(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116348140 A
(43)申请公布日 2023.06.27

(21)申请号 202180067415.9
(22)申请日 2021.09.30
(30)优先权数据
63/085,612 2020.09.30 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.03.30
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/052819 2021.09.30
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/072601 EN 2022.04.07
(71)申请人 北美生物技术公司
地址 美国马萨诸塞州,伍斯特市
申请人 安普生物医药科技(深圳)有限公司
(72)发明人 刘淑颖 赵新燕 胡昌云
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 彭鲲鹏 刘瑾
(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)

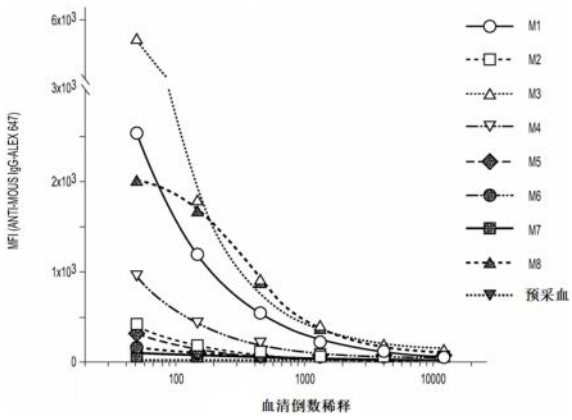
权利要求书4页 说明书53页 附图7页

(54)发明名称

抗腺苷受体(A2aR)抗体

(57)摘要

本发明提供了一种抗A2aR抗原结合分子,包括抗体及其抗原结合片段,以及使用所述分子治疗与异常腺苷信号传导相关的多种疾病的方法,其中所述疾病包括癌症、慢性疾病、慢性感染、自身免疫性疾病、炎性疾病、神经退行性疾病和纤维化疾病。



CN 116348140 A

1.一种结合人腺苷A2A受体(A2aR)的分离的抗体或其抗原结合片段,包含:

重链可变区(VH),所述重链可变区从N端到C端包含三个重链互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3;和

轻链可变区(VL),所述轻链可变区从N端到C端包含三个轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3;其中

(a)HCDR1包含氨基酸序列X_1-X_2-W-M-N(SEQ ID NO:8),其中X_1为S或R,X_2为Y或F;

(b)HCDR2包含氨基酸序列R-I-D-P-X_3-D-S-E-X_4-X_5-Y-X_6-H-K-F-W-X_7(SEQ ID NO:9),其中X_3为S或Y,X_4为A或T,X_5为H或Q,X_6为H或N,X_7为D或G;

(c)HCDR3包含氨基酸序列SLYGKGDY(SEQ ID NO:3);

(d)LCDR1包含氨基酸序列

R-S-S-Q-S-X_{17}-V-H-X_{18}-N-G-N-T-Y-L-E(SEQ ID NO:30),其中X_{17}为L或I,X_{18}为R或S;

(e)LCDR2包含氨基酸序列K-V-S-N-R-F-S(SEQ ID NO:26);和

(f)LCDR3包含氨基酸序列X_{19}-Q-G-S-H-V-P-L-T(SEQ ID NO:31),其中X_{19}为Y或F。

2.根据权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中:

(a)HCDR1包含选自SEQ ID NO:1、4和6所示的氨基酸序列;

(b)HCDR2包含选自SEQ ID NO:2、5和7所示的氨基酸序列;

(c)HCDR3包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列;

(d)LCDR1包含SEQ ID NO:25或28所示的氨基酸序列;

(e)LCDR2包含SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列;和

(f)LCDR3包含SEQ ID NO:27或29所示的氨基酸序列。

3.根据权利要求2所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含:

(a)包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:26所示氨基酸序列的LCDR2,包含SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的LCDR3;

(b)包含SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:28所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:26所示氨基酸序列的LCDR2,包含SEQ ID NO:29所示氨基酸序列的LCDR3;或

(c)包含SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:26所示氨基酸序列的LCDR2,包含SEQ ID NO:29所示氨基酸序列的LCDR3。

4.根据权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中

(a)HCDR1包含选自SEQ ID NO:21、22、23和24所示的氨基酸序列;和

(b)HCDR3包含选自SEQ ID NO:12、15和20所示的氨基酸序列。

5.根据权利要求1-4任意一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含:

(a)重链可变区(HCVR),所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:35、36、37、38、39和40所

示的氨基酸序列;和

(b)轻链可变区(LCVR),所述轻链可变区包含选自SEQ ID NO:41、42和43所示的氨基酸序列。

6.根据权利要求5所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含:

(a)包含SEQ ID NO:35或38所示的氨基酸序列的HCVR,和包含SEQ ID NO:41所示氨基酸序列的LCVR;

(b)包含SEQ ID NO:36或39所示的氨基酸序列的HCVR,和包含SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列的LCVR;或

(c)包含SEQ ID NO:37或40所示的氨基酸序列的HCVR,和包含SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的LCVR。

7.一种结合人腺苷A2A受体(人A2aR)的分离的抗体或其抗原结合片段,包含:

重链可变区(VH),所述重链可变区从N端到C端包含三个重链互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3;和

轻链可变区(VL),所述轻链可变区从N端到C端包含三个轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3;其中

(a)HCDR1包含与选自SEQ ID NO:1、4和6的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%同一性的氨基酸序列;

(b)HCDR2包含与选自SEQ ID NO:2、5和7的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%同一性的氨基酸序列;

(c)HCDR3包含与SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%同一性的氨基酸序列;

(d)LCDR1包含与选自SEQ ID NO:25和28的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%同一性的氨基酸序列;

(e)LCDR2包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%同一性的氨基酸序列;和

(f)LCDR3包含与选自SEQ ID NO:27或29的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%同一性的氨基酸序列。

8.一种结合人腺苷A2A受体(人A2aR)的分离的抗体或其抗原结合片段,包含:

(a)重链可变区(HCVR),其包含与选自SEQ ID NO:35、36和37的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%同一性的氨基酸序列;和

(b)轻链可变区(LCVR),其包含与选自SEQ ID NO:41、42和43的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%同一性的氨基酸序列。

9.一种结合人腺苷A2A受体(人A2aR)的分离的抗体或其抗原结合片段,包含:

(a)包含SEQ ID NO:35或38所示的氨基酸序列的重链可变区(HCVR);和

(b)包含SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)。

10.一种结合人腺苷A2A受体(人A2aR)的分离的抗体或其抗原结合片段,包含:

(a)包含SEQ ID NO:36或39所示的氨基酸序列的重链可变区(HCVR);和

(b)包含SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)。

11.根据权利要求1-10任意一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中重链和/或

轻链的N端是焦谷氨酸(pE)残基。

12.根据权利要求1-11任意一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中

(i)所述抗体与选自1B5-3D7、3F6-9G5或3F8-12E9的单克隆抗体竞争结合人A2aR;

(ii)所述抗体抑制A2aR的活性;

(iii)所述抗体提高免疫反应;

(iv)所述抗体特异性结合细胞表面人A2aR;

(v)所述抗体降低组织中的cAMP浓度;

(vi)所述抗体降低蛋白激酶A的活性;

(vii)所述抗体减少A2aR信号通路的cAMP反应元件的磷酸化;或

(viii)所述抗体特异性结合人和/或食蟹猴A2aR。

13.一种分离的抗体或其抗原结合片段,其与权利要求1-12任意一项所述的抗体竞争结合人A2aR。

14.根据权利要求1-13任意一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是人源化抗体或嵌合抗体。

15.根据权利要求1-14任意一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含选自IgA、IgD、IgE、IgG和IgM类的重链恒定区。

16.根据权利要求15所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含IgG类的重链恒定区,其中IgG选自IgG4、IgGl、IgG2和IgG3。

17.一种分离的多核苷酸,其编码权利要求1-16任意一项所述的抗体或其抗原结合片段、其HCVR、其LCVR、其轻链、其重链或其抗原结合片段。

18.一种表达载体,包含权利要求17所述的多核苷酸。

19.一种重组细胞,包含权利要求17所述的多核苷酸或权利要求18所述的表达载体。

20.制备权利要求1-16任意一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法,包括在权利要求17所述的重组细胞中表达所述抗体并分离表达的抗体。

21.一种药物组合物,其包含权利要求1-16任意一项所述的抗体或其抗原结合片段,以及药学上可接受的载体或稀释剂。

22.根据权利要求19所述的药物组合物,其中所述药物组合物包含有效量的所述抗体或其抗原结合片段,使其(a)特异性结合细胞表面人或食蟹猴A2aR;(b)降低组织中的cAMP浓度;(c)抑制人A2aR的活性;(d)减少A2aR信号通路的cAMP反应元件的磷酸化;(e)提高免疫细胞的免疫反应;(f)降低蛋白激酶A活性;或(g)实现(a)-(f)的任意组合。

23.抑制细胞表面表达的A2aR的活性的方法,包括使细胞与权利要求1-16任意一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,或权利要求21或22所述的药物组合物接触,从而抑制细胞中的A2aR活性。

24.增强受试者免疫反应的方法,包括向所述受试者施用权利要求1-16任意一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段或权利要求21或22所述的药物组合物,从而增强所述受试者的免疫反应。

25.抑制受试者肿瘤生长的方法,包括向所述受试者施用权利要求1-16任意一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段或权利要求21或22所述的药物组合物,从而抑制肿瘤的生长。

26.治疗受试者癌症的方法，向所述受试者施用权利要求1-16任意一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段或权利要求21或22所述的药物组合物，从而治疗癌症。

27.根据权利要求23-26任意一项所述的方法，其中所述方法激活T细胞并引导其杀死肿瘤靶细胞。

28.根据权利要求23-27任意一项所述的方法，还包括施用其他治疗剂。

29.根据权利要求28所述的方法，其中所述其他治疗剂包括抗肿瘤剂、放疗、化疗剂、手术、癌症疫苗、免疫细胞刺激受体的激动剂、细胞因子、细胞疗法，或检查点抑制剂。

30.根据权利要求29所述的方法，其中所述检查点抑制剂选自PD-1、PD-L1、TIGIT、CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、TIM-3、神经突蛋白、BTLA、CECAM-1、CECAM-5、IL-1R8、VISTA、LAIR1、LILRB1、LILRB2、LILRB3、LILRB4、LILRB5、CD96、CD112R、2B4、TGFβ-R、KIR、NKG2A的抑制剂及其任意组合。

31.根据权利要求30所述的方法，其中所述抑制剂抑制PD-1和PD-L1之间的相互作用，所述抑制剂选自帕博利珠单抗、纳武利尤单抗、阿特珠单抗、阿维鲁单抗、度伐利尤单抗、BMS-936559、信迪利单抗、特瑞普利单抗、替雷利珠单抗、卡瑞利珠单抗、舒格利单抗、派安普利单抗、卡度尼利单抗、磺胺间甲氧嘧啶1和磺胺甲二唑2。

32.根据权利要求30所述的方法，其中所述CTLA4抑制剂选自伊匹单抗、卡度尼利单抗和YH001(祐和医药)。

33.根据权利要求29所述的方法，其中所述其他治疗剂为免疫细胞刺激受体的激动剂，所述激动剂选自：OX40、CD2、CD27、CD3、ICAM-1、LFA-1、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD28、CD30、CD40、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、NKG2D、SLAMF7、NKp46、NKp80、CD160及其任意组合。

34.根据权利要求28-33任意一项所述的方法，其中所述其他治疗剂与所述抗体配制在相同的药物组合物中。

35.根据权利要求28-33任意一项所述的方法，其中所述其他治疗剂与所述抗体配制在不同的药物组合物中。

36.根据权利要求28-33和35任意一项所述的方法，其中在施用所述抗体之前和/或之后施用所述其他治疗剂。

37.根据权利要求28-35任意一项所述的方法，其中同时施用所述其他治疗剂与所述抗体或其抗原结合片段。

38.一种试剂盒，包含权利要求21或22所述的药物组合物。

39.根据权利要求38所述的试剂盒，还包含其他治疗剂。

抗腺苷受体(A2aR)抗体

本申请涉及并要求于2020年9月30日提交的申请号为63/085,612的美国临时申请的优先权。上述申请的全部内容通过引用明确并入本文。

技术领域

[0001] 本发明涉及用于癌症治疗的抗体,尤其涉及用于癌症免疫治疗的腺苷受体A2aR的抗体。

背景技术

[0002] 免疫系统在肿瘤细胞的识别和消除中起着重要作用。肿瘤细胞利用各种机制来逃避免疫介导的肿瘤细胞损伤。在这些通路中,肿瘤细胞利用腺苷(一种效应T细胞功能的高效抑制剂)信号通路来提高腺苷水平和对腺苷的反应性以规避免疫防御。

[0003] 腺苷是一种嘌呤核苷,由三磷酸腺苷(ATP)降解产生。在不利条件下(如缺氧、局部缺血、炎症或癌症),腺苷在细胞外的水平显著增加。腺苷一旦被释放,其通过与四种已知的G蛋白偶联受体(即腺苷A1受体亚型(A1R)、腺苷A2A受体亚型(A2aR)、腺苷A2B受体亚型(A2bR)和腺苷A3受体亚型(A3R))的作用来激活细胞信号通路。

[0004] 腺苷水平主要受CD39和CD73的活性控制。CD39和CD73是两种胞外酶,其在两步反应中共同作用,将促炎性ATP转化为免疫抑制性腺苷。CD39将ATP水解成AMP,AMP进一步被CD73水解成腺苷,腺苷可以很容易地进入大多数细胞。此外,当肿瘤细胞因代谢或缺氧应激而发生细胞死亡时,其将细胞内储存的ATP(通常无法透过细胞)释放到细胞外空间。

[0005] 在肿瘤微环境中,CD73产生的腺苷可促进肿瘤细胞的生长和存活,同时抑制抗肿瘤免疫反应。癌细胞在肿瘤组织中高水平表达CD73,并且CD73的积累与乳腺癌和卵巢癌患者的低总生存率和低无复发生存率有关。CD73和腺苷支持癌细胞中促生长新血管的形成、以及癌细胞的转移和存活。腺苷结合T细胞上的A2A(或A_{2A})受体(A2aR)并激活细胞内信号传导级联反应,从而抑制T细胞的激活和功能。A2aR是G蛋白偶联受体腺苷受体的一员,该受体还包括A1R、A2bR和A3R,并且A2aR是一种细胞外腺苷的抗炎效应物,主要在脑和淋巴组织细胞中表达。

[0006] 免疫微环境中异常高浓度的腺苷会激活A2aR,并引发可以使肿瘤逃避免疫识别的负反馈回路。具体而言,腺苷介导的A2aR的激活使肿瘤能够通过以下方式来逃逸免疫监视:抑制IFNγ的产生,抑制多种抗肿瘤免疫细胞(包括$CD8^+$T细胞、树突细胞、自然杀伤细胞和M1巨噬细胞)的活性,同时增强免疫抑制细胞类(包括骨髓来源的抑制细胞(MDSCs)和T调节(T_{reg})细胞)的活性。肿瘤细胞上的A2aRs的激活还可以促进肿瘤细胞转移。

[0007] 尽管一些A2A受体小分子拮抗剂已进入治疗帕金森病和癌症的临床试验阶段,但在癌症治疗方面仍缺乏用生物制剂候选药物来阻断A2aR。用A2aR拮抗剂(例如ZM241385)处理的小鼠由于对效应T细胞的免疫抑制降低而显示出肿瘤生长显著延迟。A2aR敲除小鼠进一步强调了这一点,该小鼠显示出肿瘤排斥增加。此外,与阻断单一PD-1/PD-L1或CTLA-4通路相比,将小分子拮抗剂阻断A2aR与单克隆抗体抑制PD-1/PD-L1或CTLA-4相结合,对提高

免疫反应有协同作用。

[0008] 因此，在肿瘤微环境中调节A2aR的活性、腺苷的浓度和/或CD39/CD73的表达和效应免疫细胞的激活是一种吸引人的治疗策略，其可以限制肿瘤的发展、改善抗肿瘤免疫反应、避免治疗引起的免疫偏差，以及潜在地限制对正常组织的毒性。本领域需要通过调节(例如抑制)免疫细胞的A2aR活性来治疗癌症的组合物和方法。

发明内容

[0009] 本发明提供一种抗原结合分子(例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段)用于通过特异性结合A2aR来调节(例如增强或抑制)A2aR的活性。所述A2aR可以在细胞表面上，该细胞为例如哺乳动物细胞(例如哺乳动物的免疫细胞(例如小鼠免疫细胞、食蟹猴免疫细胞或人免疫细胞))。本发明还提供了将本发明的抗原结合分子(例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段)用于调节(例如抑制)A2aR活性的方法，或用于治疗受益于调节(例如抑制)A2aR活性的受试者(例如患有或易于患有A2aR相关疾病的受试者)的方法。

一方面，本发明提供了一种结合人腺苷A2A受体(A2aR)的分离的抗原结合分子，例如抗体或其抗原结合片段。所述抗体包含重链可变区(VH)，所述重链可变区从N端到C端包含三个重链互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3；以及轻链可变区(VL)，所述轻链可变区从N端到C端包含三个轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3；其中，(a)HCDR1包含氨基酸序列X_1-X_2-W-M-N(SEQ ID NO:8)，其中X_1为S或R，X_2为Y或F；(b)HCDR2包含氨基酸序列R-I-D-P-X_3-D-S-E-X_4-X_5-Y-X_6-H-K-F-W-X_7(SEQ ID NO:9)，其中X_3为S或Y，X_4为A或T，X_5为H或Q，X_6为H或N，X_7为D或G；(c)HCDR3包含氨基酸序列SLYGKGDY(SEQ ID NO:3)；(d)LCDR1包含氨基酸序列R-S-S-Q-S-X_{17}-V-H-X_{18}-N-G-N-T-Y-L-E(SEQ ID NO:30)，其中X_{17}为L或I，X_{18}为R或S；(e)LCDR2包含氨基酸序列K-V-S-N-R-F-S(SEQ ID NO:26)；和(f)LCDR3包含氨基酸序列X_{19}-Q-G-S-H-V-P-L-T(SEQ ID NO:31)，其中X_{19}为Y或F。

[0010] 在本发明的各个方面及其实施方案中，所述抗体为抗体的抗原结合片段。在本发明的各个方面及其实施方案中，人A2aR包含SEQ ID NO:50所示的序列。

[0011] 在一个实施方案中，(a)HCDR1包含选自SEQ ID NO:1、4和6所示的氨基酸序列；(b)HCDR2包含选自SEQ ID NO:2、5和7所示的氨基酸序列；(c)HCDR3包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列；(d)LCDR1包含SEQ ID NO:25或28所示的氨基酸序列；(e)LCDR2包含SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列；和(f)LCDR3包含SEQ ID NO:27或29所示的氨基酸序列。

[0012] 在另一个实施方案中，所述分离的抗原结合分子，例如所述抗体，包含：(a)包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO:26所示氨基酸序列的LCDR2，包含SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的LCDR3；(b)包含SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO:28所示氨基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO:26所示氨基酸序列的LCDR2，包含SEQ ID NO:29所示氨基酸序列的LCDR3；或(c)包含SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的HCDR1，包含SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的HCDR2，包含SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的HCDR3，包含SEQ ID NO:25所示氨基酸序列的LCDR1，包含SEQ ID NO:26所示氨基酸序列的LCDR2，包含SEQ ID NO:29所示氨基酸序列的LCDR3。

[0013] 在又一个实施方案中，(a)HCDR1包含选自SEQ ID NO:21、22、23和24所示的氨基酸序列；和(b)HCDR3包含选自SEQ ID NO:12、15和20所示的氨基酸序列。

[0014] 在又一个实施方案中，所述抗原结合分子，例如所述抗体，包含：(a)重链可变区(HCVR)，所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:35、36、37、38、39和40所示的氨基酸序列；和(b)轻链可变区(LCVR)，所述轻链可变区包含选自SEQ ID NO:41、42和43所示的氨基酸序列。

[0015] 在一个实施方案中，所述抗原结合分子，例如所述抗体，包含：(a)包含SEQ ID NO:35或38所示的氨基酸序列的HCVR，和包含SEQ ID NO:41所示氨基酸序列的LCVR；(b)包含SEQ ID NO:36或39所示的氨基酸序列的HCVR，和包含SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列的LCVR；或(c)包含SEQ ID NO:37或40所示的氨基酸序列的HCVR，和包含SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的LCVR。

另一方面，本发明提供一种分离的抗原结合分子，例如结合人腺苷A2A受体(A2aR)的抗体。所述抗原结合分子，例如所述抗体，包含：重链可变区(VH)，所述重链可变区从N端到C端包含三个重链互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3；和轻链可变区(VL)，所述轻链可变区从N端到C端包含三个轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3；其中，(a)HCDR1包含与选自SEQ ID NO:1、4和6的氨基酸序列具有约80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％至约100％同一性的氨基酸序列；(b)HCDR2包含与选自SEQ ID NO:2、5和7的氨基酸序列具有约80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％至约100％同一性的氨基酸序列；(c)HCDR3包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有约80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％至约100％同一性的氨基酸序列；(d)LCDR1包含与选自SEQ ID NO:25和28的氨基酸序列具有约80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％至约100％同一性的氨基酸序列；(e)LCDR2包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列具有约80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％至约100％同一性的氨基酸序列；和(f)LCDR3包含与选自SEQ ID NO:27或29的氨基酸序列具有约80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％至约100％同一性的氨基酸序列。

[0016] 在一个实施方案中，(a)HCDR1包含由SEQ ID NO:1、4或6经1或2个氨基酸取代获得的序列；(b)HCDR2包含由SEQ ID NO:2、5或7经1、2、3、4或5个氨基酸取代获得的序列；(c)HCDR3包含SEQ ID NO:3所示的序列或包含由SEQ ID NO:3经1或2个氨基酸取代获得的序列；(d)LCDR1包含由SEQ ID NO:25或28经1、2、3或4个氨基酸取代获得的序列；(e)LCDR2包含SEQ ID NO:26所示的序列或包含由SEQ ID NO:26经1或2个氨基酸取代获得的序列；和(f)LCDR3包含由SEQ ID NO:27或29经1或2个氨基酸取代获得的序列。在另一个实施方案中，所述氨基酸取代是保守取代。在另一个实施方案中，(a)HCDR1包含在HCDR1的位点1或2上的氨基酸取代；(b)HCDR2包含在HCDR2的位点5、9、10、12或17上的氨基酸取代；(c)LCDR1包含在LCDR1的位点6或9上的氨基酸取代；或(d)LCDR3包含在LCDR3的位点1上的氨基酸取代。在一个实施方案中，所述氨基酸取代是保守取代。在一个实施方案中，所述氨基酸取代是保守取代。在又一个实施方案中，HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3是基于Kabat编号方案定义的。

[0017] 在一个实施方案中，(a)HCDR1包含由SEQ ID NO:10、13或16经1、2或3个氨基酸取代获得的序列；(b)HCDR2包含由SEQ ID NO:11、14或17经1、2或3个氨基酸取代获得的序列；(c)HCDR3包含由SEQ ID NO:12或15经1、2或3个氨基酸取代获得的序列；(d)LCDR1包含由

SEQ ID NO:32或33经1、2、3或4个氨基酸取代获得的序列;以及(e)LCDR3包含由SEQ ID NO:27或29经1或2个氨基酸取代获得的序列。在另一个实施方案中,所述氨基酸取代是保守取代。在另一个实施方案中,(a)HCDR1包含在HCDR1的位点3、6或7上的氨基酸取代;(b)HCDR2包含在HCDR2的位点4或8位上的氨基酸取代;(c)HCDR3包含在HCDR3的位点1上的氨基酸取代;(d)LCDR1包含在LCDR1的位点3或6上的氨基酸取代;或(e)LCDR3包含在LCDR3的位点1上的氨基酸取代。在一个实施方案中,氨基酸取代是保守取代。在又一个实施方案中,HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3是基于IMGT编号方案定义的。

[0018] 在另一方面,本发明提供一种抗原结合分子,例如抗体。所述抗体包含:(a)重链可变区(HCVR),其包含与选自SEQ ID NO:35、36和37的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%同一性的氨基酸序列;和(b)轻链可变区(LCVR),其包含与选自SEQ ID NO:41、42和43的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%同一性的氨基酸序列。

[0019] 在一个实施方案中,(a)HCVR包含由SEQ ID NO:35、36或37经1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个氨基酸取代获得的序列;(b)LCVR包含由SEQ ID NO:41、42或43经1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸取代获得的序列。在另一个实施方案中,所述氨基酸取代是保守取代。

[0020] 一方面,本发明提供一种结合人腺苷A2A受体(A2aR)的抗原结合分子,例如抗体。所述抗体包含:(a)包含SEQ ID NO:35或38所示的氨基酸序列的重链可变区(HCVR);和(b)包含SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)。

[0021] 在另一方面,本发明提供一种结合人腺苷2A受体(人A2aR)的抗原结合分子,例如抗体。所述抗体包含:(a)包含SEQ ID NO:36或39所示的氨基酸序列的重链可变区(HCVR);和(b)包含SEQ ID NO:42所示的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)。

[0022] 在又一方面,本发明提供一种结合人腺苷2A受体(人A2aR)的抗原结合分子,例如抗体。所述抗体包含:(a)包含SEQ ID NO:37或40所示的氨基酸序列的重链可变区(HCVR);和(b)包含SEQ ID NO:43所示的氨基酸序列的轻链可变区(LCVR)。

[0023] 在本发明各个方面的一个实施方案中,所述抗原结合分子(例如所述抗体)的重链和/或轻链的N端是焦谷氨酸(pE)残基。

[0024] 在另一个实施方案中,(i)所述抗体与选自1B5-3D7、3F6-9G5和3F8-12E9的单克隆抗体竞争结合人A2aR;(ii)所述抗体抑制A2aR的活性;(iii)所述抗体提高免疫反应;(iv)所述抗体特异性结合细胞表面人A2aR;(v)所述抗体降低组织中的cAMP浓度;(vi)所述抗体降低蛋白激酶A的活性;(vii)所述抗体减少A2aR信号通路的cAMP反应元件的磷酸化;或者(viii)(i)-(vii)的任意组合。

[0025] 在一个实施方案中,用实施例5、6和7中所述的基于流式细胞术的测定法或与其基本相似的测定法来测定所述抗体与A2aR或细胞表面A2aR的结合。在另一个实施方案中,用本领域已知的测定法来测定所述抗体对A2aR或细胞表面A2aR的竞争结合,所述测定法包括例如Harms等人在Microtiter plate-based antibody-competition assay to determine binding affinities and plasma/blood stability of CXCR4 ligands,Scientific Reports,2020:10:16036,doi.org/10.1038/s41598-020-73012-4中描述的测定法,或与其实质上相似的测定法。在另一个实施方案中,用实施例4中描述的测定法或与其基本相似的

测定法来测定对A2aR活性的抑制。在又一个实施方案中，用实施例4中描述的测定法或与其基本相似的测定法来测定cAMP浓度的降低。在一个实施方案中，用Karege等人在Anon-radioactive assay for the cAMP-dependent protein kinase activity in rat brain homogenates and age-related changes in hippocampus and cortex,Brain Res.,2001Jun 8;903(1-2):86-93,doi:10.1016/s0006-8993(01)02409-x中描述的方法或与其实质上相似的方法来测定蛋白激酶A活性的降低和/或A2aR信号通路的cAMP反应元件磷酸化的减少。在另一个实施方案中，用本领域熟知的方法测定免疫应答的增强，所述方法包括例如测定组织中炎性细胞因子浓度的增加、细胞毒性CD8+T细胞数量的增加。

[0026] 在一个实施方案中，所述抗体抑制(例如降低)A2aR的活性至少约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％、约95％或约100％。在另一个实施方案中，所述抗体增强免疫应答至少约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％、约95％、约100％、约1.5倍、约2倍、约4倍或更多。在又一个实施方案中，所述抗体降低组织中的cAMP浓度至少约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％、约95％或约100％。在又一个实施方案中，所述抗体降低蛋白激酶A的活性至少约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％、约95％或约100％。在一个实施方案中，所述抗体减少A2aR信号通路的cAMP反应元件的磷酸化至少约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％、约95％或约100％。

[0027] 在另一个实施方案中，所述抗体特异性结合人A2aR和/或食蟹猴A2aR。在又一个实施方案中，所述抗体以相似的亲和力特异性结合人A2aR和/或食蟹猴A2aR。在一个实施方案中，所述抗体不结合非灵长类动物的A2aR或以显著低于与人A2aR和/或食蟹猴A2aR结合的亲和力结合非灵长类动物的A2aR。在另一个实施方案中，所述抗体减少细胞内cAMP的产生。在一个实施方案中，所述抗体降低组织中cAMP的浓度。在一个实施方案中，所述抗体降低cAMP的细胞内浓度。在另一个实施方案中，所述抗体降低组织中cAMP的细胞外浓度。在本发明的各个方面及其实施方案中，食蟹猴A2aR包含SEQ ID NO:51所示的序列。

[0028] 一方面，本发明提供一种分离的抗原结合分子，例如抗体，其与任一方面所述的抗体竞争结合人A2aR。

[0029] 在一个实施方案中，所述抗原结合分子，例如抗体，是人源化抗体或嵌合抗体。在另一个实施方案中，所述抗体包含选自IgA、IgD、IgE、IgG或IgM类的重链恒定区。在另一个实施方案中，所述抗体包含IgG类的重链恒定区，其中IgG选自IgG4、IgG1、IgG2和IgG3。

[0030] 在另一个方面，本发明提供一种分离的多核苷酸，其编码所述抗原结合分子，例如任意方面及其各种实施方案所述的抗体、其HCVR、其LCVR、其轻链、其重链或其抗原结合片段。

[0031] 在又一方面，本发明提供一种表达载体，包含所述多核苷酸。

[0032] 在另一方面，本发明提供一种重组细胞，包含所述多核苷酸或所述表达载体。

[0033] 在一个方面，本发明提供制备所述抗原结合分子(例如任意方面及其各种实施方案所述的抗体)的方法。所述方法包括在重组细胞中表达所述抗体并分离表达的抗体。

[0034] 一方面，本发明提供一种药物组合物。所述药物组合物包含任意方面及其各种实施方案所述的抗原结合分子，例如所述抗体，以及药学上可接受的载体或稀释剂。

[0035] 在一个实施方案中，所述药物组合物包含有效量的所述抗体以(a)特异性结合细胞表面人或食蟹猴A2aR；(b)降低组织中的cAMP浓度；(c)抑制人A2aR的活性；(d)减少A2aR信号通路的cAMP反应元件的磷酸化；(e)提高免疫细胞的免疫反应；(f)降低蛋白激酶A活性；或(g)实现(a)-(f)的任意组合。在另一个实施方案中，与基线水平相比，组织中cAMP浓度的降低是通过降低细胞内cAMP产生和/或降低cAMP的细胞内和/或细胞外浓度来实现的。在另一个实施方案中，A2aR活性的抑制是通过抑制腺苷的生理活性实现的。

