



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 107001472 B

(45) 授权公告日 2020.12.11

(21) 申请号 201580060993.4

(22) 申请日 2015.11.09

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107001472 A

(43) 申请公布日 2017.08.01

(30) 优先权数据

62/077,486 2014.11.10 US

62/147,329 2015.04.14 US

62/188,999 2015.07.06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.05.10

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2015/076111 2015.11.09

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/075099 EN 2016.05.19

(73) 专利权人 免疫医疗有限公司
地址 英国剑桥郡

(72) 发明人 R.明特 S.鲁斯特 S.吉拉尔
L.U.耶尔穆图斯 C.海
K.萨赫森梅尔 E.萨尔特 Q.黄
P.帕夫利克 M.达姆施罗德 L.程
G.迪特里奇 J.里奥斯-多里亚

S.哈蒙德 R.E.霍林斯沃尔思

N.杜尔哈姆 C.C.廖

M.安东尼萨米 J.乔赫根 X.卢

K.罗森萨尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001

代理人 梁谋 黄希贵

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

封全灵 等.宫颈癌患者外周血中髓源抑制
细胞比例变化及CD73的表达.《郑州大学学报(医
学版)》.2014,第49卷(第4期),第476-479页.

Deepak Mittal et al..Antimetastatic
Effects of Blocking PD-1 and the
Adenosine A2A Receptor.《Cancer Research》
.2014,第74卷(第14期),第3652-3658页.

审查员 吴志琳

权利要求书1页 说明书105页
序列表92页 附图49页

(54) 发明名称

对CD73具有特异性的结合分子及其用途

(57) 摘要

本披露提供了抗CD73结合分子,例如抗体及其抗原结合片段。还提供了包括所披露的组合物的药物配制品以及与CD73表达相关的疾病例如癌症的诊断和治疗方法。可以例如通过用此处披露的抗CD73结合分子(例如,结合CD73的裸抗体或抗体药物缀合物)的直接疗法,通过用其他抗原结合抗癌剂诸如免疫检查点抑制剂(例如,抗CTLA-4和抗PD-1单克隆抗体)的辅助疗法,和/或通过其中这些抗CD73分子是在化疗之前、之后或同时给予的组合法来治疗此类疾病。

1. 一种包含抗体V_L和抗体V_H的、特异性地结合CD73的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述V_L包含SEQ ID NO:68的氨基酸序列;且其中所述V_H包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列。

2. 一种包含V_L和V_H的、特异性地结合CD73的分离的抗体或其抗原结合片段,所述V_L和V_H包括VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3、VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3,其中VL-CDR1如SEQ ID NO:46所示,VL-CDR2如SEQ ID NO:51所示,VL-CDR3如SEQ ID NO:56所示,VH-CDR1如SEQ ID NO:36所示,VH-CDR2如SEQ ID NO:39所示,且VH-CDR3如SEQ ID NO:45所示。

3. 根据权利要求1或2所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其包括重链恒定区或其片段。

4. 根据权利要求1或2所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其是CD73的拮抗剂。

5. 根据权利要求4所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述CD73是人CD73。

6. 一种包括有效量的权利要求2的抗CD73抗体或其抗原结合片段和抗PD-L1抗体或其抗原结合片段的药物配制品。

7. 如权利要求6所述的药物配制品,其中该抗PD-L1抗体是MEDI4736、BMS-936559、或MPDL3280A、或其抗原结合片段。

8. 一种包括有效量的权利要求2的抗CD73抗体或其抗原结合片段以及抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的药物配制品。

9. 如权利要求8所述的药物配制品,其中该抗CTLA4抗体是易普利姆玛或曲美木单抗(替西木单抗,CP-675,206)或其抗原结合片段。

对CD73具有特异性的结合分子及其用途

[0001] 发明背景

[0002] 在许多组织中普遍表达CD73或外-5'-核苷酸酶(5'-NT)。此蛋白通过糖基磷脂酰肌醇(GPI)键锚定于细胞膜,具有外酶活性并且在信号转导中起作用。CD73的主要功能是将对于细胞来说通常是不能渗透的细胞外核苷酸(例如,5'-AMP)转化为其对应的可容易进入大部分细胞的核苷酸(例如,腺苷)。通过AMP的去磷酸化作用CD73产生腺苷显示可调节许多组织中的腺苷受体接合,表明腺苷在细胞保护、细胞生长、血管生成以及免疫抑制中发挥作用,并且也在肿瘤发生中起作用。

[0003] CD73在肿瘤细胞上的表达已在包括结肠直肠癌、胰腺癌、膀胱癌、白血病、淋巴瘤、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、黑色素瘤、卵巢癌、甲状腺癌、食道癌、前列腺癌和乳腺癌的若干类型的癌症中有报导。提高的CD73表达与肿瘤侵袭、转移关联,并减少患者存活时间。CD73产生免疫抑制的环境,由增加的腺苷水平表征,其促进癌症的发展和进展。显然,CD73表达与黑色素瘤和乳腺癌中的促转移表型关联。

[0004] 免疫检查点抑制剂作为癌症疗法具有很大潜力。然而,免疫检查点抑制的临床效益是适度的。一个可能的解释是肿瘤使用不重叠的免疫抑制机制以促进免疫逃避。因此,急切需要用以减少肿瘤介导的免疫抑制的改进的组合物和方法。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明提供特异性地结合到CD73的分离的结合分子或其抗原结合片段。在一些方面,此类CD73结合分子是例如抗体或其抗原结合片段。在具体的实施例中,本发明的抗CD73抗体(例如,MEDI9447)对于减少肿瘤介导的免疫抑制是有用的。因此,本发明也提供以抗CD73抗体(例如,MEDI9447)为特征的治疗组合和靶向癌症免疫周期的另外方面的其他药剂(即抗PD-1或抗PD-L1抗体;抗CTLA4抗体、A2aR拮抗剂、STAT-3抑制剂)以及使用此类组合用于减少肿瘤介导的免疫抑制的方法。

[0007] 在一个方面,本发明提供特异性地结合到CD73表位的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中该结合分子特异性地结合到与一种具有选自以下项的抗体的重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)的抗体或其抗原结合片段所结合表位相同的CD73表位:CD730002、CD730003、CD730004、CD730008、CD730010、CD730011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、或CD730058。

[0008] 在另一个方面,本发明提供了分离的结合分子或其抗原结合片段,该分离的结合分子或其抗原结合片段特异性地结合到CD73并且竞争性地抑制由包括CD730002、CD730003、CD730004、CD730008、CD730010、CD730011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、或CD730058的V_H和V_L的一种抗体或其抗原结合片段结合CD73。

[0009] 在另一个方面,本发明提供了包括抗体V_L的特异性地结合到CD73的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中该V_L具有氨基酸序列:

[0010] [FW₁]SGSLSNIGRNX₁VN[FW₂]LX₂NX₃RX₄X₅[FW₃]ATWDDSX₆X₇GWX₈[FW₄]

[0011] 其中[FW₁]、[FW₂]、[FW₃]和[FW₄]表示V_L框架区,并且其中X₁表示氨基酸残基脯氨酸(P)、谷氨酸(E)或天冬氨酸(D);X₂表示氨基酸残基天冬酰胺(N)或天冬氨酸(D);

- [0012] X₃表示氨基酸残基谷氨酰胺(Q)或亮氨酸(L)；
- [0013] X₄表示氨基酸残基亮氨酸(L)或脯氨酸(P)；
- [0014] X₅表示氨基酸残基甘氨酸(G)或丝氨酸(S)；
- [0015] X₆表示氨基酸残基亮氨酸(L)或组氨酸(H)；
- [0016] X₇表示氨基酸残基赖氨酸(K)、脯氨酸(P)、异亮氨酸(I)或天冬酰胺(N)；并且
- [0017] X₈表示氨基酸残基亮氨酸(L)或苏氨酸(T)。
- [0018] 在此处描绘的任何方面的各实施例中，根据权利要求6所述的分离的结合分子或其抗原结合片段，其中FW₁包括SEQ ID NO:25或26，FW₂包括SEQ ID NO:27或28，FW₃包括SEQ ID NO:29，并且FW₄包括SEQ ID NO:30。
- [0019] 在另一个方面，本发明提供了包括抗体V_H的特定性地结合到CD73的分离的结合分子或其抗原结合片段，其中该V_H具有氨基酸序列：
- [0020] [FW₅]SYAX₉S[FW₆]X₁₀IX₁₁GSX₁₂GX₁₃TYYADSVKG[FW₇]LGYX₁₄X₁₅X₁₆DX₁₇[FW₈]
- [0021] 其中[FW₅]、[FW₆]、[FW₇]和[FW₈]表示VH框架区，并且其中
- [0022] X₉表示氨基酸残基甲硫氨酸(M)或酪氨酸(Y)；
- [0023] X₁₀表示氨基酸残基亮氨酸(L)或丙氨酸(A)；
- [0024] X₁₁表示氨基酸残基色氨酸(W)或丝氨酸(S)；
- [0025] X₁₂表示氨基酸残基色氨酸(W)或甘氨酸(G)；
- [0026] X₁₃表示氨基酸残基丝氨酸(S)或精氨酸(R)；
- [0027] X₁₄表示氨基酸残基甘氨酸(G)或丝氨酸(S)；
- [0028] X₁₅表示氨基酸残基精氨酸(R)或苏氨酸(T)；
- [0029] X₁₆表示氨基酸残基缬氨酸(V)或异亮氨酸(I)；并且
- [0030] X₁₇表示氨基酸残基酪氨酸(Y)、赖氨酸(K)、甲硫氨酸(M)、亮氨酸(L)或谷氨酸(E)。
- [0031] 在另一个方面，本发明提供了包括抗体V_L和抗体V_H的特定性地结合到CD73的分离的结合分子或其抗原结合片段，其中该V_L包括氨基酸序列：
- [0032] [FW₁]SGSLSNIGRNX₁VN[FW₂]LX₂NX₃RX₄X₅[FW₃]ATWDDSX₆X₇GWX₈[FW₄]
- [0033] 其中[FW₁]、[FW₂]、[FW₃]和[FW₄]表示V_L框架区，并且其中
- [0034] X₁表示氨基酸残基脯氨酸(P)、谷氨酸(E)或天冬氨酸(D)；
- [0035] X₂表示氨基酸残基天冬酰胺(N)或天冬氨酸(D)；
- [0036] X₃表示氨基酸残基谷氨酰胺(Q)或亮氨酸(L)；
- [0037] X₄表示氨基酸残基亮氨酸(L)或脯氨酸(P)；
- [0038] X₅表示氨基酸残基甘氨酸(G)或丝氨酸(S)；
- [0039] X₆表示氨基酸残基亮氨酸(L)或组氨酸(H)；
- [0040] X₇表示氨基酸残基赖氨酸(K)、脯氨酸(P)、异亮氨酸(I)或天冬酰胺(N)；并且
- [0041] X₈表示氨基酸残基亮氨酸(L)或苏氨酸(T)；
- [0042] 并且其中该V_H包括氨基酸序列：
- [0043] [FW₅]SYAX₉S[FW₆]X₁₀IX₁₁GSX₁₂GX₁₃TYYADSVKG[FW₇]LGYX₁₄X₁₅X₁₆DX₁₇[FW₈]
- [0044] 其中[FW₅]、[FW₆]、[FW₇]和[FW₈]表示VH框架区，并且其中
- [0045] X₉表示氨基酸残基甲硫氨酸(M)或酪氨酸(Y)；
- [0046] X₁₀表示氨基酸残基亮氨酸(L)或丙氨酸(A)；

[0047] X₁₁表示氨基酸残基色氨酸(W)或丝氨酸(S)；

[0048] X₁₂表示氨基酸残基色氨酸(W)或甘氨酸(G)；

[0049] X₁₃表示氨基酸残基丝氨酸(S)或精氨酸(R)；

[0050] X₁₄表示氨基酸残基甘氨酸(G)或丝氨酸(S)；

[0051] X₁₅表示氨基酸残基精氨酸(R)或苏氨酸(T)；

[0052] X₁₆表示氨基酸残基缬氨酸(V)或异亮氨酸(I)；并且

[0053] X₁₇表示氨基酸残基酪氨酸(Y)、赖氨酸(K)、甲硫氨酸(M)、亮氨酸(L)或谷氨酸(E)。

[0054] 在另一个方面,本发明提供了具有抗体V_L的特异性地结合到CD73的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中该V_L具有V_L互补决定区-2(VL-CDR2)氨基酸序列,该氨基酸序列与以下项一致或除了四处、三处、两处或一处氨基酸取代之外与以下项一致:SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:52。

[0055] 在另一个方面,本发明提供了具有抗体V_L的特异性地结合到CD73的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中该V_L具有互补决定区-3(VL-CDR3)氨基酸序列,该氨基酸序列与以下项一致或除了四处、三处、两处或一处氨基酸取代之外与以下项一致:SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55或SEQ ID NO:56。

[0056] 在另一个方面,本发明提供了具有抗体V_H的特异性地结合到CD73的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中该V_H具有互补决定区-1(VH-CDR1)氨基酸序列,该氨基酸序列与以下项一致或除了四处、三处、两处或一处氨基酸取代之外与以下项一致:SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:36。

[0057] 在另一个方面,本发明提供了具有抗体V_H的特异性地结合到CD73的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中该V_H具有互补决定区-2(VH-CDR2)氨基酸序列,该氨基酸序列与以下项一致或除了四处、三处、两处或一处氨基酸取代之外与以下项一致:SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:40。

[0058] 在另一个方面,本发明提供了具有抗体V_H的特异性地结合到CD73的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中该V_H具有互补决定区-3(VH-CDR3)氨基酸序列,该氨基酸序列与以下项一致或除了四处、三处、两处或一处氨基酸取代之外与以下项一致:SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:45。

[0059] 在另一个方面,本发明提供了具有抗体V_L的特异性地结合到CD73的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中该V_L具有VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3氨基酸序列,这些氨基酸序列分别与以下项一致或除了这些VL-CDR的一个或多个中的四处、三处、两处或一处氨基酸取代之外与以下项一致:SEQ ID NO:46、49和53;SEQ ID NO:47、49和53;SEQ ID NO:47、49和54;SEQ ID NO:46、50和54;SEQ ID NO:46、51和55;SEQ ID NO:48、52和54;SEQ ID NO:46、49和56;SEQ ID NO:47、49和56;SEQ ID NO:46、50和56;SEQ ID NO:46、51和56;或SEQ ID NO:48、52和56。

[0060] 在另一个方面,本发明提供了具有抗体V_H的特异性地结合到CD73的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中该V_H具有VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3氨基酸序列,这些氨基酸序列分别与以下项一致或除了这些VH-CDR的一个或多个中的四处、三处、两处或一处氨基酸取代之外与以下项一致:SEQ ID NO:35、37和41;SEQ ID NO:36、37和42;SEQ ID NO:36、38和43;SEQ ID NO:36、39和44;SEQ ID NO:36、40和44;SEQ ID NO:35、37和45;SEQ ID NO:

36、37和45;SEQ ID NO:36、38和45;SEQ ID NO:36、39和45;或SEQ ID NO:36、40和45。

[0061] 在另一个方面,本发明提供了具有V_L和V_H的特异性地结合到CD73的分离的抗体或其抗原结合片段,该V_L和V_H具有VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3、VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3氨基酸序列,这些氨基酸序列与以下项一致或除了一个或多个CDR中的四处、三处、两处或一处氨基酸取代之外与以下项一致:SEQ ID NO:46、49、53、35、37和41;SEQ ID NO:47、49、53、35、37和41;SEQ ID NO:47、49、54、36、37和42;SEQ ID NO:46、50、54、36、38和43;SEQ ID NO:46、51、55、36、39和44;SEQ ID NO:48、52、54、36、40和44;SEQ ID NO:46、49、56、35、37和41;SEQ ID NO:46、49、53、35、37和45;SEQ ID NO:47、49、56、36、37和45;SEQ ID NO:46、50、56、36、38和45;SEQ ID NO:46、51、56、36、39和45;SEQ ID NO:48、52、56、36、40和45;或SEQ ID NO:46、49、56、35、37和45。

[0062] 在另一个方面,本发明提供了具有抗体V_L和抗体V_H的特异性地结合到CD73的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中该V_L具有与选自SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69和SEQ ID NO:70的参考氨基酸序列至少约90%至约100%一致的氨基酸序列。

[0063] 在另一个方面,本发明提供了具有抗体V_L和抗体V_H的特异性地结合到CD73的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中该V_H具有与选自SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83和SEQ ID NO:84的参考氨基酸序列至少约90%至约100%一致的氨基酸序列。

[0064] 在另一个方面,本发明提供了特异性地结合到CD73的分离的抗体或其抗原结合片段,其中该抗体或抗原结合片段具有V_L,该V_L具有与选自SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69和SEQ ID NO:70的参考氨基酸序列至少约90%至约100%一致的序列,并且其中该抗体或抗原结合片段具有V_H,该V_H具有与选自SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83和SEQ ID NO:84的参考氨基酸序列至少约90%至约100%一致的序列。

[0065] 在另一个方面,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段,该分离的抗体或其抗原结合片段具有基本由SEQ ID NO:57组成的V_L和基本由SEQ ID NO:71组成的V_H。

[0066] 在另一个方面,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段,该分离的抗体或其抗原结合片段具有基本由SEQ ID NO:68组成的V_L和基本由SEQ ID NO:82组成的V_H。

[0067] 在另一个方面,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段,该分离的抗体或其抗原结合片段具有由SEQ ID NO:57组成的V_L和由SEQ ID NO:71组成的V_H。

[0068] 在另一个方面,本发明提供了分离的抗体或其抗原结合片段,该分离的抗体或其抗原结合片段具有由SEQ ID NO:68组成的V_L和由SEQ ID NO:82组成的V_H。

[0069] 在另一个方面,本发明提供了包含根据本发明的分离的抗体或其抗原结合片段以及载体的组合物。

[0070] 在另一个方面,本发明提供了具有编码根据本发明的分离的抗体或其抗原结合片段的序列的核酸。

[0071] 在另一个方面,本发明提供了包括根据本发明的核酸的组合物。

[0072] 在另一个方面,本发明提供了包含根据本发明的核酸的载体。

[0073] 在另一个方面,本发明提供了包括根据本发明的核酸序列、组合物、或载体的宿主细胞。

[0074] 在另一个方面,本发明提供了制备根据本发明的抗体或其抗原结合片段的方法,该方法涉及培养包含根据本发明的核酸序列、组合物、或载体的细胞;并分离该抗体或其抗原结合片段。

[0075] 在另一个方面,本发明提供了包含被标记的根据本发明的分离的抗体或抗原结合片段的诊断试剂。

[0076] 在另一个方面,本发明提供了包含根据本发明的分离的抗体或其抗原结合片段、组合物、或诊断试剂的试剂盒。

[0077] 在另一个方面,本发明提供了抑制表达CD73的细胞的生长的方法,该方法涉及使细胞与根据本发明的抗体或其抗原结合片段接触。

[0078] 在另一个方面,本发明提供了治疗有需要的受试者的癌症的方法,该方法涉及向该受试者给予治疗有效量的根据本发明的抗体或其抗原结合片段。

[0079] 在另一个方面,本发明提供了治疗受试者的癌症的方法,该方法涉及向该受试者给予治疗有效量的第一剂(该第一剂是根据本发明的抗体或抗原结合片段)与治疗有效量的第二剂(该第二剂是除了第一剂之外的抗癌剂)的组合。

[0080] 在另一个方面,本发明提供了涉及向鉴定为患有相对于参考具有增加的CD73表达的肿瘤的受试者给予抗CD73抗体或其抗原结合片段的治疗方法。

[0081] 在另一个方面,本发明提供了涉及向鉴定为患有相比于参考具有增加的CD73表达的肿瘤的受试者给予抗CD73抗体或其抗原结合片段,以及抗PD-1、抗PD-L1、或抗CTLA4或其抗原结合片段的治疗方法。

[0082] 在另一个方面,本发明提供了涉及向鉴定为患有相比于参考具有增加的CD73表达的肿瘤的受试者给予MEDI9447或Phen0203hIgG1或其抗原结合片段,以及派姆单抗(Keytruda®)或纳武单抗(Opdiva®)或其抗原结合片段的治疗方法。

[0083] 在另一个方面,本发明提供了涉及向鉴定为患有相比于参考具有增加的CD73表达的肿瘤的受试者给予MEDI9447或Phen0203hIgG1或其抗原结合片段,以及MEDI4736或其抗原结合片段的治疗方法。

[0084] 在另一个方面,本发明提供了涉及向鉴定为患有相比于参考具有增加的CD73表达的肿瘤的受试者给予MEDI9447或Phen0203hIgG1或其抗原结合片段,以及曲美木单抗或其抗原结合片段的治疗方法。

[0085] 在另一个方面,本发明提供了鉴定患有响应于抗CD73疗法的癌症的受试者的方法,该方法涉及检测该受试者的肿瘤细胞或血细胞中的CD73表达或活性相对于参考的增加的水平,从而鉴定响应于抗CD73疗法的所述癌症。

[0086] 在另一个方面,本发明提供了鉴定患有响应于抗CD73疗法联合抗PD-1、抗PD-L1、或抗CTLA4疗法中的一种或多种的癌症的受试者的方法,该方法涉及检测该受试者的肿瘤

细胞或血细胞中的CD73表达或活性相对于参考的增加的水平,从而鉴定响应于与抗PD-1、抗PD-L1、或抗CTLA4疗法中的一种或多种相组合的抗CD73疗法的所述癌症。

[0087] 在另一个方面,本发明提供了鉴定患有响应于抗PD-1、抗PD-L1、或抗CTLA4疗法的癌症的受试者的方法,该方法涉及检测该受试者的肿瘤细胞或血细胞中的CD73表达或活性相对于参考的降低的水平,从而鉴定响应于抗PD-1、抗PD-L1、或抗CTLA4疗法的所述癌症。

[0088] 在另一个方面,本发明提供了抑制受试者中肿瘤生长的方法,该方法涉及向有需要的受试者给予抗CD73抗体或其抗原结合片段,以及抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CTLA4抗体中的一种或多种或其抗原结合片段。

[0089] 在另一个方面,本发明提供了增加受试者中的抗肿瘤免疫应答的方法,该方法涉及向有需要的受试者给予抗CD73抗体或其抗原结合片段,并且向该受试者给予抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CTLA4抗体中的一种或多种或其抗原结合片段。

[0090] 在另一个方面,本发明提供了治疗受试者的肿瘤的方法,该方法涉及向有需要的受试者给予抗CD73抗体或其抗原结合片段,以及抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CTLA4抗体中的一种或多种或其抗原结合片段。

[0091] 在另一个方面,本发明提供了包含有效量的抗CD73抗体或其抗原结合片段以及抗PD-1抗体或其抗原结合片段的药物配制品。

[0092] 在另一个方面,本发明提供了包含有效量的MEDI9447或其抗原结合片段以及派姆单抗(Keytruda®)或其抗原结合片段的药物配制品。

[0093] 在另一个方面,本发明提供了包含有效量的MEDI9447或其抗原结合片段以及纳武单抗(Opdiva®)或其抗原结合片段的药物配制品。

[0094] 在另一个方面,本发明提供了包含有效量的Phen0203 hIgG1或其抗原结合片段以及派姆单抗(Keytruda®)或其抗原结合片段的药物配制品。

[0095] 在另一个方面,本发明提供了包含有效量的Phen0203 hIgG1或其抗原结合片段、纳武单抗(Opdiva®)或其抗原结合片段的药物配制品。

[0096] 在另一个方面,本发明提供了包含有效量的抗CD73抗体或其抗原结合片段以及抗PD-L1抗体或其抗原结合片段的药物配制品。

[0097] 在另一个方面,本发明提供了包含有效量的MEDI9447或其抗原结合片段以及MEDI4736或其抗原结合片段的药物配制品。

[0098] 在另一个方面,本发明提供了包含有效量的Phen0203 hIgG1或其抗原结合片段以及MEDI4736或其抗原结合片段的药物配制品。

[0099] 在另一个方面,本发明提供了包含有效量的抗CD73抗体或其抗原结合片段以及抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的药物配制品。

[0100] 在另一个方面,本发明提供了包含有效量的MEDI9447或其抗原结合片段以及曲美木单抗或其抗原结合片段的药物配制品。

[0101] 在另一个方面,本发明提供了包含有效量的MEDI9447或其抗原结合片段以及易普利姆玛或其抗原结合片段的药物配制品。

[0102] 在另一个方面,本发明提供了包含有效量的Phen0203 hIgG1或其抗原结合片段以及曲美木单抗或其抗原结合片段的药物配制品。

[0103] 在另一个方面,本发明提供了包含有效量的Phen0203 hIgG1或其抗原结合片段以及易普利姆玛或其抗原结合片段的药物配制品。

[0104] 在另一个方面,本发明提供了用于增加抗肿瘤活性的试剂盒,该试剂盒包括抗CD73抗体或其抗原结合片段以及抗PD-1抗体或其抗原结合片段。

[0105] 在另一个方面,本发明提供了用于增加抗肿瘤活性的试剂盒,该试剂盒包括抗CD73抗体或其抗原结合片段以及抗PD-L1抗体或其抗原结合片段。

[0106] 在另一个方面,本发明提供了用于增加抗肿瘤活性的试剂盒,该试剂盒包括抗CD73抗体或其抗原结合片段以及抗CTLA4抗体或其抗原结合片段。

[0107] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,CD730002的VL和VH分别是或包括SEQ ID NO:1和2,并且CD730010的VL和VH分别是或包括SEQ ID NO:3和4。

[0108] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该分离的结合分子或其抗原结合片段包括抗体或其抗原结合片段。

[0109] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该结合分子是亲和力成熟的。

[0110] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,FW5是或包括SEQ ID NO:31,FW6是或包括SEQ ID NO:32,FW7是或包括SEQ ID NO:33,并且FW8是或包括SEQ ID NO:34。

[0111] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,FW1是或包括SEQ ID NO:25或26,FW2是或包括SEQ ID NO:27或28,FW3是或包括SEQ ID NO:29,FW4是或包括SEQ ID NO:30,FW5是或包括SEQ ID NO:31,FW6是或包括SEQ ID NO:32,FW7是或包括SEQ ID NO:33,并且FW8是或包括SEQ ID NO:34。

[0112] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该VL包括VL互补决定区-1 (VL-CDR1) 氨基酸序列,该氨基酸序列与以下项一致或除了四处、三处、两处或一处氨基酸取代之外与以下项一致:SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、或SEQ ID NO:48。

[0113] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该分离的抗体或其抗原结合片段具备具有SEQ ID NO:57的VL和具有SEQ ID NO:71的VH。

[0114] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该分离的抗体或其抗原结合片段具备具有SEQ ID NO:68的VL和具有SEQ ID NO:82的VH。

[0115] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该分离的抗体或其抗原结合片段包括重链恒定区或其片段。

[0116] 在各实施例中,该重链恒定区或其片段是IgG恒定区,包括例如IgG1恒定区、IgG2恒定区、IgG3恒定区或IgG4恒定区。

[0117] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该分离的抗体或其抗原结合片段包括选自人 κ 恒定区和人 λ 恒定区的轻链恒定区。

[0118] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该IgG恒定区相对于野生型IgG恒定区具有一个或多个氨基酸取代,其中修饰的IgG与具有野生型IgG恒定区的IgG的半衰期比较具有增加的半衰期。

[0119] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该IgG恒定区在位置251-257、285-290、308-314、385-389和428-436处的氨基酸残基具有一个或多个氨基酸取代,其中编号是根据卡巴特(Kabat)提出的EU索引。

[0120] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,至少一个IgG恒定区氨基酸取代是选自:

- [0121] (a) 位置252处的氨基酸被酪氨酸(Y)、苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)、或苏氨酸(T)取代;
- [0122] (b) 位置254处的氨基酸被苏氨酸(T)取代;
- [0123] (c) 位置256处的氨基酸被丝氨酸(S)、精氨酸(R)、谷氨酰胺(Q)、谷氨酸(E)、天冬氨酸(D)、或苏氨酸(T)取代;
- [0124] (d) 位置257处的氨基酸被亮氨酸(L)取代;
- [0125] (e) 位置309处的氨基酸被脯氨酸(P)取代;
- [0126] (f) 位置311处的氨基酸被丝氨酸(S)取代;
- [0127] (g) 位置428处的氨基酸被苏氨酸(T)、亮氨酸(L)、苯丙氨酸(F)、或丝氨酸(S)取代;
- [0128] (h) 位置433处的氨基酸被精氨酸(R)、丝氨酸(S)、异亮氨酸(I)、脯氨酸(P)、或谷氨酰胺(Q)取代;
- [0129] (i) 位置434处的氨基酸被色氨酸(W)、甲硫氨酸(M)、丝氨酸(S)、组氨酸(H)、苯丙氨酸(F)、或酪氨酸取代;并且
- [0130] (j) 所述取代中两个或更多的组合,
- [0131] 其中编号是根据卡巴特提出的EU索引。
- [0132] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,相对于野生型人IgG恒定区,该人IgG恒定区在位置252、254、以及256处具有氨基酸取代,其中
- [0133] (a) 位置252处的氨基酸被酪氨酸(Y)取代,
- [0134] (b) 位置254处的氨基酸被苏氨酸(T)取代,并且
- [0135] (c) 位置256处的氨基酸被谷氨酸(E)取代,
- [0136] 其中编号是根据卡巴特提出的EU索引。
- [0137] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,位置434处的氨基酸被选自色氨酸(W)、甲硫氨酸(M)、酪氨酸(Y)、以及丝氨酸(S)的氨基酸取代,并且其中编号是根据卡巴特提出的EU索引。
- [0138] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,位置428处的氨基酸被选自苏氨酸(T)、亮氨酸(L)、苯丙氨酸(F)、以及丝氨酸(S)的氨基酸取代,并且其中编号是根据卡巴特提出的EU索引。
- [0139] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,位置257处的氨基酸被亮氨酸(L)取代,并且卡巴特位置434处的氨基酸被酪氨酸(Y)取代,并且其中编号是根据卡巴特提出的EU索引。
- [0140] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,卡巴特位置428处的氨基酸被亮氨酸(L)取代,并且卡巴特位置434处的氨基酸被丝氨酸(S)取代。
- [0141] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,相对于野生型人IgG恒定区,该人IgG恒定区在位置252、254、以及256处具有氨基酸取代,其中编号是根据卡巴特提出的EU索引,并且其中
- [0142] (a) 位置252处的氨基酸被酪氨酸(Y)取代,
- [0143] (b) 位置254处的氨基酸被苏氨酸(T)取代,并且
- [0144] (c) 位置256处的氨基酸被谷氨酸(E)取代。

[0145] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该抗体是完全人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、多特异性抗体或其抗原结合片段。

[0146] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该抗原结合片段是Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv、或sc(Fv)₂。

[0147] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该分离的抗体或其抗原结合片段被轭合到至少一种异源剂,包括例如抗癌剂。

[0148] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,根据本发明的组合物进一步包含抗癌剂。

[0149] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该分离的抗体或其抗原结合片段不诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。

[0150] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该分离的抗体或其抗原结合片段是CD73的拮抗剂。

[0151] 在各实施例中,该分离的抗体或其抗原结合片段是选自以下项的细胞中CD73的拮抗剂:MB-MDA-231、4T1、MK1、或所述细胞中两个或更多的组合。

[0152] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该CD73是人CD73。

[0153] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,将抗体或抗原结合片段与CD73结合可减少细胞增殖。

[0154] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,针对CD73的抗体或抗原结合片段可结合到人CD73、食蟹猴CD73以及小鼠CD73。

[0155] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该癌症是选自结肠直肠癌、胰腺癌、膀胱癌、白血病、淋巴瘤、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、黑色素瘤、卵巢癌、甲状腺癌、食道癌、前列腺癌和乳腺癌。

[0156] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该癌症具有促转移表型,包括黑色素瘤或乳腺癌。

[0157] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该受试者是人。

[0158] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该第一剂和第二剂的组合具有优越的抗肿瘤活性;可以是累加的或协同的。

[0159] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该第二剂是一种抗体或其抗原结合片段。

[0160] 在各实施例中,该第二剂特异性地结合到PD-1(程序化死亡1蛋白)、PD-L1(程序化死亡1蛋白配体1)、PD-L2(程序化死亡1蛋白配体2)、或CTLA-4(细胞毒性T淋巴细胞抗原4蛋白)。

[0161] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该第二剂是抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段,包括例如易普利姆玛、曲美木单抗(替西木单抗,CP-675,206)或其抗原结合片段。

[0162] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该第二剂是抗PD-1抗体或其抗原结合片段,包括例如派姆单抗(Keytruda®),兰布罗利珠单抗(lambrolizumab),MK-3475)、纳武单抗(Opdiva®),BMS-936558,MDX-1106,ONO-4538)、AMP-224或其抗原结合片段。

[0163] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该第二剂是抗PD-L1抗体或其抗原结合片段,包括例如MEDI4736、BMS-936559、MPDL3280A或其抗原结合片段。

[0164] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该抗CD73抗体是MEDI9447、Phen0203hIgG1或其抗原结合片段。

[0165] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该受试者正经受、已经经受、或将经受抗PD-1、抗PD-L1、或抗CTLA4疗法。

[0166] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该抗PD-1、抗PD-L1、或抗CTLA4疗法分别涉及给予抗PD-1、抗PD-L1、或抗CTLA4抗体或其抗原结合片段。

[0167] 在各实施例中,该抗PD-1抗体是派姆单抗(Keytruda®, 兰布罗利珠单抗(lambrolizumab), MK-3475)、纳武单抗(Opdiva®, BMS-936558, MDX-1106, ONO-4538)、AMP-224或其抗原结合片段。

[0168] 在各实施例中,该抗PD-L1抗体是MEDI4736、BMS-936559、MPDL3280A或其抗原结合片段。

[0169] 在各实施例中,该抗CTLA-4抗体是易普利姆玛、曲美木单抗(替西木单抗, CP-675, 206)或其抗原结合片段。

[0170] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该肿瘤是结肠癌、黑色素瘤、乳腺癌、淋巴瘤、非小细胞肺癌何杰金氏淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤、以及伯基特氏淋巴瘤、卵巢癌、乳腺癌、头颈癌、或胰腺癌。

[0171] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,在肿瘤样品、血液样品、或淋巴样品中检测CD73表达或活性。

[0172] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,在肿瘤细胞或外周血细胞(包括淋巴或髓样细胞亚群,即B淋巴细胞、CD4⁺、FoxP3⁺淋巴细胞、或髓源性抑制细胞(MDSC)中的一种或多种)中检测CD73表达。

[0173] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,通过流式细胞术、免疫组织化学(IHC)或样品中的CD73酶活性或可溶CD73水平检测CD73表达。

[0174] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,同时给予该抗CD73抗体或其抗原结合片段以及抗PD-1、抗PD-L1、或抗CTLA4抗体或其抗原结合片段。

[0175] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该方法诱导或增加肿瘤特异性免疫应答。

[0176] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该方法减少AMP/CD73/腺苷通路的免疫抑制作用。

[0177] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该肿瘤是CD73过表达肿瘤。

[0178] 在另一个方面,本发明提供了具有抗体VL和抗体VH的特异性地结合到CD73的分离的结合分子或其抗原结合片段,该分离的结合分子或其抗原结合片段特异性地结合到具有对应于Val1144、Lys180、以及Asn185的一个或多个氨基酸的CD73蛋白表位。

[0179] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该分离的结合分子或抗原结合进一步包含对应于Tyr135、Lys136、以及Asn187的一个或多个氨基酸。

[0180] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该分离的结合分子或其抗原结合片段包含对应于Tyr135、Lys136、以及Asn187的氨基酸。

[0181] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该分离的结合分子或其抗原结合片段包含对应于Tyr135、Lys136、Asn187、Tyr135、Lys136、以及Asn187的氨基酸。

[0182] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该分离的结合分子或其抗原结合片段结合了CD73蛋白的一个或多个以下区域内的表位:Tyr132-Val1144和/或Lys180-Asn187。

[0183] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该分离的结合分子或其抗原结合片段包含

或在Tyr132-Val144和/或Lys180-Asn187处的氨基酸序列内。

[0184] 在另一个方面,本发明提供CD73蛋白的表面上的具有对应于Val144、Lys180、以及Asn185的一个或多个氨基酸的构象表位,其中包含该表位的CD73蛋白可以被单克隆抗体MEDI9447或其抗原结合片段、变体、类似物或衍生物特异性地结合。

[0185] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该构象表位进一步包含对应于Tyr135、Lys136、以及Asn18的一个或多个氨基酸。

[0186] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该构象表位包含对应于Tyr135、Lys136、以及Asn187的氨基酸。

[0187] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该构象表位包含对应于Tyr135、Lys136、Asn187、Tyr135、Lys136、以及Asn187的氨基酸。

[0188] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该构象表位在CD73蛋白的一个或多个以下区域内:Tyr132-Val144和/或Lys180-Asn187。

[0189] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该构象表位包含或在Tyr132-Val144和/或Lys180-Asn187处的氨基酸序列内。

[0190] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,MEDI9447结合无活性或催化活性状态或者开放或闭合状态的CD73蛋白。

[0191] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,该CD73蛋白是人CD73。

[0192] 在此处描绘的任何方面的各实施例中,分离的结合分子或其抗原结合片段,其中该VL和VH是MEDI9447的VL和VH。

[0193] 通过本发明定义的组合物和物品单独地或者否则与下面提供的实例相关地进行制造。本发明的其他特征及优点将在详细说明以及在权利要求书中呈现。

[0194] 附图/图简要说明

[0195] 图1A显示MEDI9447VH结构域的核苷酸序列和氨基酸翻译,CDR是基于卡巴特编号规定显示。

[0196] 图1B显示MEDI9447VL结构域的核苷酸序列和氨基酸翻译,CDR是基于卡巴特编号规定显示。

[0197] 图1C显示MEDI9447VH与最接近的人VH和JH种系序列的比对。CDR基于卡巴特编号规定被高亮并且与种系序列不同的残基被加框。

[0198] 图1D显示MEDI9447VL与最接近的人VL和JL种系序列的比对。CDR基于卡巴特编号规定被高亮并且与种系序列不同的残基被加框。

[0199] 图2提供了显示细胞毒性FabZAP试剂被抗体介导内化至MDA-MB-231细胞和4T1细胞中的两个图,其中抗体是MEDI9447和对照抗体R347。

[0200] 图3A是显示抗CD73抗体MEDI9447对5' 外核苷酸酶的抑制的图。

[0201] 图3B是显示抗CD73抗体CD370010对AMP水解的抑制的图。

[0202] 图4是显示MEDI9447抑制CT26同系肿瘤模型中的肿瘤生长的图。鼠CT26肿瘤细胞被皮下植入到雌性Balb/C小鼠的右肋侧。允许肿瘤生长3天并且用MEDI9447或同种型对照每周处理两次持续两周。在第16天,收获肿瘤用于流式细胞术分析。

[0203] 图5是显示MEDI9447抑制肿瘤浸润性髓源性抑制细胞(MDSC)的图。MEDI9447处理的CT26荷瘤小鼠被处死并在研究第16天收获肿瘤。将肿瘤解离为单细胞,针对CD45和MDSC

标记物进行染色,并通过流式细胞术分析。

[0204] 图6包括显示MEDI9447 mIgG1、抗-PD-1或组合对肿瘤体积的影响的六个蜘蛛图。对照抗体包括rIgG2a,其是对大肠杆菌 β -半乳糖苷酶(β -Gal)具有特异性的大鼠IgG2a对照单克隆大鼠抗体,以及同种型对照鼠IgG1。将每组动物的肿瘤体积针对单个动物至研究第40天进行绘图。对照组小鼠在40天研究期间结束时均有肿瘤。单独的抗CD73处理在研究结束时得到10%无肿瘤动物。单独的抗PD1处理在研究结束时也得到10%无肿瘤动物。引人注目地,抗CD73和抗PD处理的组合得到60%无肿瘤小鼠。对照组小鼠中没有一只在研究结束时没有肿瘤。

[0205] 图7是显示MEDI9447 mIgG1、抗-PD1或组合对存活的影响的图。

[0206] 图8是显示在结肠直肠癌肿瘤中当与单独的任一药剂相比时,MEDI9447和抗PD-1的组合显著增强肿瘤生长抑制($p < 0.05$)的图。将小鼠皮下注射同系MC38-OVA结肠直肠癌细胞,并每周两次用单独的10mg/kg MEDI9447或10mg/kg抗PD-1抗体或两种抗体的组合进行处理。肿瘤体积每周测量两次。

[0207] 图9是显示抗PD-1诱导富含CD73的肿瘤微环境的图,如通过从荷瘤小鼠分离的肿瘤细胞上的CD73表达测量的。对小鼠($n=4$)皮下注射同系CT26结肠直肠细胞并且每周用10mg/kg抗PD-1或无关的同种型对照抗体处理两次。第一次处理之后一天,分离肿瘤,解离细胞并且通过流式细胞术针对表面表型进行分析。

[0208] 图10是显示抗PD-1诱导富含CD73的肿瘤微环境的图,如通过从荷瘤小鼠分离的髓源性抑制细胞(MDSC)上的CD73表达测量的。对小鼠($n=4$)皮下注射同系CT26结肠直肠细胞并且每周用10mg/kg抗PD-1或无关的同种型对照抗体处理两次。第一次处理之后一天,分离肿瘤,分离肿瘤细胞,收获外周全血细胞,并通过流式细胞术分析表面CD73表达。

[0209] 图11是显示抗PD-1诱导富含CD73的肿瘤微环境的图,如通过从荷瘤小鼠分离的CD4⁺、FoxP3⁺淋巴细胞上的CD73表达测量的。对小鼠($n=4$)皮下注射同系CT26结肠直肠细胞并且每周用10mg/kg抗PD-1或无关的同种型对照抗体处理两次。第一次处理之后三天,分离肿瘤,收获外周全血细胞,并通过流式细胞术分析表面CD73表达

[0210] 图12是显示在黑色素瘤肿瘤中当与单独的任一药剂相比时,MEDI9447和抗PD-L1的组合显著增强肿瘤生长抑制($p < 0.05$)的图。对小鼠皮下注射同系B16F10黑色素瘤细胞,并每周两次用单独的10mg/kg MEDI9447或10mg/kg抗PD-L1抗体或两种抗体的组合进行处理。肿瘤体积每周测量两次。

[0211] 图13是显示在淋巴瘤肿瘤中当与单独的任一药剂相比时,MEDI9447和抗PD-L1的组合显著增强肿瘤生长抑制($p < 0.01$)的图。对小鼠皮下注射同系EG7-OVA淋巴瘤细胞,并每周两次用单独的10mg/kg MEDI9447或10mg/kg抗PD-L1抗体或两种抗体的组合进行处理。肿瘤体积每周测量两次。

[0212] 图14是显示如通过在引流淋巴结B淋巴细胞上CD73的表面表达测量的抗PD-L1诱导富含CD73的肿瘤微环境的图。对小鼠($n=4$)皮下注射同系CT26结肠直肠细胞并且每周用10mg/kg抗PD-L1或无关的同种型对照抗体处理两次。第一次处理之后一天,从引流淋巴结分离细胞并且通过流式细胞术针对表面表型进行分析。

[0213] 图15是显示如通过在肿瘤浸润性CD4⁺、FoxP3⁺淋巴细胞上CD73的表面表达测量的抗PD-L1诱导富含CD73的肿瘤微环境的图。对小鼠($n=4$)皮下注射同系CT26结肠直肠细胞

并且每周用10mg/kg抗PD-L1或无关的同种型对照抗体处理两次。第一次处理之后三天,分离肿瘤,解离细胞并且通过流式细胞术针对表面表型进行分析。

[0214] 图16A和B是显示单独的或与抗PD-L1组合的MEDI9447减少肿瘤浸润性淋巴细胞上的CD73表达的图。用单独的30mg/kg MEDI9447或30mg/kg抗PD-L1或MEDI9447和抗-PD-L1两者的组合,每周两次(第12天和第16天)处理负荷结肠直肠CT26同系肿瘤的小鼠。在第17天,收获肿瘤并通过流式细胞术分析表面CD73表达。在肿瘤浸润(A) CD4+FoxP3+Treg和(B) CD8+T细胞上的CD73表达。

[0215] 图17A和B是显示单独的或与抗PD-L1组合的MEDI9447降低(A)肿瘤细胞和(B)外周全血细胞上的CD73活性的图。用单独的30mg/kg MEDI9447或30mg/kg抗PD-L1或MEDI9447和抗-PD-L1两者的组合,每周两次(第12天和第16天)处理负荷结肠直肠CT26同系肿瘤的小鼠。在第17天,收获肿瘤和外周全血细胞,并使用Cell-Titre Glo针对酶活性分析表面CD73表达。

[0216] 图18是描绘用MEDI9447和对CTLA4、OX40、PD-1和PD-L1具有特异性的抗体或融合蛋白处理的外周血单核细胞的细胞因子谱图的一组图。将原代人外周血单核细胞在与MEDI9447和/或对指定靶标具有特异性的抗体或融合蛋白的混合白细胞反应中孵育72小时。通过ELISA定量一式两份上清液中的细胞因子(IFN- γ 、IL-1 β 、TNF- α)。显示的数据代表抗CD73抗体与4种不同的配偶剂的最佳剂量组合。该抗PD-1和抗CD73组合显示显著($p < 0.05$)的协同,如通过布利斯(Bliss)响应面法(赵(Zhao)等人)确定的。细胞因子谱图表明髓样谱系和淋巴谱系两者都受影响。测试了大于50个供体对。

[0217] 图19A和19B描绘了与MEDI9447复合的CD73的氢氘交换MS(HDX-MS)分析的结果。图19A描绘了显示当与MEDI9447结合时经历氘摄取减少的那些CD73区域(N-至C-端)的氢-氘交换热图。抗体结合的和未结合的CD73之间的相对交换被描绘为暴露时间的函数,交换减少为红色,交换增加为蓝色,而不变为白色。位置132-143和182-187的N-端区展现最高程度的差异交换。图8B显示CD73单体的晶体结构,其描绘了N-端结构域(黄色)内HDX鉴定的结合界面的位置(青色)。CD73接头区域和C-端结构域分别以橙色和蓝色代表。

[0218] 图20A-20E描绘了指示在游离对结合状态下经历差异氢交换的CD73和MEDI9447的区域的氢氘交换MS(HDX-MS)分析的结果。图20A描绘了代表作为涵盖132-143区域的肽内氘暴露时间的函数的相对氘摄取(道尔顿质量变化)的图。图20B描绘了代表作为涵盖182-187区域的肽内氘暴露时间的函数的相对氘摄取(道尔顿质量变化)的图。在图20A和20B中,针对单独的CD73的摄取以方形显示,而针对结合到MEDI9447 Fab的CD73的摄取以红色显示。肽序列、位置和质量在绘图框中指示。为了缩小包含了展示氢交换变化并且将被预测形成表位的序列的区域,比较重叠肽中的相对质量变化。例如,跨越位置173-186的肽展示差异交换,而跨越173-181的肽没有差异。因此,据推断,182上游的残基没有差异标记。图20C描绘了MEDI9447 Fab重链的DynamX差异图表。图20D描绘了MEDI9447 Fab轻链的DynamX差异图表。对于图20C和20D,每个数据点指示CD73+Fab复合体(y轴上的正值)和单独的Fab(y轴上的负值)之间的氘吸收的差异。垂直条代表暴露时间点之间的摄取差异的总和。指示了当Fab结合CD73时相对摄取较低的CDR。图9E描绘了单独的CD73(y轴上的负值)与结合到Fab的CD73(y轴上的正值)的DynamX差异图表。指示了区域E1(aa 132-143)和E2(aa 182-187)。横轴对应于从N-至C-端分析的肽(从左至右)。虚线覆盖在图表上,显示针对统计学显著变化

的1.6道尔顿、98%置信区间截止值。

[0219] 图21A-21H描绘了显示MEDI9447表位位于CD73的N-端结构域内的传感器芯片数据。图21A是描绘野生型CD73蛋白的传感器芯片数据的图。将野生型CD73蛋白固定在HTG传感器芯片上,并通过表面等离子体共振 (SPR) 测量MEDI9447稀释物 (5nM至0.3nM) 的结合。图21B是描绘N-端结构域转换的CD73蛋白的传感器芯片数据的图。将N-端结构域转换的CD73蛋白固定在HTG传感器芯片上,并通过SPR测量MEDI9447稀释物 (5nM至0.3nM) 的结合。当N端结构域被转换时,MEDI9447不与CD73结合。图21C是描绘N-端和C-端结构域转换的CD73蛋白的传感器芯片数据的图。将N-端和C-端结构域转换的CD73蛋白固定在HTG传感器芯片上,并通过SPR测量MEDI9447稀释物 (5nM至0.3nM) 的结合。当N端和C端结构域均转换时,MEDI9447不与CD73结合。图21D是描绘接头区域转换的CD73蛋白的传感器芯片数据的图。将接头区域转换的CD73蛋白固定在HTG传感器芯片上,并通过SPR测量MEDI9447稀释物 (5nM至0.3nM) 的结合。仅转换接头区域不会影响结合。图21E是描绘C-端结构域转换的CD73蛋白的传感器芯片数据的图。将C-端结构域转换的CD73蛋白固定在HTG传感器芯片上,并通过SPR测量MEDI9447稀释物 (5nM至0.3nM) 的结合。仅转换C-端结构域不会影响结合。图21F是描绘界面E1 (aa 132-143) 转换的CD73蛋白的传感器芯片数据的图。将界面E1 (aa 132-143) 转换的CD73蛋白固定在HTG传感器芯片上,并通过SPR测量MEDI9447稀释物 (5nM至0.3nM) 的结合。图21G是描绘界面E2 (aa 182-187) 转换的CD73蛋白的传感器芯片数据的图。将界面E2 (aa 182-187) 转换的CD73蛋白固定在HTG传感器芯片上,并通过SPR测量MEDI9447稀释物 (5nM至0.3nM) 的结合。图21H是描绘界面E1 (aa 132-143) 和界面E2 (aa 182-187) 转换的CD73蛋白的传感器芯片数据的图。将界面E1 (aa 132-143) 和界面E2 (aa 182-187) 转换的CD73蛋白固定在HTG传感器芯片上,并通过SPR测量MEDI9447稀释物 (5nM至0.3nM) 的结合。对于图21F-21H,转换HDX界面E1 (aa 132-143) (图21F) 对结合有轻微影响,与单独转换HDX界面E2 (aa 182-187) (图21G) 或与E1的组合 (图21H) 相反。对于图21A-21H,以相匹配的颜色显示传感图和重叠拟合。每个结合分析的动力学测量见表16。

[0220] 图22描绘了人和鸡CD73蛋白序列的比对。只显示成熟的蛋白质序列。鸡序列中的非保守残基被突出显示。在鸡和人之间转换以产生敲除变体的区域被注释 (例如,DS1a、DS1b等)。

[0221] 图23描绘了MEDI9447与CD73变体的结合。图23是显示MEDI9447与CD73变体的结合的数据表。蓝色突出显示的变体的 K_D 与WT或KO亲本构建体相比变化 >2 倍。*从2:1异源配体拟合得到的动力学测量。**编号对应于鸡序列 (129=133,140=144且181=185 (在人中))。

