



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111372606 B

(45) 授权公告日 2024.02.20

(21) 申请号 201880070859.6

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

(22) 申请日 2018.11.15

专利代理人 王永伟

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111372606 A

(51) Int.CI.

C07K 16/40 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.07.03

A61P 35/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006.01)

62/586,224 2017.11.15 US

C07K 16/28 (2006.01)

62/686,149 2018.06.18 US

A61K 31/282 (2006.01)

62/733,175 2018.09.19 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2020.04.29

WO 2018167267 A1, 2018.09.20

(86) PCT国际申请的申请数据

WO 2016073845 A1, 2016.05.12

PCT/EP2018/081364 2018.11.15

CN 106852149 A, 2017.06.13

(87) PCT国际申请的公布数据

WO 2017089334 A1, 2017.06.01

W02019/096900 EN 2019.05.23

WO 2017157948 A1, 2017.09.21

(73) 专利权人 先天制药公司

M O Nicoletto 等.“Phase II study of pegylated liposomal doxorubicin and oxaliplatin in relapsed advanced ovarian cancer”.《Gynecol Oncol》.2005,第100卷(第2期),第322页讨论. (续)

地址 法国马赛

审查员 蒲恒

专利权人 奥瑞格生物技术公司

权利要求书1页 说明书46页

(72) 发明人 S · 尚特克斯 N · 戈尔丁

序列表31页 附图14页

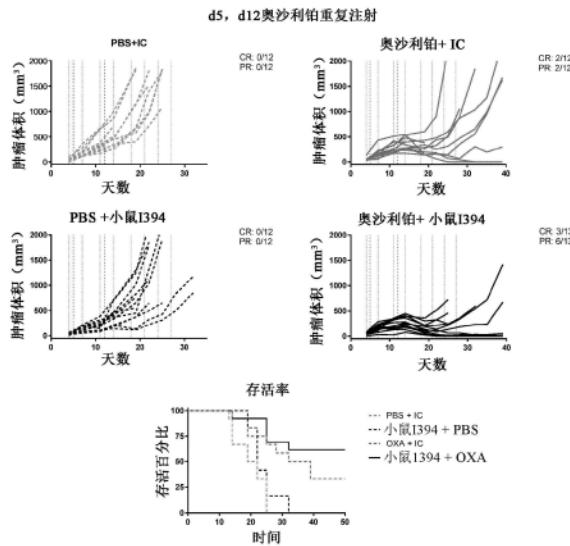
C · 帕图雷 I · 普罗特 B · 罗西

(54) 发明名称

增强ATP释放作用

(57) 摘要

本发明涉及在癌症治疗中使用抑制可溶性人类CD39的酶活性的化合物以增强诱导从肿瘤细胞细胞外释放ATP和/或诱导肿瘤细胞死亡的试剂或治疗的活性的方法。



[接上页]

(56) 对比文件

Mickaël Michaud 等.“Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice”.《Science》.2011, 第334卷(第6062期), 1576–1577.

Nathalie Bonnefoy 等.“CD39: A complementary target to immune checkpoints to counteract tumor-mediated

immunosuppression”.《Oncoimmunology》.2015, 第4卷(第5期), doi: 10.1080/2162402X.2014.1003015.

Jeremy Bastid 等.“Inhibition of CD39 enzymatic function at the surface of tumor cells alleviates their immunosuppressive activity”.《Cancer Immunol Res》.2014, 第3卷(第3期), 254–265.

1. 能够结合人类CD39 (NTPDase1) 蛋白并抑制其ATP酶活性的抗体与铂试剂的组合在制备用于治疗癌症的药物中的用途, 其中所述抗体包括SEQ ID NO:5所示的HCDR1; SEQ ID NO:6所示的HCDR2; SEQ ID NO:7所示的HCDR3; SEQ ID NO:8所示的LCDR1; SEQ ID NO:9所示的LCDR2; 和SEQ ID NO:10所示的LCDR3, 并且其中所述癌症选自卵巢癌、胃癌或食道癌、肺癌、结肠癌、头部和颈部癌以及铂耐药性癌症。
2. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述铂试剂是奥沙利铂或顺铂。
3. 根据权利要求1或2所述的用途, 其中所述癌症是卵巢癌。
4. 根据权利要求1或2所述的用途, 其中所述癌症是胃癌或食道癌。
5. 根据权利要求1或2所述的用途, 其中所述癌症是肺癌。
6. 根据权利要求1或2所述的用途, 其中所述癌症是结肠癌。
7. 根据权利要求1或2所述的用途, 其中所述癌症是头部和颈部癌。
8. 根据权利要求1或2所述的用途, 其中所述癌症是铂耐药性癌症。

增强ATP释放作用

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年11月15日提交的美国临时申请第US 62/586,224号和2018年6月18日提交的第US 62/686,149号以及2018年9月19日申请的第US 62/733,175号的权益；所有均以全文引用的方式并入本文中；包含任何附图。

[0003] 序列表的参考

[0004] 本申请与电子格式的序列表一起提交。序列表以2018年11月14日创建的名为“CD39-8_ST25”的文件提供，其大小为64KB。序列表的电子格式的信息以全文引用的方式并入本文中。

技术领域

[0005] 本发明涉及CD39中和剂治疗癌症的用途。

背景技术

[0006] NTPDase 1(胞外核苷三磷酸盐二磷酸水解酶1)，也称为CD39/ENTPD1或血管CD39，与另一种酶CD73(胞外-5'-核苷酸酶)共同作用，以水解细胞外三磷酸腺苷(ATP)和二磷酸腺苷(ADP)，以生成腺苷，其结合腺苷受体并抑制T细胞和自然杀伤(NK)细胞反应，从而抑制免疫系统。通过CD73/CD39途径生成腺苷被认为是调节性T细胞(Treg)免疫抑制功能的主要机制。CD39在N-末端和C-末端附近具有两个跨膜结构域、短的胞质N-末端和C-末端片段、以及含有活性位点的大细胞外结构域。然而，虽然CD39通常由在分子两端处的两个跨膜结构域锚定到膜，但最近还报道了CD39的可溶性催化活性形式可以在人类和小鼠循环中找到(Yegutkin等人，(2012)《美国实验生物学会联合会期刊(FASEB J.)》26(9):3875-3883)。

[0007] 放射疗法和一些化学治疗剂已示出了诱导引起免疫原性癌症细胞死亡的特定免疫反应(Martins等人2009《细胞周期(Cell Cycle)》8(22):3723-3728)。通过这类治疗诱导的抗肿瘤免疫反应取决于树突状细胞(DC)展现来自染色癌细胞的抗原和引发肿瘤特异性细胞毒素T淋巴细胞(CTL)的容量。为建立CTL反应，DC必须并入应力或染色细胞之抗原，获取成熟步骤中处理的抗原的能力并且在刺激特定CTL的分化/活化的协同刺激信号和细胞因子的背景下展现结合于MHC分子的抗原肽。

[0008] 然而，仍然需要改良经设计以消除癌细胞的当前疗法(包含放射疗法和化学治疗剂)的功效。

发明内容

[0009] 本发明尤其起因于发现：在显著浓度的ATP存在下中和CD39蛋白的ATP酶活性的抗体能够在外源添加的ATP存在下逆转树突状细胞(DC)中的CD39免疫抑制作用。此外，抗体能够诱导或增加与DC共培养的T细胞的增殖。降低CD39介导的DC活化抑制的能力提供抗体结合诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂或治疗，尤其诱导免疫原性癌症细胞死亡的试剂或治疗，例如诱导肿瘤细胞死亡的试剂或治疗(化学治疗剂、放射疗法)的有利用途。虽然

ATP释放具有免疫原性可能性且促进DC活化,但其还可经受CD39的分解代谢,继而抑制细胞外ATP的免疫原性作用。此外,在化疗期间,增加的ATP量与DC上较高的CD39表达相关联。在ATP富集肿瘤微环境内,浸润DC可能通过调节CD39表达,继而降低化疗诱导的免疫原性肿瘤细胞死亡来促进ATP降解。因此,与抗CD39抗体的组合使用准许诱导肿瘤细胞死亡(例如,细胞凋亡或坏死)的试剂或治疗的免疫原性作用的增强。

[0010] 因此,在一个方面,本发明提供通过使用在ATP存在下结合并中和CD39的抗体,以及诱导肿瘤细胞死亡的试剂或治疗,例如能够诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂或治疗,诱导免疫原性癌症细胞死亡的试剂或治疗来增强抗肿瘤免疫反应的改良方法。在一个方面,本发明提供通过使用能够在ATP存在下结合并中和CD39的抗体,以及用于诱导肿瘤细胞死亡的构件,例如用于诱导肿瘤细胞凋亡和/或ATP从肿瘤细胞细胞外释放的构件来增强抗肿瘤免疫反应的改良方法。在一个实施例中,能够诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂或治疗(或构件)包括蒽环霉素、奥沙利铂(oxaliplatin)、顺铂、X射线、PARP抑制剂、紫杉烷、蒽环霉素、DNA损伤剂、喜树碱、埃坡霉素(epothilone)、丝裂霉素、考布他汀(combretastatin)、长春花属生物碱、氮芥、类美登素(maytansinoid)、刺孢霉素(calicheamycin)、倍癌霉素(duocarmycin)、微管溶素(tubulysin)、海兔毒素(dolastatin)、奥瑞他汀(auristatin)、烯二炔、毒伞毒素(amatoxin)、吡咯并苯并二氮杂环、乙烯亚胺、放射性同位素、治疗蛋白或肽毒素,或结合由肿瘤细胞表达的抗原且介导ADCC的抗体。在一个实施例中,能够结合并中和CD39的抗体能够中和可溶性细胞外结构域CD39蛋白(sCD39)和膜结合CD39蛋白(memCD39)两种的活性。如本文中所示出,能够在外源添加的ATP存在下逆转树突状细胞(DC)中的CD39的免疫抑制作用的抗体还表征为能够中和可溶性细胞外结构域CD39蛋白(sCD39)和膜结合CD39蛋白(memCD39)两种的活性。尤其,在外源ATP存在下不能够逆转树突状细胞(DC)中CD39的免疫抑制作用的抗体BY40也不能够中和可溶性细胞外结构域CD39蛋白(sCD39)的ATP酶活性且具有膜结合CD39蛋白(memCD39)ATP酶活性的更低最大抑制。

[0011] 不希望受理论所束缚,人们相信中和细胞表面处的膜结合CD39的抗体通过抑制膜结合CD39(memCD39)的结构域运动进行操作,然而且不类似地影响可溶性CD39蛋白(sCD39)的活性。已报告memCD39以均一多聚体(例如,四聚合物和/或其它多聚体,除了单体形式外)形式出现,而sCD39是单体,且此外memCD39中的跨膜结构域经历位于与活性位点的功能关系之下的动态动作(Schulte am Esch等人1999《生物化学(Biochem.)》38(8):2248-58)。仅阻断memCD39的抗体可识别酶活性位点外部的CD39且防止多聚化而不阻断CD39的单体形式。阻断多聚化可减小酶活性,且已报告CD39多聚化实质上加强ATP酶活性。相比之下,也阻断sCD39的抗体可干扰CD39底物且抑制酶的单体形式。这类抗体也可防止memCD39的多聚化,因此提供抑制CD39的酶活性的第二机制。在ATP存在下(例如,如在肿瘤环境中),通过防止多聚化而不阻断sCD39来部分地抑制CD39可能产生足够残余AMP以防止对DC活化的任何可检测附加作用。因此,结合单体和/或可溶性CD39(例如,单体sCD39)并抑制其ATP酶活性的抗体可以有利地用于通过中和膜结合的和可溶性CD39蛋白(溶液中的细胞外结构域蛋白)两种来实现个体中CD39活性的最大中和。

[0012] 在一个方面中,本文提供用于治疗癌症的试剂,其结合CD39并抑制人类CD39蛋白的酶活性(ATP酶活性),其中将结合CD39的试剂与诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂,

任选地诱导肿瘤细胞死亡,任选地诱导凋亡和/或坏死的试剂组合施用。在一个方面中,本文提供用于治疗癌症的试剂,其诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放,任选地诱导肿瘤细胞死亡,任选地诱导凋亡和/或坏死的试剂,其中将诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂与结合CD39并抑制人类CD39蛋白的酶活性(ATP酶活性)的试剂组合施用。

[0013] 在一个实施例中,提供一种用于治疗或预防个体体内的癌症的方法,所述方法包括向个体施用:(a)结合CD39蛋白并抑制其ATP酶活性试剂,和(b)能够诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂。

[0014] 在一个实施例中,提供一种增强抗体的抗肿瘤作用的方法,所述抗体在外源添加的ATP存在下能够结合CD39并抑制其ATP酶活性,所述方法包括向个体施用诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放和/或诱导肿瘤细胞死亡的试剂或治疗。

[0015] 在一个实施例中,提供一种治疗个体体内的癌症的方法,所述个体对利用诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放和/或诱导肿瘤细胞死亡的试剂或治疗的治疗(在不存在利用抗CD39抗体的组合治疗下)具有不良反应或对反应的不良预后,所述方法包括向个体施用在外源添加的ATP存在下能够结合CD39并抑制其ATP酶活性的抗体。

[0016] 在一个实施例中,能够诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂直接诱导肿瘤细胞的细胞凋亡。在一个实施例中,能够诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂直接诱导肿瘤细胞坏死。在一个实施例中,试剂包括直接引起肿瘤细胞死亡的细胞毒性剂,任选地用于癌症治疗的化学治疗剂。在一个实施例中,试剂包括耗乏抗体。在一个实施例中,试剂包括免疫共轭物,其包括特异性结合由肿瘤细胞表达的蛋白质的抗体和细胞毒性剂。在一个实施例中,试剂包括特异性结合由肿瘤细胞表达的蛋白质且并不共轭到细胞毒性剂的抗体(例如,裸抗体)任选地,抗体能够直接诱导肿瘤细胞细胞凋亡。

[0017] 在一个实施例中,结合CD39并抑制人类CD39蛋白的ATP酶活性的试剂能够在外源添加的ATP存在下中和CD39的ATP酶活性。

[0018] 在一个实施例中,结合CD39并抑制人类CD39蛋白的ATP酶活性的试剂能够中和可溶性细胞外结构域人类CD39蛋白的ATP酶活性。任选地,试剂能够在外源添加的ATP,任选地其中以 $20\mu\text{M}$ 浓度添加的ATP存在下中和可溶性细胞外结构域人类CD39蛋白的ATP酶活性。测定可以例如如本文中的实例中所示,例如在 37°C 下在培养板中,将抗CD39抗体与可溶性重组人类CD39蛋白一起温育1h,在添加CTG (Cell Titer Glo) 试剂之前在 37°C 下将 $20\mu\text{M}$ ATP添加到所述培养板以保持额外30分钟,且在黑暗下5min的较短温育期后使用Enspire™光度计定量发射光。

[0019] 任选地,抗体能够致使溶液中人类细胞外结构域CD39蛋白的ATP酶活性降低超过50%,任选地超过60%、70%、75%或80%。

[0020] 在一个实施例中,结合CD39的试剂将提供可溶性人类CD39蛋白的ATP酶活性降低至少50%、60%、70%、75%、80%或90%(例如,如通过本文公开的方法评估),任选地进一步以与抗体施用到人类相容的浓度。

[0021] 在一个实施例中,结合CD39并抑制人类CD39蛋白的ATP酶活性的试剂能够引起单核球衍生的树突状细胞中的细胞表面活化标记物的表达增加,当这类moDC与抗体和ATP一起体外温育时,任选地其中以 0.125mM 、 0.25mM 或 0.5mM 提供外源添加的ATP。

[0022] 在一个实施例中,结合CD39并抑制人类CD39蛋白的ATP酶活性的试剂能够结合细

胞表面处的人类CD39并中和其ATP酶活性。在一个实施例中，试剂能够在ATP存在下增强树突状细胞的活化。在一个实施例中，当这类moDC与抗体和ATP一起体外温育时，试剂能够引起单核球衍生树突状细胞中的细胞表面活化标记物的表达增加。任选地，ATP为以0.125mM、0.25mM或0.5mM提供的外源添加的ATP。任选地，通过在ATP存在下培育moDC 24小时并通过流式细胞术分析moDC上CD80、CD83和/或HLA-DR的细胞表面表达来评估细胞表面活化标记物表达的增加。任选地，细胞表面标记物的表达与阴性对照(例如，培养基)相比增加至少40%、50%、75%或80%。

[0023] 在本文中的任一实施例的一个方面中，抑制CD39蛋白或中和其ATP酶活性的试剂是或包括结合CD39蛋白的抗体或抗体片段(例如，单特异性抗体、双特异性或多特异性抗体)。

[0024] 试剂的组合使用将适用于通过增加肿瘤微环境中可获得的ATP库来促进针对肿瘤的适应性免疫反应。因此，这些抗体将适用于逆转CD39对于DC和/或T细胞的活性的免疫抑制作用。在一个实施例中，本公开的方法适用于在个体中增加或增强抗肿瘤免疫性，用于降低免疫抑制，用于增强自适应抗肿瘤免疫反应，或用于活化和/或增强DC、T细胞、肿瘤浸润性和/或肿瘤特异性T细胞的活性。

[0025] 在本文中的任一实施例的一个方面中，sCD39蛋白可表征为缺乏在膜结合CD39中发现的两个跨膜结构域(即，在N末端和C末端附近的跨膜结构域)。在一个实施例中，sCD39是在循环中，例如在人类个体中发现的非膜结合sCD39蛋白。在一个实施例中，sCD39包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列或由其组成(任选地进一步包括C末端标签或另一种非CD39衍生的氨基酸序列)，例如如本文中的实例中产生的sCD39蛋白。在一个实施例中，当与溶液中的sCD39一起温育时，蛋白质、抗体或抗体片段抑制或中和sCD39的ATP酶活性，例如，根据本文公开的方法。在一个实施例中，蛋白质、抗体或抗体片段以可溶性(细胞外结构域蛋白)和膜结合形式两种特异性地结合人类CD39蛋白。

[0026] 在本文中的任一实施例的一个方面中，个体可特定是人类。

[0027] 在一个实施例中，将抗CD39抗体以治疗有效量施用。

[0028] 在一个实施例中，将抗CD39抗体以足以中和外围和/或肿瘤微环境中CD39(sCD39和/或memCD39)的活性的量和频率施用到患有癌症的个体。在一个实施例中，将抗体以足以降低肿瘤微环境中ATP的分解代谢的量和频率施用。任选地，将抗体以足以提供持续抑制外围中和/或肿瘤微环境中CD39(sCD39和/或memCD39)的活性和/或持续降低肿瘤微环境中ATP的分解代谢的量和频率施用，持续能够诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂的两个连续施用之间的持续时间。

[0029] 在一个实施例中，将能够诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂以治疗有效量施用。在一个实施例中，将能够诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂以足以诱导肿瘤细胞的死亡、细胞凋亡和/或坏死的量和频率施用到患有癌症的个体。在一个实施例中，将能够诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂以足以诱导肿瘤微环境中ATP的细胞外释放的量和频率施用到患有癌症的个体。

[0030] 在一个实施例中，将抗CD39抗体和能够诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂各自施用至少一个施用周期，所述施用周期包括抗CD39抗体和能够诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂的至少第一次和第二次(和任选地第3次、第4次、第5次、第6次、第7次和/或第

8次或其它)施用。

[0031] 在一个实施例中,癌症是白血病、神经胶质瘤或胶质母细胞瘤或膀胱癌、乳房癌、结肠癌、食道癌、肾脏癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、前列腺癌、胰脏癌、胃癌、子宫颈癌、甲状腺癌、头部和颈部癌(头颈部鳞状细胞癌)和皮肤癌(例如,黑素瘤)。在一个实施例中,癌症是晚期和/或顽固性实体肿瘤。在一个实施例中,癌症是晚期和/或顽固性实体肿瘤。在一个非限制性实施例中,癌症(例如,晚期顽固性实体肿瘤)选自由以下组成的组:非小细胞肺癌(NSCLC)、肾癌、胰腺或食道腺癌、乳癌、肾细胞癌(RCC)、黑素瘤、结肠直肠癌和卵巢癌(和任选地本文中所述的另一癌症类型)。

[0032] 在某些任选的方面中,抗CD39试剂可用于治疗患有表征为免疫抑制的,任选地缺乏肿瘤的免疫浸润或不足的免疫浸润,任选地缺乏抗肿瘤免疫性或不足的抗肿瘤免疫性的癌症或肿瘤的个体体内的癌症。

[0033] 在某些任选的方面中,本文公开的治疗可用于治疗具有疾病不良预后,尤其对利用抗癌剂,例如能够诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂、细胞毒性剂、化学治疗剂或抑制CD39的酶活性的试剂治疗的反应具有不良预后的个体体内的癌症。基于一或多个预测因素,具有较差疾病预后的个体是例如处于较高发展风险下。在一个实施例中,预测因数包括一个或多个基因中存在或不存在突变。在一个实施例中,预测因数包括免疫效应细胞上的一种或多种基因或蛋白质或实例抑制性或活化受体的表达量。在一个实施例中,预测因数包括循环中或表达CD39的肿瘤环境中细胞存在(例如,数量),和/或循环中或肿瘤环境中细胞表面上CD39的表达量;在一个实施例中,细胞是肿瘤细胞;在一个实施例中,细胞是白细胞,例如B细胞、调节性T细胞(Treg);在一个实施例中,细胞是树突状细胞。CD39的升高表达和/或CD39表达性细胞的升高数量的存在可指示个体对利用中和CD39的抗体的治疗的反应具有不良预后。

[0034] 在本文中的任一方面中,个体可以是无反应者,或对利用能够诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂的治疗经历部分或不完全反应,或在利用能够诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂的治疗之后疾病复发或发展的个体。

[0035] 在一个方面中,提供一种用于治疗个体体内的癌症的抗CD39试剂,所述个体是无反应者,或对利用能够诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂的治疗经历部分或不完全反应,或在利用能够诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂的治疗之后疾病复发或发展的个体。在一个实施例中,将抗CD39试剂与能够诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的治疗(例如,试剂)组合施用。任选地,抗CD39试剂能够在ATP存在下结合CD39并抑制其ATP酶活性且/或能够结合可溶性胞外结构域人类CD39蛋白并抑制其ATP酶活性。

[0036] 在一个实施例中,抗CD39试剂与抗体I-394、I-395、I-396、I-397、I-398或I-399竞争以结合于CD39上的表位或决定簇。在一个实施例中,抗CD39试剂与分别具有重链和轻链SEQ ID NO:37和38的抗体竞争以结合于CD39。试剂可以是例如人类或人类化抗CD39抗体。在一个实施例中,抗CD39抗体是分别包括SEQ ID NO:37的重链的重链CDR和SEQ ID NO:37的轻链的轻链CDR的抗体。在一个实施例中,抗CD39抗体分别包括:重链,其包括与SEQ ID NO:37的重链氨基酸序列至少60%、70%、75%、80%、85%或90%相同的氨基酸序列;和轻链,其包括与SEQ ID NO:38的轻链氨基酸序列至少60%、70%、75%、80%、85%或90%相同的氨基酸序列。

[0037] 在某些任选的方面中,通过评定患者是否是对于抗癌剂(例如,包括细胞毒素化合物、化学治疗剂、耗乏抗体的组合物)的不良反应者(对反应具有不良预后),个体可以识别为利用CD39中和剂和能够诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂的治疗。不良反应者可以用CD39中和剂和能够诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂的组合治疗。

[0038] 在某些任选的方面中,通过评定肿瘤样本(例如,肿瘤组织和/或肿瘤邻近组织)中存在细胞外ATP,患者可以标识为利用CD39中和剂的治疗,任选地其中ATP的预定浓度指示个体适用于利用抗CD39试剂的治疗,任选地其中细胞外ATP的浓度是至少0.01mM、0.02mM、0.05mM、0.125mM、0.25mM或0.5mM。

[0039] 在其它实施例中,本文所述的治疗方法可与任何其它合适的治疗组合使用。在一个实施例中,本文所述的治疗方法进一步包括向个体施用中和人类PD-1的抑制性活性的试剂,任选地抗体。在一个实施例中,本文所述的治疗方法进一步包括向个体施用中和人类CD73蛋白的5'-外核苷酸酶活性的试剂,任选地抗体。

[0040] 在其它实施例中,提供药物组合物和试剂盒以及用于使用所述药物组合物和试剂盒的方法。在一个实施例中,提供一种药物组合物,其包括中和人类CD39多肽的ATP酶活性的化合物和能够诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂。在一个实施例中,提供一种试剂盒,其包括中和人类CD39多肽的抑制性活性的化合物和能够诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂。

[0041] 在其它实施例中,提供用于预测或评定抗癌剂与能够结合可溶性细胞外结构域人类CD39蛋白并抑制其ATP酶活性的抗体组合使用的功效或适用性的方法,所述方法包括判定或评定(例如,体外)抗癌剂是否诱导ATP从细胞(例如,肿瘤细胞)细胞外释放,其中确定抗癌剂诱导ATP从细胞(例如,肿瘤细胞)细胞外释放指示试剂可用于与能够结合可溶性细胞外结构域人类CD39蛋白并抑制其ATP酶活性的所述抗体组合以治疗癌症。判定或评定抗癌剂是否诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放可包括,例如,使细胞(例如,肿瘤细胞)体外接触试剂并评定ATP的细胞外释放。

[0042] 在本文提供的本发明的描述中将更加充分地描述这些方面,并且额外的方面、特征和优点将是显而易见的。

附图说明

[0043] 图1示出了代表性的筛选结果,其示出了与阳性对照I-394抗体相比的抗体I-397、I-398和I-399。

[0044] 图2A示出了抗体BY40、I-394、I-395和I-396抑制细胞膜结合的CD39,与BY40相比,I-394和I-395两种在所有浓度下示出更高的效力以及对细胞CD39的更大的最大抑制作用。图2B示出了与阴性对照(BY40)和阳性对照(I-394)抗体相比,抗体I-395和I-396两种均抑制可溶性CD39。

[0045] 图3A示出了突变体5(M5)、15(M15)和19(M19)中突变的残基在CD39蛋白表面上的位置。图3B示出了针对不同抗体,结合于突变体5、15和19的结果。

[0046] 图4示出了通过流式细胞术评估的抗体I-394与表达人类CD39的细胞的结合。I-394结合表达人类CD39的细胞(CHO-huCD39)、表达食蟹猴CD39的细胞(CHO-cyCD39)和Ramos淋巴瘤细胞,但不结合表达鼠类CD39的细胞(CHO-moCD39)。

[0047] 图5示出了抗体I-394在阻断肿瘤(Ramos)细胞、表达人类CD39的细胞(CHO-huCD39)和表达食蟹猴CD39的细胞(CHO-cyCD39)中的CD39酶活性方面是高度有效的,如通过对与存在的ATP量成比例的发光单位进行定量所评估。

[0048] 图6示出了抗体I-394在阻断可溶性重组人类CD39蛋白的酶活性方面是高度有效的,如通过对与存在的ATP量成比例的发光单位进行定量所评估。

[0049] 图7示出了抗体I-394结合人类CD39,但不结合任何人类同种型CD39-L1、-L2、-L3或-L4,如ELISA测定中所评估。

[0050] 图8示出了用于评估ATP介导的DC活化对CD4 T细胞活化的影响的实验程序,洗涤ATP活化的DC,且随后与同种异体CD4 T细胞(比率1个MoDC/4个T细胞)一起温育5天,用于混合淋巴细胞反应(MLR)。通过CD25表达和通过流式细胞术进行Cell Trace Violet稀释来分析T细胞活化和增殖。

[0051] 图9示出了moDC上的HLA-DR表达,并且图10示出了moDC上的CD83表达。这些图示出抗CD39阻断抗体I-394和CD39的化学抑制剂在0.125mM、0.25mM或0.5mM中的每一种下导致moDC活化。然而,抗CD39抗体BY40或抗CD73抗体不能支持ATP诱导的树突细胞(DC)活化,这表明抗体不能充分阻断酶活性以避免ATP分解代谢。从上到下的图例对应于图表中从左到右的条形图。

[0052] 图11示出CD25表达,其示出了在ATP存在下活化的MoDC能够在MLR测定中诱导T细胞活化和增殖;通过抗CD39阻断抗体I-394增强ATP介导的MoDC活化会导致更高的T细胞增殖和活化。从上到下的图例对应于图表中从左到右的条形图。

[0053] 图12示出了在肿瘤细胞移植后第5天用对照(1个组)PBS或奥沙利铂(奥沙利铂)化疗(2个组)治疗的小鼠中的肿瘤生长和生存率。并行地,用奥沙利铂治疗的一组小鼠一周注射两次抗CD39抗体,并伴随在奥沙利铂治疗前仅一天(第4天)开始抗CD39抗体治疗。这确保奥沙利铂在CD39已经且完全抑制的肿瘤环境中诱导ATP释放,且因此提供对通过瘤内CD39的ATP降解的最佳预防。

[0054] 图13示出了,在肿瘤细胞移植后第5天用对照(1个组)PBS、抗CD39抗体、奥沙利铂或奥沙利铂与抗CD39抗体的组合治疗的小鼠中的肿瘤生长和生存率。奥沙利铂注射是在第一次奥沙利铂注射一周后,同样在用I-394抗体的治疗后仅一天重复,以提供最佳抑制ATP降解。

具体实施方式

[0055] 定义

[0056] 如在说明书中所使用,“一(a或an)”可以意味着一个或多个。如在权利要求书中所使用,当结合词语“包括(comprising)”使用时,词语“一(a或an)”可以意味着一个或超过一个。如本文中所使用,“另一(another)”可以意味着至少第二个或更多个。

[0057] 当使用“包括”时,这一词语可任选地经“主要由…组成(consisting essentially of)”或“由…组成(consisting of)”置换。

[0058] 人类CD39,也称为NTPdase1、ENTPD1、ATPDase和血管ATP二磷酸水解酶,展现出ATP酶活性。CD39是将细胞外ATP和ADP水解成AMP的膜结合蛋白,其通过另一种酶,5-引物核苷酸酶进一步转化为腺苷。人类CD39成熟多肽链的氨基酸序列在基因库中以登录号P49961示

出,其全部公开内容通过引用并入本文,并且如下:

[0059] MEDTKESNVK TFCSKNILAI LGFSSIIAVI ALLAVGLTQN KALPENVKYG IVLDAGSSHT
[0060] SLYIYKWPAAE KENDTGVVHQ VEECRVKPGP ISKFVQKVNE IGIYLDCME RAREVIPRSQ
[0061] HQETPVYLGA TAGMRLLRME SEELADRVL VVERSLSNYP FDFQGARIIT GQEEGAYGWI
[0062] TINYLLGKFS QKTRWFSIVP YETNNQETFG ALDLGGASTQ VTFVPQNQTI ESPDNALQFR
[0063] LYGKDYNVYT HSFLCYGKDQ ALWQQLAKDI QVASNEILRD PCFHGPYKKV VNVSPLYKTP
[0064] CTKRFEMTLIP FQQFEIQGIG NYQQCHQSIL ELFNTSYCPY SQCAFNGIFL PPLQGDFGAF
[0065] SAFYFVMKFL NLTSEKVSQE KVTEMMKKFC AQPWEIKE TS YAGVKEKYLS EYCFSGTYIL
[0066] SLLLQGYHFT ADSWEHIHFI GKIQGSDAGW TLGYMLNLTN MIPAEQPLST PLSHSTYVFL
[0067] MVLFLSFLVLFT VAIIGLLIFH KPSYFWKDMV
[0068] (SEQ ID NO:1)。

[0069] 在本文上下文中,当提及CD39多肽时,“抑制(inhibit/inhibiting)”、“中和(neutralize/neutralizing)”(例如,“中和CD39”、“中和CD39的活性”或“中和CD39的酶活性”)是指其中CD39的ATP水解(ATP酶)活性受到抑制的过程。这尤其包括抑制CD39介导的AMP和/或ADP的生成,即,抑制CD39介导的ATP分解代谢成AMP和/或ADP。这可以例如在细胞测定中测量,所述细胞测定测量测试化合物直接或间接地抑制ATP转化成AMP和/或ADP的能力。举例来说,如本文中所述,可以评估ATP的消失和/或AMP的生成。在一个实施例中,抗体制剂导致ATP转化成AMP降低至少60%、ATP转化成AMP降低至少70%、或ATP转化成AMP降低至少80%或90%,例如,参考本文所述的测定(例如,ATP的消失和/或AMP的生成)。

[0070] 关于试剂和特定活性(例如,结合于细胞,抑制酶活性,活化或抑制免疫细胞)的“EC₅₀”是指产生关于这类活性的最大反应或效果的50%的试剂的有效浓度。关于试剂和特定活性的“EC₁₀₀”是指产生关于这类活性的实质上最大反应的试剂的有效浓度。

[0071] 如本文中所用,术语“抗体”是指多克隆和单克隆抗体。根据重链中恒定结构域的类型,将抗体指定为以下五大类中的一种:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。这些中的几个进一步分为亚类或同种型,如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等。示范性免疫球蛋白(抗体)结构单元包括四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链构成,每对具有一个“轻”(约25kDa)和一个“重”链(约50-70kDa)。每条链的N-末端限定了约100个到110个或更多个氨基酸的可变区,其主要负责抗原识别。术语可变轻链(V_L)和可变重链(V_H)分别是指这些轻链和重链。对于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为“α”、“δ”、“ε”、“γ”和“μ”。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的。IgG是本文中使用的示范性抗体类别,因为它们是生理情况中最常见的抗体,并且因为它们最容易在实验室环境中制备。任选地,抗体是单克隆抗体。抗体的具体实例是人源化、嵌合、人类或其它人类合适的抗体。“抗体”还包含任何本文中所述抗体的任何片段或衍生物。

[0072] 术语“特异性结合”意指抗体可以优选地在竞争性结合测定中结合于结合配偶体,例如CD39,如使用蛋白质、其中表位的重组形式,或存在于分离靶细胞表面上的天然蛋白质所评估的。竞争性结合分析和用于确定特异性结合的其它方法是所属领域中众所周知的。举例来说,可以通过放射性标记,如质谱分析的物理方法或使用例如细胞荧光分析(例如,FACScan)测定到的直接或间接荧光标记检测结合。高于通过对照所见量的结合,非特异性试剂指示试剂结合于目标。

[0073] 当称一种抗体与一种特定单克隆抗体“竞争”时,其意味着所述抗体使用重组分子(例如,CD39)或表面表达的分子(例如,CD39)在结合测定中与单克隆抗体竞争。举例来说,如果测试抗体在结合测定中降低了具有SEQ ID NO:3的重链和SEQ ID NO:4的轻链的抗体与CD39多肽或CD39表达性细胞的结合,则称抗体相应地与这类抗体“竞争”。