[0036] 一方面，本发明提供抑制细胞表面表达的A2aR活性的方法，包括使细胞与任意方面所述的分离的抗体或任意方面所述的药物组合物接触，从而抑制细胞表面的A2aR活性。在一个实施方案中，A2aR的抑制导致组织中cAMP浓度降低至少约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％、约95％或约100％。在另一个实施方案中，所述方法用于治疗癌症或神经退行性疾病。在又一个实施方案中，所述抗原结合分子，例如抗体，抑制A2aR活性至少约10％、约20％、约30％、约40％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％、约95％或约100％。在另一个实施方案中，所述方法用于治疗癌症或神经退行性疾病。

[0037] 在另一方面，本发明提供一种增强受试者免疫反应的方法。所述方法包括向受试者施用任意方面所述的分离的抗体或任意方面所述的药物组合物，从而增强受试者的免疫应答。在一个实施例中，所述免疫应答包括但不限于a)促进效应T细胞功能；b)降低T_{reg}活性；c)阻止T_{reg}扩增；d)增强NK细胞功能；e)促进抗原呈递细胞的1型活化；或f)降低肿瘤微环境中的免疫抑制。在某些实施方案中，与基线水平相比，本发明所述的方法使免疫应答增加至少约10％、约20％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％、约1倍、约2倍、约4倍或更多。

[0038] 在另一方面，本发明提供抑制受试者肿瘤生长的方法。所述方法包括向受试者施用任意方面所述的分离的抗体或任意方面所述的药物组合物，从而抑制肿瘤的生长。

[0039] 在又一方面，本发明提供治疗受试者癌症的方法，包括施用任意方面所述的分离的抗体或任意方面所述的药物组合物，从而治疗癌症。在一个实施方案中，所述癌症是本文描述的任意癌症。在一个具体实施方案中，所述癌症选自三阴性乳腺癌(TNBC)、胰腺导管腺癌(PDAC)、转移性去势抵抗性前列腺癌(mCRPC)、肾细胞癌(RCC)、多发性骨髓瘤、结直肠癌(CRC)和弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。

[0040] 在又一方面，本发明提供治疗受试者的神经退行性疾病的方法，包括施用任意方面所述的分离的抗体或任意方面所述的药物组合物，从而治疗神经退行性疾病。

[0041] 在一个实施方案中，上述任意方面所述的方法导致T细胞的激活并引导其杀死肿瘤靶细胞。

[0042] 在另一个实施方案中，上述任意方面所述的方法还包括施用其他治疗剂。在一个实施方案中，所述其他治疗剂包括本文所述的任意治疗剂。在另一个实施方案中，所述其他治疗剂包括抗肿瘤剂、放疗、化疗剂、手术、癌症疫苗、免疫细胞刺激受体的激动剂、细胞因子、细胞疗法，或检查点抑制剂。在一个实施方案中，所述其他治疗剂是抗体，包括多特异性抗体，例如双特异性抗体。

[0043] 在另一个实施方案中，所述检查点抑制剂选自PD-1、PD-L1、TIGIT、CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、TIM-3、神经突蛋白、BTLA、CECAM-1、CECAM-5、IL-1R8、VISTA、LAIR1、LILRB1、LILRB2、LILRB3、LILRB4、LILRB5、CD96、CD112R、CD160、2B4、TGFβ-R、KIR、NKG2A的抑

制剂或其任意组合。在又一个实施方案中，所述抑制剂抑制PD-1和PD-L1之间的相互作用，所述抑制剂选自帕博利珠单抗、纳武利尤单抗、阿特珠单抗、阿维鲁单抗、度伐利尤单抗、BMS-936559、信迪利单抗、特瑞普利单抗、替雷利珠单抗、卡瑞利珠单抗、舒格利单抗、派安普利单抗、卡度尼利单抗、磺胺间甲氧嘧啶1和磺胺甲二唑2。在一个实施方案中，所述CTLA4抑制剂选自伊匹单抗、卡度尼利单抗和YH001(祐和医药)。

[0044] 在又一个实施方案中，所述其他治疗剂为免疫细胞刺激受体的激动剂，所述激动剂选自：OX40、CD2、CD27、CDS、ICAM-1、LFA-1、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD28、CD30、CD40、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、NKG2D、SLAMF7、NKp46、NKp80、CD160、B7-H3、CD83的配体及其任意组合。

[0045] 在一个实施方案中，所述其他治疗剂与所述抗体配制在相同的药物组合物中。在另一个实施方案中，所述其他治疗剂与所述抗体配制在不同的药物组合物中。

[0046] 在又一个实施方案中，在施用各个方面所述的抗原结合分子例如抗体之前施用所述其他治疗剂。在另一个实施方案中，在施用所述抗原结合分子例如抗体之后施用所述其他治疗剂。在另一个实施方案中，同时施用所述其他治疗剂与所述抗原结合分子例如抗体。

[0047] 一方面，本发明提供一种试剂盒。所述试剂盒包括任意方面所述的药物组合物。在一个实施方案中，所述药物组合物进一步包含本文所述的任意一种或多种其他治疗剂。

附图说明

[0048] 图1示经人A2aR编码DNA免疫小鼠诱导的血清中针对人A2aR的抗体滴度图(一条曲线代表一份小鼠血清)。测试八只小鼠(M1-M8)血清中的抗体滴度，采用流式细胞术，通过与过表达人A2aR的Expi293细胞的结合来测定抗体滴度。MFI：平均荧光强度。

[0049] 图2示荧光激活细胞分选(FACS)流式散点图，其显示了从四个杂交瘤克隆1B5-3D7、3F6-9G5、3F8-12E9和8D5-16E2的杂交瘤细胞培养液中分离出来的抗A2R抗体的结合。在本文中使用的克隆的名称，1B5-3D7、3F6-9G5、3F8-12E9和8D5-16E2，根据上下文也可以代表从这些克隆中分离的单克隆抗体。Expi293：Expi293细胞；A2aR/Expi293：转染了人A2aR表达载体的Expi293细胞。

[0050] 图3示本发明示例性抗体1B5-3D7、3F6-9G5、3F8-12E9和8D5-16E2的体外阻断活性。所述示例性抗人A2aR mAb是从杂交瘤培养液中纯化出的全IgG分子形式，采用基于细胞cAMP的检测方法。RLU：相对光单位；ZM241385：小分子A2aR拮抗剂(Sigma，货号Z0153)。

[0051] 图4示本发明示例性抗体1B5-3D7和3F6-9G5的体外阻断活性。所述示例性抗人A2aR mAb是从瞬时转染编码本发明示例性抗体序列的Expi293细胞的培养上清液中纯化获得的重组全IgG分子形式的抗体，采用基于细胞cAMP的检测方法。

[0052] 图5示本发明的示例性抗体1B5-3D7和3F6-9G5特异性结合细胞表面表达的人A2aR。该图还显示，其他来源的抗人A2aR抗体与在细胞表面表达的人A2aR的结合未被检测到或很微弱。1B5：1B5-3D7；3F6：3F6-9G5；MAB9497：人腺苷A2aR抗体(R&D Systems，货号MAB9497)；SDIX-10：美国专利公开US2014/0322236A1中公开的人腺苷A2aR抗体，克隆号864H10；SDIX-14：美国专利公开US2014/0322236A1中公开的人腺苷A2aR抗体，克隆号864H14；mIgG2a iso：小鼠IgG2a同种型对照；hIgG1 iso：人IgG1同种型对照。

[0053] 图6为流式细胞测定散点图，示本发明的示例性抗体3F6-9G5结合来源于人和食蟹

猴外周血单核细胞(PBMC)的$CD8^+CD3^+$CD8 T细胞和$CD8^-CD3^+$CD4 T细胞表面表达的人A2aR和食蟹猴A2aR。GMI:几何平均荧光强度。

具体实施方案

[0054] 现描述本发明和附图以使本领域技术人员能够实施本发明。但本领域技术人员应当理解,下文描述的发明可以在不使用这些具体细节的情况下实施,或者其可以用于本文描述的目的以外的目的。事实上,考虑到本公开内容,其可以被修改并且可以与本领域技术人员已知的产品和技术结合使用。附图和描述旨在示例本发明的各个方面,而不旨在缩小权利要求的范围。此外,应当理解,附图可以单独地显示本发明的各方面,并且一个图中的要素可以与其他图中所示的要素结合使用。

[0055] 应当理解,贯穿本说明书对方面、特征、优点或相似语言的引用并不意味着所有方面和优点都可以通过本发明实现,也不意味着其应当或已经在本发明的任何单个实施例中实现。相反,引用各方面和优点的语言应理解为所描述的与实施例相关的特定方面、特征、优点或性质应包括在本发明的至少一个实施例中。因此,贯穿本说明书的对方面和优点的讨论以及相似的语言可以但不一定指代相同的实施例。

[0056] 本发明所描述的方面、特征、优点和性质可以以任何合适的方式组合在一个或多个进一步的实施例中。此外,相关领域的技术人员将认识到,可以在没有特定实施例的一个或多个特定方面或优点的情况下实施本发明。在其他情况下,在某些实施例中可以认识到并要求其他方面、特征和优点,而这些方面、特征和优点可能不存在于本发明的所有实施例中。

[0057] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语与本申请所属领域的普通技术人员所普遍理解的含义相同。本领域技术人员将认识到与此处描述的技术和材料相似或等同的许多技术和材料可用于实施本发明的各方面和实施例。本申请所描述的方面和实施例不限于所描述的方法和材料。

[0058] 此外,在本发明的指导方面,在本申请中描述的任何引用的参考文献、任何已授权的专利或专利申请公开都通过引用明确地并入本文。

一、定义

[0059] 为了可以更容易地理解本发明,首先定义某些术语。此外,应当注意,每当列举参数的值或值的范围时,都旨在表示列举值的值和范围中间值也为本发明的一部分。

[0060] 除非本文另有说明或与上下文明显矛盾,在描述本发明的上下文中(特别是在权利要求的上下文中)使用的术语“一个”和“一种”和“所述”以及类似的指示词应被解释为涵盖单数和复数(即,一个或多个)。除非另有说明,术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应解释为开放式术语(即意为“包括但不限于”)。除非本文另有说明,本文对数值范围的列举仅旨在用作单独引用每个被引用的单独的值或引用每个落在该范围内的单独的值的简写方法,并且每个单独的值如同其被单独地列举一样被并入说明书中。

[0061] 当使用短语“在一个实施方案中”、“在另一个实施方案中”、“在其他实施方案中”、“在一些实施方案中”或“在某些实施方案中”时,本公开应被理解为包括定义其所述不同实施方案的任何特征的组合,除非这些特征不能相互组合、或这些特征相互排斥或在此明确放弃。

[0062] 术语“约”或“大约”通常是指在给定值或范围的10％以内，优选地在5％以内，或更优选地在1％以内。

[0063] 范围在本文中可以表示为从“约”一个特定值，和/或到“约”另一个特定值。当表示这样的范围时，另一个实施方案包括从一个所述特定值和/或到另一个所述特定值。类似地，当通过使用先行词“约”将值表示为近似值时，应理解为所述特定值构成另一个实施方案。还应当理解，每个范围的端点相对于另一个端点既是显著的，又是独立的。还应当理解，本文公开了大量的值，每个值除了该值本身之外也包含该特定值的“约”值。例如，如果值“10”被公开，则也公开了“约10”。还应当理解，当公开值时，“小于或等于”(该值)、“大于或等于”(该值)和值之间的可能范围也被公开，正如本领域技术人员所适当理解的一样。例如，如果值“10”被公开，则也公开了“小于或等于10”以及“大于或等于10”。

[0064] 本文所用的术语“试剂”是指任何物质、化合物(例如分子)、超分子复合物、材料或其组合或混合物。化合物可以是由化学式、化学结构或序列表示的任何试剂。试剂的实例包括，例如，小分子、多肽、核酸(例如，RNAi试剂、反义寡核苷酸、核酸适配体)、脂质、多糖等。通常，可以使用本领域已知的任何合适的方法获得试剂。普通技术人员将基于例如试剂的性质选择合适的方法。试剂可至少部分纯化。在一些实施方案中，试剂可以作为组合物的一部分被提供，在各种实施方案中，除了所述试剂之外，所述组合物可以包含例如抗衡离子、水性或非水性稀释剂或载体、缓冲剂、防腐剂或其他成分。在一些实施方案中，试剂可以盐、酯、水合物或溶剂化物的形式被提供。在一些实施方案中，试剂是可透过细胞的，其在例如被细胞吸收并在细胞内作用(例如在哺乳动物细胞内作用以产生生物效应)的典型试剂的范围内。某些化合物可以特定的几何或立体异构形式存在。此类化合物包括顺式和反式异构体、E-和Z-异构体、R-和S-对映体、非对映体、(D)-异构体、(L)-异构体、(-)-和(+)-异构体，其外消旋混合物及其其他混合物，除非另有说明，此类化合物包括在本公开的各种实施方案中。某些化合物可以多种或质子化状态存在，可具有多种构型，可作为溶剂化物存在(例如，与水(即水合物)或普通溶剂)和/或可具有不同的结晶形式(例如，多晶型物)或不同的互变异构形式。本公开在适用的情况下包括表现出此类替代性质子化状态、构型、溶剂化物和形式的实施方案。

[0065] 在某些实施例中，根据上下文理解，“试剂”还包括治疗方法，例如放疗、化疗或手术。

[0066] 术语“氨基酸”是指二十种常见的天然氨基酸。天然氨基酸包括丙氨酸(Ala;A)、精氨酸(Arg;R)、天冬酰胺(Asn;N)、天冬氨酸(Asp;D)、半胱氨酸(Cys;C)；谷氨酸(Glu;E)、谷氨酰胺(Gin;Q)、甘氨酸(Gly;G)；组氨酸(His;H)、异亮氨酸(He;I)、亮氨酸(Leu;L)、赖氨酸(Lys;K)、甲硫氨酸(Met;M)、苯丙氨酸(Phe;F)、脯氨酸(Pro;P)、丝氨酸(Ser;S)、苏氨酸(Thr;T)、色氨酸(Trp;W)、酪氨酸(Tyr;Y)和缬氨酸(Val;V)。

[0067] 术语“拮抗剂”或“抑制剂”是指防止、阻断、抑制、中和或降低另一分子(例如受体)的生物活性或作用的物质。

[0068] 术语“激动剂”是指促进(即诱导、引起、增强或增加)另一分子的生物活性或作用的物质。术语激动剂包括结合受体的物质(例如抗体)以及促进受体功能但不与其结合的物质(例如通过激活相关蛋白来促进受体功能)。

[0069] 本文中所用的术语“抗体”是指包含至少一个互补决定区(CDR)的任何抗原结合分

子或分子复合物，其特异性结合特定抗原(例如A2aR)或与其相互作用。术语“抗体”包括包含四条多肽链(即通过二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链)的免疫球蛋白分子，及其多聚体(例如IgM)。每条重链包含重链可变区(本文缩写为HCVR或VH)和重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域，即C_H1、C_H2和C_H3。每条轻链包含轻链可变区(本文缩写为LCVR或VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域(C_L1)。V_H和V_L区域可以进一步细分出高变区，称为互补决定区(CDR)，其间散布有更保守的区域，称为框架区(FR)。每个V_H和V_L由三个CDR和四个FR组成，从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本发明的不同实施方案中，抗A2aR抗体(或其抗原结合片段)的FR可以与鼠或人种系序列相同，或者可以经天然或人工修饰。氨基酸共有序列可以基于两个或多个CDR的并排分析来定义。

[0070] 本文所用的术语“抗体”还包括完整抗体分子的抗原结合片段。本文所用的术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”等包括特异性结合抗原以形成一个复合物的任何天然存在的、可通过酶法获得的、合成的或基因工程得到的多肽或糖蛋白。可以通过使用任何合适的标准技术，例如蛋白酶解或重组基因工程技术(包括操纵和表达编码抗体可变区和可选恒定区的DNA)，从完整的抗体分子中获得抗体的抗原结合片段。此类DNA是已知的和/或易于获得的，例如商业来源、DNA文库(包括例如噬菌体-抗体文库)，或者可以被合成。可以通过化学或分子生物学技术对所述DNA进行测序和操纵，例如，将一个或多个可变区和/或恒定区排列成合适的构型，或引入密码子，产生半胱氨酸残基，修饰、添加或删除氨基酸等。

[0071] 抗原结合片段的非限制性实例包括：(i)Fab片段；(ii)$F(ab')_2$片段；(iii)Fd片段；(iv)Fv片段；(v)单链Fv(scFv)分子；(vi)dAb片段；以及(vii)最小识别单元，其由模拟抗体高变区(例如分离的互补决定区(CDR)，例如CDR3肽)或受限的FR3-CDR3-FR4肽的氨基酸残基组成。其他工程分子，例如结构域特异性抗体、单结构域抗体、结构域缺失抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微型抗体、纳米抗体(例如单价纳米抗体、二价纳米抗体等)，小模块免疫药物(SMIP)和鲨鱼可变IgNAR结构域也包括在本文所用的表述“抗原结合片段”中。

[0072] 抗体的抗原结合片段通常包含至少一个可变结构域。所述可变结构域可以具有任何大小或氨基酸组成，并且通常包含至少一个与一个或多个框架序列相邻或与框架序列同框的CDR。在含有V_H结构域与V_L结构域相连的抗原结合片段中，V_H和V_L结构域可以以任何合适的排列方式彼此相对定位。例如，可变区可以是二聚体并且包含V_H-V_H、V_H-V_L或V_L-V_L二聚体。或者，抗体的抗原结合片段可含有单体V_H或V_L结构域。

[0073] 在某些实施方案中，抗体的抗原结合片段可含有与至少一个恒定结构域共价连接的至少一个可变结构域。本发明抗体的抗原结合片段包含的可变结构域和恒定结构域的非限制性示例性构型包括：(i)V_H-C_H1；(ii)V_H-C_H2；(iii)V_H-C_H3；(iv)V_H-C_H1-C_H2；(v)V_H-C_H1-C_H2-C_H3；(vi)V_H-C_H2-C_H3；(vii)V_H-C_L；(viii)V_L-C_H1；(ix)V_L-C_H2；(x)V_L-C_H3；(xi)V_L-C_H1-C_H2；(xii)V_L-C_H1-C_H2-C_H3；(xiii)V_L-C_H2-C_H3；和(xiv)V_L-C_L。在可变结构域和恒定结构域的任意构型中(包括上面列出的任意示例性构型)，可变结构域和恒定结构域可以彼此直接连接或者可以通过完整或部分铰链或接头区连接。铰链区可由至少2(例如5、10、15、20、40、60或更多)个氨基酸组成，从而形成单个多肽分子中相邻可变和/或恒定结构域之间的柔性或

半柔性连接。此外，抗原结合片段可以包含以上所列的任意可变结构域和恒定结构域构型的同源二聚体或异源二聚体(或其他多聚体)，其彼此之间非共价连接和/或其与一个或多个单体V_H或V_L结构域非共价连接(例如通过二硫键连接)。

[0074] 与完整的抗体分子一样，抗原结合片段可以是单特异性或多特异性(例如，双特异性)。抗体的多特异性抗原结合片段通常包含至少两个不同的可变结构域，其中每个可变结构域都能够特异性结合单独的抗原或同一抗原上的不同表位。通过使用本领域可用的常规技术，任何多特异性抗体形式(包括本文公开的示例性双特异性抗体形式)都可适用于本发明抗体的抗原结合片段的情况。

[0075] 本发明所述的抗体可以是分离的抗体。本文所用的“分离的”分子，例如分离的抗体或分离的多肽，是指已从其天然环境的至少一种组分中鉴定和分离和/或回收的分子，例如抗体。例如，已从生物体的至少一种成分，或从天然存在或天然产生抗体的组织或细胞中分离或去除的分子(例如抗体)是用于本发明目的的“分离的”分子(例如抗体)。分离的分子(例如抗体)还包括重组细胞内的原位分子(例如抗体)。在某些实施方案中，分离的分子(例如抗体)是已经经过至少一个纯化或分离步骤的分子(例如抗体)。根据某些实施方案，分离的分子(例如抗体)可以基本上不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0076] 本发明还包括结合A2aR的单臂抗体。本文所用的“单臂抗体”是指包含单个抗体重链和单个抗体轻链的抗原结合分子。本发明所述的单臂抗体可包含如表1-9中所列的任意HCVR/LCVR或CDR氨基酸序列。

[0077] 与抗原结合分子或抗原结合结构域来源的相应种系序列相比，本文所述的抗A2aR抗体或其抗原结合结构域可在其重链和轻链可变域的框架区和/或CDR区包括一个或多个氨基酸的替换、插入和/或缺失。通过将本文公开的氨基酸序列与可从例如公共抗体序列数据库获得的种系序列进行比较，可以容易地确定此类突变。本发明包括由本文公开的任意氨基酸序列获得的抗体及其抗原结合结构域，其中一个或多个框架区和/或CDR区内的一个或多个氨基酸突变为抗体来源的种系序列中的相应残基，或另一人种系序列的相应残基，或相应种系残基的保守氨基酸取代(此类序列变化在本文中统称为“种系突变”)。本领域普通技术人员以本文公开的重链和轻链可变区序列为起始，可以容易地制备大量抗体和抗原结合片段，其包含一个或多个个体种系突变或其组合。在某些实施方案中，V_H和/或V_L结构域内的所有框架区和/或CDR残基突变回抗体来源的原始种系序列中的残基。在其他实施方案中，仅某些残基突变回原始种系序列，例如，仅在FR1的前8个氨基酸内或在FR4的后8个氨基酸内的突变残基，或仅在CDR1，CDR2或CDR3内的突变残基。在其他实施方案中，一个或多个框架区和/或CDR残基突变为不同种系序列(即不同于抗体来源的种系序列的种系序列)的相应残基。此外，本发明的抗体或其抗原结合结构域可以在框架区和/或CDR区内包含两个或更多个种系突变的任意组合，例如，其中某些单独的残基突变为特定种系序列的相应残基，而与原始种系序列不同的某些其他残基被保留或突变为不同种系序列的相应残基。一旦获得含有一个或多个种系突变的抗体或其抗原结合片段，可以很容易地对其测试一种或多种期望特性，例如改进的结合特异性、增加的结合亲和力、改进或增强的拮抗或激动生物学特性(视情况而定)、降低的免疫原性等。以这种一般方式获得的抗体或其抗原结合片段包括在本发明内。

[0078] 本发明还包括包含本文公开的任意HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的变体的抗

A2aR抗体。本发明此方面包括的示例性变体包括本文公开的具有一个或多个保守取代的任意HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的变体。例如，本发明包括一种抗A2aR抗体和抗原结合蛋白，其具有的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列相对于本文表中列出的任意HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列来说，包含10个或更少、8个或更少、6个或更少、4个或更少等的保守氨基酸取代。

[0079] 轻链分为kappa或lambdamko(κ，λ)。每个重链类别都可以与kappa或lambda轻链结合。一般来说，轻链和重链彼此共价键合，当免疫球蛋白由杂交瘤，B细胞或基因工程宿主细胞产生时，两条重链的“尾”部通过共价二硫键或非共价键彼此相互键合。在重链中，其氨基酸序列是从Y构型分叉末端的N端到每条链底部的C端。

[0080] 本文所用的术语“轻链恒定区”或“CL”在本文中可互换使用，指源自抗体轻链的氨基酸序列。优选地，轻链恒定区包含恒定κ结构域或恒定λ结构域中的至少一种。

[0081] 本文所用的术语“重链恒定区”包括源自免疫球蛋白重链的氨基酸序列。包含重链恒定区的多肽包含以下组中的至少一个：CH1结构域、铰链(例如铰链区的上部、中部和/或下部)结构域、CH2结构域、CH3结构域，或其变体或其片段。例如，本公开使用的抗原结合多肽可以包括包含CH1结构域的多肽链；包含CH1结构域、至少部分铰链结构域和CH2结构域的多肽链；包含CH1结构域和CH3结构域的多肽链；包含CH1结构域、至少部分铰链结构域和CH3结构域的多肽链，或包含CH1结构域、至少部分铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域的多肽链。在一些实施方案中，本发明的多肽包括包含CH3结构域的多肽链。此外，本公开使用的抗体可缺少至少一部分CH2结构域(例如，全部或部分CH2结构域)。应当理解，重链恒定区可以被修饰，使其在氨基酸序列上不同于天然的免疫球蛋白分子。

[0082] 本文公开的抗体的重链恒定区可源自不同的免疫球蛋白分子。例如，多肽的重链恒定区可包含源自IgG_1分子的CH1结构域和源自IgG_3分子的铰链区。在另一个实例中，重链恒定区可包含部分源自IgG_1分子且部分源自IgG_3分子的铰链区。在另一个实例中，重链部分可包含部分源自IgG_1分子且部分源自IgG_4分子的嵌合铰链。

[0083] “轻链-重链对”是指轻链和重链的集合，其中轻链和重链可以通过轻链的CL结构域和重链的CH1结构域之间的二硫键形成二聚体。

[0084] 各种免疫球蛋白类的恒定区的亚基结构和三维构型是众所周知的。本文所用的术语“VH结构域”包括免疫球蛋白重链的N端可变结构域，术语“CH1结构域”包括免疫球蛋白重链的第一个(最N端)恒定区结构域。所述CH1结构域与所述VH结构域相邻并且是免疫球蛋白重链分子铰链区的N端。

[0085] 本文所用的术语“CH2结构域”包括从抗体的例如约残基244位延伸至残基360位的重链分子部分，其中编号使用常规编号方案(残基244至360，Kabat编号系统；或残基231-340，EU编号系统)。所述CH2结构域的独特之处在于其不与另一个结构域紧密配对。相反，一个完整的天然IgG分子的两个CH2结构域之间插入有两个N-连接的支链糖链。CH3结构域从CH2结构域延伸到IgG分子的C端，包含大约108个残基。

[0086] 本文所用的术语“铰链区”包括将CH1结构域连接到CH2结构域的重链分子的部分。所述铰链区包含大约25个残基并且是柔性的，因此允许两个N端抗原结合区独立活动。铰链区可被细分为三个不同的结构域：上铰链域、中铰链域和下铰链域。

[0087] 本文所用的术语“二硫键”包括在两个硫原子之间形成的共价键。半胱氨酸包含一

个可与第二硫醇基形成二硫键或桥的硫醇基。在大多数天然存在的IgG分子中,CH1和CL区通过二硫键连接,两条重链通过对应于位点239和242(Kabat编号系统)的两个二硫键连接,在EU编号系统中是位点226或22。

[0088] 术语“表位”是指与称为互补位的抗体分子可变区中的特异性抗原结合位点相互作用的抗原决定簇。单一抗原可具有多于一个表位。因此,不同的抗体可结合抗原的不同区域,并可具有不同的生物学效应。表位可以是构象的或线性的。构象表位由线性多肽链的不同片段在空间的并列氨基酸产生。线性表位是由多肽链中相邻的氨基酸残基产生。在某些情况下,表位可包括抗原上的糖、磷酰基或磺酰基部分。

[0089] 当提及核酸或其片段时,术语“基本同一性”或“基本相同”表示当与另一核酸(或其互补链)进行适当的核苷酸插入或缺失最佳比对时,存在与该核苷酸序列至少约95%的同一性,更优选至少约96%、97%、98%或99%的核苷酸碱基同一性,其通过任意众所周知的序列同一性算法测定,例如FASTA、BLAST或Gap法,如下讨论。在某些情况下,与参考核酸分子具有基本同一性的核酸分子可以编码具有与参考核酸分子编码的多肽相同或基本相似的氨基酸序列的多肽。

[0090] 当应用于多肽时,术语“基本相似性”或“基本相似”是指当通过程序例如GAP或BESTFIT使用默认间隙权重进行最佳比对时,两个肽序列共享至少95%的序列同一性,甚至更优选至少98%或99%的序列同一性。优选地,不相同的残基位点因保守氨基酸取代而不同。“保守氨基酸取代”是指一个氨基酸残基被另一个具有相似化学性质(例如,电荷或疏水性)侧链(R基团)的氨基酸残基取代。一般来说,保守的氨基酸取代不会实质改变蛋白质的功能特性。在两个或更多个氨基酸序列因保守取代而彼此不同的情况下,可以上调序列同一性百分比或相似度以校正取代的保守性。进行这种调整的方法是本领域技术人员所熟知的。参见,例如,Pearson(1994)Methods Mol.BioI.24:307-331。具有相似化学性质侧链的氨基酸组的实例包括:(1)脂肪族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;(2)脂肪族羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;(3)含酰胺侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;(4)芳香族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;(5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;(6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸,(7)含硫侧链:半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸取代组是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。或者,保守替换是在Gonnet等人(1992)Science 256:1443-1445中公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化。“适度保守”替换是在PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0091] 多肽的序列相似性,也称为序列同一性,通常使用序列分析软件测定。蛋白质分析软件使用分配给各种替换、删除和其他修饰(包括保守氨基酸替换)的相似性度量来匹配相似序列。例如,GCG软件包含诸如Gap和Bestfit等程序,这些程序可以使用默认参数来确定密切相关的多肽(例如来自不同生物物种的同源多肽,或野生型蛋白质与其突变蛋白的同源性多肽)之间的序列同源性或序列同一性。参见,例如,GCG版本6.1。多肽序列也可以通过FASTA使用默认或推荐参数进行比较,这是GCG版本6.1中的一个程序。FASTA(例如,FASTA2和FASTA3)提供查询和搜索序列之间最佳重叠区域的比对和序列同一性百分比(Pearson(2000)同上)。当将本发明的序列与包含来自不同生物体的大量序列的数据库进行比较时,另一种优选算法是使用默认参数的计算机程序BLAST,尤其是BLASTP或TBLASTN。参见,例

如,Altschul等人,(1990)J.Mol.BioI.215:403-410和Altschul等人,(1997)Nucleic Acids Res.25:3389-402。

[0092] 术语“抗体”包括可在生物化学上区分的各种宽泛类别的多肽。本领域技术人员将理解,重链被分类为alpha、delta、epsilon、gamma和mu(或α、δ、ε、γ和μ)以及其中的一些子类(例如γ1-γ4)。这条链的性质决定了抗体的“类别”分别为IgG、IgM、IgA、IgD或IgE。免疫球蛋白亚类(同种型)例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgG5等已得到很好的表征,且已知可赋予功能特化。鉴于本公开内容,这些类别和同种型中的每一个的修饰形式对于本领域技术人员来说是容易辨别的,因此包括在本公开的范围内。所有免疫球蛋白类别都在本公开的范围内,以下讨论一般针对IgG类的免疫球蛋白分子。