[0222] 图24A-24F描绘了MEDI9447表位位于N-端结构域的顶点。图13A显示MEDI9447与一组CD73变体 (见图22和23) 结合的评估揭示了构成相互作用位点的六个位置。三个最具影响力的残基中的两个 (突出显示的块) 位于HDX界面区域 (以蓝色突出显示) 之外。三个不太重要的残基 (粉红色块) 位于HDX界面内。图24B是显示敲入N185和V144 (K180是保守的) 到含有鸡N-和C-端结构域序列的CD73构建体,恢复了比野生型CD73 (从5nM至0.3nM的MEDI9447稀释物;与图10B相比) 的 K_D 小20倍的结合。图24C描绘了位于CD73的N-端结构域内的表位残基的特写。最重要的结合残基被突出显示,而影响较小的位置 (Y135、K136和N187) 呈粉红色。HDX界面以蓝色叠加。图24D描绘了示出表位形成近连续的结合表面的表面表示图。图24E描绘了CD73的开放构象的晶体结构,显示了表位在N-端结构域的顶端侧表面的位置。图24F显

示表位的位置远离底物结合位点(球形描绘的腺苷)和锌离子(灰色球体)配位点(青色侧链)。在所有晶体结构中,分别以黄色、橙色和蓝色描绘CD73 N-端结构域、接头区和C-端结构域。

[0223] 图25A-25C显示MEDI9447是AMP的CD73水解的非竞争性抑制剂。图25A是描绘在存在MEDI9447或同种型匹配的对照mAb的情况下测量的AMP的CD73磷酸水解的动力学的图。图25B是显示MEDI9447充当非竞争性抑制剂的图,其中不管底物浓度如何,它等效地抑制水解。相比之下,已知的CD73竞争性抑制剂APCP增加 K_m ,但没有增加 $V_{\text{最大}}$ 。图25C是描绘MEDI9447 IgG、Fab或对照IgG对抑制AMP的CD73水解的剂量响应的图。MEDI9447 IgG以与CD73二聚体(箭头)1:1摩尔化学计量达到最大抑制。在MEDI9447 IgG过量(>10nM)的高浓度下,观察到抑制丧失或“钩状效应”。MEDI9447 Fab和对照IgG不抑制CD73。所有实验使用如本文所述的CellTiterGlo测定进行(RLU,相对光单位)。

[0224] 图26A-26C显示抗CD73mAb(克隆0069)结合依赖于CD73 N-和C-端结构域残基。图26A是表示针对组氨酸标记的CD73的传感器芯片数据的图。将组氨酸标记的CD73固定在HIS2生物传感器上,并通过生物层干涉测量(BLI)来测量由mAb A的结合。mAb A与WT CD7(蓝色传感图)、N-端结构域转换敲除CD73(KO_1-291,绿色传感图)和C端结构域转换敲除CD7(KO_311-523,青色传感图)的结合显示mAb结合受N和C-端结构域两者中的残基影响。图26B显示突出显示的mAb A结合热点(aa 114-134和153-170)的位置的开放和闭合CD73的晶体结构,其位于N-和C-端结构域界面附近(N-端结构域为黄色,接头为橙色,并且C-端结构域为蓝色)。作图是基于图26A和26C的结合数据。图26C显示了mAb A与CD73的不同结构域转换敲除变体的结合传感图。转换子区DS2c(aa 114-134)或DS3a(aa 153-170)敲除了结合。所有结合分析在如本文所述的Octet QK384仪器上进行。

[0225] 图27A-27C显示MEDI9447抑制CD73向构象活性结构的转变。图27A是显示野生型CD73的生物传感器数据的图。将野生型CD73固定在HIS2生物传感器上,并通过BLI在Octet QK384上测量MEDI9447(蓝色传感图)和抗CD73 mAb A(棕色传感图)的结合。当CD73用 Zn^{2+} 和APCP进行预孵育时,MEDI9447保留结合(黑色传感图),但mAb A结合丧失(橙色传感图)。图27B是显示尽管用 Zn^{2+} 和APCP预孵育CD73引起mAb A结合的丧失(橙色传感图),在加入 Zn^{2+} 和APCP之前用MEDI9447预孵育恢复结合(紫色传感图)。分别在蓝色和棕色传感图中显示mAb A与单独的CD73和用MEDI9447(而非 Zn^{2+} 和APCP)预孵育的CD73的结合。图27C显示了描绘MEDI9447如何阻止CD73采用 Zn^{2+} 和APCP诱导的完全闭合的活性构象的拟建模型。MEDI9447可限制转变为对mAb A具有较低亲和力的中间体状态。

[0226] 图28A和28B显示了通过BLI测量的不同条件下MEDI9447或mAb A与CD73的结合,如本文所述,除非另有说明。图28A是描绘抗CD73 mAb A与固定在HIS2生物传感器上的组氨酸标记的野生型CD73的结合的图。100秒基线后,将捕获的CD73用 Zn^{2+} 、APCP和/或EDTA孵育900秒,并且然后将生物传感器在30nM mAb A中孵育600秒以测量结合。mAb A结合CD73(蓝色传感图),而不是用 Zn^{2+} 和APCP预孵育的CD73(紫色传感图)。mAb A保持与用APCP和EDTA(绿色传感图)或 Zn^{2+} 、APCP和EDTA(金色传感图)预孵育的CD73的结合。EDTA的螯合作用显示,当CD73用 Zn^{2+} 和APCP孵育时,二价阳离子是mAb A结合丧失所必需的。图28B是显示MEDI9447Fab或对照IgG没有挽救mAb A与用 Zn^{2+} 和APCP预孵育的CD73的结合的图。如图27B所示进行测定。在添加 Zn^{2+} 和APCP之前,将MEDI9447Fab或同种型匹配的对照IgG用CD73预孵

育。固定在生物传感器上的mAb A结合单独的CD73(蓝色传感图),用MEDI9447Fab(浅蓝色传感图)或对照IgG(黑色传感图)预孵育的CD73,而非用 Zn^{2+} 和APCP孵育的CD73(棕色传感图),或在加入 Zn^{2+} 和APCP之前用CD73预孵育的Fab(金色传感图)或对照IgG(紫色传感图)。

[0227] 图29A和29B显示抗CD73 mAb B结合依赖于子区DS2b(aa 92-134)或DS2c(aa 114-134)中的残基。图29A是显示对应于图30A-30C的SEC-MALS数据的表。对于CD73和MEDI9447或mAb B的每种混合物,显示形成的复合物的相应的SEC保留时间、 M_w 和多分散性。图29B描绘了CD73上mAb B的结合热点的确定。根据本文的方法,通过BLI测量mAb B与固定在HIS2生物传感器上的CD73变体的结合,如针对图26A-26C中的mAb A(克隆0069)所述。结合传感图显示,转换子区DS2b(aa 92-134)或DS2c(aa 114-134)敲除mAb B的结合。

[0228] 图30A-30C显示MEDI9447在可溶CD73分子之间形成二聚体间桥。将CD73用不同量的MEDI9447或抗-CD73 mAb B进行孵育,并通过SEC-MALS分析。显示的是SEC UV色谱图,蛋白质保留时间在x轴上,而通过MALS测定的摩尔质量在y轴上。图30A是显示MEDI9447以1:1的摩尔比(绿色迹线)与约1.7(-)和约6.6(+)兆道尔顿的CD73形成复合物的色谱图。以较低比率的MEDI9447:CD73(0.5:1为蓝色,0.1:1为品红色)形成可比较大小的复合物。单独的MEDI9447和CD73分别由黑色和红色UV迹线表示。图30B是CD73二聚体的晶体结构的自上而下的视图,显示了mAb B结合热点(紫色)和MEDI9447表位(品红色和粉红色)。mAbB结合开放构象的二聚体之间的中心凹槽附近的位点。图30C是显示当CD73与mAb B结合时形成约270-290kD(约7.2分钟的峰)的单一主要复合物的色谱图。显示的UV迹线表示1:1mAb B:CD73(红色)、0.5:1(蓝色)和0.1:1(绿色)。单独的mAb A和CD73分别是品红色和黑色。

[0229] 图31A-31D描绘了表面结合的CD73被MEDI9447的IgG和Fab形式抑制。图31A是描绘通过MEDI9447 IgG、Fab或对照抗体抑制固定的CD73的AMP水解的图。通过C-端组氨酸标签将CD73固定到包覆镍的微量滴定板上,并用本文所述的孔雀石绿测定法测量MEDI9447 IgG、Fab或对照抗体对AMP水解的抑制。MEDI9447 IgG,而非对照IgG,以剂量依赖的方式抑制AMP的CD73水解。MEDI9447 Fab还抑制CD73活性,但程度要低得多。图31B描绘了包括与抗Fd抗体(xFd,红色)结合的MEDI9447Fab(绿色)的复合物。当MEDI9447 Fab(绿色)结合到抗Fd抗体(xFd,红色)的一个臂上,另一个臂结合到非特异性多克隆Fab(pFab,橙色)时,抑制增加到可与MEDI9447 IgG相比(Fab+xFd+pFab对MEDI9447 IgG和MEDI9947 IgG+xFd+pFab)(参见图31A)。图31C是描绘由MEDI9447 IgG、Fab或对照抗体对GPI锚定的CD73的AMP水解的抑制的图。通过CellTiterGlo测定法测定MDA-MB-231细胞中内源表达的CD73的酶活性。与固定的重组CD73相似,MEDI9447 IgG以比Fab更大的程度抑制AMP水解,但是通过与抗Fd抗体形成复合物来增加MEDI9447 Fab的有效大小增强了抑制。图31D是描绘由MEDI9447 IgG、Fab或对照抗体对可溶CD73(sCD73)的AMP水解的抑制的图。为了测试xFd+MEDI9447是否可以抑制可溶CD73,使用孔雀石绿测定法测量AMP水解。单独或与单个xFd臂结合的MEDI9447 Fab不抑制可溶CD73活性。相比之下,MEDI9947Fab与两个xFd臂结合(MEDI9447 Fab+xFd)赋予了导致CD73抑制的二价性。

[0230] 图32是显示MEDI9447 IgG和Fab抑制AMP的CD73水解的图。如本文所述,使用孔雀石绿测定法在存在增加浓度的抗体的情况下测量CD73活性。MEDI9447 IgG以剂量依赖性方式抑制CD73水解活性,并且没有观察到钩状效应或抑制丧失。MEDI9447 Fab也抑制CD73功能,但达到较低水平的最大抑制。实验进行了两次,具有可比较的结果。仅显示一次实验的

数据。

[0231] 图33描绘了显示通过双重机制发生MEDI9447对CD73水解活性的抑制的模型。MEDI9447 IgG (绿色) 通过形成防止构象转变到闭合状态的二聚体间桥来抑制可溶CD73。单价结合的IgG或Fab不抑制可溶CD73。当CD73于表面结合时,通过邻接的CD73二聚体的桥连或来自单价结合的IgG或Fab/xFd (红色) 复合物的空间阻断可以发生抑制。

[0232] 发明的详细说明

[0233] 本发明提供了特异性地结合到CD73的分离的结合分子或其抗原结合片段。在一些方面,此类分子是特异性地结合到CD73的抗体及其抗原结合片段。还提供了包括抗CD73抗体或其抗原结合片段的相关的多核苷酸、载体、药物组合物。还提供了制备连同使用此处披露的抗CD73抗体和抗原结合片段的方法,例如在受试者中诊断和治疗癌症(作为直接疗法、辅助疗法、或组合疗法)的方法。本发明还提供了源自于此处披露的CD73结合分子的抗体-药物轭合物。此外,本发明提供了以抗CD73抗体(例如,MEDI9447)和靶向癌症免疫周期的其他方面的一种或多种药剂诸如抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体(例如,MEDI4736)、抗CTLA4抗体为特征的治疗组合;以及使用此类组合用于减少肿瘤介导的免疫抑制的方法。

[0234] 为了更容易地理解本披露,首先定义某些术语。附加的定义在整个详细说明中列出。

[0235] I. 定义

[0236] 在详细描述本发明之前,应理解的是本发明不限于特定的组合物或方法步骤,因为这些组合物或方法步骤可以变化。如在本说明书和所附权利要求书中使用的,单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指代物,除非上下文明确地指示其他的情况。术语“一个”(或“一种”)、连同术语“一个或多个/一种或多种”和“至少一个/一种”在此可以互换地使用。

[0237] 此外,当在此使用时“和/或”被理解为这两个指定的特征或组分每一者与或不与另一者的特定披露。因此,术语“和/或”如在此在词组如“A和/或B”中使用,旨在包括“A和B”、“A或B”、“A”(单独)、以及“B”(单独)。同样,术语“和/或”如在词组如“A、B和/或C”中使用是旨在涵盖以下方面中的每一者:A、B、和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);以及C(单独)。

[0238] 除非另外定义,在此所使用的所有技术和科学术语具有与本披露涉及的领域所属的技术人员通常所理解的相同的意义。例如,生物医学与分子生物学简明词典 (Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology), Juo、Pei-Show, 第2版, 2002, CRC 出版社;细胞与分子生物学词典 (The Dictionary of Cell and Molecular Biology) 第3版, 1999, 学术出版社 (Academic Press); 以及生物化学和分子生物学牛津词典 (Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology), 修订版, 2000, 牛津大学出版社 (Oxford University Press) 为技术人员提供在本披露中使用的许多术语的通用词典注释。

[0239] 单位、前缀和符号均以它们的国际单位系统 (SI) 接受形式表示。数值范围包括限定该范围的数字。除非另外说明,氨基酸序列以氨基至羧基取向从左向右书写。本文提供的标题不是对不同方面的限制,其可以通过参考作为整体的说明书而得到。因此,下面直接定义的术语通过以其全文参考说明书更完整地定义。

[0240] 应当理解,当用语言“包含”来说明方面时,还提供了关于“由……组成”和/或“主

要由……组成”描述的其他类似方面。

[0241] 氨基酸在本文中通过其通常已知的三字母符号抑或由IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的单字母符号来表示。同样地,核苷酸通过它们的普遍公认的单字母代码来提及。

[0242] 如此处使用的术语“CD73多肽”是指CD73(分化群73)蛋白,文献中也称为5'-核苷酸酶(5'-NT)或外-5'-核苷酸酶,由NT5E基因编码。参见,例如,米思米(Misumi)等人欧洲生物化学杂志(Eur.J.Biochem.) 191(3):563-9(1990)。CD73的人和鼠形式相应的序列可分别在Uniprot数据库登录号P21589和Q61503下获得。在定义任何CD73抗体表位时,使用的氨基酸编号表示不包含信号序列残基的成熟CD73蛋白的氨基酸残基。因此,抗体结合氨基酸Val1144、Lys180、以及Asn185,例如,是指裂解信号序列之后的氨基酸位置,即成熟蛋白质中的氨基酸。

[0243] 下面提供了一种示例性CD73多肽:

[0244] >sp|P21589|5NTD_人5'-核苷酸酶OS=智人GN=NT5E PE=1 SV=1

[0245] MCPRAARAPATLLALGAVLWPAAGAWELTILHTNDVHSRLEQTSSEDSSKCVNASRCMGGVARLFTKVQ
QIRRAEPNVLLLDAGDQYQGTTWFTVYKGA EVAHF MNALRYDAMALGNHEFDNGVEGLIEPLLKEAKFPILSANIKA
KGPLASQISGLYLPYKVLPGDEVVGIVGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEITALQPEVDKLTNLVNKIIALGHSGF
EMDKLIAQKVRGVDVVVGHSNTFLYTGNPPSKEVPAGKYPIVTSDDGRKVPVQAYAFGKYLGYLKIEFDERGNV
ISSHGNPILLNSSIPEDPSIKADINKWKRIKLDNYSTQELGKTIVYLDGSSQSCRFRECNMGNLICDAMINNNLRHTD
EMFWNHVSMCILNGGGIRSPIDERNNGTITWENLAAVL PFGGTFDLVQLKGSTLKKAFEHSVHRYGQSTGEFLQVGG
IHVVYDL SRKPGDRVVKLDVLCTKCRVPSYDPLKMDEVYKIVLPNFLANGGDGFQMIKDELLRHDSGDQDINVVSTY
ISKMKVIYPAVEGRIKFSTGSHCHGSFSLIFLSLWAVIFVLYQ

[0246] 已鉴定CD73的可溶和膜结合形式。参见克莱门斯(Klemens)等人,生物化学和生物物理学研究通讯(Biochem.Biophys.Res.Commun.) 172(3):1371-7(1990)。此外,已鉴定若干不同的同工酶。参见,罗西(Rosi)等人生命科学(Life Sci.) 62(25):2257-66(1998)。全长CD73蛋白包括574个氨基酸。在去除前肽的信号序列(位置1至26)和的C-端区(位置550-574)之后产生成熟CD73蛋白。此外,可变剪接之后CD73的同种型2中去除氨基酸404至453。还已知天然变体,例如,变体C358Y、变体T376A、以及变体M379T。参见米思米(Misumi)等人,欧洲生物化学杂志(Eur.J.Biochem.) 191:563-569(1990);大月(Otsuki)等人DNA研究(DNA Res.) 12:117-126(2005);曼加尔(Mungall)等人自然(Nature) 425:805-811(2003);汉森(Hansen)等人基因(Gene) 167:307-312(1995);克莱门斯(Klemens)等人生物化学和生物物理学研究通讯(Biochem.Biophys.Res.Commun.) 172:1371-1377(1990);克纳普(Knapp)等人结构(Structure) 20:2161-2173(2012);或圣希莱尔(St.Hilaire)等人新英格兰医学杂志(N.Engl.J.Med.) 364:432-442(2011),所有这些通过引用以其全文结合在此。

[0247] 导致患者组织流体尤其血清中的CD73水平的改变的典型疾病:组织创伤;心肌梗死或中风、器官移植或其他外科手术引起的再灌注损伤;癌症或癌症转移;或由上述创伤或再灌注损伤或者由慢性疾病(包括过敏性病症、自身免疫疾病和炎性疾病)引起的炎性病症。此类慢性病症的实例可以是所述关节炎、过敏性病症如哮喘、炎性病症如炎性肠病或皮肤炎性病症、牛皮癣、帕金森病、阿尔茨海默病、自身免疫性疾病、I型或II型糖尿病、动脉粥样硬化、多发性硬化、克罗恩病、或器官移植引起的排斥反应。具体地,炎性疾病全身炎症反应综合征(SIRS)、急性肺损伤(ALI)、多器官衰竭(MOF)、局部缺血再灌注损伤(IRI)以及药

品不良反应 (ADRS) 导致组织流体CD73蛋白的改变。因此,可使用此处披露的CD73结合分子例如来治疗或诊断癌症(例如,结肠癌、黑色素瘤、乳腺癌、淋巴瘤、非小细胞肺癌何杰金氏淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤、以及伯基特氏淋巴瘤、卵巢癌、乳腺癌、头颈癌、以及胰腺癌)。此外,使用此处披露的CD73结合分子对来自患者的样品(例如,组织流体)中的CD73的水平进行测量可用于监测上述疾病的发展,用以评估疗法的效力,以选择患者进行特定疗法治疗或作出医疗决定,例如开始、结束、中断或修改某些治疗。

[0248] 术语“抑制(inhibit)”、“阻断”、“抑制(suppress)”及其语法变体在此可互换地使用,并且指生物活性的任何统计学显著的降低,包括活性的完全阻止。例如,“抑制”可以指生物活性大约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的降低。因此,当术语“抑制(inhibition)”或“抑制(suppression)”被用于描述例如对CD73的酶活性的影响时,该术语是指相对于未处理的(对照)细胞中CD73介导的5'-核苷酸酶活性,抗CD73抗体或其抗原结合片段统计学上显著降低CD73的5'-核苷酸酶活性(异化单磷酸腺苷AMP水解为腺苷)的能力。表达CD73的细胞可以是天然存在的细胞或细胞系(例如,癌细胞)或可以通过将编码CD73的核酸引入至宿主细胞中而重组地产生。在一些方面,抗CD73抗体或其抗原结合片段可统计学上显著降低生物学流体中可溶形式CD73的5'-核苷酸酶活性。在一个方面,该抗CD73结合分子例如抗体或其抗原结合片段抑制CD73介导的5'-核苷酸酶活性至少10%、至少15%、或至少20%、至少25%、或至少30%、至少35%、或至少40%、至少45%、或至少50%、至少55%、或至少60%、至少65%、或至少70%、至少75%、或至少80%、至少85%、或至少90%、至少95%、或约100%,如例如通过以下实例中所述的方法和/或本领域已知的方法测定的。

[0249] 如此处使用的术语“抑制CD73活性”是指抗CD73结合分子例如抗体或其抗原结合片段在表达CD73的细胞或包含CD73的样品中统计学上显著降低CD73依赖性5'-核苷酸酶活性的能力。在一些方面,对CD73活性的抑制可以是当细胞或样品与本披露的抗CD73结合分子例如抗体或其抗原结合片段接触时,相对于在不存在该抗CD73结合分子例如抗体或其抗原结合片段的情况下(对照条件)测量的CD73活性,降低至少10%、或至少15%、或至少20%、或至少25%、或至少30%、或至少35%、或至少40%、或至少45%、或至少50%、或至少55%、或至少60%、或至少65%、或至少70%、或至少75%、或至少80%、或至少85%、或至少90%、或至少95%、或约100%。

[0250] 如在此可互换使用的术语“抗体”或“免疫球蛋白”包括完整抗体及其任何抗原结合片段或单链。

[0251] 典型的抗体包括通过二硫键互连的至少两条重(H)链和两条轻(L)链。每个重链由重链可变区(在此缩写成V_H或V_H)和重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3构成。每个轻链由轻链可变区(本文缩写为V_L或V_L)和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域CL构成。V_H和V_L区可以进一步细分为称为互补决定区(CDR)的高变区,其间插入更保守的称为框架区(FW)的区域。每个V_H和V_L由三个CDR和四个FW构成,从氨基末端到羧基末端按照以下顺序排列:FW1、CDR1、FW2、CDR2、FW3、CDR3、FW4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或宿主因素(包括免疫系统的不同细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q))的结合。本披露的示例性抗体包括抗CD73抗体(原始的和种系化的)、亲和力优化的克隆、缺少ADCC的优

化抗体、轭合抗体(例如,ADC)、以及其他优化的抗体(例如,血清半衰期优化的抗体,包括例如YTE突变,参见达尔阿夸(Dall'Acqua)等人,生物化学杂志(J.Biol.Chem.) 281:23514-24 (2006)以及美国专利号7,083,784,特此通过引用以其全文结合)。

[0252] 术语“种系化”意指抗体中特定位置的氨基酸突变回种系中的那些。

[0253] 术语“抗体”意指通过位于免疫球蛋白分子的可变区内的至少一个抗原识别位点识别并特异性地结合一个靶标如蛋白、多肽、肽、碳水化合物、多核苷酸、脂质、或上述物质的组合的一个免疫球蛋白分子。如在此使用的,术语“抗体”包括完整多克隆抗体,完整单克隆抗体,抗体片段(诸如Fab、Fab'、F(ab')₂、以及Fv片段),单链式Fv(scFv)突变体,产生自至少两个完整抗体、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、包含抗体的抗原决定部分的融合蛋白以及包含抗原酶识别位点的任何其他修饰的免疫球蛋白分子的多特异性抗体(例如双特异性抗体),只要这些抗体展现希望的生物活性。

[0254] 抗体可以是以下五种主要类别的免疫球蛋白中的任一种:IgA、IgD、IgE、IgG、以及IgM、或其亚类(同种型)(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、以及IgA2),基于它们的重链恒定区的特性分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、以及 μ 。不同类别的免疫球蛋白具有不同的和熟知的亚基结构和三维构型。抗体可以是裸露的或与其他分子例如毒素,放射性同位素等轭合以形成ADC。

[0255] “阻断性”抗体或“拮抗剂”抗体是抑制或降低了该抗体结合的抗原(诸如CD73)的生物活性的抗体。在某些方面,阻断性抗体或拮抗剂抗体基本上或完全抑制抗原的生物活性。理想地,该生物活性减少至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、或甚至100%。

[0256] 术语“CD73抗体”、“结合到CD73的抗体”或“抗CD73”是指抗体或其抗原结合片段,该抗体或其抗原结合片段能够以足够亲和力结合CD73使得该分子有用于在靶向CD73中作为治疗剂或诊断试剂。抗CD73抗体与不相关的非CD73蛋白的结合程度少于该抗体与CD73的结合的约10%,如例如通过放射性免疫测定(RIA)、BIAcore™(使用重组CD73作为分析物并且该抗体作为配体,或反之亦然)、或本领域已知的其他结合测定测量的。在某些方面,结合到CD73的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{pM}$ 、 $\leq 1\text{pM}$ 、或 $\leq 0.1\text{pM}$ 的解离常数(K_D)。术语“抗CD73”广泛地说也涵盖包括例如结合到支架中的此处披露的抗体的CDR的分子。因此,短语“特异性地结合到CD73的分离的结合分子或其抗原结合片段”将不仅是指抗体和其抗原结合片段,也将指包括例如结合了此处披露的抗体的CDR的一个或多个支架(例如来自纤连蛋白或肌腱蛋白-3的纤连蛋白III结构域)的分子。参见,例如,美国专利公开号20150098955,特此通过引用以其全文结合。

[0257] 在一个实施例中,抗CD73抗体是指IgG1-TM形式的抗体,使得IgG1 Fc结构域包括突变L234、L235E以及P331,结合可溶的以及细胞表面展现的CD73,并且抑制CD73酶活性。图1A-1D提供了MEDI9447 VH和VL结构域的核苷酸和氨基酸序列。

[0258] 通过“CTLA4多肽”意指与GenBank登录号AAL07473.1具有至少85%氨基酸序列一致性的多肽或其具有T细胞抑制活性的片段。以下提供了AAL07473.1的序列:

[0259] CTLA4多肽序列[智人]

[0260] gi|15778586|gb|AAL07473.1|AF414120_1

[0261] MACLGQRHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIPVFCKAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEV
RVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPYYLGIGNG
TQIYVIDPEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPEPECEKQFQPYFIPIN

[0262] 通过“CTLA4核酸分子”意指编码CTLA4多肽的多核苷酸。以Genbank登录号AAL07473提供了一个示例性CTLA4核酸分子序列。

[0263] 通过“抗CTLA4抗体”意指选择性结合CTLA4多肽的抗体。示例性的抗CTLA4抗体描述于例如美国专利号6,682,736;7,109,003;7,123,281;7,411,057;7,824,679;8,143,379;7,807,797;和8,491,895中(其中,曲美木单抗是11.2.1),这些专利通过引用结合在此。曲美木单抗是示例性抗CTLA4抗体。在以下此处的序列表中提供了曲美木单抗序列(SEQ ID NO:130-137)。

[0264] 通过“PD-1多肽”意指与NCBI登录号NP_005009具有至少约85%氨基酸一致性并且具有PD-L1和/或PD-L2结合活性的多肽或其片段。以下提供了NP_005009的序列。

[0265] PD-1多肽序列

[0266] NCBI登录号NP_005009

```
mqipqapwpv vwavlqlgwr pgwfldspdr pwnpptfspa llvvtgedna tftcsfsnts  
esfvlnwurm spsnqtdkla afpedrsqpg qdcrfrvtql pngrdfhmsv vrarrndsgt  
[0267] ylcgaislap kaqikeslra elrvterrae vptahpspsp rpagqfqtlv vgvvggllgs  
lvllvwvlav icsraargti garrtgqplk edpsavpvfs vdygeldfqw rektpeppvp  
cvpeqteyat ivfpsgmgtS sparrgsadg prsaqplrpe dghcswpl
```

[0268] 通过“PD-1核酸分子”意指编码PD-1多肽的多核苷酸。以NCBI登录号NM_005018提供了一个示例性PD-1核酸分子序列。

[0269] 通过“抗PD-1抗体”意指选择性结合PD-1多肽的抗体或其抗原结合片段。示例性抗PD-1抗体包括例如派姆单抗(**KEYTRUDA®**,兰布罗利珠单抗,MK-3475)、纳武单抗(**OPDIVA®**,BMS-936558,MDX-1106,ONO-4538)、或AMP-224。

[0270] 通过“PD-L1多肽”意指与NCBI登录号NP_001254635具有至少约85%、95%或100%氨基酸一致性并且具有PD-1和CD80结合活性的多肽或其片段。以下提供了NP_001254635的序列。

[0271] PD-L1多肽序列

[0272] NCBI登录号NP_001254635

```
mrifavfifm tywhllnapy nkinqrilvv dpvtsehelt cqaegyphae viwtssdhqv  
[0273] lsgkttttns kreeklnvt stlrnttttn eifycfrl dpeenhtael vipelplahp  
pnerthlvil gaillclgva ltfifrlrkg rmmdvkkgci qdtnskkqsd thleet
```

[0274] 通过“PD-L1核酸分子”意指编码PD-L1多肽的多核苷酸。以NCBI登录号NM_001267706提供了一个示例性PD-L1核酸分子序列。

[0275] 通过“抗PD-L1抗体”意指选择性结合PD-L1多肽的抗体或其抗原结合片段。例如此处通过引用结合的US 20130034559/US 8779108以及US 20140356353中描述了示例性抗PD-L1抗体。MEDI4736是示例性PD-L1抗体。在以下此处的序列表中提供了MEDI4736的序列(SEQ ID NO:138-145)。

[0276] 术语“抗原结合片段”是指包括完整抗体的一部分的分子,并且特别是指包括完整抗体的抗原决定可变区的分子。本领域已知,抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段进行。抗体片段的实例包括但不限于Fab,Fab',F(ab')₂和Fv片段,线性抗体,单链抗体、和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0277] “单克隆抗体”是指涉及单一抗原决定簇或表位的高度特异性识别和结合的同源抗体群体。这与典型地包括针对不同抗原决定簇的不同抗体的多克隆抗体相反。

[0278] 术语“单克隆抗体”涵盖完整和全长单克隆抗体连同抗体片段(例如Fab,Fab',F(ab')₂,Fv),单链可变片段(scFv),包括抗体部分的融合蛋白、以及包括抗原识别位点的任何其他经修饰的免疫球蛋白分子。此外,“单克隆抗体”是指以任何数目的方式制备的此类抗体,这些方式包括但不限于通过杂交瘤,噬菌体选择,重组表达和转基因动物(例如,在转基因小鼠中表达人抗体)。

[0279] 术语“人源化抗体”是指衍生自非人(例如鼠)免疫球蛋白的抗体,其被工程化成包含最小的非人(例如鼠)序列。典型地,人源化抗体是人免疫球蛋白,其中来自CDR的残基被来自非人物种(例如,小鼠、大鼠、兔子或仓鼠)的CDR的具有所希望特异性、亲和性和能力的残基替代(琼斯(Jone)等人,1986,自然(Nature),321:522-525;里希曼(Riechmann)等人,1988,自然,332:323-327;费尔海恩(Verhoeyen)等人,1988,科学(Science),239:1534-1536)。在一些情况下,人免疫球蛋白的框架(FW)氨基酸残基被来自具有希望的特异性、和/或亲和力、和/或能力的非人物种的抗体中的相应残基替换。

[0280] 人源化抗体还可以通过取代Fv构架区中和/或替代的非人类残基内的额外残基来进一步修饰以便改善并优化抗体特异性、亲和性和/或能力。通常,人源化抗体将包含基本上所有至少一个(并且典型地两个或三个)可变结构域,该可变结构域包含对应于非人免疫球蛋白的所有或基本上所有CDR区,而所有或基本上所有FR区是人免疫球蛋白共有序列的那些。人源化抗体还可以包含免疫球蛋白恒定区或结构域(Fc)的至少一部分,典型地是人免疫球蛋白的恒定区或结构域。用于产生人源化抗体的方法的实例描述于美国专利号5,225,539或5,639,641中。

[0281] 抗体的“可变区”指单独的抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区或它们的组合。重链和轻链的可变区各自自由通过三个CDR区连接的四个FW区组成。每条链中的CDR通过FW区域紧密靠近在一起,并且与来自另一条链的CDR一起有助于抗体的抗原结合位点的形成。存在至少两种用于确定CDR的技术:(1)一种基于跨物种序列变异性的方法(即卡巴特(Kabat)等人,具有免疫学目的的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),(第5版,1991年,国立卫生研究院(National Institutes of Health),贝塞斯达,马里兰州));和(2)一种基于抗原-抗体复合物的晶体学研究的方法(奥拉瑞坎尼(A1-lazikani)等人(1997)分子生物学杂志(J.Molec.Biol.)273:927-948))。此外,这两种方法的组合有时在本领域中用于确定CDR。

[0282] 当提及可变结构域中的残基(大约轻链的残基1-107和重链的残基1-113)时,通常使用卡巴特(卡巴特)编号系统(例如,卡巴特等人,免疫学目的的序列(Sequences of Immunological Interest),第5版,公共卫生服务(Public Health Service),国立卫生研究院(National Institutes of Health),贝塞斯达,马里兰州(1991))。

[0283] 短语“卡巴特中的氨基酸位置编号”、“卡巴特位置”、及其语法变体是指在卡巴特

等人,免疫学目的的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第5版,公共卫生服务,国立卫生研究院,贝塞斯达,马里兰州(1991)中用于抗体的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用这个编号系统,实际的线性氨基酸序列可以包含更少或另外的氨基酸,其对应于可变结构域的FW或CDR的截短或插入。例如,重链可变结构域可以包括在H2的残基52之后的单个氨基酸插入(根据卡巴特的残基52a)和在重链FW残基82之后的插入残基(例如,根据卡巴特的残基82a、82b和82c等)。

[0284] 表1

环	卡巴特	AbM	乔西亚
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
(卡巴特编号)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
(乔西亚编号)			
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0286] 可以通过在抗体序列与“标准”卡巴特编号序列的同源性区域进行比对来确定给定抗体的残基的卡巴特编号。相反,乔西亚(Chothia)是指结构环的位置(乔西亚和莱斯克(Lesk),分子生物学杂志(J.Mol.Biol.) 196:901-917(1987))。当使用卡巴特编号惯例编号时,乔西亚CDR-H1环的末端根据环的长度在H32和H34之间变化(这是因为卡巴特编号方案将插入放置于H35A和H35B;如果35A和35B都不存在,则环在32处结束;如果仅存在35A,则环在33处结束;如果35A和35B都存在,则环在34处结束)。AbM高变区表示卡巴特CDR和乔西亚结构环之间的折衷,并且被牛津分子(Oxford Molecular)AbM抗体建模软件使用。

[0287] IMGT(免疫遗传学)也提供一种用于免疫球蛋白可变区(包括CDR)的编号系统。参见例如,勒弗朗, M.P. (Lefranc, M.P.) 等人,发育和比较免疫学(Dev.Comp.Immunol) 27:55-77(2003),该文献通过引用结合在此。IMGT编号系统是基于高变环的多于5,000个序列的比对、结构数据和表征,并且允许容易地比较所有物种的可变区和CDR区。根据IMGT编号方案,VH-CDR1是在位置26至35处,VH-CDR2是在位置51至57处,VH-CDR3是在位置93至102处,VL-CDR1是在位置27至32处,VL-CDR2是在位置50至52处,并且VL-CDR3是在位置89至97处。

[0288] EU索引或EU编号系统是基于测序的第一人IgG(EU抗体)的序列编号。因为对这个规定最常见的引用是卡巴特序列手册(卡巴特(Kabat)等人,1991),EU索引有时与卡巴特索引被错误地同义使用。EU索引不提供插入和缺失,并且因此在一些情况下,跨IgG亚类和种类的IgG位置的比较可以是清楚的,具体地在铰链区。尽管如此,在许多Fc结构功能研究中,该规定足以使Fc区之间能够直接比较。因此,在本说明书中针对Fc区域中的取代和插入使用的编号方案是如卡巴特中的EU索引。相比之下,在本说明书中针对可变区(VH和VL)使用

的编号方案是常规卡巴特编号。

[0289] 如贯穿本说明书使用的,所述的VH CDR序列对应于经典的卡巴特编号位置,即卡巴特VH-CDR1是在位置31-35,VH-CDR2是在位置50-65,并且VH-CDR3是在位置95-102。VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3也对应于经典的卡巴特编号位置,分别即位置24-34、50-56和89-97。

[0290] 如本文所用,Fc区包括包含排除第一恒定区免疫球蛋白结构域的抗体的恒定区的多肽。因此,Fc是指IgA、IgD、以及IgG的最后两个恒定区免疫球蛋白结构域、以及IgE和IgM的最后三个恒定区免疫球蛋白结构域、以及在这些结构域的N末端的柔性铰链。对于IgA和IgM,Fc可以包括J链。对于IgG,Fc包含免疫球蛋白结构域C伽马2和C伽马3(C γ 2和C γ 3)以及C伽马1(C γ 1)和C伽马2(C γ 2)之间的铰链。

[0291] 尽管Fc区的边界可以变化,但是人IgG重链Fc区通常被定义为包含其羧基末端的残基C226或P230,其中编号是根据卡巴特所述的EU索引(卡巴特等人,免疫学目的的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第5版,公共卫生服务,国立卫生研究院,贝塞斯达,马里兰州(1991))。Fc可以指分离的这个区域,或在抗体、抗体片段、或Fc融合蛋白的背景下的这个区域。已在多个不同Fc位置处观察到多态性,包括但不限于如由EU索引编号的位置270、272、312、315、356、以及358,并且因此所呈现的序列与现有技术序列之间可能存在略微的差异。

[0292] 术语“人抗体”是指由人产生的抗体或具有与使用本领域已知的任何技术制备的由人产生的抗体相对应的氨基酸序列的抗体(例如,培养细胞中的重组体表达,或转基因动物中的表达)。因此,术语人抗体也涵盖具有对应于人原始产生的抗体(或其工程化的变体或衍生物)的氨基酸序列但表达于非人系统(例如,通过化学合成产生的;在微生物、哺乳动物、或昆虫细胞中重组地表达;或在动物受试者中表达)的抗体。因此,从人类受试者或从人类细胞(例如,表达重组抗体或其片段的杂交瘤或细胞系)获得并且随后表达于动物(例如小鼠)的抗体被认为是人抗体。人抗体的这种定义包括完整或全长抗体,其片段和/或包含至少一个人重链和/或轻链多肽的抗体,例如包含鼠轻链和人重链多肽的抗体。

[0293] 术语“嵌合抗体”是指其中免疫球蛋白分子的氨基酸序列来自两种或更多种动物物种的抗体。典型地,轻链和重链的可变区对应于源自具有所需特异性、和/或亲和力和/或能力的一种哺乳动物(例如小鼠、大鼠、兔等)的抗体的可变区,而恒定区同源衍生自另一种物种(通常为人)的抗体中的序列,以避免在该物种中引起免疫应答。

[0294] 如此处使用的术语“表位”是指能够结合到此处披露的CD73抗体或CD73结合分子的抗原蛋白决定簇。表位通常由如氨基酸或糖侧链分子的化学活性表面基团组成,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。识别该表位的抗体或结合分子的部分被叫做互补位。蛋白抗原的表位被分成两个类别,构象表位和线性表位,基于其结构和与该互补位的相互作用。构象表位是由抗原的氨基酸序列的不连续段构成。这些表位与该互补位基于该抗原的3-D表面特征和形状或第三结构相互作用。相比之下,线性表位与该互补位基于其一级结构相互作用。线性表位是由来自该抗原的氨基酸的连续序列形成。

[0295] 术语“抗体结合位点”是指互补抗体特异性地结合的包括连续或不连续位点(即表位)的抗原(例如,CD73)中的一个区域。因此,该抗体结合位点可包含该抗原中该表位外的另外区域,并且所述另外区域可确定诸如结合亲和性和/或稳定性的特性或影响诸如抗原

酶活性或二聚作用的特性。因此,即使两种抗体结合到一种抗原内的相同表位,如果该抗体分子建立与该表位外的氨基酸的不同分子间接触,此类抗体被认为结合到不同抗体结合位点。

[0296] “结合亲和力”通常是指分子(例如抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另有说明,如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对(例如抗体和抗原)的成员之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以由解离常数(K_D)表示。亲和力可以通过本领域已知的常规方法测量,包括本文所述的那些。低亲和力抗体通常缓慢地结合抗原并且倾向于容易解离,而高亲和力抗体通常更快地结合抗原并且倾向于更长地保持结合。测量结合亲和力的多种方法是本领域已知的,其中任何一种都可用于本公开的目的。

[0297] 除非另外说明,否则“效力”通常表达为以nM计的 IC_{50} 值。 IC_{50} 是抗原结合分子的抑制浓度中值。在功能性测定中, IC_{50} 是减少生物响应达其最大值的50%的浓度。在配体结合研究中, IC_{50} 是减少受体结合达最大特异性结合水平的50%的浓度。 IC_{50} 可以通过本领域已知的任何数目的手段来计算。效力上的改善可以通过测量确定,例如,针对亲本抗体(例如,种系化之前的亲本抗体或亲和力优化之前的亲本抗体)。

[0298] 与亲本抗体相比,针对本披露的抗体或多肽的效力改善倍数可以是至少约2倍、至少约4倍、至少约6倍、至少约8倍、至少约10倍、至少约15倍、至少约20倍、至少约25倍、至少约30倍、至少约40倍、至少约50倍、至少约60倍、至少约70倍、至少约80倍、至少约90倍、至少约100倍、至少约110倍、至少约120倍、至少约130倍、至少约140倍、至少约150倍、至少约160倍、至少约170倍、或至少约180倍或更多。

[0299] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是指一种细胞毒性形式,其中结合至存在于某些细胞毒性细胞(例如,天然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞、以及巨噬细胞)上的Fc受体(FcR)上的分泌的免疫球蛋白使得这些细胞毒性效应细胞能够特异性地结合至带有抗原的靶细胞并且随后用细胞毒素杀伤该靶细胞。针对靶细胞表面的特异性高亲和力IgG抗体“武装”细胞毒性细胞并且绝对是这种杀伤所需要的。靶细胞的裂解是细胞外的,要求直接的细胞与细胞接触,并且不涉及补体。可以预期的是,除抗体之外,包含Fc区(确切地是Fc融合蛋白)的、具有特异性地结合带有抗原的靶细胞能力的其他蛋白质将能够影响细胞介导的细胞毒性。为了简单起见,由Fc融合蛋白的活性产生的细胞介导的细胞毒性在此也称为ADCC活性。

[0300] “分离的”多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是呈自然界中未发现形式的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物。分离的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物包括已经被纯化至它们不再呈自然界中发现形式的程度的那些。在一些方面中,分离的抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是基本上纯的。

[0301] 术语“受试者”是指有待成为特定治疗的接受者的任何动物(例如,哺乳动物),包括但不限于人类、非人类灵长动物、啮齿类等。典型地,术语“受试者”和“患者”在此关于人类受试者可互换地使用。

[0302] 术语“药用组合物”是指一种呈关于允许活性成分(例如,在此披露的抗CD73结合分子)的生物活性有效的这种形式的制剂,以及不包含对于该组合物将给予的受试者而言具有不可接受毒性的额外组分的制剂。这样的组合物可以是无菌的。

[0303] 如在此披露的,抗CD73结合分子的“有效量”是足以实施具体阐述目的的量。关于阐述的目的,“有效量”可以经验为主地并且以常规方式来确定。

[0304] 术语“治疗有效量”是指在此披露的抗CD73结合分子或其他药物足以“治疗”受试者或哺乳动物的疾病或障碍的量。

[0305] 当用在此处时词语“标记”是指直接或间接融合(例如,基因融合)或轭合(例如,化学轭合)到此处披露的抗CD73结合分子的可检测化合物或组合物以产生“标记的”抗CD73结合分子。该标记可以是本身可检测的(例如,放射性同位素标记或荧光标记),或在酶标记的情况下可以催化可检测底物化合物或组合物的化学改变。

[0306] 术语诸如“可衍生的基团”和“可衍生的官能团”是可互换使用的,并且是指能够反应以许可此处披露的抗CD73结合分子(例如,CD73抗体)和另一种物质之间的共价键形成的官能团。在一些方面,此类物质是治疗剂(例如,细胞毒素)、可检测标记、聚合物(例如,PEG)等。示例性可衍生的基团包括巯基、羟基、氨基、羧基、以及酰胺,连同其修饰形式诸如活化或受保护形式。

[0307] 术语如“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”或“治疗(totreat)”或“减轻(alleviating)”或“减轻(alleviate)”是指(1)使得诊断的病理性病症或障碍的治愈、减缓、减轻症状、和/或停止进展的治疗措施以及(2)防止和/或减缓所靶向的病理学病症或障碍的发展的预防性或防止性措施。因此,需要治疗的那些包括已具有障碍的那些;倾向于具有以下障碍的那些;以及在它们中需要预防障碍的那些。在某些方面,如果患者显示例如,总的、部分的、或瞬时的某一类型的癌症的缓解,则根据本披露的这些方法针对癌症成功地“治疗”了该受试者。

[0308] 术语“癌症”、“肿瘤”、“癌性”、和“恶性”指或描述在哺乳动物中典型地是特征为不受控制的细胞生长的生理病症。癌症的实例包括但不限于上皮癌,包括腺癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、黑素瘤、肉瘤、和白血病。此类癌症的更具体的实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胃肠癌、何杰金氏淋巴瘤和非何杰金氏淋巴瘤、胰腺癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌(诸如肝癌和肝细胞瘤)、膀胱癌、乳腺癌(包括激素介导的乳腺癌,参见例如,英尼斯(Innes)等人(2006)英国癌症杂志(Br.J.Cancer) 94:1057-1065)、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、骨髓瘤(诸如多发性骨髓瘤)、唾液腺癌、肾癌(诸如肾细胞癌和维尔姆斯氏瘤)、基底细胞癌、黑色素瘤、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、睾丸癌、食道癌、各种类型的头颈癌以及粘液性起源的癌症(诸如粘液性卵巢癌)、胆管癌(肝)以及肾乳头状癌。在一些方面,如此处使用的术语癌症特别是指表达CD73的癌症。在一些特定方面,术语癌症是指表达低水平的CD73的癌症。在一些方面,如此处使用的术语癌症特别是指表达CD73的癌症(例如,结肠癌、乳腺癌、淋巴瘤、非小细胞癌)。

[0309] 如在此可互换使用的“多核苷酸”或“核酸”是指具有任何长度的核苷酸聚合物,并且包括DNA和RNA。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基,和/或它们的类似物,或可以通过DNA或RNA聚合酶并入聚合物的任何底物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,诸如甲基化核苷酸和它们的类似物。前述说明适用于在此提及的所有多核苷酸,包括RNA和DNA。

[0310] 术语“载体”意指一种构建体,该构建体能够在宿主细胞中递送一个或多个感兴趣的基因或序列并且在一些方面中,能够表达这些基因或序列。载体的实例包括但不限于病

毒载体、裸DNA或RNA表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子缩合剂缔合的DNA或RNA表达载体、包封在脂质体中的DNA或RNA表达载体,以及某些真核细胞(诸如生产细胞)。

[0311] 在此可互换使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”是指具有任何长度的氨基酸聚合物。该聚合物可以是线性或支化的,它可以包含修饰的氨基酸,并且它可以被非氨基酸中断。这些术语还包括已被天然修饰或通过干预修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其他操作或修饰,诸如与标记组分轭合。该定义中还包包括,例如,含有一种或多种氨基酸类似物(包括例如,非天然氨基酸等)以及本领域已知的其他修饰的多肽。应当理解,由于本披露的多肽是基于抗体的,因此在某些方面中,这些多肽可以作为单链或相关链出现。

[0312] “重组”多肽或蛋白质是指经由重组DNA技术产生的多肽或蛋白质。如同已经通过任何合适的技术分离、分馏或部分纯化或基本上纯化的天然或重组多肽一样,在工程化宿主细胞中表达的重组产生的多肽和蛋白质也被视为是分离的。在此披露的多肽可以是使用本领域已知的方法重组产生。可替代地,在此披露的蛋白质和肽可以是化学合成的。

[0313] 术语“氨基酸取代”是指用另一个氨基酸残基替代存在于亲本序列中的一个氨基酸残基。亲本序列中的氨基酸可以是例如经由化学肽合成或通过本领域已知的重组方法来取代。因此,提及“在位置X处取代”或“在位置X处取代”是指用替代性氨基酸残基取代存在于位置X处的氨基酸。在一些方面,取代类型可以根据模式AXY描述,其中A是对应于天然存在于位置X处的氨基酸的单个字母代码,并且Y是取代氨基酸残基。在其他方面,取代类型可以根据模式XY描述,其中Y是对应于取代天然存在于位置X处的氨基酸的氨基酸残基的单个字母代码。

[0314] 一种“保守的氨基酸替换”是其中用一种具有相似侧链的氨基酸残基替换该氨基酸残基的替换。具有类似侧链的氨基酸残基的家族已在现有技术中定义,所述侧链包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)及芳族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,如果多肽中的氨基酸被来自相同侧链家族的另一个氨基酸替代,该取代被认为是保守性的。在另一个方面,氨基酸串可以被保守地替代为在侧链家族成员的顺序和/或组成上不同的结构上相似的串。

[0315] 非保守性取代包括如下那些,其中(i)具有阳电性侧链的残基(例如,Arg、His或Lys)取代为或被阴电性残基(例如,Glu或Asp)取代,(ii)亲水残基(例如,Ser或Thr)取代为或被疏水的残基(例如,Ala、Leu、Ile、Phe或Val)取代,(iii)半胱氨酸或脯氨酸取代为或被任何其他残基取代,或(iv)具有大的疏水或芳香族侧链的残基(例如,Val、His、Ile或Trp)取代为或被具有更小的侧链的一种(例如,Ala、Ser)取代或无侧链(例如,Gly)。

[0316] 本领域普通技术人员可以容易地鉴定其他取代。例如,对于氨基酸丙氨酸,取代可以从D-丙氨酸、甘氨酸、β-丙氨酸、L-半胱氨酸以及D-半胱氨酸中任一项进行。针对赖氨酸,替代可以是D-赖氨酸、精氨酸、D-精氨酸、高精氨酸、甲硫氨酸、D-甲硫氨酸、鸟氨酸、或D-鸟氨酸中任一项。通常,可以预期诱导分离的多肽的特性上的改变的在功能上重要的区域中的取代是如下那些,其中(i)极性残基例如丝氨酸或苏氨酸取代为疏水残基例如亮氨酸、异

亮氨酸、苯丙氨酸、或丙氨酸(或被其取代);(ii)半胱氨酸残基取代为任何其他残基(或被其取代);(iii)具有阳电性侧链的残基例如赖氨酸、精氨酸或组氨酸取代为具有阴电性侧链的残基例如谷氨酸或天冬氨酸(或被其取代);或(iv)具有大的侧链的残基例如苯丙氨酸取代为不具有这样的侧链的一种例如甘氨酸(或被其取代)。前述的非保守性取代中之一可改变该蛋白的功能特性的可能性也与关于该蛋白的功能重要区的取代位置相关:一些非保守性取代因此可对生物特性具很少或没有影响。