[0074] 如本文中所用,术语“亲和力”是指抗体与表位结合的强度。抗体的亲和力由解离常数K_d给出,定义为 $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$,其中[Ab-Ag]是抗体-抗原复合物的摩尔浓度,[Ab]是未结合抗体的摩尔浓度,并且[Ag]是未结合抗原的摩尔浓度。亲和力常数K_a由 $1/K_d$ 定义。用于确定mAb的亲和力的方法可以在以下中找到:Harlow等人,《抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual)》,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),冷泉港(Cold Spring Harbor),纽约,(1988),Coligan等人编辑,《免疫学实验指南(Current Protocols in Immunology)》,格林出版协会和Wiley Interscience,纽约,(1992,1993)以及Muller,《酶学方法(Meth. Enzymol.)》92:589-601(1983),所述参考通过引用全部并入本文。所属领域熟知的用于确定mAb的亲和力的一种标准方法是使用表面等离子共振(SPR)筛选(如通过用BIAcoreTM SPR分析装置分析)。

[0075] 在本文的上下文中,“决定簇”表示与多肽相互作用或结合的位点。

[0076] 术语“表位”是指抗原决定簇,并且是抗体结合的抗原上的区域或区。蛋白质表位可包括直接参与结合的氨基酸残基以及由特异性抗原结合抗体或肽有效阻断的氨基酸残基,即抗体的“足迹”内的氨基酸残基。它是复合抗原分子上最简单的形式或最小的结构区域,其可以与例如抗体或受体组合。表位可以是线性的或构象的/结构的。术语“线性表位”定义为由氨基酸的线性序列(一级结构)上连续的氨基酸残基构成的表位。术语“构象或结构表位”定义为由不完全连续的氨基酸残基构成的表位,并且因此代表通过折叠分子而彼此接近的氨基酸线性序列的分离部分(二级、三级和/或四级结构)。构象表位取决于3维结构。因此,术语“构象”通常与“结构”可互换使用。

[0077] 关于肿瘤细胞的术语“缺失(deplete/depleting)”意味着导致杀灭、消除、裂解或诱导这类杀灭、消除或裂解,以便不利地影响样品中或个体体内存在的这类肿瘤细胞的数量的过程、方法或化合物。

[0078] 与“细胞内内化”可互换使用的术语“内化”是指与将分子从细胞的细胞外表面转移到细胞的细胞内表面的过程相关联的分子、生物化学和细胞事件。负责分子细胞内内化的过程是众所周知的,并且尤其可能涉及细胞外分子(如激素、抗体和小有机分子)的内化;膜相关分子(如细胞表面受体);以及结合细胞外分子的膜相关分子的复合物(例如,结合跨膜受体的配体或结合膜相关分子的抗体)。因此,“诱导和/或增加内化”包括其中引发细胞内内化和/或增加细胞内内化的速率和/或程度的事件。

[0079] 术语“试剂”在本文中用于表示化学化合物,化学化合物、生物大分子或由生物材料制成的提取物的混合物。术语“治疗剂”是指具有生物活性的试剂。

[0080] 出于本文中的目的,“人类化”或“人类”抗体是指其中一种或多种人类免疫球蛋白的恒定和可变框架区与动物免疫球蛋白的结合区,例如CDR融合的抗体。设计这类抗体以维持衍生结合区的非人抗体的结合特异性,但避免针对非人类抗体的免疫反应。这类抗体可以从转基因小鼠或已经被“工程化”以响应抗原攻击产生特异性人类抗体的其它动物中获得(参见,例如,Green等人(1994)《自然遗传学(Nature Genet)》7:13;Lonberg等人(1994)

《自然(Nature)》368:856;Taylor等人(1994)《国际免疫药理学(Int Immun)》6:579,其全部教导通过引用并入本文)。完全人类抗体也可以通过遗传或染色体转染方法以及噬菌体展示技术构建,所有这些都是所属领域已知的(参见,例如,McCafferty等人(1990)《自然》348:552-553)。人类抗体也可以通过体外活化的B细胞生成(参见,例如,美国专利第5,567,610号和第5,229,275号,其通过引用以其整体并入)。

[0081] “嵌合抗体”是抗体分子,其中(a)恒定区或其部分被改变、替换或交换,使得抗原结合位点(可变区)连接到不同或改变类别、效应子功能和/或物种、或赋予嵌合抗体新特性的完全不同分子(例如酶、毒素、激素、生长因子、药物等)的恒定区;或(b)可变区或其部分利用具有不同或改变的抗原特异性的可变区改变、替换或交换。

[0082] 当在本文中使用时,术语“高变区”是指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区通常包括来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如,轻链可变结构域中的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)以及重链可变结构域中的31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3);Kabat等人,1991)和/或来自“高变环”的那些残基(例如,轻链可变结构域中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)以及重链可变结构域中的26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3);Chothia和Lesk,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》1987;196:901-917),或用于确定负责抗原结合的必需氨基酸的类似系统。通常,这一区域中氨基酸残基的编号通过Kabat等人,同上所述的方法进行。如“Kabat位置”、“如Kabat中的可变结构域残基编号”和“根据Kabat”的短语在本文中是指用于重链可变结构域或轻链可变结构域的这一编号系统。使用Kabat编号系统,肽的实际线性氨基酸序列可以含有较少或额外的氨基酸,对应于可变结构域的FR或CDR的缩短或插入。举例来说,重链可变结构域可以包含在CDR H2的残基52之后的单个氨基酸插入物(根据Kabat的残基52a)和在重链FR残基82之后的插入残基(例如,根据Kabat的残基82a、82b和82c等)。通过将抗体的序列的同源区与“标准”Kabat编号序列比对,可以确定给定抗体的Kabat残基编号。

[0083] 如本文中所用,“框架”或“FR”残基是指除了定义为CDR的那些区之外的抗体可变结构域的区。每一抗体可变结构域框架可以进一步细分为由CDR分开的连续区(FR1、FR2、FR3和FR4)。

[0084] 术语“Fc结构域”、“Fc部分”和“Fc区”是指抗体重链的C末端片段,例如,来自人类 γ (gamma)重链的约氨基酸(aa)230到约aa 450,或其在其它类型的抗体重链中的对应序列(例如,人类抗体的 α 、 δ 、 ϵ 和 μ),或其天然存在的同种异型。除非另有说明,否则在本公开中使用普遍接受的免疫球蛋白的Kabat氨基酸编号(参见Kabat等人(1991)《具有免疫学意义的蛋白质序列(Sequences of Protein of Immunological Interest)》,第5版,美国公共卫生署(United States Public Health Service),美国国立卫生研究院(National Institute of Health),马里兰州贝塞斯达(Bethesda,MD))。

[0085] 术语“分离的”、“纯化的”或“生物学上纯的”是指实质上或基本上不含在其天然状态下发现的通常伴随其的组分的材料。纯度和均匀性通常使用分析化学技术,如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法确定。作为制剂中存在的主要物种的蛋白质是实质上纯化的。

[0086] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用以指氨基酸残基的聚合物。术语适用于氨基酸聚合物(其中一个或多个氨基酸残基是对应天然存在的氨基酸的人工化学

模拟物),以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。

[0087] 当参考例如细胞、或核酸、蛋白质或载体一起使用时,术语“重组”表明已经通过引入异源核酸或蛋白质、或天然核酸或蛋白质的改变修饰了细胞、核酸、蛋白质或载体,或细胞衍生自如此修饰的细胞。因此,例如,重组细胞表达在细胞的天然(非重组)形式内未发现的基因,或表达以其它方式异常表达、表达不足或根本不表达的天然基因。

[0088] 在本文的上下文中,术语“结合”多肽或表位的抗体表示以特异性和/或亲和力结合所述决定簇的抗体。

[0089] 当在两个或更多个多肽的序列之间的关系中使用时,术语“同一性”或“相同的”是指多肽之间的序列相关性程度,如通过两个或更多个氨基酸残基串之间的匹配数确定。“同一性”测量两个或更多个序列中的较小序列之间相同匹配的百分比,其中间隙比对(如果存在)由特定数学模型或计算机程序(即“算法”)解决。通过已知方法可以容易地计算相关多肽的同一性。这类方法包含但不限于以下中描述的那些:《计算分子生物学(Computational Molecular Biology)》,Lesk,A.M.编辑,牛津大学出版社(Oxford University Press),纽约,1988;《生物计算:信息学和基因组计划(Biocomputing:Informatics and Genome Projects)》,Smith,D.W.编辑,学术出版社(Academic Press),纽约,1993;《序列数据的计算机分析(Computer Analysis of Sequence Data)》,第1部分,Griffin,A.M.和Griffin,H.G.编辑,胡马纳出版社(Humana Press),新泽西州(New Jersey),1994;《分子生物学中的序列分析(Sequence Analysis in Molecular Biology),von Heijne,G.,学术出版社,1987;《序列分析引物(Sequence Analysis Primer)》,Gribskov,M.和Devereux,J.编辑,M.Stockton Press,纽约,1991;和Carillo等人,《工业与应用数学学会应用数学杂志(SIAM J.Applied Math.)》48,1073(1988)。

[0090] 设计用于确定同一性的方法以给出测试序列之间的最大匹配。在公开可用的计算机程序中描述了确定同一性的方法。用于确定两个序列之间的同一性的计算机程序方法包含GCG程序包,包含GAP(Devereux等人,《核酸研究(Nucl.Acid.Res.)》12,387(1984);遗传学计算机组,威斯康星大学(University of Wisconsin),麦迪逊,威斯康星州(Madison,Wis)),BLASTP、BLASTN和FASTA(Altschul等人,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》215,403-410(1990))。BLASTX程序可从国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)和其它来源公开获得(BLAST Manual,Altschul等人,NCB/NLM/NIH Bethesda,Md.20894;Altschul等人,同上)。众所周知的史密斯沃特曼算法(Smith Waterman algorithm)也可以用于确定同一性。

[0091] 抑制CD39的试剂

[0092] 根据本文使用的结合并抑制CD39的试剂可以是抗原结合结构域或包括这类抗原结合结构域的蛋白质,任选地结合CD39蛋白质(例如可溶性CD39蛋白(sCD39)、单体CD39蛋白、例如在细胞表面处表达的膜结合CD39蛋白(memCD39))并抑制或中和其ATP酶活性的抗体或抗体片段。

[0093] 在一个实施例中,sCD39蛋白是缺少膜结合CD39中发现的两个跨膜结构域(即,N-末端和C-末端附近的跨膜结构域)的CD39蛋白。在一个实施例中,sCD39是在循环中,例如在人类个体中发现的非膜结合sCD39蛋白。在一个实施例中,sCD39包括SEQ ID N0:2的氨基酸序列或由其组成(任选地进一步包括C-末端标签或另一种非CD39衍生的氨基酸序列)。在一

个实施例中,例如,根据本文公开的方法,蛋白质、抗体或抗体片段在与sCD39一起温育于溶液中时,会抑制sCD39的ATP酶活性。在一个实施例中,蛋白质、抗体或抗体片段以可溶性(细胞外结构域蛋白)和膜结合形式两种特异性结合人类CD39蛋白。

[0094] 在一个实施例中,抗CD39抗体并未增加或诱导细胞表面表达的CD39的细胞内内化,或更通常来说下调细胞表面表达的CD39和/或并不依赖于其CD39抑制性活性。

[0095] 在一个方面中,抗CD39抗体能够:(a)抑制细胞表面处表达的膜结合CD39蛋白(例如,包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列)的酶活性,和(b)抑制可溶性CD39蛋白(例如,具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CD39蛋白、缺乏其跨膜结构域的CD39蛋白)的酶活性。

[0096] 在一个实施例中,抗CD39抗体并未实质上结合(例如,通过其Fc结构域)人类Fc γ 受体(例如,CD16、CD32a、CD32b、CD64)和/或C1q,且/或并未实质上朝向CD39表达性细胞引导ADCC和/或CDC。任选地,抗体保留Fc结构域(例如,人类IgG同种型的)且保持结合于人类FcRn。

[0097] 在一个实施例中,CD39中和抗体可表征为能够导致sCD39多肽和/或单体CD39多肽的ATP酶活性降低,任选地导致由可溶性单体人类CD39蛋白(例如由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成的CD39蛋白)生成的AMP降低至少50%、60%、70%、80%或90%。

[0098] 在一个实施例中,CD39中和抗体可表征为能够造成CD39的细胞ATP酶活性降低,任选地造成由CD39表达性细胞生成的AMP降低至少50%、60%、70%、80%或90%。在一个实施例中,CD39中和抗体可表征为抑制由细胞表达的CD39的ATP酶活性的EC₅₀(例如,抑制由CD39表达性细胞生成AMP的EC₅₀)不超过1 μ g/ml,任选地不超过0.5 μ g/ml,任选地不超过0.2 μ g/ml。

[0099] 在一个实施例中,CD39中和抗体可表征为能够引起人类单核球衍生的树突状细胞(moDC)中细胞表面活化标记物的表达增加,当这类moDC与抗体和ATP一起体外温育时,任选地其中ATP是外源添加的ATP,任选地进一步其中添加的ATP以0.125mM、0.25mM或0.5mM提供。

[0100] 抗原结合化合物可以如本文进一步描述产生,且在任何所需阶段评估其通过可溶性CD39蛋白和任选地进一步通过CD39表达性细胞抑制CD39的酶活性的能力,尤其阻断sCD39的ATP酶活性的能力和减小ADP和AMP(且连同CD73、腺苷)的产生的能力,且继而恢复ATP介导的树突状细胞活性和/或T细胞增殖的活化。

[0101] 还可例如在检测ATP的消失(水解)和/或AMP的生成的测定中评估抗体的抑制性活性(例如,免疫增强可能性)。

[0102] 可在将测试抗体与可溶性CD39蛋白(例如,具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CD39蛋白,如实例1中产生,任选地进一步包括纯化标签或其它功能性或非功能性非CD39衍生氨基酸序列)一起温育后通过检测ATP来测试抗体抑制可溶性重组人类CD39蛋白的能力。参见例如实例。简单点说,可在剂量范围的测试抗体与实例中所描述的可溶性重组人类CD39蛋白在37°C下一起温育1小时的分析中使用Cell Titer GloTM(Promega)定量ATP。在添加CTG试剂之前,将20 μ M ATP添加到培养板在37°C下保持额外30分钟。在暗处5min的较短温育期后使用EnspireTM光度计定量发射光。

[0103] 可在将测试抗体与细胞(例如,Ramos细胞、经CD39转染的细胞等)一起温育后通过检测ATP来测试抗体抑制表达CD39蛋白的细胞的能力。参见例如实例1。细胞可在37°C下与

测试抗体一起温育1小时。随后在37°C下将细胞与20μM ATP一起温育额外1小时。培养板在400g下离心2min且将细胞上清液转移到荧光微板(白色孔)中。将CTG添加到上清液且在暗处温育5min后使用Enspire™光度计定量发射光。通过比较仅具有ATP(最大发光)的抗体和ATP连同细胞(最小发光)的抗体存在下的发射光确定抗CD39抗体功效。

[0104] 在抗体存在下,ATP水解成AMP的降低和/或ATP的增加和/或AMP生成的降低表明抗体抑制CD39。在一个实施例中,抗体制剂能够造成由细胞表达的CD39多肽的酶活性降低至少60%,优选地抗体造成细胞中CD39多肽的酶活性降低至少70%、80%或90%,如通过在将表达CD39多肽的细胞(例如,Ramos细胞)与测试抗体(例如,如实例1中)一起温育后使用Cell Titer Glo™(Promega)检测ATP所评估。

[0105] 在一个实施例中,抗体制剂能够造成可溶性重组CD39多肽的酶活性降低至少60%,优选地可溶性重组CD39多肽的酶活性降低至少70%、80%或90%,如通过在将可溶性重组CD39多肽与测试抗体(例如,如实例1中)一起温育后使用Cell Titer Glo™(Promega)检测ATP所评估。

[0106] 在一个实例中,提供一种用于产生或识别能够用于本公开的方法中(例如,用于与诱导ATP从肿瘤细胞释放的试剂组合)的抗CD39抗体或抗原结合结构域的体外方法,所述方法包括以下步骤:

[0107] (a) 提供结合人类CD39多肽的多种抗体,

[0108] (b) 在ATP存在下,使抗体中的每一种与人类单核球衍生的树突状细胞(moDC)接触,任选地其中ATP是外源添加的ATP,且

[0109] (c) 选择步骤(b)中使得moDC中的细胞表面活化标记物的表达增加的抗体。

[0110] 任选地,在本文中的任何实施例中,中和抗CD39抗体结合sCD39和细胞表面处表达的CD39(memCD39)两种上存在的抗原决定簇。

[0111] 任选地,在本文中的任一实施例中,中和抗CD39抗体竞争结合于由抗体I-394结合的CD39上的表位(例如,与具有任一个I-394的重链和轻链CDR或可变区的抗体竞争以结合于CD39多肽上的表位)。

[0112] 任选地,在本文中的任一实施例中,中和抗CD39抗体与单克隆抗体I-394结合相同的表位和/或竞争以结合于CD39多肽(例如与具有I-394的重链和轻链CDR或可变区的抗体竞争以结合于CD39多肽)。在一个实施例中,中和抗CD39抗体与分别具有SEQ ID NO:3和4的VH和VL区的抗体结合相同的表位和/或竞争以结合于CD39多肽。

[0113] 任选地,在本文中的任一实施例中,抗CD39抗体结合包括一个、两个或三个选自以下组成的组的氨基酸残基的表位:由I-394结合的CD39上的氨基酸残基。

[0114] 任选地,在本文中的任一实施例中,结合分子(例如,抗CD39抗体)包括:可变重链结构域(V_H),其包括如本文中所述的轻链CDR1、2和3;和可变轻链结构域(V_L),其包括如本文所述的重链CDR1、2和3;或氨基酸序列,其中CDR(或重和/或轻链CDR集合)具有与所述CDR(或所述重和/或轻链CDR集合)至少60%、70%、80%、90%或95%氨基酸同一性。在本文中的任一实施例的一个方面中,抗体可包括重链,其包括抗体I-394的重链可变区(VH)的三个CDR;和轻链,其包括抗体I-394的轻链可变区(VL)的三个CDR。

[0115] 任选地,在本文中的任一实施例中,抗CD39抗体包括经修饰的Fc结构域(与相同同型的野生型Fc结构域相比)以减小所述Fc结构域与人类CD16A、CD16B、CD32A、CD32B和/或

CD64多肽之间的结合,任选地其中抗体包括:(i)重链,其包括SEQ ID NO:3的重链可变区的CDR1、2和3;和(ii)轻链,其包括SEQ ID NO:4的轻链可变区的CDR1、2和3。在一个方面中,Fc结构域经修饰(与相同同种型的野生型Fc结构域相比)以减小Fc结构域与人类C1q多肽之间的结合。在一个实施例中,抗体在任何一个、二个、三个、四个、五个或更多个残基处包括重链恒定区的氨基酸取代,所述残基选自以下组成的组:220、226、229、233、234、235、236、237、238、243、264、268、297、298、299、309、310、318、320、322、327、330和331(Kabat EU编号)。在一个实施例中,抗体具有任何三个、四个、五个或更多个残基处的重链恒定区的氨基酸取代,所述残基选自以下组成的组:234、235、237、322、330和331。在一个实施例中,抗体包括Fc结构域,其包括下文示出的氨基酸序列。

[0116] 在一个实施例中,抗体包括重链恒定区或Fc结构域,其包括下文氨基酸序列,或与其至少90%、95%或99%相同但保留Kabat位置234、235和331(带下划线的)处的氨基酸残基的氨基酸序列:

[0117] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA**P**EAEGEGGPSVFLFPPPKD**T**L**M**ISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI~~A~~VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:44)

[0118] 在一个实施例中,抗体包括重链恒定区或Fc结构域,其包括下文氨基酸序列,或与其至少90%、95%或99%相同但保留Kabat位置234、235和331(带下划线的)处的氨基酸残基的氨基酸序列:

[0119] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA**P**EFEGGPSVFLFPPPKD**T**L**M**ISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI~~A~~VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:45)

[0120] 在一个实施例中,抗体包括重链恒定区或Fc结构域,其包括下文氨基酸序列,或与其至少90%、95%或99%相同但保留Kabat位置234、235、237、330和331(带下划线的)处的氨基酸残基的氨基酸序列:

[0121] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA**P**EAEGPSVFLFPPPKD**T**L**M**ISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI~~A~~VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:46)

[0122] 在一个实施例中,抗体包括重链恒定区或Fc结构域,其包括下文氨基酸序列,或与其至少90%、95%或99%相同但保留Kabat位置234、235、237和331(带下划线的)处的氨基酸残基的氨基酸序列:

[0123] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA**P**EAEGGPSVFLFPPPKD**T**L**M**ISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTIS

KAKGQPQREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:47)

[0124] 在一个方面中,抗CD39抗体与抗体I-394、I-395、I-396、I-397、I-398或I-399结合相同的表位。在一个实施例中,抗体结合于CD39的表位,其至少部分地与抗体I-394、I-395、I-396、I-397、I-398或I-399结合的表位重叠或包含其中的至少一个残基。可将抗体结合的残基指定存在于CD39多肽的表面上,例如细胞表面上表达的CD39多肽中。

[0125] 可测量抗CD39抗体与用CD39突变体转染的细胞的结合且与抗CD39抗体结合野生型CD39多肽(例如,SEQ ID NO:1)的能力相比。抗CD39抗体与突变体CD39多肽(例如,表1的突变体)之间的结合降低意味着结合亲和力降低(例如,如通过已知方法,如表达特定突变体的细胞的FACS测试,或通过结合突变体多肽的Biacore测试所测量)和/或抗CD39抗体的总结合能力的降低(例如,如通过抗CD39抗体浓度相对于多肽浓度的曲线图中B_{max}的降低所证明)。结合的显著降低表明,当抗CD39抗体结合CD39时,突变残基直接参与抗CD39抗体的结合或与结合蛋白紧密接近。

[0126] 在一些实施例中,结合的显著降低意味着相对于抗体与野生型CD39多肽之间的结合,抗CD39抗体与突变体CD39多肽之间的结合亲和力和/或能力降低大于40%、大于50%、大于55%、大于60%、大于65%、大于70%、大于75%、大于80%、大于85%、大于90%或大于95%。在某些实施例中,结合降低到可检测限度以下。在一些实施例中,当抗CD39抗体与突变体CD39多肽的结合小于抗CD39抗体与野生型CD39多肽之间观察到的结合的50%(例如,小于45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%或10%)时,证明结合显著降低。

[0127] 在一些实施例中,抗CD39抗体对突变体CD39多肽展现出显著更低的结合,其中包括结合抗体I-394、I-395、I-396、I-397、I-398或I-399的氨基酸残基的区段中的残基被不同的氨基酸取代。

[0128] 在一些实施例中,提供结合由抗体I-394、I-395、I-396、I-397、I-398或I-399结合的CD39上的表位的抗CD39抗体(例如,除I-394之外)。

[0129] 在一个方面中,抗体结合CD39上的表位,其包括选自以下组成的组的氨基酸残基(例如,残基中的一个、两个或三个):R138、M139和E142(参考SEQ ID NO:1)。

[0130] 在一个方面中,抗CD39抗体展现了与CD39多肽的结合降低(例如,实质上完全丧失结合),与野生型CD39多肽(SEQ ID NO:1的CD39多肽)相比,所述CD39多肽在选自以下组成的组的残基中的一个、两个或三个处具有突变:R138、M139和E142(参考SEQ ID NO:1),任选地,突变体CD39多肽具有突变:R138A、M139A和E142K。在一个任选的方面中,抗体并未丧失结合于除突变体19以外的表1的突变体CD39多肽中的任一个。在另一任选的方面中,抗CD39抗体展现了与CD39多肽的结合降低(任选地降低但实质上未完全丧失结合;或任选地实质上完全丧失结合),与野生型CD39多肽(SEQ ID NO:1的CD39多肽)相比,所述CD39多肽在选自以下组成的组的残基中的一个、两个、三个或四个处具有突变:Q96、N99、E143和R147(参考SEQ ID NO:1),任选地,突变体CD39多肽具有突变:Q96A、N99A、E143A和R147E。

[0131] 在一个方面中,抗体结合CD39上的表位,其包括选自以下组成的组的氨基酸残基(例如,残基中的一个、两个、三个或四个);Q96、N99、E143和R147(参考SEQ ID NO:1)。在一个方面中,在每一情况下,相对于抗体与包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列的野生型CD39多肽之间的结合,抗体与突变体CD39多肽的结合降低(例如,实质上完全丧失结合),所述突变体

CD39多肽包括选自以下组成的组的1个、2个、3个或4个残基处的突变:Q96、N99、E143和R147(参考SEQ ID NO:1)。

[0132] 在一个方面中,抗体结合CD39上的表位,其包括(a)选自以下组成的组的氨基酸残基(例如,残基中的一个、两个或三个):R138、M139和E142(参考SEQ ID NO:1);和(b)选自以下组成的组的氨基酸残基(例如,残基中的一个、两个、三个或四个):Q96、N99、E143和R147。

[0133] 在一个方面中,在每一情况下,与野生型CD39多肽(SEQ ID NO:1的CD39多肽)相比,抗CD39抗体展现对(a)和(b)两个的结合降低(例如,实质上完全丧失):所述(a)CD39多肽在选自以下组成的组的残基中的一个、两个、三个或四个处具有突变:Q96、N99、E143和R147(参考SEQ ID NO:1);和所述(b)CD39多肽在选自以下组成的组的残基中的一个、两个或三个处具有突变:R138、M139和E142(参考SEQ ID NO:1)。任选地,(a)的突变体CD39多肽具有突变:Q96A、N99A、E143A和R147E。任选地,(b)的突变体CD39多肽具有突变:R138A、M139A和E142K。任选地,抗体并未丧失结合于除突变体5和19以外的表1的突变体CD39多肽中的任一个。

[0134] 在一个方面中,抗体结合CD39上的表位,其包括选自以下组成的组的氨基酸残基(例如,残基中的一个、两个、三个或四个):K87、E100和D107(参考SEQ ID NO:1)。

[0135] 在一个方面中,抗CD39抗体展现了与CD39多肽的结合降低(例如,实质上完全丧失结合),与野生型CD39多肽(SEQ ID NO:1的CD39多肽)相比,所述CD39多肽在选自以下组成的组的残基中的一个、两个、三个或四个处具有突变:K87、E100和D107(参考SEQ ID NO:1),任选地,突变体CD39多肽具有突变:K87A、E100A和D107A。任选地,抗体并未丧失结合于除突变体15以外的表1的突变体CD39多肽中的任一个。

[0136] 在一个方面中,抗体结合CD39上的表位,其包括选自以下组成的组的氨基酸残基(例如,残基中的一个、两个、三个或四个):N371、L372、E375、K376和V377(参考SEQ ID NO:1)。

[0137] 在一个方面中,抗CD39抗体展现了与CD39多肽的结合降低(例如,实质上完全丧失),与野生型CD39多肽(SEQ ID NO:1的CD39多肽)相比,所述CD39多肽在选自以下组成的组的残基中的一个、两个、三个、四个或五个处具有突变:N371、L372、E375、K376和V377(参考SEQ ID NO:1),任选地,突变体CD39多肽具有突变:N371K、L372K、E375A、K376G和V377S,以及残基376与377之间的缬氨酸插入。任选地,抗体并未丧失结合于除突变体11以外的表1的突变体CD39多肽中的任一个。

[0138] 抗CD39抗体可以例如包括I-394的:HCDR1,其包括氨基酸序列:DYNMH(SEQ ID NO:5),或其至少4个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;HCDR2,其包括氨基酸序列:YIVPLNGGSTFNQKFKG(SEQ ID NO:6),或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;HCDR3,其包括氨基酸序列:GGTRFAY(SEQ ID NO:7),或其至少4个、5个或6个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;LCDR1,其包括氨基酸序列:RASESVDNFGVSFMY(SEQ ID NO:8),或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;LCDR2区,其包括氨基酸序列:GASNQGS(SEQ ID NO:9),或其至少4个、5个或6个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一

个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代；和/或LCDR3区，其包括氨基酸序列：QQTKEVPYT (SEQ ID NO:10)，或其至少4个、5个、6个、7个或8个连续氨基酸的序列，任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以缺失或被不同的氨基酸取代。CDR位置可以根据Kabat编号。

[0139] 抑制人类sCD39蛋白的酶活性的抗体的示范性抗CD39 VH和VL对是抗体I-394的VH和VL对，以下列出了其重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:3)，且以下列出了其轻链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:4)。根据Kabat编号的CDR在SEQ ID NO:3和4中带下划线。任选地，VH和VL包括（例如，经修饰以并入）人类受体框架。在一个实施例中，本公开的抗CD39抗体包括具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区的VH CDR1、CDR2和/或CDR3（例如，根据Kabat编号）。在一个实施例中，本公开的抗CD39抗体包括具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区的VL CDR1、CDR2和/或CDR3（例如，根据Kabat编号）。

[0140] I-394VH：

[0141] EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYNMHWVKQSHGRTLEWIGYIVPLNGGSTFNQKFKGRA TLTVNTSSRTAYMELRSLTSEDSAAYYCARGGTRFAYWGQGTLTVSA (SEQ ID NO:4)。

[0142] I-394VL：

[0143] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNFGVSFMYWFQQKPGQPPNLLIYGASNQGSGVPARFRG SGSGTDFSLNIHPMEADDTAMYFCQQTKEVPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:4)。

[0144] 根据本公开的另一示范性抗CD39 VH和VL对是抗体I-395的VH和VL对，以下列出了其重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:11)，并且以下列出了其轻链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:12)。根据Kabat编号的CDR在SEQ ID NO:11和12中带下划线。任选地，VH和VL包括（例如，被修饰以并入）人类受体框架。在一个实施例中，本公开的抗CD39抗体包括具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的重链可变区的VH CDR1、CDR2和/或CDR3（例如，根据Kabat编号）。在一个实施例中，本公开的抗CD39抗体包括具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链可变区的VL CDR1、CDR2和/或CDR3（例如，根据Kabat编号）。

[0145] I-395VH：

[0146] EVQLQQSGPELVKPGASVRMSCKASGYTFTDYNMHWKKNHGKLEWIGYINPNNGGTTYNQKFKGKAT LTVNTSSKTAYMELRSLTSEDSAVYYCTRGTRFASWGQGTLTVSA

[0147] (SEQ ID NO:11)。

[0148] I-395VL：

[0149] NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMWFQQKPGQPPKLLIYAASTQGSGVPARFSGS GSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSK EVPFTFGSGTKLEIK

[0150] (SEQ ID NO:12)。

[0151] 抗CD39抗体可以例如包括：I-395的HCDR1，其包括氨基酸序列：DYNMH (SEQ ID NO:13)，或其至少4个连续氨基酸的序列，任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代；I-395的HCDR2，其包括氨基酸序列：YINPNNGGTTYNQKFKG (SEQ ID NO:14)，或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列，任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代；I-395的HCDR3，其包括氨基酸序列：GGTRFAS (SEQ ID NO:15)，或其至少4个、5个、6个连续氨基酸的序列，任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代；I-395的LCDR1，其包括氨基酸序列：

RASESVDNYGISFMY (SEQ ID NO:16) ,或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;I-395的LCDR2区,其包括氨基酸序列:AASTQGS (SEQ ID NO:17) ,或其至少4个、5个或6个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;和/或I-395的LCDR3区,其包括氨基酸序列:QQSKEVPFT (SEQ ID NO:18) ,或其至少4个、5个、6个、7个或8个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以缺失或被不同的氨基酸取代。CDR位置可以根据Kabat编号。

[0152] 根据本公开的另一示范性抗CD39 VH和VL对是抗体I-396的VH和VL对,以下列出了其重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:19) ,并且以下列出了其轻链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:20) 。根据Kabat编号的CDR在SEQ ID NO:19和20中带下划线。任选地,VH和VL包括(例如,被修饰以并入)人类受体框架。在一个实施例中,本公开的抗CD39抗体包括具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区的VH CDR1、CDR2和/或CDR3(例如,根据Kabat编号)。在一个实施例中,本公开的抗CD39抗体包括具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区的VL CDR1、CDR2和/或CDR3(例如,根据Kabat编号)。

[0153] I-396VH:

[0154] EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCIVSGFNIKDTYINWVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGKAT
MTSDTSSNTAYLHLSSLTSDDSAVYYCARWGYDDEEADYFDSWGQGTTLTVSS

[0155] (SEQ ID NO:19)。

[0156] I-396VL:

[0157] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYAAASNQGSGVPARFSGS
GSGTDFSLNILPMEEVDAAMYFCHQSKEVPWTFGGGTKLEIK

[0158] (SEQ ID NO:20)。

[0159] 抗CD39抗体可以例如包括I-396的:HCDR1,其包括氨基酸序列:DTYIN (SEQ ID NO:21) ,或其至少4个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;HCDR2,其包括氨基酸序列:RIDPANGNTKYDPKFQG (SEQ ID NO:22) ,或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;HCDR3,其包括氨基酸序列:WGYDDEEADYFDS (SEQ ID NO:23) ,或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;LCDR1,其包括氨基酸序列:RASESVDNYGISFMN (SEQ ID NO:24) ,或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;LCDR2区,其包括氨基酸序列:AASNQGS (SEQ ID NO:25) ,或其至少4个、5个或6个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;和/或LCDR3区,其包括氨基酸序列:HQSKEVPWT (SEQ ID NO:26) ,或其至少4个、5个、6个、7个或8个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以缺失或被不同的氨基酸取代。CDR位置可以根据Kabat编号。

[0160] 根据本公开的另一示范性抗CD39 VH和VL对是抗体I-399的VH和VL对,以下列出了其重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:27) ,并且以下列出了其轻链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:28) 。根据Kabat编号的CDR在SEQ ID NO:27和28中带下划线。任选地,VH和VL包

括(例如,经修饰以并入)人类受体框架。在一个实施例中,本公开的抗CD39抗体包括具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区的VH CDR1、CDR2和/或CDR3(例如,根据Kabat编号)。在一个实施例中,本公开的抗CD39抗体包括具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的轻链可变区的VL CDR1、CDR2和/或CDR3(例如,根据Kabat编号)。

[0161] I-399VH:

[0162] PVQLQQPGAEVVMPGASVKLSCKASGYTFTSFWMNWMRQRPQQGLEWIGEIDPSDFYTNSNQRFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGGDFGWYFDVWGTGTSTVSS

[0163] (SEQ ID NO:27)。

[0164] I-399VL:

[0165] EIVLTQSPTTMTSSPGEKITFTCSASSSINSNYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNLASGVPTRFSGSGSTSYSLTIGTMEAEDVATYYCQQGSSLPRTFGGGTKLEIK