[0093] 本公开的抗体包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、三特异性抗体、人抗体、人源化抗体、灵长类抗体、嵌合抗体和单链抗体。本文公开的抗体可来自任何动物来源,包括鸟类和哺乳动物。优选地,所述抗体是人、鼠、驴、兔、山羊、豚鼠、骆驼、美洲驼、马或鸡的抗体。在一些实施方案中,可变区可以是来源于角鲨类(例如,来自鲨鱼)。

[0094] 本文所用的术语“人源化抗体”是指基因工程化的非人抗体,其包含人抗体恒定域和被修饰的与人可变域具有高度序列同源性的非人可变域。这可以通过将形成抗原结合位点的六个非人抗体互补决定区(CDR)移植到同源人受体框架区(FR)上来实现。为了重建亲本抗体的结合亲和力和特异性,需要将亲本抗体(即非人抗体)的框架区残基替换为人框架区残基(回复突变)。结构同源性建模可有助于识别框架区中对抗体结合特性很重要的氨基酸残基。因此,人源化抗体可包含非人CDR序列,主要是任选地包含对非人氨基酸序列的一个或多个氨基酸回复突变的人框架区,以及全人恒定区。任选地,可以应用其他氨基酸修饰(其不一定是回复突变)以获得具有优选特征例如亲和力和生化特性的人源化抗体。

[0095] 本文所用的短语“嵌合抗体”是指免疫反应区或位点获自或源自第一个物种且恒定区(其可以是完整的、部分的或根据本公开内容修饰的)获自第二个物种的抗体。在某些实施方案中,靶结合区或位点是非人来源的(例如,小鼠或灵长类动物)并且恒定区是人来源的。

[0096] “可变单链片段”或“scFv”是指免疫球蛋白重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的融合蛋白。在一些方面,这些区域通过10至约25个氨基酸的短接头肽连接。所述接头可以富含甘氨酸以提高柔韧性,也可以富含丝氨酸或苏氨酸以提高溶解度,并且可以将VH的N端与VL的C端连接,反之亦然。尽管该蛋白中去除了恒定区并引入了接头,其仍保留了原始免疫球蛋白的特异性。

[0097] 关于IgG,标准免疫球蛋白分子包含两条相同的分子量约为23,000Da的轻链多肽,和两条相同的分子量为53,000-70,000Da的重链多肽。这4条链通常通过“Y”构型中的二硫键连接,其中轻链包围重链,从“Y”口开始,延续经过可变区。

[0098] 本文所用的术语“变体”是指通过在前体多肽或多核苷酸(例如,“亲本”多肽或多核苷酸)中插入、替换或删除一个或多个氨基酸或核苷酸而得到的多肽或多核苷酸,例如抗体或多核苷酸。在某些实施方案中,变体多肽或多核苷酸具有与亲本多肽或多核苷酸的全氨基酸或核苷酸序列至少约85%的氨基酸或核苷酸序列同一性,例如约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%的氨基酸或核苷

酸序列同一性。蛋白质或肽的变体基本上保持蛋白质的结构、功能或活性。例如，抗体的变体保持特异性结合其抗原的功能或活性和/或调节，例如抑制抗原活性。在多核苷酸的情况下，其变体保持其亲本多核苷酸的功能或活性。例如，变体多核苷酸可以编码与亲本多核苷酸编码的多肽具有相似功能或活性的蛋白质或肽。本文所用的术语“序列同一性”是指核酸对或多肽分子对之间的比较，即两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的相关性。通常，比对序列以获得最高阶的匹配。确定序列同一性的方法是已知的并且可以通过商业上可获得的计算机程序来确定，该计算机程序可以计算两个或更多个序列之间的同一性百分比。此类计算机程序的典型实例是BLAST或CLUSTAL。

[0099] 本文所用的术语“特异性结合”或“特异性地结合”是指在结合发生的环境中区分可能的结合对象的能力。在一些实施方案中，当其他潜在抗体存在时，与一种特定抗原相互作用，例如优先相互作用的抗体被称为“特异性结合”与其相互作用的抗原。在一些实施方案中，通过检测或确定抗体与其靶向抗原之间的结合程度来评估特异性结合。在一些实施方案中，通过检测或确定抗体-抗原复合物的解离程度来评估特异性结合。在一些实施方案中，通过检测或确定抗体与另一种抗体与其靶标之间的替代相互作用竞争的能力来评估特异性结合。在一些实施例中，通过在一定浓度范围内进行此类检测或测定来评估特异性结合。通常，抗体通过其抗原结合结构域结合表位，并且该结合需要抗原结合结构域和表位之间的某种互补性。因此，当抗体通过其抗原结合结构域与表位结合比其与随机的、不相关的表位结合更容易时，所述抗体被称为“特异性结合”该表位。术语“特异性”在本文中用于限定特定抗体结合特定表位的相对亲和力。例如，与抗体“B”相比，抗体“A”可以被认为对给定表位具有更高的特异性，或者与相关表位“D”相比，抗体“A”可以被认为对结合表位“C”具有更高的特异性。在一些实施方案中，如果抗体或其抗原结合片段与抗原形成的复合物的解离常数(K_d)为10^{-6}M或更小、10^{-7}M或更小，10^{-8}M或更小，10^{-9}M或更小，或10^{-10}M或更小，则所述抗体或抗体片段对抗原“具有特异性”。在某些实施方案中，使用实施例4-7描述的检测方法，或基本相似的方法通过抗原结合分子与细胞表面表达的人A2aR的优先结合来显示抗原结合分子(例如抗人A2aR抗体或其抗原结合片段)的特异性结合。

[0100] 本文所用的术语“A2aR”是指腺苷型A2A受体。除非另有说明(例如具体提及人A2aR)，术语“A2aR”包括来自例如人、灵长类动物、啮齿动物、犬科动物、猫科动物、马科动物和牛科动物的所有哺乳动物物种的天然A2aR。A2aR的核苷酸和氨基酸序列是已知的并且可见于例如GenBankAccession Nos.NP_000666.2,NP_033760.2,XP_038954384.1,EHH65694.1,EAW59658.1,XP_015313061.1,NP_445746.3,和XP_001095531.1,其每一个的全部内容都通过引用并入本文。以下是示例性人A2aR氨基酸序列：

MPIMGSSVYITVELAIAVLAILGNVLVCWAVWLNSNLQNVTNYFVVSLAAADIAVGVLAIPFAITIST
GFCAACHGCLFIACFVLVLTQSSIFSLLAIAIDRYIAIRIPLRYNGLVTGTRAKGIIAICWVLSFAIGLTPMLGWN
NCGQPKEGKNHSQGCGEGQVACLFEDVVPMNYMVYFNFFACVLVPLLLMLGVYLRIFLAARRQLKQMESQPLPGER
ARSTLQKEVHAAKSLAIIVGLFALCWLPLHIINCFTFFCPDCSHAPLWLMYLAIVLSHTNSVVNPFIYAYRIREFR
QTFRKIIRSHVLRQQEPFKAAGTSARVLAAHGSDGEQVSLRLNGHPPGVWANGSAPHPERRPNGYALGLVSGGSAQ
ESQGNTGLPDVELLSHELKGVCPEPPGLDDPLAQDGAGVS(SEQ ID NO:50)

[0101] 示例性食蟹猴A2aR氨基酸序列如下所示：

VPIMGSSVYITVELAIAVLAILGNVLVCWAVWLNSNLQNVTNYFVVSLAAADIAVGVLAIPFAITIST

GFCAACHGCLFIACFVLVLTQSSIFSLLAIAIDRYIAIRIPLRYNGLVTGTRAKGIIAICWVLSFAIGLTPMLGWN
NCGQPKEGKNHSQGCGEGQVACLFEDVVPMNYMVYFNFFACVLVPLLLMLGVYLRIFLAARRQLKQMESQPLPGER
ARSTLQKEVHAAKSLAIIVGLFALCWLPLHIINCFTFFCPDCNHAPLWLMYLAIVLSHTNSVVNPFIYAYRIREFR
QTFRKIIRSHVLRQQEPFKAAGTSARVLAAHGSDGEQVSLRLNGHPPGVWANGSAPHPERRPNGYALGLVSGGSTQ
ESQGNTSLPDVELLSHELKGVCPEPPGLDDPLAQGGAGVS(SEQ ID NO:51)

[0102] 术语“抗A2aR抗体”或“A2aR抗体”是指特异性结合A2aR的抗体或多肽。在某些实施方案中,抗A2aR抗体能够抑制A2aR生物活性和/或抑制A2aR介导的下游信号通路。抗A2aR抗体包括含有一个或多个CDR或可变区形式的抗原结合结构域的抗体或多肽。在某些实施方案中,本发明的抗A2aR抗体(以任何程度,包括显著地)阻断、拮抗、抑制或降低A2aR生物活性,包括由A2aR介导的下游事件,例如A2aR结合和下游信号传导、肿瘤生长的刺激、抗肿瘤免疫反应的抑制和免疫损伤疾病状态下的免疫抑制。

[0103] 短语“小分子药物”是指分子实体,通常是有机的或有机金属,不是聚合物,具有药用活性,并且分子量小于约2kDa、小于约1kDa、小于约900Da,小于约800Da或小于约700Da。该术语包括除了蛋白质或核酸之外的大多数被称为“药物”的药用化合物,但小肽或核酸类似物可以被认为是小分子药物。实例包括化疗抗癌药和酶抑制剂。小分子药物可以通过合成、半合成(即从天然存在的前体)或生物方法获得。

[0104] 本文所用的术语“重组”是指天然不存在的多肽或多核苷酸,其可通过以通常不会一起出现的排列方式组合多核苷酸或多肽而产生。

[0105] 当在各个结构域之间用连字符描述多肽结构域排列时(例如,CH2-CH3),应当理解为所列结构域的顺序是从N端到C端的。

[0106] 术语“免疫偶联物”是指通过共价键与肽或小分子药物融合的抗体。肽或小分子药物可以与恒定重链的C端或可变轻链和/或重链的N端连接。

[0107] 在A2aR活性水平的上下文中,术语“抑制”、“降低”和“减少”指的是这种水平在统计学上显著降低。可以降低,例如,至少20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%,或低于检测方法的检测水平。例如,可以使用实施例4中描述的方法通过细胞内cAMP浓度的降低来确定A2aR活性的抑制或降低。

[0108] 术语“治疗”是指改善与疾病或病症相关的一种或多种症状。因此,这些术语指的是在治疗或改善损伤、疾病、病理或病症方面取得成功的任何标志,包括预防或延迟疾病或病症的一种或多种症状发作;降低疾病或病症的一种或多种症状的严重程度或频率;任何客观或主观参数,例如减排;缓解;症状减轻或患者更能忍受损伤、病理或病症;退化或衰退的速度减慢;退化终点虚弱减轻;和/或改善患者的身心健康。“治疗”还可以包括预防性治疗。

[0109] 短语“有需要的患者”、“需要治疗的患者”或“需要治疗的受试者”包括在细胞增殖性疾病的治疗中,将受益于施用本公开的抗体的受试者(例如哺乳动物受试者)。

[0110] 术语“预防”是指减少患者疾病症状(例如,与A2aR活性或其功能相关的)的发生。如上所述,所述预防可以是完全的(没有可检测到的症状)或部分的,使得观察到的症状比没有治疗时可能出现的症状要少。

[0111] 术语“治疗有效量”、“药理有效量”和“生理有效量”可互换使用,是指足以改善疾病或病症的至少一种症状的活性剂的量。例如,对于给定的参数,治疗有效量将显示增加或

减少至少5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%、95%、99%或至少100%。疗效也可以表示为增加或减少“倍”数。例如，治疗有效量可以具有比对照至少1.2倍、1.5倍、2倍、5倍或更多的效果。精确的量将取决于许多因素，例如特定的活性剂、组合物的组分和物理特性、预期的患者群体、患者的考虑因素，包括体重、性别等，并且可以容易地由本领域技术人员基于此处提供的信息或相关文献中提供的其他信息确定。

[0112] 在本文中使用的术语“改善”、“增加”或“减少”表示相对于基线/对照/参考测量的值或参数，例如在本文描述的治疗开始前在细胞或组织中的测量，或在没有本文描述的治疗的情况下在细胞或组织中的测量，在开始本文描述的治疗之前在同一个体中的测量，或在没有本文描述的治疗的情况下在对照个体中的测量(或在多个对照个体中的标准测量，例如多个对照个体的平均值)。

[0113] “对照个体”是具有相似病症的个体，例如，患有与接受治疗的个体相同的细胞增殖性疾病的个体，其年龄与接受治疗的个体大致相同(以确保疾病的阶段在治疗个体和对照个体具有可比性)。接受治疗的个体(也称为“患者”或“受试者”)可以是患有细胞增殖性疾病的胎儿、婴儿、儿童、青少年或成年人。

[0114] 术语“细胞增殖性病症”是指以细胞异常增殖为特征的病症。增殖性疾病并不意味着对细胞生长速率的任何限制，而仅表示丧失对生长和细胞分裂的正常控制。因此，在一些实施方案中，增殖性病症的细胞可以具有与正常细胞相同的细胞分裂速率但不响应限制这种生长的信号。“细胞增殖性疾病”的范围包括瘤、癌症或肿瘤。

[0115] 术语“癌症”是指以具有侵入周围组织和/或转移到新定植位点的能力的细胞增殖为特征的多种恶性肿瘤中的任意一种，其包括癌、肉瘤、腺癌、黑色素瘤、白血病、淋巴瘤、生殖细胞肿瘤和母细胞瘤，包括实体癌和淋巴样癌。可以根据本发明所述的组合物和方法治疗的示例性癌症包括脑癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、头颈癌、肾癌、肺癌、非小细胞肺癌、间皮瘤、卵巢癌、前列腺癌、胃和子宫癌、白血病和髓母细胞瘤。

[0116] 术语“癌”是指上皮细胞趋向于浸润周围组织并引起转移的恶性生长。示例性癌包括，例如如腺泡癌(acinar carcinoma)、腺泡状癌(acinous carcinoma)、腺囊性癌(adenocystic carcinoma)、腺样囊性癌(adenoid cystic carcinoma)、腺癌(carcinoma adenomatosum)、肾上腺皮质癌、肺泡癌、肺泡细胞癌、基底细胞癌(basal cell carcinoma)、基底细胞癌(carcinoma basocellulare)、基底细胞样癌(basaloid carcinoma)、基底鳞状细胞癌(basosquamous cell carcinoma)、细支气管肺泡癌(bronchioalveolar carcinoma)、支气管癌(bronchiolar carcinoma)、支气管源性癌(bronchogenic carcinoma)、脑样癌(cerebriform carcinoma)、肝内胆管细胞癌(cholangiocellular carcinoma)、绒毛膜癌(chorionic carcinoma)、胶样癌(colloid carcinoma)、粉刺癌(comedo carcinoma)、子宫体癌(corpus carcinoma)、筛状癌(cribriform carcinoma)、胸廓癌(carcinoma encuirasse)、皮肤癌(carcinoma cutaneum)、柱状细胞癌(cylindrical carcinoma)、柱状细胞癌(cylindrical cell carcinoma)、导管癌、硬癌(carcinoma durum)、胚胎性癌(embryonal carcinoma)、髓样癌(encephaloid carcinoma)、epiennoid癌(epiennoid carcinoma)、腺样上皮癌(carcinoma epitheliale adenoides)、外植癌(exophytic carcinoma)、溃疡性癌(carcinoma ex ulcere)、纤维性癌(carcinoma fibrosum)、胶状癌(gelatiniform carcinoma)、胶样癌

(gelatinous carcinoma)、巨大细胞癌(giant cell carcinoma)、巨细胞癌(carcinoma gigantocellulare)、腺癌(glandular carcinoma)、颗粒细胞癌、毛母质癌(hair-matrix carcinoma)、多血癌(hematoid carcinoma)、肝细胞癌(hepatocellular carcinoma)、大嗜酸细胞癌(Hurthle cell carcinoma)、透明质癌(hyaline carcinoma)、类肾透明细胞癌(hypemephroid carcinoma)、幼稚型胚胎性癌(infantile embryonal carcinoma)、原位癌、表皮内癌(intraepidermal carcinoma)、上皮内癌(intraepithelial carcinoma)、克龙派切尔癌(Krompecher'scarcinoma)、Kulchitzky细胞癌(Kulchitzky-cell carcinoma)、大细胞癌(large-cell carcinoma)、豆状癌(lenticular carcinoma)、豆状腺癌(carcinoma lenticulare)、脂瘤癌(lipomatous carcinoma)、淋巴上皮癌(lymphoepithelial carcinoma)、髓样癌(carcinoma medullare)、髓样癌(medullary carcinoma)、黑色素癌(melanotic carcinoma)、软癌(carcinoma molle)、粘液癌(mucinous carcinoma)、粘液癌(carcinoma muciparum)、粘液细胞癌(carcinoma mucocellulare)、粘液表皮样癌(mucoepidermoid carcinoma)、粘液癌(carcinoma mucosum)、粘液癌(mucous carcinoma)、粘液瘤样癌(carcinoma myxomatodes)、鼻咽癌(naspharyngeal carcinoma)、燕麦细胞癌(oat cell carcinoma)、骨化性癌(carcinoma ossificans)、类骨质癌(osteoid carcinoma)、乳头状癌(papillary carcinoma)、门脉周癌(periportal carcinoma)、浸润前期癌(preinvasive carcinoma)、棘细胞癌(prickle cell carcinoma)、软糊状癌(pultaceous carcinoma)、肾的肾细胞癌(renal cell carcinoma of kidney)、储备细胞癌(reserve cell carcinoma)、肉瘤样癌(carcinoma sarcomatodes)、施奈德癌(schneiderian carcinoma)、硬性癌(scirrhous carcinoma)、阴囊癌(carcinoma scroti)、印戒细胞癌(signet-ring cell carcinoma)、单纯癌(carcinoma simplex)、小细胞癌(small-cell carcinoma)、马铃薯状癌(solanoid carcinoma)、球状细胞癌(spheroidal cell carcinoma)、梭形细胞癌(spindle cell carcinoma)、髓样癌(carcinoma spongiosum)、鳞癌(squamous carcinoma)、鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma)、绳捆癌(string carcinoma)、血管扩张性癌(carcinoma telangiectaticum)、血管扩张性癌(carcinoma telangiectodes)、移行细胞癌(transitional cell carcinoma)、结节性皮癌(carcinoma tuberosum)、结节性皮癌(tuberous carcinoma)、疣状癌(verrucous carcinoma)和绒毛状癌(carcinoma villosum)。

[0117] 术语“肉瘤”是指由胚胎结缔组织之类的物质构成的肿瘤,通常由嵌入纤维状或均质物质中的紧密堆积的细胞组成。示例性的肉瘤包括,例如,软骨肉瘤、纤维肉瘤、淋巴肉瘤、黑素肉瘤、粘液肉瘤、骨肉瘤、阿伯内西肉瘤(Abemethy's sarcoma)、脂肪肉瘤(adipose sarcoma)、脂肪肉瘤(liposarcoma)、腺泡状软组织肉瘤(alveolar soft part sarcoma)、成釉细胞肉瘤、葡萄状肉瘤(botryoid sarcoma)、绿色瘤肉瘤、绒毛膜癌、胚胎性肉瘤(embryonal sarcoma)、维尔姆斯肿瘤肉瘤(Wilms'tumor sarcoma)、子宫内膜肉瘤(endometrial sarcoma)、间质肉瘤(stromal sarcoma)、尤因肉瘤(Ewing's sarcoma)、筋膜肉瘤(fascial sarcoma)、纤维母细胞肉瘤(fibroblastic sarcoma)、巨细胞肉瘤(giant cell sarcoma)、粒细胞肉瘤(granulocytic sarcoma)、霍奇金肉瘤(Hodgkin's sarcoma)、特发性多发性色素沉着出血性肉瘤(idiopathic multiple pigmented hemorrhagic

sarcoma)、B细胞免疫母细胞肉瘤(immunoblastic sarcoma of B cells)、淋巴瘤(例如,非霍奇金淋巴瘤)、T细胞免疫母细胞肉瘤(immunoblastic sarcoma of T-cells)、詹森肉瘤(Jensen′s sarcoma)、卡波西肉瘤(Kaposi′s sarcoma)、肝巨噬细胞肉瘤(Kupffer cell sarcoma)、血管肉瘤(angiosarcoma)、白血病性肉瘤(leukosarcoma)、恶性间叶肉瘤(malignant mesenchymoma sarcoma)、骨膜外肉瘤(parosteal sarcoma)、网织红细胞肉瘤(reticulocytic sarcoma)、劳斯肉瘤(Rous sarcoma)、浆液囊性肉瘤(serocystic sarcoma)、滑膜肉瘤和毛细血管扩张性肉瘤(telangiectatic sarcoma)。

[0118] 术语“黑色素瘤”是指由皮肤和其他器官的黑色素细胞体系产生的肿瘤。黑色素瘤包括,例如,肢端雀斑样痣黑色瘤(acral-lentiginous melanoma)、无黑色素性黑素瘤(amelanotic melanoma)、良性幼年黑素瘤(benign juvenile melanoma)、克劳德曼黑素瘤(Cloudman's melanoma)、S91黑素瘤、哈-帕二氏黑素瘤(Harding-Passey melanoma)、幼年黑素瘤(juvenile melanoma)、恶性雀斑样痣黑素瘤(lentigo maligna melanoma)、恶性黑素瘤(malignant melanoma)、结节性黑素瘤(nodular melanoma)、甲下黑素瘤(subungal melanoma)和浅表扩散性黑素瘤(superficial spreading melanoma)。

[0119] 术语“淋巴瘤”是指影响造血和淋巴组织的癌症,其产生于淋巴细胞(主要存在于淋巴结、脾脏、胸腺和骨髓中的血细胞)。淋巴瘤的两种主要类型是非霍奇金淋巴瘤和霍奇金病。霍奇金病约占所有确诊淋巴瘤的15%。这是一种与里德-斯德伯格氏恶性B淋巴细胞(Reed-Sternberg malignant B lymphocytes)相关的癌症。非霍奇金淋巴瘤(NHL)可以根据癌症的生长速度和涉及的细胞类型进行分类。有具有侵袭性(高级)和惰性(低级)的NHL类型。根据涉及的细胞类型而言,有B细胞和T细胞的NHL。示例性B细胞淋巴瘤包括但不限于小淋巴细胞淋巴瘤、被套细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、黏膜相关淋巴组织结外淋巴瘤(extranodal(MALT)lymphoma)、淋巴结单核细胞样B细胞淋巴瘤(nodal(monocytoid B-cell)lymphoma)、脾淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤(Burkitt lymphoma)、淋巴母细胞淋巴瘤、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤(immunoblastic large cell lymphoma)或前体B淋巴母细胞淋巴瘤(precursor B-lymphoblastic lymphoma)。示例性的T细胞淋巴瘤包括但不限于皮肤T细胞淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤、蕈样肉芽肿和前体T淋巴母细胞淋巴瘤。

[0120] 术语“白血病”是指造血器官的进行性恶性疾病,通常以白细胞及其前体在血液和骨髓中的异常增殖和发育为特征。示例性的白血病包括,例如,急性非淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、急性粒细胞性白血病、慢性粒细胞性白血病、急性早幼粒细胞性白血病、成年T细胞性白血病、非白血性白血病(aleukemic leukemia)、非白血球性白血病(aleukocythemic leukemia)、嗜碱性白血病(basophylic leukemia)、母细胞性白血病、牛白血病、慢性髓细胞性白血病、皮肤白血病、胚胎白血病(embryonal leukemia)、嗜酸性白血病(eosinophilic leukemia)、格罗斯白血病(Gross′leukemia)、毛细胞性白血病、成血性白血病(hemoblastic leukemia)、成血细胞性白血病(hemocytoblastic leukemia)、组织细胞性白血病、干细胞性白血病、急性单核细胞性白血病、白细胞减少性白血病、淋巴白血病(lymphatic leukemia)、成淋巴细胞性白血病(lymphoblastic leukemia)、淋巴细胞性白血病、成淋巴性白血病(lymphogenous leukemia)、淋巴样白血病(lymphoid leukemia)、淋巴肉瘤细胞性白血病、肥大细胞性白血病、巨核细胞性白血病、小成髓细胞性

白血病、单核细胞性白血病、成髓性白血病(myeloblasts leukemia)、髓细胞性白血病、髓样粒细胞性白血病(myeloid granulocytic leukemia)、髓单核细胞性白血病(myelomonocytic leukemia)、内格利型(Naegeli)白血病、浆细胞性白血病(plasma cell leukemia)、浆细胞性白血病(plasmacytic leukemia)、早幼粒细胞性白血病、李德尔细胞性白血病(Rieder cell leukemia)、希林氏白血病(Schilling's leukemia)、干细胞性白血病、亚白血性白血病和未分化细胞性白血病。

[0121] 其他癌症包括,例如,多发性骨髓瘤、神经母细胞瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、横纹肌肉瘤、原发性血小板增多症、原发性巨球蛋白血症、小细胞肺癌、原发性脑肿瘤、胃癌、结肠癌、恶性胰腺岛叶瘤、恶性类癌、癌前皮肤病变、睾丸癌、甲状腺癌、神经母细胞瘤、食道癌、泌尿生殖道癌、恶性高钙血症、宫颈癌、子宫内膜癌和肾上腺皮质癌。

二、A2aR抗体和抗原结合蛋白

[0122] 本发明提供一种特异性结合A2aR的A2aR抗原结合分子。本文所用的术语"抗原结合分子"是指特异性结合特定抗原的蛋白质、多肽或分子复合物,其包含或由至少一个互补决定区(CDR)组成,所述互补决定区单独存在或与一个或多个其他CDR和/或框架区组合(FRs)。正如本文别处所定义的术语,在某些实施方案中,抗原结合分子是抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,本发明所述的抗原结合分子抑制A2aR的一种或多种生物学功能。

[0123] 在某些实施方案中,A2aR是人A2aR。示例性人A2aR包含SEQ ID NO:50所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述A2aR是食蟹猴A2aR。示例性食蟹猴A2aR包含SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列。

[0124] 1.示例性抗原结合分子的序列

[0125] A2aR抗原结合分子可以是单克隆抗体的形式;一种或多种含有一个或多个A2aR抗原结合结构域的多肽片段的形式;或者一种或多种编码一个或多个A2aR结合结构域的核酸的形式。

[0126] 在本发明的各种示例性实施方案中,抗原结合分子,例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段,包含(1)重链可变区,所述重链可变区包含三个互补决定区(HCDRs):HCDR1、HCDR2和HCDR3,其中HCDR1包含与选自SEQ ID NO:1、4和6的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%同一性的氨基酸序列;HCDR2包含与选自SEQ ID NO:2、5和7的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%同一性的氨基酸序列;HCDR3包含与SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%同一性的氨基酸序列;以及(2)轻链可变区,所述轻链可变区包含三个互补决定区(LCDRs):LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中LCDR1包含与选自SEQ ID NO:25和28的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%同一性的氨基酸序列;LCDR2包含与SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%同一性的氨基酸序列;LCDR3包含与选自SEQ ID NO:27和29的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%同一性的氨基酸序列;其中抗原结合分子特异性结合人A2aR。对应于本发明公开的示例性抗人A2aR单克隆抗体的示例性HCDR和LCDR的氨基酸序列如表1-5所示。

[0127] CDR的氨基酸序列边界可以由本领域技术人员使用多种已知编号方案中的任意一

种来确定，包括Kabat等人所描述的方案，同上(“Kabat”编号方案)；Al-Lazikani等人，1997，J.Mol.Biol.，273:927-948所描述的方案(“Chothia”编号方案)；MacCallum等人，1996，J.Mol.Biol.262:732-745所描述的方案(“Contact”编号方案)；Lefranc等人，Dev.Comp.Immunol.，2003，27:55-77所描述的方案(“IMGT”编号方案)；和Honegge和Pluckthun，J.Mol.Biol，2001，309:657-70所描述的方案(“AHo”编号方案)；其中每一个方案都通过引用整体并入本文。表1和2分别显示了根据Kabat编号方案和IMGT编号方案得到的本发明示例性抗体的重链CDRs序列。表3显示了本发明的示例性抗体的重链CDRs的序列，其中的CDR序列是根据基于Kabat和IMGT编号方案的CDRs组合来定义。表4和5显示根据Kabat编号方案和IMGT编号方案得到的本发明示例性抗体的轻链CDR序列。

[0128] 在某些实施方案中，本发明包括一种抗原结合分子，例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段，其包含基于Kabat和IMGT编号方案或其组合定义的CDRs。在某些实施方案中，本发明包括一种抗原结合分子，例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段，其包含(1)HCDR1，其具有选自表2所列HCDR1序列的氨基酸序列；(2)HCDR2，其具有选自表2所列HCDR2序列的氨基酸序列；(3)HCDR3，其具有选自表2所列HCDR3序列的氨基酸序列；(4)LCDR1，其具有选自表5所列LCDR1序列的氨基酸序列；(5)LCDR2，其具有选自表5所列LCDR2序列的氨基酸序列；和(6)LCDR3，其具有选自表5所列LCDR3序列的氨基酸序列。

[0129] 在某些实施方案中，本发明包括一种抗原结合分子，例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段，其包含(1)HCDR1，其具有选自表3所列HCDR1序列的氨基酸序列；(2)HCDR2，其具有选自表3所列HCDR2序列的氨基酸序列；(3)HCDR3，其具有选自表3所列HCDR3序列的氨基酸序列；(4)LCDR1，其具有选自表4所列LCDR1序列的氨基酸序列；(5)LCDR2，其具有选自表4所列LCDR2序列的氨基酸序列；和(6)LCDR3，其具有选自表4所列LCDR3序列的氨基酸序列。

[0130] 本文所指CDR中的“位点”是指从CDR的N端开始计数的氨基酸。例如，HCDR1中的位点1是指HCDR1中的第一个氨基酸。因此，在mAB 1B5-3D7中，基于Kabat编号方案的HCDR1的位点1是精氨酸(R)。

[0131] 表1:示例性抗体的重链CDRs的氨基酸序列(Kabat编号方案)

mAb	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
1B5-3D7	RFWMN	1	RIDPYDSETQYNHKFWD	2	SLYGKGDY	3
3F6-9G5	SYWMN	4	RIDPSDSEAHYHHKFWG	5	SLYGKGDY	3
3F8-12E9	RYWMN	6	RIDPSDSETHYNHKFWG	7	SLYGKGDY	3
N/A	X_1X_2WMN	8	RIDPX_3DSEX_4X_5YX_6HKFWX_7	9		

