQ ID NO:138至少约75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％相同的氨基酸序列，其中在(i)-(iv)中的任一者中，氨基酸取代可以是保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代；并且其中修饰的重链恒定区相对于另一重链恒定区(例如，包含非IgG2铰链的重链恒定区)或相对于包含非IgG2铰链的相同的修饰的重链恒定区具有增强的生物活性。

[0442] 修饰的重链恒定区还可包含上述CH1、铰链、CH2和CH3结构域的组合。

[0443] 在某些实施方案中，CD73抗体(例如，包含本文所述的CD73抗体的CDR或可变区)含有包含SEQ ID NO:162-169、180-183、267-282、300-347和391-454中的任一者或SEQ ID

NO:162-169、180-183、267-282、300-347和391-454中的任一者的变体的修饰的重链恒定区,所述变体(i)与SEQ ID NO:162-169、180-183、267-282、300-347和391-454因有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个氨基酸取代、添加或缺失而不同;(ii)与SEQ ID NO:162-169、180-183、267-282、300-347和391-454因有至多10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个氨基酸取代、添加或缺失而不同;(iii)与SEQ ID NO:162-169、180-183、267-282、300-347和391-454因有1-5个、1-3个、1-2个、2-5个、3-5个、1-10个或5-10个氨基酸取代、添加或缺失而不同,和/或(iv)包含与SEQ ID NO:162-169、180-183、267-282、300-347和391-454中的任一者至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,其中在(i)-(iv)中的任一者中,氨基酸取代可以是保守氨基酸取代或非保守氨基酸取代;并且其中修饰的重链恒定区相对于另一重链恒定区(例如,包含非IgG2铰链或非IgG2 CH1结构域的重链恒定区)或相对于包含非IgG2铰链和/或非IgG2 CH1结构域的相同的修饰的重链恒定区具有增强的生物活性。

[0444] 修饰的重链恒定区可具有(i)相对于野生型重链恒定区的相似、降低或增加的效应子功能(例如,与FcγR例如FcγRIIB结合)及或(ii)相对于野生型重链恒定区的相似、降低或增加的半衰期(或与FcRn受体结合)。

[0445] 本文所述的抗CD73抗体的VH结构域可与这里描述的重链恒定区连接。例如,图18显示了抗体CD73.4的氨基酸序列,其中重链恒定区是IgG2CS-IgG1.1f(SEQ ID NO:133或189)。本文中还涵盖包含重链的抗体,所述重链包含这样的氨基酸序列,其与CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f的氨基酸序列(SEQ IDNO:133或189)有至多1-30个、1-25个、1-20个、1-15个、1-10个、1-5个、1-4个、1-3个、1-2个或1个氨基酸(取代、添加或缺失)不同和/或与CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:133或189)至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同。例如,本文中涵盖包含CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f的重链(SEQ ID NO:133或189)的抗体,并且其中缺失或存在C端K或GK或PGK。CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f(SEQ ID NO:133或189)的其他变体包括具有不同同种异型重链的那些,并且其中例如氨基酸356和358分别为D和L。变体包括具有在IgG2铰链中突变的另一个半胱氨酸(例如C220)(或具有C220S而不是C219S)的那些,以及不具有突变A330S和/或P331S的那些。CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f(SEQ ID NO:133或189)的变体优选具有相对于CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f(SEQ ID NO:133或189)至少相似的生物化学特性和/或生物活性,例如内化效率、CD73酶活性抑制、对人CD73的亲和力以及与相同或相似的表位结合。

[0446] 在某些实施方案中,抗CD73抗体或其抗原结合部分(包含本文所述的抗CD73抗体的CDR或可变区)包含这里描述的恒定区的任一者,例如,包含在SEQ ID NO:126、127、129、130、162-169、180-183、267-282、300-347和391-454任一者中列出的氨基酸序列的恒定区。

[0447] 抗CD73抗体的轻链可含有包含SEQ ID NO:131或SEQ ID NO:131的变体的轻链恒定区,所述变体(i)与SEQ ID NO:131因有1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个或更多个氨基酸取代、添加或缺失而不同;(ii)与SEQ ID NO:131因有至多10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个氨基酸取代、添加或缺失而不同;(iii)与SEQ ID NO:131因有1-5个、1-3个、1-2个、2-5个、3-5个、1-10个或5-10个氨基酸取代、添加或缺失而不同,和/或(iv)包含与SEQ ID NO:131至少约75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列,其中在(i)-(iv)中的任一者中,氨基酸取代可以是保守氨基酸取代或

非保守氨基酸取代。示例性CL突变包括C124S。

[0448] 如本文中详述，包含与表37中列出的重链或轻链中的任一者至少99％、98％、97％、96％、95％、90％、85％、80％、75％或70％相同的氨基酸序列的重链和轻链(或其可变区)可用于形成具有期望特征(例如，本文进一步描述的那些)的抗人CD73抗体。示例性变体是包含例如恒定结构域中的同种异型变异的那些。如本文中所述，包含与表37中列出的重链或轻链中的任一者因有至多1-30个、1-25个、1-20个、1-15个、1-10个、1-5个、1-4个、1-3个、1-2个或1个氨基酸(取代、添加或缺失)而不同的氨基酸序列的重链和轻链(或其可变区)可用于形成具有期望特征(例如，例如本文中进一步描述的那些)的抗人CD73抗体。

[0449] 在不同的实施方案中，上述抗体展现本文所述例如表3中列出的功能性质中的一项或多项、两项或更多项、三项或更多项、四项或更多项、五项或更多项、六项或更多项、七项或更多项、八项或更多项、九项或更多项、十项、或全部。

[0450] 这样的抗体包括例如人抗体、人源化抗体、或嵌合抗体。

[0451] 在一个实施方案中，本文所述的抗CD73抗体与糖基化(例如，N-连接或O-连接糖基化)和非糖基化人CD73结合。某些抗CD73抗体可与糖基化、而不与非糖基化CD73结合，或与非糖基化而不与糖基化CD73结合。

[0452] 在一个实施方案中，本文所述的抗CD73抗体与构象表位结合。

[0453] 在一个实施方案中，本文所述的抗CD73抗体结合人CD73的以下区域内的氨基酸残基：

[0454] FTKVQQIRRAEPNVLLLDA(SEQ ID NO:96)，并且

[0455] 这些氨基酸残基对应于人CD73(SEQ ID NO:1或2)的氨基酸残基65-83，如通过例如HDX-MS所测定的。

[0456] 在一个实施方案中，本文所述的抗CD73抗体结合人CD73中的以下氨基酸残基的全部或一部分：FTKVQQIRRAEPNVLLLDA(SEQ ID NO:96)，其对应于人CD73(SEQ ID NO:1或2)的氨基酸残基65-83，如通过例如HDX-MS所测定。

[0457] 在一个实施方案中，本文所述的抗CD73抗体结合人CD73的以下区域内的氨基酸残基：

[0458] LYLPYKVLPVGDEVVG(SEQ ID NO:97)，

[0459] 这些氨基酸残基对应于人CD73(SEQ ID NO:1或2)的氨基酸残基157-172，如通过例如HDX-MS所测定的。

[0460] 在一个实施方案中，本文所述的抗CD73抗体结合人CD73内的以下氨基酸残基的全部或一部分：LYLPYKVLPVGDEVVG(SEQ ID NO:97)，其对应于人CD73(SEQ ID NO:1或2)的氨基酸残基157-172，如通过例如HDX-MS所测定的。

[0461] 在一个实施方案中，本文所述的抗CD73抗体结合人CD73(SEQ ID NO:1或2)的以下区域内的不连续氨基酸残基：

[0462] FTKVQQIRRAEPNVLLLDA(SEQ ID NO:96)和LYLPYKVLPVGDEVVG(SEQ ID NO:97)。

[0463] 在一个实施方案中，本文所述的抗CD73抗体结合人CD73(SEQ ID NO:1或2)的以下区域内的不连续氨基酸残基的全部或一部分：FTKVQQIRRAEPNVLLLDA(SEQ ID NO:96)和LYLPYKVLPVGDEVVG(SEQ ID NO:97)，其对应于人CD73(SEQ ID NO:1或2)的氨基酸残基65-83和157-172，如通过例如HDX-MS所测定。

[0464] 在某些实施方案中，抗CD73抗体与人CD73(对应于表30中所示的那些)具有相互作用，如通过X射线晶体学所测定。抗体可享有表31中所示的与人CD73相互作用的至少50％、60％、70％、80％、90％、95％或99％。

[0465] III.具有特定种系序列的抗体

[0466] 在某些实施方案中，抗CD73抗体包含来自特定种系重链免疫球蛋白基因的重链可变区和/或来自特定种系轻链免疫球蛋白基因的轻链可变区。

[0467] 如本文中展示的，制备了对CD73特异的人抗体，其包含作为人种系VH 3-33基因、VH 3-10基因、VH 3-15基因、VH 3-16、JH6b基因、VH 6-19基因、VH 4-34基因和/或JH3b基因的产物或衍生自这些基因的重链可变区。因此，本文中提供了对人CD73特异的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其包含作为选自下组的人VH种系基因的产物或衍生自这些基因的重链可变区：VH 3-33、VH 3-10、VH 3-15、VH 3-16、VH 6-19和VH 4-34。

[0468] 制备了对CD73特异的人抗体，其包含作为人种系VK L6基因、VK L18基因、VK L15基因、VK L20基因、VK A27基因、JK5基因、JK4基因、JK2基因和JK1基因的产物或衍生自这些基因的轻链可变区。因此，本文中提供了对人CD73特异的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分，其包含作为选自下组的人VK种系基因的产物或衍生自这些基因的轻链可变区：VK L6、VK L18、VK L15、VK L20和VK A27。

[0469] 本文所述的优选抗体是这样的抗体：其包含作为上文列出的人种系VH基因之一的产物或衍生自所述基因的重链可变区，并且还包含作为上文列出的人种系VK基因之一的产物或衍生自所述基因的轻链可变区。

[0470] 如本文中使用的，如果人抗体的可变区是从使用人种系免疫球蛋白基因的系统获得的，则该抗体包含作为该特定种系序列的“产物”或“衍生自”该特定种系序列的重链或轻链可变区。这样的系统包括：用感兴趣的抗原免疫携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠，或用感兴趣的抗原筛选展示在噬菌体上的人免疫球蛋白基因文库。如此，通过比较人抗体的氨基酸序列与人种系免疫球蛋白的氨基酸序列，并选择在序列上最接近人抗体序列(即，最大同一性％)的人种系免疫球蛋白序列，可以鉴定作为人种系免疫球蛋白序列的“产物”或“衍生自”人种系免疫球蛋白序列的人抗体。由于例如天然存在的体细胞突变或有意引入定点突变，与种系序列相比，作为特定的人种系免疫球蛋白序列的“产物”或“衍生自”人种系免疫球蛋白序列的人抗体可含有氨基酸差异。然而，选择的人抗体的氨基酸序列通常与由人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列至少90％相同，并且含有当与其他物种的种系免疫球蛋白氨基酸序列(例如，鼠种系序列)相比时将人抗体鉴定为人的氨基酸残基。在某些情况下，人抗体的氨基酸序列可与由种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列至少95％、或甚至至少96％、97％、98％或99％相同。通常，衍生自特定的人种系序列的人抗体与由人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列将展现不超过10个氨基酸的差异。在某些情况下，人抗体与由种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列可展现不超过5个或甚至不超过4个、3个、2个或1个氨基酸的差异。

[0471] IV.同源抗体

[0472] 本文中涵盖具有重链和轻链可变区的抗体，所述重链和轻链可变区包含与本文所述的优选抗体的氨基酸序列同源的氨基酸序列，并且其中抗体保留本文所述的抗CD73抗体的期望的功能性质。

[0473] 例如，分离的抗CD73抗体或其抗原结合部分可包含重链可变区和轻链可变区，其中：

[0474] (a)重链可变区包含与选自下组的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％相同的氨基酸序列：SEQ ID NO:4、16、32、40、52、60、68、80、88、135和170-177，或包含相对于选自下组的氨基酸序列的1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4、1-5、1-10、1-15、1-20、1-25个或1-50个氨基酸变化(即，氨基酸取代、添加或缺失)：SEQ ID NO:4、16、32、40、52、60、68、80、88、135和170-177；

[0475] (b)轻链可变区包含与选自下组的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％相同的氨基酸序列：SEQ ID NO:8、12、20、24、28、36、44、48、56、64、72、76、84、92和138，或包含相对于选自下组的氨基酸序列的1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4、1-5、1-10、1-15、1-20、1-25个或1-50个氨基酸变化(即，氨基酸取代、添加或缺失)：SEQ ID NO:8、12、20、24、28、36、44、48、56、64、72、76、84、92和238；

[0476] (c)所述抗体与CD73特异性地结合，并且

[0477] (d)所述抗体展现表3中列出的功能性质中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10项或全部。

[0478] 在某些实施方案中，抗CD73抗体包含具有上文论述的同一性百分比和/或氨基酸变化及功能(即(a)-(d))的重链和轻链可变区，其中重链可变区的CDR3包含选自SEQ ID NO:7、19、35、43、55、63、71、83和91的氨基酸序列，并且任选地重链可变区的CDR1包含选自SEQ ID NO:5、17、33、41、53、61、69、81和89的氨基酸序列，并且任选地重链可变区的CDR2包含选自SEQ ID NO:6、18、34、42、54、62、70、82和90的氨基酸序列。

[0479] 在某些实施方案中，抗CD73抗体包含具有上文论述的同一性百分比和/或氨基酸变化及功能(即(a)-(d))的重链和轻链可变区，其中轻链可变区的CDR3包含选自SEQ ID NO:11、15、23、27、31、39、47、51、59、67、75、79、87、95和241的氨基酸序列，并且任选地轻链可变区的CDR1包含选自SEQ ID NO:9、13、21、25、29、37、45、49、57、65、73、77、85、93和239的氨基酸序列，并且任选地轻链可变区的CDR2包含选自SEQ ID NO:10、14、22、26、30、38、46、50、58、66、74、78、86、94和240的氨基酸序列。

[0480] 在某些实施方案中，抗CD73抗体包含具有上文论述的同一性百分比和/或氨基酸变化及功能(即(a)-(d))的重链和轻链可变区，其中重链可变区的CDR3包含选自SEQ ID NO:7、19、35、43、55、63、71、83和91的氨基酸序列，并且任选地重链可变区的CDR1包含选自SEQ ID NO:5、17、33、41、53、61、69、81和89的氨基酸序列，并且任选地重链可变区的CDR2包含选自SEQ ID NO:6、18、34、42、54、62、70、82和90的氨基酸序列，并且其中轻链可变区的CDR3包含选SEQ ID NO:11、15、23、27、31、39、47、51、59、67、75、79、87、95和241的氨基酸序列，并且任选地轻链可变区的CDR1包含选自SEQ ID NO:9、13、21、25、29、37、45、49、57、65、73、77、85、93和239的氨基酸序列，并且任选地轻链可变区的CDR2包含选自SEQ ID NO:10、14、22、26、30、38、46、50、58、66、74、78、86、94和240的氨基酸序列。

[0481] 在不同的实施方案中，抗体可以是例如人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

[0482] 分离的抗CD73抗体或其抗原结合部分可包含重链和轻链，其中：

[0483] (a)重链包含与选自下组的氨基酸序列至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％相同的氨基酸序列：SEQ ID NO:100、103、107、109、112、114、116、119、121、133、184-210，或包含相对于分别选自下组的氨基酸序列的1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4、1-5、1-10、

1-15、1-20、1-25个或1-50个氨基酸变化(即,氨基酸取代、添加或缺失):SEQ ID NO:100、103、107、109、112、114、116、119、121、133、184-210;

[0484] (b)轻链包含与选自下组的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列:SEQ ID NO:101、102、104、105、106、108、110、111、113、115、117、118、120和122,或包含相对于分别选自下组的氨基酸序列的1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4、1-5、1-10、1-15、1-20、1-25个或1-50个氨基酸变化(即,氨基酸取代、添加或缺失):SEQ ID NO:101、102、104、105、106、108、110、111、113、115、117、118、120和122;

[0485] (c)所述抗体与CD73特异性地结合,并且

[0486] (d)所述抗体展现表3中列出的功能性质中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10项或全部。

[0487] 在某些实施方案中,抗CD73抗体包含具有上文论述的同一性百分比和/或氨基酸变化及功能(即(a)-(d))的重链和轻链,其中重链可变区的CDR3包含选自SEQ ID NO:7、19、35、43、55、63、71、83和91的氨基酸序列,并且任选地重链可变区的CDR1包含选自SEQ ID NO:5、17、33、41、53、61、69、81和89的氨基酸序列,并且任选地重链可变区的CDR2包含选自SEQ ID NO:6、18、34、42、54、62、70、82和90的氨基酸序列。

[0488] 在某些实施方案中,抗CD73抗体包含具有上文论述的同一性百分比和/氨基酸变化及功能(即(a)-(d))的重链和轻链,其中轻链可变区的CDR3包含选自SEQ ID NO:11、15、23、27、31、39、47、51、59、67、75、79、87、95和241的氨基酸序列,并且任选地轻链可变区的CDR1包含选自SEQ ID NO:9、13、21、25、29、37、45、49、57、65、73、77、85、93和239的氨基酸序列,并且任选地轻链可变区的CDR2包含选自SEQ ID NO:10、14、22、26、30、38、46、50、58、66、74、78、86、94和240的氨基酸序列。

[0489] 在某些实施方案中,抗CD73抗体包含具有上文论述的同一性百分比和/或氨基酸变化及功能(即(a)-(d))的重链和轻链,其中重链可变区的CDR3包含选自SEQ ID NO:7、19、35、43、55、63、71、83和91的氨基酸序列,并且任选地重链可变区的CDR1包含选自SEQ ID NO:5、17、33、41、53、61、69、81和89的氨基酸序列,并且任选地重链可变区的CDR2包含选自SEQ ID NO:6、18、34、42、54、62、70、82和90的氨基酸序列,并且其中轻链可变区的CDR3包含选SEQ ID NO:11、15、23、27、31、39、47、51、59、67、75、79、87、95和241的氨基酸序列,并且任选地轻链可变区的CDR1包含选自SEQ ID NO:9、13、21、25、29、37、45、49、57、65、73、77、85、93和239的氨基酸序列,并且任选地轻链可变区的CDR2包含选自SEQ ID NO:10、14、22、26、30、38、46、50、58、66、74、78、86、94和240的氨基酸序列。

[0490] 还提供了包含与CD73.4-1、CD73.4-2、CD73.3、11F11-1、11F11-2、4C3-1、4C3-2、4C3-3、4D4、10D2-1、10D2-2、11A6、24H2、5F8-1、5F8-2、6E11和/或7A11的相应CDR因有1个、2个、3个、4个、5个、1-2个、1-3个、1-4个或1-5个氨基酸变化(即,氨基酸取代、添加或缺失)而不同的VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VLCDR1、VLCDR2和/或VLCDR3的抗CD73抗体。在某些实施方案中,抗CD73抗体在1个、2个、3个、4个、5个或6个CDR中的每一者中包含相对于CD73.4-1、CD73.4-2、CD73.3、11F11-1、11F11-2、11F11、4C3-1、4C3-2、4C3-3、4D4、10D2-1、10D2-2、11A6、24H2、5F8-1、5F8-2、6E11和/或7A11中的相应序列的1-5个氨基酸变化。在某些实施方案中,抗CD73抗体在所有CDR中均包含相对于CD73.4-1、CD73.4-2、CD73.3、11F11-1、11F11-2、4C3-1、4C3-2、4C3-3、4D4、10D2-1、10D2-2、11A6、24H2、5F8-1、5F8-2、6E11和/或7A11中的CDR的总共1-5个氨基酸变化。

[0491] 在某些实施方案中，抗CD73抗体包含由CD73.4-1或CD73.4-2的VH和VL CDR组成的VH和VL CDR，其中一个或多个CDR中的一个或多个氨基酸是本文中公开的其他抗CD73抗体之一的一个或多个氨基酸。

[0492] 可在抗CD73抗体的可变区序列中产生的突变(例如取代、添加、缺失)可基于以下各项来确定：(i)引入抗体中的突变，如实施例中所述；和(ii)在本文所述的抗CD73抗体的可变结构域中每一位置的氨基酸残基的比较(参见表37和图35)：在抗CD73抗体中某一位置的不同氨基酸可指示此位置的氨基酸残基可变成另一氨基酸残基而不显著影响抗体的活性；而如果在若干或所有抗CD73抗体中的相同位置发现相同的氨基酸残基，则此可指示应该保留该特定的氨基酸且不应该变成另一残基。以下提供了示例性实施方案。

[0493] 在某些实施方案中，可在本文所述的抗CD73抗体的重链可变区的位置25(11F11中的...RLSCATSGFTF...)引入框架取代(例如保守取代，例如取代为S或A)。例如，如果此位置的氨基酸为T，则可引入A或S取代；如果此位置的氨基酸为A，则可引入S或T取代；并且如果此位置的氨基酸为S，则可引入T或A取代。抗体24H2、4D4、10D2、6E11、7A11、11A6和4C3在此位置具有A，11F11在此位置具有T，并且73.5、73.7和73.9在此位置具有S。

[0494] 类似地，在某些实施方案中，可以在重链可变区的氨基酸位置94(11F11中的...AEDTAVYYCAR...)引入框架取代(例如V至L或L至V)。例如，抗体11F11、73.3-73.10、24H2、4D4、5F8和10D2在此位置具有V，并且6E11、7A11、11A6和4C3在此位置具有L。

[0495] 在某些实施方案中，可以对本文中公开的抗CD73抗体的重链可变区CDR2进行氨基酸取代。例如，位置52的氨基酸(11F11中的...WVAVILYDGSN...)可被W取代，或者，如果此位置的氨基酸为W，那么该氨基酸可被L取代(抗体11F11和73.4-73.7在此位置具有L，并且抗体73.8-73.10、24H2和4D4在此位置具有W)。

[0496] 类似地，在某些实施方案中，位置54的氨基酸(11F11中的...VILYDGSNKYY...)可被S或E取代，或者，如果此位置的氨基酸为S，那么该氨基酸可被E取代。抗体11F11、73.4、73.5、24H2、10D2和5F8在此位置具有G，抗体73.6-73.9、6E11、7A11、4C3和73.3在此位置具有S，并且抗体73.10和4D4在此位置具有E。

[0497] 基于使用与上文所述类似的原理比对图35中的重链和轻链可变区序列，可以确定可变区中的其他容许的取代。

[0498] 通过诱变(例如，定点诱变或PCR介导的诱变)核酸分子(例如，SEQ ID NO:139、142、146、148、151、153、155、158、160、237和/或SEQ ID NO:140、141、143、144、145、147、149、150、152、154、156、157、159、161或SEQ ID NO:134、243、246、250、252、255、257、259、262、264，和/或SEQ ID NO:244、245、247、248、249、251、253、254、256、258、260、261、263、265、266)，可以获得具有与CD73.3、CD73.4、CD73.5、CD73.6、CD73.7、CD73.8、CD73.9、CD73.10、CD73.11、11F11、4C3、4D4、10D2、11A6、24H2、5F8、6E11和/或7A11的那些序列(例如，V_H和V_L区分别为SEQ ID NO:4、16、32、40、52、60、68、80、88、135、170-177和SEQ ID NO:8、12、20、24、28、36、44、48、56、64、72、76、84、92，或重链和轻链分别为SEQ ID NO:100、103、107、109、112、114、116、119、121、133和184-210和SEQ ID NO:101、102、104、105、106、108、110、111、113、115、117、118、120和122，或CDR)同源的序列的抗体，然后使用本文所述的功能测定法测试编码的改变的抗体的保留功能。

[0499] V.具有保守修饰的抗体

[0500] 抗CD73抗体可含有包含CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区以及包含CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区，其中这些CDR序列中的一个或多个包含基于本文所述的优选抗体(例如，CD73.4-1、CD73.4-2、CD73.3、11F11-1、11F11-2、4C3-1、4C3-2、4C3-3、4D4、10D2-1、10D2-2、11A6、24H2、5F8-1、5F8-2、6E11和/或7A11)的指定氨基酸序列或其保守修饰形式，并且其中所述抗体保留本文所述的抗CD73抗体的期望的功能性质。因此，分离的抗CD73抗体或其抗原结合部分可含有包含CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区以及包含CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区，其中：

[0501] (a)重链可变区CDR3序列包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:7、19、35、43、55、63、71、83和91的氨基酸序列及其保守修饰形式，例如1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4或1-5个保守氨基酸取代；

[0502] (b)轻链可变区CDR3序列包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:11、15、23、27、31、39、47、51、59、67、75、79、87和95的氨基酸序列及其保守修饰形式，例如1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4或1-5个保守氨基酸取代；

[0503] (c)所述抗体与CD73特异性地结合，并且

[0504] (d)所述抗体展现表3中列出的功能性质中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10项或全部。

[0505] 在优选的实施方案中，重链可变区CDR2序列包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:6、18、34、42、54、62、70、82和90的氨基酸序列及其保守修饰形式，例如1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4或1-5个保守氨基酸取代；并且轻链可变区CDR2序列包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:10、14、22、26、30、38、46、50、58、66、74、78、86和94的氨基酸序列及其保守修饰形式，例如1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4或1-5个保守氨基酸取代。在另一优选的实施方案中，重链可变区CDR1序列包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:5、17、33、41、53、61、69、81和89的氨基酸序列及其保守修饰形式，例如1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4或1-5个保守氨基酸取代；并且轻链可变区CDR1序列包含选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO:9、13、21、25、29、37、45、49、57、65、73、77、85和93的氨基酸序列及其保守修饰形式，例如1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4或1-5个保守氨基酸取代。

[0506] 这样的抗体可以是例如人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

[0507] 还可以在非CDR或除CDR外的抗体部分中进行保守氨基酸取代。例如，可以在框架区中或在恒定区例如Fc区中进行保守氨基酸修饰。本文所述的任何取代可以是保守取代。相对于本文中提供的抗CD73抗体序列，可变区或重链或轻链可包含1、2、3、4、5、1-2、1-3、1-4、1-5、1-10、1-15、1-20、1-25或1-50个保守氨基酸取代。在某些实施方案中，抗CD73抗体包含保守和非保守氨基酸修饰的组合。

[0508] VI.与本文所述抗体结合CD73上的相同表位或与本文所述抗体竞争结合CD73的抗体

[0509] 还提供了与本文所述的特定抗CD73抗体(例如，抗体CD73.4、CD73.3、11F11、4C3、4D4、10D2、11A6、24H2、5F8、6E11和7A11)竞争结合CD73的抗体。这样的竞争性抗体可基于在标准CD73结合测定中其竞争性抑制单克隆抗体11F11-1、11F11-2、4C3-1、4C3-2、4C3-3、4D4、10D2-1、10D2-2、11A6、24H2、5F8-1、5F8-2、6E11、7A11和/或CD73.3或CD73.4(具有本文中针对这些抗体所述的任何恒定区和轻链)中的一者或多者与CD73结合的能力来鉴定。例如，可以使用标准ELISA测定法或竞争性ELISA测定法，其中将重组人CD73蛋白固定在平板

上,添加不同浓度的未标记的第一抗体,洗涤平板,添加标记的第二抗体,洗涤,并测量结合的标记物的量。如果递增浓度的未标记的(第一)抗体(也称为“阻断抗体”)抑制了标记的(第二)抗体的结合,则称第一抗体抑制了第二抗体与平板上的靶标的结合,或称与第二抗体竞争结合。另外地或可替代地,可以使用BIACORE®SPR分析来评估抗体竞争的能力。测试抗体抑制本文所述的抗CD73抗体与CD73结合的能力证明所述测试抗体能够与该抗体竞争结合CD73。

[0510] 本文中还提供了这样的抗CD73抗体:其将本文所述抗CD73抗体与细胞(例如,肿瘤细胞)上的CD73的结合抑制至少10%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%,和/或其与细胞(例如,肿瘤细胞)上的CD73的结合被抑制至少10%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%,正如例如通过ELISA或FACS,比如通过使用前面段落中描述的测定法测量的。

[0511] 可通过使用本领域已知的方法鉴定与本文所述的抗CD73抗体竞争结合的抗体。例如,可以用本文所述的人CD73免疫小鼠,产生杂交瘤,并筛选所得的单克隆抗体与本文所述抗体竞争结合CD73的能力。也可以用含有抗体所结合的表位的CD73的较小片段免疫小鼠。可以例如通过筛选与跨越CD73的一系列重叠肽的结合来鉴定表位或包含表位的区域。或者,可以使用Jespers等人,Biotechnology 12:899,1994的方法来指导选择与本文所述的抗CD73抗体具有相同表位、并因此具有相似性质的抗体。利用噬菌体展示,首先将抗CD73抗体的重链与(优选人的)轻链库进行配对,以选择CD73R结合性抗体,然后将新的轻链与(优选人的)重链库进行配对,以选择与本文所述的抗CD73抗体具有相同表位或表位区域的(优选人的)CD73结合性抗体。或者,可通过诱变编码抗体的重链和轻链的cDNA获得本文所述抗体的变体。

[0512] 确定抗体与本文所述抗体结合“CD73上的相同表位”的技术包括,例如,表位定位方法,例如抗原:抗体复合物的晶体的x射线分析,其提供表位的原子解析。其他方法监测抗体与抗原片段或抗原的突变变异的结合,其中由于抗原序列内氨基酸残基的修饰导致的结合丧失经常被认为是表位组分的指示。另外,还可以使用表位定位的计算组合方法。这些方法也可能依赖于感兴趣的抗体从组合噬菌体展示肽文库中亲和分离出特异性短肽(呈天然三维形式或呈变性形式)的能力。然后,将这些肽看作是界定对应于用于筛选肽文库的抗体的表位的前导。对于表位定位,还开发了已证明可以对构象不连续表位进行作图的计算算法。

[0513] 还可以使用如Cunningham和Wells,(1989)Science 244:1081-1085所述的丙氨酸扫描诱变或在CD73中的氨基酸残基的一些其他形式的点诱变来确定抗CD73抗体的功能表位。然而,诱变研究还可揭示对于CD73的整体三维结构至关重要、但不直接参与抗体-抗原接触的氨基酸残基,因此可能需要其他方法来确认使用这种方法确定的功能表位。

[0514] 还可以通过评估抗体与包含CD73的片段(例如,非变性或变性片段)的肽的结合来确定被特异性抗体结合的表位或表位区域(“表位区域”是包含表位或与表位重叠的区域)。可合成一系列涵盖CD73(例如,人CD73)的序列的重叠肽,并且例如通过直接ELISA、竞争性ELISA(其中评估肽的阻止抗体结合与微量滴定板的孔结合的CD73的能力)或在芯片上筛选结合。这样的肽筛选方法可能无法检测一些不连续的功能表位,即涉及在CD73多肽链的一

级序列上不连续的氨基酸残基的功能表位。

[0515] 还可通过基于MS的蛋白质足迹法(例如氢/氘交换质谱(HDX-MS)和蛋白质的快速光化学氧化(FPOP))鉴定表位。例如可以如实施例以及Wei等人(2014)Drug Discovery Today 19:95(其方法通过提述明确并入本文)中进一步描述的那样进行HDX-MS。例如可以如Hambley和Gross(2005)J.American Soc.Mass Spectrometry 16:2057(其方法通过提述明确并入本文)描述的那样进行FPOP。

[0516] 还可以通过结构方法(比如,X射线晶体结构测定(例如,WO2005/044853))、分子建模和核磁共振(NMR)光谱法(包括CD73中的不稳定酰胺氢在游离时以及结合在具有感兴趣的抗体的复合物中时的H-D交换速率的NMR测定)确定被抗CD73抗体结合的表位(Zinn-Justin等人(1992)Biochemistry 31,11335-11347;Zinn-Justin等人(1993)Biochemistry 32,6884-6891)。

[0517] 关于X射线晶体学,可使用任何本领域已知的方法来完成结晶(例如Giege等人(1994)Acta Crystallogr.D50:339-350;McPherson(1990)Eur.J.Biochem.189:1-23),这些方法包括微配液(microbatch)(例如Chayen(1997)Structure 5:1269-1274)、悬滴汽相扩散法(例如McPherson(1976)J.Biol.Chem.251:6300-6303)、加晶种和透析。需要使用具有至少约1mg/mL、且优选约10mg/mL至约20mg/mL浓度的蛋白质制剂。在含有聚乙二醇1000-20,000(PEG;平均分子量在约1000Da至约20,000Da的范围内,优选约5000Da至约7000Da,更优选约6000Da)的沉淀剂溶液中可以最佳地实现结晶,其中浓度在约10%至约30%(w/v)的范围内。还期望包括蛋白稳定剂,例如甘油,其浓度在约0.5%至约20%的范围内。在沉淀剂溶液中还需要适宜的盐(比如氯化钠、氯化锂或柠檬酸钠),其浓度优选在约1mM至约1000mM范围内。优选地将沉淀剂缓冲至约3.0至约5.0、优选约4.0的pH。可用于沉淀剂溶液中的具体缓冲剂可以变化并且是本领域熟知的(Scopes,Protein Purification:Principles and Practice,第三版,(1994)Springer-Verlag,New York)。有用的缓冲剂的实例包括但不限于HEPES、Tris、MES和乙酸盐。晶体可以在宽范围的温度(包括2℃、4℃、8℃和26℃)下生长。

[0518] 可使用熟知的X射线衍射技术研究抗体:抗原晶体,并且可使用计算机软件(比如X-PLOR(Yale University,1992,由Molecular Simulations公司发布;例如参见Blundell&Johnson(1985)Meth.Enzymol.114&115,H.W.Wyckoff等人编辑,Academic Press;美国专利申请公开号2004/0014194)以及BUSTER(Bricogne(1993)Acta Cryst.D49:37-60;Bricogne(1997)Meth.Enzymol.276A:361-423,Carter和Sweet编辑;Roversi等人(2000)Acta Cryst.D56:1313-1323)对其进行精修,将这些参考文献的公开内容通过提述完整并入本文。

[0519] 抗CD73抗体可与任何具有本文所述的氨基酸序列的抗CD73抗体结合相同表位,正如通过表位定位技术(如本文所述的技术)确定的。抗CD73抗体还可具有类似的与人CD73的相互作用,例如其可具有表31中所示的至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%或更大的相互作用,正如通过X射线晶体学确定的。

[0520] VII.工程改造的修饰的抗体

[0521] VH和VL区

[0522] 还提供了工程改造的修饰的抗体,所述抗体可以使用具有本文中公开的一个或多个V_H和/或V_L序列的抗体作为起始材料将修饰的抗体工程改造而制得,所述修饰的抗体可具

有相比于起始抗体的改变的性质。可以通过修饰例如处于一个或多个CDR区和/或一个或多个框架区内的一个或两个可变区(即,V_H和/或V_L)内的一个或多个残基将抗体工程改造。另外地或可替代地,可以通过修饰恒定区内的残基将抗体工程改造,以便例如改变抗体的效应子功能。

[0523] 可以实施的可变区工程改造的一种类型是CDR移植。抗体主要通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)内的氨基酸残基与靶抗原相互作用。由于这个原因,在各个抗体之间的CDR内的氨基酸序列比CDR外部的序列更加多样化。由于CDR序列负责大多数抗体-抗原相互作用,因此有可能通过构建表达载体来表达模拟特定的参考抗体的性质的重组抗体,所述表达载体包含来自特定的参考抗体的CDR序列,这些CDR序列被移植到来自具有不同性质的不同抗体的框架序列上(参见,例如,Riechmann,L.等人,(1998)Nature 332:323-327;Jones,P.等人,(1986)Nature 321:522-525;Queen,C.等人,(1989)Proc.Natl.Acad.参见U.S.A.86:10029-10033;授予Winter的美国专利No.5,225,539和授予Queen等人的美国专利No.5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370)。

[0524] 因此,本文所述的另一实施方案涉及分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包括包含分别选自下组的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:5、17、33、41、53、61、69、81和89;SEQ ID NO:6、18、34、42、54、62、70、82和90;以及SEQ ID NO:7、19、35、43、55、63、71、83和91;所述轻链可变区包括包含分别选自下组的氨基酸序列的CDR1、CDR2和CDR3序列:SEQ ID NO:9、13、21、25、29、37、45、49、57、65、73、77、85和93;SEQ ID NO:10、14、22、26、30、38、46、50、58、66、74、78、86和94;以及SEQ ID NO:11、15、23、27、31、39、47、51、59、67、75、79、87和95。因此,这样的抗体含有单克隆抗体CD73.4-1、CD73.4-2、11F11-1、11F11-2、4C3-1、4C3-2、4C3-3、4D4、10D2-1、10D2-2、11A6、24H2、5F8-1、5F8-2、6E11和7A11的V_H和V_L CDR序列,但也可含有与这些抗体不同的框架序列。

[0525] 这样的框架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共DNA数据库或公开参考文献获得。例如,人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可以在"VBase"人种系序列数据库(可以在互联网www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase访问)以及下列文献中找到:Kabat,E.A.等人,(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242;Tomlinson,I.M.等人,(1992)"The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops"J.Mol.Biol.227:776-798;和Cox,J.P.L.等人,(1994)"A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage"Eur.J.Immunol.24:827-836;将每一文献的内容通过提述明确地并入本文。

[0526] 用于本文所述抗体的优选框架序列是与本文所述抗体所用的框架序列在结构上相似的那些框架序列。V_H CDR1、2和3序列以及V_L CDR1、2和3序列可以被移植到具有与在框架区序列所来源的种系免疫球蛋白基因中发现的相同的序列的框架区上,或者CDR序列可以被移植到与种系序列相比含有至多20个、优选保守的氨基酸取代的框架区上。例如,已经发现,在某些情况下,对框架区内的残基进行突变以保持或增强抗体的抗原结合能力是有利的(参见,例如授予Queen等人的美国专利No.5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,

370)。

[0527] 本文所述的工程改造的抗体包括其中已经对V_H和/或V_L内的框架残基进行修饰以例如改良抗体特性的那些。一般来说,为了降低抗体的免疫原性而进行这样的框架修饰。例如,一种方式是将一个或多个框架残基“回复突变”成相应的种系序列。更具体地说,经过体细胞突变的抗体可能含有与该抗体所来源的种系序列不同的框架残基。这样的残基可以通过比较抗体框架序列与抗体所来源的种系序列加以鉴定。为了使框架区序列恢复其种系构型,可以通过例如定点诱变或PCR介导的诱变将体细胞突变“回复突变”成其种系序列。预期也涵盖这样的“回复突变”的抗体。另一个类型的框架修饰涉及突变在框架区内、或甚至在一个或多个CDR区内的一个或多个残基,以去除T细胞表位,由此降低抗体的潜在免疫原性。这种方式也称为“去免疫化(deimmunization)”,并且进一步详细描述于授予Carr等人的美国专利公开No.20030153043中。

[0528] 另一种类型的可变区修饰是突变CDR区内的氨基酸残基以改良感兴趣抗体的一种或多种结合性质(例如,亲和力)。可以进行定点诱变或PCR介导的诱变以引入突变,并且可以在如本文所述并且在实施例中提供的体外或体内测定中评价对抗体结合的影响或其他感兴趣的功能性质。优选引入保守修饰(如上文论述)。突变可以是氨基酸添加、缺失或优选取代。而且,一般改变CDR区内的不超过一个、二个、三个、四个或五个残基。

[0529] 因此,还提供了包含重链可变区的分离的抗CD73单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含:(a)V_H CDR1区,其包含选自SEQ ID NO:5、17、33、41、53、61、69、81和89的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:5、17、33、41、53、61、69、81和89相比具有一个、二个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列;(b)V_H CDR2区,其包含选自SEQ ID NO:6、18、34、42、54、62、70、82和90的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:6、18、34、42、54、62、70、82和90相比具有一个、二个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列;(c)V_H CDR3区,其包含选自SEQ ID NO:7、19、35、43、55、63、71、83和91的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:7、19、35、43、55、63、71、83和91相比具有一个、二个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列;(d)V_L CDR1区,其包含选自SEQ ID NO:9、13、21、25、29、37、45、49、57、65、73、77、85和93的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:9、13、21、25、29、37、45、49、57、65、73、77、85和93相比具有一个、二个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列;(e)V_L CDR2区,其包含选自SEQ ID NO:10、14、22、26、30、38、46、50、58、66、74、78、86和94的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:10、14、22、26、30、38、46、50、58、66、74、78、86和94相比具有一个、二个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列;(f)V_L CDR3区,其包含选自SEQ ID NO:11、15、23、27、31、39、47、51、59、67、75、79、87和95的氨基酸序列,或者与SEQ ID NO:11、15、23、27、31、39、47、51、59、67、75、79、87和95相比具有一个、二个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列。

[0530] 抗体CDR中的甲硫氨酸残基可能被氧化,导致潜在的化学降解和随后抗体效力的降低。因此,还提供了这样的抗CD73抗体,其重链和/或轻链CDR中的一个或多个甲硫氨酸残基被不会发生氧化降解的氨基酸残基代替。

[0531] 类似地,可以从抗CD73抗体、具体而言从CDR中去除脱酰胺位点。

[0532] 优选消除抗原结合结构域内的潜在糖基化位点,以防止可能干扰抗原结合的糖基化。参见,例如美国专利No.5,714,350。

[0533] 靶向性抗原结合

[0534] 在多个实施方案中，本发明抗体被修饰以选择性阻断其中抗原结合将有害的组织和环境中的抗原结合，但允许其中抗原结合将有益的组织和环境中的抗原结合。在一个实施方案中，产生与抗体的抗原结合表面特异性地结合且干扰抗原结合的封闭肽“掩蔽”，所述掩蔽通过肽酶可切割的接头与抗体的每一结合臂连接。例如，参见授予CytomX的美国专利No.8,518,404。这样的构建体可用于治疗在肿瘤微环境中蛋白酶水平与非肿瘤组织相比大大增加的癌症。选择性切割肿瘤微环境中的可切割接头可以使掩蔽/阻断肽解离，使得抗原能够在肿瘤中选择性地结合，而不是在抗原结合可能引起不想要的副作用的周围组织中结合。

[0535] 或者，在相关实施方案中，开发了包含两个抗原结合结构域的二价结合化合物(“掩蔽配体”)，其与(二价)抗体的两个抗原结合表面结合并干扰抗原结合，其中两个结合结构域掩蔽通过例如可经肽酶切割的可切割接头彼此连接(而不是与抗体连接)。例如，参见授予Tegopharm公司的国际专利申请公开号WO 2010/077643。掩蔽配体可包括或衍生自抗体预期结合的抗原或可以独立方式产生。这样的掩蔽配体可用于治疗在肿瘤微环境中蛋白酶水平与非肿瘤组织相比大大增加的癌症。选择性切割肿瘤微环境中的可切割接头允许两个结合结构域彼此解离，从而降低对抗体的抗原结合表面的亲合力。由此掩蔽配体与抗体的解离使得抗原能够在肿瘤中选择性地结合，而不是在抗原结合可能引起不想要的副作用的周围组织中结合。

[0536] Fc和修饰的Fc

[0537] 治疗性抗体除了抗原结合结构域与抗原结合而产生活性(例如，在拮抗剂抗体的情况下，阻断同源配体或受体蛋白，或在激动剂抗体的情况下，诱导信号转导)之外，抗体的Fc部分通常还以复杂的方式与免疫系统相互作用以引出任何数量的生物效应。效应子功能，比如免疫球蛋白的Fc区负责许多重要的抗体功能，比如抗原依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)，导致靶细胞的杀死，尽管经由的机制不同。.

[0538] 抗CD73抗体可包含本文所述抗体的可变结构域、以及构成不同Fc区的恒定结构域，基于用于预期用途的抗体的生物活性(如果有的话)而选择。Salfeld(2007)Nat.Biotechnol.25:1369。例如，人IgG可分成四个亚类，IgG1、IgG2、IgG3和IgG4，且每个亚类均包含具有针对与一种或多种Fcγ受体(活化性受体FcγRI(CD64)、FcγRIIA、FcγRIIC(CD32)；FcγRIIIA和FcγRIIIB(CD16)以及抑制性受体FcγRIIB)的结合并且针对补体的第一成分(C1q)的独特特征的Fc区。人IgG1和IgG3与所有Fcγ受体结合；IgG2与$Fc\gamma RIIA_{H131}$结合，且以较低亲和力与$Fc\gamma RIIA_{R131}$、$Fc\gamma RIIIA_{V158}$结合；IgG4与FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIB、FcγRIIC和$Fc\gamma RIIIA_{V158}$结合；并且抑制性受体FcγRIIB对IgG1、IgG2及IgG3的亲和力低于对所有其他Fcγ受体的亲和力。Bruhns等人(2009)Blood 113:3716。研究已显示，FcγRI不与IgG2结合，并且FcγRIIIB不与IgG2或IgG4结合。同前。一般而言，对于ADCC活性，人IgG1≥IgG3＞＞IgG4≥IgG2。因此，例如，可选择IgG1恒定结构域而非IgG2或IgG4用于在期望ADCC情况下的药物中；如果活化表达FcγRIIIA的NK细胞、单核细胞或巨噬细胞，则可选择IgG3；并且如果抗体用于使过敏患者脱敏，则可选择IgG4。如果抗体缺乏所有效应子功能是期望的，则也可选择IgG4。

[0539] 因此，本文所述的抗CD73可变区可与Fc连接(例如，共价连接或融合)，例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc，其可属于任何同种异型或异同种异型(isoallotype)，例如对于IgG1:G1m、G1m1(a)、G1m2(x)、G1m3(f)、G1m17(z)；对于IgG2:G2m、G2m23(n)；对于IgG3:G3m、G3m21(g1)、G3m28(g5)、G3m11(b0)、G3m5(b1)、G3m13(b3)、G3m14(b4)、G3m10(b5)、G3m15(s)、G3m16(t)、G3m6(c3)、G3m24(c5)、G3m26(u)、G3m27(v)；例如，参见Jefferis等人(2009)mAbs 1:1)。同种异型的选择可受到潜在免疫原性问题的影响，例如必须将抗药物抗体的形成降低至最低限度。

[0540] 通常为了改变抗体的一种或多种功能性质，比如血清半衰期、补体结合、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞介导的细胞毒性，本文所述的可变区可与包含一个或多个修饰的Fc连接。此外，为了改变抗体的一或多种功能性质，本文所述抗体可被化学修饰(例如，可将一个或多个化学模块附接至抗体)或可被修饰为改变其糖基化。这些实施方案的每一者进一步详述于下文。Fc区中残基的编号依据为Kabat的EU索引。参考后面为在天然氨基酸的位置处被取代的氨基酸、任选地在此位置的天然残基之前的残基编号，提供本文中公开的序列变体。在给定位置处可存在多个氨基酸的情况下，例如如果天然存在的同种型之间的序列不同或如果在该位置可取代为多个突变，则通过斜线将其分开(例如“X/Y/Z”)。

[0541] 例如，可以在Fc区中进行修饰以产生具有(a)增加或降低的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、(b)增加或降低的补体介导的细胞毒作用(CDC)、(c)增加或降低的对C1q的亲和力、和/或(d)相对于亲本Fc对Fc受体增加或降低的亲和力的Fc变体。这样的Fc区变体通常包括Fc区中的至少一个氨基酸修饰。组合性氨基酸修饰被认为是特别期望的。例如，变体Fc区可以在其中包含二个、三个、四个、五个等取代，例如在本文中鉴定的特定Fc区位置的取代。示例性Fc序列变体公开于本文中，并且还提供于美国专利No.5,624,821;6,277,375;6,737,056;6,194,551;7,317,091;8,101,720;PCT专利公开WO 00/42072;WO 01/58957;WO 04/016750;WO 04/029207;WO 04/035752;WO 04/074455;WO 04/099249;WO 04/063351;WO 05/070963;WO 05/040217;WO 05/092925和WO 06/020114中。

[0542] 降低效应子功能

[0543] 可通过修饰Fc区降低ADCC活性。在某些实施方案中，可以去除影响与Fc受体结合的位点，优选为补救受体结合位点之外的位点。在其他实施方案中，可以修饰Fc区以去除ADCC位点。ADCC位点是本领域已知的；例如，关于IgG1中的ADCC位点参见Sarmay等人(1992)Molec.Immunol.29(5):633-9。在一个实施方案中，人IgG1的G236R和L328R变体有效地消除FcγR结合。Horton等人(2011)J.Immunol.186:4223和Chu等人(2008)Mol.Immunol.45:3926。在其他实施方案中，具有降低的与FcγR结合的Fc包含氨基酸取代L234A、L235E和G237A。Gross等人(2001)Immunity 15:289。

[0544] 还可通过修饰Fc区降低CDC活性。在IgG1位置D270、K322、P329和P331的突变，特别是丙氨酸突变D270A、K322A、P329A和P331A显著降低了相应抗体结合C1q及活化补体的能力。Idusogie等人(2000)J.Immunol.164:4178;WO 99/51642。已显示IgG1的位置331的修饰(例如P331S)降低补体结合。Tao等人(1993)J.Exp.Med.178:661以及Canfield和Morrison(1991)J.Exp.Med.173:1483。在另一个实例中，氨基酸位置231到239内的一个或多个氨基酸残基被改变，从而降低抗体固定补体的能力。WO 94/29351。

[0545] 在一些实施方案中吗，具有降低的补体固定的Fc(例如，IgG1Fc)具有氨基酸取代

A330S和P331S。Gross等人(2001)Immunity 15:289。

[0546] 对于要完全避免效应子功能的应用,例如当单独的抗原结合足以产生期望治疗益处,而效应子功能只会导致不期望的副作用(或增加其风险)时,可使用IgG4抗体,或可设计缺乏Fc区或其实质性部分的抗体或片段,或可使Fc突变以完全消除糖基化(例如N297A)。或者,已产生缺乏效应子功能的人IgG2(C_H1结构域和铰链区)和人IgG4(C_H2和C_H3结构域)的杂合构建体,其缺乏结合FcγR的能力(像IgG2)且不能激活补体(像IgG4)。Rother等人(2007)Nat.Biotechnol.25:1256。还参见Mueller等人(1997)Mol.Immunol.34:441;Labriin等人(2008)Curr.Op.Immunol.20:479(论述了通常降低效应子功能的Fc修饰)。

[0547] 在其他实施方案中,通过用不同的氨基酸残基代替至少一个氨基酸残基改变Fc区来降低抗体的所有效应子功能。例如,选自氨基酸残基234、235、236、237、297、318、320和322的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸残基代替,使得抗体对效应子配体的亲和力降低,但是保留亲本抗体的抗原结合能力。对其亲和力改变的效应子配体可以是例如Fc受体(残基234、235、236、237、297)或补体的C1成分(残基297、318、320、322)。美国专利No.5,624,821和5,648,260,两者都授予Winter等人。

[0548] WO 88/007089提出修饰IgG Fc区以降低与FcγRI的结合来降低ADCC(234A;235E;236A;G237A)或阻断与补体成分C1q的结合来消除CDC(E318A或V/K320A和K322A/Q)。还参见Duncan&Winter(1988)Nature 332:563;Chappel等人(1991)Proc.Nat'l Acad.Sci.(USA)88:9036;和Sondermann等人(2000)Nature 406:267(论述了这些突变对FcγRIII结合的影响)。

[0549] 降低效应子功能的Fc修饰还包括在位置234、235、236、237、267、269、325和328处的取代、插入和缺失,比如234G、235G、236R、237K、267R、269R、325L和328R。Fc变体可以包括236R/328R。降低FcyR和补体相互作用的其他修饰包括取代297A、234A、235A、237A、318A、228P、236E、268Q、309L、330S、331S、220S、226S、229S、238S、233P和234V。这些和其他修饰综述于Strohl(2009)Current Opinion in Biotechnology 20:685-691中。可通过突变在233-236和327-331的一个或多个位置处的IgG残基(比如IgG1中的E233P、L234V、L235A,任选地G236Δ、A327G、A330S和P331S;IgG4中的E233P、F234V、L235A,任选地G236Δ;以及IgG2中的A330S和P331S)降低效应子功能(ADCC和补体激活两者),同时维持新生FcR结合(维持半衰期)。参见Armour等人(1999)Eur.J.Immunol.29:2613;WO 99/58572。降低效应子功能的其他突变包括IgG1中的L234A和L235A(Alegre等人(1994)Transplantation 57:1537);IgG2中的V234A和G237A(Cole等人(1997)J.Immunol.159:3613;还参见美国专利No.5,834,597);以及IgG4的S228P和L235E(Reddy等人(2000)J.Immunol.164:1925)。用于降低人IgG1中的效应子功能的突变的另一组合包括L234F、L235E和P331S。Oganesyan等人(2008)Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.64:700。总体上参见Labrijn等人(2008)Curr.Op.Immunol.20:479。发现在Fc(IgG1)融合蛋白(阿巴他赛(abatacept))背景下降低效应子功能的其他突变是C226S、C229S和P238S(EU残基编号)。Davis等人(2007)J.Immunol.34:2204。

[0550] 其他具有降低的ADCC和/或CDC的Fc变体公开于Glaesner等人(2010)Diabetes Metab.Res.Rev.26:287(在IgG4中降低ADCC和ADCP的F234A和L235A);Hutchins等人(1995)Proc.Nat'l Acad.Sci.(USA)92:11980(IgG4中的F234A、G237A和E318A);An等人(2009)

MAbs 1:572和美国专利申请公开2007/0148167(IgG2中的H268Q、V309L、A330S和P331S)；McEarchern等人(2007)Blood 109:1185(IgG1中的C226S、C229S、E233P、L234V、L235A)；Vafa等人(2014)Methods 65:114(IgG2中的V234V、G237A、P238S、H268A、V309L、A330S、P331S)。

[0551] 在某些实施方案中，选择基本上无效应子功能的Fc，即，它具有降低的与FcγR结合及降低的补体结合。无效应子的示例性Fc(例如，IgG1 Fc)包含以下五个突变:L234A、L235E、G237A、A330S和P331S。Gross等人(2001)Immunity 15:289。包含这些突变的示例性重链在序列表中列出，如表37中详述。这五个取代也可与N297A组合以消除糖基化。

[0552] 增强效应子功能

[0553] 或者，可通过修饰Fc区增加ADCC活性。关于ADCC活性，人IgG1≥IgG3＞＞IgG4≥IgG2，因此可选择IgG1恒定结构域而不是IgG2或IgG4用于在期望ADCC情况下的药物中。或者，通过修饰下列位置的一个或多个氨基酸:234、235、236、238、239、240、241、243、244、245、247、248、249、252、254、255、256、258、262、263、264、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、299、301、303、305、307、309、312、313、315、320、322、324、325、326、327、329、330、331、332、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、433、434、435、436、437、438或439，可以修饰Fc区，以增加抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或增加对FcγR受体的亲和力。参见WO 2012/142515;还参见WO 00/42072。示例性取代包括236A、239D、239E、268D、267E、268E、268F、324T、332D、和332E。示例性变体包括239D/332E、236A/332E、236A/239D/332E、268F/324T、267E/268F、267E/324T、和267E/268F/324T。例如，已显示包含可任选地与I332E组合的G236A变体的人IgG1Fc使FcγIIA/FcγIIB结合亲和比增加约15倍。Richards等人(2008)Mol.Cancer Therap.7:2517;Moore等人(2010)mAbs 2:181。其他用于增强FcγR和补体相互作用的修饰包括但不限于如下取代:298A、333A、334A、326A、247I、339D、339Q、280H、290S、298D、298V、243L、292P、300L、396L、305I、和396L。这些和其他修饰综述于Strohl(2009)Current Opinion in Biotechnology 20:685-691中。具体地说，可通过改变IgG1的位置E333(例如E333A)来增强ADCC和CDC两者。Shields等人(2001)J.Biol.Chem.276:6591。使用P247I和A339D/Q突变来增强IgG1中的效应子功能公开于WO 2006/020114中，并且D280H、K290S±S298D/V公开于WO 2004/074455中。已显示K326A/W和E333A/S变体增加人IgG1中的效应子功能，并且E333S增加IgG2中的效应子功能。Idusogie等人(2001)J.Immunol.166:2571。

[0554] 具体地说，已经定位人IgG1上针对FcγR1、FcγRII、FcγRIII和FcRn的结合位点，并且已经描述具有改善结合的变体。Shields等人(2001)J.Biol.Chem.276:6591-6604。在位置256、290、298、333、334和339的特定突变显示改善与FcγRIII的结合，包括组合突变体T256A/S298A、S298A/E333A、S298A/K224A和S298A/E333A/K334A(具有增强的FcγRIIIa结合和ADCC活性)。已鉴定了具有强烈增强的与FcγRIIIa结合的其他IgG1变体，包括具有S239D/I332E和S239D/I332E/A330L突变的变体，其在食蟹猴中显示对FcγRIIIa的亲和力最大增加、FcγRIIb结合减少以及强的细胞毒活性。Lazar等人(2006)Proc.Nat'l Acad Sci.(USA)103:4005;Awan等人(2010)Blood 115:1204;Desjariais&Lazar(2011)Exp.Cell Res.317:1278。抗体(比如阿伦单抗(alemtuzumab)(CD52特异性)、曲妥珠单抗

(trastuzumab)(HER2/neu特异性)、利妥昔单抗(rituximab)(CD20特异性)和西妥昔单抗(cetuximab)(EGFR特异性))中三重突变的引入转换成大大增强的体外ADCC活性,并且S239D/I332E变体在猴中显示增强的使B细胞耗竭的能力。Lazar等人(2006)Proc.Nat'l Acad Sci.(USA)103:4005。另外,已鉴定了含有L235V、F243L、R292P、Y300L、V305I和P396L突变的IgG1突变体,其在B细胞恶性肿瘤和乳腺癌模型中在表达人FcγRIIIa的转基因小鼠中展现增强的FcγRIIIa结合和同时增强的ADCC活性。Stavenhagen等人(2007)Cancer Res.67:8882;美国专利No.8,652,466;Nordstrom等人(2011)Breast Cancer Res.13:R123。

[0555] 不同的IgG同种型也展现差异性CDC活性(IgG3＞IgG1＞＞IgG2≈IgG4)。Dangl等人(1988)EMBO J.7:1989。对于其中期望增强CDC的用途,还可引入增加与C1q结合的突变。可通过IgG2中K326和/或E333的突变比如K326W(其降低ADCC活性)和E333S以增加与补体级联的第一成分C1q的结合,从而增强募集补体的能力(CDC)。Idusogie等人(2001)J.Immunol.166:2571。将S267E/H268F/S324T(单独或以任何组合)引入人IgG1中增强C1q结合。Moore等人(2010)mAbs 2:181。Natsume等人(2008)Cancer Res.68:3863(其中的图1中)的IgG1/IgG3杂合同种型抗体"113F"的Fc区也赋予增强的CDC。还参见Michaelsen等人(2009)Scand.J.Immunol.70:553和Redpath等人(1998)Immunology 93:595。

[0556] 可增加或降低效应子功能的另外的突变公开于Dall'Acqua等人(2006)J.Immunol.177:1129中。还参见Carter(2006)Nat.Rev.Immunol.6:343;Presta(2008)Curr.Op.Immunol.20:460。

[0557] 还可使用增强对抑制性受体FcyRIIb的亲和力的Fc变体,例如以增强细胞凋亡诱导的活性或佐剂活性。Li&Ravetch(2011)Science 333:1030;Li&Ravetch(2012)Proc.Nat'l Acad.Sci(USA)109:10966;美国专利申请公开2014/0010812。这样的变体可以给抗体提供与FcγRIIb^{+}细胞(包括,例如,B细胞和单核细胞)相关的免疫调节活性。在一个实施方案中,Fc变体提供了相对于一种或多种活化受体的选择性增强的与FcγRIIb的亲和力。用于改变与FcγRIIb结合的修饰包括选自在根据EU索引选自下组位置处的一个或多个修饰:234、235、236、237、239、266、267、268、325、326、327、328、和332。用于增强FcγRIIb亲和力的示例性取代包括但不限于:234D、234E、234F、234W、235D、235F、235R、235Y、236D、236N、237D、237N、239D、239E、266M、267D、267E、268D、268E、327D、327E、328F、328W、328Y、和332E。示例性取代包括235Y、236D、239D、266M、267E、268D、268E、328F、328W、和328Y。其他为了增强与FcγRIIb结合的Fc变体包括235Y/267E、236D/267E、239D/268D、239D/267E、267E/268D、267E/268E、和267E/328F。具体地说,人IgG1的S267E、G236D、S239D、L328F和I332E变体(包括S267E+L328F双重变体)在特异性增强对抑制性FcγRIIb受体的亲和力中具有特殊价值。Chu等人(2008)Mol.Immunol.45:3926;美国专利申请公开2006/0024298;WO 2012/087928。可通过添加P238D取代获得增强的对FcγRIIb的特异性(与FcγRIIa^{R131}不同)。Mimoto等人(2013)Protein.Eng.Des.&Selection 26:589;WO 2012/115241。

[0558] 在某些实施方案中,修饰抗体以增加其生物半衰期。不同的方法是可能的。例如,这可以通过增加Fc区对FcRn的结合亲和力来实现。在一个实施方案中,改变抗体内的CH1或CL区,使之含有取自IgG Fc区CH2结构域的两个环的补救受体结合表位,如Presta等人的美国专利No.5,869,046和6,121,022中所述。增加对FcRn的结合和/或改善药代动力学性质的

其他示例性Fc变体包括在位置259、308和434处的取代，包括例如259I、308F、428L、428M、434S、434H、434F、434Y、和434M。其他增加Fc与FcRn结合的变体包括：250E、250Q、428L、428F、250Q/428L(Hinton等人，2004，J.Biol.Chem.279(8)：6213-6216，Hinton等人，2006Journal of Immunology 176:346-356)、256A、272A、305A、307A、311A、312A、378Q、380A、382A、434A(Shields等人，Journal of Biological Chemistry，2001，276(9)：6591-6604)、252F、252Y、252W、254T、256Q、256E、256D、433R、434F、434Y、252Y/254T/256E、433K/434F/436H(Dall Acqua等人，Journal of Immunology，2002，169:5171-5180，Dall′Acqua等人，2006，Journal of Biological Chemistry 281:23514-23524)。参见美国专利No.8,367,805。

[0559] 已经提出修饰IgG Fc中的某些保守残基(I253/H310/Q311/H433/N434)(比如N434A变体)(Yeung等人(2009)J.Immunol.182:7663)作为增加FcRn亲和力的方式，由此延长循环抗体的半衰期。WO 98/023289。已显示包含M428L和N434S的组合Fc变体增加了FcRn结合且使血清半衰期延长高达五倍。Zalevsky等人(2010)Nat.Biotechnol.28:157。包含T307A、E380A和N434A修饰的组合Fc变体也延长了IgG1抗体的半衰期。Petkova等人(2006)Int.Immunol.18:1759。另外，还显示包含M252Y/M428L、M428L/N434H、M428L/N434F、M428L/N434Y、M428L/N434A、M428L/N434M和M428L/N434S变体的组合Fc变体延了半衰期。WO 2009/086320。

[0560] 此外，包含M252Y、S254T和T256E的组合Fc变体使半衰期几乎延长4倍。Dall'Acqua等人(2006)J.Biol.Chem.281:23514。已使用提供增加的FcRn亲和力但降低的pH依赖性的相关IgG1修饰(M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F)来产生IgG1构建体(“MST-HN Abdeg”)，用作阻止其他抗体与FcRn结合的竞争剂，从而增加所述其他抗体(内源IgG(例如在自身免疫环境下)或其他外源(治疗性)mAb)的清除率。Vaccaro等人(2005)Nat.Biotechnol.23:1283;WO 2006/130834。

[0561] 其他增加FcRn结合的修饰描述于Yeung等人(2010)J.Immunol.182:7663-7671;6,277,375;6,821,505;WO 97/34631;WO 2002/060919中。

[0562] 在某些实施方案中，可使用杂合IgG同种型来增加FcRn结合，并且潜在地延长半衰期。例如，通过将IgG1的CH2和/或CH3区中的位置取代为来自IgG3中的在这两种同种型之间存在差异的位置上的氨基酸，可以构建IgG1/IgG3杂合变体。因此，可以构建这样的杂合变体IgG抗体，其包含一个或多个取代，例如274Q、276K、300F、339T、356E、358M、384S、392N、397M、422I、435R、和436F。在本文所述的其他实施方案中，通过将IgG2的CH2和/或CH3区中的位置取代为来自IgG1中的在这两种同种型之间存在差异的位置上的氨基酸，可以构建IgG1/IgG2杂合变体。因此，可以构建这样的杂合变体IgG抗体，其包含一个或多个取代，例如一个或多个以下氨基酸取代：233E、234L、235L、-236G(是指在位置236处插入甘氨酸)、和327A。参见美国专利No.8,629,113。已产生据称延长血清半衰期并改善表达的IgG1/IgG2/IgG4序列的杂合体。美国专利No.7,867,491(其中的序列号18)。

[0563] 还可通过聚乙二醇化来延长本发明抗体的血清半衰期。可以将抗体聚乙二醇化，以便例如增加抗体的生物(例如，血清)半衰期。为了将抗体聚乙二醇化，通常在一个或多个PEG基团附接在抗体或抗体片段上的条件下，使抗体或其片段与聚乙二醇(PEG)试剂比如PEG的反应性酯或醛衍生物反应。优选地，通过与反应性PEG分子(或类似的反应性水溶性聚

合物)的酰化反应或烷基化反应进行聚乙二醇化。如本文中使用的,术语"聚乙二醇"预期涵盖任何形式的用于衍生化其他蛋白质的PEG,比如单(C1-C10)烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。在某些实施方案中,有待聚乙二醇化的抗体是无糖基化抗体。用于聚乙二醇化蛋白质的方法是本领域已知的,并可适用于本文所述的抗体。例如,参见Nishimura等人的EP 0154316和Ishikawa等人的EP 0401384。

[0564] 或者,在一些情况下,可能希望缩短而非延长本发明抗体的半衰期。人IgG1的Fc中的修饰(比如I253A(Homick等人(2000)J.Nucl.Med.41:355)和H435A/R I253A或H310A(Kim等人(2000)Eur.J.Immunol.29:2819))可降低FcRn结合,由此缩短半衰期(增加清除率),以供在快速清除率是优选的情况(例如医学成像)下使用。还参见Kenanova等人(2005)Cancer Res.65:622。增强清除率的其他方式包括将本发明的抗原结合结构域格式化为缺乏结合FcRn能力的抗体片段,例如Fab片段。这样的修饰可将抗体的循环半衰期从几周缩短至数小时。然后,如果需要,可利用抗体片段的选择性聚乙二醇化来微调(延长)抗体片段的半衰期。Chapman等人(1999)Nat.Biotechnol.17:780。还可使抗体片段与例如融合蛋白构建体中的人血清白蛋白融合来延长半衰期。Yeh等人(1992)Proc.Nat'l Acad.Sci.89:1904。或者,可以构建双特异性抗体,其具有本发明的第一抗原结合结构域和与人血清白蛋白(HSA)结合的第二抗原结合结构域。参见国际专利申请公开WO 2009/127691及其中引证的专利参考文献。或者,可将特殊多肽序列例如"XTEN"多肽序列添加至抗体片段来延长半衰期。Schellenberger等人(2009)Nat.Biotechnol.27:1186;国际专利申请公开WO 2010/091122。另外的Fc变体

[0565] 在使用IgG4恒定结构域时,通常优选包括取代S228P,该取代模拟IgG1中的铰链序列并由此使IgG4分子稳定,例如减少被治疗患者中治疗性抗体与内源IgG4之间的Fab臂交换。Labrijn等人(2009)Nat.Biotechnol.27:767;Reddy等人(2000)J.Immunol.164:1925。

[0566] 可通过D221G和K222S修饰消除IgG1构建体的铰链中的潜在蛋白酶切割位点,从而增加抗体的稳定性。WO 2014/043344。

[0567] Fc变体与其配体(Fc受体)的亲和力和结合性质可以通过本领域已知的多种体外测定方法(基于生物化学或免疫学的测定法)加以确定,包括但不限于,平衡法(例如,酶联免疫吸附测定法(ELISA)、或放射免疫测定(RIA))、或动力学(例如,BIACORE® SPR分析)、和其他方法,如间接结合测定法、竞争性抑制测定法、荧光共振能量转移(FRET)、凝胶电泳和色谱法(例如,凝胶过滤)。这些方法和其他的方法可以利用位于一个或多个被检查的组分上的标记物和/或采用多种检测方法,包括但不限于,生色、荧光、发光、或同位素标记物。关于结合亲和力和动力学的详细描述可以在侧重于抗体-免疫原相互作用的Paul,W.E.编辑的Fundamental Immunology,第4版,Lippincott-Raven,Philadelphia(1999)中找到。

[0568] 仍然在其他实施方案中,抗体的糖基化被修饰以增加或降低效应子功能。例如,通过突变在位置297处的保守天冬酰胺残基(例如N297A),可以产生缺乏所有效应子功能的无糖基化抗体,由此消除补体及Fcγ RI结合。Bolt等人(1993)Eur.J.Immunol.23:403。还参见Tao和Morrison(1989)J.Immunol.143:2595(使用IgG1中的N297Q来消除位置297处的糖基化)。

[0569] 虽然无糖基化抗体通常缺乏效应子功能,但可引入突变来恢复此功能。可进一步

突变无糖基化抗体(例如源自N297A/C/D/或H突变或在不使蛋白质糖基化的系统(例如大肠杆菌)中产生的那些)以恢复FcγR结合,例如S298G和/或T299A/G/或H(WO 2009/079242)或E382V和M428I(Jung等人(2010)Proc.Nat'l Acad.Sci(USA)107:604)。

[0570] 另外,可通过改变糖基化来产生具有增强的ADCC的抗体。例如,已显示基于改善的与FcγRIIIa的结合,从重链Asn297连接的寡糖中去除岩藻糖会增强ADCC。Shields等人(2002)JBC 277:26733;Niwa等人(2005)J.Immunol.Methods 306:151;Cardarelli等人(2009)Clin.Cancer Res.15:3376(MDX-1401);Cardarelli等人(2010)Cancer Immunol.Immunotherap.59:257(MDX-1342)。可以例如在缺乏岩藻糖基转移酶(FUT8)的基因敲除中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中(Yamane-Ohnuki等人(2004)Biotechnol.Bioeng.87:614)或在产生无岩藻糖基化抗体的其他细胞中产生这样的低岩藻糖抗体。例如,参见Zhang等人(2011)mAbs 3:289及Li等人(2006)Nat.Biotechnol.24:210(两者都描述了在糖工程改造的巴斯德毕赤酵母中的抗体产生);Mossner等人(2010)Blood 115:4393;Shields等人(2002)J.Biol.Chem.277:26733;Shinkawa等人(2003)J.Biol.Chem.278:3466;EP 1176195B1。还可以如PCT公开WO 03/035835中所述增强ADCC,其中公开了变体CHO细胞系Lec13的用途,所述细胞系具有降低的将岩藻糖附接在Asn(297)连接的碳水化合物上的能力,同样导致在该宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖化(还参见Shields,R.L.等人(2002)J.Biol.Chem.277:26733-26740)。或者,可在抗体产生期间将岩藻糖类似物添加至培养基中以抑制岩藻糖纳入抗体上的碳水化合物中。WO 2009/135181。

[0571] 增加抗体连接的寡糖中的二等分GlcNac结构也增强了ADCC。Umana等人的PCT公开WO 99/54342描述了这样的细胞系,其被工程改造为表达糖蛋白修饰性糖基转移酶(例如,β(1,4)-N-乙酰葡糖氨基转移酶III(GnTIII)),使得在所述工程改造的细胞系中表达的抗体展现增加的二等分GlcNac结构,导致抗体的ADCC活性增加(还参见,Umana等人(1999)Nat.Biotech.17:176-180)。

[0572] 本领域已开发另外的不含半乳糖、唾液酸、岩藻糖和木糖残基的糖基化变体(所谓的GNGN糖型),其展现增强的ADCC和ADCP但降低的CDC;以及不含唾液酸、岩藻糖和木糖的其他糖基化变体(所谓的G1/G2糖型),其展现增强的ADCC、ADCP和CDC。美国专利申请公开号2013/0149300。任选地在遗传修饰的已敲除内源木糖基及岩藻糖基转移酶基因的本氏烟草(N.benthamiana)植物中产生具有这些糖基化模式的抗体。

[0573] 通过改变附接在Fc区的Asn297的碳水化合物链的α2,6唾液酰含量,糖工程改造(glycoengineering)也可用于改变IgG构建体的抗炎特性,其中增加的α2,6唾液酸化形式比例产生增强的抗炎作用。参见Nimmerjahn等人(2008)Ann.Rev.Immunol.26:513。相反,降低具有a2,6唾液酸化碳水化合物的抗体的比例可能在不想要抗炎特性的情况下是有用的。例如,通过选择性纯化a2,6唾液酸化形式或通过酶修饰改变抗体的a2,6唾液酸化含量的方法由美国专利申请公开号2008/0206246提供。在其他实施方案中,例如通过包含F241A修饰,可以修饰Fc区的氨基酸序列,以模拟α2,6唾液酸化的效应。WO 2013/095966。

[0574] VIII.抗体的物理性质

[0575] 本文所述抗体可在轻链或重链可变区中含有一个或多个糖基化位点。由于改变的抗原结合,这样的糖基化位点可增加抗体的免疫原性或改变抗体的pK(Marshall等人(1972)Annu Rev Biochem 41:673-702;Gala和Morrison(2004)J.Immunol 172:5489-94;

Wallick等人(1988)J Exp Med 168:1099-109;Spiro(2002)Glycobiology 12:43R-56R;Parekh等人(1985)Nature 316:452-7;Mimura等人(2000)Mol Immunol37:697-706)。已知糖基化在含有N-X-S/T序列的基序处发生。在一些情况下,优选具有不含可变区糖基化的抗CD73抗体。这可以通过选择可变区中不含糖基化基序的抗体或通过使糖基化区域内的残基突变来实现。

[0576] 在某些实施方案中,本文所述抗体不含天冬酰胺同分异构位点。天冬酰胺的脱酰胺可发生在N-G或D-G序列上,并且可导致生成异天冬氨酸残基,该残基可以向多肽链中引入扭结并可降低其稳定性(异天冬氨酸效应)。例如,如果在抗体的重链和/或轻链CDR序列中存在氨基酸序列Asp-Gly,则将该序列取代为不发生异构化的氨基酸序列。在一个实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:6中列出的重链可变区CDR2序列,但其中Asp-Gly序列(VILYDGSNKYYPDSVKG;SEQ ID NO:6)中的Asp或Gly被不发生异构化的氨基酸序列(例如Asp-Ser或Ser-Gly序列)代替。

[0577] 每一抗体将具有独特等电点(pI),其通常在6与9.5之间的pH范围内。IgG1抗体的pI通常在7-9.5的pH范围内,IgG4抗体的pI通常在6-8的pH范围内。有推测认为,pI在正常范围外的抗体可能在体内条件下具有一定的展开和不稳定性。因此,优选具有含有在正常范围内的pI值的抗CD73抗体。这可通过选择pI在正常范围内的抗体或使带电表面残基突变来实现。

[0578] 每一抗体将具有特征性熔融温度,其中熔融温度越高指示体内总稳定性越好(Krishnamurthy R和Manning M C(2002)Curr Pharm Biotechnol 3:361-71)。通常,优选地,T_{M1}(初始展开的温度)大于60℃、优选大于65℃、甚至更优选大于70℃。可使用差示扫描量热法(Chen等人(2003)Pharm Res 20:1952-60;Ghirlando等人(1999)Immunol Lett 68:47-52)或圆二色性(Murray等人(2002)J.Chromatogr Sci 40:343-9)来测量抗体的熔点。

[0579] 在优选的实施方案中,选择不快速降解的抗体。可使用毛细管电泳(CE)和MALDI-MS(Alexander A J和Hughes D E(1995)Anal Chem 67:3626-32)来测量抗体的降解。

[0580] 在另一优选的实施方案中,选择具有最小聚集效应的抗体,聚集效应可导致触发不期望的免疫应答和/或改变的或不利的药代动力学性质。通常,聚集度为25%或更小、优选20%或更小、甚至更优选15%或更小、甚至更优选10%或更小且甚至更优选5%或更小的抗体是可接受的。可通过若干技术(包括尺寸排阻色谱柱(SEC)、高效液相色谱法(HPLC)和光散射)来测量聚集度。

[0581] IX.工程改造抗体的方法

[0582] 如上文论述的,可使用具有本文中公开的V_H和V_L序列的抗CD73抗体,以便通过修饰VH和/或VL序列或与其附接的恒定区来产生新的抗CD73抗体。因此,在本文所述的另一方面,使用本文所述的抗CD73抗体(例如CD73.4、11F11、4C3、4D4、10D2、11A6、24H2、5F8、6E11和/或7A11)的结构特征来产生结构相关的抗CD73抗体,其保留本文所述抗体的至少一种功能性质,比如与人CD73和食蟹猴CD73结合。例如,可将11F11、4C3、4D4、10D2、11A6、24H2、5F8、6E11和/或7A11的一个或多个CDR区或其突变与已知框架区和/或其他CDR以重组方式组合以产生另外的重组工程改造的本文所述抗CD73抗体,如上文论述的。其他类型的修饰包括在前一部分中描述的那些。用于工程改造方法的起始材料为在本文中提供的V_H和/或V_L序列的一种或多种或其一个或多个CDR区。为产生工程改造的抗体,不必实际制备(即,表达

为蛋白质)具有在本文中提供的V_H和/或V_L序列的一种或多种或其一个或多个CDR区的抗体。而是,使用序列中所含的信息作为起始材料以产生衍生自初始序列的“第二代”序列,且然后制备“第二代”序列并使其表达为蛋白质。

[0583] 因此,本文中提供了制备抗CD73抗体的方法,其包括:

[0584] (a)提供:(i)重链可变区抗体序列,其包含选自SEQ ID NO:5、17、33、41、53、61、69、81和89的CDR1序列、选自SEQ ID NO:6、18、34、42、54、62、70、82和90的CDR2序列和/或选自SEQ ID NO:7、19、35、43、55、63、71、83和91的CDR3序列;以及(ii)轻链可变区抗体序列,其包含选自SEQ ID NO:9、13、21、25、29、37、45、49、57、65、73、77、85和93的CDR1序列、选自SEQ ID NO:10、14、22、26、30、38、46、50、58、66、74、78、86和94的CDR2序列和/或选自SEQ ID NO:11、15、23、27、31、39、47、51、59、67、75、79、87和95的CDR3序列;

[0585] (b)改变重链可变区抗体序列和/或轻链可变区抗体序列内的至少一个氨基酸残基以产生至少一个改变的抗体序列;并且

[0586] (c)使所述改变的抗体序列表达为蛋白质。

[0587] 可使用标准分子生物学技术来制备和表达所述改变的抗体序列。

[0588] 优选地,由所述改变的抗体序列编码的抗体是保留本文所述抗CD73抗体的功能性质中的一项、一些或全部的抗体,这些功能性质包括在表3中列出的那些。

[0589] 所述改变的抗体可展现使用本文所述的功能测定法的功能性质中的一项或多项、两项或更多项、三项或更多项、四项或更多项、五项或更多项、六项或更多项、七项或更多项、八项或更多项、九项或更多项、十项或全部。可使用本领域可获得的和/或本文所述的标准测定法(例如,在实施例中列出的那些(例如,ELISA、FACS))来评估所述改变的抗体的功能性质。

[0590] 在工程改造本文所述抗体的方法的某些实施方案中,可沿抗CD73抗体编码序列的全部或部分随机或选择性地引入突变,且可针对如本文所述结合活性和/或其他功能性质来筛选所得的修饰的抗CD73抗体。突变方法在本领域已有描述。例如,Short的PCT公开WO 02/092780描述了使用饱和诱变、合成连接装配或其组合来产生和筛选抗体突变的方法。或者,Lazar等人的PCT公开WO 03/074679描述了使用计算筛选方法来优化抗体的生理化学性质的方法。

[0591] X.核酸分子

[0592] 本文所述的另一方面涉及编码本文所述抗体的核酸分子。核酸可存在于全细胞中,存在于细胞溶解物中,或以部分纯化或基本上纯的形式存在。当通过标准技术将核酸与其他细胞组分或其他污染物(例如,其他细胞核酸(例如,其他染色体DNA,例如在自然界中与分离的DNA连接的染色体DNA)或蛋白质)纯化分离时,核酸是“分离的”或“使得基本上纯的”,所述标准技术包括碱/SDS处理、CsCl显带法、柱色谱法、限制酶、琼脂糖凝胶电泳和本领域熟知的其他方法。参见,F.Ausubel等人编辑,(1987)Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing and Wiley Interscience,New York。本文所述核酸例如可以是DNA或RNA,且可含有或不含内含子序列。在某些实施方案中,核酸是cDNA分子。

[0593] 可使用标准分子生物学技术来获得本文所述的核酸。对于由杂交瘤(例如,从携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠制备的杂交瘤,如下文进一步描述的)表达的抗体,可通过

标准PCR扩增或cDNA克隆技术来获得编码通过杂交瘤制得的抗体的轻链和重链的cDNA。对于从免疫球蛋白基因文库获得的抗体(例如,使用噬菌体展示技术),可从文库中回收编码所述抗体的核酸。

[0594] 本文所述的优选核酸分子是编码本文所述的抗CD73抗体(例如,CD73.4、11F11-1、11F11-2、4C3-1、4C3-2、4C3-3、4D4、10D2-1、10D2-2、11A6、24H2、5F8-1、5F8-2、6E11、7A11、CD73.3和/或CD73.4单克隆抗体)的VH及VL序列的那些。编码CD73.4(CD73.4-1和CD73.4-2)、11F11(11F11-1和11F11-2)、4C3(4C3-1、4C3-2和4C3-3)、4D4、10D2(10D2-1和10D2-2)、11A6、24H2、5F8(5F8-1和5F8-2)、6E11、7A11、CD73.3和CD73.4的VH序列的DNA序列分别在SEQ ID NO:4、16、32、40、52、60、68、80、88、135和170中列出。编码11F11-1、11F11-2、4C3-1、4C3-2、4C3-3、4D4、10D2-1、10D2-2、11A6、24H2、5F8-1、5F8-2、6E11、7A11、CD73.3和/或CD73.4的VL序列的DNA序列分别在SEQ ID NO:8、12、20、24、28、36、44、48、56、64、72、76、84和92中列出。

[0595] 一旦获得编码VH和VL区段的DNA片段,可通过标准重组DNA技术进一步操作这些DNA片段,以便例如将可变区基因转变成全长抗体链基因、Fab片段基因或scFv基因。在这些操作中,编码VL或VH的DNA片段与编码另一蛋白质(比如,抗体恒定区或柔性接头)的另一DNA片段可操作连接。如本上下文中使用的术语“可操作连接”意指将两个DNA片段连接,使得由这两个DNA片段编码的氨基酸序列保持在框内。

[0596] 通过将编码VH的DNA与编码重链恒定区(铰链、CH1、CH2和/或CH3)的另一DNA分子可操作连接,可将编码VH区的分离的DNA转化成全长重链基因。人重链恒定区基因的序列是本领域已知的(例如,参见Kabat,E.A.等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH公开No.91-3242),且可通过标准PCR扩增来获得涵盖这些区域的DNA片段。重链恒定区可以是IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区,例如IgG1区。对于Fab片段重链基因,编码VH的DNA与仅编码重链CH1恒定区的另一DNA分子可操作连接。

[0597] 通过将编码VL的DNA与编码轻链恒定区CL的另一DNA分子可操作连接,可将编码VL区的分离的DNA转化成全长轻链基因(以及Fab轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列是本领域已知的(例如,参见Kabat,E.A.等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH公开No.91-3242),且可通过标准PCR扩增来获得涵盖这些区域的DNA片段。轻链恒定区可以是κ或λ恒定区。

[0598] 为产生scFv基因,将编码VH和VL的DNA片段与编码柔性接头(例如,编码氨基酸序列$(Gly_4\text{-}Ser)_3$)的另一片段可操作连接,使得VH和VL序列可表达为连续的单链蛋白,其中VL区和VH区通过柔性接头连接(例如,参见Bird等人(1988)Science 242:423-426;Huston等人(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;McCafferty等人,(1990)Nature 348:552-554)。

[0599] 本文中还提供了编码与本文所述抗体(例如,11F11-1、11F11-2、4C3-1、4C3-2、4C3-3、4D4、10D2-1、10D2-2、11A6、24H2、5F8-1、5F8-2、6E11、7A11、CD73.3和/或CD73.4单克隆抗体)同源的VH和VL序列或全长重链和轻链的核酸分子。示例性核酸分子编码与编码11F11-1、11F11-2、4C3-1、4C3-2、4C3-3、4D4、10D2-1、10D2-2、11A6、24H2、5F8-1、5F8-2、

6E11、7A11、CD73.3和/或CD73.4单克隆抗体的VH和VL序列或全长重链和轻链(例如表37中列出的序列)的核酸分子至少70％相同，例如至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％或至少99％相同的VH和VL序列。例如，本文中提供了抗CD73抗体，其包含由与SEQ ID NO:139和SEQ ID NO:140或141;SEQ ID NO:237和SEQ ID NO:140或141;SEQ ID NO:142和SEQ IDNO:143、144或145;SEQ ID NO:146和SEQ ID NO:147;SEQ ID NO:148和SEQ ID NO:149或150;SEQ ID NO:151和SEQ ID NO:152;SEQ ID NO:153和SEQ ID NO:154;SEQ ID NO:155和SEQ ID NO:156或157或242;SEQ ID NO:158和SEQ ID NO:159;SEQ ID NO:160和SEQ ID NO:161至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的核苷酸序列编码的VH链和VL链。还提供了抗CD73抗体，其包含由与SEQ ID NO:134、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、243、266(重链)和SEQ ID NO:244或245(轻链);SEQ ID NO:211、212、213或246和SEQ ID NO:247、248或249;SEQ ID NO:235、236或250和251;SEQ ID NO:252和SEQ ID NO:253或254;SEQ ID NO:255和SEQ ID NO:256;SEQ ID NO:257和SEQ ID NO:258;SEQ ID NO:259和SEQ ID NO:260或261;SEQ ID NO:262和SEQ ID NO:263;SEQ ID NO:264和SEQ ID NO:265至少80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％相同的核苷酸序列编码的重链和轻链。本文中还提供了例如针对密码子优化的具有沉默突变(即，在核酸分子翻译后不改变所得氨基酸序列的碱基变化)的核酸分子。

[0600] XI.抗体生成

[0601] 可使用多种已知技术(比如Kohler和Milstein,Nature 256:495(1975)所述的标准体细胞杂交技术))来产生本发明的多种抗体，例如与本文中公开的抗人CD73抗体竞争或结合至与其相同的表位的那些。虽然体细胞杂交程序是优选的，但原则上也可采用产生单克隆抗体的其他技术，例如B淋巴细胞的病毒转化或致癌性转化、使用人抗体基因文库的噬菌体展示技术。

[0602] 制备杂交瘤的优选动物系统是鼠系统。在小鼠中产生杂交瘤是已良好建立的程序。用于融合的免疫脾细胞的免疫方案和分离技术是本领域已知的。融合配偶体(例如，鼠骨髓瘤细胞)和融合程序也是已知的。

[0603] 基于如上文所述制备的鼠单克隆抗体的序列，可以制备本文所述的嵌合抗体或人源化抗体。可以从感兴趣的鼠杂交瘤获得编码重链和轻链免疫球蛋白的DNA，并使用标准分子生物学技术将其工程改造为含有非鼠(例如，人)免疫球蛋白序列。例如，为了产生嵌合抗体，可使用本领域已知的方法将鼠可变区与人恒定区连接(例如，参见授予Cabilly等人的美国专利No.4,816,567)。为了产生人源化抗体，可使用本领域已知的方法将鼠CDR区插入人框架中(例如，参见授予Winter的美国专利No.5,225,539以及授予Queen等人的美国专利No.5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370)。

[0604] 在一个实施方案中，本文所述抗体是人单克隆抗体。可使用携带人免疫系统而非小鼠系统的部分的转基因或转染色体小鼠来生成这样的针对CD73的人单克隆抗体。这些转基因和转染色体小鼠包括在本文中分别称为HuMAb小鼠和KM小鼠的小鼠，且在本文中统称为“人I_g小鼠”。

[0605] HuMAb mouse®(Medarex公司)含有编码未重排的人重链(μ和γ)及κ轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因迷你基因座以及使内源性μ和κ链基因座失活的靶向突变(例

如,参见Lonberg等人(1994)Nature 368(6474):856-859)。因此,小鼠展现降低的小鼠IgM或κ表达,并且响应于免疫,引入的人重链和轻链转基因经历类别转换和体细胞突变而生成高亲和力人IgGκ单克隆(Lonberg,N.等人(1994),上文;综述于Lonberg,N.(1994)Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101;Lonberg,N.和Huszar,D.(1995)Intern.Rev.Immunol.13:65-93,以及Harding,F.和Lonberg,N.(1995)Ann.N.Y.Acad.Sci.764:536-546)。HuMab小鼠的制备和用途以及由这样的小鼠携带的基因组修饰进一步描述于Taylor,L.等人(1992)Nucleic Acids Research 20:6287-6295;Chen,J.等人(1993)International Immunology 5:647-656;Tuaillon等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:3720-3724;Choi等人(1993)Nature Genetics 4:117-123;Chen,J.等人(1993)EMBO J.12:821-830;Tuaillon等人(1994)J.Immunol.152:2912-2920;Taylor,L.等人(1994)International Immunology 6:579-591;以及Fishwild,D.等人(1996)Nature Biotechnology 14:845-851,所有这些文献的内容明确地通过提述完整并入本文。进一步参见所有授予Lonberg和Kay的美国专利No.5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,789,650;5,877,397;5,661,016;5,814,318;5,874,299;和5,770,429;授予Surani等人的美国专利No.5,545,807;所有授予Lonberg和Kay的PCT公开号WO 92/03918、WO 93/12227、WO 94/25585、WO 97/13852、WO 98/24884和WO 99/45962;以及授予Korman等人的PCT公开号WO 01/14424。

[0606] 在某些实施方案中,本文所述抗体是使用在转基因和转染色体上携带人免疫球蛋白序列的小鼠(比如携带人重链转基因和人轻链转染色体的小鼠)产生的。这样的小鼠(在本文中称为"KM小鼠")详细描述于授予Ishida等人的PCT公开WO 02/43478中。

[0607] 更进一步地,本领域可获得表达人免疫球蛋白基因的替代转基因动物系统,并且可将其用于产生本文所述的抗CD73抗体。例如,可使用被称为Xenomouse(Abgenix公司)的替代转基因系统;这样的小鼠描述于例如授予Kucherlapati等人的美国专利No.5,939,598;6,075,181;6,114,598;6,150,584和6,162,963中。

[0608] 而且,本领域可获得表达人免疫球蛋白基因的替代转染色体动物系统,并且可将其用于产生本文所述的抗CD73抗体。例如,可使用被称为"TC小鼠"的携带人重链转染色体和人轻链转染色体的小鼠;这样的小鼠描述于Tomizuka等人(2000)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:722-727中。此外,携带人重链和轻链转染色体的牛已在本领域有描述(Kuroiwa等人(2002)Nature Biotechnology 20:889-894),并且可将其用于产生本文所述的抗CD73抗体。

[0609] 本领域描述的用于产生人抗体(例如,人抗CD73抗体)的其他小鼠系统包括(i)VelocImmune®小鼠(Regeneron Pharmaceuticals公司),其中内源性小鼠重链和轻链可变区已通过同源重组而被人重链和轻链可变区代替,后者与内源性小鼠恒定区可操作连接,使得在小鼠中产生嵌合抗体(人V/小鼠C),随后使用标准重组DNA技术将其转化成全人抗体;和(ii)MeMo®小鼠(Merus Biopharmaceuticals公司),其中小鼠含有未重排的人重链可变区但是含有单个重排的常见的人轻链可变区。这样的小鼠及其产生抗体的用途描述于例如WO 2009/15777、US 2010/0069614、WO 2011/072204、WO 2011/097603、WO 2011/163311、WO 2011/163314、WO 2012/148873、US 2012/0070861和US 2012/0073004中。

[0610] 还可使用用于筛选人免疫球蛋白基因文库的噬菌体展示方法来制备本文所述的

人单克隆抗体。这样的用于分离人抗体的噬菌体展示方法已在本领域已良好建立。例如参见:授予Ladner等人的美国专利No.5,223,409;5,403,484;和5,571,698;授予Dower等人的美国专利No.5,427,908和5,580,717;授予McCafferty等人的美国专利No.5,969,108和6,172,197;以及授予Griffiths等人的美国专利No.5,885,793;6,521,404;6,544,731;6,555,313;6,582,915和6,593,081。

[0611] 还可使用SCID小鼠来制备本文所述的人单克隆抗体,所述小鼠中已经重建了人免疫细胞,使其在免疫后能产生人抗体应答。这样的小鼠描述于例如授予Wilson等人的美国专利No.5,476,996和5,698,767中。

[0612] 免疫

[0613] 为了生成针对CD73的全人抗体,可利用CD73抗原和/或表达CD73的细胞的纯化或富集制剂免疫含有人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体小鼠(例如,HCo12、HCo7或KM小鼠),正如针对其他抗原由例如Lonberg等人(1994)Nature 368(6474):856-859;Fishwild等人(1996)Nature Biotechnology 14:845-851和WO 98/24884所述。或者,可以用编码人CD73的DNA免疫小鼠。优选地,小鼠在首次输注时为6-16周龄。例如,可使用重组CD73抗原的纯化或富集制剂(5-50μg)经腹膜内免疫HuMAb小鼠。如果使用CD73抗原的纯化或富集制剂免疫未产生抗体,还可用表达CD73的细胞(例如,细胞系)免疫小鼠以促进免疫应答。示例性细胞系包括过表达CD73的稳定CHO和Raji细胞系。

[0614] 利用各种抗原的累积经验已显示,在最初用Ribi佐剂中的抗原经腹膜内(IP)或皮下(SC)免疫、随后用Ribi佐剂中的抗原每隔一周IP/SC免疫(直至总共10次)时,HuMAb转基因小鼠的应答最佳。在免疫方案过程中,可用通过眶后采血获得的血浆样品来监测免疫应答。可通过ELISA和FACS(如下文所述)筛选血浆,并且可使用具有足够的抗CD73人免疫球蛋白效价的小鼠进行融合。可用抗原对小鼠实施静脉内加强免疫,3天后处死并去除脾和淋巴结。预计对每次免疫可能需要进行2-3次融合。针对每一抗原通常免疫6只到24只小鼠。通常,使用HCo7、HCo12和KM品系。另外,可将HCo7和HCo12转基因在一起配种到具有两个不同的人重链转基因(HCo7/HCo12)的单只小鼠中。

[0615] 产生抗CD73单克隆抗体的杂交瘤的生成

[0616] 为了生成产生本文所述的人单克隆抗体的杂交瘤,可从免疫的小鼠分离脾细胞和/或淋巴结细胞并与适当的永生化细胞系如小鼠骨髓瘤细胞系融合。可针对抗原特异性抗体的产生筛选所得的杂交瘤。例如,可使用50%PEG将来自免疫小鼠的脾淋巴细胞的单细胞悬液与Sp2/0非分泌性小鼠骨髓瘤细胞(ATCC,CRL 1581)融合。将细胞以约$2x10^5$接种在平底微量滴定板中,随后在含有10%胎牛克隆血清、18%“653”条件培养基、5%origen(IGEN)、4mM L-谷氨酰胺、1mM丙酮酸钠、5mM HEPES、0.055mM 2-巯基乙醇、50单位/ml青霉素、50mg/ml链霉素、50mg/ml庆大霉素和1X HAT(Sigma)的选择性培养基中温育两周。约两周后,可在其中HAT被HT代替的培养基中培养细胞。然后可通过ELISA筛选针对人单克隆IgM和IgG抗体的单独的孔。一旦出现杂交瘤广泛生长,通常即可在10-14天后观察培养基。可将分泌抗体的杂交瘤再接种平板,再次筛选,且如果人IgG仍为阳性,则可通过有限稀释将单克隆抗体亚克隆至少两次。然后可在体外培养稳定的亚克隆,以在用于表征的组织培养基中生成少量抗体。

[0617] 为了纯化人单克隆抗体,可使选择的杂交瘤在用于单克隆抗体纯化的两升旋转烧

瓶中生长。可将上清液过滤并浓缩，然后用蛋白A-琼脂糖(Pharmacia，Piscataway，N.J.)进行亲和色谱。可通过凝胶电泳和高效液相色谱检查洗脱的IgG以确保纯度。可将缓冲溶液更换为PBS，并且可使用消光系数1.43按照OD280来测定浓度。可将单克隆抗体分装并储存在-80℃下。

[0618] XII.抗体制造

[0619] 产生抗CD73单克隆抗体的转染瘤的生成

[0620] 可使用例如如本领域所熟知的重组DNA技术和基因转染方法的组合(Morrison，S.(1985)Science 229:1202)在宿主细胞转染瘤中产生本发明抗体，包括提供序列的特异性抗体及其他相关的抗CD73抗体。

[0621] 例如，为了表达抗体或其抗体片段，可通过标准分子生物学技术(例如，PCR扩增或使用表达感兴趣的抗体的杂交瘤的cDNA克隆)获得编码部分或全长轻链和重链的DNA，并且可将DNA插入表达载体中，使得基因与转录和翻译控制序列可操作连接。在这种背景下，术语“可操作连接”意指使抗体基因与载体连接，使得载体内的转录和翻译控制序列发挥其调控抗体基因的转录和翻译的预期功能。表达载体和表达控制序列经选择与所使用的表达宿主细胞相容。可将抗体轻链基因和抗体重链基因插入单独的载体中，或将两种基因插入同一表达载体中。通过标准方法(例如，将抗体基因片段上的互补限制位点与载体连接，或者，如果不存在限制位点，则采用平端连接)将抗体基因插入表达载体中。可以使用本文所述抗体的轻链和重链可变区，通过将其插入已经编码期望的同种型的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中，使V_H区段与载体内的C_H区段可操作连接，并且使V_L区段与载体内的C_L区段可操作连接，从而产生任何抗体同种型的全长抗体基因。另外地或可替代地，重组表达载体能够编码促进抗体链从宿主细胞分泌的信号肽。可将抗体链基因克隆到载体中，使得信号肽与抗体链基因的氨基端在框内连接。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即，来自非免疫球蛋白的蛋白质的信号肽)。

[0622] 除了抗体链基因外，重组表达载体可携带控制抗体链基因在宿主细胞中表达的调控序列。术语“调控序列”预期包括控制抗体链基因转录或翻译的启动子、增强子和其他表达控制元件(例如，多腺苷酸化信号)。这样的调控序列例如由Goeddel描述(Gene Expression Technology.Methods in Enzymology 185，Academic Press，San Diego，CA(1990))。本领域技术人员将理解，表达载体的设计(包括调控序列的选择)可取决于诸如待转化的宿主细胞的选择、期望的蛋白质表达水平等因素。用于哺乳动物宿主细胞表达的优选调控序列包括在哺乳动物细胞中指导高蛋白质表达水平的病毒元件，比如衍生自巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒40(SV40)、腺病毒(例如，腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))和多瘤病毒的启动子和/或增强子。或者，可使用非病毒调控序列，比如泛素启动子或β-珠蛋白启动子。更进一步地，调控元件由来自不同来源(比如SRα启动子系统)的序列组成，SRα启动子系统含有来自SV40早期启动子的序列和人T细胞白血病病毒1型的长末端重复序列(Takebe，Y.等人(1988)Mol.Cell.Biol.8:466-472)。

[0623] 除抗体链基因和调控序列外，重组表达载体可携带另外的序列，比如调控载体在宿主细胞中复制的序列(例如，复制起点)和可选择标志物基因。可选择标志物基因有利于选择其中已引入载体的宿主细胞(例如，参见均为Axel等人的美国专利No.4,399,216、4,634,665和5,179,017)。例如，通常可选择标志物基因赋予其中已引入载体的宿主细胞对药

物(例如G418、潮霉素或甲氨蝶呤)的抗性。优选的可选择标志物基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于dhfr-宿主细胞的甲氨蝶呤选择/扩增)和neo基因(用于G418选择)。

[0624] 为了表达轻链和重链,通过标准技术将编码重链和轻链的表达载体转染到宿主细胞中。术语"转染"的各种形式意在涵盖常用于将外源DNA引入原核和真核宿主细胞中的多种技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染等。虽然在理论上可能在原核或真核宿主细胞中表达本文所述抗体,但在真核细胞(且最优选哺乳动物宿主细胞)中表达抗体是最优选的,这是因为这样的真核细胞(且特别是哺乳动物细胞)比原核细胞更可能组装和分泌正确折叠且具有免疫学活性的抗体。已报导抗体基因的原核表达对于产生高产率的活性抗体是无效的(Boss,M.A.和Wood,C.R.(1985)Immunology Today 6:12-13)。也可在酵母菌巴斯德毕赤酵母的糖工程改造菌株中产生本发明抗体。Li等人(2006)Nat.Biotechnol.24:210。

[0625] 用于表达本文所述重组抗体的优选哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(包括dhfr-CHO细胞,描述于Urlaub和Chasin,(1980)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216-4220中,与DHFR可选择标志物一起使用,例如如R.J.Kaufman和P.A.Sharp(1982)Mol.Biol.159:601-621中所述)、NSO骨髓瘤细胞、COS细胞和SP2细胞。具体而言,对于与NSO骨髓瘤细胞一起使用,另一个优选的表达系统是在WO 87/04462、WO 89/01036和EP 338,841中公开的GS基因表达系统。当将编码抗体基因的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞时,通过培养宿主细胞足够的时间以允许抗体在宿主细胞中表达或者更优选别地允许抗体分泌到宿主细胞所生长的培养基中来产生抗体。可以使用标准蛋白质纯化方法从培养基回收抗体。

[0626] 由于通常可见到的翻译后修饰,本发明抗体多肽链的N端和C端可能与预期序列不同。例如,C端赖氨酸残基常常从抗体重链丢失。Dick等人(2008)Biotechnol.Bioeng.100:1132。在治疗性抗体的轻链和重链两者上,N端谷氨酰胺残基以及在较小程度上的谷氨酸残基经常被转化成焦谷氨酸残基。Dick等人(2007)Biotechnol.Bioeng.97:544;Liu等人(2011)JBC 28611211;Liu等人(2011)J.Biol.Chem.286:11211。

[0627] XIII.测定法

[0628] 可通过例如标准ELISA来检测本文所述抗体与CD73的结合。简言之,将微量滴定板用PBS中的1-2μg/ml的纯化CD73包被,随后用PBS中的5%牛血清白蛋白封闭。将抗体的稀释物(例如,来自CD73免疫小鼠的血浆的稀释物)添加至每个孔中,在37℃下温育1-2小时。将板用PBS/吐温洗涤,随后在37℃与缀合至辣根过氧化物酶(HRP)的二级试剂(例如,对于人抗体,山羊-抗人IgG Fc特异性多克隆试剂)一起温育1小时。在洗涤后,将板用ABTS底物(Moss公司,产品:ABTS-1000)显影并通过分光光度计在OD 415-495下进行分析。随后,通过流式细胞术进一步筛选来自免疫小鼠的血清与表达人CD73的细胞系、而非不表达CD73的对照细胞系的结合。简言之,通过将表达CD73的CHO细胞与以1:20稀释的抗CD73抗体一起温育来评估抗CD73抗体的结合。洗涤细胞并用PE标记的抗人IgG Ab检测结合。使用FACScan流式细胞术(Becton Dickinson,San Jose,CA)进行流式细胞分析。优选地,产生最高滴度的小鼠将用于融合。

[0629] 如上文所述的ELISA测定可用于筛选抗体,并因此筛选产生显示与CD73免疫原呈阳性反应性的抗体的杂交瘤。然后可将产生与CD73结合(优选以高亲和力结合)的抗体的杂

交瘤亚克隆并进一步表征。随后可从每个杂交瘤选择一个保留亲本细胞的反应性的克隆(通过ELISA),用于制备细胞库并用于抗体纯化。

[0630] 为了纯化人抗CD73抗体,可使选择的杂交瘤在用于单克隆抗体纯化的两升旋转烧瓶中生长。可将上清液过滤并浓缩,然后用蛋白A-琼脂糖(Pharmacia,Piscataway,NJ)进行亲和色谱。可通过凝胶电泳和高效液相色谱检查洗脱的IgG以确保纯度。可将缓冲溶液更换为PBS,并且可使用消光系数1.43按照OD_{280}来测定浓度。可将单克隆抗体分装并储存在-80℃下。

[0631] 为确定选择的抗CD73单克隆抗体是否与独特表位结合,可使用市售试剂(Pierce,Rockford,IL)将每一抗体生物素化。可用链霉亲和素标记的探针检测生物素化mAb的结合。可使用如上文所述的CD73包被的ELISA板,使用未标记的单克隆抗体和生物素化单克隆抗体进行竞争研究。