[0166] (SEQ ID NO:28)。

[0167] 抗CD39抗体可以例如包括I-399的:HCDR1,其包括氨基酸序列:SFWMN(SEQ ID NO:29),或其至少4个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;HCDR2,其包括氨基酸序列:EIDPSDFYTNSNQRFKG(SEQ ID NO:30),或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;HCDR3,其包括氨基酸序列:GDFGWYFDV(SEQ ID NO:31),或其至少4个、5个或6个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;LCDR1,其包括氨基酸序列:SASSSINSNYLH(SEQ ID NO:32),或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;LCDR2区,其包括氨基酸序列:RTSNLAS(SEQ ID NO:33),或其至少4个、5个或6个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;和/或LCDR3区,其包括氨基酸序列:QQGSSLPRT(SEQ ID NO:34),或其至少4个、5个、6个、7个或8个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以缺失或被不同的氨基酸取代.CDR位置可以根据Kabat编号。

[0168] 在I-394、I-395、I-396和I-399抗体中的任一个中,HCDR1、2、3和LCDR1、2、3序列(每个CDR独立地,或所有CDR)可以被指定为Kabat编号系统中的那些(如通过下划线在VH和VL序列中所表明)、Chothia编号系统中的那些、或IMGT编号系统中的那些、或任何其它合适的编号系统。

[0169] 在任何方面中,指定的可变区,FR和/或CDR序列可以包括一个或多个序列修饰,例如取代(1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多个序列修饰)。在一个实施例中,取代是保守修饰。

[0170] 在另一方面中,抗CD39化合物包括VH结构域,其与本文公开的抗体的VH结构域具有至少约60%、70%或80%的序列同一性,任选地至少约85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性。另一方面,抗CD39抗体包括VL结构域,其与本文公开的抗体的VL结构域具有至少约60%、70%或80%的序列同一性,任选地至少约85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性。

[0171] 任选地,在本文中的任一实施例中,抗CD39抗体可表征为本文所述的抗体、其重

和/或轻链、CDR或可变区中的任一个的功能保守性变体。“功能保守性变体”是其中蛋白质或酶中的给定氨基酸残基已改变但未改变多肽的整体构形和功能的那些变体,包含(但不限于)具有类似性质(如例如极性、氢键结潜能、酸性、碱性、疏水性、芳族等)的氨基酸的替代物。除指示为保守性的氨基酸以外的氨基酸的蛋白质可不同,使得类似功能的任何两个蛋白质之间的蛋白质或氨基酸序列类似性百分比可变化且可以是(例如)70%到99%,如根据对准流程,如通过团簇方法确定,其中类似性是基于MEGALIGN算法。“功能保守性变体”还包含具有如BLAST或FASTA算法确定的至少60%氨基酸同一性,优选地至少75%、更优选地至少85%、另外优选地至少90%、并且甚至更优选地至少95%,且与和其进行比较的天然或亲本蛋白(例如,其重链或轻链或CDR或可变区)具有相同或实质上类似性质或功能的多肽。在一个实施例中,所述抗体包括重链可变区,即抗体I-394、I-395、I-396、I-397、I-398或I-399的重链可变区的功能保守性变体,和轻链可变区,即相应I-394、I-395、I-396、I-397、I-398或I-399抗体的轻链可变区的功能保守性变体。在一个实施例中,所述抗体包括重链,即与本文公开的人类重链恒定区,任选地SEQ ID N0:44-47中的任一个的恒定区融合的抗体I-394、I-395、I-396、I-397、I-398或I-399的重链可变区的功能保守性变体,和轻链,即与人类C κ 轻链恒定区融合的相应I-394、I-395、I-396、I-397、I-398或I-399抗体的轻链可变区的功能保守性变体。

[0172] 产生抗体

[0173] 抗CD39抗体可通过所属领域中已知的多种技术中的任一种产生。通常,其通过为非人类动物(例如小鼠)免疫接种分别包括CD39多肽的免疫原或通过筛选具有CD39多肽的候选结合结构域文库来产生。CD39多肽可以分别地包括人类CD39多肽的全长序列或其片段或衍生物(通常免疫原性片段),即多肽的一部分包括暴露在表达CD39多肽的细胞表面上的表位。这类片段通常含有成熟多肽序列的至少约7个连续氨基酸,甚至更优地其至少约10个连续氨基酸。片段通常基本上来源于受体的细胞外结构域。在一个实施例中,免疫原包括脂膜中,通常在细胞表面处的野生型人类CD39多肽。在一具体实施例中,免疫原包括完整细胞,具体来说完整的人类细胞,任选地经治疗或裂解。在另一实施例中,多肽是重组CD39多肽。

[0174] 用抗原使非人类哺乳动物免疫的步骤可以以所属领域熟知的任何方式进行,用于刺激小鼠中抗体的产生(参见,例如,E.Harlow和D.Lane,《抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual.)》,纽约冷泉港冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor, NY),(1988),其全部公开内容通过引用并入本文)。使免疫原悬浮或溶解于缓冲液中,任选地利用佐剂,如完整或不完整的弗氏佐剂(Freund's adjuvant)。用于确定免疫原的量、缓冲剂类型和佐剂的量的方法是所属领域的技术人员熟知的且不以任何方式限制。这些参数对于不同免疫原可能不同,但容易阐明。

[0175] 类似地,足以刺激抗体产生的免疫接种的位置和频率也是所属领域中熟知的。在通常免疫方案中,在第1天向非人类动物腹膜内注射抗原且约一周后再次进行。这接着大约第20天时恢复注射抗原,任选地伴随佐剂,如不完整弗氏佐剂。所述恢复注射经静脉内进行且可重复连续数天。这接着在第40天静脉内或腹膜内辅助剂注射,通常无佐剂。这一方案在约40天后引起产生抗原特异性抗体的B细胞产生。也可使用其它方案,只要其引起B细胞的产生,所述B细胞表达针对免疫中所使用的抗原的抗体。

[0176] 对于单克隆抗体,将脾细胞与免疫的非人类哺乳动物和那些脾细胞与永生细胞的后续融合体分离以便形成产生抗体的杂交瘤。将脾细胞与非人类哺乳动物分离是所属领域中所熟知的且通常涉及从麻醉的非人类哺乳动物去除脾,将其切割成较小块且通过细胞过滤器的尼龙网将脾细胞从脾包膜挤压到适合的缓冲液中以便产生单细胞悬浮液。细胞经洗涤,离心且再悬浮于溶解任何红细胞的缓冲液中。将溶液再次离心且使丸粒中的残存淋巴细胞最终再悬浮于新制缓冲液中。

[0177] 一旦分离且存在于单细胞悬浮液中,那么淋巴细胞可以与无限增殖细胞株融合。这通常是小鼠骨髓瘤细胞株,但适用于形成杂交瘤的多个其它无限增殖细胞株是所属领域中已知的。鼠类骨髓瘤株包含(但不限于)来源于MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤(获自Salk Institute Cell Distribution Center,美国圣地亚哥(San Diego,U.S.A.)),X63 Ag8653和SP-2细胞(获自美国菌种保存中心(American Type Culture Collection),美国马里兰州罗克维尔(Rockville,Maryland U.S.A.))的那些骨髓瘤株。使用聚乙二醇或其类似物影响融合体。随后,所得杂交瘤在含有一种或多种抑制未融合亲本骨髓瘤细胞的生长或生存的选择性培养基中生长。举例来说,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT),那么杂交瘤的培养基通常将包含次黄嘌呤、氨基喋呤(aminopterin)和胸苷(HAT培养基),这些物质防止HGPRT缺陷型细胞的生长。

[0178] 杂交瘤通常在巨噬细胞的饲养层上生长。巨噬细胞优先地来自用于分离脾细胞的非人类哺乳动物的同胎仔畜且通常在接种杂交瘤之前数天通过不完整弗氏佐剂或其类似物预致敏。融合方法描述于Goding,“《单克隆抗体:原理及实践(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice)》,”第59-103页(学术出版社,1986),其公开内容以引用的方式并入本文中。

[0179] 允许细胞在选择培养基中生长充分时间以用于集落形成和抗体产生。这通常在约7与约14天之间。

[0180] 随后分析杂交瘤集落的特异性结合CD39多肽基因产物的抗体产生。测定通常是色度ELISA型测定,但可采用可适用于杂交瘤生长的孔的任何测定。其它测定包含放射免疫分析或荧光激活细胞分选术。检测对于所需抗体产生为阳性的孔以确定是否存在一种或多种独立集落。如果存在超过一种集落,那么细胞可再次克隆并生长以确保仅单个细胞已引起集落产生所需抗体。通常,还将测试抗体结合CD39多肽,例如CD39表达性细胞的能力。

[0181] 证实产生单克隆抗体的杂交瘤可以较大量在适合的培养基,如DMEM或RPMI-1640中生长。替代地,杂交瘤细胞可以腹水瘤在动物体内生长。

[0182] 在充分生长以产生所需单克隆抗体后,将含有单克隆抗体的生长培养基(或腹水流体)与细胞分离且纯化存在于其中的单克隆抗体。纯化通常通过凝胶电泳、渗析层析法,使用蛋白A或蛋白G-琼脂糖,或连接到固体支持物(如琼脂糖或琼脂糖珠粒)的抗小鼠Ig实现(所有描述于例如《抗体纯化手册(the Antibody Purification Handbook)》,《生物科学》,公开第18-1037-46号,AC版中,其公开内容特此以引用方式并入)。结合的抗体通常通过使用低pH缓冲液(pH 3.0或更小的甘氨酸或乙酸缓冲液)从蛋白A/蛋白G管柱洗脱,并伴随立即中和含抗体部分。这些部分经合并、渗析且视需要浓缩。

[0183] 具有单个明显集落的阳性孔通常经再次克隆和再次分析以保证检测且产生仅一个单克隆抗体。

[0184] 抗体还可通过选择免疫球蛋白的组合文库产生,如例如(Ward等人《自然》,341(1989)第544页,其整个公开内容以引用的方式并入本文中)中公开。

[0185] 结合所关注抗原,即CD39,具体地说或实质上与单克隆抗体I-394、I-395、I-396或I-399相同的区域、决定簇或表位的一种或多种抗体的识别可以使用可以评估抗体竞争的多种免疫筛选测定中的任一个容易地确定。多个这类测定常规地实践且是所属领域中所熟知的(参见例如1997年8月26颁布的美国专利第5,660,827号,其通过引用特定并入本文中)。

[0186] 举例来说,当待检测的测试抗体源自不同源动物,或甚至属于不同Ig同种型时,可采用单一竞争测定,其中对照(例如I-394、I-395、I-396和I-399)和测试抗体混合(或预吸附)且施加到含有CD39多肽的样品。基于蛋白质印迹法和BIACORE分析的使用的方案适用于这类竞争研究。

[0187] 在某些实施例中,在施加到CD39抗原样品之前将对照抗体(例如,I-394、I-395、I-396或I-399例如)与不同量的测试抗体(例如,约1:10或约1:100)预混合一段时间。在其它实施例中,对照和不同量的测试抗体可仅仅在暴露于CD39抗原样品期间混合。只要我们可区分结合与游离抗体(例如,通过使用分离或洗涤技术来消除未结合抗体)且区分I-394与测试抗体(例如,通过使用物种特异性或同种型特异性第二抗体或通过可检测标记特异性地标记I-394、I-395、I-396或I-399),那么我们可以确定测试抗体是否降低I-394、I-395、I-396或I-399与抗原的结合。在完全不相关抗体不存在的情况下,(标记)对照抗体的结合可充当高对照值。低对照值可以通过将标记(I-394、I-395、I-396或I-399)抗体与恰好相同类型(I-394、I-395、I-396或I-399)的未标记抗体一起温育,其中竞争将出现且降低标记抗体的结合。在测试测定中,标记抗体反应度在测试抗体存在下的显著降低指示与标记(I-394、I-395、I-396或I-399)抗体“交叉反应”或竞争的测试抗体。可以选择以I-394、I-395、I-396或I-399:测试抗体在约1:10与约1:100之间的任何比率将I-394、I-395、I-396或I-399与CD39抗原的结合降低至少约50%,如至少约60%,或更优选地至少约80%或90%(例如,约65-100%)的任何测试抗体。在一个实施例中,这类测试抗体将I-394、I-395、I-396或I-399与CD39抗原的结合降低至少约90%(例如,约95%)。

[0188] 竞争还可通过(例如)流式细胞术测试评估。在这类测试中,携带给定CD39多肽的细胞可以首先与例如I-394一起温育,且随后与用荧光染料或生物素标记的测试抗体一起温育。如果在与饱和量的I-394一起预温育之后获得的结合是抗体不与I-394一起预温育所获得的结合(如通过荧光测量)的约80%、优选地约50%、约40%或更小(例如,约30%、20%或10%),那么称抗体与I-394竞争。替代地,如果通过细胞上的标记I-394抗体(通过荧光染料或生物素)与饱和量的测试抗体一起预温育获得的结合是不与测试抗体一起预温育所获得的结合的约80%、优选地约50%、约40%或更小(例如,约30%、20%或10%),那么称抗体与I-394竞争。

[0189] 可以所属领域技术人员已知的方式进行抗体是否在表位区内结合的确定。作为这类作图/表征方法的一个实例,抗CD39抗体的表位区可以通过使用相应CD39蛋白中暴露的胺/羧基的化学修饰的表位“足印”来确定。这类足印技术的一个具体实例是使用HXMS(通过质谱法检测的氢-氘交换),其中发生受体和配体蛋白酰胺质子的氢/氘交换、结合和反向交换,其中参与蛋白质结合的主链酰胺基受到保护免于反向交换,并且因此将保持氘代。这时

可以通过消化蛋白水解、快速微孔高效液相色谱分离和/或电喷雾电离质谱法标识相关区域。参见,例如,Ehring H,《分析生物化学(Analytical Biochemistry)》,第267 (2) 卷第252-259页 (1999) Engen, J.R. 和 Smith, D.L. (2001)《分析化学(Anal. Chem.)》73, 256A-265A。合适的表位标识技术的另一实例是核磁共振表位作图(NMR),其中通常比较信号在游离抗原和与抗原结合肽复合的抗原(如抗体)的二维NMR光谱中的位置。通常用¹⁵N选择性地同位素标记抗原,使得在NMR光谱中仅看到对应于抗原的信号,并且看不到来自抗原结合肽的信号。源自参与与抗原结合肽相互作用的氨基酸的抗原信号通常将在复合物的光谱中移位(与游离抗原的光谱相比),并且可以所述方式标识参与结合的氨基酸。参见,例如,Ernst Schering Res Found Workshop. 2004; (44) :149-67; Huang等人,《分子生物学期刊(Journal of Molecular Biology)》第281 (1) 卷第61-67页 (1998); 以及Saito和Patterson,《方法(Methods.)》1996年6月; 9 (3) :516-24。

[0190] 也可以使用质谱法进行表位作图/表征。参见,例如,Downard,《质谱学杂志(J Mass Spectrom.)》2000年4月; 35 (4) :493-503以及Kiselar和Downard,《分析化学(Anal Chem.)》1999年5月1日; 71 (9) :1792-1801。蛋白酶消化技术也可以用于表位作图和标识的背景下。抗原决定簇相关区域/序列可以通过蛋白酶消化确定,例如通过以约1:50的比率使用胰蛋白酶与CD39或在pH 7-8下过夜消化(o/n digestion),,随后进行用于肽标识的质谱(MS)分析。随后可以通过将经历胰蛋白酶消化的样品和与抗体一起温育,并且随后经历例如胰蛋白酶消化的样品进行比较,标识受抗CD39结合剂保护免受胰蛋白酶裂解的肽(从而揭示粘合剂的足迹)。其它酶(如胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶等)也可以或替代性地用于类似的表位表征方法中。此外,酶消化可以提供用于分析潜在抗原决定簇序列是否在CD39多肽的未表面暴露的区域内的快速方法,并且因此,在免疫原性/抗原性方面最可能不相关。

[0191] 定点诱变是可用于阐明结合表位的另一种技术。举例来说,在“丙氨酸扫描”中,蛋白质区段内的每个残基用丙氨酸残基取代,并且测量结合亲和力的结果。如果突变导致结合亲和力显著降低,那么其很可能参与结合。对结构表位具有特异性的单克隆抗体(即,不结合未折叠蛋白质的抗体)可以用于验证丙氨酸取代不影响蛋白质的总体折叠。参见,例如,Clackson和Wells,《科学(Science)》1995; 267:383-386; 以及Wells,《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》1996; 93:1-6。

[0192] 电子显微镜也可以用于表位“足印”。举例来说,Wang等人,《自然》1992; 355: 275-278使用冷冻电镜术、三维图像重建和X射线晶体学的协调应用,以确定Fab片段在天然豇豆花叶病毒的衣壳表面上的物理足迹。

[0193] 用于表位评估的其它形式的“无标记”测定包含表面等离子共振(SPR,BIACORE)和反射干涉光谱(RiFS)。参见,例如,Fägerstam等人,《分子识别杂志(Journal of Molecular Recognition)》1990; 3:208-14; Nice等人,《色谱杂志(J.Chromatogr.)》1993; 646:159-168; Leipert等人,《应用化学国际版(Angew.Chem.Int.Ed.)》1998; 37:3308-3311; Kröger等人,《生物传感器和生物电子学(Biosensors and Bioelectronics)》2002; 17:937-944。

[0194] 还应注意,可以在本文所述的示范性竞争测定中的一种或多种测定中,标识结合与抗体相同或实质上相同的表位的抗体。

[0195] 通常,本文提供的抗CD39抗体对相应CD39多肽的亲和力在约10⁴到约10¹¹M⁻¹(例如,

约 10^8 到约 $10^{10} M^{-1}$)范围内。举例来说,在一具体方面,抗CD39抗体分别关于CD39的平均解离常数(K_D)小于 $1 \times 10^{-9} M$,如通过例如表面等离子共振(SPR)筛选(如通过用BIAcore™ SPR分析装置的分析)所测定。在一更具体的示范性方面,抗CD39抗体分别对于CD39的KD为约 $1 \times 10^{-8} M$ 到约 $1 \times 10^{-10} M$,或约 $1 \times 10^{-9} M$ 到约 $1 \times 10^{-11} M$ 。在一个实施例中,结合是单价结合。在一个实施例中,结合是二价结合。

[0196] 抗体可以表征为例如平均KD不大于约100、60、10、5或1纳摩尔(即,更好的亲和力),优选地亚纳摩尔或任选地不大于约500、200、100或10皮摩尔。可以例如通过将重组产生的人类CD39蛋白固定在芯片表面上,随后在溶液中施加待测抗体以确定KD。在一个实施例中,方法进一步包括从(b)选择能够与抗体I-394竞争以结合CD39的抗体。

[0197] 在实施例中的任一个的一个方面,根据本方法制备的抗体是单克隆抗体。在另一方面,用于根据本文方法产生抗体的非人类动物是哺乳动物,如啮齿动物、牛、猪、家禽、马、兔、山羊或绵羊。

[0198] 从杂交瘤中分离编码结合CD39多肽上存在的表位的抗体的DNA,并且将其置于合适的表达载体中,以转染到合适的宿主中。随后,将宿主用于重组产生抗体或其变体,如所述单克隆抗体的人类化版本、抗体的活性片段、包括抗体的抗原识别部分的嵌合抗体、或包括可检测部分的版本。

[0199] 编码本公开的单克隆抗体,例如抗体I-394的DNA可以容易地分离,并且使用常规方法测序(例如,通过使用能够特异性地结合于编码鼠类抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。一旦分离,就可以将DNA放入表达载体中,然后将其转染到不会另外产生免疫球蛋白的宿主细胞,如大肠杆菌细胞、猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞中,由此在重组宿主细胞中实现单克隆抗体的合成。如本说明书中其它地方所述,可以修饰这类DNA序列以用于任何大量目的,例如用于人类化抗体、产生片段或衍生物、或用于修饰抗体的序列,例如在抗原结合位点中,以优化抗体的结合特异性。在一个实施例中,提供编码抗体的轻链和/或重链的分离核酸序列以及包括(例如,在其基因组中)这类核酸的重组宿主细胞。编码抗体的DNA在细菌中的重组表达是所属领域熟知的(参见,例如,Skerra等人,《免疫学最新观点(Curr. Opinion in Immunol.)》5,第256页(1993);和Pluckthun,《免疫学(Immunol.)》130,第151页(1992))。

[0200] 抗体的片段和衍生物(除非另外说明或与上下文明显地相矛盾,否则如本申请中所使用,通过术语“抗体(antibody/antibodies)”涵盖)可以通过所属领域中已知的技术产生。“片段”包括完整抗体的一部分,一般是抗原结合位点或可变区。抗体片段的实例包含Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')2及Fv片段;双功能抗体;任何抗体片段,即具有由连续氨基酸残基的一个不间断的序列组成的一级结构的多肽(在本文中被称作“单链抗体片段”或“单链多肽”),包含(但不限于)(1)单链Fv分子;(2)单链多肽,仅含有一个轻链可变结构域或其片段,所述片段含有轻链可变结构域的三个CDR,且无相关重链部分;和(3)单链多肽,其含有仅一个重链可变区或其片段,所述片段含有重链可变区的三个CDR且无相关轻链部分;和由抗体片段形成的多特异性(例如,双特异性)抗体。尤其包含纳米抗体、结构域抗体、单结构域抗体或“dAb”。

[0201] 在一个方面中,试剂是选自完全人类抗体、人类化抗体和嵌合抗体的抗体。

[0202] 在一个方面中,试剂是包括选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的恒定结构域的抗体片

段。在一个方面中，试剂是选自以下的抗体片段：Fab片段、Fab'片段、Fab'-SH片段、F(ab)2片段、F(ab')2片段、Fv片段、重链Ig(大羊驼或骆驼Ig)、V_{HH}片段、单个结构域FV和单链抗体片段。在一个方面中，试剂是合成或半合成抗体衍生的分子，其选自：scFV、dsFV、微型抗体、双功能抗体、三功能抗体、κ主体、IgNAR；和多特异性抗体。在一个方面中，抗体呈至少部分地纯化形式。在一个方面中，抗体呈实质上分离的形式。

[0203] 如抗体的抗CD39可以掺入药物调配物中，所述药物调配物包括1mg/ml到500mg/ml的浓度，其中所述调配物的pH为2.0到10.0。调配物可以进一步包括缓冲系统、一种或多种防腐剂、一种或多种张力剂、一种或多种螯合剂、稳定剂和表面活性剂。在一个实施例中，药物调配物是含水调配物，即包括水的调配物。此类调配物通常是溶液或悬浮液。在另一实施例中，药物调配物是水溶液。术语“含水调配物”定义为包括至少50%w/w水的调配物。同样，术语“水溶液”定义为包括至少50%w/w水的溶液，并且术语“水性悬浮液”定义为包括至少50%w/w水的悬浮液。

[0204] 在另一实施例中，药物调配物是无需任何预先溶解即可使用的干燥调配物(例如，冷冻干燥或喷雾干燥)。

[0205] 在另一实施例中，药物调配物是干燥调配物(例如，冷冻干燥或喷雾干燥)，无需任何预先溶解即可使用。

[0206] 另一方面，药物调配物包括此类抗体的水溶液和缓冲液，其中抗体以1mg/ml或更高的浓度存在，并且其中所述调配物的pH为约2.0到约10.0。

[0207] 在另一实施例中，调配物的pH处于选自由以下组成的列表的范围内：约2.0到约10.0、约3.0到约9.0、约4.0到约8.5、约5.0到约8.0和约5.5到约7.5。

[0208] 在另一实施例中，缓冲剂选自以下组成的组：乙酸钠、碳酸钠、柠檬酸盐、甘氨酰甘氨酸、组氨酸、甘氨酸、赖氨酸、精氨酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸钠和三(羟甲基)-氨基甲烷、二甘氨酸、三甘氨酸、苹果酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、酒石酸、天冬氨酸或其混合物。这些特定缓冲液中的每一种构成本发明的替代性实施例。

[0209] 在另一实施例中，调配物进一步包括药学上可接受的防腐剂。在另一实施例中，调配物进一步包括等渗剂。在另一实施例中，调配物还包括螯合剂。在本发明的另一实施例中，调配物进一步包括稳定剂。在另一实施例中，调配物进一步包括表面活性剂。为方便起见，参考《雷明顿：药学技术与实践(Remington: The Science and Practice of Pharmacy)》，第19版，1995。

[0210] 本发明的肽药物调配物中可能存在其它成分。这类附加成分可以包含润湿剂、乳化剂、抗氧化剂、填充剂、张力调节剂、螯合剂、金属离子、油质媒剂、蛋白质(例如人类血清白蛋白、明胶或蛋白质)和两性离子(例如氨基酸，如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸)。当然，这类额外的成分不应对本发明的药物调配物的总体稳定性产生不利影响。

[0211] 施用根据本发明的药物组合物可以通过数种施用途径，例如静脉内。合适的抗体调配物还可以通过检验经历其它已经研发治疗性单克隆抗体来确定。已经证明几种单克隆抗体在临床情况下是有效的，如美罗华(Rituxan)(利妥昔单抗(Rituximab))、赫赛汀(Herceptin)(曲妥珠单抗(Trastuzumab))、索雷尔(Xolair)(奥马珠单抗(Omalizumab))、百克沙(Bexxar)(托西莫单抗(Tositumomab))、坎帕斯(Campath)(阿仑单抗

(Alemtuzumab))、泽娃灵 (Zevalin) 、Oncolyt和类似的调配物可以与本发明的抗体一起使用。

[0212] 还提供包含药物组合物的试剂盒,所述药物组合物以适于用于先前方法中的治疗有效量含有抗CD39抗体和诱导从肿瘤细胞释放ATP的试剂,以及药学上可接受的载剂。试剂盒任选地还可以包含说明书,例如包括施用排程,以允许从业者(例如,医师、护士或患者)施用其中含有的组合物以将组合物施用到患有癌症(例如,实体肿瘤)的患者。试剂盒还可以包含注射器。

[0213] 任选地,试剂盒包含单剂量药物组合物的多个包装,其各自含有有效量的抗CD39或诱导从肿瘤细胞释放ATP的试剂以根据上文提供的方法单一施用。用于施用药物组合物必需的仪器或装置也可包含在试剂盒中。举例来说,试剂盒可提供一种或多种预填充注射器,所述注射器含有一定量的抗CD39和诱导从肿瘤细胞释放ATP的试剂。

[0214] 在一个实施例中,本发明提供一种用于治疗人类患者的癌症的试剂盒,所述试剂盒包括:

[0215] (a)一定量的中和sCD39的活性的抗CD39抗体,任选地其中抗体包括抗体I-394的重链可变区(例如,CDR1、CDR2和CDR3结构域),和抗体I-394的轻链可变区(例如,CDR1、CDR2和CDR3结构域)。

[0216] (b)一定量的诱导从肿瘤细胞释放ATP的试剂;和

[0217] (c)任选地,用于以本文所描述的方法中的任一种使用抗CD39抗体和诱导从肿瘤细胞释放ATP的试剂的说明书。

[0218] 恶性肿瘤的诊断、预后和治疗

[0219] 本文中描述适用于诊断、预后、监测、治疗和预防个体体内的癌症的方法,其通过使用抗CD39抗体以增强诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂活性。

[0220] 细胞外ATP在压力(机械、低渗或低氧)的情况下或在细胞死亡的情况下从肿瘤细胞中释放。坏死有利于通过释放总细胞含量被动释放ATP,然而细胞凋亡有利于通过活化分解及活化Panexin1(ATP转运蛋白)的卡斯蛋白酶3和9释放ATP。诱导从肿瘤细胞中细胞外释放ATP的试剂的实例可以包含化疗、放射疗法,并且更一般来说,诱导细胞凋亡且进而有利于ATP释放的试剂。诱导细胞外释放ATP的试剂已示出诱导免疫原性细胞死亡。举例来说,实质性ATP释放可以通过以下诱导:蒽环霉素、奥沙利铂(oxaliplatin)、顺铂和X射线、PARP抑制剂、紫杉烷、蒽环霉素、DNA损伤剂、喜树碱、埃博霉素(epothilones)、丝裂霉素、风车子霉素(combretastatins)、长春花生物碱、氮芥、类美登素(maytansinoids)、刺孢霉素(calicheamycins)、倍癌霉素、微管溶素、海兔毒素(dolastatins)和奥瑞他汀(auristatins)、烯二炔、毒伞毒素(amatoxins)、吡咯并苯并二氮杂、乙烯亚胺、放射性同位素、治疗性蛋白质和肽以及毒素或其片段。

[0221] ATP还可通过施用结合癌细胞表面处表达的抗原(例如,肿瘤抗原)的消耗抗体,例如偶合到诱导ATP释放的化学治疗剂的抗体,能够介导细胞凋亡的抗体或朝向癌细胞引导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的抗体(例如其中抗体具有人类IgG1同种型的Fc结构域以便介导ADCC)来释放。

[0222] 蕤环霉素包含例如道诺霉素(daunorubicin)、小红莓(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)或艾达霉素(idarubicin),任选地其脂质体调配物,例如脂质体道诺霉素,如

DaunoXomeTM或VyxeosTM或CPX-351(阿糖胞苷和道诺霉素的组合)。蒽环霉素广泛用于治疗实体和血液恶性肿瘤,包含例如急性骨髓白血病(AML)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性骨髓性白血病(CML)和卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)。小红莓(doxorubicin)和其衍生物表柔比星用于乳癌、儿童实体肿瘤、软组织肉瘤和侵袭性淋巴瘤。道诺霉素用于治疗急性淋巴母细胞性或成髓细胞性白血病,且其衍生物艾达霉素用于多发性骨髓瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphomas)和乳癌。奈莫柔比星用于治疗肝细胞癌,派蒽醌(pixantrone)用作非霍奇金氏淋巴瘤的第二线治疗。萨巴比星(Sabarubicin)用于非小细胞肺癌、激素顽固性转移性前列腺癌和铂或紫杉烷耐药性卵巢癌。伐柔比星(Valrubicin)用于局部治疗膀胱癌。

[0223] 铂试剂包含例如奥沙利铂、顺铂、卡铂(carboplatin)、奈达铂(nedaplatin)、菲铂(Phenanthriplatin)、吡铂(picoplatin)、赛特铂(satraplatin)。

[0224] 紫杉烷包含例如太平洋紫杉醇(Taxol)和多西他赛(Taxotere)。

[0225] DNA损伤剂包含例如DNA嵌入剂,例如将自身插入到细胞的DNA结构中并结合DNA,继而致使DNA损伤的试剂(例如,道诺霉素)。化合物包含拓扑异构酶抑制剂,阻断拓扑异构酶(拓扑异构酶I和II)的作用的化学化合物。这类化合物用于广泛范围的实体肿瘤和血液恶性肿瘤,尤其淋巴瘤。拓扑异构酶I抑制剂包含喜树碱,例如伊立替康(irinotecan)(审批通过用于治疗结肠癌)、拓朴替康(topotecan)(审批通过用于治疗卵巢癌和肺癌)、喜树碱、片螺素D、茚并异喹啉(indenoisoquinoline)、因帝米替康(indimitecan)。其它喜树碱包含赛拉替康(silatecan)、柯西替康(cositecan)、依沙替康(exatecan)、勒托替康(lurtotecan)、吉马替康(gimatecan)、贝洛替康(belotecan)和鲁比替康(rubitecan)。拓扑异构酶II抑制剂包含例如依托泊苷(VP-16)、替尼泊甙(teniposide)、小红莓、道诺霉素、米托蒽醌(mitoxantrone)、安吖啶(amsacrine)、玫瑰树碱(ellipticines)、金精三羧酸(aurintricarboxylic acid)和HU-331、由大麻二酚合成的喹诺酮。

[0226] 已报道PARP抑制剂使癌细胞中的细胞死亡从坏死倾向于非卡斯蛋白酶依赖性细胞凋亡。抑制PARP引起细胞内ATP增加,相信其继而在细胞凋亡之后引起ATP的细胞外释放。酶的聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)家族将NAD⁺转换为烟碱酰胺和ADP核糖以在通常与染色质相关联的多个受体蛋白质的谷氨酸残基上形成较长的和分支链(ADP核糖)聚合物。PARP-1(最充裕的PARP)是使用NAD⁺作为底物催化其靶蛋白上形成聚(ADP-核糖)的核酶。PARP抑制剂通常含有苯并噁唑或苯甲酰胺部分作为关键药效团,且已报告各种苯甲酰胺衍生物。可根据本公开使用的审批通过的PARP抑制剂的实例包含奥拉帕尼(Olaparib)(AZD-2281,Astra Zeneca的Lynparza[®],审批通过用于卵巢癌,还有效治疗乳癌、前列腺癌和结肠直肠癌)、如卡帕瑞(Rucaparib)(PF-01367338,Clovis Oncology的Rubraca[®],审批通过用于卵巢癌)、尼拉帕尼(Niraparib)(MK-4827,Tesaro的Zejula[®],审批通过用于卵巢癌、上皮癌、输卵管癌和原发性腹膜癌)。可根据本公开使用的PARP抑制剂的其它实例包含他拉柔帕瑞(Talazoparib)(BMN-673,BioMarin Pharmaceutical Inc.,Pfizer),其用于血液和晚期或复发性实体肿瘤;维利帕瑞(Veliparib)(ABT-888,由AbbVie开发),其用于卵巢癌、三阴性乳癌和非小细胞肺癌(NSCLC)、黑素瘤;CEP 9722,其用于非小细胞肺癌(NSCLC);E7016(由Eisai开发),其用于黑素瘤;以及帕米帕瑞(Pamiparib)(BGB-290),其由Beigene开发用

于多种实体肿瘤恶性肿瘤。

[0227] 埃博霉素包含例如埃坡霉素B和其各种类似物,例如审批通过用于治疗乳癌的伊沙匹隆(ixabepilone) (BMS-247550)。长春花生物碱,包含例如长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞宾。氮芥包含例如环磷酰胺、苯丁酸氮芥、乌拉莫司汀(uromustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、美法仑(melphalan)和苯达莫司汀(bendamustine)。类美登素包含例如安丝菌素或由Immunogen公司开发的美坦辛(DM1)或DM4。

[0228] 试剂可以呈任何合适的构形或调配物形式,包含例如呈游离化合物形式或呈共轭物、纳米颗粒调配物、囊封(例如,在脂质体中)的部分形式,在每一情况下,任选地进一步与额外药物活性剂组合。试剂可适宜地共轭到靶向部分,如呈免疫共轭物形式。术语“免疫共轭物”和“抗体共轭物”可互换地使用且是指抗原结合试剂,例如抗体结合蛋白或共轭到另一部分的抗体(例如,细胞毒性剂,本文所述的诱导ATP释放的化学治疗剂)。包括共轭到细胞毒性剂的抗原结合剂的免疫共轭物还可被称作“抗体药物共轭物”或“ADC”。