[0132] 在本文中，X_1是S或R，X_2是Y或F，X_3是S或Y，X_4是A或T，X_5是H或Q，X_6是H或N，和X_7是D或G。

[0133] 表2:示例性抗体的重链CDRs的氨基酸序列(IMGT编号方案)

mAb	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:

1B5-3D7	GFTFTRFW	10	IDPYDSET	11	GRSLYGKGDY	12
3F6-9G5	GFAFTSYW	13	IDPSDSEA	14	LRSLYGKGDY	15
3F8-12E9	GFTFTRYW	16	IDPSDSET	17	LRSLYGKGDY	15
N/A	$GFX_8FTX_9X_{10}W$	18	$IDPX_{11}DSEX_{12}$	19	$X_{13}RSLYGKGDY$	20

[0134] 在本文中，X_8是A或T，X_9是R或S，X_{10}是F或Y，X_{15}是S或Y，和X_{16}是G或L。

[0135] 表3：示例性抗体的重链CDRs的氨基酸序列(Kabat和IMGT编号方案的组合)

mAb	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
1B5-3D7	GFTFTRFWMN	21	RIDPYDSETQYNHKFWD	2	GRSLYGKGDY	12
3F6-9G5	GFAFTSYWMN	22	RIDPSDSEAHYHHKFWG	5	LRSLYGKGDY	15
3F8-12E9	GFTFTRYWMN	23	RIDPSDSETHYNHKFWG	7	LRSLYGKGDY	15
N/A	$GFX_{14}FTX_{15}X_{16}WMN$	24	$RIDPX_3DSEX_4X_5YX_6HKFWX_7$	9	$X_{13}RSLYGKGDY$	20

[0136] 在本文中，X_{14}是A或T，X_{15}是R或S，和X_{16}是F或Y。

[0137] 表4：示例性抗原结合分子的轻链CDRs的氨基酸序列(Kabat编号方案)

mAb	LCDR1	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
1B5-3D7	RSSQSIVHSNGNTYLE	25	KVSNRFS	26	FQGSHVPLT	27
3F6-9G5	RSSQSLVHRNGNTYLE	28	KVSNRFS	26	YQGSHVPLT	29
3F8-12E9	RSSQSIVHSNGNTYLE	25	KVSNRFS	26	YQGSHVPLT	29
N/A	$RSSQSX_{17}VHX_{18}NGNTYLE$	30			$X_{19}QGSHVPLT$	31

[0138] 在本文中，X_{17}为L或I，X_{18}为R或S，和X_{19}为Y或F。

[0139] 表5：示例性抗原结合分子的轻链CDRs的氨基酸序列(IMGT编号方案)

mAb	LCDR1	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
1B5-3D7	QSIVHSNGNTY	32	KVS	N/A	FQGSHVPLT	27
3F6-9G5	QSLVHRNGNTY	33	KVS	N/A	YQGSHVPLT	29
3F8-12E9	QSIVHSNGNTY	32	KVS	N/A	YQGSHVPLT	29
N/A	$QSX_{20}VHX_{21}NGNTY$	34			$X_{19}QGSHVPLT$	31

[0140] 在本文中，X_{20}是L或I，和X_{21}是R或S。

[0141] 在一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段包含：(1)重链可变区(HCVR)，其包含与选自SEQ ID NO:35、36和37的氨基酸序列具有约80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％至约100％同一性的氨基酸序列；和(2)轻链可变区(LCVR)，其包含与选自SEQ ID NO:41、42和43的氨基酸序列具有约80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％至约

100％同一性的氨基酸序列，其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合人A2aR。表6-8示本发明公开的示例性抗人A2aR单克隆抗体的示例性HCVR和LCVR的氨基酸序列。表9和10示分别编码本发明示例性抗人A2aR抗体的HCVR和LCVR的DNA的示例性核苷酸序列。

[0142] 表6:示例性抗原结合分子的HCVRs的氨基酸序列

mAbs	HCVR 序列	SEQ ID NOs
1B5-3D7	QVQLQQPGTELVKPGAPVKLSCKTSGFTFTRFWMNWVRQRPGRGLEWIGRI DPYDSETQYNHKFWDRATLTVDKSSSTVYIQLSSLTSEDSAVYYCGRSLYG KGDYWGQGTTLTVSS	35
3F6-9G5	QVQLQQPGTELVKPGAPVRLSCKASGFAFTSYWMNWVRQRPGRGLEWIGRI DPSDSEAHYHHKFWGKATLTVDKSSSTVYIQLNGLTSEDSAVYYCLRSLYG KGDYWGHGTTLTVSS	36
3F8-12E	QVQLQQPGTELVKPGAPVKLSCKASGFTFTRYWMNWVKQRPGRGLEWIGRI DPSDSETHYNHKFWGKATLTVDKSSSTAYIQLNSLTSEDSAVYYCLRSLYG KGDYWGQGTTLTVSS	37

[0143] 表7:示例性抗原结合分子的焦谷氨酰化HCVRs的氨基酸序列

mAbs	焦谷氨酰化HCVR序列	SEQ ID NOs
1B5-3D7	pEVQLQQPGTELVKPGAPVKLSCKTSGFTFTRFWMNWVRQRPGRGLEWIGRI DPYDSETQYNHKFWDRATLTVDKSSSTVYIQLSSLTSEDSAVYYCGRSLYGK GDYWGQGTTLTVSS	38
3F6-9G5	pEVQLQQPGTELVKPGAPVRLSCKASGFAFTSYWMNWVRQRPGRGLEWIGRI DPSDSEAHYHHKFWGKATLTVDKSSSTVYIQLNGLTSEDSAVYYCLRSLYGK GDYWGHGTTLTVSS	39
3F8-12E9	pEVQLQQPGTELVKPGAPVKLSCKASGFTFTRYWMNWVKQRPGRGLEWIGRI DPSDSETHYNHKFWGKATLTVDKSSSTAYIQLNSLTSEDSAVYYCLRSLYGK GDYWGQGTTLTVSS	40

[0144] 表8:示例性抗原结合分子的LCVRs的氨基酸序列

mAbs	LCVR序列	SEQ ID NOs
1B5-3D7	DVLMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQRPGQSPKLLIYK VSNRFSGVPDRFSGSGSGTYFTLRISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPLTFGSGTTLE LK	41
3F6-9G5	DVLMTQTPLSLSVRLGDQASISCRSSQSLVHRNGNTYLEWYLQRPGQSPKLLIYK VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCYQGSHVPLTFGSGTKLE IK	42
3F8-12E9	DVLMTQTPLSLSVGLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQRPGQSPKLLIYK VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCYQGSHVPLTFGSGTKLE IK	43

[0145] 表9:编码示例性抗原结合分子的HCVRs的核苷酸序列

mAbs	序列	SEQ ID NOs
1B5-3D7	CAGGTCCAACTTCAGCAGCCTGGGACTGAACTTGTGAAGCCTGGGGCTCCAGTGAAGCT GTCCTGTAAGACTTCTGGCTTCACCTTCACCAGGTTCTGGATGAACTGGGTGAGGCAGA GGCCTGGACGAGGCCTCGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTTACGATAGTGAAACTCAA TATAATCACAAATTCTGGGACAGGGCCACACTGACTGTTGACAAATCCTCCAGCACAGT CTACATCCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGGAAGAT CCCTATATGGTAAAGGGGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA	44
3F6-9G5	CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGACTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTCCAGTGAGGCT GTCCTGCAAGGCTTCTGGCTTCGCCTTCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTGAGGCAGA GGCCTGGACGAGGCCTCGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTTCCGATAGTGAAGCTCAC TATCATCATAAATTCTGGGGCAAGGCCACACTGACTGTTGACAAATCCTCCAGCACCGT TTACATCCAGCTCAACGGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTCTAAGAT CCCTATATGGTAAAGGGGACTACTGGGGCCATGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA	45
3F8-12E9	CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGACTGAGCTTGTGAAGCCTGGGGCTCCAGTGAAGCT GTCCTGCAAGGCTTCTGGCTTCACCTTCACCCGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGA GGCCTGGACGAGGCCTCGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTTCCGATAGTGAAACTCAC TATAATCATAAATTCTGGGGCAAGGCCACACTGACTGTTGACAAATCCTCCAGCACAGC CTACATCCAACTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTCTAAGAT CCCTATATGGTAAAGGGGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA	46

[0146] 表10:编码示例性抗原结合分子的LCVRs的核苷酸序列

mAbs	序列	SEQ ID NOs
1B5-3D7	GATGTTTTGATGACCCAGTCTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCC	47

	ATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGG TACCTGCAGAGACCAGGCCAGTCTCCAAAACTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTT TCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACATATTTCACACTCAGGATC AGCAGAGTGGAGGCTGAAGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACATGTTCCT CTCACGTTCGGCTCGGGGACAACATTGGAACTAAAA	
3F6-9G5	GATGTTTTGATGACCCAAACCCCACTCTCCCTGTCTGTCAGACTTGGAGATCAAGCCTCC ATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGTCTTGTACATAGAAATGGAAACACCTATTTAGAATGG TACCTGCAGAGACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAGGTTTCCAACCGATTT TCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATC AGCAGAGTGGAGGCTGAAGATCTGGGAGTTTATTACTGCTATCAAGGTTCACATGTTCCT CTCACGTTCGGCTCGGGGACAAAATTGGAAATAAAA	48
3F8-12E9	GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGTCTGTCGGTCTTGGAGATCAAGCCTCC ATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGTATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGG TACCTGCAGAGACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTT TCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATC AGCAGAGTGGAGGCTGAAGATCTGGGAGTTTATTACTGCTATCAAGGTTCACATGTTCCT CTCACGTTCGGCTCGGGGACAAAATTGGAAATAAAA	49

[0147] 在某些实施方案中,本发明的抗原结合分子,例如抗体或其抗原结合片段,在翻译后被修饰。翻译后修饰的实例包括通过羧肽酶在重链C端切割赖氨酸;将重链和轻链N端的谷氨酰胺或谷氨酸通过焦谷氨酰化修饰为焦谷氨酸;糖基化;氧化;脱酰胺;和糖化,已知这种翻译后修饰发生在各种抗体中(参见journal of Pharmaceutical Sciences,2008,第97卷,第2426-2447页,其整体通过引用并入本文)。经过翻译后修饰的抗原结合分子例如抗体

或其抗原结合片段的实例包括重链可变区的N端已经焦谷氨酰化的抗原结合分子例如抗体或其抗原结合片段和/或已经删除重链C端的赖氨酸的抗原结合分子例如抗体或其抗原结合片段。N端经焦谷氨酰化的示例性抗原结合分子的序列列于表7中。当用于表示多肽中的氨基酸时，本文所用的“pE”指焦谷氨酸。

[0148] 2.抗原结合分子的变体

[0149] 在某些实施方案中，本发明所述的A2aR抗原结合分子，例如所述抗A2aR抗体，可以是单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、Fab、$(Fab)_2$、scFv或包含本文所述的其他结合特异性的多特异性抗体。

[0150] 在某些实施方案中，本文所述的抗A2aR抗体可以与包含一种或多种修饰的Fc连接，以改变抗体的一种或多种功能特性，例如血清半衰期、补体结合、Fc受体结合，和/或抗原依赖性细胞毒性。此外，本文所述的抗体可以被化学修饰(例如，将一个或多个化学部分连接到抗体上)或者被修饰以改变糖基化，从而改变抗体的一种或多种功能特性。更具体地，在某些实施方案中，本发明所述的抗体可以包含Fc区中的修饰，以产生具有以下特点的Fc变体：(a)增高或降低的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)，(b)增高或降低的补体介导的细胞毒性(CDC)，(c)增高或降低的对C1q的亲和力，和/或(d)比亲本Fc增高或降低的对Fc受体的亲和力。此类Fc区变体通常在Fc区中包含至少一个氨基酸修饰。将氨基酸修饰组合是十分可取的。例如，Fc区变体可以包括例如本文所述的特定Fc区位点的两个、三个、四个、五个等取代。

[0151] 对于需要完全避免效应子功能的用途，例如，当单独的抗原结合足以产生期望的治疗效果，并且效应子功能仅导致不期望的副作用(或增加其风险)时，可以使用IgG4抗体或无ADCC效应的IgG1 L234F、L235E和P331S变体，或者可以设计缺少Fc区或其大部分的抗体或片段，或者可以突变Fc以完全消除糖基化(例如，N297A)。或者，可以生成人IgG2(CH1结构域和铰链区)和人IgG4(CH2和CH3结构域)的杂交构建体，其没有效应子功能，并且缺乏结合FcγRs(如同IgG2)和激活补体(如同IgG4)的能力。当使用IgG4恒定结构域时，通常优选包括模拟IgG1铰链序列的S228P取代和防止Fab臂交换从而稳定IgG4分子的R409K突变，从而减少正在接受治疗的患者中治疗性抗体和内源性IgG4之间的Fab臂交换。

[0152] 在某些实施方案中，可以修饰所述抗A2aR抗体或其片段以提供延长的生物半衰期。可以采用各种方法来进行，包括例如增加Fc区对FcRn的结合亲和力的方法。在一个实施方案中，改变抗体的CH1或CL区域，以包含来自IgG的Fc区CH2结构域的两个环的补救受体结合表位，如美国专利5,278,288及6,121,022中所述。Fc区的残基编号是Kabat的EU索引的残基编号。参照残基编号提供本文公开的序列变体，所述残基编号后为取代天然存在的氨基酸的氨基酸，任选地前面是该位点的天然残基。在给定位点可存在多个氨基酸的情况下，例如，如果天然存在的同种型之间的序列不同，或者如果在该位点的可取代可有多个突变，则它们由斜线分隔(例如，“X/Y/Z”)。

[0153] 增加与FcRn的结合和/或改善药代动力学特性的示例性Fc变体包括位点259、308和434的取代，包括例如259I、308F、428L、428M、434S、434H、434F、434Y和434M。增加Fc与FcRn结合的其他变体包括：250E、250Q、428L、428F、250Q/428L(Hinton等人，2004，J.Biol.Chem.279(8):6213-6216，Hinton等人，2006Journal of Immunology 176:346-356)，256A，272A，305A，307A，311A，312A，378Q，380A，382A，434A(Shields等人，(2001)

J.Biol.Chem.,276(9):6591-6604),252F,252Y,252W,254T,256Q,256E,256D,433R,434F,434Y,252Y/254T/256E,433K/434F/436H(Dall'Acqua等人,(2002)J.Immunol.,169:5171-5180,Dall'Acqua等人,(2006)J.Biol.Chem.,281:23514-23524,以及美国专利8,367,805)。

[0154] IgG Fc中的某些保守残基(I253、H310、Q311、H433、N434)的修饰,例如N434A变体(Yeung等人,(2009)J.Immunol.182:7663),可提高与FcRn的亲和力,从而延长抗体在循环中的半衰期(WO 98/023289)。包含M428L和N434S组合的Fc变体已显示可提高与FcRn的结合并将血清半衰期延长至五倍(Zalevsky等人,(2010)Nat.Biotechnol.28:157)。包含T307A、E380A和N434A修饰组合的Fc变体也延长了IgG1抗体的半衰期(Petkova等人,(2006)Int.Immunol.18:1759)。此外,包含M252Y-M428L、M428L-N434H、M428L-N434F、M428L-N434Y、M428L-N434A、M428L-N434M和M428L-N434S组合的Fc变体也可延长半衰期(US 2006/173170)。此外,据报道,包含M252Y、S254T和T256E的组合Fc变体可将半衰期延长近4倍(Dall'Acqua等人,(2006)J.Biol.Chem.281:23514)。

[0155] 在某些实施方案中,本发明所述的A2aR抗原结合分子是双特异性抗体,包含:特异性结合A2aR的第一靶向结构域和特异性结合A2aR中另一个表位或另一种蛋白质的第二靶向结构域。在一些实施方案中,所述第一靶向结构域包含本发明所述的任意A2aR抗体的抗原结合片段。

[0156] 在某些实施方案中,本发明所述的抗原结合分子(例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段)化学缀合至一种或多种治疗活性肽和/或小分子药物上。所述肽或小分子药物可以连接到例如还原的SH基团和/或碳水化合物侧链上。制备肽或小分子药物与抗体的共价或非共价偶联物的方法是本领域已知的并且任何这样的已知方法都可以使用。

[0157] 在一些实施方案中,所述肽或小分子药物通过二硫键连接到还原的抗体组分的铰链区上。或者,可以用异双功能交联剂(例如N-琥珀酰3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP))来连接此类试剂。这种偶联的通用技术是本领域众所周知的。在一些实施方案中,所述肽或小分子药物通过抗体Fc区中的碳水化合物部分偶联。碳水化合物基团可用于增加与硫醇基团结合的相同试剂的负载,或者碳水化合物部分可用于结合不同的治疗剂或诊断剂。通过抗体碳水化合物部分将肽抑制剂或小分子药物偶联至抗体的方法是本领域技术人员众所周知的。例如,在一个实施方案中,所述方法涉及使具有氧化的碳水化合物部分的抗体组分与具有至少一个游离胺官能团的载体聚合物反应。所述反应引起初始席夫碱(亚胺)连接,其可通过还原成仲胺而稳定以形成最终的偶联物。美国专利公开2014/0356385中描述了将小分子药物和肽与抗体偶联的示例性方法。

[0158] 所述A2aR抗体(包括其片段及其多特异性形式)的大小范围可为50kD至300kD、50kD至250kD、60kD至250kD、80kDa至250kD、100kD至250kD、125kD至250kD、150kD至250kD、60kD至225kD、75kD至225kD、100kD至225kD、125kD至225kD、150kD至225kD、60kD至200kD、75kD至200kD、100kD至200kD、125kD至200kD、150kD至200kD、60kD至150kD、75kD至150kD、100kD至150kD、60kD至125kD、75kD至125kD、75kD至100kD,或上述范围中列出的整数的任意组合所包含的任意范围,或由上述范围之间的整数的任意组合指定的任意范围。

[0159] 3.抗体和抗原结合分子的生物学特性

[0160] 本发明包括一种结合人和食蟹猴A2aR的抗体及其抗原结合片段。

[0161] 本发明包括一种A2aR抗原结合分子，例如A2aR抗体或其抗原结合片段，其能够特异性结合在细胞表面上表达的人和食蟹猴A2aR并抑制A2aR活性或功能。根据某些实施方案，所述抗原结合分子阻断细胞表面表达的人A2aR与A2aR激动剂之间的相互作用。可以通过实施例4中描述的检测方法或基本上类似的方法来评估A2aR抗原结合蛋白(例如A2aR抗体或其抗原结合片段)抑制A2aR活性的程度。本发明包括一种抗原结合分子，例如抗体，其阻断在细胞表面表达的人A2aR与A2aR激动剂之间的相互作用，且用实施例4中所述的测定法或基本上类似的测定法测得其IC_{50}值为4.5×10^{-9}M至约1.5×10^{-9}M，或更低。

[0162] 本发明包括一种A2aR抗原结合分子，例如A2aR抗体，其特异性结合细胞表面上表达的人A2aR。在某些实施方案中，在使用实施例5中所述的方法或基本上类似的方法进行检测时，本发明所述的抗原结合分子与除A2aR以外的人腺苷受体或某些非人类哺乳动物的A2aR(例如鼠A2aR)的结合是检测不到的或很微弱。

[0163] 本发明包括一种A2aR抗原结合分子，例如A2aR抗体或其抗原结合片段，其特异性结合细胞表面上表达的非人灵长类动物A2aR，例如食蟹猴A2aR。在某些实施方案中，在使用实施例7中所述的方法或基本相似的方法进行检测时，所述A2aR抗原结合分子(例如A2aR抗体或其抗原结合片段)以相似的亲和力结合非人灵长类动物A2aR。

[0164] 本发明包括一种A2aR抗原结合分子，例如A2aR抗体或其抗原结合片段，其特异性结合人或非人灵长类动物免疫细胞表面上表达的内源性人和非人灵长类动物A2aR，例如食蟹猴A2aR。在某些实施方案中，在使用实施例7中所述的方法或基本相似的方法进行检测时，所述A2aR抗原结合分子(例如A2aR抗体或其抗原结合片段)结合外周血单核细胞(PBMC)中免疫细胞表面表达的人或非人灵长类动物A2aR。

[0165] 4.物种选择性和物种交叉反应

[0166] 根据某些实施方案，本发明提供一种结合人A2aR但不结合其他物种的A2aR的抗原结合分子。本发明还包括一种结合人A2aR和一种或多种非人物种(例如非人灵长类动物)的A2aR的抗原结合分子。

[0167] 根据本发明的某些示例性实施方案，本发明提供一种抗原结合分子，其结合人A2aR并可结合或不结合(视情况而定)小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、沙鼠、猪、猫、狗、兔子、山羊、绵羊、牛、马、骆驼、食蟹猴、狨猴、恒河猴或黑猩猩A2aR。例如，在本发明的特定示例性实施方案中，本发明提供一种包含结合人A2aR和非人灵长类动物(例如食蟹猴)A2aR的抗原结合结构域的抗原结合分子。

三、抗A2aR抗原结合分子的治疗用途

[0168] 本发明所述的抗A2aR抗原结合分子(包括抗体、其抗原结合片段及其多特异性抗体)具有多种体外、体内和离体用途，所述用途与在癌症治疗中通过阻断腺苷信号传导和其他信号传导来增强免疫应答相关。不希望受任何理论的束缚，假设本发明所述的抗原结合分子(例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段)结合细胞表面表达的A2aR并抑制其活性，A2aR活性的抑制导致例如细胞内cAMP浓度降低。因此，本发明所述的抗原结合分子(和包含其的治疗组合物)，除其他外，可用于治疗任何可获益于抑制A2aR活性(例如刺激和/或激活免疫反应)的疾病或病症。鉴于A2aR的广泛表达以及腺苷和A2aR介导的多样效应，本发明所述的抗A2aR抗原结合分子(例如抗体或其抗原结合片段)可以单独使用或与多种活性剂结合使用，用于治疗范围广泛的疾病或病症，包括多种癌症。

[0169] 因此，本发明提供降低细胞内cAMP浓度的方法，包括使细胞与本发明所述的抗原结合分子(例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段)接触。可以用实施例4中描述的方法或基本上类似的方法来测定细胞内cAMP浓度的降低。在某些实施方案中，与基线水平相比，本发明所述的方法将细胞内cAMP的浓度降低至少约10％、约20％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％、约95％，或更多。

[0170] 在一些实施方案中，将本发明所述的抗原结合分子(例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段)施用于(体外)培养的细胞或施用于人受试者(体内或离体)，以增强针对多种疾病的免疫力。在一个实施方案中，在有需要的受试者中刺激免疫反应的方法包括向受试者施用本文描述的抗A2aR抗体、其抗原结合片段(例如抗A2aR的HCVR和LCVR)或多特异性抗A2aR抗体，以增强、刺激、上调受试者体内的免疫反应，进而例如抑制肿瘤生长、刺激抗肿瘤T细胞免疫和/或刺激抗微生物免疫。

[0171] 一方面，增强受试者免疫反应(例如，T细胞反应)的方法包括向受试者施用本文所述的抗A2aR抗体，以增强受试者体内的免疫反应(例如，T细胞反应)。在一些实施方案中，所述受试者是患有肿瘤的受试者，针对肿瘤的免疫反应得到增强。肿瘤可以是实体瘤或液体瘤，例如血液恶性肿瘤。在某些实施方案中，所述肿瘤是免疫原性肿瘤。在其他实施方案中，肿瘤是非免疫原性的。在其他实施方案中，所述受试者是携带病原体的受试者，其针对病原体的免疫应答由于施用本文所述的抗A2aR抗体而得到增强。所述免疫应答包括但不限于：a)促进效应T细胞功能；b)降低Treg活性；c)防止Treg扩增；d)增强NK细胞功能；或者e)促进抗原呈递细胞的1型激活。

[0172] 在某些实施方案中，与基线水平相比，本发明所述的方法增加免疫应答至少约10％、约20％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％、约1倍、约2倍、约4倍或更多。

[0173] 优选的受试者包括需要增强免疫反应的人类患者。所述方法特别适用于治疗患有可通过增强免疫反应(例如，T细胞介导的免疫反应)治疗的病症的人类患者。所述方法特别适用于治疗癌症、慢性感染和慢性炎性疾病。优选地，本文所述的用于本公开的方法的抗体是人抗体或人源化抗体。

[0174] 在一个实施方案中，抑制受试者体内肿瘤细胞生长的方法包括向受试者施用本文所述的抗A2aR抗体，从而抑制受试者体内肿瘤的生长。可以通过多种方法测定对肿瘤生长的抑制。可以使用以下方法测定肿瘤的生长：例如Talkington，A and Durrett，R，Estimating Tumor Growth Rates in vivo，Bull Math Biol.，2015Oct.：77(10)：1934-54中描述的方法(可在https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4764475/获取，其全部内容通过引用并入本文)。也可以通过肿瘤大小的减小来测定对肿瘤生长的抑制。在某些实施方案中，与基线水平相比，本发明所述的方法抑制肿瘤生长至少约10％、约20％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％、约95％或更多。

[0175] 在某些实施方案中，本发明所述的抗原结合分子，例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段，可用于降低肿瘤微环境中的免疫抑制。可以通过各种方法测量这种降低。例如，可以通过肿瘤中某些生物标志物(例如PD-L1、CD73、IL-10或TGF-β)的存在和/或丰度来测量肿瘤微环境中的免疫抑制水平。也可以通过肿瘤中CD8+细胞毒性T细胞与调节性T(T_{reg})细胞的比例来测定所述免疫抑制水平。一般而言，免疫抑制会降低CD8+细胞毒性T细胞与T_{reg}的比例。在某些实施方案中，与基线水平相比，本发明所述的抗原结合分子，例如抗A2aR抗体

或其抗原结合片段，将肿瘤微环境中的免疫抑制水平降低至少约10％、约20％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％、约95％或更多。

[0176] 本文还包括从患有肿瘤(例如癌性肿瘤)的受试者的肿瘤微环境中消除T_{reg}细胞的方法，包括向受试者施用治疗有效量的本文描述的抗A2aR抗体，其包含在肿瘤微环境中刺激消除T_{reg}细胞的Fc。例如，可以是具有合适的效应子功能或增强的效应子功能(由一种或多种激活Fc受体引起)的Fc。

[0177] 在某些优选的实施方案中，在肿瘤微环境中T_{reg}被消除而T_{eff}没有被显著消除或抑制，并且在肿瘤微环境外T_{eff}细胞和T_{reg}细胞均没有被显著消除或抑制。在某些实施方案中，所述受试者的肿瘤微环境中T_{reg}细胞上的A2aR水平高于T_{eff}细胞上的A2aR水平。在某些实施方案中，抗A2aR抗体可消除肿瘤中的T_{regs}和/或肿瘤浸润淋巴细胞(TILs)中的T_{regs}。

[0178] 在某些优选的实施方案中，所述受试者患有细胞增殖性疾病或癌症。用本发明所述的抗原结合分子(例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段)阻断通过A2aR的腺苷信号传导可以增强患者对癌细胞的免疫应答。因此，本发明提供治疗患有癌症的受试者的方法，包括向受试者施用本文所述的抗A2aR抗原结合分子，例如抗体或其抗原结合片段，使受试者得到治疗，例如，抑制或减少癌性肿瘤的生长和/或使肿瘤消退。所述抗A2aR抗体可单独用于抑制癌性肿瘤的生长。或者，所述抗A2aR抗体可与一种或多种其他靶向性活性剂联合使用，例如其他抗癌靶标、免疫原性剂、标准癌症治疗或其他抗体，如下所述。本发明所述的抗原结合分子可用于治疗例如原发性和/或转移性肿瘤。本发明还包括治疗受试者体内残留癌的方法。本文所用的术语“残留癌”是指在用抗癌疗法治疗后，受试者体内存在或持续存在的一种或多种癌细胞。

[0179] 一方面，治疗癌症的方法包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的本文所述的抗A2aR抗体。优选地，所述抗体抑制人A2aR的活性并且包含本文描述的一种或多种HCVR和LCVR。此外，用于该方法的所述抗A2aR抗原结合分子(例如抗体)可包括其嵌合或人源化非人抗A2aR抗体。可以通过多种方法测定治疗癌症的功效。例如，可以通过存活率的提高或肿瘤大小的缩小来衡量治疗癌症的功效。在某些实施方案中，与基线水平相比，本发明所述的方法将治疗癌症的功效提高至少约10％、约20％、约50％、约60％、约70％、约80％、约90％、约95％，约1倍、约2倍、约4倍或更多。在癌症治疗的背景下，如果本发明所述的A2aR抗原结合分子是唯一的治疗剂，则所述基线水平是指使用安慰剂的疗效；如果本发明所述的A2aR抗原结合分子与其他治疗剂联合使用，则所述基线水平是指使用安慰剂或其他治疗剂的疗效。

[0180] 可被本发明所述的抗体抑制生长的癌症包括多种，尤其是对使用其他抗体或化学治疗剂的单一疗法无反应或倾向于无反应的癌症。用于治疗的癌症的非限制性实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、鳞状非小细胞肺癌(NSCLC)、非NSCLC、神经胶质瘤、胃肠癌、肾癌(例如透明细胞癌)、卵巢癌、肝癌、结直肠癌、子宫内膜癌、肾癌(例如肾细胞癌(RCC))、前列腺癌(例如激素难治性前列腺癌)、甲状腺癌、神经母细胞瘤、胰腺癌、胶质母细胞瘤(多形性胶质母细胞瘤)、宫颈癌、胃癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌和头颈癌、胃癌、生殖细胞瘤、小儿肉瘤、鼻窦自然杀伤细胞、黑色素瘤(例如转移性恶性黑色素瘤(例如皮肤或眼内恶性黑色素瘤))、骨癌、皮肤癌、子宫癌、肛门区癌症、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组