[0632] 为了确定纯化抗体的同种型,可使用对特定同种型的抗体特异的试剂进行同种型ELISA。例如,为了确定人单克隆抗体的同种型,可将微量滴定板的孔用1μg/ml抗人免疫球蛋白在4℃下包被过夜。在用1%BSA封闭后,使板与1μg/ml或更低的测试单克隆抗体或纯化同种型对照在环境温度下反应1至2小时。然后可使孔与人IgG1-或人IgM-特异性碱性磷酸酶缀合的探针反应。如上文所述使板显色并加以分析。

[0633] 为了测试单克隆抗体与表达CD73的活细胞的结合,可使用流式细胞术,如实施例中所述。简言之,将表达膜结合的CD73的细胞系(在标准生长条件下生长)与含有0.1%BSA的PBS中的不同浓度的单克隆抗体在4℃C下混合1小时。在洗涤后,在与一级抗体染色相同的条件下使细胞与荧光素标记的抗IgG抗体反应。可通过FACScan仪器利用光和侧向散射性质分析样品以对单细胞设门控,并确定标记抗体的结合。作为流式细胞术测定的附加或者替代,可采用使用荧光显微镜术的替代测定。可确切地如上文所述将细胞染色,并通过荧光显微镜术进行检查。这种方法允许将单独的细胞可视化,但可能具有减低的灵敏性,取决于抗原的密度。

[0634] 可通过Western印迹法进一步测试抗CD73抗体与CD73抗原的反应性。简言之,可从表达CD73的细胞制备细胞提取物,对其进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳。在电泳后,将分离的抗原转移到硝酸纤维素膜上,用20%小鼠血清封闭,并用待测试的单克隆抗体探测。可使用抗IgG碱性磷酸酶检测IgG结合,并用BCIP/NBT底物片(Sigma Chem.公司,St.Louis,MO)使其显色。

[0635] 用于分析各种抗CD73抗体的结合亲和力、交叉反应性和结合动力学的方法包括本领域已知的标准测定法,例如使用BIACORE®2000 SPR仪器(Biacore AB,Uppsala,Sweden)的BIACORE®表面等离子体共振(SPR)分析。

[0636] XIV.免疫缀合物和抗体衍生物

[0637] 本文所述抗体可用于诊断目的,包括样品测试和体内成像,出于此目的,抗体(或其结合片段)可与适当的可检测试剂缀合,以形成免疫缀合物。出于诊断目的,适当的试剂是包括用于全身成像的放射性同位素的可检测标记物,以及用于样品测试的放射性同位素、酶、荧光标记物和其他适合的抗体标签。

[0638] 可检测标记可以是当前在体外诊断学领域中使用的任何不同类型,包括颗粒标记物,包括金属溶胶,如胶体金;同位素,如I^{125}或Te^{99},例如与N_2S_2、N_3S或N_4类型的肽螯合剂一

起提供;发色团,包括荧光标志物、生物素、发光标志物、磷光标志物等,还有将给定底物转化为可检测标志物的酶标记物,以及通过后续扩增例如聚合酶链反应显示的多核苷酸标签。然后可通过亲和素或链霉亲和素结合检测生物素化抗体。适合的酶标记物包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等等。例如,标记物可以是酶(碱性磷酸酶),其可通过测定在转化下列物质之后化学发光的存在或形成而加以检测:1,2二氧杂环丁烷底物,如金刚烷基甲氧基磷氧酰苯基二氧杂环丁烷(AMPPD)、3-(4-(甲氧基螺{1,2-二氧杂环丁烷-3,2′-(5′-氯)三环{3.3.1.13,7}癸烷}-4-基)苯基磷酸二钠(CSPD),还有CDP和CDP-star®或本领域技术人员熟知的其他发光底物,例如适合的镧系元素铕(III)和铕(III)的螯合物。检测手段由选定的标记物决定。在标记物是微粒且以适当水平累积的情况下,利用肉眼或使用仪器,如分光光度计、发光计、荧光计等等可获得标记物或其反应产物的外观,一切都遵循标准实践。

[0639] 优选地,缀合方法产生实质上(或几乎)为非免疫原性的连接,例如肽-(即酰胺-)、硫化-(位阻)、二硫化物-、腙-及醚连接。这些连接几乎是非免疫原性的,并且在血清内显示合理的稳定性(例如,参见Senter,P.D.,Curr.Opin.Chem.Biol.13(2009)235-244;WO 2009/059278;WO 95/17886)。

[0640] 可采用不同的缀合策略,视模块和抗体的生物化学性质而定。在所述模块是具有50至500个氨基酸的天然存在或重组多肽的情况下,在描述蛋白缀合物的合成化学的教科书中有标准程序,本领域技术人员易于遵循这些标准程序(例如参见Hackenberger,C.P.R.和Schwarzer,D.,Angew.Chem.Int.Ed.Engl.47(2008)10030-10074)。在一个实施方案中,利用马来酰亚胺基模块与抗体或模块内的半胱氨酸残基反应。在使用例如抗体的Fab或Fab′片段的情况下,这是特别适合的偶联化学。或者,在一个实施方案中,进行了与抗体或模块的的C端偶联。蛋白质(例如,Fab片段)的C端修饰可如描述来进行(Sunbul,M.和Yin,J.,Org.Biomol.Chem.7(2009)3361-3371)。

[0641] 通常,位点特异性反应和共价偶联的基础是将天然氨基酸转化成具有与存在的其他官能团的反应性正交的反应性的氨基酸。例如,在稀有序列背景中的特定半胱氨酸可经酶转化为醛(参见Frese,M.A.和Dierks,T.,ChemBioChem.10(2009)425-427)。还可能通过利用某些酶与给定序列背景中的天然氨基酸的特异性酶反应性来获得期望的氨基酸修饰(例如参见Taki,M.等人,Prot.Eng.Des.Sel.17(2004)119-126;Gautier,A.等人,Chem.Biol.15(2008)128-136。蛋白酶催化的C--N键形成描述于Bordusa,F.,Highlights in Bioorganic Chemistry(2004)389-403。

[0642] 还可通过末端氨基酸与适当修饰试剂的选择性反应来实现位点特异性反应和共价偶联。可利用N端半胱氨酸与苯腈(benzonitril)的反应性(参见Ren,H.等人,Angew.Chem.Int.Ed.Engl.48(2009)9658-9662)来实现位点特异性共价偶联。天然化学连接也可依赖于C端半胱氨酸残基(Taylor,E.Vogel;Imperiali,B,Nucleic Acids and Molecular Biology(2009),22(Protein Engineering),65-96)。EP 1 074 563描述了缀合方法,其基于一段带负电荷的氨基酸内的半胱氨酸相比于位于一段带正电荷的氨基酸中的半胱氨酸的较快反应。

[0643] 所述模块也可以是合成肽或肽模拟物。在化学合成多肽的情况下,在这样的合成期间可掺入具有正交化学反应性的氨基酸(例如,参见de Graaf,A.J.等人,

Bioconiug.Chem.20(2009)1281-1295)。由于有许多正交官能团可用且可被引入合成肽中，这样的肽与接头的缀合是标准化学作用。

[0644] 为了获得单标记的多肽，可通过色谱法以1:1化学计量将缀合物与其他缀合副产物分离。通过使用染料标记的结合对成员和带电荷的接头可以促进这个程序。通过使用这种标记且高度带负电荷的结合对成员，容易将单缀合的多肽与未标记的多肽和携带多于一个接头的多肽分离，这是因为可以利用电荷和分子量的差异进行分离。可使用荧光染料从未结合组分(如标记的单价结合物)纯化复合物。

[0645] 在一个实施方案中，与抗CD73抗体附接的模块选自下组：结合模块、标记模块和生物活性模块。

[0646] 本文所述抗体也可与治疗剂缀合以形成免疫缀合物，比如抗体-药物缀合物(ADC)。适合的治疗剂包括抗代谢药、烷化剂、DNA小沟结合剂、DNA嵌合剂、DNA交联剂、组蛋白去乙酰化酶抑制剂、核输出抑制剂、蛋白酶体抑制剂、拓扑异构酶I或II抑制剂、热休克蛋白抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、抗生素、和抗有丝分裂剂。在ADC中，抗体和治疗剂优选地经由可裂解的接头缀合，所述接头例如肽基、二硫键、或腙接头。更优选地，接头为肽基接头，如Val-Cit、Ala-Val、Val-Ala-Val、Lys-Lys、Pro-Val-Gly-Val-Val(SEQ ID NO:219)、Ala-Asn-Val、Val-Leu-Lys、Ala-Ala-Asn、Git-Git、Val-Lys、Lys、Git、Ser、或Glu。可以如美国专利No.7,087,600;6,989,452;和7,129,261;PCT公开WO 02/096910;WO 07/038658;WO 07/051081;WO 07/059404;WO 08/083312;和WO 08/103693;美国专利公开20060024317;20060004081;和20060247295中所述来制备ADC;将这些公开内容通过提述并入本文。抗CD73抗体作为例如单一治疗的其他用途提供于本文中的别处，例如在涉及联合治疗的部分中。

[0647] 更具体地说，在ADC中，抗体与药物偶联，其中抗体用作将ADC导向到表达其抗原的靶细胞(如癌细胞)上的靶向剂。优选地，抗原是肿瘤相关抗原，即，由癌细胞独特地表达或过表达的抗原。一旦药物在靶细胞内部或在其附近释放，药物起到治疗剂的作用。关于ADC在癌症治疗中的作用机制和用途的综述，参见Schrama等人，Nature Rev.DrugDisc.2006，5,147。

[0648] 对于癌症治疗，药物优选是引起所靶向的癌细胞死亡的细胞毒性药物。可以在ADC中使用的细胞毒性药物包括下列类型的化合物及其类似物和衍生物：

[0649] (a)烯二炔类，如卡奇霉素(参见，例如，Lee等人，J.Am.Chem.Soc.1987,109,3464和3466)和uncialamycin(参见，例如，Davies等人，WO 2007/038868 A2(2007)和Chowdari等人，US 8,709,431 B2(2012))；

[0650] (b)微管溶素类(参见，例如，Domling等人，US 7,778,814 B2(2010)；Cheng等人，US 8,394,922 B2(2013)；和Cong等人，US 2014/0227295 A1；

[0651] (c)CC-1065和倍癌霉素(参见，例如，Boger,US 6,5458,530 B1(2003)；Sufi等人，US 8,461,117 B2(2013)；和Zhang等人，US 2012/0301490 A1(2012))；

[0652] (d)埃坡霉素类(参见，例如，Vite等人，US 2007/0275904 A1(2007)和US RE42930 E(2011))；

[0653] (e)奥里斯他汀类(参见，例如，Senter等人，US 6,844,869 B2(2005)和Doronina等人，US 7,498,298 B2(2009))；

[0654] (f)吡咯并苯并二氮杂卓(PBD)二聚体类(参见,例如,Howard等人,US 2013/0059800 A1(2013);US 2013/0028919 A1(2013);和WO 2013/041606 A1(2013));和

[0655] (g)美登木素生物碱类,如DM1和DM4(参见,例如,Chari等人,US 5,208,020(1993)和Amphlett等人,US 7,374,762 B2(2008))。

[0656] XV.双特异性分子

[0657] 本文所述抗体可用于形成双特异性分子。抗CD73抗体或其抗原结合部分可以被衍生化或与另一个功能分子例如另一个肽或蛋白质(例如,另一个抗体或受体配体)连接,以生成与至少两个不同结合位点或靶分子结合的双特异性分子。本文所述抗体实际上可以被衍生化或与一个以上的其他功能分子连接,以生成与多于两个不同的结合位点和/或靶分子结合的多特异性分子;这样的多特异性分子预期被本文中使用的术语"双特异性分子"涵盖。为了产生本文所述的双特异性分子,本文所述抗体可以与一个或多个其他结合分子,例如另一个抗体、抗体片段、肽或结合模拟物在功能上连接(例如通过化学偶联、基因融合、非共价结合或其他方式),从而产生双特异性分子。

[0658] 因此,本文中提供了包含至少一种对CD73的第一结合特异性以及对第二靶表位的第二结合特异性的双特异性分子。在其中双特异性分子是多特异性的本文所述实施方案中,所述分子可进一步包括第三结合特异性。

[0659] 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(scFv))作为结合特异性。抗体还可以是轻链或重链二聚体或其任何最小片段,比如Fv或单链构建体,如Ladner等人在美国专利No.4,946,778中所述,将其内容通过提述明确并入本文。

[0660] 可使用本领域公认的方法,比如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射性免疫测定(RIA)、FACS分析、生物测定(例如,生长抑制)或Western印迹测定来证实双特异性分子与其特异性靶的结合。这些测定法中的每一者通常通过采用标记试剂(例如,抗体)来检测特别感兴趣的蛋白质-抗体复合物的存在,所述标记试剂对于所述复合物而言是特异的。

[0661] XVI.组合物

[0662] 进一步提供了组合物,例如药物组合物,其含有与药学上可接受的载体配制在一起的本文所述的抗CD73抗体或其抗原结合部分之一或其组合。这样的组合物可包括本文所述抗体或免疫缀合物或双特异性分子之一或其组合(例如不同的两种或更多种)。例如,本文所述的药物组合物可包含结合靶抗原上的不同表位、或具有互补活性的抗体(或免疫缀合物或双特异性分子)的组合。

[0663] 在某些实施方案中,组合物包含至少1mg/ml、5mg/ml、10mg/ml、50mg/ml、100mg/ml、150mg/ml、200mg/ml、1-300mg/ml或100-300mg/ml浓度的抗CD73抗体。

[0664] 本文所述的药物组合物还可以在联合治疗中施用,即与其他药剂联合施用。例如,联合治疗可包括与至少一种其他抗癌剂和/或T细胞刺激(例如,活化)剂联合的本文所述的抗CD73抗体。可用于联合治疗中的治疗剂的实例更详细描述于下文关于本文所述抗体的用途部分中。

[0665] 在一些实施方案中,本文中公开的治疗组合物可包括用于治疗癌症的其他化合物、药物和/或药剂。这样的化合物、药物和/或药剂可包括例如化疗药、小分子药物、或刺激针对给定癌症的免疫应答的抗体。在一些情况下,治疗组合物可包括例如在关于联合治疗

的部分中列出的一种或多种药剂。

[0666] 如本文中使用的，“药学上可接受的载体”包括任何及所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗剂及吸收延迟剂以及生理学上相容的其他物质。优选地，载体适合于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮施用(例如，通过注射或输注)。取决于施用途径，可在材料中将活性化合物(即抗体、免疫缀合物或双特异性分子)进行包衣，以保护化合物免受酸和其他可使化合物失活的天然条件的作用。

[0667] 本文所述的药物化合物可包括一种或多种药学上可接受的盐。“药学上可接受的盐”是指保留亲本化合物的期望生物活性且不赋予任何不期望的毒理学效应的盐(例如参见Berge，S.M.等人(1977)J.Pharm.Sci.66:1-19)。这样的盐的实例包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括那些衍生自无毒无机酸比如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸，等等的盐，以及那些衍生自无毒有机酸比如脂肪族单及二羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳香族酸、脂肪族和芳香族磺酸等等的盐。碱加成盐包括那些衍生自碱土金属比如钠、钾、镁、钙，等等的盐，以及那些衍生自无毒有机胺比如N，N′-二苄基乙二胺、N-甲基葡萄糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因，等等的盐。

[0668] 本文所述的药物组合物还可包括药学上可接受的抗氧化剂。药学上可接受的抗氧化剂的实例包括：(1)水溶性抗氧化剂，比如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠，等等；(2)油溶性抗氧化剂，比如棕榈酸抗坏血酸酯、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、α-生育酚，等等；和(3)金属螯合剂，比如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸，等等。

[0669] 可用于本文所述的药物组合物中的适合的水性和非水性载体的实施例包括水、乙醇、多元醇(比如，甘油、丙二醇、聚乙二醇，等等)及其适当的混合物、植物油(比如橄榄油)以及注射用有机酯(比如油酸乙酯)。可以通过例如使用包衣材料诸如卵磷脂借助于维持在分散体情况下所需的粒径并且通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。

[0670] 这些组合物还可含有辅料，比如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。通过上文的灭菌程序以及通过包括各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如，对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸，等等)这两者可确保阻止微生物的存在。还可期望在这些组合物中包括等渗剂，比如糖、氯化钠，等等。另外，可通过包括吸收延迟剂(比如单硬脂酸铝和明胶)来实现注射药物形式的延长吸收。

[0671] 药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散液和用于临时配制无菌注射溶液或分散液的无菌粉末。针对药学活性物质的此类介质和作用剂的用途是本领域已知的。除了任何常规介质或作用剂与活性化合物不相容之外，考虑了它们在本文所述的药物组合物中的用途。组合物中还可掺入补充的活性化合物。

[0672] 治疗组合物通常必须无菌并且在制造和储存条件下稳定。可将组合物配制成溶液、微乳剂、脂质体或其他适于高药物浓度的有序结构。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如丙三醇、丙二醇、和液态聚乙二醇等等)、和其适合的混合物的溶剂或分散介质。可以通过例如使用包衣诸如卵磷脂借助于维持在分散体情况下所需的粒径和通过使用表面活性剂而维持适当的流动性。在许多情况下，优选的是在组合物中包括等渗剂，例如糖、多元醇诸如甘露醇、山梨醇、或氯化钠。可以通过在组合物中包含吸收延迟剂(例如单硬脂酸盐和明胶)来实现注射组合物的延长吸收。

[0673] 可以通过将活性化合物以所需的量掺入适当的溶剂中然后微孔过滤除菌来制备无菌注射溶液，其中所述溶剂根据需要具有一种上文列举的成分或其组合。通常，通过将活性化合物掺入无菌载体中来制备分散体，所述无菌载体含有基础分散介质和所需的来自上文列举的其他成分。在用于制备无菌注射液的无菌粉末的情况下，优选的制备方法为真空干燥和冷冻干燥(冻干)，由此从预先无菌过滤的溶液产生活性成分加上任何其他期望的成分的粉末。

[0674] 可以与载体材料组合而产生单剂量形式的活性成分的量取决于所治疗的受试者、和具体的给药方式而改变。可以与载体材料组合而产生单剂量形式的活性成分的量通常为产生治疗作用的组合物的量。通常，以百分之百为基准，这个量的范围可以是活性成分占约0.01％至约99％，优选地活性成分占约0.1％至约70％，最优选地约1％至约30％，与药学上可接受的载体组合。

[0675] 调整剂量方案以提供最佳期望反应(例如，治疗反应)。可以施用单次推注，可以在一段时间内施用多个分次剂量，或者可以根据治疗情况的紧急事件指示按比例减少或增加剂量。配制剂量单位形式的肠胃外组合物是特别有利的，以便易于施用并且剂量一致。如本文中使用的，“剂量单位形式”是指适合作为单一剂量用于待治疗受试者的物理上离散的单位；每个单位含有经计算与所需药物载体联合产生期望的治疗作用的预定量的活性化合物。本文所述剂量单位形式的规格取决于且直接依赖于(a)活性化合物的独特特征和待实现的具体治疗作用、和(b)这种活性化合物用于个体敏感性治疗的配制技术的固有限制。

[0676] 对于抗CD73抗体施用，剂量范围是约0.0001至100mg/kg，更通常为0.01至5mg/kg宿主体重。例如，剂量可以是0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重或10mg/kg体重、或在1-10mg/kg范围内。示例性治疗方案需要施用每周1次、每两周1次、每三周1次、每四周1次、每月1次、每三个月1次、或每三至六个月1次。

[0677] 在某些实施方案中，以固定剂量施用抗CD73抗体和免疫肿瘤学作用剂。因此，在某些实施方案中，抗CD73抗体，例如CD73.4IgG2C219S.IgG1.1f或MEDI19447，以约25至约1600mg，例如约50至约1600mg、约100至约约1600mg、约150至约1600mg、约300至约1600mg、约400至约1600mg、约600至约1600mg、约1200至约1600mg、约50至约1200mg、约50至约600mg、约50至约400mg、约50至约300mg、约50至约150mg、约150mg至约1200mg、约150mg至约600mg、约150至约400mg、约150至约300mg、约300至约1200mg、约300至约600mg、约400mg至约1200mg、约400至约600mg、或约600至约1200mg的固定剂量施用。例如，抗CD73抗体的剂量可以是约150mg、约300mg、约400mg、约600mg、约1200mg或约1600mg。

[0678] 在某些实施方案中，以足以达到约250nM至约1mM、约300nM至约1mM、约350nM至约1mM、约400nM至约1mM、约450nM至约1mM、约500nM至约1mM、约550nM至约1mM、约600nM至约1mM、约650nM至约1mM、约700nM至约1mM、约750nM至约1mM、约800nM至约1mM、约850nM至约1mM、约900nM至约1mM、或约500nM至约800nM稳态谷浓度的剂量向患者施用抗CD73抗体。

[0679] 在某些实施方案中，以约50mg至约1000mg，例如，约50mg至约500mg；约100mg至约500mg；约200mg至约500mg；约200mg至约400mg；约100至约300mg或约300mg至约400mg的固定剂量施用免疫肿瘤学作用剂(例如，抗PD-1抗体，比如纳武单抗或派姆单抗或本文所述的其他抗体，或PD-L1抗体)，例如，免疫肿瘤剂的剂量可以是约240mg或约360mg。在某些实施方案中，免疫肿瘤学作用剂的剂量范围为约0.0001至100mg/kg，更通常为0.01至5mg/kg宿

主体重。例如，剂量可以是0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重或10mg/kg体重、或在1-10mg/kg范围内。

[0680] 在某些实施方案中，免疫肿瘤学作用剂例如抗PD-L1抗体或抗PD-1抗体(如纳武单抗或派姆单抗)的剂量为每2周(Q2W)施用240mg。对于更长或更短的时间，这个剂量可以按比例调整(以每周120mg)，例如每3周(Q3W)施用360mg或每4周(Q4W)施用480mg。

[0681] 在某些实施方案中，以150至800mg的剂量以约45分钟至75分钟的输注持续时间(例如，约1小时)，并且以＞800mg的剂量以约100分钟至140分钟(例如，约2小时)的输注持续时间将抗CD73抗体施用于患者。

[0682] 在某些实施方案中，当以3mg/kg的剂量施用时，以约15分钟至45分钟，例如30分钟的输注持续时间将免疫肿瘤学作用剂施用于患者。在某些实施方案中，当以10mg/kg的剂量施用时，以约45分钟至75分钟，例如60分钟的输注持续时间将免疫肿瘤学作用剂施用于患者。

[0683] 在某些实施方案中，当在同一天施用时，在免疫肿瘤学作用剂之前施用抗CD73抗体。在某些实施方案中，当在同一天施用时，在免疫肿瘤学作用剂之后施用抗CD73抗体。在某些实施方案中，当在同一天施用时，抗CD73抗体与免疫肿瘤学作用剂同时施用。在某些实施方案中，当在同一天施用时，在免疫肿瘤学作用剂之前约15至45分钟(例如，约30分钟)施用抗CD73抗体。在某些实施方案中，当在同一天施用时，在免疫肿瘤学作用剂之后约15至45分钟(例如，约30分钟)施用抗CD73抗体。

[0684] 例如，用于治疗人类患者中的实体瘤的适当治疗方案包括向患者施用有效量的每一种下列抗体：

[0685] (a)本文所述的抗CD73抗体，和

[0686] (b)免疫肿瘤学作用剂，

[0687] 其中抗CD73抗体与免疫肿瘤学作用剂在同一天施用，并且以每周一次、每2周一次、每3周一次或每4周一次施用它们。例如，可以按每2周一次约100-2000mg(例如，150-1600mg，例如，约100、150、200、300、500、600、800、1000、1200或1600mg)单一剂量的抗CD73抗体和50-2000mg(例如150-1600mg，例如约100、150、200、300、500、600、800、1000、1200或1600mg)单一剂量的免疫肿瘤学作用剂对患有癌症(例如，晚期癌症)的受试者施用抗CD73抗体和免疫肿瘤学作用剂。如果免疫肿瘤学作用剂为纳武单抗，它可以以约240mg的单一剂量施用。在一个实施方案中，将抗CD73抗体CD73.4.IgG2C219S.IgG1.1f(对于重链的SEQ ID NO:133和或189，以及对于轻链的SEQ ID NO:102)以150-1600mg的单一剂量每两周一次施用于患有癌症的受试者，并且将纳武单抗以240mg的固定剂量每两周一次(与抗CD73抗体日期相同)施用于所述受试者。联合治疗可以施用1-10个周期，例如1个、2个、3个、4个、5个或6个、7个、8个、9个或10个周期，其中每个周期的时间为28天，其中对于每个周期，每种抗体施用2个剂量。例如，联合治疗可以施用4-6个周期，其中每个周期的时间为28天，其中对于每个周期，每种抗体施用2个剂量。可以例如在休息一段时间后施用更多的周期。

[0688] 在某些实施方案中，每周施用一次抗CD73抗体和免疫肿瘤学作用剂，其中，例如在同一天施用抗CD73抗体和免疫肿瘤学作用剂。

[0689] 在某些实施方案中，每周施用一次抗CD73抗体，并且每2周或3周施用一次免疫肿瘤学作用剂。例如，可以对患有癌症(例如，晚期癌症)的受试者施用每周一次约100-2000mg

(例如,150-1600mg,例如,约100、150、200、300、500、600、800、1000、1200或1600mg)单一剂量的抗CD73抗体和每2周或3周一次50-2000mg(例如150-1600mg,例如约100、150、200、300、500、600、800、1000、1200或1600mg)单一剂量的免疫肿瘤学作用剂。如果免疫肿瘤学作用剂是纳武单抗,它可以以约每2周240mg的单一剂量或每3周360mg的单一剂量施用。在某些实施方案中,每两周一次在同一天给予抗CD73抗体和免疫肿瘤学作用剂,并且每周一次单独施用抗CD73抗体,此时它们并非共同施用。联合治疗可以施用1-10个周期,例如1个、2个、3个、4个、5个或6个、7个、8个、9个或10个周期,其中每个周期的时间为28天,其中对于每个周期,施用4个剂量的抗CD73抗体和2个剂量的免疫肿瘤学作用剂。例如,联合治疗可以施用4-6个周期。可以例如在休息一段时间后施用更多的周期。

[0690] 在某些实施方案中,按照每3周一次约100-2000mg(例如,150-1600mg,例如,约100、150、200、300、500、600、800、1000、1200或1600mg)单一剂量的抗CD73抗体和50-2000mg(例如150-1600mg,例如约100、150、200、300、500、600、800、1000、1200或1600mg)单一剂量的免疫肿瘤学作用剂对患有癌症(例如,晚期癌症)的受试者施用抗CD73抗体和免疫肿瘤学作用剂。如果免疫肿瘤学作用剂为纳武单抗,它可以每三周一次以约360mg的单一剂量施用。在一个实施方案中,将抗CD73抗体CD73.4.IgG2C219S.IgG1.1f以150-1600mg的单一剂量每三周一次施用于患有癌症的受试者,并且将纳武单抗以360mg的固定剂量每三周一次(与抗CD73抗体日期相同)施用于所述受试者。两种药剂可以在同一天施用。联合治疗可以施用1-10个周期,例如1个、2个、3个、4个、5个或6个、7个、8个、9个或10个周期,其中每个周期的时间为42天,其中对于每个周期,每种抗体施用2个剂量,每三周一次。例如,联合治疗可以施用4-6个周期,其中每个周期的时间为42天,其中对于每个周期,每种抗体2个剂量,在同一天施用。可以例如在休息一段时间后施用更多的周期。

[0691] 在某些实施方案中,抗CD73抗体CD73.4.IgG2C219S.IgG1.1f和纳武单抗以下列联合剂量之一施用:50mg的抗CD73抗体和240mg的纳武单抗每两周一次;50mg的抗CD73抗体和360mg的纳武单抗每三周一次;150mg的抗CD73抗体和240mg的纳武单抗每两周一次;150mg的抗CD73抗体和360mg的纳武单抗每三周一次;300mg的抗CD73抗体和240mg的纳武单抗每两周一次;300mg的抗CD73抗体和360mg的纳武单抗每三周一次;600mg的抗CD73抗体和240mg的纳武单抗每两周一次;600mg的抗CD73抗体和360mg的纳武单抗每三周一次;1200mg的抗CD73抗体和240mg的纳武单抗每两周一次;1200mg的抗CD73抗体和360mg的纳武单抗每三周一次;1600mg的抗CD73抗体和240mg的纳武单抗每两周一次;1600mg的抗CD73抗体和360mg的纳武单抗每三周一次;2000mg的抗CD73抗体和240mg的纳武单抗每两周一次;2000mg的抗CD73抗体和360mg的纳武单抗每三周一次;50mg的抗CD73抗体每周一次和240mg的纳武单抗每两周一次;50mg的抗CD73抗体每周一次和360mg的纳武单抗每三周一次;150mg的抗CD73抗体每周一次和240mg的纳武单抗每两周一次;150mg的抗CD73抗体每周一次和360mg的纳武单抗每三周一次;300mg的抗CD73抗体每周一次和240mg的纳武单抗每两周一次;300mg的抗CD73抗体每周一次和360mg的纳武单抗每三周一次;600mg的抗CD73抗体每周一次和240mg的纳武单抗每两周一次;600mg的抗CD73抗体每周一次和360mg的纳武单抗每三周一次;1200mg的抗CD73抗体每周一次和240mg的纳武单抗每两周一次;1200mg的抗CD73抗体每周一次和360mg的纳武单抗每三周一次;1600mg的抗CD73抗体每周一次和240mg的纳武单抗每两周一次;1600mg的抗CD73抗体每周一次和360mg的纳武单抗每三周一次;

2000mg的抗CD73抗体每周一次和240mg的纳武单抗每两周一次;2000mg的抗CD73抗体每周一次和360mg的纳武单抗每三周一次。治疗之前或之后可以单独用抗CD73和/或免疫肿瘤学作用剂治疗一段时间。例如,抗CD73可以在开始联合治疗之前单独施用1、2、3或4周。在某些实施方案中,在联合治疗之后单独施用免疫肿瘤学作用剂1、2、3、4或更多周。

[0692] 在一些方法中,同时施用两种或更多种具有不同结合特异性的单克隆抗体,在此情况下每种抗体的施用剂量在指示的范围内。通常在多种情况下施用抗体。单个剂量之间的间隔可以是,例如,每周、每月、每三个月或每年。间隔也可以是不规则的,通过测量患者体内针对靶抗原的抗体的血液水平来指示。在一些方法中,调节剂量以实现约1-1000μg/ml的血浆抗体浓度,在一些方法中为约25-300μg/ml。

[0693] 本文所述或本文提及的所有抗CD73抗体(例如,在WO2016/075099中描述的MEDI9447或Phen 0203hIgG1和在WO2016/055609中描述的抗CD73抗体)可如本文所述加以联合和/或施用和/或使用。

[0694] 抗体可以作为持续释放制剂施用,在这种情况下,要求以较低频率施用。剂量和频率取决于患者体内的抗体的半衰期而变化。一般而言,人抗体显示的半衰期最长,其次是人源化抗体、嵌合抗体、和非人抗体。施用的剂量和频率可以取决于治疗是预防性的还是治疗性的而变化。在预防性应用中,在一段长时间内以相对低频的间隔施用相对低的剂量。一些患者继续接受治疗持续其一生。在治疗性应用中,有时需要以相对短的时间间隔给予相对高的剂量,直到疾病的进展减慢或终止时为止,优选地直到患者显示出疾病症状的部分或完全改善时为止。此后,可以对患者施用预防性方案。

[0695] 本文所述的药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以改变,以获得针对特定患者、组合物和施用方式有效地实现期望的治疗反应、而对患者没有毒性的活性成分量。选定的剂量水平取决于多种药代动力学因素,包括所用的本文所述特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性,施用途径,施用时间,所用特定化合物的排泄速率,治疗持续时间,与所用特定组合物联合使用的其他药物、化合物和/或材料,被治疗患者的年龄、性别、体重、状况、一般健康情况和先前病史,以及医学领域熟知的类似因素。

[0696] 本文所述的抗CD73抗体的“治疗有效剂量”优选地降低疾病症状的严重程度,增加无疾病症状时间的频率及持续时间,或预防因疾病折磨所致的损害或失能。在癌症背景下,治疗有效剂量优选预防与癌症相关的身体症状的进一步恶化。癌症的症状是本领域熟知的,例如包括不寻常的痣特征(unusual mole features)、痣的外观变化,包括不对称、边界、颜色和/或直径的变化、新着色的皮肤区域、异常的痣、指甲的变暗区、乳房肿块、乳头变化、乳腺囊肿、乳房疼痛、死亡、体重减轻、虚弱、过度疲劳、进食困难、食欲不振、慢性咳嗽、呼吸困难加重、咳血、尿血、便血、恶心、呕吐、肝转移、肺转移、骨转移、腹部胀满、腹胀(bloating)、腹腔积液、阴道出血、便秘、腹部膨胀(abdominal distension)、结肠穿孔、急性腹膜炎(感染、发热、疼痛)、疼痛、吐血、大量出汗、发热、高血压、贫血、腹泻、黄疸、头晕、畏寒、肌肉痉挛、结肠转移、肺转移、膀胱转移、肝转移、骨转移、肾转移和胰腺转移、吞咽困难,等。

[0697] 治疗有效剂量可预防或延迟癌症发作,这在有疾病的早期或初步征象时可能是期望的。用于诊断癌症的实验室试验涉及化学(包括CD73水平的测量)、血液学、血清学和放射学。因此,监测上述任一者的任何临床或生物化学测定法均可用于确定特定的治疗是否为

用于治疗癌症的治疗有效剂量。基于诸如受试者的尺寸、受试者症状的严重程度以及特定的组合物或选择的施用途径等因素，本领域的普通技术人员将能够确定这些量。

[0698] 可以使用本领域已知的多种方法中的一种或多种经由一种或多种施用途径施用本文所述的组合物。正如本领域技术人员将理解，施用途径和/或方式将视期望的结果而变化。本文所述抗体的优选施用途径包括静脉内、肌内、皮内、腹膜内、皮下、脊柱或其他肠胃外施用途径(例如通过注射或输注)。如本文中使用的短语“肠胃外施用”表示通常通过注射而不是肠内和局部施用的施用方式，包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0699] 或者，本文所述抗体可经由非肠胃外途径施用，比如局部、表皮或粘膜施用途径，例如鼻内、经口、阴道、直肠、舌下或局部。

[0700] 活性化合物可与保护该化合物免于快速释放的载体一起制备，比如控制释放制剂，包括植入物、透皮贴剂和微囊化递送系统。可使用生物可降解的生物相容性聚合物，比如乙烯基乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。用于制备这样的制剂的许多方法已获得专利权或通常为本领域技术人员已知。例如，参见Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems,J.R.Robinson编辑,Marcel Dekker,Inc.,New York,1978。

[0701] 可用本领域已知的医疗器械施用治疗组合物。例如，在优选的实施方案中，可用无针皮下注射装置(比如公开于美国专利No.5,399,163;5,383,851;5,312,335;5,064,413;4,941,880;4,790,824;或4,596,556中的装置)来施用本文所述的治疗组合物。与本文所述抗CD73抗体一起使用的熟知的植入物和组件的实例包括:美国专利No.4,487,603,其公开了用于以控制速率分配药物的可植入微量输注泵;美国专利No.4,486,194,其公开了用于经由皮肤施用药物的治疗装置;美国专利No.4,447,233,其公开了用于以精确输注速率递送药物的药物输注泵;美国专利No.4,447,224,其公开了用于连续药物递送的变流可植入输注设备;美国专利No.4,439,196,其公开了具有多腔区室的渗透药物递送系统;以及美国专利No.4,475,196,其公开了渗透药物递送系统。将这些专利通过提述并入本文。许多其他的此类植入物、递送系统和组件是本领域技术人员已知的。

[0702] 在某些实施方案中，将本文所述的抗CD73抗体配制为确保体内适当分布。例如，血脑屏障(BBB)可拒绝许多高亲水性化合物进入。为确保本文所述的治疗化合物越过BBB(如果需要的话)，可以例如将其配制在脂质体中。对于制造脂质体的方法，参见例如美国专利4,522,811;5,374,548;和5,399,331。脂质体可包含一个或多个选择性地运输到特定细胞或器官中的由此增强靶向药物递送的模块(例如，参见V.V.Ranade(1989)J.Clin.Pharmacol.29:685)。示例性靶向模块包括叶酸或生物素(例如，参见授予Low等人的美国专利5,416,016)；甘露糖苷(Umezawa等人，(1988)Biochem.Biophys.Res.Commun.153:1038)；抗体(P.G.Bloeman等人(1995)FEBS Lett.357:140;M.Owais等人(1995)Antimicrob.Agents Chemother.39:180)；表面活性剂蛋白A受体(Briscoe等人(1995)Am.J.Physiol.1233:134)；p120(Schreier等人(1994)J.Biol.Chem.269:9090)；还参见K.Keinanen;M.L.Laukkanen(1994)FEBS Lett.346:123;J.J.Killion;I.J.Fidler(1994)Immunomethods 4:273。

[0703] XVII.用途和方法

[0704] 本文所述抗体、抗体组合物和方法具有多种体外和活体内应用，例如，通过例如降低腺苷信号转导抑制肿瘤生长、抑制肿瘤转移、增强免疫应答，或CD73的检测。在优选的实施方案中，本文所述抗体是人抗体。例如，本文所述的抗CD73抗体可施用于体外或离体培养的细胞，或体内施用于例如人受试者以抑制肿瘤细胞增殖。因此，本文中提供了改变受试者中的肿瘤生长的方法，其包括向受试者施用本文所述抗体或其抗原结合部分，从而降低受试者中的肿瘤生长。

[0705] 在具体实施方案中，所述方法尤其适于癌症的体内治疗。为了实现肿瘤生长的抗原特异性抑制，本文所述的抗CD73抗体可与感兴趣的抗原一起施用，或者，所述抗原可以已经在待治疗的受试者(例如，带有肿瘤的受试者)中存在。当针对CD73的抗体与另一种药剂一起施用时，两者可单独或同时施用。

[0706] 还涵盖用于检测样品中人CD73抗原的存在或测量人CD73抗原的量的方法，其包括使样品和对照样品与特异性地结合人CD73的人单克隆抗体或其抗原结合部分在允许在所述抗体或其部分与人CD73之间形成复合物的条件下接触。然后检测复合物的形成，其中样品相比于对照样品之间的复合物形成差异指示样品中人CD73抗原的存在。而且，本文所述的抗CD73抗体可用于经由免疫亲和纯化来纯化人CD73。

[0707] 在一个实施方案中，提供了一种用于确定受试者例如患有癌症的受试者的血液或血清中可溶性CD73水平的方法。在某些实施方案中，确定了用抗CD73抗体治疗的患者的血液或血清中的可溶性CD73抗体的水平。例如，方法可包括在用抗CD73拮抗剂药剂例如CD73抗体(比如本文所述的抗体)治疗之前、期间(或之前和期间两者)从受试者获得样品，使样品与可检测可溶性CD73的药剂(比如本文所述的抗CD73抗体)接触，并确定血液或血清中可溶性CD73的水平。在某些实施方案中，检测可溶性CD73抗原的药剂并非施用于受试者进行治疗的抗体(或不包含相同的可变区)。

[0708] 在某些实施方案中，方法包括确定正在用CD73拮抗剂(比如本文所述的抗体)治疗的受试者的血清中CD73拮抗剂的水平，并且如果抗体水平低于其施用于受试者之后的抗体水平，则向受试者施用更多的CD73拮抗剂。如实施例中所述，已显示注射抗CD73抗体的动物的血清中较低水平的CD73抗体与肿瘤中CD73的抑制程度相关。

[0709] 本文中还提供了确定患有癌症的受试者是否会对用抗CD73拮抗剂治疗有反应的方法，其包括确定受试者肿瘤中CD73的水平，其中肿瘤中CD73的存在表明受试者可能对用抗CD73拮抗剂治疗有反应。

[0710] 本文中还提供了确定患有癌症的受试者是否会对用抗CD73拮抗剂和免疫肿瘤学作用剂治疗有反应的方法，其包括确定在受试者肿瘤中CD73的水平和在肿瘤的TIL中的免疫肿瘤学作用剂(例如，检查点抑制剂或共刺激蛋白)靶标的水平，其中肿瘤中CD73的存在和TIL中免疫肿瘤学作用剂靶标的存在表明受试者可能对用抗CD73拮抗剂和免疫肿瘤学作用剂治疗有反应。免疫肿瘤学作用剂可以是PD-1或PD-L1拮抗剂。

[0711] 在某些实施方案中，通过确定在CD8+ T细胞、CD4+ FoxP3- T细胞或CD4+ FoxP3+ T细胞上的肿瘤免疫靶标水平来量度TIL中的肿瘤免疫靶标水平，并且如果在这些细胞类型中的一种或多种上检测到肿瘤免疫靶标表达，那么受试者可能对用抗CD73拮抗剂和免疫肿瘤学作用剂治疗有反应。

[0712] 本文中还提供了确定患有癌症的受试者是否对用抗CD73拮抗剂和PD-1拮抗剂治疗有反应的方法，其包括确定受试者的肿瘤中CD73的水平和在肿瘤的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)中的PD-1的水平，其中肿瘤中CD73的存在和TIL中PD-1的存在表明受试者可能对用抗CD73拮抗剂和抗PD-1拮抗剂治疗有反应。

[0713] 在某些实施方案中，通过确定在CD8+ T细胞、CD4+ FoxP3- T细胞或CD4+ FoxP3+ T细胞上的PD-1水平来量度TIL中的PD-1水平，并且如果在这些细胞类型中的一种或多种上检测到PD-1表达，那么受试者可能对用抗CD73拮抗剂和抗PD-1拮抗剂治疗有反应。

[0714] 还提供了用于治疗患有癌症(或肿瘤)的受试者的方法，其包括(i)确定肿瘤细胞上CD73的表达水平；并且如果在肿瘤细胞上存在CD73，则(ii)向受试者施用治疗有效量的CD73拮抗剂，例如本文所述的抗体。方法可包括从患有癌症的患者获得肿瘤样品，确定肿瘤细胞上的CD73水平，并且如果在肿瘤细胞上检测到CD73，则向受试者施用CD73拮抗剂和任选的另一种免疫肿瘤学作用剂。

[0715] 还提供了用于治疗患有癌症(或肿瘤)的受试者的方法，其包括(i)确定肿瘤细胞上CD73的表达水平；(ii)确定TIL上免疫肿瘤学作用剂靶标(例如，PD-1)的水平，如果在肿瘤细胞上存在CD73并且在TIL上存在免疫肿瘤学作用剂靶标，则(iii)向受试者施用治疗有效量的CD73拮抗剂，例如本文所述的抗体，和靶向所述靶标的免疫肿瘤学作用剂。方法可包括从患有癌症的患者获得肿瘤样品，确定肿瘤细胞上的CD73水平，确定TIL上的PD-1水平，如果在肿瘤细胞上检测到CD73，并且在TIL上检测到PD-1，则向受试者施用CD73拮抗剂和PD-1拮抗剂。

[0716] 在某些实施方案中，用于治疗患有癌症的受试者的方法包括向具有表达CD73的肿瘤细胞的受试者施用抗CD73拮抗剂，从而治疗受试者。用于治疗患有癌症的受试者的方法还可以包括向具有表达CD73的肿瘤细胞和表达免疫肿瘤学作用剂靶标(例如，PD-1)的TIL的受试者施用抗CD73拮抗剂和免疫肿瘤学作用剂(例如，抗PD-1抗体)。

[0717] 进一步涵盖刺激受试者中的免疫应答(例如，抗原特异性T细胞应答)的方法，其包括向受试者施用本文所述的抗CD73抗体，从而刺激受试者中的免疫应答(例如，抗原特异性T细胞应答)。在优选的实施方案中，受试者是带有肿瘤的受试者，并且针对所述肿瘤的免疫应答被刺激。肿瘤可以是实体肿瘤或液体肿瘤(例如，血液恶性肿瘤)。在某些实施方案中，肿瘤是免疫原性肿瘤。在某些实施方案中，肿瘤是非免疫原性的。

[0718] 下文进一步详细论述本文所述的这些及其他方法。

[0719] 癌症

[0720] 用抗CD73抗体与免疫肿瘤学作用剂联合治疗患者可以降低患者中的肿瘤生长和转移。通过抗CD73抗体抑制CD73也可增强针对患者中的癌细胞的免疫应答。本文中提供了用于治疗患有癌症的受试者的方法，其包括向受试者联合施用本文所述的抗CD73抗体与免疫肿瘤学作用剂(例如，抗PD-1抗体)，使得受试者得到治疗，例如使得癌性肿瘤的生长被抑制或减慢和/或肿瘤消退。抗CD73抗体可与另一种药剂(例如，其他免疫原性药剂、标准癌症治疗或其他抗体)结合使用，如下文所述。

[0721] 因此，本文中提供了通过抑制受试者中的肿瘤细胞生长来治疗癌症的方法，例如临床方法，其包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的抗CD73抗体(例如，人抗CD73抗体)或其抗原结合部分以及免疫肿瘤学作用剂。另外地或可替代地，所述抗体可以是嵌合或

人源化抗CD73抗体，例如包含本文所述的抗CD73抗体或其抗原结合部分的嵌合或人源化抗CD73抗体。

[0722] 本文中提供的联合治疗涉及施用抗CD73抗体和免疫肿瘤学作用剂(例如结合抑制性免疫受体的抗体，特别是抗PD-1抗体)来治疗患有肿瘤(例如，晚期实体瘤)的受试者。

[0723] 在某些实施方案中，本文中提供了治疗癌症的方法，其中根据确定的临床剂量方案将抗CD73抗体和抗PD-1抗体施用于患有肿瘤(例如，晚期实体瘤)的患者。在某些实施方案中，抗CD73抗体是CD73.4.IgG2C219S.IgG1.1f(对于重链的SEQ ID NO:133或189，以及对于轻链的SEQ ID NO:102)。在某些实施方案中，抗PD-1抗体是BMS-936558(纳武单抗)。在某些实施方案中，剂量方案经过调整以提供最佳期望反应(例如，有效反应)。

[0724] 如在本文中使用的，辅助或联合的施用(共同施用)包括以相同或不同的剂型同时施用化合物，或分开施用化合物(例如，依次施用)。因此，抗CD73和抗PD-1抗体可以在单一制剂中同时施用。或者，抗CD73和抗PD-1抗体可以被配制为用于分开施用，以及同时或依次施用(例如，一种抗体在第二种抗体施用之前约30分钟之内施用)。

[0725] 例如，可以首先施用抗PD1抗体，接着(例如，立即接着)施用抗CD73抗体，反之亦然。在某些实施方案中，在施用抗CD73抗体之前施用抗PD-1抗体。在另一个实施方案中，在施用抗CD73抗体之后施用抗PD-1抗体。在另一个实施方案中，同时施用抗CD73抗体和抗PD-1抗体。这样的同时或依次施用优选地导致两种抗体同时存在于被治疗的患者中。

[0726] 使用本文所述的抗CD73抗体和免疫肿瘤学作用剂的联合可抑制其生长的癌症包括通常对免疫疗法有反应的癌症。待治疗的癌症的非限制性实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、鳞状非小细胞肺癌(NSCLC)、非NSCLC、神经胶质瘤、胃肠癌、肾癌(例如透明细胞癌)、卵巢癌、肝癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肾癌(例如，肾细胞癌(RCC))、前列腺癌(例如激素难治性前列腺腺癌)、甲状腺癌、神经母细胞瘤、胰腺癌、胶质母细胞瘤(多形性神经胶质母细胞瘤)、宫颈癌、胃癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌和头颈癌(或癌瘤)、胃癌、生殖细胞肿瘤、儿科肉瘤、鼻窦自然杀伤细胞淋巴瘤(sinonasal natural killer)、黑色素瘤(例如，转移性恶性黑色素瘤，例如皮肤或眼内恶性黑色素瘤)、骨癌、皮肤癌、子宫癌、肛区癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、儿童实体瘤、输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统的新生物(CNS)、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊柱轴(spinal axis)肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱导的癌症(包括那些由石棉诱导的癌症)、病毒相关癌症(例如，人乳头瘤病毒(HPV)相关肿瘤)、衍生自两种主要血细胞谱系(即，骨髓细胞系(其产生粒细胞、红细胞、凝血细胞、巨噬细胞和肥大细胞)或淋巴细胞系(其产生B、T、NK和浆细胞)中的任一者的血液学恶性肿瘤，比如所有类型的白血病、淋巴瘤和骨髓瘤，例如急性、慢性、淋巴细胞性及/或骨髓性白血病，例如急性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)和慢性骨髓性白血病(CML)、未分化的AML(M0)、成髓细胞性白血病(M1)、成髓细胞性白血病(M2;细胞成熟)、前髓细胞性白血病(M3或M3变体[M3V])、骨髓单核细胞性白血病(M4或具有嗜酸性粒细胞增多症的M4变体[M4E])、单核细胞白血病(M5)、红白血病(M6)、巨核细胞白血病(M7)、分离的粒细胞肉瘤和绿色瘤;淋巴瘤，例如霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞样淋巴瘤、单核细胞样B细胞淋巴瘤、粘膜相

关淋巴样组织(MALT)淋巴瘤、间变性(例如,Ki 1+)大细胞淋巴瘤、成人T细胞淋巴瘤/白血病、套细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤、肠T细胞淋巴瘤、原发性纵膈B细胞淋巴瘤、前体T淋巴母细胞性淋巴瘤、T淋巴母细胞性;和淋巴瘤/白血病(T-Lbly/T-ALL)、外周T细胞淋巴瘤、淋巴母细胞性淋巴瘤、移植后淋巴组织增殖性疾病、真性组织细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤(LBL)、淋巴谱系的造血肿瘤、急性淋巴母细胞白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、弥漫性组织细胞性淋巴瘤(DHL)、免疫母细胞大细胞淋巴瘤、前体B-淋巴母细胞性淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤(CTLC)(也称为蕈样真菌病或塞扎里综合征(Sezary syndrome))和具有瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症的淋巴浆细胞性淋巴瘤(LPL);骨髓瘤,比如IgG骨髓瘤、轻链骨髓瘤、非分泌型骨髓瘤、冒烟型骨髓瘤(也称为惰性骨髓瘤)、孤立性浆细胞瘤和多发性骨髓瘤、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞淋巴瘤;骨髓谱系的造血肿瘤、间质起源的肿瘤(包括纤维肉瘤和横纹肌肉瘤);精原细胞瘤、畸胎癌、中枢和周围神经肿瘤,包括星形细胞瘤、许旺细胞瘤;间质起源的肿瘤,包括纤维肉瘤、横纹肌肉瘤和骨肉瘤;及其他肿瘤,包括黑色素瘤、着色性干皮病、角化棘皮瘤、精原细胞瘤、甲状腺滤泡癌和畸胎癌、淋巴谱系的造血肿瘤,例如T细胞和B细胞肿瘤,包括但不限于T细胞疾病,例如T前淋巴细胞性白血病(T-PLL),包括小细胞和脑回样细胞型;优选T细胞型的大颗粒淋巴细胞白血病(LGL);a/d T-NHL肝脾淋巴瘤;外周/胸腺后T细胞淋巴瘤(多形性和免疫母细胞亚型);血管中心性(鼻)T细胞淋巴瘤;头或颈癌、肾癌、直肠癌、甲状腺癌;急性骨髓性淋巴瘤,以及所述癌症的任何组合。本文所述的方法也可用于治疗转移性癌症、难治性癌症(例如,例如用阻断CTLA-4或PD-1或PD-L1抗体的先前免疫疗法难治的癌症)以及复发性癌症。

[0727] 所述方法可用于治疗CD73阳性或表达高水平CD73的肿瘤或癌症。一种方法可包括首先确定肿瘤或肿瘤细胞上的CD73水平,并且如果所述肿瘤或细胞表达CD73,例如高水平的CD73,则用例如本文所述的抗CD73抗体进行治疗。

[0728] 在某些实施方案中,待治疗的患者患有肺癌。在某些实施方案中,待治疗的患者患有甲状腺癌。在某些实施方案中,待治疗的患者患有胰腺癌。在某些实施方案中,待治疗的患者患有子宫内膜癌。在某些实施方案中,待治疗的患者患有结肠癌。在某些实施方案中,待治疗的患者患有肺鳞状细胞癌。在某些实施方案中,待治疗的患者患有头颈部鳞状细胞癌。在某些实施方案中,待治疗的患者患有卵巢癌(例如,上皮性卵巢癌、原发性腹膜癌、输卵管癌)。在某些实施方案中,待治疗的患者患有胃癌(例如,胃食道交界处肿瘤)。在某些实施方案中,待治疗的患者具有活检可取得的病变。在某些实施方案中,患者患有表达CD73的肿瘤。在某些实施方案中,患者患有表达高水平CD73的肿瘤,例如相对于与肿瘤相同病因的健康组织中CD73水平的较高CD73水平。

[0729] 在某些实施方案中,患者具有表达CD73的肿瘤和在肿瘤中表达PD-1的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。在某些实施方案中,患者具有表达高水平CD73的肿瘤和表达高水平PD-1的TIL。

[0730] 在某些实施方案中,患者患有表达CD73和A2A腺苷受体(A2AR)的肿瘤。在某些实施方案中,患者具有表达CD73和A2AR的肿瘤以及表达PD-1的TIL。在某些实施方案中,患者具有表达高水平CD73和A2AR的肿瘤和表达高水平PD-1的TIL。

[0731] 使用本领域的标准方法,例如免疫组织化学或mRNA水平的定量,可以确定肿瘤中

的CD73和A2AR以及TIL中的PD-1的表达水平。

[0732] 在某些实施方案中，治疗产生了至少一种疗效，其选自肿瘤尺寸的减小、转移灶数目随着时间的减少、完全缓解、部分缓解、和疾病稳定。

[0733] 关于靶病灶，对治疗的反应可以包括：

[0734]

完全缓解(CR) (RECIST V1.1)	所有靶病灶消失。任何病理性淋巴结(不论靶或非靶)在短轴上必须减小至 <10 mm。
部分缓解(PR) (RECIST V1.1)	以基线直径总和为基准，靶病灶的直径总和减小至少30%。
疾病进展(PD) (RECIST V1.1)	以研究中的最小总和为基准(如果基线总和在研究中是最小的话，这包括基线总和)，靶病灶的直径总和增加至少20%。除了相对增加20%之外，所述总和还必须显示至少5 mm的绝对增加。(注：一个或多个新病灶的出现也被视为进展)。

[0735]

疾病稳定(SD) (RECIST V1.1)	以研究期间的最小直径总和为基准，既没有足够定性为PR的缩小，也没有足够定性为PD的增加。
免疫相关性完全缓解(irCR) (irRECIST)	所有靶病灶消失。任何病理性淋巴结(不论靶或非靶)在短轴上必须减小至 <10 mm。
免疫相关性部分缓解(irPR) (irRECIST)	以基线直径总和为基准，靶病灶和所有新的可测量病灶的直径总和减小至少30%(即，肿瘤负荷的百分比变化)。注：新的可测量病灶的出现被考虑为总肿瘤负荷的因素，但并非自动定性为疾病进展，直到与最低值相比直径总和增加≥20%。
免疫相关性疾病进展(irPD) (irRECIST)	以研究中的最小总和为基准(如果基线总和在研究中是最小的话，这包括基线总和)，肿瘤负荷(即，靶病灶和任何新的可测量病灶的直径总和)增加至少20%。除了相对增加20%之外，所述总和还必须显示至少5 mm的绝对增加。使用关于疾病进展的免疫相关标准的肿瘤评估结合了新的可测量病灶的影响。每一评估的肿瘤负荷的每个净百分比变化解释了旧病灶和新病灶在其出现时的尺寸和生长动力学。
免疫相关性疾病稳定(irSD) (irRECIST)	以研究期间的最小直径总和为基准，既没有足够定性为irPR的缩小，也没有足够定性为irPD的增加。

[0736] 关于非靶病灶，对治疗的反应可以包括：

[0737]

完全缓解(CR) (RECIST V1.1)	所有非靶病灶消失。所有淋巴结在尺寸上必须是非病理性的(短轴<10 mm)。
非CR/非PD (RECIST V1.1)	一个或多个非靶病灶持续存在。
疾病进展(PD) (RECIST V1.1)	存在的非靶病灶的明确进展。出现一个或多个新的病灶也被视为进展。
免疫相关性完全缓解(irCR) (irRECIST)	所有非靶病灶消失。所有淋巴结在尺寸上必须是非病理性的(短轴<10 mm)。
免疫相关性疾病进展(irPD) (irRECIST)	非靶病灶在上数目或尺寸上的增加病灶不构成疾病进展，除非/直到肿瘤负荷增加20%(即，在最低值的靶病灶和任何新的可测量病灶的直径总和以必需的量增加)。非靶病灶不被视为在疾病稳定和部分缓解的定义之内。

[0738] 根据本文中公开的方法治疗的患者优选地经历癌症的至少一种体征的改善。在某些实施方案中，以可测量肿瘤病灶的数量和/或尺寸的降低来衡量改善。在某些实施方案中，可以在胸部x射线或CT或MRI胶片上测量病灶。在某些实施方案中，可以使用细胞学或组织学来评价对治疗的反应性。

[0739] 在某些实施方案中，被治疗的患者表现出完全缓解(CR)、部分缓解(PR)、疾病稳定(SD)、免疫相关性完全缓解(irCR)、免疫相关性部分缓解(irPR)、或免疫相关性疾病稳定(irSD)。在某些实施方案中，被治疗的患者发生肿瘤缩小和/或生长速度的降低，即肿瘤生长的抑制。在某些实施方案中，不需要的细胞增殖被减弱或抑制。在某些实施方案中，可以发生以下一种或多种情况：癌细胞的数量可以减少；肿瘤尺寸可以减小；可以抑制、延缓、减慢或停止癌细胞浸润到周围器官；可以减慢或抑制肿瘤转移；可以抑制肿瘤生长；可以预防或延缓肿瘤复发；可以在一定程度上减轻一种或多种与癌症相关的症状。

[0740] 在某些实施方案中，根据本文中提供的任何方法施用有效量的抗CD73抗体和免疫肿瘤学作用剂(例如，抗PD-1抗体)产生选自以下的至少一种疗效：肿瘤尺寸的减小、随时间出现的转移灶数量的减少、完全缓解、部分缓解、或病情稳定。在某些实施方案中，与单独的

抗CD73抗体或免疫肿瘤学作用剂所达到的临床受益率相比，治疗方法产生了相当的临床受益率(CBR＝CR+PR+SD≥6个月)。在某些实施方案中，与单独的抗CD73抗体或免疫肿瘤学作用剂相比，临床受益率的提高为约20％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％或更高。

[0741] 在某些实施方案中，通过计算机断层摄影和/或磁共振成像进行治疗之前、期间和/或之后的病情评估。在某些实施方案中，在基线和从治疗开始后每7-10周一次进行病情评估，直到治疗中止或完成。

[0742] 在某些实施方案中，通过ORR、DOR和PFSR量度抗肿瘤功效。ORR在本文中定义为其最佳总缓解(BOR)为CR或PR的所有治疗患者的比例。BOR在本文中定义为在第一剂量的日期一直到后续治疗之前的最后一次肿瘤评估之间记录的整个研究的最佳缓解认定。DOR在本文中定义为在首次缓解日期与疾病进展或死亡日期(以先发生者为准)之间的时间。PFSR在本文中定义为被治疗受试者保持无进展和生存的比例。例如，24周PFSR是指被治疗受试者在第24周保持无进展且生存的比例。

[0743] 在某些实施方案中，基于从患者获得的活检样品进行治疗之前、期间和/或之后的病情评估。活检样品可以为例如空芯针活检、切除活检或切口活检。

[0744] 在某些实施方案中，待治疗的患者具有至少一种病变，其中可测量疾病如RECIST v1.1所定义。

[0745] 在某些实施方案中，待治疗的患者具有如RECIST v1.1所定义的疾病进展。

[0746] 在某些实施方案中，待治疗的患者患有晚期(例如转移性和/或不可切除的)恶性肿瘤，其中可测量疾病如RECIST v1.1所定义。

[0747] 在某些实施方案中，待治疗的患者已接受至少1种标准治疗方案，然后在晚期或转移性环境下出现进展或对所述方案的不耐受。

[0748] 在某些实施方案中，待治疗的患者先前已经用特异性地靶向检查点通路抑制的药剂(例如，抗PD-1、抗PD-L1、抗PD-L2、抗LAG-3和抗CTLA-4抗体)治疗。

[0749] 在某些实施方案中，待治疗的患者先前已经用特异性地靶向T细胞共刺激通路的药剂(例如，抗糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体抗体，抗CD137和抗OX40抗体)治疗。

[0750] 在某些实施方案中，待治疗的患者已经历了先前的姑息性放射治疗。

[0751] 在某些实施方案中，待治疗的患者具有足够的器官功能，总结如下：白细胞计数≥2000/μL，中性粒细胞≥1500/μL，血小板≥100×10^3/μL，血红蛋白≥9g/dL，丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)≤3×正常值上限(ULN)，总胆红素≤1.5×ULN，白蛋白＞2g/dL(20g/L)，国际标准化比率＜1.5×ULN，活化部分凝血酶原时间＜1.5×ULN，临床正常的甲状腺功能或甲状腺功能减退在适当的甲状腺补充给药法的基础上已经得到控制，以及血清肌酐≤1.5×ULN或肌酐清除率(CrCl)≥40mL/min。

[0752] 在某些实施方案中，待治疗的患者不具有已知的或疑似的CNS转移、未治疗的CNS转移，或以CNS为唯一疾病部位。然而，在某些实施方案中，具有受到控制的脑转移的患者适合用本文中公开的方法治疗，所述患者定义为在放射和/或手术治疗后至少4周没有放射学进展(或者如果没有临床指示干预则观察4周)，停止类固醇至少2周，并且没有新的或进行性的神经系统体征和症状。

[0753] 在某些实施方案中，待治疗的患者没有癌性脑膜炎。

[0754] 在某些实施方案中，待治疗的患者无临床相关腹水(即，需要穿刺的腹水)或中度

放射学腹水。

[0755] 在某些实施方案中，待治疗的患者先前未曾用纳武单抗治疗。

[0756] 在某些实施方案中，待治疗的患者先前没有恶性肿瘤。

[0757] 在某些实施方案中，待治疗的患者没有需要同时干预的不同的活动性恶性肿瘤。

[0758] 在某些实施方案中，待治疗的患者先前没有器官同种异体移植。

[0759] 在某些实施方案中，待治疗的患者先前未用抗CD73抗体、抗CD39抗体或腺苷2A受体抑制剂治疗。

[0760] 在某些实施方案中，待治疗的患者没有脑血管意外、深静脉血栓形成或其他动脉血栓的既往病史。

[0761] 在某些实施方案中，待治疗的患者没有活动性的、已知的或疑似的自身免疫病。然而，在某些实施方案中，患有白癜风、1型糖尿病、由于自身免疫病症所致的仅需要激素替代的残留甲状腺功能减退的患者、具有格雷夫病史的甲状腺机能正常、不需要全身治疗的银屑病、或在缺乏外部触发因素的情况下预期不会复发的病症的患者适合用本文中公开的方法治疗。

[0762] 在某些实施方案中，待治疗的患者没有症状性的或可能干扰疑似的药物相关肺毒性的检测或管理的间质性肺病。

[0763] 在某些实施方案中，待治疗的患者没有需要剂量大于10mg/天的泼尼松或等效物的复发性类固醇冲击或长期类固醇的慢性阻塞性肺病。

[0764] 在某些实施方案中，待治疗的患者在研究药物施用的14天内没有需要用皮质类固醇(＞10mg每日泼尼松等效物)或其他免疫抑制药物进行全身治疗的病症，在没有活动性自身免疫病的情况下＞10mg每日泼尼松等效物的肾上腺替代类固醇剂量除外。

[0765] 在某些实施方案中，待治疗的患者没有未控制的或显著的心血管疾病，包括例如在治疗开始后6个月内的心肌梗死或中风/短暂性脑缺血发作、在治疗开始后3个月内未控制的心绞痛、临床上显著的心律失常(例如，室性心动过速，心室颤动或尖端扭转型室性心动过速)病史、使用Fridericia公式校正心率的QT间期(QTcF)延长＞480毫秒、其他临床上显著的心脏病史(例如，心肌病、纽约心脏病学会[NYHA]功能分类为III至IV的充血性心力衰竭、心包炎、显著心包积液)、每日补充氧气治疗的需要。

[0766] 在某些实施方案中，待治疗的患者没有活动性肝炎。

[0767] 在某些实施方案中，待治疗的患者在开始治疗前≤7天没有活动性细菌、病毒或真菌感染。

[0768] 在某些实施方案中，待治疗的患者没有人免疫缺陷病毒(HIV)阳性检测史或已知的获得性免疫缺陷综合征(AIDS)。

[0769] 在某些实施方案中，待治疗的患者没有活动性或潜伏性结核感染的证据或病史。

[0770] 在某些实施方案中，待治疗的患者在治疗的4周内未经历大手术。

[0771] 在某些实施方案中，将治疗开始之前归因于除了患者脱发和疲劳之外的先前抗癌疗法的所有毒性解析为1级(国家癌症研究所[NCI]不良事件通用术语标准[CTCAE]版本4.03)或基线。然而，在某些实施方案中，具有归因于先前抗癌疗法的预期不会消退并导致持久的后遗症(比如铂类疗法后的慢性神经病变)的毒性的那些患者适合用本文中公开的方法治疗。

[0772] 在某些实施方案中，待治疗的患者在治疗的12周内未使用含有活病毒的用于预防感染性疾病的非肿瘤疫苗。

[0773] 在某些实施方案中，待治疗的患者在治疗前2周内未使用浓缩红细胞或接受血小板输注。

[0774] 在某些实施方案中，待治疗的患者没有纳武单抗过敏史。

[0775] 在某些实施方案中，待治疗的患者对先前的抗-癌免疫调节疗法(例如，检查点抑制剂、T细胞共-刺激抗体)没有药物过敏史(比如过敏反应)。

[0776] 联合治疗

[0777] 与免疫肿瘤学作用剂(例如抗PD-1抗体)联合的针对CD73的抗体(例如，本文所述的抗CD73抗体)可与免疫原性物质(比如癌细胞、纯化的肿瘤抗原(包括重组蛋白、肽和碳水化合物分子)、细胞以及用编码免疫刺激性细胞因子的基因转染的细胞)联合(He等人(2004)J.Immunol.173:4919-28)。可以使用的肿瘤疫苗的非限制性实例包括黑色素瘤抗原的肽，比如gp100、MAGE抗原、Trp-2、MART1和/或酪氨酸酶的肽，或经转染表达细胞因子GM-CSF的肿瘤细胞(下文进一步论述)。

[0778] 在人类中，一些肿瘤如黑色素瘤已显示具有免疫原性。通过降低经由CD73抑制的T细胞活化的阈值，可激活宿主中的肿瘤反应，从而允许治疗非免疫原性肿瘤或那些具有有限的免疫原性的肿瘤。

[0779] 抗CD73抗体(例如，本文所述的抗CD73抗体)以及任选的免疫肿瘤学作用剂可与疫苗接种方案联合。已设计针对肿瘤的疫苗接种的许多实验策略(参见Rosenberg,S.,2000,Development of Cancer Vaccines,ASCO Educational Book Spring:60-62;Logothetis,C.,2000,ASCO Educational Book Spring:300-302;Khayat,D.2000,ASCO Educational Book Spring:414-428;Foon,K.2000,ASCO Educational Book Spring:730-738;还参见Restifo,N.和Sznol,M.,Cancer Vaccines,Ch.61,第3023-3043页,DeVita等人(编辑)，1997,Cancer:Principles and Practice of Oncology,第五版)。在这些策略中之一中，使用自体或同种异体肿瘤细胞制备疫苗。已显示这些细胞疫苗在肿瘤细胞被转导为表达GM-CSF时最有效。已显示GM-CSF是用于肿瘤疫苗接种的强力的抗原呈递活化剂(Dranoff等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.90:3539-43)。

[0780] 在各种肿瘤中基因表达和大规模基因表达模式的研究产生了所谓的肿瘤特异性抗原的定义(Rosenberg,S A(1999)Immunity 10:281-7)。在许多情况下，这些肿瘤特异性抗原是在肿瘤和产生肿瘤的细胞中表达的分化抗原，例如黑色素细胞抗原gp100、MAGE抗原和Trp-2。更重要的是，许多这些抗原可能显示为在宿主中发现的肿瘤特异性T细胞的靶标。CD73抑制可与肿瘤中表达的一系列重组蛋白和/或肽的结合使用，以便产生针对这些蛋白质的免疫应答。这些蛋白质通常被免疫系统视为自身抗原并且因此对其具有耐受性。肿瘤抗原可包括蛋白端粒酶，这种酶是染色体端粒合成所需的，并且在高于85％的人类癌症和仅仅有限数目的体细胞组织中表达(Kim等人(1994)Science 266:2011-2013)。肿瘤抗原也可以是由于改变蛋白质序列或产生两个无关序列(即，费城染色体中的bcr-abl)的融合蛋白的体细胞突变、或来自B细胞肿瘤的独特型而在癌细胞中表达的“新抗原”。

[0781] 其他肿瘤疫苗可包括来自牵涉人类癌症的病毒(比如人乳头瘤病毒(HPV)、肝炎病毒(HBV和HCV)和卡波西疱疹肉瘤病毒(KHSV))的蛋白质。可与CD73抑制结合使用的另一种

形式的肿瘤特异性抗原是从肿瘤组织自身分离的纯化的热休克蛋白(HSP)。这些热休克蛋白含有来自肿瘤细胞的蛋白质的片段,并且这些HSP在递送至抗原呈递细胞时高度有效地引出肿瘤免疫(Suot和Srivastava(1995)Science 269:1585-1588;Tamura等人(1997)Science 278:117-120)。

[0782] 树突细胞(DC)是可用于引发抗原特异性应答的强有力的抗原呈递细胞。DC可离体产生并且装载有各种蛋白质和肽抗原以及肿瘤细胞提取物(Nestle等人(1998)Nature Medicine 4:328-332)。还可以通过遗传手段转导DC使之也表达这些肿瘤抗原。还将DC与肿瘤细胞直接融合用于免疫目的(Kugler等人(2000)Nature Medicine 6:332-336)。作为疫苗接种的方法,DC免疫可有效地与CD73抑制联合,以激活更有力的抗肿瘤反应。

[0783] CD73抑制任选地连同免疫肿瘤学作用剂(例如,抗PD-1抗体)可以与标准癌症治疗(例如,手术、放射和化学疗法)联合。CD73抑制可有效地与化学治疗方案联合。在这些情况下,有可能减少所施用化学治疗试剂的剂量(Mokyr等人(1998)Cancer Research 58:5301-5304)。这样的联合的一个实例是用于治疗黑色素瘤的抗CD73抗体与氨烯咪胺(decarbazine)的联合。这样的联合的另一个实例是用于治疗黑色素瘤的抗CD73抗体与白细胞介素-2(IL-2)的联合。支持CD73抑制与化学疗法联合使用的科学理论基础是:细胞死亡(这是大部分化学治疗化合物的细胞毒性作用的结果)会导致在抗原呈递途径中的肿瘤抗原水平增加。可通过细胞死亡与CD73抑制产生协同作用的其他联合治疗有放射、手术和激素剥夺。这些方案的每一者在宿主中产生肿瘤抗原的来源。也可将血管生成抑制剂与CD73抑制联合。血管生成的抑制导致肿瘤细胞死亡,这可以向宿主抗原呈递途径中输入肿瘤抗原。

[0784] 这样的组合的另一个实例是抗CD73抗体和任选的免疫肿瘤学作用剂(例如,抗PD-1抗体)与抗CD39、抗A2AR或化学抑制剂(例如,SCH58261),或抗A2BR抗体或化学抑制剂的联合。支持联合使用CD73抑制和CD39、A2AR或A2BR抑制的科学理论基础是这些蛋白质也与CD73生物学功能和信号转导有关。具体地说,CD39催化ATP或ADP转化为AMP,从而为CD73酶活性提供底物(AMP)(即AMP转化为腺苷)。此外,腺苷是包括A1R、A2AR、A2BR和A3在内的四种已知受体的配体。已显示A2AR和A2BR通过cAMP信号转导调节肿瘤细胞增殖、生长、迁移和转移,以及肿瘤环境中的T细胞活化。

[0785] 抗CD73抗体任选地连同免疫肿瘤学作用剂(例如,抗PD-1抗体)还可与双特异性抗体联合使用,所述双特异性抗体将表达Fca或Fcγ受体的效应细胞靶向至肿瘤细胞(例如,参见美国专利No.5,922,845和5,837,243)。双特异性抗体可用于靶向两种单独的抗原。例如,抗Fc受体/抗肿瘤抗原(例如,Her-2/neu)双特异性抗体已用于将巨噬细胞靶向至肿瘤部位。这种靶向可更有效地激活肿瘤特异性反应。或者,可通过使用与肿瘤抗原和树突细胞特异性细胞表面标志物结合的双特异性抗体将抗原直接递送至DC。

[0786] 肿瘤通过多种机制逃避宿主免疫监视。通过使肿瘤表达的免疫抑制性蛋白失活,可以克服许多这些机制。这些机制特别包括TGF-β(Kehrl等人(1986)J.Exp.Med.163:1037-1050)、IL-10(Howard&O'Garra(1992)Immunology Today 13:198-200)、以及Fas配体(Hahne等人(1996)Science 274:1363-1365)。针对这些实体中的每一者的抗体可与抗CD73抗体联合使用,以抵消免疫抑制剂的影响并有利于宿主的肿瘤免疫应答。

[0787] 其他激活宿主免疫应答性的抗体可与抗CD73抗体联合使用。这些抗体包括在树突

细胞表面上的激活DC功能和抗原呈递的分子。对于辅助性T细胞活性，抗CD40抗体能够有效地取代抗CD73抗体(Ridge等人(1998)Nature 393:474-478)，并且可与其结合使用。针对T细胞共刺激分子的活化抗体也可以提供增加的T细胞活化水平，所述T细胞共刺激分子例如OX-40(Weinberg等人(2000)Immunol 164:2160-2169)、4-1BB(Melero等人(1997)Nature Medicine 3:682-685(1997)和ICOS(Hutloff等人(1999)Nature 397:262-266)。PD1、PD-L1或CTLA-4的抑制剂(例如，美国专利No.5,811,097)也可以与抗CD73抗体结合使用。

[0788] 本文所述的其他方法用于治疗已暴露于特定毒素或病原体的患者。因此，本文所述的另一方面提供了治疗受试者中的感染性疾病的方法，其包括向受试者施用抗CD73抗体或其抗原结合部分，从而治疗受试者的感染性疾病。另外地或可替代地，抗体可以是嵌合或人源化抗体。

[0789] 在所有上述方法中，CD73抑制和任选的免疫肿瘤学作用剂可与其他形式的免疫疗法(比如细胞因子治疗(例如，干扰素、GM-CSF、G-CSF、IL-2)或双特异性抗体疗法(其提供增强的肿瘤抗原呈递(例如，参见Holliger(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448;Poljak(1994)Structure 2:1121-1123))联合。

[0790] 除上文所述的联合治疗外，本文所述的抗CD73抗体和任选的免疫肿瘤学作用剂也可在例如用于治疗癌症的联合治疗中使用，如下文所述。

[0791] 本文中进一步提供了联合治疗的方法，其中抗CD73抗体与一种或多种另外的药剂(例如，抗体)共同施用，所述另外的药剂在刺激免疫应答中有效，从而进一步增强、刺激或上调受试者中的免疫应答。

[0792] 通常，本文所述的抗CD73抗体可以与T细胞上的(i)共刺激受体的激动剂和/或(ii)抑制信号的拮抗剂联合，这两者都导致抗原特异性T细胞反应(免疫检查点调节剂)的放大。大多数共刺激和共抑制分子是免疫球蛋白超家族(IgSF)的成员，并且本文所述的抗CD73抗体可以与靶向IgSF家族成员的药剂一起施用以增加免疫应答。与共刺激或共抑制受体结合的膜结合配体的一个重要家族是B7家族，其包括(PD-L1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H2(ICOS-L)、B7-H3、B7-H4、B7-H5(VISTA)和B7-H6。另一个与共刺激或共抑制受体结合的膜结合配体家族是与同源TNF受体家族成员结合的分子的TNF家族，包括CD40和CD40L、OX-40、OX-40L、CD70、CD27L、CD30、CD30L、4-1BBL、CD137、GITR、TRAIL/Apo2-L、TRAILR1/DR4、TRAILR2/DR5、TRAILR3、TRAILR4、OPG、RANK、RANKL、TWEAKR/Fn14、TWEAK、BAFFR、EDAR、XEDAR、TACI、APRIL、BCMA、LTβR、LIGHT、DcR3、HVEM、VEGI/TL1A、TRAMP/DR3、EDAR、EDA1、XEDAR、EDA2、TNFR1、淋巴毒素α/TNFβ、TNFR2、TNFα、LTβR、淋巴毒素α1β2、FAS、FASL、RELT、DR6、TROY、NGFR(参见，例如Tansey(2009)Drug Discovery Today 00:1)。T细胞活化也受可溶性细胞因子的调节。因此，抗CD73抗体可以与下列各项联合：(i)抑制T细胞活化的IgSF家族或B7家族或TNF家族的蛋白质的拮抗剂(或抑制剂或阻断剂)或抑制T细胞活化的细胞因子(例如，IL-6、IL-10、TGF-β、VEGF;“免疫抑制细胞因子”)的拮抗剂和/或(ii)IgSF家族、B7家族或TNF家族的刺激性受体的激动剂，或刺激T细胞活化的细胞因子的激动剂，用于刺激免疫应答，例如用于治疗诸如癌症的增殖性疾病。

[0793] 例如，可通过本文所述的抗CD73抗体(例如CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f)与以下药剂中的一种或多种联合来刺激T细胞应答：

[0794] (1)抑制T细胞活化的蛋白质的拮抗剂(抑制剂或阻断剂)(例如，免疫检查点抑制

剂)，所述蛋白质例如如上所述的CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2和LAG-3，以及任何以下蛋白质：TIM-3、半乳凝素9、CEACAM-1、BTLA、CD69、半乳凝素-1、TIGIT、CD113、GPR56、VISTA、2B4、CD48、GARP、CD73、PD1H、LAIR1、TIM-1、TIM-4、CD39。

[0795] (2)刺激T细胞活化的蛋白质的激动剂，所述蛋白质例如B7-1、B7-2、CD28、4-1BB(CD137)、4-1BBL、GITR、GITRL、ICOS、ICOS-L、OX40、OX40L、CD70、CD27、CD40、DR3和CD28H。

[0796] 调节上述蛋白质之一并可与拮抗剂抗CD73抗体(例如，本文所述用于治疗癌症的那些)联合的示例性药剂包括：Yervoy™(伊匹单抗)或曲美木单抗(针对CTLA-4)、加利昔单抗(针对B7.1)、BMS-936558(针对PD-1)、CT-011(针对PD-1)、MK-3475(针对PD-1)、AMP224(针对B7DC)、BMS-936559(针对B7-H1)、MPDL3280A(针对B7-H1)、MEDI-570(针对ICOS)、AMG557(针对B7H2)、MGA271(针对B7H3)、IMP321(针对LAG-3)、BMS-663513(针对CD137)、PF-05082566(针对CD137)、CDX-1127(针对CD27)、抗OX40抗体(Providence Health SerVices)、huMAbOX40L(针对OX40L)、阿塞西普(针对TACI)、CP-870893(针对CD40)、鲁卡木单抗(针对CD40)、达西珠单抗(针对CD40)、莫罗单抗-CD3(针对CD3)、伊匹单抗(针对CTLA-4)。

[0797] 可以与拮抗剂抗CD73抗体联合用于治疗癌症的其他分子包括NK细胞上的抑制性受体的拮抗剂或NK细胞上的活化性受体的激动剂。例如，抗CD73拮抗剂抗体可以与KIR的拮抗剂(例如，立鲁单抗)联合。

[0798] T细胞活化还受到可溶性细胞因子的调节，并且抗CD73抗体可以与抑制T细胞活化的细胞因子的拮抗剂或刺激T细胞活化的细胞因子的激动剂一起施用于例如患有癌症的受试者。

[0799] 在某些实施方案中，抗CD73抗体可以与下列各项联合：(i)抑制T细胞活化的IgSF家族或B7家族或TNF家族的蛋白质的拮抗剂(或抑制剂或阻断剂)或抑制T细胞活化的细胞因子(例如，IL-6、IL-10、TGF-β、VEGF；“免疫抑制细胞因子”)的拮抗剂和/或(ii)IgSF家族、B7家族或TNF家族的刺激性受体的激动剂，或刺激T细胞活化的细胞因子的激动剂，用于刺激免疫应答，例如用于治疗诸如癌症的增殖性疾病。

[0800] 用于联合治疗的其他药剂还包括抑制或耗竭巨噬细胞或单核细胞的药剂，包括但不限于CSF-1R拮抗剂，比如CSF-1R拮抗剂抗体，包括RG7155(WO11/70024、WO11/107553、WO11/131407、WO13/87699、WO13/119716、WO13/132044)或FPA-008(WO11/140249；WO13169264；WO14/036357)。

[0801] 抗CD73抗体也可以与抑制TGF-β信号转导的药剂一起施用。

[0802] 可以与抗CD73抗体联合的另外的药剂包括增强肿瘤抗原呈递的药剂，例如树突细胞疫苗、分泌GM-CSF的细胞疫苗、CpG寡核苷酸和咪喹莫特，或增强肿瘤细胞的免疫原性的治疗(例如，蒽环类)。

[0803] 可与抗CD73抗体联合的其他治疗还包括耗竭或阻断Treg细胞的治疗，例如与CD25特异性地结合的药剂。

[0804] 另一种可与抗CD73抗体联合的治疗是抑制代谢酶比如吲哚胺双加氧酶(IDO)、双加氧酶、精氨酸酶或一氧化氮合成酶的治疗。

[0805] 另一类可与抗CD73抗体一起使用的药剂包括抑制腺苷形成或抑制腺苷A2A受体的药剂。

[0806] 可以与用于治疗癌症的抗CD73抗体联合的其他治疗包括逆转/预防T细胞无能或耗竭的治疗和在肿瘤部位触发先天免疫激活和/或炎症的治疗。

[0807] 抗CD73抗体可以与多于一种的免疫肿瘤学作用剂联合，并且可以例如与靶向免疫途径的多种成分的组合方法联合，所述组合方法例如以下一种或多种：增强肿瘤抗原呈递的治疗(例如，树突细胞疫苗，分泌GM-CSF的细胞疫苗、CpG寡核苷酸、咪喹莫特)；例如通过抑制CTLA-4和/或PD1/PD-L1/PD-L2途径和/或耗竭或阻断Treg或其他免疫抑制性细胞来抑制负性免疫调节的治疗；刺激正性免疫调节的治疗，例如用刺激CD-137、OX-40和/或CD73途径和/或刺激T细胞效应子功能的激动剂；全身性地增加抗肿瘤T细胞的频率的治疗；耗竭或抑制Treg(比如肿瘤中的Treg)的治疗，例如使用CD25拮抗剂(例如，达利珠单抗)或通过离体抗CD25珠耗竭；影响肿瘤中的抑制性髓样细胞功能的治疗；增强肿瘤细胞的免疫原性的治疗(例如，蒽环类)；过继性T细胞或NK细胞转移，所述细胞包括遗传修饰的细胞，例如经嵌合抗原受体修饰的细胞(CAR-T疗法)；抑制代谢酶如吲哚胺双加氧酶(IDO)、双加氧酶、精氨酸酶或一氧化氮合成酶的治疗；逆转/防止T细胞无能或耗竭的治疗；在肿瘤部位触发先天免疫激活和/或炎症的治疗；免疫刺激性细胞因子的施用；或免疫抑制性细胞因子的阻断。

[0808] 通常，本文所述的抗CD73抗体可以与一种或多种下列药剂一起使用：连接正性共刺激受体的激动剂；通过抑制性受体减弱信号转导的阻断剂、拮抗剂和一种或多种全身性地增加抗肿瘤T细胞的频率的药剂；克服肿瘤微环境中不同免疫抑制途径(例如，阻断抑制性受体接合(例如，PD-L1/PD-1相互作用))、耗竭或抑制Treg(例如，使用抗CD25单克隆抗体(例如，达利珠单抗)或通过离体抗CD25珠耗竭)、抑制代谢酶比如IDO、或逆转/预防T细胞无能或耗竭)的药剂以及在肿瘤部位触发先天免疫激活和/或炎症的药剂。抑制性受体的内化增加可能转化为较低水平的潜在抑制剂(假设信号转导不会跟着发生)。

[0809] 在某些实施方案中，如果受试者为BRAF V600突变阳性，则将抗CD73抗体与BRAF抑制剂一起施用于受试者。

[0810] 本文中提供了刺激受试者中的免疫应答的方法，其包括向受试者施用拮抗剂抗CD73分子，例如抗体和一种或多种另外的免疫刺激性抗体，如抗PD-1拮抗剂(例如，拮抗剂抗体)、抗PD-L1拮抗剂(例如，拮抗剂抗体)、拮抗剂抗CTLA-4拮抗剂(例如，拮抗剂抗体)和/或抗LAG3拮抗剂(例如，拮抗剂抗体)，从而刺激受试者中的免疫应答，以便例如抑制肿瘤生长或刺激抗病毒反应。在一个实施方案中，给受试者施用拮抗剂抗CD73抗体和拮抗剂抗PD-1抗体。在一个实施方案中，给受试者施用拮抗剂抗CD73抗体和拮抗剂抗PD-L1抗体。在一个实施方案中，给受试者施用拮抗剂抗CD73抗体和拮抗剂抗CTLA-4抗体。在一个实施方案中，抗CD73抗体是人抗体，比如本文所述抗体。或者，抗CD73抗体可以是例如嵌合或人源化抗体(例如，从小鼠抗CD73mAb制备)，如本文中进一步描述的那些。在一个实施方案中，至少一种另外的免疫刺激性抗体(例如，拮抗剂抗PD-1、拮抗剂抗PD-L1、拮抗剂抗CTLA-4和/或拮抗剂抗LAG3抗体)是人抗体。或者，至少一种另外的免疫刺激性抗体可以是例如嵌合或人源化抗体(例如，从小鼠抗PD-1、抗PD-L1、抗CTLA-4和/或抗LAG3抗体制备)。

[0811] 本文中提供了治疗过度增殖性疾病(例如，癌症)的方法，其包括向受试者施用拮抗剂抗CD73抗体和拮抗剂PD-1抗体。在某些实施方案中，抗CD73抗体以亚治疗剂量施用，抗PD-1抗体以亚治疗剂量施用，或两者都以亚治疗剂量施用。本文中还提供了改变与用免疫刺激剂治疗过度增殖性疾病相关的不良事件的方法，其包括向受试者施用抗CD73抗体和亚

治疗剂量的抗PD-1抗体。在某些实施方案中，受试者是人。在某些实施方案中，抗PD-1抗体是人序列单克隆抗体，并且抗CD73抗体是人序列单克隆抗体，比如包含本文所述的11F11、4C3、4D4、10D2、11A6、24H2、5F8、6E11、7A11、CD73.3、CD73.4、CD73.5、CD73.6、CD73.7、CD73.8、CD73.9、CD73.10或CD73.11的CDR或可变区的抗体或本文所述的另一种拮抗剂抗CD73抗体。

[0812] 适合用于本文所述方法的PD-1拮抗剂包括但不限于配体、抗体(例如，单克隆抗体和双特异性抗体)和多价药剂。在一个实施方案中，PD-1拮抗剂是融合蛋白，例如Fc融合蛋白，比如AMP-244。在一个实施方案中，PD-1拮抗剂是抗PD-1或抗PD-L1抗体。

[0813] 示例性抗PD-1抗体是纳武单抗(BMS-936558)或包含WO 2006/121168中所述的抗体17D8、2D3、4H1、5C4、7D3、5F4和4A11之一的CDR或可变区的抗体。在某些实施方案中，抗PD1抗体是WO2012/145493中描述的MK-3475(拉姆布罗力珠单抗(lambrolizumab))；在WO2012/145493中描述的AMP-514；PDR001；和CT-011(皮地利珠单抗；先前的CT-AcTibody或BAT；参见，例如，Rosenblatt等人(2011)J.Immunotherapy 34:409))。其他已知的PD-1抗体和其他PD-1抑制剂包括在WO 2009/014708、WO 03/099196、WO 2009/114335、WO 2011/066389、WO 2011/161699、WO2012/145493、美国专利No.7,635,757和8,217,149以及美国专利公开号2009/0317368中描述的那些。还可使用在WO2013/173223中公开的抗PD-1抗体中的任一者。与这些抗体之一竞争结合和/或结合PD-1上的相同表位的抗PD-1抗体也可用于联合治疗。在某些实施方案中，抗体与上述抗体具有至少约90％的可变区氨基酸序列同一性。

[0814] 在某些实施方案中，抗CD73抗体与包含重链和轻链的纳武单抗、或其抗原结合片段和变体联合使用，所述重链和轻链分别包含在SEQ ID NO:449和450中所示的序列。在某些实施方案中，所述抗体具有纳武单抗的重链和轻链CDR或可变区。因此，在一个实施方案中，所述抗体包含具有SEQ ID NO:381中列出的序列的纳武单抗的VH的CDR1、CDR2、和CDR3结构域，以及具有SEQ ID NO:382中列出的序列的纳武单抗的VL的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在某些实施方案中，所述抗体包含含有分别在SEQ ID NO:383-385中列出的序列的CDR1、CDR2和CDR3结构域，以及含有分别在SEQ ID NO:386-388中列出的序列的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在某些实施方案中，所述抗体包含含有分别在SEQ ID NO:381和/或SEQ ID NO:382中列出的氨基酸序列的VH和/或VL区。在某些实施方案中，所述抗体包含由分别在SEQ ID NO:389和/或SEQ ID NO:390中列出的核酸序列编码的重链可变(VH)和/或轻链可变(VL)区。在某些实施方案中，所述抗体与SEQ ID NO:381或SEQ ID NO:382具有至少约90％，例如，至少约90％、95％或99％的可变区同一性。

[0815] 在例如本文提供的联合治疗的某些实施方案中，抗CD73抗体是在WO2016/075099中描述的MEDI9447或Phen 0203hIgG1或在WO2016/055609中描述的抗CD73抗体。例如，根据本文中提供的方案，MEDI9447可以与抗PD-L1抗体(例如，MEDI4736)联合。例如，它们可以每1、2、3或4周施用一次，其中它们两者都在同一天彼此相隔数分钟或数小时之内的时间施用。

[0816] 在某些实施方案中，抗PD-1抗体以5×10^{-8}M或更小的K_D与人PD-1结合，以1×10^{-8}M或更小的K_D与人PD-1结合，以5×10^{-9}M或更小的K_D与人PD-1结合，或以1×10^{-8}M至1×10^{-10}M之间或更小的K_D与人PD-1结合。

[0817] 本文中提供了用于治疗过度增殖性疾病(例如,癌症)的方法,其包括向受试者施用拮抗剂抗CD73抗体和拮抗剂PD-L1抗体。在某些实施方案中,抗CD73抗体以亚治疗剂量施用,抗PD-L1抗体以亚治疗剂量施用,或两者都以亚治疗剂量施用。本文中提供了改变与用免疫刺激剂治疗过度增殖性疾病相关的不良事件的方法,其包括向受试者施用抗CD73抗体和亚治疗剂量的抗PD-L1抗体。在某些实施方案中,受试者是人。在某些实施方案中,抗PD-L1抗体是人序列单克隆抗体,并且抗CD73抗体是人序列单克隆抗体,比如包含本文所述的11F11、4C3、4D4、10D2、11A6、24H2、5F8、6E11、7A11、CD73.3、CD73.4、CD73.5、CD73.6、CD73.7、CD73.8、CD73.9、CD73.10或CD73.11的CDR或可变区的抗体或本文所述的另一种拮抗剂抗CD73抗体。

[0818] 在一个实施方案中,抗PD-L1抗体是BMS-936559(在WO 2007/005874和美国专利No.7,943,743中被称为12A4)、或包含描述于PCT公开WO 07/005874和美国专利No.7,943,743中的3G10、12A4、10A5、5F8、10H10、1B12、7H1、11E6、12B7和13G4的CDR或可变区的抗体。在某些实施方案中,抗PD-L1抗体是MEDI4736(也称作抗B7-H1)或MPDL3280A(也称作RG7446)。还可使用在WO2013/173223、WO2011/066389、WO2012/145493、美国专利No.7,635,757和8,217,149以及美国公开号2009/145493中公开的抗PD-L1抗体中的任一者。与这些抗体中的任一者竞争和/或结合相同表位的抗PD-L1抗体也可用于联合治疗。

[0819] 在某些实施方案中,抗PD-L1抗体以5×10^{-8}M或更小的K_D与人PD-L1结合,以1×10^{-8}M或更小的K_D与人PD-L1结合,以5×10^{-9}M或更小的K_D与人PD-L1结合,或以1×10^{-8}M和1×10^{-10}M之间或更小的K_D与人PD-L1结合。

[0820] 本文中提供了治疗过度增殖性疾病(例如,癌症)的方法,其包括向受试者施用本文所述抗CD73抗体和CTLA-4拮抗剂抗体。在某些实施方案中,抗CD73抗体以亚治疗剂量施用,抗CTLA-4抗体以亚治疗剂量施用,或两者都以亚治疗剂量施用。本文中提供了改变与用免疫刺激剂治疗过度增殖性疾病相关的不良事件的方法,其包括向受试者施用抗CD73抗体和亚治疗剂量的抗CTLA-4抗体。在某些实施方案中,受试者是人。在某些实施方案中,抗CTLA-4抗体是选自下组的抗体:Yervoy™(伊匹单抗或抗体10D1,描述于PCT公开WO 01/14424中)、曲美木单抗(以前的替西木单抗,CP-675,206)、描述于以下公开中的任一者中的单克隆或抗CTLA-4抗体:WO 98/42752;WO 00/37504;美国专利No.6,207,156;Hurwitz等人(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95(17):10067-10071;Camacho等人(2004)J.Clin.Oncology 22(145):摘要号2505(抗体CP-675206);以及Mokyr等人(1998)Cancer Res.58:5301-5304。还可使用在WO2013/173223中公开的抗CTLA-4抗体中的任一者。

[0821] 在某些实施方案中,抗CTLA-4抗体以5×10^{-8}M或更小的K_D与人CTLA-4结合,以1×10^{-8}M或更小的K_D与人CTLA-4结合,以5×10^{-9}M或更小的K_D与人CTLA-4结合,或以1×10^{-8}M和1×10^{-10}M之间或更小的K_D与人CTLA-4结合。

[0822] 本文中提供了治疗过度增殖性疾病(例如,癌症)的方法,其包括向受试者施用抗CD73抗体和LAG-3抗体。在进一步的实施方案中,抗CD73抗体以亚治疗剂量施用,抗LAG-3抗体以亚治疗剂量施用,或两者都以亚治疗剂量施用。本文中提供了改变与用免疫刺激剂治疗过度增殖性疾病相关的不良事件的方法,其包括向受试者施用抗CD73抗体和亚治疗剂量的抗LAG-3抗体。在某些实施方案中,受试者是人。在某些实施方案中,抗PD-L1抗体是人序列单克隆抗体,并且抗CD73抗体是人序列单克隆抗体,比如包含本文所述的11F11、4C3、

4D4、10D2、11A6、24H2、5F8、6E11、7A11、CD73.3、CD73.4、CD73.5、CD73.6、CD73.7、CD73.8、CD73.9、CD73.10或CD73.11的CDR或可变区的抗体或另一种拮抗剂抗CD73抗体。抗LAG3抗体的实例包括包含描述于美国专利公开号US2011/0150892和WO2014/008218中的抗体25F7、26H10、25E3、8B7、11F2或17E5的CDR或可变区的抗体。在一个实施方案中，抗LAG-3抗体是BMS-986016。可使用的其他本领域公认的抗LAG-3抗体包括描述于US 2011/007023中的IMP731。也可以使用IMP-321。与这些抗体中的任一者竞争和/或结合相同表位的抗LAG-3抗体也可用于联合治疗。

[0823] 在某些实施方案中，抗LAG-3抗体以5×10^{-8}M或更小的K_D与人LAG-3结合，以1×10^{-8}M或更小的K_D与人LAG-3结合，以5×10^{-9}M或更小的K_D与人LAG-3结合，或以1×10^{-8}M和1×10^{-10}M之间或更小的K_D与人LAG-3结合。

[0824] 在某些实施方案中，与抗GITR激动剂抗体一起施用的抗CD73抗体是例如具有6C8的CDR序列的抗体，例如具有6C8的CDR的人源化抗体，正如例如WO2006/105021中所述；包含WO2011/028683中所述的抗GITR抗体的CDR的抗体；包含JP2008278814中所述的抗GITR抗体的CDR的抗体；或包含PCT/US2015/033991中所述的抗GITR抗体的CDR的抗体。

[0825] 施用本文所述的抗CD73抗体和针对一种或多种第二靶抗原(比如LAG-3和/或CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1)的拮抗剂(例如，拮抗剂抗体)可增强对患者中的癌细胞的免疫应答。使用本公开抗体可抑制其生长的癌症包括通常对免疫疗法有反应的癌症。用本公开的联合治疗进行治疗的癌症的代表性实例包括在上文关于抗CD73抗体单一疗法的论述中具体列举的那些癌症。

[0826] 在某些实施方案中，本文中论述的联合治疗抗体可以以在药学上可接受的载体中的单一组合物形式同时施用，或以每种抗体在药学上可接受的载体中的单独的组合物形式同时施用。在另一个实施方案中，可依次施用联合治疗抗体。例如，抗CTLA-4抗体和抗CD73抗体可依次施用，比如首先施用抗CTLA-4抗体并且然后施用抗CD73抗体，或首先施用抗CD73抗体并且然后施用抗CTLA-4抗体。另外地或可替代地，抗PD-1抗体和抗CD73抗体可依次施用，比如首先施用抗PD-1抗体并且然后施用抗CD73抗体，或首先施用抗CD73抗体并且然后施用抗PD-1抗体。另外地或可替代地，抗PD-L1抗体和抗CD73抗体可依次施用，比如首先施用抗PD-L1抗体并且然后施用抗CD73抗体，或首先施用抗CD73抗体并且然后施用抗PD-L1抗体。另外地或可替代地，抗LAG-3抗体和抗CD73抗体可依次施用，比如首先施用抗LAG-3抗体并且然后施用抗CD73抗体，或首先施用抗CD73抗体并且然后施用抗LAG-3抗体。

[0827] 此外，如果依次施用联合治疗的多于一个的剂量，则可将依次施用次序反过来或在每个施用时间点保持相同的次序，依次施用可与同时施用组合，或其任何组合。例如，抗CTLA-4抗体与抗CD73抗体联合的首次施用可以是同时的；第二次施用可以是依次的，其中首先是抗CTLA-4抗体，并且然后是抗CD73抗体；并且第三次施用可以是依次的，其中首先是抗CD73抗体，并且然后是抗CTLA-4抗体，等等。另外地或可替代地，抗PD-1抗体与抗CD73抗体联合的首次施用可以是同时的；第二次施用可以是依次的，其中首先是抗PD-1抗体，并且然后是抗CD73抗体；并且第三次施用可以是依次的，其中首先是抗CD73抗体，并且然后是抗PD-1抗体，等等。另外地或可替代地，抗PD-L1抗体与抗CD73抗体联合的首次施用可以是同时的；第二次施用可以是依次的，其中首先是抗PD-L1抗体，并且然后是抗CD73抗体；并且第三次施用可以是依次的，其中首先是抗CD73抗体，并且然后是抗PD-L1抗体，等等。另外地或

可替代地，抗LAG-3抗体与抗CD73抗体联合的首次施用可以是同时的；第二次施用可以是依次的，其中首先是抗LAG-3抗体，并且然后是抗CD73抗体；并且第三次施用可以是依次的，其中首先是抗CD73抗体，并且然后是抗LAG-3抗体，等等。另一个代表性给药方案可涉及首次依次施用，其中首先是抗CD73抗体，并且然后是抗CTLA-4抗体(和/或抗PD-1抗体和/或抗PD-L1抗体和/或抗LAG-3抗体)，并且随后的施用可以是同时的。

[0828] 在一个实施方案中，通过向患有可受益于刺激免疫系统的疾病(例如，癌症或感染性疾病)的受试者施用免疫肿瘤学作用剂和抗CD73抗体来治疗所述受试者，其中所述免疫肿瘤学作用剂为CD137(4-1BB)激动剂，比如激动性CD137抗体。适合的CD137抗体包括例如乌瑞鲁单抗(urelumab)或PF-05082566(WO12/32433)。

[0829] 在一个实施方案中，通过向患有可受益于刺激免疫系统的疾病(例如，癌症或感染性疾病)的受试者施用免疫肿瘤学作用剂和抗CD73抗体来治疗所述受试者，其中所述免疫肿瘤学作用剂为OX40激动剂，比如激动性OX40抗体。适合的OX40抗体包括例如MEDI-6383、MEDI-6469或MOXR0916(RG7888;WO06/029879)。

[0830] 在一个实施方案中，通过向患有可受益于刺激免疫系统的疾病(例如，癌症或感染性疾病)的受试者施用免疫肿瘤学作用剂和抗CD73抗体来治疗所述受试者，其中所述免疫肿瘤学作用剂为CD40激动剂，比如激动性CD40抗体。在某些实施方案中，免疫肿瘤学作用剂为CD40拮抗剂，例如拮抗性CD40抗体。适合的CD40抗体包括例如鲁卡木单抗(HCD122)、达西珠单抗(SGN-40)、CP-870,893或Chi Lob 7/4。

[0831] 在一个实施方案中，通过向患有可受益于刺激免疫系统的疾病(例如，癌症或感染性疾病)的受试者施用免疫肿瘤学作用剂和抗CD73抗体来治疗所述受试者，其中所述免疫肿瘤学作用剂为CD27激动剂，比如激动性CD27抗体。适合的CD27抗体包括例如瓦里木单抗(varlilumab)(CDX-1127)。

[0832] 在一个实施方案中，通过向患有可受益于刺激免疫系统的疾病(例如，癌症或感染性疾病)的受试者施用免疫肿瘤学作用剂和抗CD73抗体来治疗所述受试者，其中所述免疫肿瘤学作用剂为MGA271(针对B7H3)(WO11/109400)。

[0833] 在一个实施方案中，通过向患有可受益于刺激免疫系统的疾病(例如，癌症或感染性疾病)的受试者施用免疫肿瘤学作用剂和抗CD73抗体来治疗所述受试者，其中所述免疫肿瘤学作用剂为KIR拮抗剂，比如立鲁单抗(lirilumab)。

[0834] 在一个实施方案中，通过向患有可受益于刺激免疫系统的疾病(例如，癌症或感染性疾病)的受试者施用免疫肿瘤学作用剂和抗CD73抗体来治疗所述受试者，其中所述免疫肿瘤学作用剂为IDO拮抗剂。适合的IDO拮抗剂包括(例如)INCB-024360(WO2006/122150、WO07/75598、WO08/36653、WO08/36642)、吲哚莫德(indoximod)、NLG-919(WO09/73620、WO09/1156652、WO11/56652、WO12/142237)或F001287。

[0835] 在一个实施方案中，通过向患有可受益于刺激免疫系统的疾病(例如，癌症或感染性疾病)的受试者施用免疫肿瘤学作用剂和抗CD73抗体来治疗所述受试者，其中所述免疫肿瘤学作用剂为Toll样受体激动剂，例如TLR2/4激动剂(例如，卡介苗)；TLR7激动剂(例如，Hiltonol或咪喹莫特)；TLR7/8激动剂(例如，瑞喹莫德(Resiquimod))；或TLR9激动剂(例如，CPG7909)。

[0836] 在一个实施方案中，通过向患有可受益于刺激免疫系统的疾病(例如，癌症或感染

性疾病)的受试者施用免疫肿瘤学作用剂和抗CD73抗体来治疗所述受试者,其中所述免疫肿瘤学作用剂为TGF-β抑制剂,例如GC1008、LY2157299、TEW7197或IMC-TR1。

[0837] 在一个方面,依次在施用第二药剂(例如,免疫肿瘤学作用剂)之前施用抗CD73抗体。在一个方面,抗CD73抗体与第二药剂(例如,免疫肿瘤学作用剂)同时施用。在再一方面,依次在施用第二药剂之后施用抗CD73抗体。两种药剂施用的开始可以间隔例如30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、3小时、6小时、12小时、24小时、36小时、48小时、3天、5天、7天或一个或多个周的时间,或第二药剂施用的开始可在施用第一药剂之后例如30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、3小时、6小时、12小时、24小时、36小时、48小时、3天、5天、7天或一个或多个周。