[0229] 虽然本文所述的治疗方案和方法特别适用于治疗实体肿瘤,但本文所述的治疗方案和方法还可用于多种血液癌。本发明的方法和组合物用于实例治疗多种癌症和其它增殖疾病,包含(但不限于):癌瘤,包含膀胱癌瘤、乳房癌瘤、结肠癌瘤、肾脏癌瘤、肝癌瘤、肺癌瘤、卵巢癌瘤、子宫癌瘤、前列腺癌瘤、胰脏癌瘤、胃癌瘤、子宫颈癌瘤、甲状腺癌瘤、头部和颈部癌瘤(头颈部鳞状细胞癌)和皮肤癌瘤(例如,黑素瘤);淋巴谱系的造血肿瘤,包含白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞性白血病、急性淋巴母细胞白血病、B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkins lymphoma)、非霍奇金氏淋巴瘤、毛状细胞淋巴瘤和伯基特淋巴瘤(Burkitts lymphoma)以及多发性骨髓瘤;骨髓谱系的造血肿瘤,包含急性和慢性骨髓性白血病、前髓细胞白血病和骨髓发育不良综合症;间叶细胞源肿瘤,包含纤维肉瘤和横纹肌肉瘤;其它肿瘤,包含黑素瘤、精原细胞瘤、畸形癌瘤、神经母细胞瘤和神经胶质瘤;中枢和外围神经系统的肿瘤,包含星形细胞瘤、神经母细胞瘤、神经胶质瘤和神经鞘瘤;间叶细胞源的肿瘤,包含纤维肉瘤、面部横纹肌肉瘤(rhabdomyoscaroma)和骨肉瘤;和其它肿瘤,包含黑素瘤、着色性干皮病、角化棘皮瘤、精原细胞瘤和甲状腺滤泡状癌。

[0230] 本文提供的用于治疗癌症的组合疗法涉及施用中和抗CD39试剂(例如,抗体)和诱导ATP的细胞外释放的试剂以治疗罹患癌症的个体。在一个实施例中,本发明提供组合使用的抗CD39抗体和诱导ATP细胞外释放的治疗(例如,试剂),以治疗患有实体肿瘤(例如,实体肿瘤、晚期顽固性实体肿瘤)的个体或具有血液肿瘤的个体。在一个实施例中,提供一种用于治疗患有癌症的个体的抗CD39抗体(例如,具有本文所述的其它特征),其中治疗包括向个体施用抗CD39抗体以及用于在癌细胞中诱导凋亡(例如,以便在癌细胞中诱导ATP的细胞外释放)的构件。在一个实施例中,提供一种用于治疗患有癌症的个体的抗CD39抗体(例如,具有本文所述的其它特征),其中治疗包括向个体施用抗CD39抗体以及药物组合物,所述药物组合物包括(a)用于诱导癌细胞的细胞凋亡的构件(例如,试剂或治疗)和(b)药学上可接受的载剂。在一个实施例中,提供一种用于治疗患有癌症的个体的抗CD39抗体(例如,具有本文所述的其它特征),其中治疗包括向个体施用抗CD39抗体以及药物组合物,所述药物组合物包括(a)用于在癌细胞中诱导ATP细胞外释放的构件(例如,和试剂或治疗)和(b)药学上可接受的载剂。

[0231] 在一个实施例中,本发明提供抗CD39抗体,其与铂试剂(例如,奥沙利铂、顺铂、卡

铂、奈达铂、菲铂、吡铂、赛特铂或包括铂试剂的组合方案)组合使用以治疗患有实体肿瘤的个体。在一个实施例中,实体肿瘤是肺癌、鳞状肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌、癌瘤、头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、结肠直肠癌、泌尿道上皮癌、膀胱癌、宫颈癌、胃癌、食道癌或乳癌。在一个实施例中,包括铂试剂的组合方案是FOLFOX(亚叶酸、5-Fu和奥沙利铂)。在一个实施例中,包括铂试剂的组合方案包括卡铂和紫杉烷(例如,太平洋紫杉醇)。

[0232] 在一个实施例中,本发明提供与紫杉烷试剂(例如,太平洋紫杉醇(TaxolTM)或多西他赛(TaxotereTM))组合使用以治疗患有实体肿瘤,例如卵巢癌、乳癌的个体的抗CD39抗体。

[0233] 在一个实施例中,本发明提供与吉西他滨组合使用以治疗患有实体肿瘤,例如卵巢癌的个体的抗CD39抗体。

[0234] 在一个实施例中,提供一种与蒽环霉素试剂(例如,道诺霉素、小红莓、表柔比星或艾达霉素)组合使用以治疗患有实体肿瘤,例如卵巢癌、乳癌、非小细胞肺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、软组织肉瘤或膀胱癌的个体的抗CD39抗体。在一个实施例中,本发明提供与蒽环霉素试剂(例如,道诺霉素、小红莓、表柔比星或艾达霉素)组合使用以治疗患有血液学肿瘤,例如AML、急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性骨髓性白血病(CML)、淋巴瘤、急性淋巴母细胞性、骨髓母细胞白血病、多发性骨髓瘤或非霍奇金氏淋巴瘤的个体的抗CD39抗体。

[0235] 在一个实施例中,本发明提供与PARP抑制剂试剂(例如,PARP-1抑制剂、奥拉帕尼、如卡帕瑞、尼拉帕尼、他拉柔帕瑞、维利帕瑞、CEP 9722、E7016或帕米帕瑞)组合使用以治疗患有实体肿瘤,例如上皮癌、卵巢癌、乳癌、前列腺癌、结肠直肠癌、输卵管癌、腹膜癌、肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)或黑素瘤的个体的抗CD39抗体。

[0236] 本文所述的组合治疗可以特别有效于治疗表征为较高CD39表达(在存在或不存在评定个体体内的CD39的表达或量的预先步骤下)的癌症,特别包含卵巢癌、胃癌和食道癌。

[0237] 在一个实施例中,提供与铂试剂(例如,卡铂),和任选地进一步与吉西他滨组合使用以治疗患有卵巢癌的个体的抗CD39抗体。

[0238] 在一个实施例中,提供一种与铂试剂(例如,奥沙利铂)组合使用的抗CD39抗体,任选地其中抗CD39抗体与FOLFOX方案(亚叶酸、5-Fu和奥沙利铂)组合使用,以治疗患有胃癌或食道癌的个体。

[0239] 在一个实施例中,提供一种与铂试剂(例如,卡铂),且任选地进一步以及紫杉烷(例如,太平洋紫杉醇)组合使用以治疗患有NSCLC的个体的抗CD39抗体,任选地其中NSCLC是鳞状细胞肺癌。

[0240] 在一个实施例中,提供一种与FOLFOX组合使用的抗CD39抗体。

[0241] 在一个实施例中,实体肿瘤是卵巢癌且个体用抗CD39抗体与奥沙利铂或卡铂,任选地进一步与吉西他滨组合进行治疗。任选地,在本文中的任一实施例中,卵巢癌是铂耐药性卵巢癌。患有铂耐药性卵巢癌的个体可例如表征为患有已发展、复发或对利用不包含抗CD39抗体的含铂试剂的治疗性方案的预先治疗无反应的癌症。在另一实施例中,卵巢癌可表征为铂敏感型卵巢癌。

[0242] 涉及抗CD39抗体的组合疗法可以有利地用于增强诱导ATP从肿瘤细胞中细胞外释放和/或诱导肿瘤细胞死亡的试剂或治疗的作用。这可以适用于例如患有癌症(例如,肺癌、卵巢癌、结肠直肠癌、胃癌、食道癌)的个体,所述个体对诱导ATP从肿瘤细胞中细胞外释放和/或诱导肿瘤细胞死亡的试剂或治疗具有耐药性。患有对试剂或治疗具有耐药性的癌症

的个体可例如表征为患有已发展、复发或对利用这类试剂或治疗的预先治疗(或包括这类试剂或治疗的治疗性方案,其中方案不包含抗CD39抗体)无反应的癌症。

[0243] 举例来说,患有对诱导ATP从肿瘤细胞中细胞外释放的特定类别的试剂或治疗(例如,紫杉烷、铂试剂、PARP抑制剂或包括这类的组合方案)中的一员具有耐药性的癌症(例如,乳癌、卵巢癌、结肠直肠癌、胃癌、食道癌)的个体可以用抗CD39抗体与诱导ATP从肿瘤细胞中细胞外释放的所述类别的试剂或治疗中的试剂组合进行治疗。举例来说,在一个实施例中,抗CD39抗体可与紫杉烷组合使用以治疗患有紫杉烷耐药性癌症的个体。在另一实例中,抗CD39抗体可与铂试剂组合使用,以治疗患有铂试剂耐药性癌症的个体。在另一实例中,抗CD39抗体可与PARP抑制剂组合使用,以治疗患有PARP抑制剂耐药性癌症的个体。

[0244] 在另一实施例中,患有对诱导ATP从肿瘤细胞中细胞外释放的特定类别的试剂或治疗中的一员(例如,紫杉烷、铂试剂、PARP抑制剂或包括这类的组合方案)具有耐药性的癌症的个体可以用抗CD39抗体与诱导ATP从肿瘤细胞中细胞外释放的不同类别的试剂或治疗中的试剂组合进行治疗。举例来说,在一个实施例中,抗CD39抗体可与紫杉烷组合使用,以治疗患有铂抵耐药性癌症的个体。在另一实施例中,抗CD39抗体可与铂试剂组合使用,以治疗患有紫杉烷耐药性癌症的个体。在另一实施例中,抗CD39抗体可与PARP抑制剂组合使用,以治疗紫杉烷耐药性和/或铂耐药性癌症的个体。

[0245] 在一个实施例中,提供一种用于治疗或预防个体体内的癌症的抗体,其能够结合可溶性细胞外结构域人类CD39蛋白并抑制其ATP酶活性,所述治疗包括:

[0246] a) 判定所述个体是否对利用诱导ATP从肿瘤细胞中细胞外释放的试剂的治疗的反应具有不良预后,且

[0247] b) 在确定个体对利用诱导ATP从肿瘤细胞中细胞外释放的试剂的治疗的反应具有不良预后之后,向个体施用在外源添加的ATP存在下能够结合人类CD39蛋白并抑制其ATP酶活性的抗体。任选地,个体患有铂耐药性癌症、紫杉烷耐药性癌症或PARP抑制剂耐药性癌症。任选地,确定个体对利用诱导ATP从肿瘤细胞中细胞外释放的试剂的治疗的反应具有不良预后的步骤包括评定来自个体的生物样品中的免疫效应细胞是否表征为一个或免疫抑制和/或耗竭的标记物,其中表征为一个或免疫抑制和/或耗竭标记物的免疫效应细胞的存在或和/或升高量表明对利用诱导ATP从肿瘤细胞中细胞外释放的试剂的治疗的反应具有不良预后。

[0248] 使用抗CD39抗体增强诱导ATP从肿瘤细胞中细胞外释放和/或诱导肿瘤细胞死亡的试剂或治疗的作用的优点还可用于在对诱导ATP从肿瘤细胞中细胞外释放和/或诱导肿瘤细胞死亡的试剂或治疗具有敏感性(例如,预测或确定为敏感性)的患有癌症(例如,肺癌、卵巢癌、结肠直肠癌、胃癌、食道癌)的个体中实现改良的结果。举例来说,在一个实施例中,抗CD39抗体可与紫杉烷组合使用以治疗患有紫杉烷敏感性癌症的个体。在另一实例中,抗CD39抗体可与铂试剂组合使用,以治疗患有铂试剂敏感性癌症的个体。在另一实例中,抗CD39抗体可与PARP抑制剂组合使用,以治疗患有PARP抑制剂敏感性癌症的个体。

[0249] 如本文中所使用,辅助或组合施用(共施用)包含以相同或不同剂型同时施用化合物或单独施用化合物(例如,连续施用)。因此,抗CD39和诱导ATP的细胞外释放的试剂可以单一调配物形式同时施用。替代地,抗CD39和诱导ATP细胞外释放的试剂可以被调配成用于单独施用和并行地或依序地施用。

[0250] 患有癌症的患者可以在存在或不存在评估肿瘤ATP酶活性、肿瘤ATP(例如,瘤内ATP浓度)和/或细胞上的CD39表达的预先检测步骤下用抗CD39试剂和诱导ATP细胞外释放的试剂进行治疗。任选地,治疗方法可包括检测来自个体的肿瘤的生物样品中的(例如,肿瘤或肿瘤浸润性细胞上的)CD39核酸或多肽的步骤。

[0251] 任选地,治疗方法可包括检测来自个体的生物样品中的CD39核酸或多肽的步骤。生物样品的实例包含任何合适的生物流体(例如血清、淋巴、血液)、细胞样品或组织样品。生物样品中的细胞(例如,癌细胞、淋巴细胞,例如Treg细胞、B细胞、T细胞)以高含量表达CD39,样品中较高数量的细胞是CD39阳性或展示高强度抗CD39抗体染色(与参考相比)的任何确定可以指示个体患有癌症,所述个体可强烈受益于利用抑制CD39的试剂与诱导从肿瘤细胞释放ATP的试剂组合治疗。在一个实施例中,治疗方法可包括检测来自个体的肿瘤的生物样品中的(例如,肿瘤浸润性细胞上的)CD39核酸或多肽的步骤。

[0252] 在治疗方法中,抗CD39抗体和诱导ATP细胞外释放的试剂或治疗可以单独地、一起或依序、或以混合液形式(适当时)施用。在一些实施例中,在施用抗CD39抗体之前施用诱导ATP细胞外释放的试剂或治疗。在优选实施例中,在诱导ATP细胞外释放的试剂或治疗的施用之前或与所述施用同时施用抗CD39抗体。在一个有利实施例中,与利用诱导ATP细胞外释放的试剂或治疗的治疗过程或周期同时或之前0到15天施用抗CD39抗体。举例来说,可以在诱导ATP细胞外释放的试剂或治疗的施用之前大致0到15天施用抗CD39抗体。在一些实施例中,在诱导ATP细胞外释放的试剂或治疗的施用之前至少1小时、12小时、24小时或48小时施用抗CD39抗体。在一些实施例中,在诱导ATP细胞外释放的试剂或治疗的施用之前至少1小时、12小时、24小时或48小时但在诱导ATP细胞外释放的试剂或治疗的施用之前不超过1周施用抗CD39抗体。在一些实施例中,在诱导ATP细胞外释放的试剂或治疗的施用之前0与48小时之间或1与48小时之间施用抗CD39抗体。在一些实施例中,在诱导ATP细胞外释放的试剂或治疗的施用之前约30分钟到约2周、约30分钟到约1周、约1小时到约2周、约1小时到约1周、约1小时到约2小时、约2小时到约4小时、约4小时到约6小时、约6小时到约8小时、约8小时到1天、约24或48小时到约5、6或7天、约1小时到约5、6或7天、约1小时到约15天、约24或48小时到约15天、约3到7天或约1到5天施用抗CD39抗体。在一些实施例中,与诱导ATP细胞外释放的试剂或治疗的施用同时施用抗CD39抗体。在一些有利的实施例中,在抗CD39抗体施用之后的15天或约两周内施用诱导ATP细胞外释放的试剂或治疗至少两次。在其它实施例中,在诱导ATP细胞外释放的试剂或治疗的施用之后施用抗CD39抗体。在一些实施例中,在诱导ATP细胞外释放的试剂或治疗的施用之后约30分钟到约2周、约30分钟到约1周、约1小时到约24、36或48小时、约1小时到约2小时、约2小时到约4小时、约4小时到约6小时、约6小时到约8小时、约8小时到1天或约1天到约2、3、4或5天施用抗CD39抗体。

[0253] 诱导ATP细胞外释放的试剂或治疗可以通常用于呈单药疗法形式的试剂或治疗的量和治疗方案施用以用于所治疗的特定疾病或病状。

[0254] 抗CD39抗体的合适的量的实例可以在每千克体重1毫克与每千克体重20毫克之间。在一个实施例中,将所述量每周一次、每两周一次、每月一次或每两月一次施用到个体。

[0255] 在一个实施例中,提供一种治疗患有癌症的人类个体的方法,其包括向所述个体施用至少一个施用周期,所述施用周期包括有效量的本公开的抗CD39抗体和有效量的诱导ATP细胞外释放的试剂或治疗。在一个实施例中,周期为八周或更少(例如,2周、4周、8周)时

段。在一个实施例中,对于至少一个周期中的每一个,施用抗CD39抗体的一个、两个、三个或四个剂量,任选地以每千克体重1到20毫克的剂量。在一个实施例中,通过静脉内输注施用抗CD39抗体。在一个实施例中,对于至少一个周期中的每一个,施用诱导ATP细胞外释放的试剂或治疗的一个、两个、三个或四个剂量。

[0256] 如本文中所示出,当在饱和浓度的抗CD39抗体存在下重复施用化学治疗剂时,观测到最强抗肿瘤反应,其准许在建立高效抗肿瘤免疫反应所需的典型两周时段期间发生ATP积聚和腺苷(Ado)抑制。因此,在一个有利的实施例中,根据本公开的治疗包括诱导ATP细胞外释放的试剂或治疗的至少两次连续施用。在一个实施例中,在施用抗CD39抗体后15天时段或约两周内施用诱导ATP细胞外释放的试剂或治疗至少两次。可以使得在诱导ATP细胞外释放的试剂或治疗的两个连续施用中的每一个处,循环和/或所关注组织(例如,肿瘤组织)中抗CD39抗体的浓度抑制CD39的ATP酶活性(例如,以使CD39蛋白饱和的浓度)的量和/或排程施用抗CD39抗体。举例来说,在一个有利的治疗性方案中,与诱导ATP释放的化学治疗剂的施用同时或在其之前至少1到48小时施用抗CD39抗体。在一个有利的治疗性方案中,在诱导ATP释放的化学治疗剂的施用之前至少1、2、3、4、5、6或7天施用抗CD39抗体。

[0257] 在一个实施例中,提供用于治疗人类个体体内的肿瘤的抗体,其能够结合人类CD39(NTPDase1)蛋白并抑制其ATP酶活性,所述治疗包括向个体施用有效量的抗CD39抗体和诱导ATP从肿瘤细胞中细胞外释放的试剂或治疗中的每一个,其中将诱导ATP从肿瘤细胞中细胞外释放的试剂或治疗施用至少两次(例如,以第一次和第二次连续施用形式)且其中,将抗CD39抗体以有效地在诱导ATP从肿瘤细胞中细胞外释放的试剂或治疗的所述两个施用之间获得和/或维持饱和浓度的抗CD39抗体的量和/或排程施用。举例来说,可以施用抗CD39抗体一次或两次。在一个实施例中,诱导ATP从肿瘤细胞中细胞外释放的试剂或治疗的两个施用间隔两周或更少(例如,每日一次、每周一次两周一次施用)。在一个实施例中,在两周时段期间将诱导ATP从肿瘤细胞中细胞外释放的试剂或治疗施用至少2、3或4次。在一个实施例中,可以将抗CD39抗体以产生一浓度(至少为实质上完全(例如,90%、95%)占据(饱和)CD39蛋白需要的最小浓度)的量施用。在一个实施例中,可以将抗CD39抗体以诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂或治疗的所述两个施用之间产生一浓度(至少为实质上完全(例如,90%、95%)占据(饱和)CD39蛋白抗体所需的最小浓度)的量施用。

[0258] 利用抗CD39抗体治疗人类的示范性治疗方案包含(例如)向所述患者施用有效量的抗CD39抗体和诱导ATP从肿瘤细胞中细胞外释放的试剂或治疗中的每一个,其中所述方法包括至少一种施用周期,其中施用抗CD39抗体的至少一个剂量且施用诱导ATP从肿瘤细胞细胞外释放的试剂或治疗的两个剂量,其中以两周或更少的间隔施用诱导ATP细胞外释放的试剂或治疗的所述两个剂量。在一个实施例中,施用周期在2周与8周之间。在一个实施例中,可以使得循环和/或所关注组织(例如,肿瘤组织)中抗CD39抗体的浓度抑制CD39的ATP酶活性的量和/或排程施用抗CD39抗体。任选地,将抗CD39抗体以提供一浓度的量施用,所述浓度提供实质上完全(例如,90%、95%)占据(饱和)CD39。在一个实施例中,抗CD39抗体与诱导ATP从肿瘤细胞中细胞外释放的试剂或治疗的施用同时或在所述施用之前1到48小时施用。

[0259] 在一个实施例中,提供用于治疗人类个体体内的肿瘤的抗体,其能够结合人类CD39(NTPDase1)蛋白并抑制其ATP酶活性,所述治疗包括向个体施用:(a)以有效地获得和/

或维持饱和浓度的抗CD39抗体至少一周,任选地至少两周(例如,两周、三周、四周或更多)的量和/或排程施用抗CD39抗体,和(b)诱导ATP从肿瘤细胞中细胞外释放的试剂或治疗,其中抗CD39抗体与诱导ATP从肿瘤细胞中细胞外释放的试剂或治疗的施用同时或在所述施用之前1到48小时施用。任选地,诱导ATP从肿瘤细胞中细胞外释放的试剂或治疗在抗CD39抗体的施用之后的两周时段内施用至少两次,例如诱导ATP从肿瘤细胞中细胞外释放的试剂或治疗可每周至少施用一次。

[0260] 在任何实施例中,可以将抗CD39抗体以产生一浓度(至少为实质上完全(例如,90%、95%)占据(饱和)CD39蛋白抗体需要的最小浓度)的量施用一周。在一个实施例中,可以将抗CD39抗体以产生一浓度(至少为实质上完全(例如,90%、95%)占据(饱和)CD39蛋白抗体需要的最小浓度)的量施用两周。

[0261] 抗CD39抗体组合物与诱导ATP的细胞外释放的试剂或治疗组合可任选地为与一种或多种其它治疗或治疗剂,包含通常用于施用抗体的特定治疗性目的的试剂的组合(进一步组合)治疗。将通常以通常用于呈单药疗法形式的所述试剂的量和治疗方案施用另外的治疗剂以用于所治疗的特定疾病或病状。在一个实施例中,另外的治疗剂是抑制CTLA-4或PD-1轴(即,抑制PD-1或PD-L1)的试剂(例如,抗体)。结合CTLA-4、PD1或PD-L1的抗体可例如以示范性的剂量和/或频率使用,这类试剂用作单药疗法,例如如下所述。在一个实施例中,另外的治疗剂是结合人类CD73蛋白(例如,可溶性CD73蛋白,由细胞表达的CD73蛋白)并中和其5'-外核苷酸酶活性的试剂(例如,抗体)。由NT5E基因编码的人类CD73,又称为胞外-5'-核苷酸酶和5-引物核糖核苷酸磷酸水解酶EC 3.1.3.5,展现出5'-核苷酸酶,尤其AMP-、NAD-和NMN-核苷酶活性。CD73催化在中性pH下将嘌呤5'-引物单核苷酸转化成核苷,优选的底物是AMP。酶由2个相同的70-kD亚基的二聚体组成,所述亚基由糖基磷脂酰肌醇键结合到质膜的外部表面。人类CD73前蛋白(单体)的氨基酸序列,包含氨基酸1到26处的信号序列,以寄存编号NP_002517示出于基因库,其整个公开内容通过引用并入本文中,且如下:

[0262] MCPRAARAPA TLLLALGAVL WPAAGAWELT ILHTNDVHSR LEQTSEDSSK CVNASRCMGG
[0263] VARLFTKVQQ IRRAEPNVLL LDAGDQYQGT IWFTVYKGAE VAHFMNALRY DAMALGNHEF
[0264] DNGVEGLIEP LLKEAKFPIL SANIKAKGPL ASQISGLYLP YKVLPGDEV VGIVGYTSKE
[0265] TPFLSNPGTN LVFEDEITAL QPEVDKLKTL NVNKIIALGH SGFEMDKLIA QKVRGVDVVV
[0266] GGHGSNTFLYT GNPPSKEVPA GKYPFIVTSD DGRKVPVVQA YAFGKYLGYL KIEFDERGNV
[0267] ISSHGNPILL NSSIPEDPSI KADINKWRRIK LDNYSTQELG KTIVYLDGSS QSCRFRRECNM
[0268] GNLIICDAMIN NNLRHTDEMFWNHVSMCILN GGGIRSPIDE RNNGTITWEN LAAVLPFGGT
[0269] FDLVQLKGST LKKAFEHSVH RYGQSTGEFL QVGGIHVVYD LSRKPGDRVV KLDVLCTKCR
[0270] VPSYDPLKMD EVYKVILPNF LANGGDGFQM IKDELLRHDS GDQDINVVST YISKMKVIYP
[0271] AVEGRIKFST GSHCHGSFSL IFLSLWAVIF VLYQ
[0272] (SEQ ID NO:48)。

[0273] 在本文上下文中,当提及CD73多肽时,“抑制(inhibit/inhibiting)”、“中和(neutralize/neutralizing)”(例如,“中和CD73”、“中和CD73的活性”或“中和CD73的酶活性”等等)是指其中CD73的5'-核苷酸酶(5'-外核苷酸酶)活性受到抑制的过程。这尤其包括抑制CD73介导的腺苷生成,即抑制CD73介导的AMP分解代谢成腺苷。这可以在无细胞测定中进行测量,所述无细胞测定测量测试化合物直接或间接地将AMP转化成腺苷的能力。在一个

实施例中,抗体制剂导致AMP转化成腺苷降低至少50%、AMP转化成腺苷降低至少70%、或ATP转化成腺苷降低至少80%,例如,参考本文所述的测定。

[0274] 实例

[0275] 方法

[0276] CD39突变体的生成

[0277] 通过PCR生成CD39突变体。扩增的序列在琼脂糖凝胶上电泳,并且使用Macherey Nagel PCR Clean-Up Gel Extraction试剂盒(参考740609)纯化。然后用ClonTech InFusion系统将每种突变体生成的纯化PCR产物连接到表达载体中。将含有突变序列的载体制备成Miniprep并且测序。测序之后,使用Promega PureYieldTM Plasmid Midiprep系统,将含有突变序列的载体制备成Midiprep。HEK293T细胞在DMEM培养基(Invitrogen)中生长,使用Invitrogen的Lipofectamine 2000用载体转染,并且在测试转基因表达之前,在37°C下在CO₂培养箱中温育48小时。在Hek-293T细胞中转染突变体,如下表所示。使用SEQ ID NO:1的编号示出下表1中的靶向氨基酸突变。

[0278] 表1

	突变体		取代			
[0279]	1	V77G	H79Q	Q444K	G445D	
	2A	V81S	E82A	R111A	V115A	
	2B	E110A	R113T	E114A		
	3	R118A	S119A	Q120K	Q122H E123A	
	4	D150A	E153S	R154A	S157K N158A L278F	
	5	Q96A	N99A	E143A	R147E	
	6	K188R		通过 KTPGGS 替换残基 190 到 207		
	7	A273S	N275A	I277S	R279A	
	8	S294A	K298G	K303A	E306A T308K Q312A	
	9	K288E	K289A	V290A	E315R	
	10A	Q354A	D356S	E435A	H436Q	
	10B	H428A	T430A	A431D	D432A	
	11	N371K	L372K	E375A	K376G 插入 377V V377S	
	12	K388N	Q392K	P393S	E396A	
	13	A402P	G403A	K405A	E406A	
	15	K87A	E100A	D107A		
	16	Q323A	Q324A	Q327A	E331K	
	17	N334A	S336A	Y337G	N346A	
	18	Q228A	I230S	D234A	Q238A	
	19	R138A	M139A	E142K		

[0280] 可溶性huCD39的克隆、生产和纯化

[0281] 分子生物学

[0282] 使用以下引物TACGACTCACAGCTTGGCGCCACCATGGAAGATAAAAGGAGTC (SEQ ID NO:35) (正向) 和CCGCCCGACTCTAGATCACTGTCTATCGTCATTTGTATCGA CATAGGTGGAGTGGGAGAG (SEQ ID NO:36) (反向),从人类PBMC cDNA克隆huCD39蛋白。然后使用InFusion克隆系统,将纯化PCR产物克隆到表达载体中。在蛋白质的C末端部分加入M2标签(SEQ ID NO:39中带下划线的FLAG标签)用于纯化步骤;应当理解,在任何实施例中,(例如,SEQ ID NO:39的)CD39细胞外结构域蛋白可以任选地被指定为缺少M2标签。

[0283] huCD39蛋白的表达和纯化

[0284] 在验证克隆的序列之后,对CHO细胞进行核转染,并且随后亚克隆产生库以获得产

生huCD39蛋白的细胞克隆。收获来自在滚筒中生长的huCD39克隆的上清液，并且使用M2色谱柱纯化，并且使用M2肽洗脱。然后将纯化蛋白质装载到S200尺寸排阻色谱柱上。在TBS PH7.5缓冲液中调配对应于单体的纯化蛋白质。没有M2标签的CD39-M2细胞外结构域重组蛋白的氨基酸序列如下：

[0285] MEDTKESNVKTFC SKN ILA IL GFSS II AVI ALL A VGL TQN KAL PENV KYG I VLDAG SSHTSL YI YK WPA EKENDTGVVHQVEECRVKGPGISKFVQKVNEIGIYLTDCMERAREVIPRSQHQETPVYLGA TAGMRLRMESEELAD RVLDVVERSLSNYPFDQGARIITGQEEGAYGWITINYLLGKFSQKTRWFSIVPYETNNQETFGALDLGGASTQVTF VPQNQTIESPDNALQFR LY GKD DYN VY THSFL CYGKD QALWQKLAKDIQVASNEILRDPCFH PGYKKVVNVSDLYKTP CTKR FEMTLPFQQFEIQGIGNYQQCHQSILELFNTSYCPYSQCAFNGIFLPPPLQGDFGAFSAFYFVMKFLNLTSEKV SQEKVTEMMKKFCAQPWEEIKTSYAGVKEKYLSEYCFSGTYILSLLLQGYHFTADSWEHIHFIGKIQGSDAGWTLYMLNLTNMIPAEQPLSTPLSHSTYV

[0286] (SEQ ID NO:2)。

[0287] 具有M2标签的CD39-M2细胞外结构域重组蛋白的最终氨基酸序列如下：

[0288] MEDTKESNVKTFC SKN ILA IL GFSS II AVI ALL A VGL TQN KAL PENV KYG I VLDAG SSHTSL YI YK WPA EKENDTGVVHQVEECRVKGPGISKFVQKVNEIGIYLTDCMERAREVIPRSQHQETPVYLGA TAGMRLRMESEELAD RVLDVVERSLSNYPFDQGARIITGQEEGAYGWITINYLLGKFSQKTRWFSIVPYETNNQETFGALDLGGASTQVTF VPQNQTIESPDNALQFR LY GKD DYN VY THSFL CYGKD QALWQKLAKDIQVASNEILRDPCFH PGYKKVVNVSDLYKTP CTKR FEMTLPFQQFEIQGIGNYQQCHQSILELFNTSYCPYSQCAFNGIFLPPPLQGDFGAFSAFYFVMKFLNLTSEKV SQEKVTEMMKKFCAQPWEEIKTSYAGVKEKYLSEYCFSGTYILSLLLQGYHFTADSWEHIHFIGKIQGSDAGWTLYMLNLTNMIPAEQPLSTPLSHSTYVDYKDDDDK

[0289] (SEQ ID NO:39)。

[0290] 抑制可溶性CD39的酶活性

[0291] 使用Cell Titer GloTM (Promega, 参考G7571) (其允许通过使用生成与存在的ATP量成比例的发光信号的试剂评估ATP水解) 评估抗体对产生的可溶性CD39蛋白的酶活性的抑制。以这种方式, 可以评估可溶性CD39-介导的ATP水解的抑制。简单来说, 在37℃下, 将100μg/ml到6×10⁻³μg/ml剂量范围的抗CD39抗体与400ng/ml具有方法部分(SEQ ID NO:39)中所描述的氨基酸序列的可溶性重组人类CD39蛋白一起温育1小时。在加入CTG (Cell Titer Glo) 试剂之前, 在37℃下将20μM ATP加入培养板中持续另外30分钟。在黑暗中短暂温育5分钟之后, 使用EnspireTM发光计对发射光进行定量。通过将抗体存在下的发射光与单独的ATP(最大光发射)以及与可溶性CD39蛋白一起的ATP(最小光发射)进行比较, 确定抗CD39抗体功效。

[0292] 抑制细胞CD39的酶活性

[0293] 使用Cell Titer GloTM (Promega, 参考G7571) (其允许通过使用生成与存在的ATP量成比例的发光信号的试剂评估ATP水解) 评估抗体对CD39表达性细胞中CD39酶活性的抑制。因此设计测定, 以允许评估对细胞培养上清液中CD39水解的ATP的抑制。简单点说, 在37℃下, 将5×10⁴个Ramos人类淋巴瘤细胞、5×10³个人类CD39、食蟹猴CD39和小鼠CD39表达性CHO细胞与30μg/ml到5×10⁻⁴μg/ml的抗CD39抗体一起温育1小时。然后在37℃下, 将细胞与20μM ATP再温育1小时。将培养板在400g下离心2分钟, 并且将50μl细胞上清液转移在发光微板(白色孔)中。将50μl CellTiter-Glo®试剂(CTG)加入到上清液中, 并且在黑暗中温育

5分钟之后,使用EnspireTM发光计对发射光进行定量。通过将抗体存在下的发射光与单独的ATP(最大光发射)以及与细胞一起的ATP(最小光发射)进行比较,确定抗CD39抗体功效。

[0294] 抗体的生成:小鼠中的免疫和筛选

[0295] 为了获得抗人类CD39抗体,用上述重组人类CD39-M2细胞外结构域重组蛋白免疫Balb/c小鼠。小鼠以腹腔注射方式接受一次50 μ g CD39蛋白和完全弗氏佐剂乳液的初次免疫,以腹腔注射方式接受50 μ g CD39蛋白和不完全弗氏佐剂乳液进行第2次免疫,,并且最后以静脉注射方式接受10 μ g CD39蛋白加强免疫。免疫脾细胞在用X63.Ag8.653永生化B细胞增强之后3天融合,并且在照射脾细胞的存在下培养。将杂交瘤接种含有半固体甲基纤维素的培养基中,并且使用clonepix 2设备(分子仪器公司(Molecular Devices))挑取生长的克隆。

[0296] 实例1:已知的中和CD39 mAb的表位作图

[0297] 为了深入了解抗体如何能抑制细胞CD39的酶(ATP酶)活性,我们研究了抗体结合的表位,据报道,所述抗体在细胞测定中抑制CD39的ATP酶活性:在PCT公开第W02009/095478号中公开的BY40。

[0298] 为了定义抗CD39抗体的表位,我们设计了CD39突变体,其由CD39表面上方的分子表面暴露的氨基酸取代定义。使用SEQ ID NO:1的编号,突变体在Hek-293T细胞中转染,如表1中所示。