[0317] 术语“氨基酸插入”是指在存在于亲本序列中的两个氨基酸残基之间引入一个新的氨基酸残基。一个氨基酸可以例如经由化学肽合成或通过本领域已知的重组方法来插入在亲本序列之中。因此如在此所用,短语“在位置X和Y之间的插入”或“在卡巴特位置X和Y之间的插入”(其中X和Y对应于氨基酸位置(例如,在位置239与240之间的半胱氨酸氨基酸插入))是指在X与Y位置之间的氨基酸插入,并且还是指在编码位置X和Y处氨基酸的密码子之间的编码氨基酸的密码子的核酸序列中的插入。插入类型可以根据模式AXin描述,其中A是对应于被插入的氨基酸的单个字母代码,并且X是该插入之间的位置。

[0318] 术语两个多肽或多核苷酸序列之间的“序列一致性百分比”是指考虑到为了最佳比对两个序列而必须引入的添加或缺失(即,空隙),在比较窗口上由这些序列共用的相同匹配位置的数目。匹配位置是其中相同核苷酸或氨基酸呈现在靶标序列与参考序列两者中的任何位置。呈现在靶标序列中的空隙未计数,因为空隙并非核苷酸或氨基酸。同样地,呈现在参考序列中的空隙未计数,因为对靶标序列核苷酸或氨基酸进行计数,而不对来自参考序列的核苷酸或氨基酸进行计数。

[0319] 序列一致性百分比的计算是通过确定相同氨基酸残基或核酸碱基出现在两个序列中的位置的数目以便产生匹配位置数目,将匹配位置数目除以比较窗口中的位置总数并且将结果乘以100,从而产生序列一致性百分比。序列的比较和两个序列之间的序列一致性百分比的确定可以使用供在线使用与下载两者的易于得到的软件来完成。合适的软件程序可从不同来源获得,并且用于比对蛋白质与核苷酸序列。用于确定序列一致性百分比的一种合适程序是bl2seq,该程序是可从美国政府的国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)BLAST网站(blast.ncbi.nlm.nih.gov)获得的BLAST程序套件的一部分。Bl2seq使用BLASTN或BLASTP算法在两个序列之间执行比较。BLASTN用于比较核酸序列,而BLASTP用于比较氨基酸序列。其他合适程序是例如Needle、Stretcher、Water或Matcher,它们是EMBOSS生物信息学程序套件的一部分并且也可在www.ebi.ac.uk/Tools/psa上从欧洲生物信息学研究所(European Bioinformatics Institute;EBI)获得。

[0320] 与多核苷酸或多肽参考序列比对的单一多核苷酸或多肽靶标序列内的不同区域可各自具有其本身的序列一致性百分比。应指出的是序列一致性百分比值被四舍五入至最近的十分位。例如,80.11、80.12、80.13以及80.14向下舍入至80.1,而80.15、80.16、80.17、80.18以及80.19向上舍入至80.2。还应指出长度值将总是整数。

[0321] 在某些方面,第一氨基酸序列与第二序列氨基酸的一致性百分比“X”计算为 $100 \times (Y/Z)$,其中Y是氨基酸残基数目,计分为比对该第一和第二序列时的一致匹配数(如通过目检或具体序列比对程序比对的),并且Z是该第二序列中的残基的总数目。如果第一序列的长度比第二序列长,该第一序列与该第二序列的一致性百分比将高于该第二序列与该第一序列的一致性百分比。

[0322] 本领域技术人员应了解用于计算序列一致性百分比的序列比对的产生不局限于完全由基本序列数据驱动的二元序列-序列比较。序列比对可来自多重序列比对。产生多重序列比对的一种合适程序是可从www.clustal.org获得的ClustalW2。另一种合适程序是可从www.drive5.com/muscle/获得的MUSCLE。ClustalW2和MUSCLE可替代地从例如EBI获得。

[0323] 还应理解序列比对可以通过将序列数据与来自异类来源的数据如结构数据(例如,结晶学蛋白质结构)、功能数据(例如,突变位置)或系统发生数据集来产生。将异类数据集集成以便产生多重序列比对的合适程序是T-Coffee,它可从www.tcoffee.org获得,并且替代地可从例如EBI获得。还应理解用于计算序列一致性百分比的最终比对可以自动或手动地管理(curated)。

[0324] 如此处使用的术语关于轻链(VL)和重链(VH)可变区的“共有序列”是指复合的或通用化VL或VH序列,基于该VL或VH链内的氨基酸残基能够经受修饰而不损害抗原结合的信息定义。因此,在VL或VH链的“共有序列”中,某些氨基酸位置被那个位置处的多个可能氨基酸残基中的一个占用。例如,如果精氨酸(R)或丝氨酸(S)在具体位置发生,则该共有序列内的具体位置可以是精氨酸或丝氨酸(R或S)。VH和VL链的共有序列可以例如通过以下方式定义:体外亲和力成熟(例如,使用简并的编码引物随机化某个CDR中的每个氨基酸位置),抗体CDR内的氨基酸残基的扫描诱变(例如,丙氨酸扫描诱变)或本领域已知的任何其他方法,随后评价这些突变体与该抗原的结合以确定突变的氨基酸位置是否影响抗原结合。在一些方面,突变被引入CDR区。在其他方面,在框架区引入突变。在一些其他方面,在CDR和框架区引入突变。

[0325] II.CD73结合分子

[0326] 本披露提供特异性地结合CD73(例如人CD73)的CD73结合分子例如抗体和其抗原结合片段。CD73的全长氨基酸(aa)和核苷酸(nt)序列是本领域已知的(参见,例如针对人CD73的UniProt登录号P21589、或针对小鼠CD73的UniProt登录号Q61503)。在一些方面,该抗CD73结合分子是人抗体(例如克隆10.3抗体,克隆2C5抗体,MEDI9447)。在某些方面,该CD73结合分子是抗体或其抗原结合片段。

[0327] 在一些方面,CD73结合分子例如抗体或其抗原结合片段包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、单链Fv或scFv、双硫化物连接的Fv、V-NAR结构域、IgNar、内抗体、IgG CH2、迷你抗体、F(ab')₃、四体抗体、三体抗体、双体抗体、单一结构域抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb²、(scFv)₂、或scFv-Fc。在一些方面,该抗体属于IgG类型,例如属于IgG1类型。

[0328] 在一些方面,该抗CD73抗体(例如,MEDI9447,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段包括重链恒定区或其片段。在一些特定方面,该重链恒定区是IgG恒定区。该IgG恒定区可包括选自下组的轻链恒定区,该组由以下各项组成:κ恒定区和λ恒定区。

[0329] 在某些方面,与亲本抗体例如CD730010抗体或CD730002抗体相比,此处披露的抗CD73抗体或其抗原结合片段被修饰。在一些方面,该亲本抗体是CD730010。在其他方面,该亲本抗体是CD730002。在其他方面,该亲本抗体是CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069。相比于亲本抗体例如CD730010或CD730002,这些修饰可包括CDR区域和/或FW区域中的突变。

[0330] 短语“CD730002抗体”是指包含包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列的两个VL结构域以及包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列的两个VH结构域的IgG1。

[0331] 短语“CD730004抗体”是指包含包括SEQ ID NO:104的氨基酸序列的两个VL结构域以及包括SEQ ID NO:103的氨基酸序列的两个VH结构域的IgG1。

[0332] 短语“CD730008抗体”是指包含包括SEQ ID NO:106的氨基酸序列的两个VL结构域以及包括SEQ ID NO:107的氨基酸序列的两个VH结构域的IgG1。

[0333] 短语“CD730010抗体”是指包含包括SEQ ID NO:3的氨基酸序列的两个VL结构域以及包括SEQ ID NO:4的氨基酸序列的两个VH结构域的IgG1。

[0334] 短语“CD730011抗体”是指包含包括SEQ ID NO:5的氨基酸序列的两个VL结构域以及包括SEQ ID NO:6的氨基酸序列的两个VH结构域的IgG1。

[0335] 短语“CD730021抗体”是指包含包括SEQ ID NO:7的氨基酸序列的两个VL结构域以及包括SEQ ID NO:8的氨基酸序列的两个VH结构域的IgG1。

[0336] 短语“CD730042抗体”是指包含包括SEQ ID NO:9的氨基酸序列的两个VL结构域以及包括SEQ ID NO:10的氨基酸序列的两个VH结构域的IgG1。

[0337] 短语“CD730046抗体”是指包含包括SEQ ID NO:11的氨基酸序列的两个VL结构域以及包括SEQ ID NO:12的氨基酸序列的两个VH结构域的IgG1。

[0338] 短语“CD730047抗体”是指包含包括SEQ ID NO:13的氨基酸序列的两个VL结构域以及包括SEQ ID NO:14的氨基酸序列的两个VH结构域的IgG1。

[0339] 短语“CD730068抗体”是指包含包括SEQ ID NO:108的氨基酸序列的两个VL结构域以及包括SEQ ID NO:107的氨基酸序列的两个VH结构域的IgG1。

[0340] 短语“CD730069抗体”是指包含包括SEQ ID NO:110的氨基酸序列的两个VL结构域以及包括SEQ ID NO:109的氨基酸序列的两个VH结构域的IgG1。

[0341] (i) CD730010衍生的抗CD73抗体

[0342] 在某些方面,本披露的抗CD73抗体包括对CD730010抗体的轻链的CDR1和/或CDR2和/或CDR3的修饰,包括但不限于:

[0343] 1) 包括共有序列SGSLSNIGRN_{X1}VN的轻链CDR1,其中_{X1}表示氨基酸残基脯氨酸(P)、谷氨酸(E)或天冬氨酸(D);和/或

[0344] 2) 包括共有序列LX₂NX₃RX₄X₅的轻链CDR2,其中_{X2}表示氨基酸残基天冬酰胺(N)或天冬氨酸(D),_{X3}表示氨基酸残基谷氨酰胺(Q)或亮氨酸(L),_{X4}表示氨基酸残基亮氨酸(L)或脯氨酸(P),并且_{X5}表示氨基酸残基甘氨酸(G)或丝氨酸(S);和/或

[0345] 3) 包括共有序列ATWDDSX₆X₇GWX₈的轻链CDR3,其中_{X6}表示氨基酸残基亮氨酸(L)或组氨酸(H),_{X7}表示氨基酸残基赖氨酸(K)、脯氨酸(P)、异亮氨酸(I)或天冬酰胺(N),并且_{X8}表示氨基酸残基亮氨酸(L)或苏氨酸(T)。

[0346] 在某些方面,本披露的抗CD73抗体包括对CD730010抗体的重链的CDR1和/或CDR2和/或CDR3的修饰,包括但不限于:

[0347] 1) 包括共有序列SYAX₉S的重链CDR1,其中_{X9}表示氨基酸残基甲硫氨酸(M)或酪氨酸(Y);和/或

[0348] 2) 包括共有序列X₁₀IX₁₁GSX₁₂GX₁₃TYADSVKG的重链CDR2,其中_{X10}表示氨基酸残基亮氨酸(L)或丙氨酸(A),_{X11}表示氨基酸残基色氨酸(W)或丝氨酸(S),_{X12}表示氨基酸残基色氨酸(W)或甘氨酸(G),并且_{X13}表示氨基酸残基丝氨酸(S)或精氨酸(R);和/或

[0349] 3) 包括共有序列LGYX₁₄X₁₅X₁₆DX₁₇的重链CDR3,其中_{X14}表示氨基酸残基甘氨酸(G)

或丝氨酸(S),X₁₅表示氨基酸残基精氨酸(R)或苏氨酸(T),X₁₆表示氨基酸残基缬氨酸(V)或异亮氨酸(I),并且X₁₇表示氨基酸残基酪氨酸(Y)、赖氨酸(K)、甲硫氨酸(M)、亮氨酸(L)或谷氨酸(E)。

[0350] 在一个方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括VL区,该VL区包括共有氨基酸序列:

[0351] [FW₁]SGSLSNIGRNX₁VN[FW₂]LX₂NX₃RX₄X₅[FW₃]ATWDDSX₆X₇GWX₈[FW₄]

[0352] 其中[FW₁]、[FW₂]、[FW₃]和[FW₄]分别表示VL框架区1(SEQ ID NO:25或26)、VL框架区2(SEQ ID NO:27或28)、VL框架区3(SEQ ID NO:29)和VL框架区4(SEQ ID NO:30)的氨基酸残基,并且其中

[0353] X₁表示氨基酸残基脯氨酸(P)、谷氨酸(E)或天冬氨酸(D);

[0354] X₂表示氨基酸残基天冬酰胺(N)或天冬氨酸(D);

[0355] X₃表示氨基酸残基谷氨酰胺(Q)或亮氨酸(L);

[0356] X₄表示氨基酸残基亮氨酸(L)或脯氨酸(P);

[0357] X₅表示氨基酸残基甘氨酸(G)或丝氨酸(S);

[0358] X₆表示氨基酸残基亮氨酸(L)或组氨酸(H);

[0359] X₇表示氨基酸残基赖氨酸(K)、脯氨酸(P)、异亮氨酸(I)或天冬酰胺(N);并且

[0360] X₈表示氨基酸残基亮氨酸(L)或苏氨酸(T)。

[0361] 在一个方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括VH区,该VH区包括共有氨基酸序列:

[0362] [FW₅]SYAX₉S[FW₆]X₁₀IX₁₁GSX₁₂GX₁₃TYIYADSVKG[FW₇]LGYX₁₄X₁₅X₁₆DX₁₇[FW₈]

[0363] 其中[FW₅]、[FW₆]、[FW₇]和[FW₈]分别表示VH框架区1(SEQ ID NO:31)、VH框架区2(SEQ ID NO:32)、VH框架区3(SEQ ID NO:33)和VH框架区4(SEQ ID NO:34)的氨基酸残基,并且其中

[0364] X₉表示氨基酸残基甲硫氨酸(M)或酪氨酸(Y);

[0365] X₁₀表示氨基酸残基亮氨酸(L)或丙氨酸(A);

[0366] X₁₁表示氨基酸残基色氨酸(W)或丝氨酸(S);

[0367] X₁₂表示氨基酸残基色氨酸(W)或甘氨酸(G);

[0368] X₁₃表示氨基酸残基丝氨酸(S)或精氨酸(R);

[0369] X₁₄表示氨基酸残基甘氨酸(G)或丝氨酸(S);

[0370] X₁₅表示氨基酸残基精氨酸(R)或苏氨酸(T);

[0371] X₁₆表示氨基酸残基缬氨酸(V)或异亮氨酸(I)

[0372] X₁₇表示氨基酸残基酪氨酸(Y)、赖氨酸(K)、甲硫氨酸(M)、亮氨酸(L)或谷氨酸(E)。

[0373] 在一个方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括VL区,该VL区包括共有氨基酸序列:

[0374] [FW₁]SGSLSNIGRNX₁VN[FW₂]LX₂NX₃RX₄X₅[FW₃]ATWDDSX₆X₇GWX₈[FW₄]

[0375] 其中[FW₁]、[FW₂]、[FW₃]和[FW₄]分别表示VL框架区1(SEQ ID NO:25或26)、VL框架区2(SEQ ID NO:27或28)、VL框架区3(SEQ ID NO:29)和VL框架区4(SEQ ID NO:30)的氨基酸残基,并且其中

[0376] X₁表示氨基酸残基脯氨酸(P)、谷氨酸(E)或天冬氨酸(D);

- [0377] X₂表示氨基酸残基天冬酰胺(N)或天冬氨酸(D)；
- [0378] X₃表示氨基酸残基谷氨酰胺(Q)或亮氨酸(L)；
- [0379] X₄表示氨基酸残基亮氨酸(L)或脯氨酸(P)；
- [0380] X₅表示氨基酸残基甘氨酸(G)或丝氨酸(S)；
- [0381] X₆表示氨基酸残基亮氨酸(L)或组氨酸(H)；
- [0382] X₇表示氨基酸残基赖氨酸(K)、脯氨酸(P)、异亮氨酸(I)或天冬酰胺(N)；并且
- [0383] X₈表示氨基酸残基亮氨酸(L)或苏氨酸(T)；
- [0384] 并且其中该抗CD73抗体或其抗原结合片段另外包括VH区，该VH区包括共有氨基酸序列：
- [0385] [FW₅]SYAX₉S[FW₆]X₁₀IX₁₁GSX₁₂GX₁₃TYYADSVKG[FW₇]LGYX₁₄X₁₅X₁₆DX₁₇[FW₈]
- [0386] 其中[FW₅]、[FW₆]、[FW₇]和[FW₈]分别表示VH框架区1(SEQ ID NO:31)、VH框架区2(SEQ ID NO:32)、VH框架区3(SEQ ID NO:33)和VH框架区4(SEQ ID NO:34)的氨基酸残基，并且其中
- [0387] X₉表示氨基酸残基甲硫氨酸(M)或酪氨酸(Y)；
- [0388] X₁₀表示氨基酸残基亮氨酸(L)或丙氨酸(A)；
- [0389] X₁₁表示氨基酸残基色氨酸(W)或丝氨酸(S)；
- [0390] X₁₂表示氨基酸残基色氨酸(W)或甘氨酸(G)；
- [0391] X₁₃表示氨基酸残基丝氨酸(S)或精氨酸(R)；
- [0392] X₁₄表示氨基酸残基甘氨酸(G)或丝氨酸(S)；
- [0393] X₁₅表示氨基酸残基精氨酸(R)或苏氨酸(T)；
- [0394] X₁₆表示氨基酸残基缬氨酸(V)或异亮氨酸(I)
- [0395] X₁₇表示氨基酸残基酪氨酸(Y)、赖氨酸(K)、甲硫氨酸(M)、亮氨酸(L)或谷氨酸(E)。
- [0396] 在一些方面，该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由选自下组的序列组成的VL-CDR1，该组由以下各项组成：SEQ ID NO:46、47和48。在一些方面，该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括如下VL-CDR1，该VL-CDR1包括选自下组的序列，该组由以下各项组成：SEQ ID NO:46、47以及48。
- [0397] 在一些方面，该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由选自下组的序列组成的VL-CDR2，该组由以下各项组成：SEQ ID NO:49、50、51和52。在一些方面，该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括如下VL-CDR2，该VL-CDR2包括选自下组的序列，该组由以下各项组成：SEQ ID NO:49、50、51以及52。
- [0398] 在一些方面，该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由选自下组的序列组成的VL-CDR3，该组由以下各项组成：SEQ ID NO:53、54、55和56。在一些方面，该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括如下VL-CDR3，该VL-CDR3包括选自下组的序列，该组由以下各项组成：SEQ ID NO:53、54、55以及56。
- [0399] 在一些方面，该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由选自下组的序列组成的VH-CDR1，该组由以下各项组成：SEQ ID NO:35和36。在一些方面，该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括如下VH-CDR1，该VH-CDR1包括选自下组的序列，该组由以下各项组成：SEQ ID NO:35和36。
- [0400] 在一些方面，该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由选自下组的序列组成的VH-

CDR2,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:37、38、39和40。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括如下VH-CDR2,该VH-CDR2包括选自下组的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:37、38、39以及40。

[0401] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由选自下组的序列组成的VH-CDR3,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:41、42、43、44和45。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括如下VH-CDR3,该VH-CDR3包括选自下组的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:41、42、43、44以及45。

[0402] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由选自下组的序列组成的VL-CDR1,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:46、47和48,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括如下VL-CDR1,该VL-CDR1包括选自下组的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:46、47以及48,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。

[0403] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由选自下组的序列组成的VL-CDR2,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:49、50、51和52,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括如下VL-CDR2,该VL-CDR2包括选自下组的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:49、50、51以及52,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。

[0404] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由选自下组的序列组成的VL-CDR3,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:53、54、55和56,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括如下VL-CDR3,该VL-CDR3包括选自下组的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:53、54、55以及56,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。

[0405] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由选自下组的序列组成的VH-CDR1,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:35和36,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括如下VH-CDR1,该VH-CDR1包括选自下组的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:35和36,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。

[0406] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由选自下组的序列组成的VH-CDR2,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:37、38、39和40,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括如下VH-CDR2,该VH-CDR2包括选自下组的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:37、38、39以及40,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。

[0407] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由选自下组的序列组成的VH-CDR3,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:41、42、43、44和45,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括如下VH-CDR3,该VH-CDR3包括选自下组的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:41、42、43、44以及45,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。

[0408] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由选自下组的序列组成的VL-CDR1,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:46、47和48;由选自下组的序列组成的VL-CDR2,该

组由以下各项组成:SEQ ID NO:49、50、51以及52;以及由选自下组的序列组成的VL-CDR3,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:53、54、55以及56。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括如下VL-CDR1,该VL-CDR1包括选自下组的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:46、47以及48;包括选自下组的序列的VL-CDR2,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:49、50、51以及52;以及包括选自下组的序列的VL-CDR3,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:53、54、55以及56。

[0409] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由选自下组的序列组成的VH-CDR1,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:35和36;由选自下组的序列组成的VH-CDR2,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:37、38、39以及40;以及由选自下组的序列组成的VH-CDR3,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:41、42、43、44以及45。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括如下VH-CDR1,该VH-CDR1包括选自下组的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:35和36;包括选自下组的序列的VH-CDR2,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:37、38、39以及40;包括选自下组的序列的VH-CDR3,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:41、42、43、44以及45。

[0410] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由选自下组的序列组成的VL-CDR1,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:46、47和48,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;由选自下组的序列组成的VL-CDR2,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:49、50、51和52,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;以及由选自下组的序列组成的VL-CDR3,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:53、54、55和56,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。

[0411] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括如下VL-CDR1,该VL-CDR1包括选自下组的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:46、47以及48,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;包括选自下组的序列的VL-CDR2,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:49、50、51以及52,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;以及包括选自下组的序列的VL-CDR3,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:53、54、55以及56,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。

[0412] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由选自下组的序列组成的VH-CDR1,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:35和36,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;由选自下组的序列组成的VH-CDR2,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:37、38、39和40,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;以及由选自下组的序列组成的VH-CDR3,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:41、42、43、44和45,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。

[0413] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括如下VH-CDR1,该VH-CDR1包括选自下组的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:35和36,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;包括选自下组的序列的VH-CDR2,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:37、38、39以及40,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;包括选自下组的序列的VH-CDR3,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:41、42、43、44以及45,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。

[0414] 在某些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括对重链和/或轻链的CDR1和/或

CDR2和/或CDR3的修饰,并且进一步包括对重链和/或轻链的FW1和/或FW2和/或FW3和/或FW4的修饰。

[0415] 在一些方面,FW₁包括SEQ ID NO:25或26,FW₂包括SEQ ID NO:27或28,FW₃包括SEQ ID NO:29,FW₄包括SEQ ID NO:30,FW₅包括SEQ ID NO:31,FW₆包括SEQ ID NO:32,FW₇包括SEQ ID NO:33,并且FW₈包括SEQ ID NO:34。

[0416] 在一些方面,FW₁包括SEQ ID NO:25或26,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;FW₂包括SEQ ID NO:27或28,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;FW₃包括SEQ ID NO:29,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;FW₄包括SEQ ID NO:30,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;FW₅包括SEQ ID NO:31,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;FW₆包括SEQ ID NO:32,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;FW₇包括SEQ ID NO:33,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;并且FW₈包括SEQ ID NO:34。

[0417] 在某些方面,该抗CD733抗体或其抗原结合片段包括VL和VH,该VL和VH包括一致或除了一个或多个CDR中的一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外一致的VL-CDR1、VL-CRD2、VL-CDR3、VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3氨基酸序列,其中此类VL-CDR1、VL-CRD2、VL-CDR3、VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别是:

[0418] SEQ ID NO:46、49、53、35、37和41;或

[0419] SEQ ID NO:47、49、53、35、37和41;或

[0420] SEQ ID NO:47、49、54、36、37和42;或

[0421] SEQ ID NO:46、50、54、36、38和43;或

[0422] SEQ ID NO:46、51、55、36、39和44;或

[0423] SEQ ID NO:48、52、54、36、40和44;或

[0424] SEQ ID NO:46、49、56、35、37和41;或

[0425] SEQ ID NO:46、49、53、35、37和45;或

[0426] SEQ ID NO:47、49、56、36、37和45;或

[0427] SEQ ID NO:46、50、56、36、38和45;或

[0428] SEQ ID NO:46、51、56、36、39和45;或

[0429] SEQ ID NO:48、52、56、36、40和45;或

[0430] SEQ ID NO:46、49、56、35、37和45。

[0431] 在某些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括抗体VL和抗体VH,其中该VL包括与选自下组的参考氨基酸序列至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、或约100%一致的氨基酸序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69和SEQ ID NO:70。

[0432] 在其他方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括抗体VL和抗体VH,其中该VH包括与选自下组的参考氨基酸序列至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、或约100%一致的氨基酸序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID

NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83和SEQ ID NO:84。

[0433] 在其他方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括VL,该VL包括与选自下组的参考氨基酸序列至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、或约100%一致的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64、SEQ ID NO:65、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:67、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69和SEQ ID NO:70,并且进一步包括VH,该VH包括与选自下组的参考氨基酸序列至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、或约100%一致的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:71、SEQ ID NO:72、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:74、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:76、SEQ ID NO:77、SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:83以及SEQ ID NO:84。

[0434] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包含包括SEQ ID NO:68序列的VL以及包括SEQ ID NO:82序列的VH。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由SEQ ID NO:68序列组成的VL以及由SEQ ID NO:82序列组成的VH。

[0435] “克隆10.3抗体”(也命名为“73combo3”或“MEDI9447”)是包括SEQ ID NO:68的两条CD730010衍生的轻链(VL)(包括三个CDR,CDR1、CDR2和CDR3,分别具有SEQ ID NO:46、51和56的序列)以及SEQ ID NO:82的两条CD730010衍生的重链(VH)(包括三个CDR,CDR1、CDR2和CDR3,分别具有SEQ ID NO:36、39和45的序列)的IgG1。

[0436] 在某些方面,此处披露的抗CD73抗体或其抗原结合片段以与包括SEQ ID NO:82的10.3重链VH以及SEQ ID NO:68的10.3轻链VL的10.3抗体基本上相同或更好的亲和力结合CD73。

[0437] (ii) CD730002衍生的抗CD73抗体

[0438] 在某些方面,本披露的抗CD73抗体包括对CD730002抗体的轻链的CDR1和/或CDR2和/或CDR3的修饰,包括但不限于:

[0439] 1) 包括序列SGDKVGD KYAS的轻链CDR1;和/或

[0440] 2) 包括共有序列EDX₁₈KX₁₉X₂₀S的轻链CDR2,其中X₁₈表示氨基酸残基丝氨酸(S)或苏氨酸(T),X₁₉表示氨基酸残基精氨酸(R)或酪氨酸(Y),并且X₂₀表示氨基酸残基组氨酸(H)、脯氨酸(P)或亮氨酸(L);和/或

[0441] 3) 包括序列QAWDTSFWV的轻链CDR3。

[0442] 在某些方面,本披露的抗CD73抗体包括对CD730002的重链的CDR1和/或CDR2和/或CDR3的修饰,包括但不限于:

[0443] 1) 包括序列SX₂₁A X₂₂S的重链CDR1,其中X₂₁表示氨基酸残基酪氨酸(Y)或缬氨酸(V),并且X₂₂表示氨基酸残基甲硫氨酸(M)或精氨酸(R);和/或

[0444] 2) 包括序列AISGSGSX₂₃YY X₂₄DSVKX₂₅的重链CDR2,其中X₂₃表示氨基酸残基苏氨酸(T)或脯氨酸(P);X₂₄表示氨基酸残基丙氨酸(A)或G(甘氨酸);并且X₂₅表示氨基酸残基甘氨酸(G)或精氨酸(R);和/或

[0445] 3) 包括序列DKGYWYM的重链CDR3。

[0446] 在一个方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括VL区,该VL区包括共有氨基酸

序列:

[0447] [FW₉]SGDKVGDKYAS[FW₁₀]EDX₁₈KX₁₉X₂₀S[FW₁₁]QAWDTSFWV[FW₁₂]

[0448] 其中[FW₉]、[FW₁₀]、[FW₁₁]和[FW₁₂]分别表示VL框架区1(SEQ ID NO:90或91)、VL框架区2(SEQ ID NO:92)、VL框架区3(SEQ ID NO:93、94或122)和VL框架区4(SEQ ID NO:30)的氨基酸残基;并且其中X₁₈表示氨基酸残基脯氨酸(P)或亮氨酸(L);X₁₉表示氨基酸残基精氨酸(R)或酪氨酸(Y);并且X₂₀表示氨基酸残基组氨酸(H)、脯氨酸(P)或亮氨酸(L)。

[0449] 在一个方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括VH区,该VH区包括共有氨基酸序列:

[0450] [FW₁₃]SX₂₁AX₂₂S[FW₁₄]AISGSGGSX₂₃YYX₂₄DSVKX₂₅[FW₁₅]DKGYWYWM[FW₁₆]

[0451] 其中[FW₁₃]、[FW₁₄]、[FW₁₅]和[FW₁₆]分别表示VH框架区1(SEQ ID NO:31)、VH框架区2(SEQ ID NO:32)、VH框架区3(SEQ ID NO:33)和VH框架区4(SEQ ID NO:89)的氨基酸残基;并且其中X₂₁表示氨基酸残基酪氨酸(Y)或缬氨酸(V);X₂₂表示氨基酸残基甲硫氨酸(M)或精氨酸(R);X₂₃表示氨基酸残基苏氨酸(T)或脯氨酸(P);X₂₄表示氨基酸残基丙氨酸(A)或G(甘氨酸);并且X₂₅表示氨基酸残基甘氨酸(G)或精氨酸(R)。

[0452] 在一个方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括VL区,该VL区包括共有氨基酸序列:

[0453] [FW₉]SGDKVGDKYAS[FW₁₀]EDX₁₈KX₁₉X₂₀S[FW₁₁]QAWDTSFWV[FW₁₂]

[0454] 其中[FW₉]、[FW₁₀]、[FW₁₁]和[FW₁₂]分别表示VL框架区1(SEQ ID NO:90或91)、VL框架区2(SEQ ID NO:92)、VL框架区3(SEQ ID NO:93、94或122)和VL框架区4(SEQ ID NO:30)的氨基酸残基;并且其中X₁₈表示氨基酸残基脯氨酸(P)或亮氨酸(L);X₁₉表示氨基酸残基精氨酸(R)或酪氨酸(Y);并且X₂₀表示氨基酸残基组氨酸(H)、脯氨酸(P)或亮氨酸(L),

[0455] 并且其中该抗CD73抗体或其抗原结合片段另外包括VH区,该VH区包括共有氨基酸序列:

[0456] [FW₁₃]SX₂₁AX₂₂S[FW₁₄]AISGSGGSX₂₃YYX₂₄DSVKX₂₅[FW₁₅]DKGYWYWM[FW₁₆]

[0457] 其中[FW₁₃]、[FW₁₄]、[FW₁₅]和[FW₁₆]分别表示VH框架区1(SEQ ID NO:31)、VH框架区2(SEQ ID NO:32)、VH框架区3(SEQ ID NO:33)和VH框架区4(SEQ ID NO:89)的氨基酸残基;并且其中X₂₁表示氨基酸残基酪氨酸(Y)或缬氨酸(V);X₂₂表示氨基酸残基甲硫氨酸(M)或精氨酸(R);X₂₃表示氨基酸残基苏氨酸(T)或脯氨酸(P);X₂₄表示氨基酸残基丙氨酸(A)或G(甘氨酸);并且X₂₅表示氨基酸残基甘氨酸(G)或精氨酸(R)。

[0458] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由以下各项组成的VL-CDR1:由SEQ ID NO:97组成的序列。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括VL-CDR1,该VL-CDR1包括由SEQ ID NO:97组成的序列。

[0459] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由选自下组的序列组成的VL-CDR2,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:98、99、127、128和129。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括如下VL-CDR2,该VL-CDR2包括选自下组的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:98、99、127、128以及129。

[0460] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由以下各项组成的VL-CDR3:由SEQ ID NO:100组成的序列。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括VL-CDR3,该VL-CDR3包括由SEQ ID NO:100组成的序列。

[0461] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由选自下组的序列组成的VH-CDR1,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:35、123和124。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括如下VH-CDR1,该VH-CDR1包括选自下组的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:35、123以及124。

[0462] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由选自下组的序列组成的VH-CDR2,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:37、95、125和126。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括如下VH-CDR2,该VH-CDR2包括选自下组的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:37、95、125以及126。

[0463] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由以下各项组成的VH-CDR3:由SEQ ID NO:96组成的序列。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括VH-CDR3,该VH-CDR3包括由SEQ ID NO:96组成的序列。

[0464] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由以下组成的VL-CDR1:由SEQ ID NO:97组成的序列,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括VL-CDR1,该VL-CDR1包括由SEQ ID NO:97组成的序列,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。

[0465] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由选自下组的序列组成的VL-CDR2,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:98、99、127、128和129,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括如下VL-CDR2,该VL-CDR2包括选自下组的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:98、99、127、128以及129,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。

[0466] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由以下组成的VL-CDR3:由SEQ ID NO:100组成的序列,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括VL-CDR3,该VL-CDR3包括由SEQ ID NO:100组成的序列,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。

[0467] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由选自下组的序列组成的VH-CDR1,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:35、123和124,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括如下VH-CDR1,该VH-CDR1包括选自下组的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:35、123和124,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。

[0468] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由选自下组的序列组成的VH-CDR2,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:37、95、125和126,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括如下VH-CDR2,该VH-CDR2包括选自下组的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:37、95、125以及126,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。

[0469] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由以下组成的VH-CDR3:由SEQ ID NO:96组成的序列,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括VH-CDR3,该VH-CDR3包括由SEQ ID NO:96组成的序列,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。

[0470] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由以下各项组成的VL-CDR1:由

SEQ ID NO:97组成的序列;由选自下组的序列组成的VL-CDR2,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:98、99、127、128以及129;以及由以下组成的VL-CDR3:由SEQ ID NO:100组成的序列。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括VL-CDR1,该VL-CDR1包括由SEQ ID NO:97组成的序列;包括选自下组的序列的VL-CDR2,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:98、99、127、128以及129;以及包括如下的VL-CDR3:由SEQ ID NO:100组成的序列。

[0471] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由选自下组的序列组成的VH-CDR1,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:35、123和124;由选自下组的序列组成的VH-CDR2,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:37、95、125以及126;以及由以下组成的VH-CDR3:由SEQ ID NO:96组成的序列。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括如下VH-CDR1,该VH-CDR1包括选自下组的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:35、123以及124;包括选自下组的序列的VH-CDR2,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:37、95、125以及126;包括如下的VH-CDR3:由SEQ ID NO:96组成的序列。

[0472] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由以下组成的VL-CDR1:由SEQ ID NO:97组成的序列,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;由选自下组的序列组成的VL-CDR2,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:98、99、127、128和129,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;以及由以下组成的VL-CDR3:由SEQ ID NO:100组成的序列,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。

[0473] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括VL-CDR1,该VL-CDR1包括由SEQ ID NO:97组成的序列,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;包括选自下组的序列的VL-CDR2,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:98、99、127、128以及129,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;以及包括以下的VL-CDR3:由SEQ ID NO:100组成的序列,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。

[0474] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由选自下组的序列组成的VH-CDR1,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:35、123和124,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;由选自下组的序列组成的VH-CDR2,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:37、95、125和126,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;以及由以下组成的VH-CDR3:由SEQ ID NO:96组成的序列,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。

[0475] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括如下VH-CDR1,该VH-CDR1包括选自下组的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:35、123和124,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;包括选自下组的序列的VH-CDR2,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:37、95、125以及126,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;包括以下的VH-CDR3:由SEQ ID NO:96组成的序列,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。

[0476] 在某些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括对重链和/或轻链的CDR1和/或CDR2和/或CDR3的修饰,并且进一步包括对重链和/或轻链的FW1和/或FW2和/或FW3和/或FW4的修饰。

[0477] 在一些方面,FW₉包括SEQ ID NO:90或91,FW₁₀包括SEQ ID NO:92,FW₁₁包括SEQ ID NO:93、94、或122,FW₁₂包括SEQ ID NO:30,FW₁₃包括SEQ ID NO:31,FW₁₄包括SEQ ID NO:32,FW₁₅包括SEQ ID NO:33,并且FW₁₆包括SEQ ID NO:89。

[0478] 在一些方面,FW₉包括除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外的SEQ ID NO:

90或91,FW₁₀包括除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外的SEQ ID NO:92,FW₁₁包括除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外的SEQ ID NO:93、94、或122,FW₁₂包括除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外的SEQ ID NO:30,FW₁₃包括除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外的SEQ ID NO:31,FW₁₄包括除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外的SEQ ID NO:32,FW₁₅包括除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外的SEQ ID NO:33,并且FW₁₆包括SEQ ID NO:89。

[0479] 在某些方面,该抗CD733抗体或其抗原结合片段包括VL和VH,该VL和VH包括一致或除了一个或多个CDR中的一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外一致的VL-CDR1、VL-CRD2、VL-CDR3、VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3氨基酸序列,其中此类VL-CDR1、VL-CRD2、VL-CDR3、VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3分别是:

[0480] SEQ ID NO:97、98、100、35、37和96;或

[0481] SEQ ID NO:97、99、100、35、95和96;或

[0482] SEQ ID NO:97、98、100、35、37和96;或

[0483] SEQ ID NO:97、99、100、123、37和96;或

[0484] SEQ ID NO:97、99、100、124、37和96;或

[0485] SEQ ID NO:97、99、100、35、125和96;或

[0486] SEQ ID NO:97、99、100、35、126和96;或

[0487] SEQ ID NO:97、99、100、35、95和96;或

[0488] SEQ ID NO:97、127、100、35、95和96;或

[0489] SEQ ID NO:97、128、100、35、95和96;或

[0490] SEQ ID NO:97、129、100、35、95和96;或

[0491] SEQ ID NO:97、99、100、35、95和96。

[0492] 在某些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括抗体VL和抗体VH,其中该VL包括与选自下组的参考氨基酸序列至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、或约100%一致的氨基酸序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:86、88、112、118、119、120以及121。

[0493] 在其他方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括抗体VL和抗体VH,其中该VH包括与选自下组的参考氨基酸序列至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、或约100%一致的氨基酸序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:85、87、111、113、114、115、116以及117。

[0494] 在其他方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括VL,该VL包括与选自下组的参考氨基酸序列至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、或约100%一致的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:86、88、112、118、119、120以及121;并且进一步包括VH,该VH包括与选自下组的参考氨基酸序列至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、或约100%一致的序列,该组由以下各项组成:SEQ ID NO:85、87、111、113、114、115、116以及117。

[0495] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包含包括SEQ ID NO:88序列的VL以及包括SEQ ID NO:87序列的VH。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括由SEQ ID NO:87序列组成的VL以及由SEQ ID NO:87序列组成的VH。

[0496] “克隆2C5抗体”是包括SEQ ID NO:88的两条CD730002衍生的轻链(VL) (包括三个CDR, CDR1、CDR2和CDR3, 分别具有SEQ ID NO:97、99和100的序列) 以及SEQ ID NO:87的CD7300002衍生的重链(VH) (包括三个CDR, CDR1、CDR2和CDR3, 分别具有SEQ ID NO:35、95和96的序列) 的IgG1。

[0497] 在某些方面, 此处披露的抗CD73抗体或其抗原结合片段以与包括SEQ ID NO:87的2C5重链VH以及SEQ ID NO:88的2C5轻链VL的2C5抗体基本上相同或更好的亲和力结合CD73。

[0498] (iii) 具有除CD730002或CD730010外的亲本抗体的抗CD73抗体

[0499] 在其他方面, 此处披露的抗CD73抗体或抗原结合片段的亲本抗体是CD730004 (即包括SEQ ID NO:104的VL和SEQ ID NO:103的VH的抗CD73抗体)、CD730008 (即包括SEQ ID NO:106的VL和SEQ ID NO:107的VH的抗CD73抗体)、CD7300011 (即包括SEQ ID NO:5的VL和SEQ ID NO:6的VH的抗CD73抗体)、CD730021 (即包括SEQ ID NO:7的VL和SEQ ID NO:8的VH的抗CD73抗体)、CD730042 (即包括SEQ ID NO:9的VL和SEQ ID NO:10的VH的抗CD73抗体)、CD730046 (即包括SEQ ID NO:11的VL和SEQ ID NO:12的VH的抗CD73抗体)、CD730047 (即包括SEQ ID NO:13的VL和SEQ ID NO:14的VH的抗CD73抗体)、CD730068 (即包括SEQ ID NO:108的VL和SEQ ID NO:107的VH的抗CD73抗体)、或CD730069 (即包括SEQ ID NO:110的VL和SEQ ID NO:109的VH的抗CD73抗体)。相比于亲本抗体例如CD730004, 对这些亲本抗体的修饰可包括CDR区域和/或FW区域中的突变。

[0500] 在某些方面, 该抗CD73抗体包括对CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的轻链的CDR1和/或CDR2和/或CDR3的修饰。

[0501] 在某些方面, 该抗CD73抗体包括对CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的重链的CDR1和/或CDR2和/或CDR3的修饰。

[0502] 在一些方面, 该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VL-CDR1。在一些方面, 该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VL-CDR2。在一些方面, 该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VL-CDR3。

[0503] 在一些方面, 该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VH-CDR1。在一些方面, 该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VH-CDR2。在一些方面, 该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VH-CDR3。

[0504] 在一些方面, 该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VL-CDR1, 除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。在一些方面, 该抗CD73抗体或其抗原结合片段

包括来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VL-CDR2,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VL-CDR3,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。

[0505] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VH-CDR1,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VH-CDR2,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VH-CDR3,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。

[0506] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VL-CDR1;来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VL-CDR2;以及来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VL-CDR3。

[0507] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VH-CDR1;来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VH-CDR2;以及来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VH-CDR3。

[0508] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VL-CDR1,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VL-CDR2,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;以及来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VL-CDR3,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。

[0509] 在一些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VH-CDR1,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VH-CDR2,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外;以及来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VH-CDR3,除了一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外。

[0510] 在某些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括对来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的重链和/或

轻链的CDR1和/或CDR2和/或CDR3的修饰,并且另外包括对来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的重链和/或轻链的FW1和/或FW2和/或FW3和/或FW4的修饰。

[0511] 在某些方面,该抗CD733抗体或其抗原结合片段包括VL和VH,该VL和VH包括一致或除了一个或多个CDR中的一处、两处、三处或四处氨基酸取代之外一致的VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3、VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3氨基酸序列,其中此类VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3、VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3是来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069。

[0512] 在某些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括抗体VL和抗体VH,其中该VL包括与选自来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VL序列的参考氨基酸序列至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、或约100%一致的氨基酸序列。

[0513] 在其他方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括抗体VL和抗体VH,其中该VH包括与选自来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VH序列的参考氨基酸序列至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、或约100%一致的氨基酸序列。

[0514] 在其他方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段包括VL,该VL包括与选自来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的V1序列的参考氨基酸序列至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、或约100%一致的序列,并且进一步包括VH,该VH包括与选自来自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069的VH序列的参考氨基酸序列至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、或约100%一致的序列。

[0515] 在某些方面,此处披露的抗CD73抗体或其抗原结合片段以与CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069抗体基本上相同或更好的亲和力结合CD73。

[0516] (iv) 混合和匹配的抗CD73抗体

[0517] 可以将来自此处披露的抗CD73结合分子(例如,CD730002、CD730004、CD730008、CD730010、CD730011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、或CD730069)的VH和VL序列或此类序列的变体(例如,克隆10 GL9、克隆10 P32E、克隆10 C1、克隆10 C2、克隆10 D3、克隆10 G10、克隆10 HPT、克隆10 GRVE、克隆10 combo1、克隆10 combo2、克隆10 combo3、克隆10 combo5、或克隆combo6)的VH和VL“混合和匹配”以产生其他抗CD73结合分子。

[0518] 在某些方面,将该10.3抗体和该2C5抗体的VH序列混合和匹配。在另一个方面,可以将该10.03抗体和该2C5抗体的VL序列混合和匹配。另外或可替代地,可以将此处披露的克隆10(CD730010)变体的VL和/或VH序列混合和匹配。另外或可替代地,可以将此处披露的克隆2(CD730002)变体的VL和/或VH序列混合和匹配。另外或可替代地,可以将此处披露的克隆10(CD730010)和克隆2(CD730002)变体的VL和/或VH序列混合和匹配。

[0519] 在一些方面,VL和/或VH混合和匹配可在源自于相同表位盒(bin)中分组的抗体的

序列之间发生(参见实例2)。如此处使用的,术语“表位盒”是指结合相同表位或重叠表位、或与彼此竞争结合相同表位或重叠表位的抗体或其抗原结合片段的分组。例如,来自CD730003、CD730010、CD730021、CD730042、CD730046、以及CD730047的序列,所有这些属于“表位盒B”的抗体可以被混合和匹配。在其他方面,VL和/或VH混合和匹配可在源自于不同表位盒中分组的抗CD73抗体的序列之间发生。因此,可以将来自属于“表位盒B”的抗体的序列与来自“表位盒A”(CD730002、CD730004、CD730008、以及CD730011)或“表位盒C”(CD730068和CD730069)中的抗CD73抗体的序列混合和匹配。

[0520] (v) 突变体抗CD73抗体

[0521] 在某些方面,此处披露的抗CD73抗体(例如,MEDI9447,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段包括改善与人FcRn的结合并且改善该抗CD73抗体或其抗原结合片段的半衰期的突变。在一些方面,此类突变是引入到IgG1的恒定结构域中的位置252处的甲硫氨酸(M)至酪氨酸(Y)突变、位置254处的丝氨酸(S)至苏氨酸(T)突变、以及位置256处的苏氨酸(T)至谷氨酸(E)突变,这些是根据卡巴特中的EU索引进行编号的(卡巴特(Kabat)等人(1991)免疫学感兴趣的蛋白的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),美国公共卫生署(U.S.Public Health Service),美国国立卫生研究院(the National Institutes of Health),华盛顿特区)。参见美国专利号7,658,921,通过引用将其结合在此。此种类型的突变体IgG(称为“YTE突变体”)相较于相同抗体的野生型形式已显示展现增加大约四倍的半衰期(达尔阿夸(Dall'Acqua)等人,生物化学杂志(J.Biol.Chem.) 281:23514-24(2006))。在一些方面,包括IgG恒定结构域的抗CD73抗体或其抗原结合片段包括位置251-257、285-290、308-314、385-389以及428-436处的氨基酸残基的一个或多个氨基酸取代,根据卡巴特中的EU索引进行编号,其中此类突变增加该抗CD73抗体或其抗原结合片段的血清半衰期。

[0522] 在一些方面,YTE突变体进一步包括选自下组的氨基酸对IgG恒定结构域的位置434处的取代(根据卡巴特中的EU索引进行编号),该组由以下各项组成:色氨酸(W)、甲硫氨酸(M)、酪氨酸(Y)以及丝氨酸(S)。在其他方面,YTE突变体进一步包括选自下组的氨基酸对IgG恒定结构域的位置434处的取代(根据卡巴特中的EU索引进行编号),该组由以下各项组成:色氨酸(W)、甲硫氨酸(M)、酪氨酸(Y)以及丝氨酸(S);以及选自下组的氨基酸对IgG恒定结构域的位置428处的取代(根据卡巴特中的EU索引进行编号),该组由以下各项组成:苏氨酸(T)、亮氨酸(L)、苯丙氨酸(F)、以及丝氨酸(S)。

[0523] 仍在其他方面中,YTE突变体进一步包括酪氨酸(Y)对IgG恒定结构域的位置434处的取代(根据卡巴特中的EU索引进行编号),以及亮氨酸(L)对IgG恒定结构域的位置257处的取代(根据卡巴特中的EU索引进行编号)。在一些方面,YTE突变体进一步包括丝氨酸(S)对IgG恒定结构域的位置434处的取代(根据卡巴特中的EU索引进行编号),以及亮氨酸(L)对IgG恒定结构域的位置428处的取代(根据卡巴特中的EU索引进行编号)。

[0524] 在特定方面,此处披露的抗CD73抗体(例如,MEDI9447,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段包括IgG1恒定结构域,其包括IgG1恒定结构域的位置252处的甲硫氨酸(M)至酪氨酸(Y)突变、位置254处的丝氨酸(S)至苏氨酸(T)突变、以及位置256处的苏氨酸(T)至谷氨酸(E)突变(根据卡巴特中的EU索引进行编号)。

[0525] 在某些方面,此处披露的抗CD73抗体(例如,MEDI9447,克隆10.3抗体或克隆2C5抗

体)或其抗原结合片段包括选自下组的至少一个IgG恒定结构域氨基酸取代,该组由以下各项组成:

[0526] (a) 位置252处的氨基酸被酪氨酸(Y)、苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)、或苏氨酸(T)取代;

[0527] (b) 位置254处的氨基酸被苏氨酸(T)取代;

[0528] (c) 位置256处的氨基酸被丝氨酸(S)、精氨酸(R)、谷氨酰胺(Q)、谷氨酸(E)、天冬氨酸(D)、或苏氨酸(T)取代;

[0529] (d) 位置257处的氨基酸被亮氨酸(L)取代;

[0530] (e) 位置309处的氨基酸被脯氨酸(P)取代;

[0531] (f) 位置311处的氨基酸被丝氨酸(S)取代;

[0532] (g) 位置428处的氨基酸被苏氨酸(T)、亮氨酸(L)、苯丙氨酸(F)、或丝氨酸(S)取代;

[0533] (h) 位置433处的氨基酸被精氨酸(R)、丝氨酸(S)、异亮氨酸(I)、脯氨酸(P)、或谷氨酰胺(Q)取代;

[0534] (i) 位置434处的氨基酸被色氨酸(W)、甲硫氨酸(M)、丝氨酸(S)、组氨酸(H)、苯丙氨酸(F)、或酪氨酸取代;以及

[0535] (j) 所述取代中两个或更多个的组合,

[0536] 其中这些位置是根据卡巴特中的EU索引进行编号,并且其中比较于具有野生型IgG恒定结构域的IgG的血清半衰期,经修饰的IgG具有增加的血清半衰期。

[0537] 在一些方面,此处披露的抗CD73抗体(例如,MEDI9447,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段的VH和/或VL氨基酸序列可以与以上列出的VH和VL序列85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%类似,并且包括1处、2处、3处、4处、5处或更多保守性取代。具有分别与SEQ ID NO:71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、87、111、113、114、115、116、或117的VH区域,和/或SEQ ID NO:57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、86、88、112、118、119、120、或121的VL区具有高(即80%或更大)序列相似性或序列一致性的VH和VL区的CD73抗体可以通过编码SEQ ID NO:57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、或121的核酸分子的诱变(例如,定点或PCR介导的诱变)随后使用此处描述的功能测试对编码的改变的抗体针对保留功能进行测试来获得。

[0538] 在一些方面,此处披露的抗CD73抗体的Fc结构域或包括此处披露的抗体的CD73结合片段的融合蛋白的Fc结构域具有减少的与Fc受体的结合,以例如通过ADCC减少细胞毒性。在一些方面中,该抗体或Fc融合蛋白的Fc结构域具有增加的与Fc受体的结合从而增大例如经由ADCC的细胞毒性。在一些方面中,该抗体或Fc融合蛋白的Fc结构域包含选自下组的一个或多个位置处的非天然存在的ADCC降低性氨基酸残基,该组由以下各项组成:如通过在卡巴特中列出的EU索引来编号的234、235、236、237、238、239、240、241、243、244、245、247、251、252、254、255、256、262、263、264、265、266、267、269、279、280、284、292、296、297、298、299、305、313、316、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、339、341、343、370、373、378、392、416、419、421、440以及443。能够减小抗体ADCC活性的许多特定突变是本领域已知的,并且包括例如234F、235E、235F、235Q(或235Y)、239A、332Q、331S以及其组合。例如,