[0838] 在某些方面,抗CD73抗体和第二药剂(例如,免疫肿瘤学作用剂)同时施用,例如,向患者同时输注例如30分钟或60分钟的时间。抗CD73抗体可与第二药剂(例如,免疫肿瘤学作用剂)共同配制。

[0839] 任选地,任选地与一种或多种另外的免疫治疗抗体(例如,抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗LAG-3阻断)联合的抗CD73抗体可进一步与免疫原性物质(比如癌细胞、纯化肿瘤抗原(包括重组蛋白、肽和碳水化合物分子)、细胞以及用编码免疫刺激性细胞因子的基因转染的细胞)联合(He等人(2004)J.Immunol.173:4919-28)。可以使用的肿瘤疫苗的非限制性实例包括黑色素瘤抗原的肽,比如gp100、MAGE抗原、Trp-2、MART1和/或酪氨酸酶的肽,或经转染表达细胞因子GM-CSF的肿瘤细胞(下文进一步论述)。联合的CD73抑制与一种或多种另外的抗体(例如,CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断)还可进一步与标准癌症治疗联合。例如,联合的CD73抑制与一种或多种另外的抗体(例如,CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断)可与化学治疗方案有效联合。在这些情况下,利用本公开的联合有可能减少所施用的化学治疗试剂的剂量(Mokyr等人(1998)Cancer Research 58:5301-5304)。这样的联合实例为进一步与氨烯咪胺联合用于治疗黑色素瘤的抗CD73拮抗剂抗体的联合,其中具有或没有另外的抗体,比如抗CTLA-4抗体和/或抗PD-1抗体和/或抗PD-L1抗体和/或抗LAG-3抗体。另一个实例为其进一步与白细胞介素2(IL-2)联合用于治疗黑色素瘤的抗CD73抗体的联合,其中具有或没有抗CTLA-4抗体和/或抗PD-1抗体和/或抗PD-L1抗体和/或抗LAG-3抗体。支持CD73抑制与CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断以及化学疗法联合使用的科学理论基础是:细胞死亡(这是大部分化学治疗化合物的细胞毒性作用的结果)会导致在抗原呈递途径中的肿瘤抗原水平增加。可通过细胞死亡与联合的CD73抑制(具有或没有CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断)产生协同作用的其他联合治疗包括放射、手术或激素剥夺。这些方案的每一者在宿主中产生肿瘤抗原的来源。血管生成抑制剂还可与联合的CD73抑制以及CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断联合。血管生成的抑制导致肿瘤细胞死亡,这可以是输入宿主抗原呈递途径中的肿瘤抗原的来源。

[0840] 任选地与CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断抗体联合的抗CD73拮抗剂抗体还可与将表达Fca或Fcγ受体的效应细胞靶向至肿瘤细胞的双特异性抗体联合使用(例如,参见美国专利No.5,922,845和5,837,243)。双特异性抗体可用于靶向两种单独的抗原。通过使用联合的CD73抑制与CCTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断,可加强这些应答的T细胞臂。

[0841] 在另一实例中,任选地与另外的免疫刺激剂(例如抗CTLA-4抗体和/或抗PD-1抗体

和/或抗PD-L1抗体和/或LAG-3药剂(例如抗体))联合的抗CD73拮抗剂抗体可与抗新生物抗体结合使用,所述抗新生物抗体比如Rituxan®(利妥昔单抗)、Herceptin®(曲妥珠单抗)、Bexxar®(托西莫单抗)、Zevalin®(替伊莫单抗)、Campath®(阿伦单抗)、Lymphocide®(依帕珠单抗(eprtuzumab))、Avastin®(贝伐珠单抗)以及Tarceva®(厄洛替尼),等等。作为举例且不希望受理论的束缚,用抗癌抗体或与毒素缀合的抗癌抗体治疗可导致癌细胞(例如,肿瘤细胞)死亡,其可增强由免疫刺激剂(例如CD73、CTLA-4、PD-1、PD-L1或LAG-3药剂,比如抗体)介导的免疫应答。在示例性实施方案中,过度增殖性疾病(例如,癌症肿瘤)的治疗可包括抗癌剂(例如抗体)与抗CD73以及任选的另外的免疫刺激剂(例如,抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗LAG-3药剂,比如抗体)的联合(同时施用或依次施用或其任何组合),其可增强宿主的抗肿瘤免疫应答。

[0842] 肿瘤通过多种机制逃避宿主免疫监视。通过使肿瘤表达的免疫抑制性蛋白失活,可以克服许多这些机制。这些机制特别包括TGF-β(Kehrl等人(1986)J.Exp.Med.163:1037-1050)、IL-10(Howard&O′Garra(1992)Immunology Today 13:198-200)、以及Fas配体(Hahne等人(1996)Science 274:1363-1365)。针对这些实体中的每一者的抗体可进一步与抗CD73抗体联合,其中具有或没有另外的免疫刺激剂(例如,抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗LAG-3药剂,比如抗体),以抵消免疫抑制剂的影响并有利于宿主的抗肿瘤免疫应答。

[0843] 可用于激活宿主免疫应答性的其他药剂(例如,抗体)可进一步与抗CD73抗体联合使用,其中具有或没有另外的免疫刺激剂,比如抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗LAG-3抗体。这些抗体包括在树突细胞表面上的激活DC功能和抗原呈递的分子。抗CD40抗体(Ridge等人,上文)可与抗CD73抗体以及任选的另外的免疫刺激剂(例如,抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗LAG-3药剂,例如抗体)结合使用。针对T细胞共刺激分子的其他活化抗体(Weinberg等人,上文;Melero等人,上文;Hutloff等人,上文)也可提供增加的T细胞活化水平。

[0844] 如上文论述,目前正在使用骨髓移植来治疗多种造血起源的肿瘤。单独的或与CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断联合的抗CD73免疫疗法可用于增加供体移入的肿瘤特异性T细胞的有效性。

[0845] 若干实验治疗方案涉及抗原特异性T细胞的离体活化与扩增以及这些细胞到受体中的过继转移,以刺激针对肿瘤的抗原特异性T细胞(Greenberg和Riddell,上文)。这些方法还可用于激活针对传染原(如CMV)的T细胞应答。预期在抗CD73存在下的离体活化可增加过继转移的T细胞的频率和活性,其中具有或没有另外的免疫刺激疗法,例如,抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗LAG-3抗体。

[0846] 本文中提供了改变与使用免疫刺激剂治疗过度增殖性疾病(例如癌症)相关的不良事件的方法,其包括向受试者施用抗CD73抗体连同亚治疗剂量的抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗LAG-3药剂(例如,抗体)。例如,本文所述的方法提供了通过向患者施用非吸收性类固醇来降低免疫刺激性治疗抗体诱导的结肠炎或腹泻的发病率的方法。如本文中使用的,“非吸收性类固醇”是这样的糖皮质激素,其展现广泛的首过代谢,使得其在肝中代谢后,类固醇的生物利用度是低的,即小于约20%。在本文所述的一个实施方案中,非吸收性类固醇是布地奈德。布地奈德是一种局部作用的糖皮质类固醇,其在口服施用后被

广泛代谢，主要通过肝脏代谢。ENTOCORT EC®(Astra-Zeneca)是布地奈德的pH依赖性和时间依赖性口服制剂，是为了优化到回肠和整个结肠的药物递送而开发的。ENTOCORT EC®在美国获准用于治疗涉及回肠和/或升结肠的轻度至中度克罗恩病。用于治疗克罗恩病的ENTOCORT EC®的通常口服剂量为6mg/天至9mg/天。ENTOCORT EC®在肠中释放，之后吸收并保留在肠粘膜中。一旦其穿过肠粘膜靶组织，ENTOCORT EC®即被肝中的细胞色素P450系统广泛代谢成为几乎没有糖皮质激素活性的代谢物。因此，其生物利用度是低的(约10％)。与具有较不广泛的首过代谢的其他糖皮质激素相比，布地奈德的低生物利用度产生了改良的治疗比。相比于全身作用的皮质类固醇，布地奈德产生较少的副作用，包括更小的下丘脑-垂体抑制。然而，长期施用ENTOCORT EC®可导致全身性糖皮质激素作用，比如肾上腺功能亢进和肾上腺抑制。参见PDR，第58版，2004；608-610。

[0847] 在更进一步的实施方案中，与非吸收性类固醇结合的CD73抑制连同CTLA-4和/或PD-1和/或PD-L1和/或LAG-3阻断(即，免疫刺激性治疗抗体抗CD73和任选的抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗LAG-3抗体)可进一步与水杨酸盐联合。水杨酸盐包括5-ASA剂，例如像：柳氮磺胺吡啶(AZULFIDINE®,Pharmacia&UpJohn)；奥沙拉秦(DIPENTUM®,Pharmacia&UpJohn)；巴柳氮(COLAZAL®,Salix Pharmaceuticals公司)；以及美沙拉秦(ASACOL®,Procter&Gamble Pharmaceuticals；PENTASA®,Shire US；CANASA®,Axcan Scandipharm公司；ROWASA®,Solvay)。

[0848] 根据本文所述的方法，为了降低免疫刺激性抗体诱导的结肠炎的发病率，与抗CD73连同抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或LAG-3抗体和非吸收性类固醇联合施用的水杨酸盐可包括水杨酸盐和非吸收性类固醇的任何重叠或依次施用。因此，例如，用于降低本文所述的免疫刺激性抗体诱导的结肠炎的发病率的方法涵盖同时或依次施用水杨酸盐和非吸收性类固醇(例如，在非吸收性类固醇6小时后施用水杨酸盐)或其任何组合。此外，水杨酸盐和非吸收性类固醇可通过相同途径施用(例如，两者都经口施用)或通过不同途径施用(例如，水杨酸盐经口施用，并且非吸收性类固醇经直肠施用)，其可不同于用于施用抗CD73以及抗CTLA-4和/或抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗LAG-3抗体的途径。

[0849] 本文所述的抗CD73抗体和联合抗体治疗也可与其他熟知的治疗结合使用，这些熟知的治疗的选择依据是针对其治疗的适应症(例如癌症)的特殊有用性。本文所述的抗CD73抗体的联合可与已知的药学上可接受的药剂依次使用。

[0850] 例如，本文所述的抗CD73抗体和联合抗体治疗可与另外的治疗联合使用(例如同时或分开)，所述另外的治疗例如照射、化学疗法(例如，使用喜树碱(CPT-11)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、顺铂、多柔比星、伊立替康、紫杉醇、吉西他滨、顺铂、紫杉醇、卡铂-紫杉醇(Taxol)、多柔比星、5-fu或喜树碱+apo21/TRAIL(6X combo))、一种或多种蛋白酶体抑制剂(例如，硼替佐米或MG132)、一种或多种Bcl-2抑制剂(例如，BH3I-2'(bcl-xl抑制剂)、吲哚胺加双氧酶-1(IDO1)抑制剂(例如，INCB24360)、AT-101(R-(-)-棉酚衍生物)、ABT-263(小分子)、GX-15-070(奥巴克拉(obatoclax))或MCL-1(髓性白血病细胞分化蛋白-1)拮抗剂)、iAP(细胞凋亡蛋白的抑制剂)拮抗剂(例如，smac7、smac4、小分子smac模拟物、合成smac肽(参见Fulda等人，Nat Med 2002；8：808-15)、ISIS23722(LY2181308)或AEG-35156(GEM-640))、HDAC(组蛋白去乙酰化酶)抑制剂、抗CD20抗体(例如，利妥昔单抗)、血管生成抑制剂(例如，

贝伐珠单抗)、靶向VEGF和VEGFR的抗血管生成剂(例如,癌思停(Avastin))、合成三萜系化合物(参见Hyer等人,Cancer Research 2005;65:4799-808)、c-FLIP(细胞FLICE抑制蛋白)调节剂(例如,PPARγ(过氧化物酶体增殖物活化受体γ)的天然及合成配体、5809354或5569100)、激酶抑制剂(例如,索拉菲尼)、曲妥珠单抗、西妥昔单抗、替西罗莫司(Temsirolimus)、mTOR抑制剂(比如雷帕霉素和替西罗莫司、硼替佐米、JAK2抑制剂、HSP90抑制剂、PI3K-AKT抑制剂、来那度胺(Lenalildomide)、GSK3β抑制剂、IAP抑制剂和/或遗传毒性药物。

[0851] 本文所述的抗CD73抗体和联合抗体治疗可进一步与一种或多种抗增殖细胞毒性剂联合使用。可用作抗增殖细胞毒性剂的化合物的类别包括但不限于以下类别:

[0852] 烷化剂(包括但不限于氮芥、次乙亚胺衍生物、烷基磺酸盐、亚硝基脲和三氮烯):尿嘧啶氮芥、甲川氯、环磷酰胺(CYTOXAN™)、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、哌泊溴烷、曲他胺(Triethylenemelamine)、三亚乙基硫代磷酰胺、白消安、卡莫司汀、洛莫司汀、链脲佐菌素、达卡巴嗪和替莫唑胺。

[0853] 抗代谢药(包括但不限于叶酸拮抗剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物和腺苷脱氨酶抑制剂):甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、磷酸氟达拉滨、喷司他丁(Pentostatine)和吉西他滨。

[0854] 除了本领域已知的其他微管蛋白(microtubuline)稳定剂外,适合于与拮抗剂抗CD73抗体联合的抗增殖剂包括但不限于:紫杉烷、紫杉醇(紫杉醇以TAXOL™形式市售)、多西他赛、圆皮海绵内酯(discodermolide)(DDM)、dictyostatin(DCT)、Pelomside A、埃博霉素、埃博霉素A、埃博霉素B、埃博霉素C、埃博霉素D、埃博霉素E、埃博霉素F、呋喃埃博霉素D(furanoepothilone D)、去氧埃博霉素B1、[17]-脱氢去氧埃博霉素B、[18]脱氢去氧埃博霉素B、C12,13-环丙基-埃博霉素A、C6-C8桥接埃博霉素A、反式-9,10-脱氢埃博霉素D、顺式-9,10-脱氢埃博霉素D、16-去甲基埃博霉素B、埃博霉素B10、discoderomolide、帕土匹龙(patupilone)(EPO-906)、KOS-862、KOS-1584、ZK-EPO、ABJ-789、XAA296A(圆皮海绵内酯)、TZT-1027(索利多汀(soblidotin))、ILX-651(盐酸泰丝多汀(tasidotin hydrochloride))、软海绵素B(Halichondrin B)、甲磺酸埃日布林(Eribulin mesylate)(E-7389)、哈米特林(Hemiasterlin)(HTI-286)、E-7974、念珠藻素(Cyrptophycin)、LY-355703、美登木素生物碱(Maytansinoid)免疫缀合物(DM-1)、MKC-1、ABT-751、T1-38067、T-900607、SB-715992(伊匹尼塞(ispinesib))、SB-743921、MK-0731、STA-5312、软珊瑚醇(eleutherobin)、17β-乙酰氧基-2-乙氧基-6-氧-B-高-雌-1,3,5(10)-三烯-3-醇、cyclostreptin、isolaulimalide、laulimalide、4-表-7-去羟基-14,16-二去甲基-(+)-圆皮海绵内酯和cryptothilone 1。

[0855] 在希望结合本文所述抗的CD73抗体或在用本文所述抗CD73抗体治疗之前使得异常增殖细胞休眠的情况下,还可以向患者施用激素和类固醇(包括合成类似物),例如7a-炔雌醇、己烯雌酚(Diethylstilbestrol)、睾酮、泼尼松、氟甲睾酮、屈他雄酮丙酸酯(Dromostanolone propionate)、睾内酯、醋酸甲地孕酮、甲基泼尼松龙、甲基睾酮、泼尼松龙、曲安西龙、氯烯雌醚、羟孕酮、氨鲁米特、雌莫司汀、醋酸甲羟孕酮、亮丙瑞林、氟他胺、托瑞米芬、ZOLADEX™。当采用本文所述的方法或组合物时,也可根据需要施用在临床情境中用于调节肿瘤生长或转移的其他药剂,比如抗模拟物(antimimetics)。

[0856] 化疗剂的安全有效施用方法是本领域技术人员已知的。另外，它们的施用描述于标准文献中。例如，许多化疗剂的施用描述于Physicians′Desk Reference(PDR)，例如1996版(Medical Economics公司，Montvale，N.J.07645-1742，USA)中；其公开内容通过提述并入本文。

[0857] 可根据本领域熟知的治疗方案施用化疗剂和/或放射治疗。对于本领域技术人员来说显而易见的是，化疗剂和或放射治疗的施用可根据被治疗的疾病以及化疗剂和/或放射治疗对该疾病的已知效果加以改变。同样，根据熟练的临床医师的知识，基于观察到的施用的治疗剂对患者的效果，并且基于观察到的疾病对施用的治疗剂的反应，可以改变治疗方案(例如，施用的剂量和时间)。

[0858] VIII.试剂盒和单位剂型

[0859] 本文中还提供了包括适合于在前述方法中使用的治疗有效量的药物组合物的试剂盒，所述药物组合物含有抗CD73抗体(例如，CD73.4-IgG2/IgG1.1f)和免疫肿瘤学作用剂(例如，抗PD-1抗体，比如纳武单抗)、以及药学上可接受的载体。所述试剂盒任选地还可以包括允许从业者(如医师、护士、或患者)施用包含在试剂盒中的组合物以便向患有癌症(例如，实体瘤)的患者施用所述组合物的说明书(例如，包括给药时间表)。所述试剂盒还可包括注射器。

[0860] 任选地，所述试剂盒包括根据以上提供的方法用于单次给药的单剂量药物组合物的多个包装，所述药物组合物各自包含有效量的抗CD73抗体或免疫肿瘤学作用剂(例如，抗PD-1抗体)。所述试剂盒中还可以包括施用药物组合物必需的仪器或装置。例如，试剂盒可以提供一个或多个预填充注射器，所述注射器包含一定量的抗CD73或抗PD-1抗体。

[0861] 在一个实施方案中，本发明提供了用于治疗人类患者中的实体瘤的试剂盒，所述试剂盒包括：

[0862] (a)一定剂量的抗CD73抗体，所述抗体包含具有SEQ ID NO:135中列出的序列的重链可变区的CDR1、CDR2、和CDR3结构域，以及具有SEQ ID NO:8或12中列出的序列的轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3结构域；

[0863] (b)一定剂量的抗PD-1抗体，所述抗体包含具有SEQ ID NO:381中列出的序列的重链可变区的CDR1、CDR2、和CDR3结构域，以及具有SEQ ID NO:382中列出的序列的轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3结构域；和

[0864] (c)关于在本文所述方法中使用抗CD73抗体和抗PD-1抗体的说明书。

[0865] 通过下列实施例进一步展示了本公开，这些实施例不应该解释为进一步的限制。所有附图和所有参考文献的内容、Genbank序列、在本申请各处引证的专利和公开的专利申请都通过提述明确并入本文。具体而言，将PCT公开WO09/045957、WO09/073533、WO09/073546、WO09/054863、WO2016/075099、WO2016/055609、PCT/US2013/072918、PCT/US15/61639和美国专利公开号2011/0150892和2016/129108的公开内容通过提述明确并入本文。

实施例

[0866] 实施例1：人抗CD73抗体的生成

[0867] 在HuMAb®转基因小鼠(“HuMAb”是Medarex公司的商标，Princeton，New Jersey)的Hco7、Hco27、Hco20、Hco12、Hco17和Hc2品系以及KM小鼠(KMMouse®品是含有如

PCT公开WO 02/43478中所述的SC20转染色体)中生成人抗CD73单克隆抗体。如美国专利No.5,770,429和5,545,806中所述生成HC2/KCo27 HuMAb小鼠和KM小鼠，将这些文献的全部公开内容通过提述并入本文。

[0868] 用不同的免疫策略(不同的抗原、不同的剂量、持续时间、施用途径(足垫(中)、腹膜内(ip)和皮下(sc))，以及佐剂(CFA/IFA、Ribi和抗体)，等等)免疫小鼠，包括转基因小鼠的不同基因型(比如KM、Hco7、Hco27、Hco20、Hco12、Hco17和Hc2)。基于小鼠进行融合并筛选，并从这些融合物鉴定抗体。经过进一步表征，分离出特别感兴趣的抗体，包括命名为11F11-1、11F11-2、4C3-1、4C3-2、4C3-3、4D4-1、10D2-1、10D2-2、11A6-1、24H2-1、5F8-1、5F8-2、6E11-1和7A11-1的抗体。表7(下文)提供了每一抗体的重链的IgG同种型和同种异型以及轻链类型。仅轻链不同的抗体以连接号之后的不同数字表示。例如，11F11-1具有与11F11-2相同的重链，但11F11-1具有轻链VK1，而11F11-2具有轻链VK2。除非另有说明，否则基于表中抗体的VH区的重组抗体具有主要轻链。

[0869] 表7：

[0870]

克隆	同种型	主要轻链	其他表达的轻链
11F11	IgG2	VK2	VK1
4C3	IgG1za	VK1	VK2,VK3
4D4	IgG2	VK1	
10D2	IgG4	VK2	VK1
11A6	IgG1za	VK1	
24H2	IgG4	VK1	
5F8	IgG1za	VK1	VK2
6E11	IgG1za	VK1	
7A11	IgG1za	VK1	

[0871] 每一抗体的重链和轻链的全长序列、VH和VL结构域以及CDR的氨基酸和核苷酸序列示于序列表和表37中。VH和VL氨基酸序列也示于图1A至17B中，不同抗体的VH和VL氨基酸序列的比对示于图35中(CDR序列为粗体)。

[0872] 实施例2：可变区和同种型变化形式中的氨基酸取代

[0873] 通过在以下氨基酸残基处引入一或多个突变来突变抗体11F11的VH区的框架区(显示了周围的氨基酸并且将突变的氨基酸加下划线)：T25(框架突变；...RLSCATSGFTF...)、L52(CDR2突变；...WVAVILYDGSN...)、G54(CDR2突变；...VILYDGSNKYY...)和V94(框架突变；...AEDTAVYYCAR...)。构建体的名称及其中每一者中的取代在表8中列出：

[0874] 表8.

[0875]

抗体名称	初始抗体	取代
CD73.3	4C3	V94A
CD73.4	11F11	T25A
CD73.5		T25S
CD73.6		T25A, G54S
CD73.7		T25S, G54S
CD73.8		T25A, L52W, G54S
CD73.9		T25S, L52W, G54S
CD73.10		T25A, L52W, G54E
CD73.11*	4D4	A25, W52, E54

[0876] *CD73.11即是4D4,且分离时即含有这些氨基酸残基。它列于表中是为了比较目的。

[0877] 抗体11F11和4D4的恒定区也通过将其转换为以下恒定区而被修饰:具有C219S取代的IgG2恒定区(CH1、铰链、CH2和CH3)("IgG2CS";SEQ ID NO:267),具有取代L234A、L235E、G237A、A330S和P331S的无效应子的IgG1恒定区("IgG1.1f";SEQ ID NO:268),或含有来自IgG2的CH1和铰链(具有C219S)以及IgG1的CH2和CH3(具有A330S/P331S)的无效应子的IgG1/IgG2杂合恒定区("IgG2CS-IgG1.1f"或"IgG2C219S-IgG1.1f";SEQ ID NO:169)。表9中列出了制备的构建体。

[0878] 表9.

[0879]

抗体名称	初始Ab	VH取代	恒定区	抗体的名称
CD73.4	11F11	T25A	IgG2CS	CD73.4-IgG2CS
CD73.4		T25A	IgG2CS-IgG1.1f	CD73.4-IgG2CS IgG1.1f
CD73.6		T25A, G54S	IgG2CS-IgG1.1f	CD73.6-IgG2CS IgG1.1f
CD73.8		T25A, L52W, G54S	IgG2CS-IgG1.1f	CD73.8-IgG2CS IgG1.1f
CD73.10		T25A, L52W, G54E	IgG2CS-IgG1.1f	CD73.10-IgG2CS IgG1.1f
CD73.10		T25A, L52W, G54E	IgG1.1f	CD73.10- IgG1.1f
CD73.10		T25A, L52W, G54E	IgG2CS	CD73.10-IgG2CS
CD73.11	4D4	A25, W52, E54	IgG2CS	CD73.11-IgG2CS

[0880] CD73.4-IgG2CS IgG1.1f的氨基酸序列显示在图18中(SEQ ID NO:189)。

[0881] 如下制造抗体CD73.3-CD73.11。将轻链VK2(SEQ ID NO:102)用于源自11F11的抗体(CD73.4、CD73.6、CD73.8和CD73.10)。在HEK293-6E细胞中表达重链和轻链,并且在转染后5天收获培养基。

[0882] 经由SPR测量构建体与人FcγR的结合。针对IgG1.1和IgG2分子的hCD64和hCD32a-H131结合数据与针对不同Fc的预期值一致。IgG1.1f是最惰性的Fc。IgG2和IgG2-C219S显示典型的FcR对IgG2结合。如所预期的,IgG2-C219S-G1.1f的数据提示比野生型IgG1或IgG2显著较弱的结合,但相比于IgG1.1f增加的结合。IgG2-C219S-G1.1f具有弱的hCD32a-H131结合(K_D为2.3μM),并且与所有其他FcγR的结合亲和力小于5μM。IgG2-C219S-G1.1f与食蟹猴FcγR的结合亲和力大于5μM。IgG2-C219S-G1.1f与人FcRn的结合的SPR分析显示pH依赖性结合(在pH 6较强,在pH 7.4较弱结合并且快速解离)。

[0883] 发现重组制备物经常缺乏重链的C端Lys。例如,抗体CD73.4.IgG2-C219S-G1.1f重链的97%缺乏C端赖氨酸。某些制剂在重链的N端Q(谷氨酰胺)具有焦谷氨酰胺(pyro-Q)。例如,抗体CD73.4.IgG2-C219S-G1.1f重链N端谷氨酰胺的94%为焦谷氨酰胺。

[0884] 实施例3:抗CD73抗体的结合特征

[0885] A.表面等离子共振(SPR)

[0886] 使用Biacore T100仪器(GE Healthcare),在25℃通过表面等离子共振(SPR)研究CD73结合动力学和亲和力。

[0887] 一种实验格式测试了hCD73的N端结构域(由人CD73的残基26-336组成;称为N-hCD73)与捕获在固定的蛋白A表面上的抗体的结合。对于这些实验,利用标准的乙基(二甲基氨基丙基)碳化二亚胺(EDC)/N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)化学,结合乙醇胺封闭,在0.01M HEPES(pH7.4)、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005%v/v吐温20的运行缓冲液中,将蛋白A(Pierce)以3000-4000RU的密度固定在CM5传感器芯片(GE Healthcare)的流动池1-4上。通过下列步骤进行动力学实验:首先以10μl/min使用30s接触时间将抗体(5-10μg/ml)捕获在蛋白A表面上,以30μl/min的流速使用180s结合时间和360s解离时间与600nM、200nM、66.7nM、22.2nM、7.4nM和2.5nM N-hCD73-his结合。用于动力学实验的运行缓冲液为10mM磷酸钠、130mM氯化钠、0.05%吐温20,pH 7.1。在以30μl/min的流速使用两个30s脉冲的10mM甘氨酸(pH 1.5)的每一周期之后使表面再生。将传感图数据进行双重参照(double referenced),然后使用Biacore T100评估软件v2.0.4拟合至1:1 Langmuir模型,以确定结合速率常数(ka)、解离速率常数(kd)和平衡解离常数(KD)。

[0888] 结果显示在表10中。该表汇集了来自不同实验的数据。对于显示两组或更多组数值的抗体而言,每一组对应于在一个单独实验中所获得的数据。

[0889] 表10.

[0890] 在25℃下CD73 mAb与N-hCD73-his结合(hCD73(26-336)His)的动力学

[0891]

mAb	Fc	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
11F11	IgG2	2.6E+05	4.2E-04	1.6
		2.9 E+05	1.6 E-04	0.56
4C3	IgG1	2.2E+04	2.4E-03	110
		2.4 E+04	2.2 E-03	92
4D4	IgG2	8.2E+04	7.7E-04	9.4
		7.9 E+04	4.9 E-04	6.2

[0892]

10D2	IgG4	6.1E+05	9.5E-04	1.6
11A6	IgG1	5.5E+04	7.6E-03	140
1H9	IgG1	3.3E+05	9.3E-04	2.8
24H2	IgG4	2.3E+05	3.2E-03	14
5F8	IgG1	1.5E+05	6.0E-03	41
6E11	IgG1	5.7E+04	1.4E-03	25
7A11	IgG1	8.8E+05	3.8E-04	0.43
CD73.4	IgG1.1f	4.2 E+05	3.9 E-04	0.92
CD73.4	IgG2-C219S	2.9 E+05	1.6 E-04	0.55
		2.8 E+05	3.3 E-04	1.2
		2.9 E+05	3.7 E-04	1.3
		3.5 E+05	4.4 E-04	1.2
CD73.4	IgG2-C219S-IgG1.1f	3.1 E+05	3.5 E-04	1.1
		3.3 E+05	1.4 E-04	0.43
		3.1 E+05	1.3 E-04	0.42
		3.2 E+05	1.5 E-04	0.47
		3.1 E+05	4.1 E-04	1.4
		2.7 E+05	3.8 E-04	1.4
		3.0 E+05	4.1 E-04	1.4
		3.1 E+05	4.2 E-04	1.3
		3.2 E+05	4.3 E-04	1.3
		2.9 E+05	4.0 E-04	1.4
CD73.10	IgG1.1f	2.7 E+05	1.3 E-03	4.7
CD73.10	IgG2-C219S	2.2 E+05	1.4 E-03	6.2
		2.2 E+05	1.8 E-03	8.3
CD73.10	IgG2-C219S-IgG1.1f	2.4 E+05	1.4 E-03	5.7
		2.3 E+05	1.60E-03	6.8
CD73.3	IgG1.1f	1.6 E+04	3.6 E-03	220
CD73.11	IgG2-C219S	8.0 E+04	2.8 E-04	3.5
		7.9 E+04	5.1 E-04	6.5

[0893]

CD73.6	IgG1.1f	3.7 E+05	2.5 E-04	0.68
CD73.6	IgG2-C219S-IgG1.1f	3.0 E+05	2.2 E-04	0.72

[0894] 该表中的K_D为单价K_D,即抗体与人CD73的N端部分的结合的K_D,此结合是单价的。

[0895] G54S突变得到了容忍,而且似乎稍微增加了亲和力,同时去除了预期的DG异构化位点。L52W突变似乎引起亲和力减小约10倍。4D4变体具有独特的CDR3序列和不同的动力学(与11F11分子相比更慢的结合)。

[0896] 来自针对CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f的10个实验的平均K_D为1.1±0.4nM。相对于11F11的T25A突变并不影响亲和力。

[0897] 结果显示所有抗CD73抗体均以良好亲和力与人CD73结合,并且具有缓慢的解离速率。

[0898] 结合研究的结果指示,在将突变引入11F11、4C3或4D4中,或经过同种型转换后,结合活性得以维持,不过一些抗体具有相对于原始抗体(即11F11、4C3或4D4)的降低的亲和力。具体而言,CD73.10(T25A、L52W、G54E)具有比CD73.4(T25A)或CD73.11(4D4)更快的解离速率。所有IgG2分子的比较指示,11F11和CD73.4(11F11-T25A)具有最高的单价CD73亲和力(KD=1.1nM+0.4nM)。CD73.10(11F11-T25A、L52W、G54E)的CD73亲和力比11F11或CD73.4的CD73亲和力低约10倍。这表明当L52W或G54E或这两个突变与其他11F11序列联合时降低了CD73亲和力。4D4和CD73.11具有与CD73.10(KD约5nM)相当的亲和力,但具有不同的动力学。4C3表位被认为包括CD73的N和C结构域的区域,因此对于分离的N结构域的测量KD是弱的(KD=100-200nM)。

[0899] 如在ELISA测定法中确定的,具有K370N突变(CH3结构域中的...CLVNGFY...)的CD73.4-IgG2/IgG1.1显示与人CD73结合。

[0900] 还研究了CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f与食蟹猴CD73的结合。使用Biacore T100仪器(GE Healthcare),在25℃下通过表面等离子共振(SPR)比较了CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f结合食蟹猴CD73的特异性与结合人CD73的特异性。测试了人CD73的全长细胞外结构域(由连接有His标签的人CD73的残基27-547组成,称为hCD73-his)或食蟹猴CD73的全长细胞外结构域(由由连接有His标签的食蟹猴CD73的残基27-547组成,称为cy-CD73-his)与被捕获在固定的蛋白A表面上的抗体的结合。对于这些实验,利用标准乙基(二甲基氨基丙基)碳化二亚胺(EDC)/N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)化学,结合乙醇胺封闭,在0.01M HEPES(pH7.4)、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005%v/v吐温20的运行缓冲液中,将蛋白A(Pierce)以3000-4000RU的密度固定在CM5传感器芯片(GE Healthcare)的流动池1-4上。通过下列步骤进行实验:首先以10μl/min使用30s接触时间将抗体(5-10μg/ml)捕获在蛋白A表面上,以30μl/min的流速使用180s结合时间和360s解离时间与600nM、200nM、66.7nM、22.2nM、7.4nM和2.5nM hCD73-his或食蟹猴CD73-his结合。用于这些实验的运行缓冲液为10mM磷酸钠、130mM氯化钠、0.05%吐温20,pH 7.1。在以30μl/min的流速使用两个30s脉冲的10mM甘氨酸(pH 1.5)的每一周期之后使表面再生。

[0901] 图19中所示的结果表明,CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f以相似的亲和力和动力学与食蟹猴CD73和人CD73结合。CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f以小于1nM的KD与全长人CD73二

聚体和食蟹猴CD73二聚体结合。未观察到CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f对小鼠或大鼠CD73的显著交叉反应性。

[0902] 还通过SPR评估了从11F11抗体分离的Fab片段的动力学和亲和力。在这些实验中，使用EDC/NHS将来自鼠抗6xHis抗体的Fab结构域以约3000RU的密度固定在CM5传感器芯片上。以10μl/min使用30s接触时间，将全长hCD73-his以10RU密度捕获至Fc2上(1μg/ml hCD73-his)，以40RU密度捕获至Fc3上(5μg/ml hCD73-his)，并且以160 RU密度捕获至Fc4上(20μg/ml hCD73-his)。然后，在10mM磷酸钠、130mM氯化钠、0.05％吐温20的运行缓冲液(pH 7.1)中，以30μl/min使用180s结合时间、600s解离时间测试11F11Fab片段(从胃蛋白酶切割的L-半胱氨酸还原的11F11抗体纯化)在400nM、135nM、44.4nM、14.8nM、4.9nM、1.7nM、0.55nM下的结合。在以30μl/min的流速使用两个15s脉冲的10mM甘氨酸(pH 2.0)的每一周期之后使表面再生。将传感图数据进行双重参照(double referenced)，然后使用Biacore T100评估软件v2.0.4拟合至1:1 Langmuir模型，以确定结合速率常数(ka)、解离速率常数(kd)和平衡解离常数(K_D)。结果显示在以下表11中。

[0903] 表11.

[0904] 25℃下11F11-Fab与hCD73-his表面结合的动力学

[0905]

hCD73-his 表面密度 (RU)	**ka (1/Ms)**	**kd (1/s)**	**K_D (nM)**
10	1.2E+06	8.7E-04	0.73
40	1.2E+06	8.7E-04	0.73
160	1.1E+06	8.5E-04	0.77

[0906] 因此，结果显示11F11 Fab片段具有针对hCD73的高亲和力(K_D约0.74nM)。

[0907] B.CD73抗体与CD73阳性细胞的结合

[0908] 利用Calu6(CD73内源表达子;人肺腺癌细胞系)、DMS114(CD73阴性;人小细胞肺癌细胞系)、CHO-食蟹猴CD73(经食蟹猴CD73转染)和CHO-K1(食蟹猴CD73阴性)细胞上的CD73抗体，使用Alexa Fluor®647山羊抗人IgG(H+L)作为第二抗体(Invitrogen目录号A-21445)，使用以下方法产生滴定结合曲线：

[0909] 将100000个细胞平板接种在100μL PBS+2％FBS/孔中，封闭20分钟。使用U形底96深孔板，按照下表12的规定合并多个体积的抗体和PBS+2％FBS。

[0910] 表12.

[0911]

克隆	[原液](mg/mL)	[染色剂](mg/ml)	Ab体积(μL)	TM体积(μL)
11F11	3.70	0.020	2.92	537.1
CD73.10-IgG1.1f	1.3	0.020	8.31	531.7
CD73.10-IgG2	1	0.020	10.80	529.2
CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f	1	0.020	1-/80	529.2
CD73.4-IgG2	2.3	0.020	4.70	535.3

CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f	2	0.020	5.40	534.6
CD73.4-IgG1.1f	2.3	0.020	4.70	535.3

[0912] 通过将1/6体积(90μL)稀释在450μL PBS+2%FBS中来进行8点连续稀释。将细胞板在1500rpm下旋转5分钟。板的每一孔中加入100μL稀释抗体。在所有其他孔中添加100μL PBS+2%FBS。将板在冰上染色45分钟，在1500rpm下旋转5分钟，并且在200μL PBS+2%FBS/孔中洗涤两次。将已接受未缀合抗体的孔加上每个细胞系一个未染色的孔，重悬于100μL APC抗人二级抗体(20μg/mL)中。所有其他孔中加入100μL PBS+2%FBS，并且在冰上染色45分钟。将板在1500rpm下旋转5分钟，并且在200μL PBS+2%FBS/孔中洗涤。将板再次洗涤，重悬于200μL/孔的溶于PBS的2%FBS中，然后运行样品。

[0913] 结果如图20A1、20A2、20B1、20B2、20C1、20C2、20D1、20D2和表13中所示，其表明，所有CD73抗体均与天然表达CD73的细胞(Calu6细胞)以及经转染以表达食蟹猴CD73的CHO细胞结合，但这些抗体与不表达CD73的细胞(DMS114和CHO-K1)不结合。对每一抗体获得的结合的EC50显示在表13中。

[0914] 表13.

[0915]

抗体	EC50 nM Calu6	EC50 nM CHO-食蟹猴CD73
11F11	0.78	0.58
CD73.10-IgG1.1f	0.64	0.67
CD73.10-IgG2	0.85	1.24
CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f	0.85	1.27
CD73.4-IgG2	0.49	0.34
CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f	0.53	0.51
CD73.4-IgG1.1f	0.43	0.45

[0916] CD73.4-IgG2-IgG1.1f与人肿瘤细胞系的结合的EC50为0.5nM(范围为0.3nM至0.67nM)。CD73.4-IgG2-IgG1.1f与食蟹猴CD73转染的CHO细胞的结合的EC50为0.3nM(范围为0.1nM至0.5nM)。

[0917] 还测定了CD73.4抗体与人B细胞和T细胞的结合。使用Lympholyte-H细胞分离梯度介质分离外周血单核细胞(PBMC)。将PBMC与连续稀释的FITC标记的CD73.4-IgG2、CD73.4-IgG2-IgG1.1f或CD73.4-IgG1.1f抗体一起温育，并使用荧光染料标记的针对CD3和CD20的抗体来识别T细胞和B细胞。汇集来自两个供体的细胞，用于未染色样品和FMO(荧光扣除对照)对照样品。图20E和F以及表14中所示的结果表明这些抗体与人B和T细胞特异性地结合。

[0918] 表14:CD73抗体与B和T细胞结合的IC50

[0919]

	IC50 (nM) B细胞	IC50 (nM) T细胞
D316 mAb-CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f	0.1648	0.1829
D316 mAb-CD73.4-IgG2	0.1588	0.1799
D316 mAb-CD73.4-IgG1.1f	0.0994	0.1263
D329 mAb-CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f	0.1454	0.2406
D329 mAb-CD73.4-IgG2	0.07766	0.1348
D329 mAb-CD73.4-IgG1.1f	0.1356	0.2248

[0920] C.通过Scatchard分析抗CD73抗体的结合亲和力

[0921] 使用IODO-GEN®固相碘化试剂(1,3,4,6-四氯-3α-6α-二苯基甘脲;Pierce目录28600)用^{125}I-Na(1mCi;PerkinElmer目录NEZ033H001MC)将CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f(即CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f)放射性碘化。使用脱盐柱(Pierce目录43243)去除过量的碘化物。收集标记的抗体级分,在Wizard1470γ计数器(PerkinElmer)上分析其放射性。用来自Invitrogen的Qubit®荧光计计算每个级分中的^{125}I-CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f的浓度。通过对峰蛋白和放射性级分的薄层色谱法(TLC)(Pinestar Technology目录151005)确定放射性纯度。

[0922] CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f与人B细胞的结合:通过将人B细胞与一定滴度的^{125}I-CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f一起温育来证明与人B细胞的结合。通过在100倍摩尔过量的滴度的未标记CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f存在下的结合来确定非特异性结合,然后从每分钟总计数(CPM)减去该非特异性结合来计算特异性结合。使用^{125}I-CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f浓度对CPM的线性标准曲线来外推结合的^{125}I-CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f的最大nM,由此计算每细胞的受体数目。

[0923] CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f与人Calu-6细胞的结合。通过将Calu-6细胞与一定滴度的^{125}I-CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f一起温育来证明与人肺肿瘤细胞的结合。通过在100倍摩尔过量的滴度的未标记CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f存在下的结合来确定非特异性结合,然后从总CPM减去该非特异性结合来计算特异性结合。使用^{125}I-CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f浓度对CPM的线性标准曲线来外推结合的^{125}I-CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f的最大nM,由此计算每细胞的受体数目。

[0924] CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f与CHO-食蟹猴CD73转染子的结合。通过将表达食蟹猴CD73的CHO细胞与一定滴度的^{125}I-CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f一起温育来证明与食蟹猴CD73的结合。通过在100倍摩尔过量的滴度的未标记CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f存在下的结合来确定非特异性结合,然后从总CPM减去该非特异性结合来计算特异性结合。使用^{125}I-CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f浓度对CPM的线性标准曲线来外推结合的^{125}I-CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f的

最大nM,由此计算每细胞的受体数目。

[0925] Scatchard分析的结果显示,CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f以0.03nM的平衡解离常数(KD)与人B细胞特异性地结合(图20G),以0.30nM的KD与Calu-6细胞上的人CD73结合(图20H),并且以0.04nM的KD与CHO-食蟹猴CD73转染子结合(图20I)。

[0926] 因此,通过Scatchard还显示CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f以高亲和力与表达在细胞上的CD73结合,这进一步支持了流式细胞术的结果。

[0927] 实施例4:抗CD73抗体的生物物理特征

[0928] A.尺寸排阻色谱法偶联在线多角度光散射检测器(SEC-MALS)

[0929] 通过大小排阻色谱偶联在线多角度光散射检测器(SEC-MALS)来检查CD73mAb的寡聚状态。在缓冲液中在连接于Prominence Shimadzu UFLC的Shodex PROTEIN KW-803柱上进行等度分离,其中缓冲液含有200mM K_2HPO_4、150mM NaCl(pH 6.8)且含有0.02%叠氮化钠(经0.1μm过滤),以0.5mL/min运行。使用SIL-20AC Prominence Shimadzu自动进样器将样品注射到柱上,并且从串联连接的三个在线检测器获得数据:Prominence SPD-20AD二极管阵列UV/vis分光光度计,其后为Wyatt miniDAWN™ TREOS多角度光散射检测器,再后为Wyatt Optilab T-rEX折射率检测器。收集数据(如下表15中所示)且使用Astra(Wyatt)和Labsolutions(Shimadzu)软件进行分析。结果显示在表15中。

[0930] B.差示扫描量热法(DSC)

[0931] 使用MicroCal Capillary DSC仪器(GE Healthcare)来测定CD73 mAb的热稳定性。分析在PBS(pH 7.1)中的0.5-0.75mg/ml浓度的抗体。为了稳定DSC仪基线并获得一致的热历程,在样品分析之前记录单独的缓冲液在样品池和参考池二者中的多次扫描。样品扫描在样品池中含有mAb,在参考池中含有PBS(pH 7.1)。所有扫描从10℃-110℃以60℃/hr的扫描速率运行,循环前恒温时段5分钟,没有循环后恒温时段。使用MicroCal Origin CapDSC分析软件分析数据(如下表15中所示)。从样品-缓冲液数据扣除适宜的缓冲液-缓冲液空白扫描,并且通过将数据拟合至非2态模型来确定转变中点温度(Tm)值。结果显示在表15中。Tm1、Tm2和Tm3是抗体中不同结构域的Tm。

[0932] 表15.SEC-MALS和DSC

[0933]

mAb	Fc	SEC %HMW	SEC %单体	SEC %LMW	MALS质量(主峰/单体)	DSC T起始(oC)	DSC Tm1(oC)	DSC Tm2(oC)	DSC Tm3(oC)
7A11		0.5	98.5	0.5	146.3	56.0	64.8	70.2	82.8
6E11		2.1	97.6	0.1	145.2	55.0	62.3	72.0	83.3
11F11		0.8	99.2	0.0	143.3	64.0	73.3	78.0	
5F8		2.3	97.7	0.0	143.8	59.0	68.7	82.7	
4C3		0.9	94.4	4.5	142.7	60.0	66.9	71.2	82.7
11A6		4.8	94.0	0.0	143.2	61.0	66.0	71.4	82.1
10D2		1.1	98.8	0.0	141.4	61.0	67.7	77.1	
24H2		0.0	100.0	0.0	142.4	62.0	71.7	76.9	79.8
4D4		3.2	96.8	0.0	144.2	62.0	71.7	77.0	79.9
CD73.4	IgG1.1f		98.2	1.8	140.4	59	65.5	81.2	
CD73.4	IgG2-C219S					60	72.9	77.5	
CD73.4	IgG2-C219S-IgG1.1f	0.4	99.6		141.5	59	68.4	78.3	
CD73.10	IgG1.1f	0.4	99.6		135.9	55	64.2	78.2	
CD73.10	IgG2-C219S		100		152	61	73.2	77.0	
CD73.10	IgG2-C219S-IgG1.1f		100		139.5	61	70.4	76.5	84.1
CD73.3	IgG1.1f	0.6	99.4		146.1	56	64.8	75.0	83.4
CD73.11	IgG2-C219S					61	73.4	77.9	
CD73.6	IgG1.1f	0.2	99.7	0.0	142.0	58	64.2	79.7	
CD73.6	IgG2-C219S-IgG1.1f	0.3	99.7	0.1	142.3	60	70.1	77.4	84.6

[0934] 结果显示所有抗体几乎都是单体且稳定的。

[0935] 使用供体血液在体外免疫原性测定中测试CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f的免疫原性。结果表明较低的预期免疫原性。

[0936] 实施例5:抗CD73Ab对酶活性的抑制

[0937] A.珠子结合的CD73酶活性的抑制

[0938] 为了评估抗CD73抗体对珠子结合的CD73的酶活性的抑制,使用以下材料和方法:

[0939] 材料

[0940] Tm缓冲液:25mM Tris、5mM $MgCl_2$水溶液

[0941] 0.5mM磷酸钠缓冲液,pH 8.0

[0942] 洗涤缓冲液(10mL 0.5mM磷酸钠,pH 8.0;10mL 5M NaCl;34mL水;10μL吐温20)

[0943] 腺苷5′-单磷酸二钠盐,Sigma目录号01930-%G,300mM,溶于TM缓冲液中

[0944] 腺苷5′-三磷酸二钠盐水合物,Sigma目录号A6419-1G,100mM,溶于TM缓冲液中

[0945] rhCD73,0.781mg/mL

[0946] 食蟹猴CD73,Sino Biological Inc目录号90192-C08H

[0947] his标签磁珠,Invitrogen目录号10103D

[0948] CellTiter-Glo®发光细胞活力测定,Promega目录号G7572

[0949] mAb0,不结合CD73的无关抗体

[0950] 方法

[0951] 通过混合表16中规定的体积并稀释3倍(将225μL转移到450μL TM缓冲液中),进行表16中列出的抗CD73抗体的6点连续稀释(最大浓度10μg/mL)。具有IgG2铰链的所有抗体都

含有C219S突变。

[0952] 表16.

[0953]

克隆	[原液](mg/mL)	[Stim](mg/mL)	Vol Ab(uL)	Vol TM(uL)
mAb0	5.38	0.010	1.25	673.7
F3713.11F11.F3.A4	3.70	0.010	1.82	673.2
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f	1.3	0.010	5.19	669.8
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2	1	0.010	6.75	668.3
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	1	0.010	6.75	668.3
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2	2.3	0.010	2.93	672.1
mAb-CD73.4-Vh-hHCIgG2-IgG1.1f	2	0.010	3.38	671.6
mAb-CD73.4-Vh-IgG1.1f	2.3	0.010	2.93	672.1

[0954] 将磁珠(每样品2μl珠子)在微量离心管中的1mL磷酸钠缓冲液中洗涤。用磁铁将珠子拉下并重悬于400μL TM缓冲液中。对于每个CD73种类:在单独的管中,将CD73(每个样品75ng)与TM合并使体积达到400μL。针对空白珠(无CD73)制备第三管。将珠子悬浮液与rhCD73溶液合并,并在摇床上在室温下混合5分钟。用磁铁将珠子拉下,并将珠子在1mL洗涤缓冲液中洗涤。用磁铁将珠子拉下并重悬于TM缓冲液(每样品40μL)中。将珠子转移到PCR 96孔板中(每孔40μL)。将200μL/孔的连续稀释的CD73 HuMab加入板中并充分混合。将板在室温下温育30分钟。制备各700μL的400μM ATP(8X)和1.2mM AMP(8X)。将各自650μL合并以制备4X AMP/ATP储备混合物。将珠子拉下并用每孔200μL TM缓冲液洗涤两次。将珠子再次拉下并重悬于30μL TM缓冲液中。将30μL珠子转移到黑色96孔板中。加入10μL的4x AMP/TP储备溶液(终浓度150μM的AMP/50μM的ATP)并混合。加入40μL体积的对照孔(终浓度150μM的AMP和/或50μM的ATP)。将板在37℃下温育15分钟。

[0955] 结果显示在图21A1、21A2、21B1和21B2以及表17中。

[0956] 表17:

[0957]

mAB	Fc	EC50 (nM)
11F11	IgG2	3.98
4C3	IgG1	3.63
4D4	IgG2	5.31
10D2	IgG1	6.94
11A6	IgG1	3.12
24H2	IgG1	4.18
5F8	IgG1	5.76
6E11	IgG1	3.71
7A11	IgG1	2.86

[0958]

CD73.4	IgG1.1f	3.25
CD73.4	IgG2-C219S	2.72
CD73.4	IgG2-C219S-IgG1.1f	2.97
CD73.10	IgG1.1f	4.69
CD73.10	IgG2-C219S	7.54
CD73.10	IgG2-C219S-IgG1.1f	4.84

[0959] 食蟹猴CD73的酶抑制结果列于表18中。

[0960] 表18：

[0961]

mAB	Fc	EC50(nM)
CD73.4	IgG1.1f	7.123
CD73.4	IgG2-C219S	3.658
CD73.4	IgG2-C219S-IgG1.1f	4.572
CD73.10	IgG1.1f	10.2
CD73.10	IgG2-C219S	8.783
CD73.10	IgG2-C219S-IgG1.1f	9.935

[0962] 结果显示所述抗体剂量依赖性地抑制人CD73的酶活性。在重组人CD73酶抑制测定中，CD73.4.IgG2-C219S-IgG1.1f的EC50为2.97(范围2.9nM至3.1nM)。在重组食蟹猴CD73酶抑制测定中，CD73.4.IgG2-C219S-IgG1.1f的EC50为3.7(范围1.6nM至12.6nM)。因此，所有测试的针对CD73的抗体都抑制了珠子结合的人和食蟹猴CD73酶活性。

[0963] B.Calu6细胞中CD73酶活性的抑制

[0964] 该实施例描述了在用抗CD73抗体处理后Calu6(CD73阳性)和DMS-114(CD73阴性)细胞的AMP的CD73去磷酸化的评估。

[0965] 材料：

[0966] CD73抗体;参见下表

[0967] MabO对照抗体，5.38mg/mL

[0968] TM缓冲液：在水中的25mM Tris、5mM $MgCl_2$

[0969] 腺苷5′-单磷酸二钠盐，Sigma目录号01930-5G，300mM，在TM缓冲液中

[0970] 腺苷5′-三磷酸二钠盐水合物，Sigma目录号A6419-1G，100mM，在TM缓冲液中

[0971] rhCD73，0.781mg/mL

[0972] CellTiter-Glo®发光细胞活力测定，Promega目录号G7572

[0973] 方法：

[0974] 如下表19规定通过在U型底96孔板中混合纯化抗体和PBS的体积来将抗体连续稀释。将抗体(最大浓度25μg/mL，300μL)以5倍稀释度进行6点连续稀释，将60μL转移到240μL PBS中。具有IgG2铰链的所有抗体都含有C219S突变。

[0975] 表19.

[0976]

克隆	浓度mg/mL)	Vol Ab(uL)	Vol PBS(uL)
mAb0	5.38	1.39	298.6
F3713.11F11.F3.A4	3.70	2.03	298.0
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f	1.3	5.77	294.2
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2	1	7.50	292.5
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	1	7.50	292.5
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2	2.3	3.26	296.7
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	2	3.75	296.3
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f	2.3	3.26	296.7

[0977] 用维尔烯(Versene)收获细胞并计数。接种到平板上,以1500rpm旋转5分钟,并重悬于100μL连续稀释的抗体中。将所有其他孔重悬于100μL PBS中。在37℃下温育20分钟。在TM缓冲液中制备15mL 180μM的AMP储备液。

[0978] 将板以1500rpm离心5分钟并用200μL PBS/孔洗涤一次。将板再次旋转并重悬于100μL AMP中。将所有其他孔重悬于100μL TM缓冲液中。在37℃下将细胞与AMP一起温育60分钟。制备在TM缓冲液中的7.5mL 60μM ATP储备液。在1500rpm下将板旋转5分钟,并将50μL上清液转移到黑色96孔板中。添加50μL的ATP。以每孔75ng将rhCD73加入某些孔中作为阳性对照。未接受rhCD73的孔用TM缓冲液加至100μL。终浓度为90μM AMP:30μM ATP。在37℃下温育15分钟。对于CellTiterGlo测定法(其检测ATP),每孔加入100μL并读取平板。

[0979] 显示在图22A1、22A2、22B1、22B2和表20中的结果表明,抗CD73抗体抑制人CD73阳性Calu6细胞中AMP的去磷酸化(或减少AMP加工),但对CD73阴性的DMS114细胞没有作用。CD73.4-IgG2S-IgG1.1f抗体阻断人肿瘤细胞系Calu6中的内源细胞CD73的EC50为0.39nM(范围0.31nM至0.48nM)。在NCI-H292(粘液表皮样癌细胞系)和SK-MEL-24(人黑色素瘤细胞系)细胞中重复这些实验,结果相似(表20)。

[0980] 表20:

[0981]

抗体	EC50 结合 Calu6[1] (nM)	EC50 酶抑制[2] (nM)	EC50 Calu6 抑制[3] (nM)	EC50 SKMEL24 抑制[3] (nM)	EC50 H292 抑制[3] (nM)
11F11	0.78	3.980	0.70	3.15	0.81
4C3	2.00	3.63	3.43	13.29	4.48
4D4	0.82	5.31			
11A6	1.93	3.12	2.21		
5F8	11.65	5.76	8.10	110.19	13.46
7A11	0.35	2.86	0.95	3.72	1.31
24H2		4.18			
10D2		6.94			
6E11	0.63	3.71	1.54	3.43	1.34
CD73.4-IgG2CS	0.49	2.72	0.34		
CD73.4-IgG1.1f	0.43	3.25	0.37		
CD73.4-IgG2S-IgG1.1f	0.53	2.97	0.39		
CD73.10-IgG2S-IgG1.1f	0.85	4.84	0.77		
CD73.10-IgG1.1f	0.64	4.69	0.77		
CD73.10- IgG2S	0.85	7.54	0.84		

[0982] [1]在具有内源CD73表达的Calu6细胞上的结合滴定。在2-6个独立实验中测试抗体，并且指示了平均值。

[0983] [2]来自该实施例的部分A的数据。在1-5个独立实验中测试抗体，并且指示了平均值。

[0984] [3]在指示的细胞系中的细胞CD73活性的抑制。在2-4个独立实验中测试抗体，并且指示了平均值。

[0985] C.在双细胞系cAMP测定中CD73酶活性的抑制

[0986] 均相时间分辨荧光(HTRF)cAMP测定

[0987] 用含有0.2％BSA的PBS缓冲液连续稀释CD73抗体，且以5μl/孔接种于384孔白底浅孔微孔板(PerkinElmer，Waltham，MA)。收获Calu-6细胞且将其重悬于含有0.2％BSA的PBS中，然后将5μl细胞(300个细胞/孔)添加至板中。在37℃、5％CO_2和95％湿度下将细胞与抗

体一起温育10分钟，然后以5μl/孔添加80mM AMP。在37℃下将细胞与AMP一起进一步温育30分钟。在此期间，收获HEK293/A2AR细胞且在含有0.2%BSA的PBS中将其稀释至40万/ml。以5μl/孔将它们添加至测定平板中并且在37℃下继续温育1小时。根据制造商的说明书，使用均相时间分辨荧光(HTRF)HiRange cAMP检测试剂盒(Cisbio，Bedford，MA)，通过添加溶解缓冲液中的10μl/孔cAMP缀合的d2和10μl/孔铕穴状化合物缀合的抗cAMP抗体来进行HRTF测定。将板在室温下温育60分钟，并且使用EnVision酶标仪(PerkinElmer，Waltham，MA)读取荧光共振能量转移(FRET)信号(665nM和615nM)。计算来自665nm(受体)通道和615nm(供体)通道的信号的比率且乘以10,000作为FRET信号。测量IC_{50}和Ymax。通过与100nM剂量的11F11比较确定Ymax作为内部最大值。所有计算值均被确定为与该对照(设定为100%)相比的抑制百分比。

[0988] 表21中所示的结果表明，在这项利用细胞系共培养系统的cAMP测定中，各抗CD73mAb展示了不同的功效和效能。所有Ab均显示一定的腺苷产生减少，并且对大多数被筛选的Ab而言抑制程度相似。对11F11、11A6、4C3和5F8观察到最大抑制。

[0989] 表21：

[0990]

物质	IC50 (nM)	Ymax
APCP	1.29	97
11A6	4.87	84
5F8	13.17	80

[0991]

4C3	9.02	80
11F11	0.75	76
7A11	0.95	45

[0992] 还使用11F11Fab和$F(ab')_2$进行了酶抑制测定。图22C中所示的结果表明，使用$F(ab')_2$片段发生了酶抑制，但使用Fab片段则不然。由此可见，对于11F11酶抑制而言Fc区不是必需的，但二价是必需的。

[0993] 还使用上述cAMP测定确定了包含表26中所示的不同重链恒定区的CD73.4抗体在Calu6细胞中的酶抑制。就相对于背景的EC50和抑制水平("S:B")而言，结果提供在表28的最后两列中。这些结果表明所有CD73.4抗体均抑制了Calu6细胞中的人CD73酶活性。

[0994] D.CD73酶活性抑制的时程

[0995] 通过LC/MS/MS评价腺苷产生，还评价了酶活性抑制的时程。将Calu6细胞与11F11或4C3一起温育30分钟、2小时或4小时，然后添加50μM AMP，通过LC/MS/MS使用标准方法评价腺苷产生。

[0996] 质谱条件(Xevo TQ-S)：

[0997] 仪器:Xevo TQ-S(具有Waters 2777C)

[0998]

调谐 = CD73_adenosine_MRM_tune2.ipr	
电离：(+) ESI	去溶剂化温度(°C)：500
毛细管电压(kV)：0.9	去溶剂化气体流速(L/Hr)：1000
锥孔电压(V)：参见下文	锥孔气体流速(L/Hr)：150
源补偿电压(V)：50	雾化器压力(巴)：7.0
低端分辨率1：2.81	高端分辨率1: 15.00
低端分辨率2：2.93	高端分辨率2: 15.00
离子能量1：0.4	离子能量2：0.9
碰撞气体流速(mL/min)：0.15	碰撞：参见下文
前0.5分钟样品转化为废物	

[0999]

Waters Xevo TQ-S	序号：WAA021

[1000] 如图22D中所示的结果表明，在30分钟时间点的温育时间确实产生了差异，且11F11的抑制比4C3的抑制更快。虽然两种抗体在随后的时间点达到了相等的抑制，但11F11抗体更迅速地抑制细胞中的CD73酶活性。

[1001] 实施例6：抗体介导的CD73内化

[1002] 在两个不同测定中测量抗CD73抗体介导的CD73内化。

[1003] A.高含量内化测定法(2小时固定时间测定法)

[1004] 使用抗CD73抗体，通过评估抗体温育2小时后的细胞表达来测试Calu6细胞中的抗CD73抗体依赖性CD73内化。将20μl完全培养基(含有10％热灭活胎牛血清的Gibco RPMI培养基1640)中的细胞(2,000个细胞/孔)接种在384BD Falcon板中，然后使其在37℃、5％CO_2和95％湿度下生长过夜。用含有0.2％BSA的PBS缓冲液连续稀释抗CD73抗体，并且以5μl/孔添加至细胞板中。在37℃、5％CO_2和95％湿度下将细胞与抗体一起温育2小时，然后用PBS缓冲液洗涤一次。然后将甲醛(最终为PBS中的4％)以20μl/孔添加至细胞板中，并且将板在室温下温育10分钟。然后，吸出所有液体并且用30μl PBS将细胞洗涤一次。将检测抗体(2.5μg/孔抗CD73Ab CD73.10.IgG2C219S)以15μg/孔添加至固定的细胞板中。在4℃下将细胞温育过夜。在第二天，用PBS缓冲液将板洗涤两次，然后添加含有Alexa-488的山羊抗人第二抗体和DAPI，在室温下染色1小时。在PBS缓冲液中洗涤3次后，在Arrayscan Vti(Cellomics，Pittsburgh，PA)上将板成像。测量IC_{50}和Ymax。通过与100nM剂量的11F11比较确定Ymax作为内部最大值。所有计算值均被确定为与该对照(设定为100％)相比的内化百分比。

[1005] 结果提供在表22中。

[1006] 表22：

[1007]

mAb	恒定区	表位仓	EC50 (nM)	Ymax
11F11	IgG2	1	0.58	98
4C3	IgG1	2	ND	NA

[1008]

4D4	IgG2	1	0.38	104
10D2	IgG1	1	ND	29
11A6	IgG1	1	ND	NA
24H2	IgG1	1	8.2	51
5F8	IgG1	2	ND	NA
6E11	IgG1	1	ND	NA
7A11	IgG1	1	2.59	50
CD73.4	IgG2-C219S-IgG1.1f	1	1.2	97
CD73.10	IgG1.1f	1	6.18	64
CD73.10	IgG2-C219S	1	0.67	99
CD73.10	IgG2-C219S-IgG1.1f	1	0.87	99

[1009] ND＝未检测到

[1010] NA＝不适用

[1011] 由此可见，结果指示在表达人CD73的细胞系Calu6中由CD73.4.IgG2-C219S-IgG1.1f介导的CD73内化的EC50为1.2nM，并且该细胞系中的最大内化水平为97.5％。

[1012] 还使用11F11Fab和F(ab')$_2$进行了内化测定。图22C中所示的结果表明，使用F(ab')$_2$片段发生了内化，但使用Fab片段则不然。因此，Fc区不是11F11内化必需的。

[1013] 进行动力学内化研究来评估内化速率。将20μl完全培养基(含有10％热灭活胎牛血清的Gibco RPMI培养基1640)中的细胞(2,000个细胞/孔)接种在384BD Falcon板中，然后使其在37℃、5％CO_2和95％湿度下生长过夜。用含有0.2％BSA的PBS缓冲液将CD73抗体稀释至10μg/ml并且以5μl/孔添加至细胞板中。在37℃下将细胞与抗体一起温育0-2小时时程，然后用PBS缓冲液洗涤一次。随后在室温下用甲醛(最终为PBS中的4％)将细胞固定10分钟，并且然后用30μl PBS洗涤一次。用含有0.2％BSA的PBS缓冲液稀释检测抗体(2.5μg/孔抗CD73 Ab CD73.10.IgG2C219S)，并且以15μl/孔添加至固定的细胞板中。在4℃下将板温育过夜。在第二天，在PBS缓冲液中洗涤3次后，添加Alexa488、山羊抗人第二抗体与DAPI。在室温下将细胞染色60分钟，洗涤3次后，使用Arrayscan Vti(Cellomics，Pittsburgh，PA)获取影像。结果提供在图23A-23D以及表23和24中。表24中的值源自图23A-D中所示的数据。

[1014] 表23：

[1015]

细胞系	细胞类型	11F11(IgG2) $T_{1/2}$ (min)	6E11 1$T_{1/2}$ (min)	CD73.10.IgG1.1f $T_{1/2}$ (min)
Calu6	人肺腺癌	3.9	60.9	14.4
HCC44	非小细胞肺癌	3.3	27.9	23.5
H2030	非小细胞肺癌	3.3	40.3	18.3
H647	非小细胞肺癌	45.7	N/A	N/A
H2228	非小细胞肺癌	10.9	36.5	35.7
HCC15	非小细胞肺癌	2.2	84.4	37.9
SKLU1	肺腺癌	6.8	18.0	17.2
SKMES1	黑色素瘤	2.2	62.8	32.3
SW900	肺鳞状细胞癌	10.3	94.9	43.4

[1016] 表24:CD73抗体在4种人细胞系中的$T_{1/2}$和内化%

[1017]

	H228细胞		HCC15细胞		Calu6细胞		H2030细胞	
	$T_{1/2}$ min	内化%	$T_{1/2}$ min	内化%	$T_{1/2}$ min	内化%	$T_{1/2}$ min	内化%
CD73.11-IgG2CS	-	-	-	-	4.1	89	4.6	85
CD73.10-IgG2CS	9.7	93	2.6	91	3.0	91	3.3	85
CD73.10-IgG2CS-IgG1.1f	9.4	92	3.0	91	3.1	91	4.3	87
CD73.4-IgG2CS	13.8	94	3.1	94	6.5	88	3.7	89
CD73.10-IgG1.1f	35.7	33	37.9	71	14.4	63	18.3	67
CD73.3-IgG1.1f	16.5	-47	>240	38	111.4	79	>120	27
11F11	10.9	96	2.2	94	3.9	87	3.3	90
4C3	7.6	-48	141.5	28	0.6	-6	>120	-34
6E11	36.5	13	84.4	64	107.4	68	40.32	51

[1018] 结果表明,仓1抗体(11F11及其衍生物CD73.4和CD73.10)显示良好的内化EC_{50}和最大值(97.5%),虽然某些抗体比其他抗体内化更多。11F11活性最大且在数分钟内内化,在30分钟内达到平台,而6E11(同样为仓1抗体,IgG1)内化较缓慢,以约1小时达到平台(图23A-D)。仓2抗体(5F8和4C3)未显著内化。另外,IgG2铰链和CH1结构域的存在增强了内化的速度和程度。这种趋势在若干细胞系中观察到(图23A-D和表24)。

[1019] B.通过流式细胞术测量内化

[1020] 还通过流式细胞术测试了抗CD73抗体介导的CD73内化。在冰上将指示细胞与10μg/mL标示抗体一起温育30分钟,洗涤若干次,转移至37℃持续指示的时间。在指示的温育时间后同时收获细胞。再次用一级抗体(与初始温育使用相同的抗体)将细胞染色,然后用抗人二级抗体染色。然后通过流式细胞术测定细胞的CD73表达。

[1021] 图23E和表25中所示的结果与上述内化测定中获得的结果一致,表明具有IgG2铰

链和CH1的所有抗体均诱导了快速且完全的内化。CD73水平在洗出后22小时之后保持较低，表明该内化是持久的。

[1022] 在NCI-H292细胞系中获得图23F和表25中所示的类似结果，其中在温育时间期间(未洗出)将抗体维持在培养物中。而且，这些数据指示了内源CD73的快速且显著的内化以及下调的维持。

[1023] 还使用人SNU-C1(结肠癌细胞系)和NCI-H1437(非小细胞肺癌细胞系)细胞进行了内化测定。在图23I和23J以及表25中所示的结果也表明快速内化，其中在5小时内达到最大水平，并且CD73.4.IgG2-C219S-IgG1.1f在SNU-C1中的最大内化水平为约50％，对于NCI-H1437细胞则为60％。图23G和23H显示了CD73.4.IgG2-C219S-IgG1.1f在Calu6和NCI-H292细胞中相似的内化动力学。对于显示CD73内化％的图表，如下获得此数值：

[1024] $$\%\,CD73\ \ 内化 = 100 - \left(\frac{MFI_{t=x} - MFI_{背景}}{MFI_{t=0} - MFI_{背景}} \times 100\right)$$

[1025] 其中对于每一抗体，$MFI_{t=x}$为给定时间点的MFI，$MFI_{t=0}$为t＝0时的最大荧光，$MFI_{背景}$为仅有二级抗体时的MFI。

[1026] 表25：在几个细胞系中的抗体介导的CD73内化的EC_{50}

[1027]

	Calu6		NCI-H292		SNU-C1		SNU-C1 (未洗涤)		NCI-H1437		NCI-H1437 (未洗涤)	
	Ymax (%)	$T_{1/2}$ (hr)	Ymax (%)	$T_{1/2}$ (hr)	Ymax (%)	$T_{1/2}$ (hr)	Ymax (%)	$T_{1/2}$ (hr)	Ymax (%)	$T_{1/2}$ (hr)	Ymax (%)	$T_{1/2}$ (hr)
mAb-CD73.4-IgG2-IgG1.1f	76.8	0.5661	77.64	0.2633	48.96	0.4954	38.39	1.025	63.12	0.3164	62.78	0.3418
mAb-CD73.4-IgG2	75.59	0.6003	78.42	0.2766	-	-	-	-	-	-	-	-
mAb-CD73.4-IgG1.1f	44.99	1.737	51.49	0.2087	30.58	0.9915	33.16	2.33	49.76	0.4915	49.95	0.5384

[1028] 在Calu6和H292细胞中进行另外的内化测定以进一步区分同种型对内化的作用。如上文所述进行内化测定(无抗体洗出步骤的方案)，并且在温育时间期间将表26中所示的不同杂合同种型的抗体以10μg/mL维持在培养物中。对于流式细胞术实验，实施例6B的方法适用于96孔板(与48孔板相反)和每孔50,000个细胞的高通量分析。

[1029] 表26：用CD73.4可变区测试的恒定区：

[1030]

构建体	恒定区的SEQ ID NO	描述
IgG1f	267	野生型IgG1f
IgG1.1f	272	标准惰性IgG1.1f
IgG2.3	268	IgG2 A型(C219S)
IgG2.5	271	IgG2 B型(C131S)
IgG2.3G1-KH	270	IgG2.3的CH1、上铰链和下铰链/上部CH2，所有其他为IgG1f
IgG2.5G1-KH	279	IgG2.5的CH1、上铰链和下铰链/上部CH2，所有其他为IgG1f
IgG2.3G1-AY	269	IgG2.3的CH1和上铰链，所有其他为IgG1f
IgG2.5G1-AY	278	IgG2.5的CH1和上铰链，所有其他为IgG1f
IgG1-G2.3G1-KH	282	IgG1的CH1，IgG2.3的上铰链和下铰链/上部CH2，所有其他为IgG1f
IgG1-G2.3G1-AY	281	IgG1的CH1，IgG2.3的上铰链，所有其他为IgG1f
IgG2.3G1.1f-KH	273	IgG2.3的CH1、上铰链和下铰链/上部CH2，所有其他为IgG1.1f
IgG2.5G1.1f-KH	277	IgG2.5的CH1、上铰链和下铰链/上部CH2，所有其他为IgG1.1f
IgG1-δTHT	274	的IgG1，其中THT序列从铰链中去除
IgG2.3-加THT	275	IgG2.3，其中THT序列(来自IgG1)添加到铰链中
IgG2.5-加THT	280	IgG2.5，其中THT序列(来自IgG1)添加到铰链中
IgG2.3-加GGG	276	IgG2.3，其中柔性GGG序列添加到铰链中

[1031] 对于每一构建体，显示Fc γ R结合正如预期，即Fc γ R结合是由下铰链/CH2区驱动的。

[1032] 结果显示在图23K、L、M以及表27和28中。表27中所示的数据是使用与实施例6B中所述相同的方案生成的。表28中所示的数据是使用与实施例6A中所述相同的方案生成的。

[1033] 表27：在Calu6和NCI-292细胞中抗体介导的CD73内化的Ymax和$T_{1/2}$

[1034]

	Calu6		NCI-H292	
	Ymax (%)	$T_{1/2}$ (hr)	Ymax (%)	$T_{1/2}$ (hr)
mAb-CD73.4-IgG1f/LC-11F11-Vk2	55.72	0.8452	73.05	0.5014
mAb-CD73.4-IgG2.3G1-AY-pTT5-SP	85.07	0.3326	90.25	0.272
mAb-CD73.4-IgG2.3G1-KH	81.62	0.3962	91.61	0.2801
mAb-CD73.4-G1-G2.3-G1-AY	72.7	0.4229	84.51	0.3083
mAb-CD73.4-IgG1-δTHT	69.27	0.5652	83.63	0.3441
mAb-CD73.4-G1-G2.3-G1-KH	65.67	0.5674	83.29	0.343
mAb-CD73.4-IgG2.3-加THT	81.19	0.3551	91.41	0.2935
mAb-CD73.4-IgG2.3-加GGG	81.72	0.3355	91.6	0.2712
mAb-CD73.4-IgG2.5	78.98	0.3485	89.56	0.3057
mAb-CD73.4-IgG2.5G1.1f-KH	79.63	0.3527	90.86	0.2993
mAb-CD73.4-IgG2.5G1-AY	81.91	0.2901	91.3	0.2452
mAb-CD73.4-IgG2.5G1-KH	76	0.2837	90.75	0.256
mAb-CD73.4-IgG2.5加THT/LC	80.15	0.2869	89.6	0.2565
mAb-CD73.4-IgG2-C219S/LC	82.35	0.3725	88.91	0.2866
mAb-CD73.4-IgG2-C219S/LC	82.54	0.3639	87.66	0.2845
mAb-CD73.4-IgG1.1f+K/LC	57.07	1.519	70.4	0.4969
mAb-CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f	80.98	0.3508	90.35	0.2764

[1035] 表28:具有不同恒定区的CD73.4在Calu6细胞中的内化和酶抑制特征

[1036]

#	CD73_mAb_克隆	内化		CD73抑制	
		最大	速度	EC50 (nM)	S:B
1	CD73.4-IgG1f/LC-11F11-Vk2	+	+	2.01	2
2	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3G1-AY-pTT5-SP5	++++	++++	2.37	56
3	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3G1-KH	++++	+++	1.70	52
4	CD73.4-Vh-hHC-G1-G2.3-G1-AY	++	++	0.38	6
5	CD73.4-Vh-hHC-G1-G2.3-G1-KH	++	++	0.63	3
6	CD73.4-Vh-hHC-IgG1-deltaTHT	++	+++	0.31	6
7	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3-plusTHT	++++	++++	1.54	33
8	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3-plusGGG	++++	++++	1.26	26
9	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5	++++	++++	2.17	51
10	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5G1.1f-KH	++	++++	0.87	45
11	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5G1-AY	+++	++++	0.43	92
12	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5G1-KH	+++	++++	0.44	42
13	CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5plusTHT/LC	++++	++++	0.90	44
14	CD73.4-Vh-hHC-IgG2-C219S/LC	++++	++++	1.56	28
15	CD73.4-Vh-hHC-IgG2-C219S/LC	++++	++++	1.78	41
16	CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f+K/LC	+	+	0.70	2
17	CD73.4-Vh-hHC-IgG2C219S-IgG1.1f	++++	++++	1.28	12

[1037] 图23K、L和M以及表27和28指示，具有IgG2同种型的铰链和CH1结构域的抗体驱动CD73内化的效率最高，而具有IgG1铰链和CH1结构域的抗体对应于图中的下部曲线，即较低的内化程度。另外，仅具有来自IgG2的铰链的抗体与人IgG1铰链相比具有增加的内化。因此，具有IgG2同种型的铰链和CH1结构域的抗体相对于具有IgG1同种型的抗体具有优越的内化特征。

[1038] 因此，抗CD73抗体mAb-CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f诱导了依赖于测试的细胞系的快速内化。内化的T1/2介于数分钟至不到1小时的范围。测试的大多数细胞系具有不到10分钟的T1/2。对于一些细胞系诱导了几乎完全的内化，且测试的所有细胞系的表面CD73表达降低至少50％，所述降低通常到5小时时(在一些情况下短得多)达到最大水平。

[1039] SEC-MALS和DLS数据证明，hCD73-his与含有IgG2铰链和CH1区的抗体(IgG2-C219S或IgG2-C219S-IgG1.1f)形成的复合物比与含有IgG1铰链和CH1区的抗体(IgG1.1f)形成的复合物更大。

[1040] 实施例7：在异种移植动物模型中的肿瘤的CD73酶抑制

[1041] A.在Calu-6异种移植模型中抗CD73抗体的CD73酶活性的原位抑制

[1042] 将带有皮下人Calu6肿瘤的小鼠在生长7天后用CD73.10-IgG1.1、CD73.10-IgG2CS或CD73.10-IgG2CS-IgG1.1进行治疗。以10mg/kg IP给予抗体。在抗体施用后第1天、第2天、第3天和第7天收获肿瘤，包埋在OCT中并且在冷异戊烷中速冻。将OCT包埋的肿瘤切割成5-6μm切片并且在室温下干燥过夜。使用冷的10％磷酸盐缓冲的福尔马林和丙酮的1:1混合物将肿瘤切片固定2.5分钟，然后在室温下在含有2mM CaCl2和0.25M蔗糖的50mM Tris-马来酸盐缓冲液(pH 7.4)中预温育1小时。1小时后，去除预温育缓冲液，更换为补充有5mM $MnCl_2$、2mM Pb(NO3)2、2.5％葡聚糖T200、2.5mM左旋咪唑和1mM AMP的相同缓冲液。在37℃下进行1小时的酶反应。用DI水冲洗后，将切片与1％ $(NH_4)_2S$一起温育正好1分钟，然后在DI

水中快速冲洗。使用苏木精将切片复染色，脱水，用基于二甲苯的封片剂封片。棕色指示活性CD73的存在，而缺乏棕色则指示CD73酶活性被抗体抑制。

[1043] 结果表明，CD73.10-IgG1.1、CD73.10-IgG2CS和CD73.10-IgG2CS-IgG1.1抑制了体内CD73酶活性。来自用CD73.10-IgG2CS-IgG1.1抗体治疗的小鼠的肿瘤的代表性染色切片显示在图24A-24E中。来自用其他两种抗体治疗的小鼠的肿瘤的染色切片是相似的。CD73的抑制程度与抗体的血清水平相关。因此，与第7天实例相比，在第3天实例中观察到的稍高的CD73活性水平与更低的抗体血清水平相关。

[1044] B.在Calu-6异种移植模型中CD73.4-IgG2.CS.IgG1.1f对CD73酶活性的原位抑制

[1045] 这项实验评估了CD73.4-IgG2.C219S.IgG1.1f在Calu-6异种移植肿瘤模型中抑制CD73的酶活性的能力。

[1046] 将Calu-6肿瘤(25-50mm^3)植入小鼠(Hsd无胸腺裸Foxnlnu，Harlan，6-8周龄)。当植入的肿瘤达到约250mm^3时，给小鼠腹膜内施用0.1、0.3、1、3和10mg/kg单剂量的CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f，以及不相关的全人单克隆抗体(mAb))作为对照。72小时后收获肿瘤并包埋在最佳切割温度(OCT)介质中。

[1047] 将OCT包埋的肿瘤切成5μm-6μm切片，并在室温(RT)下干燥过夜，然后储存在-80℃。将肿瘤切片解冻，使用冷的10％磷酸盐缓冲的福尔马林和丙酮的1:1混合物固定2.5分钟，然后在室温下在含有2mM CaCl2和0.25M蔗糖的50mM Tris-马来酸盐缓冲液(pH 7.4)中预温育1小时。1小时后，去除预温育缓冲液，更换为补充有5mM MnCl2、2mM Pb(NO3)2、2.5％葡聚糖T200、2.5mM左旋咪唑和1mM 5’AMP的相同缓冲液。在37℃下进行1小时的酶反应。用去离子(DI)水冲洗后，将切片与1％(NH4)2S一起温育正好1分钟，然后在DI水中快速冲洗。使用苏木精将切片复染色，脱水，用基于二甲苯的封片剂封片。进行自动图像分析将CD73的酶活性定量。使用来自3DHISTECH Ltd.的Pannoramic MIDI扫描仪扫描所有载玻片。使用Image-Pro软件的Smart Segmentation算法对整个肿瘤切片(不包括坏死区域)进行分析。在多个图像上训练该算法以检测褐色染色(酶活性的指示)、蓝色染色(酶活性缺乏的指示)和背景。一旦设置了算法参数，就分析所有载玻片。该应用程序以像素为单位计算染成褐色的区域和蓝色区域。使用GraphPad Prism分析和绘制数据。

[1048] 与CD73的酶活性相关的深褐色染色表明，Calu-6肿瘤表达高水平的CD73。用3mg/kg和10mg/kg的CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f台疗以剂量依赖性方式抑制了CD73。肿瘤切片的图像分析表明，以3mg/kg给药的CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f抑制了肿瘤中约24％的CD73活性，而10mg/kg的剂量实现了67％的CD73活性抑制(表29和图22E)。在小于3mg/kg的剂量下，仅观察到最小CD73抑制，正如肿瘤边缘上更浅的褐色染色指示；因此，没有进行图像分析。

[1049] 表29:CD73的原位酶活性的定量

[1050]

	对照抗体		3 mg/kg		10 mg/kg	
	%棕色	%蓝色	%棕色	%蓝色	%棕色	%蓝色
肿瘤1	93.36	6.64	79.13	20.87	60.55	39.45
肿瘤2	89.85	10.15	86.05	13.95	41.04	58.96
肿瘤3	96.20	3.80	61.07	38.93	17.14	82.86
肿瘤4	95.90	4.10	82.19	17.81	12.66	87.34
肿瘤5	95.14	4.86	67.50	32.50		
平均	94.09 +/- 2.6	5.91 +/- 2.6	75.19 +/- 10.5	24.81 +/- 10.5	32.85 +/- 22.7	67.15 +/- 22.7

[1051] 由于存在表达小鼠CD73的小鼠基质,即使用10mg/kg的饱和剂量,也未实现Calu-6肿瘤中CD73活性的完全抑制。CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f不与小鼠CD73交叉反应。因此,由小鼠组织(例如,基质、血管)产生的基线CD73活性总是存在于异种移植肿瘤模型中。

[1052] 这些结果表明,CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f以剂量依赖性方式抑制Calu-6肿瘤中CD73的酶活性。然而,由于异种移植肿瘤内存在正常小鼠组织,不能实现CD73活性的完全抑制。

[1053] C.在SNUC1异种移植模型中CD73.4-IgG2.CS.IgG1.1f对CD73酶活性的原位抑制

[1054] 对携带皮下人SNUC1结肠腺癌来源的异种移植肿瘤并且用抗CD73抗体CD73.4IgG2CS-IgG1.1f治疗的小鼠进行与上述相似的实验。在第0天,用1mg/kg、3mg/kg和10mg/kg的CD73.4IgG2CS-IgG1.1f经IP治疗具有SNUC1肿瘤的小鼠。在给药后24小时、48小时、72小时、96小时和168小时收获肿瘤。如上所述进行CD73酶抑制测定。使用Image Pro Premier软件(Media Cybernetics)进行褐色染色的定量。

[1055] 在图24F的线图中提供的结果显示,与对照抗体治疗的小鼠相比,给予抗CD73抗体的动物中CD73活性显著降低,表明抗体在所有个种浓度下都有强烈的CD73酶抑制作用。因此,抗CD73抗体CD73.4IgG2CS-IgG1.1f有效抑制体内CD73酶活性。

[1056] 使用HALO™软件对整个载玻片图像进行的自动图像分析显示,与对应的对照组相比,所有给药组中的酶活性降低范围为70%至96%,在观察到47%降低的一个时间点(1mg/kg,在第96小时)除外。未观察到明显的剂量或时程依赖性。这可能部分归因于CD73.4IgG2CS-IgG1.1f与小鼠CD73(不能完全抑制异种移植系统中的所有CD73酶活性)的交叉反应性的缺乏和在测试的暴露水平下抑制的有效性。

[1057] 结果表明,CD73.4IgG2CS-IgG1.1f抑制了SNU-C1肿瘤中70%至96%的CD73活性。

[1058] 还在4T1同源肿瘤模型中确定了抗CD73抗体对CD73抑制的动力学。在4T1肿瘤细胞注射后第7天注射TY/23(大鼠抗小鼠CD73抗体)或大鼠IgG对照(10mg/kg)。在抗体治疗后第1、2、3、6和7天收集肿瘤、脾、全血和血清。如上所述测量来自指示日期的切片中CD73活性的抑制。代表性肿瘤切片显示在图25A和25B中。数据表明,TY/23抑制了体内CD73活性。

[1059] D.在MC38肿瘤中抗小鼠CD73抗体对CD73酶活性的原位抑制

[1060] 还测定了在施用10mg/kg、20mg/kg或30mg/kg单剂量的抗小鼠CD73抗体之后的不同时间在MC38肿瘤中的体内CD73酶活性的抑制水平。

[1061] 对具有MC38肿瘤的动物给予0mg/kg、10mg/kg、20mg/kg或30mg/kg的抗小鼠CD73抗体,并且测定在24、48、96、168、240、336或504小时后收获的肿瘤中的酶活性。在图像分析后

将酶抑制水平转换成数值。图24G中所示的结果表明在所有3个剂量的抗CD73抗体的酶活性抑制，并且表明在所有三个剂量的抗体施用后该抑制持续了延长的时间。对于所有3个测试剂量，用抗小鼠CD73抗体治疗在给药后的前96小时抑制了CD73活性(图24G)。在后来的时间点观察到剂量依赖性反应，较高剂量的抗体显示对CD73活性的抑制超过336小时，而较低剂量显示对CD73活性的抑制仅为168小时。由此可见，在抗体施用后，抑制持续了较长时间，并且CD73酶活性的抑制水平与血清抗体水平相关。

[1062] 实施例8:表位分仓和基于流式细胞术的交叉阻断

[1063] 使用Octet RED仪器(Pall Fortebio)在25℃下通过Biolayer Interferometry (BLI)进行表位分仓研究。对于这些研究，使用90-180秒负载期将20-30μg/ml hCD73-his捕获到抗五his传感器上。通过允许给定抗体(mAb1)与hCD73-his表面结合达180秒、然后立即暴露于二级抗体溶液(mAb2)180秒来评价抗体竞争。将mAb1的预结合后的mAb2结合信号与不存在竞争时的mAb2结合信号进行比较，以确定mAb1和mAb2是否与hCD73-his表面竞争结合。对多个mAb对以两种顺序(mAb1然后mAb2，以及mAb2然后mAb1)进行这些实验，以确立竞争态势和表位仓(如下表30中概述)。

[1064] 如表30中所示，表位分仓分析揭示了2个表位仓。

[1065] 表30.

[1066]

抗体	仓1	仓2
7A11	X	
6E11	X	
11F11	X	
5F8		X

[1067]

4C3		X
11A6		X

[1068] 还对抗体进行了基于流式细胞术的交叉阻断。使用一组荧光标记抗体和第二组未标记抗体如下进行实验:每孔接种100000个NCI-H292细胞。将板旋转并且将细胞重悬于每孔100μL的2%FBS/PBS溶液中。在冰上将细胞封闭20分钟。将如指示的2%FBS/PBS溶液中的未标记抗体添加至每个孔中。将板旋转，并且将细胞重悬于100μL/孔的与FITC缀合的稀释的标记抗体(10μg/mL)即4C3或11F11中。将细胞的6个孔在没有抗体的条件下温育，并且仅将其重悬于100μL 2%FBS/PBS溶液中(用于对照)。然后在冰上将细胞温育30分钟。用2%FBS/PBS溶液将细胞洗涤两次，将样品重悬于140μL 2%FBS/PBS溶液中，并且在FacsCalibur流式细胞仪(Becton Dickinson)上分析。

[1069] 在图26A和B中所示的基于流式细胞术的交叉阻断的结果证实了上文列出的SPR表位分仓数据。例如，7A11与11F11竞争，但4C3则不然。

[1070] 实施例9:通过HDX的表位定位

[1071] 本实施例描述了使用HDX-MS来鉴定CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f所结合的人CD73上的表位。

[1072] 氢/氘交换质谱(HDX-MS)方法通过监测蛋白质主链酰胺氢原子(脯氨酸除外)的氘交换速率和程度来探测溶液中的蛋白质构象和构象动力学。HDX的交换水平取决于蛋白质溶剂可及性和氢键,并且通过MS可以精确测量蛋白质在HDX上的质量增加。当这项技术与酶消化配对时,可解析在肽水平上的结构特征,使得能够区分表面暴露的肽与内部折叠的肽。在表位定位实验中,对抗原和抗原/mAb复合物平行进行氘标记和随后的猝灭实验,然后进行在线胃蛋白酶消化、肽分离和MS分析。

[1073] 在通过HDX-MS进行CD73.4-IgG2-CS-IgG1.1f在CD73中的表位定位之前,进行非氘化实验以生成重组人全长ECD二聚体CD73(12μM)以及重组人CD73与CD73mAb的蛋白质复合物(1:1摩尔比,对于CD73mAb为12μM)的常见胃酶解肽的列表,达到全长ECD CD73的88%的序列覆盖率。在HDX-MS实验中,将将5μL的CD73(SEQ ID NO:99)或CD73与CD73.4-IgG2-CS-IgG1.1f mAb在55μL的D_2O缓冲液(10mM磷酸盐缓冲液,D_2O,pD 7.0)中稀释,以在室温下开始标记反应。使用的CD73蛋白为具有SEQ ID NO:99的糖基化全长二聚体hCD73(也在下文中示出)。反应进行不同的时间:20秒、1分钟、10分钟和240分钟。在每个标记反应期结束时,通过加入猝灭缓冲液(含有4M GdnCl及0.4M TCEP的100mM磷酸盐缓冲液,pH 2.5,1:1,v/v)将反应猝灭,并将50μL猝灭的样品注射到Waters HDX-MS系统中用于分析。在CD73 mAb不存在/存在下监测常见胃酶解肽的氘摄取水平。

[1074] 使用的CD73蛋白具有包含SEQ ID NO:99的氨基酸序列。

[1075] 对CD73中的CD73 mAb的HDX-MS测量表明,CD73.4-IgG2-CS-IgG1.1f mAb识别包含CD73的N端区域中的两个肽区的不连续表位:

[1076] 肽区1(65-83):FTKVQQIRRAEPNVLLLDA(SEQ ID NO:96)

[1077] 肽区2(157-172):LYLPYKVLPVGDEVVG(SEQ ID NO:97)

[1078] 相互作用的三维视图(图27B)显示这两个区域在几何学上接近。相互作用的详细图显示在图27A中。

[1079] 实施例10:与CD73结合的11F11的晶体结构

[1080] 本实施例描述了与CD73(26-336)His结合的11F11的Fab'的晶体结构。

[1081] 使用标准方案从瞬时转染的HEK-293E细胞纯化CD73(26-336)His,并且照原样使用,或通过PNGase F处理去糖基化并浓缩至1.2mg/ml。使用标准方案通过胃蛋白酶消化11F11制备抗体11F11Fab'并且浓缩至1.1mg/ml。

[1082] 通过在4℃下将等体积的去糖基化hCD73(26-336)His和11F11 Fab'温育过夜形成复合物,通过使用GE Superdex 200 26/60柱纯化,并且使用10k MWCO旋转浓缩器浓缩至9.5mg/ml。

[1083] 在坐滴蒸汽扩散实验中使晶体生长,液滴为与0.25μL储藏溶液混合的0.25μL蛋白质。设置了超过7100个的结晶实验。初始晶体引子(lead)小约10μm。优化的晶体的大小为200-300μm。结晶优化包括筛选:添加剂、洗涤剂、沉淀剂、pH、温度和缓冲液类型。允许晶体形成的条件如下:储藏溶液由34%聚丙二醇P400、0.1M Na/K PO4(pH 6.5)和15μM CYMAL-7组成;将结晶实验设置在室温下,然后置于4℃下温育;并且在4℃下温育7天。仅对糖基化的CD73蛋白观察到晶体形成。

[1084] 从结晶滴直接收获晶体且将其直接置于液体N2中。针对内部衍射筛选超过100个晶体。

[1085] 在具有Rayonix MX-33HS高速CCD检测器的SER-CAT束线22ID上使用小束、极小减弱及螺旋数据收集来收集数据。收集在4.1 Å、3.8 Å、3.5 Å以及最后在3.05 Å的数据集。使用程序HKL2000(Otwinowski Z.,Minor W.,Methods in Enzymology 276,307-326(1997))处理并缩放后的数据对于3.04 Å分辨率为96％完整。

[1086] 使用BLAST(Altschul等人(1990)"Basic local alignment search tool."J.Mol.Biol.215:403-410)检索,在RCSB蛋白质数据库中找到CD73N端结构域以及Fc和Fv结构域的最接近模型以待用于分子置换检索:CD73模型来自PDB条目4H1S(Heuts等人,Chembiochem.2012年11月5日;13(16):2384-91)。

[1087] 使用这些模型作为PHASER(McCoy等人,J.Appl.Cryst.(2007).40,658-674)分子置换检索中的起始模型。CD73检索找到在不对称单元中的5个分子。保持CD73固定,利用重链检索模型的检索找到在不对称单元中的2个分子。保持CD73和重链固定,利用轻链的第三PHASER检索也找到在不对称单元中的2个分子。通过叠加五个CD73并使重链与轻链匹配,从这些部分解决方案构建五个完整复合物的复合模型。将其用作BUSTER(Bricogne等人(2011)BUSTER 2.11.6版.Cambridge,United Kingdom:Global Phasing Ltd)精修的起始模型。

[1088] 该模型已经过再拟合和氨基酸改变,以反映11F11序列。该模型经历了大量人工建模和精修。运行了总共五个BUSTER循环来完成精修。27,484个蛋白质原子及24个溶剂分子的最终R-因子为20.59％(自由R因子＝24.58％)。

[1089] 复合物的晶体结构的表示在图28A-D中列出。

[1090] 该晶体结构显示,除一种之外的所有相互作用均来自CDR区中的残基,并且大多数相互作用来自VH结构域,另外两种相互作用来自VL结构域(图28A)。人CD73和11F11Fab'的相互作用残基显示在表31中。

[1091] 表31.