[0299] 通过流式细胞术在20个生成的突变体上测试I-394的剂量范围(10-2.5-0.625-0.1563-0.0391-0.0098-0.0024-0.0006 μ g/ml)。BY40抗体均完全丧失与表达CD39的突变体5的细胞的结合,而不丧失与任何其它突变体的结合。突变体5在残基Q96、N99、E143和R147处含有氨基酸取代。图3A中示出了突变体5在CD39表面上的位置。

[0300] 实例2:已知的中和CD39 mAb不能抑制重组可溶性CD39蛋白的ATP酶活性

[0301] 据报道在细胞测定中抑制CD39的ATP酶活性的两种抗体(BY40和BY12)被评估,以确定是否能够抑制重组可溶性CD39蛋白的ATP酶活性。使用CellTiter GloTM(Promega,参考G7571),评估抗体对如上所述产生的可溶性CD39蛋白的酶活性的抑制。如上所述评估了抗体对细胞CD39蛋白的酶活性的抑制。

[0302] 正如所料,BY40抑制细胞中CD39蛋白的ATP酶活性。然而,BY40不能抑制可溶性CD39蛋白的酶活性。图2B示出了BY40与本文标识的新抗体的对比。

[0303] 实例3:筛选新的mAb以阻断sCD39活性

[0304] 进行了一系列免疫,以便寻找中和sCD39的ATP酶活性的抗体。为了获得抗人类CD39抗体,用上述重组人类CD39-M2细胞外结构域重组蛋白使动物免疫。使用不同方案并在不同动物中,总共进行15个免疫系列。包含不同的小鼠品系、大鼠和兔子。

[0305] 在初始免疫方案中,初步筛选涉及使用野生型CHO和CHO表达性huCD39细胞系,通过流式细胞术测试生长克隆的上清液(SN)。分别用0.1 μ M和0.005 μ M CFSE对细胞进行染色。对于流式细胞术筛选,所有细胞均匀混合,并且用APC标记的山羊抗小鼠多克隆抗体(pAb)揭示上清液中反应抗体的存在。对于结合huCD39的抗体,随后使用上文研发且描述的筛选测定(方法)筛选抑制可溶性CD39的酶活性的上清液。

[0306] 结果示出虽然可以获得许多特异性CD39结合抗体,但是来自任何这些免疫的抗体均未示出对可溶性CD39的酶活性的任何抑制。一种可能性是CD39上的显性表位不包含合适

地定位在所述CD39的催化位点处或附近的任何表位。鉴于可用于抑制细胞CD39的少数抗体以及使用抗体抑制酶的催化位点的已知困难,缺乏中和sCD39的抗体可能表明不可能获得抑制可溶性(细胞外结构域)CD39的抗体。其它可能性涉及非功能性筛选测定和/或不正确折叠或功能性可溶性CD39蛋白,特别是因为缺乏可以抑制可溶性CD39的任何抗体阻碍了sCD39阻断测定的验证。

[0307] 鉴于不存在能够抑制可溶性CD39的抗体,用筛选方案进行另一免疫,所述筛选方案设计成有利于生成结合如抗体BY40的表位所标识的CD39的活性位点的抗体。简单点说,初始筛选涉及使用野生型CHO和CHO表达性huCD39细胞系通过流式细胞术测试生长克隆的上清液(SN),如前述免疫,随后筛选与野生型CD39相比,丧失对表达CD39突变体5的Hek-293T细胞的结合,如表1中所示。突变体5在残基Q96、N99、E143和R147处具有取代。然而,结果再次示出虽然可以获得许多特异性CD39结合抗体,其示出与突变体5的结合丧失,但来自任何初始免疫的抗体均未示出对可溶性CD39的酶活性的任何抑制。

[0308] 实例4:标识作为表位定向筛选的一部分抑制sCD39活性的第一抗体

[0309] 我们试图标识不结合Q96、N99、E143和R147区(由突变体5定义)的抗CD39抗体,以便具有不与BY40样抗体竞争的抗体。不需要具有阻断CD39的ATP酶活性的任何能力的这类抗体可以用于抑制结合BY40结合位点的细胞CD39的抗体的药理学研究,例如,在抑制细胞CD39的BY40或BY40样抗体的存在下,检测细胞上的游离CD39蛋白并对其进行定量。

[0310] 从实例3的免疫结果开始,其中筛选丧失了与CD39突变体5结合的杂交瘤,选择示出未丧失与CD39突变体5的结合的杂交瘤。这种杂交瘤(I-394)属于更广泛的库,这是由于表明与突变体5的结合可能部分降低,但并未丧失与突变体5的结合并且因此最初没有保留的不确定数据。

[0311] 在抑制可溶性CD39的酶活性的进一步免疫上清液的持续筛选的上下文中,已经克隆且产生的抗体I-394包含作为对照。令人惊讶的是,尽管抗体I-394未在表位定向筛选中所保留的克隆当中,但这一抗体在上述测定(方法)中示出对可溶性CD39的酶活性的较强抑制。

[0312] 产生具有IgG1同种型的人类恒定区,以及具有突变L234A/L235E/G237A/A330S/P331S(Kabat EU编号)的经修饰Fc结构域的I-394,这导致缺乏与人类Fc γ 受体CD16A、CD16B、CD32A、CD32B和CD64的结合,简单点说,将I-394抗体的VH和Vk序列(分别在SEQ ID NO:3和4中示出的VH和Vk可变区)克隆到含有huIgG1恒定结构域的表达载体中,所述恒定结构域分别具有上述突变和huFc恒定结构域。将两种所获载体共转染到CHO细胞系中。建立的细胞库用于在CHO培养基中产生抗体。随后使用蛋白A纯化抗体。以下示出I-394的相应重链和轻链可变结构域的氨基酸序列(加下划线的Kabat CDR)。

[0313] I-394重链可变结构域序列:

[0314] EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYNMHWVKQSHGRTEWIGYIVPLNGGSTFNQKFKGRA
TLTVNTSSRTAYMELRSLTSEDSAAYYCARGC~~T~~RFAYWGQGTLTVSA (SEQ ID NO:3)。

[0315] I-394轻链可变结构域序列:

[0316] DIVLTQSPASLA~~V~~SLGQRATISCRASESVDNFGVSFMYWFQQKPGQPPNLLIYGASNQGSGVPARFRG
SGSGTDFSLNIHPMEADDTAMYFCQQTKEV~~P~~YTFGGGT~~K~~LEIK (SEQ ID NO:4)。

[0317] 以下示出具有人类IgG1恒定区的I-394及L234A/L235E/G237A/A330S/P331S取代

(保持N297连接糖基化)的重链和轻链序列:

[0318] I-394重链序列:

[0319] EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYNMHWVKQSHGRTLEWIGYIVPLNGGSTFNQKFGRAT
LTVNTSSRTAYMELRSLTSEDSAAYYCARGGTRFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH
TCPPCPAPEAEGAPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0320] (SEQ ID NO:37)。

[0321] I-394轻链序列:

[0322] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNFGVFSMYWFQQKPGQPPNLLIYGASNQGSGVPARFRGS
GSGTDFSLNIHPMEADDTAMYFCQQTKEVPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0323] (SEQ ID NO:38)。

[0324] 随后测试抗体I-394与CD39突变体结合的丧失,所述CD39突变体通过CD39表面上方的分子表面处暴露的氨基酸取代定义。使用SEQ ID NO:1的编号,突变体在Hek-293T细胞中转染,如表1中所示。通过流式细胞术,在20种突变体上测试抗体I-394的剂量范围。如图3B所示,I-394示出完全丧失与表达CD39的突变体19的细胞的结合。突变体19包含残基R138、M139和E142处的取代。因此,I-394的核心表位包含一个或多个(或所有)残基R138、M139和E142。

[0325] 与先前丧失与突变体5的结合并具有抑制细胞CD39但不抑制溶解性CD39的能力的抗体BY40不同,抗体I-394丧失与邻近突变体19的结合,与突变体5的结合强烈减少(但与突变体5具有一定残余结合)。有趣的是,突变体19的残基与残基5的残基非常接近或邻近,使得I-394可以代表与BY40相比的表位移位。因此,抗体I-394为抗CD39抗体呈现了有价值的新表位,其允许抑制可溶性CD39蛋白的ATP酶活性。还提供特异性阳性对照,其允许验证和测试筛选测定,以检测中和可溶性CD39蛋白的ATP酶活性的其它抗体。

[0326] 实例5:用于sCD39中和mAb的非表位定向筛选

[0327] 基于表明抗体介导的可溶性CD39的抑制是可能的实例4的结果,重新讨论使用实例3的不同方案的不同免疫的融合,以寻找中和sCD39的ATP酶活性的抗体。

[0328] 随后评估用于筛选ATP酶抑制的不同方法。在一个实验中,使用I-394抗体刺激来自实例3的免疫的杂交瘤的上清液,发现其抑制可溶性CD39的ATP酶活性的能力是阴性的。向上清液中添加此I-394不能恢复阴性上清液抑制CD39的ATP酶活性的能力。随后使用蛋白A包被的珠粒从阴性上清液中纯化抗体I-394,并且我们观察到纯化的I-394再次能够抑制ATP酶活性的恢复。

[0329] 鉴于上述结果,开发新的免疫和筛选方案,其中使用野生型CHO和CHO表达性huCD39细胞系,通过流式细胞术筛选来自新的和过去免疫的生长克隆,而不评估可溶性CD39或细胞CD39 ATP酶活性的抑制,并且没有表位的筛选偏差。虽然一些杂交瘤可获得与突变体5或19丧失结合的数据,但这类数据不用于克隆选择,而仅保留用于在ATP酶阻断测定中出现阴性结果的情况下拯救杂交瘤用于克隆目的。选择并克隆结合CD39的杂交瘤,并

且随后根据以下方案使用蛋白A进行纯化：

- [0330] - 向300μl杂交瘤上清液中加入10μl蛋白A珠粒
- [0331] - 加入NaCl到最终浓度为1,5M
- [0332] - 在4℃下将试管旋转3-4h
- [0333] - 以1500rpm离心1min
- [0334] - 消除上清液，并且用1ml TBS进行三次洗涤
- [0335] - 在第三次洗涤之后，消除所有TBS
- [0336] - 加入50μl柠檬酸盐0.1M pH3, 匀质化并且在室温下温育5min
- [0337] - 以1500rpm离心珠粒1min
- [0338] - 收获50μl洗脱液，并且快速加入450μl TBS，并且存储在4℃下。

[0339] 随后在对比测定中筛选所获得抗体抑制CD39的ATP酶活性达到与I-394类似程度的能力。用于抑制可溶性和细胞CD39的酶活性的测定如上文所述(方法)。令人惊讶的是，在通过这种方式产生的示范性抗体中，几种示出了对可溶性CD39的抑制(以及对细胞CD39的抑制)。图1示出了代表性的筛选结果，其示出了与阳性对照I-394抗体相比的抗体I-397、I-398和I-399。类似地，来自不同免疫的抗体I-395和I-396抑制可溶性CD39蛋白的酶活性。图2A和2B示出了抗体I-395和I-396的结果，其中更大量的抗体可用于可溶性和细胞CD39中和两个的额外实验。图2A示出了与BY40和I-394抗体相比，抗体I-395和I-396两个都抑制细胞膜结合的CD39，与BY40相比，I-394和I-395两个都示出了更高的效力和对细胞CD39的最大抑制。图2B示出了与BY40和I-394抗体相比，抗体I-395和I-396两个均抑制可溶性CD39。虽然BY40在任何浓度下都不抑制可溶性CD39，但I-394、I-395和I-396都抑制可溶性CD39，其中I-394示出最大效力，接着是I-395，并且随后是具有较低效力的I-396。

[0340] 所获得结果提高了杂交瘤上清液中的一个或多个因子在细胞培养物和可溶性CD39测定中快速水解ATP的可能性，使得在使用常规方法筛选抗体时未检测到ATP的信号。可溶性因子可以是CD39或一些其它酶，例如由融合配偶体产生的。

[0341] 随后克隆抗体，进行修饰以具有带突变L234A/L235E/G237A/A330S/P331S (Kabat EU编号) 的IgG1 Fc结构域的人类恒定区，其导致缺乏与人类Fc γ受体CD16A、CD16B、CD32A、CD32B和CD64的结合，以与本文对I-394所示的方式相同。随后可以对所得抗体进行滴定，并且随后进行更详细的活性评估，如实例7-9所示(滴定、抑制ATP酶活性)，以评估EC₅₀和IC₅₀测定，以根据效力对抗体进行分级。

[0342] 实例6：sCD39中和mAb的表位作图

[0343] 如实例4中所示，I-394示出完全丧失与表达CD39的突变体19的细胞的结合，但不会丧失与突变体5的结合。为了定义实例5的其它抗CD39抗体的表位，如实例1和表1中所述，测试它们与CD39突变体组的结合丧失。如表1中所示，使用SEQ ID NO:1的编号，使突变体在Hek-293T细胞中转染。通过流式细胞术在20个生成的突变体上测试测试抗体的剂量范围(10-2.5-0.625-0.1563-0.0391-0.0098-0.0024-0.0006μg/ml)。

[0344] 结果示出了实例5中选择的抗体抑制可溶性CD39的能力代表几种不同的表位。在实例5中示出对可溶性细胞外CD39进行抑制的抗体中，抗体I-395是以下抗体的实例，所述抗体显示与在残基Q96、N99、E143和R147处具有取代的突变体5丧失结合，以及与在残基R138、M139和E142处具有取代的突变体19丧失结合。突变体19包含残基R138、M139和E142处

的取代。因此, I-395的CD39上的核心表位包括残基Q96、N99、E143和R147中的一个、两个、三个或四个残基以及残基R138、M139和E142中的一个、两个或三个残基。

[0345] 另一方面, 抗体I-398是以下抗体的实例, 所述抗体显示与在残基R138、M139和E142处具有取代的突变体19丧失结合, 但并未降低或丧失与在残基Q96、N99、E143和R147处具有取代的突变体5的结合。

[0346] 实例5中示出对可溶性细胞外CD39进行抑制的其它抗体具有非常不同的表位, 并且没有示出与突变体5或19中的任一种丧失结合, 从而表明可溶性CD39也可以通过结合sCD39上的其它位点而被抑制。对于一些抗体, 与表1的20种突变体之一种丧失结合允许CD39上的结合位点的定位, 而对于其它抗体, 结合位点仍然待确定, 因为它们不会丧失与20种突变体中的任何突变体的结合。在实例5中示出抑制可溶性CD39的ATP酶活性的抗体中, 抗体I-396示出与具有取代K87A、E100A和D107A的突变体15丧失结合, 而不丧失与其它20种突变体中的任何突变体的结合。因此, 这一抗体的CD39上的核心表位包括一个或多个(或所有)残基K87、E100和D107。抗体I-399示出了与具有取代N371K、L372K、E375A、K376G、V377A以及K376与V377之间插入的缬氨酸(在表1中称为“插入377V”)的突变体11丧失结合, 而不丧失与其它20个突变体中的任何突变体的结合。因此, 这一抗体的CD39上的核心表位包括一个或多个(或所有)残基N371、L372、E375、K376和V377。图3A示出了突变体5(M5)、15(M15)和19(M19)中突变的残基在CD39蛋白表面上的位置。图3B示出了针对不同抗体, 结合于突变体5、15和19的结果。

[0347] 因此, 结果示出了可以针对不同表位获得抑制可溶性CD39的抗体。表位包含由突变体19的一个或多个残基定义的表位, 其位于BY40或BY40样抗体的结合位点附近, 其仅抑制细胞CD39但不抑制可溶性CD39(其丧失与突变体5的结合); 由突变体19的一个或多个残基, 但也部分地由突变体5定义的表位, 表明与BY40或BY40样抗体相比, 可能有较小的移位; 由突变体19的一个或多个残基, 而不由突变体5的残基定义的表位; 以及其它表位, 如由突变体11的一个或多个残基或突变体15的一个或多个残基, 或者进一步由与任何突变体5、15或19(表位的定位有待确定)的结合没有任何降低的其它抗体定义的那些表位。

[0348] 实例7: 通过流式细胞术在CD39表达性细胞上进行抗体滴定

[0349] 在两个重复实验中, 测试抗体I-394与表达人类CD39的CHO细胞、表达食蟹猴(cynomolgus)(食蟹猴(macaca fascicularis))CD39的CHO细胞、表达鼠类CD39的CHO细胞和人类Ramos淋巴瘤细胞(ATCCTM, 参考CRL-1596)的结合。使细胞与30μg/ml到5×10⁻⁴μg/ml各种浓度的未经过标记的抗CD39抗体一起在4℃下温育30分钟。洗涤之后, 将细胞与经过山羊抗小鼠H+L标记的第二抗体在4℃下温育30min。

[0350] 结果示出在图4中。抗体I-394结合表达人类CD39的细胞(CHO-huCD39)、表达食蟹猴CD39的细胞(CHO-cyCD39)和Ramos淋巴瘤细胞, 但不结合表达鼠类CD39的细胞(CHO-moCD39)。I-394在相应的第一和第二组实验中以EC₅₀值0.16μg/ml和0.19μg/ml结合Ramos细胞。几种其它抗CD39抗体示出结合Ramos细胞的可比较的EC₅₀值。

[0351] 实例8: 抑制细胞ATP酶活性的IC50测定

[0352] 如上所述(方法), 使用用于抑制细胞CD39的酶活性的测定评估抗体I-394对CD39表达性细胞中CD39的ATP酶活性的抑制。

[0353] 结果示出在图5中。I-394在阻断肿瘤(Ramos)细胞中的CD39酶活性方面非常有效,

与所有其它测试的抗体相比具有更高的效力。I-394还阻断表达人类CD39的细胞(CHO-huCD39)和表达食蟹猴CD39的细胞(CHO-cycCD39)中的CD39酶活性。表达鼠类CD39的细胞(CHO-moCD39)示出为阴性对照。计算的IC₅₀(对由50,000个Ramos细胞表达的CD39的酶活性的50%的抑制)是0.05μg/ml。实现的最大抑制率为81.6%。同种型对照无效。

[0354] 实例9:抑制重组可溶性CD39蛋白的ATP酶活性的IC50测定

[0355] 如上所述(方法),使用用于抑制可溶性CD39的酶活性的测定评估抗体I-394对可溶性CD39蛋白的ATP酶活性的抑制。结果示出在图6中。I-394抑制可溶性CD39蛋白的酶活性。相比之下,抗体BY40不抑制可溶性CD39蛋白的酶活性。计算的IC₅₀是0.003μg/ml。实现的最大抑制率为74.9%。

[0356] 实例10:CD39-L1、L2、L3、L4同种型上的ELISA滴定

[0357] 测试抗体I-394与具有以下所示的氨基酸序列的重组人类CD39同种型(REC-huCD39同种型)的结合,在4°C下将其以500ng/ml或1μg/ml涂布在96孔板中的PBS 1X中过夜。将孔在TBS Tween 20中洗涤,并且在室温下在TBS阻断缓冲液中进一步饱和2H。将剂量范围浓度的一级抗体在TBS阻断缓冲液中在室温下温育2h。将孔在TBS Tween 20中洗涤。将次级抗体(TBS阻断缓冲液中的GAM-HRP或GAH-HRP)在室温下温育1H,并且用TMB显示。在EnspireTM上在OD=450下测量光密度。

[0358] 克隆的huCD39(血管同种型)的氨基酸序列:

[0359] 人类CD39-L1,也称为NTPDase2或ENTPD2:

1	MAGKVRSLLP	PLLLAAAGLA	GLL LLCV PTR	D VREPP PALKY	
	GIVLDAGSSH	TSMFIYKWPA			
61	DKENDTGIVG	QHSSCDVPGG	GISSYADNPS	GASQSLVGCL	
	EQALQDV PKE	RHAGTPLYLG			
121	ATAGMRL NL	TNPEASTS VL	MAVTHTLTQY	PFD FRGARIL	
	SGQEEGVFGW	VTANYLLENF			
181	IKYGVVGRWF	RPRKGTLGAM	DLGGASTQIT	FETTSPAEDR	
	ASEVQLHLYG	QHYRVYTHSF			
[0360]	241	LCYGRDQVLQ	RLLASALQTH	GFHPCWPRGF	STQVLLGDVY
	QSPCTMAQRP	QNFN NSSARVS			
301	LSGSSDPHLC	RDLV SGLFSF	SSCPFSRC SF	NGVFQPPVAG	
	NFVA FSAFFY	TVDF LRTSMG			
361	LPVATLQQLE	AAA VNV CNQT	WAQQ LLSRGY	GFDERA FG GV	
	IFQKKAADTA	VGW ALGYMLN			
421	L TNLIPADPP	GLRK GTDFSS	W VV VLLL FAS	ALL AALV LLL	
	RQVHS AKLPS	TI			

[0361] (SEQ ID NO:40)。

[0362] 人类CD39-L2,也称为NTPDase6或ENTPD6:

1 MKKGIRYETS RKTSYIFQQP QHGPWQTRMR KISNHGSLRV
AKVAYPLGLC VGVFIYVAYI

61 KWHRATATQA FFSITRAAPG ARWGQQAHSP LGTAADGHEV

[0363] FYGIMFDAGS TGTRVHFQF

121 TRPPRETPTL THETFKALKP GLSAYADDVE KSAQGIRELL
DVAKQDIPFD FWKATPLVLK

181 ATAGLRLLPG EKAQKLLQKV KEVFKASPFL VGDDCVSIMN
GTDEGVSAWI TINFLTGSRK

241 TPGGSSVGML DLGGGSTQIA FLPRVEGTLQ ASPPGYLTAL
RMFNRTYKLY SYSYLGLGLM

301 SARLAILGGV EGQPAKDGKE LVSPCLSPSF KGEWEHAEVT
YRVSGQKAAA SLHELCAARV

[0364] 361 SEVLQNRVHR TEEVKHVDFY AFSYYYDLAA GVGLIDAEKG
GSLVVGDFEI AAKYVCRTLE

421 TQPQSSPFSC MDLTYVSLLL QEFGFPRSKV LKLTRKIDNV
ETSWALGAIF HYIDSLNRQK

481 SPAS

[0365] (SEQ ID NO:41)。

[0366] 人类CD39-L3,也称为NTPDase3或ENTPD3:

1 MFTVLTRQPC EQAGLKALYR TPTIIALVVL LVSIVVLVSI
TVIQIHKQEVLPPGLKYGIV

61 LDAGSSRTTV YVYQWPAEKE NNTGVVSQTF KCSVKGSGIS
SYGNPQDVP RAFEECMQKV

121 KGQVPSHLHG STPIHLGATA GMRLLRLQNE TAANEVLESI
QSYFKSQPFDFRGAQIISGQ

181 EEGVYGVITA NYLMGNFLEK NLWHMWVHPL GVETTGALDL
GGASTQISFVAGEKMDLNTS

[0367] 241 DIMQVSLYGY VYTLYTHSFQ CYGRNEAEKK FLAMLLQNSP
TKNHLTNPACY PRDYSISFTM

301 GHVFDSLCTV DQRPESYNPN DVITFEGTGD PSLCKEKVAS
IFDFKACHDQETCSFDGVYQ

361 PKIKGPVAF AGFYYTASAL NLSGSFSLDT FNSSTWNFCS
QNWSQLPLLLPKFDEVYARS

421 YCFSANYIYH LFVNGYKFTE ETWPQIHFEK EVGNSSIAWS
LGYMLSLTNQIPAESPLIRL

[0368] 481 PIEPPVFVGT LAFFTAALL CLAFLAYLCS ATRRKRHSEH
AFDHAVDSD

[0369] (SEQ ID NO:42)。

[0370] 人类CD39-L4,也称为NTPDase5或ENTPD5:

1 MATSWGTVFF MLVVSCVCSA VSHRNQQTWF EGIFLSSMCP
 INVSASTLYG IMF DAGSTGT
 61 RIHVYTFVQK MPGQLPILEG EVFDSVKPGL SAFVDQPKQG
 AETVQGLLEV AKDSIPRSHW
 121 KKTPVVLKAT AGLRLLPEHK AKALLFEVKE IFRKSPFLVP
 KGSVSIMDGS DEGILAWVT
 181 NFLTGQLHGH RQETVGTL DL GGASTQITFL PQFEKTLEQT
 [0371] PRGYLTSFEM FNSTYKLYTH
 241 SYLGFGLKAA RLATLGALET EGTDGHTFRS ACLPRWLEAE
 WIFGGVKYQY GGNQEGERVGF
 301 EPCYAEVLRV VRGKLHQPEE VQRGSFYAFS YYYDRAVDTD
 MIDYEKGGL KVEDFERKAR
 361 EVCDNLENFT SGSPFLCMDL SYITALLKDG FGFADSTVLQ
 LTKKVNNIET GWALGATFHL
 421 LQSLGISH

[0372] (SEQ ID NO:43)。

[0373] I-394结合CD39,但不结合任何同种型CD39-L1、-L2、-L3或-L4。同种型对照抗体(IC)不结合任何CD39或CD39-L分子。结果示出在图7中。

[0374] 实例11:树突细胞的活化

[0375] 虽然ATP具有促炎活性,但相信CD39介导的ATP分解代谢能够损害树突细胞(DC)活化,从而改变对肿瘤抗原更广泛的适应性免疫反应。为了评估使用抗CD39抗体的CD39阻断是否能够在ATP的存在下克服CD39介导的树突细胞(DC)活化的改变,我们在ATP的存在下,将单核细胞衍生的DC(moDC)与抗CD39抗体一起温育。

[0376] 简单点说,从人类健康血液中纯化人类单核细胞,并且在GM-CSF和IL-4的存在下在6天内分化成MoDC。随后在24小时内ATP(Sigma,0.25-1mM)的存在下活化MoDC,并且通过流式细胞术分析CD80、CD83和HLA-DR表达来评估DC活化。在一些情况下,MoDC在CD39抑制剂:ARL6716(Tocris,250μM)、CD73抑制剂:APCP(Tocris 50μM)、抗CD39阻断抗体I-394或BY40(对于BY40,参见W02009/095478)、或抗CD73阻断抗体的存在下,预温育1小时。LPS(Invivogen,10ng/ml)用作阳性对照。为了评估ATP介导的DC活化对CD4 T细胞活化的所得效果,洗涤ATP活化的DC,并且随后与同种异体CD4 T细胞(比率1个MoDC/4个T细胞)一起温育5天,用于混合淋巴细胞反应(MLR)。通过CD25表达和通过流式细胞术进行CellTraceViolet稀释来分析T细胞活化和增殖(图8)。

[0377] 结果示出在图9、10和11中。在阴性对照(培养基)的存在下,在1mMATP的存在下观察到moDC活化,然而0.125mM、0.25mM或0.5mM的ATP不允许moDC活化。认为添加CD39的化学抑制剂是通过结合活性位点而完全阻断CD39酶活性,导致在0.125mM、0.25mM或0.5mM中的每一种下的moDC活化。然而,抗CD39抗体,如BY40或抗CD73抗体不能支持ATP诱导的树突细

胞(DC)活化,这表明抗体不能充分阻断酶活性以避免ATP分解代谢。令人惊讶的是,实质上完全阻断CD39的ATP酶活性,并且因此可以允许ATP积累的抗CD39阻断抗体I-394(图中以浓度 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 示出)允许MoDC活化,如在 0.125mM 、 0.25mM 或 0.5mM 中的每一个处通过HLA-DR或CD83表达评估(图9和10)。有趣的是,在ATP存在下活化的MoDC能够在MLR测定中诱导更好的T细胞活化和增殖。此外,通过抗CD39阻断抗体I-394增强ATP介导的MoDC活化导致更高的T细胞增殖和活化(图11)。

[0378] 评估CD39抑制剂在ATP的存在下活化DC的能力提供一种标识和评价能够实现CD39的高度抑制的抗CD39抗体的方法。此外,使用抗CD39抗体减轻CD39对DC施加的免疫抑制作用的可能性可以增强针对抗原的适应性免疫反应,特别是对肿瘤细胞。此外,当用于增强化学治疗剂的免疫原性作用时,这类抗CD39抗体可能特别令人关注。许多引起肿瘤细胞坏死的化学治疗剂能够诱导ATP;与抗CD39抗体组合使用可能对于增强这些环境中的抗肿瘤反应特别有用。

[0379] 实例12:利用诱导ATP释放的试剂的抗CD39抗体的体内组合治疗

[0380] 将 1×10^6 个MCA205小鼠肿瘤细胞(肉瘤)皮下移植于遗传修饰以表达人类CD39的小鼠(CD39KI小鼠)的右侧侧腹。小鼠($n=9$ 到13只)用对照奥沙利铂($10\text{mg}/\text{kg}$,腹膜内,在第5天和第12天或第14天),鼠类抗人类CD39抗体I-394($20\text{mg}/\text{kg}$ 用于第一次注射且随后 $10\text{mg}/\text{kg}$,静脉内,一周两次从第4天开始持续3或4周)或两个的组合治疗。用测径规(L :长度且 w ;宽度)一周测量肿瘤两次并且利用式 $(L \times w^2)/2$ 计算肿瘤体积。当肿瘤体积大于 1800mm^3 时或当肿瘤高度坏死时,将小鼠处死。在第0天使人类CD39 KI小鼠移植有MCA205肿瘤细胞。所使用鼠类I-394经工程改造具有无糖基化小鼠IgG1同种型(Kabat重链残基N297处的取代),以防止小鼠FcR和补体结合,使得将观测到的唯一作用与抗体的阻断性质进行关联,且不与CD39+免疫抑制细胞或CD39+内皮细胞的ADCC或CDC裂解进行关联。

[0381] 在第一实验系列中,小鼠在肿瘤细胞移植后第5天利用对照(1个组)PBS或奥沙利铂化疗(2个组)进行治疗。并行地,用奥沙利铂治疗的一组小鼠一周注射两次抗CD39抗体,并伴随在奥沙利铂治疗前仅一天(第4天)开始抗CD39抗体治疗。这确保奥沙利铂在CD39已经且完全抑制的肿瘤环境中诱导ATP释放,且因此提供对通过瘤内CD39的ATP降解的最佳预防。在这一实验中,肿瘤生长的延迟和小鼠生存率可以在奥沙利铂和I-394抗体的组合组中观测到,然而,延迟视为相对适度的,即使在这一组中获得一个完全反应(CR),而在对照或奥沙利铂单一试剂组中未观测到CR。对照的生存中值是20天,奥沙利铂的生存中值是25天且I-394抗体与奥沙利铂组合的生存中值是31天。结果示出于图12中。

[0382] 在第二实验系列(示出了2个中的一个代表性实验)中,在第一次奥沙利铂注射后一周,同样在用I-394抗体治疗后仅一天,重复奥沙利铂注射,以提供ATP降解的最佳抑制。单独施用的I-394Ab对肿瘤生长和小鼠生存率仅具有边际作用。重复(两次)注射呈单一试剂形式的奥沙利铂确实诱导肿瘤体积的一定消退并增加小鼠生存率。然而,所有小鼠中在奥沙利铂诱导肿瘤体积消退之前施用的奥沙利铂结合抗体I-394的重复注射的组合具有3个CR(与单独奥沙利铂的2个CR相比)和6个部分反应(PR)(与单独奥沙利铂的3个PR相比)。组合还改良小鼠的生存率,在肿瘤移植后40天,其中4/13无肿瘤小鼠,相较于单独奥沙利铂组中2/12无肿瘤小鼠。结果示出于图13中。

[0383] 相信这一设定中的奥沙利铂的第二次重复注射允许在阻断抗CD39抗体存在下的

ATP积聚和腺苷(Ado)抑制在建立高效抗肿瘤免疫反应所需的典型两周时段期间发生。因此,在人体内改良治疗方案可涉及重复化疗施用至少两次,以见到利用抗CD39阻断抗体的最强组合作用。另外,抗CD39 Ab可理想地在诱导ATP释放的化学治疗剂之前至少1到48h施用,以确保在化学治疗剂诱导ATP释放的时刻,完全抑制瘤内CD39且完全抑制ATP降解成腺苷。

[0384] 本文引用的所有参考文献,包含出版物、专利申请和专利均通过引用以其整体并入本文,其程度如同每个参考文献被单独且具体地指出通过引用并入,并且在本文中完整地阐述(在法律允许的最大范围内),不论是否单独提供本文其它地方参考的特定文件的并入。

[0385] 除非另有说明,否则本文提供的所有精确值均代表对应的近似值(例如,关于特定因子或测量提供的所有确切示范性值可以视为还提供对应的近似测量,在适当的情况下由“约”修饰)。当“约”结合数字使用时,这可以规定为包含对应于规定数字的+/-10%的值。

[0386] 本文中使用如“包括”、“具有”、“包含”或“含有”等术语的本发明的任何方面或实施例的描述旨在提供对本文中“由所述一个或多个特定元素组成”、“基本上由所述一个或多个特定元素组成”或“实质上包括所述一个或多个特定元素”的类似方面或实施例的支持,除非另有说明或明确与上下文矛盾(例如,本文描述的包括特定元素的组合物应理解为还描述由所述元素组成的组合物,除非另有说明或明确与上下文矛盾)。

[0387] 除非另外声明,否则本文提供的任何和所有实例或示范性语言(例如,“如”)的使用仅旨在更好地阐明本发明,并且不对本发明的范围构成限制。本说明书中的任何语言都不应被解释为将任何未要求保护的元素指示为实践本发明所必须的。

- [0001] 序列表
[0002] <110> 先天制药公司(INNATE PHARMA)
[0003] <120> 增强ATP释放作用
[0004] <130> CD39-8
[0005] <150> US 62/586,224
[0006] <151> 2017-11-15
[0007] <150> US 62/733,175
[0008] <151> 2018-09-19
[0009] <150> US 62/686,149
[0010] <151> 2018-06-18
[0011] <160> 48
[0012] <170> PatentIn version 3.5
[0013] <210> 1
[0014] <211> 510
[0015] <212> PRT
[0016] <213> 智人
[0017] <400> 1
[0018] Met Glu Asp Thr Lys Glu Ser Asn Val Lys Thr Phe Cys Ser Lys Asn
[0019] 1 5 10 15
[0020] Ile Leu Ala Ile Leu Gly Phe Ser Ser Ile Ile Ala Val Ile Ala Leu
[0021] 20 25 30
[0022] Leu Ala Val Gly Leu Thr Gln Asn Lys Ala Leu Pro Glu Asn Val Lys
[0023] 35 40 45
[0024] Tyr Gly Ile Val Leu Asp Ala Gly Ser Ser His Thr Ser Leu Tyr Ile
[0025] 50 55 60
[0026] Tyr Lys Trp Pro Ala Glu Lys Glu Asn Asp Thr Gly Val Val His Gln
[0027] 65 70 75 80
[0028] Val Glu Glu Cys Arg Val Lys Gly Pro Gly Ile Ser Lys Phe Val Gln
[0029] 85 90 95
[0030] Lys Val Asn Glu Ile Gly Ile Tyr Leu Thr Asp Cys Met Glu Arg Ala
[0031] 100 105 110
[0032] Arg Glu Val Ile Pro Arg Ser Gln His Gln Glu Thr Pro Val Tyr Leu
[0033] 115 120 125
[0034] Gly Ala Thr Ala Gly Met Arg Leu Leu Arg Met Glu Ser Glu Glu Leu
[0035] 130 135 140
[0036] Ala Asp Arg Val Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Leu Ser Asn Tyr Pro
[0037] 145 150 155 160
[0038] Phe Asp Phe Gln Gly Ala Arg Ile Ile Thr Gly Gln Glu Glu Gly Ala