参见美国专利号5,624,821、5,648,260、7,597,889、8,961,967、7,371,826、7,785,791、7,790,858;美国专利公开号20140378663、20130071390、20110212087、20150118227、20060194290、20060194291、20080274105、20080274506、US 20130089541、以及US 20130108623中所述的突变,这些通过引用以其全部内容结合在此。具有降低的ADCC效应子功能的抗体还包括具有在Fc区残基238、265、269、270、297、327以及329中的一个或多个的取代的那些抗体(参见,例如美国专利号6,737,056)。此类Fc突变体还包括在氨基酸位置265、269、270、297以及327中的两个或更多个位置处具有取代的Fc突变体,包括其中残基265和297到丙氨酸的取代的Fc突变体(参见,例如美国专利号7,332,581)。任选地,可以并入降低ADCC和CDC两者的突变。在一些方面,包括减少或消除ADCC和/或CDC的突变的此处披露的抗CD73抗体或其抗原结合片段可用于产生抗体药物轭合物(ADC)。

[0539] 在一个方面,本披露提供了抗CD73抗体,其中该抗体是IgG1、IgG2或IgG3,并且在选自下组的一个或多个位置处包括至少一个修饰,该组由以下各项组成:234、235以及331,如通过如在卡巴特中列出的EU索引编号的。在再另一个特定方面,该Fc区是IgG1、IgG2或IgG3 Fc区,并且这些非天然存在的氨基酸选自下组,该组由以下各项组成:234F、235E、235F、235Q(或235Y)、239A、332Q、331S、332Q,如通过如在卡巴特中列出的EU索引编号的。

[0540] 在另一个方面,本披露提供了抗CD73抗体,其中该抗体是IgG4,并且在选自下组的一个或多个位置处包括至少一个修饰,该组由以下各项组成:228和235,如通过如在卡巴特中列出的EU索引编号的。在再另一个特定方面,该Fc区是一个IgG4 Fc区,并且这些非天然存在的氨基酸选自下组,该组由以下各项组成:228P、235E以及235Y,如通过如在卡巴特中列出的EU索引编号的。在特定的方面,本披露提供了抗CD73抗体,其中该抗体是IgG1、IgG2、或IgG3,并且包括以下位置处的修饰:(i) 234F、235E、以及331S;(ii) 234F、235F、以及331S;(iii) 234F、235Q、以及322Q。在另一个特定方面,本披露提供了抗CD73抗体,其中该抗体是IgG4,并且包括修饰228P和235E。

[0541] III. 表位竞争性CD73结合分子

[0542] 在另一个方面,本披露提供结合到与此处描述的不同抗CD73抗体相同的表位的CD73结合分子,例如,结合到与MEDI9447、克隆10.3抗体所结合表位相同的表位或结合到与克隆2C5抗体所结合表位相同的表位的分子。

[0543] 在标准CD73结合测定(例如,流式细胞术测定、表面等离子体共振、或溶液测定)中,可以基于其与此处披露的抗CD73抗体诸如CD730010抗体、CD730002抗体、CD730004抗体及其抗原结合片段交叉竞争(例如竞争抑制该结合,以统计学显著的方式)的能力,鉴定此类抗体。

[0544] 因此,在一个方面,本披露提供抗CD73抗体和其抗原结合片段例如人单克隆抗体,该抗CD73抗体和其抗原结合片段与另一种抗CD73抗体或其抗原结合片段诸如CD730010抗体、CD730002抗体、CD730004抗体、其变体(例如,MEDI9447,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)、或其抗原结合片段竞争结合到CD73。测试抗体抑制例如CD730010抗体(或克隆10.3抗体或其抗原结合片段)或CD730002抗体(或克隆2C5抗体或其抗原结合片段)的结合的能力证明该测试抗体可与那种抗体竞争结合到CD73;根据非限制性理论,此类抗体可结合到与它竞争的抗CD73抗体或其抗原结合片段所结合表位相同或相关的(例如,结构上相似或空间上接近的)CD73上的表位。在一个方面,结合到与例如CD730010抗体(或克隆10.3抗体或其抗

原结合片段)或CD730002抗体(或克隆2C5抗体或其抗原结合片段)所结合表位相同的CD73上的表位的抗CD73抗体或其抗原结合片段是人单克隆抗体。

[0545] 如此处所述的,直接抑制CD73的酶活性的一种单克隆抗体MEDI9447的表位被鉴定以阐明MEDI9447的作用机制。该表位位于CD73的N-端结构域的顶面内,一个远离底物结合和活性位点残基的区域。结构和机制研究揭示MEDI9447通过阻止CD73采用催化活性构象的双重机制拮抗CD73。这些结果提供了精细映射的表位的第一个报告,该表位可被靶向用于选择性、有效和非竞争性抑制CD73,作为在肿瘤微环境中调节腺苷信号传导的手段。

[0546] 使用氢-氘交换(HDX)质谱法(MS)和诱变策略,我们定义了MEDI9447的表位并且检查抗体结合对总体CD73结构的潜在影响。该抗体结合到CD73的N-端结构域中的一个位点,使得能够非竞争性地抑制AMP水解。在不同方面,该表位包括对应于V144、K180、以及N185的一个或多个CD73氨基酸残基。在不同方面,该表位另外包括对应于CD73的Y135、K136、以及N187的一个或多个CD73氨基酸残基。引人注目地,该表位如此定位使得抗体结合妨碍CD73从开放构象异构体向有催化活性的闭合构象异构体转化。此外,我们的研究显示MEDI9447可通过由抗体与CD73的相互作用的效价介导的抑制的双重机制来抑制锚定的和可溶的CD73两者。

[0547] IV. 抗CD73抗体的功能特征

[0548] 抗体对抗原的亲合力或亲合力可以使用本领域熟知的任何适合的方法(例如,流式细胞术、酶联免疫吸附测定(ELISA)、或放射免疫测定(RIA)、或动力学(例如BIACORE™分析))在实验上测定。可以容易地采用直接结合测定以及竞争性结合测定形式。(参见例如,伯佐斯科(Berzofsky)等人,“抗体-抗原相互作用(Antibody-Antigen Interactions)”在基础免疫学(Fundamental Immunology),保罗(Paul),W.E.编,纽约州纽约市雷文出版社(Raven Press:New York,N.Y.) (1984);库比(Kuby),免疫学(Immunology),纽约州纽约市W.H.弗里曼公司(W.H.Freeman and Company:New York,N.Y.) (1992);和本文描述的方法)。如果在不同条件(例如,盐浓度、pH、温度)下测量,特定抗体-抗原相互作用的测量亲合力可以变化。因此,亲合力和其他抗原结合参数(例如, K_D 或 K_d 、 K_{on} 、 K_{off})的测量是用抗体和抗原的标准化溶液和标准化缓冲液(如本领域中已知的,并且诸如本文所述的缓冲液)进行。

[0549] 本领域还已知,使用表面等离子体共振分析(例如,BIACORE™)测量的亲合力可依赖于哪种反应物结合到芯片上而变化。在此方面,亲合力可以使用其中靶向抗体(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)被固定到芯片(称为“IgG下”形式)的形式或使用其中靶蛋白(例如,CD73)被固定到芯片上(称为例如“CD73下”形式)的形式进行测量。

[0550] 在本披露的一个方面,该抗CD73抗体(例如,MEDI9447,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段以少于 $10^{-6}M$ 、或少于 $10^{-7}M$ 、或少于 $10^{-8}M$ 、或少于 $10^{-9}M$ 、或少于 $10^{-10}M$ 、或少于 $10^{-11}M$ 、或少于 $10^{-12}M$ 、或少于 $10^{-13}M$ 的解离常数或 k_d (k_{off}/k_{on}) 特异性地结合CD73和/或其抗原片段。

[0551] 在另一个方面,该抗CD73抗体(例如,MEDI9447,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段以少于 $1 \times 10^{-3}s^{-1}$ 、或少于 $2 \times 10^{-3}s^{-1}$ 的 K_{off} 结合到CD73和/或其抗原片段。在其他方面,抗CD73抗体或其抗原结合片段以少于 $10^{-3}s^{-1}$ 、少于 $5 \times 10^{-3}s^{-1}$ 、少于 $10^{-4}s^{-1}$ 、少于 $5 \times 10^{-4}s^{-1}$ 、少于 $10^{-5}s^{-1}$ 、少于 $5 \times 10^{-5}s^{-1}$ 、少于 $10^{-6}s^{-1}$ 、少于 $5 \times 10^{-6}s^{-1}$ 、少于少于 $5 \times 10^{-7}s^{-1}$ 、少

于 10^{-8}s^{-1} 、少于 $5 \times 10^{-8}\text{s}^{-1}$ 、少于 10^{-9}s^{-1} 、少于 $5 \times 10^{-9}\text{s}^{-1}$ 、或少于 10^{-10}s^{-1} 的 K_{off} 结合到CD73及其抗原片段。

[0552] 在另一个方面,该抗CD73抗体(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段以至少 $10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、至少 $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、至少 $10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、或至少 $10^8\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、或至少 $10^9\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 的结合速率常数或 k_{on} 率结合到CD73和/或其抗原片段。

[0553] 在一些方面,该抗CD73抗体(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段以至少约60pM、至少约70pM、至少约80pM、至少约90pM、至少约100pM、至少约110pM、至少约120pM、至少约130pM、至少约140pM、至少约150pM、至少约160pM、或至少约170pM(如通过流式细胞术测量)的 K_{D} 结合到MB-MDA-231细胞表面上的CD73。在一个特定方面,该抗CD73抗体是克隆10.3抗体,并且它以约150pM(如通过流式细胞术测量)的 K_{D} 结合到MB-MDA-231细胞表面上的CD73。在另一个特定方面,该抗CD73抗体是克隆2C5抗体,并且它以约80pM(如通过流式细胞术测量)的 K_{D} 结合到MB-MDA-231细胞表面上的CD73。

[0554] 在一些方面,该抗CD73抗体(例如,MEDI9447,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段以至少约40pM、至少约50pM、至少约60pM、至少约70pM、至少约80pM、至少约90pM、至少约100pM、至少约120pM、或至少约130pM(如通过流式细胞术测量)的 K_{D} 结合到鼠3T1细胞表面上的CD73。在一个特定方面,该抗CD73抗体是克隆10.3抗体,并且它以约110pM(如通过流式细胞术测量)的 K_{D} 结合到鼠3T1细胞表面上的CD73。在另一个特定方面,该抗CD73抗体是克隆2C5抗体,并且它以约55pM(如通过流式细胞术测量)的 K_{D} 结合到鼠3T1细胞表面上的CD73。

[0555] 在一些方面,该抗CD73抗体(例如,MEDI9447,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段以至少约40pM、至少约50pM、至少约60pM、至少约70pM、至少约80pM、至少约90pM、或至少约100pM(如通过流式细胞术测量)的 K_{D} 结合到食蟹猴MK-1细胞表面上的CD73。在一个特定方面,该抗CD73抗体是克隆10.3抗体,并且它以约80pM(如通过流式细胞术测量)的 K_{D} 结合到食蟹猴MK-1细胞表面上的CD73。在另一个特定方面,该抗CD73抗体是克隆2C5抗体,并且它以约60pM(如通过流式细胞术测量)的 K_{D} 结合到食蟹猴MK-1细胞表面上的CD73。

[0556] 在一些方面,该抗CD73抗体(例如,MEDI9447,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段以至少约3pM、至少约4pM、至少约5pM、至少约6pM、至少约7pM、至少约8pM、至少约9pM、或至少约10pM(如通过表面等离子体共振(**PROTEON®**)测量)的 K_{D} 结合到人CD73。在一个特定方面,该抗CD73抗体是克隆10.3抗体,并且它以约4pM(如通过表面等离子体共振(**PROTEON®**)测量)的 K_{D} 结合到人CD73。在另一个特定方面,该抗CD73抗体是克隆2C5抗体,并且它以约9pM(如通过表面等离子体共振(**PROTEON®**)测量)的 K_{D} 结合到人CD73。

[0557] 在一些方面,此处披露的抗CD73抗体(例如,MEDI9447,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段以至少约1pM、至少约2pM、至少约3pM、至少约4pM、至少约5pM、至少约6pM、至少约7pM、至少约8pM、至少约9pM、至少约10pM、至少约11pM、至少约12pM、至少约13pM、至少约14pM、至少约15pM、至少约16pM、至少约17pM、至少约18pM、至少约19pM、至少约

20pM、至少约21pM、至少约22pM、至少约23pM、至少约24pM、或至少约25pM(如通过表面等离子体共振(**PROTEON®**)测量)的 K_D 结合到鼠CD73。在一个特定方面,该抗CD73抗体是克隆10.3抗体,并且它以约1pM(如通过表面等离子体共振(**PROTEON®**)测量)的 K_D 结合到鼠CD73。在另一个特定方面,该抗CD73抗体是克隆2C5抗体,并且它以约22pM(如通过表面等离子体共振(**PROTEON®**)测量)的 K_D 结合到鼠CD73。

[0558] 在一些方面,抗CD73抗体(例如,MEDI9447,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段以至少约3pM、至少约4pM、至少约5pM、至少约6pM、至少约7pM、至少约8pM、至少约9pM、或至少约10pM(如通过表面等离子体共振(**PROTEON®**)测量)的 K_D 结合到食蟹猴CD73。在一个特定方面,该抗CD73抗体是克隆10.3抗体,并且它以约7pM(如通过SPR(Proteon)测量)的 K_D 结合到食蟹猴CD73。在另一个特定方面,该抗CD73抗体是克隆2C5抗体,并且它以约9pM(如通过表面等离子体共振(**PROTEON®**)测量)的 K_D 结合到食蟹猴CD73。

[0559] 在一些方面,该抗CD73抗体(例如,MEDI9447,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段以至少约40pM、至少约50pM、至少约60pM、至少约70pM、至少约80pM、至少约90pM、至少约100pM、或至少约110pM(如通过溶液结合测量)的 K_D 结合到人CD73。在一个特定方面,该抗CD73抗体是克隆10.3抗体,并且它以约80pM(如通过溶液结合测量)的 K_D 结合到人CD73。在另一个特定方面,该抗CD73抗体是克隆2C5抗体,并且它以约80pM(如通过溶液结合测量)的 K_D 结合到人CD73。

[0560] 在一些方面,该抗CD73抗体(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段以至少约100pM、至少约200pM、至少约300pM、至少约400pM、至少约500pM、至少约600pM、至少约700pM、至少约800pM、至少约900pM、至少约1000pM、至少约1100pM、至少约1200pM、至少约1300pM、至少约1400pM、至少约1500pM、至少约1600pM、至少约、或至少约1700pM(如通过溶液结合测量)的 K_D 结合到鼠CD73。在一个特定方面,该抗CD73抗体是克隆10.3抗体,并且它以约130pM(如通过溶液结合测量)的 K_D 结合到鼠CD73。在另一个特定方面,该抗CD73抗体是克隆2C5抗体,并且它以约1500pM(如通过溶液结合测量)的 K_D 结合到鼠CD73。

[0561] 在一些方面,该抗CD73抗体(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段以至少约60pM、至少约70pM、至少约80pM、至少约90pM、至少约100pM、至少约110pM、或至少约120pM(如通过溶液结合测量)的 K_D 结合到食蟹猴CD73。在一个特定方面,该抗CD73抗体是克隆10.3抗体,并且它以约90pM(如通过溶液结合测量)的 K_D 结合到食蟹猴CD73。在另一个特定方面,该抗CD73抗体是克隆2C5抗体,并且它以约100pM(如通过溶液结合测量)的 K_D 结合到食蟹猴CD73。在具体的方面,MEDI9447以约 1×10^{-12} 、 5×10^{-12} 、 10×10^{-12} 、 100×10^{-12} 、或 150×10^{-12} 的 K_D 结合CD73。

[0562] 在一些方面,此处披露的CD73结合分子例如抗CD73抗体(例如,MEDI9447,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段可解除AMP介导的对T细胞分裂的抑制。在其他方面,此处披露的CD73结合分子例如抗CD73抗体(例如,MEDI9447,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段可解救ATP诱导的由T调节的 T_{eff} 抑制。

[0563] 在一些方面,此处披露的CD73结合分子例如抗CD73抗体或其抗原结合片段(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)可显著抑制同系肿瘤生长。在一个方面,该肿瘤是非小细胞

肺肿瘤、卵巢肿瘤、乳腺肿瘤、头颈肿瘤、胰腺肿瘤、结直肠癌肿瘤、黑色素瘤肿瘤、淋巴瘤肿瘤。在一个方面,该肿瘤是CT26小鼠同系CRC肿瘤、B16F10黑色素瘤肿瘤、EG7-OVA淋巴瘤肿瘤、或LL2(路易斯肺)肿瘤。在一些方面,此处披露的CD73结合分子例如抗CD73抗体或其抗原结合片段(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)可显著抑制肿瘤生长,其中该肿瘤对用抗PD-1和/或抗PD-L1和/或抗PD-L2和/或抗CTLA-4抗体进行的疗法无响应。在一些方面,当在约1mg/kg、约2mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约6mg/kg、约7mg/kg、约8mg/kg、约9mg/kg、或约10mg/kg.PD1的浓度给予时,此处披露的CD73结合分子例如抗CD73抗体或其抗原结合片段(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)可显著抑制肿瘤生长。

[0564] 在一些方面,此处披露的CD73结合分子例如抗CD73抗体或其抗原结合片段(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)可在结合到细胞之后内化。在一些方面,该CD73结合分子是抗体药物轭合物(ADC)。

[0565] V. 制备抗CD73抗体和抗原结合片段

[0566] 单克隆抗CD73抗体(例如,MEDI9447,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)以及其抗原结合片段可以使用杂交瘤方法(诸如科勒(Kohler)和米尔斯坦(Milstein)(1975)自然(Nature) 256:495所述的那些)来制备。利用杂交瘤方法,小鼠、仓鼠或其他合适宿主动物如上所述进行免疫,以引发淋巴细胞产生将特异性地结合至免疫抗原的抗体。淋巴细胞也可以在体外免疫。免疫后,分离淋巴球,并利用例如聚乙二醇与合适骨髓瘤细胞系融合,以形成可随后从未融合的淋巴细胞和骨髓瘤细胞选择出的杂交瘤细胞。然后产生特异性针对选定的抗原的单克隆抗体的杂交瘤(这是通过免疫沉淀法、免疫印迹法或通过体外结合测定(例如放射免疫测定(RIA);酶联免疫吸附测定(ELISA)))可在体外培养物中利用标准方法(戈丁(Goding),单克隆抗体:原理和实践,学术出版社,1986)或在体内作为动物的腹水肿瘤增殖。然后单克隆抗体可从培养基或腹水,如上文针对多克隆抗体所述进行纯化。

[0567] 可替代地,抗CD73单克隆抗体(例如,MEDI9447,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)以及其抗原结合片段也可使用重组DNA方法(如例如美国专利号4,816,567所述的)制备。编码单克隆抗体的多核苷酸是从成熟B细胞或杂交瘤细胞,诸如通过RT-PCR,利用特异性扩增编码抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸引物分离,且它们的序列是利用常规程序测定。然后将编码重链和轻链的分离的多核苷酸克隆到合适表达载体中,这些载体在转染进入不产生免疫球蛋白的宿主细胞,诸如大肠杆菌细胞、类人猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞中时,通过这些宿主细胞生产单克隆抗体。还有,所期望物种的重组抗CD73单克隆抗体或其抗原结合片段可从表达如所述的期望物种的CDR的噬菌体展示文库分离(麦卡弗蒂(McCafferty)等人,1990,自然348:552-554;克拉克森(Clarkson)等人,1991,自然352:624-628;和马克斯(Marks)等人,1991,分子生物学杂志222:581-597)。

[0568] 编码抗CD73抗体(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段的一种或多种多核苷酸可进一步以多种不同方式使用重组DNA技术修饰以产生供选择的抗体。在一些方面中,例如,小鼠单克隆抗体的轻链和重链的恒定结构域可以被(1)例如人抗体的那些区域取代以便产生嵌合抗体或被(2)非免疫球蛋白多肽取代以便产生融合抗体。在一些方面中,截断或去除这些恒定区以便产生单克隆抗体的所希望的抗体片段。定点诱变或高密度诱变可变区可以用于优化单克隆抗体的特异性、亲和性等等。

[0569] 在某些方面,该抗CD73抗体(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片

段是人抗体或其抗原结合片段。可以使用本领域已知的不同技术来直接制备人抗体。可以产生在体外免疫的或从产生针对靶抗原的抗体的免疫个体分离的永生化人B淋巴细胞(参见,例如,科尔(Cole)等人,单克隆抗体和癌症疗法(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy),艾伦R.丽思出版社(Alan R.Liss),第77页(1985);伯默(Boemer)等人,1991,免疫学杂志(J.Immunol.) 147(1):86-95;以及美国专利5,750,373)。

[0570] 另外,该抗CD73人抗体(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段可以选自噬菌体文库,其中该噬菌体文库表达人抗体,如描述于例如沃恩(Vaughan)等人,1996,自然生物技术(Nat.Biotech.), 14:309-314,希茨(Sheets)等人,1998,美国国家科学院院刊95:6157-6162,胡根布姆(Hoogenboom)和温特(Winter),1991,分子生物学杂志227:381,和马克斯等人,1991,分子生物学杂志222:581)中所述的人抗体。用于生成和使用抗体噬菌体文库的技术还描述在美国专利号5,969,108;6,172,197;5,885,793;6,521,404;6,544,731;6,555,313;6,582,915;6,593,081;6,300,064;6,653,068;6,706,484;和7,264,963;和罗思(Rothe)等人,2007,分子生物学杂志,doi:10.1016/j.jmb.2007.12.018(其中每一个通过引用以其全文结合)。

[0571] 亲和力和成熟策略和链改组策略(马克斯等人,1992,生物/技术(Bio/Technology) 10:779-783,通过引用以其全文结合)在本领域中是已知的,且可用于产生高亲和力人抗体或其抗原结合片段。

[0572] 在一些方面,该抗CD73单克隆抗体(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)可以是人源化抗体。用于工程化、人源化或表面重修非人抗体或人抗体的方法也可以使用并且是本领域熟知的。人源化、表面重修或类似工程化抗体可以具有来自非人类来源的一个或多个氨基酸残基,该来源例如但不限于,小鼠、大鼠、兔子、非人类灵长动物或其他哺乳动物。这些非人类氨基酸残基被经常称为“输入”残基的残基替代,这些残基典型地取自已知人序列的“输入”可变结构域、恒定结构域或其他结构域。此类输入序列可以用于降低免疫原性或减小、增强或修饰结合、亲和力、结合速率、解离速率、亲合力、特异性、半衰期、或如本领域已知的任何其他适合的特征。一般来说,CDR残基直接且最实质性地参与影响CD73结合。因此,保持部分或全部非人类或人类CDR序列,同时可变区和恒定区的非人类序列可以被人类或其他氨基酸替换。

[0573] 抗体还可以任选地人源化、表面重修、工程化或人抗体工程化,保留针对CD73抗原的高亲和力以及其他有利生物性质。为实现这个目标,人源化(或人类)或工程化抗CD73抗体以及表面重修的抗体可任选地通过利用亲本、工程化和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念人源化和工程化产物制备。三维免疫球蛋白模型是通常可得到的并且对于本领域普通技术人员而言是熟悉的。说明并展示所选择的候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序是可获得的。检查这些展示允许分析残基在候选免疫球蛋白序列功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原如CD73的能力的残基。按照此方式,可以从一致的并且输入的序列中选择并且组合框架(FW)残基,这样使得所希望的抗体特征,例如增加一种或多种靶抗原的亲合性得以实现。

[0574] 可以使用任何已知的方法进行抗CD73抗体(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段的人源化、表面重修或工程化,这些方法诸如但不限于描述于以下的那些,琼斯(Jones)等人,自然(Nature) 321:522(1986);里希曼(Riechmann)等人,自然332:323

(1988); 费尔海恩 (Verhoeyen) 等人, 科学 (Science) 239:1534 (1988)), 西姆斯 (Sims) 等人, 免疫学杂志 (J. Immunol) 151:2296 (1993); 乔西亚 (Chothia) 和莱斯克 (Lesk), 分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 196:901 (1987), 卡特 (Carter) 等人, 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 89:4285 (1992); 普雷斯塔 (Presta) 等人, 免疫学杂志 (J. Immunol) 151:2623 (1993), 美国专利号 5,639,641; 5,723,323; 5,976,862; 5,824,514; 5,817,483; 5,814,476; 5,763,192; 5,723,323; 5,766,886; 5,714,352; 5,955,358; 6,204,023; 6,180,370; 6,331,431; 5,693,762; 5,530,101; 5,585,089; 5,225,539; 4,816,567; 5,969,108; 7,635,666; 7,723,270; 7,557,189; 7,538,195; 以及 7,342,110; 国际申请号 PCT/US 98/16280; PCT/US 91/05939; PCT/US 94/01234; PCT/GB 92/01755; 国际专利申请公开号 WO 90/14443; WO 90/14424; WO 90/14430; 以及欧洲专利公开号 EP 229246; 这些中每个都通过引用完全结合在此, 包括其中引用的参考文献。

[0575] 抗CD73人源化抗体和其抗原结合片段也可以在含有人类免疫球蛋白基因座的转基因小鼠中制造, 这些基因座在免疫时能够在没有内源性免疫球蛋白产生存在时产生全套人抗体。这种途径描述在美国专利号 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 和 5,661,016 中。

[0576] 在某些方面, 提供了抗CD73抗体片段 (例如, 来自克隆 10.3 抗体或来自克隆 2C5 抗体的片段)。已知各种用于生产抗体片段的技术。传统上, 这些片段通过完整抗体的蛋白水解衍生 (例如森本 (Morimoto) 等人, 1993, 生物化学和生物物理方法杂志 (Journal of Biochemical and Biophysical Methods) 24:107-117; 布伦南 (Brennan) 等人, 1985, 科学 229:81)。在某些方面, 抗CD73抗体片段是重组地产生。所有 Fab、Fv 和 scFv 抗体片段都可以表达在大肠杆菌或其他宿主细胞中并且从其分泌, 因而允许大量这些片段的产生。此类抗CD73抗体片段也可以从以上讨论的抗体噬菌体文库分离。抗CD73抗体片段也可以是如美国专利号 5,641,870 中所述的线性抗体。用于产生抗体片段的其他技术 (例如化学合成) 对于熟练的从业人员将是清楚的。

[0577] 根据本披露, 技术可经改编以生产对CD73具有特异性的单链抗体 (参见例如, 美国专利号 4,946,778)。此外, 方法可经改编以构建 Fab 表达文库 (参见例如, 休斯 (Huse) 等人, 科学 246:1275-1281 (1989)), 以允许快速且有效地鉴定具有针对CD73或其衍生物、片段、类似物或同系物的期望特异性的单克隆 Fab 片段。抗体片段可通过本领域的技术生产, 包括但不限于: (a) 通过抗体分子的胃蛋白酶消化产生的 F(ab')₂ 片段; (b) 通过减少 F(ab')₂ 片段的二硫键产生的 Fab 片段, (c) 通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子产生的 Fab 片段, 和 (d) Fv 片段。

[0578] 此处披露的抗CD73抗体 (例如克隆 10.3 抗体或克隆 2C5 抗体) 或其抗原结合片段可以被修饰以增加其血清半衰期。这可通过例如使抗体或抗体片段中的合适区域突变将补救受体结合表位并入抗体或抗体片段, 或通过表位并入随后融合在抗体或抗体片段的末端或中部的肽标签 (例如, 通过 DNA 或肽合成) 或通过 YTE 突变来实现。本领域中已知其他增加抗体或其抗原结合片段的血清半衰期的方法, 例如, 融合至异源分子诸如 PEG。

[0579] 异源轭合物抗CD73抗体 (例如克隆 10.3 抗体或克隆 2C5 抗体) 以及其抗原结合片段也在本披露范围内。异源轭合物抗体由两个共价结合的抗体组成。此类抗体已经例如被建议用于将免疫细胞靶向非期望的细胞 (参见例如, 美国专利号 4,676,980)。预期异源轭合物

抗CD73抗体(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)以及其抗原结合片段可以使用合成蛋白化学中已知的方法(包括涉及交联剂的那些)进行体外制备。例如,免疫毒素可利用二硫化物交换反应或通过形成硫醚键构建。适合此目的的试剂的实例包括亚胺硫醇和甲基-4-巯基丁亚氨酸酯(methyl-4-mercaptobutyrimidate)。

[0580] 在某些方面,此处披露的CD73结合分子例如抗体(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段可以与其他治疗剂组合(例如,在组合疗法中)或它们可以与至少一个异源部分融合(例如,基因融合,以形成融合蛋白)或轭合(例如,化学轭合或酶轭合)。因此,此处披露的CD73结合分子,它们可以与其他治疗剂或毒素融合或轭合以形成免疫轭合物和/或融合蛋白。本披露也提供包括此处披露的CD73结合分子中至少一个的抗体-药物轭合物(ADC),所述CD73结合分子中至少一个被衍生化或连接(例如,化学地或重组地)至另一个分子(例如,肽、小药物分子、可检测分子等)。通常,抗CD73抗体或其部分被衍生化以使得它们结合CD73不受衍生化或标记的不利影响。因此,本披露的抗CD73抗体以及抗体部分旨在包括完整和修饰形式的此处所述的抗CD73结合分子两者。例如,此处披露的抗CD73结合分子或其CD73结合部分可以功能性地连接(通过化学偶联、基因融合、非共价关联、或其他)至一个或多个其他分子实体诸如细胞毒性剂、药剂、检测剂、和/或蛋白或肽,这些分子实体可介导该抗CD73结合分子与另一个分子(例如链霉抗生物素蛋白核心区或多组氨酸标签)的结合。

[0581] 一个类型的衍生化分子可以通过交联两个或更多个分子实体例如此处披露的抗CD73结合分子和治疗剂(例如,细胞毒素诸如微管溶素或MEDI1508)来产生。适合的交联剂包括如下那些,异双功能的,即具有被适合的间隔子分离的两个具不同反应性的基团(例如,m-马来酰亚胺基苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯);或同双功能的(例如,辛二酸二琥珀酰亚胺)。此类交联剂可从例如皮尔斯化学公司(Pierce Chemicals),罗克福德,II获得。另外的双功能偶联剂包括N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二巯基)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯、亚氨基硫烷(IT)、亚胺酯的双功能衍生物(例如己二亚氨盐酸二甲酯(dimethyl adipimidate HCL))、活化酯(例如辛二酸二琥珀酰亚胺)、醛(例如戊二醛)、双-叠氮化合物(例如双(对-叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双-重氮衍生物(例如双-(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(例如甲苯2,6-二异氰酸酯)、以及双-活性氟化合物(例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

[0582] 另一个类型的衍生化分子可以通过结合可检测标记来产生。有用的检测剂包括荧光化合物(例如,荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、5-二甲胺-1-萘磺酰基氯化物、藻红蛋白、镧系元素磷光体等)、有益于检测的酶(例如,辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酯酶、葡萄糖氧化酶等)、次级报告物识别的表位(例如,亮氨酸拉链对序列、二级抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签等)。在一些方面,可检测标记可以通过至少一个间隔臂衔接。间隔臂可以具有不同的长度以减少潜在的空间位阻。

[0583] 此处披露的抗CD73结合分子也可用放射性标记的氨基酸来标记。放射性标记可用于诊断和治疗目的两者。例如,放射性标记可用以通过X射线或其他诊断技术诸如正电子发射断层扫描(PET)来检测CD73表达细胞。

[0584] 此外,放射性标记可治疗地用作CD73表达细胞的毒素,诸如引起不想要的免疫应答的那些。多肽的标记的实例包括但不限于以下放射性同位素或放射性核素: ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、

^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 以及 ^{131}I 。在一些方面,该抗CD73结合分子可以用显像时可检测的顺磁性、放射性、或荧光离子来标记。在一些方面,顺磁性离子是铬(III)、锰(II)、铁(III)、铁(II)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、钆(III)、钐(III)、镱(III)、钆(III)、钒(II)、铽(III)、镨(III)、钬(III)或铒(III)。在其他方面,放射性离子是碘-123、镓-67、铟-111、镱-188、镱-186、铜-67、碘-131、钐-90、碘-125、碲-125和镓-67。在其他方面,该抗CD73结合分子是用X射线显像剂诸如镧(III)、金(III)、铅(II)和铋(III)标记的。此处披露的抗CD73结合分子也可用化学基团例如聚合物诸如聚乙二醇(PEG)、甲基基团、乙基基团、或碳水化合物基团衍生化。这些基团可用于改善抗体的生物学特征,例如用以增加血清半衰期或增加组织结合。

[0585] 术语“细胞毒剂”如在此使用的是广泛定义的并且是指抑制或阻止细胞的功能和/或造成细胞破坏(细胞死亡)、和/或施加抗肿瘤/抗增生作用的一种物质。例如,细胞毒性试剂可直接或间接防止赘生性肿瘤细胞的发育、成熟、或扩散。该术语还包括仅引起抑制细胞生长效应并且不仅仅是细胞毒性效应的此类试剂。该术语包括如下指出的化疗剂,连同其他CD73拮抗剂、抗血管生成剂、酪氨酸激酶抑制剂、蛋白激酶A抑制剂、细胞因子家族的成员、放射性同位素、以及毒素如细菌、真菌、植物或动物来源的酶促活性毒素。

[0586] 术语“化疗剂”是包括天然或合成的化学化合物的术语“细胞毒剂”的子集。化疗剂的实例包括烷化剂,例如氮芥、乙烯亚胺化合物、烷基磺酸盐和具有烷基化作用的其他化合物,例如亚硝基脲、顺铂和达卡巴嗪;抗代谢物,例如叶酸、嘌呤或嘧啶拮抗剂;有丝分裂抑制剂,例如长春花生物碱、和鬼臼毒素衍生物;细胞毒性抗生素和喜树碱衍生物。其他化疗剂是氨磷汀(ETHYOL®)、顺铂、达卡巴嗪(DTIC)、更生霉素、二氯甲基二乙胺(氮芥)、链霉素、环磷酰胺、卡氮芥(BCNU)、洛莫司汀(CCNU)、多柔比星(ADRIAMYCIN®)、多柔比星立波(doxorubicin lipo)(DOXIL®)、吉西他滨(GEMZAR®)、柔红霉素、柔红霉素立波(daunorubicin lipo)(DAUNOXOME®)、丙卡巴肼、丝裂霉素、阿糖胞苷、依托泊苷、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶(5-FU)、长春碱、长春新碱、博来霉素、紫杉醇(TAXOL®)、多西他赛(TAXOTERE®)、阿地白介素、门冬酰胺酶、白消安、卡铂、克拉屈滨、喜树碱、CPT-11、10-羟基-7-乙基-喜树碱(SN38)、吉非替尼(IRESSA®)、达卡巴嗪、氟尿苷、氟达拉滨、羟基脲、异环磷酰胺、伊达比星、美司钠、干扰素 α 、干扰素 β 、伊立替康、米托蒽醌、托泊替康、亮丙瑞林、甲地孕酮、美法仑、巯基嘌呤、普卡霉素、米托坦、培门冬酶、喷司他丁、哌泊溴烷、普卡霉素、链佐星、他莫昔芬、替尼泊苷、睾丸酯、硫鸟嘌呤、塞替派、尿嘧啶氮芥、长春瑞滨、苯丁酸氮芥芳香酶抑制剂及其组合。

[0587] 出于本披露的目的,应理解修饰的抗CD73抗体或其抗原结合片段可包括任何类型的提供该抗体或多肽与CD73的结合的可变区。在这点上,可变区可包含或衍生自可诱导增加体液应答并生成针对期望的肿瘤相关抗原的免疫球蛋白的任何类型的哺乳动物。正因如此,修饰的抗CD73抗体或其抗原结合片段的可变区可以是例如人类、鼠类、非人类灵长类动物(例如,食蟹猴、猕猴等)或羽扇豆来源。在一些方面,修饰的抗CD73抗体或其抗原结合片段的可变区和恒定区是人类的。在其他方面,相容性抗体的可变区(通常源自非人类来源)可经工程化或专门定制来改善结合性质或减少分子的免疫原性。在这点上,可变区可经人

源化或通过纳入导入的氨基酸序列改变。

[0588] 在某些方面,抗CD73抗体(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段的重链和轻链中的可变结构域通过至少部分替换一个或多个CDR和(如果必要)通过部分框架区域替换和序列改变而改变。虽然CDR可来自与框架区所得自的抗体相同的类别或甚至子类别的抗体,但是设想CDR将来自不同类别的抗体并且在某些方面来自不同种类的抗体。不必用来自供体可变区的完整CDR来替换所有CDR以便将一个可变域的抗原结合能力转移至另一个。而是,只需要转移维持抗原结合位点的活性所必需的那些残基。考虑到美国专利号5,585,089、5,693,761以及5,693,762中所阐明的解释,本领域技术人员完全有能力通过进行常规实验或通过逐次逼近试验(trial and error testing)来获得具有减少的免疫原性的功能抗体。

[0589] 尽管对可变区进行改变,本领域的普通技术人员将知道,该修饰的抗CD73抗体(例如,修饰的克隆10.3抗体或修饰的克隆2C5抗体)或其抗原结合片段将包括抗体(例如全长抗体或其免疫反应性片段),其中一个或多个恒定区结构域的至少一部分已被缺失或以其他方式改变,以提供期望的生物化学特征,诸如与包含天然或未改变的恒定区且具有大约相同的免疫原性的抗体相比时增加的肿瘤定位或减少的血清半衰期。在一些方面,修饰的抗体的恒定区包含人类恒定区。与此兼容的对此处披露的抗CD73分子的恒定区的修饰包括一个或多个结构域中的一个或多个氨基酸的添加、缺失或取代。即,本文披露的修饰的抗体可包含对三个重链恒定结构域(CH1、CH2或CH3)中的一个或多个和/或对轻链恒定结构域(CL)的改变或修饰。在一些方面,考虑了修饰的恒定区,其中一个或多个结构域部分或全部缺失。在一些方面,修饰的抗体将包含缺失结构域的构建体或变体,其中整个CH2结构域被移除(Δ CH2构建体)。在一些方面,省略的恒定区结构域将被短氨基酸间隔区(例如,10个残基)替换,该间隔区提供通常由不存在的恒定区所赋予的一定分子柔性。

[0590] 除它们的构型以外,本领域中已知恒定区介导几种效应子功能。例如,补体的C1组分与抗体的结合活化补体系统。补体的活化在细胞病原体的调理作用和裂解方面是重要的。补体的活化还刺激炎症应答并且还可以涉及在自身免疫性超敏反应之中。此外,抗体经由Fc区来结合至细胞,其中抗体Fc区上的Fc受体位点结合至细胞上的Fc受体(FcR)。存在许多对于不同类别的抗体具有特异性的Fc受体,包括IgG(γ 受体)、IgE(η 受体)、IgA(α 受体)、以及IgM(μ 受体)。抗体与细胞表面上的Fc受体的结合触发许多重要并且多样的生物应答,包括抗体包覆的颗粒的吞噬和破坏、免疫复合物的清除、杀伤细胞裂解抗体包覆的靶细胞(称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,或ADCC)、炎症介体的释放、胎盘转运、以及对免疫球蛋白产生的控制。

[0591] 在某些方面,该抗CD73抗体(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段提供改变的效应子功能,进而影响给予的抗体或其抗原结合片段的生物学特征。例如,恒定区的缺失或失活(经由点突变或其他手段)可减少循环的修饰抗体的Fc受体结合,从而增加肿瘤定位。在其他情况下,与本披露一致的,恒定区修饰可以缓和补体结合并且因而减少结合的细胞毒素的血清半衰期和非特异性关联。恒定区的又其他修饰可以用于消除二硫键或寡糖部分,从而允许由于抗原特异性或抗体灵活性增加而增强定位。相似地,根据本披露对恒定区的修饰可容易地利用技术人员认知范围内的熟知的生物化学或分子工程技术进行。

[0592] 在某些方面,作为抗体(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段的此处披露的CD73结合分子不具有一个或多个效应子功能。例如,在一些方面,该抗体或其抗原结合片段无抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性和/或无补体依赖性细胞毒性(CDC)活性。在某些方面,该抗CD73抗体或其抗原结合片段不结合至Fc受体和/或补体因子。在某些方面,该抗体或其抗原结合片段无效应子功能。

[0593] 应注意,在某些方面,该抗CD73修饰的抗体或其抗原结合片段可以被工程化以将CH3结构域直接融合到相应的修饰抗体或其片段的铰链区。在其他构建体中,所期望的可以在铰链区与修饰的CH2和/或CH3结构域之间提供肽间隔区。例如,可表达相容性构建体,其中CH2结构域已经缺失,且剩余的CH3结构域(修饰的或未修饰的)与具有5-20个氨基酸间隔区的铰链区结合。可添加此间隔区,例如以确保恒定结构域的调节元件保持游离且可接触,或者铰链区保持柔性。然而,应注意,在一些情况中,氨基酸间隔区可被证明具有免疫原性,并引发针对构建体的非所需免疫应答。因此,在某些方面,添加至构建体的任何间隔区都将是相对无免疫原性的,或甚至被完全省略,以维持修饰的抗体的期望生物化学性质。

[0594] 除了全部恒定区结构域的缺失,将理解本披露的抗CD73抗体和其抗原结合片段可以通过几个或甚至单个氨基酸的部分缺失或取代来提供。例如,CH2结构域中的选定区域中的单个氨基酸的突变可足以实质性地减少Fc结合,且从而增加肿瘤定位。相似地,所期望的可以是仅仅使控制待调节的效应子功能(例如,补体C1q结合)的一个或多个恒定区结构域部分缺失。恒定区的这类部分缺失可改善该抗体或其抗原结合片段的选定特性(例如,血清半衰期),同时使与受试者恒定区结构域相关的其他期望功能保持完整。此外,正如上面提到的,所披露的抗CD73抗体和其抗原结合片段的恒定区可通过一个或多个氨基酸的突变或取代修饰,这增强最终构建体的特征。在这个方面,可干扰保守结合位点(例如,Fc结合)所提供的活性,同时基本上维持修饰的抗体或其抗原结合片段的构型和免疫原性特征。某些方面可包括向恒定区添加一个或多个氨基酸以增强期望特性,诸如减少或增加效应子功能,或提供更多细胞毒素或碳水化合物附接。在这些方面,可以希望插入或复制源自选定的恒定区结构域的特定序列。

[0595] 本披露也提供与此处列出的嵌合、人源化和人抗CD73抗体或其抗原结合片段基本同源的变体和等效物。这些可以包含例如保守取代突变,即通过类似的氨基酸取代一个或多个氨基酸。例如,保守取代是指用相同通用类别内的另一个氨基酸取代一个氨基酸,如例如,用另一个酸性氨基酸取代一个酸性氨基酸、用另一个碱性氨基酸取代一个碱性氨基酸或用另一个中性氨基酸取代一个中性氨基酸。保守氨基酸取代所指的内容在本领域是熟知的。

[0596] 抗CD73抗体或其抗原结合片段可以被进一步修饰为包含通常不是蛋白质的一部分的另外的化学部分。那些衍生的部分可以改善蛋白质的溶解性、生物半衰期、或吸收。这些部分还可以减少或消除蛋白质的任何所希望的副作用等。对那些部分的综述可以发现雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences),第20版,马克出版公司(Mack Publishing Co.),伊斯顿,宾夕法尼亚州(2000)中。

[0597] VI. 编码CD73结合分子的多核苷酸

[0598] 在某些方面,本披露涵盖包括编码特异性地结合CD73或其抗原结合片段的多肽的核酸序列的多核苷酸。例如,本披露提供包括编码抗CD73抗体(例如克隆10.3抗体或克隆

2C5抗体)或编码这样一种抗体的抗原结合片段的核酸序列的多核苷酸。本披露的多核苷酸可以处于RNA形式或处于DNA形式。DNA包括cDNA、基因组DNA和合成DNA;并且可以是双链的或单链的,并且如果是单链的话,可以是编码链或非编码(反义)链。

[0599] 在某些方面中,多核苷酸是分离的。在某些方面中,多核苷酸是基本上纯的。在某些方面中,多核苷酸包含在相同阅读框中融合至有助于例如多肽表达和多肽从宿主细胞分泌的多核苷酸(例如,充当用于控制多肽从细胞运输的分泌序列的前导序列)的成熟多肽的编码序列。具有前导序列的多肽是前蛋白质并且可以使得前导序列被宿主细胞裂解以形成成熟形式的多肽。这些多核苷酸也可编码CD73结合蛋白原,该蛋白原是成熟蛋白质加额外的5'氨基酸残基。

[0600] 在某些方面,这些多核苷酸包括成熟CD73结合多肽例如抗CD73抗体(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段的编码序列,该编码序列在相同阅读框中与允许例如纯化该编码多肽的标记物序列融合。例如,在细菌宿主的情况下,该标记物序列可以由pQE-9载体供给的六聚组氨酸标签以便提供对融合至该标记物的成熟多肽的纯化,或者当使用哺乳动物宿主(例如,COS-7细胞)时,该标记物序列可以是来源于流感病毒血凝素蛋白的血球凝集素(HA)标签。

[0601] 本披露也提供编码例如此处披露的CD73结合分子(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)的CD73结合片段、类似物以及衍生物的所述多核苷酸的变体。

[0602] 这些多核苷酸变体可以含有在编码区、非编码区、或两者中的改变。在一些方面中,这些多核苷酸变体含有产生沉默取代、添加、或缺失而不改变编码的多肽的特性或活性的改变。在一些方面中,核苷酸变体由归因于遗传密码的简并性的沉默取代产生。多核苷酸变体可以因为各种原因而产生,例如,为了优化特定宿主的密码子表达(将人mRNA中的密码子改变成诸如大肠杆菌的细菌宿主优选的那些密码子)。还提供包含在此描述的多核苷酸的载体和细胞。

[0603] 在一些方面,编码CD73结合分子例如抗CD73抗体(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段的DNA序列可以使用寡核苷酸合成仪通过化学合成来构建。此类寡核苷酸可以是基于所希望的多肽的氨基酸序列并且选择在宿主细胞(其中将产生感兴趣的重组多肽)中偏爱的那些密码子来设计。标准方法可以用于合成编码感兴趣的分离多肽的分离多核苷酸序列。例如,完整氨基酸序列可以用于构建反-翻译基因。此外,可以合成含有编码特定分离多肽的核苷酸序列的DNA寡聚体。例如,可以合成并且然后连接几个编码所希望多肽部分的小寡核苷酸。个体的寡核苷酸典型地含有用于互补组装的5'或3'突出端。

[0604] 一旦组装(通过合成、定点诱变或另一种方法),编码特定的感兴趣的分离多肽的多核苷酸序列将被插入表达载体中并且操作性地连接到适于在所希望宿主中表达该蛋白质的表达控制序列。可以通过核苷酸测序、限制酶切作图以及表达适合宿主中的生物活性多肽来确认适当的组装。如本领域中所熟知的,为了在宿主中获得高表达水平的转染基因,该基因必须操作性地连接到在选择表达宿主中起作用的转录和翻译表达控制序列。

[0605] 在某些方面,重组表达载体用于扩增和表达编码抗CD73抗体(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段的DNA。重组表达载体是可复制的DNA构建体,它具有编码抗CD73抗体的多肽链或和其抗原结合片段的合成的或cDNA来源的DNA片段,操作性地连接到来源于哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因的适合的转录和翻译调控元件。

[0606] 转录单位总体上包含以下组件：(1) 基因表达中具有调节作用的一个或多个遗传元件，例如转录启动子或增强子，(2) 转录成mRNA并翻译成蛋白质的结构序列或编码序列，以及(3) 适当的转录和翻译启动和终止序列，如以下详细描述。此类调控元件可以包括用于控制转录的操纵子序列。可以另外掺入通常赋予在宿主中进行复制的能力的复制起点以及有助于识别转化体的选择基因。当DNA区域在功能上彼此相关时，将它们可操作地连接。例如，将信号肽(分泌性前导子)的DNA可操作地连接多肽的DNA，如果它被表达为参与多肽的分泌的前体的话；将启动子可操作地连接至编码序列，如果它控制该序列的转录的话；或将核糖体结合位点可操作地连接至编码序列，如果它被定位地允许翻译的话。旨在用于在酵母表达系统中使用的结构元件包括前导子序列，它使得宿主细胞可以将翻译的蛋白质分泌到胞外。可替代地，在无需前导子或转运序列表达重组蛋白质的情况下，它可以包括N-端甲硫氨酸残基。随后，此残基可以任选地被从表达的重组蛋白上裂解下来，以提供终产物。

[0607] 表达控制序列和表达载体的选择将取决于宿主的选择。可以采用多种多样的表达宿主/载体组合。对于真核宿主有用的表达载体包括例如含有来自SV40、牛乳头瘤病毒、腺病毒、以及巨细胞病毒的表达控制序列的载体。对于细菌宿主有用的表达载体包括已知细菌质粒，诸如来自大肠杆菌的质粒，包括pCR 1、pBR322、pMB9以及其衍生物，更广泛的宿主范围质粒，诸如M13和丝状单链DNA噬菌体。

[0608] 用于在适当启动子的控制下表达CD73结合分子例如抗CD73抗体(例如，克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段的适合的宿主细胞包括原核生物、酵母、昆虫或高等真核细胞。原核细胞包括革兰阴性或革兰阳性生物体，例如大肠杆菌或杆菌。高等真核细胞包括如下所述哺乳动物起源的已建立的细胞系。还可以采用无细胞翻译系统。用于细菌、真菌、酵母菌、以及哺乳动物细胞宿主的适当的克隆和表达载体由波韦尔斯(Pouwels)等人(克隆载体：实验室手册(Cloning Vectors:A Laboratory Manual)，纽约爱思唯尔公司(Elsevier,N.Y.)，1985)描述，该文献的相关披露通过引用结合在此。关于蛋白质产生(包括抗体产生)方法的其他信息可以在例如美国专利公开号2008/0187954、美国专利号6,413,746、6,660,501和7,932,087中找到，这些专利各自通过引用以其全文结合在此。

[0609] 各种哺乳动物或昆虫细胞培养系统也可以有利地用于表达重组CD73结合分子，例如抗CD73抗体(例如，克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段。可以在哺乳动物细胞中进行重组蛋白质的表达，因为此类蛋白质总体上被正确地折叠，适当地修饰并且完全起作用。