[1092]

CD73残基	相互作用	11F11重链		11F11轻链	
		残基	距离(Å)	残基	距离(Å)
Phe-65	VDW			Ser-30	4.0
				Ser-31	3.5
				Trp-32	3.8
Gln-69	VDW			Trp-32	3.9
Arg-73	VDW			Ser-53	3.8

[1093]

Asn-106	VDW	Tyr-100	3.6		
Ala-107				Trp-32	3.7
Arg-109	H键	Pro-100A	2.8	Tyr-91	3.0
	VDW	Tyr-100	3.4	Trp-32	3.5
				Asn-92	3.5
Tyr-100	H键	Tyr-100	3.0		
Lys-136	VDW	Trp-99	3.3		
		Tyr-100	3.6		
Phe-137	VDW	Trp-99	3.6		
		Tyr-100	3.3		
Pro-138	VDW	Trp-99	3.4		
Lys-162	盐键	Asp-53	2.8		
	VDW	Tyr-52A	3.2		
		Trp-99	3.8		
Leu-164	VDW	Tyr-52A	3.6		
Pro-165	VDW	Asn-31	3.2		
		Tyr-52A	3.6		
		Ser-97	3.5		
Gly-167	H键	Asn-31	2.7		
	VDW	Tyr-32	3.7		
Asp-168	H键	Thr-28	2.9		
	VDW	Asn-31	3.3		
		Phe-27	3.4		
Glu-169	H键	Asn-31	2.9		
Val-170	VDW	Asn-31	3.5		
Ser-319	H键			Ser-67	2.7
				Gly-68	3.0
	VDW			Ser-30	3.8
				Ser-67	3.8
Ile-320	VDW			Ser-30	4.0

[1094] 基于叠加在CD73二聚体(PDB条目4H1S)上的两个CD73(NDT)/11F11复合物的复合结构的模型表明,11F11与CD73上远离二聚体界面的表面结合,这表明Fab不会干扰二聚体

形成。

[1095] 关于CD73/11F11复合物的HDX-MS作图和X射线结果的比较显示它们基本上一致，表明在CD73上的表位(65-83和157-172)相似。然而，X射线结构显示在以下区域中的另外的相互作用(小于6Å)：Met-105至Asp-111(包括H键至Arg-109和Tyr-110)、Lys-135至Pro-139以及Asp-317至Ile-320(包括H键至Ser-319)。

[1096] 实施例11：不同铰链/Fc对抗体/CD73复合物大小的影响

[1097] 如以上实施例中所示，具有IgG2铰链及CH1的抗CD73抗体与具有IgG1铰链的相同抗体相比，可更好地抑制细胞上CD73酶活性且更好地内化。基于此观察结果，以及IgG2铰链比IgG1铰链更具刚性的事实，提出了这样的假说，即在抗原与具有IgG2铰链的抗体之间形成的复合物相对于与具有IgG1铰链的抗体形成的复合物更大。进行了以下实验来分析这个假说。

[1098] 通过SEC-MALS和DLS检查溶液中CD73/抗体复合物的结构和寡聚状态。对于这些研究，将含有IgG1或IgG2恒定区的抗体与重组蛋白以不同摩尔比混合，所述重组蛋白包含：含有C端多组氨酸标签的人CD73全长细胞外结构域(人CD73的氨基酸残基26-546，称为“hCD73-his”)或对应于人CD73的N端结构域的片段(氨基酸残基26-336，称为“N-hCD73-his”)。

[1099] 通过大小排阻色谱偶联在线多角度光散射检测器(SEC-MALS)来检查CD73/抗体复合物的寡聚状态。在缓冲液中在连接至Prominence Shimadzu UFLC的Shodex PROTEIN KW-803柱上进行等度分离，其中缓冲液含有200mM K_2HPO_4、150mM NaCl(pH 6.8)且含有0.02％叠氮化钠(经0.1μm过滤)，以0.5mL/min运行。使用SIL-20AC Prominence Shimadzu自动进样器将样品注射到柱上，并且从串联连接的三个在线检测器获得数据：Prominence SPD-20AD二极管阵列UV/vis分光光度计，其后为Wyatt miniDAWN™ TREOS多角度光散射检测器，再后为Wyatt Optilab T-rEX折射率检测器。收集数据且使用Astra(Wyatt)和Labsolutions(Shimadzu)软件进行分析。

[1100] 在25℃下在Wyatt DynaPro酶标仪上对384孔板进行动态光散射(DLS)研究。实验参数为：每次测量20次获取，每次5秒，并且测量以一式四份记录，报告了平均值和标准偏差。使用Dynamics软件(Wyatt Technologies)中的“正则化”算法拟合强度自相关函数。

[1101] SEC-MALS和DLS的总结提供在图29A和B中。对单独的抗体进行的分析显示了每一抗体的滞留时间(约16-17分钟)、质量(140-150kDa)和流体力学半径(5.0-5.4nm)，均具有单体单克隆抗体的典型特征。hCD73-his蛋白的数据与采取预期的溶液中二聚体结构的蛋白质一致；具体而言，根据SEC-MALS数据确定的质量(120kDa)与CD73-his二聚体的预期质量(117kDa)一致，而与hCD73-his单体的预期质量(58.5kDa)不一致。N-hCD73的数据与在溶液中为单体的重组N-结构域蛋白一致(SEC-MALS测量的质量＝38kDa，与之相比预期的单体质量＝35.0kDa)，这是符合预期的，因为全长CD73细胞外结构域的负责蛋白质二聚化的区域包含在C端结构域内，而没有N结构域残基的贡献。

[1102] 发现给定抗体与N-hCD73-his的等摩尔混合物在SEC中作为单一种类洗脱，并且具有比单独的抗体或N-hCD73-his更短的保留时间，以及通过DLS测得的更大的流体力学半径(Rh)，这符合复合物的形成。MALS数据指示这些复合物的质量为大约210kDa。这符合一个N-hCD73-his分子结合于给定抗体的两个Fab结构域中的每一个以形成1:2抗体:N-hCD73-his

复合物。

[1103] 抗CD73抗体与hCD73-his二聚体的混合物的SEC-MALS数据显示，该混合物比单独的hCD73-his或抗体更早洗脱，提示形成了复合物。比较含有相同可变区但含有不同恒定结构域的mAb的数据显示，hCD73-his与含有IgG2恒定结构域(IgG2-C219S、IgG2-C219S-IgG1.1f)的mAb的复合物的洗脱时间比hCD73-his与含有IgG1.1f恒定结构域的mAb的复合物的洗脱时间更早。另外，MALS测定的hCD73-his与含有IgG2恒定结构域的mAb的复合物的质量大于hCD73-his与含有IgG1恒定结构域的mAb的复合物的质量。DLS数据进一步显示，hCD73-his与含有IgG2恒定结构域的mAb的复合物的流体力学半径大于hCD73-his与含有IgG1恒定结构域的mAb的复合物的流体力学半径。例如，具有三种不同的恒定区(IgG2-C219S、IgG2-C219S-IgG1.1f或IgG1.1f)的CD73.4的SEC-MALS和DLS数据显示在图30中。在这里可见，相比于hCD73-his与CD73.4-IgG1.1f的复合物，hCD73-his与含有IgG2恒定结构域的CD73.4的复合物具有更短的保留时间(图30A)、更大的流体力学半径(图30B)和更大的MALS测定的质量(图30C)。基于MALS质量，图30D中显示了hCD73-his与抗体之间的复合物的结构和化学计量的示意性模型，其中含有CD73.4-IgG1.1f的复合物主要形成较小的2:2(峰1＝约550kDa)或4:4mAb/CD73二聚体复合物(峰2＝约1300kDa)，而CD73.4-IgG2-C219S或CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f与hCD73-his形成大得多的复合物(＞3000kDa)，无法可信地对其精确结构和化学计量建模。

[1104] 还测试了具有表27中列出的重链恒定区的CD73.4抗体的复合物形成的大小。如图30D中所示，结果表明，相对于具有IgG1 CH1结构域的抗体，用具有IgG2 CH1结构域的抗体形成更高级的复合物。

[1105] 总之，SEC-MALS和DLS数据证明，hCD73-his与含有IgG2铰链和CH1区的抗体(IgG2-C219S或IgG2-C219S-IgG1.1f)形成的复合物比与含有IgG1铰链和CH1区的抗体(IgG1.1f)形成更大的复合物。另外，具有IgG2 CH1结构域的抗体比具有IgG1 CH1结构域的抗体形成更大的复合物。

[1106] 电子显微镜分析证实，与具有IgG1铰链的抗体形成较小的复合物，相比之下，与具有IgG2铰链的抗体形成较大的串状复合物(参见实施例25和图52)。

[1107] 实施例12:IgG2 CH1和铰链区中的某些氨基酸残基在改善抗体介导的CD73内化中的相关性

[1108] 制备具有表32中所示的重链恒定区的抗CD73抗体(CD73.4)，并且如上所述在抗体介导的CD73内化测定中进行测试。

[1109] 表32:与抗CD73可变区融合的重链恒定区

[1110]

描述	构建体	恒定区的SEQ ID NO
IgG2的CH1结构域，其他全部为IgG1。同样，Cys>Ser突变体降低潜在的二硫键异质性：	G2-G1-G1-G1	300
	G2.5-G1-G1-G1	301
IgG1的CH1结构域，其他全部为IgG2.3：	G1-G2.3-G2-G2	302
IgG1中的CH1区与IgG2中的CH1区交换，分开或一起	G1-KRGEGSSNLF	303
	G1-KRGEGS	304
	G1-SNLF	305
	IgG1-ITNDRTPR	306
	G1-SNLFPR	307
IgG2中的CH1区与IgG1中的CH1区交换，分开或一起	G2-RKEGSGNSFL	308
	G2-RKEGSG	309
	G2-NSFL	310
	IgG2-TIDNTRRP	311
	G2-NSFLRP	312
具有IgG2的CH2结构域残基的IgG1：	G1-G1-G2-G1-AY	313

[1111]

	G1-G1-G2-G1-KH	314
具有IgG1的CH2结构域残基的IgG2：	G2-G2.3-G1-G2-KH	315
	G2.5-G2.3-G1-G2-KH	316
	G2-G2.3-G1-G2-AY	317
	G2.5-G2.3-G1-G2-AY	318
在IgG1与IgG2之间交换铰链区：	G1-G2.3-G1-G1-KH	319
	G2-G1-G2-G2-AY	320
	G2.5-G1-G2-G2-AY	321
	G1-G2-G1-G1-AY	322
	G2-G1-G2-G2-KH	323
	G2.5-G1-G2-G2-KH	324
铰链截短	IgG1 – δ铰链	325
	IgG2 – δ铰链	326
	IgG2.5 – δ铰链	327
	IgG1 – δG237	328
	IgG2 – 加G237	329
其他	IgG2.4	330
	IgG2.3/4	331

[1112] 在CD73内化的背景下，图31中所示的结果如提供了以下信息：

[1113] • CH2结构域似乎没有影响，表现在

[1114] oa)在包含具有型式“AY”(具有IgG2铰链ERKCCVECPPCPAPPVAG(SEQID NO:8))的修饰重链恒定区的抗体相对于具有型式“KH”(ERKCCVECPPCPAPELLGG(SEQ ID NO:22))的抗体之间观察到的内化能力差异极少(第5、6和7组)；

[1115] ob)CH2交换与野生型G1或G2相当(第5和第6组)；和

[1116] oc)残基237对内化没有影响：无论是IgG2铰链中添加“G”残基还是IgG1铰链中的C端“G”缺失都没有影响内化(第9组)。

[1117] 这提示CH2结构域不影响内化(即CH2结构域可以来自IgG1或IgG2)；

[1118] • 将IgG1中的第3组(KRGEGSSNLF;KRGEGS;SNLF;ITNDRTPR和SNLFPR)中指示的CH1

区与IgG2的CH1区交.换几乎未提供益处,即内化仍然类似于IgG1;参见第3组);

[1119] • 将IgG2中的第4组(RKEGSGNSFL;RKEGSG;NSFL;TIDNTRRP和NSFLRP)中指示的CH1区与IgG1的CH1区交换具有不同的影响:改变NSFL没有影响,而其他2个区(RKEGSG和RP)有牵涉(参见第4组)。第3组和第4组的结果似乎说明,CH1区和铰链之间存在相互作用,且RKEGSG和RP区比NSFL区更重要;

[1120] • 铰链区影响内化,即IgG2的铰链相对于IgG1的铰链提供更好的内化(参见第7和8组)。另外,具有缺失(G1-δ-铰链)的IgG1相对于IgG1改善了内化。具有缺失(G2-δ-铰链)的IgG2提供了相对于IgG2铰链的相似的内化水平。这表明铰链区影响内化,这种效应被IgG2 CH1增强(G2-G1-G2-G2-AY与G1-G2-G1-G1-AY相当);

[1121] • IgG2.4(C220S)与IgG2.3(C219S)相比具有相似或降低的内化。与单独的IgG2.3或IgG2.4相比,IgG2.3/4(C219S/C220S)的内化大大降低(参见第10组)。这提示具有IgG2铰链和C219S的抗体的内化与具有IgG2铰链和C220S的抗体的内化大致相同,两者均大大优于具有IgG2铰链以及C219S和C220S两者的抗体;

[1122] • 与具有C131的构建体相比,IgG2.5(C131S突变)的内化降低(参见第1、6和7组)。

[1123] 因此,这些结果表明,CH1结构域和铰链两者在抗体介导的CD73内化中都是相关的,并且具有来自这些结构域的IgG2序列的抗体相对于具有来自IgG1的这些区域的抗体具有更好的功效。

[1124] 实施例13:具有IgG2铰链和/或CH1结构域的抗体形成高分子量复合物

[1125] 如实施例11所述,还通过SEC-MALS和DLS实验测试了具有表27中列出的重链恒定区的CD73.4抗体的高分子量复合物的形成。

[1126] 先前测试了本研究的16种抗体中的3种:CD73.4-IgG1.1f、CD73.4-IgG2-C219S(也称为CD73.4-IgG2.3)和CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f(也称为CD73.4-IgG2.3G1.1f-KH)。单独的抗体的SEC-MALS和DLS数据显示了每种抗体的具备单体单克隆抗体典型特征保留时间、质量和流体动力学半径。对于每种抗体(5.5μM)与hCD73-his(5.5μM)的等摩尔复合物,与单独的抗体或hCD73相比,所有复合物均显示出更慢的保留时间,表明复合物的形成。图32A中显示了16种复合物中的每一种的SEC色谱数据的叠加。色谱图数据可分为4个显著的峰,如图32B所示。峰1含有的种类最大,MALS测定的质量提示质量当量大于hCD73-his:mAb 4:4复合的复合物。峰2所含的种类MALS测定的质量提示hCD73-his:mAb 2:2复合的复合物。峰3是一个低信号的次要种类,其中MALS测定的质量提示hCD73-his:mAb约1:1的复合物。峰4对应于单独的mAb的洗脱,其中MALS-测定的质量与游离抗体一致。为了定量每个种类的相对量,将每个色谱图的4个峰整合为峰1(<12.9分钟)、峰2(12.9-15.1分钟)、峰3(15.1-16.7分钟)、峰4(16.7-19.3分钟)。积分还包括了一个额外的积分范围,称为峰5(>19.3分钟),以应对任何低分子量物质,后来发现它们是可忽略的(对于所有复合物,其<3.5%)。来自该积分的每个种类的百分比总结在表33中。所有复合物均含相似的小百分比的峰3(约6-9%),但其他峰的量各有不同。最值得注意的是,所有由hCD73-his与含有来自hIgG1的CH1结构域的抗体之间形成的复合物均具有显著较大百分比的较小复合物(峰2),而含有来自hIgG2的CH1结构域的那些复合物则具有较大百分比的较大复合物(峰1)(表33和图32C)。这提示不仅铰链区,而且CH1结构域也在高级复合物形成中起重要作用。

[1127] 表33:具有修饰的重链恒定区的CD73.4抗体的保留时间

[1128]

	UV%				
	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5
复合物	<12.9 min	12.9-15.1min	15.1-16.7min	16.7-19.3min	>19.3min
CD73.4-IgG2.3 + hCD73-his	37.0	23.8	7.7	28.6	2.9
CD73.4-IgG2.3G1.1f-KH + hCD73-his	36.0	23.8	7.9	29.3	3.0
CD73.4-IgG1.1f + hCD73-his	28.4	36.2	7.4	25.6	2.3
CD73.4-IgG1f + hCD73-his	26.0	36.5	7.5	27.8	2.2
CD73.4-IgG2.3G1-AY + hCD73-his	30.2	24.3	8.1	34.4	3.0
CD73.4-IgG2.3G1-KH + hCD73-his	34.9	23.4	7.9	30.7	3.0
CD73.4-IgG1-G2.3G1-AY + hCD73-his	14.6	29.2	6.4	48.3	1.6
CD73.4-IgG1-G2.3G1-KH + hCD73-his	23.8	32.6	7.0	34.5	2.1
CD73.4-IgG1-δTHT + hCD73-his	28.3	35.4	7.0	26.9	2.4
CD73.4-IgG2.3-加THT + hCD73-his	30.6	24.3	8.3	33.7	3.2
CD73.4-IgG2.3-加GGG + hCD73-his	30.0	23.9	8.2	34.9	2.9
CD73.4-IgG2.5 + hCD73-his	31.7	24.4	8.4	32.5	3.1
CD73.4-IgG2.5G1.1f-KH + hCD73-his	30.7	24.3	8.9	32.7	3.4
CD73.4-IgG2.5G1-AY + hCD73-his	26.3	24.8	8.1	38.3	2.6
CD73.4-IgG2.5G1-KH + hCD73-his	21.4	24.1	7.0	45.6	1.9
CD73.4-IgG2.5-加THT + hCD73-his	32.6	23.5	8.3	32.6	3.0

[1129] 实施例14:具有工程改造的恒定结构域的抗体的Fc受体结合

[1130] 本实施例证明,对于具有包含IgG2的CH1和铰链的修饰的重链恒定区的抗体,当所述抗体含有IgG1的CH2和CH3结构域时,其与FcγR结合。

[1131] 除了通过可变结构域结合抗原之外,抗体还可以通过与恒定结构域的相互作用来接合Fc-γ受体(FcgR)。这些相互作用介导效应子功能,比如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。对于IgG1同种型而言,效应子功能活性高,但对IgG2和IgG4很低或不存在,因为这些同种型对FcgR具有较低的亲和力。另外,可以通过恒定区内的氨基酸残基突变来修饰IgG1的效应子功能,以改变FcgR亲和力和选择性。

[1132] 使用包括Biacore表面等离子体共振(SPR)和Forebio生物层干涉测量法(BLI)的生物传感器技术来研究抗体与FcγR受体(FcγR或FcgR)的结合。在25℃下在Biacore T100仪器(GE Healthcare)上进行SPR研究。使用EDC/NHS将来自鼠抗6xHis抗体的Fab片段以约3000RU的密度固定在CM5传感器芯片上。使用30秒的接触时间通过C端his标签以10μl/min捕获各种带his标签的FcgR(7μg/ml),并且在10mM NaPO4、130mM NaCl、0.05%p20(PBS-T)(pH 7.1)的运行缓冲液中评估1.0μM抗体的结合。用于这些实验的FcgR包括CD64(FcgRI)、CD32a-H131(FcgRIIa-H131)、CD32a-R131(FcgRIIa-R131)、CD32b(FcgRIIb)、CD16a-V158(FcgRIIIa-V158)、CD16b-NA1(FcgRIIIb-NA1)和CD16B-NA2(FcgRIIIb-NA2)。在10mM NaPO4、130mM NaCl、0.05%p20(PBS-T)(pH 7.1)中,在Fortebio Octet RED仪器(Pall,Fortebio)上在25℃进行BLI实验。在蛋白A包被的传感器上从未稀释的表达上清液中捕获抗体,随后与1μM hCD32a-H131、hCD32a-R131、hCD32b、hCD16a-V158或0.1μM hCD64分析物结合。

[1133] 首先，制造含有修饰的IgG1 Fc结构域的抗体，其包含取代S267E(SE)和S267E/L328F(SELF)以及突变P238D、P271G、H268D、A330R、G237D、E233D(称为V4、V7、V8、V9和V12)的各种组合。通过Biacore SPR研究这些抗体的结合，与IgG1f、IgG2.3(IgG2-C219S)和IgG4.1(IgG4-S228P)抗体以及经过工程改造以降低与所有FcgR结合的IgG1.1f进行比较。图33中所示的结果证明了IgG1f、IgG2.3和IgG4.1以及突变的IgG1抗体的预期FcgR结合特性，其包括：对SE和SELF而言的CD32a-H131、CD32a-R131和CD32b结合增加，以及相对于CD32a-H131和CD32a-R131，V4、V7、V8、V9和V12突变体对CD32b的选择性增加，图33。

[1134] 使用下一组构建体将效应子功能构建到本来是效应子功能阴性的IgG2同种型中。对于这项研究，在IgG2.3恒定区或称为IgG2.3G1-AY的IgG2.3/IgG1f杂合体的背景下引入上述突变(表34)。抗体以小规模表达为上清液的形式，并使用Fortebio Octet生物层干涉测量法生物传感器技术测试抗体与FcgR的结合。由于抗体在上清液中以低浓度存在，所以通过使用蛋白A包被的传感器从上清液中捕获抗体，然后在溶液中结合FcgR分析物来进行实验。还包括纯化的上清液对照IgG1f(包括野生型IgG1、SE、P238D、V4和V12抗体)用于比较，并且这些对照抗体中的每一种均显示预期的FcgR结合特性(图34)。IgG2.3抗体也显示出预期的结合特征，仅与CD32a-H131有明显的结合。然而，所有将S267E、L328F、P238D、P271G、H268D、A330R、G237D或E233D突变引入IgG2.3的突变都未能重现相应的工程改造的IgG1 mAb的FcgR亲和力(图34)。相比之下，IgG2.3G1-AY构建体能够完全保留野生型IgG1的FcgR结合特性，同时保留IgG2.3的CH1和铰链区。另外，含有S267E、L328F、P238D、P271G、H268D、A330R、G237D和E233D的所有IgG2.3G1-AY突变体均显示与含有相同突变的IgG1型mAb相当的FcgR结合特性(图34)。这证明，具有IgG2的CH1和铰链区、同时具有与野生型或突变型IgG1的效应子功能的抗体的改造成功了。

[1135] 表34：工程改造的IgG2构建体

[1136]

集合	ID	构建体	序列 ID 号
1	IgG2.3	hHC-IgG2-C219S	268
	IgG2.3-V13	hHC-IgG2-C219S – P238D	332
	IgG2.3-V14	hHC-IgG2-C219S – P238D,P271G	333
	IgG2.3-V15	hHC-IgG2-C219S – P238D,H268D,P271G	334
	IgG2.3-V16	hHC-IgG2-C219S – P238D,P271G,A330R	335
	IgG2.3-V17	hHC-IgG2-C219S – P238D,H268D,P271G,A330R	336
	IgG2.3-V18	hHC-IgG2-C219S – S267E	337
	IgG2.3-V19	hHC-IgG2-C219S – S267E,L328F	338
2	IgG2.3G1	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f	269
	IgG2.3G1-AY-V20	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – P238D	339
	IgG2.3G1-AY-V21	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – P238D,P271G	340

[1137]

	IgG2.3G1-AY-V22	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – P238D,H268D,P271G	341
	IgG2.3G1-AY-V23	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – P238D,P271G,A330R	342
	IgG2.3G1-AY-V24	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – P238D,H268D,P271G,A330R	343
	IgG2.3G1-AY-V25	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – G237D,P238D,H268D,P271G,A330R	344
	IgG2.3G1-AY-V26	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – E233D,G237D,P238D,H268D,P271G,A330R	345
	IgG2.3G1-AY-V27	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – S267E	346
	IgG2.3G1-AY-V28	hHC-IgG2-C219S/hHC-IgG1f – S267E,L328F	347

[1138] 通过如下方式进一步探索这个工程改造策略:产生用IgG2.3G1-AY、IgG2.3G1-AY-S267E(IgG2.3G1-AY-V27)以及IgG2-B型变体(IgG2.5G1-AY和IgG2.5G1-AY-V27)格式化的其他抗体、以及含有IgG1和IgG2恒定结构域的不同组合的其他杂合抗体,并且使用Biacore SPR技术测试这些抗体与抗his Fab捕获的带有his标签的FcgR的结合。与Octet上清液数据一致,SPR数据显示,IgG2.3G1-AY和IgG2.3G1-AY-V27抗体尽管含有A型IgG2抗体(IgG2.3)的CH1和铰链区,但分别具有与IgG1f和IgG1f-S267E相当的FcgR结合特性(表35)。使用

IgG2.5G1-AY和IgG2.5G1-AY-V27抗体也获得相似的数据，证明具有IgG1f或修饰的IgG1f样效应子功能的B型IgG2抗体(含有C131S突变，称为IgG2.5)的工程改造是成功的。具有IgG2.3G1-AY、IgG2.3G1-AY-V27、IgG2.5G1-AY或IgG2.5G1-AY-V27恒定区但可变区不同的其他几种抗体的数据表明，这个工程策略广泛适用于其他抗体，与可变结构域无关(表35)。证明IgG1f样FcgR结合特性的其他构建体包括IgG1-G2.3G1-AY和IgG1δTHT，而几个修饰的恒定区构建体不能保留IgG1f样FcgR结合特性，这些恒定区构建体包括IgG2.3G1-KH、IgG2.5G1-KH、IgG2.3加THT、IgG2.5加THT和IgG2.3加GGG构建体(表35)。

[1139] 表35:1μM抗体与抗his Fab捕获的FcgR-his蛋白结合的R%最大值

[1140]

mAb	hCD64	hCD32a-H131	hCD32a-R131	hCD32b	hCD16a-V158	hCD16B-NA2
mAb8-IgG1f	80%	82%	51%	27%	51%	21%

[1141]

mAb9-IgG1f	70%	33%	19%	4%	28%	10%
CD73.4-IgG1f	65%	46%	26%	6%	43%	17%
CD73.4-IgG1.1f	2%	0%	2%	1%	0%	0%
mAb11-IgG2.3	2%	44%	17%	5%	1%	0%
CD73.4-IgG2.3	3%	48%	11%	1%	1%	0%
mAb6-IgG2.3	3%	66%	14%	3%	1%	0%
mAb4-IgG2.3	1%	39%	6%	1%	1%	0%
mAb5-IgG2.3	6%	100%	30%	4%	3%	0%
mAb12-IgG2.3	2%	39%	7%	1%	1%	0%
mAb13-IgG2.3	2%	40%	7%	1%	1%	0%
mAb11-IgG2.5	0%	40%	13%	3%	0%	-1%
mAb7-IgG2.5	4%	72%	19%	2%	2%	0%
mAb8-IgG2.5	3%	59%	14%	3%	2%	0%
mAb10-IgG2.5	1%	29%	5%	1%	1%	0%
CD73.4-IgG2.5	3%	40%	7%	1%	1%	0%
mAb6-IgG2.5	3%	75%	17%	4%	2%	0%
mAb4-IgG2.5	2%	46%	8%	1%	1%	0%
mAb5-IgG2.5	6%	89%	26%	5%	4%	1%
mAb12-IgG2.5	1%	36%	6%	1%	1%	0%
mAb13-IgG2.5	-2%	39%	4%	-2%	0%	-2%
mAb8-IgG2.3G1-AY	77%	61%	38%	10%	38%	13%
mAb10-IgG2.3G1-AY	67%	23%	14%	4%	24%	8%
CD73.4-IgG2.3G1-AY	65%	38%	20%	5%	38%	14%
mAb7-IgG2.5G1-AY	80%	73%	45%	12%	47%	19%
mAb8-IgG2.5G1-AY	77%	70%	45%	17%	48%	22%
CD73.4-IgG2.5G1-AY	65%	43%	24%	7%	40%	16%
CD73.4-IgG2.3G1-KH	2%	15%	2%	0%	2%	0%
CD73.4-IgG2.5G1- KH	2%	17%	2%	0%	3%	0%
CD73.4-IgG2.3G1.1f-KH	1%	10%	1%	0%	1%	0%
CD73.4-IgG2.5G1.1f-KH	1%	6%	1%	0%	1%	0%
mAb7-IgG2.3G1-AY-V27	84%	68%	92%	76%	26%	7%
mAb8-IgG2.3G1-AY-V27	78%	67%	80%	67%	24%	7%
mAb10-IgG2.3G1-AY-V27	69%	24%	57%	40%	12%	3%
mAb7-IgG2.5G1-AY-V27	81%	74%	89%	84%	32%	9%
mAb8-IgG2.5G1-AY-V27	77%	76%	79%	77%	33%	10%
CD73.4-IgG1-G2.3G1-AY	66%	50%	31%	10%	48%	23%
CD73.4-IgG1-G2.3G1-KH	2%	18%	2%	0%	4%	1%

[1142]

CD73.4-IgG1δTHT	65%	43%	23%	6%	42%	17%
CD73.4-IgG2.3加THT	3%	42%	8%	1%	1%	0%
CD73.4-IgG2.5加THT	2%	34%	7%	1%	1%	0%
CD73.4-IgG2.3加GGG	3%	43%	8%	1%	1%	0%

[1143] 总的来看,这些数据显示,在IgG1中位于在铰链区中的保守的CPPCPAP(SEQ ID NO:380)基序紧邻C端的序列赋予了FcgR介导的效应子功能,而抗体的CH1和铰链上部可以被IgG2或修饰的IgG2序列置换,从而可能将IgG1和修饰的IgG1的效应子功能与含有IgG2 CH1和/或铰链区的抗体的优越的内化或信号转导特性相结合。

[1144] 在另一个系列的实验中,显示CD73抗体CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f未介导体外效应子功能。在使用原代NK细胞作为效应子和表达CD73的Calu-6肿瘤细胞作为靶标的ADCC实验中,CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f在高达3μg/mL的浓度下未诱导靶细胞的杀死,而对照IgG1 CD73 mAb确实诱导了ADCC。在CDC和ADCP实验中(ADCP实验使用原代巨噬细胞作为效应子和Calu-6作为靶),分别高达10μg/mL或1μg/mL的CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f未诱导靶溶解,而对照IgG1 CD73 mAb确实诱导了溶解。这些结果证明,CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f缺乏Fc效应子功能;因此,当施用于人时,不大可能见到表达CD73的细胞的耗竭。

[1145] 实施例15:抗体内化后抗CD73抗体与溶酶体标志物的共定位

[1146] 本实施例显示了在将抗CD73 Ab内化到Calu6细胞中后的内化和相关动力学的详细机制。将抗体与早期内体标志物EEA1、晚期内体标志物Rab7和溶酶体标志物Lamp-1共定位。

[1147] 在本实验中,用Alexa fluor647标记的抗CD73抗体11F11、6E11和4C3对Calu6细胞进行脉冲追踪分析。首先将细胞在冰上冷却15分钟,然后在冰上(脉冲)分别与2μg/ml的11F11、6E11和4C3结合30分钟。在30分钟结合后,使用冷介质洗掉未结合的抗体,并且将细胞升至37℃以开始追踪。将内化反应设定在0分钟、15分钟、30分钟、60分钟或120分钟的5个时间点,然后用4%多聚甲醛固定细胞。固定后,将细胞透化并且用内吞标志物抗体抗EEA1、抗Rab7和抗Lamp1(Cell signaling Technologies,MA)在室温下染色一小时,然后用Alexa fluor 488缀合的山羊抗兔二级抗体(Life technologies,IL)进行标记。在具有60X水浸物镜的Opera共焦系统(Pelkin Elmer,MA)上将细胞成像。测量来自抗-73抗体和内吞标志物两者的荧光,并将其表示为直方图格式的共定位系数。

[1148] 在图36A-36C中所示的结果表明,抗CD73抗体11F11与EEA1、Rab7和Lamp-1共定位,并且抗体定位至早期内体的等级顺序与功能和受体消耗数据相符。

[1149] 实施例16:通过肿瘤微阵列在人肿瘤中进行CD73表达概况分析

[1150] 本实施例显示了通过IHC在多组织微阵列(TMA)中用mAb 1D7测定的人肿瘤中的CD73表达水平。

[1151] 对于初始筛选,在包括15种肿瘤类型的多个FFPE(福尔马林固定石蜡包埋的)TMA中进行商业小鼠单克隆抗体(mAb)抗人CD73克隆1D7(Abcam)的免疫组织化学(IHC)。每个肿瘤类型有9到52份样品。TMA购自商业来源。为了检测CD73组织结合,开发了使用Mach 3检测

试剂盒(BioCare Medical)的自动化IHC测定,用于Dako Autostainer Plus平台。简言之,用HIER(热诱导抗原修复)溶液pH 9(Dako)在95℃下进行抗原修复20分钟。将mAb 1D7以1:750稀释并温育60分钟,然后与Mach 3小鼠探针温育20分钟,然后与Mach 3聚合物再温育20分钟。最后,使载玻片与DAB底物-色原体溶液反应6分钟。然后遵循常规组织学程序将载玻片用苏木精复染,脱水,透明化,并且用DePeX覆盖盖玻片。将Dako蛋白阻断剂(block)和FLEX抗体稀释剂分别用作一级抗体的非特异性阻断剂和稀释剂。为了确定CD73的水平,使用半定量评分方法,所述方法捕获肿瘤细胞的表面膜或细胞质上的染色强度(评分为1至3)和频率(评分为1至4)。

[1152] 在图37A和37B中所示的结果表明,CD73在肿瘤细胞的细胞质和表面膜中都表达。在所检查的肿瘤类型中,在甲状腺癌、肝细胞癌、头颈部鳞状细胞癌、胰腺癌、结肠直肠腺癌和子宫内膜癌中的肿瘤细胞的膜染色(图37B)是高的;在非小细胞癌、肾细胞癌和胃癌中为中等;在卵巢腺癌、前列腺癌、膀胱癌、食道鳞状细胞癌和淋巴瘤中是低的;并且在BrC中不表达。

[1153] 实施例17:通过对全组织切片的免疫组织化学确定多种肿瘤类型中的CD73表达

[1154] 本实施例显示了通过在全组织切片上用mAb D7F9A的免疫组织化学(IHC)确定的多种肿瘤类型的肿瘤细胞的表面膜和细胞质中的CD73水平。

[1155] 在来自7个肿瘤类型的常规全尺寸FFPE切片中进行进一步的用兔mAb抗人乙CD73克隆D7F9A(Cell Signaling Technology)的IHC,所述肿瘤类型包括结肠直肠腺癌(CRC)、子宫内膜癌(EC)、甲状腺癌(TC)、头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、非小细胞癌(NSCLC)、卵巢腺癌(OvC)和胰腺癌(PC)。除了NSCLC之外,每个肿瘤类型有30份样品,其中肺腺癌(ADLC)和鳞状细胞癌(SQLC)各自有20份。

[1156] 为了检测CD73组织结合,开发了使用Bond Polymer Refine检测试剂盒(Leica)的自动化IHC测定,用于BondRx平台。简言之,用Bond表位修复溶液2(pH 9)在100℃下进行抗原修复20分钟。将mAb D7F9A稀释至0.5μg/ml并温育60分钟,然后与来自Refine检测试剂盒的聚合物温育30分钟。最后,使载玻片与DAB底物-色原体溶液反应6分钟。然后遵循常规组织学程序将载玻片用苏木精复染,脱水,透明化,并且用DePeX覆盖盖玻片。用补充0.5%人γ球蛋白的Dako蛋白封闭剂或Dako蛋白封闭剂分别用作一级抗体的非特异性封闭剂和稀释剂。为了确定CD73的水平,在光学显微镜下评估捕获肿瘤细胞的表面膜或细胞质上的染色强度(评分为1至3)和频率(评分为1至100)的H评分。

[1157] 在图38A和38B中所示的结果显示了在肿瘤细胞中的膜标记和细胞质标记的相似染色模式。分别使用膜H评分100和50作为高表达和中度表达的截止标准,ADLC、TC、PC和EC显示高表达,CRC和SQLC显示中度表达,并且HNSCC和OvC显示低表达。还发现小部分TIL是CD73阳性的。

[1158] 图39A-39H显示了在每个肿瘤类型的单独的样品中CD73表达的水平。结果显示,即使在平均表达较低水平的CD73的肿瘤中(图38),某些样品也含有高水平的CD73。

[1159] 实施例18:在某些肿瘤类型的肿瘤浸润淋巴细胞上的PD-1水平

[1160] 本实施例显示了在来自结肠腺癌、肾细胞癌和肺腺癌患者中的外周血和肿瘤微环境的T细胞上的PD-1表达频率。简言之,将新鲜肿瘤样品和匹配的外周血针对PD-1、CD8、CD4和Foxp3染色,并通过流式细胞术评估。

[1161] 如下测定外周T细胞和TIL上的PD-1水平。使用Miltenyi解离试剂盒(Miltenyi,目录号130-095-929)将肿瘤组织称重并解离,在RBC裂解缓冲液(Biolegend,目录号420301)中裂解红细胞之后分离外周血细胞。将细胞悬液(来自肿瘤或外周血)在HBSS(无钙,无镁)中洗涤两次,用NIR Viability染料(Molecular Probes by Life Technologies#L34976)染色,用Dulbecco PBS(dPBS)中的人AB血清封闭,并加入到含有抗体混合物的孔中,在黑暗中在冰上温育45分钟。然后用dPBS/BSA/叠氮化钠洗涤细胞两次,固定,并使用FoxP3缓冲液试剂盒(Biolegend目录号421403)透化。针对所有抗体制备荧光扣除(FMO)对照并用于确定阳性细胞群。在BD Fortessa流式细胞仪(Becton Dickinson)上获取样品,并使用Flowjo X软件(Flowjo)分析数据。

[1162] 在图40中所示的结果表明,PD-1表达的频率在肿瘤浸润性T细胞上较高,在外周T细胞上较低。具体而言,PD-1在肿瘤中的CD8+ T细胞、CD4+FoxP3-和CD4+FoxP3+ T细胞上的表达水平高于血液中的表达,并且在测试的三种肿瘤中均被检测到。

[1163] 由此可见,至少基于在结肠腺癌、肾细胞癌和肺腺癌中的高水平的CD73肿瘤表达(通过IHC)和PD-1TIL表达(通过流式细胞术)的存在,CD73拮抗剂和PD-1拮抗剂的联合在这些癌症的治疗中将会有效。

[1164] 实施例19:通过抗CD73抗体和抗PD-1抗体联合治疗抑制体内肿瘤生长

[1165] 在鼠MC38结肠腺癌肿瘤模型中进行实验,以检验抗CD73抗体和抗PD-1抗体联合治疗的抗肿瘤活性。

[1166] 使用的给药方案显示在下表36中。用磷酸盐缓冲盐水(PBS)将用于腹膜内(IP)治疗的给药体积调节至0.2mL。

[1167] 表36.

[1168]

抗体	浓度(mg/mL)	给药体积(mL/小鼠)
小鼠 IgG1 同种型(10 mg/kg)	5.54	0.036
抗 PD-1 mIgG1(10 mg/kg)	6.51	0.03
抗 CD73 mIgG1(5 mg/kg)	11.87	0.008

[1169]

抗 CD73 mIgG1(10 mg/kg)	11.87	0.017
抗 CD73 mIgG1(20 mg/kg)	11.87	0.033

[1170] [a]小鼠抗白喉毒素mAb(igG1同种型对照)

[1171] [b]嵌合抗PD-1 mIgG1

[1172] [c]抗小鼠CD73抗体

[1173] 使用雌性Black 6(B6NTac)小鼠。给小鼠随意提供食物和水。将MC38细胞在具有10%热-灭活胎牛血清(FBS)的达尔伯克改良伊格尔培养(DMEM)中培养。将细胞每2天以1:10分盘。使用1-cm^3注射器和25号半英寸针将每只小鼠的右胁腹皮下植入在0.2mL PBS中的2×10^6个细胞(第0天)。在植入后第7天,根据它们的肿瘤体积将104只小鼠随机分成8组,每组13只小鼠,所述肿瘤体积是使用公式LxWxH/2测量的。在随机化之后,所有组都具有约87mm^3的平均肿瘤体积。在第7、11和14天,IP施用指定的抗小鼠CD73和/或抗小鼠PD-1 mAb

或同种型对照。每周两次测量肿瘤和体重直至研究终止。利用Fowler电子数字卡尺(62379-531型;Fred V.Fowler公司,Newton,MA)以3维测量肿瘤,且使用来自Studylog Systems公司(South San Francisco,CA)的StudyDirector软件以电子方式记录数据。每天检查动物的姿势、理毛行为和呼吸变化,以及嗜睡情况。当肿瘤达到2000mm^{3}终点或表观形成溃疡时对小鼠实施安乐死。

[1174] 如图41A-41D和42A-42D中所示,当抗CD73抗体与抗PD-1抗体联合使用时,在测试的每个抗CD73剂量下观察到肿瘤生长的显著延迟(图42A-42D)。在研究结束时,相比于用各单独的治疗剂治疗的组(抗PD-1抗体组中的2/13和抗CD73抗体组中的0/13),在用抗CD73抗体和抗PD-1抗体联合治疗的组中有更多的小鼠无肿瘤(TF)(在5mg/kg、10mg/kg和20mg/kg组中分别为5/13、4/13和5/13)。

[1175] 由于过早溃疡的高发生率(15%至69%)(大多数在肿瘤植入后第10至20天)和随后的安乐死,未能直接计算出平均肿瘤生长抑制(TGI)。因此,为了评估肿瘤生长抑制和总生存率,如果小鼠在肿瘤植入后27天显示肿瘤溃疡(在第7天开始药物治疗之后约3个肿瘤倍增时间),则排除掉与该小鼠相关的肿瘤生长数据。结果,抗CD73抗体单一疗法组未留下足够的小鼠,而单独的mIgG1抗体、抗PD-1抗体以及抗PD-1抗体+抗CD73抗体组有足够的小鼠(8-13只)留下。因此,仅分析了含有mIgG和抗PD-1抗体的组的TGI和生存率。这些组的中位肿瘤体积显示在图43中。基于在校正初始肿瘤体积之后肿瘤体积对时间曲线下的面积的中位值,计算第27天(在第7天开始药物治疗之后约3个倍增时间)的TGI。抗PD-1抗体组的TGI值为80%,5mg/kg、10mg/kg和20mg/kg的抗CD73抗体+抗PD-1抗体组的TGI值分别为100%、97%和105%。

[1176] 生存率定义为肿瘤大小＜2000mm^{3}且无肿瘤溃疡形成。如图44所示,与mIgG1治疗相比,抗PD-1抗体单一疗法和抗PD-1抗体与抗CD73抗体联合均显示出生存益处。抗-PD-1抗体与5mg/kg或20mg/kg抗CD73抗体的联合治疗均显示出比抗PD-1抗体单一疗法更好的生存。

[1177] 这些结果表明,在分期的MC38同源肿瘤模型中,单独的抗CD73抗体治疗未促进抗肿瘤活性,但当与抗PD-1抗体联合时,观察到肿瘤生长的显著延迟,并且在研究结束时,大约35%的小鼠无肿瘤。抗CD73抗体与抗PD-1无肿瘤小鼠的发生率增加、TGI增加和生存率提高证明了抗体联合的协同作用。

[1178] 抗CD73抗体和抗PD-1Ab的联合在未分期的CT26癌症模型中也具有抗肿瘤功效。简言之,对未分期的CT26肿瘤,每4天以200μg/小鼠(约10mg/kg)单独的CD73抗体TY/23或与抗PD1抗体一起给药共3次。图45A-45D中所示的结果表明,抗CD73和抗PD-1抗体联合比单独任一种抗体具有更强的抗肿瘤作用。

[1179] 实施例20:临床前代谢和药代动力学

[1180] CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f在食蟹猴中单次静脉内(IV)给药后显示出明显的非线性PK,这可能是由于靶点介导的药物处置(target-mediated drug disposition)所致。在剂量为5mg/kg至40mg/kg时,全身总血清清除率(CLT)从0.85mL/h/kg降至0.22mL/h/kg。稳态分布容积(Vss)在不同剂量水平之间相似,范围为0.042L/kg至0.068L/kg,表明CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f主要存在于血管外空间。鉴于具有相似Vss的不同CLT值,在5mg/kg至40mg/kg的剂量范围内,表观终末半衰期(T-HALF)从20小时增加至238小时。

[1181] 在给药期间的大多数猴中,所有剂量的CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f治疗在24小时内导致药理学介导的血清游离可溶性CD73(sCD73)的快速降低。≥1nM浓度的CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f完全抑制了游离血清sCD73(>98%)。相反,施用CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f后,总sCD73的血清浓度增加。总血清sCD73的蓄积可能是由于总sCD73的清除机制的转变所致。在基线水平,总sCD73主要由游离sCD73组成,其通过其自身的清除途径被消除。然而,在施用CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f后,大部分总sCD73都由CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f/sCD73复合物负责,这些复合物可能比单独的sCD73经历更慢的消除。

[1182] 实施例21:CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f对全血中的细胞因子释放没有影响

[1183] 评估了在来自8个供体的人正常全血样品中的由CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f介导的细胞因子释放。评价了一组61种细胞因子,以论述暴露于CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f后免疫细胞活化的潜能。结果显示,与同种型对照相比,向供体血液样品中添加CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f(10μg/mL)未介导可检测水平的细胞因子分泌。这些数据证实了预期的结果,表明CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f不是全血中的细胞的激活剂。这些数据也与在使用干燥棕黄层(dried coat)模式的PBMC的细胞因子释放测定中获得的数据一致,并且表明全血成分在暴露于CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f后未被激活。

[1184] 实施例22:抗人CD73抗体对人CD73受体的占有率的测定

[1185] 材料和方法

[1186] 单克隆抗体和试剂

[1187] 使用小鼠抗人IgG1-PE,克隆IS1112E4.23.20(Miltenyi Biotec,San Diego,CA)直接检测结合的化合物。IgG1同种型-PE(Miltenyi Biotec)用于评估背景结合,并提供计算每个被分析样品的受体占有率的参考。CD3-BV421,克隆UCHT1(BD Biosciences,San Jose,CA);CD4-PerCP/Cy5.5,克隆OKT4(Biolegend);CD8-PE-Cy7,克隆SK1(Biolegend);CD19-APC,克隆HIB 19(Biolegend)用于协助鉴定T细胞亚群和B细胞。小鼠IgG(Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)用于阻止非特异性结合。使用了一种如本文所述的并且包含人IgG2铰链区和人IgG1 FC部分的CD73抗体。IgG2铰链区被设计为促进抗体内化,由此降低CD73的活性水平。将全血样品裂解并固定,然后用BD FACS™裂解溶液(BD Biosciences)进行流式细胞术获取。

[1188] 外周血样品和QC材料

[1189] 将来自正常健康人供体的全血样品抽吸到肝素钠Vacutainers®(BD Biosciences)中。预期来自正常人健康供体的CD73表达在表达水平上与临床试验期间收集的患者样品相似。因此,对于开发和验证,未采集来自患者样品的全血。为了测定验证的目的,在全血样品中掺入多个浓度的CD73抗体。将掺有CD73抗体的样品在37℃温育30分钟,然后在室温下静置直到处理时为止。全血样品用于评估剂量反应、测定内的性能和收集后样品稳定性。在测定验证后,将测定转移至CRO,目的在于分析从参与临床方案的受试者收集的全血样品。处理CD-Chex®Plus Normal(Streck Laboratories,Omaha,NE)(保存的全血样品),各自每日运行以评估测定性能。

[1190] CD73受体占有率实验程序

[1191] 通过直接免疫荧光染色技术将全血或CD-Chex®Plus Normal染色。简言之,将100μL全血或CD-Chex®Plus Normal各自等分至三个12x75mm的管中。将两个等分试样与

10μL本文所述的饱和剂量的CD73抗体(5μL/mL)一起温育,而剩余的等分试样接受10μL的含有0.1%NaN3的PBS。用化合物处理后,从所有等分试样中洗去过量的化合物。然后在冰上用小鼠血清将所有测定管处理10分钟,以将荧光染料缀合的试剂的非特异性结合降低至最低限度。将CD3、CD4、CD8和CD19的荧光染料缀合物加入到所有测定管中,并且在冰上在黑暗中温育30分钟。洗涤所有等分试样,然后裂解,并且用1mL的1 X FACS™裂解溶液在室温下在黑暗中固定10分钟。然后将等分试样离心,倾析,然后重悬于含有0.1%NaN3的PBS中。

[1192] 流式细胞术分析

[1193] 使用贝克顿-迪金森公司(Becton-Dickinson)的Cytometer Setup和Tracking System,每日验证FACSCanto(BD Biosciences)流式细胞仪的最佳性能特征。使用BD补偿珠(BD Biosciences)设定补偿。获得至少3,000个CD19+ B细胞/染色管。

[1194] 应用计算(ApplCalculation)s

[1195] 使用来自每个测定管的测量的平均荧光强度结果,推导出CD73抗体对CD73至靶的受体占有率。

[1196] RO%计算:{[结合的ΔMFI(结合的-同种型)]/[(总的ΔMFI(总体-同种型)]}x100

[1197] 适合目的的验证(fit-for-purpose validation)策略

[1198] 遵照适合目的的生物标志物测定开发和验证模型,验证流式细胞术测定方法。预验证考虑因素包括用于测定的预期用途、测定精度、收集后样品稳定性和质量控制。为了评估测定内精度,全血样品中掺有或未掺0μg/mL、0.0005μg/mL、0.005μg/mL、0.05和5μg/mL的CD73抗体,然后进行三次重复处理。为了确定全血样品稳定性,样品中掺有或未掺CD73抗体,然后使其在室温下静置72小时。每个样品在收集后0、24、48、72小时加以处理。使用CD-Chex®Plus Normal(保存的全血样品)作为质量控制材料,以监测受体占有率测定的免疫表型分型程序。将每批CD-Chex®Plus Normal分析5次以确定95%置信区间,来规定将来的分析性运行。

[1199] 临床试验实施

[1200] 在临床试验中,例如可以将CD73抗体对靶细胞群的CD73的受体占有率用作探索性生物标志物方法。

[1201] 结果

[1202] 为了这种直接检测受体占有率测定,筛选了可商购获得的抗人IgG1-PE。理想的是,推荐将与靶标特异性地结合的抗独特型抗体用于直接检测受体占有率测定。测试抗IgG1-PE的克隆以确定抗体是否能够以剂量依赖性方式识别来自人全血的细胞亚群上的抗CD73抗体。使用三种抗人IgG1-PE抗体(IS1112E.4.23.20、AP10D10和HP6069)进行滴定。为了确定总受体表达水平,用饱和剂量的抗CD73抗体处理全血。另外,未用抗CD73抗体处理全血的等分试样,以确定每种抗体的非特异性结合。选择了克隆IS1112E.4.23.30,因为它与抗CD73抗体结合并且相对于其他抗体候选物具有最佳信噪比(图46)。

[1203] 使用克隆IS1112E.E.23.30,通过用连续稀释浓度的抗CD73抗体处理从正常健康供体收集的全血生成剂量反应曲线(图47)。该数据用于选择针对CRO的额外验证和技术转移的浓度(0μg/mL、0.0005μg/mL、0.005μg/mL、0.05μg/mL和5μg/mL)。从三个正常的健康供体评估测量结果(图48)和推导结果(图49)的测定精度(参见下表)。

[1204]

治疗性治疗	% RO CD4+ T细胞(均值±SD) n=3	% RO CD8+ T细胞(均值±SD) n=3	% RO CD19+ B细胞(均值±SD) n=3
0 μg/mL	6.7 ± 2.4	1.0 ± 1.4	3.0 ± 3.3
0.0005 μg/mL	14.9 ± 6.1	5.3 ± 4.7	12.9 ± 11.3
0.005 μg/mL	55.1 ± 19.4	40.8 ± 8.6	56.1 ± 2.8
0.05 μg/mL	85.8 ± 21.0	90.1 ± 9.5	85.3 ± 19.3
5 μg/mL	89.9 ± 6.8	97.5 ± 10.0	97.3 ± 15.8

[1205] 接下来,评估收集的全血样品的稳定性以确定收集后的最佳时间,从而对来自临床试验的样品进行受体占有率程序(图50)。基于收集的数据,确定使用在收集后24小时和48小时之间的患者样品最佳地进行该受体占有率测定。进行该测定的考虑因素包括诸如靶细胞群的受体表达水平的变异性、受体占有率结果的变异性以及国内和国际运输物流等因素。

[1206] 鉴定了质量控制材料以辅助验证每日测定性能。CD-Chex Plus是具有长期稳定性的可商购获得的固定全血样品。数据显示了在靶群体上可检测的表面CD73表达,并用于监测受体占有率测定的染色程序(图51)。

[1207] 实施例23:CD73和抗体复合物的电子显微镜成像

[1208] 对具有IgG1或IgG2.C219S恒定区的CD73抗体(CD73.4)与人CD73的复合物进行负染色透射电子显微镜(TEM)成像和2D类平均化分析。简言之,将可溶性全长人CD73和给定抗体在室温下以1:1摩尔比混合1小时,两种组分的终浓度为8.2μM。然后将两个样品用缓冲液以1:20稀释,使用在120keV下操作的FEI Tecnai T12电子显微镜进行成像,所述电子显微镜配备有FEI Eagle 4k x 4k CCD相机。将负染色网格转移到电子显微镜中。以多个尺度获取每个网格的图像以评估样本的总体分布。在以较低放大率识别用于成像的潜在适合的靶区域之后,以67,000x(0.16nm/像素)的标称放大率获取高放大率图像。在-2.5μm至-1.5μm的标称欠焦和约30 e-/Å2的电子剂量下获取图像。

[1209] 图52中提供的图像示例表明,分别利用基于IgG1和IgG2.C219S的抗体形成不同类型的复合物。由包含IgG1恒定结构域的抗体制成的抗原-抗体复合物小于包含IgG2.C219S恒定结构域的抗原-抗体复合物。对于用含有IgG1恒定结构域的抗体制成的复合物,经常观察到的结构之一是直径在约220-350Å之间的环形颗粒,其致密影从一些颗粒上的环的相对端分支出来(图52A和B)。环形颗粒在其构造上的变化为从窄椭圆形到圆形或菱形结构。环形颗粒的特异性选择和2D平均显示它们可能由四个分子组成:两个IgG1和两个CD73二聚体(图52A和B)。看起来每个CD73单体都被IgG1的Fab臂之一结合,由此,当两个IgG1与相同的两个CD73二聚体结合时产生环状复合物。在包含含有IgG1铰链的抗体的环形颗粒的2D平均中出现的另一种主要结构具有钩形,其在尖端具有一个或两个圆形致密影(图52C和D)。这些结构看起来是单个IgG1分子,其中一个或两个CD73二聚体与Fab臂的末端结合(分别为

图52C和D)。

[1210] 含有CD73+IgG2.C219S的抗体样品包含异质颗粒,其具有形成串状结构的倾向(图52F-J)。所述串状结构可以达到1000-2000Å的长度并且具有包含许多扭折和/或弯曲以及分支致密影的不规则结构。用于2D平均的所有颗粒的选择导致一些小结构,其本身可以是CD73二聚体或IgG2.C219S,但更普遍的是细长结构,其似乎既孤立存在又作为串状结构的结构单元(building block)存在(图52)。

[1211] 实施例24:患者肿瘤样品中的CD73酶抑制

[1212] 在向患者施用抗CD73抗体之前和之后,测量了患者肿瘤样品中的CD73酶活性。CD73酶活性测量如实施例7中所述。

[1213] 图53中所示的结果表明,相对于来自抗CD73抗体施用之前的受试者的肿瘤样品中的CD73酶活性,在给患者施用抗CD73之后从患者获得的肿瘤具CD73酶活性水平更低(至少低2倍,如通过CD73阳性细胞百分比或H评分确定的)。这些结果表明,给受试者施用抗CD73抗体可降低受试者肿瘤中的CD73酶活性。

[1214] 实施例25:具有另外的恒定结构域重链的抗CD73抗体的内化

[1215] 合成了含有具有SEQ ID NO:401-412和421-454之一所示的氨基酸序列的重链恒定区的抗体。这些恒定区中的每一个的描述均提供在本文的序列表中。用CD73.4的可变区合成抗体。

[1216] 将具有包含SEQ ID NO:401-412或421-454的氨基酸序列的重链恒定区的抗CD73抗体进行实施例4中所述的内化测定,并且在第0小时、1小时、4小时和21小时测量内化。

[1217] 在图54和55中所示的结果表明,相对于具有相同的可变结构域但具有野生型IgG2恒定区的抗体,IgG2.3-R217I(即具有R217I和C219S突变的IgG2野生型)在所有3个时间点均提供了增强的抗体内化。结果还证实了铰链和CH1在CD73抗体内化中的作用。Fc区也显示出与FcR结合,正如基于上述实施例中描述的相关恒定区的结合所预期的。

[1218] 实施例26:另外的重链恒定域突变体的合成

[1219] 作为实施例25中描述的结果的后续,还制备并测试了具有SEQ ID NO:457-468的重链恒定区的抗CD73抗体,并且发现其相对于具有IgG1铰链的CD73抗体具有增强的内化。

[1220] 等效形式

[1221] 本领域技术人员使用不超出常规的实验将认识到或能够确定本文所述的具体实施方案的许多等效形式。这样的等效形式预期被下列权利要求涵盖。

[1222] 序列表总结

[1223] 表37.

[1224]

SEQ ID	说明	序列
1	人CD73同种型1	MCPRAARAPA TLLLALGAVL WPAAGAWELT ILHTNDVHSR LEQTSEDSSK CVNASRCMGG VARLFTKVQQ IRRAEPNVLL LDAGDQYQGT IWFTVYKGAE VAHFMNALRY DAMALGNHEFDNGVEGLIEP LLKEAKFPIL SANIKAKGPL ASQISGLYLP YKVLPVGDEV VGIVGYTSKE TPFLSNPGTN LVFEDEITAL QPEVDKLKTL NVNKIIALGH SGFEMDKLIA QKVRGVDVVV GGHSNTFLYT GNPPSKEVPA GKYPFIVTSD DGRKVPVVQA YAFGKYLGYL KIEFDERGNV ISSHGNPILL NSSIPEDPSI KADINKWRIK LDNYSTQELG KTIVYLDGSS QSCRFRECNM GNLICDAMIN NNLRHTDEMF WNHVSMCILN GGGIRSPIDE RNNGTITWEN LAAVLPFGGT FDLVQLKGST LKKAFEHSVH RYGQSTGEFL QVGGIHVVYD LSRKPGDRVV KLDVLCTKCRVPSYDPLKMD EVYKVILPNF LANGGDGFQM IKDELLRHDS GDQDINVVST YISKMKVIYP AVEGRIKFST GSHCHGSFSL IFLSLWAVIF VLYQ
2	人CD73同种型2	MCPRAARAPA TLLLALGAVL WPAAGAWELT ILHTNDVHSR LEQTSEDSSK CVNASRCMGGVARLFTKVQQ IRRAEPNVLL LDAGDQYQGT IWFTVYKGAE VAHFMNALRY DAMALGNHEFDNGVEGLIEP LLKEAKFPIL SANIKAKGPL ASQISGLYLP YKVLPVGDEV VGIVGYTSKETPFLSNPGTN LVFEDEITAL QPEVDKLKTL NVNKIIALGH SGFEMDKLIA QKVRGVDVVVGGHSNTFLYT GNPPSKEVPA GKYPFIVTSD DGRKVPVVQA YAFGKYLGYL KIEFDERGNVISSHGNPILL NSSIPEDPSI KADINKWRIK LDNYSTQELG KTIVYLDGSS QSCRFRECNMGNLICDAMIN NNLRHTDEMF WNHVSMCILN GGGIRSPIDE RNNGIHVVYD LSRKPGDRVVKLDVLCTKCR VPSYDPLKMD EVYKVILPNF LANGGDGFQM IKDELLRHDS GDQDINVVSTYISKMKVIYP AVEGRIKFST GSHCHGSFSL IFLSLWAVIF VLYQ

[1225]

3	食蟹猴CD73	MCPRAARAPA TLLLAVGALL WSAAGAWELT ILHTNDVHSR LEQTSEDSSK CVNASRCMGGVARLFTKVQQ IRRAEPNVLL LDAGDQYQGT IWFTVYKGAE VAHFMNALRY DAMALGNHEFDNGVEGLIEP LLKEAKFPIL SANIKAKGPL ASQISGLYLP YKVLPVGDEV VGIVGYTSKETPFLSNPGTN LVFEDEITAL QPEVDKLKTL NVNKIIALGH SGFETDKLIA QKVRGVDVVVGGHSNTFLYT GNPPSKEVPA GKYPFIVTSD DGRKVPVVQA YAFGKYLGYL KIEFDERGNVISSHGNPILL NSSIPEDPSI KADINKWRIK LDNYSTQELG KTIVYLDGSS QSCRFRECNMGNLICDAMIN NNLRHADEMF WNHVSMCILN GGGIRSPIDE RNNGTITWEN LAAVLPFGGTFDLVQLKGST LKKAFEHSVH RYGQSTGEFL QVGGIHVVYD LSRKPGDRVV KLDVLCTKCRVPSYDPLKMD EIYKVILPNF LANGGDGFQM IKDELLRHDS GDQDINVVST YISKMKVIYPAVEGRIKFST GSHCHGSFSL IFLSFCAVIF VLYQ
4	11F11 VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCATSGFTFSNYG MHWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGGSSWYPDSFDIWGQGTMVTVSS
5	11F11 VH CDR1	NYGMH
6	11F11 VH CDR2	VILYDGSNKYYPDSVKG
7	11F11 VH CDR3	GGSSWYPDSFDI
8	11F11 VK1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGPG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWHLTFGGGT KVEIK
9	11F11 VK1 CDR1	RASQGVSSYLA
10	11F11 VK1 CDR2	DASNRAT
11	11F11 VK1 CDR3	QQRSNWHLT
12	11F11 VK2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLA WYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGT KVEIK
13	11F11 VK2 CDR1	RASQGISSWLA
14	11F11 VK2 CDR2	AASSLQS
15	11F11 VK2 CDR3	QQYNSYPLT
16	4C3 VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGISWKSGSIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCVK GYYVILTGLDYWGQGTLVTVS S
17	4C3 VH CDR1	DYAMH
18	4C3 VH CDR2	GISWKSGSIGYADSVKG
19	4C3 VH CDR3	GYYVILTGLDY

[1226]

20	4C3 VK1	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTK VEIK
21	4C3 VK1 CDR1	RASQSVSSYLAW
22	4C3 VK1 CDR2	ASSRATG
23	4C3 VK1 CDR3	QYGSSPLT
24	4C3 VK2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTFTCRASQGISSWLA WYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGQGT KVEIK
25	4C3 VK2 CDR1	RASQGISSWLA
26	4C3 VK2 CDR2	AASSLQS
27	4C3 VK2 CDR3	QQYNSYPPT
28	4C3 VK3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTFTCRASQGISSWLA WYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGQGT KVEIK
29	4C3 VK3 CDR1	RASQGISSWLA
30	4C3 VK3 CDR2	AASSLQS
31	4C3 VK3 CDR3	QQYNSYPPT
32	4D4 VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG MHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDESNKYYADSV KGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCA RGYNSRWYPDAFDIWGQGTMVT VSS
33	4D4 VH CDR1	NYGMH
34	4D4 VH CDR2	VIWYDESNKYYADSVKG
35	4D4 VH CDR3	GYNSRWYPDAFDI
36	4D4 VK1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLA WYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGT KVEIK
37	4D4 VK1 CDR1	RASQGISSWLA
38	4D4 VK1 CDR2	AASSLQS
39	4D4 VK1 CDR3	QQYNSYPLT
40	10D2 VH1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG LHWVRQAPGKGLEWVAVIRYDGSNKYYADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCA RGGSSWYPDGLDVWGQGTTVTV SS
41	10D2 VH1 CDR1	NYGLH
42	10D2 VH1 CDR2	VIRYDGSNKYYADSVKG
43	10D2 VH1 CDR3	GGSSWYPDGLDV
44	10D2 VK1	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAW YQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPTFGGGTKV EIK
45	10D2 VK1 CDR1	RASQGISSALA
46	10D2 VK1 CDR2	DASSLES
47	10D2 VK1 CDR3	QQFNSYPT

[1227]

48	10D2 VK2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLA WYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGT KVEIK
49	10D2 VK2 CDR1	RASQGISSWLA
50	10D2 VK2 CDR2	AASSLQS
51	10D2 VK2 CDR3	QQYNSYPLT
52	11A6 VH	EVQLVESGGNLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGISWNNNDIGYADSV KGRFIISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTALYYCV KGYYVILTGLDYWGQGTPVTVS S
53	11A6 VH CDR1	DYAMH
54	11A6 VH CDR2	GISWNNNDIGYADSVKG
55	11A6 VH CDR3	GYYVILTGLDY
56	11A6 VK1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLA WYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGT KVEIK
57	11A6 VK1 CDR1	RASQGISSWLA
58	11A6 VK1 CDR2	AASSLQS
59	11A6 VK1 CDR3	QQYNSYPLT
60	24H2 VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG MHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGGNKYYADS VKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYC ARGGSSWYPDAFDIWGQGTMVTV SS
61	24H2 VH CDR1	NYGMH
62	24H2 VH CDR2	VIWYDGGNKYYADSVKG
63	24H2 VH CDR3	GGSSWYPDAFDI
64	24H2 VK1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLA WYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGT KVEIK
65	24H2 VK1 CDR1	RASQGISSWLA
66	24H2 VK1 CDR2	AASSLQS
67	24H2 VK1 CDR3	QQYNSYPLT
68	5F8 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYW MHWVRQAPGKGLVWVSRIISDGSSTGYADSVK GRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR EFSSGWYFDYWGQGTLVTVSS
69	5F8 VH CDR1	SYWMH
70	5F8 VH CDR2	RIISDGSSTGYADSVKG
71	5F8 VH CDR3	EFSSGWYFDY
72	5F8 VK1	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAW YQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQFSSYPRTFGQGTK VEIK
73	5F8 VK1 CDR1	RASQGISSALA
74	5F8 VK1 CDR2	DASSLES

[1228]

75	5F8 VK1 CDR3	QQFSSYPRT
76	5F8 VK2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLA WYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TGFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPRTFGQGT KVEIK
77	5F8 VK2 CDR1	RASQGISSWLA
78	5F8 VK2 CDR2	AASSLQS
79	5F8 VK2 CDR3	QQYNSYPRT
80	6E11 VH	EVQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGITWNSGGIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK DRYYSSWLLFDNWGQGILVTV SS
81	6E11 VH CDR1	DYAMH
82	6E11 VH CDR2	GITWNSGGIGYADSVKG
83	6E11 VH CDR3	DRYYSSWLLFDN
84	6E11 VK1	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSFTFGPGTK VDIK
85	6E11 VK1 CDR1	RASQSVSSSYLA
86	6E11 VK1 CDR2	GASSRAT
87	6E11 VK1 CDR3	QHYGSSFT
88	7A11 VH	EVQLVESGGGLVQTGRSLRLSCAASGFTFDDYA MHWVRQAPGKGLEWVSDISWNSDIIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK DIYGSGSSFFDYWGQGILVTV SS
89	7A11 VH CDR1	DYAMH
90	7A11 VH CDR2	DISWNSDIIGYADSVKG
91	7A11 VH CDR3	DIYGSGSSFFDY
92	7A11 VK1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQYISSWLA WYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYHSYPPTFGQGT RLEIK
93	7A11 VK1 CDR1	RASQYISSWLA
94	7A11 VK1 CDR2	AASSLQS
95	7A11 VK1 CDR3	QQYHSYPPT
96	11F11表位#1	FTKVQQIRRAEPNVLLLDA
97	11F11表位#2	LYLPYKVLPVGDEVVG
98	野生型IgG1 CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

[1229]

99	带His标签的CD73	MCPRAARAPATLLLALGAVLWPAAGAWELTIL HTNDVHSRLEQTSEDSSKCVNASRCMGGVARLF TKVQQIRRAEPNVLLLDAGDQYQGTIWFTVYKG AEVAHFMNALRYDAMALGNHEFDNGVEGLIEP LLKEAKFPILSANIKAKGPLASQISGLYLPYKVLP VGDEVVGIVGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEITA LQPEVDKLKTLNVNKIIALGHSGFEMDKLIAQKV RGVDVVVGGHSNTFLYTGNPPSKEVPAGKYPFI VTSDDGRKVPVVQAYAFGKYLGYLKIEFDERGN VISSHGNPILLNSSIPEDPSIKADINKWRIKLDNYS TQELGKTIVYLDGSSQSCRFRECNMGNLICDAMI NNNLRHADETFWNHVSMCILNGGGIRSPIDERN NGTITWENLAAVLPFGGTFDLVQLKGSTLKKAF EHSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDLSRKPGDR VVKLDVLCTKCRVPSYDPLKMDEVYKVILPNFL ANGGDGFQMIKDELLRHDSGDQDINVVSTYISK MKVIYPAVEGRIKHHHHHH
100	11F11(全长重链)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCATSGFTFSNYG MHWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGGSSWYPDSFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFG TQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCP APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP MLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
101	11F11(全长轻链1)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGPG TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWHLTFGGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
102	11F11(全长轻链2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLA WYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
103	4C3(全长重链)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGISWKSGSIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCVK GYYVILTGLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK

[1230]

104	4C3(全长轻链1)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
105	4C3(全长轻链2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTFTCRASQGISSWLA WYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
106	4C3(全长轻链3)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTFTCRASQGISSWLA WYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
107	4D4(全长重链)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG MHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDESNKYYADSV KGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCA RGYNSRWYPDAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSN FGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP MLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
108	4D4(全长轻链1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLA WYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
109	10D2(全长重链)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG LHWVRQAPGKGLEWVAVIRYDGSNKYYADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCA RGGSSWYPDGLDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK

[1231]

110	10D2(全长轻链1)	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAW YQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPTFGGGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
111	10D2(全长轻链2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLA WYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
112	11A6(全长重链)	EVQLVESGGNLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGISWNNNDIGYADSV KGRFIISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTALYYCV KGYYVILTGLDYWGQGTPVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
113	11A6(全长轻链1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLA WYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
114	24H2(全长重链)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG MHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGGNKYYADS VKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYC ARGGSSWYPDAFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSV FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK
115	24H2(全长轻链1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLA WYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC

[1232]

116	5F8(全长重链)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYW MHWVRQAPGKGLVWVSRIISDGSSTGYADSVK GRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR EFSSGWYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
117	5F8(全长轻链1)	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAW YQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCQQFSSYPRTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
118	5F8(全长轻链2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLA WYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TGFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPRTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
119	6E11(全长重链)	EVQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGITWNSGGIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK DRYYSSWLLFDNWGQGILVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
120	6E11(全长轻链1)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSG TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSFTFGPGTK VDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC

[1233]

121	7A11(全长重链)	EVQLVESGGGLVQTGRSLRLSCAASGFTFDDYA MHWVRQAPGKGLEWVSDISWNSDIIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK DIYGSGSSFFDYWGQGILVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
122	7A11(全长轻链1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQYISSWLA WYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYHSYPPTFGQGT RLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
123	铰链C219S	ERKSCVECPPCPAPPVAG
124	IgG2 CH1(野生型)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV
125	IgG1 CH2 + A330S和P331S	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIS KAK
126	人IgG1恒定区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
127	人IgG1恒定区(同种异型变体)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
128	IgG1 CH3 + E356和M358	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK

[1234]

129	IgG1恒定区	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
130	IgG2恒定区	ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVER KCCVECP PCPAPPVAG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STFRVVSVLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
131	人IgG1κ轻链(CL)	RTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
132	重链C端	LSPGK
133	CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f，氨基酸序列	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG MHWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGGSSWYPDSFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFG TQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKSCVECPPCP APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
134	CD73.4-IgG2CS-IgG1.1f，核苷酸序列	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggt ccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgc actgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatat tgtatgatggaagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcacc atctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctga gagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggggcagcagctgg taccctgattcttttgatatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttca gcgtcgaccaagggcccatcggtcttccccctggcgccctgctccaggagc acctccgagagcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttcccc gaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgctctgaccagcggcgtgca caccttcccagctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtgg tgaccgtgccctccagcaacttcggcacccagacctacacctgcaacgtag atcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgcaaatcc tgtgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagtc ttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctg aggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaag ttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccg

[1235]

		cgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgt cctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaa caaagccctcccaagcagcatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggc agccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatg accaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagc gacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactaca agaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaag ctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcc gtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgt ccccgggtaaa
135	CD73.4 VH(氨基酸)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG MHWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGGSSWYPDSFDIWGQGTMVTVSS
136	野生型IgG2铰链	ERKCCVECPPCPAPPVAG
137	野生型IgG1 CH2	PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAK
138	野生型IgG1 CH3	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
139	11F11 VH - 核苷酸序列	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGT GGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAACGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTAT GGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA GGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATTGTATG ATGGAAGTAATAAATACTATCCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTC CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC TGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGT GCGAGAGGGGGCAGCAGCTGGTACCCTGATTC TTTTGATATCTGGGGCCAAGGAACAATGGTCA CCGTCTC TTCA
140	11F11 VK1 - 核苷酸序列	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGGGTGTTAGCAGCTAC TTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGC TCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACA GGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGC AGTGGGCCTGGGACAGACTTCACTCTCACCAT CAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTT ATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCATCTC ACTTTCGGCGG AGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
141	11F11 VK2 - 核苷酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACT GTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA CTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGG TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGC CCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTT GCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCA GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTA TTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCTCTCAC TTTCGGCGG AGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

[1236]

142	4C3 VH - 核苷酸序列	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATG CCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAG GGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAA GAGTGGTAGCATAGGCTATGCGGACTCTGTGA AGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC AAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCT GAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTG TAAAAGGGTATTACGTTATTTTGACTGGCCTTG ACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC TCCTC A
143	4C3 VK1 - 核苷酸序列	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTAC TTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGC TCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCA GGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGC AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCAT CAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGT ATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTC ACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCA AA
144	4C3 VK2 - 核苷酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACT GTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCTTCA CTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGG TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGC CCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTT GCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCA GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTA TTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCTCCAA CGTTCGGCCA GGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
145	4C3 VK3 - 核苷酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACT GTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCTTCA CTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGG TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGC CCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTT GCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCA GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTA TTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCTCCAA CGTTCGGCCA AGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
146	4D4 VH - 核苷酸序列	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGT GGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTAT GGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA GGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATG ATGAAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTC CAAGAACACGCTGTTTCTGCAAATGAACAGCC TGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTATTGT GCGAGAGGGTATAACAGCAGGTGGTACCCTG ATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATG GTCACCGT CTCTTCA

[1237]

147	4D4 VK1 - 核苷酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACT GTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA CTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGG TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGC CCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTT GCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCA GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTA TTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCGCTCA CTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA A
148	10D2 VH1 - 核苷酸序列	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGT GGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTAT GGCCTGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA GGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATACGGTATG ATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTC CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAGCAGCC TGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGT GCGAGGGGGGGGCAGCAGCTGGTACCCGGACG GTTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTC ACCGTCTC CTCA
149	10D2 VK1 - 核苷酸序列	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTG TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAC TTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTT TAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCT CCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTG GAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAG TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCA GCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTAT TACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCCACTTTC GGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
150	10D2 VK2 - 核苷酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACT GTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA CTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGG TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGC CCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTT GCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCA GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTA TTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCGCTCA CTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA A
151	11A6 VH - 核苷酸序列	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGGGGAAACTT GGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATG CCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAG GGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAA TAATAATGACATAGGCTATGCGGACTCTGTGA AGGGCCGATTCATCATCTCCAGAGACAACGCC AAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCT GAGACCTGAGGACACGGCCTTGTATTATTGTG TAAAAGGTTATTACGTTATTTTGACTGGTCTTG ACTACTGGGGCCAGGGAACCCCGGTCACCGTC TCCTC A

[1238]

152	11A6 VK1 - 核苷酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACT GTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA CTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGG TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGC CCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTT GCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCA GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTA TTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCGCTCA CTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA A
153	24H2 VH - 核苷酸序列	CAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGT GGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTAT GGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA GGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATG ATGGAGGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTC CAAGAACACGCTGTTTCTGCAAATGAACAGCC TGAGAGCCGAAGACACGGCTGTGTATTACTGT GCGAGAGGGGGCAGCAGCTGGTACCCTGATG CTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTC ACCGTCTC TTCA
154	24H2 VK1 - 核苷酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACT GTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA CTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGG TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGC CCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTT GCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCA GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTA TTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCTCTCAC TTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
155	5F8 VH - 核苷酸序列	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTT AGTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTACT GGATGCACTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAG GGGCTGGTGTGGGTCTCACGTATTATTAGTGA TGGGAGTAGCACAGGTTACGCGGATTCCGTGA AGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCT GAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTG CAAGAGAGTTTAGCAGTGGCTGGTACTTTGAC TACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTC CTCA
156	5F8 VK1 - 核苷酸序列	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTG TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAC TTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTT TAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCT CCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTG GAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAG TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCA GCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTAT TACTGTCAACAGTTTAGTAGTTACCCTCGGAC GTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

[1239]

157	5F8 VK2 - 核苷酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACT GTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA CTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGG TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGC CCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTT GCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCA GTGGATCTGGGACAGGTTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTA TTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCTCGGA CGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA A
158	6E11 VH - 核苷酸序列	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGCCTT GGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATG CCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAG GGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTACTTGGAA TAGTGGTGGCATAGGCTACGCGGACTCTGTGA AGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC AAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCT GAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTG CAAAAGATAGGTATTACAGCAGTTGGCTCCTC TTTGACAACTGGGGCCAGGGAATTCTGGTCAC CGTCTC CTCA
159	6E11 VK1 - 核苷酸序列	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAG TGTATTACTGTCAGCATTATGGTAGCTCATTCA CTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA
160	7A11 VH - 核苷酸序列	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGACTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATG CCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAG GGCCTGGAGTGGGTCTCAGATATTAGTTGGAA TAGTGATATTATAGGCTATGCGGACTCTGTGA AGGGCCGATTCACCATCTCTAGAGACAACGCC AAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCT GAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTG CAAAAGATATTTATGGTTCGGGGAGTTCTTTTT TTGACTACTGGGGCCAGGGAATCCTGGTCACC GTCTC CTCA
161	7A11 VK1 - 核苷酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACT GTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA CTTGTCGGGCGAGTCAGTATATTAGCAGCTGG TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGC CCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTT GCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCA GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTA TTACTGCCAACAGTATCATAGTTACCCTCCCAC CTTCGGCCA AGGGACACGACTGGAGATTAAA

[1240]

162	IgG1-IgG2-IgG1f2 (MHCCR)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERK CCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
163	IgG1-IgG2CS-IgG1f2 (MHCCR)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
164	IgG2-IgG1f2 (MHCCR)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK CCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
165	IgG2CS-IgG1f2 (MHCCR)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
166	IgG1-IgG2-IgG1.1f (MHCCR)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERK CCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1241]

167	IgG1-IgG2CS-IgG1.1f (MHCCR)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
168	IgG2-IgG1.1f (MHCCR)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK CCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
169	IgG2CS-IgG1.1f (MHCCR)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
170	CD73.3 VH(氨基酸)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYA MHWVRQAPGKGLEWVSGISWKSGSIGYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTVLYYCVK GYYVILTGLDYWGQGTLVTVSS
171	CD73.5 VH(氨基酸)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCASSGFTFSNYG MHWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGGSSWYPDSFDIWGQGTMVTVSS
172	CD73.6 VH(氨基酸)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG MHWVRQAPGKGLEWVAVILYDSSNKYYPDSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR GGSSWYPDSFDIWGQGTMVTVSS
173	CD73.7 VH(氨基酸)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCASSGFTFSNYG MHWVRQAPGKGLEWVAVILYDSSNKYYPDSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR GGSSWYPDSFDIWGQGTMVTVSS
174	CD73.8 VH(氨基酸)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG MHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDSSNKYYPDSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGGSSWYPDSFDIWGQGTMVTVSS
175	CD73.9 VH(氨基酸)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCASSGFTFSNYG MHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDSSNKYYPDSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGGSSWYPDSFDIWGQGTMVTVSS
176	CD73.10 VH(氨基酸)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG MHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDESNKYYPDSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RGGSSWYPDSFDIWGQGTMVTVSS

[1242]

177	CD73.11 VH(氨基酸)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYG MHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDESNKYYADSV KGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCA RGYNSRWYPDAFDIWGQGTMVTVSS
178	IgG2/IgG1杂合铰链	ERKCCVECPPCPAPELLGG
179	IgG2 C219S/IgG1杂合铰链	ERKSCVECPPCPAPELLGG
180	IgG1-IgG2-IgG1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERK CCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
181	IgG1-IgG2CS-IgG1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVERK SCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
182	IgG2-IgG1f	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK CCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
183	IgG2CS-IgG1f	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
184	mAb-CD73.3-Vh-hHC-IgG1.1f	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSGISWKSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKGYYVILTGLDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAEGA PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE

[1243]

		MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG
185	mAb-CD73.3-Vh-hHC-IgG2-C219S	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWKSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKGY YVILTGLDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVER KSCVECPPCP APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC KVSNKGLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPMLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPG
186	mAb-CD73.3-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWKSGSIGY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKGY YVILTGLDYW GQGTLVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVDHKPS NTKVDKTVER KSCVECPPCP APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPSS IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPG
187	mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDGSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEAEG APSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
188	mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-C219S	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDGSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV

[1244]

		FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
189	mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f (与SEQ ID NO:133相同，除了缺乏C端赖氨酸之外)	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDGSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
190	mAb-CD73.5-Vh-hHC-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDGSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEAEG APSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
191	mAb-CD73.5-Vh-hHC-IgG2-C219S	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDGSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
192	mAb-CD73.5-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDGSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP

[1245]

		SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
193	mAb-CD73.6-Vh-hHC-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDSSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEAEG APSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
194	mAb-CD73.6-Vh-hHC-IgG2-C219S	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDSSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
195	mAb-CD73.6-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG 1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDSSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
196	mAb-CD73.7-Vh-hHC-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDSSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS

[1246]

		SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEAEG APSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
197	mAb-CD73.7-Vh-hHC-IgG2-C219S	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDSSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
198	mAb-CD73.7-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG 1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV ILYDSSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
199	mAb-CD73.8-Vh-hHC-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDSSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEAEG APSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
200	mAb-CD73.8-Vh-hHC-IgG2-C219S	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDSSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV

[1247]

		KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
201	mAb-CD73.8-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG 1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDSSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
202	mAb-CD73.9-Vh-hHC-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDSSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEAEG APSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
203	mAb-CD73.9-Vh-hHC-IgG2-C219S	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDSSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
204	mAb-CD73.9-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG 1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCASSGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDSSNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS

[1248]

		SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
205	mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDESNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEAEG APSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
206	mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-C219S	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDESNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
207	mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDESNKYY PDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG SSWYPDSFDI WGQGTMVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKSCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG
208	mAb-CD73.11-Vh-hHC-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDESNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED

[1249]

		TAVYYCARGY NSRWYPDAFD IWGQGTMVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKRV EPKSCDKTHT CPPCPAPEAE GAPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSPG
209	mAb-CD73.11-Vh-hHC-IgG2-C219S	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDESNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCARGY NSRWYPDAFD IWGQGTMVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKSCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG
210	mAb-CD73.11-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDESNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCARGY NSRWYPDAFD IWGQGTMVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKSCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG
211	mAb-CD73.3-Vh-hHC-IgG1.1f	gaagtgcagctggtggagtctgggggaggcttggtacagcctggcaggtc cctgagactctcctgtgcagcctctggattcacctttgatgattatgccatgca ctgggtccggcaagctccagggaagggcctggagtgggtctcaggtattag ttggaagagtggtagcataggctatgcggactctgtgaagggccgattcacc atctccagagacaacgccaagaactccctgtatctgcaaatgaacagtctga gagctgaggacacggccttgtattactgtgccaaagggtattacgttattttga ctggccttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcgtc gaccaagggcccctcgtgtttcctctggccccttccagcaagtccacctctg gcggaacagccgctctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagcctg tgaccgtgtcctggaactctggcgccctgacatctggcgtgcacaccttccct gctgtgctgcagtctagcggcctgtactccctgtcctccgtcgtgacagtgcc ctccagctctctgggcacccagacctacatctgcaacgtgaaccacaagcc ctccaacaccaaggtggacaagcgggtggaacccaagtcctgcgacaaga cccatacctgccctccctgccctgctcctgaagctgaaggcgcccctagcgt gttcctgttccctccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccggaccct gaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggacccagaagtgaa gttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagc

[1250]

		ctagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccg tgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtcca acaaggccctgcctagctccatcgaaaagaccatctccaaggctaagggcc agccccgcgagccccaggtgtacacactgcctccatcccgggaagagatg accaagaaccaggtgtccctgacttgcctcgtgaagggcttctaccctccg atatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaactacaag accaccctcccgtgctggactccgacggctcattcttcctgtacagcaagct gacagtggataagtcccggtggcagcaggggaacgtgttctcctgctccgt gatgcacgaggctctgcacaaccactacacacagaagtccctgtctctgtcc cctggc
212	mAb-CD73.3-Vh-hHC-IgG2-C219S	gaagtgcagctggtggagtctgggggaggcttggtacagcctggcaggtc cctgagactctcctgtgcagcctctggattcacctttgatgattatgccatgca ctgggtccggcaagctccagggaagggcctggagtgggtctcaggtattag ttggaagagtggtagcataggctatgcggactctgtgaagggccgattcacc atctccagagacaacgccaagaactccctgtatctgcaaatgaacagtctga gagctgaggacacggccttgtattactgtgccaaagggtattacgttattttga ctggccttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcgtc gaccaagggcccctctgtgtttcctctggccccttgctcccggtccacctctg agtctaccgctgctctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagcctgt gaccgtgtcctggaactctggcgctctgacctccggcgtgcacaccttttcca gccgtgctgcagtcctccggcctgtactctctgtcctccgtcgtgaccgtgcc ctcctccaacttcggcacccagacctacacctgtaacgtggaccacaagcc ctccaacaccaaggtggacaagaccgtggaacggaagtcctgcgtggaat gccctccttgccctgcacctcctgtggctggcccttccgtgttcctgttccccc caaagcccaaggacaccctgatgatctcccggacccccgaagtgacctgc gtggtggtggatgtgtcccacgaggacccccgaggtgcagttcaattggtac gtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaa cagttcaactccaccttccgggtggtgtccgtgctgaccgtggtgcaccagg actggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaagggcctg cctgccccatcgaaaagaccatctccaagacaaagggccagccccgcga gcctcaggtgtacacactgcctcccagccgggaagagatgaccaagaacc aggtgtccctgacctgtctggtcaagggcttctaccctccgatatcgccgtg gaatgggagtccaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccccc ccatgctggactccgacggctcattcttcctgtactccaagctgacagtggac aagtcccggtggcagcagggcaacgtgttctcctgctctgtgatgcacgag gccctgcacaaccactacacccagaagtccctgtccctgagccccggcaa
213	mAb-CD73.3-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	gaagtgcagctggtggagtctgggggaggcttggtacagcctggcaggtc cctgagactctcctgtgcagcctctggattcacctttgatgattatgccatgca ctgggtccggcaagctccagggaagggcctggagtgggtctcaggtattag ttggaagagtggtagcataggctatgcggactctgtgaagggccgattcacc atctccagagacaacgccaagaactccctgtatctgcaaatgaacagtctga gagctgaggacacggccttgtattactgtgccaaagggtattacgttattttga ctggccttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcgtc gaccaagggcccatcggtcttcccctggcgccctgctccaggagcacctc cgagagcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaac cggtgacggtgtcgtggaactcaggcgctctgaccagcggcgtgcacacct tcccagctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacc gtgccctccagcaacttcggcacccagacctacacctgcaacgtagatcac aagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgcaaatcctgtgt cgagtgcccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagtcttcct cttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggt cacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaa ctggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcggg aggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgc accaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaa gccctcccaagcagcatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagcc ccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgacca agaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacat

[1251]

		cgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagacc acgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaagctcac cgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgat gcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtcccc gggtaaa
214	mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggt ccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgc actgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatat tgtatgatggaagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcacc atctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctga gagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggggcagcagctgg taccctgattcttttgatatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttca gcgtcgaccaagggccccctccgtgtttcctctggccccttccagcaagtcca cctctggcggaacagccgctctgggctgcctggtcaaggactacttccccg agcctgtgaccgtgtcctggaactctggcgccctgacatctggcgtgcacac cttccctgctgtgctgcagtctagcggcctgtactccctgtcctccgtcgtgac agtgccctccagctctctgggcacccagacctacatctgcaacgtgaaccac aagccctccaacaccaaggtggacaagcgggtggaacccaagtcctgcga caagacccatacctgccctccctgccctgctcctgaagctgaaggcgcccct agcgtgttcctgttccctccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccgga cccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggacccagaag tgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagacca agcctagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctga ccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgt ccaacaaggccctgcctagctccatcgaaaagaccatctccaaggctaagg gccagccccgcgagccccaggtgtacacactgcctccatcccgggaagag atgaccaagaaccaggtgtccctgacttgcctcgtgaagggcttctaccct ccgatatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaactac aagaccaccctcccgtgctggactccgacggctcattcttcctgtacagca agctgacagtggataagtcccggtggcagcaggggaacgtgttctcctgct ccgtgatgcacgaggctctgcacaaccactacacacagaagtccctgtctct gtccctggc
215	mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-C219S	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggt ccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgc actgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatat tgtatgatggaagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcacc atctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctga gagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggggcagcagctgg taccctgattcttttgatatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttca gcgtcgaccaagggccccctctgtgtttcctctggccccttgctcccggtccac ctctgagtctaccgctgctctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagc ctgtgaccgtgtcctggaactctggcgctctgacctccggcgtgcacaccttt ccagccgtgctgcagtcctccggcctgtactctctgtcctccgtcgtgaccgt gccctcctccaacttcggcacccagacctacacctgtaacgtggaccacaa gccctccaacaccaaggtggacaagaccgtggaacggaagtcctgcgtgg aatgccctccttgccctgcacctcctgtggctggcccttccgtgttcctgttcc ccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccggacccccgaagtgacc tgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggaccccgaggtgcagttcaattggt acgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagagg aacagttcaactccaccttccgggtggtgtccgtgctgaccgtggtgcacca ggactggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaagggcc tgcctgcccccatcgaaaagaccatctccaagacaaagggccagccccgc gagcctcaggtgtacacactgcctcccagccgggaagagatgaccaagaa ccaggtgtccctgacctgtctggtcaagggcttctacccctccgatatcgccg tggaatgggagtccaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccc ccccatgctggactccgacggctcattcttcctgtactccaagctgacagtgg acaagtcccggtggcagcagggcaacgtgttctcctgctctgtgatgcacga

[1252]

		ggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgtccctgagccccggcaaa
216	mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatattgtatgatggaagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggggcagcagctggtaccctgattcttttgatatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggcccatcggtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgctctgaccagcggcgtgcacaccttcccagctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaacttcggcacccagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgcaaatcctgtgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccaagcagcatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtccccgggtaaa
217	mAb-CD73.5-Vh-hHC-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcaagctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatattgtatgatggaagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggggcagcagctggtaccctgattcttttgatatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggcccctccgtgtttcctctggccccttccagcaagtccacctctggcggaacagccgctctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagcctgtgaccgtgtcctggaactctggcgccctgacatctggcgtgcacaccttccctgctgtgctgcagtctagcggcctgtactccctgtcctccgtcgtgacagtgccctccagctctctgggcacccagacctacatctgcaacgtgaaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagcgggtggaacccaagtcctgcgacaagacccatacctgccctccctgccctgctcctgaagctgaaggcgccccctagcgtgttcctgttccctccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggacccagaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcctagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaaggccctgcctagctccatcgaaaagaccatctccaaggctaaggccagccccgcgagccccaggtgtacacactgcctccatcccgggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacttgcctcgtgaagggcttctaccccctccgatatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaactacaagaccacccctcccgtgctggactccgacggctcattcttcctgtacagcaagctgacagtggataagtcccggtggcagcaggggaacgtgttctcctgctccgtgatgcacgaggctctgcacaaccactacacacagaagtccctgtctctgtcccctggc

[1253]

218	mAb-CD73.5-Vh-hHC-IgG2-C219S	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggt ccctgagactctcctgtgcaagctctggattcaccttcagtaactatggcatgc actgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatat tgtatgatggaagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcacc atctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctga gagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggggcagcagctgg taccctgattcttttgatatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttca gcgtcgaccaagggcccctctgtgtttcctctggccccttgctcccggtccac ctctgagtctaccgctgctctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagc ctgtgaccgtgtcctggaactctggcgctctgacctccggcgtgcacacctttt ccagccgtgctgcagtcctccggcctgtactctctgtcctccgtcgtgaccgt gccctcctccaacttcggcacccagacctacacctgtaacgtggaccacaa gccctccaacaccaaggtggacaagaccgtggaacggaagtcctgcgtgg aatgccctccttgccctgcacctcctgtggctggcccttccgtgttcctgttcc ccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccggacccccgaagtgacc tgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggacccgaggtgcagttcaattggt acgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagagg aacagttcaactccaccttccgggtggtgtccgtgctgaccgtggtgcacca ggactggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaagggcc tgcctgccccatcgaaaagaccatctccaagacaaagggccagccccgc gagcctcaggtgtacacactgcctcccagccgggaagagatgaccaagaa ccaggtgtccctgacctgtctggtcaagggcttctacccctccgatatcgccg tggaatgggagtccaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccc ccccatgctggactccgacggctcattcttcctgtactccaagctgacagtgg acaagtcccggtggcagcagggcaacgtgttctcctgctctgtgatgcacga ggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgtccctgagccccggca aa
219	mAb-CD73.5-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggt ccctgagactctcctgtgcaagctctggattcaccttcagtaactatggcatgc actgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatat tgtatgatggaagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcacc atctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctga gagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggggcagcagctgg taccctgattcttttgatatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttca gcgtcgaccaagggcccatcggtcttcccctggcgccctgctccaggagc acctccgagagcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttcccc gaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgctctgaccagcggcgtgca caccttcccagctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtgg tgaccgtgccctccagcaacttcggcacccagacctacacctgcaacgtag atcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgcaaatcc tgtgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagtc ttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctg aggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaag ttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccg cgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgt cctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaa caaagccctcccaagcagcatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggc agccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatg accaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagc gacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactaca agaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaag ctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcc gtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgt ccccgggtaaa
220	mAb-CD73.6-Vh-hHC-IgG1.1f	ggcatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtgg cagttatattgtatgattccagtaataaatactatccagactccgtgaagggcc gattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaac agcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggggcag

[1254]

		cagctggtaccctgattcttttgatatctggggccaaggaacaatggtcaccg tctcttcagcgtcgaccaagggcccctccgtgtttcctctggccccttccagc aagtccacctctggcggaacagccgctctgggctgcctggtcaaggactac ttccccgagcctgtgaccgtgtcctggaactctggcgccctgacatctggcg tgcacaccttccctgctgtgctgcagtctagcggcctgtactccctgtcctccg tcgtgacagtgccctccagctctctgggcacccagacctacatctgcaacgt gaaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagcgggtggaacccaag tcctgcgacaagacccatacctgccctccctgccctgctcctgaagctgaag gcgcccctagcgtgttcctgttcccctccaaagcccaaggacaccctgatgat ctcccggacccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccacgagga cccagaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgc caagaccaagcctagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgt ccgtgctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagt gcaaggtgtccaacaaggccctgcctagctccatcgaaaagaccatctcca aggctaagggccagccccgcgagccccaggtgtacacactgcctccatcc cgggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacttgcctcgtgaaggg cttctaccctccgatatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctga gaacaactacaagaccaccctcccgtgctggactccgacggctcattcttc ctgtacagcaagctgacagtggataagtcccggtggcagcaggggaacgt gttctcctgctccgtgatgcacgaggctctgcacaaccactacacacagaag tccctgtctctgtccctggc
221	mAb-CD73.6-Vh-hHC-IgG2-C219S	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtc cctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgca ctgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatt gtatgattccagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcacca tctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgag agccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggggcagcagctggt accctgattcttttgatatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcag cgtcgaccaagggccccctctgtgtttcctctggccccttgctcccggtccacc tctgagtctaccgctgctctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagcc tgtgaccgtgtcctggaactctggcgctctgacctccggcgtgcacaccttc cagccgtgctgcagtcctccggcctgtactctctgtcctccgtcgtgaccgtg ccctcctccaacttcggcacccagacctacacctgtaacgtggaccacaag ccctccaacaccaaggtggacaagaccgtggaacggaagtcctgcgtgga atgccctccttgccctgcacctcctgtggctggcccttccgtgttcctgttccc cccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccggacccccgaagtgacct gcgtggtggtggatgtgtcccacgaggaccccgaggtgcagttcaattggt acgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagagg aacagttcaactccaccttccgggtggtgtccgtgctgaccgtggtgcacca ggactggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaagggcc tgcctgcccccatcgaaaagaccatctccaagacaaagggccagccccgc gagcctcaggtgtacacactgcctcccagccgggaagagatgaccaagaa ccaggtgtccctgacctgtctggtcaagggcttctacccctccgatatcgccg tggaatgggagtccaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccc ccccatgctggactccgacggctcattcttcctgtactccaagctgacagtgg acaagtcccggtggcagcagggcaacgtgttctcctgctctgtgatgcacga ggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgtccctgagccccggca aa
222	mAb-CD73.6-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtc cctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgca ctgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatt gtatgattccagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcacca tctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgag agccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggggcagcagctggt accctgattcttttgatatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcag cgtcgaccaagggcccatcggtcttccccctggcgccctgctccaggagca cctccgagagcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccg aaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgctctgaccagcggcgtgcac

[1255]

		accttcccagctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggt gaccgtgccctccagcaacttcggcacccagacctacacctgcaacgtaga tcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgcaaatcct gtgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagtct tcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctga ggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagtt caactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgc gggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtc ctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaac aaagccctcccaagcagcatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggca gccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatga ccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcg acatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaa gaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaagc tcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccg tgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtc cccgggtaaa
223	mAb-CD73.7-Vh-hHC-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtc cctgagactctcctgtgcaagctctggattcaccttcagtaactatggcatgca ctgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatt gtatgattccagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcacca tctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgag agccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggggcagcagctggt accctgattcttttgatatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcag cgtcgaccaagggcccctccgtgtttcctctggccccttccagcaagtccac ctctggcggaacagccgctctgggctgcctggtcaaggactacttccccga gcctgtgaccgtgtcctggaactctggcgccctgacatctggcgtgcacacc ttccctgctgtgctgcagtctagcggcctgtactccctgtcctccgtcgtgaca gtgccctccagctctctgggcacccagacctacatctgcaacgtgaaccaca agccctccaacaccaaggtggacaagcgggtggaacccaagtcctgcgac aagacccatacctgccctccctgccctgctcctgaagctgaaggcgccccta gcgtgttcctgttccctccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccggac ccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggacccagaagt gaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagacca agcctagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctga ccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgt ccaacaaggccctgcctagctccatcgaaaagaccatctccaaggctaagg gccagccccgcgagccccaggtgtacacactgcctccatcccgggaagag atgaccaagaaccaggtgtccctgacttgcctcgtgaagggcttctaccct ccgatatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaactac aagaccaccctcccgtgctggactccgacggctcattcttcctgtacagca agctgacagtggataagtcccggtggcagcaggggaacgtgttctcctgct ccgtgatgcacgaggctctgcacaaccactacacacagaagtccctgtctct gtccctggc
224	mAb-CD73.7-Vh-hHC-IgG2-C219S	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtc cctgagactctcctgtgcaagctctggattcaccttcagtaactatggcatgca ctgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatt gtatgattccagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcacca tctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgag agccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggggcagcagctggt accctgattcttttgatatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcag cgtcgaccaagggcccctctgtgtttcctctggccccttgctcccggtccacc tctgagtctaccgctgctctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagcc tgtgaccgtgtcctggaactctggcgctctgacctccggcgtgcacaccttc cagccgtgctgcagtcctccggcctgtactctctgtcctccgtcgtgaccgtg ccctcctccaacttcggcacccagacctacacctgtaacgtggaccacaag

[1256]

		ccctccaacaccaaggtggacaagaccgtggaacggaagtcctgcgtggaatgccctccttgccctgcacctcctgtggctggcccttccgtgttcctgttcccccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccggaccccccgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggacccccgaggtgcagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagaggaacagttcaactccaccttccgggtggtgtccgtgctgaccgtggtgcaccaggactggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaagggcctgcctgcccccatcgaaaagaccatctccaagacaaagggccagccccgcgagcctcaggtgtacacactgcctcccagccgggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctggtcaagggcttctacccctccgatatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccccccatgctggactccgacggctcattcttcctgtactccaagctgacagtggacaagtcccggtggcagcagggcaacgtgttctcctgctctgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgtccctgagccccggcaaa
225	mAb-CD73.7-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcaagctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatattgtatgattccagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggggcagcagctggtaccctgattcttttgatatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggcccatcggtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgctctgaccagcggcgtgcacaccttcccagctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcaacttcggcacccagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgcaaatcctgtgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccaagcagcatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtcccccgggtaaa
226	mAb-CD73.8-Vh-hHC-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatggtatgattccagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggggcagcagctggtaccctgattcttttgatatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttcagcgtcgaccaagggcccctccgtgtttcctctggccccttccagcaagtccacctctggcggaacagccgctctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagcctgtgaccgtgtcctggaactctggcgccctgacatctggcgtgcacaccttccctgctgtgctgcagtctagcggcctgtactccctgtcctccgtcgtgacagtgccctccagctctctgggcacccagacctacatctgcaacgtgaaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagcgggtggaacccaagtcctgcgacaagacccatacctgccctccctgccctgctcctgaagctgaaggcgcccctagcgtgttcctgttccctccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccggaccccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggacccagaag

[1257]

		tgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagacca agcctagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctga ccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgt ccaacaaggccctgcctagctccatcgaaaagaccatctccaaggctaagg gccagccccgcgagccccaggtgtacacactgcctccatcccgggaagag atgaccaagaaccaggtgtccctgacttgcctcgtgaagggcttctaccct ccgatatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaactac aagaccaccctcccgtgctggactccgacggctcattcttcctgtacagca agctgacagtggataagtcccggtggcagcaggggaacgtgttctcctgct ccgtgatgcacgaggctctgcacaaccactacacacagaagtccctgtctct gtcccctggc
227	mAb-CD73.8-Vh-hHC-IgG2-C219S	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtc cctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgca ctgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatat ggtatgattccagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcacc atctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctga gagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggggggcagcagctgg taccctgattcttttgatatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttca gcgtcgaccaagggcccctctgtgtttcctctggccccttgctcccggtccac ctctgagtctaccgctgctctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagc ctgtgaccgtgtcctggaactctggcgctctgacctccggcgtgcacaccttt ccagccgtgctgcagtcctccggcctgtactctctgtcctccgtcgtgaccgt gccctcctccaacttcggcacccagacctacacctgtaacgtggaccacaa gccctccaacaccaaggtggacaagaccgtggaacggaagtcctgcgtgg aatgccctccttgccctgcacctcctgtggctggcccttccgtgttcctgttcc ccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccggacccccgaagtgacc tgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggaccccgaggtgcagttcaattggt acgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagagg aacagttcaactccaccttccgggtggtgtccgtgctgaccgtggtgcacca ggactggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaagggcc tgcctgcccccatcgaaaagaccatctccaagacaaagggccagccccgc gagcctcaggtgtacacactgcctcccagccgggaagagatgaccaagaa ccaggtgtccctgacctgtctggtcaagggcttctacccctccgatatcgccg tggaatgggagtccaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccc ccccatgctggactccgacggctcattcttcctgtactccaagctgacagtgg acaagtcccggtggcagcagggcaacgtgttctcctgctctgtgatgcacga ggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgtccctgagccccggca aa
228	mAb-CD73.8-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtc cctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgca ctgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatat ggtatgattccagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcacc atctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctga gagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggggggcagcagctgg taccctgattcttttgatatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttca gcgtcgaccaagggcccatcggtcttcccctggcgccctgctccaggagc acctccgagagcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttcccc gaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgctctgaccagcggcgtgca caccttcccagctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtgg tgaccgtgccctccagcaacttcggcacccagacctacacctgcaacgtag atcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgcaaatcc tgtgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagtc ttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctg aggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaag ttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccg cgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgt cctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaa caaagccctcccaagcagcatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggc

[1258]

		agccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatg accaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagc gacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactaca agaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaag ctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcc gtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgt ccccgggtaaa
229	mAb-CD73.9-Vh-hHC-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtc cctgagactctcctgtgcaagctctggattcaccttcagtaactatggcatgca ctgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatat ggtatgattccagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcacc atctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctga gagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctgg taccctgattcttttgatatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttca gcgtcgaccaagggcccctccgtgtttcctctggccccttccagcaagtcca cctctggcggaacagccgctctgggctgcctggtcaaggactacttccccg agcctgtgaccgtgtcctggaactctggcgccctgacatctggcgtgcacac cttccctgctgtgctgcagtctagcggcctgtactccctgtcctccgtcgtgac agtgccctccagctctctgggcacccagacctacatctgcaacgtgaaccac aagccctccaacaccaaggtggacaagcgggtggaacccaagtcctgcga caagacccatacctgccctccctgccctgctcctgaagctgaaggcgcccct agcgtgttcctgttccctccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccgga ccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggacccagaag tgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagacca agcctagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctga ccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgt ccaacaaggccctgcctagctccatcgaaaagaccatctccaaggctaagg gccagccccgcgagccccaggtgtacacactgcctccatcccgggaagag atgaccaagaaccaggtgtccctgacttgcctcgtgaagggcttctaccct ccgatatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaactac aagaccaccctcccgtgctggactccgacggctcattcttcctgtacagca agctgacagtggataagtcccggtggcagcaggggaacgtgttctcctgct ccgtgatgcacgaggctctgcacaaccactacacacagaagtccctgtctct gtcccctggc
230	mAb-CD73.9-Vh-hHC-IgG2-C219S	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtc cctgagactctcctgtgcaagctctggattcaccttcagtaactatggcatgca ctgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatat ggtatgattccagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcacc atctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctga gagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctgg taccctgattcttttgatatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttca gcgtcgaccaagggcccctctgtgtttcctctggccccttgctcccggtccac ctctgagtctaccgctgctctgggctgcctggtcaaggactacttccccgagc ctgtgaccgtgtcctggaactctggcgctctgacctccggcgtgcacaccttt ccagccgtgctgcagtcctccggcctgtactctctgtcctccgtcgtgaccgt gccctcctccaacttcggcacccagacctacacctgtaacgtggaccacaa gccctccaacaccaaggtggacaagaccgtggaacggaagtcctgcgtgg aatgccctccttgccctgcacctcctgtggctggcccttccgtgttcctgttcc ccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccggacccccgaagtgacc tgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggacccccgaggtgcagttcaattggt acgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagagg aacagttcaactccaccttccgggtggtgtccgtgctgaccgtggtgcacca ggactggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaagggcc tgcctgcccccatcgaaaagaccatctccaagacaaagggccagccccgc gagcctcaggtgtacacactgcctcccagccgggaagagatgaccaagaa ccaggtgtccctgacctgtctggtcaagggcttctacccctccgatatcgccg tggaatgggagtccaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccc

[1259]

		ccccatgctggactccgacggctcattcttcctgtactccaagctgacagtgg acaagtcccggtggcagcagggcaacgtgttctcctgctctgtgatgcacga ggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgtccctgagccccggca aa
231	mAb-CD73.9-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG 1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtc cctgagactctcctgtgcaagctctggattcaccttcagtaactatggcatgca ctgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatat ggtatgattccagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcacc atctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctga gagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctgg taccctgattcttttgatatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttca gcgtcgaccaagggcccatcggtcttccccctggcgccctgctccaggagc acctccgagagcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttcccc gaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgctctgaccagcggcgtgca caccttcccagctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtgg tgaccgtgccctccagcaacttcggcacccagacctacacctgcaacgtag atcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgcaaatcc tgtgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagtc ttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctg aggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaag ttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccg cgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgt cctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaa caaagccctcccaagcagcatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggc agccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatg accaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagc gacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactaca agaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaag ctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcc gtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgt ccccgggtaaa
232	mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtc cctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgca ctgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatat ggtatgatgagagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcac catctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctg agagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagggggcagcagctg gtaccctgattcttttgatatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttc agcgtcgaccaagggcccctccgtgtttcctctggccccttccagcaagtcc acctctggcggaacagccgctctgggctgcctggtcaaggactacttcccc gagcctgtgaccgtgtcctggaactctggcgccctgacatctggcgtgcaca ccttccctgctgtgctgcagtctagcggcctgtactccctgtcctccgtcgtga cagtgccctccagctctctgggcacccagacctacatctgcaacgtgaacca caagccctccaacaccaaggtggacaagcgggtggaacccaagtcctgcg acaagacccatacctgccctccctgccctgctcctgaagctgaaggcgccc ctagcgtgttcctgttccctccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccgg acccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggacccagaa gtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagacc aagcctagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtgctg accgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggt gtccaacaaggccctgcctagctccatcgaaaagaccatctccaaggctaa gggccagccccgcgagccccaggtgtacacactgcctccatcccgggaa gagatgaccaagaaccaggtgtccctgacttgcctcgtgaagggcttctacc cctccgatatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaacaact acaagaccaccctcccgtgctggactccgacggctcattcttcctgtacag caagctgacagtggataagtcccggtggcagcaggggaacgtgttctcctg ctccgtgatgcacgaggctctgcacaaccactacacacagaagtccctgtct ctgtcccctggc

[1260]

233	mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-C219S	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtc cctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgca ctgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatat ggtatgatgagagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcac catctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctg agagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggggcagcagctg gtaccctgattcttttgatatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttc agcgtcgaccaagggcccctctgtgtttcctctggccccttgctcccggtcca cctctgagtctaccgctgctctgggctgcctggtcaaggactacttccccgag cctgtgaccgtgtcctggaactctggcgctctgacctccggcgtgcacacctt tccagccgtgctgcagtcctccggcctgtactctctgtcctccgtcgtgaccg tgccctcctccaacttcggcacccagacctacacctgtaacgtggaccacaa gccctccaacaccaaggtggacaagaccgtggaacggaagtcctgcgtgg aatgccctccttgccctgcacctcctgtggctggcccttccgtgttcctgttcc ccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccggacccccgaagtgacc tgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggaccccgaggtgcagttcaattggt acgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagagg aacagttcaactccaccttccgggtggtgtccgtgctgaccgtggtgcacca ggactggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaagggcc tgcctgcccccatcgaaaagaccatctccaagacaaagggccagccccgc gagcctcaggtgtacacactgcctcccagccgggaagagatgaccaagaa ccaggtgtccctgacctgtctggtcaagggcttctacccctccgatatcgccg tggaatgggagtccaacggccagcccgagaacaactacaagaccacccc ccccatgctggactccgacggctcattcttcctgtactccaagctgacagtgg acaagtcccggtggcagcagggcaacgtgttctcctgctctgtgatgcacga ggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgtccctgagccccggca aa
234	mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtc cctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgca ctgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatat ggtatgatgagagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcac catctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctg agagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggggcagcagctg gtaccctgattcttttgatatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttc agcgtcgaccaagggcccatcggtcttcccctggcgccctgctccaggag cacctccgagagcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccc cgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgctctgaccagcggcgtgc acaccttcccagctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtg gtgaccgtgccctccagcaacttcggcacccagacctacacctgcaacgta gatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgcaaatc ctgtgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagt cttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccct gaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaa gttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagcc gcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccg tcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctcca acaaagccctcccaagcagcatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggg cagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagat gaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccag cgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactac aagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaa gctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctc cgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccct gtccccgggtaaa
235	mAb-CD73.11-Vh-hHC-IgG1.1f	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtc cctgagactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtaactatggcatgca ctgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatat

[1261]

		ggtatgatgaaagtaataaatactatgcagactccgtgaagggccgattcac catctccagagacaattccaagaacacgctgtttctgcaaatgaacagcctg agagccgaggacacggctgtgtattattgtgcgagagggtataacagcagg tggtaccctgatgcttttgatatctggggccaagggacaatggtcaccgtctct tcagcgtcgaccaagggccccctccgtgtttcctctggccccttccagcaagt ccacctctggcggaacagccgctctgggctgcctggtcaaggactacttcc ccgagcctgtgaccgtgtcctggaactctggcgccctgacatctggcgtgca caccttccctgctgtgctgcagtctagcggcctgtactccctgtcctccgtcgt gacagtgccctccagctctctgggcacccagacctacatctgcaacgtgaa ccacaagccctccaacaccaaggtggacaagcgggtggaacccaagtcct gcgacaagacccatacctgccctccctgccctgctcctgaagctgaaggcg cccctagcgtgttcctgttccctccaaagcccaaggacaccctgatgatctcc cggaccctgaagtgacctgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggaccca gaagtgaagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaag accaagcctagagaggaacagtacaactccacctaccgggtggtgtccgtg ctgaccgtgctgcaccaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgcaa ggtgtccaacaaggccctgcctagctccatcgaaaagaccatctccaaggc taagggccagccccgcgagccccaggtgtacacactgcctccatcccggg aagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacttgcctcgtgaagggcttcta ccctccgatatcgccgtggaatgggagtccaacggccagcctgagaaca actacaagaccaccctcccgtgctggactccgacggctcattcttcctgtac agcaagctgacagtggataagtcccggtggcagcaggggaacgtgttctcc tgctccgtgatgcacgaggctctgcacaaccactacacacagaagtccctgt ctctgtcccctggc
236	mAb-CD73.11-Vh-hHC-IgG2-C219S	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtc cctgagactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtaactatggcatgca ctgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatat ggtatgatgaaagtaataaatactatgcagactccgtgaagggccgattcac catctccagagacaattccaagaacacgctgtttctgcaaatgaacagcctg agagccgaggacacggctgtgtattattgtgcgagagggtataacagcagg tggtaccctgatgcttttgatatctggggccaagggacaatggtcaccgtctct tcagcgtcgaccaagggccccctctgtgtttcctctggccccttgctcccggtc cacctctgagtctaccgctgctctgggctgcctggtcaaggactacttccccg agcctgtgaccgtgtcctggaactctggcgctctgacctccggcgtgcacac ctttccagccgtgctgcagtcctccggcctgtactctctgtcctccgtcgtgac cgtgccctcctccaacttcggcacccagacctacacctgtaacgtggaccac aagccctccaacaccaaggtggacaagaccgtggaacggaagtcctgcgt ggaatgccctccttgccctgcacctcctgtggctggcccttccgtgttcctgtt ccccccaaagcccaaggacaccctgatgatctcccggaccccccgaagtga cctgcgtggtggtggatgtgtcccacgaggaccccgaggtgcagttcaattg gtacgtggacggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcccagagag gaacagttcaactccaccttccgggtggtgtccgtgctgaccgtggtgcacc aggactggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtccaacaagggc ctgcctgccccccatcgaaaagaccatctccaagacaaagggccagccccg cgagcctcaggtgtacacactgcctcccagccgggaagagatgaccaaga accaggtgtccctgacctgtctggtcaagggcttctaccccctccgatatcgcc gtggaatgggagtccaacggccagcccgagaacaactacaagaccaccc ccccccatgctggactccgacggctcattcttcctgtactccaagctgacagtg gacaagtcccggtggcagcagggcaacgtgttctcctgctctgtgatgcac gaggccctgcacaaccactacacccagaagtccctgtccctgagccccgg caaa
237	CD73.4 (VH) - 核苷酸序列	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtc cctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagtaactatggcatgca ctgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatt gtatgatggaagtaataaatactatccagactccgtgaagggccgattcacc atctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctga gagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggggggcagcagctgg

[1262]

		taccctgattcttttgatatctggggccaaggaacaatggtcaccgtctcttca
238	5F8 VK3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWWTFGQGTK VEIK
239	5F8 VK3 CDR1	RASQSVSSYLA
240	5F8 VK3 CDR2	DASNRAT
241	5F8 VK3 CDR3	QQRSNWWT
242	5F8 VK3 - 核苷酸序列	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTT AGTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTACT GGATGCACTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAG GGGCTGGTGTGGGTCTCACGTATTATTAGTGA TGGGAGTAGCACAGGTTACGCGGATTCCGTGA AGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCT GAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTG CAAGAGAGTTTAGCAGTGGCTGGTACTTTGAC TACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTC CTCA
243	11F11(全长重链) - 核苷酸序列	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGT GGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAACGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTAT GGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA GGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATTGTATG ATGGAAGTAATAAATACTATCCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTC CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCC TGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGT GCGAGAGGGGGCAGCAGCTGGTACCCTGATTC TTTTGATATCTGGGGCCAAGGAACAATGGTCA CCGTCTCTTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCG GTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCAC CTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG TCGTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGT GCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAG GACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG CCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACAC CTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGT GTCGAGTGCCCACCGTGCCCAGCACCACCTGT GGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAA AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGC ACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTG CACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT ACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC ACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTT

[1263]

		CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA
244	11F11(全长轻链1) - 核苷酸序列	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGGGTGTTAGCAGCTAC TTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGC TCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACA GGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGC AGTGGGCCTGGGACAGACTTCACTCTCACCAT CAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTT ATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCATCTC ACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCA AACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCT TCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGG TGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG GAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACA GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTG AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCT ACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC TCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
245	11F11(全长轻链2) - 核苷酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACT GTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA CTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGG TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGC CCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTT GCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCA GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTA TTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCTCTCAC TTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC TGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTG GATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGA GAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAG CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGT
246	4C3(全长重链) - 核苷酸序列	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATG CCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAG GGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAA GAGTGGTAGCATAGGCTATGCGGACTCTGTGA AGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC AAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCT GAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTG TAAAAGGGTATTACGTTATTTTGACTGGCCTTG ACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTG

[1264]

		GCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA CGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTC CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAA CTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAAC CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGAC TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACT ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT CTCCGGGTAAA
247	4C3(全长轻链1) - 核苷酸序列	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTAC TTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGC TCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCA GGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGC AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCAT CAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGT ATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTC ACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCA AACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCT TCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGG TGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAG GAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACA GCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTG AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCT ACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC TCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
248	4C3(全长轻链2) - 核苷酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACT GTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCTTCA CTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGG TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGC CCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTT GCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCA GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTA TTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCTCCAA CGTTCGGCCAGGGGACCAAGGTGGAAATCAA ACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT

[1265]

		ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG AGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG CACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA CGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
249	4C3(全长轻链3) - 核苷酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACT GTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCTTCA CTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGG TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGC CCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTT GCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCA GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTA TTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCTCCAA CGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA ACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG AGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG CACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA CGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
250	4D4(全长重链) - 核苷酸序列	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGT GGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTAT GGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA GGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATG ATGAAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTC CAAGAACACGCTGTTTCTGCAAATGAACAGCC TGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTATTGT GCGAGAGGGTATAACAGCAGGTGGTACCCTG ATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATG GTCACCGTCTCTTCAGCCTCCACCAAGGGCCC ATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGA GCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGC CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTCGTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCG GCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC GTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTA CACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATG TTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCCCAGCACCAC CTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACT GGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACA GCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTT GTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGT

[1266]

		ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCA GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT TCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGA CCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGG TAAA
251	4D4(全长轻链1) - 核苷酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACT GTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA CTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGG TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGC CCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTT GCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCA GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTA TTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCGCTCA CTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA ACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG AGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG CACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA CGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
252	10D2(全长重链) - 核苷酸序列	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGT GGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTAT GGCCTGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA GGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATACGGTATG ATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTC CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAGCAGCC TGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGT GCGAGGGGGGGGCAGCAGCTGGTACCCGGACG GTTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTC ACCGTCTCCTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATC CGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCA CCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTG GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT GTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAG GACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG CCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACAC CTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGT CCCCCATGCCCATCATGCCCAGCACCTGAGTT CCTGGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCC AAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGA CCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTG

[1267]

		AGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTG GTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC TGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGT CCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCT GCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT CTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT AAA
253	10D2(全长轻链1) - 核苷酸序列	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTG TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAC TTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTT TAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCT CCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTG GAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAG TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCA GCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTAT TACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCCACTTTC GGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAA CTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGC CATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCC TCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCC AGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATA ACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGT GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCT ACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAA GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCG TCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
254	10D2(全长轻链2) - 核苷酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACT GTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA CTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGG TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGC CCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTT GCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCA GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTA TTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCGCTCA CTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA ACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG AGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG CACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA CGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT

[1268]

255	11A6(全长重链) - 核苷酸序列	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGGGGAAACTT GGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATG CCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAG GGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAA TAATAATGACATAGGCTATGCGGACTCTGTGA AGGGCCGATTCATCATCTCCAGAGACAACGCC AAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCT GAGACCTGAGGACACGGCCTTGTATTATTGTG TAAAAGGTTATTACGTTATTTTGACTGGTCTTG ACTACTGGGGCCAGGGAACCCCGGTCACCGTC TCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTG GCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA CGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTC CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAA CTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAAC CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGAC TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG CCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACT ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT CTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT CTCCGGGTAAA
256	11A6(全长轻链1) - 核苷酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACT GTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA CTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGG TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGC CCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTT GCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCA GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTA TTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCGCTCA CTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA ACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG AGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG CACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA CGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
257	24H2(全长重链) - 核苷酸序列	CAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGT

[1269]

		GGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTAT GGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAA GGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATG ATGGAGGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTG AAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTC CAAGAACACGCTGTTTCTGCAAATGAACAGCC TGAGAGCCGAAGACACGGCTGTGTATTACTGT GCGAGAGGGGGCAGCAGCTGGTACCCTGATG CTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTC ACCGTCTCTTCAGCTTCCACCAAGGGCCCATC CGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCA CCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTG GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT GTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAG GACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG CCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACAC CTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGT CCCCCATGCCCATCATGCCCAGCACCTGAGTT CCTGGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCC AAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGA CCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTG GTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC TGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGT CCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCT GCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT CTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATG CTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT AAA
258	24H2(全长轻链1) - 核苷酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACT GTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA CTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGG TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGC CCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTT GCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCA GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTA TTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCTCTCAC TTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC TGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTG GATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGA GAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAG

[1270]

		CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGT
259	5F8(全长重链) - 核苷酸序列	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCTT AGTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTACT GGATGCACTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAG GGGCTGGTGTGGGTCTCACGTATTATTAGTGA TGGGAGTAGCACAGGTTACGCGGATTCCGTGA AGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGTCT GAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTG CAAGAGAGTTTAGCAGTGGCTGGTACTTTGAC TACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTC CTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGC ACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG TGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACA CCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACA AAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCT GGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCG TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC CCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC ATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGAC CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAA GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTAAA
260	5F8(全长轻链1) - 核苷酸序列	GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTG TCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAC TTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTT TAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCT CCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTG GAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAG TGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCA GCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTAT TACTGTCAACAGTTTAGTAGTTACCCTCGGAC GTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC TGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTG GATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGA GAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAG CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC

[1271]

		GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGT
261	5F8(全长轻链2) - 核苷酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACT GTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA CTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGG TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGC CCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTT GCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCA GTGGATCTGGGACAGGTTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTA TTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCTCGGA CGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA ACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG AGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG CACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA CGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT
262	6E11(全长重链) - 核苷酸序列	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGCCTT GGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATG CCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAG GGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTACTTGGAA TAGTGGTGGCATAGGCTACGCGGACTCTGTGA AGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC AAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCT GAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTG CAAAAGATAGGTATTACAGCAGTTGGCTCCTC TTTGACAACTGGGGCCAGGGAATTCTGGTCAC CGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC CCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGC GGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG GTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT GGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATC TTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCT GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAA AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTC AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTC CTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG

[1272]

		AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAA
263	6E11(全长轻链1) - 核苷酸序列	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCT GTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGC TACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGT GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAG TGTATTACTGTCAGCATTATGGTAGCTCATTCA CTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC TGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTG GATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGA GAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAG CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGT
264	7A11(全长重链) - 核苷酸序列	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTT GGTACAGACTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCT GTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTGATGATTATG CCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAG GGCCTGGAGTGGGTCTCAGATATTAGTTGGAA TAGTGATATTATAGGCTATGCGGACTCTGTGA AGGGCCGATTCACCATCTCTAGAGACAACGCC AAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCT GAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTG CAAAAGATATTTATGGTTCGGGGAGTTCTTTTT TTGACTACTGGGGCCAGGGAATCCTGGTCACC GTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC CCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG TGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT TGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTG AACTCCTGGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA ACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCA GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA CTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC TTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG

[1273]

		TCTCCGGGTAAA
265	7A11(全长轻链1) - 核苷酸序列	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACT GTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA CTTGTCGGGCGAGTCAGTATATTAGCAGCTGG TTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGC CCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTT GCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCA GTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTA TTACTGCCAACAGTATCATAGTTACCCTCCCAC CTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAAC GAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACT GCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGG ATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG AGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCA CCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGC AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCG CCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT GT
266	CD73.4.IgG2C219SIgG1.1f – 替代核苷酸序列	caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt aactatggca tgcactgggt ccgccaggct ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atattgtatg atggaagtaa taaatactat ccagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagggggc agcagctggt accctgattc ttttgatatc tggggccaag gaacaatggt caccgtctct tcagcgtcga ccaagggccc atcggtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc gagagcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg tcgtggaact caggcgctct gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcaactt cggcacccag acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gacagttgag cgcaaatcct gtgtcgagtg cccaccgtgc ccagcaccac ctgtggcagg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccaagc agcatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccccat cccgggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat

[1274]

		cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttcctcta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ccccgggttg a
267	IgG1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
268	IgG2.3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
269	IgG2.3G1-AY	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
270	IgG2.3G1-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
271	IgG2.5	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1275]

272	IgG1.1f	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
273	IgG2.3G1.1f-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
274	IgG1-δTHT	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
275	IgG2.3-加THT	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVETHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
276	IgG2.3-加GGG	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVEGGGCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
277	IgG2.5G1.1f-KH	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE

[1276]

		EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
278	IgG2.5G1-AY	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC CVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
279	IgG2.5G1-KH	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
280	IgG2.5-加THT	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC CVETHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
281	IgG1-G2.3G1-AY	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVERKS CVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
282	IgG1-G2.3G1-KH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVERKS CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
283	来自图27A的CD73	XCPRAARAPATLLLALGAVLWPAAGAWELTILH TNDVHSRLEQTSEDSSKCVNASRCMGGVARLFT KVQQIRRAEPNVLLLDAGDQYQGTIWFTVYKGA EVAHFMNALRYDAMALGNHEFDNGVEGLIEPL LKEAKFPILSANIKAKGPLASQISGLYLPYKVLPV GDEVVGIVGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEITAL

[1277]

		QPEVDKLKTLNVNKIIALGHSGFEMDKLIAQKV RGVDVVVGGHSNTFLYTGNPPSKEVPAGKYPFI VTSDDGRKVPVVQAYAFGKYLGYLKIEFDERGN VISSHGNPILLNSSIPEDPSIKADINKWRIKLDNYS TQELGKTIVYLDGSSQSCRFRECNMGNLICDAMI NNNLRHADETFWNHVSMCILNGGGIRSPIDERN NGTITWENLAAVLPFGGTFDLVQLKGSTLKKAF EHSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDLSRKPGDR VVKLDVLCTKCRVPSYDPLKMDEVYKVILPNFL ANGGDGFQMIKDELLRHDSGDQDINVVSTYISK MKVIYPAVEGRIKHHHHHH
284	铰链区氨基酸	VDKRV
285	铰链区氨基酸	VDKTV
286	铰链区氨基酸	EPKSCDKTHT
287	铰链区氨基酸	ELKTPLGDTTHT
288	铰链区氨基酸	EPKS
289	铰链区氨基酸	ESKYGPP
290	铰链区氨基酸	CPPCP
291	铰链区氨基酸	CCVECPPCP
292	铰链区氨基酸	$CPRCP\ (EPKSCDTPPPCPRCP)_3$
293	铰链区氨基酸	$CPRCP\ (EPKSCDTPPPCPRCP)_2$
294	铰链区氨基酸	$CPRCP\ (EPKSCDTPPPCPRCP)_1$
295	铰链区氨基酸	$CDTPPPCPRCP\ (EPKSCDTPPPCPRCP)_2$
296	铰链区氨基酸	CDTPPPCPRCP
297	铰链区氨基酸	CPSCP
298	铰链区氨基酸	APELLGG
299	铰链区氨基酸	APPVAG
300	G2-G1-G1-G1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
301	G2.5-G1-G1-G1	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
302	G1-G2.3-G2-G2	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE

[1278]

		EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
303	G1-KRGEGSSNLF	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
304	G1-KRGEGS	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
305	G1-SNLF	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
306	IgG1-ITNDRTPR	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
307	G1-SNLFPR	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVERK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
308	G2-RKEGSGNSFL	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC

[1279]

		KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
309	G2-RKEGSG	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
310	G2-NSFL	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
311	IgG2-TIDNTRRP	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
312	G2-NSFLRP	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVEPK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
313	G1-G1-G2-G1-AY	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
314	G1-G1-G2-G1-KH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS

[1280]

		CDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
315	G2-G2.3-G1-G2-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
316	G2.5-G2.3-G1-G2-KH	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKS CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
317	G2-G2.3-G1-G2-AY	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
318	G2.5-G2.3-G1-G2-AY	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKS CVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
319	G1-G2.3-G1-G1-KH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
320	G2-G1-G2-G2-AY	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV

[1281]

		VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
321	G2.5-G1-G2-G2-AY	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
322	G1-G2-G1-G1-AY	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
323	G2-G1-G2-G2-KH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
324	G2.5-G1-G2-G2-KH	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKS CDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
325	IgG1-δ铰链	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
326	IgG2-δ铰链	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP

[1282]

		EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
327	IgG2.5-δ铰链	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
328	IgG1-δG237	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
329	IgG2-加G237	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
330	IgG2.4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK CSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
331	IgG2.3/4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SSVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1283]

332	IgG2.3-V13	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGDSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
333	IgG2.3-V14	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGDSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDGEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
334	IgG2.3-V15	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGDSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSDEDGEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
335	IgG2.3-V16	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGDSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDGEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPRPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
336	IgG2.3-V17	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGDSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSDEDGEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPRPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
337	IgG2.3-V18	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVEHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV

[1284]

		FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
338	IgG2.3-V19	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVEHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGFPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
339	IgG2.3G1-AY-V20	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPELLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
340	IgG2.3G1-AY-V21	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPELLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDGEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
341	IgG2.3G1-AY-V22	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPELLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSDEDGEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
342	IgG2.3G1-AY-V23	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPELLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDGEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPRPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
343	IgG2.3G1-AY-V24	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPELLGGDSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSDEDGEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPRPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ

[1285]

		PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
344	IgG2.3G1-AY-V25	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPELLGDDSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSDEDGEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPRPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
345	IgG2.3G1-AY-V26	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPDLLGDDSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSDEDGEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPRPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
346	IgG2.3G1-AY-V27	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
347	IgG2.3G1-AY-V28	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
348	替代铰链	ERKCCVECPPCPAPPVAG
349	替代铰链	ERKSCVECPPCPAPPVAG
350	替代铰链	ERKCSVECPPCPAPPVAG
351	替代铰链	ERKXCVECPPCPAPPVAG
352	替代铰链	ERKCXVECPPCPAPPVAG
353	替代铰链	ERKCCVECPPCPAPPVAGX
354	替代铰链	ERKSCVECPPCPAPPVAGX
355	替代铰链	ERKCSVECPPCPAPPVAGX
356	替代铰链	ERKXCVECPPCPAPPVAGX
357	替代铰链	ERKCXVECPPCPAPPVAGX
358	替代铰链	ERKCCVECPPCPAPELLGG
359	替代铰链	ERKSCVECPPCPAPELLGG
360	替代铰链	ERKCCSVECPPCPAPELLGG

[1286]

361	替代铰链	ERKXCVECPPCPAPELLGG
362	替代铰链	ERKCXVECPPCPAPELLGG
363	替代铰链	ERKCCVECPPCPAPELLG
364	替代铰链	ERKSCVECPPCPAPELLG
365	替代铰链	ERKCCSVECPPCPAPELLG
366	替代铰链	ERKXCVECPPCPAPELLG
367	替代铰链	ERKCXVECPPCPAPELLG
368	替代铰链	ERKCCVECPPCPAP
369	替代铰链	ERKSCVECPPCPAP
370	替代铰链	ERKCSVECPPCPAP
371	替代铰链	ERKXCVECPPCPAP
372	替代铰链	ERKCXVECPPCPAP
373	铰链的一部分	PVAG
374	铰链的一部分	ELLG
375	铰链的一部分	ELLGG
376	铰链的一部分	SCDKTHT
377	铰链的一部分	CCVE
378	野生型IgG2 CH1结构域	ASTKGPSVFPLAP**C**S**R**STS**ES**TAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSS*NF*GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV
379	IgG2 CH1和铰链	ASTKGPSVFPLAP**C**S**R**STS**ES**TAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSS*NF*GTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK CCVECPPCPAPPVAG
380	铰链的一部分	CPPCPAP
381	纳武单抗的重链可变区	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSG MHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSV KGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCA TNDDYWGQGTLVTVSS
382	纳武单抗的轻链可变区	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTK VEIK
383	纳武单抗的重链CDR1	NSGMH
384	纳武单抗的重链CDR2	VIWYDGSKRYYADSVKG
385	纳武单抗的重链CDR3	NDDY
386	纳武单抗的轻链CDR1	RASQSVSSYLA
387	纳武单抗的轻链CDR2	DASNRAT
388	纳武单抗的轻链CDR2	QQSSNWPRT
389	纳武单抗的重链可变区(核酸序列)	cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc gac tgt aaa gcg tct gga atc acc ttc agt aac tct ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca gtt att tgg tat gat gga agt aaa aga tac tat gca gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg ttt ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aca aac gac gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca
390	纳武单抗的轻链可变区(核酸序列)	gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agt agt tac tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc

[1287]

		atc cca gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag agt agc aac tgg cct cgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa
391	IgG2.3G1-AY-V9-D270E	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPELLGDDSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEEGEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPRPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
392	IgG2.3G1-AY-V11	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPELLGDDSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSDEDGEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPRPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
393	IgG2.5G1-AY-V9-D270E	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC CVECPPCPAPELLGDDSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEEGEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPRPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
394	IgG2.5G1-AY-V11	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC CVECPPCPAPELLGDDSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSDEDGEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPRPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
395	IgG1f-GASDALIE	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1288]

396	IgG1f-G236A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
397	IgG2.3G1-AY-G236A	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
398	IgG2.3G1-AY-GASDALIE	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
399	IgG2.5G1-AY-G236A	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC CVECPPCPAPELLAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
400	IgG2.5G1-AY-GASDALIE	STKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC CVECPPCPAPELLAGPDVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
401	IgG2.3G1.1f-AY	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR

[1289]

		EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
402	IgG2.3G1.3f-AY	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
403	IgG2.3G1-AY-D265A	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
404	IgG2.3G1-AY-N297A	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
405	IgG2.5G1.1f-AY	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC CVECPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
406	IgG2.5G1.3f-AY	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC CVECPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
407	IgG2.5G1-AY-D265A	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC CVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

[1290]

		KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
408	IgG2.5G1-AY-N297A	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC CVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
409	CT	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
410	CTf	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
411	IgG2.3-CT	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVESPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
412	IgG2.5-CT	ASTKGPSVFPLAPSSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKC CVESPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
413	IgG1fa-C226S	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTSPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN

[1291]

		AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
414	IgG1fa-C229S	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
415	IgG1fa-C226S,C229S	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
416	IgG1fa-P238S	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
417	IgG1fa-C226A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTAPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
418	IgG1fa-C229A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPAPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
419	IgG1fa-C226A,C229A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTAPPAPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS

[1292]

		RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
420	IgG1fa-P238K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGKSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
421	IgG2.3-R133K	ASTKGPSVFPLAPCSKSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
422	IgG2.3-E137G	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGSTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
423	IgG2.3-S138G	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSEGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
424	IgG2.3-E137G-S138G	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
425	IgG2.3-T214R	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVERK

[1293]

		SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
426	IgG2.3-R217P	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVEPK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
427	IgG2.3-R217S	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVESK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
428	IgG2.3-V224A	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCAECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
429	IgG2.3-E225A	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVACPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
430	IgG2.3-R133A	ASTKGPSVFPLAPCSASTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
431	IgG2.3-E137D	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSDSTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV

[1294]

		VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
432	IgG2.3-E137Q	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSQSTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
433	IgG2.3-S138T	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSETTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
434	IgG2.3-S138E	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSEETAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
435	IgG2.3-E137A-S138I	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSAITAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKS CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
436	IgG2.3-E137I-S138A	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSIATAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKS CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
437	IgG2.3-R217G	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP

[1295]

		EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVEGK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
438	IgG2.3-R217A	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVEAK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
439	IgG2.3-R217I	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVEIKS CVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
440	IgG2.3-R217E	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVEEK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
441	IgG2.3-R217K	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVEKK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
442	IgG2.3-V224I	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCIECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1296]

443	IgG2.3-E225D	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVDCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
444	IgG2-G4.1-G4-G4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
445	IgG4-G2.3-G2-G2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
446	IgG2-G4.1-G2-G2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
447	IgG4-G2.3-G4-G4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
448	IgG2-G2.3-G4-G4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV

[1297]

		FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
449	IgG4-G4.1-G2-G2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
450	IgG4-G4.1-G1-G1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
451	IgG4.1	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
452	IgG4.1-R214T	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKTVESK YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
453	IgG4.1-S217R	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVERK YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
454	IgG4.1-S217P	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVEPK YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE

[1298]

		NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
455	纳武单抗的重链序列	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSG MHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSV KGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCA TNDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCN VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSLGK
456	纳武单抗的轻链序列	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGT DFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
457	IgG2.3-R217L	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVELK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
458	IgG2.3-R217V	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVEVK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
459	IgG2.3-R217F	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVEFK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
460	IgG2.3-R217M	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVEMK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC

[1299]

		KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
461	IgG2.3-R217H	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVEHK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
462	IgG2.3-R217Y	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVEYK SCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
463	IgG2.3-R217W	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVEW KSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
464	IgG2.3G1-AY-R217I	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVEIKS CVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
465	IgG2.3G1-AY-R217L	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVELK SCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
466	IgG2.3G1-AY-R217V	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVEVK SCVECPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK

[1300]

		TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
467	IgG2.3G1.3f-AY-R217I	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVEIKS CVECPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
468	IgG2.3G1.3f-AY-R217L	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVELK SCVECPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1301] 序列表提供了成熟可变区以及重链和轻链的序列及(序列不包括信号肽)。具有C端赖氨酸的重链序列也可以在没有该赖氨酸(K)或没有GK的情况下使用。

抗-CD73 CD73.4-1 VH

V区段： VH3 / 3-33
D区段： D6 / 6-13
J区段： JH3 / 3

```
                Q   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   V   V   Q   P   G   R   S
1               CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC

                L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   N   Y   G   M
52              CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AAC TAT GGC ATG
                CDR1                                                CDR2
                H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   A   V   I
103             CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA

                L   Y   D   G   S   N   K   Y   Y   P   D   S   V   K   G   R   P
154             TTG TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT CCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC

                T   I   S   R   D   N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S
205             ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC
                                                CDR3
                L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   G   G   S   S
256             CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GGG GGC AGC AGC

                W   Y   P   D   S   F   D   I   W   G   Q   G   T   M   V   T   V
307             TGG TAC CCT GAT TCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGA ACA ATG GTC ACC GTC

                S   S
358             TCT TCA
```

图1A

抗-CD73 CD73.4-1 VK

V 区段: VK3 / L20
J 区段: JK4 / 4

```
                                                
```

抗-CD73 CD73.4-2 VH

V区段： VH3 / 3-33
D区段： D6 / 6-13
J区段： JH3 / 3

```
                                                
```

抗-CD73 CD73.4-2 VK

V区段: VK1 / L15
J区段: JK4 / 4

```
                D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
    1           GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

                                    CDR1                                    CDR2
                R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A
   52           AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

                W   Y   Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A
  103           TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

                S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
  154           TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

                T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
  205           ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

                                    CDR3                                    
                Y   Y   C   Q   Q   Y   N   S   Y   P   L   T   F   G   G   G   T
  256           TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC

                K   V   E   I   K
  307           AAG GTG GAG ATC AAA
```

图2B

抗-CD73 11F11-1 VH

V区段： VH3 / 3-33
D区段： D6 / 6-13
J区段： JH3 / 3

```
                                                
```

抗-CD73 11F11-1 VK

V区段: VK3 / L20
J区段: JK4 / 4

```
                E   I   V   L   T   Q   S   P   A   T   L   S   L   S   P   G   E
1               GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA

                                  CDR1
                R   A   T   L   S   C   R   A   S   Q   G   V   S   S   Y   L   A
52              AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG GGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC

                                                                  CDR2
                W   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   D   A
103             TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA

                ....S   N   R   A   T   G   I   P   A   R   F   S   G   S   G   P   G
154             TCC AAC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG CCT GGG

                T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   E   P   E   D   F   A   V
205             ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT

                                  CDR3
                Y   Y   C   Q   Q   R   S   N   W   H   L   T   F   G   G   G   T
256             TAT TAC TGT CAG CAG CGT AGC AAC TGG CAT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC

                K   V   E   I   K
307             AAG GTG GAG ATC AAA
```

图3B

图4A

抗-CD73 11F11-2 VK

V区段: VK1 / L15
J区段: JK4 / 4

```
                D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
1               GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

                                  CDR1
                R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A
52              AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

                                                                  CDR2
                W   Y   Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A
103             TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

                S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154             TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

                T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205             ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

                                  CDR3
                Y   Y   C   Q   Q   Y   N   S   Y   P   L   T   F   G   G   G   T
256             TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC

                K   V   E   I   K
307             AAG GTG GAG ATC AAA
```

图4B

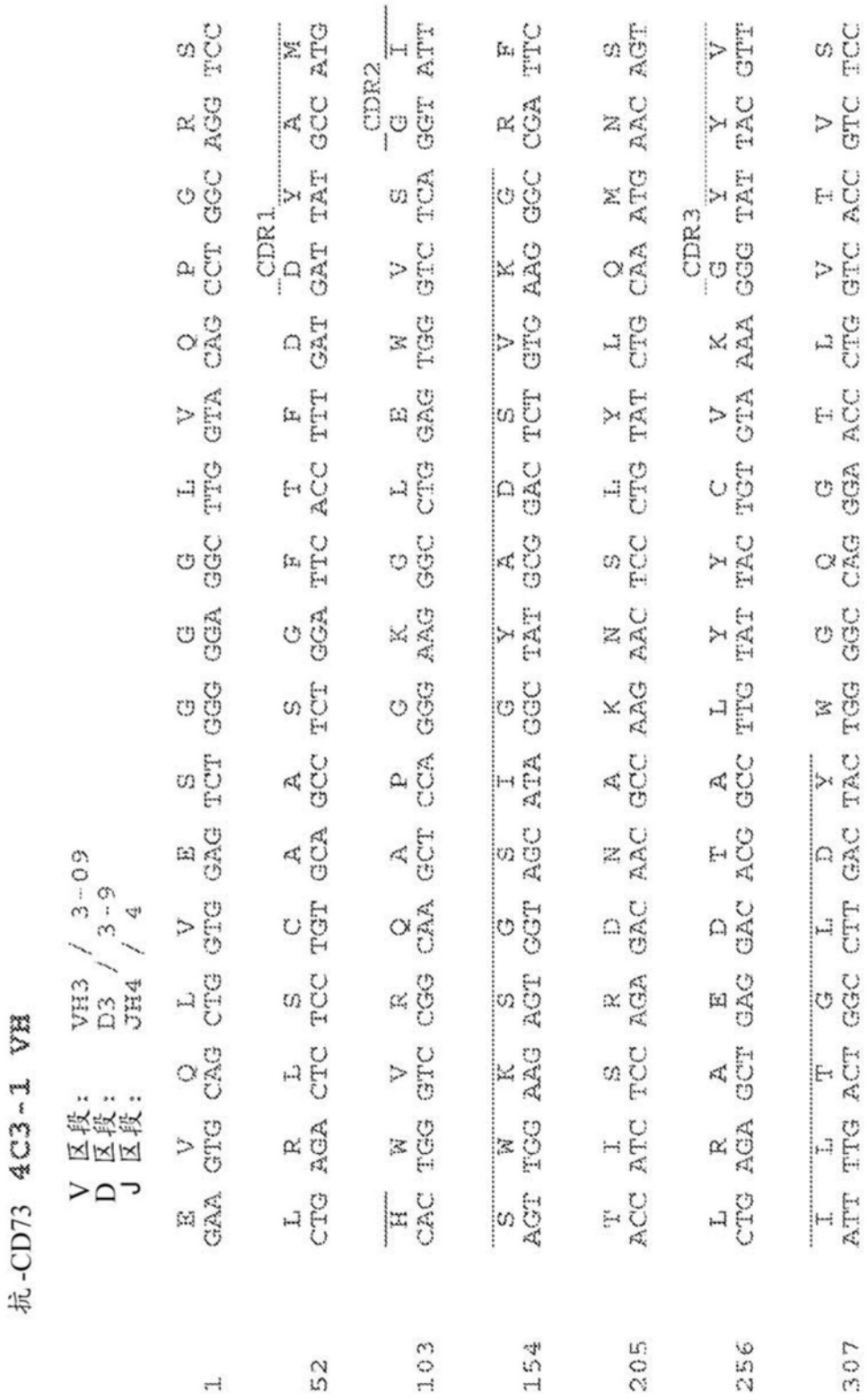


图5A

抗-CD73 4C3-1 VK

V 区段: VK3 / A27
J 区段: JK4 / 4

```
                                                
```

抗-CD73 4C3-2 VH

V 区段： VH3 / 3-09
D 区段： D3 / 3-9
J 区段： JH4 / 4

```
                                                
```

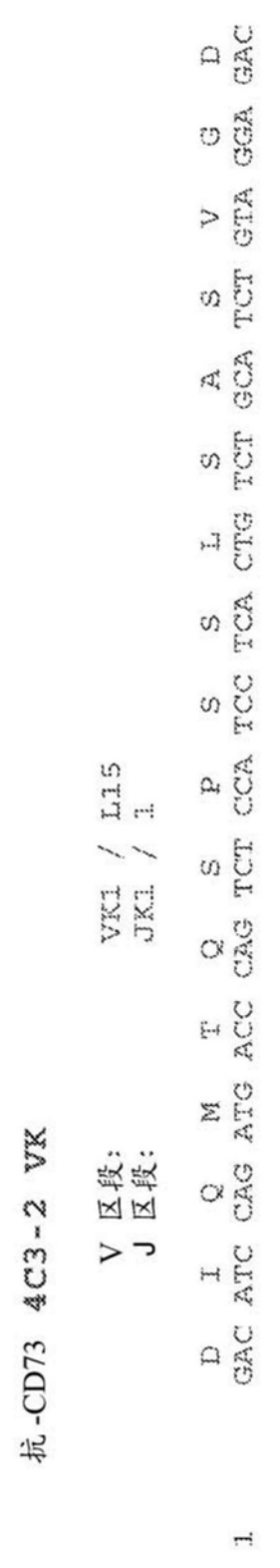


图6B

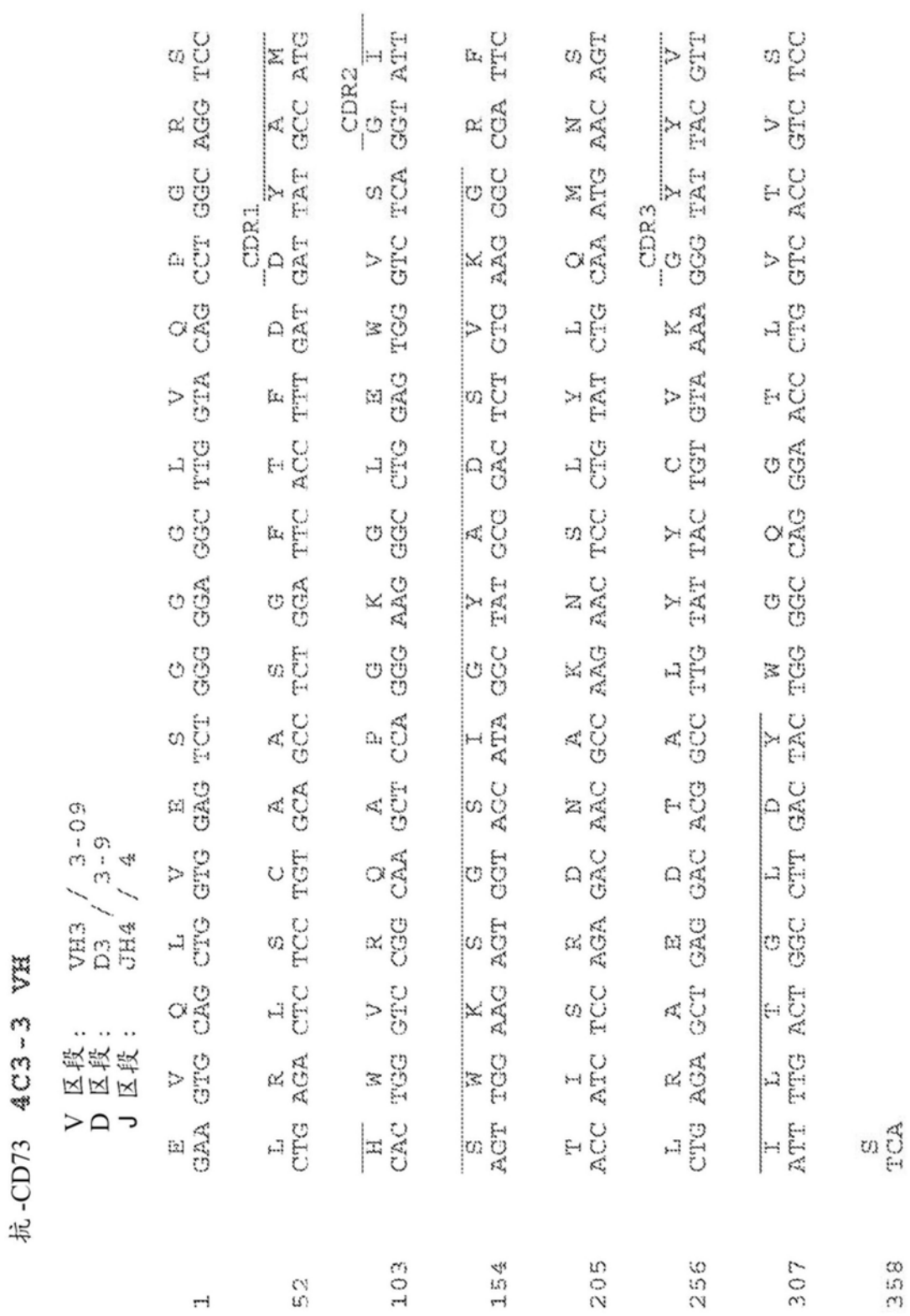


图7A

抗-CD73 4C3-3 VK

V 区段： VK1 / L15
J 区段： JK1 / 1

```
                D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
    1   GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC
                                 CDR1
                R   V   T   F   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A
   52   AGA GTC ACC TTC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC
                                                                 CDR2
                W   Y   Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A
  103   TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA
                S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
  154   TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG
                T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
  205   ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT
                                 CDR3
                Y   Y   C   Q   Q   Y   N   S   Y   P   P   T   F   G   Q   G   T
  256   TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCT CCA ACG TTC GGC CAA GGG ACC
                K   V   E   I   K
  307   AAG GTG GAA ATC AAA
```

图7B

抗-CD73 4D4-1 VH

V 区段： VH3 / 3-33
D 区段： D6 / 6-13
J 区段： JH3 / 3

```
                                                
```



图8B

抗-CD73 10D2-1 VH

V区段： VH3 / 3-33
D区段： D6 / 6-13
J区段： JH6 / 6

```
                                                
```

抗-CD73 10D2-1 VK

V 区段： VK1 / L18
J 区段： JK4 / 4

```
                                                
```

抗-CD73 10D2-2 VH

V 区段： VH3 / 3-33
D 区段： D6 / 6-13
J 区段： JH6 / 6

```
                                                
```

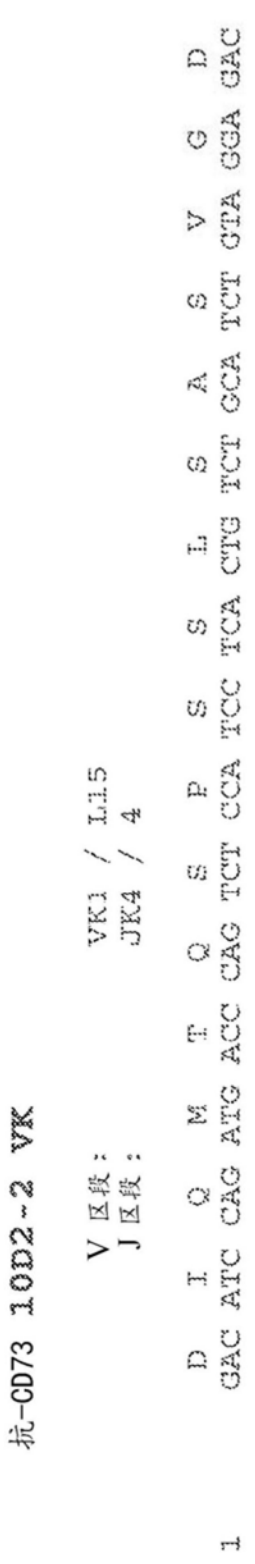


图10B

抗-CD73 11A6-1 VH

V区段： VH3 / 3-09
D区段： D3 / 3-9
J区段： JH4 / 4

```
                E   V   Q   L   V   E   S   G   G   N   L   V   Q   P   G   R   S
1               GAA GTG CAG CTG GTG GAA TCT GGG GGA AAC TTG GTA CAG CCT GGC AGG TCC

                L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   D   D   Y   A   M
52              CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GCC ATG

                H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   S   G   I
103             CAC TGG GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATT

                S   W   N   N   N   D   I   G   Y   A   D   S   V   K   G   R   F
154             AGT TGG AAT AAT GAC GCC ATA GGC TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC

                I   I   S   R   D   N   A   K   N   S   L   Y   L   Q   M   N   S
205             ATC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT

                L   R   P   E   D   T   A   L   Y   Y   C   V   K   G   Y   Y   V
256             CTG AGA CCT GAG GAC ACG GCC TTG TAT TAT TGT GTA AAA GGT TAT TAC GTT

                I   L   T   G   L   D   Y   W   G   Q   G   T   P   V   T   V   S
307             ATT TTG ACT GGT CTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CCG GTC ACC GTC TCC

                S
358             TCA
```

图11A

抗-CD73 11A6-1 VK

V 区段： VK1 / L15
J 区段： JK4 / 4

```
                D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
1               GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

                                  CDR1
                R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A
52              AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

                                                                  CDR2
                W   Y   Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A
103             TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

                S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154             TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

                T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205             ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

                                  CDR3
                Y   Y   C   Q   Q   Y   N   S   Y   P   L   T   F   G   G   G   T
256             TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC

                K   V   E   I   K
307             AAG GTG GAG ATC AAA
```

图11B

抗-CD73 24H2-1 VH

V 区段： VH3 / 3-33
D 区段： D6 / 6-13
J 区段： JH3 / 3

```
                                                
```

抗-CD73 24H2-1 VK

V 区段： VK1 / L15
J 区段： JK4 / 4

```
                                                
```

抗-CD73 5F8-1 VH

V区段: VH3 / 3-74
D区段: D6 / 6-19
J区段: JH4 / 4

```
                E   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   G   S
    1   GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCC GGG GGA GGC TTA GTT CAG CCT GGG GGG TCC
                L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   S   Y   W   M
   52   CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAC TGG ATG
                CDR1                                                CDR2
                H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   V   W   V   S   R   I
  103   CAC TGG GTC CGC CAA GCT CCA GGG AAG GGG CTG GTG TGG GTC TCA CGT ATT
                I   S   D   G   S   S   T   G   Y   A   D   S   V   K   G   R   F
  154   ATT AGT GAT GGG AGT AGC ACA GGT TAC GCG GAT TCC GTG AAG GGC CGA TTC
                T   I   S   R   D   N   A   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S
  205   ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT
                L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   E   F   S   S
  256   CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCA AGA GAG TTT AGC AGT
                CDR3
                G   W   Y   F   D   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S
  307   GGC TGG TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

图13A

抗-CD73 5F8-1 VK

V 区段： VK1 / L18
J 区段： JK1 / 1

```
                A   I   Q   L   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
1               GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

                                  CDR1
                R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   A   L   A
52              AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC

                                                                  CDR2
                W   Y   Q   Q   K   P   G   K   A   P   K   L   L   I   Y   D   A
103             TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC

                S   S   L   E   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154             TCC AGT TTG GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

                T   D   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205             ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

                                  CDR3
                Y   Y   C   Q   Q   F   S   S   Y   P   R   T   F   G   Q   G   T
256             TAT TAC TGT CAA CAG TTT AGT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC

                K   V   E   I   K
307             AAG GTG GAA ATC AAA
```

图13B

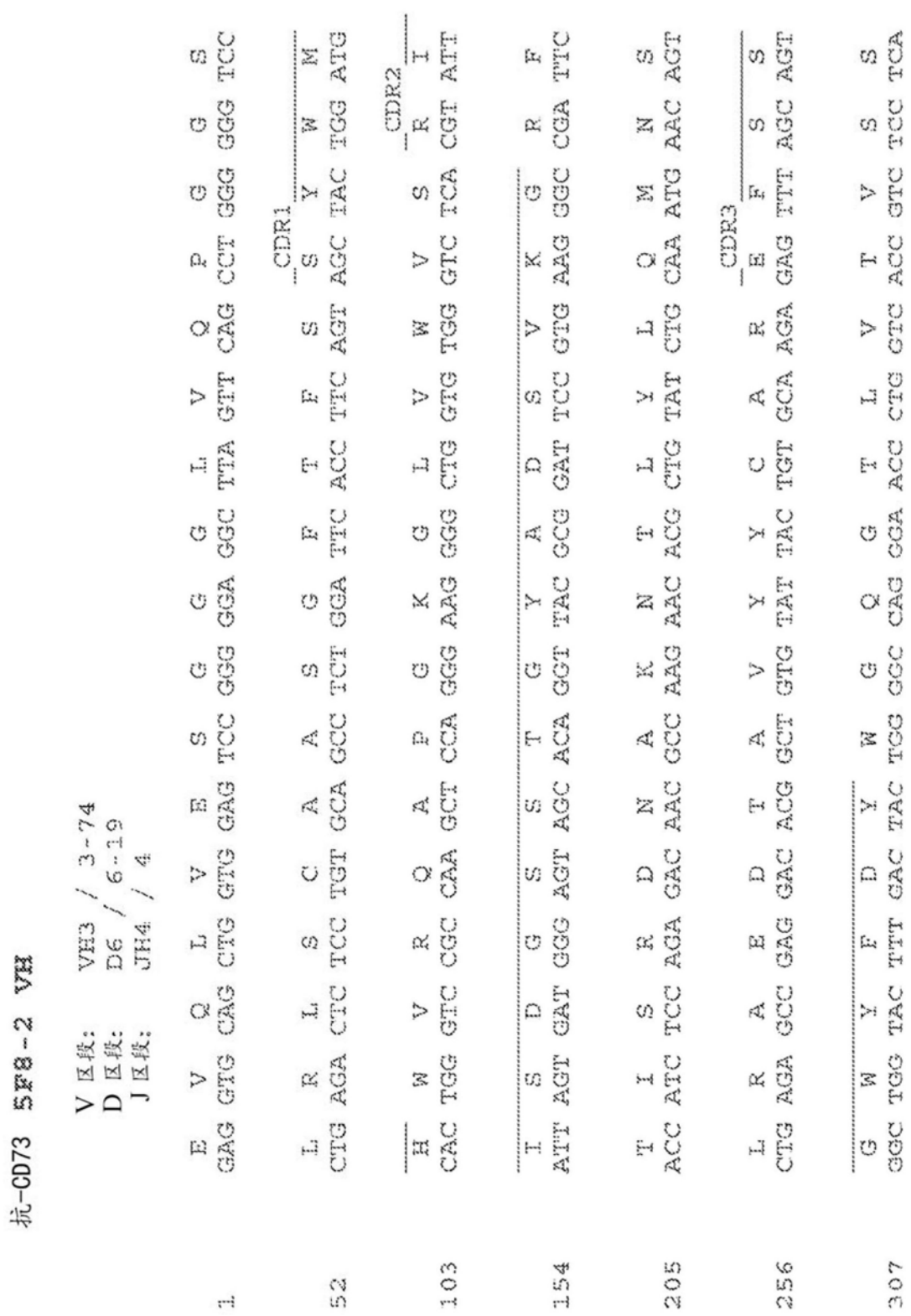


图14A

抗-CD73 5F8-2 VK

V 区段： VK1 / L15
J 区段： JK1 / 1

```
                D   I   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D
1               GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC

                                  CDR1
                R   V   T   I   T   C   R   A   S   Q   G   I   S   S   W   L   A
52              AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC

                                                                  CDR2
                W   Y   Q   Q   K   P   E   K   A   P   K   S   L   I   Y   A   A
103             TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA

                S   S   L   Q   S   G   V   P   S   R   F   S   G   S   G   S   G
154             TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG

                T   G   F   T   L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T
205             ACA GGT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT

                                  CDR3
                Y   Y   C   Q   Q   Y   N   S   Y   P   R   T   F   G   Q   G   T
256             TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAC CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC

                K   V   E   I   K
307             AAG GTG GAA ATC AAA
```

图14B

抗-CD73 SF8-3 VH

V区段： VH3 / 3-74
D区段： D6 / 6-19
J区段： JH4 / 4

```
                E   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   G   S
1               GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCC GGG GGA GGC TTA GTT CAG CCT GGG GGG TCC
                                                        CDR1
                L   E   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   S   Y   W   M
52              CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAC TGG ATG
                                                                    CDR2
                H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   V   W   V   S   R   I
103             CAC TGG GTC CGC CAA GCT CCA GGG AAG GGG CTG GTG TGG GTC TCA CGT ATT
                I   S   D   G   S   S   T   G   Y   A   D   S   V   K   G   R   F
154             ATT AGT GAT GGG AGT AGC ACA GGT TAC GCG GAT TCC GTG AAG GGC CGA TTC
                T   I   S   R   D   N   A   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S
205             ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT
                                                            CDR3
                L   R   A   E   D   T   A   V   Y   Y   C   A   R   E   F   S   S
256             CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCA AGA GAG TTT AGC AGT
                G   W   Y   F   D   Y   W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S
307             GGC TGG TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

图15A



图15B

抗-CD73 6E11-1 VH

V区段: VH3 / 3-09
D区段: D6 / 6-13
J区段: JH4 / 4

```
                E   V   Q   L   V   E   S   G   G   A   L   V   Q   P   G   R   S
1               GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GCC TTG GTA CAG CCT GGC AGG TCC
                L   R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   F   D   D   Y   A   M
52              CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GCC ATG
                H   W   V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   S   G   I
103             CAC TGG GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATT
                T   W   N   S   G   G   I   G   Y   A   D   S   V   K   G   R   F
154             ACT TGG AAT AGT GGT GGC ATA GGC TAC GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC
                T   I   S   R   D   N   A   K   N   S   L   Y   L   Q   M   N   S
205             ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT
                L   R   A   E   D   T   A   L   Y   Y   C   A   K   D   R   Y   Y
256             CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCC TTG TAT TAC TGT GCA AAA GAT AGG TAT TAC
                S   S   W   L   L   F   D   N   W   G   Q   G   I   L   V   T   V
307             AGC AGT TGG CTC CTC TTT GAC AAC TGG GGC CAG GGA ATT CTG GTC ACC GTC
                S   S
358             TCC TCA
```

图16A

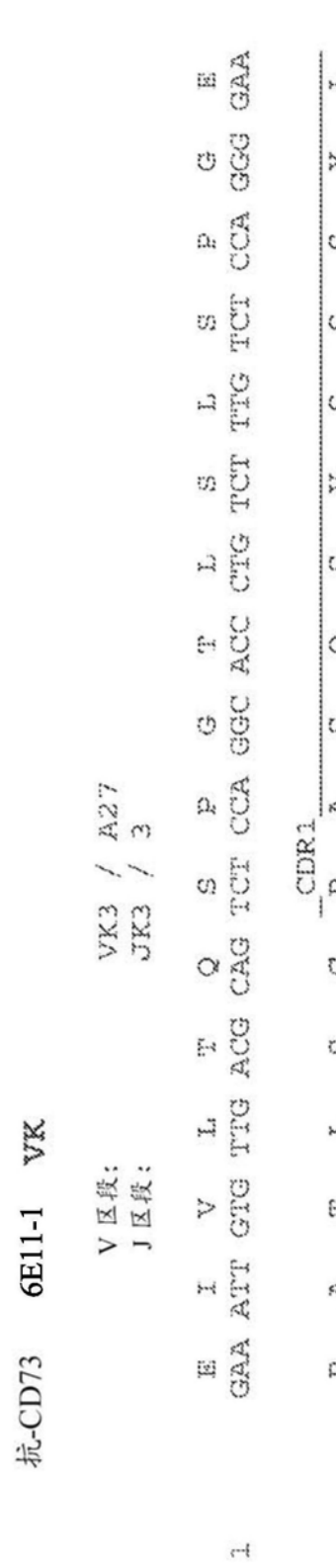


图16B

抗-CD73 7A11-1 VH

V区段: VH3 / 3-09
D区段: D3 / 3-10
J区段: JH4 / 4

```
                                                
```

抗-CD73 7A11-1 VK

V区段: VK1 / L15
J区段: JK5 / 5

```
                                                
```

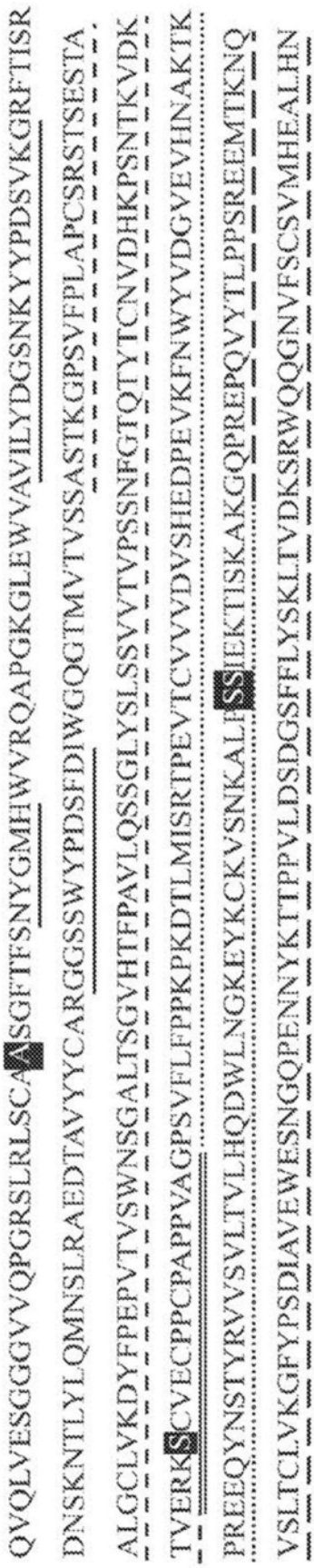

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSWYPDSFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDK
TVERKSCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPG
没有下划线: VH
CDR1、2和3
CH1
铰链
CH2
CH3

图18

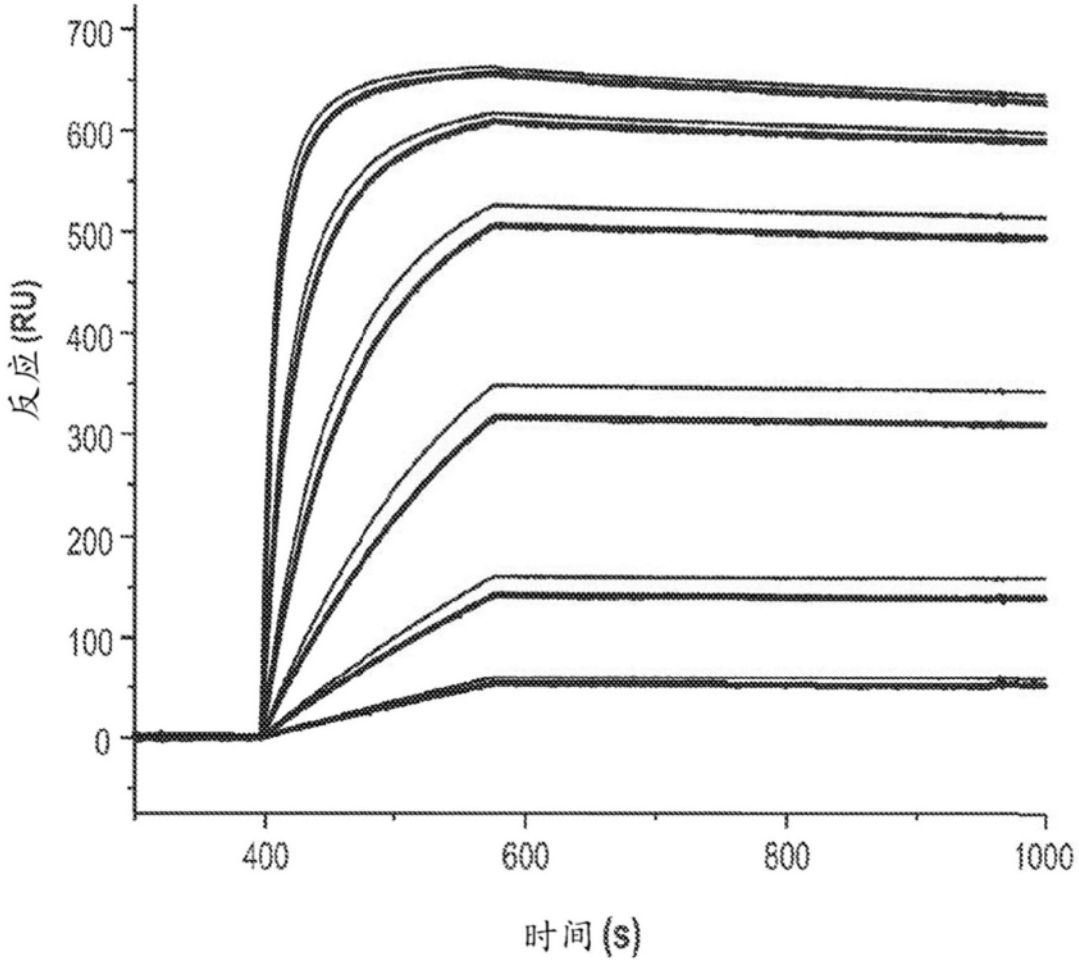


图19

ng/mL	20000	3333.33	555.56	92.59	15.43	2.57	0.43	0.07	Kd (ng/mL)
F3713.11F11.F3.A4	36600	29700	27400	12100	4828	2253	1293	788	188.18
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f	36900	33400	32800	15600	5598	2272	1505	822	126.85
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2	35700	31200	29600	13000	5860	2310	1316	843	162.27
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	36500	31300	30000	13600	5143	2383	1192	708	156.46
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2	37400	32000	30500	19800	8250	3176	1810	1148	82.57
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	37700	32000	29700	18500	7275	2858	1732	1076	96.41
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f	36000	32400	31300	18800	7315	3104	1633	793	85.00
未染色	-8.27								
仅切片	30.3								

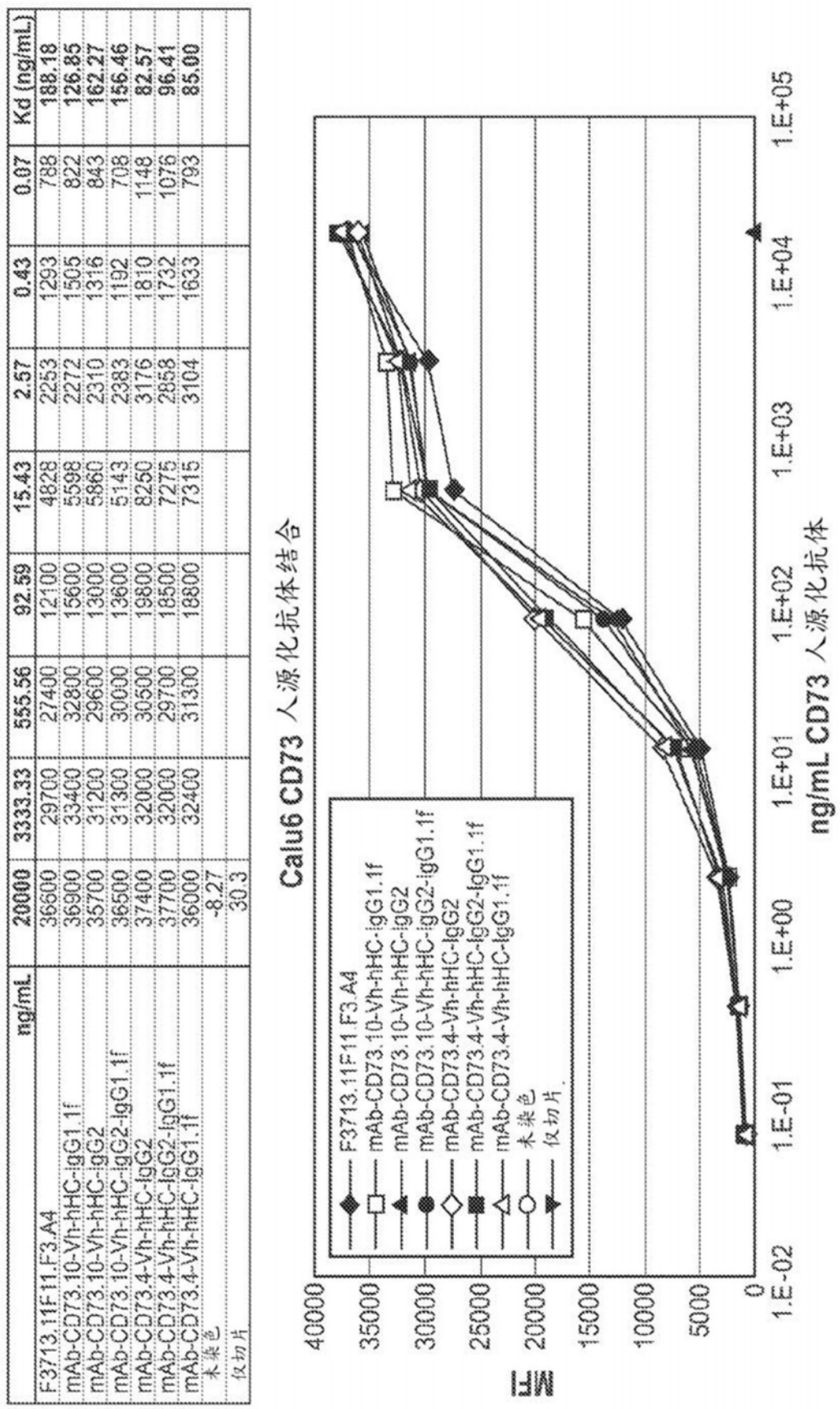


图20A1

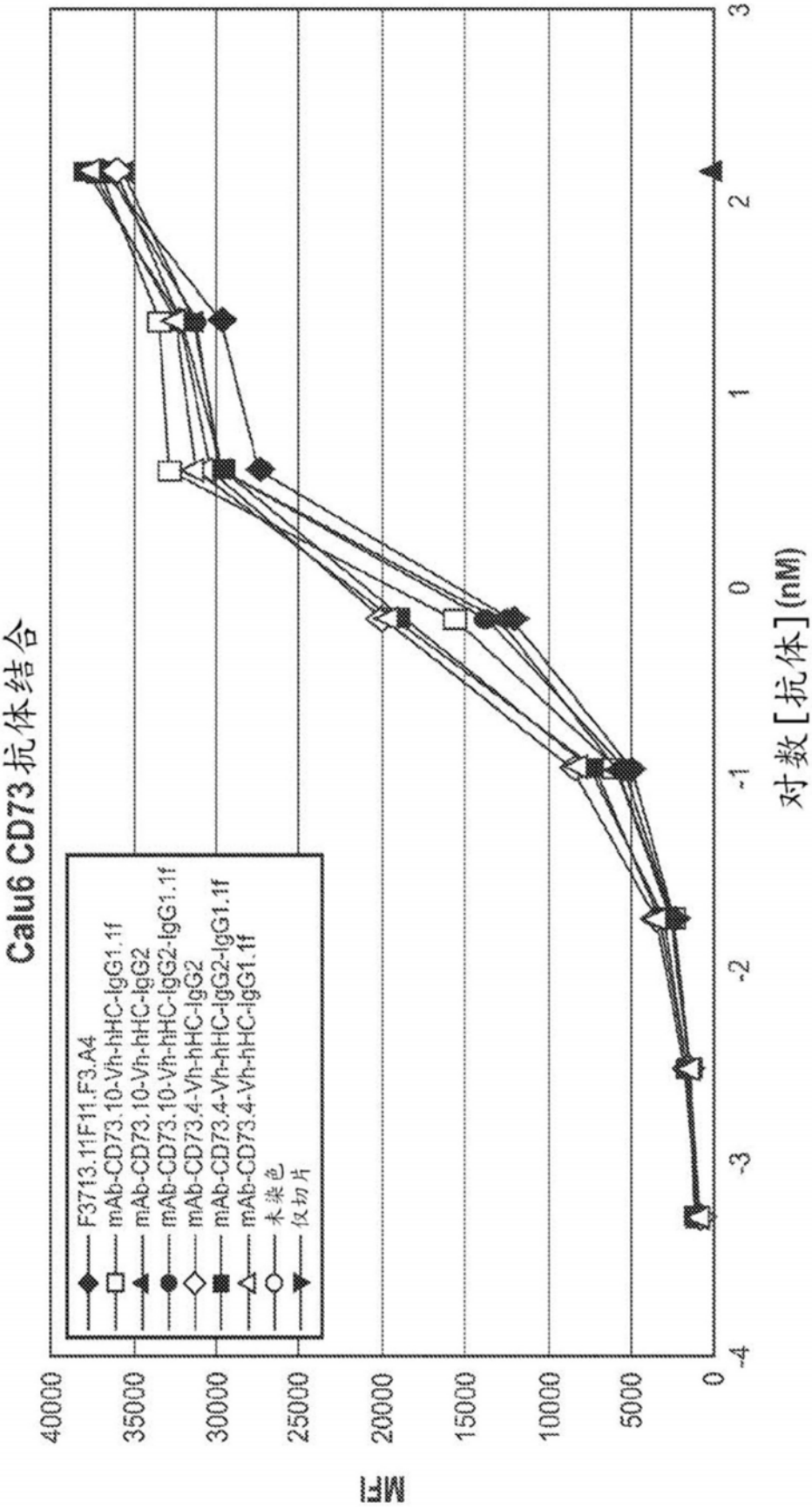

Calu6 CD73抗体结合
MFI
对数[抗体](nM)
F3713.11F11.F3.A4
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f
未染色
仅切片
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3

图20A2

ng/mL	20000	3333.33	555.56	92.59	15.43	2.57	0.43	0.07
F3713.11F11.F3.A4	96.2	37.6	29.7	30.2	31.3	20.9	30.7	23.1
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f	59.2	33.5	30.4	29.1	25.6	20	25.4	20.8
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2	58.1	27.8	28.2	31.4	31	20.5	23.8	21.4
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	59.6	35.5	29.1	23.2	29.5	23.6	23.9	23.2
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2	132	40.9	35.7	25.9	29	20.8	26	18.6
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	129	36.5	23.8	24.7	23.1	19.2	26.4	21.9
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f	96.6	48.1	28.4	28.3	28.2	25.3	25.7	21.4
未染色	0.378							
仅切片	39.5							

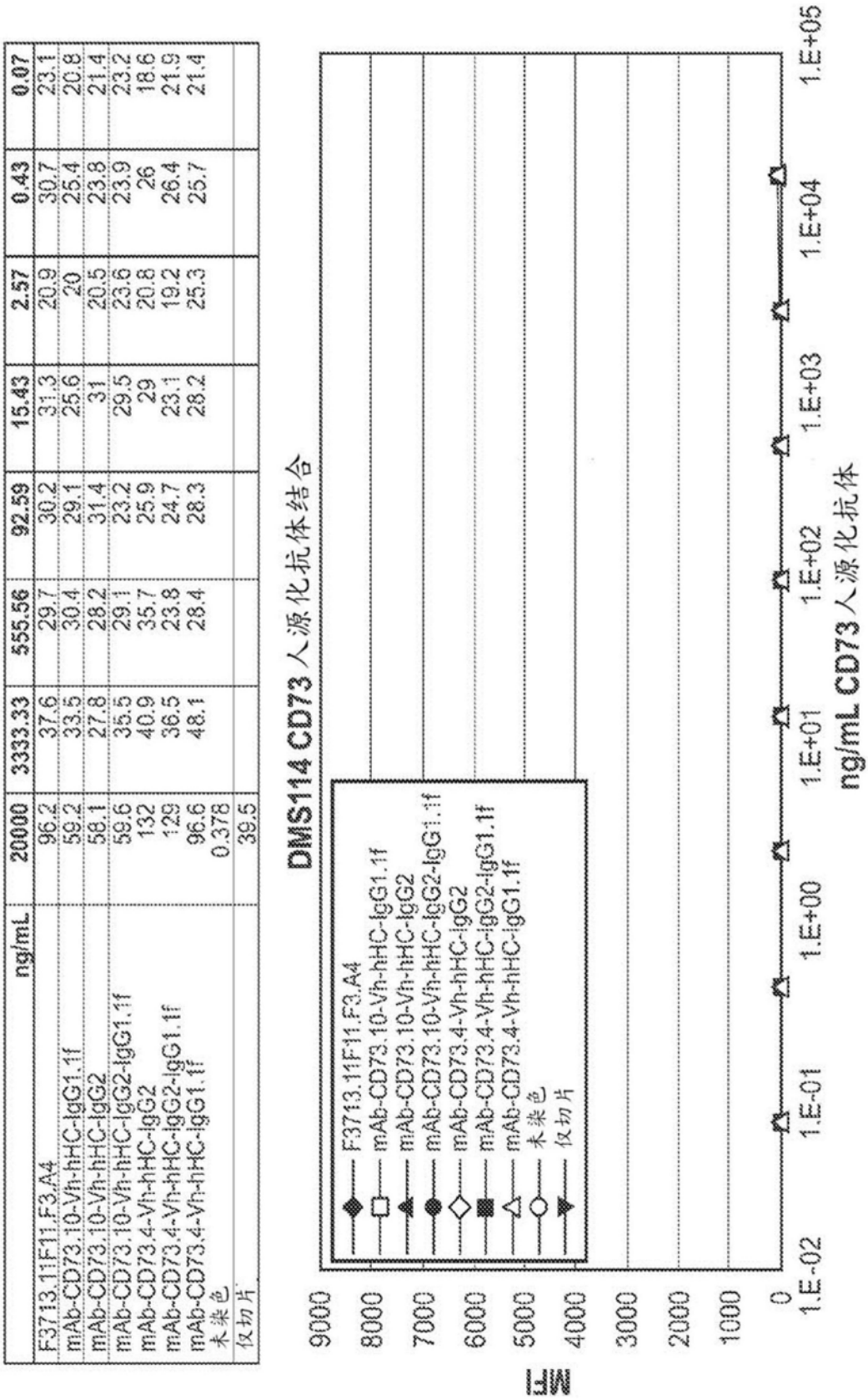


图20B1

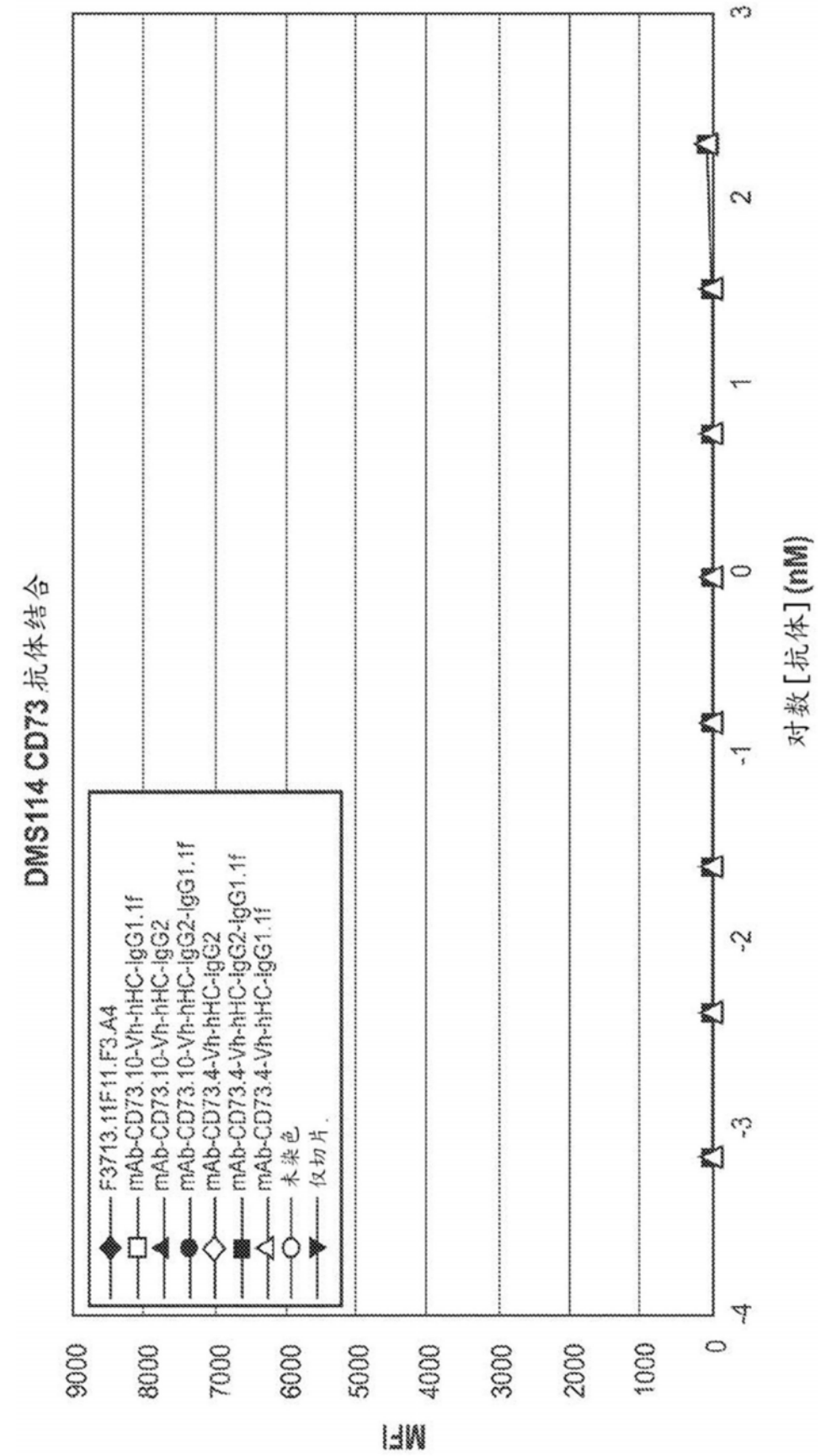

DMS114 CD73 抗体结合
F3713.11F11.F3.A4
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f
未染色
仅切片
MFI
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
对数[抗体](nM)

图20B2

ng/mL	20000	3333.33	555.56	92.59	15.43	2.57	0.43	0.07	Kd (ng/mL)
F3713.11F11.F3.A4	2656	1994	1638	1474	1152	670	342	200	20.73
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f	2159	1602	1738	1594	1054	542	207	129	16.74
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2	2060	1698	1528	1350	775	326	173	118	26.59
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	2101	1690	1529	1336	807	371	193	104	25.69
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2	2814	2092	1804	1644	1420	891	487	289	15.55
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	2753	2072	1755	1573	1426	804	487	255	14.75
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f	2186	1855	1758	1703	1515	816	458	202	7.11
未染色	4.81								
仅Ab片	18.5								

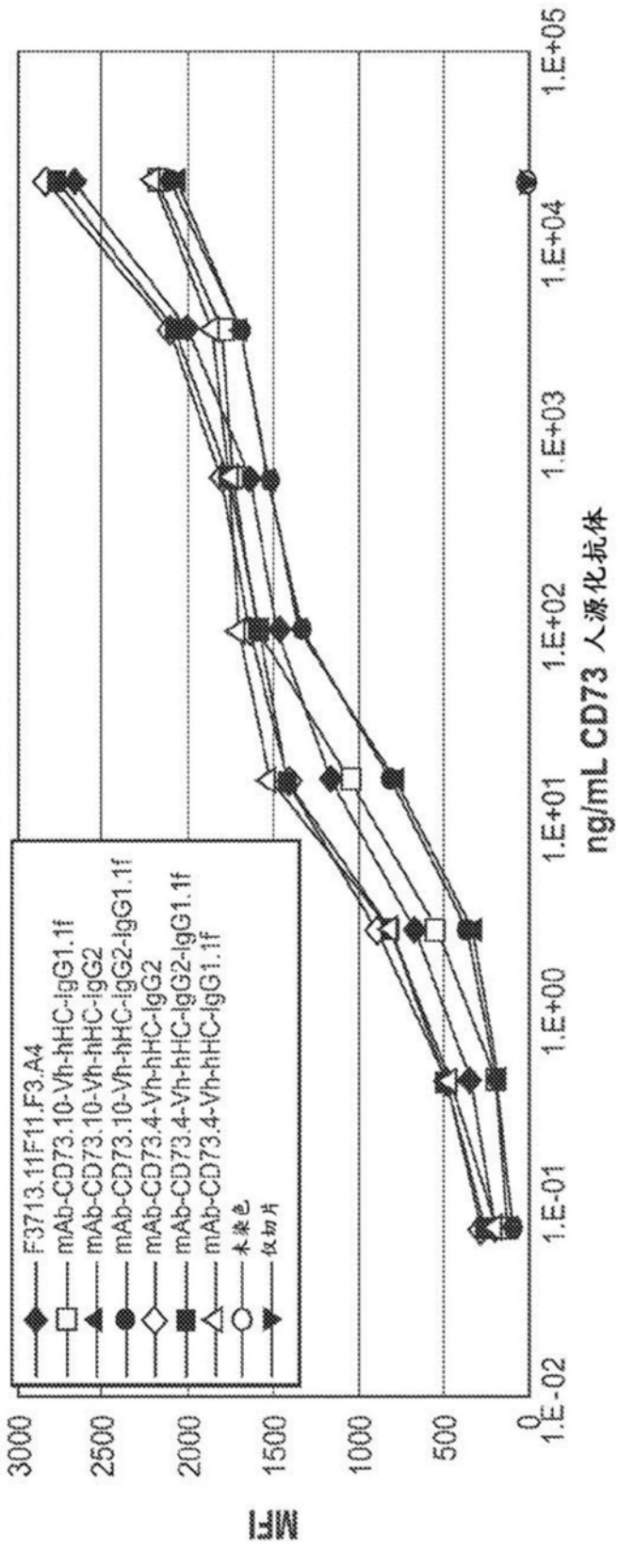


图20C1

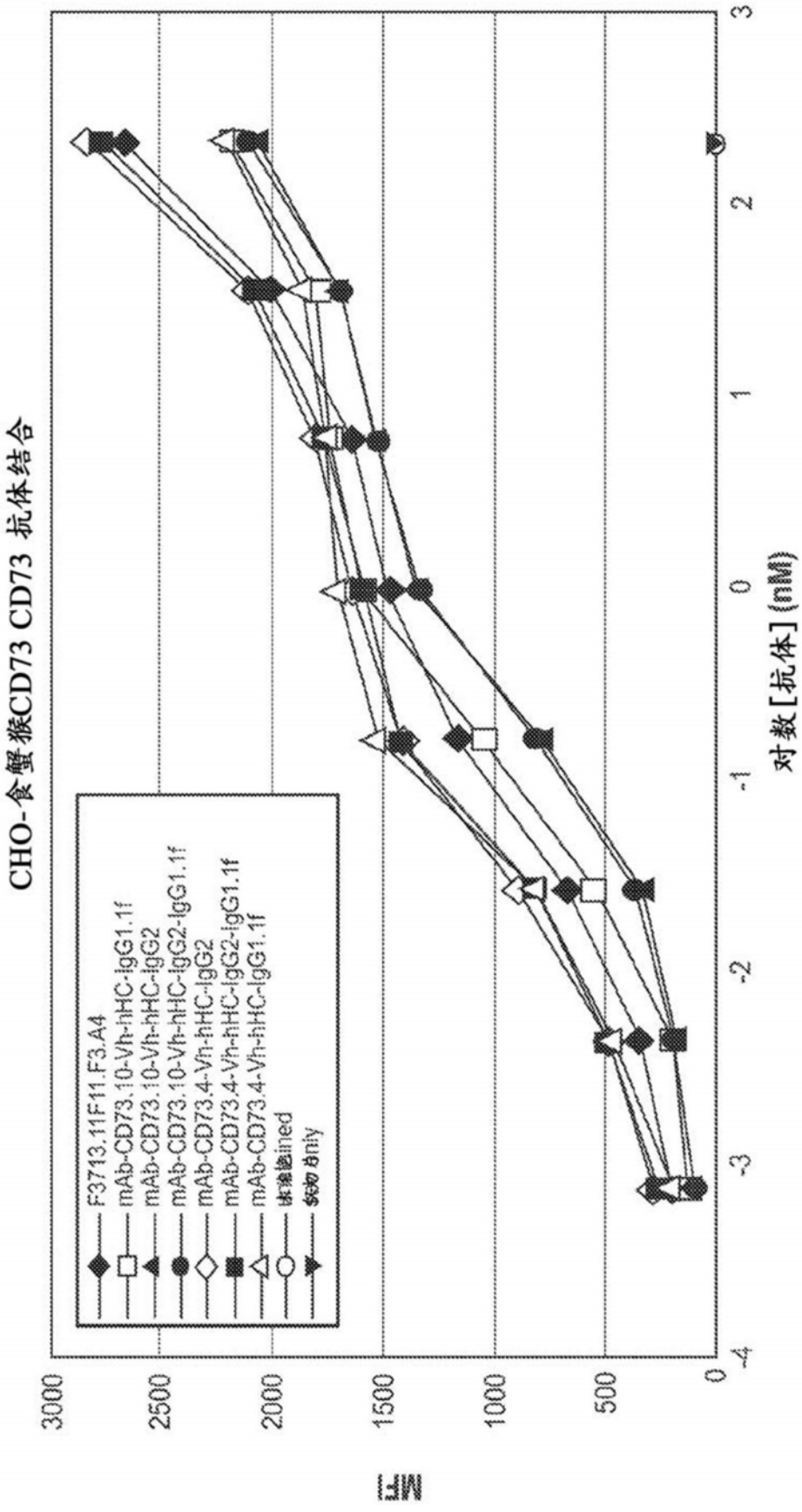

CHO-食蟹猴CD73 CD73 抗体结合
F3713.11F11.F3.A4
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f
MFI
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
对数[抗体](nM)

图20C2

ng/mL	20000	3333.33	555.56	92.59	15.43	2.57	0.43	0.07
F3713.11F11.F3.A4	22.2	15.4	15.9	13.9	14.1	17.3	14.7	17.1
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f	21.6	20.4	15.4	16.5	12	13.5	10.3	18.9
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2	17.9	12.9	10.5	14	13.9	17.9	15.1	7.57
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	13	14.7	13.2	14.4	10.9	11.6	14.5	14.9
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2	42.6	15	13.3	9.42	9.74	16.7	11.3	9.5
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f	44.6	10.9	11.7	8.92	7.34	8.08	12.2	12.9
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f	17.5	12.5	11.1	14.8	15.6	13.3	7.81	6.31
未染色	6.85							
仅二抗	12.7							

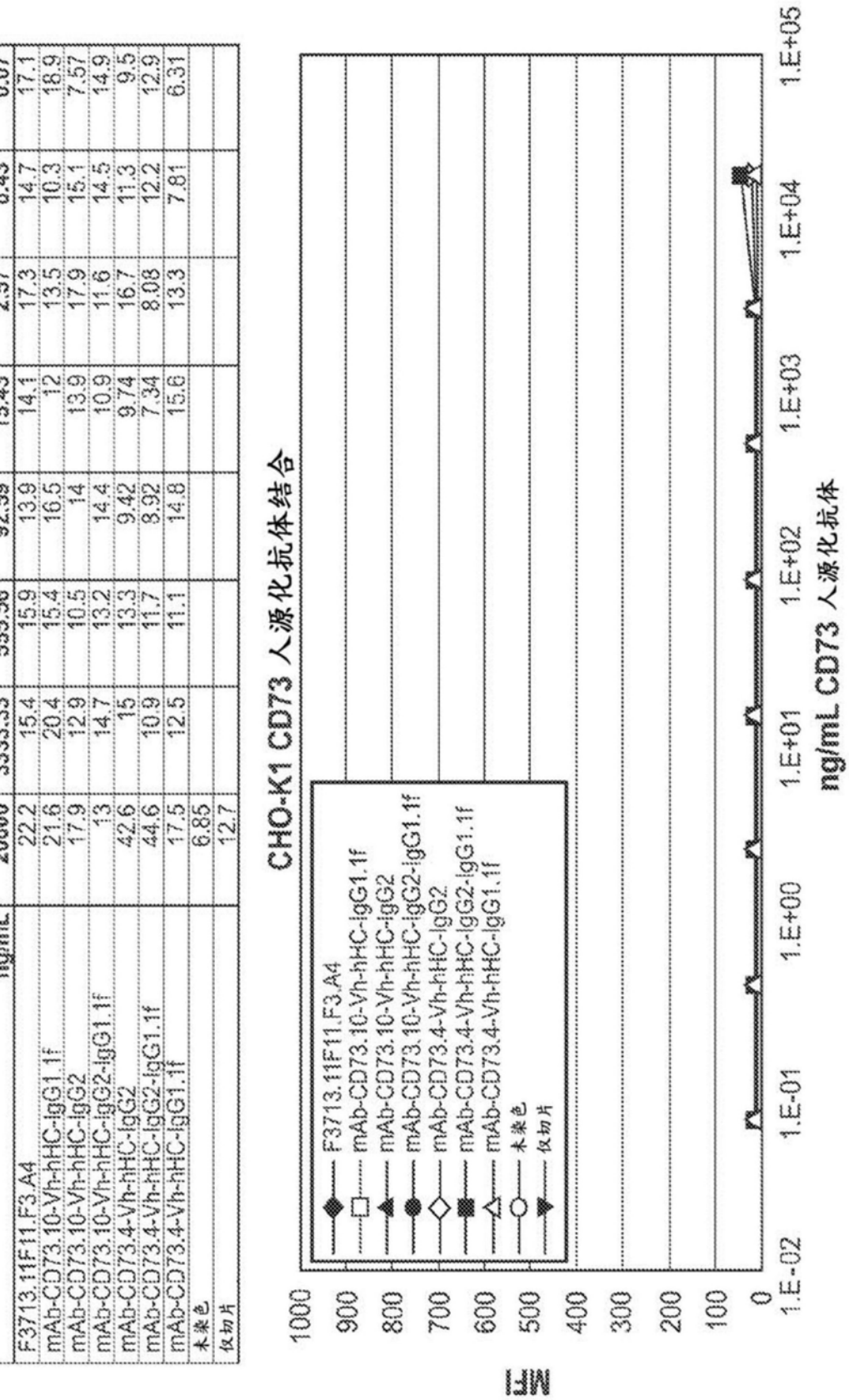


图20D1

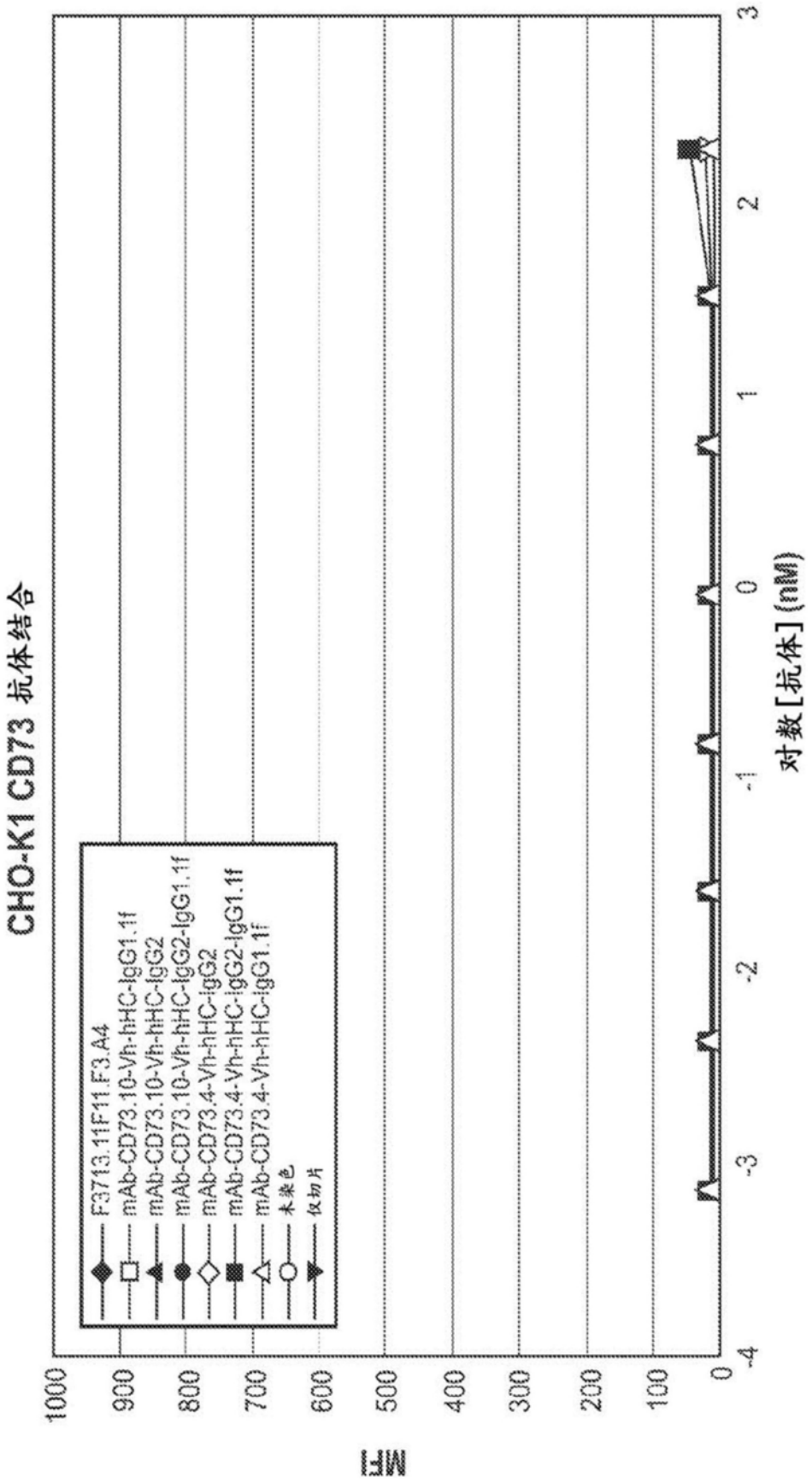

CHO-K1 CD73 抗体结合
MFI
对数[抗体](nM)
F3713.11F11.F3.A4
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f
未染色
仅细胞
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3

图20D2

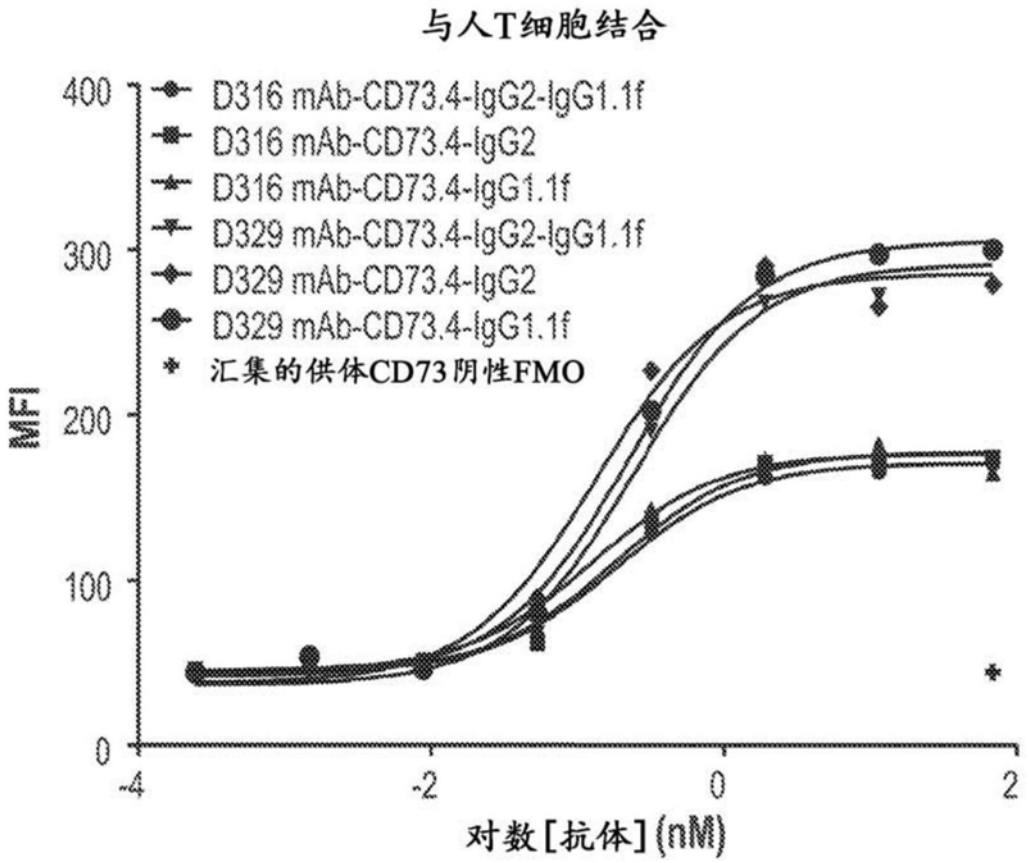

与人T细胞结合
D316 mAb-CD73.4-IgG2-IgG1.1f
D316 mAb-CD73.4-IgG2
D316 mAb-CD73.4-IgG1.1f
D329 mAb-CD73.4-IgG2-IgG1.1f
D329 mAb-CD73.4-IgG2
D329 mAb-CD73.4-IgG1.1f
汇集的供体CD73阴性FMO
MFI
400
300
200
100
0
-4
-2
0
2
对数[抗体](nM)

图20E

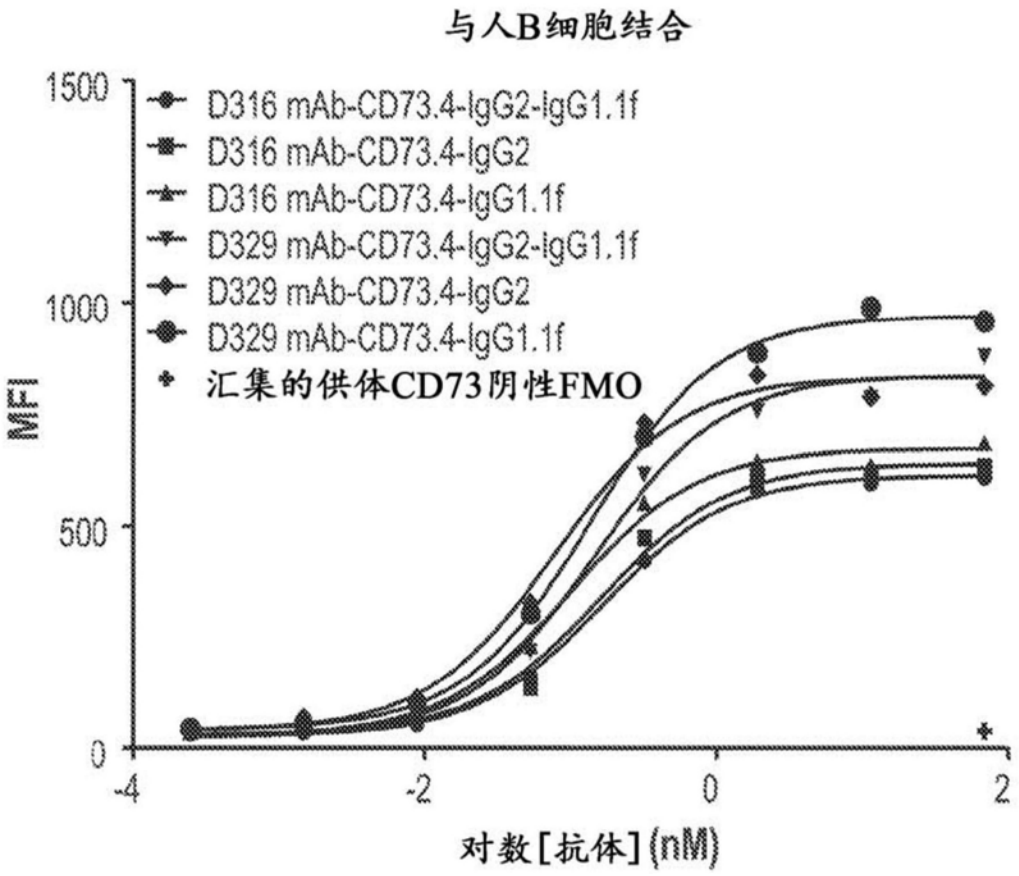
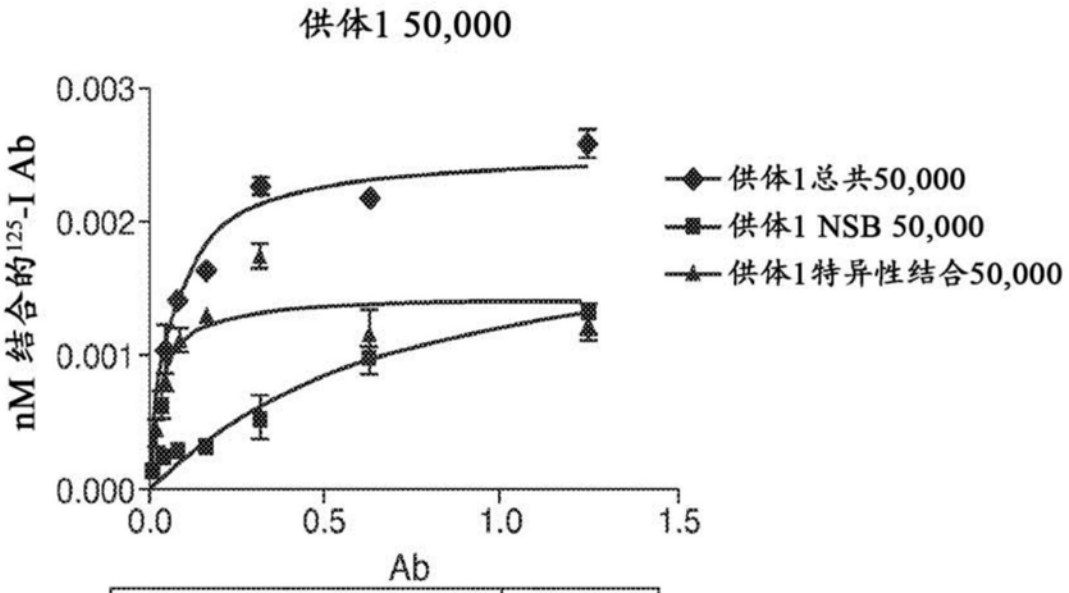

与人B细胞结合
1500
1000
500
0
MFI
D316 mAb-CD73.4-IgG2-IgG1.1f
D316 mAb-CD73.4-IgG2
D316 mAb-CD73.4-IgG1.1f
D329 mAb-CD73.4-IgG2-IgG1.1f
D329 mAb-CD73.4-IgG2
D329 mAb-CD73.4-IgG1.1f
汇集的供体CD73阴性FMO
-4
-2
0
2
对数[抗体](nM)

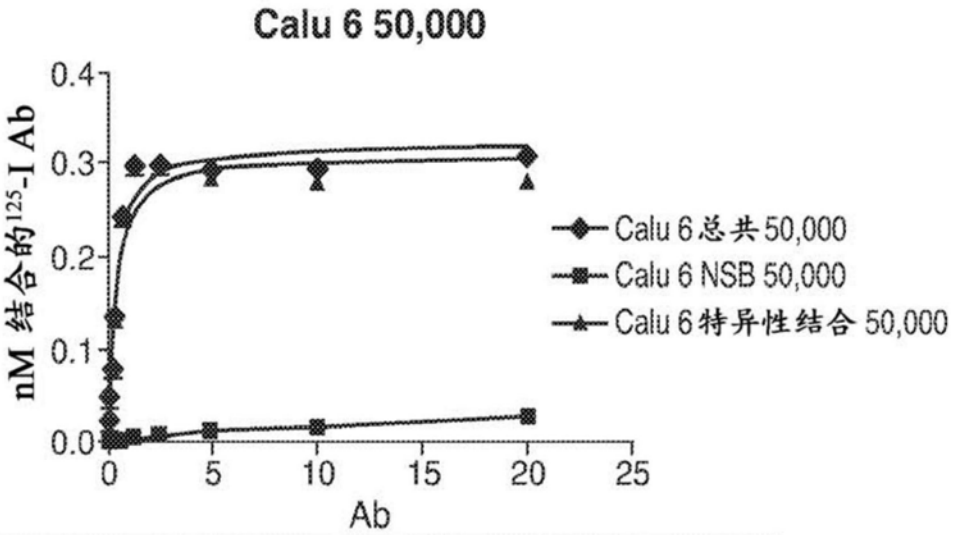
图20F



一个位点特异性结合	
最佳拟合值	
Bmax	0.001471
Kd	0.02852

每细胞的受体数
= Bmax(6e 10)/每孔细胞数
= 0.00147(6e 10)/50000
= 1764

图20G



	Calu 6 特异性结合 50,000
一个位点特异性结合	
最佳拟合值	
Bmax	0.3116
Kd	0.3181

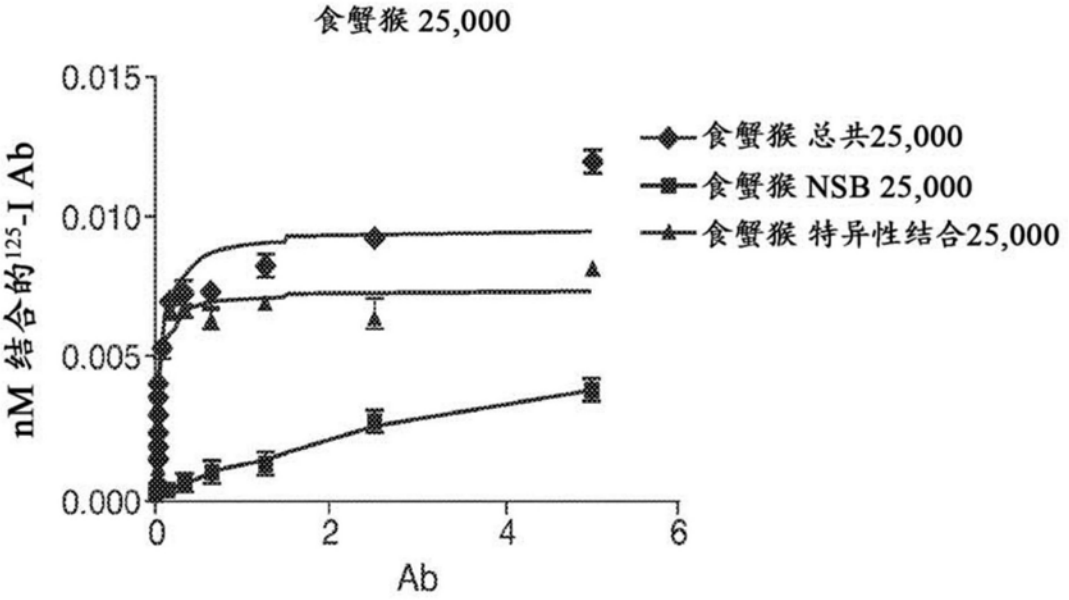
每细胞的受体数

= Bmax(6e 10)/每孔细胞数

= 0.3116(6e 10)/50000

= 373,920

图20H



一个位点特异性结合	
最佳拟合值	
Bmax	0.007366
Kd	0.04000

每细胞的受体数:

= Bmax(6e 10)/每孔细胞数

= 0.007(6e 10)/25000

= 168,000

图20I

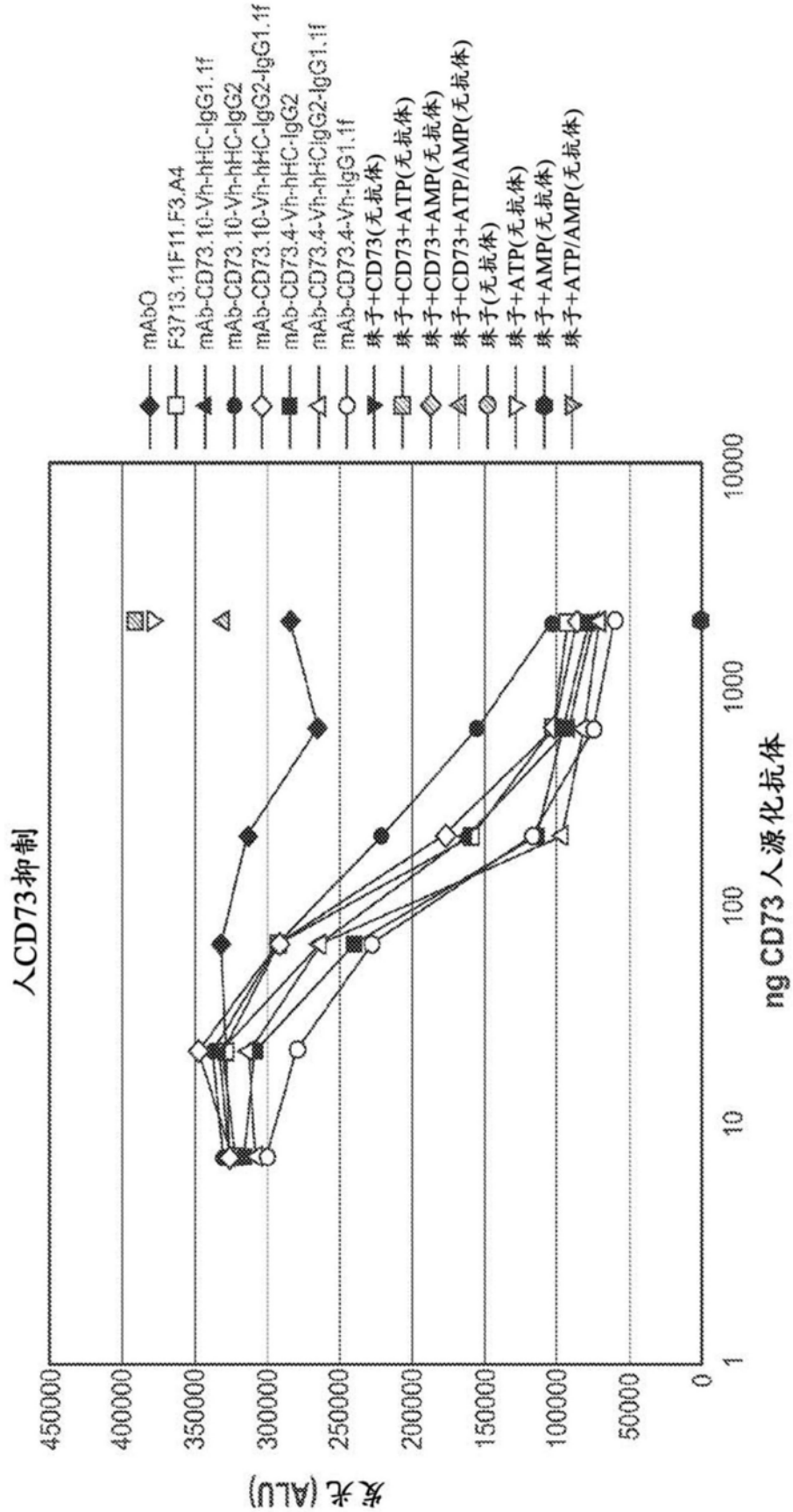

mAbO
F3713.11F11.F3.A4
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.4-Vh-hHCIgG2-IgG1.1f
mAb-CD73.4-Vh-IgG1.1f
珠子+CD73(无抗体)
珠子+CD73+ATP(无抗体)
珠子+CD73+AMP(无抗体)
珠子+CD73+ATP/AMP(无抗体)
珠子(无抗体)
珠子+ATP(无抗体)
珠子+AMP(无抗体)
珠子+ATP/AMP(无抗体)
人CD73抑制
发光(ALU)
450000
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
1
10
100
1000
10000
ng CD73人源化抗体

图21A1

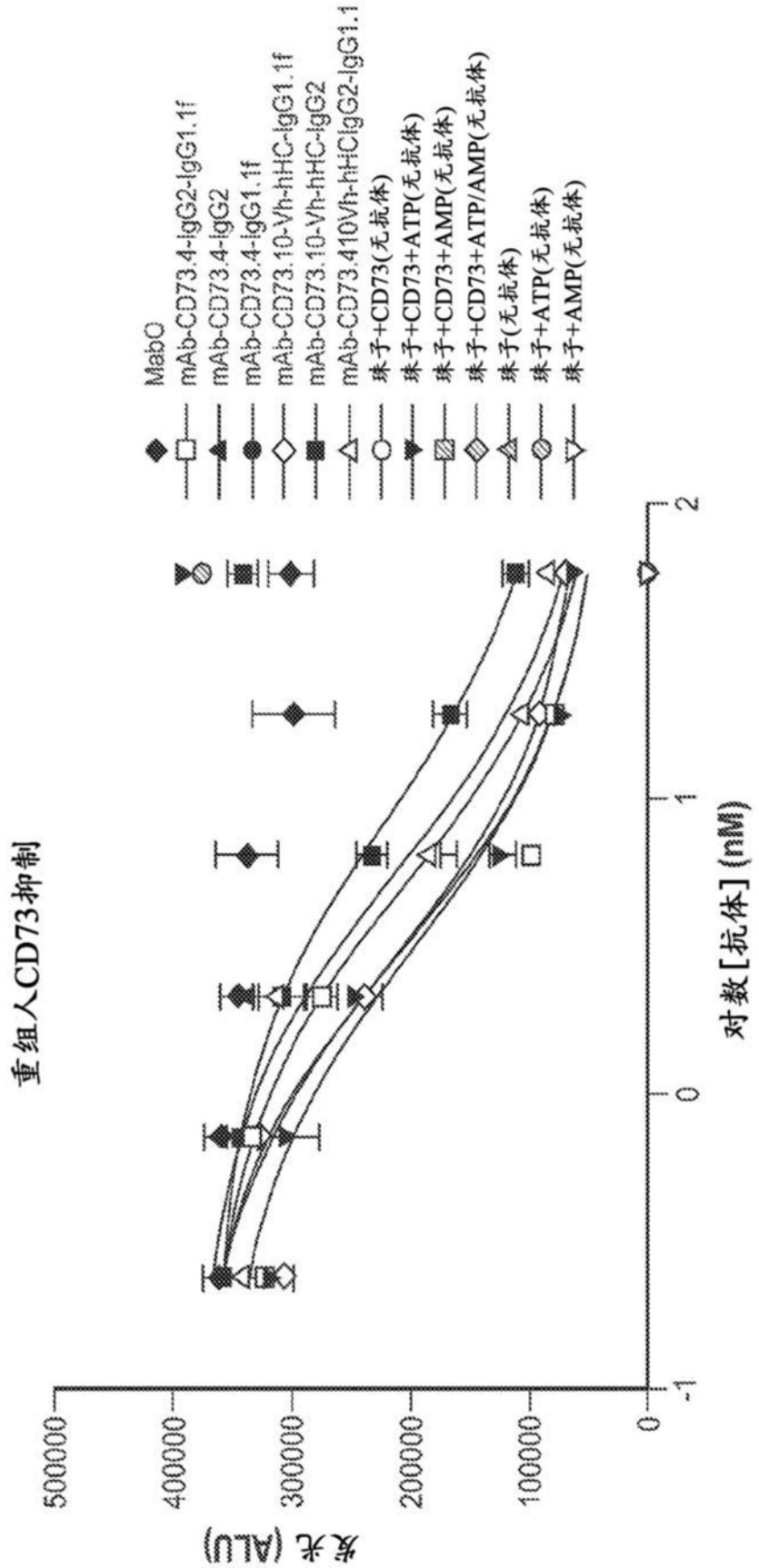

重组人CD73抑制
发光 (RLU)
500000
400000
300000
200000
100000
0
-1
0
1
2
对数[抗体] (nM)
MabO
mAb-CD73.4-IgG2-IgG1.1f
mAb-CD73.4-IgG2
mAb-CD73.4-IgG1.1f
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.410Vh-hHClgG2-IgG1.1
珠子+CD73(无抗体)
珠子+CD73+ATP(无抗体)
珠子+CD73+AMP(无抗体)
珠子+CD73+ATP/AMP(无抗体)
珠子(无抗体)
珠子+ATP(无抗体)
珠子+AMP(无抗体)

图21A2

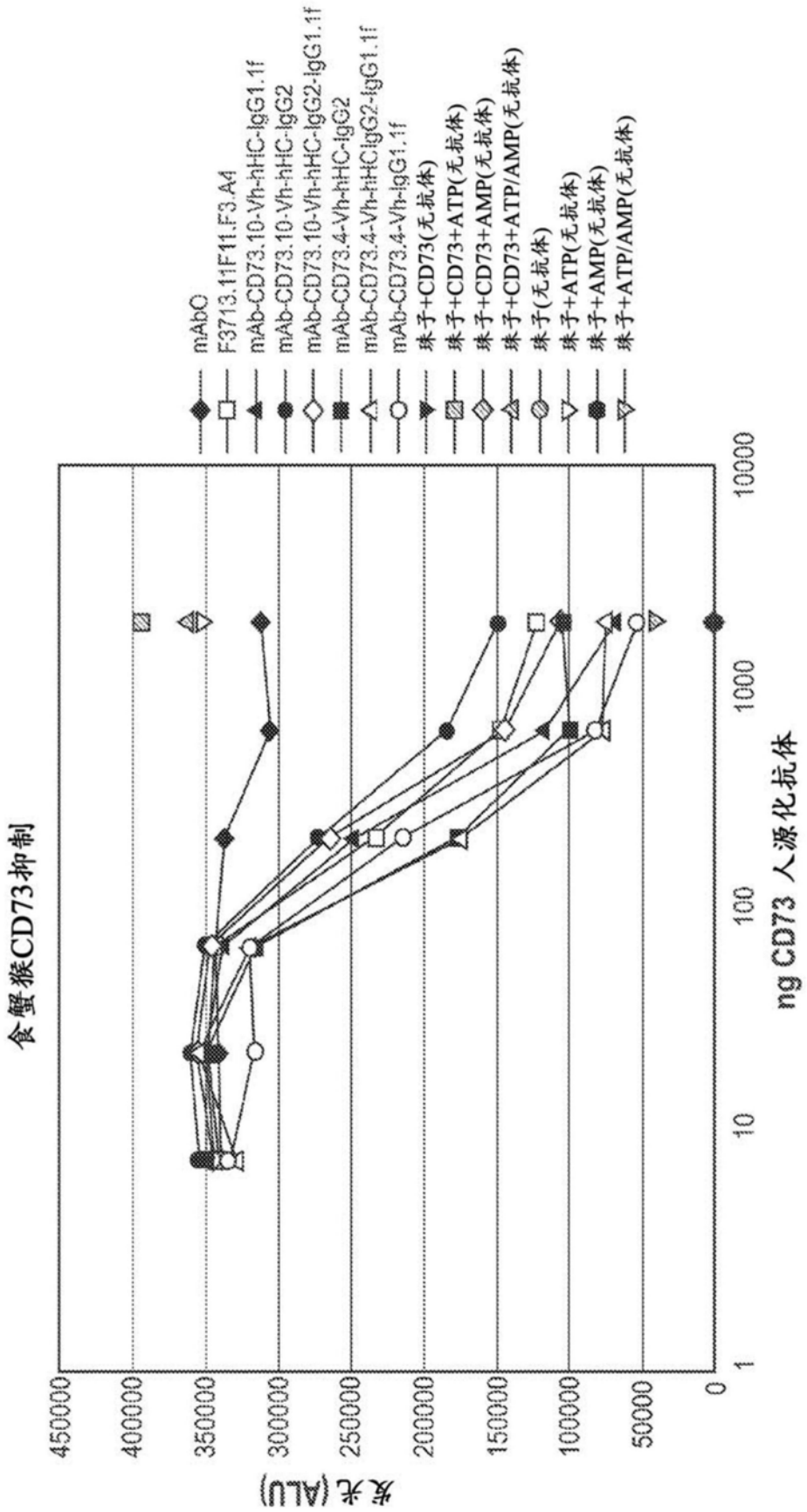

食蟹猴CD73抑制
发光(ALU)
450000
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
1
10
100
1000
10000
ng CD73 人源化抗体
mAbO
F3713.11F11.F3.A4
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.4-Vh-hHC IgG2-IgG1.1f
mAb-CD73.4-Vh-IgG1.1f
珠子+CD73(无抗体)
珠子+CD73+ATP(无抗体)
珠子+CD73+AMP(无抗体)
珠子+CD73+ATP/AMP(无抗体)
珠子(无抗体)
珠子+ATP(无抗体)
珠子+AMP(无抗体)
珠子+ATP/AMP(无抗体)

图21B1

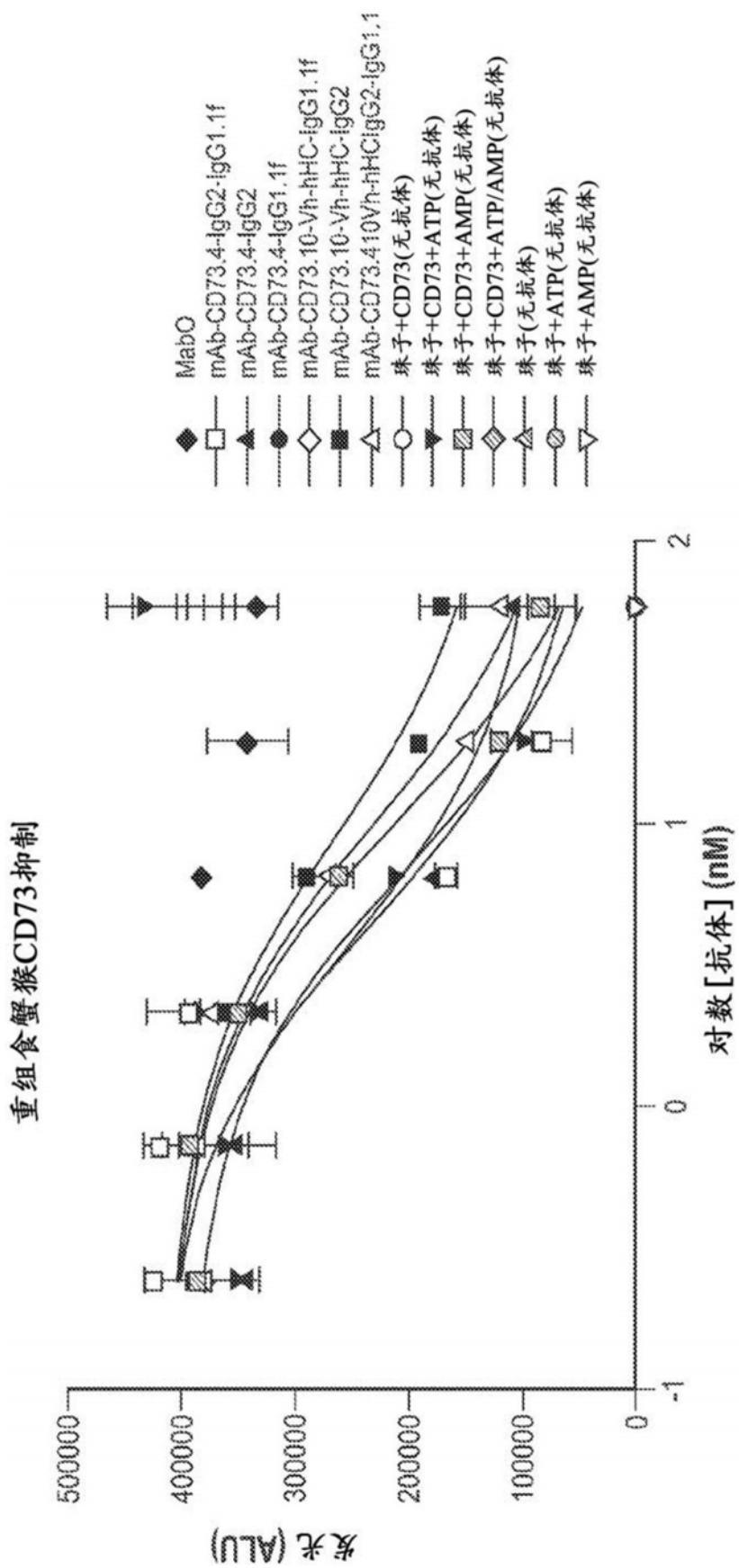

重组食蟹猴CD73抑制
发光 (ALU)
500000
400000
300000
200000
100000
0
-1
0
1
2
对数[抗体] (nM)
MabO
mAb-CD73.4-IgG2-IgG1.1f
mAb-CD73.4-IgG2
mAb-CD73.4-IgG1.1f
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.410Vh-hHCIgG2-IgG1.1
珠子+CD73(无抗体)
珠子+CD73+ATP(无抗体)
珠子+CD73+AMP(无抗体)
珠子+CD73+ATP/AMP(无抗体)
珠子(无抗体)
珠子+ATP(无抗体)
珠子+AMP(无抗体)

图21B2

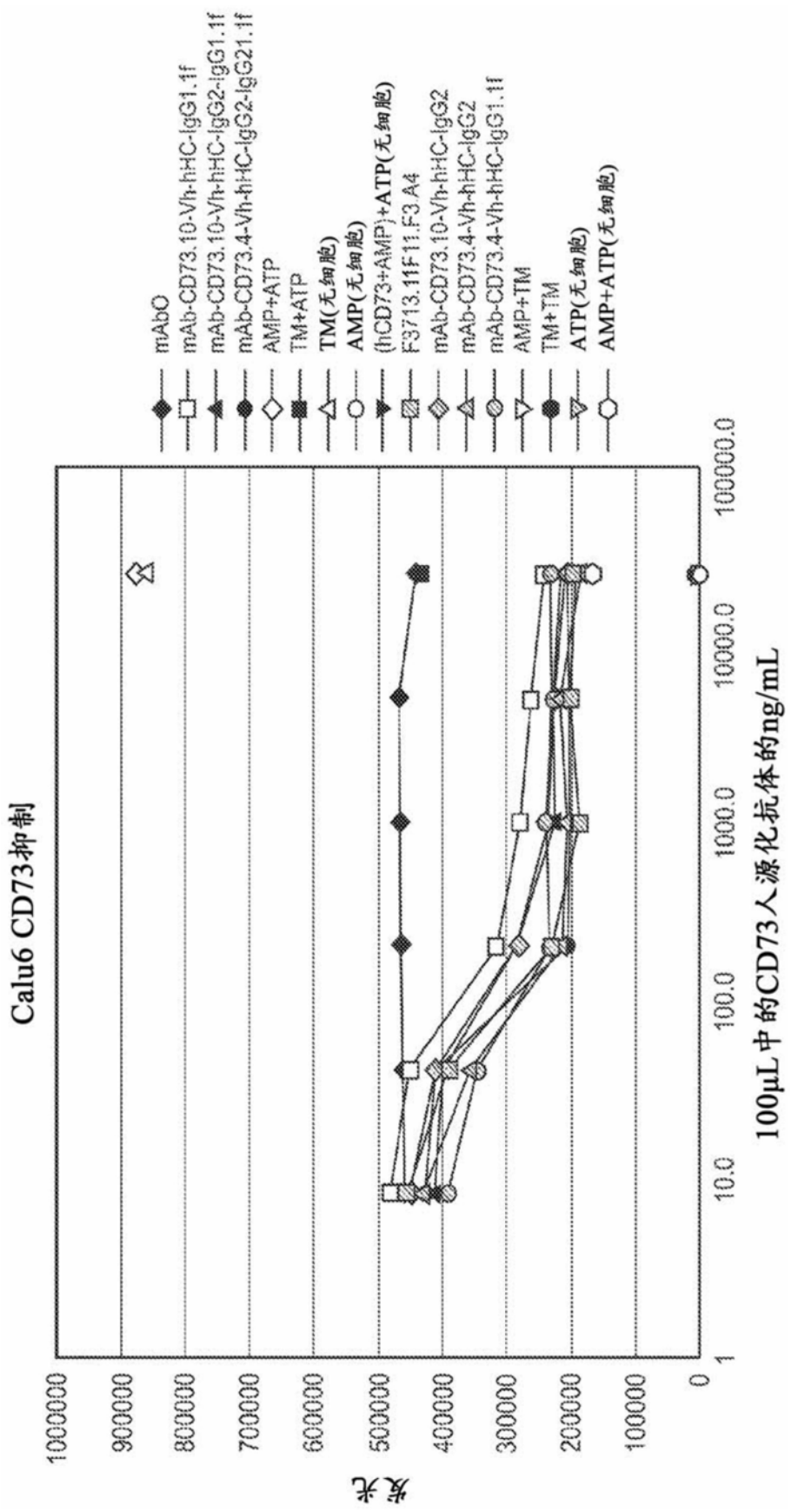

Calu6 CD73抑制
发光
1000000
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
1
10.0
100.0
1000.0
10000.0
100000.0
100μL中的CD73人源化抗体的ng/mL
mAbO
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG21.1f
AMP+ATP
TM+ATP
TM(无细胞)
AMP(无细胞)
(hCD73+AMP)+ATP(无细胞)
F3713.11F11.F3 A4
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f
AMP+TM
TM+TM
ATP(无细胞)
AMP+ATP(无细胞)

图22A1

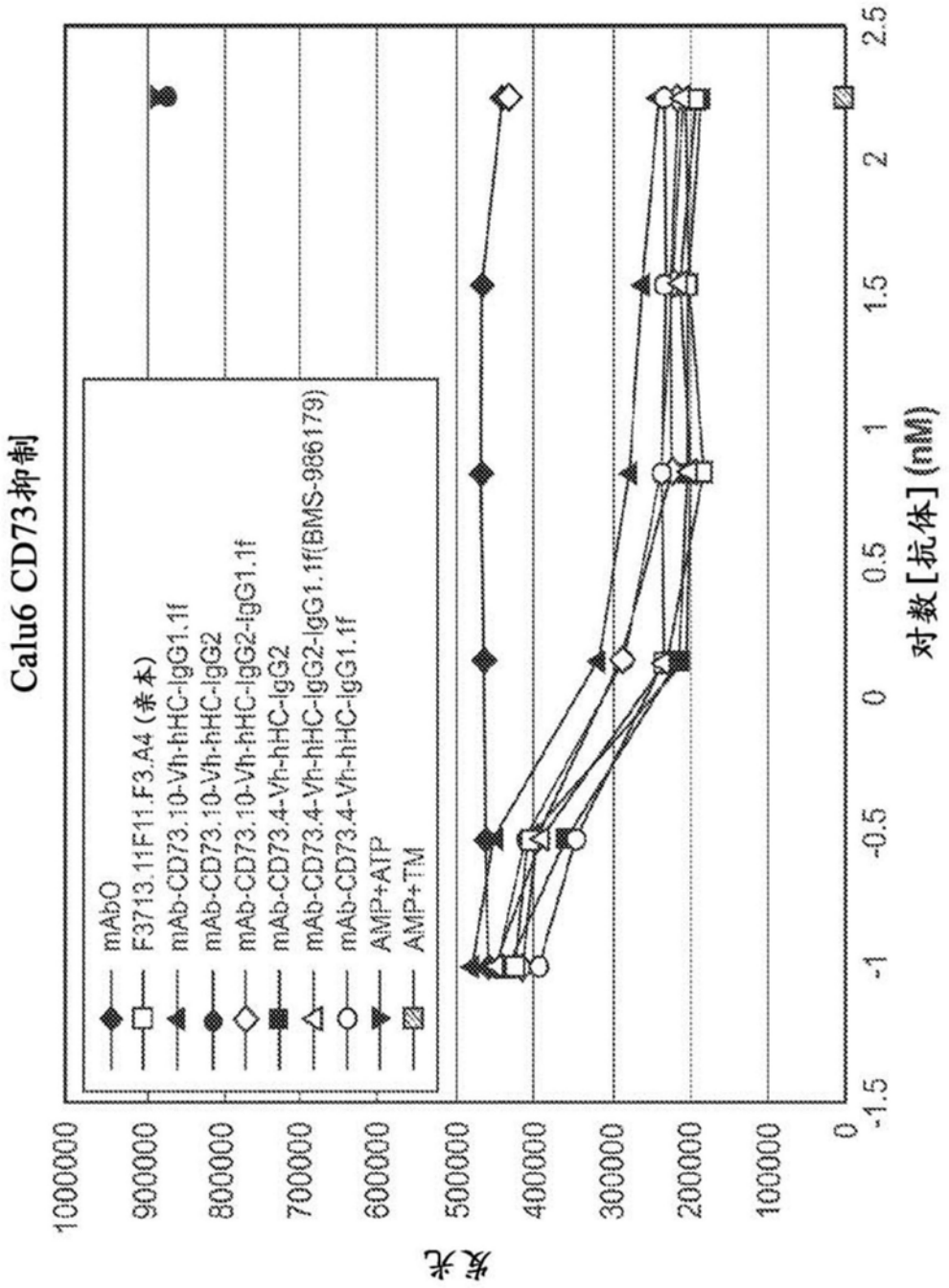

Calu6 CD73抑制
mAbO
F3713.11F11.F3.A4 (亲本)
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f(BMS-986179)
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f
AMP+ATP
AMP+TM
荧光
1000000
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
-1.5
-1
-0.5
0
0.5
1
1.5
2
2.5
对数[抗体](nM)

图22A2

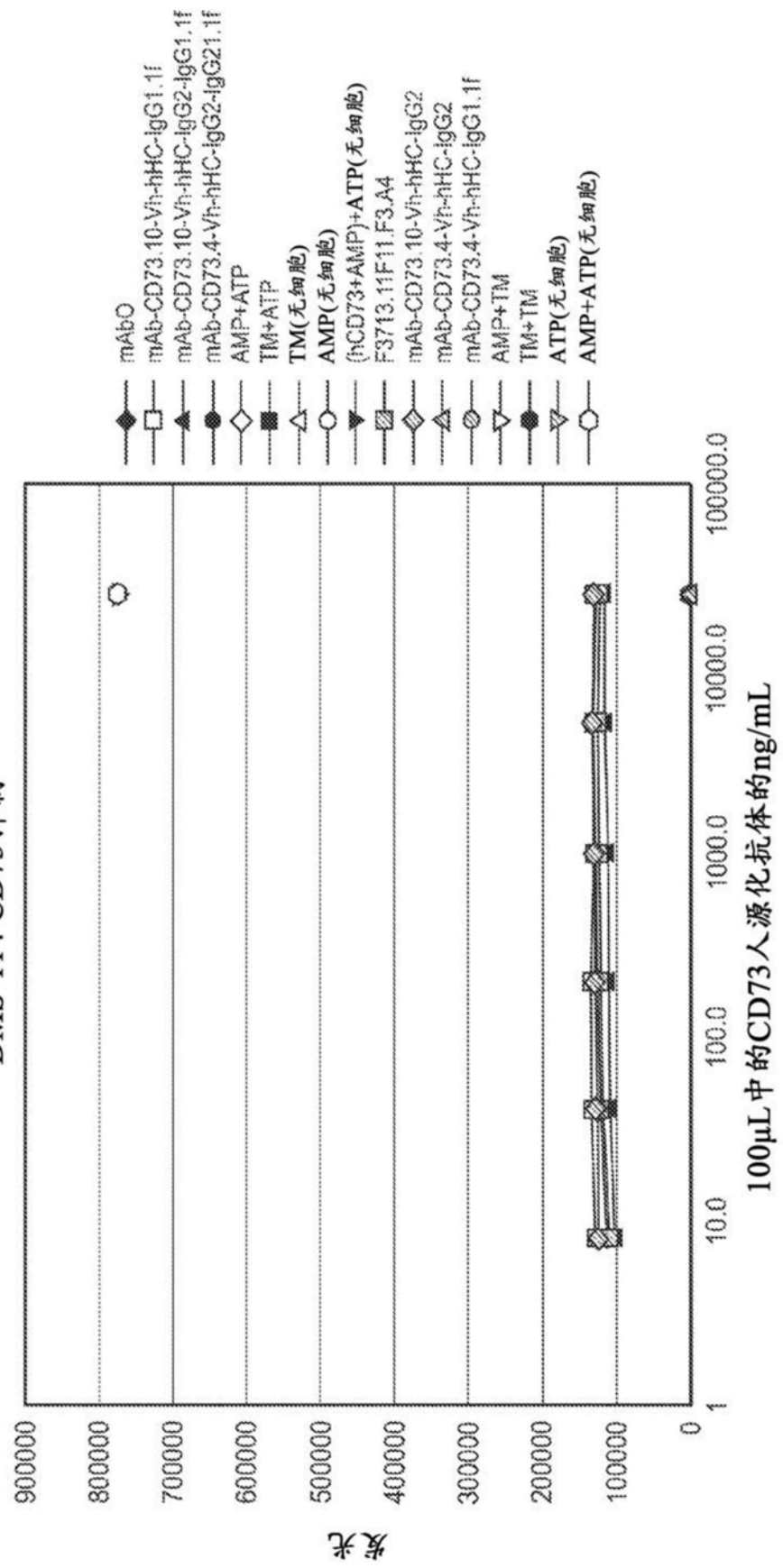

DMS-114 CD73抑制
发光
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
1
10.0
100.0
1000.0
10000.0
100000.0
100μL中的CD73人源化抗体的ng/mL
mAbO
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG21.1f
AMP+ATP
TM+ATP
TM(无细胞)
AMP(无细胞)
(hCD73+AMP)+ATP(无细胞)
F3713.11F11.F3.A4
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f
AMP+TM
TM+TM
ATP(无细胞)
AMP+ATP(无细胞)

图22B1

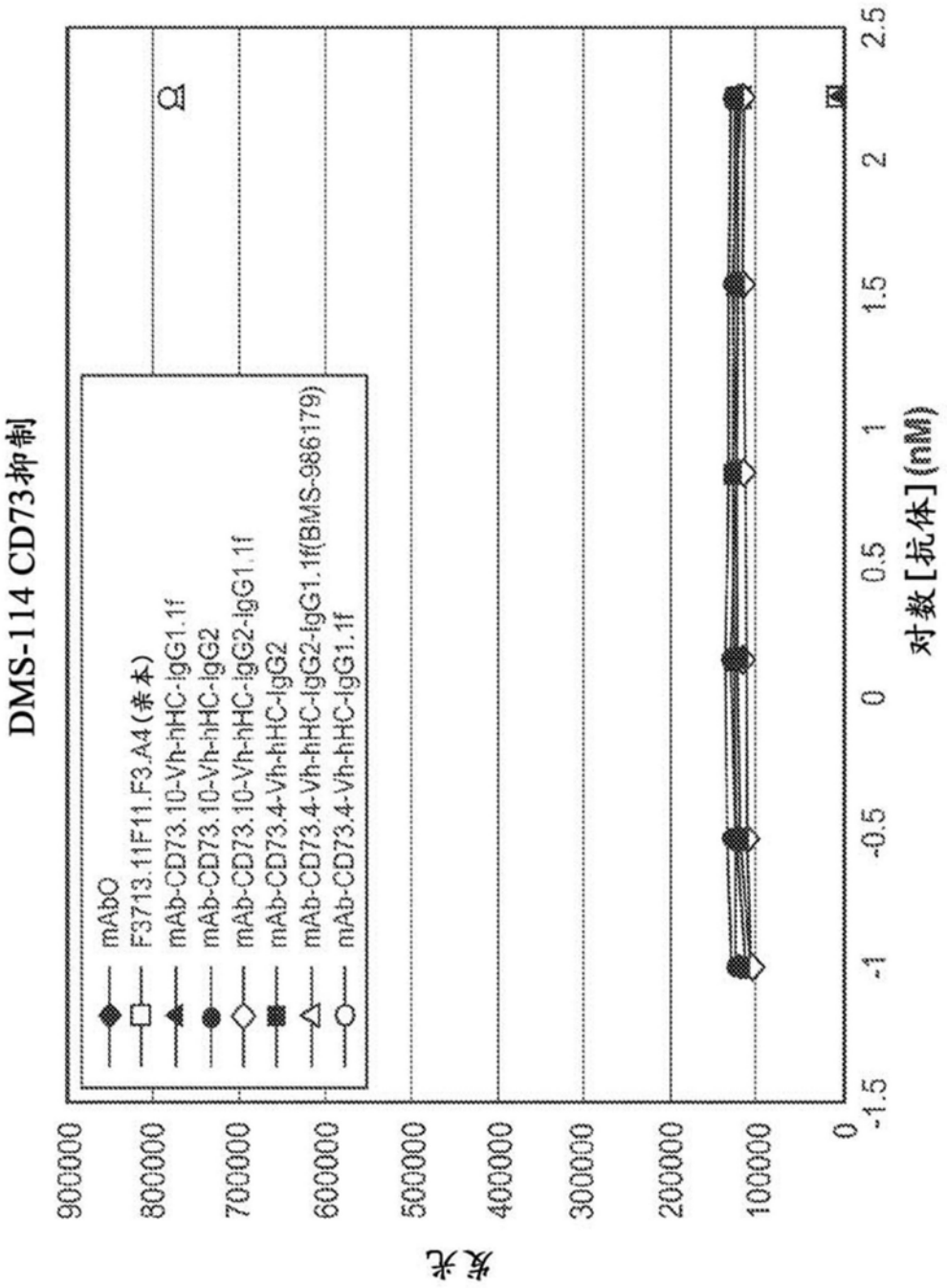

DMS-114 CD73抑制
mAbO
F3713.11F11.F3.A4(亲本)
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f(BMS-986179)
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f
发光
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
-1.5
-1
-0.5
0
0.5
1
1.5
2
2.5
对数[抗体](nM)

图22B2

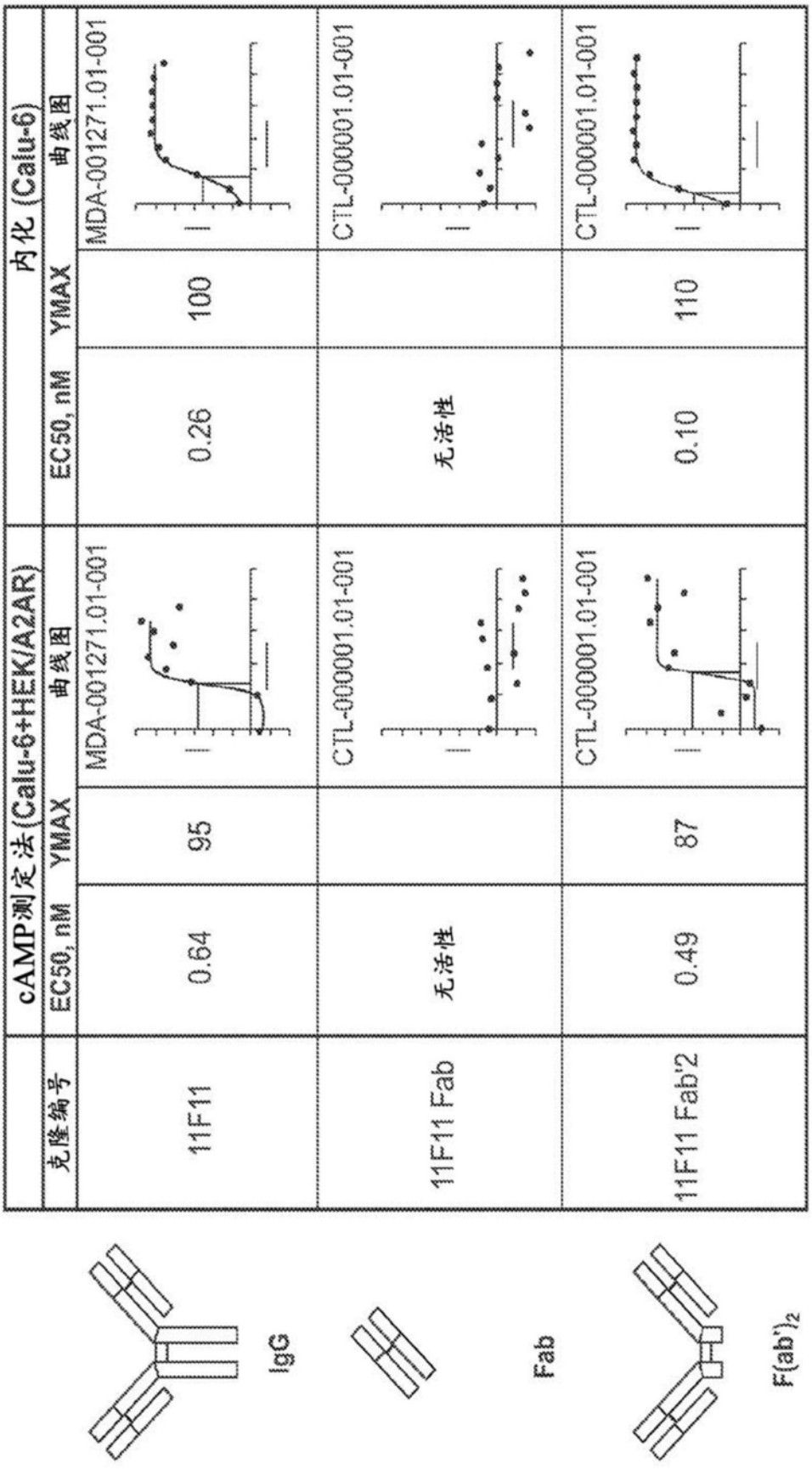

cAMP测定法(Calu-6+HEK/A2AR)
内化 (Calu-6)
克隆编号
EC50, nM
YMAX
曲线图
EC50, nM
YMAX
曲线图
11F11
0.64
95
MDA-001271.01-001
0.26
100
MDA-001271.01-001
11F11 Fab
无活性
CTL-000001.01-001
无活性
CTL-000001.01-001
11F11 Fab'2
0.49
87
CTL-000001.01-001
0.10
110
CTL-000001.01-001
IgG
Fab
F(ab')2

图22C

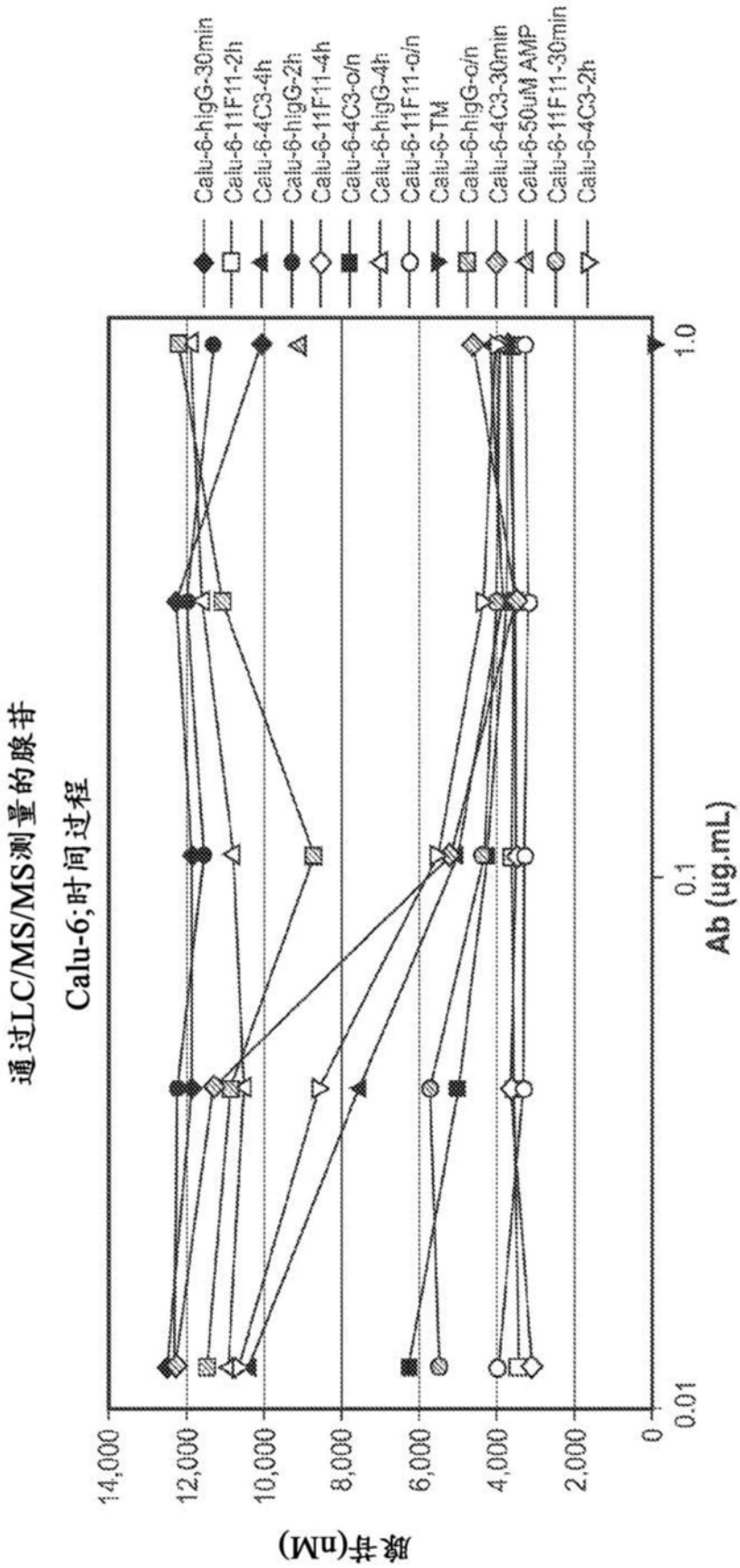

通过LC/MS/MS测量的腺苷
Calu-6;时间过程
腺苷(nM)
14,000
12,000
10,000
8,000
6,000
4,000
2,000
0
0.01
0.1
1.0
Ab (ug.mL)
Calu-6-higG-30min
Calu-6-11F11-2h
Calu-6-4C3-4h
Calu-6-higG-2h
Calu-6-11F11-4h
Calu-6-4C3-o/n
Calu-6-higG-4h
Calu-6-11F11-o/n
Calu-6-TM
Calu-6-higG-o/n
Calu-6-4C3-30min
Calu-6-50uM AMP
Calu-6-11F11-30min
Calu-6-4C3-2h

图22D

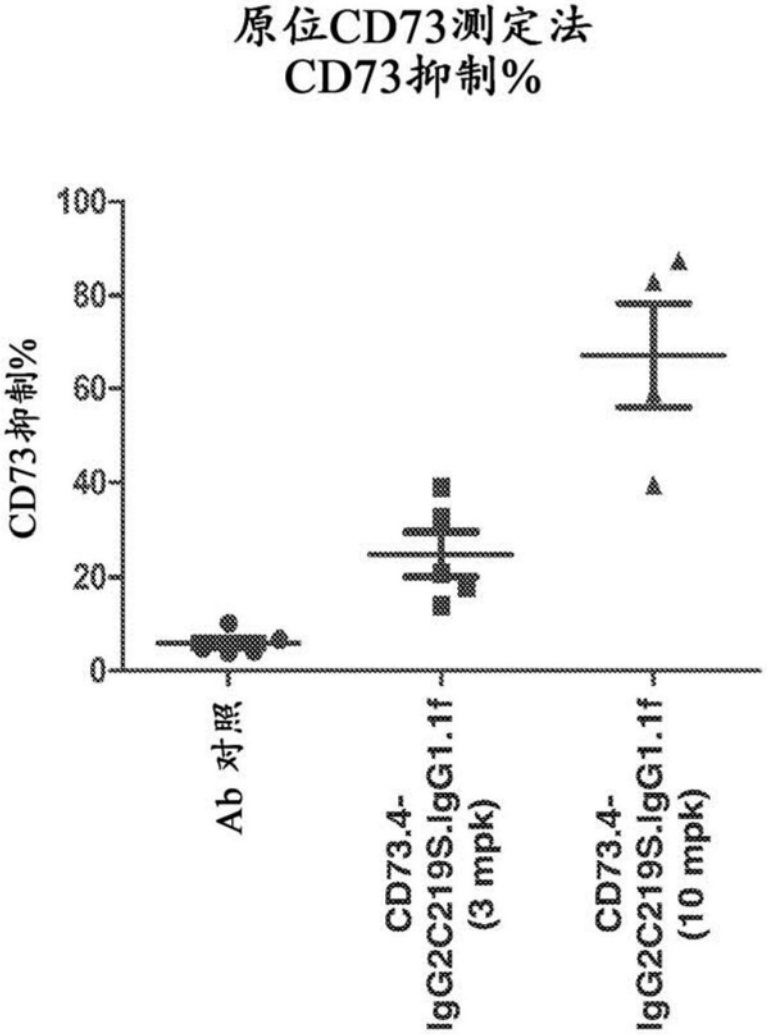

原位CD73测定法
CD73抑制%
CD73抑制%
100
80
60
40
20
0
Ab 对照
CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f (3 mpk)
CD73.4-IgG2C219S.IgG1.1f (10 mpk)

图22E

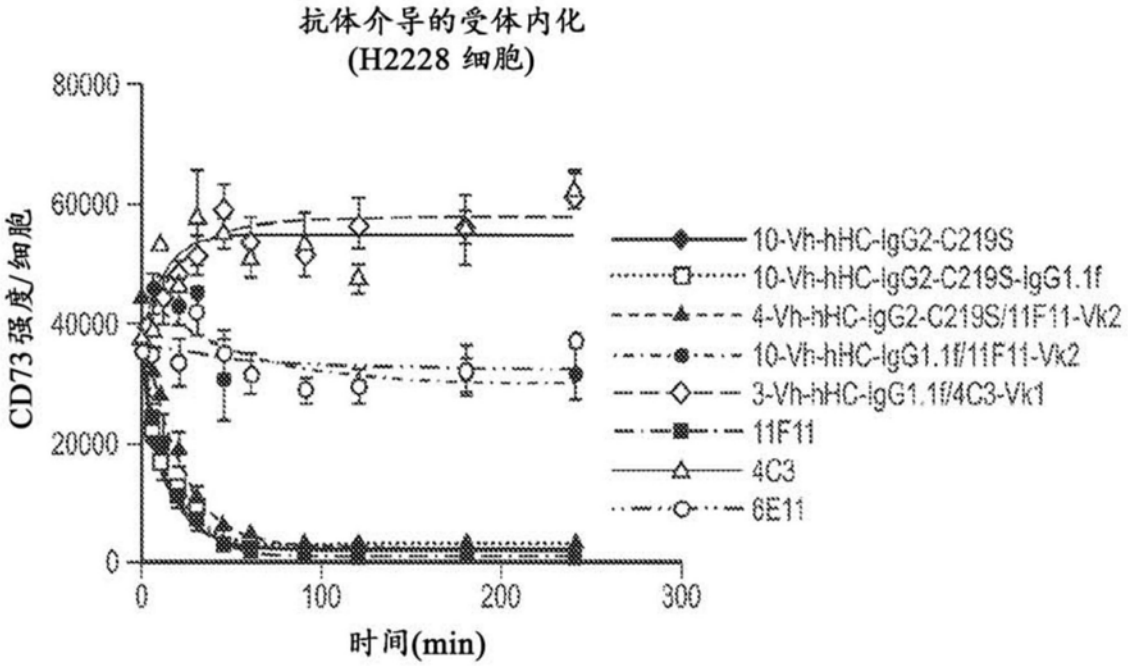

抗体介导的受体内化
(H2228 细胞)
CD73 强度/细胞
80000
60000
40000
20000
0
0
100
200
300
时间(min)
10-Vh-hHC-IgG2-C219S
10-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f
4-Vh-hHC-IgG2-C219S/11F11-Vk2
10-Vh-hHC-IgG1.1f/11F11-Vk2
3-Vh-hHC-IgG1.1f/4C3-Vk1
11F11
4C3
6E11

图23A

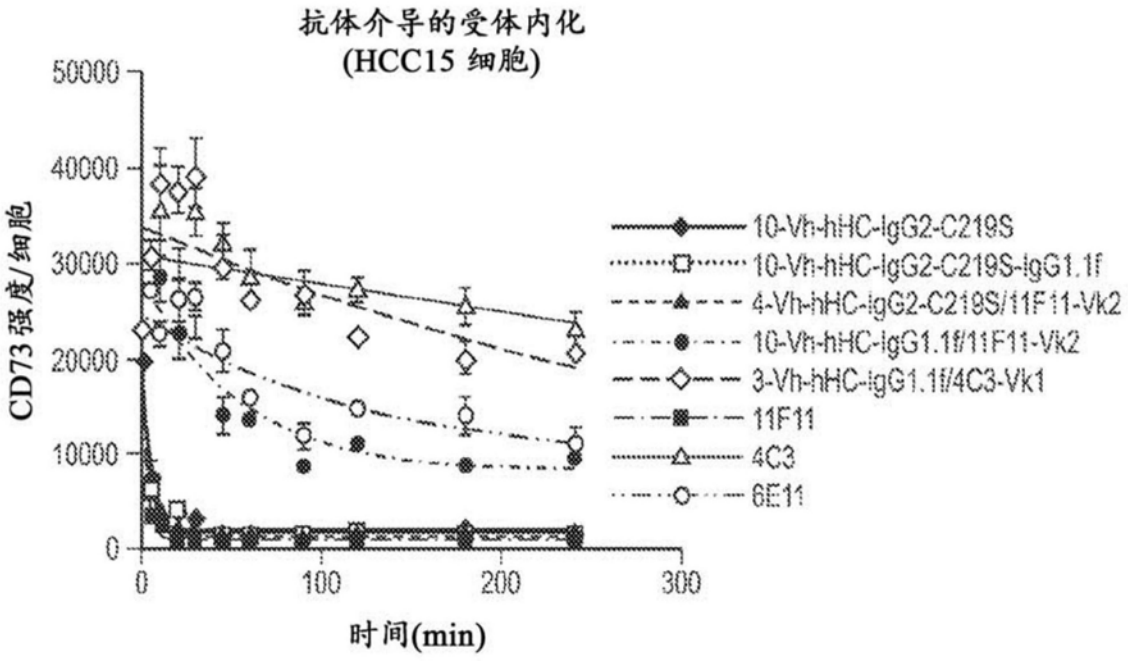

抗体介导的受体内化
(HCC15 细胞)
CD73 强度/细胞
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
100
200
300
时间(min)
10-Vh-hHC-IgG2-C219S
10-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f
4-Vh-hHC-IgG2-C219S/11F11-Vk2
10-Vh-hHC-IgG1.1f/11F11-Vk2
3-Vh-hHC-IgG1.1f/4C3-Vk1
11F11
4C3
6E11

图23B

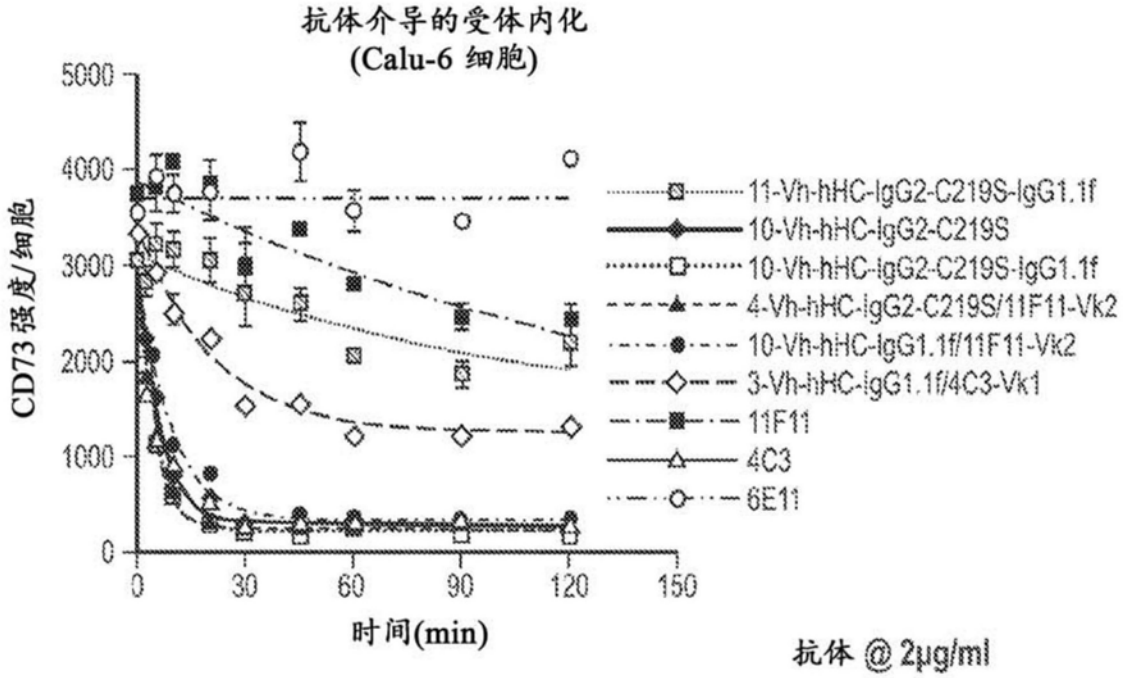

抗体介导的受体内化
(Calu-6 细胞)
CD73 强度/细胞
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
30
60
90
120
150
时间(min)
11-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f
10-Vh-hHC-IgG2-C219S
10-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f
4-Vh-hHC-IgG2-C219S/11F11-Vk2
10-Vh-hHC-IgG1.1f/11F11-Vk2
3-Vh-hHC-IgG1.1f/4C3-Vk1
11F11
4C3
6E11
抗体 @ 2μg/ml

图23C

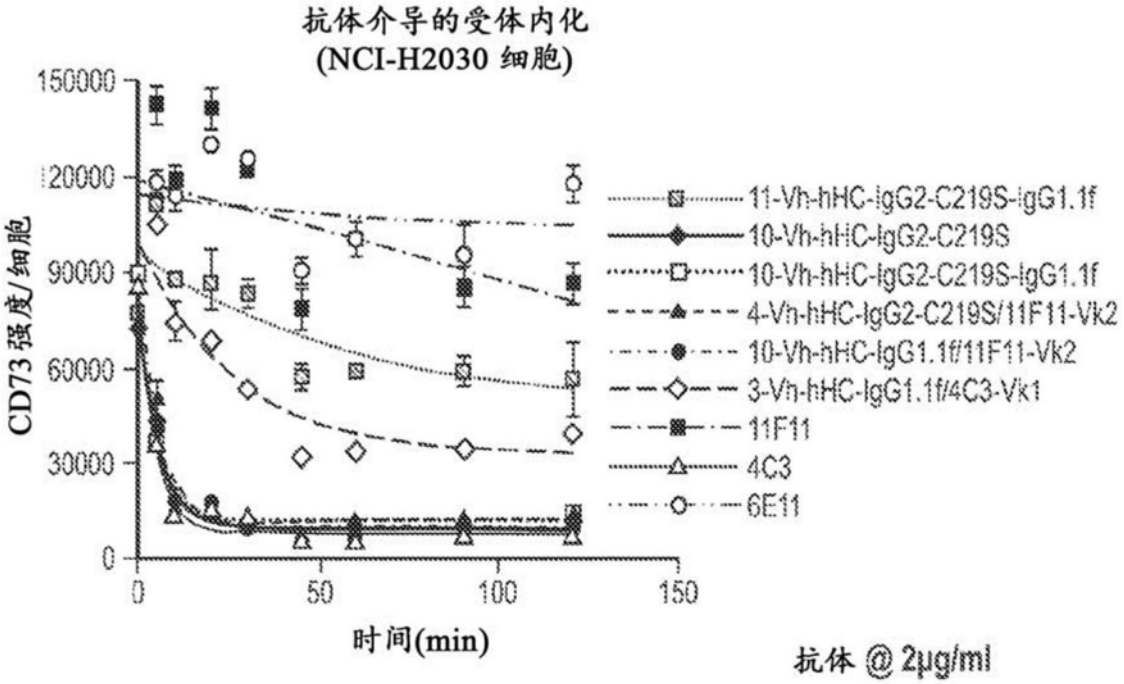

抗体介导的受体内化
(NCI-H2030 细胞)
CD73 强度/细胞
150000
120000
90000
60000
30000
0
0
50
100
150
时间(min)
11-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f
10-Vh-hHC-IgG2-C219S
10-Vh-hHC-IgG2-C219S-IgG1.1f
4-Vh-hHC-IgG2-C219S/11F11-Vk2
10-Vh-hHC-IgG1.1f/11F11-Vk2
3-Vh-hHC-IgG1.1f/4C3-Vk1
11F11
4C3
6E11
抗体 @ 2μg/ml

图23D

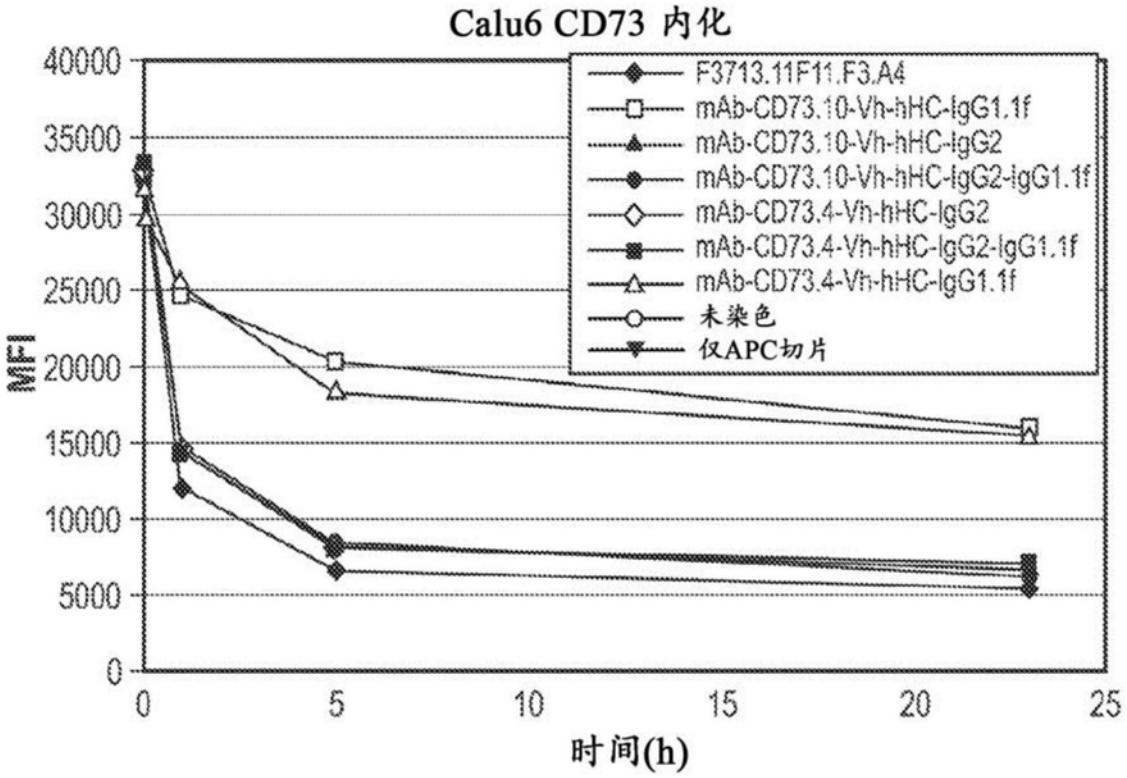

Calu6 CD73 内化
MFI
时间(h)
F3713.11F11.F3.A4
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f
未染色
仅APC切片

图23E

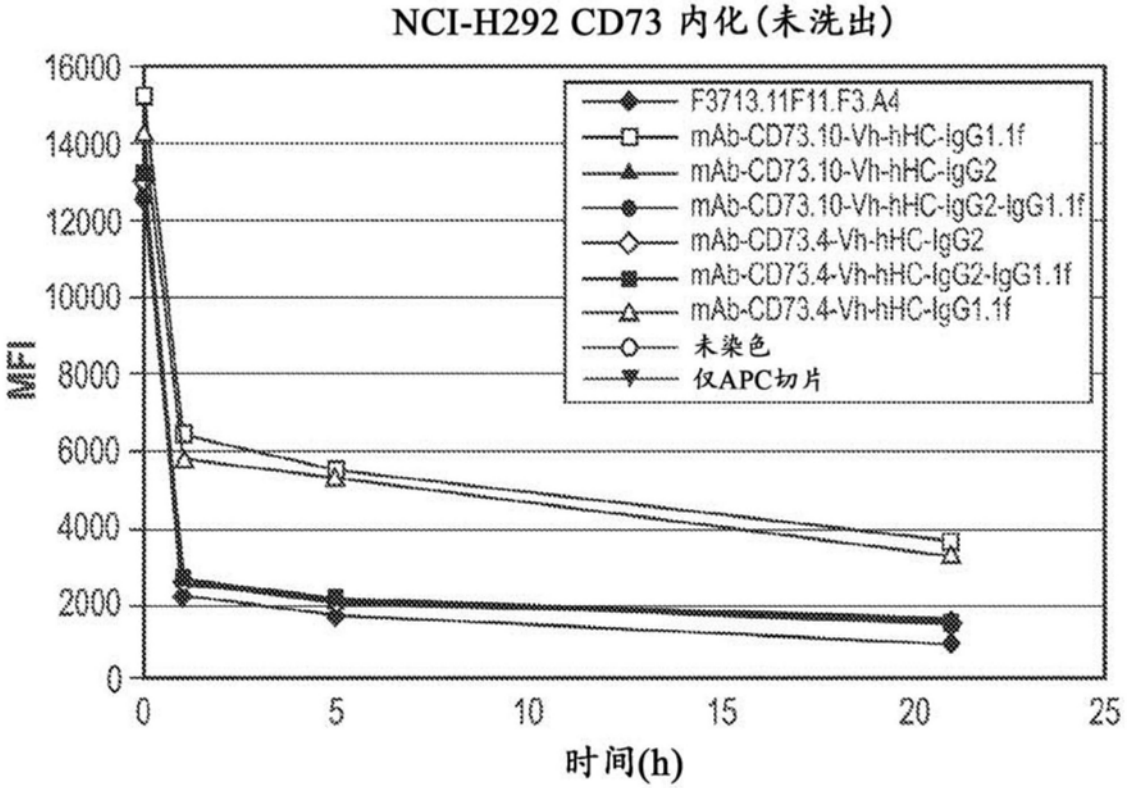

NCI-H292 CD73 内化(未洗出)
MFI
时间(h)
F3713.11F11.F3.A4
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG1.1f
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.10-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG2-IgG1.1f
mAb-CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f
未染色
仅APC切片

图23F

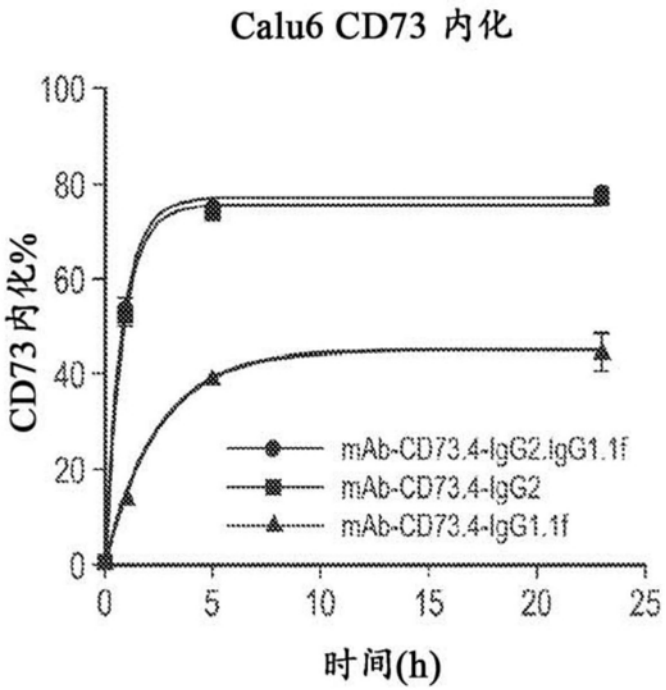

Calu6 CD73 内化
CD73 内化%
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
时间(h)
mAb-CD73.4-IgG2.IgG1.1f
mAb-CD73.4-IgG2
mAb-CD73.4-IgG1.1f

图23G

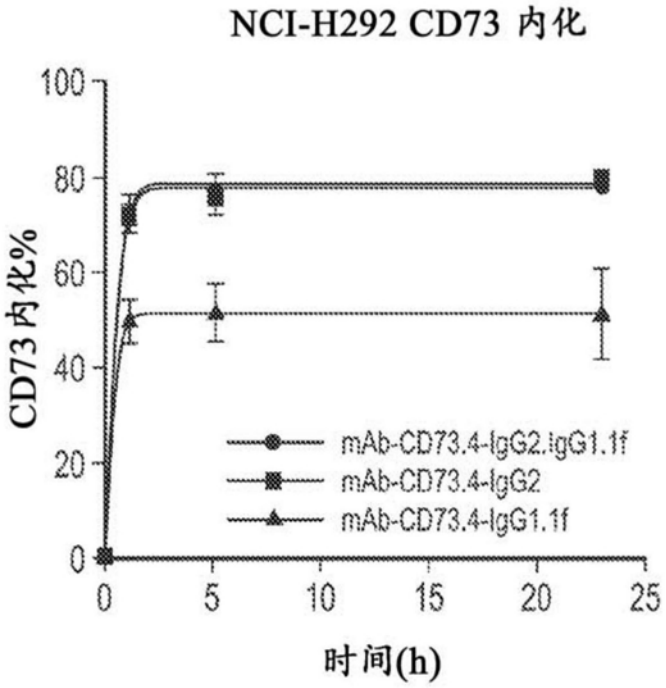

NCI-H292 CD73 内化
CD73 内化%
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
时间(h)
mAb-CD73.4-IgG2.IgG1.1f
mAb-CD73.4-IgG2
mAb-CD73.4-IgG1.1f

图23H

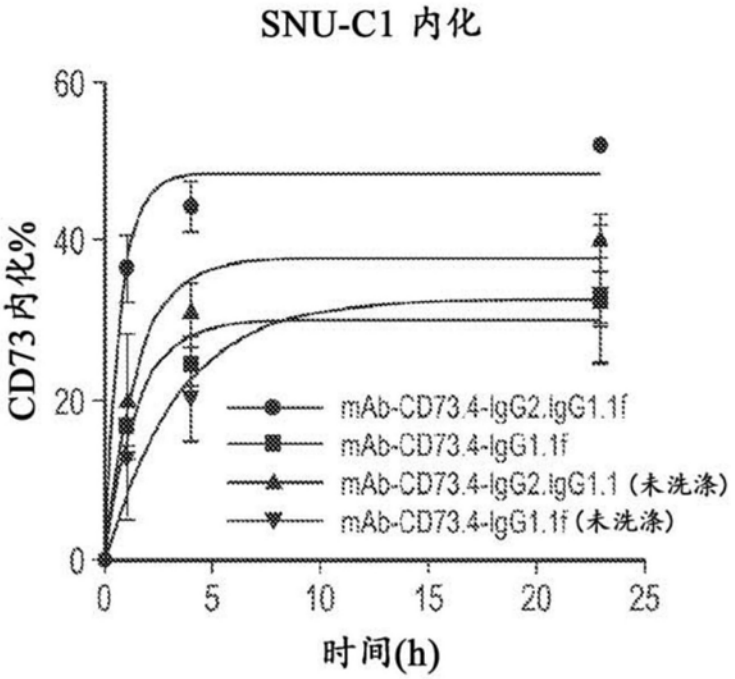

SNU-C1 内化
CD73 内化%
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
时间(h)
mAb-CD73.4-IgG2.IgG1.1f
mAb-CD73.4-IgG1.1f
mAb-CD73.4-IgG2.IgG1.1 (未洗涤)
mAb-CD73.4-IgG1.1f (未洗涤)

图23I

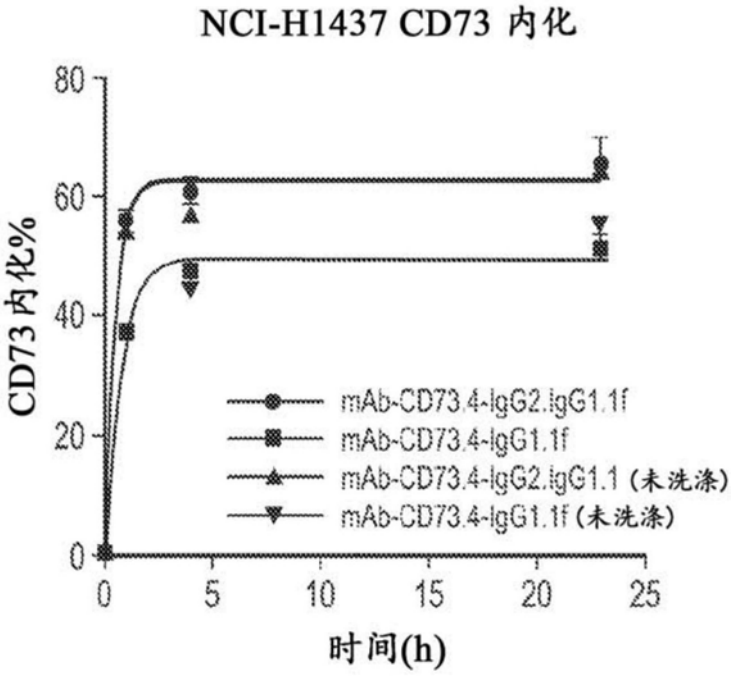

NCI-H1437 CD73 内化
CD73 内化%
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
时间(h)
mAb-CD73.4-IgG2.IgG1.1f
mAb-CD73.4-IgG1.1f
mAb-CD73.4-IgG2.IgG1.1 (未洗涤)
mAb-CD73.4-IgG1.1f (未洗涤)

图23J

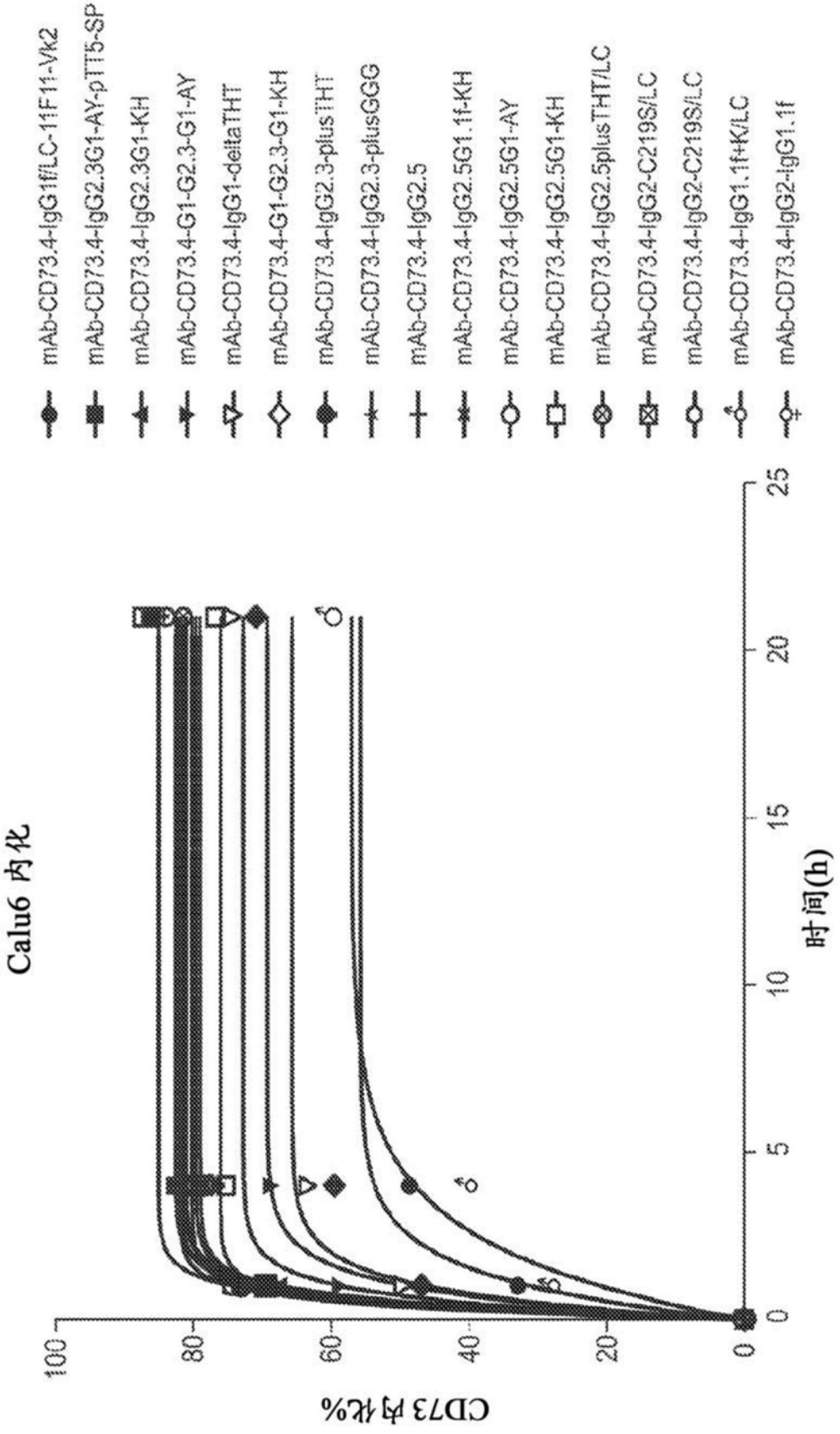

Calu6 内化
CD73 内化%
时间(h)
0
20
40
60
80
100
0
5
10
15
20
25
mAb-CD73.4-IgG1f/LC-11F11-Vk2
mAb-CD73.4-IgG2.3G1-AY-pTT5-SP
mAb-CD73.4-IgG2.3G1-KH
mAb-CD73.4-G1-G2.3-G1-AY
mAb-CD73.4-IgG1-deltaTHT
mAb-CD73.4-G1-G2.3-G1-KH
mAb-CD73.4-IgG2.3-plusTHT
mAb-CD73.4-IgG2.3-plusGGG
mAb-CD73.4-IgG2.5
mAb-CD73.4-IgG2.5G1.1f-KH
mAb-CD73.4-IgG2.5G1-AY
mAb-CD73.4-IgG2.5G1-KH
mAb-CD73.4-IgG2.5plusTHT/LC
mAb-CD73.4-IgG2-C219S/LC
mAb-CD73.4-IgG2-C219S/LC
mAb-CD73.4-IgG1.1f-K/LC
mAb-CD73.4-IgG2-IgG1.1f

图23K

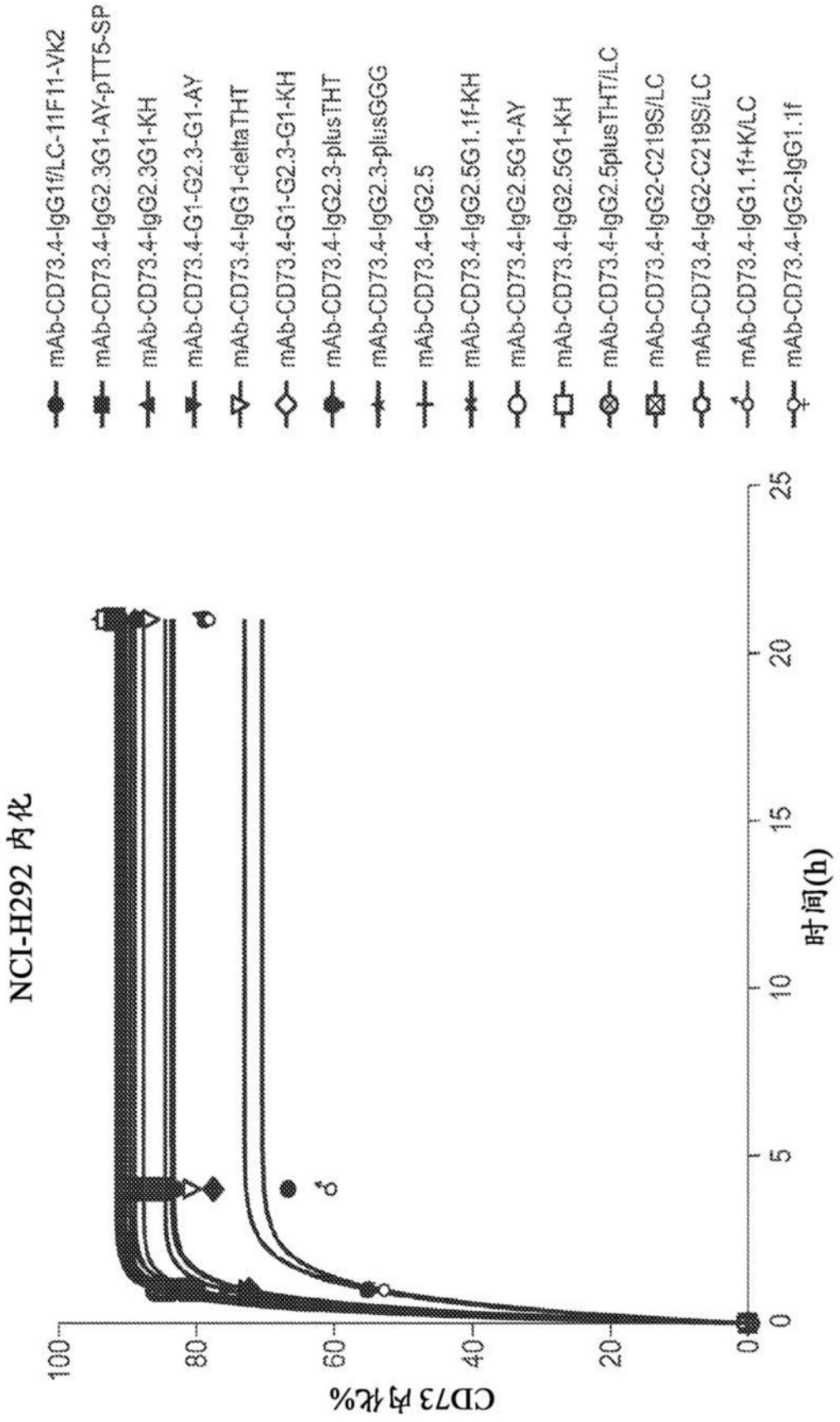

NCI-H292 内化
CD73 内化%
时间(h)
0
20
40
60
80
100
0
5
10
15
20
25
mAb-CD73.4-IgG1f/LC-11F11-Vk2
mAb-CD73.4-IgG2.3G1-AY-pTT5-SP
mAb-CD73.4-IgG2.3G1-KH
mAb-CD73.4-G1-G2.3-G1-AY
mAb-CD73.4-IgG1-deltaTHT
mAb-CD73.4-G1-G2.3-G1-KH
mAb-CD73.4-IgG2.3-plusTHT
mAb-CD73.4-IgG2.3-plusGGG
mAb-CD73.4-IgG2.5
mAb-CD73.4-IgG2.5G1.1f-KH
mAb-CD73.4-IgG2.5G1-AY
mAb-CD73.4-IgG2.5G1-KH
mAb-CD73.4-IgG2.5plusTHT/LC
mAb-CD73.4-IgG2-C219S/LC
mAb-CD73.4-IgG2-C219S/LC
mAb-CD73.4-IgG1.1f+K/LC
mAb-CD73.4-IgG2-IgG1.1f

图23L

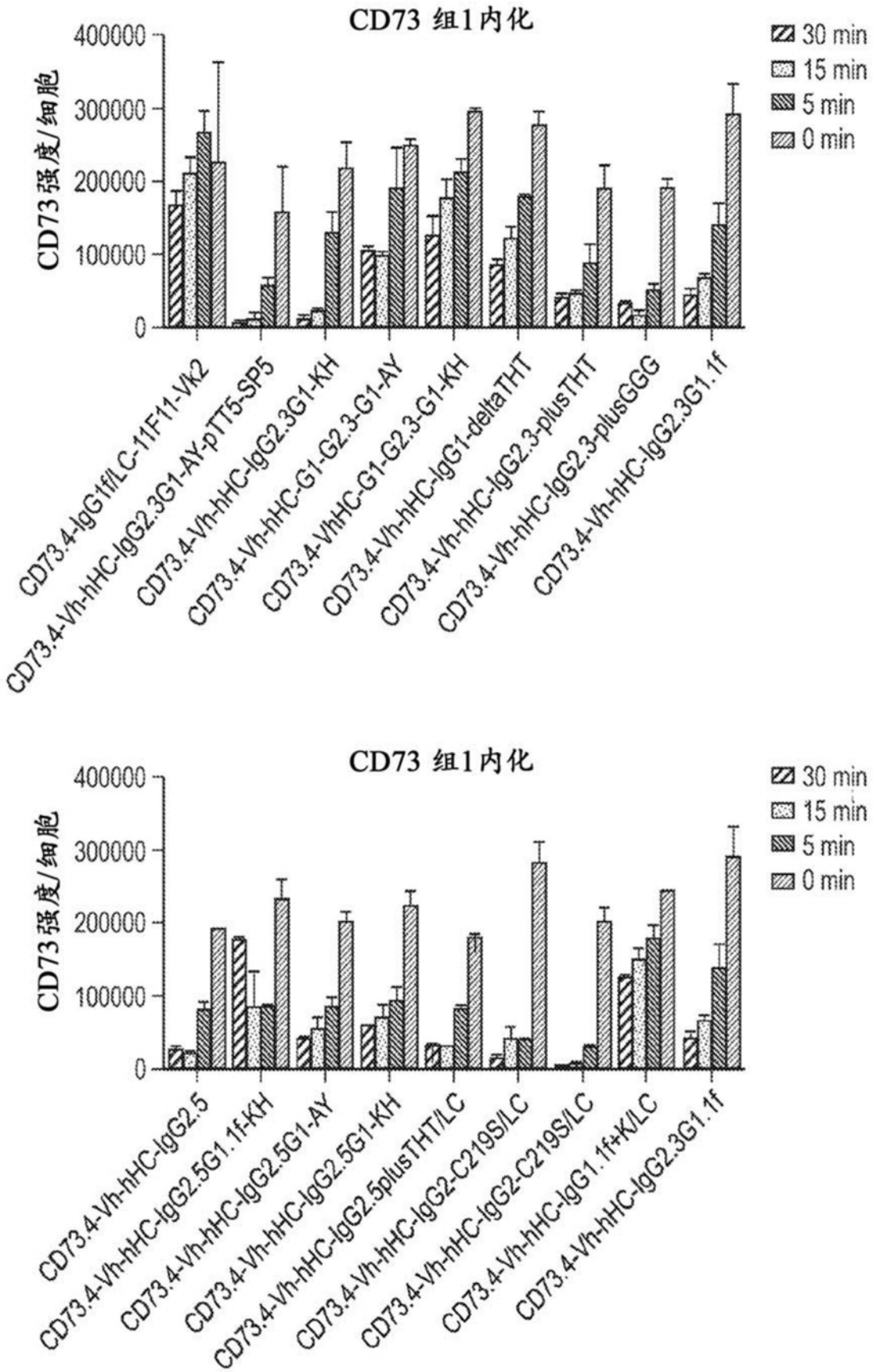

CD73 组1内化
CD73强度/细胞
400000
300000
200000
100000
0
30 min
15 min
5 min
0 min
CD73.4-IgG1f/LC-11F11-Vk2
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3G1-AY-pTT5-SP5
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3G1-KH
CD73.4-Vh-hHC-G1-G2.3-G1-AY
CD73.4-VhHC-G1-G2.3-G1-KH
CD73.4-Vh-hHC-IgG1-deltaTHT
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3-plusTHT
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3-plusGGG
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3G1.1f
CD73 组1内化
CD73强度/细胞
400000
300000
200000
100000
0
30 min
15 min
5 min
0 min
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5G1.1f-KH
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5G1-AY
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5G1-KH
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.5plusTHT/LC
CD73.4-Vh-hHC-IgG2-C219S/LC
CD73.4-Vh-hHC-IgG2-C219S/LC
CD73.4-Vh-hHC-IgG1.1f+K/LC
CD73.4-Vh-hHC-IgG2.3G1.1f

图23M

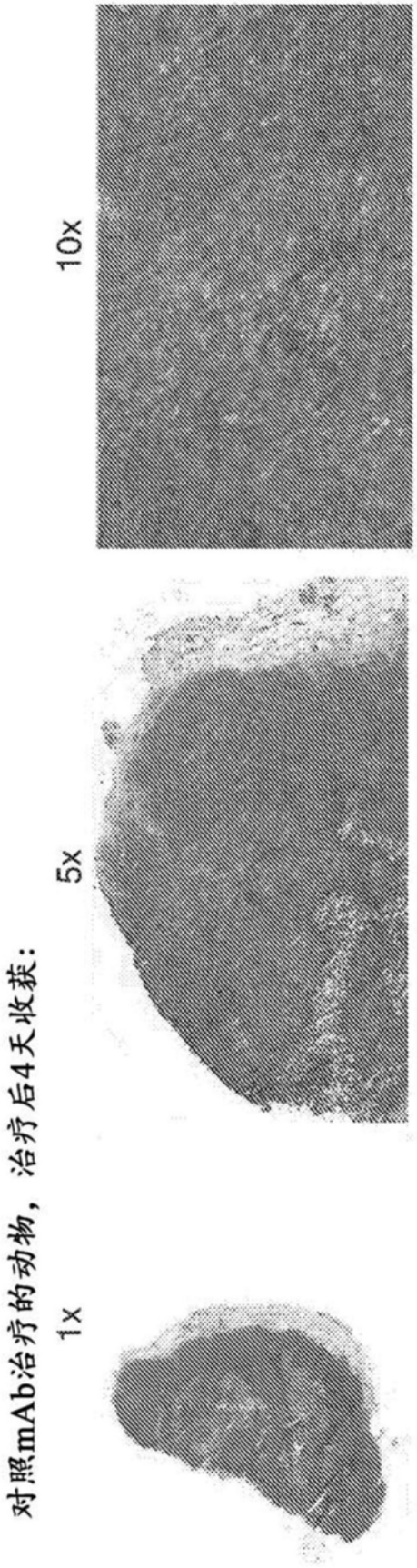


图24A

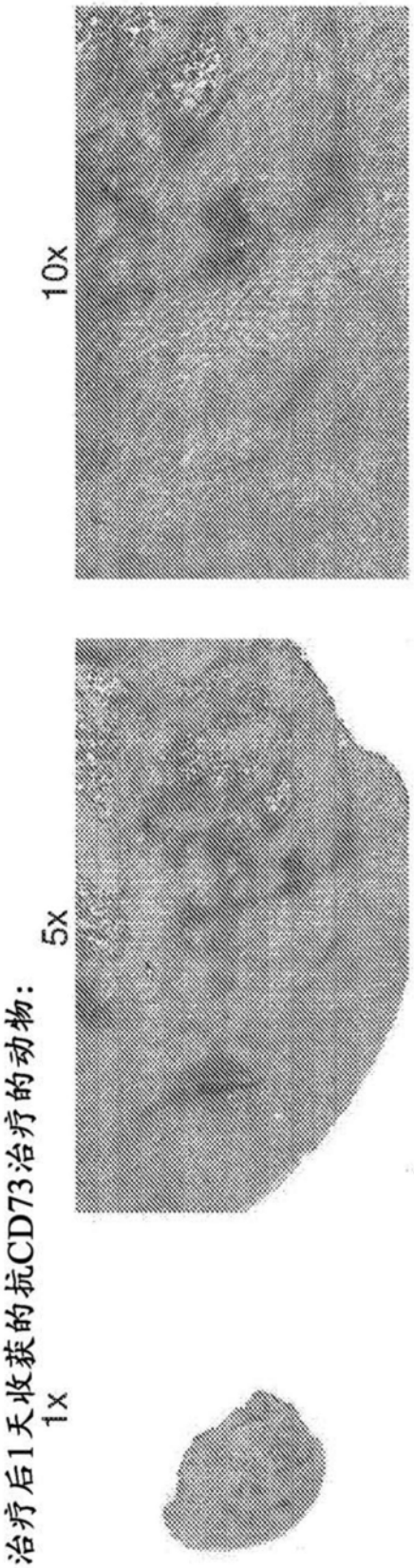


图24B

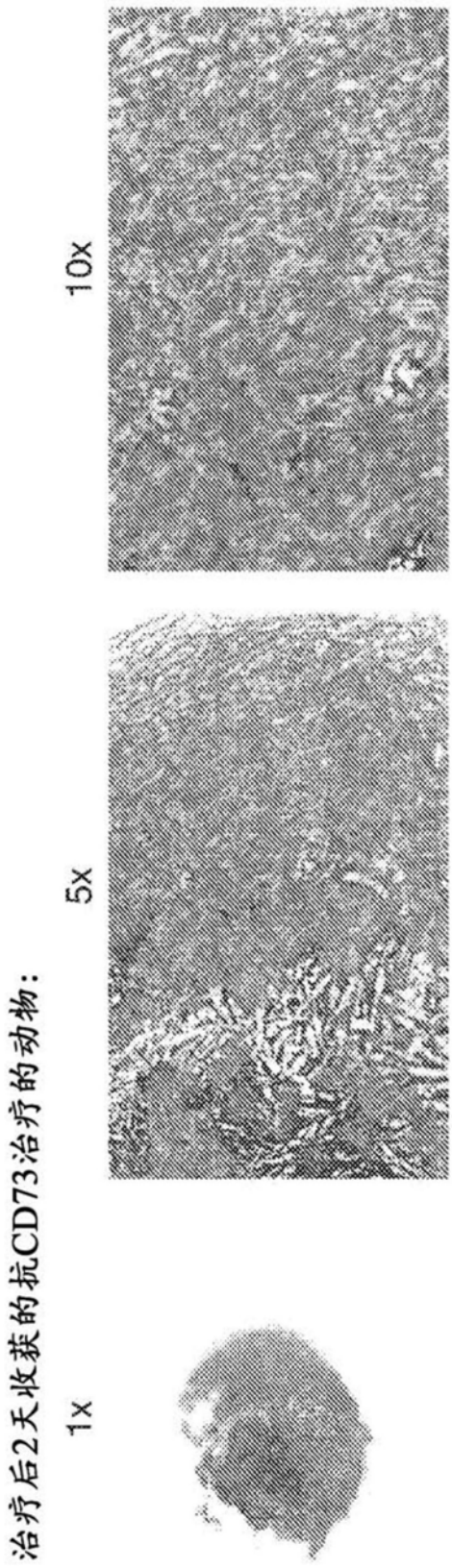


图24C

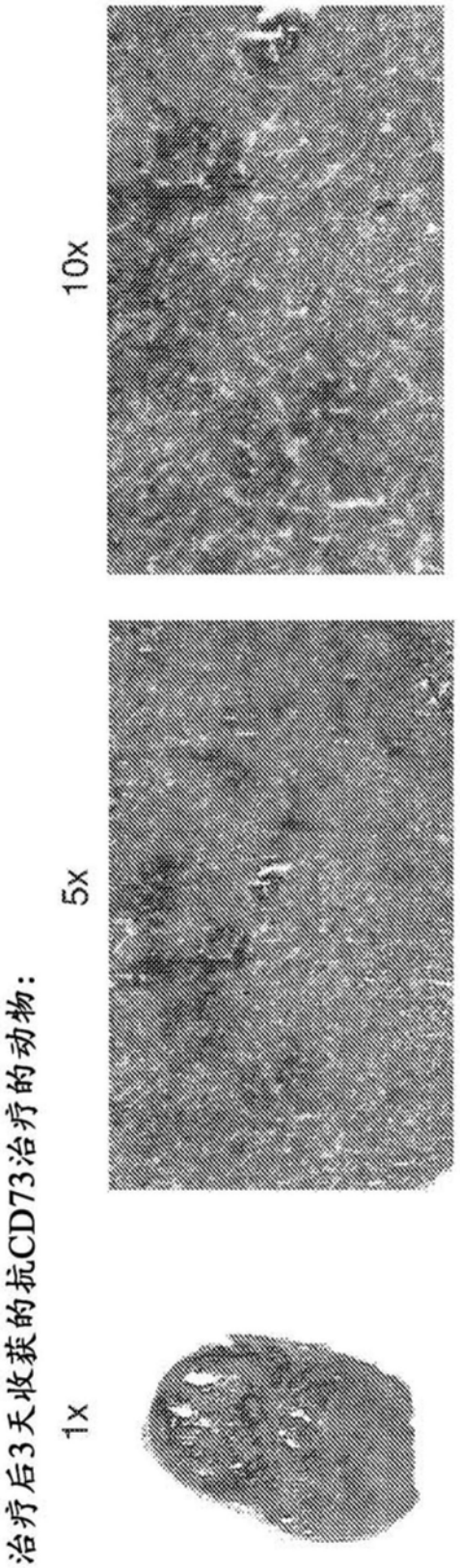


图24D

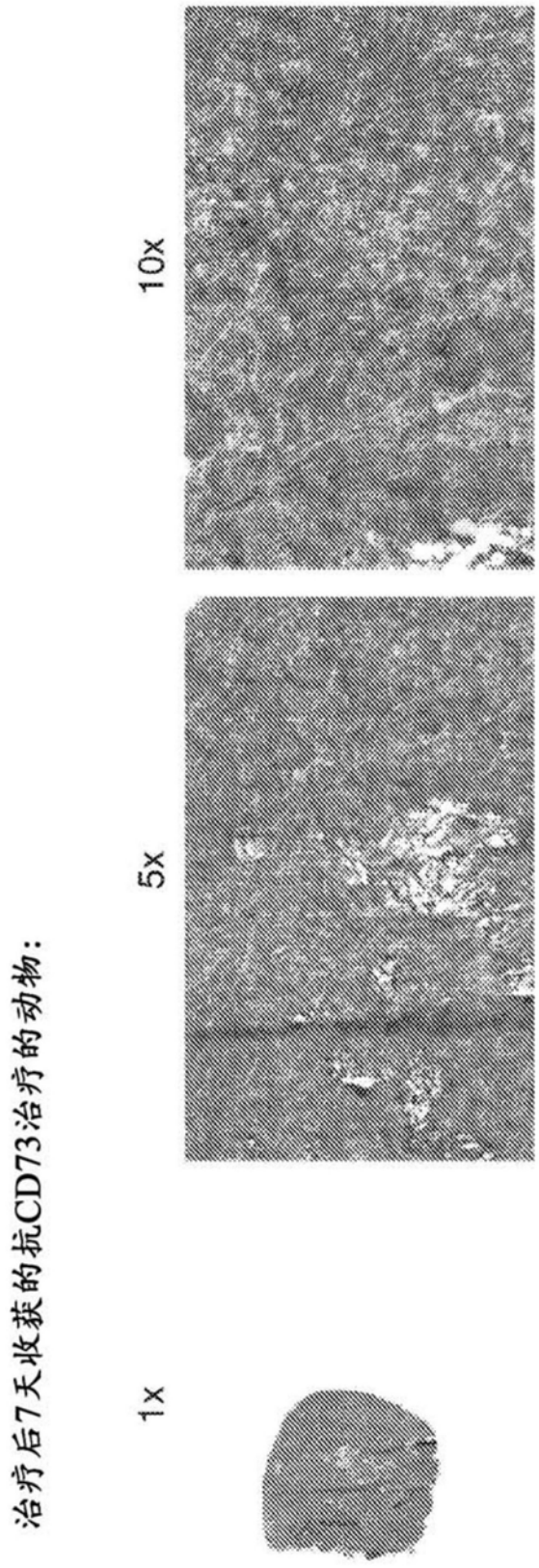


图24E

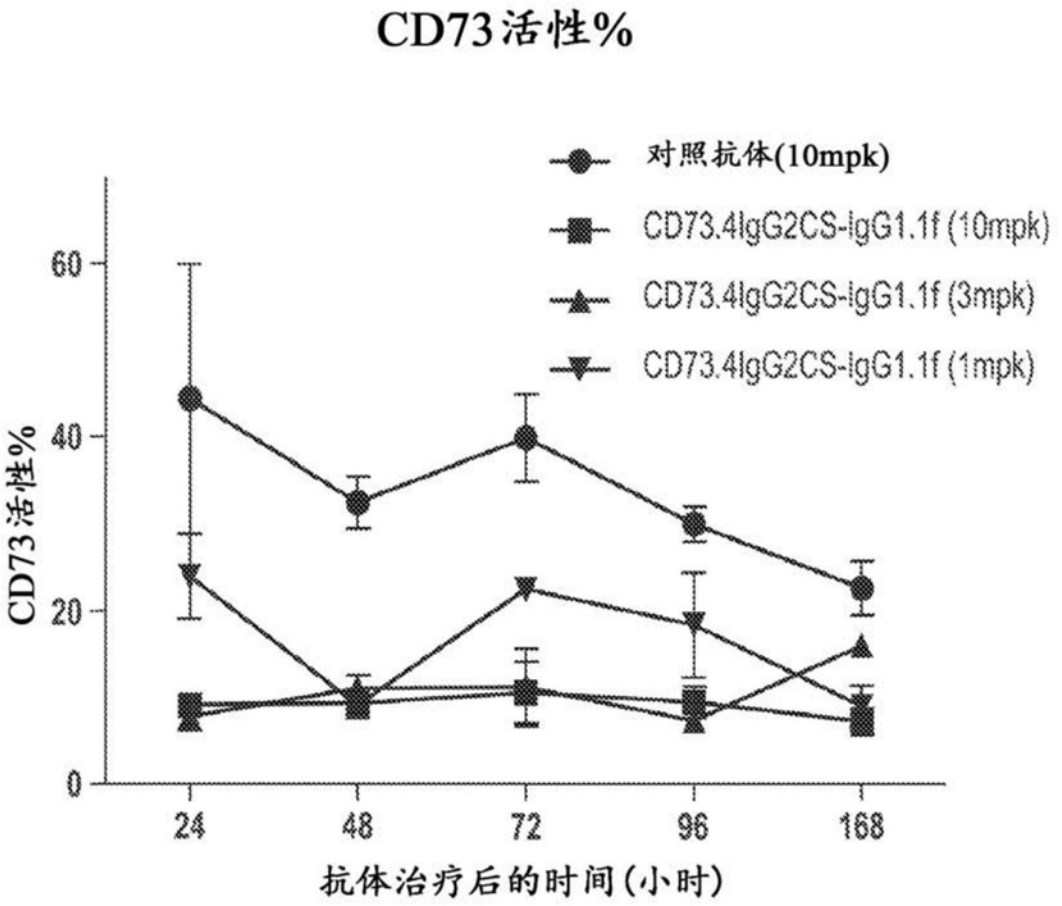

CD73活性%
对照抗体(10mpk)
CD73.4IgG2CS-IgG1.1f (10mpk)
CD73.4IgG2CS-IgG1.1f (3mpk)
CD73.4IgG2CS-IgG1.1f (1mpk)
CD73活性%
0
20
40
60
24
48
72
96
168
抗体治疗后的时间(小时)

图24F

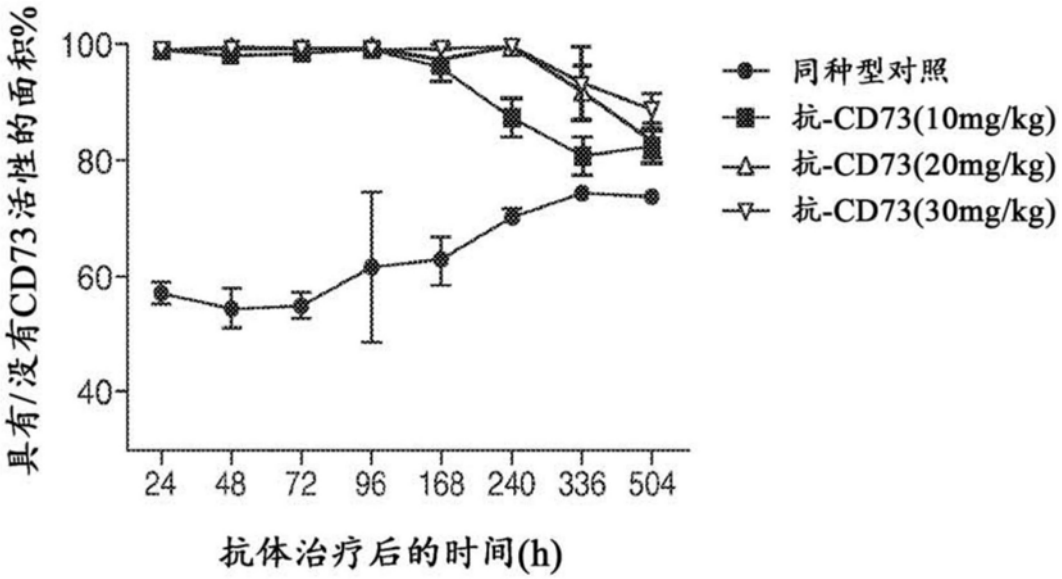

具有/没有CD73活性的面积%
100
80
60
40
24
48
72
96
168
240
336
504
抗体治疗后的时间(h)
同种型对照
抗-CD73(10mg/kg)
抗-CD73(20mg/kg)
抗-CD73(30mg/kg)

图24G

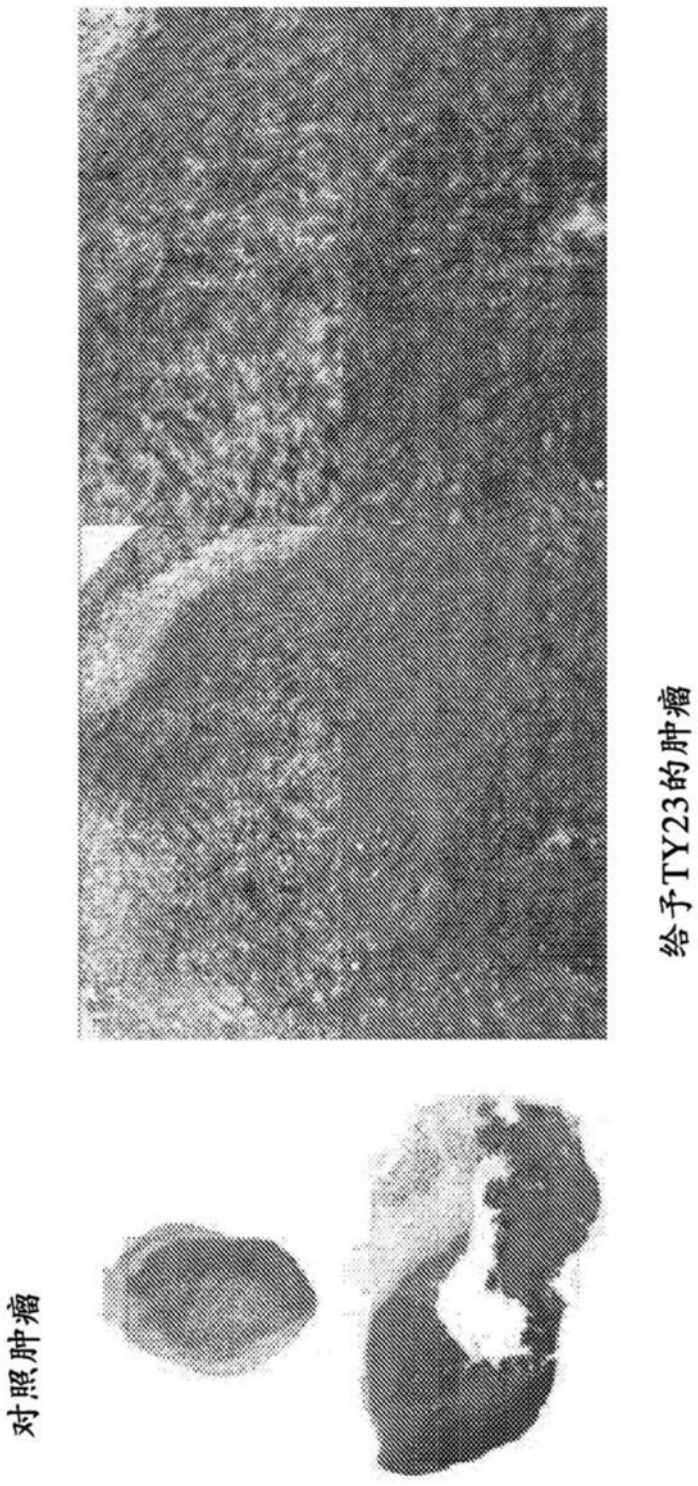


图25A

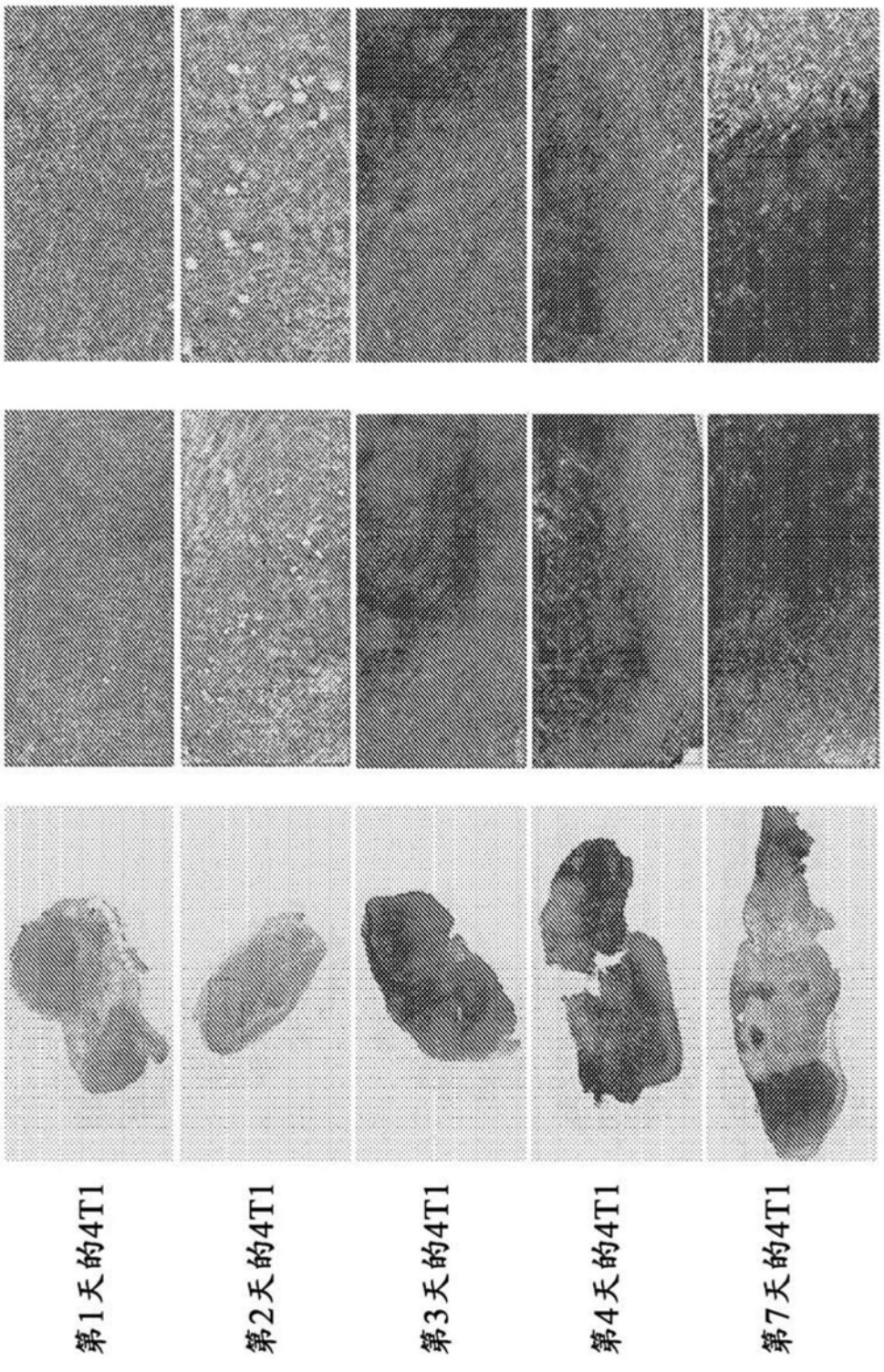


图25B

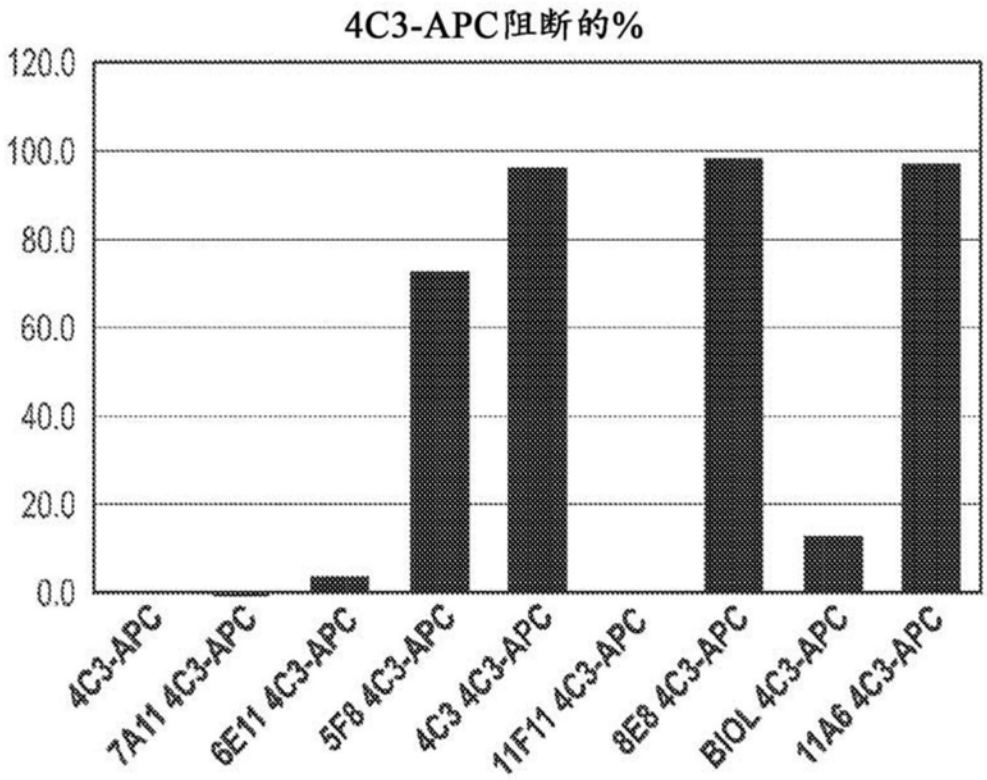

4C3-APC阻断的%
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
4C3-APC
7A11 4C3-APC
6E11 4C3-APC
5F8 4C3-APC
4C3 4C3-APC
11F11 4C3-APC
8E8 4C3-APC
BIOL 4C3-APC
11A6 4C3-APC