[0039]	165	170	175
[0040]	Tyr Gly Trp Ile Thr Ile Asn Tyr Leu Leu Gly Lys Phe Ser Gln Lys		
[0041]	180	185	190
[0042]	Thr Arg Trp Phe Ser Ile Val Pro Tyr Glu Thr Asn Asn Gln Glu Thr		
[0043]	195	200	205
[0044]	Phe Gly Ala Leu Asp Leu Gly Gly Ala Ser Thr Gln Val Thr Phe Val		
[0045]	210	215	220
[0046]	Pro Gln Asn Gln Thr Ile Glu Ser Pro Asp Asn Ala Leu Gln Phe Arg		
[0047]	225	230	235
[0048]	Leu Tyr Gly Lys Asp Tyr Asn Val Tyr Thr His Ser Phe Leu Cys Tyr		
[0049]	245	250	255
[0050]	Gly Lys Asp Gln Ala Leu Trp Gln Lys Leu Ala Lys Asp Ile Gln Val		
[0051]	260	265	270
[0052]	Ala Ser Asn Glu Ile Leu Arg Asp Pro Cys Phe His Pro Gly Tyr Lys		
[0053]	275	280	285
[0054]	Lys Val Val Asn Val Ser Asp Leu Tyr Lys Thr Pro Cys Thr Lys Arg		
[0055]	290	295	300
[0056]	Phe Glu Met Thr Leu Pro Phe Gln Gln Phe Glu Ile Gln Gly Ile Gly		
[0057]	305	310	315
[0058]	Asn Tyr Gln Gln Cys His Gln Ser Ile Leu Glu Leu Phe Asn Thr Ser		
[0059]	325	330	335
[0060]	Tyr Cys Pro Tyr Ser Gln Cys Ala Phe Asn Gly Ile Phe Leu Pro Pro		
[0061]	340	345	350
[0062]	Leu Gln Gly Asp Phe Gly Ala Phe Ser Ala Phe Tyr Phe Val Met Lys		
[0063]	355	360	365
[0064]	Phe Leu Asn Leu Thr Ser Glu Lys Val Ser Gln Glu Lys Val Thr Glu		
[0065]	370	375	380
[0066]	Met Met Lys Lys Phe Cys Ala Gln Pro Trp Glu Glu Ile Lys Thr Ser		
[0067]	385	390	395
[0068]	Tyr Ala Gly Val Lys Glu Lys Tyr Leu Ser Glu Tyr Cys Phe Ser Gly		
[0069]	405	410	415
[0070]	Thr Tyr Ile Leu Ser Leu Leu Gln Gly Tyr His Phe Thr Ala Asp		
[0071]	420	425	430
[0072]	Ser Trp Glu His Ile His Phe Ile Gly Lys Ile Gln Gly Ser Asp Ala		
[0073]	435	440	445
[0074]	Gly Trp Thr Leu Gly Tyr Met Leu Asn Leu Thr Asn Met Ile Pro Ala		
[0075]	450	455	460
[0076]	Glu Gln Pro Leu Ser Thr Pro Leu Ser His Ser Thr Tyr Val Phe Leu		
[0077]	465	470	475
			480

[0078]	Met Val Leu Phe Ser Leu Val Leu Phe Thr Val Ala Ile Ile Gly Leu			
[0079]		485	490	495
[0080]	Leu Ile Phe His Lys Pro Ser Tyr Phe Trp Lys Asp Met Val			
[0081]		500	505	510
[0082]	<210> 2			
[0083]	<211> 478			
[0084]	<212> PRT			
[0085]	<213> 智人			
[0086]	<400> 2			
[0087]	Met Glu Asp Thr Lys Glu Ser Asn Val Lys Thr Phe Cys Ser Lys Asn			
[0088]	1	5	10	15
[0089]	Ile Leu Ala Ile Leu Gly Phe Ser Ser Ile Ile Ala Val Ile Ala Leu			
[0090]		20	25	30
[0091]	Leu Ala Val Gly Leu Thr Gln Asn Lys Ala Leu Pro Glu Asn Val Lys			
[0092]		35	40	45
[0093]	Tyr Gly Ile Val Leu Asp Ala Gly Ser Ser His Thr Ser Leu Tyr Ile			
[0094]		50	55	60
[0095]	Tyr Lys Trp Pro Ala Glu Lys Glu Asn Asp Thr Gly Val Val His Gln			
[0096]		65	70	75
[0097]	Val Glu Glu Cys Arg Val Lys Gly Pro Gly Ile Ser Lys Phe Val Gln			
[0098]		85	90	95
[0099]	Lys Val Asn Glu Ile Gly Ile Tyr Leu Thr Asp Cys Met Glu Arg Ala			
[0100]		100	105	110
[0101]	Arg Glu Val Ile Pro Arg Ser Gln His Gln Glu Thr Pro Val Tyr Leu			
[0102]		115	120	125
[0103]	Gly Ala Thr Ala Gly Met Arg Leu Leu Arg Met Glu Ser Glu Glu Leu			
[0104]		130	135	140
[0105]	Ala Asp Arg Val Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Leu Ser Asn Tyr Pro			
[0106]		145	150	155
[0107]	Phe Asp Phe Gln Gly Ala Arg Ile Ile Thr Gly Gln Glu Glu Gly Ala			
[0108]		165	170	175
[0109]	Tyr Gly Trp Ile Thr Ile Asn Tyr Leu Leu Gly Lys Phe Ser Gln Lys			
[0110]		180	185	190
[0111]	Thr Arg Trp Phe Ser Ile Val Pro Tyr Glu Thr Asn Asn Gln Glu Thr			
[0112]		195	200	205
[0113]	Phe Gly Ala Leu Asp Leu Gly Gly Ala Ser Thr Gln Val Thr Phe Val			
[0114]		210	215	220
[0115]	Pro Gln Asn Gln Thr Ile Glu Ser Pro Asp Asn Ala Leu Gln Phe Arg			
[0116]		225	230	235
				240

[0117]	Leu Tyr Gly Lys Asp Tyr Asn Val Tyr Thr His Ser Phe Leu Cys Tyr			
[0118]	245	250	255	
[0119]	Gly Lys Asp Gln Ala Leu Trp Gln Lys Leu Ala Lys Asp Ile Gln Val			
[0120]	260	265	270	
[0121]	Ala Ser Asn Glu Ile Leu Arg Asp Pro Cys Phe His Pro Gly Tyr Lys			
[0122]	275	280	285	
[0123]	Lys Val Val Asn Val Ser Asp Leu Tyr Lys Thr Pro Cys Thr Lys Arg			
[0124]	290	295	300	
[0125]	Phe Glu Met Thr Leu Pro Phe Gln Gln Phe Glu Ile Gln Gly Ile Gly			
[0126]	305	310	315	320
[0127]	Asn Tyr Gln Gln Cys His Gln Ser Ile Leu Glu Leu Phe Asn Thr Ser			
[0128]	325	330	335	
[0129]	Tyr Cys Pro Tyr Ser Gln Cys Ala Phe Asn Gly Ile Phe Leu Pro Pro			
[0130]	340	345	350	
[0131]	Leu Gln Gly Asp Phe Gly Ala Phe Ser Ala Phe Tyr Phe Val Met Lys			
[0132]	355	360	365	
[0133]	Phe Leu Asn Leu Thr Ser Glu Lys Val Ser Gln Glu Lys Val Thr Glu			
[0134]	370	375	380	
[0135]	Met Met Lys Lys Phe Cys Ala Gln Pro Trp Glu Glu Ile Lys Thr Ser			
[0136]	385	390	395	400
[0137]	Tyr Ala Gly Val Lys Glu Lys Tyr Leu Ser Glu Tyr Cys Phe Ser Gly			
[0138]	405	410	415	
[0139]	Thr Tyr Ile Leu Ser Leu Leu Gln Gly Tyr His Phe Thr Ala Asp			
[0140]	420	425	430	
[0141]	Ser Trp Glu His Ile His Phe Ile Gly Lys Ile Gln Gly Ser Asp Ala			
[0142]	435	440	445	
[0143]	Gly Trp Thr Leu Gly Tyr Met Leu Asn Leu Thr Asn Met Ile Pro Ala			
[0144]	450	455	460	
[0145]	Glu Gln Pro Leu Ser Thr Pro Leu Ser His Ser Thr Tyr Val			
[0146]	465	470	475	
[0147]	<210> 3			
[0148]	<211> 116			
[0149]	<212> PRT			
[0150]	<213> 小鼠			
[0151]	<400> 3			
[0152]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala			
[0153]	1	5	10	15
[0154]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr			
[0155]	20	25	30	

[0156]	Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Arg Thr Leu Glu Trp Ile			
[0157]	35	40	45	
[0158]	Gly Tyr Ile Val Pro Leu Asn Gly Gly Ser Thr Phe Asn Gln Lys Phe			
[0159]	50	55	60	
[0160]	Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asn Thr Ser Ser Arg Thr Ala Tyr			
[0161]	65	70	75	80
[0162]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ala Tyr Tyr Cys			
[0163]	85	90	95	
[0164]	Ala Arg Gly Gly Thr Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
[0165]	100	105	110	
[0166]	Thr Val Ser Ala			
[0167]	115			
[0168]	<210> 4			
[0169]	<211> 111			
[0170]	<212> PRT			
[0171]	<213> 小鼠			
[0172]	<400> 4			
[0173]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly			
[0174]	1 5 10 15			
[0175]	Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe			
[0176]	20 25 30			
[0177]	Gly Val Ser Phe Met Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro			
[0178]	35 40 45			
[0179]	Asn Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala			
[0180]	50 55 60			
[0181]	Arg Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His			
[0182]	65 70 75 80			
[0183]	Pro Met Glu Ala Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Thr Lys			
[0184]	85 90 95			
[0185]	Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0186]	100 105 110			
[0187]	<210> 5			
[0188]	<211> 5			
[0189]	<212> PRT			
[0190]	<213> 小鼠			
[0191]	<400> 5			
[0192]	Asp Tyr Asn Met His			
[0193]	1 5			
[0194]	<210> 6			

- [0195] <211> 17
[0196] <212> PRT
[0197] <213> 小鼠
[0198] <400> 6
[0199] Tyr Ile Val Pro Leu Asn Gly Gly Ser Thr Phe Asn Gln Lys Phe Lys
[0200] 1 5 10 15
[0201] Gly
[0202] <210> 7
[0203] <211> 7
[0204] <212> PRT
[0205] <213> 小鼠
[0206] <400> 7
[0207] Gly Gly Thr Arg Phe Ala Tyr
[0208] 1 5
[0209] <210> 8
[0210] <211> 15
[0211] <212> PRT
[0212] <213> 小鼠
[0213] <400> 8
[0214] Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe Gly Val Ser Phe Met Tyr
[0215] 1 5 10 15
[0216] <210> 9
[0217] <211> 7
[0218] <212> PRT
[0219] <213> 小鼠
[0220] <400> 9
[0221] Gly Ala Ser Asn Gln Gly Ser
[0222] 1 5
[0223] <210> 10
[0224] <211> 9
[0225] <212> PRT
[0226] <213> 小鼠
[0227] <400> 10
[0228] Gln Gln Thr Lys Glu Val Pro Tyr Thr
[0229] 1 5
[0230] <210> 11
[0231] <211> 116
[0232] <212> PRT
[0233] <213> 小鼠

[0234]	<400>	11		
[0235]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala			
[0236]	1	5	10	15
[0237]	Ser Val Arg Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr			
[0238]	20	25	30	
[0239]	Asn Met His Trp Val Lys Lys Asn His Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
[0240]	35	40	45	
[0241]	Gly Tyr Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe			
[0242]	50	55	60	
[0243]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asn Thr Ser Ser Lys Thr Ala Tyr			
[0244]	65	70	75	80
[0245]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0246]	85	90	95	
[0247]	Thr Arg Gly Gly Thr Arg Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
[0248]	100	105	110	
[0249]	Thr Val Ser Ala			
[0250]	115			
[0251]	<210>	12		
[0252]	<211>	111		
[0253]	<212>	PRT		
[0254]	<213>	小鼠		
[0255]	<400>	12		
[0256]	Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly			
[0257]	1	5	10	15
[0258]	Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr			
[0259]	20	25	30	
[0260]	Gly Ile Ser Phe Met Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro			
[0261]	35	40	45	
[0262]	Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala			
[0263]	50	55	60	
[0264]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His			
[0265]	65	70	75	80
[0266]	Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys			
[0267]	85	90	95	
[0268]	Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0269]	100	105	110	
[0270]	<210>	13		
[0271]	<211>	5		
[0272]	<212>	PRT		

- [0273] <213> 小鼠
[0274] <400> 13
[0275] Asp Tyr Asn Met His
[0276] 1 5
[0277] <210> 14
[0278] <211> 17
[0279] <212> PRT
[0280] <213> 小鼠
[0281] <400> 14
[0282] Tyr Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
[0283] 1 5 10 15
[0284] Gly
[0285] <210> 15
[0286] <211> 7
[0287] <212> PRT
[0288] <213> 小鼠
[0289] <400> 15
[0290] Gly Gly Thr Arg Phe Ala Ser
[0291] 1 5
[0292] <210> 16
[0293] <211> 15
[0294] <212> PRT
[0295] <213> 小鼠
[0296] <400> 16
[0297] Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Tyr
[0298] 1 5 10 15
[0299] <210> 17
[0300] <211> 7
[0301] <212> PRT
[0302] <213> 小鼠
[0303] <400> 17
[0304] Ala Ala Ser Thr Gln Gly Ser
[0305] 1 5
[0306] <210> 18
[0307] <211> 9
[0308] <212> PRT
[0309] <213> 小鼠
[0310] <400> 18
[0311] Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Phe Thr

[0312]	1	5		
[0313]	<210>	19		
[0314]	<211>	122		
[0315]	<212>	PRT		
[0316]	<213>	小鼠		
[0317]	<400>	19		
[0318]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala			
[0319]	1	5	10	15
[0320]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Ile Val Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr			
[0321]		20	25	30
[0322]	Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
[0323]		35	40	45
[0324]	Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe			
[0325]		50	55	60
[0326]	Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr			
[0327]		65	70	75
[0328]	Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0329]		85	90	95
[0330]	Ala Arg Trp Gly Tyr Asp Asp Glu Glu Ala Asp Tyr Phe Asp Ser Trp			
[0331]		100	105	110
[0332]	Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser			
[0333]		115	120	
[0334]	<210>	20		
[0335]	<211>	111		
[0336]	<212>	PRT		
[0337]	<213>	小鼠		
[0338]	<400>	20		
[0339]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly			
[0340]	1	5	10	15
[0341]	Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr			
[0342]		20	25	30
[0343]	Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro			
[0344]		35	40	45
[0345]	Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala			
[0346]		50	55	60
[0347]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile Leu			
[0348]		65	70	75
[0349]	Pro Met Glu Glu Val Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys His Gln Ser Lys			
[0350]		85	90	95

[0351]	Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0352]		100	105	110
[0353]	<210> 21			
[0354]	<211> 5			
[0355]	<212> PRT			
[0356]	<213> 小鼠			
[0357]	<400> 21			
[0358]	Asp Thr Tyr Ile Asn			
[0359]	1	5		
[0360]	<210> 22			
[0361]	<211> 17			
[0362]	<212> PRT			
[0363]	<213> 小鼠			
[0364]	<400> 22			
[0365]	Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln			
[0366]	1	5	10	15
[0367]	Gly			
[0368]	<210> 23			
[0369]	<211> 13			
[0370]	<212> PRT			
[0371]	<213> 小鼠			
[0372]	<400> 23			
[0373]	Trp Gly Tyr Asp Asp Glu Glu Ala Asp Tyr Phe Asp Ser			
[0374]	1	5	10	
[0375]	<210> 24			
[0376]	<211> 15			
[0377]	<212> PRT			
[0378]	<213> 小鼠			
[0379]	<400> 24			
[0380]	Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn			
[0381]	1	5	10	15
[0382]	<210> 25			
[0383]	<211> 7			
[0384]	<212> PRT			
[0385]	<213> 小鼠			
[0386]	<400> 25			
[0387]	Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser			
[0388]	1	5		
[0389]	<210> 26			

[0390]	<211>	9		
[0391]	<212>	PRT		
[0392]	<213>	小鼠		
[0393]	<400>	26		
[0394]	His Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr			
[0395]	1	5		
[0396]	<210>	27		
[0397]	<211>	118		
[0398]	<212>	PRT		
[0399]	<213>	小鼠		
[0400]	<400>	27		
[0401]	Pro Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Met Pro Gly Ala			
[0402]	1	5	10	15
[0403]	Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe			
[0404]	20	25	30	
[0405]	Trp Met Asn Trp Met Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
[0406]	35	40	45	
[0407]	Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Phe Tyr Thr Asn Ser Asn Gln Arg Phe			
[0408]	50	55	60	
[0409]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
[0410]	65	70	75	80
[0411]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys			
[0412]	85	90	95	
[0413]	Ala Arg Gly Asp Phe Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr			
[0414]	100	105	110	
[0415]	Ser Val Thr Val Ser Ser			
[0416]	115			
[0417]	<210>	28		
[0418]	<211>	108		
[0419]	<212>	PRT		
[0420]	<213>	小鼠		
[0421]	<400>	28		
[0422]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr Met Thr Ser Ser Pro Gly			
[0423]	1	5	10	15
[0424]	Glu Lys Ile Thr Phe Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Asn Ser Asn			
[0425]	20	25	30	
[0426]	Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Phe Ser Pro Lys Leu Leu			
[0427]	35	40	45	
[0428]	Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser			

[0429]	50	55	60
[0430]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Gly Thr Met Glu		
[0431]	65	70	75
[0432]	Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser Leu Pro		80
[0433]		85	90
[0434]	Arg Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		95
[0435]		100	105
[0436]	<210> 29		
[0437]	<211> 5		
[0438]	<212> PRT		
[0439]	<213> 小鼠		
[0440]	<400> 29		
[0441]	Ser Phe Trp Met Asn		
[0442]	1	5	
[0443]	<210> 30		
[0444]	<211> 17		
[0445]	<212> PRT		
[0446]	<213> 小鼠		
[0447]	<400> 30		
[0448]	Glu Ile Asp Pro Ser Asp Phe Tyr Thr Asn Ser Asn Gln Arg Phe Lys		
[0449]	1	5	10
[0450]	Gly		15
[0451]	<210> 31		
[0452]	<211> 9		
[0453]	<212> PRT		
[0454]	<213> 小鼠		
[0455]	<400> 31		
[0456]	Gly Asp Phe Gly Trp Tyr Phe Asp Val		
[0457]	1	5	
[0458]	<210> 32		
[0459]	<211> 12		
[0460]	<212> PRT		
[0461]	<213> 小鼠		
[0462]	<400> 32		
[0463]	Ser Ala Ser Ser Ser Ile Asn Ser Asn Tyr Leu His		
[0464]	1	5	10
[0465]	<210> 33		
[0466]	<211> 7		
[0467]	<212> PRT		

- [0468] <213> 小鼠
[0469] <400> 33
[0470] Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser
[0471] 1 5
[0472] <210> 34
[0473] <211> 9
[0474] <212> PRT
[0475] <213> 小鼠
[0476] <400> 34
[0477] Gln Gln Gly Ser Ser Leu Pro Arg Thr
[0478] 1 5
[0479] <210> 35
[0480] <211> 45
[0481] <212> DNA
[0482] <213> 智人
[0483] <400> 35
[0484] tacgactcac aagcttgccg ccaccatgga agatacaaag gagtc 45
[0485] <210> 36
[0486] <211> 64
[0487] <212> DNA
[0488] <213> 智人
[0489] <400> 36
[0490] ccggccccgac tctagatcac ttgtcatcgt catcttgta atcgacatag gtggagttgg 60
[0491] agag 64
[0492] <210> 37
[0493] <211> 446
[0494] <212> PRT
[0495] <213> 人工
[0496] <220>
[0497] <223> 嵌合智人小鼠
[0498] <400> 37
[0499] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0500] 1 5 10 15
[0501] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
[0502] 20 25 30
[0503] Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Arg Thr Leu Glu Trp Ile
[0504] 35 40 45
[0505] Gly Tyr Ile Val Pro Leu Asn Gly Gly Ser Thr Phe Asn Gln Lys Phe
[0506] 50 55 60

[0507]	Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asn Thr Ser Ser Arg Thr Ala Tyr			
[0508]	65	70	75	80
[0509]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ala Tyr Tyr Cys			
[0510]	85	90	95	
[0511]	Ala Arg Gly Gly Thr Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
[0512]	100	105	110	
[0513]	Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala			
[0514]	115	120	125	
[0515]	Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu			
[0516]	130	135	140	
[0517]	Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly			
[0518]	145	150	155	160
[0519]	Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser			
[0520]	165	170	175	
[0521]	Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu			
[0522]	180	185	190	
[0523]	Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr			
[0524]	195	200	205	
[0525]	Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr			
[0526]	210	215	220	
[0527]	Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe			
[0528]	225	230	235	240
[0529]	Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro			
[0530]	245	250	255	
[0531]	Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val			
[0532]	260	265	270	
[0533]	Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr			
[0534]	275	280	285	
[0535]	Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val			
[0536]	290	295	300	
[0537]	Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys			
[0538]	305	310	315	320
[0539]	Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser			
[0540]	325	330	335	
[0541]	Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro			
[0542]	340	345	350	
[0543]	Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val			
[0544]	355	360	365	
[0545]	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly			

[0546]	370	375	380
[0547]	Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp		
[0548]	385	390	395
[0549]	Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		400
[0550]	405	410	415
[0551]	Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His		
[0552]	420	425	430
[0553]	Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0554]	435	440	445
[0555]	<210> 38		
[0556]	<211> 218		
[0557]	<212> PRT		
[0558]	<213> 人工		
[0559]	<220>		
[0560]	<223> 嵌合智人小鼠		
[0561]	<400> 38		
[0562]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly		
[0563]	1	5	10
[0564]	15		
[0565]	Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe		
[0566]	20	25	30
[0567]	Gly Val Ser Phe Met Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro		
[0568]	35	40	45
[0569]	Asn Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala		
[0570]	50	55	60
[0571]	Arg Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His		
[0572]	65	70	75
[0573]	80		
[0574]	Pro Met Glu Ala Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Thr Lys		
[0575]	85	90	95
[0576]	Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
[0577]	100	105	110
[0578]	Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln		
[0579]	115	120	125
[0580]	Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr		
[0581]	130	135	140
[0582]	Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser		
[0583]	145	150	155
[0584]	Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr		160
[0585]	165	170	175
[0586]	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys		

[0585]	180	185	190
[0586]	His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro		
[0587]	195	200	205
[0588]	Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0589]	210	215	
[0590]	<210> 39		
[0591]	<211> 486		
[0592]	<212> PRT		
[0593]	<213> 智人		
[0594]	<400> 39		
[0595]	Met Glu Asp Thr Lys Glu Ser Asn Val Lys Thr Phe Cys Ser Lys Asn		
[0596]	1 5 10 15		
[0597]	Ile Leu Ala Ile Leu Gly Phe Ser Ser Ile Ile Ala Val Ile Ala Leu		
[0598]	20 25 30		
[0599]	Leu Ala Val Gly Leu Thr Gln Asn Lys Ala Leu Pro Glu Asn Val Lys		
[0600]	35 40 45		
[0601]	Tyr Gly Ile Val Leu Asp Ala Gly Ser Ser His Thr Ser Leu Tyr Ile		
[0602]	50 55 60		
[0603]	Tyr Lys Trp Pro Ala Glu Lys Glu Asn Asp Thr Gly Val Val His Gln		
[0604]	65 70 75 80		
[0605]	Val Glu Glu Cys Arg Val Lys Gly Pro Gly Ile Ser Lys Phe Val Gln		
[0606]	85 90 95		
[0607]	Lys Val Asn Glu Ile Gly Ile Tyr Leu Thr Asp Cys Met Glu Arg Ala		
[0608]	100 105 110		
[0609]	Arg Glu Val Ile Pro Arg Ser Gln His Gln Glu Thr Pro Val Tyr Leu		
[0610]	115 120 125		
[0611]	Gly Ala Thr Ala Gly Met Arg Leu Leu Arg Met Glu Ser Glu Glu Leu		
[0612]	130 135 140		
[0613]	Ala Asp Arg Val Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Leu Ser Asn Tyr Pro		
[0614]	145 150 155 160		
[0615]	Phe Asp Phe Gln Gly Ala Arg Ile Ile Thr Gly Gln Glu Glu Gly Ala		
[0616]	165 170 175		
[0617]	Tyr Gly Trp Ile Thr Ile Asn Tyr Leu Leu Gly Lys Phe Ser Gln Lys		
[0618]	180 185 190		
[0619]	Thr Arg Trp Phe Ser Ile Val Pro Tyr Glu Thr Asn Asn Gln Glu Thr		
[0620]	195 200 205		
[0621]	Phe Gly Ala Leu Asp Leu Gly Gly Ala Ser Thr Gln Val Thr Phe Val		
[0622]	210 215 220		
[0623]	Pro Gln Asn Gln Thr Ile Glu Ser Pro Asp Asn Ala Leu Gln Phe Arg		

[0624]	225	230	235	240
[0625]	Leu Tyr Gly Lys Asp Tyr Asn Val Tyr Thr His Ser Phe Leu Cys Tyr			
[0626]	245	250	255	
[0627]	Gly Lys Asp Gln Ala Leu Trp Gln Lys Leu Ala Lys Asp Ile Gln Val			
[0628]	260	265	270	
[0629]	Ala Ser Asn Glu Ile Leu Arg Asp Pro Cys Phe His Pro Gly Tyr Lys			
[0630]	275	280	285	
[0631]	Lys Val Val Asn Val Ser Asp Leu Tyr Lys Thr Pro Cys Thr Lys Arg			
[0632]	290	295	300	
[0633]	Phe Glu Met Thr Leu Pro Phe Gln Gln Phe Glu Ile Gln Gly Ile Gly			
[0634]	305	310	315	320
[0635]	Asn Tyr Gln Gln Cys His Gln Ser Ile Leu Glu Leu Phe Asn Thr Ser			
[0636]	325	330	335	
[0637]	Tyr Cys Pro Tyr Ser Gln Cys Ala Phe Asn Gly Ile Phe Leu Pro Pro			
[0638]	340	345	350	
[0639]	Leu Gln Gly Asp Phe Gly Ala Phe Ser Ala Phe Tyr Phe Val Met Lys			
[0640]	355	360	365	
[0641]	Phe Leu Asn Leu Thr Ser Glu Lys Val Ser Gln Glu Lys Val Thr Glu			
[0642]	370	375	380	
[0643]	Met Met Lys Lys Phe Cys Ala Gln Pro Trp Glu Glu Ile Lys Thr Ser			
[0644]	385	390	395	400
[0645]	Tyr Ala Gly Val Lys Glu Lys Tyr Leu Ser Glu Tyr Cys Phe Ser Gly			
[0646]	405	410	415	
[0647]	Thr Tyr Ile Leu Ser Leu Leu Gln Gly Tyr His Phe Thr Ala Asp			
[0648]	420	425	430	
[0649]	Ser Trp Glu His Ile His Phe Ile Gly Lys Ile Gln Gly Ser Asp Ala			
[0650]	435	440	445	
[0651]	Gly Trp Thr Leu Gly Tyr Met Leu Asn Leu Thr Asn Met Ile Pro Ala			
[0652]	450	455	460	
[0653]	Glu Gln Pro Leu Ser Thr Pro Leu Ser His Ser Thr Tyr Val Asp Tyr			
[0654]	465	470	475	480
[0655]	Lys Asp Asp Asp Asp Lys			
[0656]	485			
[0657]	<210> 40			
[0658]	<211> 472			
[0659]	<212> PRT			
[0660]	<213> 智人			
[0661]	<400> 40			
[0662]	Met Ala Gly Lys Val Arg Ser Leu Leu Pro Pro Leu Leu Ala Ala			

[0663]	1	5	10	15
[0664]	Ala Gly Leu Ala Gly Leu Leu Leu Cys Val Pro Thr Arg Asp Val			
[0665]		20	25	30
[0666]	Arg Glu Pro Pro Ala Leu Lys Tyr Gly Ile Val Leu Asp Ala Gly Ser			
[0667]		35	40	45
[0668]	Ser His Thr Ser Met Phe Ile Tyr Lys Trp Pro Ala Asp Lys Glu Asn			
[0669]		50	55	60
[0670]	Asp Thr Gly Ile Val Gly Gln His Ser Ser Cys Asp Val Pro Gly Gly			
[0671]		65	70	75
[0672]	Gly Ile Ser Ser Tyr Ala Asp Asn Pro Ser Gly Ala Ser Gln Ser Leu			
[0673]		85	90	95
[0674]	Val Gly Cys Leu Glu Gln Ala Leu Gln Asp Val Pro Lys Glu Arg His			
[0675]		100	105	110
[0676]	Ala Gly Thr Pro Leu Tyr Leu Gly Ala Thr Ala Gly Met Arg Leu Leu			
[0677]		115	120	125
[0678]	Asn Leu Thr Asn Pro Glu Ala Ser Thr Ser Val Leu Met Ala Val Thr			
[0679]		130	135	140
[0680]	His Thr Leu Thr Gln Tyr Pro Phe Asp Phe Arg Gly Ala Arg Ile Leu			
[0681]		145	150	155
[0682]	Ser Gly Gln Glu Glu Gly Val Phe Gly Trp Val Thr Ala Asn Tyr Leu			
[0683]		165	170	175
[0684]	Leu Glu Asn Phe Ile Lys Tyr Gly Trp Val Gly Arg Trp Phe Arg Pro			
[0685]		180	185	190
[0686]	Arg Lys Gly Thr Leu Gly Ala Met Asp Leu Gly Gly Ala Ser Thr Gln			
[0687]		195	200	205
[0688]	Ile Thr Phe Glu Thr Thr Ser Pro Ala Glu Asp Arg Ala Ser Glu Val			
[0689]		210	215	220
[0690]	Gln Leu His Leu Tyr Gly Gln His Tyr Arg Val Tyr Thr His Ser Phe			
[0691]		225	230	235
[0692]	Leu Cys Tyr Gly Arg Asp Gln Val Leu Gln Arg Leu Leu Ala Ser Ala			
[0693]		245	250	255
[0694]	Leu Gln Thr His Gly Phe His Pro Cys Trp Pro Arg Gly Phe Ser Thr			
[0695]		260	265	270
[0696]	Gln Val Leu Leu Gly Asp Val Tyr Gln Ser Pro Cys Thr Met Ala Gln			
[0697]		275	280	285
[0698]	Arg Pro Gln Asn Phe Asn Ser Ser Ala Arg Val Ser Leu Ser Gly Ser			
[0699]		290	295	300
[0700]	Ser Asp Pro His Leu Cys Arg Asp Leu Val Ser Gly Leu Phe Ser Phe			
[0701]		305	310	315
				320

[0702]	Ser Ser Cys Pro Phe Ser Arg Cys Ser Phe Asn Gly Val Phe Gln Pro			
[0703]		325	330	335
[0704]	Pro Val Ala Gly Asn Phe Val Ala Phe Ser Ala Phe Phe Tyr Thr Val			
[0705]		340	345	350
[0706]	Asp Phe Leu Arg Thr Ser Met Gly Leu Pro Val Ala Thr Leu Gln Gln			
[0707]		355	360	365
[0708]	Leu Glu Ala Ala Ala Val Asn Val Cys Asn Gln Thr Trp Ala Gln Gln			
[0709]		370	375	380
[0710]	Leu Leu Ser Arg Gly Tyr Gly Phe Asp Glu Arg Ala Phe Gly Gly Val			
[0711]		385	390	395
[0712]	Ile Phe Gln Lys Lys Ala Ala Asp Thr Ala Val Gly Trp Ala Leu Gly			
[0713]		405	410	415
[0714]	Tyr Met Leu Asn Leu Thr Asn Leu Ile Pro Ala Asp Pro Pro Gly Leu			
[0715]		420	425	430
[0716]	Arg Lys Gly Thr Asp Phe Ser Ser Trp Val Val Leu Leu Leu Phe			
[0717]		435	440	445
[0718]	Ala Ser Ala Leu Leu Ala Ala Leu Val Leu Leu Leu Arg Gln Val His			
[0719]		450	455	460
[0720]	Ser Ala Lys Leu Pro Ser Thr Ile			
[0721]		465	470	
[0722]	<210> 41			
[0723]	<211> 484			
[0724]	<212> PRT			
[0725]	<213> 智人			
[0726]	<400> 41			
[0727]	Met Lys Lys Gly Ile Arg Tyr Glu Thr Ser Arg Lys Thr Ser Tyr Ile			
[0728]		1	5	10
				15
[0729]	Phe Gln Gln Pro Gln His Gly Pro Trp Gln Thr Arg Met Arg Lys Ile			
[0730]		20	25	30
[0731]	Ser Asn His Gly Ser Leu Arg Val Ala Lys Val Ala Tyr Pro Leu Gly			
[0732]		35	40	45
[0733]	Leu Cys Val Gly Val Phe Ile Tyr Val Ala Tyr Ile Lys Trp His Arg			
[0734]		50	55	60
[0735]	Ala Thr Ala Thr Gln Ala Phe Phe Ser Ile Thr Arg Ala Ala Pro Gly			
[0736]		65	70	75
				80
[0737]	Ala Arg Trp Gly Gln Gln Ala His Ser Pro Leu Gly Thr Ala Ala Asp			
[0738]		85	90	95
[0739]	Gly His Glu Val Phe Tyr Gly Ile Met Phe Asp Ala Gly Ser Thr Gly			
[0740]		100	105	110