[0610] 适合的哺乳动物宿主细胞系的实例包括HEK-293和HEK-293T、由格卢兹曼(Gluzman)(细胞23:175,1981)描述的猴肾细胞的COS-7系、以及包括例如L细胞、C127、3T3、中国仓鼠卵巢(CHO)、NS0、HeLa以及BHK细胞系的其他细胞系。哺乳动物表达载体可以包含非转录元件，诸如复制原点、连接有待表达的基因的适合的启动子和增强子、以及其他5'或3'侧接非转录序列、以及5'或3'非翻译序列(诸如必要的核糖体结合位点、聚腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点)，以及转录终止序列。用于产生昆虫细胞中的异源蛋白质的杆状病毒系统通过卢科和萨莫斯(Luckow和Summers)，生物技术(BioTechnology)6:47(1988)评价。

[0611] 可以根据任何适合方法纯化通过转化宿主产生的CD73结合分子例如抗CD73抗体(例如，克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段。此类标准方法包括色谱法(例如，

离子交换色谱、亲和色谱以及尺寸分级柱色谱)、离心、差别溶解度,或者通过用于蛋白质纯化的任何其他标准技术。亲和标签诸如六组氨酸、麦芽糖结合域、流感外壳序列以及谷胱甘肽-S-转移酶可以附接至蛋白质,以便允许蛋白质通过合适的亲和柱后较容易地得到纯化。还可以使用诸如蛋白质水解、核磁共振和x射线结晶的此类技术来物理性表征分离的蛋白质。

[0612] 例如,可以首先使用商业上可获得的蛋白浓缩过滤器例如艾美康恩(AMICON)®或密理博皮里康恩(Millipore PELLICON)®超滤单元浓缩来自将重组蛋白分泌到培养基中的系统的上清液。浓缩步骤之后,浓缩物可以施加到适合的纯化基质。可替代地,可以采用阴离子交换树脂,例如具有侧接的二乙氨基乙基(DEAE)基团的基质或基底。基质可以是丙烯酰胺、琼脂糖、右旋糖酐、纤维素或在蛋白质纯化中常用的其他类型。可替代地,可以采用阳离子交换步骤。适合的阳离子交换剂包括含有磺丙基或羧甲基的各种不可溶基质。最后,可以使用采用疏水性RP-HPLC介质(例如,具有侧接甲基或其他脂族基团的硅胶)的一个或多个反相高效液相色谱(RP-HPLC)步骤,以便进一步纯化CD73结合分子(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)。还可以采用不同组合的一些或所有上述纯化步骤以便提供均质的重组蛋白。

[0613] 细菌培养物中产生的重组CD73结合蛋白例如抗CD73抗体(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段可例如通过开始从细胞沉淀物提取,接着进行一个或多个浓缩、盐析、水离子交换或尺寸排阻色谱步骤分离。可以采用高效液相色谱(HPLC)进行最终纯化步骤。用于重组蛋白表达的微生物细胞可以通过任何常规方法来破坏,这些方法包括冻融循环、超声处理、机械破坏或使用细胞裂解剂。

[0614] 用于纯化抗体和其他蛋白质的本领域已知的方法还包括,例如在美国专利公开号2008/0312425、2008/0177048以及2009/0187005中描述的那些,这些专利各自通过引用以其全部内容结合在此。

[0615] 在某些方面,该CD73结合分子是不为抗体的多肽。本领域中已知各种鉴定和产生以高亲和力结合至蛋白质标靶的非-抗体多肽的方法。参见例如,斯科拉(Skerra),生物技术的最新观点(Curr.Opin.Biotechnol.) 18:295-304 (2007), 霍斯(Hosse)等人,蛋白质科学(Protein Science) 15:14-27 (2006), 吉尔(Gill)等人,生物技术的最新观点17:653-658 (2006), 尼格伦(Nygren), 欧洲生化联盟杂志(FEBS J.) 275:2668-76 (2008), 和斯科拉,欧洲生化联盟杂志275:2677-83 (2008), 其中每一个通过引用以其全文结合在此。在某些方面,可使用噬菌体展示技术来鉴定/产生CD73结合多肽。在某些方面,多肽包含一类选自下组的蛋白骨架,该组由以下各项组成:蛋白A、脂质运载蛋白、纤连蛋白结构域(例如,纤连蛋白结构域诸如肌腱蛋白-3Fn III结构域)、锚蛋白共有重复结构域和硫氧还蛋白。

[0616] VI. 使用治疗性抗CD73抗体的治疗方法

[0617] 本披露提供针对使用抗CD73结合分子例如抗体(包括其抗原结合片段、变体、以及衍生物)(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)以治疗患有与CD73表达或CD73-表达细胞相关的疾病(例如,癌症)的患者的方法。在一些特定方面,此类癌症是肺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠直肠癌、膀胱癌、胰腺癌、肾癌、胃癌、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌和淋巴瘤。

[0618] “CD73-表达细胞”意指表达CD73的细胞。CD73可以通过糖基-磷脂酰肌醇锚定而被膜结合并且也呈现为可溶蛋白。用于检测细胞和其他适合样品中的CD73表达的方法是本领域

域中众所周知的,且包括但不限于免疫组织化学、流式细胞术、蛋白质印迹、ELISA等。

[0619] 尽管以下讨论是指用本披露的CD73结合分子(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)对不同疾病和障碍的诊断方法及治疗,此处描述的方法也适用保留此处披露的抗CD73抗体的期望特性例如能够特异性地结合CD73和中和其5'-核苷酸酶活性的任何其他抗CD73抗体以及这些抗CD73抗体的抗原结合片段、变体和衍生物(例如,融合蛋白或轭合物)。在一些方面,CD73结合分子是不会介导人ADCC的人或人源化抗体,或是工程化使其不会介导ADCC的抗CD73抗体。

[0620] 在一些方面,该CD73结合分子是CD730010抗体或其抗原结合片段,克隆10.3抗体或其抗原结合片段,CD730002抗体或其抗原结合片段,克隆2C5抗体或其抗原结合片段,或CD73004抗体或其抗原结合片段。在其他方面,该CD73结合分子是克隆10.3突变抗体。在一些方面,该CD73结合分子是克隆10.3单克隆抗体。在一些方面,该CD73结合分子是被工程化以延长血清半衰期的克隆10.3单克隆抗体。在其他方面,该CD73结合分子是克隆10.3YTE突变抗体。在其他方面,该CD73结合分子是克隆2C5突变抗体。在一些方面,该CD73结合分子是克隆2C5单克隆抗体。在一些方面,该CD73结合分子是被工程化以延长血清半衰期的克隆2C5单克隆抗体。在其他方面,该CD73结合分子是克隆2C5YTE突变抗体。

[0621] 在一个方面,治疗包括向受试者或患者施用或给予本披露的抗CD73结合分子例如抗体(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或者其抗原结合片段、变体、或衍生物,或向从受试者或患者分离的组织或细胞系施用或给予该抗CD73结合分子,其中该受试者或患者具有一种疾病、一种疾病症状、或一种疾病的易患病体质。在另一个方面,治疗也旨在包括向受试者或患者施用或给予包括本披露的抗CD73结合分子例如抗体或其抗原结合片段、变体、或衍生物的药物组合物,或向从受试者或患者分离的组织或细胞系施用或给予包括该抗CD73结合分子的药物组合物,该受试者或患者具有一种疾病、一种疾病症状、或一种疾病的易患病体质。

[0622] 本披露的抗CD73结合分子,例如抗体(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或者其抗原结合片段、变体、或衍生物可用于治疗不同癌症。在一个方面,本披露提供抗CD73结合分子,例如抗体(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或者其抗原结合片段、变体、或衍生物,用以作为药剂,具体而言该药剂用以治疗或预防癌症(例如,结肠癌、黑色素瘤、乳腺癌、淋巴瘤或非小细胞肺癌何杰金氏淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤、以及伯基特氏淋巴瘤、卵巢癌、乳腺癌、头颈癌、以及胰腺癌)。在一些方面,该癌症呈现促转移表型。在一些方面,呈现促转移表型的癌症是黑色素瘤或乳腺癌。在一些方面,该癌症是转移性癌症。在一些方面,此处披露的抗CD73结合分子可触发适应性抗肿瘤活性和/或抑制转移。在一些具体方面,此处披露的抗CD73结合分子可抑制乳腺癌中的转移。

[0623] 根据本披露的方法,如在此处其他地方所定义的至少一种抗CD73结合分子例如抗体(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或者其抗原结合片段、变体、或衍生物用于促进对于癌症的积极治疗响应。术语对于癌症治疗的“积极治疗响应”是指与这些抗CD73结合分子例如抗体或其抗原结合片段、变体、或衍生物的活性相关的疾病上的改善和/或与该疾病相关的症状上的改善。因此,例如,疾病的改进可被表征为完全响应。通过术语“完全响应”旨在通过任何先前测试结果的归一化,不存在临床上可检测的疾病。可替代地,疾病的改进可以被归类为部分响应。“积极治疗响应”涵盖从此处披露的抗CD73结合分子的给予得到的癌

症的进展和/或持续时间的减少或抑制,癌症的严重性的减少或改进、和/或其一种或多种症状的改进。

[0624] 在具体方面中,此类术语是指给予此处披露的抗CD73结合分子之后以下一种、两种或三种或更多种结果:(1) 癌细胞群的稳定、减少或消除;(2) 癌症生长的稳定化或减少;(3) 癌症形成方面的受损;(4) 原发性、区域性和/或转移性癌症的根除、除去,或控制;(5) 死亡率的降低;(6) 无疾病、无复发、无进展、和/或总存活期、持续时间、或速率的增加;(7) 响应或处于缓解期的患者的响应速率、响应持久性或数目的增加;(8) 住院率的降低,(9) 住院时间的减少,(10) 癌症的尺寸维持并且不增加或增加少于10%、优选少于5%、优选少于4%、优选少于2%,以及(12) 处于缓解期患者的数目的增加。

[0625] 临床响应可以使用筛选技术评定,如磁共振成像(MRI)扫描、x-射线照相成像、计算机断层成像(CT)扫描、流式细胞计量术或荧光活化细胞分选仪(FACS)分析、组织学、宏观病理学、和血液化学,包括但不限于可通过ELISA、RIA、色谱、以及类似物检测的变化。除了这些积极治疗响应之外,正经受用抗CD73结合分子例如抗体或其抗原结合片段、变体、或衍生物进行的治疗的受试者可以经历与该疾病相关的症状的改进的有益效果。

[0626] 该抗CD73结合分子,例如此处披露的抗体(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或者其抗原结合片段、变体、或衍生物,可以用于与已知用于癌症的任何疗法相组合,这些疗法包括已知有用于治疗、或已用于或当前用于治疗癌症(例如,结肠癌、黑色素瘤、乳腺癌、淋巴瘤、非小细胞肺癌何杰金氏淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤、以及伯基特氏淋巴瘤、卵巢癌、乳腺癌、头颈癌、以及胰腺癌)的任何药剂或药剂的组合。该药物组合配制品或给药方案的第二剂或药剂组合优选地与本披露的抗体或多肽具有互补活性,这样它们不会对彼此有不利影响。

[0627] 抗癌剂包括用于治疗恶性肿瘤例如癌性生长的药物。药物疗法可以单独使用,或与其他治疗例如手术或放射疗法组合使用。取决于所涉及器官的性质,若干类型的药物可用于癌症治疗。例如,乳腺癌通常由雌激素刺激,并且可以用灭活性激素的药物进行治疗。类似地,前列腺癌可以用灭活雄激素、男性性激素的药物进行治疗。用于本披露的某些方法中的抗癌剂除其他之外包括抗体(例如,结合IGF-1R的抗体、结合EGFR的抗体、结合Her2的抗体、或结合cMET的抗体),靶向IGF1R的小分子、靶向EGFR的小分子、靶向Her2的小分子、抗代谢物、烷化剂、拓扑异构酶抑制剂、微管靶向剂、激酶抑制剂、蛋白质合成抑制剂、免疫治疗剂、激素治疗剂、糖皮质激素、芳香酶抑制剂、mTOR抑制剂、化疗剂、蛋白激酶B抑制剂、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抑制剂、细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)抑制剂、RLr9、CD289、酶抑制剂、抗TRAIL、MEK抑制剂等。

[0628] 在特定方面,此处披露的CD73结合分子例如抗体(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段可与靶向例如PD-1(程序化死亡1蛋白)、其两种配体PD-L1(程序化死亡配体1)和/或PD-L2、或CTLA-4(细胞毒性T淋巴细胞抗原4蛋白)的抗体或抗体片段组合给予。参见,例如,斯塔格(Stagg)等人PNAS 107:1547-1552(2010);金(Jin)等人癌症研究(Cancer Res.) 70(6):(2010);阿拉德(Allard)等人临床癌症研究(Clin.Cancer Res.) 19:5626(2013),将其通过引用以其全文结合在此。在一些方面,该抗CTLA-4抗体是易普利姆玛或其抗原结合片段。在其他方面,该抗CTLA-4抗体是曲美木单抗(替西木单抗,CP-675,206)或其抗原结合片段。在一些方面,该抗PD-1抗体是派姆单抗(KEYTRUDA®,以前是兰布

罗利珠单抗,也称为MK-3475)或其抗原结合片段。在一些方面,该抗PD-1抗体是纳武单抗(BMS-936558,MDX-1106,ONO-4538,OPDIVA®)或其抗原结合片段。在一些方面,该抗PD-L1抗体是BMS-936559或其抗原结合片段。在其他方面,该抗PD-L1抗体是MPDL3280A。在其他方面,该抗PD-1抗体是AMP-224(抗PD-1 Fc融合蛋白)或其抗原结合片段。在不同方面,该抗PD-L1抗体是MEDI4736或其抗原结合片段。

[0629] 在一些方面,此处披露的CD73结合分子(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)可与抗PD-1或抗PD-1抗体组合给予。在各实施例中,该抗CD73抗体是以约1mg/kg、约2mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约6mg/kg、约7mg/kg、约8mg/kg、约9mg/kg、约10mg/kg、约11mg/kg、约12mg/kg、约13mg/kg、约14mg/kg、约15mg/kg、约16mg/kg、约17mg/kg、约18mg/kg、约19mg/kg、或约20mg/kg的浓度给予。在一些方面,此处披露的CD73结合分子(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)可与抗PD-1、抗PD-L1、或抗CTLA4抗体组合给予,其中该抗PD-1、抗PD-L1、或抗CTLA4抗体是以约1mg/kg、约2mg/kg、约3mg/kg、约4mg/kg、约5mg/kg、约6mg/kg、约7mg/kg、约8mg/kg、约9mg/kg、约10mg/kg、约11mg/kg、约12mg/kg、约13mg/kg、约14mg/kg、约15mg/kg、约16mg/kg、约17mg/kg、约18mg/kg、约19mg/kg、或约20mg/kg的浓度给予。在一些方面,该抗CD73抗体和该抗PD-1抗体、抗PD-L1、或抗CTLA4是以约1:1、1:2、1:3或1:4的比率给予。在一些方面,该抗CD73抗体和该抗PD-1、抗PD-L1、或抗CTLA4抗体是以约1:2的比率给予。在一个特定方面,抗CD73抗体(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)的浓度是约10mg/kg,并且该抗PD-1抗体的浓度是约20mg/kg。在一些方面,此处披露的CD73结合分子(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)可与抗PD-1抗体组合给予。在一些方面,组合治疗的给予,包括此处披露的CD73结合分子(例如,MEDI9447,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)联合抗PD-1、抗PD-L1、或抗CTLA4抗体,相比于未经治疗的受试者或用单疗法(例如,抗PD-1、抗PD-L1、或抗CTLA4抗体,无抗CD73抗体)治疗的受试者,可将存活率提高约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、或约100%。在一些方面,组合治疗的给予,包括此处披露的CD73结合分子(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)联合抗PD-1、抗PD-L1、或抗CTLA4抗体,相比于未经治疗的受试者或用单疗法(例如,抗PD-1、抗PD-L1、或抗CTLA4抗体,无抗CD73抗体)治疗的受试者,可将存活率提高约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9倍、或约10倍。

[0630] 在组合疗法包括给予抗CD73结合分子与给予另一种治疗剂(例如,抗PD-1、抗PD-L1、或抗CTLA4抗体)的组合的情况下,此处披露的方法涵盖使用单独的配制品或单一药物配制品的共同给予,以及以任一顺序连续给予。在一些方面,与其他药物组合给予此处描述的抗CD73抗体(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体),其中该抗体或其抗原结合片段、变体、或衍生物和该一种或多种治疗剂可以按任何顺序或同时(即,同时或在相同的时间框架内)依次给予。

[0631] 该组合疗法可以提供“协同作用”并且证明是“协同的”,即,当这些活性成分一起使用时所实现的效果大于分开使用这些化合物产生的效果的总和。在以下情况下可以得到协同作用,当该活性成分是:(1)同时以组合的单位剂量配制品共配制和给予或递送的;(2)作为分开的配制品通过交替或平行递送的;或(3)通过一些其他方案时。当以交替疗法递送时,当这些化合物是例如,通过分开的注射器的不同注射顺序地给予或递送时,可以达到一种协同作用。总体上,在交替疗法过程中,顺序地,即连续地给予每种活性成分的有效剂

量,而在组合疗法中,一起给予两种或更多种活性成分的有效剂量。

[0632] 在其他方面,此处披露的CD73结合分子(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)可与酪氨酸激酶抑制剂组合给予。在一些其他特定方面,此处披露的CD73结合分子可与具有与EGFR和/或HER2/neu相关的酪氨酸激酶活性的抑制剂例如拉帕替尼组合给予。在一些方面,此处披露的CD73结合分子可与抗有丝分裂剂组合给予。在一些特定方面,此处披露的CD73结合分子可与使有丝分裂纺锤体微管组装稳定化的试剂例如紫杉醇或多西他赛组合给予。另一个方面是抗CD73结合分子例如抗体或者其抗原结合片段、变体、或衍生物(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)用于诊断监测组织中的蛋白水平(作为临床测试程序的部分)例如以确定给定治疗方案的效力的用途。例如,通过使抗体偶联到可检测物质上可促进检测。

[0633] 可检测物质的实例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。合适酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适辅基复合物的实例包括链霉亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素;合适荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的实例包括鲁米诺;生物发光材料的实例包括荧光素酶、萤光素和水母素;合适的放射性材料的实例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。

[0634] VIII. 抗CD73抗体治疗组合和共治

[0635] 本披露提供针对使用治疗组合包括抗CD73结合分子(例如抗体,包括其抗原结合片段、变体、以及衍生物(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体))治疗患有癌症(包括结肠癌、黑色素瘤、乳腺癌、淋巴瘤、非小细胞肺癌何杰金氏淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、卵巢癌、乳腺癌、头颈癌、以及胰腺癌)的患者的方法。

[0636] 尽管以下讨论是指以本披露的CD73结合分子(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)为特色的治疗组合,此处描述的方法也适用保留此处披露的抗CD73抗体的期望特性例如能够特异性地结合CD73和中和其5'-核苷酸酶活性的任何其他抗CD73抗体以及这些抗CD73抗体的抗原结合片段、变体和衍生物(例如,融合蛋白或轭合物)。在一些方面,CD73结合分子是不会介导ADCC的人或人源化抗体,或是工程化使其不会介导ADCC的抗CD73抗体。

[0637] 使用本发明的组合诸如抗CD73抗体或其抗原结合片段与抗PD-1、抗PD-L1、或抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的组合来治疗患有实体瘤的患者可导致累加或协同效应。此处所用的术语“协同”是指比单一疗法的累加效应更加有效的治疗组合(例如,抗CD73抗体(例如,MEDI9447)和抗PD-1、抗PD-L1、或抗CTLA4抗体的组合)。

[0638] 治疗组合(例如,抗CD73抗体(例如,MEDI9447)和抗PD-1、抗PD-L1、或抗CTLA4抗体的组合)的协同效应允许向患有实体瘤的患者使用一种或多种这些治疗剂的更低剂量和/或向患有实体瘤的患者以更少的频率给予所述治疗剂。利用治疗剂的更低剂量和/或以更少频率给予所述疗法的能力减少与向受试者给予所述疗法相关的毒性而不降低所述疗法在实体瘤的治疗中的疗效。此外,协同效应可以导致治疗剂在实体瘤的管理、治疗或改善中的功效增加。治疗剂的组合的协同效应可避免或减少与使用任一单一疗法相关的不良或不需要的副作用。

[0639] 在共治中,抗CD73抗体(例如,MEDI9447)或其抗原结合片段和抗PD-1、抗PD-L1、或抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的组合可以任选地包括在相同药物组合物中,或可包括

在单独的药物组合物中。在后一种情况下,包括抗CD73抗体(例如,MEDI9447)或其抗原结合片段的药物组合物适合在给予包括抗PD-1、抗PD-L1、或抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的药物组合物之前、同时或之后给予。在某些情况下,该抗CD73抗体(例如,MEDI9447)或其抗原结合片段和抗PD-1、抗PD-L1、或抗CTLA4抗体是在单独组合物中以重叠时间给予。

[0640] 抗CD73抗体(例如,MEDI9447)或其抗原结合片段和抗PD-1、抗PD-L1、或抗CTLA4抗体或其抗原结合片段可以仅被给予一次或偶尔给予,而仍然为该患者提供益处。在另外的方面中,该患者被给予另外的后继剂量。可以取决于该患者的年龄、体重、临床评价、肿瘤负荷和/或其他因素(包括主治医生的判断),在不同时间间隔下给予后续剂量。

[0641] 在此提供的这些方法可以减弱或延迟肿瘤生长。在一些方面中,该减小或延迟可以是统计学上显著的。可以通过与基线处的患者肿瘤的生长、针对预期的肿瘤生长、针对基于大的患者群体的预期的肿瘤生长或针对对照群体的肿瘤生长进行比较来测量肿瘤生长的减少。在其他实施例中,本发明的方法提高存活率。

[0642] IX. 抗PD-L1抗体

[0643] 特异性地结合且抑制PD-L1活性(例如,结合到PD-1和/或CD80)的抗体有用于治疗肿瘤。B7-H1,也称为PD-L1,是具有大约53kDa的大小的I型跨膜蛋白。在人中,B7-H1表达于许多免疫细胞类型(包括活化和无变应性的/耗尽的T细胞)上,初试的和活化的B细胞上,连同髓样树突细胞(DC)、单核细胞和肥大细胞上。它还在非免疫细胞上表达,包括胰腺的胰岛、肝脏枯氏细胞、血管内皮和选择的上皮细胞(例如气道上皮细胞和肾小管上皮细胞),其中其表达在炎症发作期间增强。在许多肿瘤上也发现增加水平的B7-H1表达,包括但不限于乳腺、结肠、结肠直肠、肺、肾细胞肿瘤,包括肾细胞癌、胃癌、膀胱癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肝细胞癌(HCC)和胰腺癌以及黑色素瘤。

[0644] 已知B7-H1结合两种可供选择的配体,这些中的第一种,PD-1,是最初在经受激活-诱导凋亡的T细胞系中鉴定的50-55kDa I型跨膜受体。PD-1表达于活化T细胞、B细胞、以及单核细胞连同免疫系统的其他细胞上,并且结合B7-H1(PD-L1)和相关的B7-DC(PD-L2)两者。第二种是B7家族成员B7-1,其表达于活化T细胞、B细胞、单核细胞以及抗原递呈细胞上。

[0645] 通过PD-1/B7-H1轴信号传导被认为通过负面调节T细胞应答在免疫系统内起重要的非冗余功能。肿瘤细胞上的B7-H1表达被认为有助于肿瘤回避免疫系统的检测和消除。B7-H1通过若干供选择的机制在这个方面起作用,包括驱动肿瘤浸润性T淋巴细胞耗尽和失能,刺激免疫抑制细胞因子分泌到肿瘤微环境中,刺激抑制调控T细胞功能并且保护B7-H1表达肿瘤细胞免于被肿瘤细胞特异性细胞毒性T细胞裂解。

[0646] MEDI4736是对B7-H1有选择性的示例性抗PD-L1抗体并且阻断了B7-H1与PD-1和CD80受体的结合。MEDI4736可以在体外解除B7-H1介导的对人T-细胞激活的抑制,并且通过T-细胞依赖性机制在异种移植物模型中抑制肿瘤生长。可使用的其他试剂包括抑制PD-L1和/或PD-1的试剂(AB或其他)。

[0647] 用于在此提供的这些方法中的关于MEDI4736(或其片段)的信息可以见于US 20130034559/US 8779108以及US 20140356353,这些的披露内容通过引用以其全文结合在此。MEDI4736的片段可结晶(Fc)结构域在IgG1重链的恒定结构域中含有三重突变,该三重突变使与负责介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的补体组分C1q和Fc γ 受体的结合减少。

[0648] 用于在此提供的这些方法中的MEDI4736和其抗原结合片段包含重链和轻链或重链可变区和轻链可变区。在一个特定方面,用于在此提供的这些方法中的MEDI4736或其抗原结合片段包含轻链可变区和重链可变区,该轻链可变区包含SEQ ID NO:130的氨基酸序列,该重链可变区包含SEQ ID NO:131的氨基酸序列。在一个特定方面,用于在此提供的这些方法中的MEDI4736或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,其中该重链可变区包含SEQ ID NO:132-134的卡巴特 (Kabat) 定义的CDR1、CDR2和CDR3序列,并且其中该轻链可变区包含SEQ ID NO:135-137的卡巴特定义的CDR1、CDR2和CDR3序列。本领域技术人员将能够容易地鉴定对于本领域技术人员而言已知的乔西亚 (Chothia) 定义、Abm定义或其他CDR定义。在一个特定方面,用于在此提供的这些方法中的MEDI4736或其抗原结合片段包含如在US 20130034559/US 8779108和US 20140356353中所披露的2.14H90PT抗体的可变重链和可变轻链CDR序列,这些中的每个披露内容都通过引用以其全文结合在此。

[0649] X. 抗CTLA4抗体

[0650] 因此,在一个实施例中,本发明的治疗组合包括减少PD1/PD-L1相互作用的CTLA4阻断抗体(例如,曲美木单抗)和/或多个抗体。迄今为止受到显著关注的两个T细胞调控通路通过毒性T淋巴细胞抗原-4 (CTLA4,CD152) 和程序性死亡配体1 (PD-L1,也被称为B7H-1或CD274) 发信号。

[0651] CTLA4在活化的T细胞上表达,并随着CD28介导的T细胞激活作为共抑制剂以抑制T细胞应答。CTLA4被认为在TCR接合之后调节幼稚和记忆性T细胞的早期激活幅度,并且是影响抗肿瘤免疫和自身免疫两者的中央抑制途径的一部分。CTLA4主要在T细胞中表达,并且其配体CD80 (B7.1) 和CD86 (B7.2) 的表达主要限于抗原提呈细胞、T细胞、和其他免疫介导的细胞。已经报道了阻断CTLA4信号通路的拮抗性抗CTLA4抗体增强T细胞激活。一个这样的抗体易普利姆玛在2011年被FDA批准用于转移性黑色素瘤的治疗。另一个抗CTLA4抗体曲美木单抗,在III期临床试验中测试了对于晚期黑色素瘤的治疗,但相比当时的标准治疗(替莫唑胺或达卡巴嗪)没有显著增加患者的整体存活率。

[0652] 关于用于在此提供的方法中的曲美木单抗(或其抗原结合片段)的信息可以见于US 6,682,736(其中它被称为11.2.1),该专利的披露内容通过引用以其全文结合在此。曲美木单抗(也称为CP-675,206、CP-675、CP-675206、和替西木单抗)是一种人类IgG2单克隆抗体,该单克隆抗体对于CTLA4有高度选择性并阻断了CTLA4与CD80 (B7.1) 和CD86 (B7.2) 的结合。它已被证明导致体外免疫激活,并且用曲美木单抗治疗的一些患者已表现出肿瘤消退。

[0653] 用于在此提供的这些方法中的曲美木单抗包含重链和轻链或重链可变区和轻链可变区。在特定方面,用于此处提供的方法中的曲美木单抗或其抗原结合片段包括轻链可变区和重链可变区。在特定方面,用于此处提供的方法中的曲美木单抗或其抗原结合片段包括此处鉴定的重链可变区和轻链可变区。本领域技术人员将能够容易地鉴定对于本领域技术人员而言已知的乔西亚 (Chothia) 定义、Abm定义或其他CDR定义。在一个特定方面,用于在此提供的方法中的曲美木单抗或其抗原结合片段包括如在US 6,682,736中所披露的11.2.1抗体的可变重链和可变轻链CDR序列,该专利通过引用以其全文结合在此。

[0654] XI.VII. 药物组合物和给予方法

[0655] 制备和向有需要的受试者给予抗CD73结合分子例如抗体、或其抗原结合片段、变

体、或衍生物(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)的方法是本领域的普通技术人员众所周知或容易确定的。抗CD73结合分子(例如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物)的给予途径可以是例如口服、肠胃外、吸入或局部。如本文使用的术语肠胃外包括例如静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、皮下、直肠或阴道给予。然而,在与本文传授相容的其他方法中,本披露的抗CD73结合分子例如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以直接递送至不利细胞群体的位点,从而增加患病组织对治疗剂的暴露。

[0656] 如此处所讨论的,本披露的抗CD73结合分子例如抗体或者其抗原结合片段、变体、或衍生物(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)可按体内治疗CD73-表达细胞介导的疾病诸如某些类型的癌症的药学有效量给予。

[0657] 制备和向有需要的受试者给予包括抗CD73结合分子例如抗体或其抗原结合片段、变体、或衍生物(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)联合抗PD-1、抗PD-L1、和/或抗CTLA4抗体或其抗原结合片段的治疗组合的方法是本领域的普通技术人员众所周知或容易确定的。该组合的给予途径可以是例如口服、胃肠外、吸入或局部给药。如在此所用的术语肠胃外包括例如静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、皮下、直肠或经阴道给药。然而,在与本文传授相容的其他方法中,本披露的组合可以直接递送至不利细胞群体的位点,从而增加患病组织对治疗剂的暴露。如此处所讨论的,抗CD73抗体(例如,MEDI9447)和抗PD-1、抗PD-L1、和/或抗CTLA4抗体的组合可按体内治疗CD73-表达细胞介导的疾病诸如某些类型的癌症的药学有效量给予。

[0658] 药物组合物可以包括药学上可接受的载体,包括例如水、离子交换剂、蛋白质、缓冲物质、和盐。也可以存在防腐剂和其他添加剂。载体可以是溶剂或分散介质。用于在此披露的治疗方法中使用的合适配制品被描述于雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences),马克出版公司,第16版(1980)。

[0659] 在任何情况下,可以通过在适合溶剂中掺入需要量的本发明的治疗组合,一种活性化合物(例如,抗CD73抗体、或其抗原结合片段、变体、或衍生物,例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体,自身或与其他活性剂组合)随后过滤灭菌来制备无菌可注射溶液。此外,这些制剂可以按试剂盒的形式包装和出售。这样的制品可以具有标记或包装说明书,表明相关组合物可用于治疗患有或倾向于患有疾病或障碍的受试者。

[0660] 胃肠外配制品可以是单次推注剂量,输注或加载推注剂量,随后是维持剂量。这些组合物可以按特定的固定的或可变的间隔给予,例如每天一次,或在“根据需要”的基础上给予。

[0661] 组合物可以作为单剂量,多剂量或经在输注中的确定时间段给予。还可以调节剂量方案以提供最佳的希望的反应(例如治疗的或预防的反应)。

[0662] 本披露的组合物用于治疗CD73表达细胞介导的疾病诸如某些类型的癌症(包括例如结肠癌、黑色素瘤、乳腺癌、淋巴瘤、非小细胞肺癌何杰金氏淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤、以及伯基特氏淋巴瘤、卵巢癌、乳腺癌、头颈癌、以及胰腺癌)的治疗有效剂量随着许多不同因素(包括给药方式、靶部位、患者的生理状态、患者是人还是动物、其他给药药物、以及治疗是预防性还是治疗性)而变化。通常,患者是人,但是也可以治疗非人哺乳动物,包括转基因哺乳动物。可以使用本领域技术人员已知的常规方法滴定治疗剂量,以优化安全性和功效。

[0663] 待给予的本发明的至少一种抗CD73结合分子例如抗体或其结合片段、变体、或衍生物(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或治疗组合的量容易由本领域的普通技术人员考虑本披露的披露内容而无需过多的实验确定。影响本发明的至少一种抗CD73结合分子例如抗体,其抗原结合片段、变体或衍生物,或者治疗组合的给予模式和各自量的因素包括但不限于疾病的严重性,疾病的病史,以及经历治疗的个体的年龄、身高、体重、健康、和身体状况。类似地,待给予的本发明的抗CD73结合分子(例如抗体或其片段,变体或衍生物)或治疗组合的量将取决于给予模式以及受试者是否将经历单剂量或多剂量的这一药剂。

[0664] 本披露也提供抗CD73结合分子(例如抗体或者其抗原结合片段、变体、或衍生物(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体))或本发明的治疗组合在用于治疗一种类型的癌症(包括例如结肠癌、黑色素瘤、乳腺癌、淋巴瘤、非小细胞肺癌何杰金氏淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤、以及伯基特氏淋巴瘤、卵巢癌、乳腺癌、头颈癌、以及胰腺癌)的药剂的制造中的用途。

[0665] 本披露也提供抗CD73结合分子例如抗体或者其抗原结合片段、变体、或衍生物(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)在用于治疗受试者(针对治疗一种类型的癌症)的一种药剂的制造中的用途。在某些方面,该药剂用于已经用至少一种其他疗法预处理的受试者。

[0666] “预处理的”或“预处理”意指受试者在接受包括抗CD73结合分子例如抗体或者其抗原结合片段、变体、或衍生物(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)的药剂之前已经接受一种或多种其他疗法(例如,已经用至少一种其他抗癌疗法进行治疗)。受试者不必是对用在先的一种或多种疗法的预处理的响应者。因此,接受包括该抗CD73结合分子例如抗体或其抗原结合片段、变体、或衍生物的药剂的受试者可能已经响应或可能未响应用在先治疗剂的预处理,或在其中预处理包括多种疗法的情况下可能已经响应或可能未响应这些在先疗法中的一种或多种。

[0667] 本披露也提供共给予抗CD73结合分子例如抗体或者其抗原结合片段、变体、或衍生物(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)以及至少一种其他疗法。该抗CD73抗体和该至少一种其他疗法可以在单个组合物中一起共给予或可以在相同时间或重叠的时间在单独的组合物中一起共给予。在一些方面,该抗CD73抗体可以与例如靶向PD-1的抗体(程序化死亡1蛋白)共给予。本披露也提供抗CD73结合分子例如抗体或者其抗原结合片段、变体、或衍生物(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)在用于治疗受试者(针对治疗癌症)的一种药剂的制造中的用途,其中该抗CD73结合分子是用至少一种其他疗法对受试者进行治疗之前给予。

[0668] VIII. 诊断

[0669] 本披露进一步提供在诊断CD73-表达细胞介导的疾病诸如某些类型的癌症过程中有用的诊断方法,其涉及在来自个体的组织或其他细胞或体液中测量CD73蛋白的表达水平,并且将测量的表达水平与正常组织或体液中的标准CD73表达水平比较,凭此该表达水平比较于该标准的增加指示了障碍。

[0670] 此处披露的抗CD73抗体及其抗原结合片段、变体和衍生物(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)可用以使用本领域的普通技术人员已知的经典的免疫组织学方法测定生物样品中的CD73蛋白水平(例如,参见亚尔卡宁(Jalkanen)等人,细胞生物学杂志(J.Cell.Biol.) 101:976-985(1985);亚尔卡宁(Jalkanen)等人,细胞生物学杂志(J.Cell.Biol.) 105:3087-3096(1987))。可用于检测CD73蛋白表达的其他基于抗体的方法

包括免疫测定,诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫沉淀法或蛋白质印迹法。本文在其他地方更详细地描述了适合的测定。

[0671] 所谓“测定CD73多肽的表达水平”旨在直接地(例如,通过测定或估算绝对蛋白水平)或相对地(例如,通过与第二生物样品中的疾病相关多肽水平比较)定性或定量测量或估算第一生物样品中的CD73多肽水平。可测量或估计并且将第一生物试样中的CD73多肽表达水平与标准CD73多肽水平进行比较,标准取自从不患有障碍的个体中获得的第二生物试样或由不患有障碍的个体的种群的平均水平确定。正如本领域将理解的,一旦已知“标准”CD73多肽水平,其可重复用作为比较的标准品。

[0672] 所谓“生物样品”意指从潜在地表达CD73的个体、细胞系、组织培养物或其他细胞来源获得的任何生物样品。本领域中熟知用于从哺乳动物获得组织活检和体液的方法。

[0673] IX. 包括CD73结合分子的试剂盒

[0674] 本披露也提供包括此处描述的CD73结合分子例如抗CD73抗体或其抗原结合片段、此处披露的分子的变体或衍生物(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)中至少一种的试剂盒,其可用以执行此处描述的方法。在某些方面,试剂盒包括在一个或多个容器中的至少一种纯化的抗CD73抗体或其抗原结合片段。在一些方面中,试剂盒含有所有必要和/或足够进行检测测定的组件,包括所有对照、用于进行测定的指导、以及用于分析和表示结果的任何必要的软件。本领域的普通技术人员将易于认识到,所披露的CD73结合分子例如本披露的抗CD73抗体或其抗原结合片段(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)可易于与本领域中熟知的已建立的试剂盒形式相结合。

[0675] X. 免疫测定

[0676] 此处披露的抗CD73结合分子例如抗CD73抗体或其抗原结合片段、此处披露的分子的变体或衍生物(例如,克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)可以通过本领域已知的任何方法针对免疫特异性结合进行测定。可使用的免疫测定包括但不限于使用如以下技术的竞争性和非竞争性测定系统:蛋白质印迹、放射免疫测定、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定、免疫沉淀测定、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散测定、凝集测定、补体固定测定、免疫放射测定、荧光免疫测定、蛋白质A免疫测定,仅举几个例子。此类测定是常规的并且在本领域是熟知的(参见,例如奥苏贝尔等人编著,1994,分子生物学现代方法(约翰威利父子公司,纽约)第1卷,其通过引用以其全文结合在此)。

[0677] CD73结合分子例如抗CD73抗体或其抗原结合片段、及其变体或衍生物(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)可使用在组织学上,如在免疫荧光法、免疫电子显微术或非免疫学测定中,用于原位检测CD73或其保守变体或肽片段。原位检测可以通过从患者去除组织学标本并且将其应用于标记的CD73结合分子例如抗CD73抗体或其抗原结合片段、其变体或衍生物进行,优选地通过覆盖所标记的CD73结合分子(例如,以及抗体或片段)到生物样品上来应用。通过使用这一程序,不仅可测定CD73或保守变体或肽片段的存在,还可测定其在检查的组织中的分布。利用本披露,一般技术人员将容易知道,可修改众多各种组织学方法(诸如染色程序)中的任一种来实现这种原位检测。

[0678] 给定多种CD73结合分子例如抗CD73抗体(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段、其变体或衍生物的结合活性可以根据众所周知的方法测定。技术人员将能够通过常规实验确定每个测定的操作和最佳测定条件。

[0679] 适用于确定分离的CD73结合分子例如抗CD73抗体(例如克隆10.3抗体或克隆2C5抗体)或其抗原结合片段、其变体或改变/突变衍生物的结合特征的方法和试剂在本领域中是已知的和/或是可商购的。设计用于此类动力学分析的设备 and 软件是可商购的(例如,BIAcore,BIA评价(BIAevaluation)软件,GE医疗集团(GE Healthcare);KinExa软件,萨比戴恩(Sapidyne)仪器)。

[0680] 除非另外指示,否则本披露的实践将采用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组DNA以及免疫学的常规技术,这些技术在本领域的技能范围内。此类技术在文献中得到充分解释。参见,例如,萨姆布鲁克(Sambrook)等人,编著(1989),分子克隆实验手册(Molecular Cloning A Laboratory Manual)(第2版;冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press));萨姆布鲁克等人,编著(1992)分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)(冷泉港实验室,纽约);D.N.格洛弗(D.N.Glover)编著,(1985)DNA克隆(DNA Cloning),第I卷和第II卷;盖特(Gait),编著,(1984)寡核苷酸合成(Oligonucleotide Synthesis);穆利斯(Mullis)等人,美国专利号4,683,195;黑姆斯(Hames)和希金斯(Higgins),编著,(1984)核酸杂交(Nucleic Acid Hybridization);黑姆斯和希金斯,编著,(1984)转录和翻译(Transcription And Translation);Freshney(1987年)动物细胞培养(Culture Of Animal Cells)(阿伦利斯公司(Alan R.Liss,Inc.));固定化细胞与酶(Immobilized Cells And Enzymes)(IRL出版社)(1986);派尔巴尔(Perbal)(1984)分子克隆实用指南(A Practical Guide To Molecular Cloning);专注,酶学方法(Methods In Enzymology)(学术出版社公司(Academic Press,Inc.),纽约);米勒(Miller)和卡洛斯(Calos)编著(1987)用于哺乳动物细胞的基因转移载体(Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells),(冷泉港实验室);吴(Wu)等人,编著,酶学方法(Methods In Enzymology),第154和155卷;迈耶(Mayer)和沃克(Walker),编著,(1987)在细胞和分子生物学中的免疫化学方法(Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology)(学术出版社,伦敦);韦尔(Weir)和布莱克威尔(Blackwell),编著,(1986)实验免疫学手册(Handbook Of Experimental Immunology),卷I-IV;操纵小鼠胚胎(Manipulating the Mouse Embryo),冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约,(1986);和奥苏贝尔(Ausubel)等人(1989)分子生物学现代方法(Current Protocols in Molecular Biology)(约翰威利父子公司(John Wiley and Sons),巴尔的摩,马里兰州)。

[0681] 在博雷贝克(Borrebaeck)编辑(1995)抗体工程(Antibody Engineering)(第二版;牛津大学出版社)中,提出了抗体工程的普遍原理。在雷克伍德(Rickwood)等人,编著(1995)蛋白质工程实用方法(Protein Engineering,A Practical Approach)(在牛津大学出版社的IRL出版社,牛津,英格兰)中提出了蛋白质工程化的普遍原理。在尼森奥夫(Nisonoff)(1984)分子免疫学(Molecular Immunology)(第2版;西诺埃联合公司(Sinauer Associates),桑德兰,马萨诸塞州);以及斯图尔德(Steward)(1984)抗体,它们的结构和功能(Antibodies,Their Structure and Function)(查普曼(Chapman)和霍尔(Hall),纽约,纽约州)中提出了抗体和抗体半抗原结合的普遍原理。另外,本领域中已知的免疫学标准方法,不再做具体的描述,大体上遵循以下:免疫学现代方法,约翰威利父子公司(John Wiley&Sons),纽约;斯蒂茨(Stites)等人,编著(1994)基础和临床免疫学(第8版;阿普尔顿

和兰格公司 (Appleton&Lange), 诺瓦克, 康涅狄格州); 以及米歇尔 (Mishell) 和椎木 (Shiigi) 编著 (1980) 在细胞免疫学中的选择方法 (Selected Methods in Cellular Immunology) (W.H. 弗里曼与公司 (W.H. Freeman and Co.), 纽约州)。

[0682] 提出了免疫学一般原则的标准工具书包括: 当代免疫学实验手册 (Current Protocols in Immunology), 约翰&威利父子公司 (John Wiley&Sons), 纽约; 克莱因 (Klein) (1982) 免疫学杂志 (J. Immunology): 免疫学: 自我-非自身辨别的科学 (Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination) (约翰&威利父子公司, 纽约); 肯尼特 (Kennett) 等人编辑 (1980) 单克隆抗体, 杂交瘤: 在生物分析中的一个新的层面 (Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses) (普莱纽姆出版社 (Plenum Press), 纽约); 坎贝尔 (Campbell) (1984) “单克隆抗体技术 (Monoclonal Antibody Technology)” 于生物化学和分子生物学的实验室技术 (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology) 编辑伯登 (Burden) 等人 (Elsevier, 阿姆斯特丹); 格士柏 (Goldsby) 等人编辑 (2000) Kuby 免疫学 (Kuby Immunology) (第4版; 弗里曼公司 (H. Freeman & Co.)); 罗义特 (Roitt) 等人编辑 (2001) 免疫学 (Immunology) (第6版; 伦敦: 莫斯比 (Mosby)); 阿巴斯 (Abbas) 等人编辑 (2005) 细胞与分子免疫学 (Cellular and Molecular Immunology) (第5版; 爱思唯尔健康科学部 (Elsevier Health Sciences Division)); 科特曼 (Kontermann) 和迪贝尔 (Dubel) (2001) 抗体工程 (Antibody Engineering) (施普林格 (Springer Verlag)); 萨姆布鲁克 (Sambrook) 和拉塞尔 (Russell) (2001) 分子克隆: 实验室手册 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual) (冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Press)); 列文 (Lewin) (2003) 基因VIII (Genes VIII) (普伦蒂斯·霍尔 (Prentice Hall) 2003); 哈洛 (Harlow) 和莱恩 (Lane) (1988) 抗体: 实验室手册 (Antibodies: A laboratory Manual) (冷泉港出版社); 迪芬巴赫 (Dieffenbach) 和德韦桑勒 (Dveksler) (2003) PCR 引物 (PCR Primer) (冷泉港出版社)。

[0683] 以上引用的所有参考文献, 连同在此引用的所有参考文献, 是通过引用以其全文结合在此。

[0684] 通过说明而不是通过限制的方式, 提供以下实例。

[0685] 实例

[0686] 本披露的多方面可以进一步通过参考以下非限制性实例进行定义, 这些非限制性实例详细描述了本披露的某些抗体的制备以及使用本披露抗体的方法。对于本领域技术人员来说将会清楚的是, 在不背离本披露的范围的情况下, 可以对材料和方法二者做出许多修改。

[0687] CD73 (分化群73), 也称为外-5'-核苷酸酶 (NT5E), 是肿瘤细胞上连同正常基质细胞诸如内皮细胞以及某些白细胞中发现的跨膜受体。CD73 催化单磷酸腺苷为腺苷和有机磷酸盐。腺苷受体信号的细胞外部分通过环状AMP结合来抑制T-细胞受体激活 (由林登 (Linden) 和 (西基茨 (Cekic) 综述的, 2012)。认为CD73在介导调节性B和T淋巴细胞的抑制功能中发挥作用 (萨兹 (Saze) 等人, 2013) 连同维持内皮完整性 (由亚尔卡宁 (Jalkanen) 和萨尔米 (Salmi) 综述的, 2008)。

[0688] 除其在正常生物学方面的作用外, CD73和腺苷还影响肿瘤生物学。肿瘤微环境内

细胞外腺苷的存在已作为免疫抑制性“光环”描述过(安东尼奥利(Antonioli)等人,2013)。与针对腺苷的此作用一致,缺少腺苷受体的敲除小鼠已显示比正常小鼠更容易抵制肿瘤(奥塔(Ohta)等人,2006)。肿瘤内的细胞外腺苷的主要来源被认为是CD73(奥古斯托(Augusto)等人,2013)。与此假设连同用A2A缺陷小鼠进行的研究一致,当与正常小鼠相比时,缺少CD73的敲除小鼠具有增加的抗肿瘤免疫力(斯塔格(Stagg)等人,2011)并且显示降低的致癌作用(斯塔格(Stagg)等人,2012)。确切地说,认为细胞外腺苷除其他之外介导调节性T细胞和髓源性抑制细胞(MDSC)两者的免疫抑制作用(由安东尼奥利(Antonioli)等人综述的,2013)。与显示用小分子或抗体对CD73的分子抑制可抑制肿瘤形成、生长、以及转移(由杨(Young)等人,2014)的其他研究一起,假设肿瘤使用CD73产生腺苷且从而抑制抗肿瘤免疫力。因此,选择性地结合并且抑制CD73的外核苷酸酶活性的抗CD73抗体很可能有助于增强抗肿瘤免疫应答。

[0689] 实例1:抗CD73抗体的分离和鉴定

[0690] 将人scFv噬菌体展示文库用生物素酰化的CD73细胞外结构域(ECD)进行淘选以分离结合至人、食蟹猴、以及鼠CD73的抗体。先导抗体CD730010显示特异性地结合到人、鼠、以及食蟹猴CD73-表达细胞(通过流式细胞术),并且抑制重组可溶CD73 ECD连同细胞上展示的天然CD73的活性。起始CD730010的亲和力成熟以增强CD730010与人CD73的结合亲和性。

[0691] 在亲和力优化之前,尝试恢复CD730010的许多框架残基至最接近的人种系序列(基于IMGT谱)而不损坏亲和力。这样做是为了最小化人中最终抗体药物的潜在免疫原性。该VL结构域的所有框架残基和该VH结构域除了一个框架残基的所有可被复原以匹配人种系IGLV1-44、IGLJ3、IGHV3-23、以及IGHJ2的氨基酸序列。CD730010的VH结构域的位置94处的赖氨酸(卡巴特编号;卡巴特(Kabat),1991)可不复原而没有损失亲和力。

[0692] 通过产生CDR变体的文库并且针对改善的与CD73的结合测试这些变体而优化种系化的CD730010抗体的亲和力和效力。具有最佳亲和力改善的若干突变被合并以产生候选药物MEDI9447。MEDI9447的核苷酸和推导的氨基酸序列示于图1A-1D中。

[0693] 基本上如之前在劳埃德(Lloyd)等人,PEDS 22:159-68(2009)中描述的,从哺乳动物细胞内部产生的生物素酰化的人和鼠CD73细胞外结构域(ECD)上,在一系列重复交替选择循环中,从人scFv噬菌体展示文库分离CD73特异性scFv抗体。来自第2轮和第3轮筛选输出的ScFv区基因被批式转化到细菌scFv-Fc或Fab表达载体中。将携带可溶scFv-Fc或Fab的细菌培养物上清液针对其与人、鼠、以及食蟹猴CD73 ECD的结合通过ELISA或均相时间分辨荧光(HTRF)进行筛选。选择显示交叉反应性的居前命中者(top hit),经受DNA测序,并且转化为全免疫球蛋白G1三突变抗体形式(“IgG-TM”,掺入突变L234F、L235E以及P331S的IgG1 Fc序列)。IgG1 TM抗体表达于哺乳动物细胞,通过亲和色谱纯化并且基于其在结合和功能测定中的特征进行排序。

[0694] 实例2:抗CD73抗体的表位分类

[0695] 在Octet仪器上评估抗CD73抗体彼此竞争结合到人CD73 ECD的能力,基本上如所述的(艾迪赫(Abdiche)YN等人,分析生物化学(Anal Biochem) 386:172-80(2009)。将CD73 ECD蛋白和第一抗CD73抗体预孵育并且添加到链霉亲和素传感器上捕获的生物素酰化的第二抗CD73抗体。如果该第一抗CD73抗体阻断CD73 ECD与该第二抗CD73抗体的结合,两种抗体都放置在相同或重叠的表位盒中。如果两种抗体可同时结合到CD73 ECD,它们被放置在

非重叠表位盒中。抗CD73抗体的成对测试证明它们属于3个非重叠表位盒(表2)。

[0696] 表2:抗CD73抗体的表位盒

[0697]	表位盒	抗体
	A	CD730002、CD730004、CD730008、CD730011
	B	CD730003、CD730010、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047
	C	CD730068、CD730069