织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、儿童实体瘤、输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊髓轴肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症(包括石棉诱发的癌症、病毒相关癌症(例如人乳头瘤病毒(HPV)相关肿瘤)和血液系统恶性肿瘤(其衍生自两种主要血细胞谱系中的任一种,即骨髓细胞系(产生粒细胞、红细胞、血小板、巨噬细胞和肥大细胞)或淋巴细胞系(产生B、T、NK和浆细胞),例如所有类型的白血病、淋巴瘤和骨髓瘤(例如急性、慢性、淋巴细胞和/或骨髓性白血病,例如急性白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴性白血病(CLL)慢性髓性白血病(CIVIL)、未分化AML(MO)、成髓细胞白血病(M1)、成髓细胞白血病(M2;细胞成熟)、早幼粒细胞白血病(M3或M3变体[M3V])、粒单核细胞白血病(M4或伴嗜酸性粒细胞增多的M4变体[M4E])、单核细胞白血病(M5)、红白血病(M6)、巨核细胞白血病(M7)、孤立性粒细胞白血病肉瘤和绿色瘤;淋巴瘤(例如霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NEIL)、B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞样淋巴瘤、单核细胞样B细胞淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤、间变性(例如,Ki 1+)大细胞淋巴瘤、成人T细胞淋巴瘤/白血病、套细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤、肠T细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、前体T淋巴母细胞淋巴瘤、T淋巴母细胞;和淋巴瘤/白血病(T-Lbly/T-ALL)、外周T细胞淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤、移植后淋巴组织增生性疾病、真组织细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤(LBL)、淋巴系造血肿瘤、急性淋巴细胞白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、滤泡性淋巴瘤、弥漫性组织细胞淋巴瘤(DHL)、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤(CTLC)(或称为蕈样肉芽肿或Sezary综合征)和伴有华氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)的淋巴浆细胞样淋巴瘤(LPL));骨髓瘤(例如IgG骨髓瘤、轻链骨髓瘤、非分泌性骨髓瘤、冒烟型骨髓瘤(也称为惰性骨髓瘤)、孤立性浆细胞瘤和多发性骨髓瘤)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、毛细胞淋巴瘤;髓系造血肿瘤,间充质来源肿瘤(包括纤维肉瘤和横纹肌肉瘤);精原细胞瘤,畸胎癌,中枢和周围神经肿瘤(包括星形细胞瘤,神经鞘瘤);间充质来源肿瘤(包括纤维肉瘤、横纹肌肉瘤和骨肉瘤);和其他肿瘤(包括黑色素瘤、色素性干皮病、角化棘皮瘤、精原细胞瘤、甲状腺滤泡癌和畸胎癌)、淋巴谱系造血肿瘤(例如T细胞和B细胞肿瘤,包括但不限于T细胞疾病,例如T-幼淋巴细胞白血病(T-PLL),包括小细胞和脑样细胞类型;优选T细胞类型的大颗粒淋巴细胞白血病(LGL);a/d T-NHL肝脾淋巴瘤;外周/胸腺后T细胞淋巴瘤(多形性和免疫母细胞亚型);血管中心(鼻腔)T细胞淋巴瘤);头颈癌、肾癌、直肠癌、甲状腺癌;急性髓性淋巴瘤,以及所述癌症的任意组合。本文所述的方法也可用于治疗转移性癌症、难治性癌症(例如,先前的免疫治疗(例如使用阻断CTLA-4或PD-1的抗体)难以治疗的癌症)和复发性癌症。

[0181] 在一些实施方案中,相对于当前护理标准来说,用本发明所述的抗A2aR抗体和/或其他活性剂治疗癌症患者可产生长期持久反应,包括至少1、2、3、4、5、10年或更长时间的长期存活和/或至少1、2、3、4、5、10年或更长时间的无复发存活。在某些实施方案中,用本发明所述的抗A2aR抗体和/或其他活性剂治疗癌症患者可以预防癌症复发或将癌症复发延迟例如1、2、3、4、5、10年或更长时间。所述抗A2aR治疗可用作主要或次要治疗。

[0182] 骨髓移植目前被用于治疗多种造血来源的肿瘤。但这种治疗的后果是产生移植物

抗宿主病，而抑制A2aR可降低移植物抗肿瘤反应，从而提高供体移植的肿瘤特异性T细胞的有效性。

[0183] 在一些实施方案中，在抗A2aR抗体存在下的离体激活和抗原特异性T细胞的扩增以及这些细胞向接受处的过继转移可增加过继转移的T细胞的频率和活性，以刺激抗原特异性T细胞对抗癌症或病毒感染。

[0184] 本文所述的适用于在体内、离体或体外施用本发明所述抗原结合分子(例如抗A2aR抗体及其抗原结合片段)的途径是本领域公知的并且可以由普通技术人员选择。例如，所述抗体组合物可以通过肠胃外注射(例如，静脉内或皮下)施用。如下文进一步描述的，合适的剂量取决于所述受试者的年龄和体重以及所述抗体组合物的浓度和/或配方。

[0185] 神经退行性疾病与增加的A2aR活性有关。因此，在某些实施方案中，本发明提供治疗神经退行性疾病的方法，包括向有需要的受试者施用本发明所述的抗原结合分子，例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段，从而治疗神经退行性疾病。

四、联合疗法

[0186] 在另一方面，本发明提供在受试者中增强抗原特异性T细胞应答、降低免疫抑制和/或减缓肿瘤生长的治疗组合物和联合疗法。本发明包括包含任意(例如本文中)示例性抗原结合分子与一种或多种其他治疗剂组合的组合物和治疗制剂，以及包括向有需要的受试者施用此类组合物的治疗方法。本文所用的术语“其他治疗剂”是指可用于治疗疾病或病症的任意药剂，以及用于治疗某些疾病或病症的任意方法。例如，当放疗和手术与本发明所述的抗原结合分子例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段组合使用时，其被视为“其他治疗剂”。

[0187] 在某些实施方案中，所述其他治疗剂可以是不同于本发明所述的抗原结合分子(例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段)的A2aR拮抗剂。示例性A2aR拮抗剂包括但不限于AZD4635(AstraZeneca)、NIR178(Novartis)、AB928(Arcus)、CPI-444(Corvus)、EOS850(iTeos)和MK-3814(MerckSharp and Dolme)。

[0188] 在一个实施方案中，所述其他治疗剂可以抗体或其抗体片段的形式施用，针对另一种腺苷信号通路的成员，例如A1aR拮抗剂、A2bR拮抗剂、A3R拮抗剂、CD39拮抗剂、CD73拮抗剂，或其组合。示例性CD39拮抗剂包括但不限于示例性抗CD39抗体及其抗原结合部位(美国专利10,738,128、10,662,253和10,556,959中有所描述)。示例性小分子CD73拮抗剂包括但不限于AB421、MEDI9447和BMS-986179。示例性抗CD73抗体及其抗原结合位点在专利10,766,966、10,584,169、10,556,968和10,167,343中有所描述。

[0189] 在一些实施方案中，本发明所述的抗A2aR抗原结合分子，例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段，与一种或多种其他治疗剂共同施用，其中所述其他治疗剂具有有效刺激免疫反应和/或细胞凋亡的量，以进一步增强、刺激或上调受试者体内的免疫反应和/或细胞凋亡。此外，所述一种或多种其他治疗活性剂在用抗A2aR抗体治疗之前或之后施用。

[0190] 在某些实施方案中，本文所述的抗A2aR抗体与一种或多种其他活性剂(例如抗癌抗体或多肽、化疗剂和放射毒剂)联合施用或同时联合施用。在其他实施方案中，本文所述的抗A2aR抗体与标准癌症治疗(例如手术或放疗)联合施用或同时联合施用。

[0191] 所述抗A2aR抗体与这些活性剂或治疗方式的共同施用可以解决以下临床缺陷：耐药性、导致肿瘤细胞不与抗体反应的抗原性的变化，以及毒性(通过施用较低剂量的一个或

多个药剂)。A2aR抑制特别适合与其他情况下难起效的化疗方案联合使用。在这些情况下,其有可能实现增强的效力,同时减少所施用的化疗试剂的剂量(Mokyr等人,(1998)Cancer Research 58:5301-5304)。用放疗或化疗抑制A2aR的基本原理是基于放疗和大多数化疗化合物的细胞毒性作用促进细胞死亡,这可进一步导致抗原呈递通路中肿瘤抗原水平的升高。通过细胞死亡与A2aR抑制相加或协同作用的其他组合疗法包括手术和激素剥夺或抑制。这些方案中的每一个都进一步在宿主中产生肿瘤抗原来源。

[0192] 在一些实施方案中,本文所述的抗A2aR抗体与另一种活性剂连接成免疫复合物、免疫缀合物或融合蛋白的形式。或者,所述抗A2aR抗体可以与其他活性剂分开施用。在这种情况下,所述抗A2aR抗体和其他拮抗剂可以在其他活性剂之前、之后或同时施用,或者可以与其他已知疗法(例如其他抗癌剂、放射等)共同施用。因此,本发明提供一种组合物和方法,用于提供两种或更多种抗癌剂,其通过不同的机制相加或协同作用,以在人类癌细胞中有益地发挥细胞毒性和免疫保护作用。

[0193] 例如,在一些实施方案中,本文所述的抗A2aR抗体可与以下抗癌剂组合:例如烷化剂;蒽环类抗生素;抗代谢物;解毒剂;干扰素;多克隆或单克隆抗体;EGFR抑制剂;HER2抑制剂;组蛋白脱乙酰酶抑制剂;激素;有丝分裂抑制剂;磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)抑制剂;Akt抑制剂;哺乳动物雷帕霉素靶标(mTOR)抑制剂;蛋白酶体抑制剂;聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)抑制剂;Ras/MAPK通路抑制剂;中心体去簇剂;多激酶抑制剂;丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂;酪氨酸激酶抑制剂;VEGF/VEGFR抑制剂;紫杉烷或紫杉烷衍生物、芳香酶抑制剂、蒽环类药物、微管靶向药物、拓扑异构酶毒性药物、分子靶标或酶(例如激酶或蛋白质甲基转移酶)的抑制剂、胞苷类似物或其组合。

[0194] 示例性烷化剂包括但不限于环磷酰胺(Cytoxan;Neosar);苯丁酸氮芥(Leukeran);马法兰(Alkeran);卡莫司汀(BiCNU);白消安(Busulfex);洛莫司汀(CeeNU);达卡巴嗪(DTIC-Dome);奥沙利铂(Eloxatin);卡莫司汀(Gliadel);异环磷酰胺(Ifex);二氯甲基二乙胺(Mustargen);白消安(Myleran);卡铂(Paraplatin);顺铂(CDDP;Platinol);替莫唑胺(Temodar);噻替哌(Thioplex);苯达莫司汀(Treanda);或链脲菌素(Zanosar)。

[0195] 示例性的蒽环类抗生素包括但不限于阿霉素(Adriamycin);阿霉素脂质体(Doxil);米托蒽醌(Novantrone);博来霉素(Blenoxane);柔红霉素(Cerubidine);柔红霉素脂质体(DaunoXome);更生霉素(Cosmegen);表柔比星(Ellence);伊达比星(Idamycin);普卡霉素(Mithracin);丝裂霉素(Mutamycin);喷司他丁(Nipent);或戊柔比星(Valstar)。

[0196] 示例性的抗代谢物包括但不限于氟尿嘧啶(Adrucil);卡培他滨(希罗达);羟基脲(Hydrea);巯嘌呤(Purinethol);培美曲塞(Alimta);氟达拉滨(Fludara);奈拉滨(Arranon);克拉屈滨(Cladribine Novaplus);氯法拉滨(Clolar);阿糖胞苷(Cytosar-U);地西他滨(Dacogen);阿糖胞苷脂质体(DepoCyt);羟基脲(Droxia);普拉曲沙(Folotyn);氟尿苷(FUDR);吉西他滨(Gemzar);克拉屈滨(Leustatin);氟达拉滨(Oforta);甲氨蝶呤(MTX;Rheumatrex);甲氨蝶呤(Trexall);硫鸟嘌呤(Tabloid);TS-1或阿糖胞苷(Tarabine PFS)。

[0197] 示例性解毒剂包括但不限于氨磷汀(Ethyol)或美司钠(Mesnex)。

[0198] 示例性干扰素包括但不限于干扰素α-2b(Intron A)或干扰素α-2a(Roferon-A)。

[0199] 示例性的多克隆或单克隆抗体包括但不限于曲妥珠单抗(Herceptin);奥法木单

抗(Arzerra)；贝伐珠单抗(阿瓦斯汀)；利妥昔单抗(Rituxan)；西妥昔单抗(Erbitux)；帕尼单抗(维克替比)；托西莫单抗/碘131托西莫单抗(Bexxar)；阿伦单抗(Campath)；替伊莫单抗(Zevalin;In-111;Y-90Zevalin)；吉妥珠单抗(Mylotarg)；依库珠单抗(Soliris)或者地舒单抗。

[0200] 示例性的EGFR抑制剂包括但不限于吉非替尼(Iressa)；拉帕替尼(Tykerb)；西妥昔单抗(Erbitux)；厄洛替尼(Tarceva)；帕尼单抗(Vectibix)；PKI-166；卡奈替尼(CI-1033)；马妥珠单抗(Emd7200)或EKB-569。

[0201] 示例性的HER2抑制剂包括但不限于曲妥珠单抗(Herceptin)；拉帕替尼(Tykerb)或AC-480。

[0202] 示例性组蛋白脱乙酰酶抑制剂包括但不限于伏立诺他(Zolinza)、丙戊酸、罗米地辛、恩替诺特、艾贝司他、吉维诺司他(givinostat)和莫塞替诺特(mocetinostat)。

[0203] 示例性激素包括但不限于他莫昔芬(Soltamox;Nolvadex)；雷洛昔芬(Evista)；甲地孕酮(Megace)；亮丙瑞林(Lupron;Lupron Depot;Eligard;Viadur)；氟维司群(Faslodex)；来曲唑(Femara)；曲普瑞林(Trelstar LA;Trelstar Depot)；依西美坦(Aromasin)；戈舍瑞林(Zoladex)；比卡鲁胺(Casodex)；阿那曲唑(Arimidex)；氟甲睾酮(Androxy;Halotestin)；甲羟孕酮(Provera;Depo-Provera)；雌莫司汀(Emcyt)；氟他胺(Eulexin)；托瑞米芬(Fareston)；地加瑞克(Firmagon)；尼鲁米特(Nilandron)；阿巴瑞克(Plenaxis)；或睾内酯(Teslac)。

[0204] 示例性的有丝分裂抑制剂包括但不限于紫杉醇(Taxol;Onxol;Abraxane)；多西紫杉醇(Taxotere)；长春新碱(Oncovin;Vincasar PFS)；长春碱(Velban)；依托泊苷(Toposar;Etopophos;VePesid)；替尼泊苷(Vumon)；伊沙匹隆(Ixempra)；诺考达唑；埃博霉素；长春瑞滨(Navelbine)；喜树碱(CPT)；伊立替康(Camptosar)；拓扑替康(Hycamtin)；安吖啶或片螺素D(lamellarin D,LAM-D)。

[0205] 示例性磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)抑制剂包括渥曼青霉素(一种PI3K的不可逆抑制剂)、去甲氧绿胶霉素(demethoxyviridin,一种渥曼青霉素的衍生物)、LY294002(一种PI3K的可逆抑制剂)；BKM120(Buparlisib)；艾代拉里斯(一种PI3K Delta抑制剂)；杜韦利西布(IPI-145,一种PI3K delta和gamma抑制剂)；阿培利西(BYL719,一种α特异性PI3K抑制剂)；TGR 1202(以前称为RP5264,一种口服PI3Kδ抑制剂)；和库潘尼西(BAY 80-6946,一种主要是PI3Kα,δ亚型的抑制剂)。

[0206] 示例性Akt抑制剂包括但不限于米替福新、AZD5363、GDC-0068、MK2206、哌立福新、RX-0201、PBI-05204、GSK2141795和SR13668。

[0207] 示例性MTOR抑制剂包括但不限于依维莫司(Afinitor)或替西罗莫司(Torisel)；雷帕鸣(rapamune)，利罗莫司(ridaforolimus)；地磷莫司(deforolimus,AP23573)、AZD8055(AstraZeneca)、OSI-027(OSI)、INK-128、BEZ235、PI-103、Torin1、PP242、PP30、Ku-0063794、WAY-600、WYE-687、WYE-354和CC-223。

[0208] 示例性蛋白酶体抑制剂包括但不限于硼替佐米(PS-341)、伊沙佐米(MLN 2238)、MLN 9708、德兰佐米(CEP-18770)、卡非佐米(PR-171)、YU101、奥普佐米(ONX-0912)、马里佐米(NPI-0052)和双硫仑。

[0209] 示例性PARP抑制剂包括但不限于奥拉帕尼、伊尼帕尼(iniparib)、维利帕尼、BMN-

673、BSI-201、AG014699、ABT-888、GPI21016、MK4827、INO-1001、CEP-9722、PJ-34、Tiq-A，Phen，PF-01367338及其组合。

[0210] 示例性Ras/MAPK通路抑制剂包括但不限于曲美替尼、司美替尼、考比替尼、CI-1040、PD0325901、AS703026、R04987655、R05068760、AZD6244、GSK1120212、TAK-733、U0126、MEK1627和GG。

[0211] 示例性中心体去簇剂包括但不限于灰黄霉素；那可汀、那可汀衍生物，例如溴化那可汀(例如，9-溴那可汀)、还原溴那可汀(RBN)、N-(3-溴苄基)那可汀、氨基那可汀及其水溶性衍生物；CWO69；菲衍生聚(ADP-核糖)聚合酶抑制剂，PJ-34；N2-(3-吡啶基甲基)-5-硝基-2-呋喃酰胺、N2-(2-噻吩甲基)-5-硝基-2-呋喃酰胺和N2-苄基-5-硝基-2-呋喃酰胺。

[0212] 示例性多激酶抑制剂包括但不限于瑞戈非尼；索拉非尼(Nexavar)；舒尼替尼(Sutent)；BIBW 2992；E7080；Zd6474；PKC-412；莫特塞尼；或AP24534。

[0213] 示例性的丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂包括但不限于，鲁伯斯塔；伊瑞/法舒地尔(eril/easudil)盐酸盐；夫拉平度；塞利西利(CYC202；Roscovitrine)；SNS-032(BMS-387032)；Pkc412；苔藓抑素；KAI-9803；SF1126；VX-680；azd1152；Arry-142886(AZD-6244)；SCIO-469；GW681323；CC-401；CEP-1347或PD 332991。

[0214] 示例性酪氨酸激酶抑制剂包括但不限于厄洛替尼(Tarceva)；吉非替尼(Iressa)；伊马替尼(Gleevec)；索拉非尼(Nexavar)；舒尼替尼(Sutent)；曲妥珠单抗(Herceptin)；贝伐珠单抗(Avastin)；利妥昔单抗(Rituxan)；拉帕替尼(Tykerb)；西妥昔单抗(Erbitux)；帕尼单抗(Vectibix)；依维莫司(Afinitor)；阿伦单抗(Campath)；吉妥单抗(Mylotarg)；替西罗莫司(Torisel)；帕唑帕尼(Votrient)；达沙替尼(Sprycel)；尼洛替尼(Tasigna)；瓦他拉尼(Ptk787；ZK222584)；CEP-701；SU5614；MLN518；XL999；VX-322；azd0530；BMS-354825；SKI-606CP-690；AG-490；WHI-P154；WHI-P131；AC-220；或AMG888。

[0215] 示例性的VEGF/VEGFR抑制剂包括但不限于贝伐珠单抗(Avastin)；索拉非尼(Nexavar)，舒尼替尼(Sutent)；雷珠单抗；培加他尼；或凡德替尼。

[0216] 示例性微管靶向药物包括但不限于紫杉醇、多西紫杉醇、长春新碱、长春碱、诺考达唑、埃博霉素和长春瑞滨。

[0217] 示例性拓扑异构酶毒性药物包括但不限于替尼泊苷、依托泊苷、阿霉素、喜树碱、柔红霉素、更生霉素、米托蒽醌、安吖啶、表柔比星和伊达比星。

[0218] 示例性紫杉烷或紫杉烷衍生物包括但不限于紫杉醇和多西紫杉醇。

[0219] 示例性一般化学治疗剂、抗肿瘤剂、抗增殖剂包括但不限于六甲蜜胺(Hexalen)；异维A酸(Accutane；Amnesteem；Claravis；Sotret)；维A酸(Vesanoid)；阿扎胞苷(Vidaza)；硼替佐米(Velcade)；天冬酰胺酶(Elspar)；左旋咪唑(Ergamisol)；米托坦(Lysodren)；甲基苄肼(Matulane)；培门冬酶(Oncaspar)；地尼白介素diftitox(Ontak)；卟吩姆(porfimer，Photofrin)；阿地白介素(Proleukin)；来那度胺(Revlimid)；贝沙罗汀(Targretin)；沙利度胺(Thalomid)；替西罗莫司(Torisel)；三氧化二砷(Trisenox)；维替泊芬(Visudyne)；含羞草素(Leucenol)；(1M替加氟-0.4M 5-氯-2,4-二羟基嘧啶-1M氧酸钾)或洛伐他汀。

[0220] 在某些实施方案中，A2aR抑制与CD3刺激联合进行，CD3刺激在抗A2aR抗体治疗之前、同时或之后。例如，在一个实施方案中，增强抗原特异性T细胞应答的方法包括将T细胞

与本文所述的抗A2aR抗体和表达CD3的细胞接触，使得抗原特异性T细胞反应增强，A2aR介导的免疫抑制降低。抗原特异性T细胞反应的任何合适的指标都可用于测定抗原特异性T细胞反应。此类合适指标的非限制性实例包括在抗体的存在下T细胞增殖提高和/或在抗体的存在下细胞因子产生增加。在一个优选的实施方案中，所述抗原特异性T细胞的白介素-2和/或干扰素-γ的产生得到增强。

[0221] 在一些实施方案中，本文所述的抗A2aR抗体还可与双特异性抗体联合使用，所述双特异性抗体把表达Fcα或Fcγ受体的效应细胞靶向肿瘤细胞(参见例如美国专利5,922,845和5,837,243)。此类双特异性抗体可用于靶向两种不同的抗原。例如，抗Fc受体/抗肿瘤抗原(例如Her-2/neu)的双特异性抗体已被用于将巨噬细胞靶向肿瘤部位。这种靶向可能更有效地激活肿瘤特异性反应。这些反应的T细胞臂会因A2aR的抑制而增强。或者，可以使用结合肿瘤抗原和树突细胞特异性细胞表面标记物的双特异性抗体将抗原直接递送至DC。

[0222] 在所有上述方法中，A2aR抑制可以与以下其他形式的免疫疗法相结合：例如细胞因子治疗(例如，干扰素、GM-CSF、G-CSF、IL-2)，或使用两种不同结合特异性的双特异性抗体疗法，以提供增强的肿瘤抗原呈递。

[0223] 在一些实施方案中，用于任意前述治疗方法、用于抗原结合分子或药物组合物的所述其他治疗剂是选自以下的免疫刺激剂：(a)阻断免疫细胞抑制性受体(免疫检查点)信号传导的试剂或其配体(免疫检查点抑制剂)或编码此类试剂的核酸；(b)免疫细胞刺激受体的激动剂或编码这种激动剂的核酸；(c)细胞因子或编码细胞因子的核酸；(d)溶瘤病毒或编码溶瘤病毒的核酸；(e)表达嵌合抗原受体的T细胞；(f)双特异性或多特异性T细胞靶向抗体或编码此类抗体的核酸；(g)抗TGF-β抗体或编码此类抗体的核酸；(h)TGF-β诱捕器或编码这种诱捕器的核酸；(i)癌症相关抗原的疫苗，包括此类抗原或编码此类抗原的核酸，(j)细胞疗法，和(k)以上的组合。在一些实施方案中，所述其他治疗剂是阻断免疫细胞的抑制性受体或其配体的信号传导的试剂或编码此类试剂的核酸，所述抑制性受体或其配体选自PD-1、PD-L1、TIGIT、CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、TIM-3、神经突蛋白、BTLA、CECAM-1、CECAM-5、IL-1R8、VISTA、LAIR1、LILRB1、LILRB2、LILRB3、LILRB4、LILRB5、CD96、CD112R、CD160、2B4、TGFβ-R、KIR、NKG2A及其组合。在一些实施方案中，所述其他治疗剂是免疫细胞刺激受体的激动剂或编码此类激动剂的核酸，所述激动剂选自OX40、CD2、CD27、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、ICOS(CD278)、4-1BB(CD 137)、GITR、CD28、CD30、CD40、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、KG2C、SLAMF7、NKG2C、NKG2D、NKp46、NKp80、CD 160、B7-H3、CD83的配体及其组合。在一些实施方案中，所述其他治疗剂是细胞因子或编码选自IL-2、IL-5、IL-7、IL-12、IL-15、IL-2I及其组合的细胞因子的核酸。在一些实施方案中，所述其他治疗剂是溶瘤病毒或编码选自单纯疱疹病毒、水泡性口炎病毒、腺病毒、新城疫病毒、牛痘病毒、马拉巴病毒及其组合的溶瘤病毒的核酸。在一些实施方案中，所述其他治疗剂是细胞疗法。细胞疗法可包括具有嵌合抗原受体(CAR)的T细胞、NK细胞或巨噬细胞。在一些实施方案中，所述细胞疗法包括双特异性或多特异性T细胞靶向抗体。

[0224] 在某些实施方案中，本发明提供了治疗受试者的疾病或病症例如癌症的方法。所述方法包括将本发明的抗原结合分子，例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段单独或与第二种或多种其他治疗剂组合施用至受试者，其中受试者先前已接受过第一种或多种其他治疗剂的治疗。在某些实施方案中，用第一种或多种其他治疗剂治疗受试者的疾病时可能表现出

低功效。例如，用所述第一种或多种治疗剂进行的治疗可以是用抗PD1抗体进行的治疗，受试者可能对其表现出抗性。在一些实施方案中，所述第二种或多种其他治疗剂与所述第一种或多种其他治疗剂相同。在一些实施方案中，所述第二种或多种其他治疗剂与所述第一种或多种其他治疗剂不同。

[0225] 在某些实施方案中，所述免疫检查点抑制剂是与免疫检查点特异性相互作用的抗体。在一些实施方案中，所述其他治疗剂包括免疫刺激剂。在一些方面，所述免疫检查点抑制剂选自抗PD-1抗体(例如，帕博利珠单抗或纳武利尤单抗)，和抗PD-L抗体(例如，阿替利珠单抗)，和抗CTLA-4抗体(例如，伊匹单抗)，及其组合。在一些方面，所述免疫检查点抑制剂是帕博利珠单抗。在一些方面，所述免疫检查点抑制剂是纳武利尤单抗。在一些方面，所述免疫检查点抑制剂是阿替利珠单抗。

[0226] 在一些实施方案中，所述其他治疗剂是抑制PD-1和PD-L1之间相互作用的药剂。在一些方面，所述抑制PD-1和PD-L1之间相互作用的其他治疗剂选自抗体、拟肽和小分子。在一些方面，所述抑制PD-1和PD-L1之间相互作用的其他治疗剂选自帕博利珠单抗、纳武利尤单抗、阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、度伐利尤单抗、BMS-936559、磺胺间甲氧嘧啶1和磺胺甲二唑2。

[0227] 在一些实施方案中，所述抗A2aR抗体与免疫原性试剂组合或同时施用。免疫原性试剂的非限制性实例包括癌细胞、肿瘤疫苗和纯化的肿瘤抗原(包括重组蛋白、肽和碳水化合物分子)；溶瘤病毒；转染了编码免疫刺激细胞因子等的基因的细胞。

[0228] 在某些实施方案中，所述抗A2aR抗体与目标抗原或已知存在于待治疗的受试者(例如，携带肿瘤或携带病毒的受试者)体内的抗原一起施用以增强抗原特异性免疫。当抗A2aR抗体与另一种药剂一起施用时，两者可以分开或同时施用。

[0229] 在某些实施方案中，可通过将任何本文所述的抗A2aR抗体中的一种或多种与目的抗原(例如疫苗)共同施用来增强抗原特异性免疫应答。因此，在一个实施方案中，在受试者体内增强对抗原的免疫应答的方法包括向受试者施用：(i)抗原；(ii)基于A2aR的抗体，从而增强受试者对抗原的免疫反应。所述抗原可以是例如肿瘤抗原、病毒抗原、细菌抗原或来自病原体的抗原。此类抗原的非限制性实例包括上文部分描述的抗原，例如上文讨论的肿瘤抗原(或肿瘤疫苗)，或来自病毒、细菌或上文描述的其他病原体的抗原。

[0230] 考虑到活性剂组合物的协同益处，在某些实施方案中，抗A2aR抗体和其他活性剂各自以相对于其单一疗法中使用的剂量的亚治疗剂量施用于有需要的受试者。

[0231] 在某些实施方案中，A2aR抑制与标准癌症治疗(例如手术、放疗和化学疗法)联用。在这些情况下，有可能减少化疗试剂的给药剂量。A2aR抑制和化学疗法的联合使用可以加剧细胞凋亡并促进肿瘤抗原呈递以实现杀伤性细胞免疫。其他协同联合疗法包括A2aR抑制与放疗、手术或激素剥夺或抑制相结合。这些方案中的每一个都在宿主中产生肿瘤抗原来源。

[0232] 所述其他治疗剂可以在施用本发明所述的抗原结合分子之前、同时或之后施用；(出于本公开的目的，此类施用方案被认为是抗原结合分子与其他治疗活性成分“联合”施用)。

[0233] 本发明包括一种药物组合物，其中本发明所述的抗原结合分子与一种或多种本文所述的其他治疗剂共同配制。

五、表达抗A2aR抗体的核酸和宿主细胞

[0234] 另一方面，本发明提供一种编码本发明所述的抗原结合分子(例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段)的核酸，以及包含此类核酸的表达载体。在一些实施方案中，核酸编码本文所述的实施方案中的抗体或片段的HCVR和/或LCVR片段，或编码本文所述的任何其他抗体和抗体片段。

[0235] 可以使用常规方法(例如，使用能够特异性结合编码单克隆抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)将编码单克隆抗体中抗原结合位点的DNA从杂交瘤细胞中分离并测序。或者，可以通过直接蛋白质测序来测定目标免疫球蛋白的氨基酸序列，并且可以根据通用密码子表设计合适的编码核苷酸序列。在其他情况下，抗原结合位点的核苷酸和氨基酸序列或其他免疫球蛋白序列，包括恒定区、铰链区等，都可以从本领域熟知的公开来源获得。

[0236] 表达载体可用于在体外培养的细胞中合成本公开所述的抗体，或者其可直接施用于患者以在体内或离体表达本公开所述的抗体。本文所用的“表达载体”是指病毒或非病毒载体，其包含编码一种或多种本公开所述抗体的多核苷酸，其形式适合在宿主细胞中表达多核苷酸以用于抗体制备目的或作为治疗剂直接施用。

[0237] 当一个核酸序列被置于与另一个核酸序列的功能关系中时，称一个核酸序列“可操作地连接”另一个核酸序列。例如，如果前序列或信号肽的DNA表达参与多肽分泌的前蛋白，则所述前序列或信号肽的DNA可操作地连接多肽的DNA；如果启动子或增强子影响序列的转录，则所述启动子或增强子可操作地连接编码序列；或者如果核糖体结合位点被定位以便于翻译，则所述核糖体结合位点可操作地连接编码序列。通常，“可操作地连接”是指被连接的DNA序列是连续的，并且在信号肽存在的情况下，其是连续的并且处于读取阶段。然而，增强子不必是连续的。连接是通过在方便的限制性位点上连接来完成的。如果不存在此类位点，则可根据常规做法使用合成的寡核苷酸衔接子或接头。