[0741]	Thr Arg Val His Val Phe Gln Phe Thr Arg Pro Pro Arg Glu Thr Pro			
[0742]	115	120	125	
[0743]	Thr Leu Thr His Glu Thr Phe Lys Ala Leu Lys Pro Gly Leu Ser Ala			
[0744]	130	135	140	
[0745]	Tyr Ala Asp Asp Val Glu Lys Ser Ala Gln Gly Ile Arg Glu Leu Leu			
[0746]	145	150	155	160
[0747]	Asp Val Ala Lys Gln Asp Ile Pro Phe Asp Phe Trp Lys Ala Thr Pro			
[0748]	165	170	175	
[0749]	Leu Val Leu Lys Ala Thr Ala Gly Leu Arg Leu Leu Pro Gly Glu Lys			
[0750]	180	185	190	
[0751]	Ala Gln Lys Leu Leu Gln Lys Val Lys Glu Val Phe Lys Ala Ser Pro			
[0752]	195	200	205	
[0753]	Phe Leu Val Gly Asp Asp Cys Val Ser Ile Met Asn Gly Thr Asp Glu			
[0754]	210	215	220	
[0755]	Gly Val Ser Ala Trp Ile Thr Ile Asn Phe Leu Thr Gly Ser Leu Lys			
[0756]	225	230	235	240
[0757]	Thr Pro Gly Gly Ser Ser Val Gly Met Leu Asp Leu Gly Gly Ser			
[0758]	245	250	255	
[0759]	Thr Gln Ile Ala Phe Leu Pro Arg Val Glu Gly Thr Leu Gln Ala Ser			
[0760]	260	265	270	
[0761]	Pro Pro Gly Tyr Leu Thr Ala Leu Arg Met Phe Asn Arg Thr Tyr Lys			
[0762]	275	280	285	
[0763]	Leu Tyr Ser Tyr Ser Tyr Leu Gly Leu Gly Leu Met Ser Ala Arg Leu			
[0764]	290	295	300	
[0765]	Ala Ile Leu Gly Gly Val Glu Gly Gln Pro Ala Lys Asp Gly Lys Glu			
[0766]	305	310	315	320
[0767]	Leu Val Ser Pro Cys Leu Ser Pro Ser Phe Lys Gly Glu Trp Glu His			
[0768]	325	330	335	
[0769]	Ala Glu Val Thr Tyr Arg Val Ser Gly Gln Lys Ala Ala Ala Ser Leu			
[0770]	340	345	350	
[0771]	His Glu Leu Cys Ala Ala Arg Val Ser Glu Val Leu Gln Asn Arg Val			
[0772]	355	360	365	
[0773]	His Arg Thr Glu Glu Val Lys His Val Asp Phe Tyr Ala Phe Ser Tyr			
[0774]	370	375	380	
[0775]	Tyr Tyr Asp Leu Ala Ala Gly Val Gly Leu Ile Asp Ala Glu Lys Gly			
[0776]	385	390	395	400
[0777]	Gly Ser Leu Val Val Gly Asp Phe Glu Ile Ala Ala Lys Tyr Val Cys			
[0778]	405	410	415	
[0779]	Arg Thr Leu Glu Thr Gln Pro Gln Ser Ser Pro Phe Ser Cys Met Asp			

[0780]	420	425	430
[0781]	Leu Thr Tyr Val Ser Leu Leu Leu Gln Glu Phe Gly Phe Pro Arg Ser		
[0782]	435	440	445
[0783]	Lys Val Leu Lys Leu Thr Arg Lys Ile Asp Asn Val Glu Thr Ser Trp		
[0784]	450	455	460
[0785]	Ala Leu Gly Ala Ile Phe His Tyr Ile Asp Ser Leu Asn Arg Gln Lys		
[0786]	465	470	475
[0787]	Ser Pro Ala Ser		
[0788]	<210> 42		
[0789]	<211> 529		
[0790]	<212> PRT		
[0791]	<213> 智人		
[0792]	<400> 42		
[0793]	Met Phe Thr Val Leu Thr Arg Gln Pro Cys Glu Gln Ala Gly Leu Lys		
[0794]	1 5 10 15		
[0795]	Ala Leu Tyr Arg Thr Pro Thr Ile Ile Ala Leu Val Val Leu Leu Val		
[0796]	20 25 30		
[0797]	Ser Ile Val Val Leu Val Ser Ile Thr Val Ile Gln Ile His Lys Gln		
[0798]	35 40 45		
[0799]	Glu Val Leu Pro Pro Gly Leu Lys Tyr Gly Ile Val Leu Asp Ala Gly		
[0800]	50 55 60		
[0801]	Ser Ser Arg Thr Thr Val Tyr Val Tyr Gln Trp Pro Ala Glu Lys Glu		
[0802]	65 70 75 80		
[0803]	Asn Asn Thr Gly Val Val Ser Gln Thr Phe Lys Cys Ser Val Lys Gly		
[0804]	85 90 95		
[0805]	Ser Gly Ile Ser Ser Tyr Gly Asn Asn Pro Gln Asp Val Pro Arg Ala		
[0806]	100 105 110		
[0807]	Phe Glu Glu Cys Met Gln Lys Val Lys Gly Gln Val Pro Ser His Leu		
[0808]	115 120 125		
[0809]	His Gly Ser Thr Pro Ile His Leu Gly Ala Thr Ala Gly Met Arg Leu		
[0810]	130 135 140		
[0811]	Leu Arg Leu Gln Asn Glu Thr Ala Ala Asn Glu Val Leu Glu Ser Ile		
[0812]	145 150 155 160		
[0813]	Gln Ser Tyr Phe Lys Ser Gln Pro Phe Asp Phe Arg Gly Ala Gln Ile		
[0814]	165 170 175		
[0815]	Ile Ser Gly Gln Glu Glu Gly Val Tyr Gly Trp Ile Thr Ala Asn Tyr		
[0816]	180 185 190		
[0817]	Leu Met Gly Asn Phe Leu Glu Lys Asn Leu Trp His Met Trp Val His		
[0818]	195 200 205		

[0819]	Pro His Gly Val Glu Thr Thr Gly Ala Leu Asp Leu Gly Gly Ala Ser		
[0820]	210	215	220
[0821]	Thr Gln Ile Ser Phe Val Ala Gly Glu Lys Met Asp Leu Asn Thr Ser		
[0822]	225	230	235
[0823]	Asp Ile Met Gln Val Ser Leu Tyr Gly Tyr Val Tyr Thr Leu Tyr Thr		
[0824]	245	250	255
[0825]	His Ser Phe Gln Cys Tyr Gly Arg Asn Glu Ala Glu Lys Lys Phe Leu		
[0826]	260	265	270
[0827]	Ala Met Leu Leu Gln Asn Ser Pro Thr Lys Asn His Leu Thr Asn Pro		
[0828]	275	280	285
[0829]	Cys Tyr Pro Arg Asp Tyr Ser Ile Ser Phe Thr Met Gly His Val Phe		
[0830]	290	295	300
[0831]	Asp Ser Leu Cys Thr Val Asp Gln Arg Pro Glu Ser Tyr Asn Pro Asn		
[0832]	305	310	315
[0833]	Asp Val Ile Thr Phe Glu Gly Thr Gly Asp Pro Ser Leu Cys Lys Glu		
[0834]	325	330	335
[0835]	Lys Val Ala Ser Ile Phe Asp Phe Lys Ala Cys His Asp Gln Glu Thr		
[0836]	340	345	350
[0837]	Cys Ser Phe Asp Gly Val Tyr Gln Pro Lys Ile Lys Gly Pro Phe Val		
[0838]	355	360	365
[0839]	Ala Phe Ala Gly Phe Tyr Tyr Thr Ala Ser Ala Leu Asn Leu Ser Gly		
[0840]	370	375	380
[0841]	Ser Phe Ser Leu Asp Thr Phe Asn Ser Ser Thr Trp Asn Phe Cys Ser		
[0842]	385	390	395
[0843]	Gln Asn Trp Ser Gln Leu Pro Leu Leu Pro Lys Phe Asp Glu Val		
[0844]	405	410	415
[0845]	Tyr Ala Arg Ser Tyr Cys Phe Ser Ala Asn Tyr Ile Tyr His Leu Phe		
[0846]	420	425	430
[0847]	Val Asn Gly Tyr Lys Phe Thr Glu Glu Thr Trp Pro Gln Ile His Phe		
[0848]	435	440	445
[0849]	Glu Lys Glu Val Gly Asn Ser Ser Ile Ala Trp Ser Leu Gly Tyr Met		
[0850]	450	455	460
[0851]	Leu Ser Leu Thr Asn Gln Ile Pro Ala Glu Ser Pro Leu Ile Arg Leu		
[0852]	465	470	475
[0853]	Pro Ile Glu Pro Pro Val Phe Val Gly Thr Leu Ala Phe Phe Thr Ala		
[0854]	485	490	495
[0855]	Ala Ala Leu Leu Cys Leu Ala Phe Leu Ala Tyr Leu Cys Ser Ala Thr		
[0856]	500	505	510
[0857]	Arg Arg Lys Arg His Ser Glu His Ala Phe Asp His Ala Val Asp Ser		

[0858]	515	520	525
[0859]	Asp		
[0860]	<210>	43	
[0861]	<211>	428	
[0862]	<212>	PRT	
[0863]	<213>	智人	
[0864]	<400>	43	
[0865]	Met Ala Thr Ser Trp Gly Thr Val Phe Phe Met Leu Val Val Ser Cys		
[0866]	1	5	10
[0867]	Val Cys Ser Ala Val Ser His Arg Asn Gln Gln Thr Trp Phe Glu Gly		15
[0868]		20	25
[0869]	Ile Phe Leu Ser Ser Met Cys Pro Ile Asn Val Ser Ala Ser Thr Leu		30
[0870]		35	40
[0871]	Tyr Gly Ile Met Phe Asp Ala Gly Ser Thr Gly Thr Arg Ile His Val		45
[0872]		50	55
[0873]	Tyr Thr Phe Val Gln Lys Met Pro Gly Gln Leu Pro Ile Leu Glu Gly		60
[0874]		65	70
[0875]	Glu Val Phe Asp Ser Val Lys Pro Gly Leu Ser Ala Phe Val Asp Gln		75
[0876]		85	90
[0877]	Pro Lys Gln Gly Ala Glu Thr Val Gln Gly Leu Leu Glu Val Ala Lys		95
[0878]		100	105
[0879]	Asp Ser Ile Pro Arg Ser His Trp Lys Lys Thr Pro Val Val Leu Lys		110
[0880]		115	120
[0881]	Ala Thr Ala Gly Leu Arg Leu Leu Pro Glu His Lys Ala Lys Ala Leu		125
[0882]		130	135
[0883]	Leu Phe Glu Val Lys Glu Ile Phe Arg Lys Ser Pro Phe Leu Val Pro		140
[0884]		145	150
[0885]	Lys Gly Ser Val Ser Ile Met Asp Gly Ser Asp Glu Gly Ile Leu Ala		155
[0886]		165	170
[0887]	Trp Val Thr Val Asn Phe Leu Thr Gly Gln Leu His Gly His Arg Gln		175
[0888]		180	185
[0889]	Glu Thr Val Gly Thr Leu Asp Leu Gly Gly Ala Ser Thr Gln Ile Thr		190
[0890]		195	200
[0891]	Phe Leu Pro Gln Phe Glu Lys Thr Leu Glu Gln Thr Pro Arg Gly Tyr		205
[0892]		210	215
[0893]	Leu Thr Ser Phe Glu Met Phe Asn Ser Thr Tyr Lys Leu Tyr Thr His		220
[0894]		225	230
[0895]	Ser Tyr Leu Gly Phe Gly Leu Lys Ala Ala Arg Leu Ala Thr Leu Gly		235
[0896]		245	250
			240
			255

[0897]	Ala Leu Glu Thr Glu Gly Thr Asp Gly His Thr Phe Arg Ser Ala Cys			
[0898]	260	265	270	
[0899]	Leu Pro Arg Trp Leu Glu Ala Glu Trp Ile Phe Gly Gly Val Lys Tyr			
[0900]	275	280	285	
[0901]	Gln Tyr Gly Gly Asn Gln Glu Gly Glu Val Gly Phe Glu Pro Cys Tyr			
[0902]	290	295	300	
[0903]	Ala Glu Val Leu Arg Val Val Arg Gly Lys Leu His Gln Pro Glu Glu			
[0904]	305	310	315	320
[0905]	Val Gln Arg Gly Ser Phe Tyr Ala Phe Ser Tyr Tyr Tyr Asp Arg Ala			
[0906]	325	330	335	
[0907]	Val Asp Thr Asp Met Ile Asp Tyr Glu Lys Gly Gly Ile Leu Lys Val			
[0908]	340	345	350	
[0909]	Glu Asp Phe Glu Arg Lys Ala Arg Glu Val Cys Asp Asn Leu Glu Asn			
[0910]	355	360	365	
[0911]	Phe Thr Ser Gly Ser Pro Phe Leu Cys Met Asp Leu Ser Tyr Ile Thr			
[0912]	370	375	380	
[0913]	Ala Leu Leu Lys Asp Gly Phe Gly Phe Ala Asp Ser Thr Val Leu Gln			
[0914]	385	390	395	400
[0915]	Leu Thr Lys Lys Val Asn Asn Ile Glu Thr Gly Trp Ala Leu Gly Ala			
[0916]	405	410	415	
[0917]	Thr Phe His Leu Leu Gln Ser Leu Gly Ile Ser His			
[0918]	420	425		
[0919]	<210> 44			
[0920]	<211> 330			
[0921]	<212> PRT			
[0922]	<213> 智人			
[0923]	<400> 44			
[0924]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys			
[0925]	1	5	10	15
[0926]	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
[0927]	20	25	30	
[0928]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
[0929]	35	40	45	
[0930]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
[0931]	50	55	60	
[0932]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
[0933]	65	70	75	80
[0934]	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
[0935]	85	90	95	

[0936]	Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
[0937]	100	105	110	
[0938]	Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
[0939]	115	120	125	
[0940]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
[0941]	130	135	140	
[0942]	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
[0943]	145	150	155	160
[0944]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
[0945]	165	170	175	
[0946]	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
[0947]	180	185	190	
[0948]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
[0949]	195	200	205	
[0950]	Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
[0951]	210	215	220	
[0952]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu			
[0953]	225	230	235	240
[0954]	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
[0955]	245	250	255	
[0956]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
[0957]	260	265	270	
[0958]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
[0959]	275	280	285	
[0960]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
[0961]	290	295	300	
[0962]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
[0963]	305	310	315	320
[0964]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
[0965]	325	330		
[0966]	<210> 45			
[0967]	<211> 330			
[0968]	<212> PRT			
[0969]	<213> 智人			
[0970]	<400> 45			
[0971]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys			
[0972]	1	5	10	15
[0973]	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
[0974]	20	25	30	

[0975]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
[0976]	35	40	45	
[0977]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
[0978]	50	55	60	
[0979]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
[0980]	65	70	75	80
[0981]	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
[0982]	85	90	95	
[0983]	Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
[0984]	100	105	110	
[0985]	Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
[0986]	115	120	125	
[0987]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
[0988]	130	135	140	
[0989]	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
[0990]	145	150	155	160
[0991]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
[0992]	165	170	175	
[0993]	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
[0994]	180	185	190	
[0995]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
[0996]	195	200	205	
[0997]	Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
[0998]	210	215	220	
[0999]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu			
[1000]	225	230	235	240
[1001]	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
[1002]	245	250	255	
[1003]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
[1004]	260	265	270	
[1005]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
[1006]	275	280	285	
[1007]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
[1008]	290	295	300	
[1009]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
[1010]	305	310	315	320
[1011]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
[1012]	325	330		
[1013]	<210> 46			

[1014]	<211>	330		
[1015]	<212>	PRT		
[1016]	<213>	智人		
[1017]	<400>	46		
[1018]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys			
[1019]	1	5	10	15
[1020]	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
[1021]	20	25	30	
[1022]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
[1023]	35	40	45	
[1024]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
[1025]	50	55	60	
[1026]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			
[1027]	65	70	75	80
[1028]	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys			
[1029]	85	90	95	
[1030]	Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
[1031]	100	105	110	
[1032]	Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
[1033]	115	120	125	
[1034]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
[1035]	130	135	140	
[1036]	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
[1037]	145	150	155	160
[1038]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
[1039]	165	170	175	
[1040]	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
[1041]	180	185	190	
[1042]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
[1043]	195	200	205	
[1044]	Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
[1045]	210	215	220	
[1046]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu			
[1047]	225	230	235	240
[1048]	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
[1049]	245	250	255	
[1050]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
[1051]	260	265	270	
[1052]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			

[1053]	275	280	285
[1054]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
[1055]	290	295	300
[1056]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
[1057]	305	310	315
[1058]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[1059]		325	330
[1060]	<210> 47		
[1061]	<211> 330		
[1062]	<212> PRT		
[1063]	<213> 智人		
[1064]	<400> 47		
[1065]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
[1066]	1	5	10
[1067]	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
[1068]		20	25
[1069]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
[1070]		35	40
[1071]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
[1072]		50	55
[1073]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
[1074]		65	70
[1075]	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
[1076]		85	90
[1077]	Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
[1078]		100	105
[1079]	Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
[1080]		115	120
[1081]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
[1082]		130	135
[1083]	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
[1084]		145	150
[1085]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
[1086]		165	170
[1087]	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
[1088]		180	185
[1089]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
[1090]		195	200
[1091]	Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		

[1092]	210	215	220
[1093]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
[1094]	225	230	235
[1095]	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		240
[1096]	245	250	255
[1097]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
[1098]	260	265	270
[1099]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
[1100]	275	280	285
[1101]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
[1102]	290	295	300
[1103]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
[1104]	305	310	315
[1105]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[1106]	325	330	
[1107]	<210> 48		
[1108]	<211> 574		
[1109]	<212> PRT		
[1110]	<213> 智人		
[1111]	<400> 48		
[1112]	Met Cys Pro Arg Ala Ala Arg Ala Pro Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu		
[1113]	1	5	10
			15
[1114]	Gly Ala Val Leu Trp Pro Ala Ala Gly Ala Trp Glu Leu Thr Ile Leu		
[1115]	20	25	30
[1116]	His Thr Asn Asp Val His Ser Arg Leu Glu Gln Thr Ser Glu Asp Ser		
[1117]	35	40	45
[1118]	Ser Lys Cys Val Asn Ala Ser Arg Cys Met Gly Gly Val Ala Arg Leu		
[1119]	50	55	60
[1120]	Phe Thr Lys Val Gln Gln Ile Arg Arg Ala Glu Pro Asn Val Leu Leu		
[1121]	65	70	75
			80
[1122]	Leu Asp Ala Gly Asp Gln Tyr Gln Gly Thr Ile Trp Phe Thr Val Tyr		
[1123]	85	90	95
[1124]	Lys Gly Ala Glu Val Ala His Phe Met Asn Ala Leu Arg Tyr Asp Ala		
[1125]	100	105	110
[1126]	Met Ala Leu Gly Asn His Glu Phe Asp Asn Gly Val Glu Gly Leu Ile		
[1127]	115	120	125
[1128]	Glu Pro Leu Leu Lys Glu Ala Lys Phe Pro Ile Leu Ser Ala Asn Ile		
[1129]	130	135	140
[1130]	Lys Ala Lys Gly Pro Leu Ala Ser Gln Ile Ser Gly Leu Tyr Leu Pro		

[1131]	145	150	155	160
[1132]	Tyr Lys Val Leu Pro Val Gly Asp Glu Val Val Gly Ile Val Gly Tyr			
[1133]	165	170	175	
[1134]	Thr Ser Lys Glu Thr Pro Phe Leu Ser Asn Pro Gly Thr Asn Leu Val			
[1135]	180	185	190	
[1136]	Phe Glu Asp Glu Ile Thr Ala Leu Gln Pro Glu Val Asp Lys Leu Lys			
[1137]	195	200	205	
[1138]	Thr Leu Asn Val Asn Lys Ile Ile Ala Leu Gly His Ser Gly Phe Glu			
[1139]	210	215	220	
[1140]	Met Asp Lys Leu Ile Ala Gln Lys Val Arg Gly Val Asp Val Val Val			
[1141]	225	230	235	240
[1142]	Gly Gly His Ser Asn Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Asn Pro Pro Ser Lys			
[1143]	245	250	255	
[1144]	Glu Val Pro Ala Gly Lys Tyr Pro Phe Ile Val Thr Ser Asp Asp Gly			
[1145]	260	265	270	
[1146]	Arg Lys Val Pro Val Val Gln Ala Tyr Ala Phe Gly Lys Tyr Leu Gly			
[1147]	275	280	285	
[1148]	Tyr Leu Lys Ile Glu Phe Asp Glu Arg Gly Asn Val Ile Ser Ser His			
[1149]	290	295	300	
[1150]	Gly Asn Pro Ile Leu Leu Asn Ser Ser Ile Pro Glu Asp Pro Ser Ile			
[1151]	305	310	315	320
[1152]	Lys Ala Asp Ile Asn Lys Trp Arg Ile Lys Leu Asp Asn Tyr Ser Thr			
[1153]	325	330	335	
[1154]	Gln Glu Leu Gly Lys Thr Ile Val Tyr Leu Asp Gly Ser Ser Gln Ser			
[1155]	340	345	350	
[1156]	Cys Arg Phe Arg Glu Cys Asn Met Gly Asn Leu Ile Cys Asp Ala Met			
[1157]	355	360	365	
[1158]	Ile Asn Asn Asn Leu Arg His Thr Asp Glu Met Phe Trp Asn His Val			
[1159]	370	375	380	
[1160]	Ser Met Cys Ile Leu Asn Gly Gly Ile Arg Ser Pro Ile Asp Glu			
[1161]	385	390	395	400
[1162]	Arg Asn Asn Gly Thr Ile Thr Trp Glu Asn Leu Ala Ala Val Leu Pro			
[1163]	405	410	415	
[1164]	Phe Gly Gly Thr Phe Asp Leu Val Gln Leu Lys Gly Ser Thr Leu Lys			
[1165]	420	425	430	
[1166]	Lys Ala Phe Glu His Ser Val His Arg Tyr Gly Gln Ser Thr Gly Glu			
[1167]	435	440	445	
[1168]	Phe Leu Gln Val Gly Gly Ile His Val Val Tyr Asp Leu Ser Arg Lys			
[1169]	450	455	460	

[1170]	Pro Gly Asp Arg Val Val Lys Leu Asp Val Leu Cys Thr Lys Cys Arg			
[1171]	465	470	475	480
[1172]	Val Pro Ser Tyr Asp Pro Leu Lys Met Asp Glu Val Tyr Lys Val Ile			
[1173]	485	490	495	
[1174]	Leu Pro Asn Phe Leu Ala Asn Gly Gly Asp Gly Phe Gln Met Ile Lys			
[1175]	500	505	510	
[1176]	Asp Glu Leu Leu Arg His Asp Ser Gly Asp Gln Asp Ile Asn Val Val			
[1177]	515	520	525	
[1178]	Ser Thr Tyr Ile Ser Lys Met Lys Val Ile Tyr Pro Ala Val Glu Gly			
[1179]	530	535	540	
[1180]	Arg Ile Lys Phe Ser Thr Gly Ser His Cys His Gly Ser Phe Ser Leu			
[1181]	545	550	555	560
[1182]	Ile Phe Leu Ser Leu Trp Ala Val Ile Phe Val Leu Tyr Gln			
[1183]	565	570		

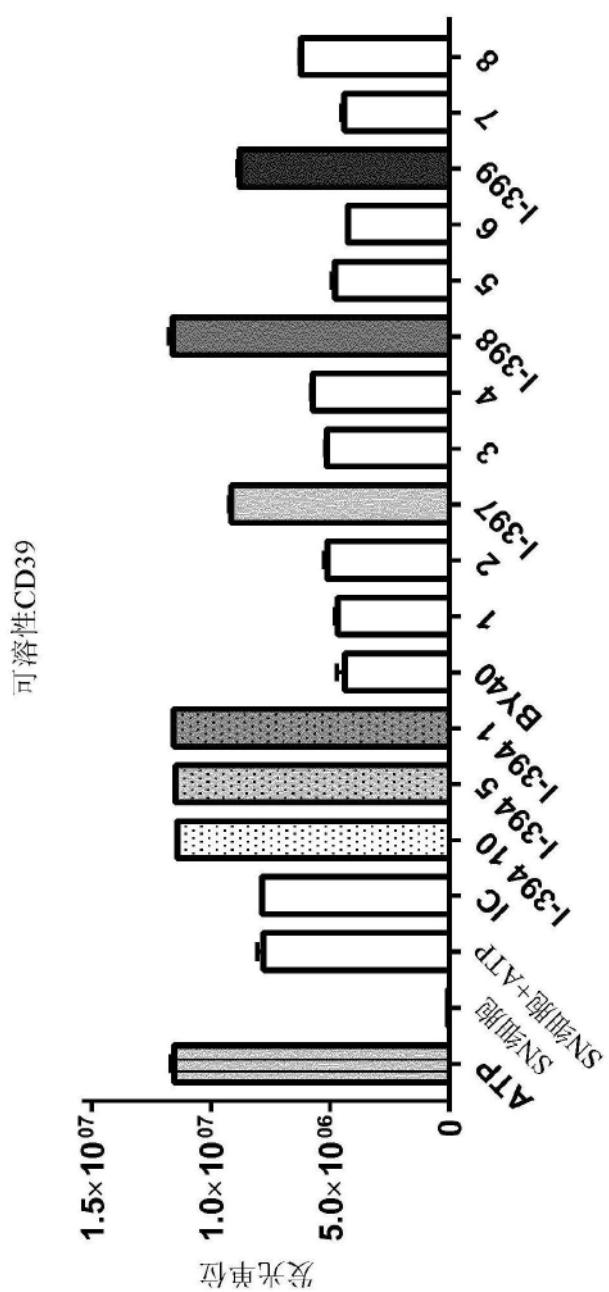


图1

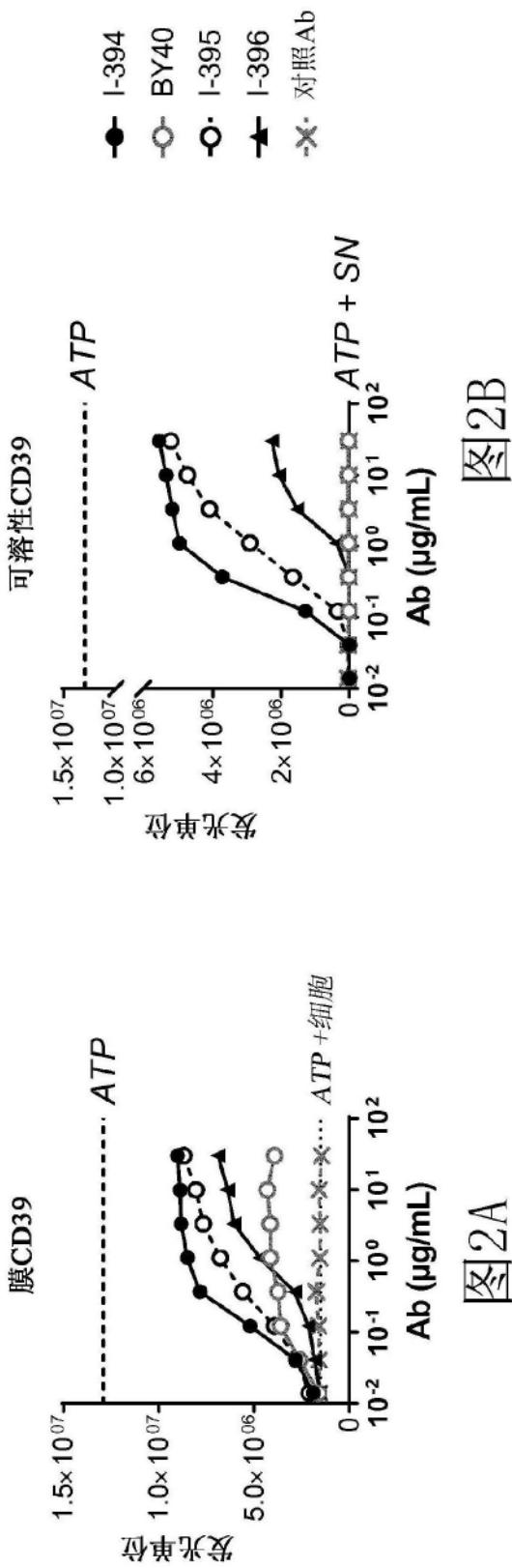


图2B

图2A

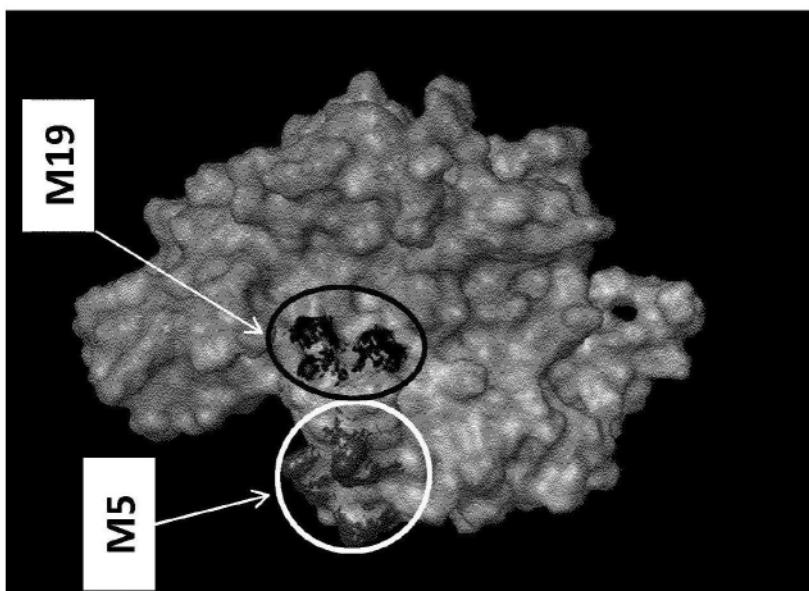
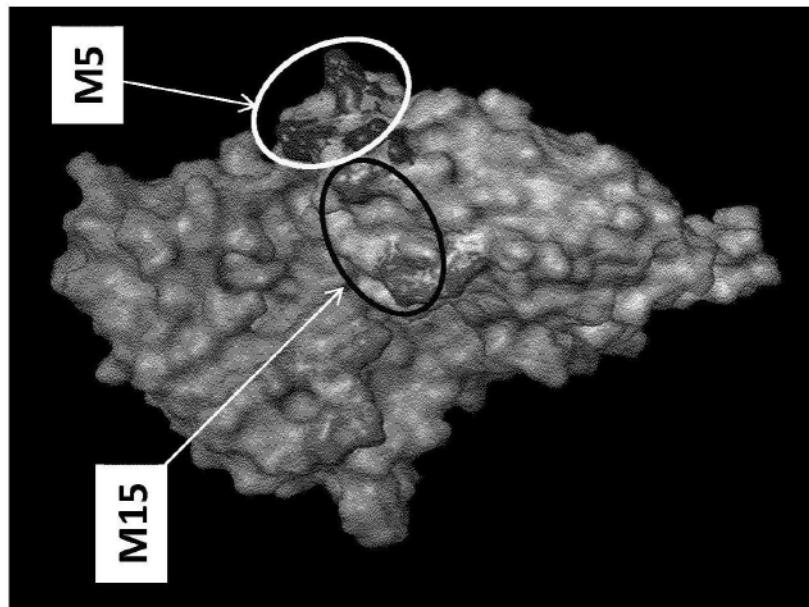
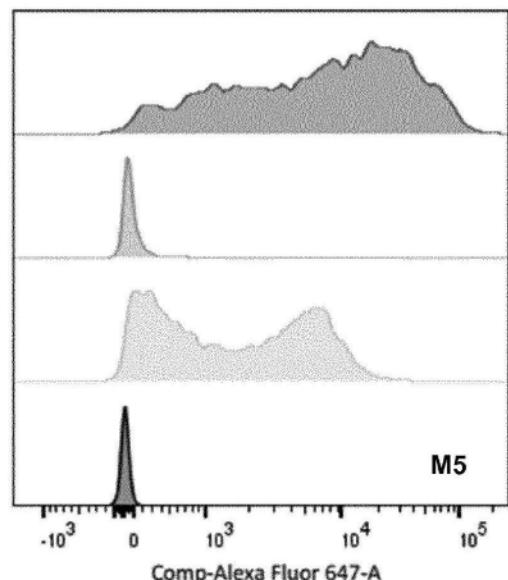
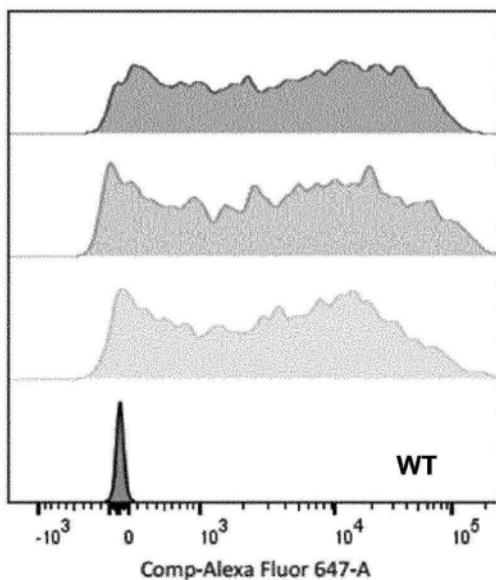
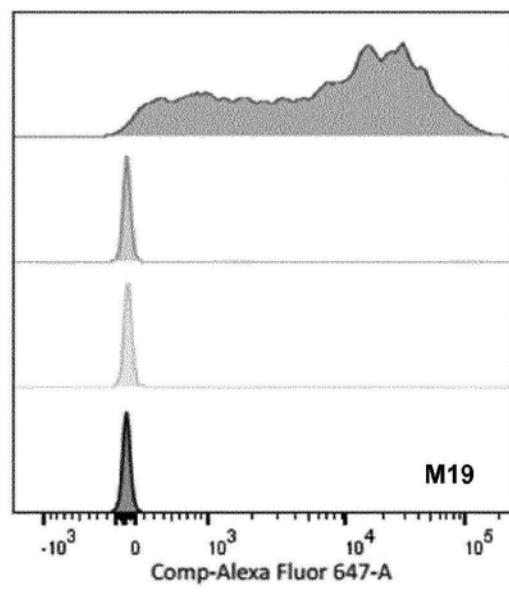
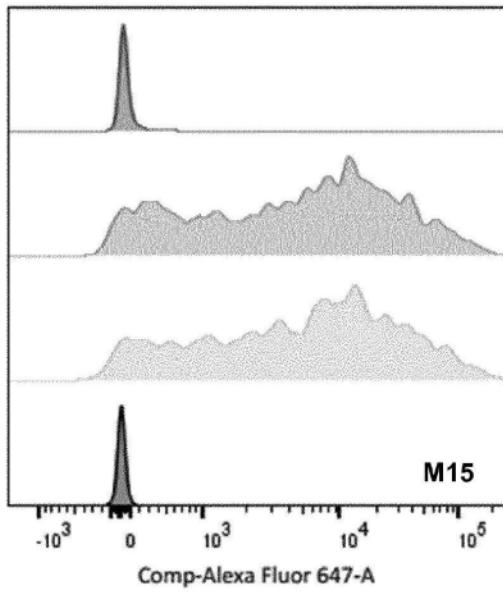