[0698] 实例3:抗CD73抗体与CD73的结合

[0699] 抗CD73抗体的结合亲和性和特异性是通过表面等离子体共振 (SPR) 和流式细胞术确定的。

[0700] 使用ProteOn XPR36仪器以表征MEDI9447与人、鼠、以及食蟹猴CD73 ECD的结合。使用抗人Fc抗体对MEDI9447进行亲和力捕获。CD73 ECD在流动相中。CD73与MEDI9447的结合和解离可用朗缪尔 (Langmuir) 1:1模型准确描述。示于表3的结果证明MEDI9447与来自三个物种的CD73 ECD的亲和力是可比较的并且在低皮摩尔范围内。

[0701] 表3:由表面等离子体共振确定的MEDI9447与CD73 ECD的亲和力

[0702]	分析物	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
	人CD73 ECD	2.57×10^6	1.06×10^{-5}	4.1×10^{-12}
	鼠CD73 ECD	2.41×10^6	2.32×10^{-6}	0.9×10^{-12}
	食蟹猴CD73 ECD	2.71×10^6	1.76×10^{-5}	6.5×10^{-12}

[0703] k_a 结合速率常数; k_d 解离速率常数; K_D 解离常数

[0704] 人、鼠、以及食蟹猴细胞系上表达的MEDI9447与天然CD73的结合是由流式细胞术表征的。将细胞用不同浓度的MEDI9447孵育并且用荧光团标记的抗人Fc抗体监测抗体结合。将荧光强度中值作为MEDI9447浓度的函数的绘图使用一位点结合等温模型进行非线性拟合以计算平衡解离常数。通过流式细胞术进行的分析证实MEDI9447与人、鼠、以及食蟹猴CD73以可比较的亲和力结合(表4), 尽管 K_D 值比由SPR确定的那些大13-126倍, 很可能是因为重组和天然CD73之间的构象差异。

[0705] 表4:由流式细胞术确定的MEDI9447与天然CD73的亲和力

[0706]	分析物	K_D (M)
	MDA-MB-231细胞(人)	154×10^{-12}
	4T1细胞(鼠)	113×10^{-12}
	MK-1细胞(食蟹猴)	84×10^{-12}

[0707] 为了通过流式细胞术确定MEDI9447对人CD73的特异性, 开发了细胞系。将作为源自于胸腔积液的人乳腺癌细胞的MDA-MB-231细胞用人CD73短发夹RNA (shRNA) 转染以敲减CD73的细胞表面表达。将尤尔卡特 (Jurka) 细胞(源自于伯基特淋巴瘤细胞的T细胞系) 用质粒表达人CD73 mRNA转染以敲入CD73的细胞表面表达。尤尔卡特细胞表达少量内源CD73。

[0708] MEDI9447对人CD73的特异性是由MEDI9447与高CD73-表达细胞系(MDA-MB-231) 和低表达细胞系(MDA-MB-231, CD73-shRNA) 的结合的比率确定的。MEDI9447对人CD73的特异

性也是由高CD73表达性细胞系(尤尔卡特-CD73敲入)与更低表达性细胞系尤尔卡特的比率确定的。

[0709] MEDI9447对鼠CD73(mCD73)的特异性是通过流式细胞术比较小鼠细胞系4T1(高mCD73表达)与敲减细胞系(4T1 mCD73-shRNA)确定的。此外,将MEDI9447对具有鼠CD73敲入的尤尔卡特细胞的特异性与野生型尤尔卡特细胞(无鼠CD73)进行比较。

[0710] 表5:MEDI9447对人和小鼠CD73的特异性

[0711]	MEDI9447 的特异性	细胞系关系	荧光强度比率均值(MFIR)
	人	MDA-MB-231 / MDA-MB-231(CD73-shRNA)	3.5
	人	尤尔卡特 (CD73 敲入) / 尤尔卡特	7.9
	小鼠	4T1 / 4T1(mCD73 -shRNA)	3.9
	小鼠	尤尔卡特 (mCD73 敲入) / 尤尔卡特	57.1

[0712] 实例4:通过抗CD73抗体MEDI9447内化CD73

[0713] 通过流式细胞术评估CD73的抗体介导的内化或脱落。将MDA-MB-231细胞在存在100nM MEDI9447或阴性对照抗体R347的情况下,在生长培养基中在37℃孵育0-4小时。洗涤细胞并且将其重悬于冰冷的PBS中。通过添加10nM DyLight488标记的检测抗体来检测细胞表面上CD73的存在。将细胞孵育15分钟,洗涤并且通过流式细胞术分析。检测抗体结合到CD73的表位,其不同于MEDI9447表位,并且两种抗体同时结合到CD73而没有干扰。CD73的细胞表面表达在用MEDI9447进行4小时孵育之后降至其原始值的73%,表明27%的CD73在MEDI9447结合时内化或脱落(错误!未找到参考来源)。

[0714] 表6:用测试抗体孵育之后MDA-MB-231细胞的细胞表面上剩余的CD73的百分比

[0715]	时间[h]	R347	MEDI9447
	0	100%	100%
	0.25	107%	90%
	0.5	104%	90%
	1	102%	87%
	2	104%	80%
	4	102%	73%

[0716] 使用人抗体内化试剂盒评估MEDI9447向细胞系MDA-MB-231(人乳腺癌)和4T1(鼠乳腺癌)中的内化,该试剂盒是市场上以FabZAP测定(高级靶向系统公司(Advanced Targeting Systems),圣地亚哥,加利福尼亚州)销售的。将MEDI9447或阴性对照抗体R347的连续稀释物用40nM FabZAP试剂(靶向至细胞毒性蛋白皂草素的多克隆抗人IgG抗体的Fab片段)进行预孵育并且然后添加到这些细胞系中。培养3天之后,使用以CellTiter-Glo测定(普洛麦格公司(Promega),麦迪逊,威斯康辛州)销售的发光细胞活力测定来测量细胞增殖。使用此测定来计算EC₅₀值和最大毒性。该FabZAP试剂本身不能内化到细胞中。它结合至测试抗体(例如,MEDI9447)并且仅在该测试抗体内化时是有细胞毒性的。MEDI9447引起

FabZAP的内化并且以剂量依赖方式抑制细胞增殖。

[0717] 表7:细胞毒性FabZAP试剂经抗体介导内化至MDA-MB-231细胞和4T1细胞中

[0718]		MDA-MB-231		4T1	
		EC ₅₀ [pM]	最大毒性	EC ₅₀ [pM]	最大毒性
	MEDI9447	3.5	97%	18.5	97%

[0719] 通过CellTiter-Glo测定来测量用测试抗体和FabZAP试剂的连续稀释物处理的MDA-MB-231细胞和4T1细胞的细胞增殖(图2)。从MEDI9447的信号减去来自CellTiter-Glo测定中的阴性对照抗体R347的信号,并且通过使用非线性回归分析拟合剂量响应曲线来计算EC50值和最大毒性。

[0720] 实例5:抗CD73抗体MEDI9447对5' 外核苷酸酶活性的抑制

[0721] 在此研究中,在体外测定中确定MEDI9447的功能活性,该体外测定使用人非小细胞癌症细胞系NCI-H322测量CD73催化的AMP水解。MEDI9447的配制品是通过将其在无血清RPMI培养基中的储备溶液稀释至1μM的最终浓度来制备。R347的配制品是通过将其在RPMI中的储备溶液稀释至1μM的最终浓度来制备。

[0722] 将NCI-H322细胞以1500rpm离心5分钟。除去上清液,并替换为无血清RPMI培养基。使用ViCell(贝克曼库尔特(Beckman Coulter))细胞计数器对该细胞悬液进行计数。将细胞以10,000个细胞/100μL/孔的细胞密度铺板到96孔板中。添加50μL的4X浓缩AMP(200μM)。然后将这些板在37℃、5%CO₂下孵育24小时。离心这些板,并将50μL的该培养上清液孔对孔转移到96孔不透明的圆底板中。然后添加2X ATP。根据制造商的说明书添加CellTiterGlo®(普洛麦格(Promega))。在珀金埃尔默易美森工作站(Perkin-Elmer Envision Workstation)的多标记读取器上测量5' 外核苷酸酶的细胞酶抑制。使用棱柱(Prism)软件分析样品。

[0723] MEDI9447特异性地抑制人体外系统中单磷酸腺苷(AMP)的去磷酸化作用。在表面表达的CD73的基于细胞的测定中,MEDI9447以剂量依赖性方式减少单磷酸腺苷向腺苷的转化,但无关的同种型对照抗体不会这样(图3)。图3中描绘的结果是使用CD73-表达型NSCLC细胞获得的,将这些细胞在100μL的没有添加剂的RPMI培养基中以10,000个细胞/孔铺板到96孔非组织培养处理板(福尔肯(Falcon) 3788)中。随着AMP(200μM最终浓度)一式两份添加抗体并且将各板在37℃、5%CO₂下孵育24小时。然后将各板以1500rpm离心3分钟。将上清液收集到新的96孔板(科斯塔(Costar) #3605)中并且添加ATP至100μM的最终浓度。1:1添加CellTiter-Glo®试剂(普洛麦格)并且通过使用易美森(Envision)发光酶标仪(珀金埃尔默(Perkin Elmer))测量ATP水平来确定细胞CD73酶AMP磷酸化酶活性。仅包含ATP和AMP的缓冲液被用作阴性对照。重复该测定,并且图3显示的结果代表使用其他的人癌细胞系进行的两个类似实验。

[0724] 这些结果表明MEDI9447抑制癌症细胞产生腺苷。认为腺苷介导肿瘤微环境内的肿瘤免疫抑制作用。

[0725] 实例6:MEDI9447减少肿瘤浸润髓源性抑制细胞

[0726] 源自于鼠结肠癌的CT26细胞是通过将悬浮于0.1mL的PBS中的5x 10⁵个细胞皮下

(SC) 注射至4至6周大雌性小鼠的右肋侧内建立的。将小鼠用MEDI9447或对照抗体进行处理。

[0727] 在此研究中使用10只小鼠/组。将动物随机分组。组1中的动物是未处理的并且对组2给予同种型对照。将MEDI9447给予到组3中。在第3天开始每周两次腹腔内给予测试品。在第16天,将来自每个组的5只动物进行尸体剖检并分离肿瘤。

[0728] 组名称和剂量水平示于表8中。

[0729] 表8:组名称和剂量水平

[0730]

组	动物 (雌性) 数目	处理	给药天数	剂量水平 (mg/kg) ^a	ROA
1	5	未处理	N/A	N/A	N/A
2	5	同种型	每周 2X	20 mg/kg	IP
3	5	MEDI9447	每周 2X	10 mg/kg	IP

[0731] N/A=不适用;ROA=给药途径。

[0732] 在第1、7、9、12、14和16天通过卡尺测量肿瘤,并且如下计算肿瘤体积:

[0733] (1) (肿瘤体积长度 (mm) x (肿瘤体积宽度)² (mm)) /2MEDI9447的抗癌作用被表示为肿瘤生长抑制百分比,其计算如下:

[0734] (2) (针对MEDI9447的平均肿瘤体积/针对R347-TM的平均肿瘤体积) x100

[0735] 分离肿瘤用于流式细胞术。在研究第16天从CT26荷瘤小鼠切开肿瘤。将肿瘤切成小块并且用胶原酶消化。30分钟孵育之后,使经消化的样品通过70微米过滤器。将解离的细胞以1000rpm在4℃球粒化5分钟,并且重悬于荧光活化的细胞分选 (FACS) 缓冲液中。在Vi-Cell1上使用默认设置对细胞进行计数。每孔铺板1x10⁶个细胞。将细胞用抗CD45 (检测所有白细胞) 抗GR1 (检测MDSC) 以及抗Ly6g (Gran MDSC) 进行染色。在LSRII流式细胞仪上采集数据。从MDSC分析获得的显著的p值 (如果有的话) 呈现于邻近描述性统计 (即均值和标准差) 的图4中。

[0736] MEDI9447抑制鼠CT26同系Ba1b/C肿瘤模式中的肿瘤生长 (图4)。

[0737] MEDI9447减少鼠CT26同系Ba1b/C肿瘤模式中的肿瘤浸润性MDSC的比例 (图5)。

[0738] MEDI9447抑制CT26鼠同系肿瘤的生长。此外,用MEDI9447处理后,同系CT26结肠癌肿瘤中髓源性抑制细胞减少。肿瘤内MDSC对肿瘤微环境具有免疫抑制作用,允许增强的肿瘤生长。用MEDI9447处理之后在肿瘤内MDSC中观察到的减少证明用MEDI9447进行的处理减少肿瘤免疫抑制的机制。

[0739] 实例7:MEDI9447 mIgG1和抗PD-1抗体的组合减少肿瘤生长且提高存活率。

[0740] 同系肿瘤是通过将0.1ml的悬浮于HBSS中的5×10⁶个CT26细胞/ml皮下 (SC) 注射至8至10周大的动物的右肋侧内建立的。通过卡尺测量肿瘤且使用以下公式计算肿瘤体积 (TV) :

[0741] (1) TV= (L x W²) /2

[0742] 其中L是毫米计的肿瘤长度,并且W是毫米计的肿瘤宽度

[0743] 基于体重将小鼠随机化到多个组中。没有动物替换。在此研究中使用60只雌性Balb/c小鼠。

[0744] 将动物随机分为6组。将动物给予MEDI9447 (mIgG1)。在第3天开始每周两次腹膜内(IP)注射测试品。组名称和剂量水平示于表9中。

[0745] 表9:组名称和剂量水平

组	动物 (雌性) 数目	处理	给药方案 (每周 2 次)	剂量水平 (mg/kg) ^a	ROA
1	10	未处理	NA	NA	NA
2	10	同种型 mIgG1	4 剂	10	ip
[0746] 3	10	同种型 rIgG2a	4 剂	10	ip
4	10	MEDI9447 mIgG1	4 剂	10	ip
6	10	抗 PD1	4 剂	0.5	ip
7	10	PD1 + MEDI9447	4 剂	0.5 + 10	ip

[0747] F=雌性; IV=静脉内; M=雄性; ROA=给药途径。

[0748] ^a给药体积: 10mL/kg。

[0749] (a) 体内肿瘤抑制研究的结果

[0750] 将CT26鼠结肠癌植入同系Balb/C小鼠中并且用抗CD73 (MEDI9447 mIgG1)、抗PD1或组合进行处理。当与单独的抗CD73比较时, 该组合处理显著抑制肿瘤生长 ($p=0.015$, ANOVA)。对每组的动物针对至研究第40天的个体动物的肿瘤体积进行绘图。对照组小鼠在40天研究期间结束时均有肿瘤。单独的抗CD73处理在研究结束时得到10%无肿瘤动物。单独的抗PD1处理在研究结束时也得到10%无肿瘤动物。引人注目地, 抗CD73和抗PD1处理的组合得到60%无肿瘤小鼠。对照组小鼠中没有一只在研究结束时没有肿瘤。在用抗CD73 (MEDI9447 mIgG1)、抗PD1或抗CD73和抗PD1的组合处理的小鼠中测量CT26肿瘤。测量小鼠直至研究第40天, 并且一旦肿瘤达到2000mm³就人道处死。当与单独的抗CD73或抗PD1处理比较时, 抗CD73和抗PD1处理一起的组合导致统计学上显著的存活率提高 (对应地, $p=0.005$ 和 $p=0.038$, 对数秩检验) (图7)。与该组合在第40天的“未定义”相比, 存活率中值从25和33天增加 (对应地, 抗CD73和抗PD1) (表10)。

[0751] 表10: 在研究第40天的结果

处理	无肿瘤小鼠 (%)	存活率 (%)
未处理	0	0
同种型 mIgG1	0	0
同种型 rIgG2a	0	0

抗CD73	10	10
抗PD1	10	20
抗CD73+抗PD1	60	70

[0753] 总体上,抗CD73抗体,MEDI9447 mIgG1,当在鼠同系CT26结肠癌模式中与抗PD-1抗体组合时显示增强的抗肿瘤活性。此外,抗CD73和抗PD处理的组合得到60%无肿瘤小鼠。当与单独的抗CD73或抗PD1处理相比时,抗CD73和抗PD1处理一起的组合也导致统计学上显著的存活率提高。

[0754] 实例8:抗PD-1诱导富含CD73的肿瘤微环境,如通过肿瘤细胞(图9)髓源性抑制细胞(MDSC)以及肿瘤浸润性CD4⁺、FoxP3⁺淋巴细胞上的CD73表达测量的(图15)。

[0755] 同系肿瘤是通过皮下(SC)注射同系B16F10黑色素瘤细胞或同系EG7-OVA淋巴瘤细胞建立的。将小鼠用MEDI9447 (10mg/kg)、抗PD-L1抗体 (10mg/kg)、或MEDI9447 (10mg/kg) 和抗PD-L1抗体 (10mg/kg) 的组合每周处理两次。肿瘤体积每周测量两次。组合给予MEDI9447和抗PD-L1显著增强黑色素瘤肿瘤(图12)和淋巴瘤肿瘤(图13)中的肿瘤生长抑制。

[0756] 为了理解抗PD-L1对肿瘤微环境的影响,研究了淋巴细胞上的CD73表达。对小鼠(n=4)皮下注射同系CT26结肠直肠细胞并且每周用10mg/kg抗PD-L1或无关的同种型对照抗体处理两次。第一次处理之后一天,从引流淋巴结分离细胞并且通过流式细胞术针对表面表型进行分析。第一次处理之后三天,分离肿瘤,解离细胞并且通过流式细胞术针对表面表型进行分析。抗PD-L1诱导富含CD73的肿瘤微环境,如通过引流淋巴结B淋巴细胞上(图14)和肿瘤浸润性CD4⁺、FoxP3⁺淋巴细胞上(图15)CD73的表面表达测量的。

[0757] 将负荷结肠直肠CT26同系肿瘤的小鼠用MEDI9447 (30mg/kg) 或抗PD-L1 (30mg/kg) 或MEDI9447 (30mg/kg) 和抗PD-L1 (30mg/kg) 的组合每周处理两次。在第16天,收获肿瘤和外周全血细胞并且通过流式细胞术分析表面CD73表达和酶活性。单独的MEDI9447或与抗PD-L1组合减少外周全血细胞(图16)、肿瘤浸润性CD4⁺、FoxP3⁺淋巴细胞(图17)以及肿瘤浸润性CD8⁺淋巴细胞(图18)上的CD73表达。单独的MEDI9447或与抗PD-L1组合也减少肿瘤细胞上的CD73表达(图19)。

[0758] 在混合的白细胞反应中,将对CTLA4、OX40、PD-1、以及PD-L1具有特异性的MEDI9447和抗体或融合蛋白用初级人外周血单核细胞孵育72小时。通过ELISA定量一式两份的上清液中所指示的细胞因子。显示的数据代表抗CD73抗体与4种不同的配偶剂的最佳剂量组合。该抗PD-1和抗CD73组合显示显著($p < 0.05$)协同(图20),如通过布利斯(Bliss)响应面法(赵(Zhao)等人)确定的。细胞因子谱图表明髓样谱系和淋巴谱系两者都受影响。测试了大于50个供体对。

[0759] 总体上,抗PD-1和抗PD-L1抗体建立了外周可检测的并且通过用抗CD73抗体MEDI9447 mIgG1处理可反转的富含CD73的肿瘤微环境。确切地说,当将负荷CT26肿瘤的小鼠用抗PD-1或抗PD-L1抗体处理时,鼠CT26肿瘤上CD73细胞表面表达水平和酶活性显著地增加。此外,用单独的抗CD73抗体MEDI9447或与抗PD-L1抗体的组合进行处理减少了表达和活性水平。肿瘤连同循环外周全血细胞两者中都观察到这些改变。因此,CD73表达和活性可充当抗PDL1和抗CD73治疗两者的药效动力学标记物或充当用于细分用抗PD-1或抗PD-L1治疗的患者(其肿瘤已经通过未调节CD73表达和活性“逃逸”)的预测性生物标记物。重要地,抗CD73抗体MEDI9447,与抗PD1或抗PD-L1 MEDI 4736组合,显示增强的抗肿瘤活性。

[0760] 通过不同测量的这些结果一起证实抗PD-1和抗PD-L1抗体诱导“富含CD73的”肿瘤微环境并且针对将MEDI9447与靶向PD-1/PD-L1轴的疗法进行组合提供了强有力的理由。

[0761] 实例9:抗CD730010抗体和抗体变体

[0762] 表11:亲本抗CD730010抗体和抗体变体与种系化的氨基酸的亲合力。

抗体变体	VL 位置的氨基酸					VH 位置的氨基酸	EC50 [nM]
	1	2	11	37	39	94	
[0763] CD730010	L	P	V	K	V	R	69
CD730010 GL9	Q	S	A	Q	L	R	64
CD730010 GL10	L	P	V	K	V	K	205
CD730010 GL18	Q	S	A	Q	L	K	132

[0764] 对于CD730002,最接近的种系基因是IGHV3-23,并且对于VH结构域是IGHJ3,并且对于VL结构域是IGLV3-1和IGLJ3。鉴定了CDR区域外的四个非种系残基:VH中的R94,以及VL中的T20、R57、L81和F87(卡巴特编号)(表11)。通过标准分子生物学技术,使CD730002 IgG1-TM表达载体中的核苷酸回复突变,以使得得到的表达载体编码这些位置中的种系氨基酸(VH中的K94,以及VL中的S20、G57、M81和Y87)。将这些CD730002 IgG1-TM蛋白变体表达、纯化并且通过流式细胞术针对与重组的人和鼠CD73的结合进行测试。VL中的所有4个非种系氨基酸可改变为其种系残基而不损害结合。然而,VH中的R94对于结合是重要的并且将其变为K损害结合。变体CD730002 SGMY(非种系化的V,完全种系化的VL)被用作产生亲和力优化的抗体变体的模板。

[0765] 实例10:抗CD73抗体CD730010GL9的亲和力优化

[0766] CD730010GL9 IgG1-TM是通过对包括具有单个氨基酸突变的变体CDR序列的Fab文库进行筛选来优化的。六个CDR中61个位置中每个被逐个随机化到19个氨基酸(所有天然氨基酸除了半胱氨酸),产生1159个独特克隆的具有理论多样性(19个氨基酸/位置乘61个位置)的文库。细菌Fab片段是从该文库的4224个克隆产生的并且通过捕获ELISA针对与人和鼠CD73蛋白的结合进行筛选(测定2)。选择相比于亲本CD730010 GL9 IgG1-TM具有增加的结合信号的180个克隆,并且通过DNA测序鉴定VH或VL结构域中的突变。将细菌上清液中的Fab浓度标准化并且通过直接ELISA来评价标准化的上清液与人和鼠CD73蛋白的结合(测定1)。表12列出所选的有益单个氨基酸取代和它们对结合到重组CD73蛋白的影响。

[0767] 表12:具有改进的亲合力的CD730010 GL9的单个氨基酸变体。

[0768]

CDR	氨基酸改变	ELISA 信号，相对于亲本抗体的改进倍数	
		huCD73	muCD73
L1	P32E	27.7	6.7
L1	P32D	11.7	6.5
H3	Y102K	9.9	7.4
L2	N51D	8.9	4.5
H2	G54N	8.9	7.1
H2	S52W	8.9	4.4
H3	Y102M	7.9	6.3
H3	Y102L	7.3	5.8
L2	S56G	7.1	5.6
L2	N51A	6.7	2.5
H3	Y102A	6.6	5.0
L1	P32G	6.1	5.8
L1	P32A	6.0	5.5
L2	Q53L	6.0	3.8
L2	Q53Y	5.8	2.3
L2	P55L	5.7	4.3
H2	S56R	5.6	4.9
L2	N51Q	4.2	2.3
H2	G54W	4.2	3.7
H2	A50L	4.2	3.0
L2	Q53F	4.1	2.7
H1	M34Y	3.9	2.9
L2	P55I	3.7	3.2
H3	Y102Q	3.6	3.0
L2	Q53W	3.1	2.7
L2	Q53H	2.4	1.9
L2	L50F	2.2	1.4
H1	S35H	1.8	1.1

[0769]

H1	M34I	1.5	1.1
----	------	-----	-----

[0770]

为了进一步改进抗CD73抗体的亲和力，当相比于亲本CD730010 GL9改进结合的若

干单个氨基酸改变被组合以建立组合的Fab文库(测定4)。该组合文库的4224个克隆的Fab片段是在大肠杆菌中产生的并且通过捕获ELISA针对与人和鼠CD73蛋白的结合进行筛选。选择来自每个筛选测定的前20个克隆用于进一步表征。将上清液中的Fab浓度标准化并且将标准化上清液的连续稀释物针对与人和鼠CD73的结合通过捕获ELISA和直接ELISA进行测试。克隆C1、C2、D3和G10显示与人和鼠CD73的强结合并且被选择用于进一步表征。

[0771] 也利用基于亲和力的噬菌体筛选优化CD730010 GL9的抗原结合。源自于先导CD730010 GL9序列的大scFv文库是通过利用如所述的标准分子生物技术对可变重链(VH)互补决定区3(CDR3)或可变轻链(VL)CDR3进行寡核苷酸定点诱变而建立(芬奇(Finch)等人, JMB 411, 791-807 (2011))。在一系列重复交替选择循环中, 对这些文库用生物素酰化的人和鼠CD73细胞外结构域蛋白进行淘选。来自第3轮筛选输出的ScFv区基因被批式转化到细菌IgG表达载体中。将包含可溶IgG的细菌培养上清液针对其与人和鼠CD73的结合进行筛选。使相比于亲本CD730010 GL9具有显著改进的与CD73的结合的IgG变体经受DNA测序。选择GRVE和HPT两种变体用于进一步表征。

[0772] 为了产生另外的亲和力改进, 将从组合Fab文库和从基于亲和力的噬菌体选择鉴定的有益突变合并, 产生变体73combo1至73combo6。

[0773] 实例11: 抗CD73抗体CD730002SGMY的亲和力优化

[0774] CD730002SGMY IgG1-TM是通过包括具有单个氨基酸突变的变体CDR序列的Fab文库进行筛选来优化的, 如针对CD730010GL9所述的。鉴定了VH结构域中的五个氨基酸突变以及VL结构域中的四个氨基酸突变, 得到增加的与重组CD73的结合信号。表13列出有益的单个氨基酸取代和它们对结合到重组CD73的影响。

[0775] 表13: 具有改进的亲和力的CD730002SGMY的单个氨基酸变体。

[0776]	CDR	氨基酸改变	FACS 信号, 相对于亲本抗体的改进倍数
			MDA-MB-231 细胞
	H1	Y32V	1.2
	H1	M34R	1.1
[0777]	H2	T57P	1.5
	H2	A60G	1.3
	H2	G65R	1.3
	L2	T52S	1.5
	L2	R54Y	1.2
	L2	P55L	1.9
	L2	P55H	1.5

[0778] 为了进一步改进抗CD73抗体CD730002SGMY的亲和力, 制备含有VH结构域中的一个有益氨基酸改变以及VL结构域中的一个有益氨基酸改变的IgG变体。通过瞬时转染293F细胞制备抗体变体, 并且针对与MDA-MB-231细胞的结合通过流式细胞术进行筛选。克隆2C5具

有比亲本CD730002SGMY低3倍的EC50值。

[0779] 实例12:优化的抗CD73抗体的亲和力

[0780] 通过流式细胞术和表面等离子体共振 (SPR) 确定优化的抗CD73抗体 (IgG1-TM形式) 与人、鼠和食蟹猴CD73的亲和力 (表14)。优化的抗体与来自三个物种的细胞和重组CD73具有pM亲和力。

[0781] 表14:抗CD73抗体与人、鼠、以及食蟹猴CD73的亲和力

	KD [pM]					
	流式细胞术			SPR (Proteon)		
	MB-MDA-231 (人)	4T1 (鼠)	MK-1 (食蟹猴)	人 CD73	鼠 CD73	食蟹猴 CD73
[0782]	CD730010	8000	6100	ND	3580	2470
	CD730010GL9	8949	16365	16460	1640	ND
	P32E	178	145	110	63	35
	C1	179	95	160	29	6
	C2	158	67	105	23	
	G10	354	259	258	9	
	HPT	739	5812	1138	548	
	GRVE	125	88	101	29	
	73combo1 (C1+GRVE+HPT)	157	150	90	7	2
	73combo2 (C2+GRVE+HPT)	166	64	74	5	
[0783]	73combo3(D3+GRVE+HPT)	154	113	84	4	1
	73combo5 (G10+GRVE+HPT)	169	205	78	7	
	73combo6(GRVE+HPT)	166	82	107	15	
	CD730002	52	50	52	7	40
	CD730002 2C5	84	55	63	9	22

[0784] 实例13:抗CD73抗体的内化

[0785] 使用FabZAP测定 (高级靶向系统公司 (Advanced Targeting Systems), 圣地亚哥, 加利福尼亚州) 评估抗CD73抗体向细胞系MDA-MB-231和4T1中的内化。在存在抗CD73抗体和FabZAP试剂的情况下孵育细胞系。3天之后, 测量细胞增殖以计算EC50值和最大毒性 (表15)。FACS数据显示亲和力优化的抗体的内化率是低的。

[0786] 表15:抗CD73抗体的内化

[0787]

	MDA-MB-231		4T1	
	EC50 [pM]	最大毒性	EC50 [pM]	最大毒性
CD730010	158.3	84%	ND	ND
L1-P32E	15.7	95%	123.8	92%
73combo1	3.8	97%	33.1	97%
73combo3	3.5	97%	18.5	97%
CD730002	7.1	95%	205.6	83%
CD730002 2C5	9.1	98%	172.6	82%
Phen0203	92.5	91%	ND	ND

[0788] 在另一个实验中,通过分析抗CD73抗体/皂草素甾合物对CD73-阳性细胞系的细胞毒性影响来评估抗体向细胞系中的内化(表15)。使用S-HyNic和4FB化学(索卢林克(Solulink),圣地亚哥,加利福尼亚州)抗CD73抗体直接甾合到皂草素毒素,并且测定了将细胞生长抑制50%所需的抗体/皂草素甾合物浓度。

[0789] 表15:抗CD73抗体的表征。

[0790]

	1/EC ₅₀ (nM)					
抗体	结合			酶抑制		内化
	人	小鼠	食蟹猴	rCD73	MDA-MB-231	MDA-MB-231

[0791]

CD730002	1.0E-001	2.4E-002	2.0E-001	2.10E-02	1.20E+01	2.10E-02
CD730003	1.8E-004	2.3E-004	4.8E-005	2.00E-03	7.00E-03	2.00E-03
CD730004	2.3E-005	2.3E-004	2.0E-006	0.00E+00	6.00E-02	0.00E+00
CD730008	1.1E-003	5.8E-004	1.1E-003	0.00E+00	1.10E-01	0.00E+00
CD730010	3.4E-003	2.4E-003	3.3E-003	6.20E-03	3.30E-01	6.20E-03
CD730011	2.1E-003	1.5E-003	2.7E-003	0.00E+00	6.80E-04	0.00E+00
CD730021	8.5E-004	5.7E-004	1.2E-003	1.10E-03	9.50E-03	1.10E-03
CD730042	1.7E-003	0.0E+000	1.4E-003	0.00E+00	3.20E-03	0.00E+00
CD730046	4.1E-003	5.2E-003	1.0E-002	0.00E+00	8.10E-02	0.00E+00
CD730047	0.0E+000	0.0E+000	0.0E+000	1.00E-03	2.70E-02	1.00E-03
CD730068	ND	ND	ND	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
CD730069	ND	ND	ND	3.80E-02	1.30E-03	3.80E-02

[0792] 实例14:抗人CD73抗体Phen0203 hIgG1,以浓度依赖性方式,体外抑制AMP介导的对CD4+CD25-T细胞增殖的压制。

[0793] 进行研究来确定抗CD73抗体(Phen0203)体外解除AMP介导的T-细胞抑制的能力。在此体外研究中,检查了抗人CD73抗体(Phen0203 hIgG1)抑制单磷酸腺苷由CD73催化为腺

昔和有机磷酸盐的能力以及对T-细胞功能的随后影响。Phen0203 hIgG1对MEDI9447具有类似的功能特性,包括体外抑制CD73的细胞和生物化学酶活性的能力。

[0794] Phen0203 hIgG1抗体是在重链恒定区不具有工程化的人IgG1 mAb。类似于MEDI9447,它也选择性地结合至人CD73并且抑制通过人CD73的外核苷酸酶活性产生免疫抑制性腺苷。然而,Phen0203缺少针对小鼠CD73的交叉反应性。

[0795] 在针对AMP介导的T-细胞抑制的测定中,从白细胞锥的内容物分离耗尽CD25⁺细胞的初级人CD4⁺ T细胞并用作效应细胞;每个锥是分别进行的。简而言之,将来自白细胞锥的内容物在PBS中稀释,然后置于菲可帕克加(GE医疗集团(GE Healthcare),查尔方特圣吉尔斯(Chalfont St Giles),英国)上并在400×g离心40分钟,制动器关掉。然后从界面分离外周血单核细胞(PBMC)并通过在200×g离心10分钟用PBS洗涤。弃去上清液并且将细胞悬浮于PBS中。测定有活力的细胞,然后在350×g球粒化5分钟并且以 5×10^7 /mL的浓度悬浮于Robosep缓冲液(干细胞公司(Stem Cell),格勒诺布尔,法国)。使用EasySep人CD4⁺ T细胞富集试剂盒(干细胞,格勒诺布尔,法国)和RoboSep(干细胞公司(Stem Cell),格勒诺布尔,法国)通过阴性选择从PBMC分离CD4⁺ T细胞。球粒化纯化的CD4⁺ T细胞并以 1.5×10^7 /mL重悬于Robosep缓冲液中。以200μL/ 1.5×10^7 个细胞添加戴纳珠(Dynabeads) CD25(戴纳珠(Dynabeads)调控CD4⁺CD25⁺ T细胞试剂盒的组分;生命技术公司(Life Technologies),佩斯利,英国)并且在连续混合下在4℃孵育25分钟。然后将细胞放置到DynaMag-15磁体(生命技术公司,佩斯利,英国)中持续1分钟并且将包含CD4⁺CD25⁻效应细胞的上清液转移至新的试管中。

[0796] 用CFSE探针(3μM)使用CellTrace CFSE细胞增殖试剂盒(生命技术公司,佩斯利,英国)以包含0.1%BSA的PBS中 1×10^6 个细胞/mL的细胞密度、在37℃孵育15分钟的时间段来标记分离的效应细胞。用温的X-Vivo 15培养基将细胞洗涤两次并且以 5×10^5 个细胞/mL悬浮于相同培养基中。在37℃通过添加25μL的抗CD3和抗CD28包被的微珠(戴纳珠(Dynabeads)人T-活化剂CD3/CD28;生命技术公司,佩斯利,英国)/ 1×10^6 个细胞和60IU/mL的rhIL-2,将标记的效应细胞活化1小时。这之后,将活化的CD4⁺CD25⁻细胞(100μL中大约50,000个)添加到无菌圆底96孔板的孔中。在X-Vivo 15培养基(隆察公司(Lonza),斯劳(Slough),英国)中进行以下试剂的连续稀释:测试品Phen0203 hIgG1和R347对照抗体,

[0797] 向板中的细胞中添加50μL的稀释试剂,随后添加包含400μM或800μM的AMP(西格玛-奥德里奇,吉林厄姆(Gillingham),英国)的50μL的X-Vivo 15(隆察公司,斯劳,英国)。还包括以下对照孔:无AMP的活化CFSE标记的CD4⁺CD25⁻细胞(活化对照);具有AMP但无测试/对照品的CFSE标记的CD4⁺CD25⁻细胞(未处理的对照);以及无AMP的未活化的(静止对照)CFSE标记的CD4⁺CD25⁻细胞。将该测定中的细胞通过在100×g离心2分钟进行温和的球粒化,并且在37℃加湿组织培养孵育器中伴随5%CO₂放置72小时。

[0798] 72小时孵育之后,将细胞通过在380g离心4分钟球粒化,用100μL的FACS缓冲液(e生物科学公司(eBioscience),哈特菲尔德,英国)洗涤一次并且最终悬浮于包含3.7%甲醛的100μL PBS中用于在BD FACSCanto II(BD生物科学,牛津,英国)上进行流式细胞术分析。无AMP的静止CFSE⁺CD4⁺CD25⁻细胞孔被用以鉴定经受了细胞分裂的细胞(分裂的细胞)。

[0799] 发现CD73在CD4⁺ T细胞亚群上表达。在存在细胞外AMP的情况下,CD73⁺ T细胞具有以下潜力:使涉及通过CD73将AMP代谢为腺苷随后激活腺苷受体并且随后调节T细胞功能的

旁分泌/自分泌通路成为可能。通过使用由TCR信号传导和rhIL-2活化的纯化的CD4⁺CD25⁻初级人T细胞对此CD73/腺苷通路进行体外建模。在存在100或200μM细胞外AMP的情况下,T-细胞增殖被抑制。

[0800] Phen0203 hIgG1,即一种抗人CD73抗体,能够以浓度依赖性方式,体外抑制AMP介导的对CD4⁺CD25⁻T细胞增殖的压制。该数据为靶向AMP/CD73/腺苷通路的免疫抑制作用的抗CD73抗体途径提供了科学原理。

[0801] 实例15:MEDI9447表位和互补位作图

[0802] 为了鉴定MEDI9447和CD73的结合界面,用单独的或复合的MEDI9447 Fab和重组可溶CD73 (sCD73) 进行氢氘交换MS (HDX-MS) 分析(图19A、19B、以及20A-20E)。近年来,氢-氘交换MS (HDX-MS) 已证明是对蛋白-蛋白相互作用的位点作图并且表征蛋白结构和构象动态的有力工具。通过以溶剂可及性介导的方式利用蛋白区的差示标记法,已经使用HDX-MS对抗体表位成功作图。比较游离和复合的CD73之间的氢交换的动力学揭示了位于sCD73(氨基酸(aa) 132-143和182-187) 的N-端结构域内的两个区域,其当与Fab结合时展现减少的氘摄取(图19A、20A和20B)。区域132-143 (HDX_E1) 仅在最短暴露时间点显示摄取上的显著改变。在更长的暴露时间,交换不存在差异。不受具体理论的束缚,这表明该位点仅被部分地保护避开溶剂。相比之下,区域182-187 (HDX_E2) 中氘的差别摄取的程度随着暴露时间增加。不受具体理论的束缚,这与高亲和力蛋白-蛋白相互作用一致,其减少溶剂可及性(图19A)。Fab的分析显示重链的互补决定区(CDR) 1和3以及轻链的CDR1和CDR2当与CD73复合时展示交换上最大的减少,表明这些区域是互补位的主要组分(图20C和20D)。尽管CD73 aa 132-143 (HDX_E1) 和182-187 (HDX_E2) 在序列空间上是不连续的,当映射到CD73的折叠结构上时它们是邻近的(图19B)。在CD73内的其他区域处观察到氢交换上的差异。然而,大多数质量改变,包括包含已知底物结合和活性位点残基的肽的那些,不是统计学上显著的(图19A和20E)。

[0803] 如关于多肽骨架溶剂暴露中的背景依赖性改变的HDX报告,需要验证以区分归因于以下的氢交换上的差异:表位-互补位界面内的骨架掩蔽对由抗体结合间接或别构地诱导的构象改变。为了确定HDX_E1和HDX_E2是否构成MEDI9447表位,评价抗体与结构域转换的嵌合CD73突变体的结合(图21A-21H和表16)。

[0804] 表16:MEDI9447与CD73变体的结合

[0805]

CD73构建体	KO 交换/突变位置	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)
野生型人CD73	WT huCD73	4.20E-12	4.63E+06	1.94E-05
KO_N端+C端	KO_1-291+311-523		无结合	
KO_N端	KO_1-291		无结合	
KO_接头	KO_292-310	4.14E-12	5.57E+06	2.31E-05
KO_C端	KO_311-523	1.70E-12	4.75E+06	8.10E-06
HDX_E1	KO_132-143	9.90E-12	2.15E+06	2.12E-05
HDX_E2	KO_182-187*	2.83E-09	5.73E+06	1.62E-02
HDX_E1+E2	KO_132-143+182-187*	4.43E-09	4.76E+06	2.11E-02
V144K	V144K	8.14E-11	1.13E+06	9.18E-05
K180A	K180A	4.35E-11	3.45E+06	1.54E-04
N185G	N185G*	2.69E-11	9.11E+06	2.45E-04
V144K+K180A	V144K+K180A	2.68E-09	1.58E+06	4.25E-03
V144K+N185G	V144K+N185G		无结合	
K180A+N185G	K180A+N185G		无结合	

[0806] *源自于2:1拟合的动力学值。

[0807] 结构域转换是如下的技术,凭此未结合感兴趣的抗体的靶蛋白(即人CD73)的同系物被用以产生嵌合体,其揭示构成该表位的那些残基。与引入缺失相反,同系物之间交换序列最小化了全局地破坏蛋白结构或阻止蛋白表达的可能性。原鸡(鸡)CD73与成熟人CD73享有约65%序列一致性(图22)。当人CD73N-端结构域(KO_1-291)或N-和C-端结构域(KO_1-291+311-523)两者都通过用对应的鸡序列进行替代被敲除时,则丧失转化的嵌合体与MEDI9447的结合(图21A-21H和表16)。仅敲除C-端结构域(aa 311-523)或 α 螺旋接头区(aa 292-310)与野生型(WT)蛋白相比不影响结合(图21A、21D、21E和表16)。这些结果与CD73的N-端结构域内的表位位置一致。接着,每个HDX界面区被分别和组合地敲除。MEDI9447与KO_HDX_E1的结合和WT CD73是可比较的,尽管结合速率 k_a 上存在较少的减小(图21F和表16)。相比之下,与KO_HDX_E2的结合亲和性显著比WT CD73弱,由更快的解离驱动(图21F和表16)。相比于单独的区域E2,敲除两个区域(KO_HDX_E1+E2)导致结合上仅小幅减少(图21G和表16)。这些发现表明,尽管区域182-187,并且到更小的范围132-143,包含对于抗体结合来说重要的残基,HDX鉴定的界面外的另外的残基构成该表位。

[0808] 为了完全定义MEDI9447表位,产生一组序列转换嵌合体,将人CD73的N-端结构域的约70aa片段用对应的鸡序列进行替代(图22、23A和23B)。单独敲除区域2(DS2)或3(DS3)减少结合,且一起转换两个区域(DS2_3)敲除结合(图23A和23B)。敲除区域4(DS4)或区域1的部分(DS1a)(转换全部区阻止表达)不影响结合(图23A和23B)。用包含约20-30aa转换区域的嵌合体进行的结合分析揭示,子区DS2d(aa 135-152)和DS3b(aa 171-188)包含影响MEDI9447结合的残基(图23A和23B)。当子区2d的部分(DS2dmod)被区域3b(DS2dmod_3b)转换,则丧失结合(图23A和23B)。明显地,这两个子区涵盖HDX研究鉴定的界面(图22)。一起转换两个HDX区域不会消除结合的观察表明介导结合的另外的残基位于子区2d和3b内,但不在HDX鉴定的位点内。为了对这些另外的表位残基作图,评价了抗体与包含单个点突变或点突变和区域转换的组合的一组CD73嵌合体的结合。也在HDX界面内的和空间上接近的残基(其在鸡和人CD73之间是保守的)上进行丙氨酸诱变(图22、23A和23B)。这些分析揭示了,V144、K180、以及N185是初级表位残基,N185是最重要的(图23A、23B和24)。将N185G突变与

K180A或V144K组合消除结合,而K180和V144一起突变导致结合的减少(图23A和23B)。除K180外,发现三个其他保守残基即Y135、K136和N187影响结合,但仅到很小的程度(图23A、23B和24A)。后面这三个残基的作用是通过在结构域转换的K0背景的上下文中使它们突变为丙氨酸来揭示的;作为独有的点突变,它们对亲和力具有最小或无影响(图23A和23B)。为了验证V144、K180、以及N185作为该表位重要的成分,将鸡CD73用V144和N185替代(K180是保守的)。这三个残基的存在赋予MEDI9947以次纳摩尔的亲和力结合($K_D=79\text{pM}$) (图23A、23B和24B)。不受具体理论的束缚,这表明MEDI9447结合至CD73主要由这三个氨基酸位置介导。明显地,尽管HDX分析鉴定了结合界面的一般位置,三个重要表位残基中的两个未包含在展现氢交换变化的肽内(图20A和20B)。

[0809] 将鉴定的表位叠加到CD73的结构上显示该结合位点位于CD73的开放构象的顶端侧表面(图24C-24E)。N185位于从螺旋G向外延伸的环区中N-端结构域顶点附近,该环区包含K180(图24C)。位于 β -链6上并且邻近于K180的是Y135和K136。V144位于 β -链7内,与N187密切接触(图24C)。共同地,这些残基的侧链形成近连续的结合表面(图24D)。当在CD73单体开放结构上看时,明显的是该表位在相对面上且空间上远离底物结合位点(图24F)。此外,该结合位点不涵盖任何活性位点残基,包括协调与 Zn^{2+} 辅助因子的相互作用的那些(图24F)。不被具体理论所束缚,预测MEDI9447不竞争AMP结合,但代替地基于该表位的位置通过可能的变构机制抑制CD73酶活性。

[0810] 实例14:MEDI9447抑制CD73酶活性

[0811] 为了表征抑制的MEDI9447模式,首先在存在MEDI9447或CD73的不可水解的抑制剂APCP的情况下检查sCD73水解AMP的动力学。MEDI9447非竞争性地抑制sCD73,如通过不论底物浓度如何,降低的 $V_{\text{最大}}$ (4.59 ± 0.26 对 1.21 ± 0.03)证明的(图25A)。相比之下,APCP增加米氏常数 K_m (75.85 ± 3.36 对 26.03 ± 3.87),但不降低 $V_{\text{最大}}$ (3.35 ± 0.04 对 3.50 ± 0.11),与APCP是CD73的竞争性抑制物的前述发现相一致(图25B)。这些结果显示MEDI9447阻断sCD73水解AMP的能力。此外,它们表明MEDI9447未阻断AMP底物的结合,其与该表位的位置一致。

[0812] 接着,sCD73的抑制是作为IgG或Fab形式的MEDI9447的渐增的浓度的函数来测试的。MEDI9447 IgG以剂量响应方式抑制sCD73活性,最大抑制是在IgG和sCD73二聚体之间约1:1的摩尔比下实现的(图25C)。然而,当IgG相对于sCD73是化学计量上过量的时,观察到抑制损失(图25C)。这所谓的“钩状效应(hook effect)”已在其他免疫测定中观察到并且可起因于由竞争限制靶抗原上结合位点的相同IgG分子上的Fab臂驱动的单价抗体结合。与此观察一致,Fab形式的MEDI9447不抑制sCD73活性(图25C)。这些结果一起表明需要MEDI9447的二价相互作用来抑制sCD73功能。

[0813] 实例15:MEDI9447防止CD73构象转变为闭合状态

[0814] CD73的前述结构研究揭示CD73的酶活性需要在“开放”和“闭合”构象之间转变。在开放状态,该酶是无活性的,而在闭合状态,形成活性位点,使得底物能够水解。对人CD73的晶体结构的测定显示开放和闭合构象异构体之间的转变需要 α -螺旋接头区的广泛弯曲和旋转以允许N-端结构域针对C-端结构域复位以形成活性位点。假设MEDI9447的每个Fab臂在两个CD73 N端结构域上的接合可以形成限制CD73从无活性开放状态转变为催化活性的闭合状态的桥。为了测试MEDI9447是否抑制CD73构象转变,利用作为CD73构象的报告物开发的抗体mAb A。mAb A的结合界面的作图显示它与CD73的N-和C-端结构域两者相互作用

(图26A-26C)。考虑到结合区域的位置,假设表位将存在于CD73开放构象异构体中,但在闭合构象异构体中被破坏(图26B)。为了测试这一点,测量了mAb A与开放的无底物的sCD73和闭合的sCD73的结合(图27A-27C)。为了诱导闭合构象,将sCD73用 Zn^{2+} 和APCP预孵育;此辅助因子和不可水解的底物先前用于产生人CD73的闭合构象异构体的晶体结构。结合分析显示,mAb A与开放的sCD73结合,但当CD73用 Zn^{2+} 和APCP预孵育时,结合被消除(图27A)。不受具体理论的束缚,这个发现与仅在CD73的开放结构中存在的mAb A表位一致。相比之下,MEDI9447结合对CD73的状态不敏感,表明它可以结合无底物的或被结合的CD73(图27A)。mAb A的结合丧失依赖于 Zn^{2+} 和APCP(图28A)。已经确立了mAb A结合报告关于CD73的构象状态,接下来测试了MEDI9447对 Zn^{2+} /APCP诱导的CD73结构转变的影响。mAb A结合到用MEDI9447预孵育的sCD73,表明两种抗体结合不同的表位(图27B)。重要的是,当sCD73-MEDI9447复合物随后用 Zn^{2+} 和APCP孵育时,维持mAb A的结合(图27B)。相比之下,在 Zn^{2+} 和APCP加入之前,当与sCD73预先复合时,对照IgG和MEDI9447的Fab形式不恢复mAb A结合(图28B)。这些结果支持二价MEDI9447结合阻止sCD73从开放状态转变为完全闭合的水解活性构象的假设。当MEDI9447结合时,mAb A结合部分维持的观察表明 Zn^{2+} 和APCP可诱导CD73采用以较低亲和力结合报告抗体的催化无活性中间体(图27C)。

[0815] 实例16:sCD73和MEDI9447形成二聚体间桥连复合物

[0816] 观察到的MEDI9447的抑制活性可以通过单个CD73分子的N-端结构域,二聚体间桥连,或通过单独的CD73分子的二聚体内桥连发生。为了区分这些情况,表征了溶液中形成的复合物的大小。基于未结合的MEDI9447和CD73的测量质量(分别为145和125千道尔顿(kD)),抗体与CD73的二聚体间桥连1:1复合物的预测大小将为约270kD(图29A)。当MEDI9447和sCD73以1:1的摩尔比结合时,形成两种复合物。超优势种类的重均摩尔质量(M_w)为约1.74兆道尔顿,并且较不丰富的种类的 M_w 为约0.66kD(图30A)。最大复合物的 M_w 与含有七个CD73二聚体和六个IgG($7 \times 125kD + 6 \times 150kD = 1.745$ 兆道尔顿)的低聚物一致。当MEDI9447是限制性的(0.5:1,0.1:1)情况下,形成了具有可比较的 M_w 的复合物,但是每个种类的丰度的相对差异不太明显(图30A)。将与MEDI9447的复合物与用不同抗CD73抗体(mAb B)形成的复合物进行比较。mAb B与一组结构域转换的CD73嵌合体的结合分析显示其结合CD73的N-端结构域内的区域,与MEDI9447相反,在CD73单体之间形成的凹槽附近(图29B和19B)。假定在这个内部定位的表面的结合可以排除mAb B的Fab臂跨越CD73二聚体桥连。实际上,SEC-MALS显示,mAb B形成约270-295kD的复合物,接近针对1:1相互作用预测的 M_w (图30C)。总的来说,研究结果表明MEDI9447在多个sCD73二聚体之间形成二聚体间桥,并且这些低聚物的产生由表位赋予。