[0238] 用于表达本公开所述抗体的核酸序列通常包括从成熟蛋白中去除的N端信号肽序列。由于信号肽序列可以影响表达水平，多核苷酸可以编码多种不同的N端信号肽序列中的任意一种。本领域技术人员应当理解，表达载体的设计可取决于以下因素：要转化的宿主细胞的选择、目标蛋白质的表达水平等。

[0239] 上述“调节序列”是指在一种或多种宿主生物体中表达可操作连接的编码序列所必需的DNA序列。术语“调节序列”包括启动子、增强子和其他表达控制元件(例如，聚腺苷酸化信号)。调节序列包括在许多类型的宿主细胞中指导核苷酸序列组成型表达的调节序列，或仅在某些宿主细胞中指导核苷酸序列表达的调节序列(例如，组织特异性调节序列)。表达载体通常含有用于转录终止的序列，并且可以另外含有一种或多种对mRNA稳定性有积极影响的元件。

[0240] 所述表达载体包含一种或多种转录调节元件，包括启动子和/或增强子，用于指导本公开所述的抗体的表达。启动子包含DNA序列，其功能是从对于转录起始位点的相对固定的位置启动转录。启动子包含RNA聚合酶和转录因子基本相互作用所需的核心元件，并且可以与其他上游元件和应答元件一起操作。

[0241] 本文所用的术语“启动子”应广义解释以包括例如来自基因组基因的转录调控元件(TREs)或其嵌合TREs，包括TATA盒或用于精确转录起始的起始元件，含或不含其他TREs(即，上游激活序列、转录因子结合位点、增强子和沉默子)，其调节可操作连接的基因的激

活或抑制以响应发育和/或外部刺激，以及反式作用调节蛋白或核酸。启动子可以包含基因组片段或者其可以包含一个或多个TRE组合在一起的的嵌合体。

[0242] 优选的启动子是能够在目标靶细胞中指导高水平表达的启动子。所述启动子可包括组成型启动子(例如，HCMV、SV40、延伸因子-1α(EF-1α)的启动子)，或在特定目标细胞类型中表现出优先表达的启动子。增强子通常是指远离转录起始位点发挥作用的DNA序列，其可以位于转录单位的5'或3'端。此外，增强子可以在内含子内以及编码序列内。其长度通常在10至300bp之间，并且以顺式方式发挥作用。增强子的功能是增加和/或调节附近启动子的转录。优选的增强子包括在产生抗体的细胞中指导高水平表达的增强子。可以将细胞或组织特异性转录调控元件(TRE)并入表达载体中，以将表达限制在期望的细胞类型中。Pol III启动子(H1或U6)特别适用于表达可表达siRNA的shRNA。可以设计表达载体以促进本公开所述的抗体在一种或多种细胞类型中的表达。

[0243] siRNA是一种双链RNA，可以对其进行改造以诱导mRNA的序列特异性转录后的基因沉默。合成的siRNA在结构上模拟通常在细胞中由Dicer酶加工的siRNA类型。当用表达载体表达时，所述表达载体被设计为将处理过的转录短双链发夹样RNA(shRNA)转录为细胞内的靶向siRNA。可以使用熟知的算法设计并使用常规的DNA/RNA合成仪合成siRNA和shRNA。

[0244] 为了共表达本公开的抗体的独立的链，可以并入合适的剪接供体和剪接受体序列以表达两种产物。或者，内部核糖体结合序列(IRES)或2A肽序列可用于由一个启动子表达多种产物。IRES提供了一种核糖体可以结合的结构，其不需要位于mRNA的5'端。因此，其可以指导核糖体在mRNA中的第二个起始密码子处开始翻译，使得单个mRNA产生不止一种多肽。2A肽包含短序列，所述短序列介导2A位点上游和下游肽的共翻译自裂解，使得等摩尔量的单个转录物产生两种不同的蛋白质。CHYSEL是2A肽的非限制性实例，其使得翻译真核核糖体释放其正在合成的增长的多肽链，而不与mRNA解离。所述核糖体继续翻译，从而产生第二个多肽。

[0245] 表达载体可包括病毒载体或非病毒载体。病毒载体可以来源于腺相关病毒(AAV)、腺病毒、疱疹病毒、牛痘病毒、脊髓灰质炎病毒、痘病毒、逆转录病毒(包括慢病毒，例如HIV-1和HIV-2)、辛德毕斯(Sindbis)病毒和其他RNA病毒、甲病毒、星状病毒、冠状病毒、正粘病毒、乳多空病毒、副粘病毒、细小病毒、微小核糖核酸病毒、披膜病毒(togaviruses)等。非病毒载体只是一种“裸”表达载体，其没有与病毒衍生成分(例如，衣壳和/或包膜)包装在一起。

[0246] 在某些情况下，可以通过使用病毒载体固有的或工程化到病毒载体中的靶向特性来工程化这些载体以靶向某些疾病或细胞群。特定细胞可以被“靶向”用于多核苷酸的递送以及表达。在这种情况下，术语“靶向”是指使用衣壳、包膜蛋白、抗体形式的内源性或异源性结合剂对特定细胞进行递送，或指使用组织特异性调节元件来限制到特定的细胞子集的表达，或两者均有。

[0247] 在一些实施方案中，抗体链的表达处于调节元件(例如组织特异性或普遍存在的启动子)的控制之下。在一些实施方案中，普遍存在的启动子(例如CMV启动子、CMV-鸡β-肌动蛋白杂交(CAG)启动子、组织特异性或肿瘤特异性启动子)控制特定抗体重链或轻链或单链衍生物的表达。

[0248] 可以通过直接注射裸DNA或通过将编码抗体的多核苷酸封装在脂质体、微粒、微胶

囊、病毒样颗粒或红细胞影中的方法，将非病毒表达载体用于非病毒基因的转移。此类组合物可以通过化学偶联进一步连接至靶向结构域，以促进核酸的靶向递送和/或进入期望的目标细胞。此外，质粒载体可以与合成基因转移分子(例如聚合DNA结合阳离子例如聚赖氨酸、鱼精蛋白和白蛋白)一起孵育，并与细胞靶向配体(例如脱唾液酸类粘蛋白、胰岛素、半乳糖、乳糖或转铁蛋白)连接。

[0249] 或者，可以使用裸DNA。可通过压缩或使用可生物降解的乳胶珠子提高裸DNA的摄取效率。可以通过处理珠子以增加疏水性并促进破坏核内体以及释放DNA到细胞质中来进一步改善这种递送。

六、生产抗A2aR抗体的方法

[0250] 另一方面，本发明提供一种转化有编码抗A2aR HCVR和/或LCVR的核酸或表达载体的宿主细胞。所述宿主细胞可以是细菌或真核细胞，所述细菌或真核细胞能够表达编码抗A2aR HCVR和/或LCVR的核酸或表达载体或本文所述的任何其他共同施用的抗体或拮抗剂。

[0251] 在另一方面，制备本公开所述的抗体的方法包括在允许产生抗体或其片段的条件下培养转化有编码抗A2aR HCVR和/或LCVR的核酸或表达载体的宿主细胞，并从细胞中纯化抗体。

[0252] 在另一方面，本发明提供制备抗体的方法，包括培养可瞬时或稳定表达一种或多种编码抗体中的一条或多条多肽链的构建体的细胞；并且从培养的细胞中纯化抗体。可以使用任何能够产生功能性抗体的细胞。在优选的实施方案中，所述表达抗体的细胞是真核或哺乳动物细胞，优选人细胞。各种组织细胞类型的细胞可用于表达抗体。在其他实施方案中，所述细胞是酵母细胞、昆虫细胞或细菌细胞。优选地，用表达抗体的载体稳定转化所述产生抗体的细胞。

[0253] 可以通过任何常规方法将一种或多种编码抗体重链或轻链的表达载体引入细胞，所述常规方法包括例如裸DNA技术、阳离子脂质介导的转染、聚合物介导的转染、肽介导的转染、病毒介导的感染、物理或化学试剂或处理、电穿孔等。此外，可以用一种或多种表达抗体的表达载体连同有助于选择表达抗体的稳定转化的克隆的选择标记一起转染细胞。可以根据本领域已知的技术收集和/或纯化由此类细胞产生的抗体，例如离心、层析等。

[0254] 适用于哺乳动物细胞的选择性标记的实例包括二氢叶酸还原酶(DHFR)、胸苷激酶、新霉素、新霉素类似物G418、氢霉素和嘌呤霉素。当此类选择标记成功转移到哺乳动物宿主细胞中时，在选择压力下，转化的哺乳动物宿主细胞可以存活。有两类广泛使用的不同的选择方案。第一类是基于细胞的新陈代谢和使用缺乏独立于补充培养基生长的能力的突变细胞系。两个实例为CHO DHFR$^-$细胞和小鼠LTV细胞。如果不添加胸苷或次黄嘌呤等营养物质，这些细胞就无法生长。因为这些细胞缺乏完整核苷酸合成途径所必需的某些基因，所以除非在补充培养基中提供缺失的核苷酸，否则它们无法存活。补充培养基的另一种方法是将完整的DHFR或TK基因引入缺乏相应基因的细胞中，从而改变它们的生长需求。未用DHFR或TK基因转化的单个细胞将无法在未补充的培养基中存活。

[0255] 第二类是显性选择，其指的是在任何细胞类型中都可使用的选择方案，不需要使用突变细胞系。在这些方案中，通常使用药物来阻止宿主细胞的生长。具有新基因的细胞会表达传递耐药性的蛋白质，并会在选择中存活下来。这种显性选择的实例包括使用药物新霉素、麦考酚酸或潮霉素。在这三个实例中，真核生物控制下的细菌基因分别对适当的药物

G418或新霉素(遗传霉素)、xgpt(麦考酚酸)或潮霉素产生耐药性。其他药物包括新霉素类似物G418和嘌呤霉素。

[0256] 示例性表达抗体的细胞包括人T淋巴细胞白血病细胞、人胚肾(HEK)293细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、小鼠WEHI纤维肉瘤细胞,以及单细胞原生动物物种,例如利什曼原虫(Leishmania tarentolae)。此外,可以使用用c-myc或其他永生化剂永生化的原代细胞产生稳定转化的产生抗体的细胞系。

[0257] 在一个实施方案中,所述细胞系包括稳定转化的利什曼原虫细胞系,例如利什曼原虫(Leishmania tarentolae)。利什曼原虫可以提供强大的、快速生长的单细胞宿主,其可用于高水平表达表现出哺乳动物型糖基化模式的真核蛋白质。可商业购买利什曼原虫真核表达试剂盒(Jena Bioscience GmbH,耶拿,德国)。

[0258] 在一些实施方案中,每升培养物中,所述细胞系表达至少1mg、至少2mg、至少5mg、至少10mg、至少20mg、至少50mg或至少100mg的抗体.

[0259] 本发明所述的抗体可以在任何合适的培养基(例如RPMI、DMEM和AIM V®)中培养和维持,然后从抗体表达细胞中分离。可以使用常规蛋白质纯化方法(例如亲和纯化、层析等)纯化抗体,包括使用蛋白质-A或蛋白质-G免疫亲和纯化。在一些实施方案中,抗体被设计为分泌到培养物上清液中以从中分离。

七、药物组合物和给药方法

[0260] 一方面,本发明所述的药物组合物包括本文所述的抗原结合分子(例如A2aR抗体或其抗原结合片段),以及药学上可接受的载体。在其他实施方案中,所述A2aR抗体或其抗原结合片段与药学上可接受的载体联合施用。如本文所述,抗A2aR组合物可包含一种或多种不同抗体、一种或多种多特异性抗体、一种或多种融合蛋白、一种或多种免疫缀合物或其组合。

[0261] 本发明提供一种包含本发明所述的抗原结合分子的药物组合物。本发明所述的药物组合物与合适的载体、赋形剂和其他试剂一起配制,所述其他试剂可以改善转移、递送、耐受性等。所有药物化学家已知的处方中包括许多合适的制剂:Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Company,Easton,PA。这些制剂包括,例如,粉剂、糊剂、软膏剂、果冻剂、蜡剂、油剂、脂质、含有囊泡的脂质(阳离子或阴离子)(例如LIPOFECTIN™,Life Technologies,Carlsbad,CA)、DNA缀合物、无水吸收糊剂、水包油和油包水乳液、碳蜡乳液(各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶和含有碳蜡的半固体混合物。另见Powell等人,"Compendium of excipients for parenteral formulations"PDA(1998)JPharm Sci Technol 52:238-311。

[0262] 施用于患者的抗原结合分子的剂量可根据患者的年龄和体型、目标疾病、病症、施用途径等而变化。优选剂量通常根据体重或体表面积计算。当本发明所述的双特异性抗原结合分子用于治疗成年患者时,有利的方案是以约0.01至约20mg/kg体重的单剂量静脉内施用本发明所述的双特异性抗原结合分子,更优选的剂量为约0.02至约7、约0.03至约5或约0.05至约3mg/kg体重。根据病情的严重程度,可以调整治疗的频率和持续时间。可以凭经验确定施用双特异性抗原结合分子的有效剂量和时间安排;例如,可以通过定期评估来监测患者的病情进展,并相应地调整剂量。此外,可以使用本领域熟知的方法进行剂量的种间缩放(例如,Mordenti等人,1991,Pharmaceut.Res.8:1351)。

[0263] 已知多种递送系统并且其可用于施用本发明的药物组合物，例如，脂质体包裹、微粒、微囊、表达突变病毒的重组细胞、受体介导的内吞作用(参见，例如，Wu等人，1987，J.BioI.Chem.262:4429-4432)。导入方法包括但不限于皮内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。可以通过任何方便的途径施用所述组合物，例如通过输注或推注，通过上皮或粘膜皮肤内层(例如，口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收，并且所述组合物可以与其他生物活性剂一起施用。可以是全身或局部施用。

[0264] 可以用标准针头和注射器皮下或静脉内递送本发明所述的药物组合物。此外，关于皮下递送，笔式递送装置很容易用于递送本发明所述的药物组合物。这种笔式递送装置可以是可重复使用的或一次性的。可重复使用的笔式递送装置通常使用包含药物组合物的可更换药筒。一旦药筒内的所有药物组合物都已被施用并且药筒已空，则可以丢弃空药筒并替换上包含药物组合物的新药筒。然后可以重新使用笔式递送装置。在一次性笔式递送装置中，没有可更换的筒。相反，一次性笔式递送装置预填充有药物组合物，其保存在装置内的储器中。一旦储器中的药物组合物被清空，整个装置就被丢弃。

[0265] 在某些情况下，可以在控释系统中递送所述药物组合物。在一个实施方案中，可以使用泵(参见Langer，同上；Sefton，1987，CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.14:201)。在另一个实施方案中，可以使用聚合物材料；参见，Medical Applications of Controlled Release，Langer and Wise(eds.)，1974，CRC Pres.，Boca Raton，Florida。在又一个实施方案中，可以将控释系统放在组合物的目标附近，从而只需要全身剂量的一部分即可(参见，例如，Goodson，1984，in Medical Applications of Controlled Release，同上，第2卷，第115-138页)。在Langer，1990，Science 249:1527-1533的综述中讨论了其他控释系统。

[0266] 所述注射剂可以包括用于静脉内、皮下、皮内和肌内注射、滴注等的剂型。这些注射剂可以通过公知的方法制备。例如，可通过例如将上述抗体或其盐溶解、混悬或乳化在常规用于注射的无菌水性介质或油性介质中来制备可注射制剂。注射用的水性介质包括例如生理盐水、含有葡萄糖等助剂的等渗溶液等，其可以与以下适当的增溶剂组合使用：例如醇类(例如乙醇)、多元醇(例如，丙二醇、聚乙二醇)、非离子表面活性剂(例如，聚山梨酯80、HCO-50(聚氧乙烯(50mol)氢化蓖麻油的加合物))等。油性介质包括例如芝麻油、大豆油等，其可与苯甲酸苄酯、苯甲醇等增溶剂组合使用。制成的注射剂最好装在合适的安瓿瓶中。

[0267] 将上述用于口服或肠胃外使用的药物组合物制备成适合于活性成分剂量的单位剂量的剂型是十分有益的。此类单位剂量剂型包括例如片剂、丸剂、胶囊剂、注射剂(安瓿)、栓剂等。上述抗体的含量通常为单位剂量中每个剂型约5至约500mg；特别是在注射剂形式中，优选含有约5至约100mg的上述抗体，对于其他剂型，优选含有约10至约250mg。

[0268] 在另一个方面，治疗细胞增殖性病症例如癌症、慢性感染或免疫受损疾病状态的方法包括向有此需要的受试者施用含有所述抗A2aR抗体或其抗原结合片段与药学上可接受的载体组合的药物组合物。在一些实施方案中，所述方法恢复、加强或增强有需要的受试者的淋巴细胞活性。在某些优选的实施方案中，所述抗体或片段是减少或消除A2aR的信号传导的人或人源化抗A2aR抗体。

[0269] 在一些实施方案中，施用所述药物组合物增加患有疾病患者的淋巴细胞(例如T细胞)的活性，其中淋巴细胞活性的增加对所述疾病是有益的，或所述疾病是由免疫抑制、免疫抑制细胞或例如CD4T细胞、CD8T细胞、B细胞产生的腺苷引起或以此为特征的。本文所述

的方法特别有用，例如，在患有实体瘤的患者中，肿瘤微环境(和其中产生的腺苷)可能有助于减少免疫系统的识别(免疫逃逸)。例如，肿瘤可能以表达(或过度表达)A2aR的免疫细胞为特征，例如CD4T细胞、CD8T细胞、T-regs、B细胞。

[0270] 在某些实施方案中，所述方法和组合物用于治疗多种癌症和其他增殖性疾病。由于这些方法可以降低腺苷水平，从而抑制淋巴细胞的抗肿瘤活性，因此适用于非常广泛的癌症，尤其是实体瘤，所述实体瘤肿瘤微环境中的腺苷会抑制抗肿瘤免疫反应。

[0271] 使用本发明所述的抗原结合分子(例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段)治疗的非限制性癌症包括例如肝癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈癌、乳腺癌、肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、去势抵抗性前列腺癌(CRPC)、黑色素瘤、子宫癌、结肠癌、直肠癌、肛门癌、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、非霍奇金淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、儿童实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾脏或输尿管、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊柱轴肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、环境诱发的癌症(包括由石棉诱发的癌症)、血液恶性肿瘤，包括例如多发性骨髓瘤、B细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤/原发性纵隔B细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、急性骨髓性淋巴瘤、慢性骨髓性白血病、慢性淋巴性白血病，滤泡性淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、免疫母细胞大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、蕈样肉芽肿、间变性大细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤和前体T淋巴母细胞淋巴瘤，或这些癌症的任意组合。本公开还适用于转移性癌症的治疗。可以在治疗之前、期间或之后测试或选择患者的一种或多种上述临床属性。

[0272] 在一个实施方案中，施用有效量的所述抗A2aR抗体以实现和/或维持(例如，持续1、2、3、4周，和/或直到之后施用抗原结合化合物)其在个体血液中的浓度至少是EC_{50}，任选地EC_{70}，任选地基本上EC_{100}，以中和A2aR的酶活性。在一个实施方案中，抗A2aR抗体的活性量是实现在个体血管外组织中中和A2aR酶活性的至少EC_{50}，任选地EC_{70}，任选地基本上EC_{100}的有效量。在一个实施方案中，抗A2aR抗体的活性量是实现(或维持)在个体中抑制中和A2aR的酶活性的EC_{50}，任选地EC_{70}，任选地基本上EC_{100}的有效量。

[0273] 任选地，在一个实施方案中，与一些通过ADCC消除表达A2aR的肿瘤细胞的抗体(其例如可以在等于或显著低于提供受体饱和的浓度下发挥全部功效)相反，所述抗A2aR抗体主要是一种阻断剂(没有实质性的Fcγ受体介导的活性)，并且以中和A2aR的酶活性的有效量施用一段理想的时间(例如，1周、2周、一个月)，直到下一次连续施用抗A2aR抗体。

[0274] 在一个实施方案中，施用有效量的所述抗A2aR抗体以实现和/或维持(例如，持续1、2、3、4周，和/或直到之后的抗A2aR抗体的施用)其在个体中抑制A2aR介导的AMP到腺苷的分解代谢的至少EC_{50}，任选地EC_{70}，任选地基本上EC_{100}的血液浓度。在一个实施方案中，所述抗A2aR抗体的量是实现(或维持)其在个体的血管外组织中抑制A2aR介导的AMP分解代谢为腺苷的EC_{50}，任选地EC_{70}，任选地基本上EC_{100}的有效量。

[0275] 在一个实施方案中，本发明提供治疗或预防个体癌症的方法，所述方法包括向患有疾病的个体施用一定量的抗A2aR抗体，所述抗体的量可达到或维持指定时间段内的循环浓度，任选地在目标血管外组织(例如肿瘤或肿瘤环境)中，其浓度高于循环中表达A2aR的细胞达到50％、70％或完全(例如90％)受体饱和所需的浓度(例如在PBMC中评估的)。任选

地，所达到的浓度比特定受体饱和所需的浓度高至少20％、50％或100％。

[0276] 在一个实施方案中，本发明提供治疗或预防个体癌症的方法，所述方法包括向个体施用一定量的抗A2aR抗体，所述抗体的量是在循环中，任选地在目标血管外组织(例如，肿瘤或肿瘤环境)中达到或维持一段特定时间的浓度，其高于用于结合表达A2aR的细胞的EC_{50}，任选地EC_{70}，或任选地EC_{100}。任选地，达到的浓度比用于结合表达A2aR的细胞的EC_{50}，任选地EC_{70}，或任选地EC_{100}高至少20％、50％或100％。

[0277] 在任何实施方案中，例如所述抗体结合人PBMC中A2aR表达细胞的EC_{50}，任选地EC_{70}，或任选地EC_{100}在0.5-100ng/ml之间，任选地1-100ng/ml，任选地30-100ng/ml，例如，约30-90ng/ml。例如，所述EC_{50}可以是约30、37、39、43、57、58、61、62、90、95、143ng/ml。

[0278] 用抗A2aR抗体中和A2aR的酶活性的EC_{50}可以是例如约0.01μg/ml和1μg/ml之间，任选地在0.1μg/ml和10μg/ml之间，任选地在0.1μg/ml和1μg/ml之间。例如，所述EC_{50}可以是约0.1μg/ml、约0.2μg/ml或约0.3μg/ml。因此，例如施用一定量的该抗A2aR抗体以达到和/或维持至少0.1μg/ml、任选至少0.2μg/ml、任选至少1μg/ml或任选至少2μg/ml的血液浓度。

[0279] 与在循环中提供相应浓度的剂量相比，当脉管系统外的组织被靶向时(肿瘤环境，例如，在实体瘤的治疗中)，通常需要大约10倍高的剂量。实现(和/或维持)循环(血液)中约1μg/ml、2μg/ml、10μg/ml或20μg/ml的浓度的抗A2aR抗体的施用量，预期可以分别达到(和/或维持)约0.1μg/ml、0.2μg/ml、1μg/ml、2μg/ml的血管外组织(例如肿瘤组织)浓度。

[0280] 在一个实施方案中，例如施用一定量的抗A2aR抗体以达到和/或维持至少0.1μg/ml、任选至少0.2μg/ml、任选至少1μg/ml，或任选地至少2μg/ml的组织(例如肿瘤环境)浓度。所述抗体可以例如以一定的量施用，所述抗体的量可以实现和/或维持至少约1μg/ml、2μg/ml、10μg/ml或20μg/ml的血液浓度，例如，1-100μg/ml、10-100μg/ml、1-50μg/ml、1-20μg/ml或1-10μg/ml。可以调整施用量以在施用后的指定时间段(例如，1、2、3、4周等)内维持所需浓度。

[0281] 在一些实施方案中，施用一定量的抗A2aR抗体以获得血液(血清)或血管外组织(例如，肿瘤环境)中用于中和A2aR的酶活性的至少EC_{70}或EC_{100}的浓度。所述抗体可以例如一定的量施用，所述抗体的量可以实现和/或维持至少约1μg/ml、2μg/ml、10μg/ml或20μg/ml的血液或血管外组织(例如，肿瘤环境)浓度。

[0282] 给定A2aR抗体的EC_{50}、EC_{70}和EC_{100}的值可以例如在中和A2aR的酶活性的细胞测定中评估。中和A2aR的酶活性的“EC_{50}”是指可以产生最大中和酶活性的反应或作用的50％的抗A2aR抗体的浓度。中和A2aR的酶活性的“EC_{70}”是指产生最大反应或作用的70％的抗A2aR抗体的浓度。中和A2aR的酶活性的“EC_{100}”是指可以产生这种中和酶活性的最大反应或作用的抗A2aR抗体的有效浓度。在某些实施方案中，根据上下文，EC_{50}、EC_{70}或EC_{100}可分别指代为IC_{50}、IC_{70}或IC_{100}以反映抗原结合分子(例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段)抑制A2aR的活性。IC_{xx}是指抑制生物过程的xx％所需的药物浓度。

[0283] 在一些实施方案中，特别是对于实体瘤的治疗，设计所达到的浓度为使组织(在脉管系统之外，例如，在肿瘤或肿瘤环境中)中的浓度对应于中和酶活性的至少EC_{50}，任选地约为或至少约为EC_{100}。

[0284] 在一个实施方案中，抗A2aR抗体的量在1和20mg/kg体重之间。在一个实施方案中，每周、每两周、每月或每两个月给个体施用所述的量。

[0285] 在一个实施方案中，治疗有此需要的受试者的癌症的方法包括向个体施用有效量的本公开所述的抗A2aR抗体至少一个施用周期(任选地至少2、3、4或更多施用周期)，其中所述周期是八周或更短的时间，其中对于至少一个周期中的每一个来说，以1-20mg/kg体重的剂量施用一剂、两剂、三剂或四剂抗A2aR抗体。在一个实施方案中，通过静脉内输注施用所述抗A2aR抗体。

[0286] 适用于治疗例如人类受试者的治疗方案包括，例如，以本文公开的量向患者施用抗A2aR抗体，其中所述方法包括至少一个施用周期，在一个施用周期中施用至少一剂抗A2aR抗体。任选地，施用至少2、3、4、5、6、7或8剂抗A2aR抗体。在一个实施方案中，所述施用周期为2周至8周。

[0287] 在一个实施方案中，治疗或预防个体疾病(例如，癌症、实体瘤、血液肿瘤)的方法包括向个体施用抗A2aR抗体，所述抗体中和A2aR的酶促活性至少一个施用周期，所述施用周期包括至少第一次和第二次(以及任选地第3、4、5、6、7和/或8次或更多次)所述抗A2aR抗体的施用，其中以有效量施用所述抗A2aR抗体，所述有效量使在两次连续施用之间的血液(血清)浓度的量达到或维持在至少0.1μg/ml、至少0.2μg/ml、至少1μg/ml、至少2μg/ml，至少10μg/ml，至少20μg/ml，1-100μg/ml，1-50μg/ml，1-20μg/ml，1-10μg/ml或任意上述浓度之间的范围。

[0288] 在一个实施方案中，维持指定的连续血液浓度，其中所述血液浓度在指定时间段(例如，两次抗体施用之间、周数、1周、2周、3周、4周)内不会显著低于指定的血液浓度。换句话说，尽管血液浓度在指定时间段内会发生变化，但保持的指定血液浓度代表最小或“谷值”浓度。

[0289] 在一个实施方案中，抗A2aR抗体的治疗活性量的是指能够在血液和/或组织中提供(至少)EC_{50}浓度、任选地EC_{70}浓度、任选地EC_{100}浓度以在施用抗体后在一段时间内中和A2aR的酶活性的此类抗体的量，所述一段时间为至少约1周、约2周或约1个月。

[0290] 在使用本公开所述的抗A2aR抗体治疗之前或期间，可以在患者肿瘤内和/或其附近评估细胞中A2aR、CD39和/或CD73的表达水平；A2aR表达细胞、CD39表达细胞和/或CD73表达细胞的百分比；和/或腺苷、ADP和/或AMP的水平，以评估患者是否适合治疗以及是否可能对治疗有反应。前述的水平或表达的增加可以指示个体适合用(例如，可能受益于)本公开所述的抗A2aR抗体治疗。

[0291] 在一些实施方案中，评估患者肿瘤组织样品内和/或其附近的A2aR、CD39和/或CD73的表达水平以及腺苷、ADP和/或AMP的浓度的步骤包括从受试者处获得人体组织的生物样品，所述人体组织选自癌症患者的组织，例如癌组织、癌附近或周围的组织、癌邻近组织、邻近非肿瘤组织或正常邻近组织，以及组织内A2aR、CD39和/或CD73的表达水平以及腺苷、ADP和/或AMP的浓度。患者体内的所述表达水平或核苷酸浓度可以与参考水平(例如，健康个体的水平)进行比较。

[0292] 与治疗(或抗体给药)前的水平相比，施用(或抗体给药)后腺苷、ADP和/或AMP水平的降低可以表明个体正受益于本公开所述的抗A2aR抗体(包括但不限于抑制底物结合A2aR的抗体)的治疗。任选地，如果患者受益于用抗A2aR抗体的治疗，则方法可以进一步包括单独或与另一种活性剂组合向患者施用另外剂量的抗A2aR抗体(例如，继续治疗)。

[0293] 鉴于前述，在某些实施方案中，所述方法包括以下步骤：(a)测定在肿瘤环境中，任

选地在肿瘤内和/或邻近组织内，A2aR、CD39和/或CD73的表达水平和/或腺苷、ADP和/或AMP的浓度，并且在确定肿瘤环境中A2aR、CD39、CD73、腺苷、ADP和/或AMP的水平与其相应的参考水平相比增加后，(b)向个体施用抗A2aR抗体。

[0294] 在某些实施方案中，确定肿瘤环境中A2aR、CD39、CD73、腺苷、ADP和/或AMP的水平包括从受试者处获得含有癌组织和/或接近或位于肿瘤周围的组织(例如，癌邻近组织、邻近非肿瘤组织或正常邻近组织)的生物样品，并检测A2aR表达细胞、CD39表达细胞和/或CD73表达细胞的水平和/或其相对百分比，和/或腺苷、ADP和/或AMP的水平。A2aR表达细胞、CD39表达细胞和/或CD73表达细胞可包括例如肿瘤细胞、CD4T细胞、CD8T细胞、B细胞及其组合。可以使用本领域普通技术人员熟知的技术，通过与健康受试者的参考水平或与治疗前的参考水平相比，评估A2aR、CD39、CD73的mRNA表达(通过例如RT-PCR法)或多肽表达(通过例如蛋白印迹法、免疫荧光染色法)，以测定A2aR、CD39、CD73的表达水平。