图3A



	管名称	计数	中值: Comp-Alexa fluor 647-A
	I-396	2487	4343
	I-395	2565	4237
	I-394	2151	3716
	US	1942	10.3

	管名称	计数	中值: Comp-Alexa fluor 647-A
	I-396	2152	8189
	I-395	2281	52.6
	I-394	2219	1459
	US	1524	8.98



	管名称	计数	中值: Comp-Alexa fluor 647-A
	I-396	2186	35.9
	I-395	2138	5750
	I-394	2014	6363
	US	1908	8.98

	管名称	计数	中值: Comp-Alexa fluor 647-A
	I-396	2375	8893
	I-395	2698	15.4
	I-394	2611	24.4
	US	1879	8.98

图3B

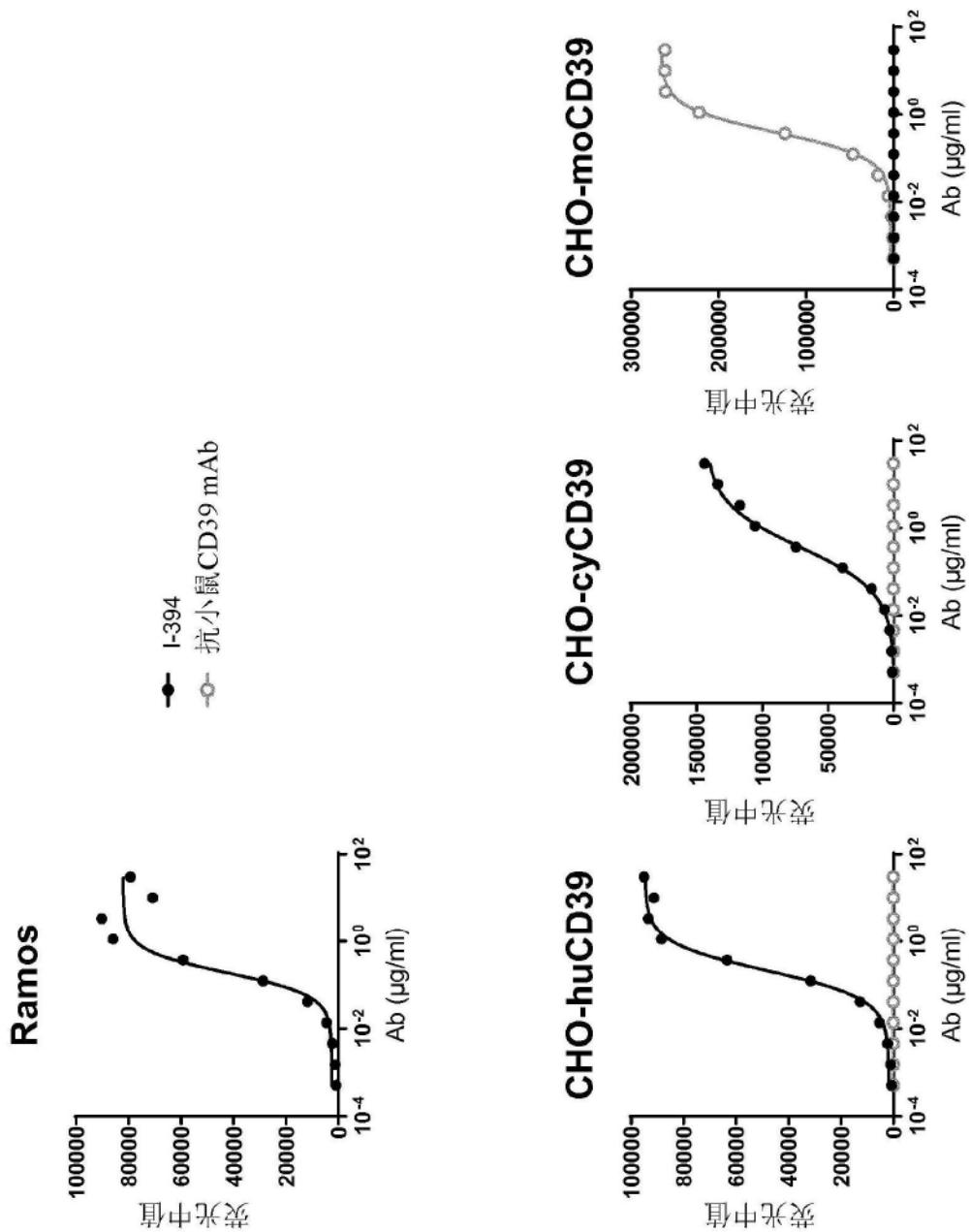


图4

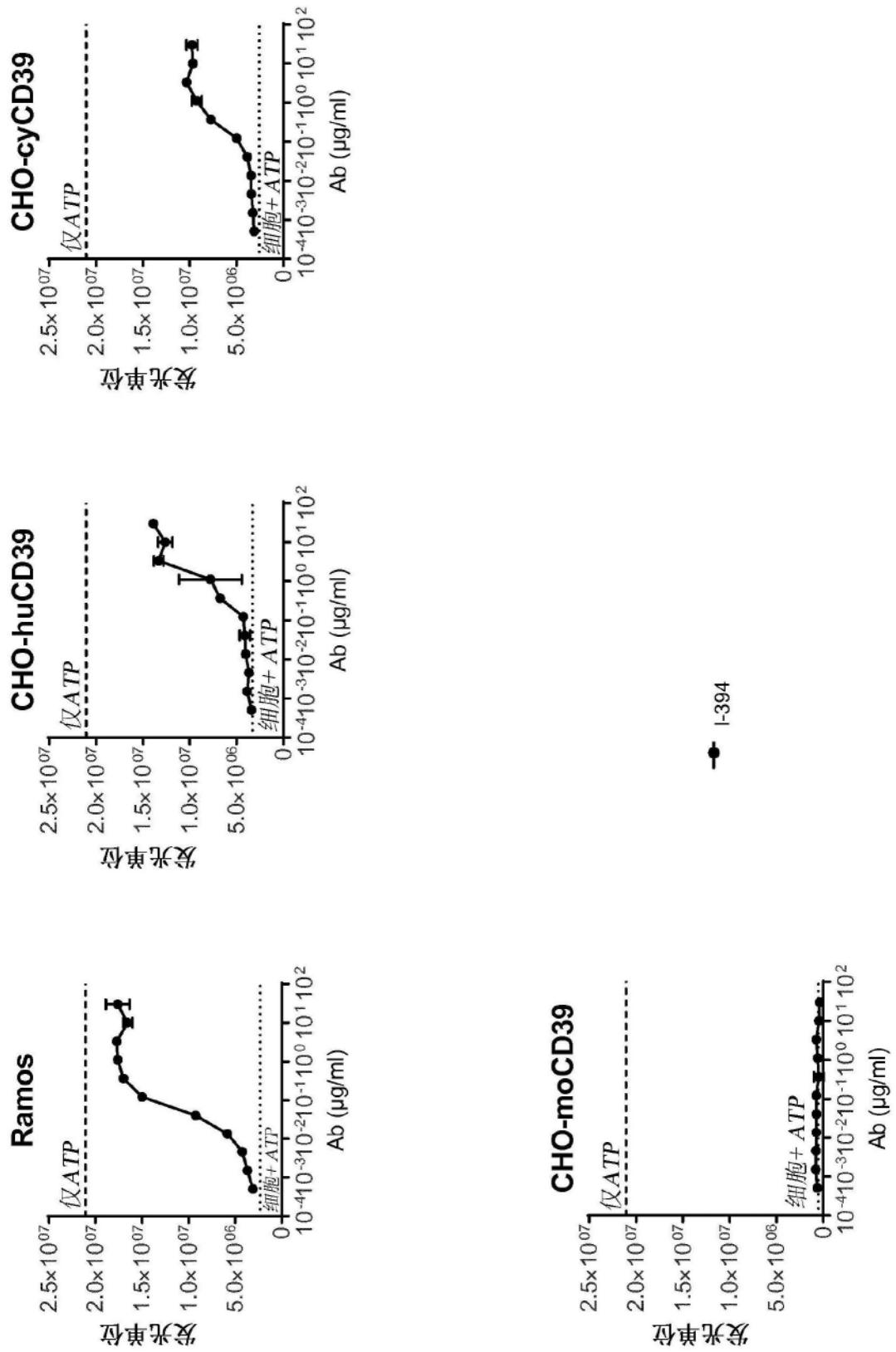


图5

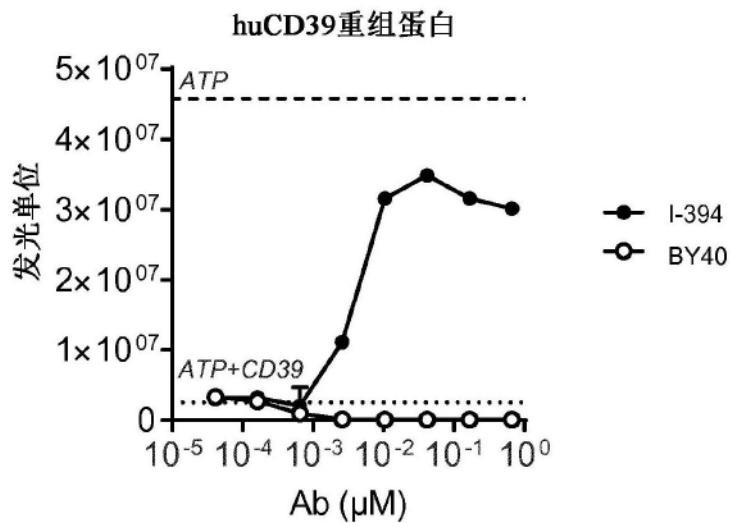


图6

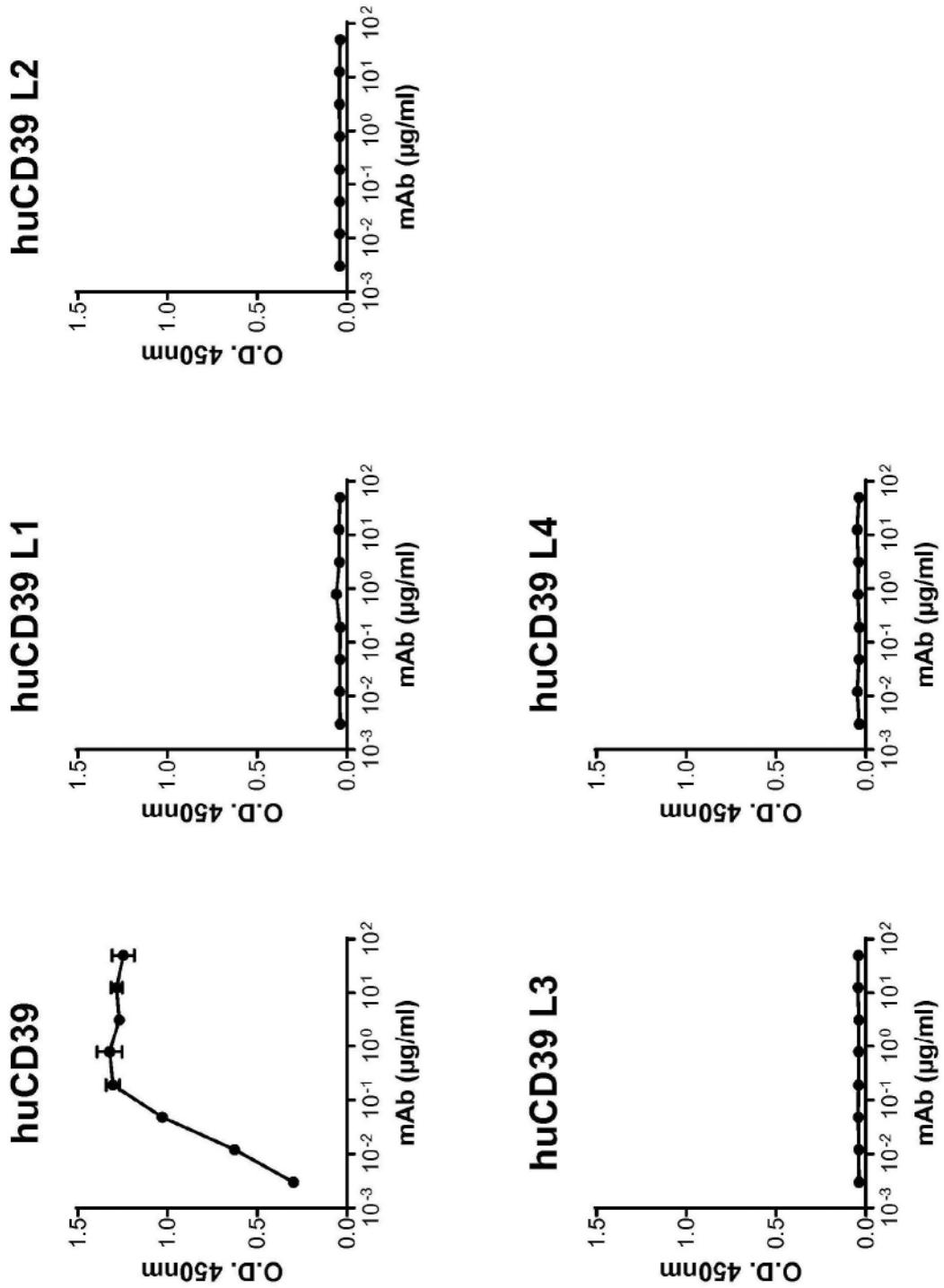
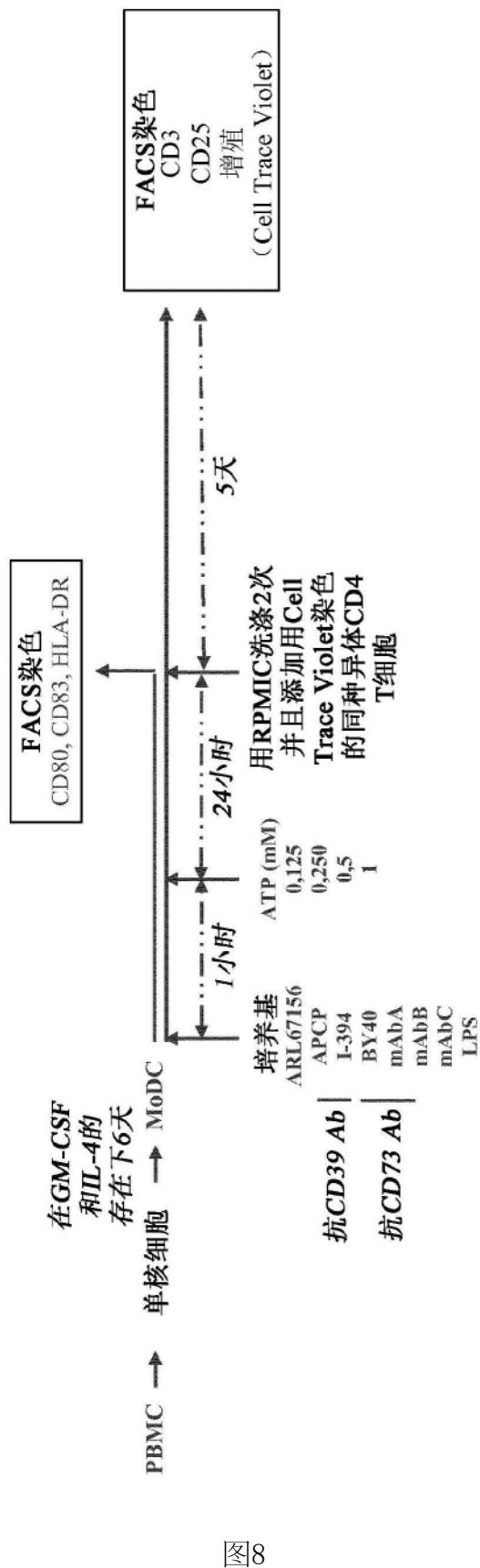


图7



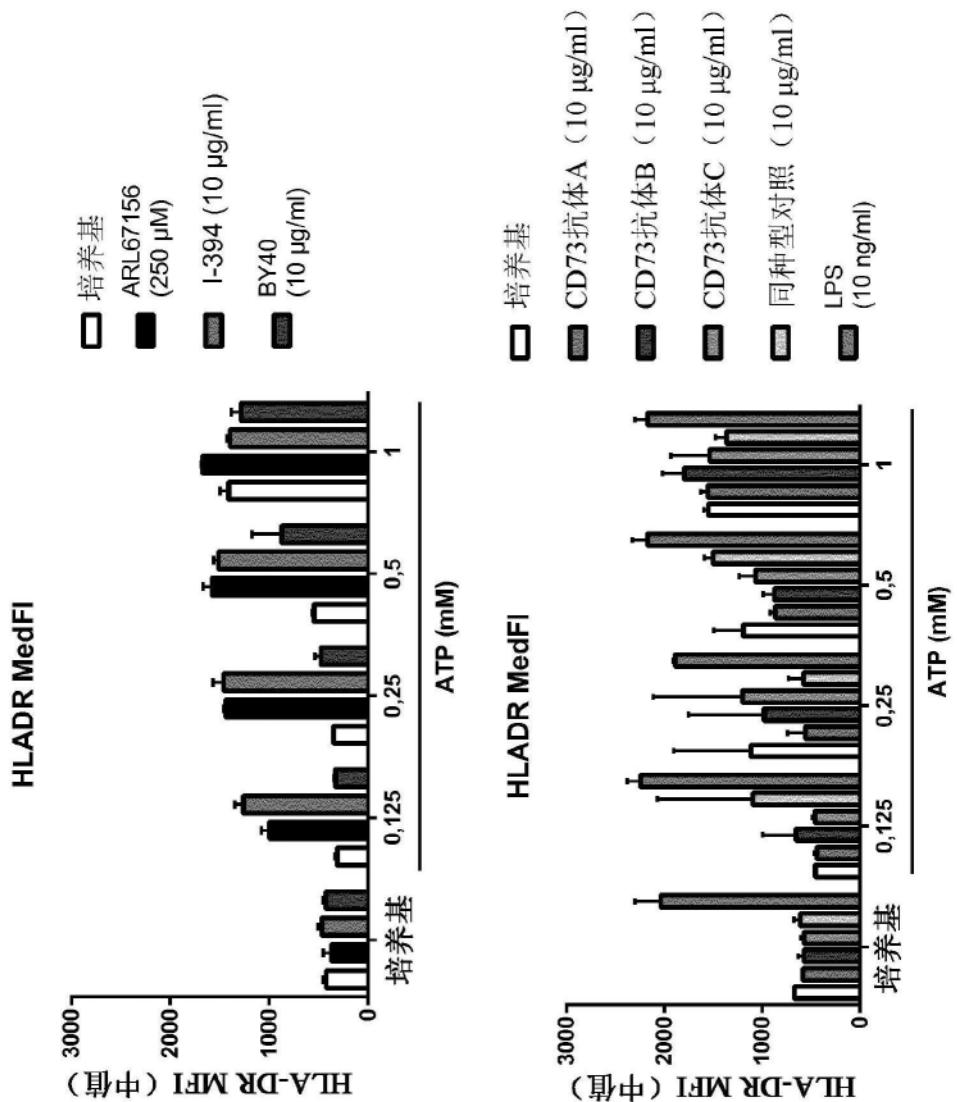


图9

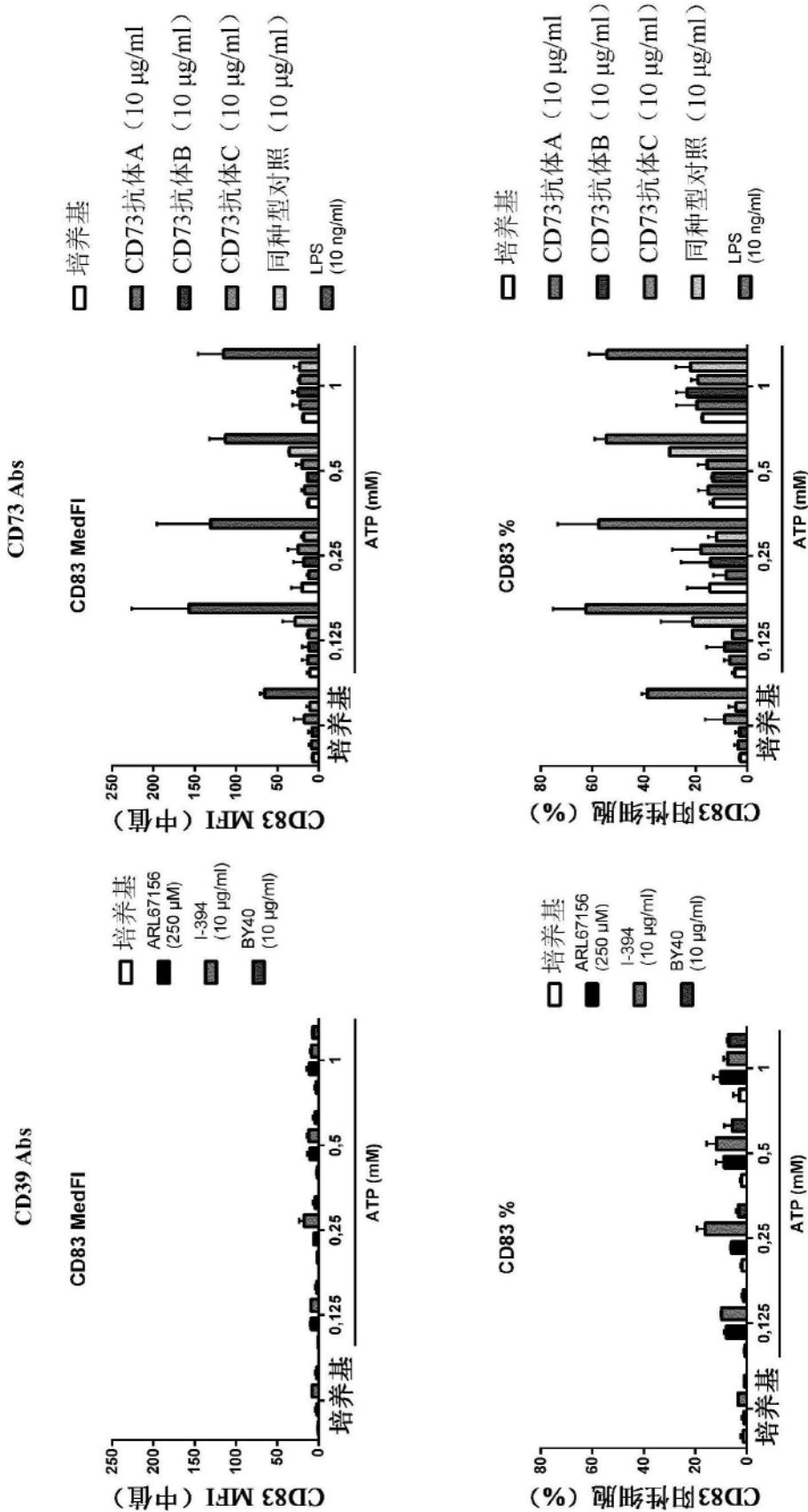


图10

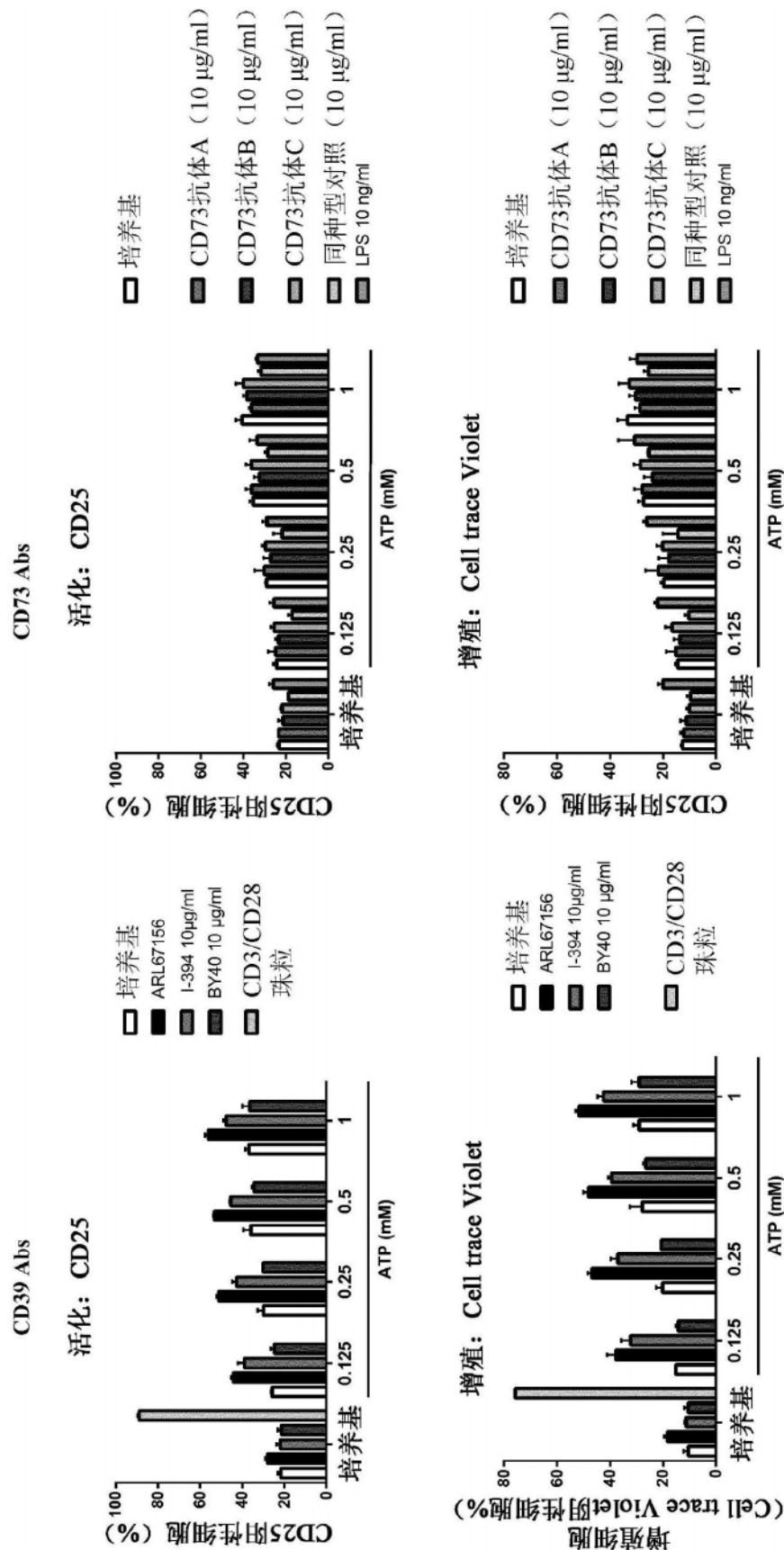


图11

奥沙利铂 (Oxa) 单一注射第5天

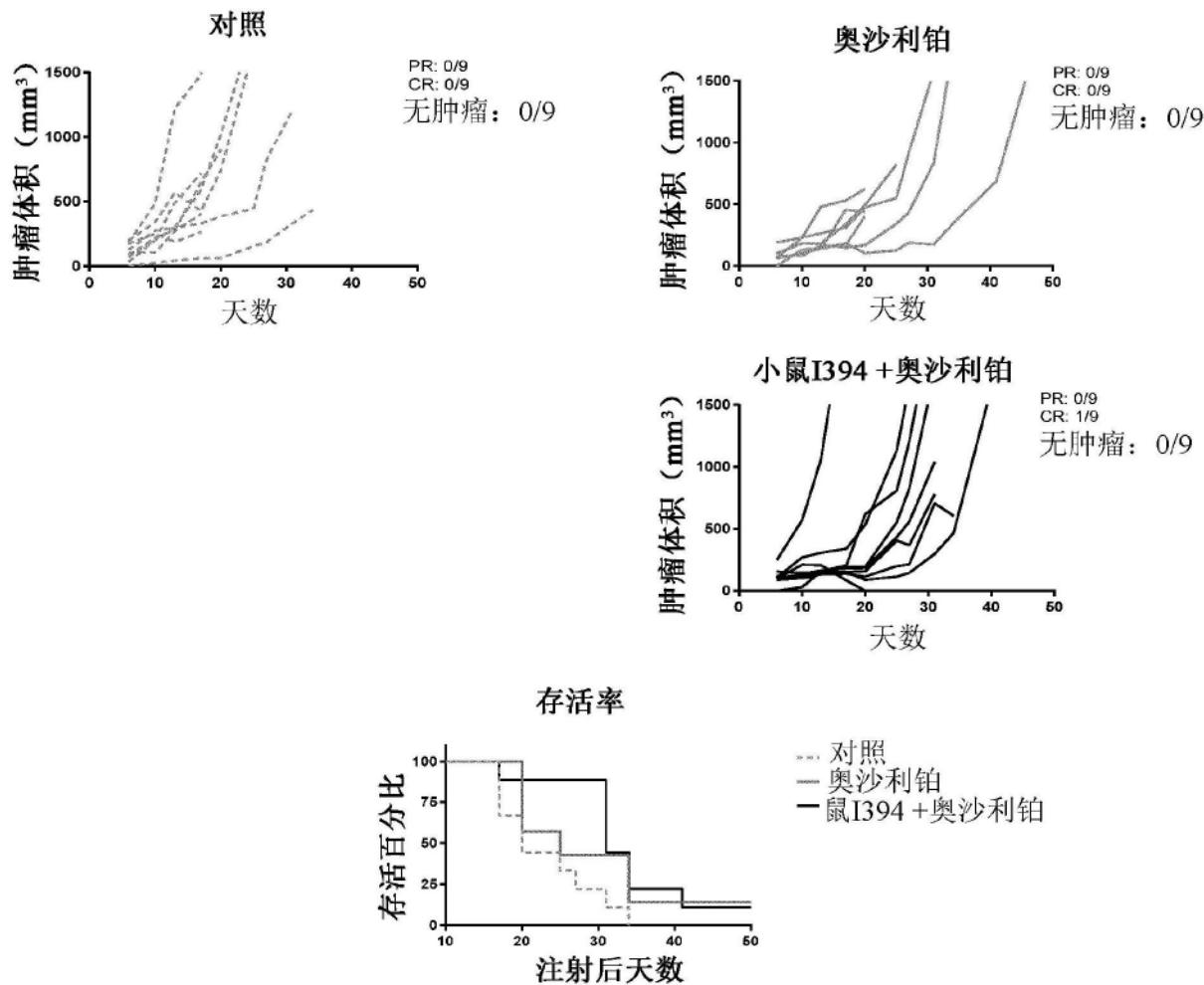


图12

d5, d12奥沙利铂重复注射

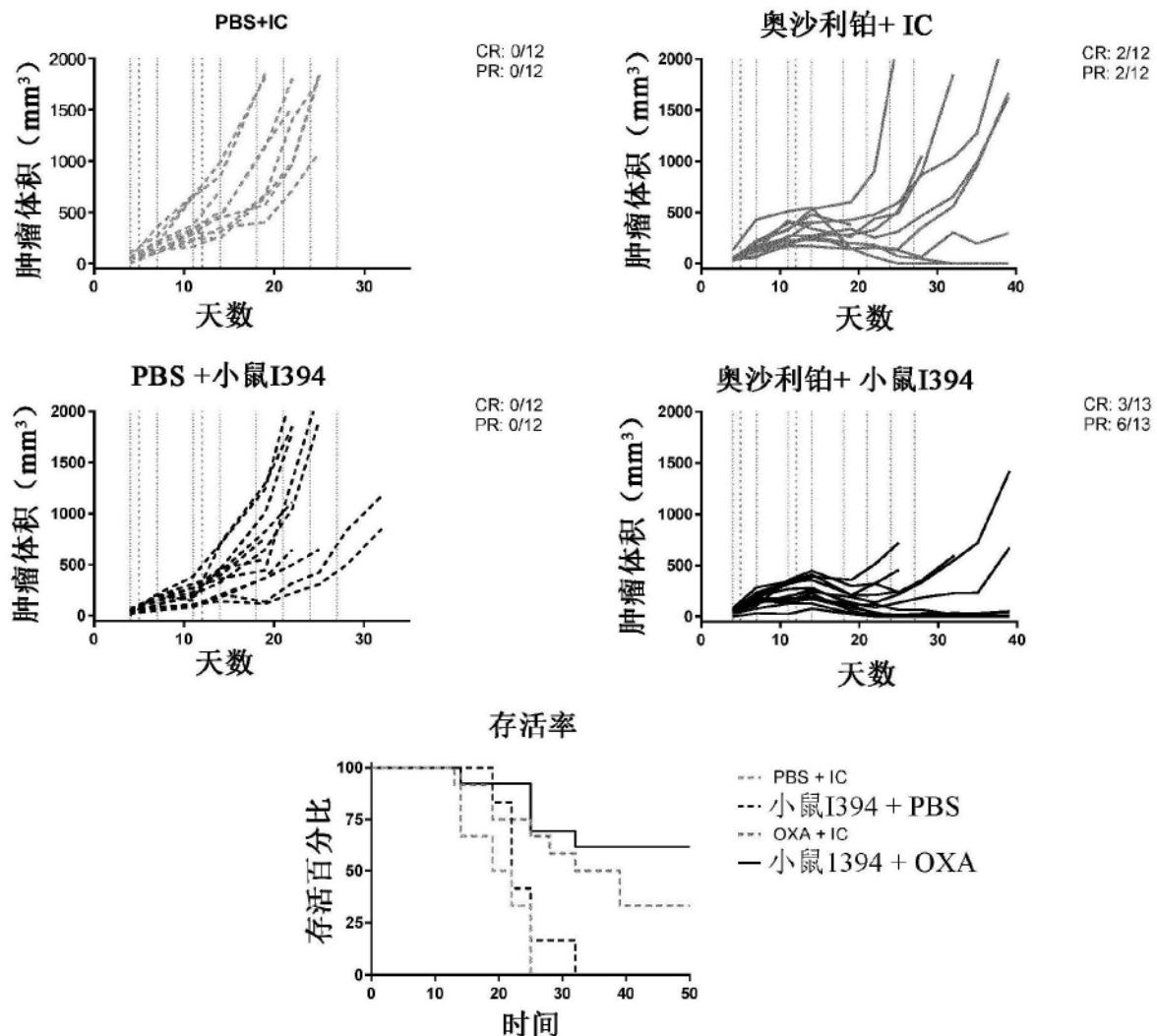


图13