[0817] 实例17:MEDI9447通过单价相互作用抑制锚定的CD73

[0818] 尽管CD73在体内从细胞表面脱落并保留其可溶形式的酶活性,但大部分天然CD73以GPI锚定形式存在。鉴于此以及以可溶形式的CD73进行前述研究的事实,有必要用固定状态的CD73表征MEDI9447活性。通过包覆镍的微量滴定板上的C-端六个组氨酸标签捕获重组CD73,使得我们能够测定以类似于在细胞表面上GPI锚定的CD73的方式空间定位的固定的CD73的酶活性。与我们以前的结果相似,MEDI9447 IgG以剂量依赖的方式抑制AMP水解(图31A)。然而,当抗体相对于CD73二聚体摩尔过量时,没有观察到抑制丧失或钩状效应(图31A和32)。出乎意料的是,与MEDI9447 IgG相比,MEDI9447 Fab也抑制CD73活性,但具有较低的

最大抑制作用(图31A和32)。这些结果表明,与可溶CD73不同,通过单价抗体相互作用可以抑制锚定的CD73。IgG和Fab之间的抑制差异表明抗体分子的大小可决定效力。为了研究这一点,在使得xFd抗体的一个Fab臂结合MEDI9447Fab且其他臂结合非特异性多克隆Fab(pFab)的条件下,将MEDI9447Fab用抗Fd抗体(xFd)进行预孵育(图31B)。此复合物的形成有效地增加了MEDI9447 Fab的大小,同时保持对于CD73的单价。该xFd结合的Fab将CD73活性抑制到与MEDI9447 IgG相当的程度(图31A)。为了验证这一观察,在人上皮乳腺癌细胞系MBA-MD-231中测量了内源表达的CD73的抗体抑制。与固定的重组CD73相似,通过MEDI9447 IgG,适当地,通过MEDI9447 Fab,稳健抑制GPI锚定的CD73,并且与xFd抗体的预结合Fab将最大抑制增加到与IgG相当的水平(图31C)。最后,测试结合到xFd抗体的一个或两个臂的MEDI9447 Fab对sCD73的抑制。与表面结合的CD73不同,sCD73不被结合到单个xFd臂的MEDI9447 Fab抑制(图31D)。然而,通过将MEDI9447 Fab结合到两个xFd臂上赋予二价性导致与MEDI9447 IgG可比的sCD73抑制(图31B和31D)。这些发现显示,表面锚定的CD73可以通过单价抗体结合来抑制,并且该效力由抗体的大小介导。这与sCD73形成直接对照,sCD73仅被MEDI9447通过二价相互作用而抑制。

[0819] 实例18:MEDI9447通过双重非竞争性作用机制抑制CD73构象变化和AMP水解

[0820] 如此处所述,测定抑制CD73的酶活性的治疗性单克隆抗体的表位和作用机制。该研究的结果揭示了CD73 N-端结构域内的结合位点,通过两种不同的机制实现抑制。重要的是,此特征赋予MEDI9447以非竞争性的方式阻断可溶的和细胞表面锚定的CD73的能力。

[0821] 使用HDX-MS鉴定了CD73和MEDI9447 Fab之间的结合界面。由于源自于胃蛋白酶消化的相对较大的肽,通过交换分析鉴定的相互作用位点相对较宽,跨越两个不连续肽的总共十八个氨基酸。结构域转变和诱变实验示出,只有这些残基的一个子集在抗体结合中是有影响的,并且三个最有影响力的氨基酸中的两个(V144和K180)被包含在不显示差异氢交换的肽中。对于这种矛盾的一个解释是,虽然V144和K180侧链可由于与抗体CDR残基的接触而被封闭,但经受氘交换的相关多肽骨架酰胺氢原子可相对暴露于溶剂。HDX-MS结果还示出,由aa 132-143构成的区域仅在最短的暴露时间点展现交换动力学的显著变化。不受具体理论的束缚,这表明在该区域的结合相对较弱。实际上,发现影响该区域内的结合的两个残基(Y135和K136)对MEDI9947亲和力影响较小(图23A和23B)。相比之下,具有最显著差异交换的区域(aa 182-187)含有对结合最重要的残基(N185)。在不存在共晶体结构的情况下,不能正式排除这样一种可能性,即与MEDI9447作为互动者被忽视的一些残基确实与互补位形成接触。然而,广泛的突变体结合分析表明,这些潜在的残基将对结合的热力学贡献最小。由于重链CDR3在形成抗原接触位点中是重要的,所以该CDR展现最大程度的差异交换。HDX结果还表明轻链对于抗原结合是重要的,特别是CDR1和2(图20C和20D)。总之,这些结果突出了HDX-MS在表位作图中的应用以及通过这种诱变的正交技术验证所预测结合界面的重要性。

[0822] 在远离CD73底物结合和活性位点残基的N-端结构域内的位置处的表位的位置与显示MEDI9447具有非竞争性抑制模式的结果一致。基于单独的表位的足迹,一个可能的假设是抗体作为经典的变构抑制剂作用,诱导CD73中的远程构象变化,其以防止水解活性的方式扭曲活性位点残基。然而,HDX-MS数据没有揭示在支持这种形式变构的结合界面以外的区域中CD73结构的显著变化。可替代地,该表位可以表明MEDI9447结合限制催化活性所

需的N-端结构域内的环、 β 链或 α 螺旋的移动。与此相反,报道了CD73的开放结构和闭合结构之间N-端结构域内的二级结构或三级结构几乎没有差异。确实发生的局部结构域间构象变化限于接头和C-端结构域。

[0823] 作为诱导结构变化的替代方案,认为该表位的位置将被很好地定位,以使抗体桥连或交联CD73二聚体,这将限制构象的必要改变。这一桥连概念得到了如下数据的支持,该数据显示需要IgG来抑制CD73的可溶形式,并且MEDI9447形成含有多个CD73二聚体的复合物。后一个结果与不形成二聚体间桥连的mAb B相反,突出了MEDI9447表位在赋予交联活性上的重要性。合理地,如果两个CD73 N-端结构域被相同IgG的Fab结构域结合,则这可以物理上限制酶采用其闭合的活性结构所需的N-端结构域和接头区的移动。通过使用充当CD73状态的构象探针的mAb A,证明MEDI9447的结合抑制CD73采用完全闭合的构象异构体,如由 Zn^{2+} 和APCP诱导的。当MEDI9447与CD73预复合时,报告物mAb A的结合的中间体水平表明 Zn^{2+} 和APCP仍然诱导一定程度的构象转变。减少的mAb A结合可以反映其表位在该中间体状态下部分扭曲,但仍足以产生结合。鉴于铰链区域的高度灵活性,即使MEDI9447桥连CD73二聚体也不奇怪,归因于底物结合,仍然会有一些CD73结构改变。不受具体理论的束缚,很难预想结合的IgG会使CD73陷入完全刚性的构象。

[0824] 这项工作的出人意料的结果是,除了通过二价相互作用的桥连外,MEDI9447还可以在通过单价结合机制表面结合时抑制CD73。虽然最初令人困惑,但空间介导的锚定CD73活性的阻断机制与本文所述的观察一致。具有催化活性的GPI锚定CD73的形成需要N-端结构域向下旋转到靠近细胞表面的位置。天然CD73二聚体是约130kDa。与IgG或Fab的大小(分别为约150kD和约50kD)相比,结合N-端结构域的抗体可以在空间上阻断CD73完全旋转以采用闭合构象。这种机制得到两个观察的支持。首先,与IgG相比,Fab展现较低的最大抑制的事实,与大小依赖性空间效应一致。Fab和IgG之间的差异不大可能是由于结合差异,因为Fab亲和力仍然是次纳摩尔的($K_D=327\text{pM}$,数据未显示)。此外,通过与xFd抗体轭合而增加Fab的有效大小而赋予的提高了的效力也强烈地支持大小依赖性空间机制,而不是价态或亲和力依赖性空间机制。当CD73被表面结合时,支持这种抑制模式的第二个观察是MEDI9447 IgG没有观察到钩状效应或抑制丧失。推测起来,这是因为抗体可以通过二价或单价相互作用阻断AMP的锚定CD73水解(图33)。相比之下,当CD73可溶时,由于不存在单价结合的IgG或Fab所需的用以空间阻断N-端结构域旋转的固相,观察到钩状效应。

[0825] 因此,提出了一种模型,其中MEDI9447通过与其表位整体关联的双重抑制机制而拮抗可溶和GPI锚定的CD73功能(图33)。尽管本文所述的研究示出MEDI9447可以阻断可溶和结合的CD73,但体内未知GPI锚定的CD73是否通过一种或两种机制被抑制。推测起来,CD73在细胞表面上的密度、取向和二聚体之间的距离将决定主要的抑制模式。鉴于大多数癌细胞过度表达CD73,这将增加二聚体接近的可能性,预期MEDI9447将参与二价和单价相互作用。在正常的非肿瘤组织上,其中CD73表达将处于相对较低的表面密度,MEDI9447可能主要通过空间阻断模式抑制AMP水解。

[0826] 从机械学的角度来看,阻断CD73是与可比较的靶标诸如PD-1和CTLA-4(针对它们已存在经批准的药物)不同的免疫肿瘤学策略。从治疗的角度来看,MEDI9447的活性是有利的。它非竞争性地抑制CD73,并且因此不必通过阻断活性位点与内源性核苷酸结合相竞争。这避免了对具有保守结构的活性位点的其他核苷酸/侧结合蛋白的潜在交叉反应性。此外,

MEDI9447可以通过单价或二价接合来抑制可溶和膜结合的CD73。预期这两个特征都将有助于体内功效。这种治疗性mAb单独和与靶向互补的免疫调节途径的现有化学治疗剂组合对于治疗癌症具有免疫调节潜力。

[0827] 使用以下材料和方法进行上述结果。

[0828] 测定1:直接ELISA

[0829] 将384孔ELISA板用约1.5ng/孔的重组CD73蛋白包被,用1%BSA/0.1%Tween20/PBS阻断,并在室温下用抗体样品孵育90分钟。这之后在室温下用山羊抗Ig λ 辣根过氧化物酶(HRP) 轭合物孵育30分钟。用四甲基联苯胺(TMB)底物检测HRP活性,并用1M HCl终止反应。在450nm处读板。

[0830] 测定2:捕获ELISA

[0831] 将384孔ELISA板用约3ng/孔的绵羊抗人Fd抗体(用于筛选Fab形式的抗体)包被,用1%BSA/0.1%Tween20/PBS阻断,并在室温下用样品孵育90分钟。然后加入生物素酰化的CD73蛋白在室温下持续1小时。这之后在室温下用链霉亲和素-辣根过氧化物酶(HRP) 轭合物孵育30分钟。用四甲基联苯胺(TMB)底物检测HRP活性,并用1M HCl终止反应。在450nm处读板。

[0832] 使用约50ng/孔生物素酰化的重组CD73筛选具有单个氨基酸突变的克隆。为了筛选来自组合文库的克隆,使用10ng/孔生物素酰化的重组CD73。

[0833] 测定3:流式细胞术结合测定

[0834] 所有流式细胞术实验均在4℃运行,并且试剂在PBS/1%FBS缓冲液中制备。将10,000个细胞用50 μ L体积的测试抗体孵育4小时。将细胞洗涤两次并在50 μ L山羊抗人IgGFc-AlexaFluor647轭合物中孵育15分钟。将细胞进行洗涤,重悬于补充有Dapi的缓冲液中,并在流式细胞仪上进行分析。通过高Dapi染色鉴定的死细胞被排除在分析之外。对于KD值的测定,将荧光强度中值作为测试抗体浓度的函数的绘图使用一位点结合等温模型进行非线性拟合。

[0835] 测定4:产生具有单一氨基酸变化的抗体文库

[0836] 使用QuikChange快速多定点诱变试剂盒(Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit)(安捷伦(Agilent))和引物进行CD730010或CD730002的CDR密码子的定点诱变。用将野生型密码子以密码子NNS替代的引物诱变每个密码子。将诱变的VH和VL基因克隆到Fab载体中用于细菌表达。用抗体文库转化大肠杆菌菌株BL21(DE3),挑取单独的菌落,并在魔法培养基(Magic Media)(英杰公司(Invitrogen))中在室温下培养24小时以产生细菌Fab片段。制备细菌上清液并用于在ELISA结合测定中筛选抗体文库。

[0837] 测定5:产生具有组合氨基酸变化的抗体文库

[0838] 将CD730010GL9 VH和VL基因克隆到载体中用于细菌Fab表达。使用QuikChange快速多位点定向诱变试剂盒(QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit)(安捷伦(Agilent))或重叠PCR和简并引物进行CD730010GL9的CDR密码子的定点诱变。设计简并引物以编码所选的氨基酸变化连同相同位置的亲本氨基酸。用Fab文库转化大肠杆菌菌株BL21(DE3),将单独的菌落在魔法培养基(Magic Media)(英杰公司(Invitrogen))中在室温下培养24小时以产生细菌Fab片段。将细菌上清液用于在ELISA结合测定中筛选抗体文库。

[0839] 测定6:FabZAP测定

[0840] 在96孔板中,将1,000个细胞/孔在RPMI/10%FBS中进行培养。将以5nM开始的抗CD73抗体的连续稀释物与FabZAP试剂(高级靶向系统公司(Advanced Targeting Systems),圣地亚哥,加利福尼亚州)混合并加入到细胞中。在37℃下孵育3天后,使用CellTiter-Glo测定(普洛麦格公司(Promega),威斯康辛州麦迪逊)测量细胞增殖。

[0841] 使用以下CD73和抗体试剂进行以下测定(测定7-11)。

[0842] 构建了编码重组成熟人CD73(氨基酸位置1-526)的哺乳动物表达载体质粒(米迪缪尼公司(MedImmune))。为了实现可溶的分泌形式的CD73的表达,除去GPI锚定信号肽并用C端6x-组氨酸标签替代。CD73序列编号基于没有信号肽的成熟蛋白(人NT5E,NCBI参考序列NP_002517.1)。使用编码密码子优化的鸡CD73DNA序列(鸡NT5E,NCBI参考序列XP_004940453.1)的合成DNA gBlocks(IDT有限公司)产生编码重组人/鸡嵌合结构域转换的“敲除”(KO)突变体的质粒。基于与人CD73蛋白序列的比对,含有鸡N-端结构域的构建体的氨基酸编码位置1对应于含有预测信号肽的未成熟鸡CD73的位置20。通过gBlocks和人CD73的PCR扩增子的单重叠延伸PCR来制备全长KO DNA构建体。所有构建体都含有C-端6x组氨酸标签。通过使用Quick Change快速多位点定向诱变试剂盒(斯特拉塔根公司(Stratagene))的定点诱变制造人和嵌合构建体中的单点和多点突变。所有CD73构建体在悬浮HEK293细胞中表达。通过米迪缪尼蛋白质科学(MedImmune Protein Sciences)组使用HisTrap镍亲和柱(通用医疗生命科学公司(GE Healthcare Life Sciences))纯化组氨酸标记的野生型人CD73(缺乏GPI锚定信号序列)。证实蛋白质在溶液中是二聚体,摩尔质量为约125kDa(参见图18A和18B)。使用293Fectin(生命技术公司(Life Technologies))通过瞬时转染悬浮HEK293细胞来表达所有突变体CD73构建体。在24孔深井块中使细胞生长并转染到无血清293Freestyle培养基(生命技术公司)中。在转染后6天收获粗细胞上清液,并通过0.45μm过滤器过滤以在使用前除去细胞碎片。在Octet QK384生物层干涉测量(BLI)仪器(FortéBio/颇尔生命科学公司(Pall Life Sciences))上通过测量组氨酸标记的蛋白质与HIS2生物传感器(FortéBio/颇尔生命科学公司)的结合来确定CD73变体的上清液浓度。通过将结合信号与由已知浓度的纯化的重组的6x-组氨酸标记的人CD73的稀释物产生的标准曲线进行比较,使用Octet数据分析软件计算浓度。由米迪缪尼蛋白质科学和表达组表达和纯化MEDI9447(人IgG1和小鼠IgG1形式)、mAb A(人IgG1)和mAb B(人IgG1)以及MEDI9447Fab(人IgG1)。IgG在哺乳动物细胞中表达,并且通过蛋白A和尺寸排阻色谱法进行纯化。为了产生MEDI9447Fab,用固定的木瓜蛋白酶(赛默飞科技公司(Thermo Scientific)/生命技术公司(Life Technologies))在37℃下将10mg IgG消化5小时,并使用HiTrap Q柱(通用医疗生命科学公司)纯化Fab。

[0843] 测定7:HDX-MS分析

[0844] 以2mg/mL的浓度制备重组人CD73和MEDI9447 Fab样品。通过以1:1的浓度比预孵育而形成CD73+Fab复合体。整个HDX实验使用配有莱亚(Leap)自动化机器人的沃特斯(Waters)HDX技术(沃特斯公司)进行。简言之,将1.25μL蛋白质样品在20℃下用H₂O或D₂O缓冲液(10mM磷酸盐,pH 7.0)稀释二十倍。在不同的孵育时间后(对于未氘化实验为0秒或氘化实验为0.5、1、5、10、30、60和120分钟),通过加入等体积的4.0M冰冷的盐酸胍(皮尔斯生物技术公司(Pierce Biotechnology))、500mM盐酸三(2-羧乙基)膦(TCEP)(皮尔斯生物技

术公司)溶液(pH 2.4)淬灭标记的样品。此后立即,使用Poroszyme固定的胃蛋白酶柱(应用生物系统公司(Applied Biosystems))在20℃下消化样品。收集消化片段并使用ACQUITY BEH C18 VanGuard前置柱(2.1x 5mm,沃特斯公司)脱盐,并在0℃下洗脱到ACQUITY BEH C18柱(1.7μm,1.0x 100mm,沃特斯公司)中。通过SYNAPT G2质谱仪(沃特斯公司)分析柱上分离的肽。对于数据分析,使用ProteinLynx全球服务器(Global Server)软件(沃特斯公司)鉴定肽,并使用DynamX(沃特斯公司)计算每个标记时间的每个消化肽的氘掺入水平。对于每种蛋白质,进行四个未氧化实验和三次完整的HDX实验。如前所述,使用实验不确定度和98%置信区间计算显著差异值(±1.6道尔顿),不同的是使用标准差的合并方差替代单个标准差的均值。通过DynamX软件(沃特斯公司)生成CD73+Fab复合物和CD73之间的相对分数摄取,并输出到PyMOL (Shrödinger有限公司)进行结构建模。人CD73的所有结构图都使用PyMol和CD73的开放和闭合构象的报道结晶结构(PDB参考号分别为4H2F和4H2I)产生。

[0845] 测定8:SPR和BLI结合分析

[0846] 使用ProteOn仪器(伯乐公司(BioRad))通过表面等离子体共振(SPR)测量MEDI9447与野生型和突变型CD73蛋白的结合。将CD73粗细胞上清液蛋白样品在PBS、0.005%Tween-20(pH 7.4)(伯乐公司)中稀释至3μg/ml,并在用10mM NiSO₄、10mM MES(pH 6.0)(伯乐公司)预活化的HTG tris-NTA传感器芯片(伯乐公司)上固定至约400RU。包括来自未转染细胞的等同稀释的粗细胞上清液样品作为参考通道对照。通过使在PBS、0.005%Tween-20(pH 7.4)中制备的MEDI9447的5nM至0.31nM范围的两倍稀释物流动来记录传感图。在某些情况下,对于弱结合MEDI9447的CD73变体,抗体稀释范围为20nM至1.25nM。以100μL/min的流速测量抗体结合,具有3分钟缔合相和20分钟解离相。传感器芯片表面在每次运行之间通过以30μL/min的流速注射800s的300mM EDTA(pH 8.5)(伯乐公司)再生。使用ProteOn数据分析软件分析结合动力学。执行双引用,并且除非另有说明,否则使用1:1朗缪尔结合模型来拟合数据。在氨基酸区域171-188内含有突变的一些CD73变体很难拟合到1:1模型上(即,Chi²值>R最大的10%)。这里注意,这些变体以异源抗原(2:1)模型拟合。由于MEDI9447(约4pM)的高亲和力和ProteOn的敏感性限制,当比较MEDI9447与CD73变体的结合时,仅测量动力学的>2倍的变化被认为是有意义的。由于测定形式(抗原被固定)和CD73的二聚体状态,K_D值可由于亲合力影响而被夸大。然而,不会预料这会影响MEDI9447与不同CD73变体的结合的排名。

[0847] 通过BLI使用Octet QK384仪器对抗CD73抗体mAb A和mAb B结合的热点进行作图。所有蛋白质在1x动力学缓冲液(FortéBio/颇尔生命科学公司)中制备。将来自粗细胞上清液的C-端组氨酸标记的CD73变体稀释至6μg/ml,并固定在HIS2生物传感器上至0.8nm的结合响应阈值。在300秒基线步骤后,将传感器浸入30nM抗体中。结合和解离时间为600秒。在数据分析过程中针对背景结合减法包括未转染的细胞上清液参考对照。处理数据,并使用FortéBio数据分析软件准备图表。

[0848] 测定9:CD73酶活性测定

[0849] 通过定量无机磷酸盐(孔雀石绿测定;R&D系统)或测量由AMP抑制的荧光素的ATP依赖性氧化(CellTiterGlo测定;普洛麦格公司)来分析CD73催化的AMP至腺苷和无机磷酸盐的水解。使用棱柱(Prism)软件(Graphpad)生成数据图和酶动力学测量(米氏(Michaelis-Menten)非线性回归)。实验以一式两份或一式三份进行。

[0850] 对于使用CellTiterGlo测定的可溶重组CD73测量,将400pM重组CD73和各种浓度的抗CD73抗体在测定缓冲液(25mM Tris pH 7.5,5mM MgCl₂,0.005%Tween-20)中在37℃下孵育1小时,之后加入等体积的200μM AMP/600μM ATP(在测定缓冲液中)。在37℃下孵育1小时后,使用CellTiterGlo测定按照制造商的说明书确定样品中的AMP浓度。

[0851] 对于使用孔雀石绿测定的可溶重组CD73测量,将1nM重组CD73和1nM抗体或40μM腺苷5'-(α,β-亚甲基)二磷酸(APCP;西格玛-奥德里奇)在测定缓冲液(25mM Tris pH 7.5,5mM MgCl₂,0.005%Tween-20)中在室温下孵育1小时。加入同样体积的400μM AMP(对于抗CD73抗体)或3mM AMP(对于APCP),并且将样品在室温下孵育15分钟。根据制造商的说明书,使用孔雀石绿测定法来测定无机磷酸盐的浓度。

[0852] 对于固定的重组CD73的测量,将补充有100μg/mL BSA的测定缓冲液(25mM Tris pH 7.5,5mM MgCl₂,0.005%Tween-20)中的100ng/mL的50μL CD73固定在包覆镍的板(生命技术公司)上。洗去未结合的CD73,并且加入50μL抗CD73抗体(在测定缓冲液中)。在室温下孵育1小时后,再次洗涤各板,加入100μL 500μM AMP(在测定缓冲液中),并将样品在室温下孵育15分钟。根据制造商的说明书,使用孔雀石绿测定法来测定无机磷酸盐的浓度。在使用固定的和可溶的CD73的一些实验中,在加入CD73之前,将抗CD73抗体(IgG和Fab)用10倍摩尔过量的多克隆人Fab片段(Bethyl实验室)和100倍摩尔过量的绵羊-抗人IgG(Fd)(迈迪安生命科学公司(Meridian Life Sciences))预孵育至少2小时。

[0853] 为了测量培养细胞中的内源CD73活性,将20,000个MDA-MB-231细胞/孔铺板在96孔板中的RPMI/10%FBS(生命技术公司)中。过夜孵育后,用无血清RPMI洗涤各孔3次,并加入50μL抗体(无血清RPMI)。在37℃下孵育30分钟后,每孔加入25μL的1.2mM AMP(无血清RPMI)。在37℃下将各板孵育3小时。将25μL细胞上清液和25μL 100mM ATP混合,并使用CellTiterGlo测定法按照制造商的说明书确定样品中的AMP浓度。

[0854] 测定10:CD73构象转变的mAb报告物测定

[0855] 在Octet QK384仪器上进行MEDI9447和mAb A与纯化的重组人CD73的结合。为了比较mAb A和MEDI9447的结合,将CD73在PBS(pH 7.4)(生命技术公司)加0.5%牛血清白蛋白(PBSB;西格玛-奥德里奇)中稀释至6μg/mL,并加载到HIS2生物传感器上以达到结合信号阈值1.0nm。然后将生物传感器转移到单独的PBSB或具有10μM ZnCl₂(西格玛-奥德里奇)、APCP和/或2mM乙二胺四乙酸(EDTA)(生命技术公司)的PBSB中并孵育15分钟。接下来,将生物传感器转移到含有MEDI9447或mAb A(在PBSB中稀释至30nM)的PBSB中,并测量抗体结合10分钟。

[0856] 为了测试在ZnCl₂和APCP存在下,MEDI9447对CD73构象转变的影响,将在PBS(pH 7.4)中稀释至10μg/mL的mAb A固定在抗人FcAHC生物传感器(FortéBio/颇尔生命科学公司)上。在400秒的固定步骤之后,将生物传感器在PBS(pH 7.4)中50μg/mL非特异性多克隆人IgG(杰克逊免疫研究实验室(Jackson ImmunoResearch Laboratories))阻断10分钟。在4分钟基线步骤之后,通过在含有CD73的孔中孵育生物传感器600秒来测量mAb A结合,CD73在单独的PBS中或含有10μM ZnCl₂和/或0.5mM APCP的PBS中稀释至250nM(基于二聚体的分子量)。对于含有结合到CD73的MEDI9447的样品,在用ZnCl₂和APCP孵育前,将在PBS中稀释至250nM的小鼠IgG1形式的MEDI9447(用以避免与抗人Fc生物传感器结合)在室温下用CD73预孵育15分钟。以500nM测试MEDI9447Fab和小鼠同种型匹配对照IgG1(在米迪缪尼公司产

生)。所有测定步骤的振动速度为1000rpm。使用FortéBio数据分析软件生成结合分析和数据图。

[0857] 测定11:SEC-MALS分析

[0858] 对于分析与CD73和MEDI9447或mAb B形成的复合物的实验,将900皮摩尔CD73用稀释到PBS (pH 7.4) 中的900、450、90或0皮摩尔抗体孵育。还制备仅900皮摩尔抗体的单独样品。将样品在室温下孵育30分钟,并且然后使用TSKgel G3000WxL 5 μ m,7.88mm x 30cm柱(东曹生物科学有限责任公司(Tosoh Bioscience,LLC))在HP 1100HPLC(安捷伦公司)上分离100 μ L的每个样品,流速为1mL/min,持续20min。样品运行缓冲液为0.1M NaPi,0.1M NaSO₄,pH 6.8。在HPLC分离后,使用Dawn Heleos II MALS检测器和Optilab T-rEx折射率检测器(怀亚特(Wyatt))分析所有样品。使用阿斯特拉(Astra)软件(怀亚特)分析数据。

[0859] 具体方面的以上描述将充分地揭示本发明的总体性质,使得在不脱离本发明的一般概念的情况下,其他人可以无需过多的实验通过应用本领域的技术内的知识,容易地针对此类具体方面的各种应用修改和/或改编。因此,基于在此提出的传授和指导,此类改编和修改旨在处于所披露的含义和等效范围内。应当理解在此的短语或术语是出于描述而非限制的目的,这样使得本说明书的术语或短语可根据这些传授和指导被技术人员理解。

[0860] 序列表

[0861] >SEQ ID NO:1 CD730002 VL

[0862] QSVLTQPPSVSVSPGQTATITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRPSRIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYFCQAWDTSFVWFVGGGTKLTVL

[0863] >SEQ ID NO:2 CD730002 VH

[0864] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWGQGTMTVSS

[0865] >SEQ ID NO:3 CD730010 VL

[0866] LPVLTQPPSVSGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYKQVPGTAPKLLIYLNQRPSPGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNGWLFVGGGTKLTVL

[0867] >SEQ ID NO:4 CD730010 VH

[0868] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDYWGRGTLTVSS

[0869] >SEQ ID NO:5 CD730011 VL

[0870] NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASKYVQWYQQRPQGSSPMAVIYKDNQRSSGVPDRFSGSIDS SSNSASLTISGLKPEDEADYYCQSYDASNYYVFGTGTKVTVL

[0871] >SEQ ID NO:6CD730011 VH

[0872] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGHGLYFDLWGQGTTVTVSS

[0873] >SEQ ID NO:7 CD730021 VL

[0874] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRPNIGGNTVNWYQQLPGAAPKLLIYSNSQRPSPGVPDRFSGSKYGTSASLAISGLQSDDEADYYCGTWDDSLNGPVFGRGTKLTVL

[0875] >SEQ ID NO:8 CD730021 VH

[0876] QVQLQESGPGLVRPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWAWVRQSPGKGLEWIGNIYYRGSTYYNP SLKSRV

TMSVDMSKHQFSLKLSSLNAADTAVYYCASLYSGTYVFDYWGRGTLTVTVSS

[0877] >SEQ ID NO:9 CD730042 VL

[0878] QSVLTQPASVSGSPGQSITISCAGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEGSKRPSGVSNRFSGSK
SGNTASLTISGLQAEDEADYYCSYTTR-STRVFGGGTKLTVL

[0879] >SEQ ID NO:10 CD730042 VH

[0880] GVQLVQSGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFT
ISRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCSTLSGSYGYFDYWGRGTLTVTVSS

[0881] >SEQ ID NO:11 CD730046 VL

[0882] QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGSNTVSWYQHLPGTAPQLLIYTNHRPSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLSGYVFGTGTKVTVL

[0883] >SEQ ID NO:12 CD730046 VH

[0884] QVQLVQSGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFT
ISRDNKNSLFLQMNSLRDDDTATYYCARGHLLRIGDIFYYSLDVWVGQGTTLTVTVSS

[0885] >SEQ ID NO:13 CD730047 VL

[0886] QSVLTQPPSASGAPGQRTVITSCSGSSSNIGSNTVNWYQRLPGAAPQLLIYNNDQRPSGIPDRFSGSKSG
TSGSLVISGLQSEDEADYYCAAWDDSLSGNVFGTGTKVTVL

[0887] >SEQ ID NO:14 CD730047 VH

[0888] EVQLVQSGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSIKYYADSVKGRFA
ISRDNKNTLYLQMNSLRREDTAMYYCASGLTGAVAGALGVWGRGTLTVTVSS

[0889] >SEQ ID NO:15 CD730058 VL

[0890] QSVLTQPPSVSVSPGQTATITCSGDRLRNEFVSWYQQRPGQSPVVVIYQDIYRPSGIPDRFSGSKSGNT
ATLTISGPQTVDEADYYCQAWDSNTVVFGGGTKLTVL

[0891] >SEQ ID NO:16 CD730058 VH

[0892] QLQLQESGSLVKPSQTLSLICAVSGGSITSGGNAWNWIRQSPGAGLEWIGYIFSNGATYYNPSLESRV
TISADTSKNQFSLTLTSVTAADTAVYYCARGDFWTGKGVFDPPWQGTTLTVTVSS

[0893] >SEQ ID NO:17 10.3AA_HC

[0894] EVQLLESGLLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGRITYYADSVKGRFT
ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLG YGRVDEWGRGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKT
HTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0895] >SEQ ID NO:18 10.3Nt_HC

[0896] GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC
AGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCTATAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTC
TCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGAACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACA
ATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGATT
AGGGTATGGGCGGGTGGACGAGTGGGGCAGGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCCTCGACCAAGGGCCCATCC
GTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT

TCCCCGAACCGGTGACGGTGTcTGGAACCTCAGGCGCtCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACA
GTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGCGCACCCAGACCTACATCTGC
AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACAT
gcCCAcCGTGCCAGCACCTGAATTCGAGGGGGGAcCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCaAGACACCT
CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAAC
TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTG
TGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC
CCTCCCAGCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTcTACACCCTGCCC
CCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC
CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT
TCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

[0897] >SEQ ID NO:19 10.3AA_LC

[0898] QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG
AVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKNYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0899] >SEQ ID NO:20 10.3Nt-LC

[0900] CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCT
GGAAGCCTCTCCAACATCGGAAGGAATCCTGTAACTGGTATCAGCAGCTCCCAGGGACGGCCCCCAAACCTCCTCAT
CTATCTTGATAATCTACGGCTAAGTGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGAACCTCAGCCTCCCTGG
CCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAACATGGGATGACAGCCACCCCGGGTGGACG
TTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCGGCGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTC
TGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCT
GGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCG
GCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAGTCCACAGAAGCTACAGTGCCAGGTACGCATGAAGG
GAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTCA

[0901] >SEQ ID NO:21 10.3AA_VH

[0902] EVQLLESGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGRITYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGRVDEWGRGTLVTSS

[0903] >SEQ ID NO:22 10.3Nt_VH

[0904] GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCA
GCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCTATAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTC
AGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGAACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATT
CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGATTAGGG
TATGGGCGGGTGGACGAGTGGGGCAGGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT

[0905] >SEQ ID NO:23 10.3AA_VL

[0906] QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL

[0907] >SEQ ID NO:24 10.3Nt-VL

[0908] CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTT
GGAAGCCTCTCCAACATCGGAAGGAATCCTGTAACTGGTATCAGCAGCTCCCAGGGACGGCCCCCAAACCTCCTCAT
CTATCTTGATAATCTACGGCTAAGTGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGAACCTCAGCCTCCCTGG
CCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAACATGGGATGACAGCCACCCCGGGTGGACG
TTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

[0909] >SEQ ID NO:25 CD7300010亲本FW1-VL

[0910] LPVLTQPPSVSGTPGQRTISC

[0911] >SEQ ID NO:26 CD7300010 GL FW1-VL

[0912] QSVLTQPPSASGTPGQRTISC

[0913] >SEQ ID NO:27 CD7300010亲本FW2-VL

[0914] WYKQVPGTAPKLLIY

[0915] >SEQ ID NO:28 CD7300010 GL FW2-VL

[0916] WYQQLPGTAPKLLIY

[0917] >SEQ ID NO:29 CD7300010亲本/GL FW3-VL

[0918] GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC

[0919] >SEQ ID NO:30 CD7300010亲本/GL FW4-VL (连同CD370002和2C5)

[0920] FGGGTKLTVL

[0921] >SEQ ID NO:31 CD7300010亲本/GL FW1-VH (连同CD370002和2C5)

[0922] EVQLLESGLLVQPGSLRLSCAASGFTFS

[0923] >SEQ ID NO:32 CD7300010亲本/GL FW2-VH (连同CD370002和2C5)

[0924] WVRQAPGKGLEWVS

[0925] >SEQ ID NO:33 CD7300010亲本/GL FW3-VH (连同CD370002和2C5)

[0926] RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

[0927] >SEQ ID NO:34 CD7300010亲本/GL FW4-VH

[0928] WGRGTLVTVSS

[0929] >SEQ ID NO:35 CD7300010 CDR1-VH (连同CD370002和2C5)

[0930] SYAMS

[0931] >SEQ ID NO:36 CD7300010 CDR1-VH

[0932] SYAYS

[0933] >SEQ ID NO:37 CDR2-VH (连同CD370002)

[0934] AISGSGGSTYYADSVKG

[0935] >SEQ ID NO:38 CDR2-VH

[0936] LIWGSWGSTYYADSVKG

[0937] >SEQ ID NO:39 CDR2-VH

[0938] AISGSGGRYYADSVKG

[0939] >SEQ ID NO:40 CDR2-VH

[0940] AISGSWGRTYYADSVKG

[0941] >SEQ ID NO:41 CDR3-VH

[0942] LGYSTIDY

[0943] >SEQ ID NO:42 CDR3-VH
[0944] LGYSTIDK
[0945] >SEQ ID NO:43 CDR3-VH
[0946] LGYSTIDM
[0947] >SEQ ID NO:44 CDR3-VH
[0948] LGYSTIDL
[0949] >SEQ ID NO:45 CDR3-VH
[0950] LGYGRVDE
[0951] >SEQ ID NO:46 CDR1-VL
[0952] SGSLSNIGRNPVN
[0953] >SEQ ID NO:47 CDR1-VL
[0954] SGSLSNIGRNEVN
[0955] >SEQ ID NO:48 CDR1-VL
[0956] SGSLSNIGRNDVN
[0957] >SEQ ID NO:49 CDR2-VL
[0958] LNNQRPS
[0959] >SEQ ID NO:50 CDR2-VL
[0960] LDNLRLG
[0961] >SEQ ID NO:51 CDR2-VL
[0962] LDNLRLS
[0963] >SEQ ID NO:52 CDR2-VL
[0964] LNNQRLG
[0965] >SEQ ID NO:53 CDR3-VL
[0966] ATWDDSLNGWL
[0967] >SEQ ID NO:54 CDR3-VL
[0968] ATWDDSLKGWL
[0969] >SEQ ID NO:55 CDR3-VL
[0970] ATWDDSLIGWL
[0971] >SEQ ID NO:56 CDR3-VL
[0972] ATWDDSHPGWT
[0973] >SEQ ID NO:57 CD730010-VL
[0974] LPVLTQPPSVSGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYKQVPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNGWLFGGGTKLTVL
[0975] >SEQ ID NO:58 CD730010GL9-VL
[0976] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNGWLFGGGTKLTVL
[0977] >SEQ ID NO:59 P32E-VL
[0978] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNEVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNGWLFGGGTKLTVL

[0979] >SEQ ID NO:60 C1-VL
[0980] QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNEVNWYQQLPGTAPKLLIYLNQRPSPGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLKGWLFGGGTKLTVL
[0981] >SEQ ID NO:61 C2-VL
[0982] QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLGGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLKGWLFGGGTKLTVL
[0983] >SEQ ID NO:62 D3-VL
[0984] QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLIGWLFGGGTKLTVL
[0985] >SEQ ID NO:63 G10-VL
[0986] QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNDVNWYQQLPGTAPKLLIYLNQRLGGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLKGWLFGGGTKLTVL
[0987] >SEQ ID NO:64 HPT-VL
[0988] QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLNQRPSPGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL
[0989] >SEQ ID NO:65 GRVE-VL
[0990] QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLNQRPSPGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNGWLFGGGTKLTVL
[0991] >SEQ ID NO:66 73combo1 (C1+GRVE+HPT) -VL
[0992] QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNEVNWYQQLPGTAPKLLIYLNQRPSPGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL
[0993] >SEQ ID NO:67 73combo2 (C2+GRVE+HPT) -VL
[0994] QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLGGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL
[0995] >SEQ ID NO:68 73combo3 (D3+GRVE+HPT) -VL [10.3]
[0996] QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL
[0997] >SEQ ID NO:69 73combo5 (G10+GRVE+HPT) -VL
[0998] QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNDVNWYQQLPGTAPKLLIYLNQRLGGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL
[0999] >SEQ ID NO:70 73combo6 (GRVE+HPT) -VL
[1000] QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLNQRPSPGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL
[1001] >SEQ ID NO:71 CD730010-VH
[1002] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDYWGRGTLVTVSS
[1003] >SEQ ID NO:72 CD730010GL9-VH
[1004] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDYWGRGTLVTVSS

- [1005] >SEQ ID NO:73 P32E-VH
- [1006] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDYWGRGTLVTVSS
- [1007] >SEQ ID NO:74 C1-VH
- [1008] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDKWGRGTLVTVSS
- [1009] >SEQ ID NO:75 C2-VH
- [1010] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSLIWGSWGSTYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDMWGRGTLVTVSS
- [1011] >SEQ ID NO:76 D3-VH
- [1012] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGRYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDLWGRGTLVTVSS
- [1013] >SEQ ID NO:77 G10-VH
- [1014] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGRYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDLWGRGTLVTVSS
- [1015] >SEQ ID NO:78 HPT-VH
- [1016] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDYWGRGTLVTVSS
- [1017] >SEQ ID NO:79 GRVE-VH
- [1018] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLG YGRVDEWGRGTLVTVSS
- [1019] >SEQ ID NO:80 73combo1 (C1+GRVE+HPT) -VH
- [1020] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLG YGRVDEWGRGTLVTVSS
- [1021] >SEQ ID NO:81 73combo2 (C2+GRVE+HPT) -VH
- [1022] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSLIWGSWGSTYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLG YGRVDEWGRGTLVTVSS
- [1023] >SEQ ID NO:82 73combo3 (D3+GRVE+HPT) -VH[10.3]
- [1024] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGRYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLG YGRVDEWGRGTLVTVSS
- [1025] >SEQ ID NO:83 73combo5 (G10+GRVE+HPT) -VH
- [1026] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGRYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLG YGRVDEWGRGTLVTVSS
- [1027] >SEQ ID NO:84 73combo6 (GRVE+HPT) -VH
- [1028] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLG YGRVDEWGRGTLVTVSS
- [1029] >SEQ ID NO:85 CD730002VH
- [1030] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWGQGMVTVSS

[1031] >SEQ ID NO:86 CD730002VL
[1032] QSVLTQPPSVSVSPGQTATITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRPSRIPERFSGSNSGNT
ATLTISGTQALDEADYFCQAWDTSFWVFGGGTKLTVL
[1033] >SEQ ID NO:87 2C5VH
[1034] EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKRRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWGQGMVTVSS
[1035] >SEQ ID NO:88 2C5VL
[1036] QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRLSGIPERFSGSNSGNT
ATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFWVFGGGTKLTVL
[1037] >SEQ ID NO:89 CD730002亲本/2C5FW4-VH
[1038] WGQGMVTVSS
[1039] >SEQ ID NO:90 CD730002亲本FW1-VL
[1040] QSVLTQPPSVSVSPGQTATITC
[1041] >SEQ ID NO:91 CD7300002 2C5 FW1-VL
[1042] QSVLTQPPSVSVSPGQTASITC
[1043] >SEQ ID NO:92 CD730002亲本/2C5 FW2-VL
[1044] WYQQKPGQSPVLVIY
[1045] >SEQ ID NO:93 CD730002亲本FW3-VL
[1046] RIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYFC
[1047] >SEQ ID NO:94 CD730002/2C5 FW3-VL
[1048] GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC
[1049] >SEQ ID NO:95 CD730002/2C5 CDR2-VH
[1050] AISGSGGSTYYADSVKR
[1051] >SEQ ID NO:96 CD730002亲本/2C5 CDR3-VH
[1052] DKGYWYMDV
[1053] >SEQ ID NO:97 CD730002亲本/2C5 CDR1-VL
[1054] SGDKVGDKYAS
[1055] >SEQ ID NO:98 CD730002亲本CDR2-VL
[1056] EDTKRPS
[1057] >SEQ ID NO:99 CD730002 2C5 CDR2-VL
[1058] EDTKRLS
[1059] >SEQ ID NO:100 CD730002亲本/2C5 CDR3-VL
[1060] QAWDTSFWV
[1061] >SEQ ID NO:101 Phen0203-VH
[1062] EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFRFSDFAMHWVRQAPGKGLEWVAGISYDGGNKYYADSVKGRFT
ISRDN SNNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDHGYS GYYGHLDYWGRGTLVTVSS
[1063] >SEQ ID NO:102 Phen0203-VL
[1064] QSVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGRVFGTGTKLTVL

[1065] >SEQ ID NO:103 CD730004-VH
[1066] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRPNYYGASGSYYKQGGDHWGQGTMTVTSS
[1067] >SEQ ID NO:104 CD730004-VL
[1068] NFMLTQPHSVSESPGQTVTISCTRSSGSIASKYVQWYQKRP GSSPTTVIYEDTQRPSGVPDRFSGSIDI
SSNSASLTISGLRTEDEADYYCQSYDSTNWFVGGGTKVTVL
[1069] >SEQ ID NO:105 CD730008-VH
[1070] EVQLLETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNYGNLDHWGKGT LVTVSS
[1071] >SEQ ID NO:106 CD730008-VL
[1072] QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYQDRKRPSGIPERFSGSNSGNT
ATLTISGTQPMDEADYYCQAWDSSHVWFVGGGTKLTVL
[1073] >SEQ ID NO:107 CD730068-VH
[1074] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYIMGWVRQAPGKGLEWVSSISSSGGATIIYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDMAVYYCAKDHLGGHGMDVWGQGT TTVTVSS
[1075] >SEQ ID NO:108 CD730068-VL
[1076] DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQDISNYLAWFQQKPGKAPKSLIFAASSLESGVPSKFSGSGSGT
DFTLTISSLQPEDSATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK
[1077] >SEQ ID NO:109 CD730069-VH
[1078] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSEYQMGWVRQAPGKGLEWVSYIRSSGGQTIYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTYSSGWHIDYWGQGT LVTVSS
[1079] >SEQ ID NO:110 CD730069-VL
[1080] DIQMTQSPDLSASVGDRTTITCRASQISRYLNWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSGSGT
DFS LTISSLQLED FATYYCQQSYRTPLTFGGGTKVEIQ
[1081] >SEQ ID NO:111 克隆2 SGMV-VH
[1082] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWGQGTMTVTSS
[1083] >SEQ ID NO:112 克隆2 SGMV-VL
[1084] QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRPSGIPERFSGSNSGNT
ATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFVWFVGGGTKLTVL
[1085] >SEQ ID NO:113 CDRH1 Y32V-VH
[1086] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSVAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWGQGTMTVTSS
[1087] >SEQ ID NO:114 CDRH1 M34R-VH
[1088] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYARSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWGQGTMTVTSS
[1089] >SEQ ID NO:115 CDRH2 T57P-VH
[1090] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSPYYADSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWGQGTMTVTSS

- [1091] >SEQ ID NO:116 CDRH2 A60G-VH
- [1092] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYGDSVKGRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWGQGTMTVSS
- [1093] >SEQ ID NO:117 CDRH2 G65R-VH
- [1094] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKRRFT
ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWGQGTMTVSS
- [1095] >SEQ ID NO:118 CDRL2 T52S-VL
- [1096] QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSNSGNT
ATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFWVFGGGTKLTVLL
- [1097] >SEQ ID NO:119 CDRL2 R54Y-VL
- [1098] QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKYPSGIPERFSGSNSGNT
ATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFWVFGGGTKLTVLVL
- [1099] >SEQ ID NO:120 CDRL2 P55H-VL
- [1100] QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSVLVIYEDTKRHSGIPERFSGSNSGNTA
TLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFWVFGGGTKLTVLVL
- [1101] >SEQ ID NO:121 CDRL2 P55L-VL
- [1102] QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRLSGIPERFSGSNRGNT
ATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFWVFGGGTKLTVLVL
- [1103] >SEQ ID NO:122 2SGMY FW3-VL
- [1104] GIPERFSGSNRGNTATLTISGTQAMDEADYYC
- [1105] >SEQ ID NO:123 CDRH1 Y32V CDR1-VH
- [1106] SVAMS
- [1107] >SEQ ID NO:124 CDRH1 M34R CDR1-VH
- [1108] SYARS
- [1109] >SEQ ID NO:125 CDRH2 T57P CDR2-VH
- [1110] AISGSGGSPYYADSVKG
- [1111] >SEQ ID NO:126 CDRH2 A60G CDR2-VH
- [1112] AISGSGGSTYYGDSVKG
- [1113] >SEQ ID NO:127 CDRL2 T52S CDR2-VL
- [1114] EDSKRPS
- [1115] >SEQ ID NO:128 CDRL2 R54H CDR2-VL
- [1116] EDTKYP
- [1117] >SEQ ID NO:129 CDRL2 P55H CDR2-VL
- [1118] EDTKRLS
- [1119] >SEQ ID NO:130曲美木单抗VL,来自美国6,682,736
- [1120] PSSLSASVGDRVTITCRASQSINSYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQYYSTPFTFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
- [1121] >SEQ ID NO:131曲美木单抗VH,来自美国6,682,736
- [1122] GVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNT

LYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLYYYYYGMDVWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVH

[1123] >SEQ ID NO:132曲美木单抗VH CDR1,来自美国6,682,736

[1124] GFTFSSYGMH

[1125] >SEQ ID NO:133曲美木单抗VH CDR2,来自美国6,682,736

[1126] VIWYDGSNKYYADSV

[1127] >SEQ ID NO:134曲美木单抗VH CDR3,来自美国6,682,736

[1128] DPRGATLYYYYYGMDV

[1129] >SEQ ID NO:135曲美木单抗VL CDR1,来自美国6,682,736

[1130] RASQSINSYLD

[1131] >SEQ ID NO:136曲美木单抗VL CDR2,来自美国6,682,736

[1132] AASSLQS

[1133] >SEQ ID NO:137曲美木单抗VL CDR3,来自美国6,682,736

[1134] QQYYSTPFT

[1135] >SEQ ID NO:138

[1136] US 20130034559_77序列77,来自US 20130034559生物体:智人

[1137] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSG
TDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIK

[1138] >SEQ ID NO:139

[1139] US 20130034559_72序列72,来自US 20130034559生物体:智人

[1140] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFT
ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGTTLVTVSS

[1141] >SEQ ID NO:140-VH CDR1

[1142] US 20130034559_73序列73,来自US 20130034559生物体:智人

[1143] RYWMS

[1144] >SEQ ID NO:141-VH CDR2

[1145] US 20130034559_74序列74,来自US 20130034559生物体:智人

[1146] NIKQDGSEKYYVDSVKG

[1147] >SEQ ID NO:142-VH CDR3

[1148] US 20130034559_75序列75,来自US 20130034559生物体:智人

[1149] EGGWFGELAFDY

[1150] >SEQ ID NO:143-VL CDR1

[1151] US 20130034559_78序列78,来自US 20130034559生物体:智人

[1152] RASQRVSSSYLA

[1153] >SEQ ID NO:144-VL CDR2

[1154] US 20130034559_79序列79,来自US 20130034559生物体:智人

[1155] DASSRAT

[1156] >SEQ ID NO:145-VL CDR3

[1157] US 20130034559_80序列80,来自US 20130034559生物体:智人

[1158] QQYGSLPWT

[0001]	<110>	米迪缪尼有限公司
[0002]	<120>	对CD73具有特异性的结合分子及其用途
[0003]	<130>	CD73-100W01
[0004]	<140>	
[0005]	<141>	
[0006]	<150>	62/188,999
[0007]	<151>	2015-07-06
[0008]	<150>	62/147,329
[0009]	<151>	2015-04-14
[0010]	<150>	62/077,486
[0011]	<151>	2014-11-10
[0012]	<160>	178
[0013]	<170>	PatentIn 3.5版
[0014]	<210>	1
[0015]	<211>	106
[0016]	<212>	PRT
[0017]	<213>	人工序列
[0018]	<220>	
[0019]	<221>	来源
[0020]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[0021]		多肽"
[0022]	<400>	1
[0023]		Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
[0024]		1 5 10 15
[0025]		Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Val Gly Asp Lys Tyr Ala
[0026]		20 25 30
[0027]		Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
[0028]		35 40 45
[0029]		Glu Asp Thr Lys Arg Pro Ser Arg Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
[0030]		50 55 60
[0031]		Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Leu
[0032]		65 70 75 80
[0033]		Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Ala Trp Asp Thr Ser Phe Trp Val
[0034]		85 90 95
[0035]		Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[0036]		100 105
[0037]	<210>	2
[0038]	<211>	119
[0039]	<212>	PRT
[0040]	<213>	人工序列
[0041]	<220>	