[0295] 评估或不评估肿瘤微环境(例如，肿瘤细胞、CD4T细胞、CD8T细胞，B细胞)中的A2aR、CD39、CD73、腺苷、ADP和/或AMP水平，都可以使用抗A2aR抗体治疗患有癌症的受试者。

[0296] 与参照相比，生物样品包括过表达A2aR、CD39和/或CD73的细胞，和/或含有高浓度的腺苷、ADP和/或AMP的细胞的测定结果表明受试者患有癌症，所述癌症可受益于A2aR抑制剂的治疗。在一些实施方案中，术语“过表达”是指在取自给定患者的大量细胞中表达A2aR、CD39和/或CD73多肽，例如取自受试者的至少10％、至少20％、至少30％、至少40％、至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％或更多的肿瘤细胞或淋巴细胞。

[0297] 在一个实施方案中，在有此需要的受试者中治疗或预防癌症的方法包括以下步骤：(a)检测肿瘤环境中，任选地在肿瘤内和/或邻近组织中的A2aR、CD39和/或CD73的细胞百分比和/或表达程度，并且在确定肿瘤环境包括过表达A2aR、CD39和/或CD73的细胞，任选地与合适的参考水平相比，A2aR、CD39和/或CD73的水平增加后，(b)向受试者施用抗A2aR抗体。在一个实施方案中，所述细胞是肿瘤细胞。在另一个实施方案中，肿瘤环境、肿瘤和/或邻近组织内的细胞是非恶性免疫细胞，例如T细胞。

[0298] 在一些实施方案中，测定肿瘤环境中A2aR、CD39和/或CD73的表达程度包括从个体获得生物样品，所述生物样品包含癌组织和/或接近癌或癌周围的组织(例如、癌邻近组织、邻近非肿瘤组织或正常邻近组织)，将细胞与结合A2aR多肽、CD39多肽和/或CD73多肽的抗体接触，并检测A2aR、CD39和/或CD73的细胞百分比和/或表达程度。在某些实施方案中，使用免疫组化法通过A2aR、CD39和/或CD73的细胞表面表达来评估A2aR、CD39和/或CD73的表达。

[0299] 抗体组合物可作为单一疗法使用或与一种或多种其他治疗剂联合治疗使用，所述其他治疗剂包括通常用于施用抗体的特定治疗目的的药剂。参见上面的“联合疗法”。通常以在所述其他治疗剂治疗特定疾病或病症的单一疗法中通常使用的量和治疗方案施用该药剂。这样的治疗剂包括但不限于抗癌剂和化疗剂。

[0300] 如上所述，本文所述的使用药物组合物的方法包括向有此需要的受试者施用有效量的本公开所述的药物组合物。

[0301] 可以采用任何合适的施用途径或模式来为患者提供治疗或预防有效剂量的抗体。示例性施用途径或模式包括肠胃外(例如静脉内、动脉内、肌内、皮下、瘤内)、口服、局部(鼻腔、透皮、皮内或眼内)、粘膜(例如鼻腔、舌下、口腔、直肠、阴道)，吸入、淋巴内、脊柱内、颅

内、腹膜内、气管内、膀胱内、鞘内、肠内、肺内、淋巴内、腔内、眼眶内、囊内和经尿道施用，以及经导管或支架局部递送。

[0302] 包含本公开所述的抗A2aR抗体的药物组合物可以配制在任何药学上可接受的载体或赋形剂中。本文所用的术语“药学上可接受的载体”包括生理上相容的任意和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。药物组合物可包含合适的固相或凝胶相载体或赋形剂。示例性的载体或赋形剂包括但不限于碳酸钙、磷酸钙、各种糖、淀粉、纤维素衍生物、明胶和聚合物如聚乙二醇。示例性的药学上可接受的载体包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合中的一种或多种。在许多情况下，优选在组合物中包含等渗剂，例如糖、多元醇如甘露醇、山梨糖醇或氯化钠。药学上可接受的载体还可以包含少量的辅助物质，例如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂，其可以提高治疗剂的保质期或有效性。

[0303] 在某些优选的实施方案中，治疗活性剂可以掺入适合肠胃外给药的药物组合物中。可以通过注射例如通过推注或连续输注配制用于肠胃外给药的药物组合物。

[0304] 合适的缓冲剂包括但不限于琥珀酸钠、柠檬酸钠、磷酸钠或磷酸钾。浓度为0-300mM(对于液体剂型，最佳浓度为150mM)的氯化钠可用于改变溶液的毒性。冻干剂型可以包含冷冻保护剂，主要是0-10％的蔗糖(最佳0.5-1.0％)。其他合适的冷冻保护剂包括海藻糖和乳糖。冻干剂型可以包含填充剂，主要是1-10％的甘露醇(最佳2-4％)。稳定剂可用于液体剂型和冻干剂型，主要是1-50mM的L-甲硫氨酸(最佳5-10mM)。其他合适的填充剂包括甘氨酸、精氨酸，以及0-0.05％的聚山梨醇酯-80(最佳0.005-0.01％)。其他表面活性剂包括但不限于聚山梨醇酯20和BRIJ表面活性剂。

[0305] 治疗剂制剂可以冻干并作为无菌粉末储存，优选在真空下储存，然后在注射前在抑菌水(包含例如苯甲醇防腐剂)或无菌水中重构。所述药物组合物中的治疗剂可以配制为“治疗有效量”或“预防有效量”。“治疗有效量”是指在必要的剂量和时间段内有效实现期望的治疗结果的量。抗体或活性剂的治疗有效量可根据以下情况而变化：待治疗的病症、病症的严重程度和病程、施用方式、抗体或活性剂是出于预防目的还是治疗目的而施用、特定药剂的生物利用度、抗体在个体中引起所需反应的能力、既往治疗、患者的年龄、体重和性别、患者的临床病史和对抗体的反应、所用抗体的类型，主治医师的酌情决定等。治疗有效量也是治疗有益作用大于重组载体的任何毒性或有害作用的量。“预防有效量”是指在必要的剂量和时间段内有效实现期望的预防结果的量。

[0306] 优选地，在本文所述的抗体或其他活性剂中使用的多肽结构域源自相同的宿主，在所述宿主中施用所述多肽结构域以减少施用所述治疗剂引起的炎症反应。如上所建议的，在一次或在一系列治疗中适当地向受试者施用所述治疗剂，并且可以在从诊断开始的任何时间向患者施用所述治疗剂。所述A2aR抗体可以作为单独的治疗施用或与可用于治疗所讨论病症的其他活性剂或疗法联合施用。

[0307] 无论是一次还是多次施用，一般建议治疗有效量或预防有效量的A2aR抗体(或其他活性剂)在约1ng/kg体重/天至约100mg/kg体重/天的范围内施用。在一个具体实施方案中，每种A2aR抗体或活性剂的施用范围为约1ng/kg体重/天至约10mg/kg体重/天，约1ng/kg体重/天至约1mg/kg体重/天，约1ng/kg体重/天至约100μg/kg体重/天，约1ng/kg体重/天至约10μg/kg体重/天，约1ng/kg体重/天至约1μg/kg体重/天，约1ng/kg体重/天至约100ng/kg

体重/天，约1ng/kg体重/天至约10ng/kg体重/天，约10ng/kg体重/天至约100mg/kg体重/天，约10ng/kg体重/天至约10mg/kg体重/天，约10ng/kg体重/天至约1mg/kg体重/天，约10ng/kg体重/天至约100μg/kg体重/天，约10ng/kg体重/天至约10μg/kg体重/天，约10ng/kg体重/天至约1μg/kg体重/天，10ng/kg体重/天至约100ng/kg体重体重/天，约100ng/kg体重/天至约100mg/kg体重/天，约100ng/kg体重/天至约10mg/kg体重/天，约100ng/kg体重体重/天至约1mg/kg体重/天，约100ng/kg体重/天至约100μg/kg体重/天，约100ng/kg体重/天至约10μg/kg体重体重/天，约100ng/kg体重/天至约1μg/kg体重/天，约1μg/kg体重/天至约100mg/kg体重/天，约1μg/kg体重体重/天至约10mg/kg体重/天，约1μg/kg体重/天至约1mg/kg体重/天，约1μg/kg体重/天至约100μg/kg体重体重/天，约1μg/kg体重/天至约10μg/kg体重/天，约10μg/kg体重/天至约100mg/kg体重/天，约10μg/kg体重体重/天至约10mg/kg体重/天，约10μg/kg体重/天至约1mg/kg体重/天，约10μg/kg体重/天至约100μg/kg体重重量/天，约100μg/kg体重/天至约100mg/kg体重/天，约100μg/kg体重/天至约10mg/kg体重/天，约100μg/kg体重/每天至约1mg/kg体重/天，约1mg/kg体重/天至约100mg/kg体重/天，约1mg/kg体重/天至约10mg/kg体重/天，约10mg/kg体重/天至约100mg/kg体重/天。

[0308] 在其他实施方案中，所述A2aR抗体和/或活性剂的施用剂量为每三天500μg至20g或每三天25mg/kg体重的剂量。

[0309] 在其他实施方案中，每种A2aR抗体和/或活性剂在每次单独施用中的施用范围为约10ng至约100ng，约10ng至约1μg，约10ng至约10μg，约10ng至约100μg，约10ng至约1mg，约10ng至约10mg，约10ng至约100mg，约10ng至约1000mg，约10ng至约10,000mg，约100ng至约1μg，约100ng至约10μg，约100ng至约100μg，约100ng至约1mg，约100ng至约10mg，约100ng至约100mg，约100ng至约1000mg，约100ng至约10,000mg，约1μg至约10μg，约1μg至约100μg，约1μg至约1mg，约1μg至约10mg，约1μg至约100mg，约1μg至约1000mg，约1μg至约10,000mg，约10μg至约100μg，约10μg至约1mg，约10μg至约10mg，约10μg至约100mg，约10μg至约1000mg，约10μg至约10,000mg，约100μg至约1mg，约100μg至约10mg，约100μg至约100mg，约100μg至约1000mg，约100μg至约10,000mg，约1mg至约10mg，约1mg至约100mg，约1mg至约1000mg，约1mg约10,000mg，约10mg至约100mg，约10mg至约1000mg，约10mg至约10,000mg，约100mg至约1000mg，约100mg至约10,000mg，或约1000mg至约10,000mg。可以每天、每2、3、4、5、6或7天，或每1、2、3或4周施用本公开所述的抗体。

[0310] 在其他具体实施方案中，每个A2aR抗体或活性剂的施用量可以为以下剂量：约0.0006mg/天、0.001mg/天、0.003mg/天、0.006mg/天、0.01mg/天、0.03mg/天、0.06mg/天、0.1mg/天、0.3mg/天、0.6mg/天、1mg/天、3mg/天、6mg/天、10mg/天、30mg/天、60mg/天、100mg/天、300mg/天、600mg/天、1000mg/天、2000mg/天、5000mg/天或10,000mg/天。

[0311] 在某些实施方案中，所述A2aR抗体和/或其他活性剂的编码序列被并入合适的表达载体(例如，病毒或非病毒载体)以在需要根据上述方法进行治疗的受试者中表达有效量的A2aR抗体或其他活性剂。在包括施用例如一种或多种重组AAV(rAAV)病毒的某些实施方案中，所述药物组合物可以包含的rAAVs的量为每千克包含至少10^{10}、至少10^{11}、至少10^{12}、至少10^{13}，或至少10^{14}个基因组拷贝(GC)或重组病毒颗粒，或其任意范围。在某些实施方案中，所述药物组合物包含有效量的所述重组病毒，例如rAAV，其量为每个受试者包含至少10^{10}、至少10^{11}、至少10^{12}、至少10^{13}，至少10^{14}、至少10^{15}个基因组拷贝或重组病毒颗粒基因组拷

贝，或其任意范围。

[0312] 可以在适合任何特定细胞增殖病症或免疫受损疾病状态的一种或几种本领域接受的动物模型中测试剂量。

[0313] 递送方法还可以包括使用与杀死的病毒连接或未连接的聚阳离子浓缩DNA、配体连接的DNA、脂质体、真核细胞递送载体细胞、光聚合水凝胶材料的沉积、手持式基因转移粒子枪的使用、电离辐射、核电荷与细胞膜的中和或融合、粒子介导的基因转移等。

八、抗体的诊断用途

[0314] 本发明所述的抗原结合分子(例如抗体或其抗原结合片段)也可用于检测和/或测量样品中的人或食蟹猴A2aR，或人或食蟹猴A2aR表达细胞，例如用于诊断目的。例如，抗A2aR抗体或其抗原结合片段可用于诊断以A2aR的异常表达(例如，过表达、表达不足、缺乏表达等)为特征的病症或疾病。A2aR的示例性诊断测定包括，例如，将获自患者的样品与本发明所述的抗体接触，其中用可检测的标记或报告分子标记所述抗体。或者，未标记的抗体可与本身可检测标记的二抗结合用于诊断应用。所述可检测的标记或报告分子可以是放射性同位素，例如^{3}H、^{14}C、^{18}F、^{32}p、^{35}S或^{125}I；荧光或化学发光部分，例如异硫氰酸荧光素或罗丹明；或酶，例如碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶或荧光素酶。可用于检测或测定样品中A2aR的具体示例性测定法包括酶联免疫吸附测定法(ELISA)、放射免疫测定法(RIA)和荧光激活细胞分选法(FACS)。可用于本发明所述的A2aR诊断测定的样品包括可从患者处获得的任何组织或液体样品，其在正常或病理条件下含有可检测量的A2aR蛋白或其片段。通常，测量获自健康患者(例如未患有与异常A2aR水平或活性相关的疾病或病症的患者)的特定样品中的A2aR水平以初步建立A2aR的基线或标准水平。然后可以将该A2aR基线水平与从疑似患有A2aR相关疾病或病症的个体获得的样品中测得的A2aR水平进行比较。

[0315] 此外，可通过免疫亲和纯化，使用本文所述的抗A2aR抗体来纯化人A2aR。

九、试剂盒

[0316] 本文所述的任意组合物，例如本发明所述的抗A2aR抗原结合分子，和/或其他治疗剂，都可以包含在试剂盒中。在非限制性实例中，所述试剂盒包含抗原结合分子，例如抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中，所述试剂盒还包括本文所述的其他治疗剂。

[0317] 所述试剂盒还可以包括用于治疗疾病或病症的试剂或说明书。其还可以包括一个或多个缓冲剂。

[0318] 所述试剂盒的所述成分可以以水性介质或冻干形式包装。所述试剂盒的容器装置通常包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶子、注射器或其他容器装置，可以将组分放置，优选地，适当地分装在所述容器装置中。如果所述试剂盒中有不止一种组分(标记试剂和标签可以包装在一起)，则所述试剂盒通常还包含第二个、第三个或其他容器，所述其他组分可以单独地放入所述其他容器中。所述试剂盒还可以包含第二个容器装置，用于容纳无菌的药学上可接受的缓冲液和/或其他稀释剂。此外，小瓶中可以包含组分的各种组合。本发明所述的试剂盒通常还包括用于容纳本发明所述的组合物(例如抗A2aR抗原结合分子和/或其他治疗剂)的装置，以及密闭的用于商业销售的任何其他试剂容器。

[0319] 当试剂盒的组分以一种和/或多种液体溶液的形式提供时，所述液体溶液是水溶液，特别优选无菌水溶液。此外，所述试剂盒的组分可以以干粉形式提供。当试剂和/或组分以干粉形式提供时，可以通过添加合适的溶剂来重构所述干粉。假定也可以在另一个容器

装置中提供溶剂。

[0320] 通过以下实施例进一步说明本发明,但其不应被解释为限制本发明。本申请全文引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容以及图和表均通过引用并入本文。

实施例

实施例1:抗A2aR单克隆抗体的产生

[0321] 免疫小鼠

[0322] 根据IACUC批准的方案,向6-8周龄的C57BL/6小鼠注射编码人A2aR的质粒(人A2aR:SEQ ID NO:50)来免疫小鼠。简而言之,将人A2aR基因片段克隆到修饰的表达载体中。然后使用Mega纯化试剂盒(Qiagen,货号12981)从大肠杆菌(HB101菌株)中制备DNA质粒。每只六到八周龄的C57/B6小鼠(Taconic Farms)都接受了多轮人A2aR编码质粒的免疫,所述人A2aR编码质粒是通过基因枪(Bio-rad)系统或皮内(ID)注射,然后电穿孔(BTX-Harvard仪器)进行递送的。在第一次免疫前和最后一次免疫后7天采集血清样品。

[0323] 根据标准程序使用荧光激活细胞分选法(FACS)进行血清滴定。首先将表达人A2aR的Expi293细胞加入96孔板(每孔1x10^5个细胞),将50μl系列稀释的(1:50、1;150、1:450、1:1350、1:4053、1:12150)每只小鼠的血清与细胞一起冰上孵育30分钟。用FACS缓冲液(2%胎牛血清,2mM EDTA的PBS溶液)洗涤后,加入Alex Fluor 647偶联的抗小鼠IgG并在冰上孵育20分钟。两次洗涤后用100μl FACS缓冲液重悬细胞,并准备进行FACS分析(BD LSR II流式细胞仪,HTS)。如图1所示,一些小鼠在用编码A2aR的DNA免疫后表现出强烈的A2aR特异性抗体反应,在预采血血清中无结合。(MFI:平均荧光强度)。

[0324] 然后选择具有高特异性滴度的小鼠进行安乐死以无菌分离脾脏。

[0325] Sp2/0细胞与脾细胞的融合

[0326] 将脾脏组织均质化。制备脾脏的单细胞悬液,然后通过电融合(BTX-Harvard Apparatus)将脾脏的单细胞悬液与SP2/0骨髓瘤细胞以1:1的比例融合。将所述细胞接种在含有次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷(HAT)培养基(Millipore-Sigma,货号H0262)的96孔板中。将所述细胞培养12-14天,更换两次培养基以减少非特异性背景以用于下一步筛选。

[0327] 杂交瘤初筛

[0328] 使用与血清滴定中所述FACS程序除以下变化外相同的程序对96孔板中的杂交瘤上清液进行初步筛选:1)表达人A2aR的Expi293细胞(表达GFP)与亲本Expi293(无A2aR表达)以1:1的比例混合并添加至96孔板中(每孔2x10^5个细胞),2)从96孔板的每个孔中转移出50μl杂交瘤上清液与细胞一起冰上孵育30分钟。选择并处理对人类A2aR表达细胞呈阳性而对亲本Expi293细胞不呈阳性的孔以进行亚克隆处理。

[0329] 亚克隆

[0330] 通过有限稀释法进行亚克隆。简而言之,将FACS鉴定的阳性孔以1个细胞/孔的平均密度接种到96孔板中。将所述96孔板置于培养箱中7-10天使细胞生长。定期监测细胞的生长。大约在第4天,在相差显微镜下观察平板上的孔并记录似乎具有单克隆生长(即,只有一个杂交瘤团块)的孔。当细胞汇合度达到约50%时,使用与初步筛选杂交瘤所述相同的程序,通过FACS筛选单克隆孔的细胞。如图2所示,从杂交瘤克隆1B5-3D7、3F6-9G5和3F8-12E9、8D5-16E2分离的抗体显示出与人A2aR表达细胞的特异性结合,但其不与亲本Expi293细胞结合。

[0331] 杂交瘤细胞培养和抗体纯化

[0332] 杂交瘤细胞在补充有低IgG胎牛血清(Millipore Sigma,货号F1283)的BD Cell mAb Quantum yield培养基(Thermo Fisher,货号220511)中生长。当细胞存活率降至约50％时收集上清液。按照制造商的方案使用蛋白G树脂纯化抗体。

实施例2:从抗A2aR小鼠杂交瘤中克隆抗体可变区

[0333] SMARTer RACE试剂盒(TaKaRa,货号634858)用于克隆DNA片段,所述DNA片段编码4个小鼠杂交瘤中示例性抗体可变区(即HCVR和LCVR)。培养四种小鼠杂交瘤细胞,并通过亚类测试确定其产生单克隆抗体,所述单克隆抗体具有分别由γ2a和κ链组成的H链和L链。使用Qiagen RNA试剂盒从$3x10^6$个细胞中制备总RNA。

[0334] 按照SMARTer RACE cDNA扩增试剂盒的方案,首先合成第一链cDNA,并在其5'端添加SMART序列,以将该位点用于以总RNA为模板的下游扩增和克隆。对于每个样品,同时进行两个PCR反应,将通用正向引物(试剂盒中提供)和反向引物(根据在NCBI核苷酸数据库中注册的小鼠IgG2a和小鼠Kappa类的恒定区序列设计)分别用于H链和L链。

[0335] 在琼脂糖凝胶电泳之后,使用NucleoSpin凝胶和PCR Clean试剂盒(Qiagen,货号740609)通过凝胶提取纯化上述反应中扩增的PCR产物,并且使用In-Fusion HD克隆(在SMARTer RACE试剂盒中提供)将其克隆到线性化pRACE载体中(在SMARTer RACE试剂盒中提供)。H和L可变区序列通过Sanger测序分析和确定。

[0336] 如Kabat和IMGT编号方案所定义的,示例性抗体1B5-3D7、3F6-9G5和3F8-12E9的CDR、HCVR和LCVR的氨基酸序列如表1-5所示。表10和11显示了编码示例性抗体1B5-3D7、3F6-9G5和3F8-12E9的示例性核酸序列。

实施例3:小鼠IgG抗体的重组表达与纯化

[0337] 为了在哺乳动物细胞系中表达,首先将编码1B5-3D7和3F6-9G5的抗体基因重新克隆到合适的表达载体中。在小规模制备质粒DNA后,将Expi293细胞系用于瞬时转染。转染后5至7天后收集上清液,并按照制造商的方案使用蛋白G树脂(GE,货号GE17-0618-01)纯化IgG形式的抗体。

实施例4:抗人A2aR mAb 8D5-16E2、3F6-9G5、1B5-3D7和3F8-12E9的体外阻断活性

[0338] A2aR的活性由激活腺苷酸环化酶的Gαs蛋白介导,其可引起细胞内cAMP的合成。cAMP的水平与相应的腺苷(激动剂)水平相关。可以使用多种商业cAMP检测试剂盒检测cAMP。

[0339] 稳定表达人A2aR的HEK293细胞(BPS Bioscience,货号79381)以5000个细胞/孔的密度接种于200μl饥饿培养基(MEM(Hyclone,货号SH30024.01)+2％活性炭剥离血清(Thermo Fisher,货号A3382101))中,并在37℃下培养过夜。第二天,用200μl温PBS洗涤3次后,在诱导缓冲液(PBS w/500μM 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMX)(Millipore Sigma,货号I7018)+100μM Ro 20-1724,Millipore Sigma,货号B8279)中的2倍或3倍连续稀释浓度的A2aR mAb(1B5-3D7、3F6-9G5和3F8-12E9)或ZM241385对照(A2aR的标准小分子拮抗剂)在37℃下与细胞预孵育15分钟。在与抗体或ZM241385(Millipore Sigma,Z0153)孵育后,添加稳定的腺苷激动剂NECA(Millipore Sigma,E2387)至其终浓度为300nM或500nM。然后将细胞在37℃下再孵育1小时。使用cAMP-Glo™检测试剂盒(Promega,货号V1501)进行细胞裂解并检测cAMP。使用发光计读取结果(相对光单位,RLU)。可以使用cAMP标准曲线和Prism软件将

RLU转换为cAMP(nM)。

[0340] 如图3所示,本发明的示例性抗体,从杂交瘤上清液中纯化的小鼠IgG2a形式的抗人A2aR mAb 1B5-3D7、3F6-9G5和3F8-12E9,阻断了细胞表面表达的人A2aR的活性,且其IC_{50}值在约4.5×10^{-9}M至约1.5×10^{-9}M之间。表11显示了示例性抗体阻断NECA结合细胞表面人A2aR诱导产生cAMP的IC_{50}值。示例性抗体的IC_{50}值比小分子抑制剂(SMI)ZM241385低100倍,表明示例性抗体的体外抑制比SMI ZM241385强至少100倍。

[0341] 表11:示例性抗体结合细胞表面人A2aR的IC_{50}值

	1B5-3D7	3F6-9G5	3F8-12E9	ZM241385
IC_{50}(M)	4.48E-09	1.57E-09	4.35E-09	4.72E-07

[0342] 如图4所示,对于阻断表达在细胞表面的人A2aR的活性,本发明的示例性抗体(抗人A2aR mAb 1B5-3D7和3F6-9G5)显示出相似的IC_{50},其中所述示例性抗体是从用表达抗体基因的重组表达载体瞬时转染的Expi293细胞中纯化的小鼠IgG2a形式。

实施例5:测定抗人A2aR抗体特异性

[0343] 该评估的目的是测定示例性抗人A2aR抗体(克隆1B5-3D7和3F6-9G5)对腺苷受体家族成员(包括人A1R、A2bR和A3R)的特异性,以及其与小鼠A2aR的交叉反应性。

[0344] 方法

[0345] 为了测试本发明所述的抗原结合分子(例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段)对人A2aR而非对任何其他3个腺苷受体家族成员的特异性,使用Multispan Inc(加利福尼亚州海沃德)通过流式细胞术测定细胞结合。将稳定表达各种腺苷受体(即人A1R、A2bR和A3R)的HEK293T细胞,以及由Multispan Inc和HEK293T亲本细胞系产生的小鼠A2R用于测定。简而言之,将过表达腺苷受体的细胞系和HEK293T亲本细胞系与2、10和50nM的抗人A2aR单克隆抗体(克隆1B5-3D7和3F6-9G5)以及10和50nM的小鼠IgG2a同种型对照一起在4℃避光孵育60分钟。将抗FLAG抗体(Abcam,ab72469,2μg/mL)用作过表达各种腺苷受体的细胞系的阳性对照。用FACS缓冲液(PBS加0.1%BSA和0.2%叠氮化钠)洗涤3次后,用抗小鼠IgG-PE(Invitrogen,货号P852)检测抗体将细胞在4℃下染色45分钟。然后将细胞用FACS缓冲液洗涤3次并在FACSort(Becton Dickinson)上分析。使用CellQuest Pro(Becton Dickinson)分析数据。

[0346] 结果

[0347] 本发明的两个示例性抗体1B5-3D7和3F6-9G5特异性结合人A2aR。其与其他人腺苷受体或小鼠A2aR的结合与在阴性对照(HEK293T)中检测到的结合水平相似,或者(HEK293T-A1)显著弱于与人A2aR的结合(表12)。

[0348] 表12总结了通过重复FACS测试测得的示例性抗体1B-3D7和3F6-9G5与表达不同腺苷受体的亲本HEK293T细胞或HEK293细胞的结合信号。

[0349] 表12:示例性抗体与表达不同腺苷受体的HEK293细胞的结合

几何平均数	1B5-3D7			3F6-9G5			同种型对照mIgG2a		抗FLAG
	50nM	10nM	2nM	50nM	10nM	2nM	50nM	10nM	
HEK293T-A1	27.59	18.4	10.15	22.97	15.26	8.35	2.5	2.48	53.32
	30.66	24.97	11.83	22.51	15.56	8.81	2.7	2.24	121.29
HEK293T-A2A	260.67	261.79	97.49	270	273.51	112.47	2.92	2.97	183.3
	377.56	221.91	95.04	289.37	290.29	109.2	2.83	2.82	223.45
HEK293T-A2B	3.42	7.23	5.42	7.27	6.07	3.13	2.33	2.42	78.57
	2.79	3.58	3.8	3.74	2.93	2.8	2.69	2.41	50.12
HEK293T-A3	2.45	2.23	2.11	2.66	2.49	2.07	1.87	1.9	48.17
	2.3	2.32	2.09	2.25	2.33	1.96	1.84	1.81	47.36
HEK293T-mA2A	3.48	4.13	2.96	4.98	3.7	2.9	2.05	2	70.36
	6.03	6.16	3.82	4.76	3.25	3.08	2.06	2.39	104.61
HEK293T	5.24	5.42	3.69	4.19	4.01	3.98	3.78	3.75	3.8
	4.96	4.07	4.11	6.16	4.27	4.33	3.29	3.73	4.22

HEK293T-A1:表达人腺苷受体A1的HEK293T细胞

HEK293T-A2A:表达人腺苷受体A2A的HEK293T细胞

HEK293T-A2B:表达人腺苷受体A2B的HEK293T细胞

HEK293T-A3:表达人腺苷受体A3的HEK293T细胞

HEK293T-mA2A:表达小鼠腺苷受体A2A的HEK293T细胞

HEK293T:没有外源性腺苷受体的HEK293T细胞

实施例6:本发明示例性抗人A2aR抗体与其他抗人A2aR抗体之间结合亲和力的比较

[0350] 首先将表达人A2aR的Expi293细胞或亲本Expi293细胞添加至96孔板中(每孔1x10^5个细胞)。将每个抗体从7.5μg/ml开始按1:2连续稀释12个浓度点的样品取50微升(50μl),与细胞在冰上孵育30分钟。用FACS缓冲液(2%胎牛血清的DPBS溶液)洗涤后,加入100μl的1μg/ml的Alex Fluor 633-偶联抗小鼠IgG(Life technology,货号A21050)或Alex Fluor 647-偶联抗人IgG,并在冰上孵育30分钟。两次洗涤后用100μl的FACS缓冲液重悬细胞。将100μl的按1:50稀释的用于活/死细胞染色的7-AAD添加到细胞悬液中,所述细胞悬液已准备好用于FACS分析(BD Accuri C6 plus或LSR II流式细胞仪,HTS)。

[0351] 如图5所示,mIgG2a形式的示例性抗体1B5-3D7和3F6-9G5显示出与hA2aR-Expi293的强剂量依赖性特异性结合,但其不与亲本Expi293结合。令人惊讶的是,在抗A2aR单克隆抗体MAB9497R(R&D Systems,克隆599717R)或SDIX-14(美国专利公开US2014/0322236A1,克隆864H14)的染色中,未检测到其与hA2aR-Expi293细胞的结合。此外,抗hA2aR单克隆抗体SDIX-10(美国专利公开US2014/0322236A1,克隆864H10)显示出与hA2aR-Expi293细胞和亲本Expi293细胞的非特异性结合,并且具有相似的较低GMI(在50nM浓度时<2000)。(GMI:几何平均荧光强度)。

实施例7:测定抗人A2aR抗体与人和食蟹猴原代细胞的结合以及与非人灵长类动物的交叉反应性

[0352] 据报道在人类中A2aR由T细胞表达。测试阻断腺苷的抗人A2aR抗体(克隆3F6-9G5)