图26A

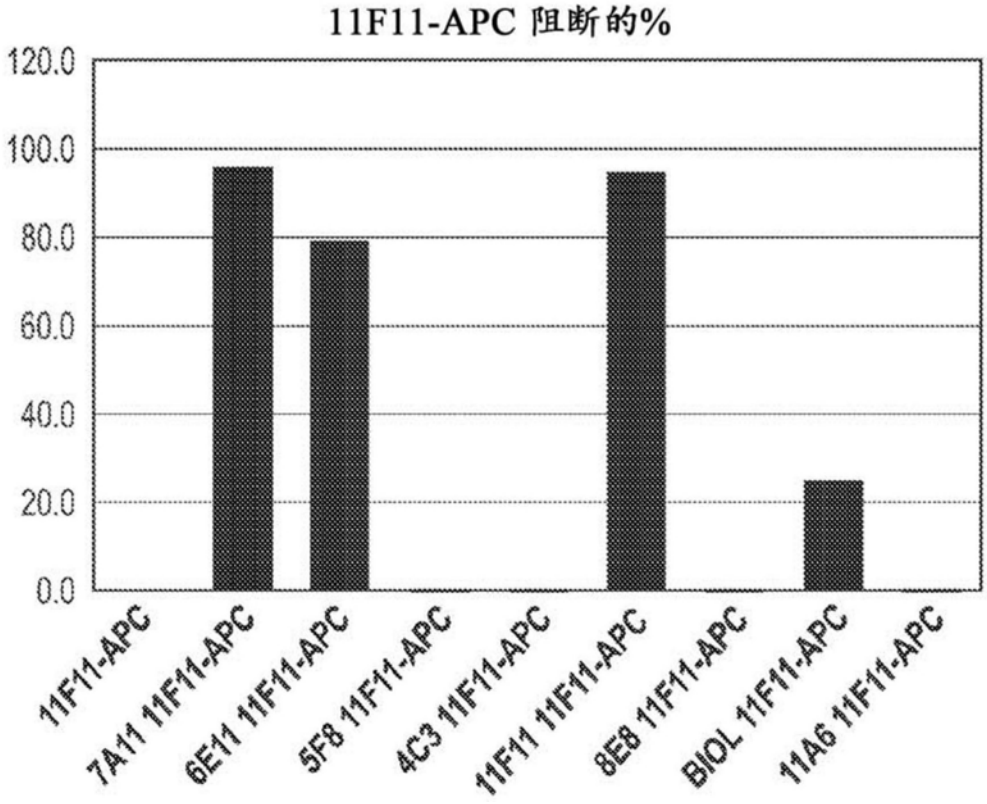

11F11-APC 阻断的%
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
11F11-APC
7A11 11F11-APC
6E11 11F11-APC
5F8 11F11-APC
4C3 11F11-APC
11F11 11F11-APC
8E8 11F11-APC
BIOL 11F11-APC
11A6 11F11-APC

图26B

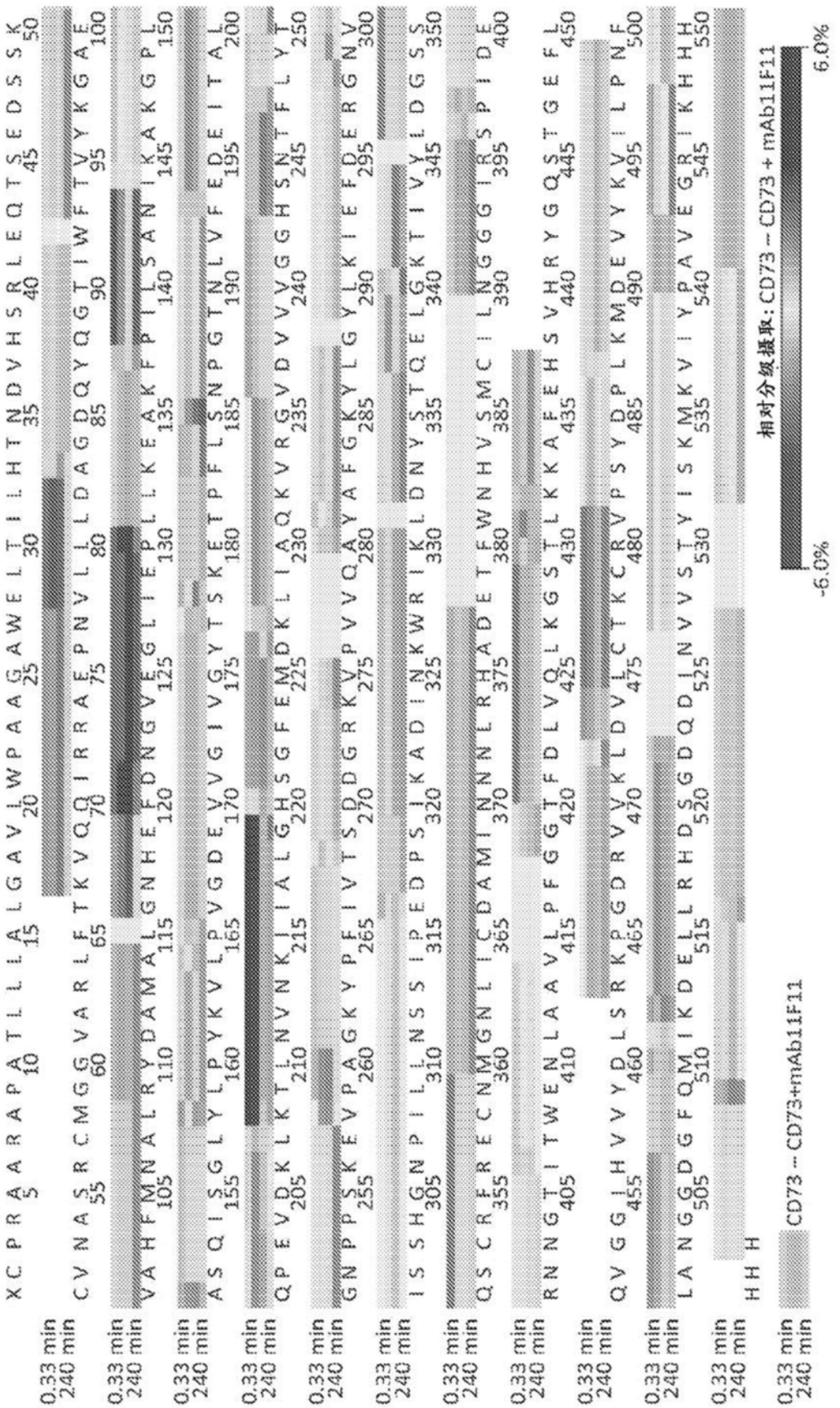


图27A

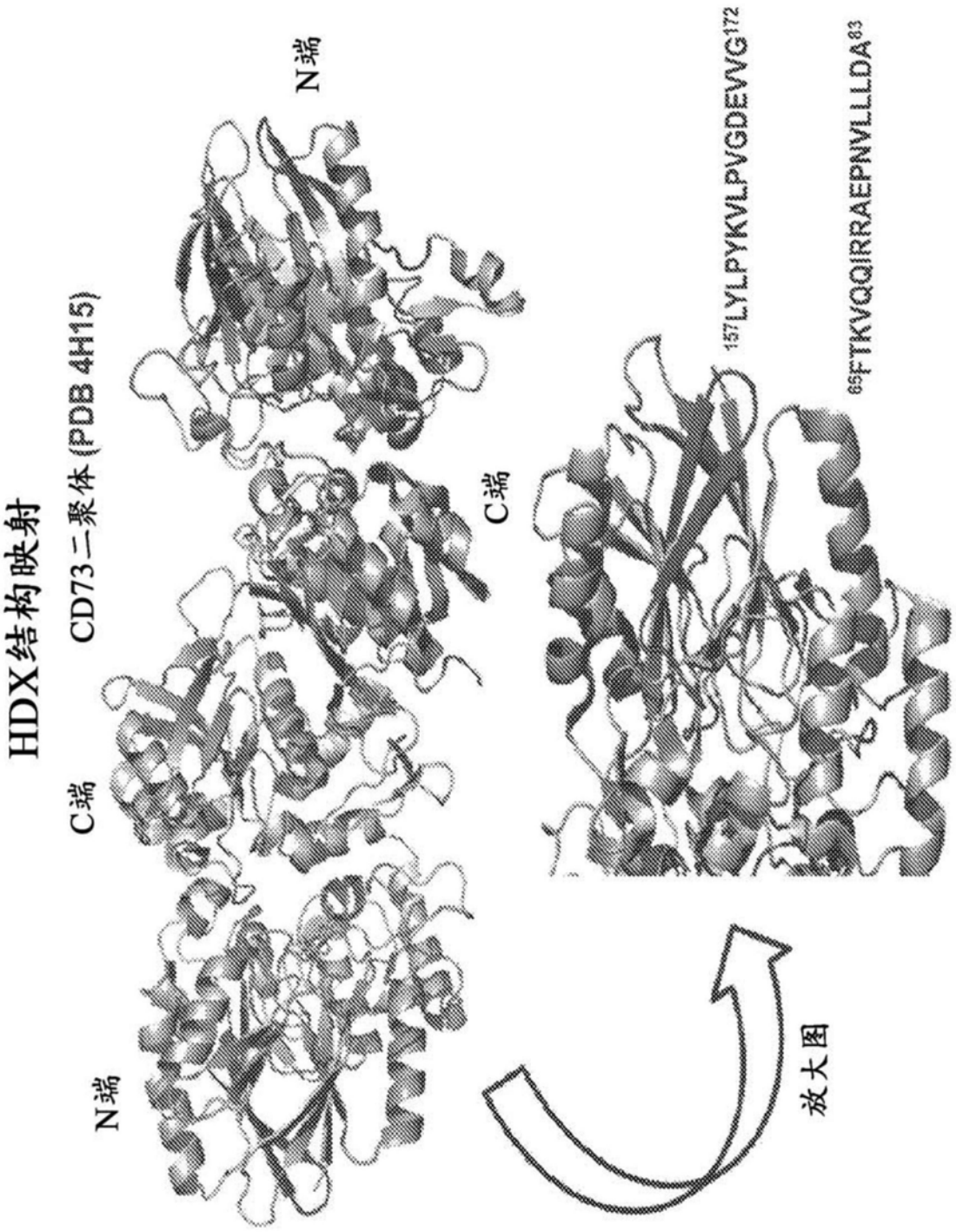

HDX结构映射
CD73二聚体 (PDB 4H15)
N端
C端
N端
C端
157LYLPYKVLPVGDEVVG172
65FTKVQQIRRAEPNVLLLDA83
放大图

图27B

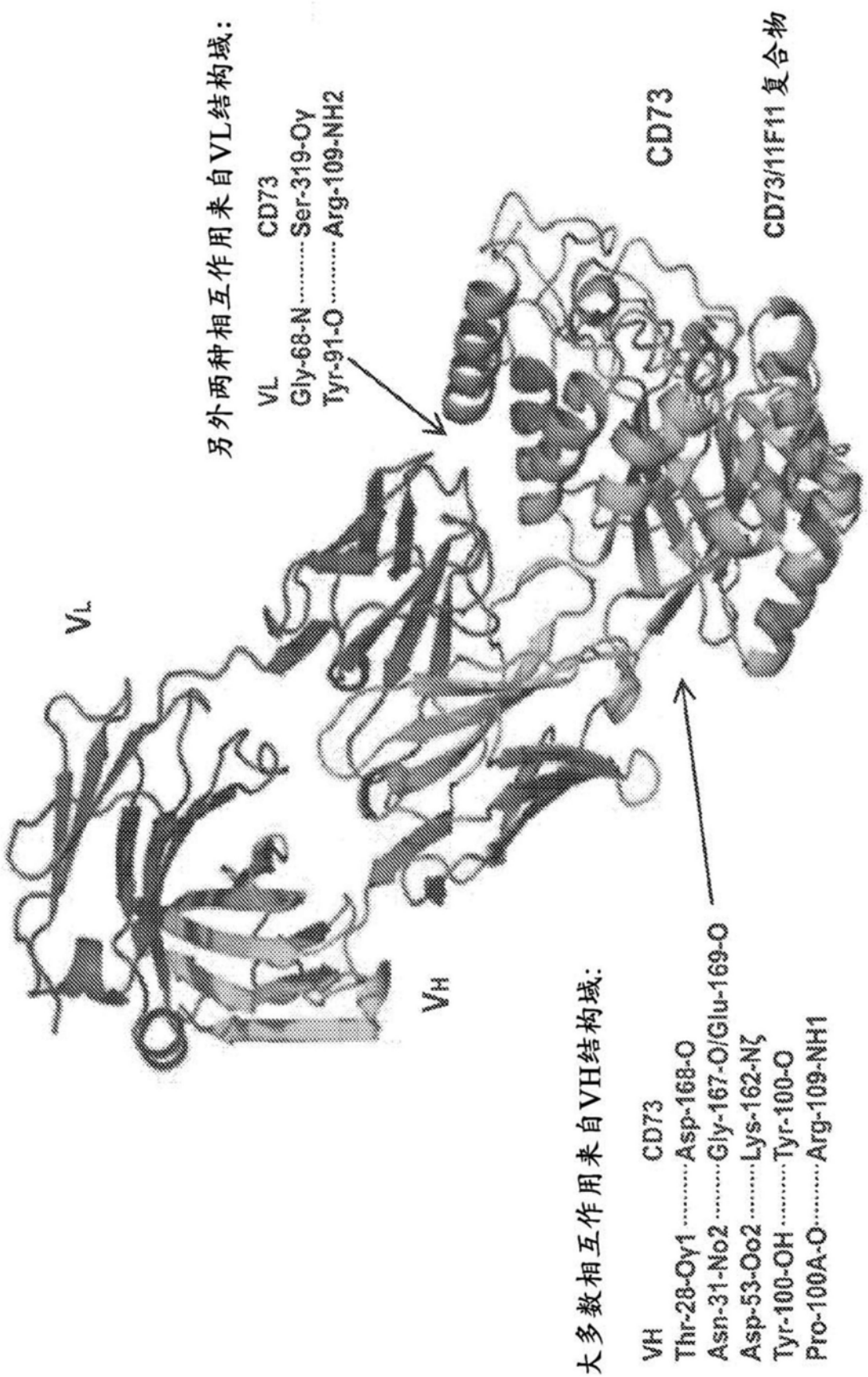

另外两种相互作用来自VL结构域：
VL CD73
Gly-68-N.....Ser-319-Oγ
Tyr-91-O.....Arg-109-NH2
VL
VH
CD73
CD73/11F11 复合物
大多数相互作用来自VH结构域：
VH CD73
Thr-28-Oγ1.....Asp-168-O
Asn-31-Nδ2.....Gly-167-O/Glu-169-O
Asp-53-Oδ2.....Lys-162-Nζ
Tyr-100-OH.....Tyr-100-O
Pro-100A-O.....Arg-109-NH1

图28A

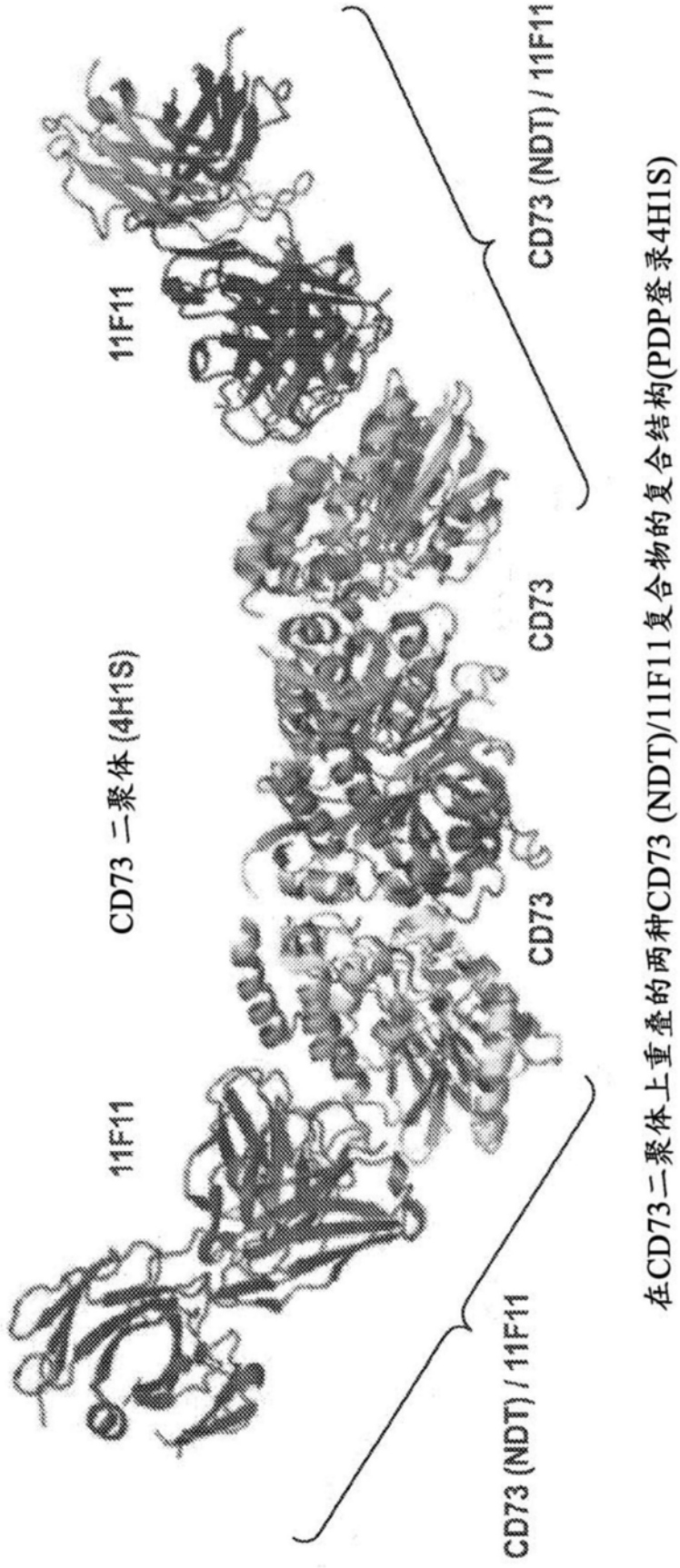

11F11
CD73 二聚体 (4H1S)
11F11
CD73
CD73
CD73 (NDT) / 11F11
CD73 (NDT) / 11F11
在CD73二聚体上重叠的两种CD73 (NDT)/11F11复合物的复合结构(PDP登录4H1S)

图28B

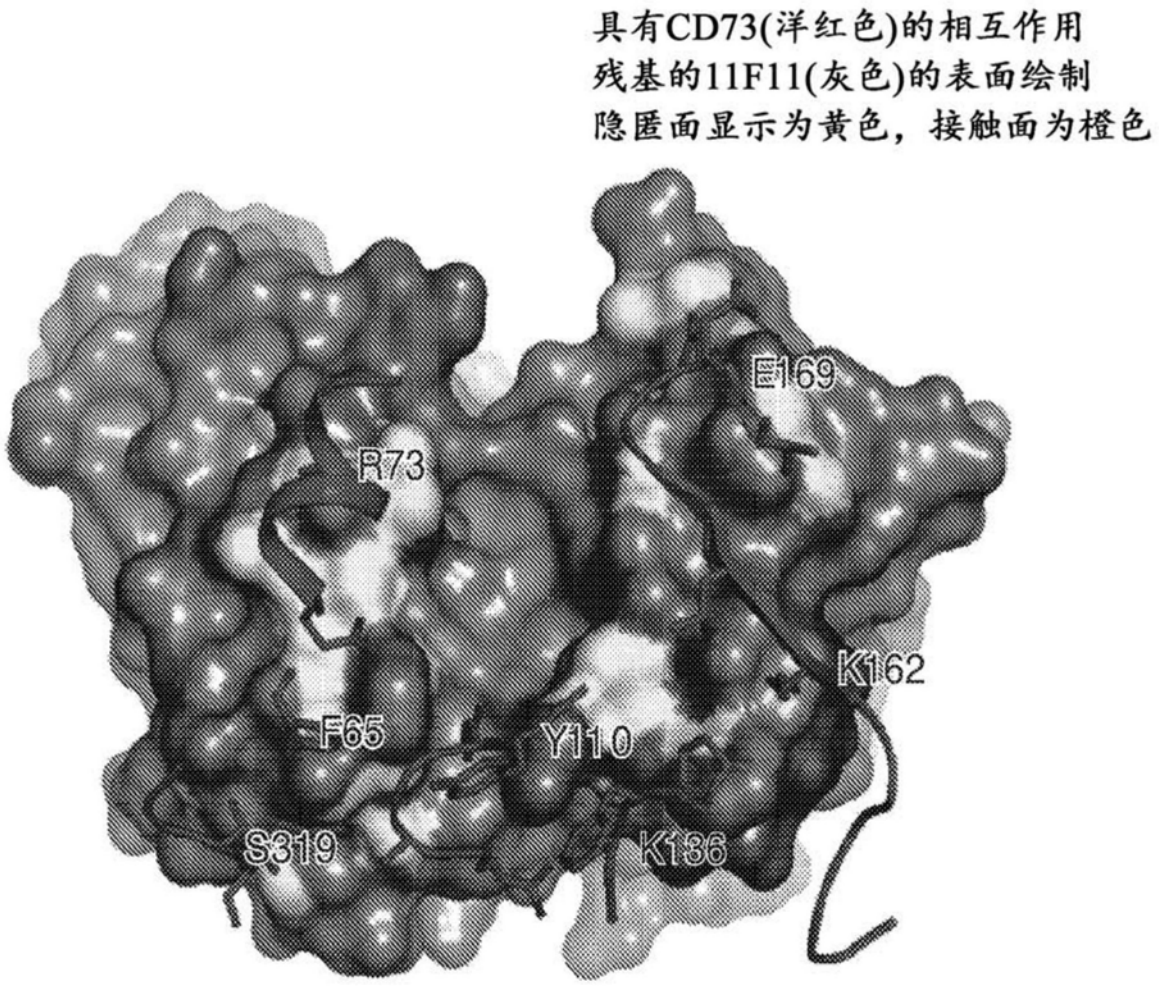

具有CD73(洋红色)的相互作用
残基的11F11(灰色)的表面绘制
隐匿面显示为黄色，接触面为橙色
E169
R73
K162
F65
Y110
S319
K136

图28C

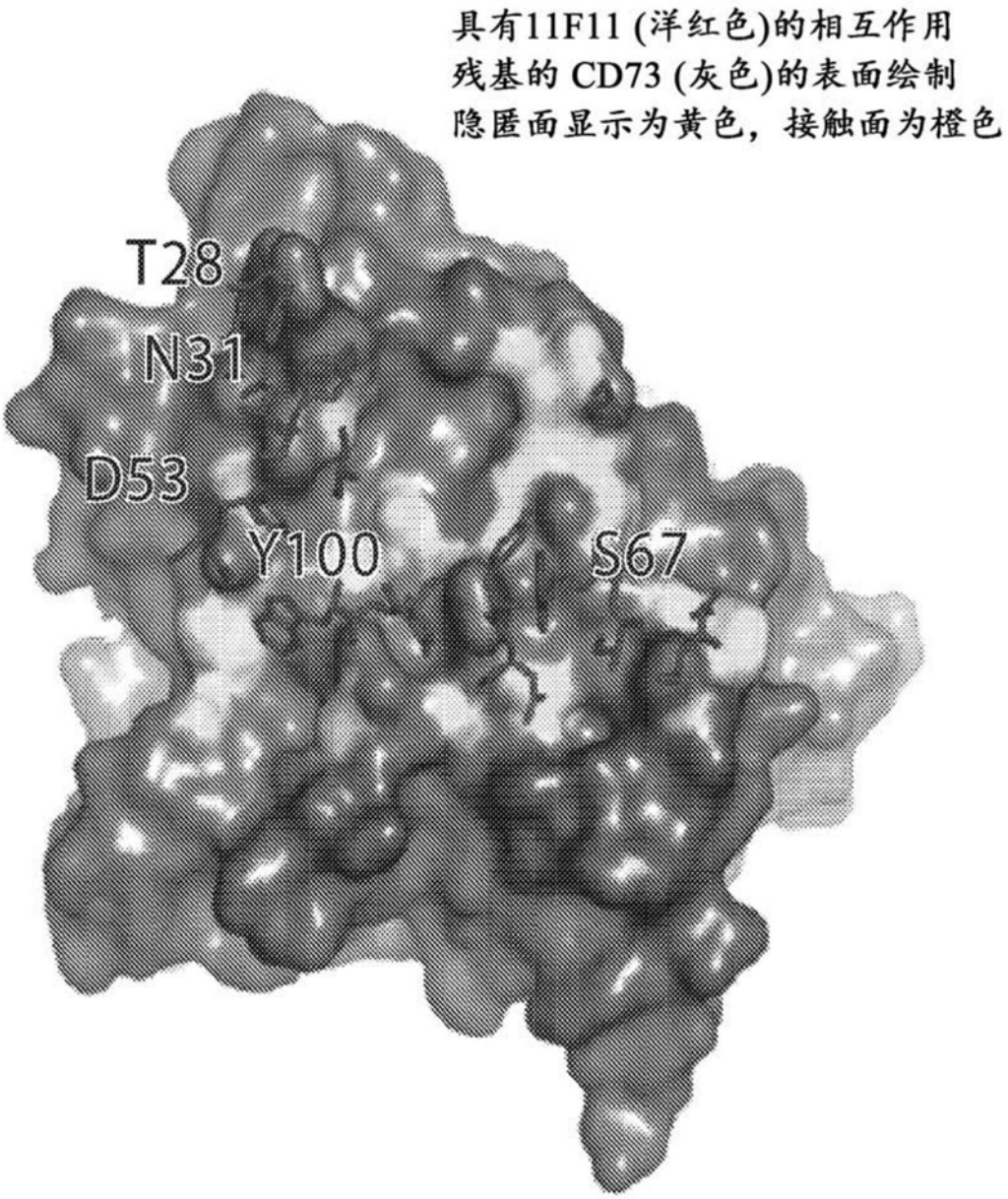

具有11F11 (洋红色)的相互作用
残基的 CD73 (灰色)的表面绘制
隐匿面显示为黄色，接触面为橙色
T28
N31
D53
Y100
S67

图28D

CD73/mAb复合物的SEC-MALS数据

靶标	mAb	摩尔比	[靶标] (uM)	[mAb] (uM)	UV洗脱时间 (min)				SEC UV综合%				MW (kDa)			
					峰1	峰2	峰3	峰4	峰1	峰2	峰3	峰4	峰1	峰2	峰3	峰4
	CD73.10-IgG1.1f	0:1		4	~2.0	~14.0	~17.3		0.3	0.3	99.4		n/a	62	140	
	CD73.10-IgG2-C219S	0:1		4	~2.0	~17.5			0.1	99.5			73	150		
	CD73.3-IgG1.1f	0:1		4	~16.3				100.0				150			
	11F11-Fab	0:1		8	~2.0	~17.7	~20.2		0.8	0.6	98.7		n/a	19	47	
hCD73-his		1:0	4		~17.1	~18.4			2.6	97.2			230	120		
N-hCD73-his		1:0	8		~19.3				100.0				38			
hCD73-his	CD73.10-IgG1.1f	1:1	4	4	~11.7	~12.7	~16.9		34.2	67.2	3.0		1100	540	180	
hCD73-his	CD73.10-IgG2-C219S	1:1	4	4	~10.3	~11.1			6.4	93.3			110000	3400		
hCD73-his	CD73.3-IgG1.1f	1:1	4	4	~12.0	~13.0	~14.8		17.5	78.3	4.0		960	530	250	
hCD73-his	11F11-Fab	1:2	4	8	~12.5	~14.7	~16.8	~20.1	0.9	90.7	0.8	7.7	300	310	95	40
N-hCD73-his	CD73.10-IgG1.1f	2:1	8	4	~14.6	~17.1			86.5	13.5			210	140		
N-hCD73-his	CD73.10-IgG2-C219S	2:1	8	4	~14.7	~17.3			87.1	12.9			210	150		
N-hCD73-his	CD73.3-IgG1.1f	2:1	8	4	~15.3	~16.2	~19.3		6.4	68.7	24.9		170	160	42	
N-hCD73-his	11F11-Fab	1:1	8	8	~17.4	~20.0			95.3	4.7			84	44		
		1:0	2.5	0	~16.9				100.0				120			
hCD73	CD73.4-杂合体	1:0.25	2.5	0.625	~11.8	~13.4	~17.1		42.0	21.6	36.4		1200	520	120	
hCD73	CD73.4-杂合体	1:0.5	2.5	1.25	~11.7	~13.4	~17.1		71.9	15.8	13.4		1900	540	130	
hCD73	CD73.4-杂合体	1:1	2.5	2.5	~11.5	~13.4	~17.1		95.3	1.9	2.8		3300	1000	530	
hCD73	CD73.4-杂合体	1:2	2.5	5	~11.7	~13.4	~15.3	~17.1	52.5	17.7	0.6	29.3	1700	500	220	140
hCD73	CD73.4-杂合体	1:4	2.5	10	~11.7	~13.4	~15.3	~17.1	24.1	16.2	1.2	58.6	1300	500	200	140
hCD73		1:0	2.5	0	~16.9	~18.2			97.6	2.4			120	73		
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:0.25	2.5	0.625	~12.3	~13.1	~17.1		11.8	49.5	38.6		830	530	120	
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:0.5	2.5	1.25	~12.3	~13.1	~17.1		31.1	54.6	3.3	10.7	890	540	120	81
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:1	2.5	2.5	~12.1	~12.3	~13.1	~17.0	55.2	44.5	2.1	2.2	1100	580	280	160
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:2	2.5	5	~12.3	~13.1	~15.3	~17.0	22.3	44.1	2.6	30.7	910	530	210	140
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:4	2.5	10	~12.3	~13.2	~15.3	~17.0	9.1	31.0	2.4	57.4	810	510	200	140
N-hCD73	CD73.4-杂合体	1:1	5	2.5	~13.9	~14.7	~15.9	~17.0	0.7	88.3	8.1	2.8	390	210	180	150
N-hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:1	5	2.5	~13.4	~14.7			1.7	98.3			360	210		
	CD73.4-杂合体	0:1	0	5	~15.9	~16.9			0.4	99.6			290	140		
	CD73.4-IgG1.1f	0:1	0	5	~14.2	~15.9	~17.1		0.6	1.2	98.2		81	120	140	
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S	1:1	2.5	2.5	~11.5	~13.4	~17.3		95.0	2.1	2.8		3400	970	480	
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f	1:1	2.5	2.5	~11.5	~13.4	~17.3		94.7	2.3	3.0		3600	1100	580	
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:1	2.5	2.5	~11.7	~13.0	~15.1	~17.0	60.0	35.3	2.3	2.5	1300	550	270	160
hCD73	CD73.10-IgG2-C219S	1:1	2.5	2.5	~11.8	~16.9			96.2	3.2			2000	310		
hCD73	CD73.10-IgG2CS-1.1	1:1	2.5	2.5	~11.8	~16.9			96.6	2.5	0.9		2000	320	390	
hCD73	CD73.10-IgG1.1f	1:1	2.5	2.5	~12.1	~13.0	~16.5		35.1	62.1	2.7		1000	530	170	
hCD73		1:0	2.5	0	~17.3	~18.4			97.2	2.6			120	60		
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f	1:1	5	5	~11.5	~13.4	~17.3		93.9	2.6	3.5		4800	1300	740	
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f	1:1	1	1	~11.5	~13.4	~15.0	~17.3	84.4	7.6	2.5	5.4	2900	660	460	240

* 摩尔浓度定义为N-hCD73单体、11F11-Fab单体、hCD73-his二聚体和(二价) mAb

图29A

CD73/mAb复合物的DLS数据

靶标	mAb	摩尔比	[靶标] (uM)	[mAb] (uM)	DLS					
					Rh	Rh SD	%Pd	%Pd SD	质量%	质量% SD
	CD73.10-IgG1.1f	0:1		4	5.0	0.6	11.0	6.0	100.0	0.0
	CD73.10-IgG2-C219S	0:1		4	5.2	0.1	11.9	2.3	100.0	0.0
	CD73.3-IgG1.1f	0:1		4	5.1	0.5	11.6	6.9	100.0	0.0
	11F11-Fab	0:1		8	3.4	0.2	22.0	5.3	100.0	0.1
hCD73-his		1:0	4		4.3	0.3	10.6	5.2	99.8	0.2
N-hCD73-his		1:0	8		2.3	0.2	19.3	12.3	99.9	0.2
hCD73-his	CD73.10-IgG1.1f	1:1	4	4	12.8	0.7	32.4	6.7	100.0	0.0
hCD73-his	CD73.10-IgG2-C219S	1:1	4	4	2.9	1.5	7.5	0.8	73.9	11.5
hCD73-his	CD73.3-IgG1.1f	1:1	4	4	10.8	0.1	26.2	0.6	100.0	0.0
hCD73-his	11F11-Fab	1:2	4	8	6.4	0.1	15.1	4.3	100.0	0.0
N-hCD73-his	CD73.10-IgG1.1f	2:1	8	4	6.6	0.3	15.3	6.5	100.0	0.0
N-hCD73-his	CD73.10-IgG2-C219S	2:1	8	4	6.5	0.2	15.7	5.7	100.0	0.1
N-hCD73-his	CD73.3-IgG1.1f	2:1	8	4	5.8	0.3	12.8	5.3	100.0	0.0
N-hCD73-his	11F11-Fab	1:1	8	8	4.2	0.1	12.6	4.7	100.0	0.0
hCD73		1:0	2.5	0	4.5	0.1	12.3	4.3	99.9	0.2
hCD73	**CD73.4-杂合体**	1:0.25	2.5	0.625	13.2	1.7	46.5	5.9	99.9	0.1
hCD73	**CD73.4-杂合体**	1:0.5	2.5	1.25	17.5	1.0	31.7	8.8	62.6	25.8
hCD73	**CD73.4-杂合体**	1:1	2.5	2.5	29.9	1.0	25.1	2.1	22.3	4.9
hCD73	**CD73.4-杂合体**	1:2	2.5	5	14.4	0.1	31.3	5.5	68.7	25.8
hCD73	**CD73.4-杂合体**	1:4	2.5	10	11.4	0.9	42.9	3.5	90.2	17.5
hCD73		1:0	2.5	0	4.7	0.1	18.6	3.3	99.8	0.1
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:0.25	2.5	0.625	10.4	1.5	38.6	15.9	81.3	37.1
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:0.5	2.5	1.25	12.9	0.6	35.5	5.4	88.3	23.2
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:1	2.5	2.5	14.7	0.5	34.3	3.9	100.0	0.0
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:2	2.5	5	11.6	0.4	24.9	8.5	65.0	32.5
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:4	2.5	10	8.1	4.0	33.0	16.9	84.2	31.7
N-hCD73	**CD73.4-杂合体**	1:1	5	2.5	6.7	0.3	13.9	7.0	100.0	0.0
N-hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:1	5	2.5	6.5	0.1	7.4	3.2	100.0	0.0
	CD73.4-杂合体	0:1	0	5	5.4	0.2	15.7	5.7	99.9	0.1
	CD73.4-IgG1.1f	0:1	0	5	5.3	0.4	13.6	7.9	100.0	0.0
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S	1:1	2.5	2.5	31.7	2.4	31.6	11.4	19.3	12.2
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f	1:1	2.5	2.5	31.2	0.9	30.8	3.8	17.5	11.4
hCD73	CD73.4-IgG1.1f	1:1	2.5	2.5	15.6	1.2	32.7	8.0	100.0	0.0
hCD73	CD73.10-IgG2-C219S	1:1	2.5	2.5	23.9	1.2	26.7	4.4	36.3	5.3
hCD73	CD73.10-IgG2CS-1.1	1:1	2.5	2.5	25.6	2.3	30.1	8.8	35.9	9.1
hCD73	CD73.10-IgG1.1f	1:1	2.5	2.5	13.5	1.2	31.6	12.0	83.2	31.5
hCD73		1:0	2.5	0	4.2	0.8	24.4	12.8	99.1	0.7
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f	1:1	5	5	35.3	3.8	35.2	13.9	6.7	4.4
hCD73	CD73.4-IgG2-C219S-IgG1.1f	1:1	1	1	25.5	3.2	32.9	2.9	60.7	27.5

* 摩尔浓度定义为N-hCD73单体、11F11-Fab单体、hCD73-his二聚体和(二价) mAb

图29B

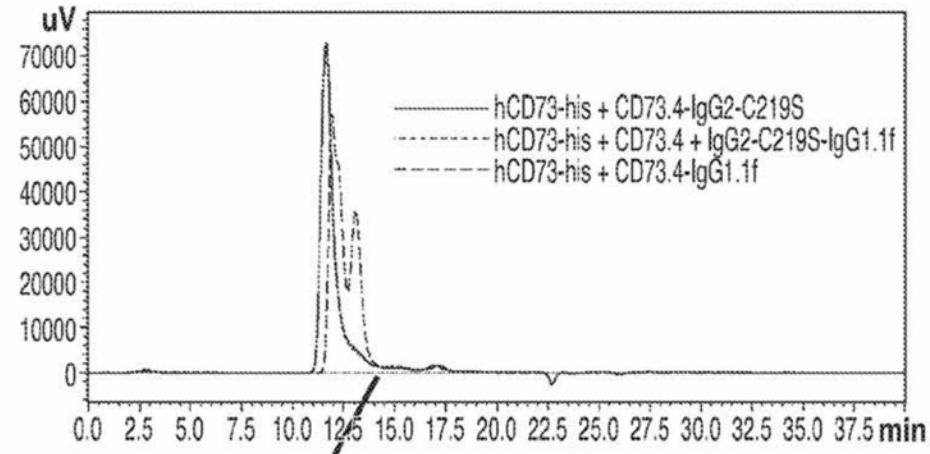


图 30A

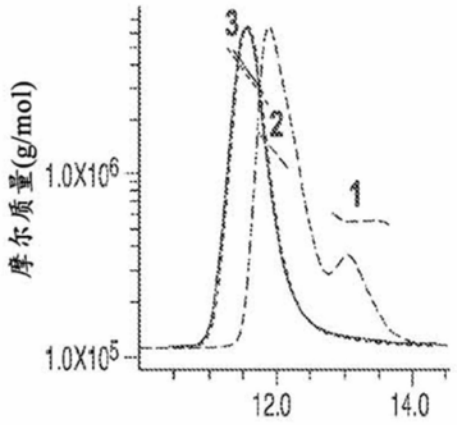


图 30C

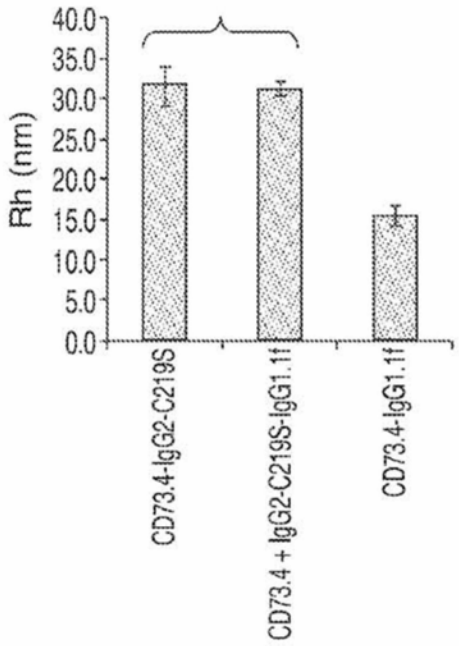


图 30B

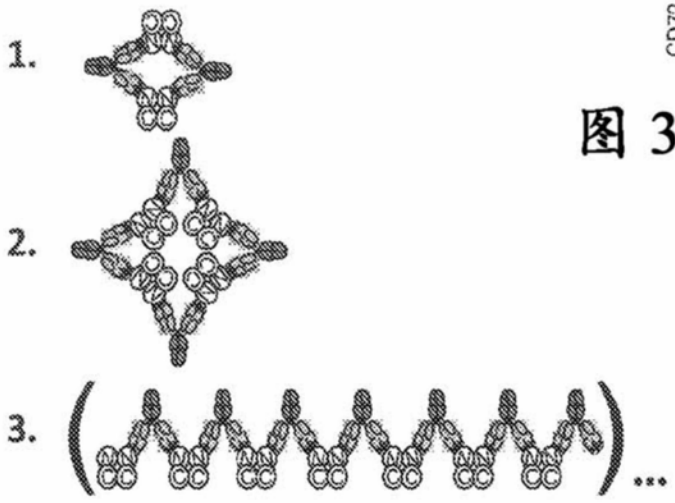


图 30D

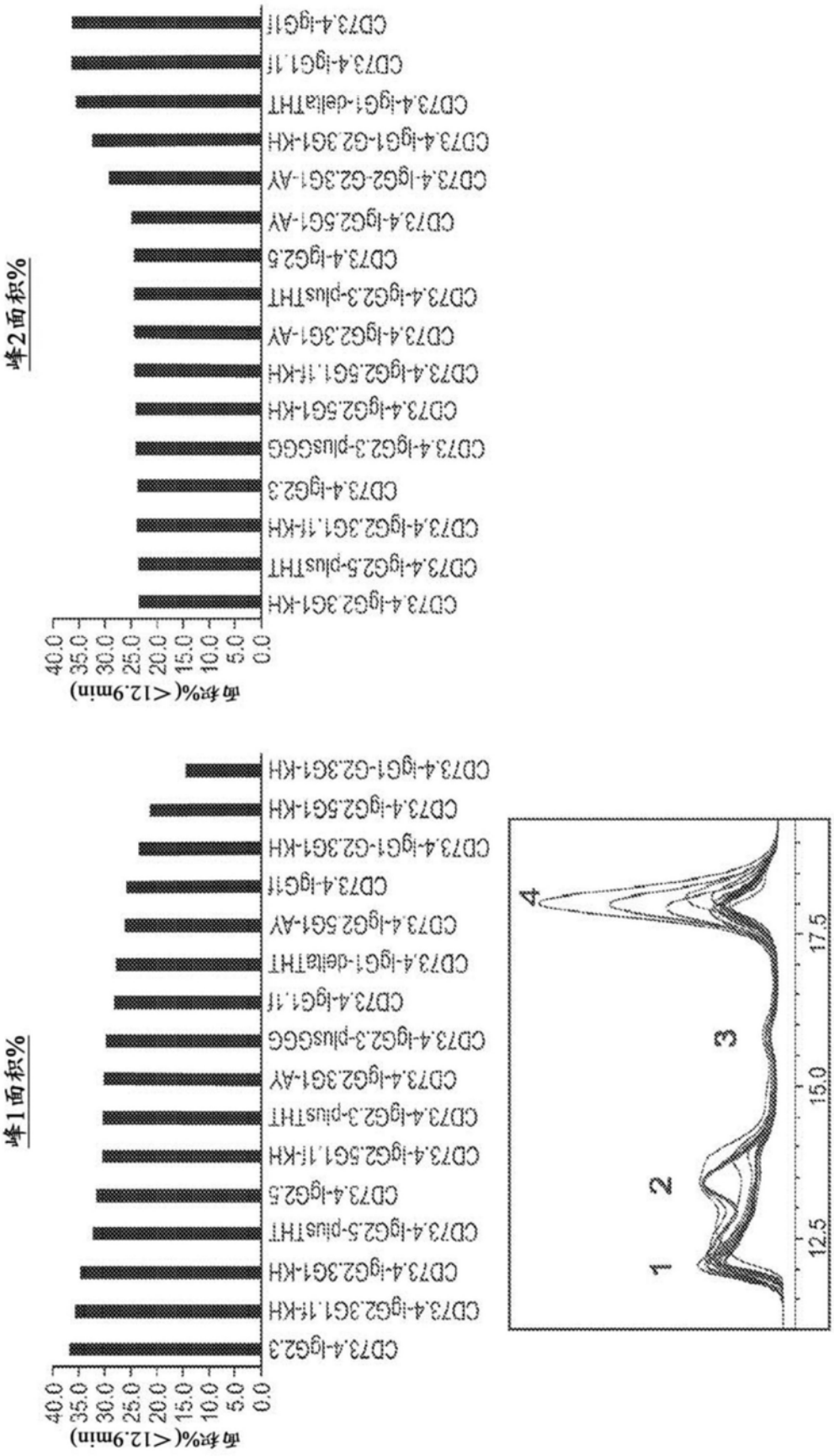

峰2面积%
面积%(<12.9min)
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
CD73.4-IgG2.3G1-KH
CD73.4-IgG2.5-plusTHT
CD73.4-IgG2.3G1.1f-KH
CD73.4-IgG2.3G1-AV
CD73.4-IgG2.3-plusGG
CD73.4-IgG2.5G1-KH
CD73.4-IgG2.5G1.1f-KH
CD73.4-IgG2.3G1-AV
CD73.4-IgG2.3-plusTHT
CD73.4-IgG2.5
CD73.4-IgG2.5G1-AV
CD73.4-IgG2-G2.3G1-AV
CD73.4-IgG1-G2.3G1-KH
CD73.4-IgG1-deltaTHT
CD73.4-IgG1.1f
CD73.4-IgG1f
峰1面积%
面积%(<12.9min)
CD73.4-IgG2.3
CD73.4-IgG2.3G1.1f-KH
CD73.4-IgG2.3G1-KH
CD73.4-IgG2.5-plusTHT
CD73.4-IgG2.5
CD73.4-IgG2.5G1.1f-KH
CD73.4-IgG2.3-plusTHT
CD73.4-IgG2.3G1-AV
CD73.4-IgG2.3-plusGG
CD73.4-IgG1.1f
CD73.4-IgG1-deltaTHT
CD73.4-IgG2.5G1-AV
CD73.4-IgG1f
CD73.4-IgG1-G2.3G1-KH
CD73.4-IgG2.5G1-KH
CD73.4-IgG1-G2.3G1-KH
1
2
3
4
12.5
15.0
17.5

图30E

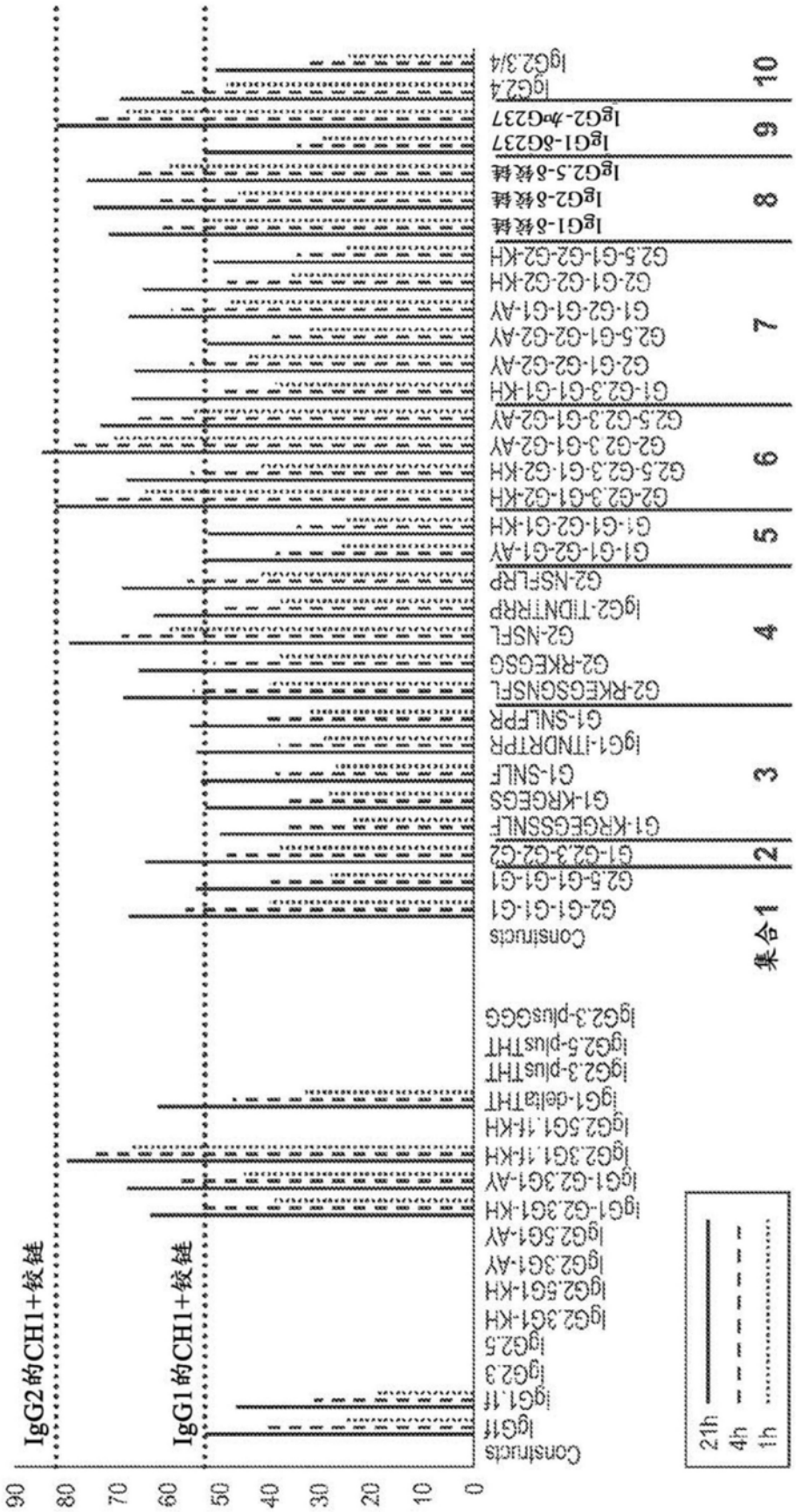

IgG2的CH1+铰链
IgG1的CH1+铰链
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
21h
4h
1h
集合1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Constructs
IgG1f
IgG1.1f
IgG2.3
IgG2.5
IgG2.3G1-KH
IgG2.5G1-KH
IgG2.3G1-AY
IgG2.5G1-AY
IgG1-G2.3G1-KH
IgG1-G2.3G1-AY
IgG2.3G1.1f-KH
IgG2.5G1.1f-KH
IgG1-deltaTHT
IgG2.3-plusTHT
IgG2.5-plusTHT
IgG2.3-plusGGG
Constructs
G2-G1-G1-G1
G2.5-G1-G1-G1
G1-G2.3-G2-G2
G1-KRGEGSSNLF
G1-KRGEGS
G1-SNLF
IgG1-ITNDRTPR
G1-SNLFPR
G2-RKEGSGNSFL
G2-RKEGSG
G2-NSFL
IgG2-TIDNTRRP
G2-NSFLRP
G1-G1-G2-G1-AY
G1-G1-G2-G1-KH
G2-G2.3-G1-G2-KH
G2.5-G2.3-G1-G2-KH
G2-G2.3-G1-G2-AY
G2.5-G2.3-G1-G2-AY
G1-G2.3-G1-G1-KH
G2-G1-G2-G2-AY
G2.5-G1-G2-G2-AY
G1-G2-G1-G1-AY
G2-G1-G2-G2-KH
G2.5-G1-G2-G2-KH
IgG1-δ铰链
IgG2-δ铰链
IgG2.5-δ铰链
IgG1-δG237
IgG2-δpG237
IgG2.4
IgG2.3/4

图31

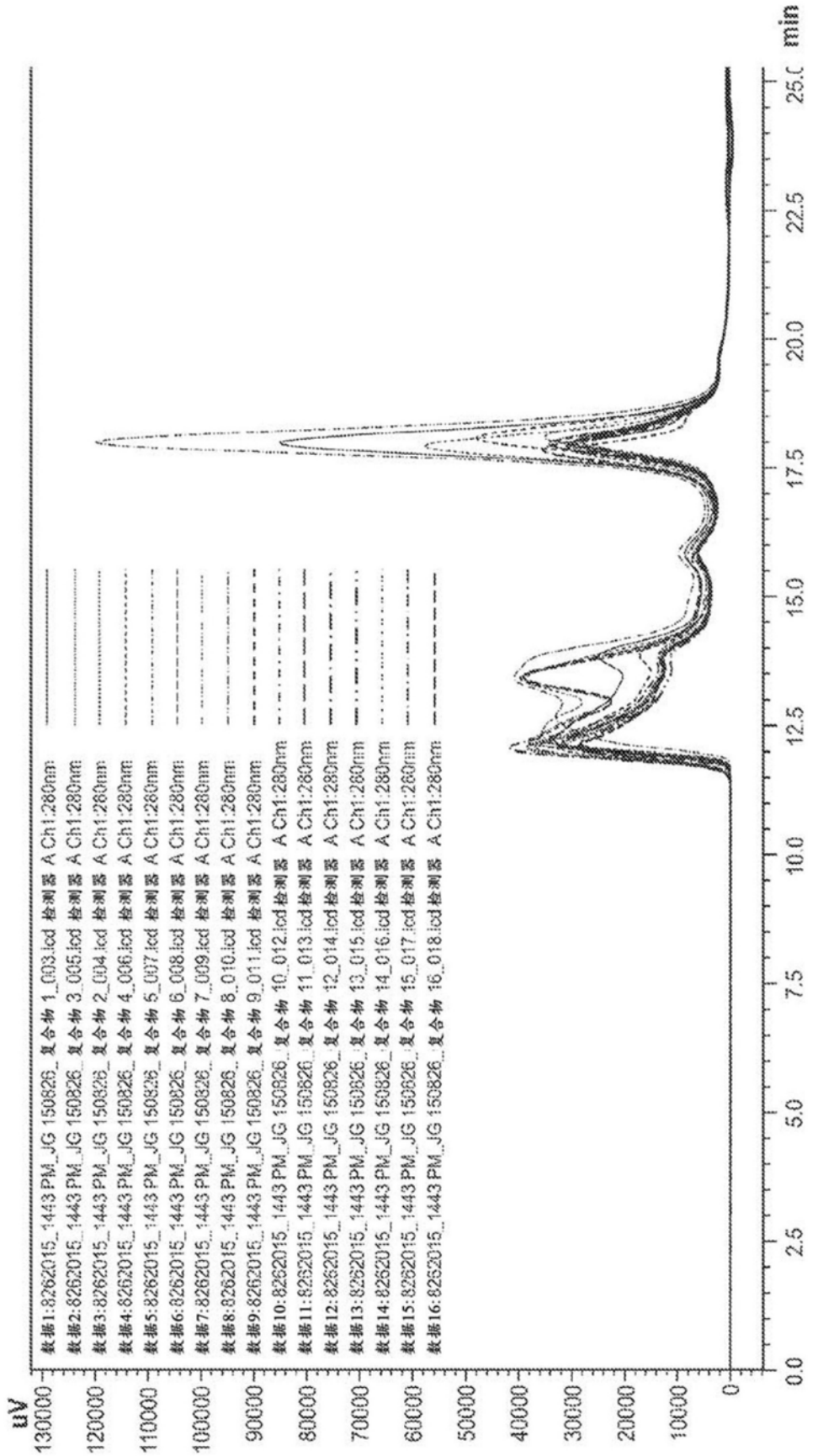

uV
130000
120000
110000
100000
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
15.0
17.5
20.0
22.5
min
数据1:8262015_1443 PM_JG 150826_复合物 1_003.icd 检测器 A Ch1:280nm
数据2:8262015_1443 PM_JG 150826_复合物 3_005.icd 检测器 A Ch1:280nm
数据3:8262015_1443 PM_JG 150826_复合物 2_004.icd 检测器 A Ch1:280nm
数据4:8262015_1443 PM_JG 150826_复合物 4_006.icd 检测器 A Ch1:280nm
数据5:8262015_1443 PM_JG 150826_复合物 5_007.icd 检测器 A Ch1:280nm
数据6:8262015_1443 PM_JG 150826_复合物 6_008.icd 检测器 A Ch1:280nm
数据7:8262015_1443 PM_JG 150826_复合物 7_009.icd 检测器 A Ch1:280nm
数据8:8262015_1443 PM_JG 150826_复合物 8_010.icd 检测器 A Ch1:280nm
数据9:8262015_1443 PM_JG 150826_复合物 9_011.icd 检测器 A Ch1:280nm
数据10:8262015_1443 PM_JG 150826_复合物 10_012.icd 检测器 A Ch1:280nm
数据11:8262015_1443 PM_JG 150826_复合物 11_013.icd 检测器 A Ch1:280nm
数据12:8262015_1443 PM_JG 150826_复合物 12_014.icd 检测器 A Ch1:280nm
数据13:8262015_1443 PM_JG 150826_复合物 13_015.icd 检测器 A Ch1:280nm
数据14:8262015_1443 PM_JG 150826_复合物 14_016.icd 检测器 A Ch1:280nm
数据15:8262015_1443 PM_JG 150826_复合物 15_017.icd 检测器 A Ch1:280nm
数据16:8262015_1443 PM_JG 150826_复合物 16_018.icd 检测器 A Ch1:280nm

图32A

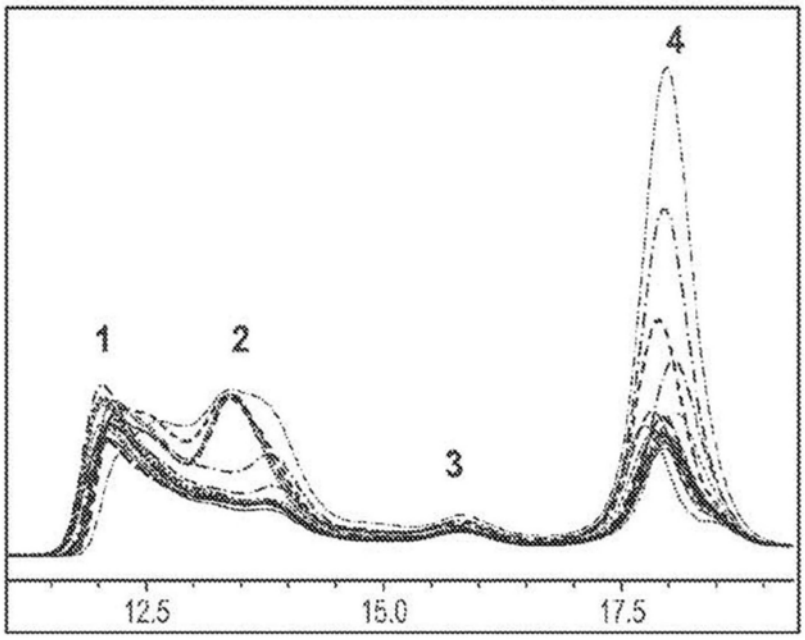

1
2
3
4
12.5
15.0
17.5

图32B

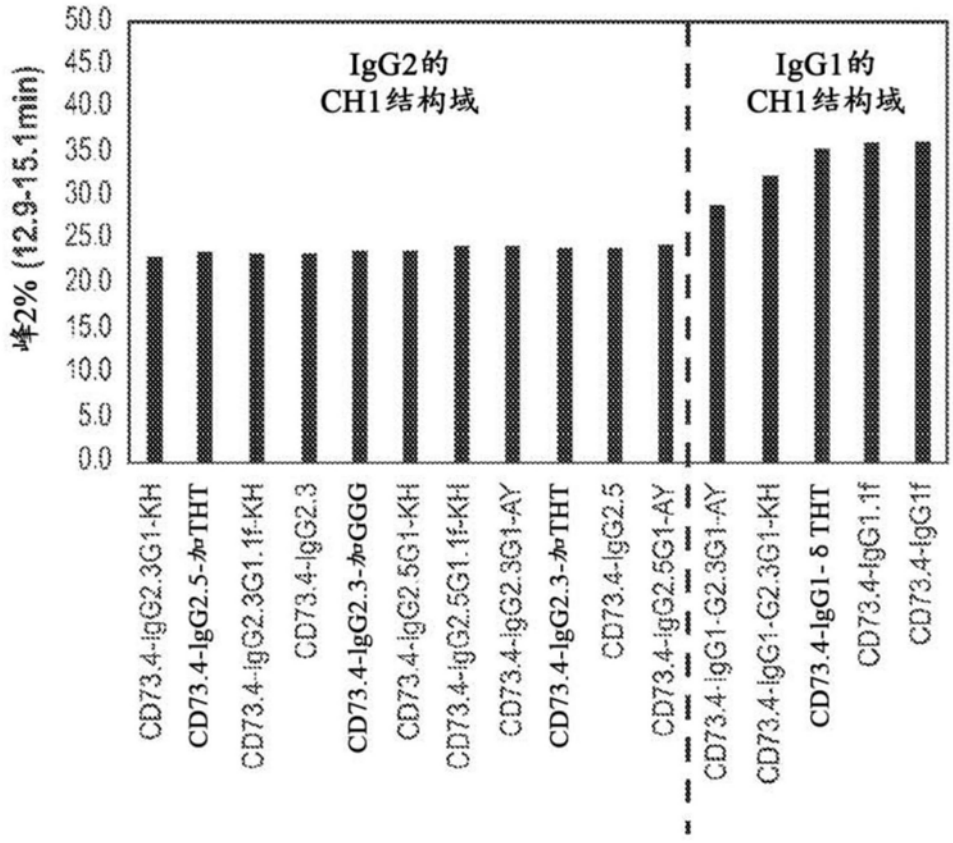

峰2% (12.9-15.1min)
50.0
45.0
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
IgG2的
CH1结构域
IgG1的
CH1结构域
CD73.4-IgG2.3G1-KH
CD73.4-IgG2.5-δTHT
CD73.4-IgG2.3G1.1f-KH
CD73.4-IgG2.3
CD73.4-IgG2.3-δGGG
CD73.4-IgG2.5G1-KH
CD73.4-IgG2.5G1.1f-KH
CD73.4-IgG2.3G1-AY
CD73.4-IgG2.3-δTHT
CD73.4-IgG2.5
CD73.4-IgG2.5G1-AY
CD73.4-IgG1-G2.3G1-AY
CD73.4-IgG1-G2.3G1-KH
CD73.4-IgG1-δ THT
CD73.4-IgG1.1f
CD73.4-IgG1f

图32C

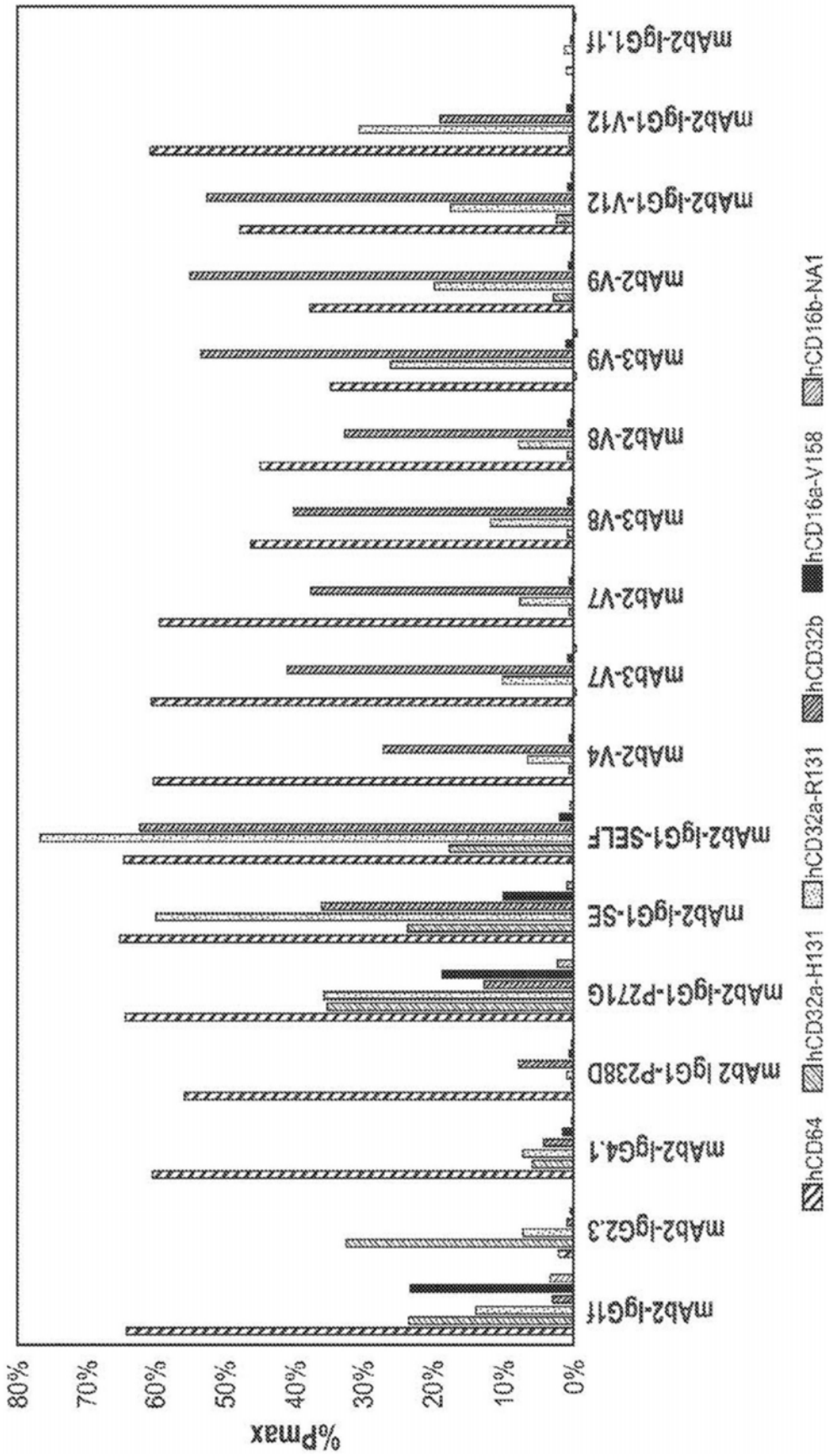

mAb2-IgG1.1f
mAb2-IgG1-V12
mAb2-IgG1-V12
mAb2-V9
mAb3-V9
mAb2-V8
mAb3-V8
mAb2-V7
mAb3-V7
mAb2-V4
mAb2-IgG1-SELF
mAb2-IgG1-SE
mAb2-IgG1-P271G
mAb2 IgG1-P238D
mAb2-IgG4.1
mAb2-IgG2.3
mAb2-IgG1f
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
%Pmax
hCD64
hCD32a-H131
hCD32a-R131
hCD32b
hCD16a-V158
hCD16b-NA1

图33

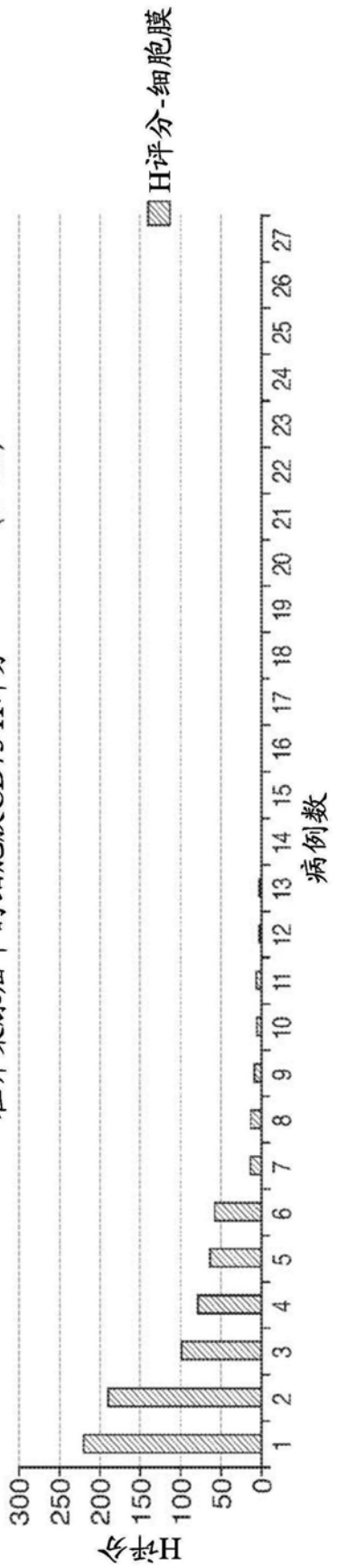

在卵巢腺癌中的细胞膜CD73 H评分 (n=30)
H评分-细胞膜
H评分
300
250
200
150
100
50
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27
病例数

图39G

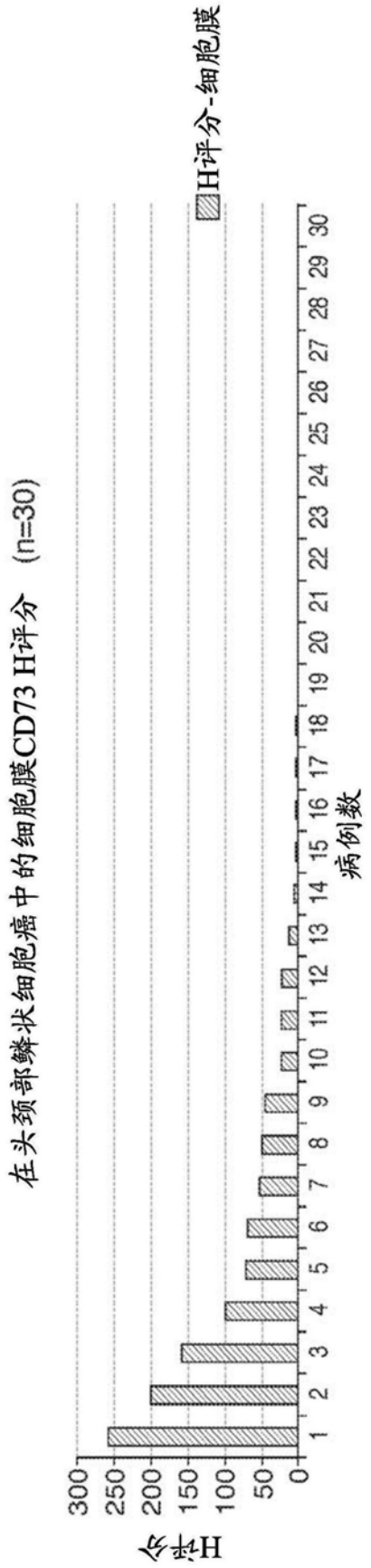
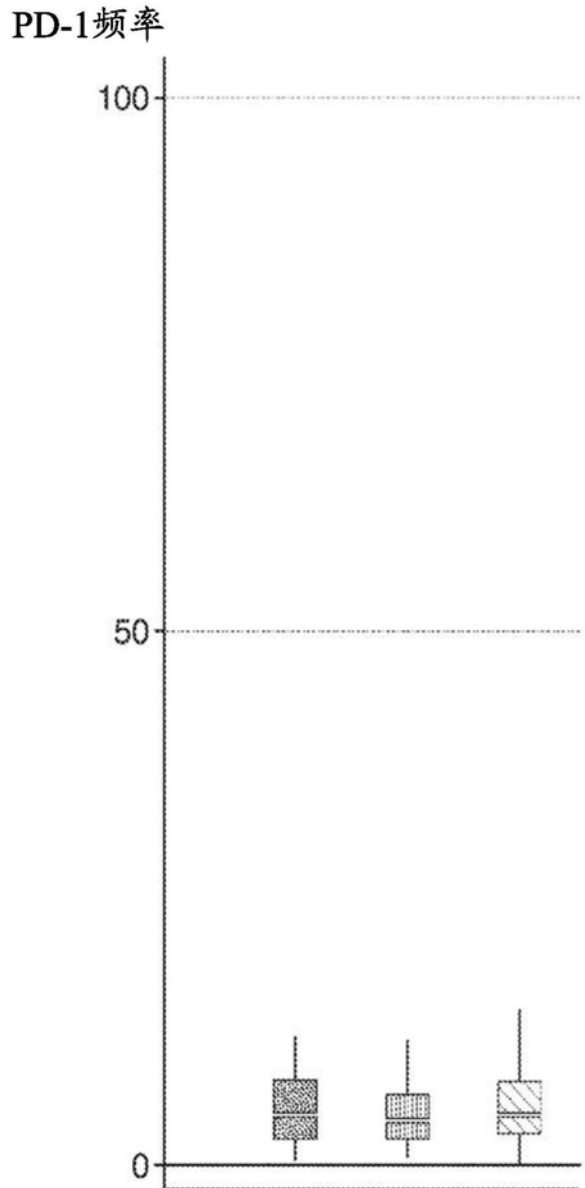

在头颈部鳞状细胞癌中的细胞膜CD73 H评分 (n=30)
H评分-细胞膜
H评分
病例数
0
50
100
150
200
250
300
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

图39H

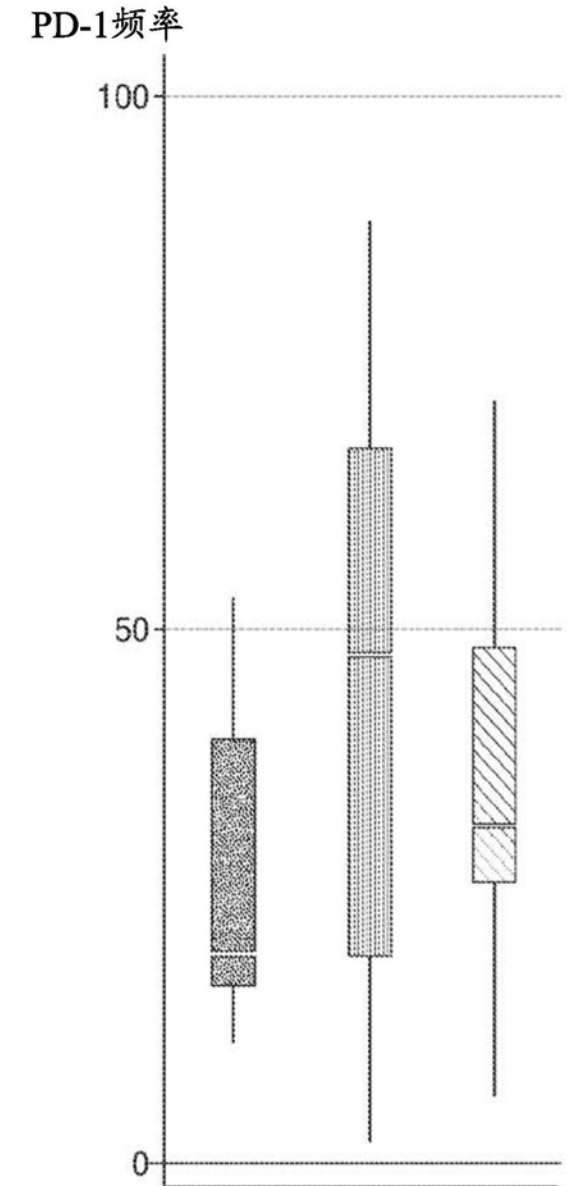


P1 血 CD8 T (PD1+ (%))			
	结肠	肾脏	肺
计数	14	22	17
中位值	4.625	4.13	4.68
标准差	3.53887	3.20332	4.3742

根据初步诊断填色

结肠
肾脏
肺
参考点
中位值

图40A

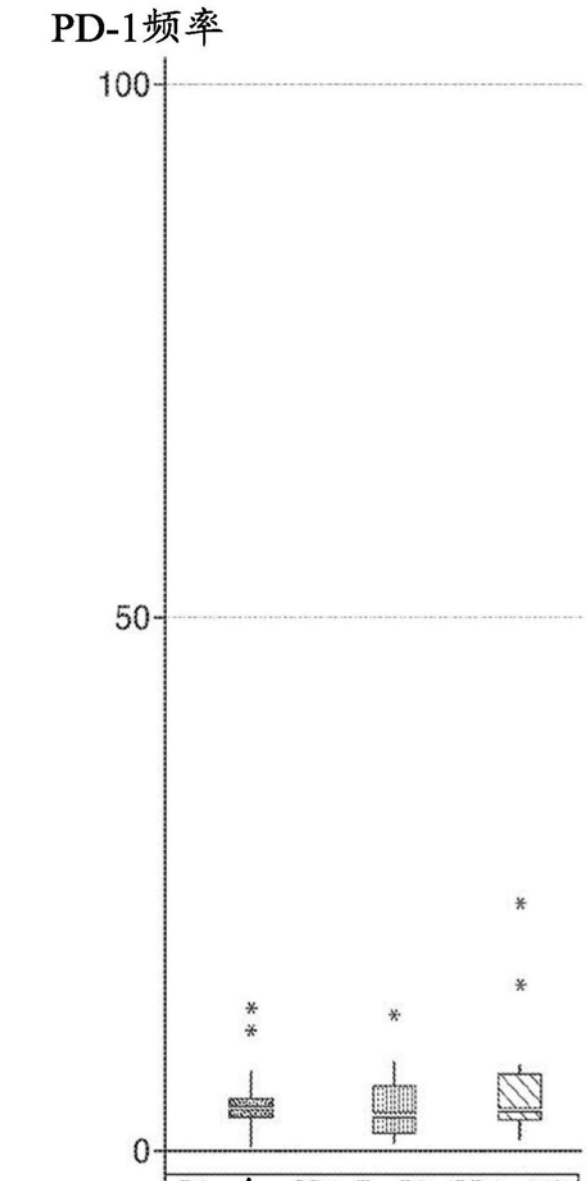


P1 肿瘤CD8 T (PD1+ (%))			
	结肠	肾脏	肺
计数	10	23	16
中位值	19.55	47.3	31.5
标准差	15.9245	25.7824	19.4067

根据初步诊断填色

结肠
肾脏
肺
参考点
中位值

图40B

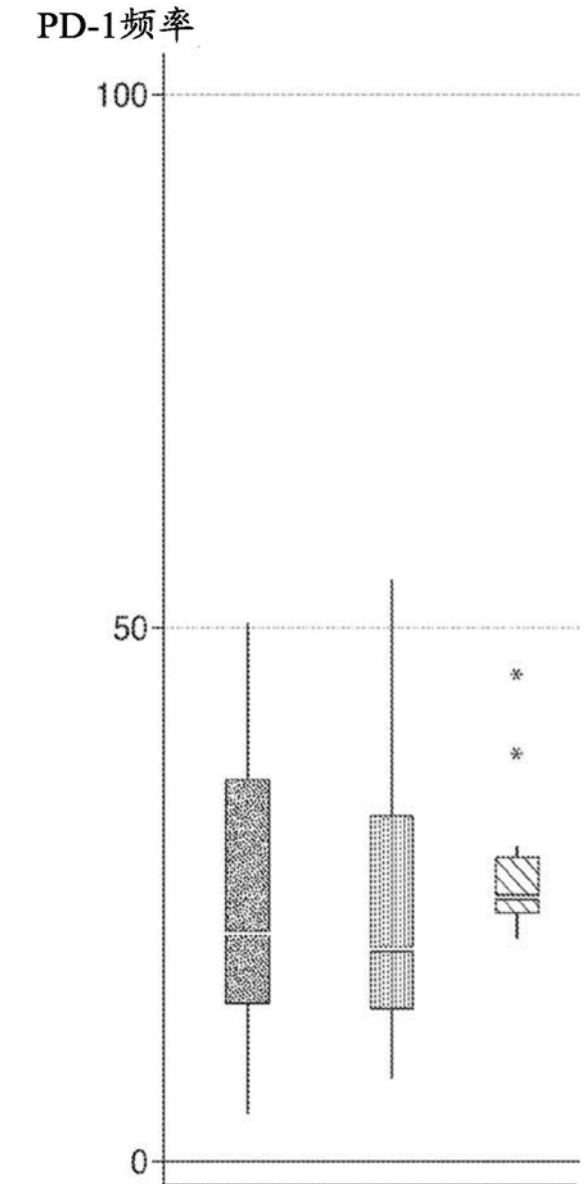


	P1 血 CD4+FoxP3- (PD1+ (%))		
	结肠	肾脏	肺
计数	13	21	12
中位值	3.86	3.12	3.65
标准差	3.76143	3.11247	6.60667

根据初步诊断填色

结肠
肾脏
肺
参考点
中位值

图40C



	P1肿瘤 CD4+FoxP3- (PD1+ (%))		
	结肠	肾脏	肺
计数	10	21	11
中位值	21.4	19.9	24.9
标准差	16.5667	13.8944	7.79198

根据初步诊断填色

结肠
肾脏
肺
参考点
中位值

图40D

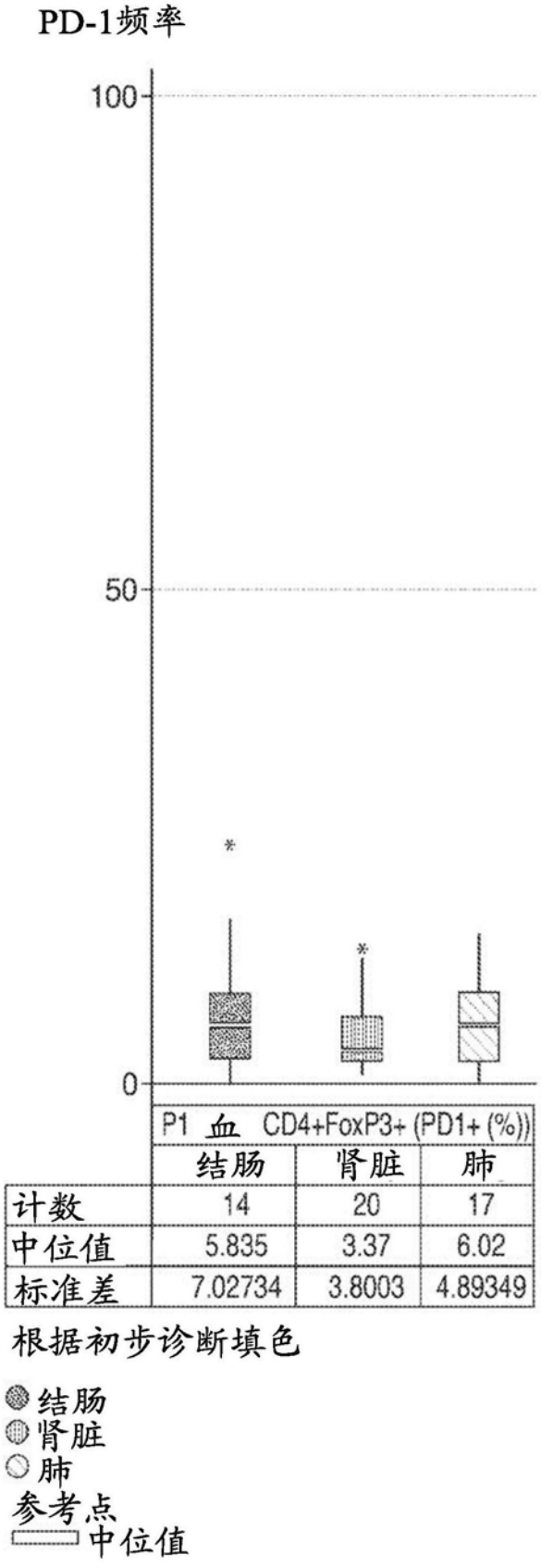
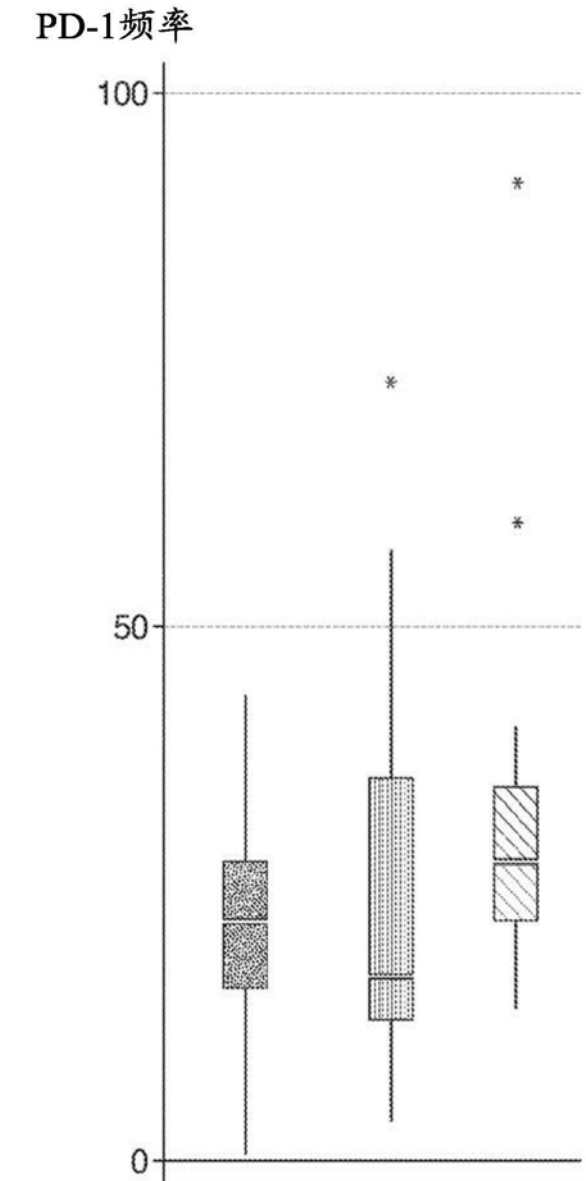

PD-1频率
100
50
0
*
*
P1 血 CD4+FoxP3+ (PD1+ (%))
结肠 肾脏 肺
计数 14 20 17
中位值 5.835 3.37 6.02
标准差 7.02734 3.8003 4.89349
根据初步诊断填色
结肠
肾脏
肺
参考点
中位值

图40E



	P1肿瘤 CD4+FoxP3+ (PD1+ (%))		
	结肠	肾脏	肺
计数	11	23	15
中位值	22.3	17.3	28.05
标准差	11.8884	17.1978	19.0997

根据初步诊断填色

结肠
肾脏
肺
参考点
中位值

图40F

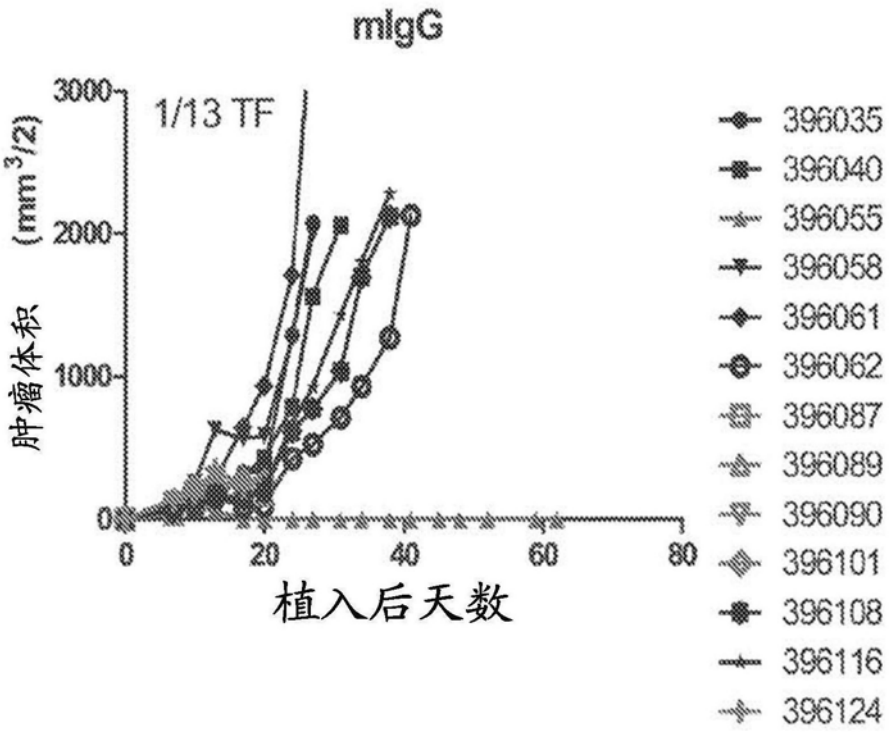

mIgG
1/13 TF
肿瘤体积 (mm3/2)
3000
2000
1000
0
0
20
40
60
80
植入后天数
396035
396040
396055
396058
396061
396062
396087
396089
396090
396101
396108
396116
396124

图41A

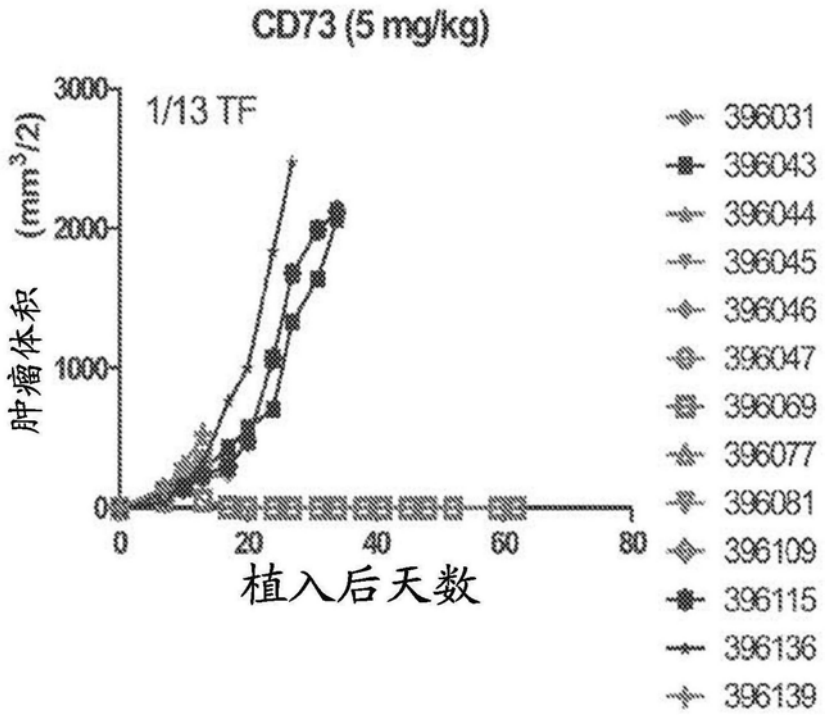

CD73 (5 mg/kg)
1/13 TF
肿瘤体积 (mm3/2)
3000
2000
1000
0
0
20
40
60
80
植入后天数
396031
396043
396044
396045
396046
396047
396069
396077
396081
396109
396115
396136
396139

图41B

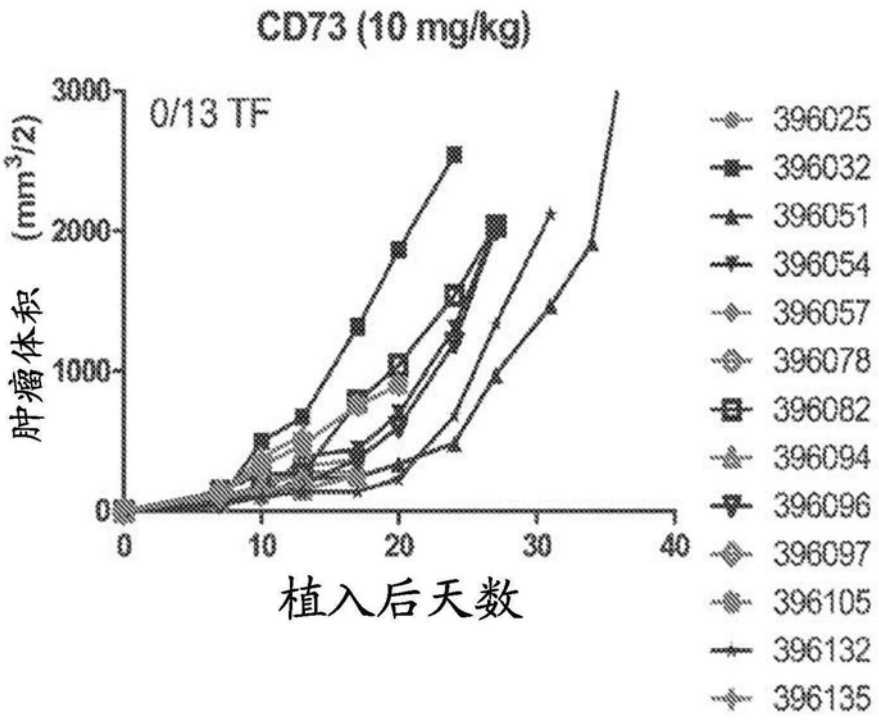

CD73 (10 mg/kg)
0/13 TF
肿瘤体积 (mm3/2)
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
40
植入后天数
396025
396032
396051
396054
396057
396078
396082
396094
396096
396097
396105
396132
396135

图41C

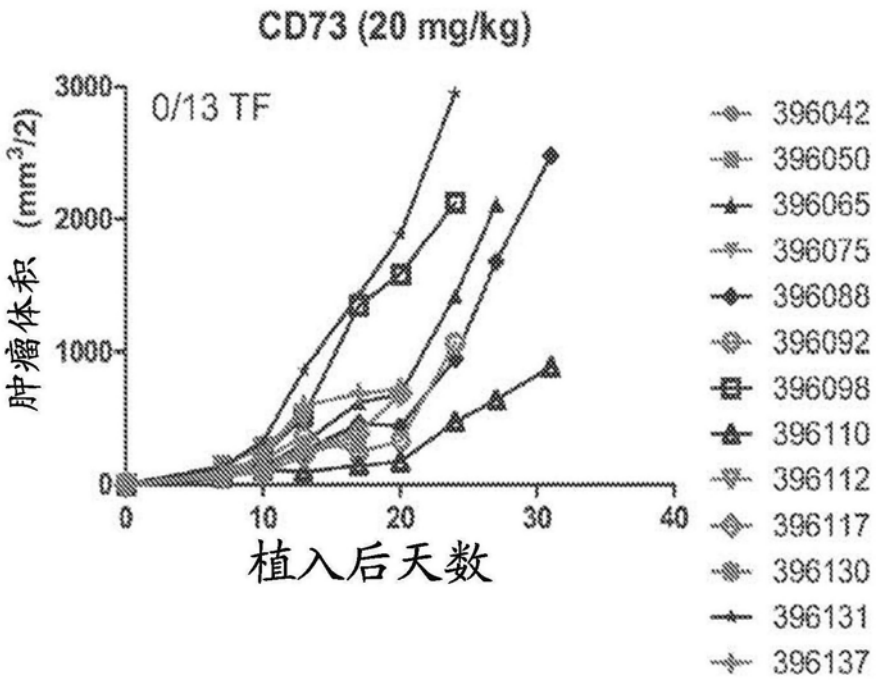

CD73 (20 mg/kg)
0/13 TF
肿瘤体积 (mm3/2)
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
40
植入后天数
396042
396050
396065
396075
396088
396092
396098
396110
396112
396117
396130
396131
396137

图41D

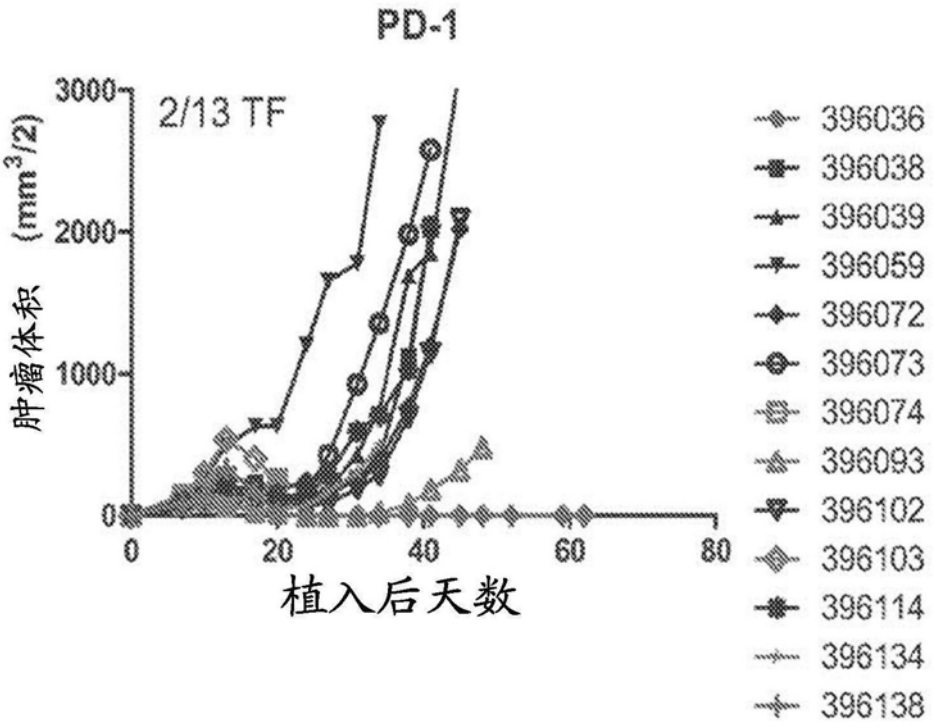

PD-1
2/13 TF
肿瘤体积 (mm3/2)
3000
2000
1000
0
0
20
40
60
80
植入后天数
396036
396038
396039
396059
396072
396073
396074
396093
396102
396103
396114
396134
396138

图42A

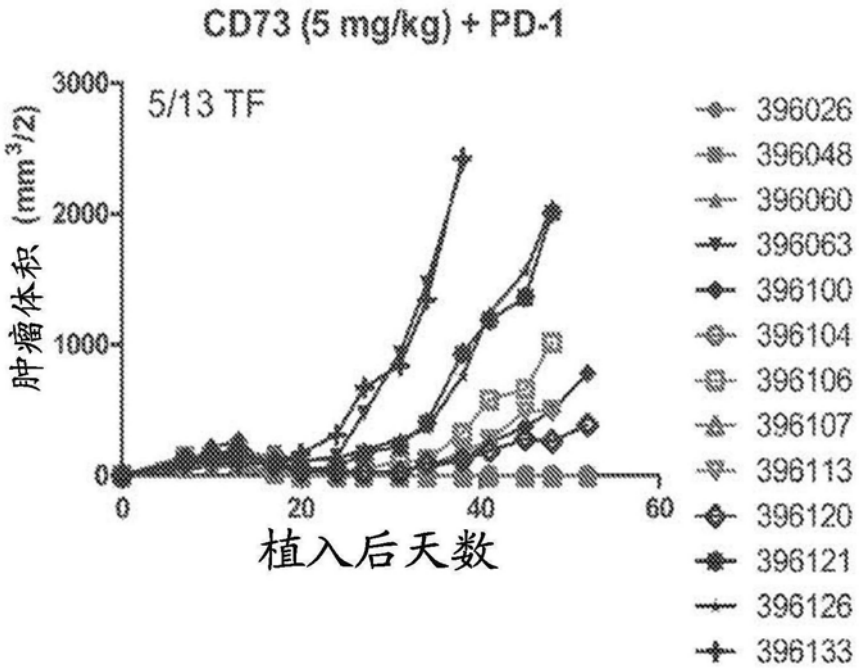

CD73 (5 mg/kg) + PD-1
5/13 TF
肿瘤体积 (mm3/2)
3000
2000
1000
0
0
20
40
60
植入后天数
396026
396048
396060
396063
396100
396104
396106
396107
396113
396120
396121
396126
396133