与人和食蟹猴PBMC的潜在结合。

[0353] 方法

[0354] 人和食蟹猴的PBMCs分别购自Cytologics LLC(加利福尼亚州,圣地亚哥)和iQ Biosciences(加利福尼亚州,伯克利)。使用含兔Fc的抗人A2aR克隆3F6-9G5测定原代细胞结合。简而言之,将在100μl FACS缓冲液中的10^6个人和/或食蟹猴的PBMCs与3F6-9G5(2μg/ml)在4℃下孵育60分钟。根据制造商的说明书使用食蟹猴交叉反应性抗人CD3(克隆SP34,BD)、抗人CD8(克隆RPA-T8,Biolegend)和Zombie Green fixable Viability染料(Biolegend,货号423111)来确定活免疫细胞亚群。用FACS缓冲液洗涤3次后,将细胞用PE偶联的驴抗兔Fc检测抗体(1:200,Biolegend,货号406421)在4℃下染色30分钟。用FACS缓冲液洗涤3次后,在LSRII(Becton Dickinson)上分析细胞。使用FlowJo(Becton Dickinson)分析数据。

[0355] 结果

[0356] 抗人A2aR克隆3F6-9G5(而非抗HEL兔Fc同种型对照(Biointron,货号B730001))与人T细胞(CD4+和CD8+)的一个小亚群结合(图6)。其还与食蟹猴T细胞(CD4+和CD8+)发生交叉反应(图6)。

[0357] 以上描述是为了指导本领域的普通技术人员实践本发明,而不是为了详细说明所有显而易见的修改和变化,所述修改和变化在本领域技术人员阅读本说明书后将变得显而易见。然而,所有这些显而易见的修改和变化都应当包括在本发明的范围内,其由所附权利要求限定。除非上下文特别指出相反的情况,权利要求旨在以有效满足其预期目标的任何顺序覆盖要求保护的组分和步骤。

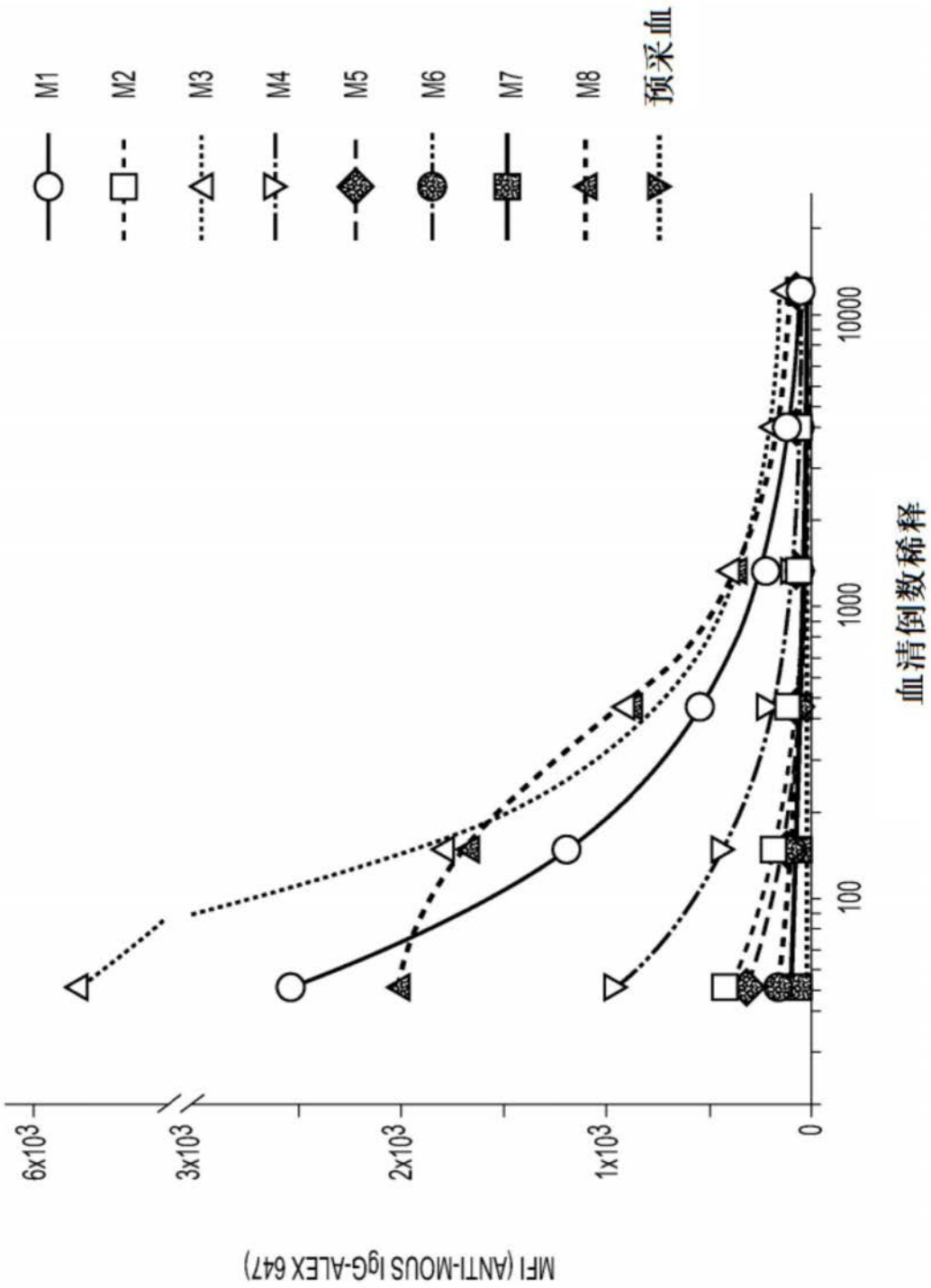

M1
M2
M3
M4
M5
M6
M7
M8
预采血
血清倒数稀释
MFI (ANTI-MOUSE IgG-ALEX 647)
6x10^3
3x10^3
2x10^3
1x10^3
0
100
1000
10000

图1

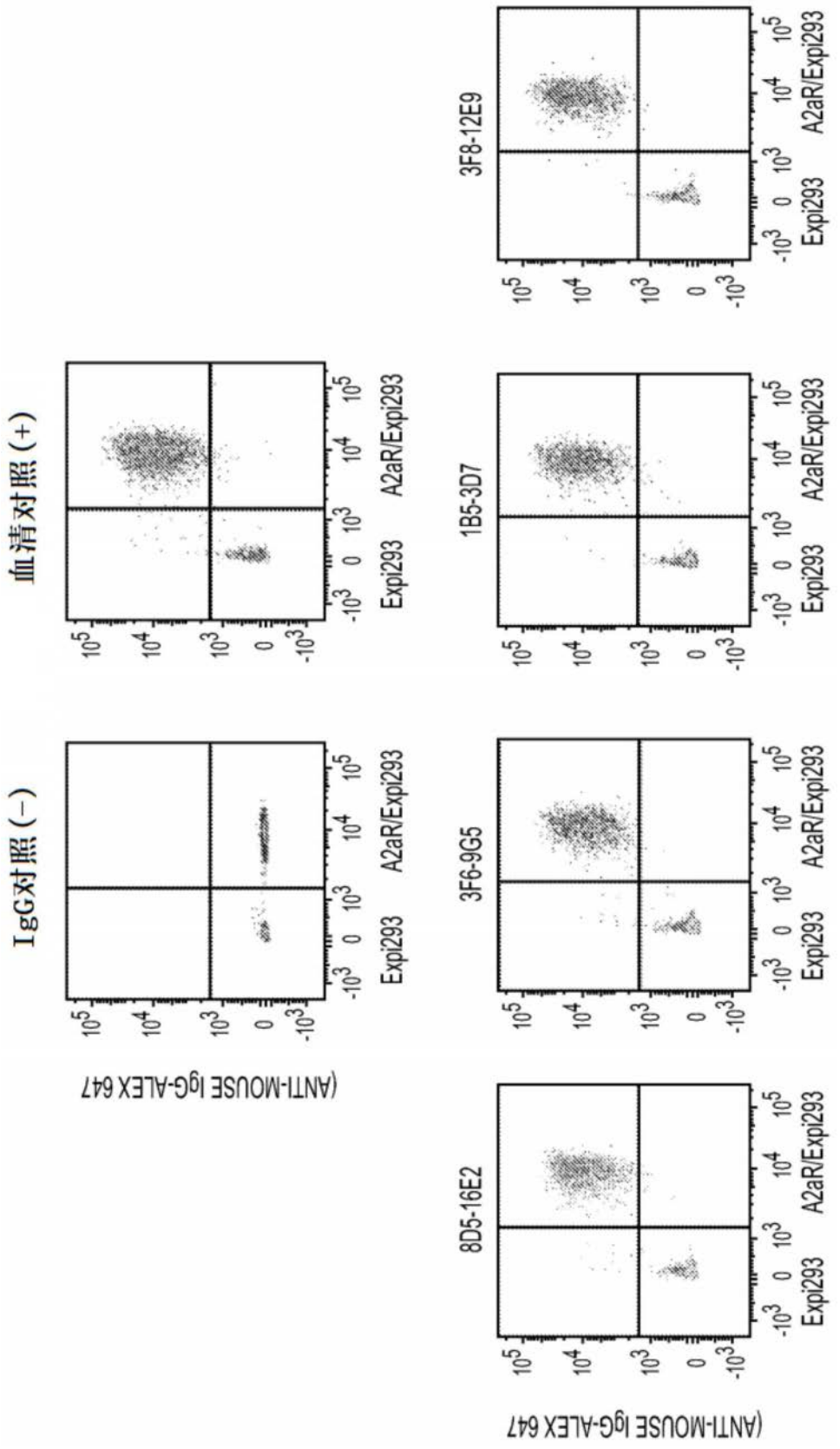

IgG对照 (-)
血清对照 (+)
8D5-16E2
3F6-9G5
1B5-3D7
3F8-12E9
(ANTI-MOUSE IgG-ALEX 647)
Expi293
A2aR/Expi293

图2

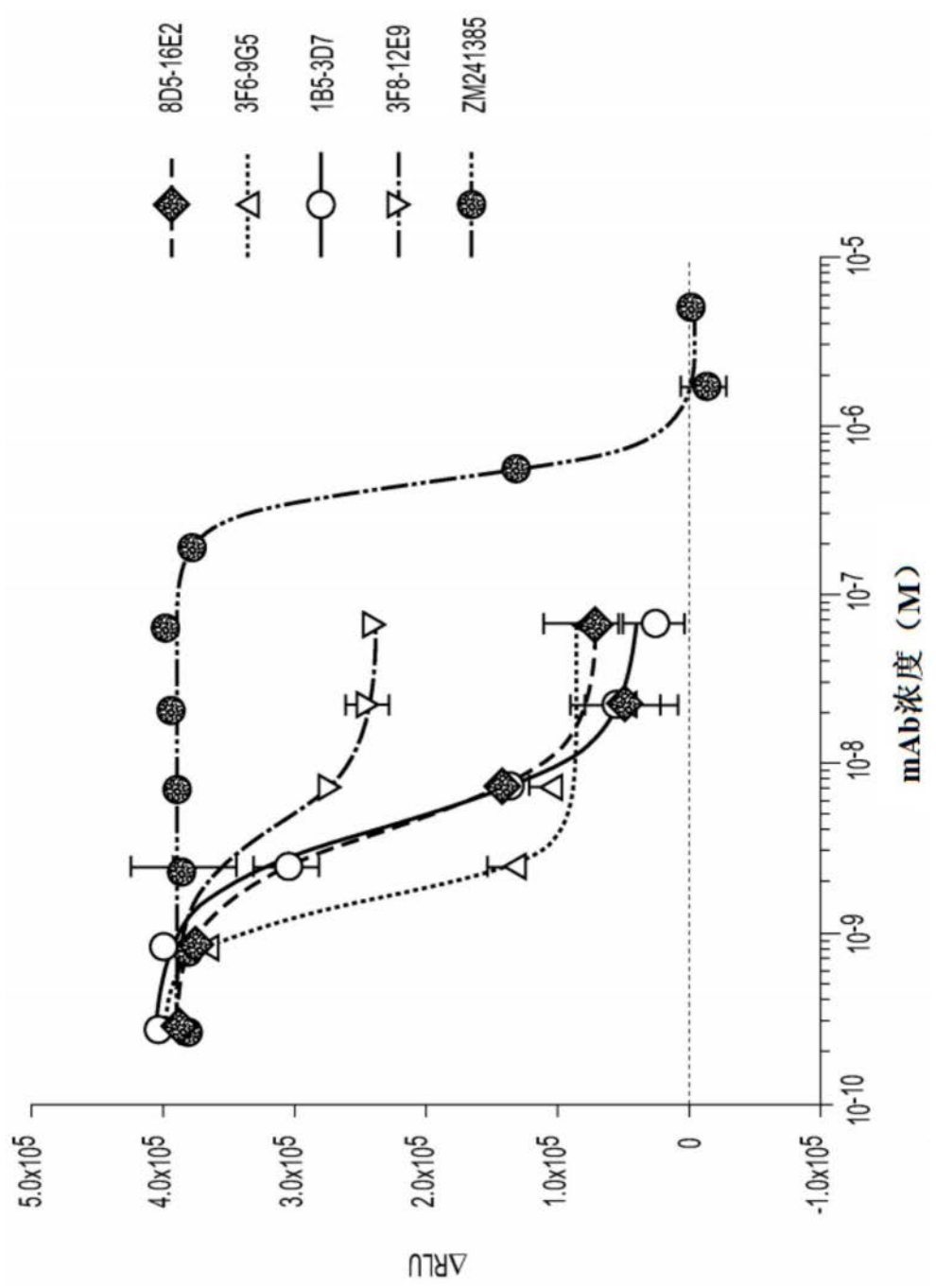

8D5-16E2
3F6-9G5
1B5-3D7
3F8-12E9
ZM241385
ΔRLU
5.0x10⁵
4.0x10⁵
3.0x10⁵
2.0x10⁵
1.0x10⁵
0
-1.0x10⁵
10⁻⁵
10⁻⁶
10⁻⁷
10⁻⁸
10⁻⁹
10⁻¹⁰
mAb浓度（M）

图3

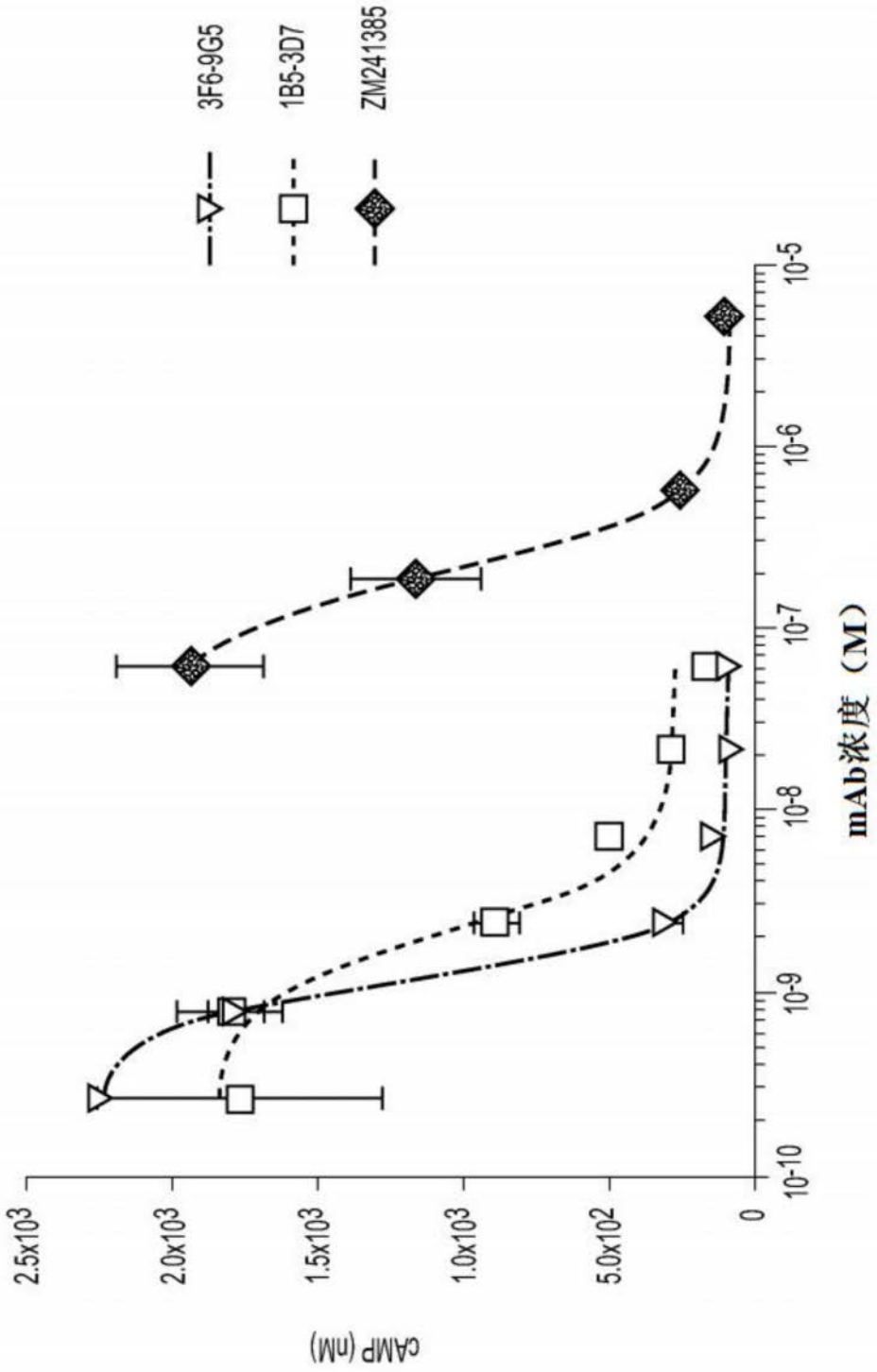

3F6-9G5
1B5-3D7
ZM241385
cAMP (nM)
2.5x10³
2.0x10³
1.5x10³
1.0x10³
5.0x10²
0
10⁻¹⁰
10⁻⁹
10⁻⁸
10⁻⁷
10⁻⁶
10⁻⁵
mAb浓度（M）

图4

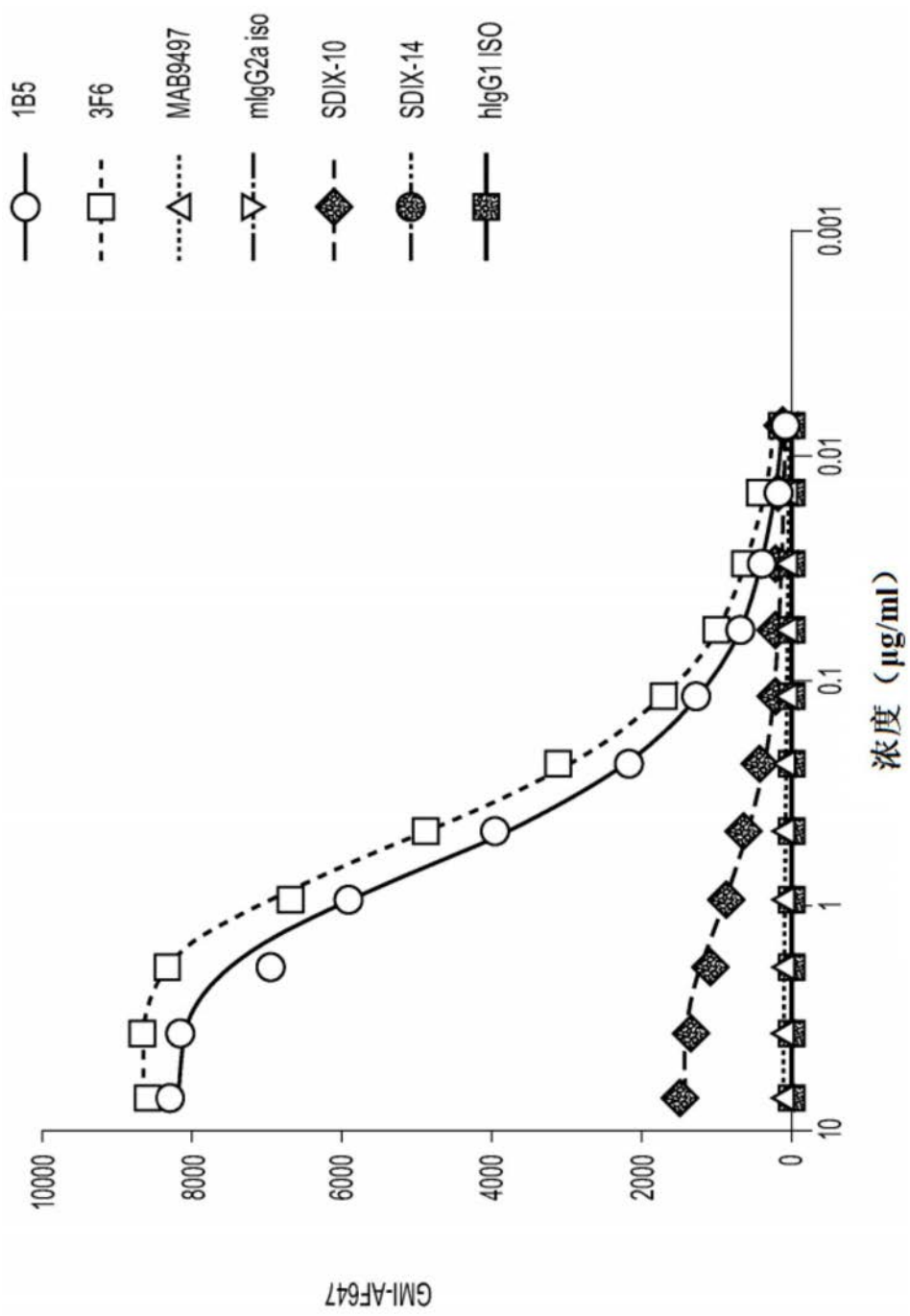

1B5
3F6
MAB9497
mIgG2a iso
SDIX-10
SDIX-14
hIgG1 ISO
GMI-AF647
10000
8000
6000
4000
2000
0
10
1
0.1
0.01
0.001
浓度（μg/ml）

图5

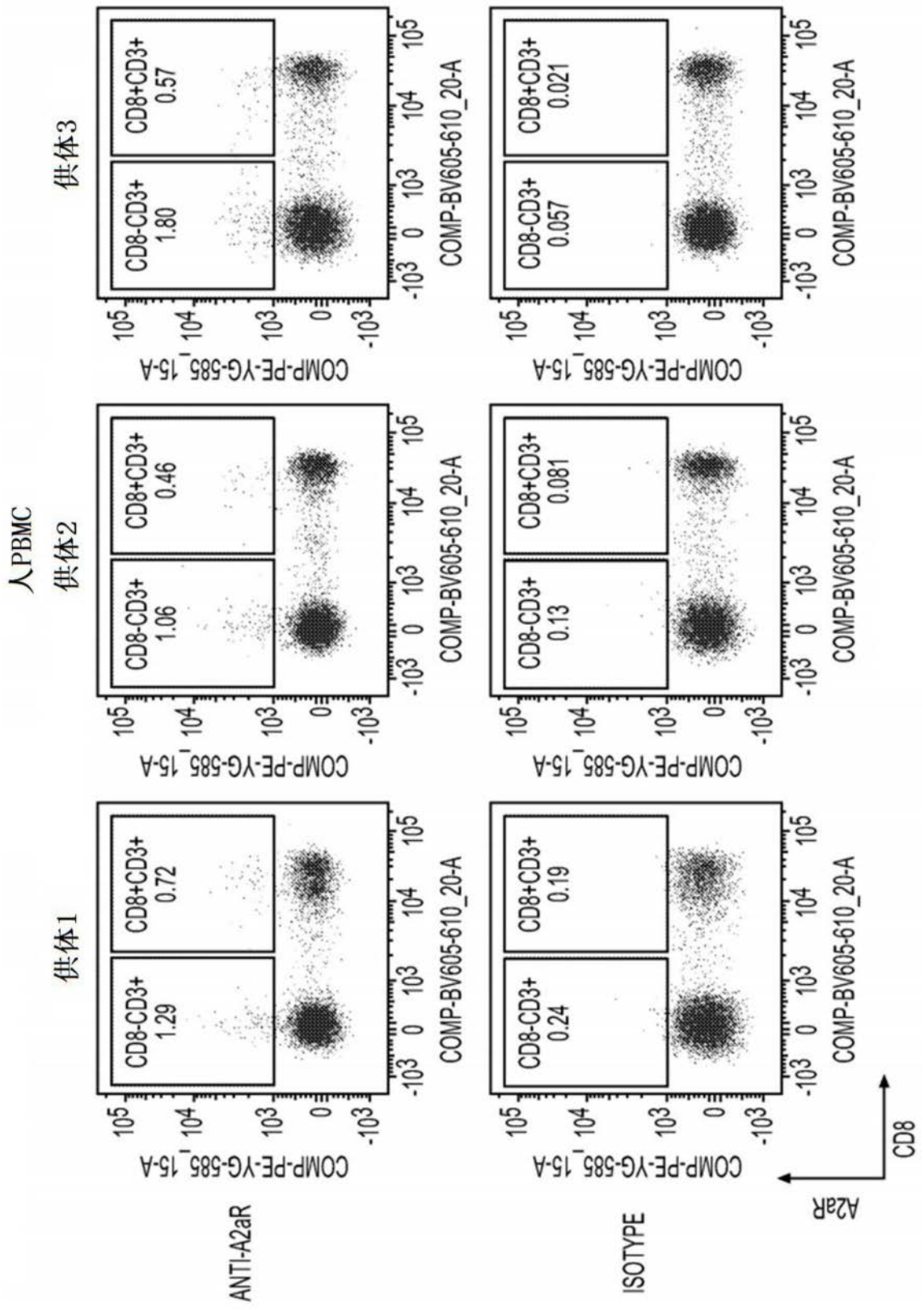

人PBMC
供体1
供体2
供体3
ANTI-A2aR
ISOTYPE
CD8-CD3+ 1.29
CD8+CD3+ 0.72
CD8-CD3+ 1.06
CD8+CD3+ 0.46
CD8-CD3+ 1.80
CD8+CD3+ 0.57
CD8-CD3+ 0.24
CD8+CD3+ 0.19
CD8-CD3+ 0.13
CD8+CD3+ 0.081
CD8-CD3+ 0.057
CD8+CD3+ 0.021
COMP-PE-YG-585_15-A
COMP-BV605-610_20-A
A2aR
CD8

图6

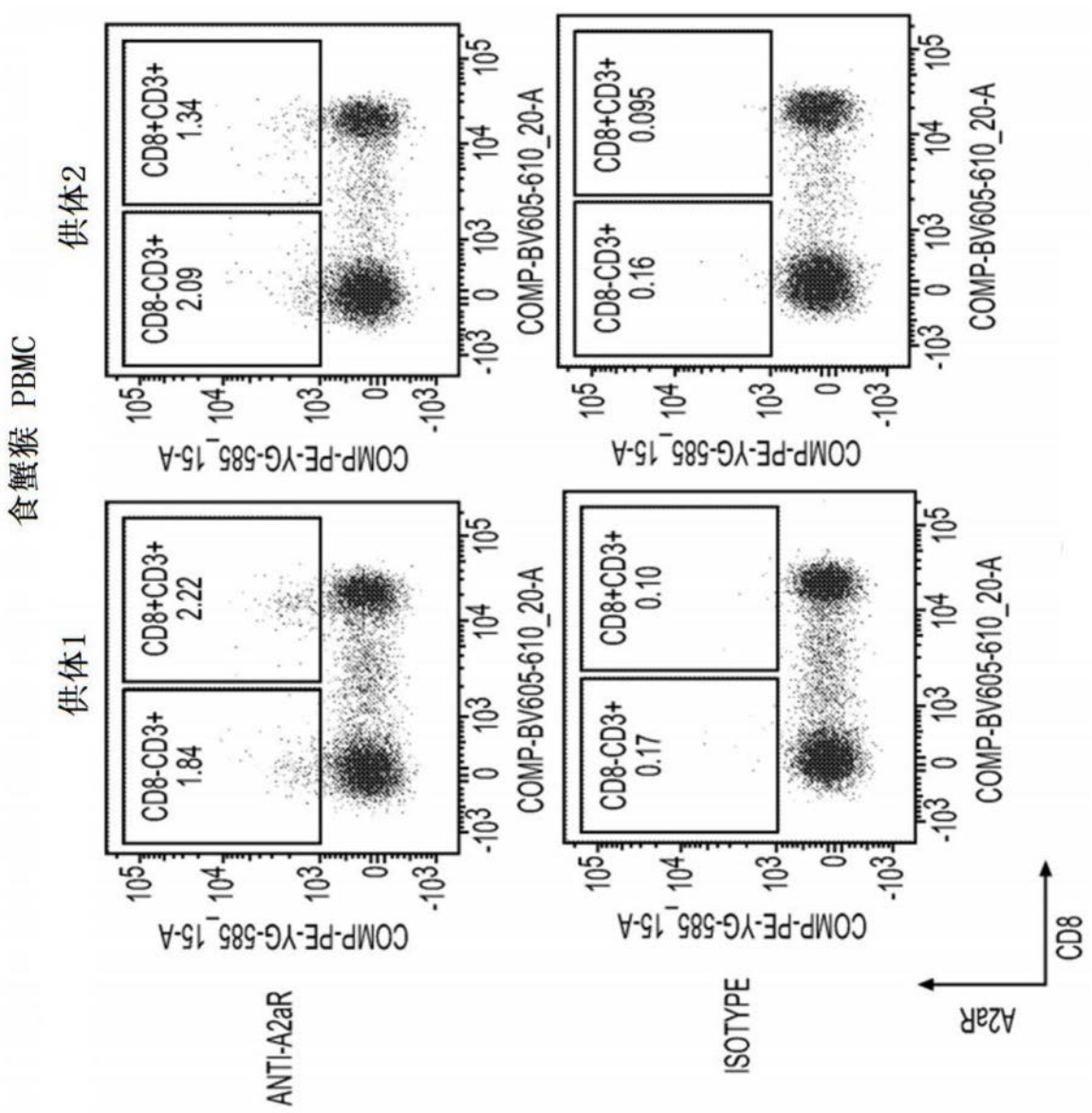

食蟹猴 PBMC
供体1
供体2
ANTI-A2aR
ISOTYPE
CD8-CD3+
1.84
CD8+CD3+
2.22
CD8-CD3+
0.17
CD8+CD3+
0.10
CD8-CD3+
2.09
CD8+CD3+
1.34
CD8-CD3+
0.16
CD8+CD3+
0.095
COMP-PE-YG-585_15-A
COMP-BV605-610_20-A
A2aR
CD8

图6(续)