图42B

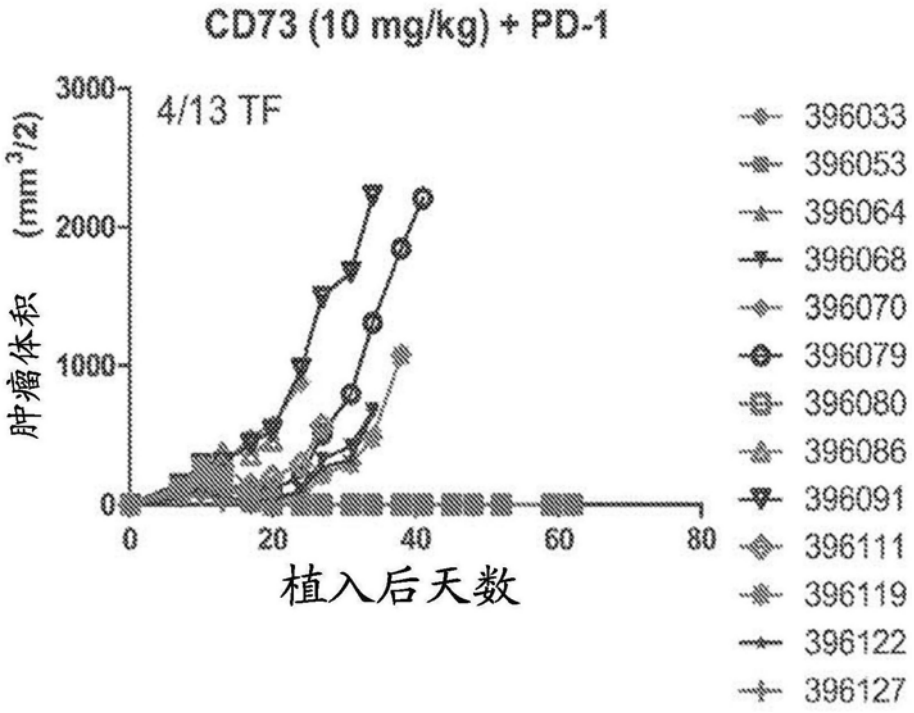

CD73 (10 mg/kg) + PD-1
4/13 TF
肿瘤体积 (mm3/2)
3000
2000
1000
0
0
20
40
60
80
植入后天数
396033
396053
396064
396068
396070
396079
396080
396086
396091
396111
396119
396122
396127

图42C

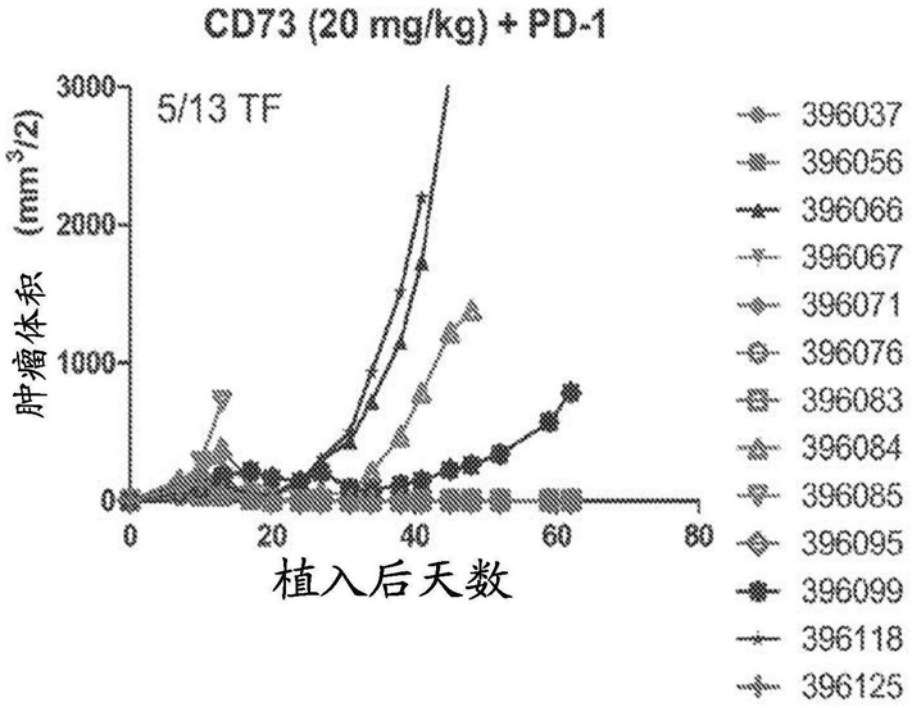

CD73 (20 mg/kg) + PD-1
5/13 TF
肿瘤体积 (mm3/2)
3000
2000
1000
0
0
20
40
60
80
植入后天数
396037
396056
396066
396067
396071
396076
396083
396084
396085
396095
396099
396118
396125

图42D

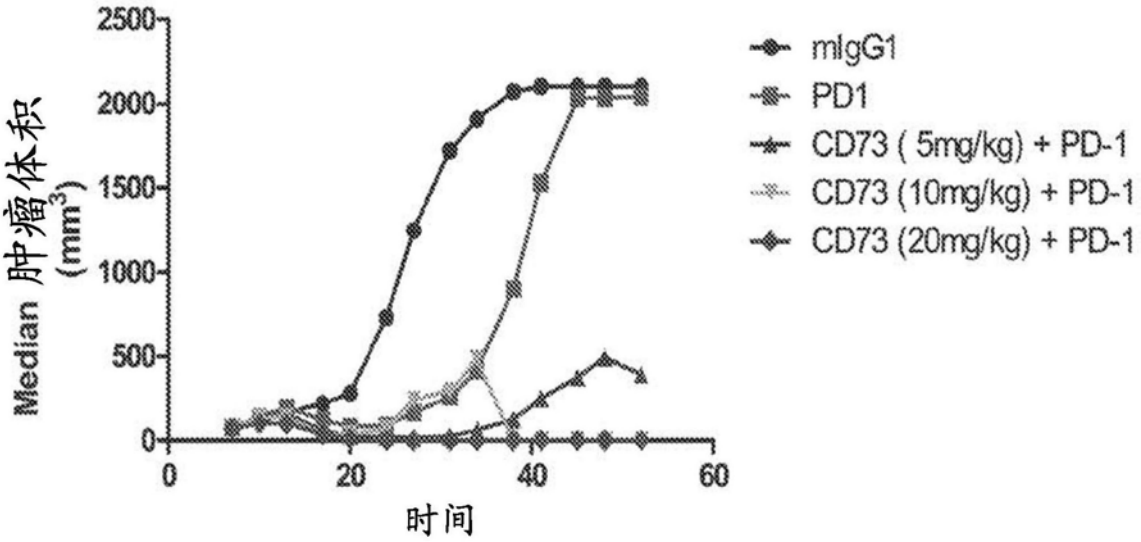

Median 肿瘤体积 (mm^3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
20
40
60
时间
mIgG1
PD1
CD73 (5mg/kg) + PD-1
CD73 (10mg/kg) + PD-1
CD73 (20mg/kg) + PD-1

图43

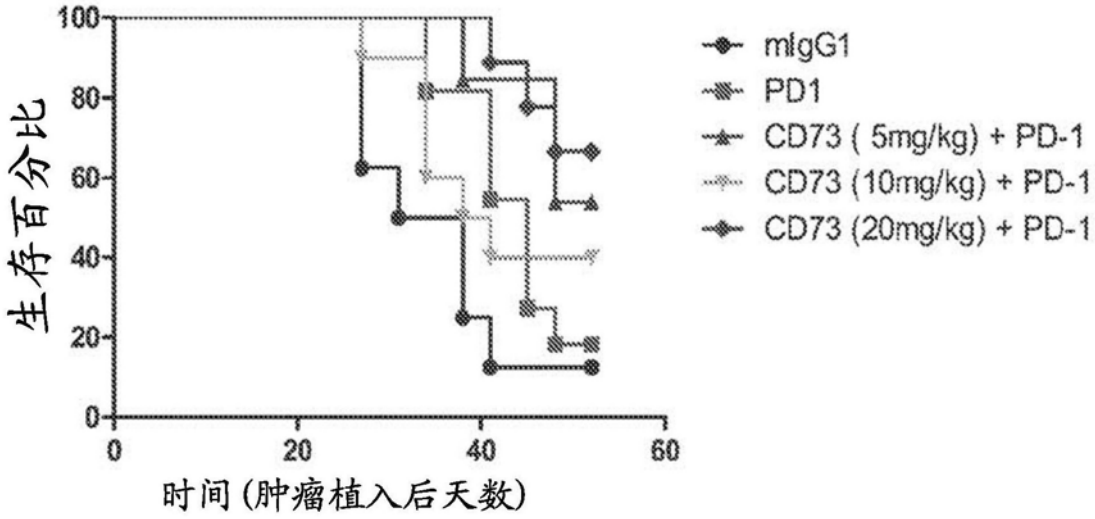

生存百分比
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
时间(肿瘤植入后天数)
mIgG1
PD1
CD73 (5mg/kg) + PD-1
CD73 (10mg/kg) + PD-1
CD73 (20mg/kg) + PD-1

图44

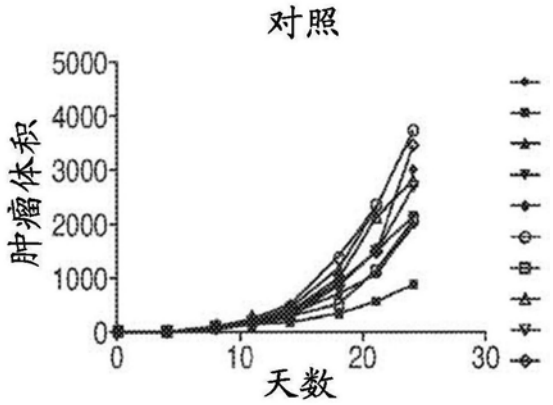


图45A

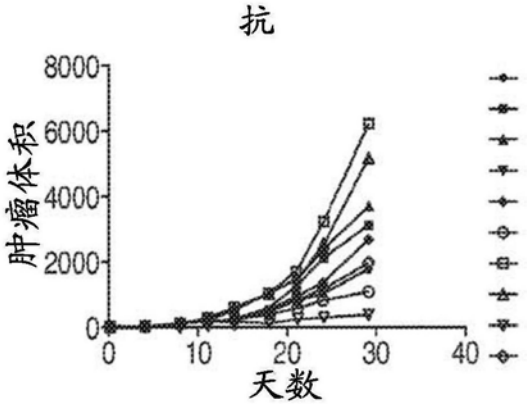


图45B

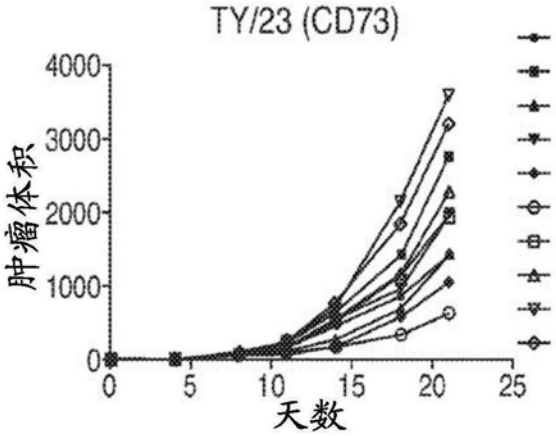


图45C

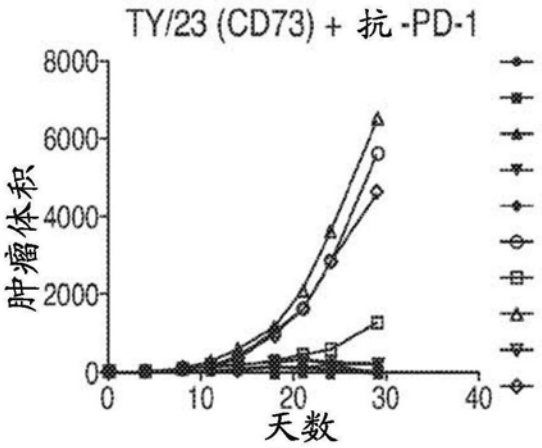


图45D

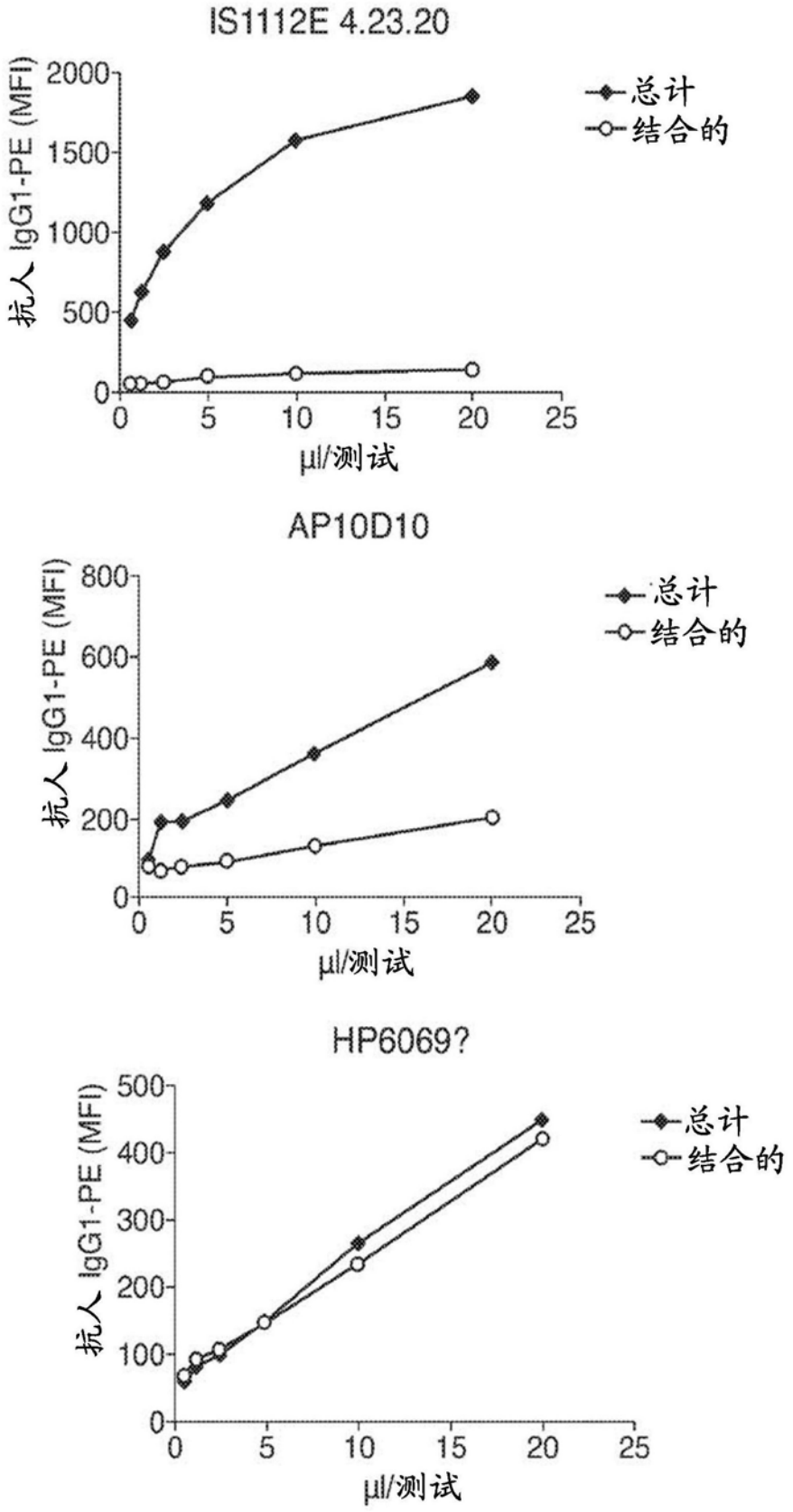

IS1112E 4.23.20
抗人 IgG1-PE (MFI)
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
µl/测试
总计
结合的
AP10D10
抗人 IgG1-PE (MFI)
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
µl/测试
总计
结合的
HP6069?
抗人 IgG1-PE (MFI)
500
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
25
µl/测试
总计
结合的

图46

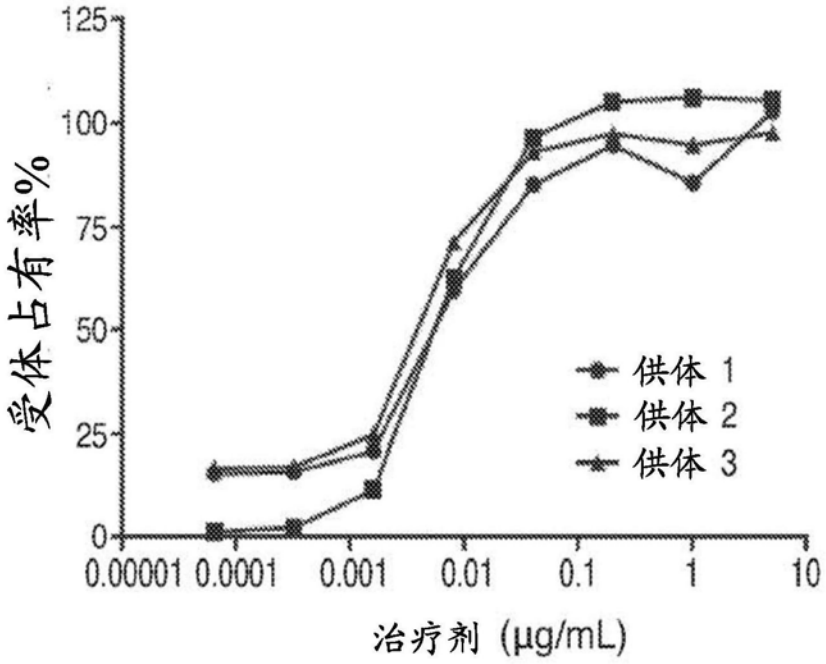

125
100
75
50
25
0
受体占有率%
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
治疗剂 (μg/mL)
供体 1
供体 2
供体 3

图47

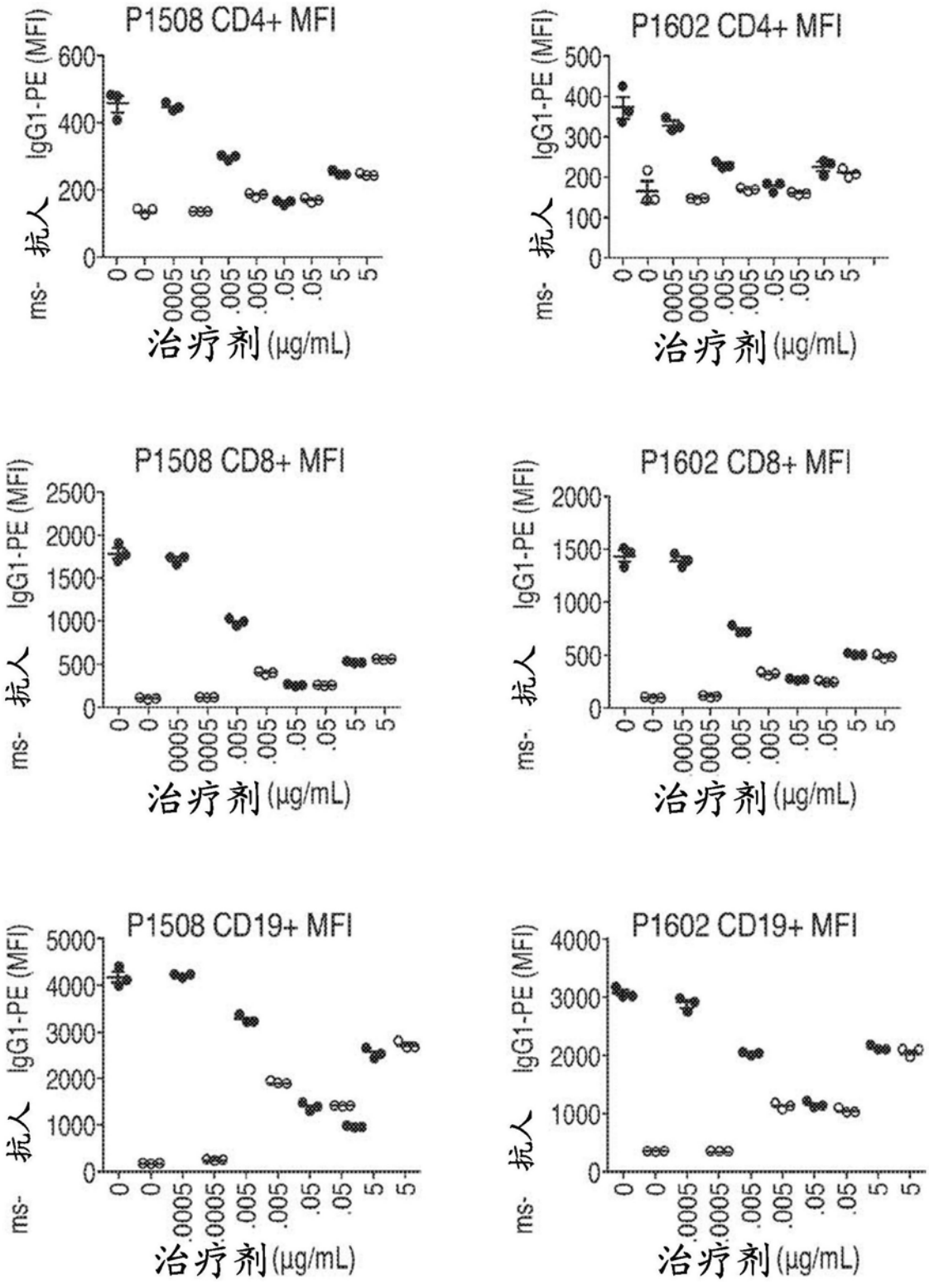
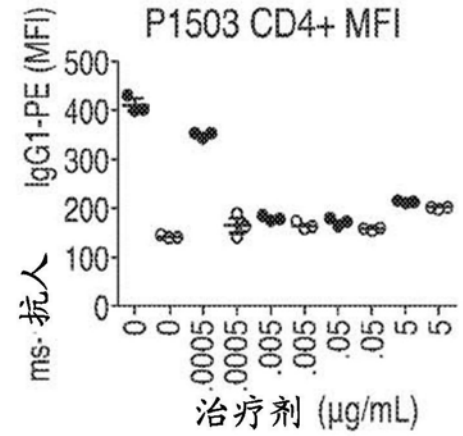
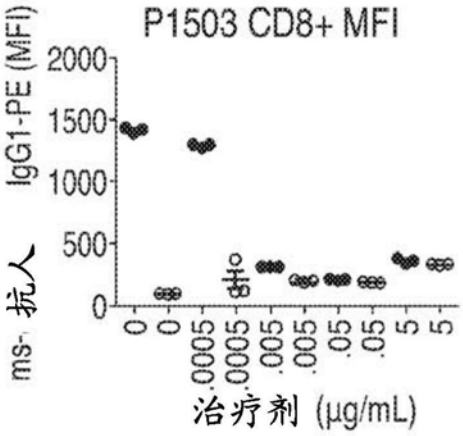

P1508 CD4+ MFI
P1602 CD4+ MFI
P1508 CD8+ MFI
P1602 CD8+ MFI
P1508 CD19+ MFI
P1602 CD19+ MFI
ms- 抗人 IgG1-PE (MFI)
治疗剂 (μg/mL)
0
0
.0005
.0005
.005
.005
.05
.05
5
5

图48


P1503 CD4+ MFI
ms-抗人 IgG1-PE (MFI)
500
400
300
200
100
0
0 0 .0005 .0005 .005 .005 .05 .05 5 5
治疗剂 (μg/mL)


P1503 CD8+ MFI
ms-抗人 IgG1-PE (MFI)
2000
1500
1000
500
0
0 0 .0005 .0005 .005 .005 .05 .05 5 5
治疗剂 (μg/mL)

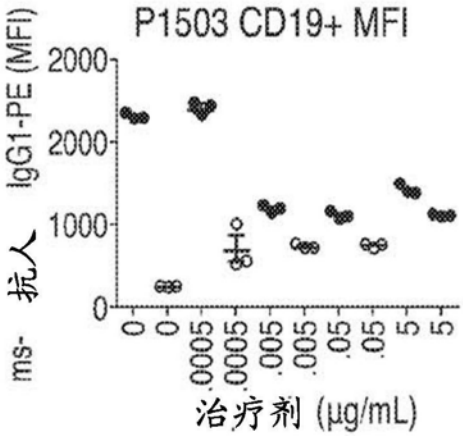

P1503 CD19+ MFI
ms-抗人 IgG1-PE (MFI)
2000
2000
1000
0
0 0 .0005 .0005 .005 .005 .05 .05 5 5
治疗剂 (μg/mL)

图48 续

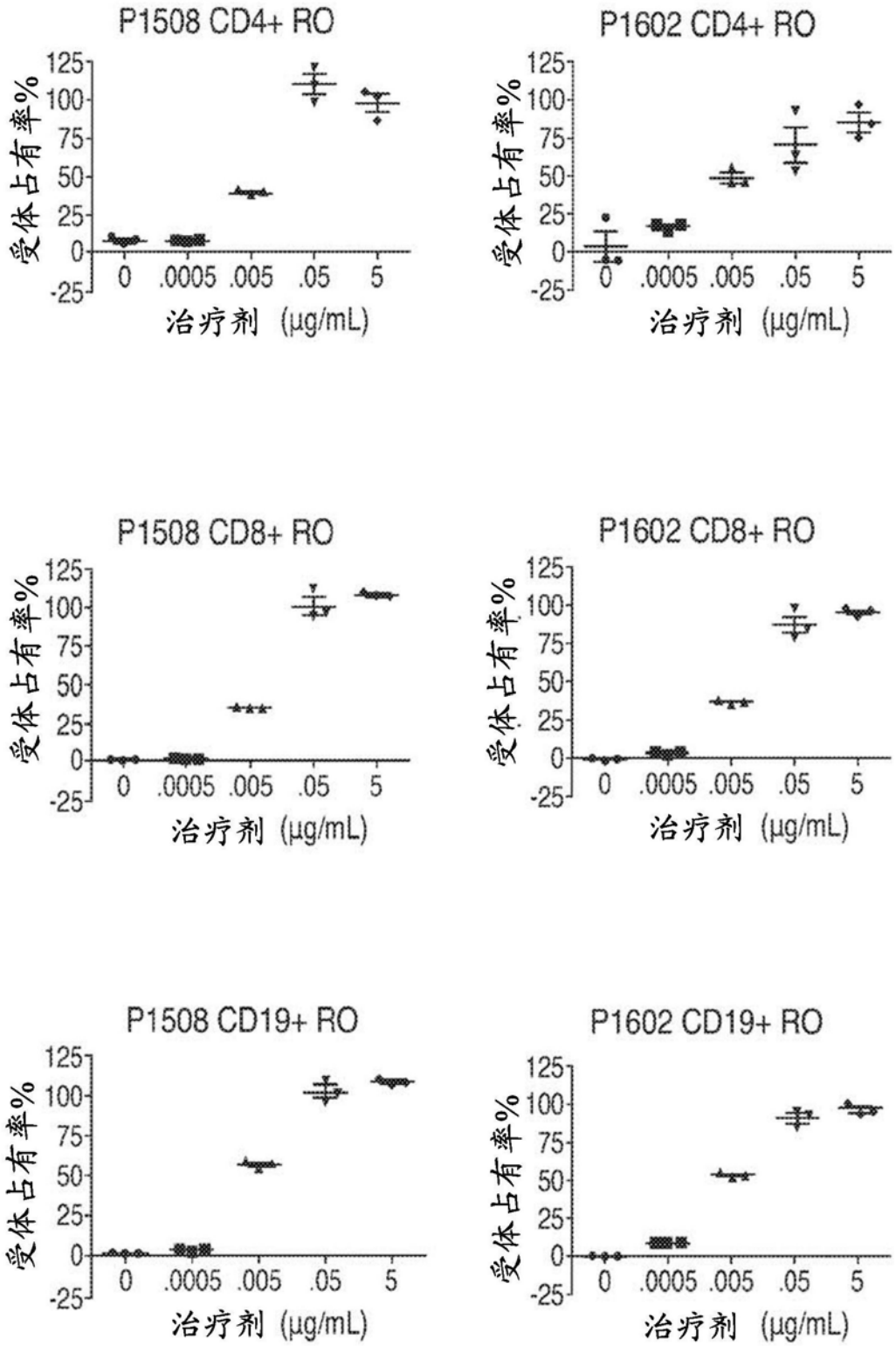

P1508 CD4+ RO
P1602 CD4+ RO
P1508 CD8+ RO
P1602 CD8+ RO
P1508 CD19+ RO
P1602 CD19+ RO
受体占有率%
125
100
75
50
25
0
-25
0
.0005
.005
.05
5
治疗剂 (μg/mL)

图49

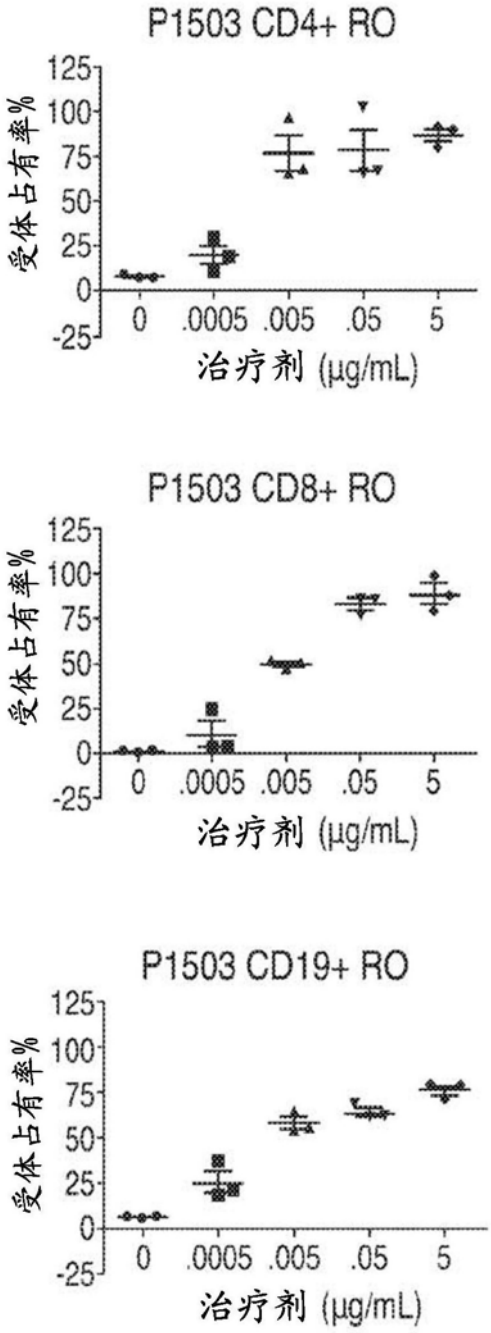

P1503 CD4+ RO
受体占有率%
125
100
75
50
25
0
-25
0
.0005
.005
.05
5
治疗剂 (μg/mL)
P1503 CD8+ RO
受体占有率%
治疗剂 (μg/mL)
P1503 CD19+ RO
受体占有率%
治疗剂 (μg/mL)

图49 续

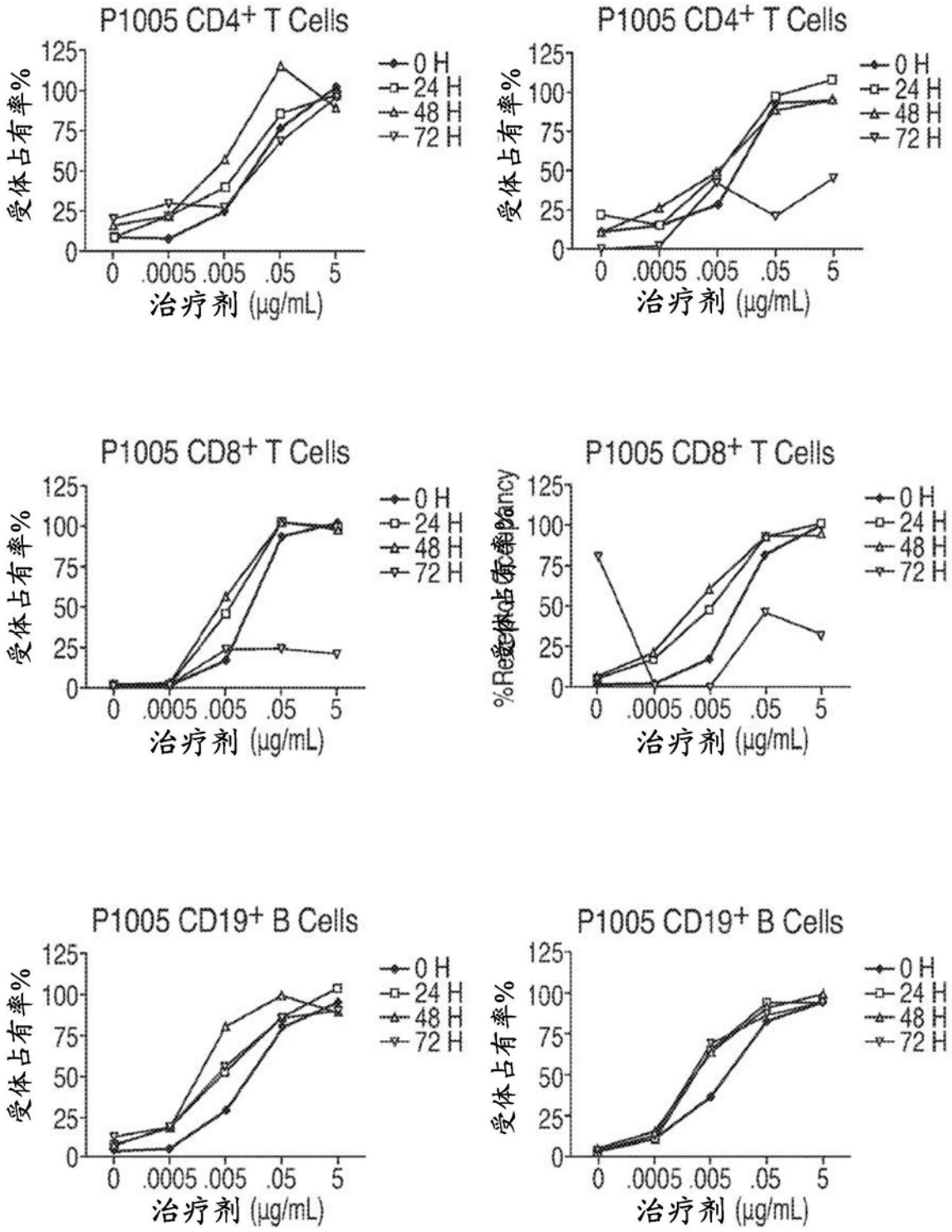
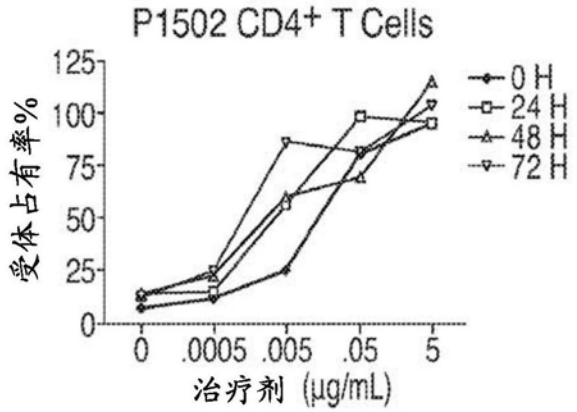
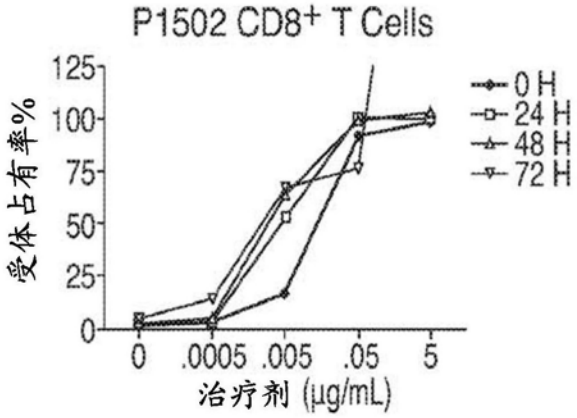

P1005 CD4+ T Cells
受体占有率%
治疗剂 (μg/mL)
0 H
24 H
48 H
72 H
P1005 CD8+ T Cells
P1005 CD19+ B Cells
0
.0005
.005
.05
5
125
100
75
50
25

图50


P1502 CD4+ T Cells
受体占有率%
125
100
75
50
25
0
0 .0005 .005 .05 5
治疗剂 (μg/mL)
0 H
24 H
48 H
72 H


P1502 CD8+ T Cells
受体占有率%
125
100
75
50
25
0
0 .0005 .005 .05 5
治疗剂 (μg/mL)
0 H
24 H
48 H
72 H

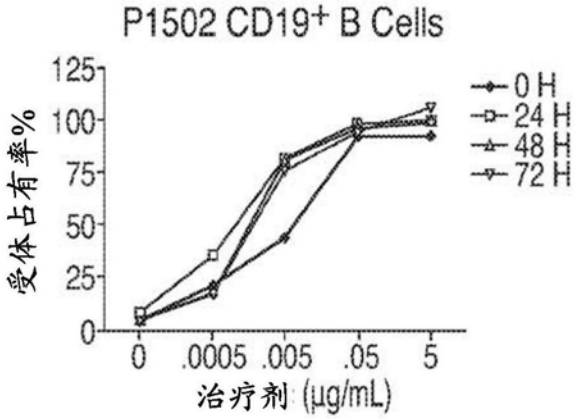

P1502 CD19+ B Cells
受体占有率%
125
100
75
50
25
0
0 .0005 .005 .05 5
治疗剂 (μg/mL)
0 H
24 H
48 H
72 H

图50续

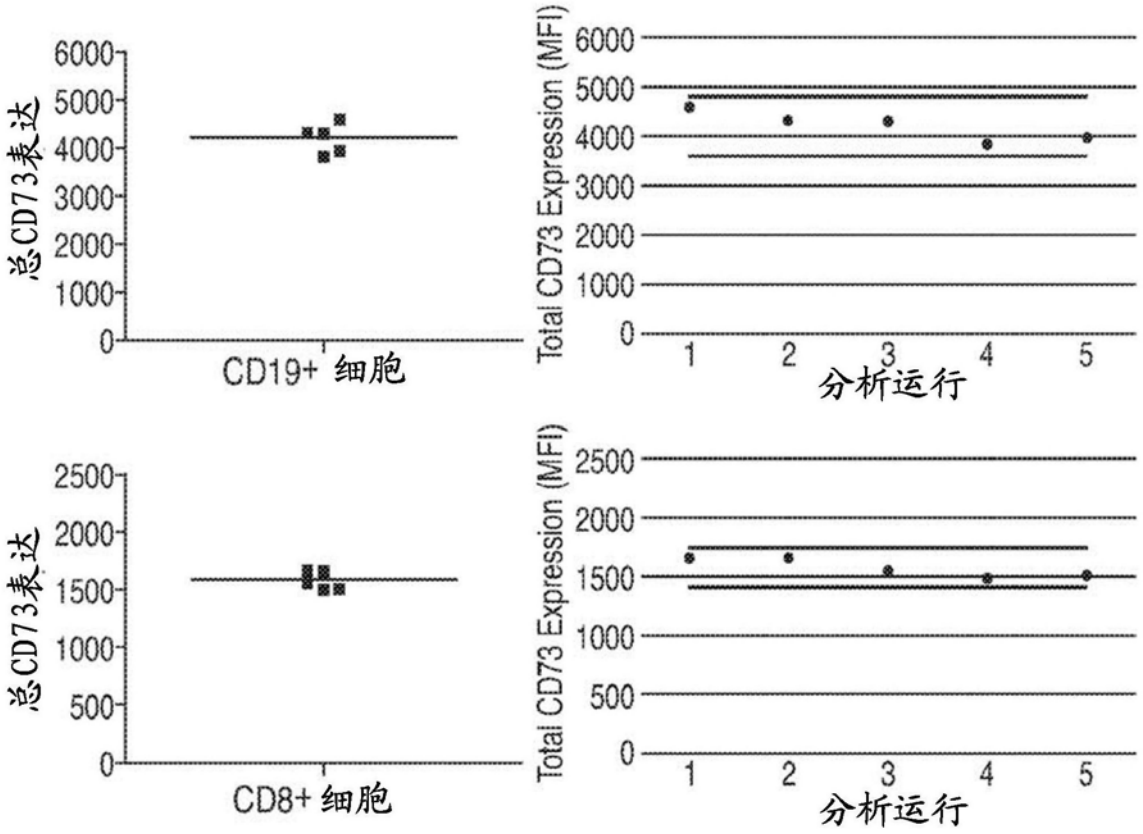

总CD73表达
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
CD19+ 细胞
Total CD73 Expression (MFI)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
1
2
3
4
5
分析运行
总CD73表达
2500
2000
1500
1000
500
0
CD8+ 细胞
Total CD73 Expression (MFI)
2500
2000
1500
1000
500
0
1
2
3
4
5
分析运行

图51

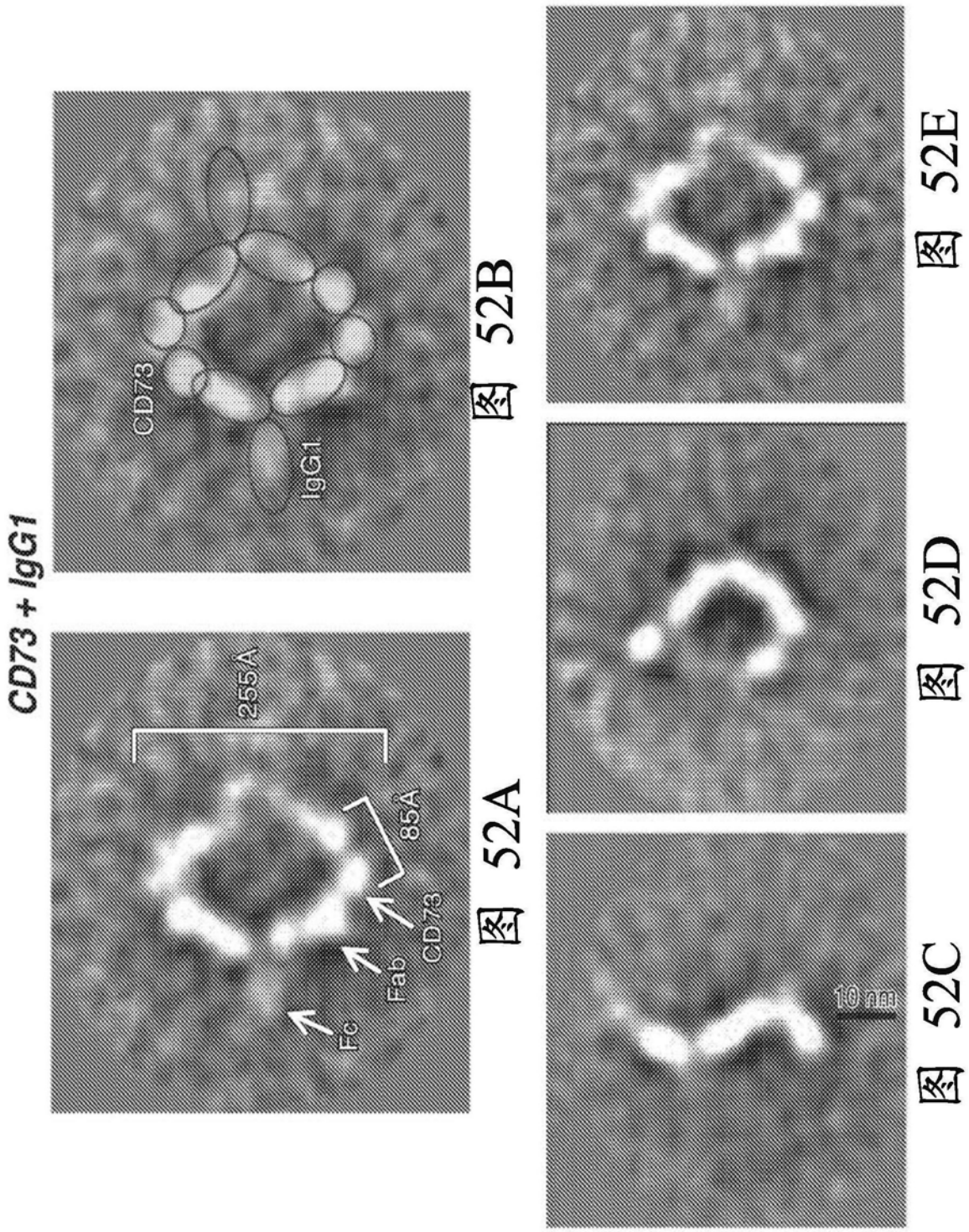
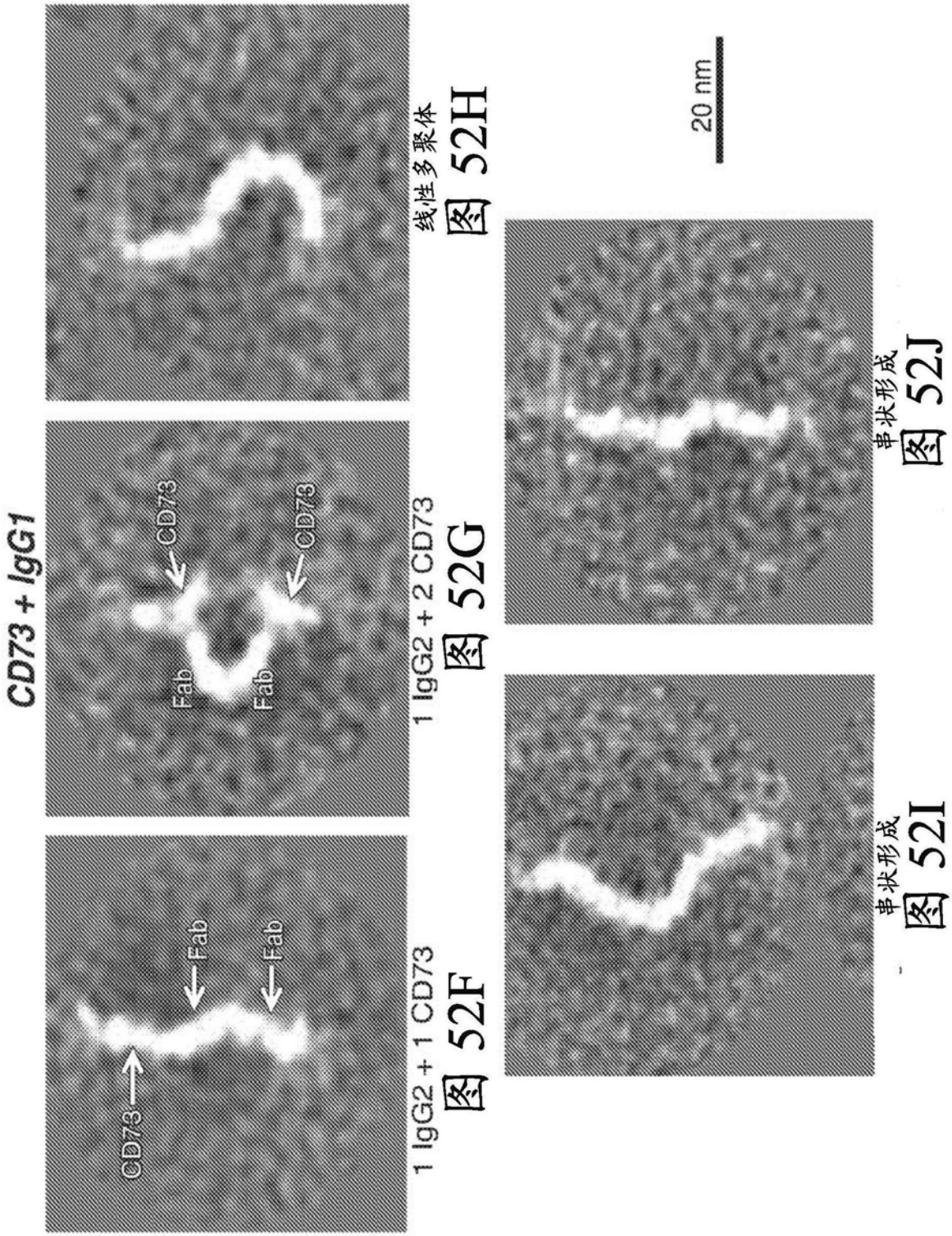


图 52A 图 52B 图 52C 图 52D 图 52E



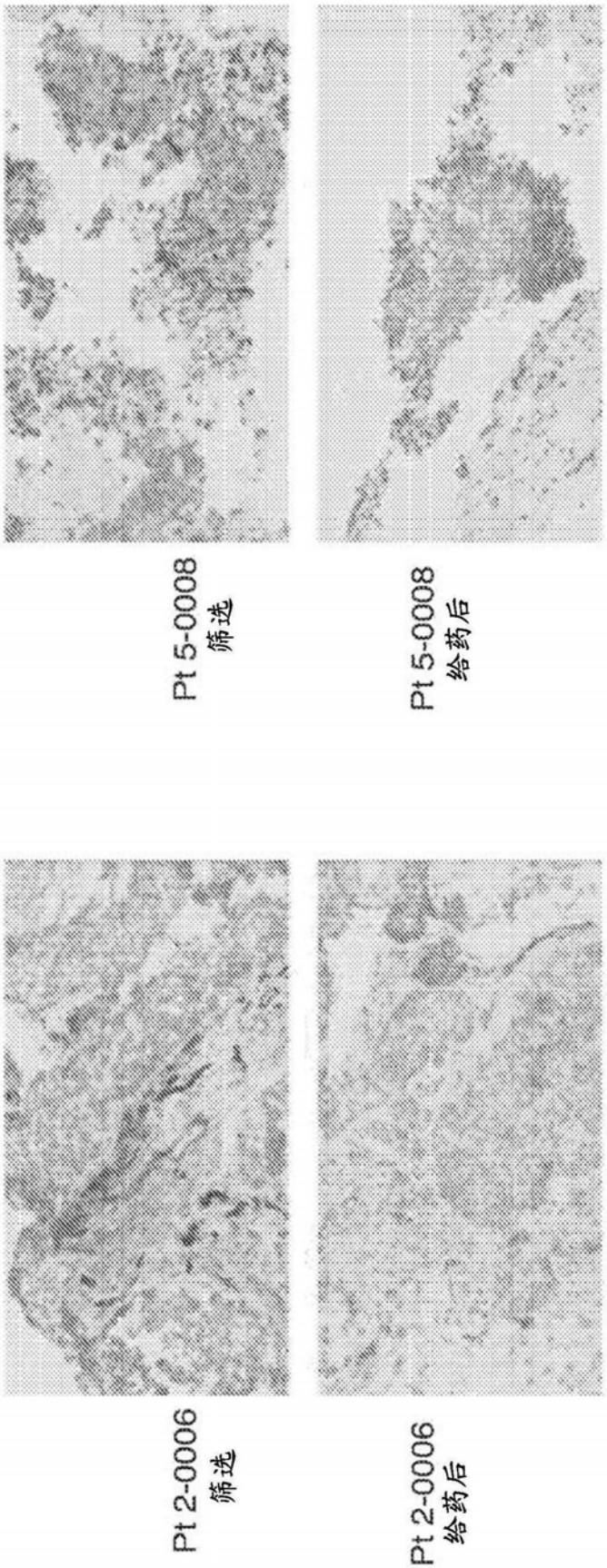
1 IgG2 + 1 CD73
图 52F

1 IgG2 + 2 CD73
图 52G

线性多聚体
图 52H

串状形成
图 52I

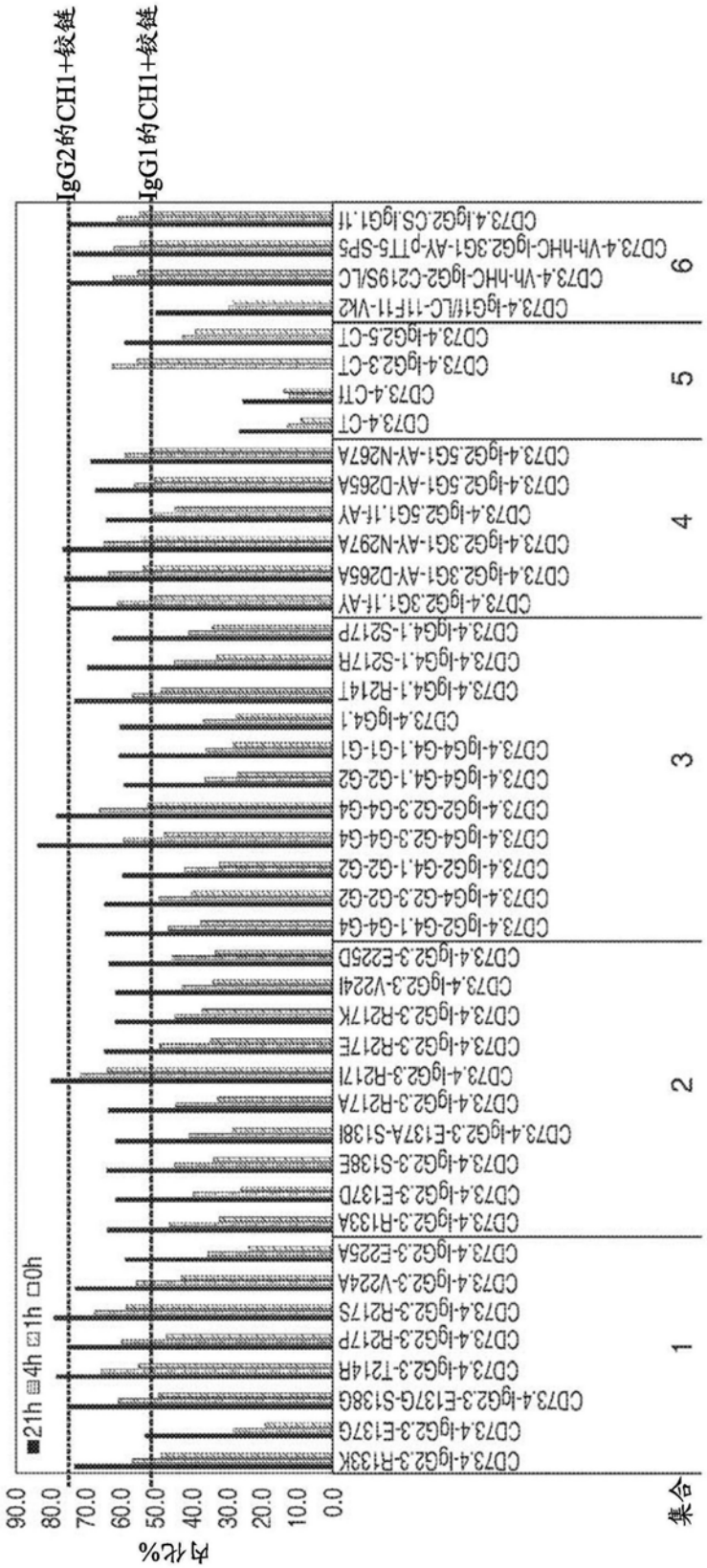
串状形成
图 52J



图像分析

患者	(3+)百分比	(2+)百分比	百分比	阳性百分比	评分
0008 给药后	0.01	0.01	0.01	0.02	0.04
0008 筛选	0.65	1.21	0.96	2.81	5.31
0006 给药后	0.07	0.23	0.16	0.46	0.83
0006 筛选	1.82	2.88	2.16	6.87	13.39

图53



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

图54

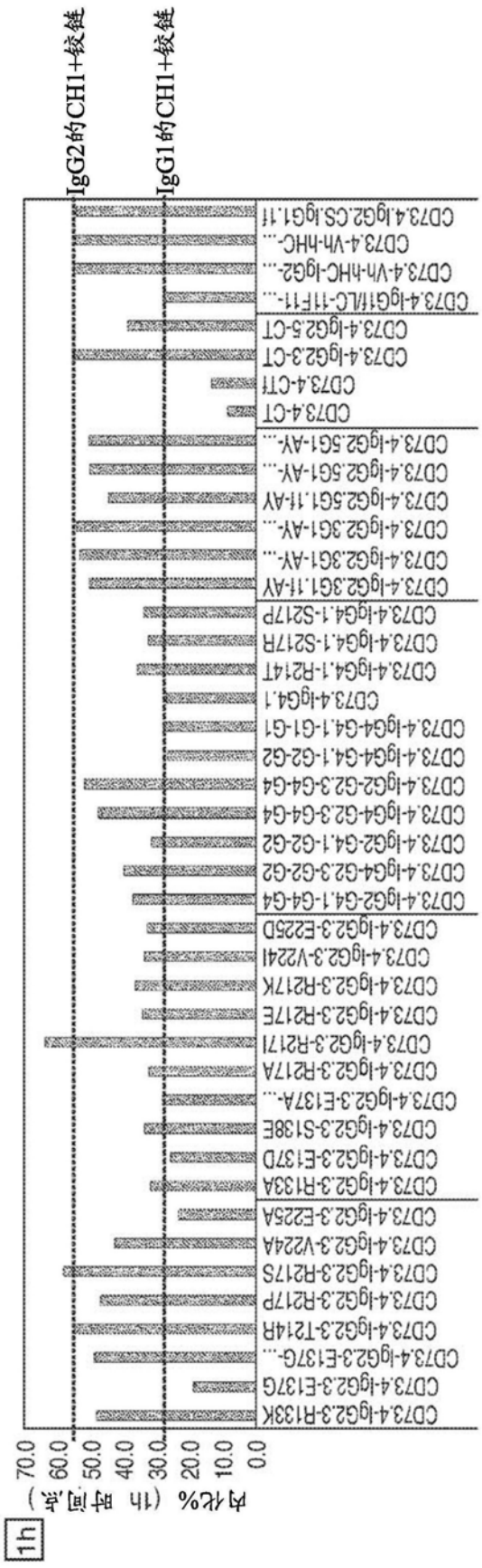

1h
内化% (1h 时间点)
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
50.0
60.0
70.0
IgG1的CH1+铰链
IgG2的CH1+铰链
CD73.4-hIgG2.3-R133K
CD73.4-hIgG2.3-E137G
CD73.4-hIgG2.3-E137G-...
CD73.4-hIgG2.3-T214R
CD73.4-hIgG2.3-R217P
CD73.4-hIgG2.3-R217S
CD73.4-hIgG2.3-V224A
CD73.4-hIgG2.3-E225A
CD73.4-hIgG2.3-R133A
CD73.4-hIgG2.3-E137D
CD73.4-hIgG2.3-S138E
CD73.4-hIgG2.3-E137A-...
CD73.4-hIgG2.3-R217A
CD73.4-hIgG2.3-R217I
CD73.4-hIgG2.3-R217E
CD73.4-hIgG2.3-R217K
CD73.4-hIgG2.3-V224I
CD73.4-hIgG2.3-E225D
CD73.4-hIgG2-G4.1-G4-G4
CD73.4-hIgG4-G2.3-G2-G2
CD73.4-hIgG2-G4.1-G2-G2
CD73.4-hIgG4-G2.3-G4-G4
CD73.4-hIgG2-G2.3-G4-G4
CD73.4-hIgG4-G4.1-G2-G2
CD73.4-hIgG4-G4.1-G1-G1
CD73.4-hIgG4.1
CD73.4-hIgG4.1-R214T
CD73.4-hIgG4.1-S217R
CD73.4-hIgG4.1-S217P
CD73.4-hIgG2.3G1.1f-AY
CD73.4-hIgG2.3G1-AY-...
CD73.4-hIgG2.3G1-AY-...
CD73.4-hIgG2.5G1.1f-AY
CD73.4-hIgG2.5G1-AY-...
CD73.4-hIgG2.5G1-AY-...
CD73.4-CT
CD73.4-CTf
CD73.4-hIgG2.3-CT
CD73.4-hIgG2.5-CT
CD73.4-hIgG1fLC-11F11-...
CD73.4-Vh-hHC-hIgG2-...
CD73.4-Vh-hHC-...
CD73.4.hIgG2.CS.hIgG1.1f

图55A

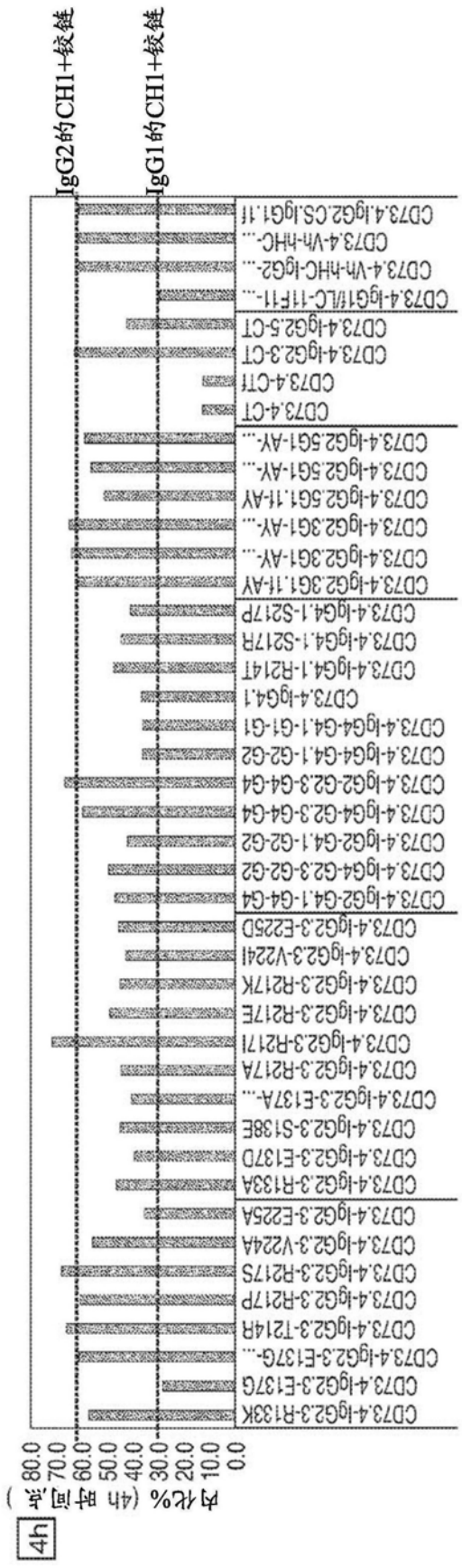

IgG2的CH1+铰链
IgG1的CH1+铰链
CD73.4-IgG2.3-R133K
CD73.4-IgG2.3-E137G
CD73.4-IgG2.3-E137G-...
CD73.4-IgG2.3-T214R
CD73.4-IgG2.3-R217P
CD73.4-IgG2.3-R217S
CD73.4-IgG2.3-V224A
CD73.4-IgG2.3-E225A
CD73.4-IgG2.3-R133A
CD73.4-IgG2.3-E137D
CD73.4-IgG2.3-S138E
CD73.4-IgG2.3-E137A-...
CD73.4-IgG2.3-R217A
CD73.4-IgG2.3-R217I
CD73.4-IgG2.3-R217E
CD73.4-IgG2.3-R217K
CD73.4-IgG2.3-V224I
CD73.4-IgG2.3-E225D
CD73.4-IgG2-G4.1-G4-G4
CD73.4-IgG4-G2.3-G2-G2
CD73.4-IgG2-G4.1-G2-G2
CD73.4-IgG4-G2.3-G4-G4
CD73.4-IgG2-G2.3-G4-G4
CD73.4-IgG4-G4.1-G2-G2
CD73.4-IgG4-G4.1-G1-G1
CD73.4-IgG4.1
CD73.4-IgG4.1-R214T
CD73.4-IgG4.1-S217R
CD73.4-IgG4.1-S217P
CD73.4-IgG2.3G1.1f-AY
CD73.4-IgG2.3G1-AY-...
CD73.4-IgG2.3G1-AY-...
CD73.4-IgG2.5G1.1f-AY
CD73.4-IgG2.5G1-AY-...
CD73.4-IgG2.5G1-AY-...
CD73.4-CT
CD73.4-CTf
CD73.4-IgG2.3-CT
CD73.4-IgG2.5-CT
CD73.4-IgG1f/LC-11F11-...
CD73.4-Vh-hHC-IgG2-...
CD73.4-Vh-hHC-...
CD73.4.IgG2.CS.IgG1.1f
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
50.0
60.0
70.0
80.0
内化% (4h 时间点)
4h

图55B

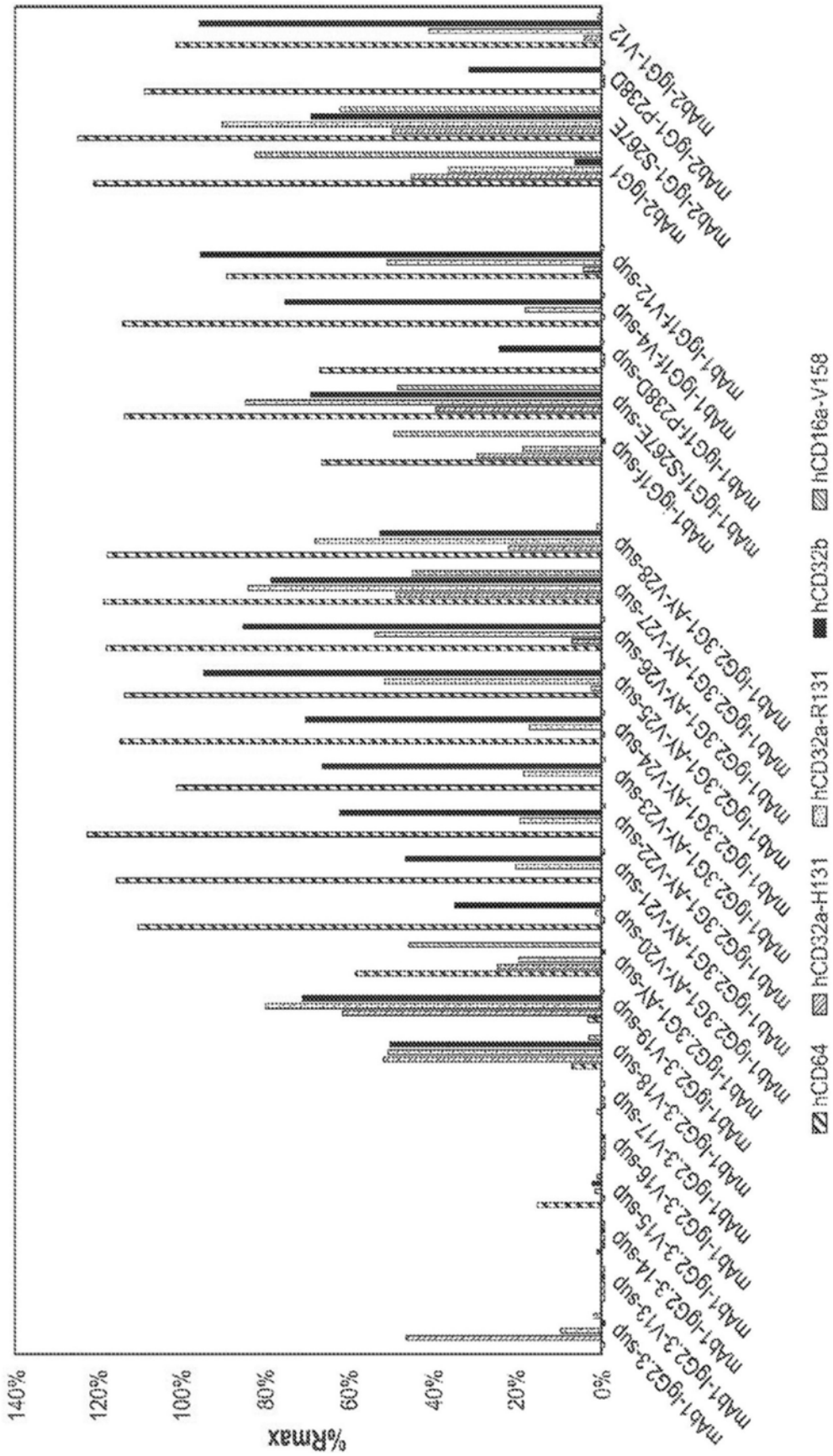

%Rmax
140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
mAb1-IgG2.3-sup
mAb1-IgG2.3-V13-sup
mAb1-IgG2.3-14-sup
mAb1-IgG2.3-V15-sup
mAb1-IgG2.3-V16-sup
mAb1-IgG2.3-V17-sup
mAb1-IgG2.3-V18-sup
mAb1-IgG2.3-V19-sup
mAb1-IgG2.3G1-AY-sup
mAb1-IgG2.3G1-AY-V20-sup
mAb1-IgG2.3G1-AY-V21-sup
mAb1-IgG2.3G1-AY-V22-sup
mAb1-IgG2.3G1-AY-V23-sup
mAb1-IgG2.3G1-AY-V24-sup
mAb1-IgG2.3G1-AY-V25-sup
mAb1-IgG2.3G1-AY-V26-sup
mAb1-IgG2.3G1-AY-V27-sup
mAb1-IgG2.3G1-AY-V28-sup
mAb1-IgG1f-sup
mAb1-IgG1f-S267E-sup
mAb1-IgG1f-P238D-sup
mAb1-IgG1f-V4-sup
mAb1-IgG1f-V12-sup
mAb2-IgG1
mAb2-IgG1-S267E
mAb2-IgG1-P238D
mAb2-IgG1-V12
hCD64
hCD32a-H131
hCD32a-R131
hCD32b
hCD16a-V158

图34

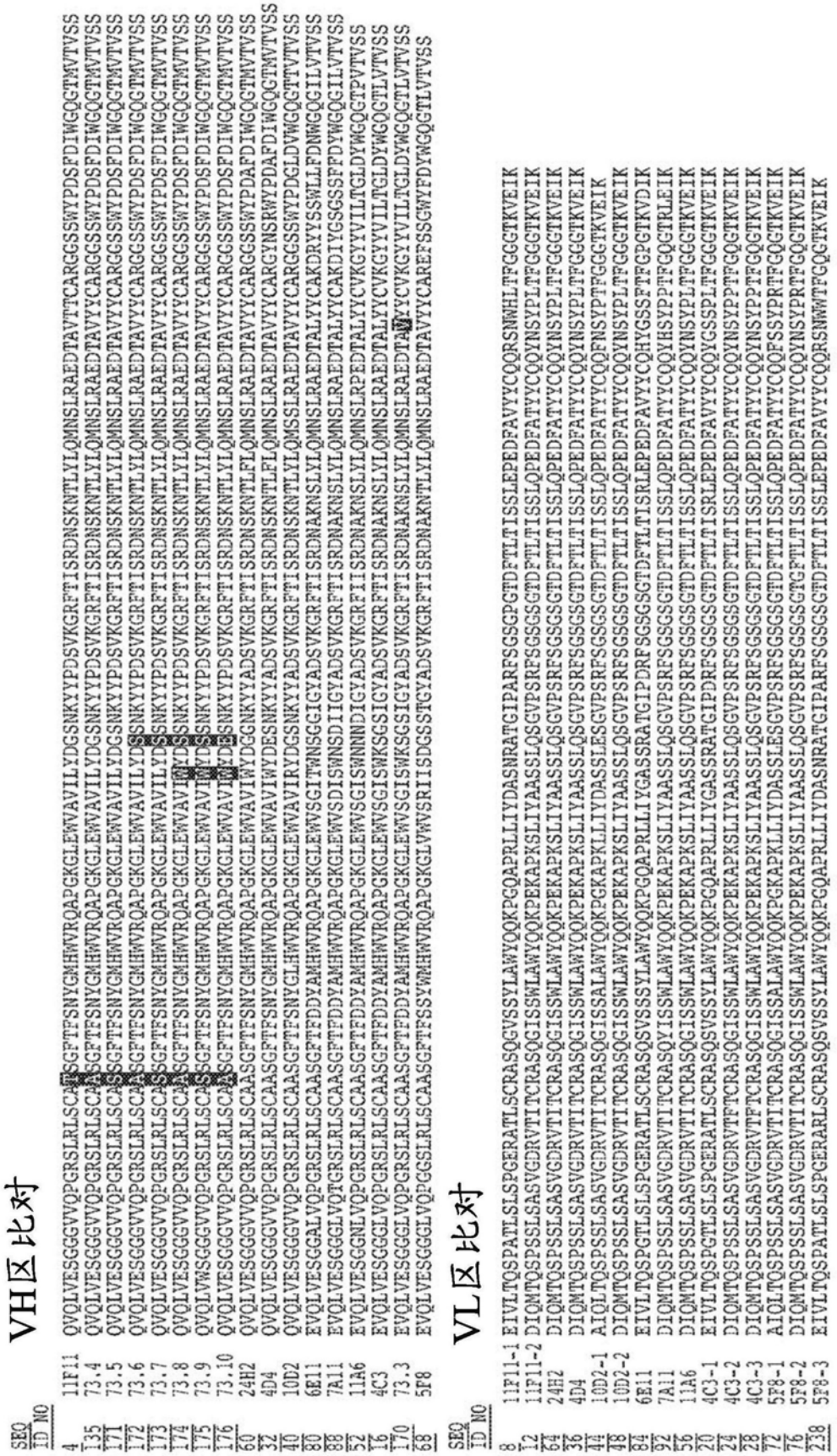

VH区比对
SEQ ID NO
4 11F11 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVTYCARGGSSWYPDSFDIWGQGTMVTVSS
135 73.4 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSWYPDSFDIWGQGTMVTVSS
171 73.5 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSWYPDSFDIWGQGTMVTVSS
172 73.6 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSWYPDSFDIWGQGTMVTVSS
173 73.7 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSWYPDSFDIWGQGTMVTVSS
174 73.8 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSWYPDSFDIWGQGTMVTVSS
175 73.9 QVQLVWSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSWYPDSFDIWGQGTMVTVSS
176 73.10 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVILYDGSNKYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGSSWYPDSFDIWGQGTMVTVSS
60 24H2 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGGNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARGYNSRWYPDAFDIWGQGTMVTVSS
32 4D4 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDESNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARGYNSRWYPDAFDIWGQGTMVTVSS
40 10D2 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGLHWVRQAPGKGLEWVAVIRYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARGYNSRWYPDGLDVWGQGTTVTVSS
80 6E11 EVQLVESGGALVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGITWNSGGIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDRYYSSWLLFDNWGQGILVTVSS
88 7A11 EVQLVESGGGLVQTGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSDISWNSDIIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIYGSGSSFFDYWGQGILVTVSS
52 11A6 EVQLVESGGNLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNNNDIGYADSVKGRFIISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTALYYCVKGYYVILTGLDYWGQGTPVTVSS
16 4C3 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWKSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCVKGYYVILTGLDYWGQGTLVTVSS
170 73.3 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWKSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAWYYCVKGYYVILTGLDYWGQGTLVTVSS
68 5F8 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVWVSRIISDGSSTGYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVTYCAREFSSGWYFDYWGQGTLVTVSS
VL区比对
SEQ ID NO
8 11F11-1 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGPGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWHLTFGGGTKVEIK
12 11F11-2 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK
64 24H2 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK
36 4D4 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPTFGGGTKVEIK
44 10D2-1 AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPLTFGGGTKVEIK
48 10D2-2 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK
84 6E11 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQHYGSSPTFGPGTKVDIK
92 7A11 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQYISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYHSYPPTFGQGTRLEIK
56 11A6 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK
20 4C3-1 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIK
24 4C3-2 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTFTCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGQGTKVEIK
28 4C3-3 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTFTCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGQGTKVEIK
72 5F8-1 AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFSSYPRTFGQGTKVEIK
76 5F8-2 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPRTFGQGTKVEIK
238 5F8-3 EIVLTQSPATLSLSPGERARLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWMTFGQGTKVEIK

图35

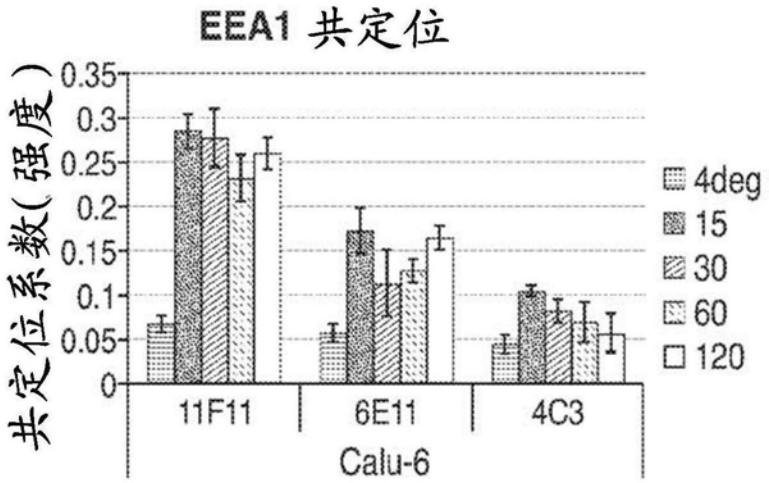

EEA1 共定位
共定位系数(强度)
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
4deg
15
30
60
120
11F11
6E11
4C3
Calu-6

图36A

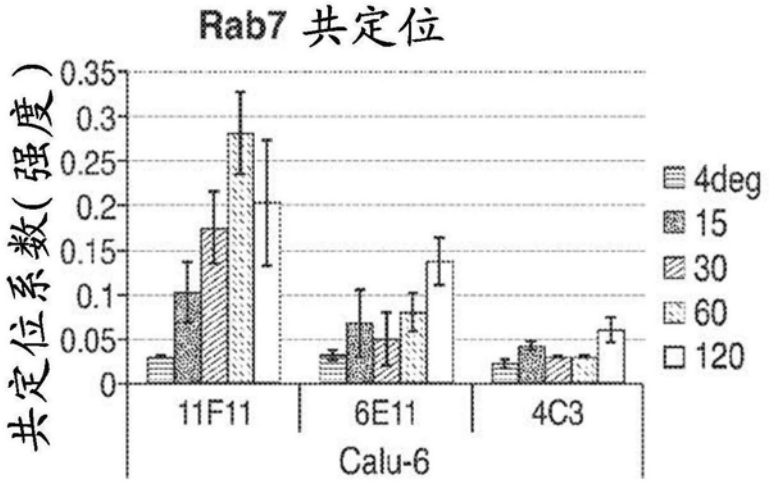

Rab7 共定位
共定位系数(强度)
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
4deg
15
30
60
120
11F11
6E11
4C3
Calu-6

图36B

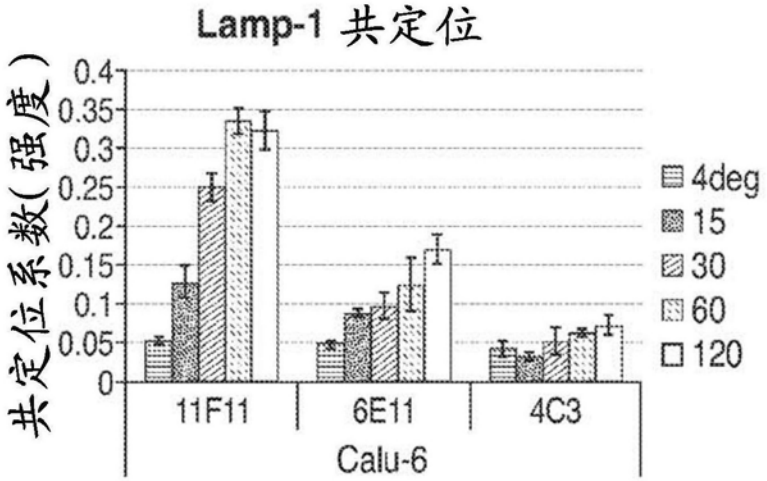

Lamp-1 共定位
共定位系数(强度)
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
11F11
6E11
4C3
Calu-6
4deg
15
30
60
120

图36C

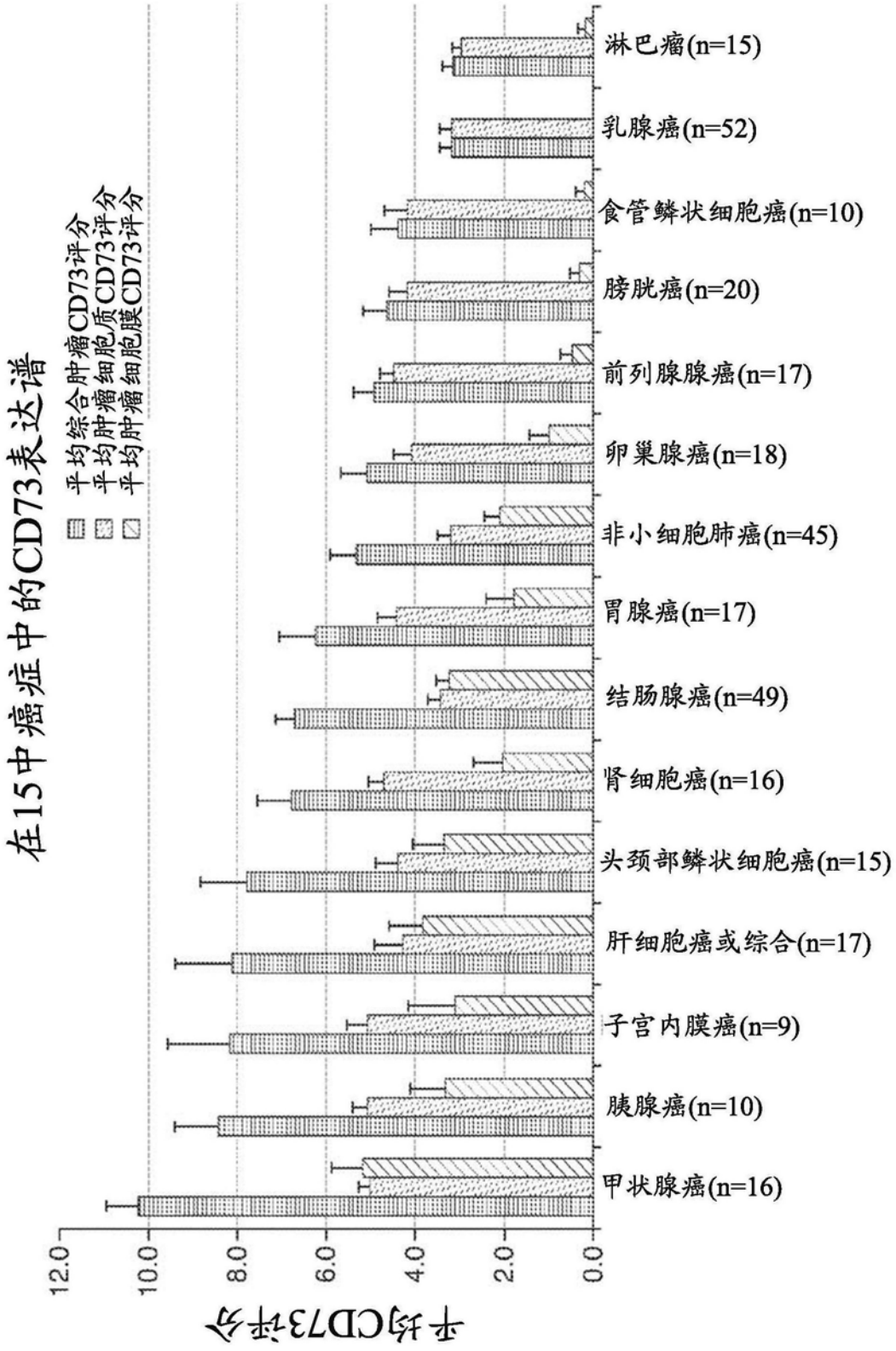

在15中癌症中的CD73表达谱
平均综合肿瘤CD73评分
平均肿瘤细胞质CD73评分
平均肿瘤细胞膜CD73评分
淋巴瘤(n=15)
乳腺癌(n=52)
食管鳞状细胞癌(n=10)
膀胱癌(n=20)
前列腺腺癌(n=17)
卵巢腺癌(n=18)
非小细胞肺癌(n=45)
胃腺癌(n=17)
结肠腺癌(n=49)
肾细胞癌(n=16)
头颈部鳞状细胞癌(n=15)
肝细胞癌或综合(n=17)
子宫内膜癌(n=9)
胰腺癌(n=10)
甲状腺癌(n=16)
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
平均CD73评分

图37A

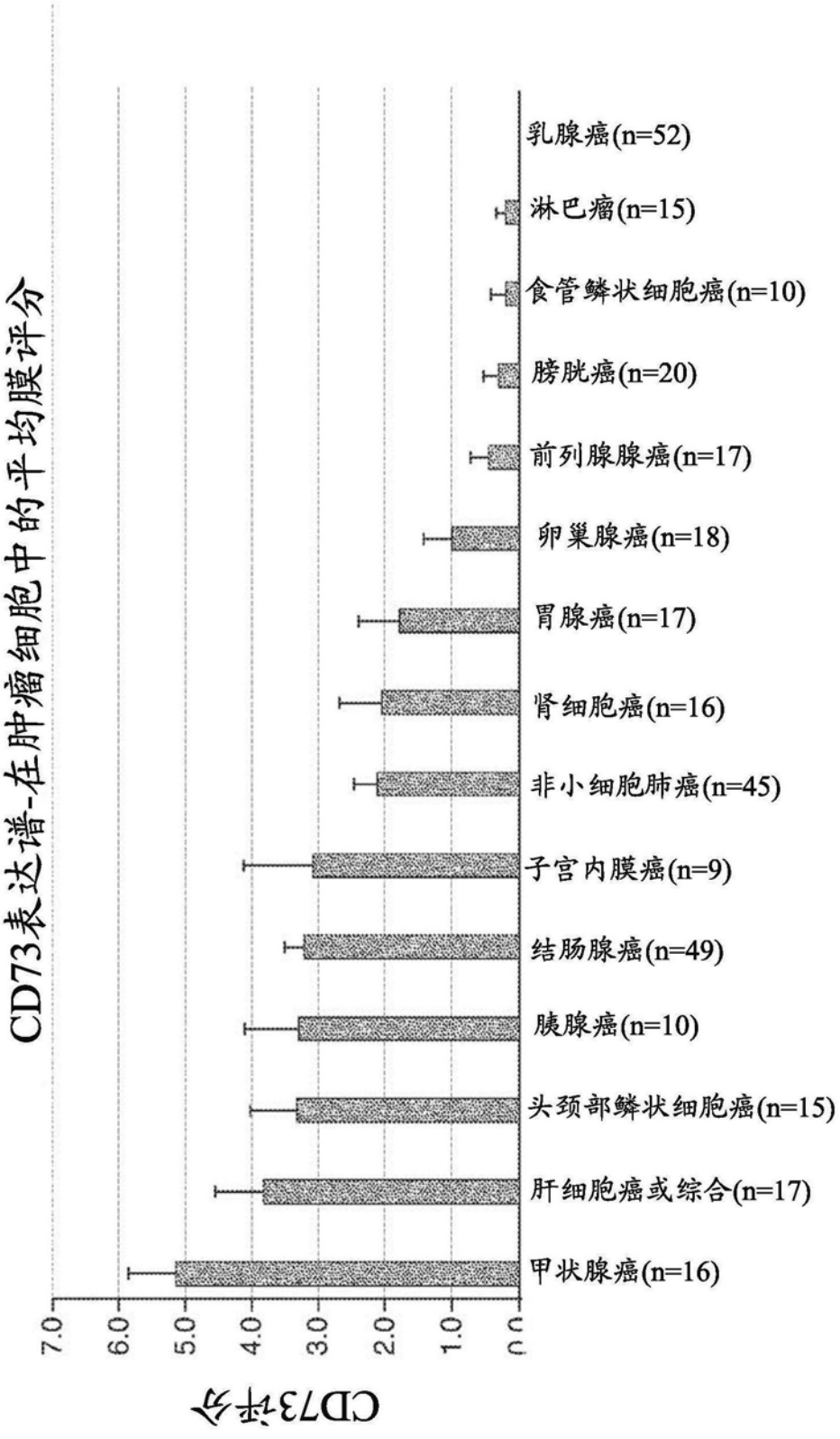

CD73表达谱-在肿瘤细胞中的平均膜评分
乳腺癌(n=52)
淋巴瘤(n=15)
食管鳞状细胞癌(n=10)
膀胱癌(n=20)
前列腺腺癌(n=17)
卵巢腺癌(n=18)
胃腺癌(n=17)
肾细胞癌(n=16)
非小细胞肺癌(n=45)
子宫内膜癌(n=9)
结肠腺癌(n=49)
胰腺癌(n=10)
头颈部鳞状细胞癌(n=15)
肝细胞癌或综合(n=17)
甲状腺癌(n=16)
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
CD73评分

图37B

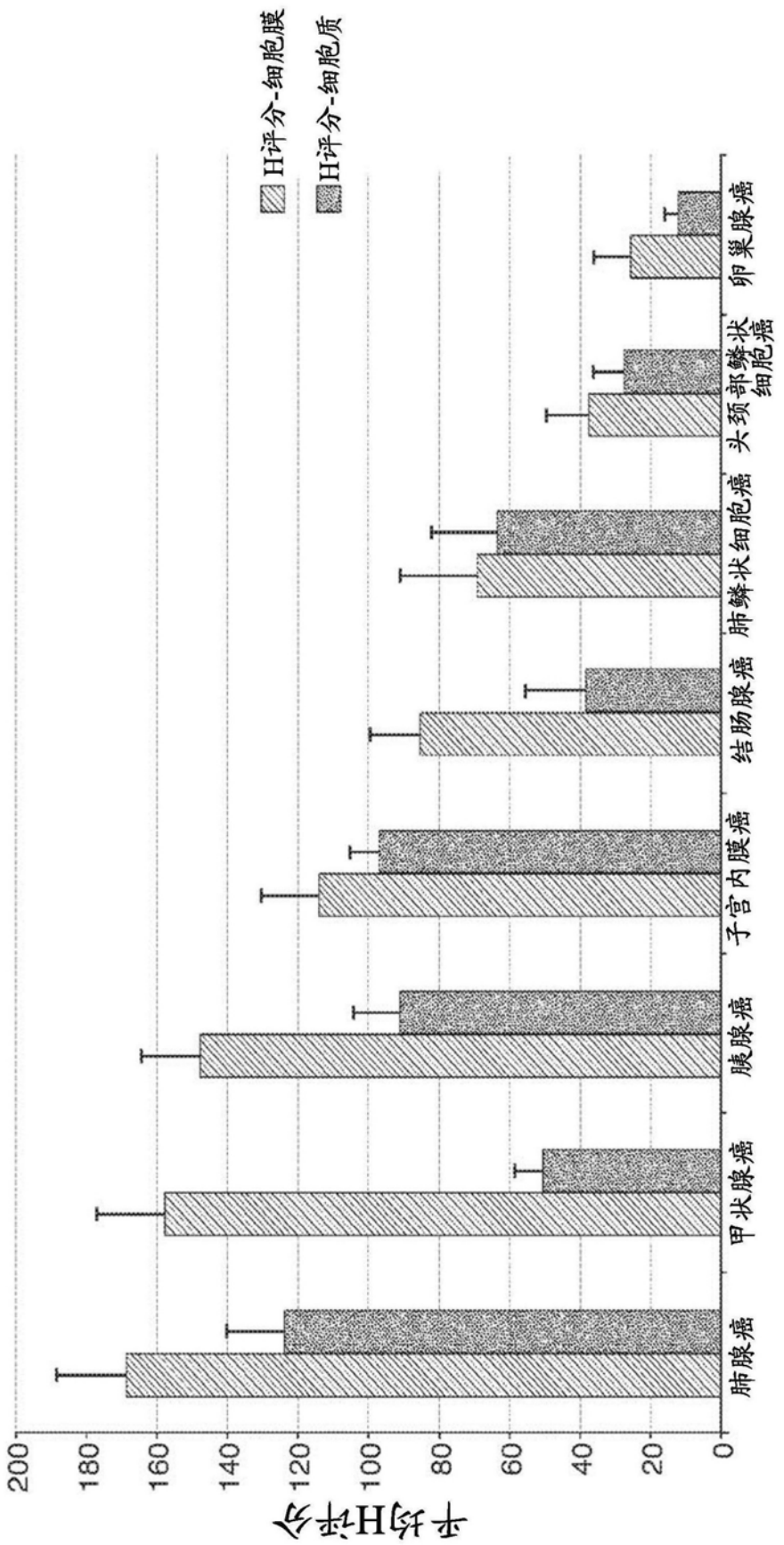

H评分-细胞膜
H评分-细胞质
平均H评分
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
肺腺癌
甲状腺癌
胰腺癌
子宫内膜癌
结肠腺癌
肺鳞状细胞癌
头颈部鳞状细胞癌
卵巢腺癌

图38A

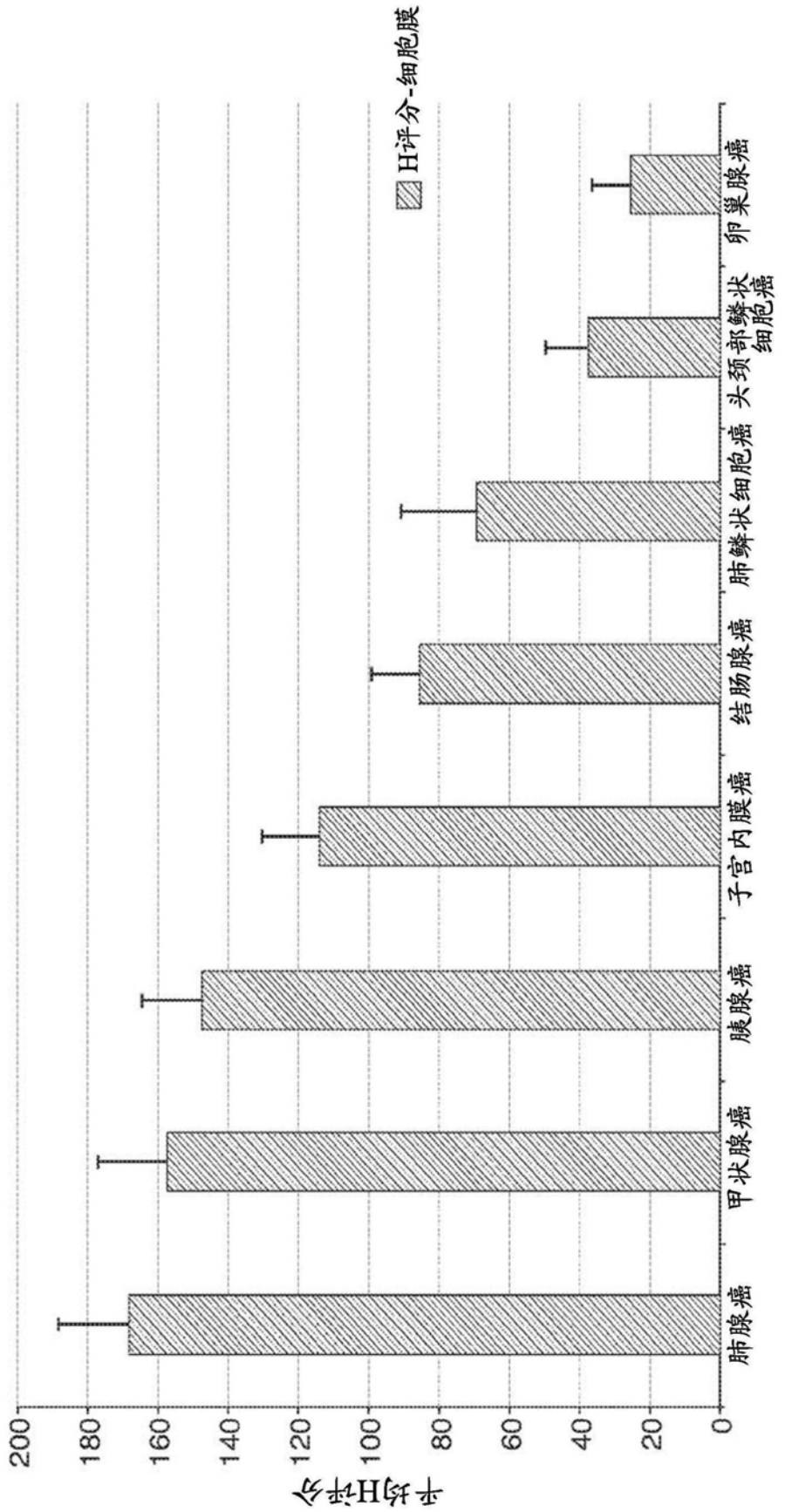

H评分-细胞膜
平均H评分
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
肺腺癌
甲状腺癌
胰腺癌
子宫内膜癌
结肠腺癌
肺鳞状细胞癌
头颈部鳞状细胞癌
卵巢腺癌

图38B

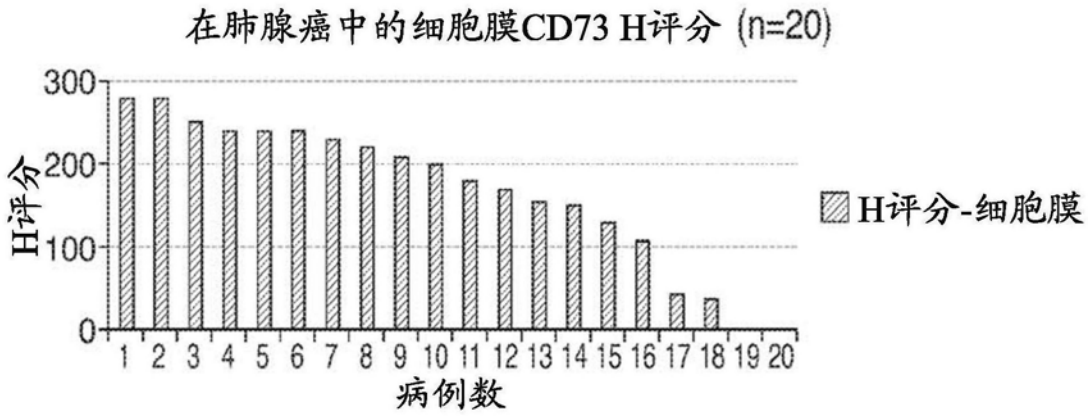


图39A

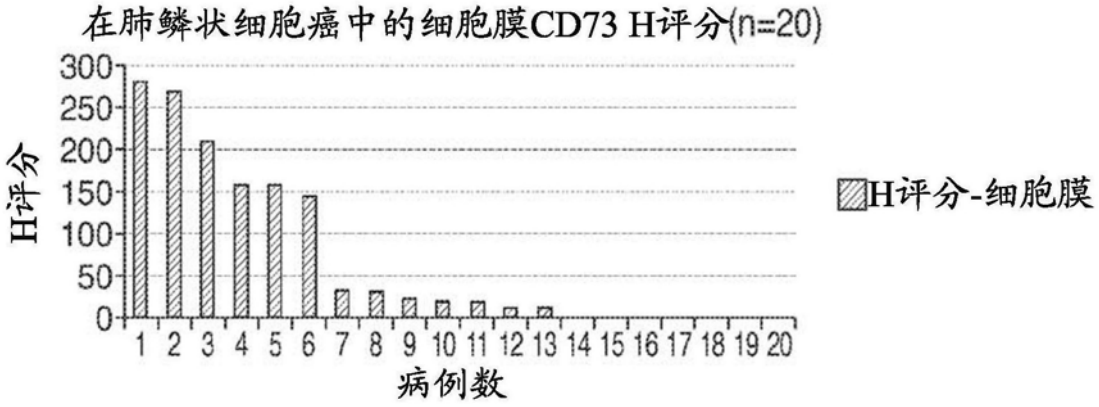


图39B

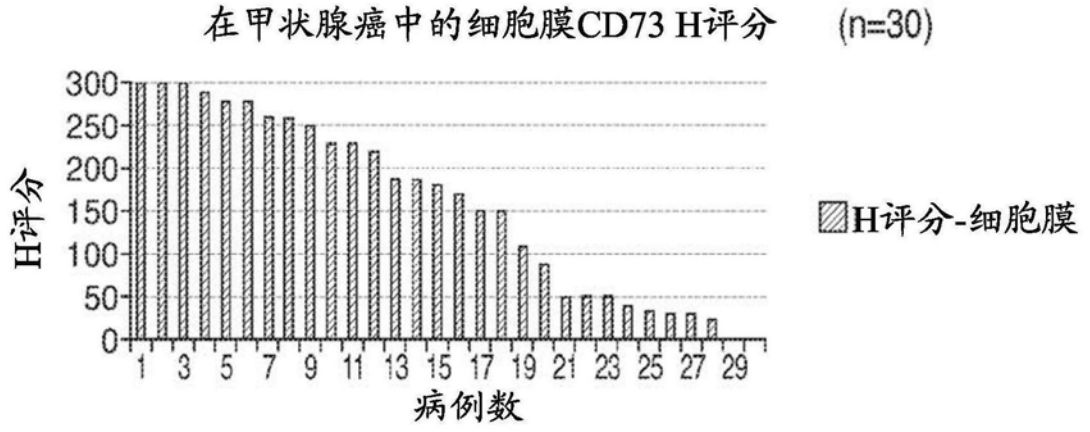


图39C

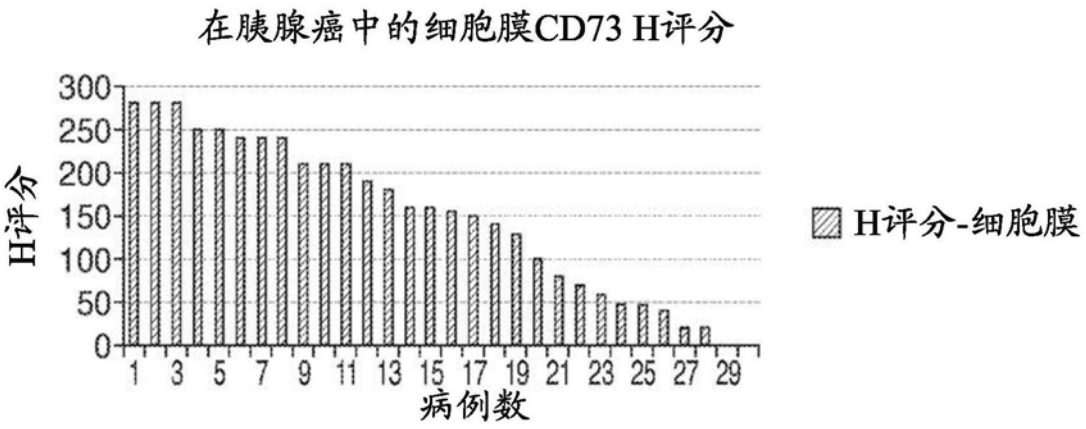


图39D

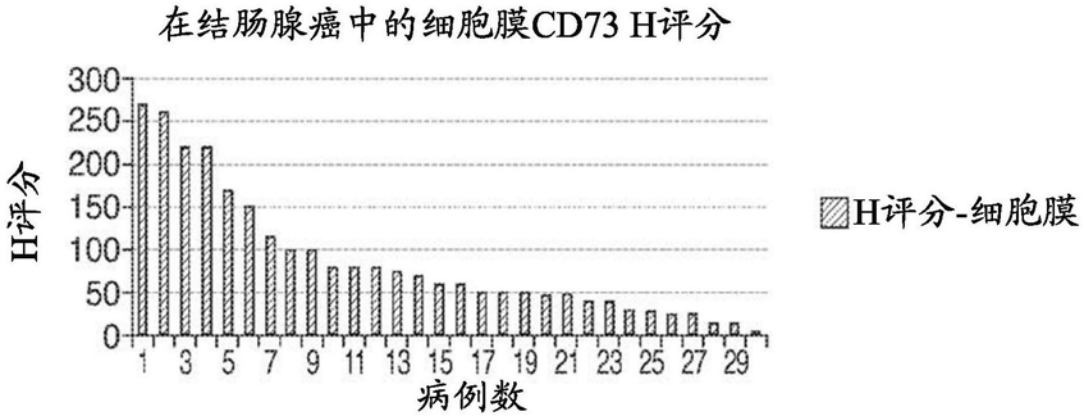


图39E

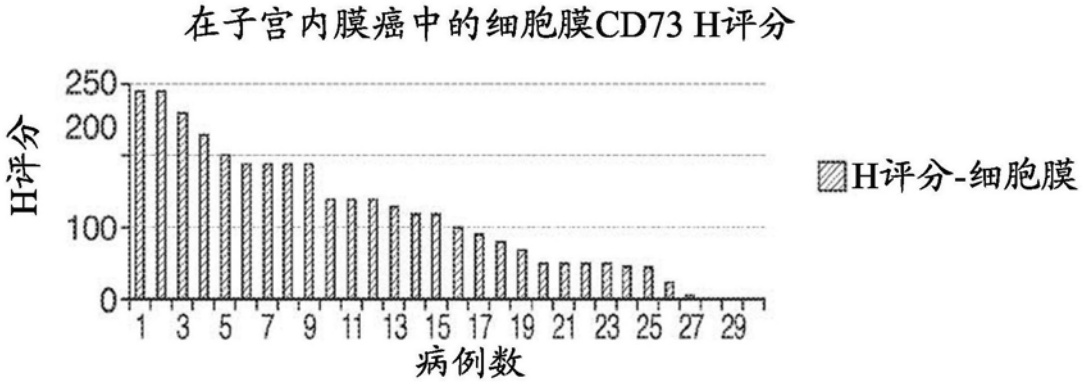


图39F