[0042] <221> 来源
 [0043] <223> /注解="人工序列的说明:合成
 [0044] 多肽"
 [0045] <400> 2
 [0046] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0047] 1 5 10 15
 [0048] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 [0049] 20 25 30
 [0050] Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0051] 35 40 45
 [0052] Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0053] 50 55 60
 [0054] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0055] 65 70 75 80
 [0056] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0057] 85 90 95
 [0058] Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 [0059] 100 105 110
 [0060] Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 [0061] 115
 [0062] <210> 3
 [0063] <211> 110
 [0064] <212> PRT
 [0065] <213> 人工序列
 [0066] <220>
 [0067] <221> 来源
 [0068] <223> /注解="人工序列的说明:合成
 [0069] 多肽"
 [0070] <400> 3
 [0071] Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 [0072] 1 5 10 15
 [0073] Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
 [0074] 20 25 30
 [0075] Pro Val Asn Trp Tyr Lys Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 [0076] 35 40 45
 [0077] Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 [0078] 50 55 60
 [0079] Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 [0080] 65 70 75 80
 [0081] Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
 [0082] 85 90 95
 [0083] Asn Gly Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

[0084]	100	105	110
[0085]	<210> 4		
[0086]	<211> 117		
[0087]	<212> PRT		
[0088]	<213> 人工序列		
[0089]	<220>		
[0090]	<221> 来源		
[0091]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[0092]	多肽"		
[0093]	<400> 4		
[0094]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0095]	1	5	10 15
[0096]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
[0097]	20	25	30
[0098]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0099]	35	40	45
[0100]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[0101]	50	55	60
[0102]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0103]	65	70	75 80
[0104]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0105]	85	90	95
[0106]	Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu		
[0107]	100	105	110
[0108]	Val Thr Val Ser Ser		
[0109]	115		
[0110]	<210> 5		
[0111]	<211> 111		
[0112]	<212> PRT		
[0113]	<213> 人工序列		
[0114]	<220>		
[0115]	<221> 来源		
[0116]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[0117]	多肽"		
[0118]	<400> 5		
[0119]	Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys		
[0120]	1	5	10 15
[0121]	Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Lys		
[0122]	20	25	30
[0123]	Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Met Ala Val		
[0124]	35	40	45
[0125]	Ile Tyr Lys Asp Asn Gln Arg Ser Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser		

[0126]	50	55	60
[0127]	Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly		
[0128]	65	70	75 80
[0129]	Leu Lys Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ala		
[0130]	85	90	95
[0131]	Ser Asn Tyr Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu		
[0132]	100	105	110
[0133]	<210> 6		
[0134]	<211> 118		
[0135]	<212> PRT		
[0136]	<213> 人工序列		
[0137]	<220>		
[0138]	<221> 来源		
[0139]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[0140]	多肽"		
[0141]	<400> 6		
[0142]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0143]	1 5 10 15		
[0144]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
[0145]	20 25 30		
[0146]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0147]	35 40 45		
[0148]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[0149]	50 55 60		
[0150]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0151]	65 70 75 80		
[0152]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0153]	85 90 95		
[0154]	Ala Arg Arg Gly His Gly Leu Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr		
[0155]	100 105 110		
[0156]	Thr Val Thr Val Ser Ser		
[0157]	115		
[0158]	<210> 7		
[0159]	<211> 110		
[0160]	<212> PRT		
[0161]	<213> 人工序列		
[0162]	<220>		
[0163]	<221> 来源		
[0164]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[0165]	多肽"		
[0166]	<400> 7		
[0167]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln		

[0168]	1	5	10	15
[0169]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Pro Asn Ile Gly Gly Asn			
[0170]	20	25	30	
[0171]	Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu Leu			
[0172]	35	40	45	
[0173]	Ile Tyr Ser Asn Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser			
[0174]	50	55	60	
[0175]	Gly Ser Lys Tyr Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln			
[0176]	65	70	75	80
[0177]	Ser Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Asp Ser Leu			
[0178]	85	90	95	
[0179]	Asn Gly Pro Val Phe Gly Arg Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu			
[0180]	100	105	110	
[0181]	<210> 8			
[0182]	<211> 120			
[0183]	<212> PRT			
[0184]	<213> 人工序列			
[0185]	<220>			
[0186]	<221> 来源			
[0187]	<223> /注解="人工序列的说明:合成			
[0188]	多肽"			
[0189]	<400> 8			
[0190]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Glu			
[0191]	1	5	10	15
[0192]	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser			
[0193]	20	25	30	
[0194]	Ser Tyr Tyr Trp Ala Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu			
[0195]	35	40	45	
[0196]	Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Tyr Arg Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser			
[0197]	50	55	60	
[0198]	Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Met Ser Lys His Gln Phe			
[0199]	65	70	75	80
[0200]	Ser Leu Lys Leu Ser Ser Leu Asn Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr			
[0201]	85	90	95	
[0202]	Cys Ala Ser Leu Tyr Ser Gly Thr Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Arg			
[0203]	100	105	110	
[0204]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0205]	115	120		
[0206]	<210> 9			
[0207]	<211> 110			
[0208]	<212> PRT			
[0209]	<213> 人工序列			

[0210]	<220>
[0211]	<221> 来源
[0212]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[0213]	多肽"
[0214]	<400> 9
[0215]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
[0216]	1 5 10 15
[0217]	Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ala Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
[0218]	20 25 30
[0219]	Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
[0220]	35 40 45
[0221]	Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
[0222]	50 55 60
[0223]	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
[0224]	65 70 75 80
[0225]	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Arg
[0226]	85 90 95
[0227]	Ser Thr Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[0228]	100 105 110
[0229]	<210> 10
[0230]	<211> 119
[0231]	<212> PRT
[0232]	<213> 人工序列
[0233]	<220>
[0234]	<221> 来源
[0235]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[0236]	多肽"
[0237]	<400> 10
[0238]	Gly Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0239]	1 5 10 15
[0240]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[0241]	20 25 30
[0242]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0243]	35 40 45
[0244]	Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0245]	50 55 60
[0246]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ala Leu Tyr
[0247]	65 70 75 80
[0248]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0249]	85 90 95
[0250]	Ser Thr Leu Ser Gly Ser Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly
[0251]	100 105 110

[0252] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0253] 115
 [0254] <210> 11
 [0255] <211> 110
 [0256] <212> PRT
 [0257] <213> 人工序列
 [0258] <220>
 [0259] <221> 来源
 [0260] <223> /注解="人工序列的说明:合成
 [0261] 多肽"
 [0262] <400> 11
 [0263] Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 [0264] 1 5 10 15
 [0265] Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 [0266] 20 25 30
 [0267] Thr Val Ser Trp Tyr Gln His Leu Pro Gly Thr Ala Pro Gln Leu Leu
 [0268] 35 40 45
 [0269] Ile Tyr Thr Asn Asn His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 [0270] 50 55 60
 [0271] Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 [0272] 65 70 75 80
 [0273] Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 [0274] 85 90 95
 [0275] Ser Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 [0276] 100 105 110
 [0277] <210> 12
 [0278] <211> 125
 [0279] <212> PRT
 [0280] <213> 人工序列
 [0281] <220>
 [0282] <221> 来源
 [0283] <223> /注解="人工序列的说明:合成
 [0284] 多肽"
 [0285] <400> 12
 [0286] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 [0287] 1 5 10 15
 [0288] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 [0289] 20 25 30
 [0290] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0291] 35 40 45
 [0292] Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0293] 50 55 60

[0294]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Phe
[0295]	65 70 75 80
[0296]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
[0297]	85 90 95
[0298]	Ala Arg Gly His Leu Leu Arg Ile Gly Asp Ile Phe Tyr Tyr Ser Leu
[0299]	100 105 110
[0300]	Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0301]	115 120 125
[0302]	<210> 13
[0303]	<211> 110
[0304]	<212> PRT
[0305]	<213> 人工序列
[0306]	<220>
[0307]	<221> 来源
[0308]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[0309]	多肽"
[0310]	<400> 13
[0311]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ala Pro Gly Gln
[0312]	1 5 10 15
[0313]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
[0314]	20 25 30
[0315]	Thr Val Asn Trp Tyr Gln Arg Leu Pro Gly Ala Ala Pro Gln Leu Leu
[0316]	35 40 45
[0317]	Ile Tyr Asn Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
[0318]	50 55 60
[0319]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Gly Ser Leu Val Ile Ser Gly Leu Gln
[0320]	65 70 75 80
[0321]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
[0322]	85 90 95
[0323]	Ser Gly Asn Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
[0324]	100 105 110
[0325]	<210> 14
[0326]	<211> 120
[0327]	<212> PRT
[0328]	<213> 人工序列
[0329]	<220>
[0330]	<221> 来源
[0331]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[0332]	多肽"
[0333]	<400> 14
[0334]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
[0335]	1 5 10 15

[0336]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[0337]	20 25 30
[0338]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0339]	35 40 45
[0340]	Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0341]	50 55 60
[0342]	Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
[0343]	65 70 75 80
[0344]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Arg Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
[0345]	85 90 95
[0346]	Ala Ser Gly Leu Thr Gly Val Ala Gly Ala Leu Gly Val Trp Gly Arg
[0347]	100 105 110
[0348]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0349]	115 120
[0350]	<210> 15
[0351]	<211> 106
[0352]	<212> PRT
[0353]	<213> 人工序列
[0354]	<220>
[0355]	<221> 来源
[0356]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[0357]	多肽"
[0358]	<400> 15
[0359]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
[0360]	1 5 10 15
[0361]	Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly Asp Arg Leu Arg Asn Glu Phe Val
[0362]	20 25 30
[0363]	Ser Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Val Val Val Ile Tyr
[0364]	35 40 45
[0365]	Gln Asp Ile Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
[0366]	50 55 60
[0367]	Lys Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Pro Gln Thr Val
[0368]	65 70 75 80
[0369]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Asn Thr Val Val
[0370]	85 90 95
[0371]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[0372]	100 105
[0373]	<210> 16
[0374]	<211> 122
[0375]	<212> PRT
[0376]	<213> 人工序列
[0377]	<220>

[0378] <221> 来源
 [0379] <223> /注解="人工序列的说明:合成
 [0380] 多肽"
 [0381] <400> 16
 [0382] Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ser Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 [0383] 1 5 10 15
 [0384] Thr Leu Ser Leu Ile Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
 [0385] 20 25 30
 [0386] Gly Asn Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Ala Gly Leu Glu
 [0387] 35 40 45
 [0388] Trp Ile Gly Tyr Ile Phe Ser Asn Gly Ala Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 [0389] 50 55 60
 [0390] Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 [0391] 65 70 75 80
 [0392] Ser Leu Thr Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 [0393] 85 90 95
 [0394] Cys Ala Arg Gly Asp Phe Trp Thr Gly Lys Gly Val Phe Asp Pro Trp
 [0395] 100 105 110
 [0396] Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0397] 115 120
 [0398] <210> 17
 [0399] <211> 447
 [0400] <212> PRT
 [0401] <213> 人工序列
 [0402] <220>
 [0403] <221> 来源
 [0404] <223> /注解="人工序列的说明:合成
 [0405] 多肽"
 [0406] <400> 17
 [0407] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0408] 1 5 10 15
 [0409] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 [0410] 20 25 30
 [0411] Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0412] 35 40 45
 [0413] Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0414] 50 55 60
 [0415] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0416] 65 70 75 80
 [0417] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0418] 85 90 95
 [0419] Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu Trp Gly Arg Gly Thr Leu

[0420]	100	105	110
[0421]	Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu		
[0422]	115	120	125
[0423]	Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys		
[0424]	130	135	140
[0425]	Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser		
[0426]	145	150	155
[0427]	Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser		
[0428]	165	170	175
[0429]	Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser		
[0430]	180	185	190
[0431]	Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn		
[0432]	195	200	205
[0433]	Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His		
[0434]	210	215	220
[0435]	Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val		
[0436]	225	230	235
[0437]	Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
[0438]	245	250	255
[0439]	Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu		
[0440]	260	265	270
[0441]	Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
[0442]	275	280	285
[0443]	Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
[0444]	290	295	300
[0445]	Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
[0446]	305	310	315
[0447]	Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile		
[0448]	325	330	335
[0449]	Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
[0450]	340	345	350
[0451]	Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
[0452]	355	360	365
[0453]	Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
[0454]	370	375	380
[0455]	Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
[0456]	385	390	395
[0457]	Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
[0458]	405	410	415
[0459]	Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
[0460]	420	425	430
[0461]	His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		

[0462]	435	440	445
[0463]	<210> 18		
[0464]	<211> 1341		
[0465]	<212> DNA		
[0466]	<213> 人工序列		
[0467]	<220>		
[0468]	<221> 来源		
[0469]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[0470]	多核苷酸"		
[0471]	<400> 18		
[0472]	gagggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc	60	
[0473]	tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcct atagctgggt ccgccaggct	120	
[0474]	ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag aacatactac	180	
[0475]	gcagactccg tgaaggcccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240	
[0476]	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagattaggg	300	
[0477]	tatgggcggg tggacgagtg gggcagggga accctgggtca ccgtctcgag tgcgtcgacc	360	
[0478]	aagggcccat ccgtcttccc cctggcaccc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg	420	
[0479]	gccctgggct gcctgtgtaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc ctggaactca	480	
[0480]	ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcttc aggactctac	540	
[0481]	tcctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc	600	
[0482]	aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gaggttgagcc caaatcttgt	660	
[0483]	gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaat tcgagggggg accgtcagtc	720	
[0484]	ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	780	
[0485]	tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac	840	
[0486]	ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	900	
[0487]	cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	960	
[0488]	tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc tccatcgaga aaacctctc caaagccaaa	1020	
[0489]	gggcagcccc gagaaccaca ggtctacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag	1080	
[0490]	aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	1140	
[0491]	tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc	1200	
[0492]	gacggctcct tcttctctta tagcaagtc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg	1260	
[0493]	aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc	1320	
[0494]	ctctccctgt ctccgggtaa a	1341	
[0495]	<210> 19		
[0496]	<211> 216		
[0497]	<212> PRT		
[0498]	<213> 人工序列		
[0499]	<220>		
[0500]	<221> 来源		
[0501]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[0502]	多肽"		
[0503]	<400> 19		

[0504]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln	
[0505]	1 5 10 15	
[0506]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn	
[0507]	20 25 30	
[0508]	Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu	
[0509]	35 40 45	
[0510]	Ile Tyr Leu Asp Asn Leu Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser	
[0511]	50 55 60	
[0512]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln	
[0513]	65 70 75 80	
[0514]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His	
[0515]	85 90 95	
[0516]	Pro Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln	
[0517]	100 105 110	
[0518]	Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu	
[0519]	115 120 125	
[0520]	Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr	
[0521]	130 135 140	
[0522]	Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys	
[0523]	145 150 155 160	
[0524]	Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr	
[0525]	165 170 175	
[0526]	Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His	
[0527]	180 185 190	
[0528]	Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys	
[0529]	195 200 205	
[0530]	Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser	
[0531]	210 215	
[0532]	<210> 20	
[0533]	<211> 648	
[0534]	<212> DNA	
[0535]	<213> 人工序列	
[0536]	<220>	
[0537]	<221> 来源	
[0538]	<223> /注解="人工序列的说明:合成	
[0539]	多核苷酸"	
[0540]	<400> 20	
[0541]	cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
[0542]	tcttgttctg gaagcctctc caacatcgga aggaatcctg ttaactggta tcagcagctc	120
[0543]	ccagggacgg cccccaaact cctcatctat cttgataatc tacggctaag tggggtccct	180
[0544]	gaccgattct ctggctccaa gtctggaacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag	240
[0545]	tctgaggatg aggetgatta ttactgtgca acatgggatg acagccaccc cgggtggacg	300

[0546] ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtcagccca aggcggcgcc ctcggtcact 360
 [0547] ctgttccccgc cctcctctga ggagcttcaa gccaacaagg ccacactggt gtgtctcata 420
 [0548] agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag 480
 [0549] gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc 540
 [0550] tacctgagcc tgacgcctga gcagtgaag tccacagaa gctacagctg ccaggtcacg 600
 [0551] catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg gccctacag aatgttca 648
 [0552] <210> 21
 [0553] <211> 117
 [0554] <212> PRT
 [0555] <213> 人工序列
 [0556] <220>
 [0557] <221> 来源
 [0558] <223> /注解="人工序列的说明:合成
 [0559] 多肽"
 [0560] <400> 21
 [0561] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0562] 1 5 10 15
 [0563] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 [0564] 20 25 30
 [0565] Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0566] 35 40 45
 [0567] Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0568] 50 55 60
 [0569] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0570] 65 70 75 80
 [0571] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0572] 85 90 95
 [0573] Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
 [0574] 100 105 110
 [0575] Val Thr Val Ser Ser
 [0576] 115
 [0577] <210> 22
 [0578] <211> 351
 [0579] <212> DNA
 [0580] <213> 人工序列
 [0581] <220>
 [0582] <221> 来源
 [0583] <223> /注解="人工序列的说明:合成
 [0584] 多核苷酸"
 [0585] <220>
 [0586] <221> CDS
 [0587] <222> (1) .. (351)

[0588]	<400> 22	
[0589]	gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg	48
[0590]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[0591]	1 5 10 15	
[0592]	tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agc agc tat	96
[0593]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
[0594]	20 25 30	
[0595]	gcc tat agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc	144
[0596]	Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[0597]	35 40 45	
[0598]	tca gct att agt ggt agt ggt ggt aga aca tac tac gca gac tcc gtg	192
[0599]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
[0600]	50 55 60	
[0601]	aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat	240
[0602]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
[0603]	65 70 75 80	
[0604]	ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt	288
[0605]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0606]	85 90 95	
[0607]	gcg aga tta ggg tat ggg cgg gtg gac gag tgg ggc agg gga acc ctg	336
[0608]	Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu Trp Gly Arg Gly Thr Leu	
[0609]	100 105 110	
[0610]	gtc acc gtc tcg agt	351
[0611]	Val Thr Val Ser Ser	
[0612]	115	
[0613]	<210> 23	
[0614]	<211> 110	
[0615]	<212> PRT	
[0616]	<213> 人工序列	
[0617]	<220>	
[0618]	<221> 来源	
[0619]	<223> /注解="人工序列的说明:合成	
[0620]	多肽"	
[0621]	<400> 23	
[0622]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln	
[0623]	1 5 10 15	
[0624]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn	
[0625]	20 25 30	
[0626]	Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu	
[0627]	35 40 45	
[0628]	Ile Tyr Leu Asp Asn Leu Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser	
[0629]	50 55 60	

[0630]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln	
[0631]	65 70 75 80	
[0632]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His	
[0633]	85 90 95	
[0634]	Pro Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
[0635]	100 105 110	
[0636]	<210> 24	
[0637]	<211> 330	
[0638]	<212> DNA	
[0639]	<213> 人工序列	
[0640]	<220>	
[0641]	<221> 来源	
[0642]	<223> /注解="人工序列的说明:合成	
[0643]	多核苷酸"	
[0644]	<220>	
[0645]	<221> CDS	
[0646]	<222> (1) .. (330)	
[0647]	<400> 24	
[0648]	cag tct gtg ctg act cag cca ccc tca gcg tct ggg acc ccc ggg cag	48
[0649]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln	
[0650]	1 5 10 15	
[0651]	agg gtc acc atc tct tgt tct gga agc ctc tcc aac atc gga agg aat	96
[0652]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn	
[0653]	20 25 30	
[0654]	cct gtt aac tgg tat cag cag ctc cca ggg acg gcc ccc aaa ctc ctc	144
[0655]	Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu	
[0656]	35 40 45	
[0657]	atc tat ctt gat aat cta cgg cta agt ggg gtc cct gac cga ttc tct	192
[0658]	Ile Tyr Leu Asp Asn Leu Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser	
[0659]	50 55 60	
[0660]	ggc tcc aag tct gga acc tca gcc tcc ctg gcc atc agt ggg ctc cag	240
[0661]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln	
[0662]	65 70 75 80	
[0663]	tct gag gat gag gct gat tat tac tgt gca aca tgg gat gac agc cac	288
[0664]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His	
[0665]	85 90 95	
[0666]	ccc ggg tgg acg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta	330
[0667]	Pro Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
[0668]	100 105 110	
[0669]	<210> 25	
[0670]	<211> 22	
[0671]	<212> PRT	

[0672]	<213>	人工序列
[0673]	<220>	
[0674]	<221>	来源
[0675]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[0676]		肽"
[0677]	<400>	25
[0678]	Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Thr Pro Gly Gln	
[0679]	1	5 10 15
[0680]	Arg Val Thr Ile Ser Cys	
[0681]		20
[0682]	<210>	26
[0683]	<211>	22
[0684]	<212>	PRT
[0685]	<213>	人工序列
[0686]	<220>	
[0687]	<221>	来源
[0688]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[0689]		肽"
[0690]	<400>	26
[0691]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln	
[0692]	1	5 10 15
[0693]	Arg Val Thr Ile Ser Cys	
[0694]		20
[0695]	<210>	27
[0696]	<211>	15
[0697]	<212>	PRT
[0698]	<213>	人工序列
[0699]	<220>	
[0700]	<221>	来源
[0701]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[0702]		肽"
[0703]	<400>	27
[0704]	Trp Tyr Lys Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr	
[0705]	1	5 10 15
[0706]	<210>	28
[0707]	<211>	15
[0708]	<212>	PRT
[0709]	<213>	人工序列
[0710]	<220>	
[0711]	<221>	来源
[0712]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[0713]		肽"

[0714]	<400> 28
[0715]	Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
[0716]	1 5 10 15
[0717]	<210> 29
[0718]	<211> 32
[0719]	<212> PRT
[0720]	<213> 人工序列
[0721]	<220>
[0722]	<221> 来源
[0723]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[0724]	多肽"
[0725]	<400> 29
[0726]	Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser
[0727]	1 5 10 15
[0728]	Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
[0729]	20 25 30
[0730]	<210> 30
[0731]	<211> 10
[0732]	<212> PRT
[0733]	<213> 人工序列
[0734]	<220>
[0735]	<221> 来源
[0736]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[0737]	肽"
[0738]	<400> 30
[0739]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[0740]	1 5 10
[0741]	<210> 31
[0742]	<211> 30
[0743]	<212> PRT
[0744]	<213> 人工序列
[0745]	<220>
[0746]	<221> 来源
[0747]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[0748]	多肽"
[0749]	<400> 31
[0750]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0751]	1 5 10 15
[0752]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
[0753]	20 25 30
[0754]	<210> 32
[0755]	<211> 14

[0756]	<212>	PRT
[0757]	<213>	人工序列
[0758]	<220>	
[0759]	<221>	来源
[0760]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[0761]		肽"
[0762]	<400>	32
[0763]		Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
[0764]	1	5 10
[0765]	<210>	33
[0766]	<211>	32
[0767]	<212>	PRT
[0768]	<213>	人工序列
[0769]	<220>	
[0770]	<221>	来源
[0771]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[0772]		多肽"
[0773]	<400>	33
[0774]		Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
[0775]	1	5 10 15
[0776]		Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
[0777]		20 25 30
[0778]	<210>	34
[0779]	<211>	11
[0780]	<212>	PRT
[0781]	<213>	人工序列
[0782]	<220>	
[0783]	<221>	来源
[0784]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[0785]		肽"
[0786]	<400>	34
[0787]		Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0788]	1	5 10
[0789]	<210>	35
[0790]	<211>	5
[0791]	<212>	PRT
[0792]	<213>	人工序列
[0793]	<220>	
[0794]	<221>	来源
[0795]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[0796]		肽"
[0797]	<400>	35

[0798] Ser Tyr Ala Met Ser
 [0799] 1 5
 [0800] <210> 36
 [0801] <211> 5
 [0802] <212> PRT
 [0803] <213> 人工序列
 [0804] <220>
 [0805] <221> 来源
 [0806] <223> /注解="人工序列的说明:合成
 [0807] 肽"
 [0808] <400> 36
 [0809] Ser Tyr Ala Tyr Ser
 [0810] 1 5
 [0811] <210> 37
 [0812] <211> 17
 [0813] <212> PRT
 [0814] <213> 人工序列
 [0815] <220>
 [0816] <221> 来源
 [0817] <223> /注解="人工序列的说明:合成
 [0818] 肽"
 [0819] <400> 37
 [0820] Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 [0821] 1 5 10 15
 [0822] Gly
 [0823] <210> 38
 [0824] <211> 17
 [0825] <212> PRT
 [0826] <213> 人工序列
 [0827] <220>
 [0828] <221> 来源
 [0829] <223> /注解="人工序列的说明:合成
 [0830] 肽"
 [0831] <400> 38
 [0832] Leu Ile Trp Gly Ser Trp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 [0833] 1 5 10 15
 [0834] Gly
 [0835] <210> 39
 [0836] <211> 17
 [0837] <212> PRT
 [0838] <213> 人工序列
 [0839] <220>

[0840] <221> 来源
[0841] <223> /注解="人工序列的说明:合成
[0842] 肽"
[0843] <400> 39
[0844] Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
[0845] 1 5 10 15
[0846] Gly
[0847] <210> 40
[0848] <211> 17
[0849] <212> PRT
[0850] <213> 人工序列
[0851] <220>
[0852] <221> 来源
[0853] <223> /注解="人工序列的说明:合成
[0854] 肽"
[0855] <400> 40
[0856] Ala Ile Ser Gly Ser Trp Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
[0857] 1 5 10 15
[0858] Gly
[0859] <210> 41
[0860] <211> 8
[0861] <212> PRT
[0862] <213> 人工序列
[0863] <220>
[0864] <221> 来源
[0865] <223> /注解="人工序列的说明:合成
[0866] 肽"
[0867] <400> 41
[0868] Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Tyr
[0869] 1 5
[0870] <210> 42
[0871] <211> 8
[0872] <212> PRT
[0873] <213> 人工序列
[0874] <220>
[0875] <221> 来源
[0876] <223> /注解="人工序列的说明:合成
[0877] 肽"
[0878] <400> 42
[0879] Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Lys
[0880] 1 5
[0881] <210> 43

[0882] <211> 8
[0883] <212> PRT
[0884] <213> 人工序列
[0885] <220>
[0886] <221> 来源
[0887] <223> /注解="人工序列的说明:合成
[0888] 肽"
[0889] <400> 43
[0890] Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Met
[0891] 1 5
[0892] <210> 44
[0893] <211> 8
[0894] <212> PRT
[0895] <213> 人工序列
[0896] <220>
[0897] <221> 来源
[0898] <223> /注解="人工序列的说明:合成
[0899] 肽"
[0900] <400> 44
[0901] Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Leu
[0902] 1 5
[0903] <210> 45
[0904] <211> 8
[0905] <212> PRT
[0906] <213> 人工序列
[0907] <220>
[0908] <221> 来源
[0909] <223> /注解="人工序列的说明:合成
[0910] 肽"
[0911] <400> 45
[0912] Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu
[0913] 1 5
[0914] <210> 46
[0915] <211> 13
[0916] <212> PRT
[0917] <213> 人工序列
[0918] <220>
[0919] <221> 来源
[0920] <223> /注解="人工序列的说明:合成
[0921] 肽"
[0922] <400> 46
[0923] Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn Pro Val Asn

[0924]	1	5	10
[0925]	<210> 47		
[0926]	<211> 13		
[0927]	<212> PRT		
[0928]	<213> 人工序列		
[0929]	<220>		
[0930]	<221> 来源		
[0931]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[0932]	肽"		
[0933]	<400> 47		
[0934]	Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn Glu Val Asn		
[0935]	1	5	10
[0936]	<210> 48		
[0937]	<211> 13		
[0938]	<212> PRT		
[0939]	<213> 人工序列		
[0940]	<220>		
[0941]	<221> 来源		
[0942]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[0943]	肽"		
[0944]	<400> 48		
[0945]	Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn Asp Val Asn		
[0946]	1	5	10
[0947]	<210> 49		
[0948]	<211> 7		
[0949]	<212> PRT		
[0950]	<213> 人工序列		
[0951]	<220>		
[0952]	<221> 来源		
[0953]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[0954]	肽"		
[0955]	<400> 49		
[0956]	Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser		
[0957]	1	5	
[0958]	<210> 50		
[0959]	<211> 7		
[0960]	<212> PRT		
[0961]	<213> 人工序列		
[0962]	<220>		
[0963]	<221> 来源		
[0964]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[0965]	肽"		

[0966]	<400> 50
[0967]	Leu Asp Asn Leu Arg Leu Gly
[0968]	1 5
[0969]	<210> 51
[0970]	<211> 7
[0971]	<212> PRT
[0972]	<213> 人工序列
[0973]	<220>
[0974]	<221> 来源
[0975]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[0976]	肽"
[0977]	<400> 51
[0978]	Leu Asp Asn Leu Arg Leu Ser
[0979]	1 5
[0980]	<210> 52
[0981]	<211> 7
[0982]	<212> PRT
[0983]	<213> 人工序列
[0984]	<220>
[0985]	<221> 来源
[0986]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[0987]	肽"
[0988]	<400> 52
[0989]	Leu Asn Asn Gln Arg Leu Gly
[0990]	1 5
[0991]	<210> 53
[0992]	<211> 11
[0993]	<212> PRT
[0994]	<213> 人工序列
[0995]	<220>
[0996]	<221> 来源
[0997]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[0998]	肽"
[0999]	<400> 53
[1000]	Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Trp Leu
[1001]	1 5 10
[1002]	<210> 54
[1003]	<211> 11
[1004]	<212> PRT
[1005]	<213> 人工序列
[1006]	<220>
[1007]	<221> 来源

[1008]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[1009]	肽"
[1010]	<400> 54
[1011]	Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Lys Gly Trp Leu
[1012]	1 5 10
[1013]	<210> 55
[1014]	<211> 11
[1015]	<212> PRT
[1016]	<213> 人工序列
[1017]	<220>
[1018]	<221> 来源
[1019]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[1020]	肽"
[1021]	<400> 55
[1022]	Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Ile Gly Trp Leu
[1023]	1 5 10
[1024]	<210> 56
[1025]	<211> 11
[1026]	<212> PRT
[1027]	<213> 人工序列
[1028]	<220>
[1029]	<221> 来源
[1030]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[1031]	肽"
[1032]	<400> 56
[1033]	Ala Thr Trp Asp Asp Ser His Pro Gly Trp Thr
[1034]	1 5 10
[1035]	<210> 57
[1036]	<211> 110
[1037]	<212> PRT
[1038]	<213> 人工序列
[1039]	<220>
[1040]	<221> 来源
[1041]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[1042]	多肽"
[1043]	<400> 57
[1044]	Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Thr Pro Gly Gln
[1045]	1 5 10 15
[1046]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
[1047]	20 25 30
[1048]	Pro Val Asn Trp Tyr Lys Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
[1049]	35 40 45

[1050]	Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
[1051]	50 55 60
[1052]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
[1053]	65 70 75 80
[1054]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
[1055]	85 90 95
[1056]	Asn Gly Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[1057]	100 105 110
[1058]	<210> 58
[1059]	<211> 110
[1060]	<212> PRT
[1061]	<213> 人工序列
[1062]	<220>
[1063]	<221> 来源
[1064]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[1065]	多肽"
[1066]	<400> 58
[1067]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
[1068]	1 5 10 15
[1069]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
[1070]	20 25 30
[1071]	Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
[1072]	35 40 45
[1073]	Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
[1074]	50 55 60
[1075]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
[1076]	65 70 75 80
[1077]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
[1078]	85 90 95
[1079]	Asn Gly Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[1080]	100 105 110
[1081]	<210> 59
[1082]	<211> 110
[1083]	<212> PRT
[1084]	<213> 人工序列
[1085]	<220>
[1086]	<221> 来源
[1087]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[1088]	多肽"
[1089]	<400> 59
[1090]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
[1091]	1 5 10 15

[1092]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
[1093]	20 25 30
[1094]	Glu Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
[1095]	35 40 45
[1096]	Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
[1097]	50 55 60
[1098]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
[1099]	65 70 75 80
[1100]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
[1101]	85 90 95
[1102]	Asn Gly Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[1103]	100 105 110
[1104]	<210> 60
[1105]	<211> 110
[1106]	<212> PRT
[1107]	<213> 人工序列
[1108]	<220>
[1109]	<221> 来源
[1110]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[1111]	多肽"
[1112]	<400> 60
[1113]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
[1114]	1 5 10 15
[1115]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
[1116]	20 25 30
[1117]	Glu Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
[1118]	35 40 45
[1119]	Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
[1120]	50 55 60
[1121]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
[1122]	65 70 75 80
[1123]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
[1124]	85 90 95
[1125]	Lys Gly Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[1126]	100 105 110
[1127]	<210> 61
[1128]	<211> 110
[1129]	<212> PRT
[1130]	<213> 人工序列
[1131]	<220>
[1132]	<221> 来源
[1133]	<223> /注解="人工序列的说明:合成

[1134]	多肽”															
[1135]	<400> 61															
[1136]	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln
[1137]	1			5					10					15		
[1138]	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Asn	Ile	Gly	Arg	Asn
[1139]				20				25					30			
[1140]	Pro	Val	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu
[1141]			35				40					45				
[1142]	Ile	Tyr	Leu	Asp	Asn	Leu	Arg	Leu	Gly	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
[1143]	50					55					60					
[1144]	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln
[1145]	65				70					75					80	
[1146]	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Thr	Trp	Asp	Asp	Ser	Leu
[1147]				85				90					95			
[1148]	Lys	Gly	Trp	Leu	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu		
[1149]			100				105						110			
[1150]	<210> 62															
[1151]	<211> 110															
[1152]	<212> PRT															
[1153]	<213> 人工序列															
[1154]	<220>															
[1155]	<221> 来源															
[1156]	<223> /注解=”人工序列的说明:合成															
[1157]	多肽”															
[1158]	<400> 62															
[1159]	Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln
[1160]	1			5					10					15		
[1161]	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Asn	Ile	Gly	Arg	Asn
[1162]				20				25					30			
[1163]	Pro	Val	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu
[1164]			35				40					45				
[1165]	Ile	Tyr	Leu	Asp	Asn	Leu	Arg	Leu	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
[1166]	50					55					60					
[1167]	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln
[1168]	65				70					75					80	
[1169]	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Thr	Trp	Asp	Asp	Ser	Leu
[1170]				85				90					95			
[1171]	Ile	Gly	Trp	Leu	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu		
[1172]			100				105						110			
[1173]	<210> 63															
[1174]	<211> 110															
[1175]	<212> PRT															

[1176]	<213>	人工序列
[1177]	<220>	
[1178]	<221>	来源
[1179]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[1180]		多肽"
[1181]	<400>	63
[1182]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln	
[1183]	1 5 10 15	
[1184]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn	
[1185]	20 25 30	
[1186]	Asp Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu	
[1187]	35 40 45	
[1188]	Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Leu Gly Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser	
[1189]	50 55 60	
[1190]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln	
[1191]	65 70 75 80	
[1192]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu	
[1193]	85 90 95	
[1194]	Lys Gly Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
[1195]	100 105 110	
[1196]	<210>	64
[1197]	<211>	110
[1198]	<212>	PRT
[1199]	<213>	人工序列
[1200]	<220>	
[1201]	<221>	来源
[1202]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[1203]		多肽"
[1204]	<400>	64
[1205]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln	
[1206]	1 5 10 15	
[1207]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn	
[1208]	20 25 30	
[1209]	Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu	
[1210]	35 40 45	
[1211]	Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser	
[1212]	50 55 60	
[1213]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln	
[1214]	65 70 75 80	
[1215]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His	
[1216]	85 90 95	
[1217]	Pro Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	

[1218]	100	105	110
[1219]	<210> 65		
[1220]	<211> 110		
[1221]	<212> PRT		
[1222]	<213> 人工序列		
[1223]	<220>		
[1224]	<221> 来源		
[1225]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[1226]	多肽"		
[1227]	<400> 65		
[1228]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln		
[1229]	1 5 10 15		
[1230]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn		
[1231]	20 25 30		
[1232]	Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu		
[1233]	35 40 45		
[1234]	Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser		
[1235]	50 55 60		
[1236]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln		
[1237]	65 70 75 80		
[1238]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu		
[1239]	85 90 95		
[1240]	Asn Gly Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu		
[1241]	100 105 110		
[1242]	<210> 66		
[1243]	<211> 110		
[1244]	<212> PRT		
[1245]	<213> 人工序列		
[1246]	<220>		
[1247]	<221> 来源		
[1248]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[1249]	多肽"		
[1250]	<400> 66		
[1251]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln		
[1252]	1 5 10 15		
[1253]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn		
[1254]	20 25 30		
[1255]	Glu Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu		
[1256]	35 40 45		
[1257]	Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser		
[1258]	50 55 60		
[1259]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln		

[1260]	65	70	75	80
[1261]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His			
[1262]		85	90	95
[1263]	Pro Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu			
[1264]		100	105	110
[1265]	<210> 67			
[1266]	<211> 110			
[1267]	<212> PRT			
[1268]	<213> 人工序列			
[1269]	<220>			
[1270]	<221> 来源			
[1271]	<223> /注解="人工序列的说明:合成			
[1272]	多肽"			
[1273]	<400> 67			
[1274]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln			
[1275]	1	5	10	15
[1276]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn			
[1277]		20	25	30
[1278]	Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu			
[1279]		35	40	45
[1280]	Ile Tyr Leu Asp Asn Leu Arg Leu Gly Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser			
[1281]	50	55	60	
[1282]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln			
[1283]	65	70	75	80
[1284]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His			
[1285]		85	90	95
[1286]	Pro Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu			
[1287]		100	105	110
[1288]	<210> 68			
[1289]	<211> 110			
[1290]	<212> PRT			
[1291]	<213> 人工序列			
[1292]	<220>			
[1293]	<221> 来源			
[1294]	<223> /注解="人工序列的说明:合成			
[1295]	多肽"			
[1296]	<400> 68			
[1297]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln			
[1298]	1	5	10	15
[1299]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn			
[1300]		20	25	30
[1301]	Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu			

[1302]	35	40	45
[1303]	Ile Tyr Leu Asp Asn Leu Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser		
[1304]	50	55	60
[1305]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln		
[1306]	65	70	75
[1307]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His		
[1308]	85	90	95
[1309]	Pro Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu		
[1310]	100	105	110
[1311]	<210> 69		
[1312]	<211> 110		
[1313]	<212> PRT		
[1314]	<213> 人工序列		
[1315]	<220>		
[1316]	<221> 来源		
[1317]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[1318]	多肽"		
[1319]	<400> 69		
[1320]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln		
[1321]	1	5	10
[1322]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn		
[1323]	20	25	30
[1324]	Asp Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu		
[1325]	35	40	45
[1326]	Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Leu Gly Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser		
[1327]	50	55	60
[1328]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln		
[1329]	65	70	75
[1330]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His		
[1331]	85	90	95
[1332]	Pro Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu		
[1333]	100	105	110
[1334]	<210> 70		
[1335]	<211> 110		
[1336]	<212> PRT		
[1337]	<213> 人工序列		
[1338]	<220>		
[1339]	<221> 来源		
[1340]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[1341]	多肽"		
[1342]	<400> 70		
[1343]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln		

[1344]	1	5	10	15
[1345]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn			
[1346]	20	25	30	
[1347]	Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu			
[1348]	35	40	45	
[1349]	Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser			
[1350]	50	55	60	
[1351]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln			
[1352]	65	70	75	80
[1353]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His			
[1354]	85	90	95	
[1355]	Pro Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu			
[1356]	100	105	110	
[1357]	<210> 71			
[1358]	<211> 117			
[1359]	<212> PRT			
[1360]	<213> 人工序列			
[1361]	<220>			
[1362]	<221> 来源			
[1363]	<223> /注解="人工序列的说明:合成			
[1364]	多肽"			
[1365]	<400> 71			
[1366]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[1367]	1	5	10	15
[1368]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
[1369]	20	25	30	
[1370]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[1371]	35	40	45	
[1372]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
[1373]	50	55	60	
[1374]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
[1375]	65	70	75	80
[1376]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[1377]	85	90	95	
[1378]	Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu			
[1379]	100	105	110	
[1380]	Val Thr Val Ser Ser			
[1381]	115			
[1382]	<210> 72			
[1383]	<211> 117			
[1384]	<212> PRT			
[1385]	<213> 人工序列			

[1386]	<220>
[1387]	<221> 来源
[1388]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[1389]	多肽"
[1390]	<400> 72
[1391]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1392]	1 5 10 15
[1393]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[1394]	20 25 30
[1395]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1396]	35 40 45
[1397]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[1398]	50 55 60
[1399]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1400]	65 70 75 80
[1401]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1402]	85 90 95
[1403]	Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu
[1404]	100 105 110
[1405]	Val Thr Val Ser Ser
[1406]	115
[1407]	<210> 73
[1408]	<211> 117
[1409]	<212> PRT
[1410]	<213> 人工序列
[1411]	<220>
[1412]	<221> 来源
[1413]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[1414]	多肽"
[1415]	<400> 73
[1416]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1417]	1 5 10 15
[1418]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[1419]	20 25 30
[1420]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1421]	35 40 45
[1422]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[1423]	50 55 60
[1424]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1425]	65 70 75 80
[1426]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1427]	85 90 95

[1428]	Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu
[1429]	100 105 110
[1430]	Val Thr Val Ser Ser
[1431]	115
[1432]	<210> 74
[1433]	<211> 117
[1434]	<212> PRT
[1435]	<213> 人工序列
[1436]	<220>
[1437]	<221> 来源
[1438]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[1439]	多肽"
[1440]	<400> 74
[1441]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1442]	1 5 10 15
[1443]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[1444]	20 25 30
[1445]	Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1446]	35 40 45
[1447]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[1448]	50 55 60
[1449]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1450]	65 70 75 80
[1451]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1452]	85 90 95
[1453]	Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Lys Trp Gly Arg Gly Thr Leu
[1454]	100 105 110
[1455]	Val Thr Val Ser Ser
[1456]	115
[1457]	<210> 75
[1458]	<211> 117
[1459]	<212> PRT
[1460]	<213> 人工序列
[1461]	<220>
[1462]	<221> 来源
[1463]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[1464]	多肽"
[1465]	<400> 75
[1466]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1467]	1 5 10 15
[1468]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[1469]	20 25 30

[1470]	Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1471]	35 40 45
[1472]	Ser Leu Ile Trp Gly Ser Trp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[1473]	50 55 60
[1474]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1475]	65 70 75 80
[1476]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1477]	85 90 95
[1478]	Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Met Trp Gly Arg Gly Thr Leu
[1479]	100 105 110
[1480]	Val Thr Val Ser Ser
[1481]	115
[1482]	<210> 76
[1483]	<211> 117
[1484]	<212> PRT
[1485]	<213> 人工序列
[1486]	<220>
[1487]	<221> 来源
[1488]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[1489]	多肽"
[1490]	<400> 76
[1491]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1492]	1 5 10 15
[1493]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[1494]	20 25 30
[1495]	Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1496]	35 40 45
[1497]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[1498]	50 55 60
[1499]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1500]	65 70 75 80
[1501]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1502]	85 90 95
[1503]	Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
[1504]	100 105 110
[1505]	Val Thr Val Ser Ser
[1506]	115
[1507]	<210> 77
[1508]	<211> 117
[1509]	<212> PRT
[1510]	<213> 人工序列
[1511]	<220>

[1512]	<221>	来源
[1513]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[1514]		多肽"
[1515]	<400>	77
[1516]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[1517]	1	5 10 15
[1518]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
[1519]		20 25 30
[1520]	Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[1521]		35 40 45
[1522]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Trp Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
[1523]		50 55 60
[1524]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
[1525]	65	70 75 80
[1526]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[1527]		85 90 95
[1528]	Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu	
[1529]		100 105 110
[1530]	Val Thr Val Ser Ser	
[1531]		115
[1532]	<210>	78
[1533]	<211>	117
[1534]	<212>	PRT
[1535]	<213>	人工序列
[1536]	<220>	
[1537]	<221>	来源
[1538]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[1539]		多肽"
[1540]	<400>	78
[1541]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[1542]	1	5 10 15
[1543]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
[1544]		20 25 30
[1545]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[1546]		35 40 45
[1547]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
[1548]		50 55 60
[1549]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
[1550]	65	70 75 80
[1551]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[1552]		85 90 95
[1553]	Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu	

[1554]	100	105	110
[1555]	Val Thr Val Ser Ser		
[1556]	115		
[1557]	<210> 79		
[1558]	<211> 117		
[1559]	<212> PRT		
[1560]	<213> 人工序列		
[1561]	<220>		
[1562]	<221> 来源		
[1563]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[1564]	多肽"		
[1565]	<400> 79		
[1566]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[1567]	1 5 10 15		
[1568]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
[1569]	20 25 30		
[1570]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[1571]	35 40 45		
[1572]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[1573]	50 55 60		
[1574]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[1575]	65 70 75 80		
[1576]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[1577]	85 90 95		
[1578]	Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu Trp Gly Arg Gly Thr Leu		
[1579]	100 105 110		
[1580]	Val Thr Val Ser Ser		
[1581]	115		
[1582]	<210> 80		
[1583]	<211> 117		
[1584]	<212> PRT		
[1585]	<213> 人工序列		
[1586]	<220>		
[1587]	<221> 来源		
[1588]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[1589]	多肽"		
[1590]	<400> 80		
[1591]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[1592]	1 5 10 15		
[1593]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
[1594]	20 25 30		
[1595]	Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		

[1596]	35	40	45
[1597]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[1598]	50	55	60
[1599]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[1600]	65	70	75
[1601]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[1602]	85	90	95
[1603]	Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu Trp Gly Arg Gly Thr Leu		
[1604]	100	105	110
[1605]	Val Thr Val Ser Ser		
[1606]	115		
[1607]	<210> 81		
[1608]	<211> 117		
[1609]	<212> PRT		
[1610]	<213> 人工序列		
[1611]	<220>		
[1612]	<221> 来源		
[1613]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[1614]	多肽"		
[1615]	<400> 81		
[1616]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[1617]	1	5	10
[1618]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
[1619]	20	25	30
[1620]	Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[1621]	35	40	45
[1622]	Ser Leu Ile Trp Gly Ser Trp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[1623]	50	55	60
[1624]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[1625]	65	70	75
[1626]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[1627]	85	90	95
[1628]	Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu Trp Gly Arg Gly Thr Leu		
[1629]	100	105	110
[1630]	Val Thr Val Ser Ser		
[1631]	115		
[1632]	<210> 82		
[1633]	<211> 117		
[1634]	<212> PRT		
[1635]	<213> 人工序列		
[1636]	<220>		
[1637]	<221> 来源		

[1638] <223> /注解="人工序列的说明:合成
 [1639] 多肽"
 [1640] <400> 82
 [1641] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [1642] 1 5 10 15
 [1643] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 [1644] 20 25 30
 [1645] Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [1646] 35 40 45
 [1647] Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [1648] 50 55 60
 [1649] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [1650] 65 70 75 80
 [1651] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1652] 85 90 95
 [1653] Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
 [1654] 100 105 110
 [1655] Val Thr Val Ser Ser
 [1656] 115
 [1657] <210> 83
 [1658] <211> 117
 [1659] <212> PRT
 [1660] <213> 人工序列
 [1661] <220>
 [1662] <221> 来源
 [1663] <223> /注解="人工序列的说明:合成
 [1664] 多肽"
 [1665] <400> 83
 [1666] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [1667] 1 5 10 15
 [1668] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 [1669] 20 25 30
 [1670] Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [1671] 35 40 45
 [1672] Ser Ala Ile Ser Gly Ser Trp Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [1673] 50 55 60
 [1674] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [1675] 65 70 75 80
 [1676] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [1677] 85 90 95
 [1678] Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
 [1679] 100 105 110

[1680]	Val Thr Val Ser Ser
[1681]	115
[1682]	<210> 84
[1683]	<211> 117
[1684]	<212> PRT
[1685]	<213> 人工序列
[1686]	<220>
[1687]	<221> 来源
[1688]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[1689]	多肽"
[1690]	<400> 84
[1691]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1692]	1 5 10 15
[1693]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[1694]	20 25 30
[1695]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1696]	35 40 45
[1697]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[1698]	50 55 60
[1699]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1700]	65 70 75 80
[1701]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1702]	85 90 95
[1703]	Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
[1704]	100 105 110
[1705]	Val Thr Val Ser Ser
[1706]	115
[1707]	<210> 85
[1708]	<211> 119
[1709]	<212> PRT
[1710]	<213> 人工序列
[1711]	<220>
[1712]	<221> 来源
[1713]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[1714]	多肽"
[1715]	<400> 85
[1716]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1717]	1 5 10 15
[1718]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[1719]	20 25 30
[1720]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1721]	35 40 45

[1722]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[1723]	50 55 60
[1724]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1725]	65 70 75 80
[1726]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1727]	85 90 95
[1728]	Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
[1729]	100 105 110
[1730]	Thr Met Val Thr Val Ser Ser
[1731]	115
[1732]	<210> 86
[1733]	<211> 106
[1734]	<212> PRT
[1735]	<213> 人工序列
[1736]	<220>
[1737]	<221> 来源
[1738]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[1739]	多肽"
[1740]	<400> 86
[1741]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
[1742]	1 5 10 15
[1743]	Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Val Gly Asp Lys Tyr Ala
[1744]	20 25 30
[1745]	Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
[1746]	35 40 45
[1747]	Glu Asp Thr Lys Arg Pro Ser Arg Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
[1748]	50 55 60
[1749]	Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Leu
[1750]	65 70 75 80
[1751]	Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Ala Trp Asp Thr Ser Phe Trp Val
[1752]	85 90 95
[1753]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[1754]	100 105
[1755]	<210> 87
[1756]	<211> 119
[1757]	<212> PRT
[1758]	<213> 人工序列
[1759]	<220>
[1760]	<221> 来源
[1761]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[1762]	多肽"
[1763]	<400> 87

[1764]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1765]	1 5 10 15
[1766]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[1767]	20 25 30
[1768]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[1769]	35 40 45
[1770]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[1771]	50 55 60
[1772]	Lys Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1773]	65 70 75 80
[1774]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1775]	85 90 95
[1776]	Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
[1777]	100 105 110
[1778]	Thr Met Val Thr Val Ser Ser
[1779]	115
[1780]	<210> 88
[1781]	<211> 106
[1782]	<212> PRT
[1783]	<213> 人工序列
[1784]	<220>
[1785]	<221> 来源
[1786]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[1787]	多肽"
[1788]	<400> 88
[1789]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
[1790]	1 5 10 15
[1791]	Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Val Gly Asp Lys Tyr Ala
[1792]	20 25 30
[1793]	Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
[1794]	35 40 45
[1795]	Glu Asp Thr Lys Arg Leu Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
[1796]	50 55 60
[1797]	Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
[1798]	65 70 75 80
[1799]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Thr Ser Phe Trp Val
[1800]	85 90 95
[1801]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[1802]	100 105
[1803]	<210> 89
[1804]	<211> 11
[1805]	<212> PRT

[1806]	<213>	人工序列
[1807]	<220>	
[1808]	<221>	来源
[1809]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[1810]		肽"
[1811]	<400>	89
[1812]	Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser	
[1813]	1	5 10
[1814]	<210>	90
[1815]	<211>	22
[1816]	<212>	PRT
[1817]	<213>	人工序列
[1818]	<220>	
[1819]	<221>	来源
[1820]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[1821]		肽"
[1822]	<400>	90
[1823]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln	
[1824]	1	5 10 15
[1825]	Thr Ala Thr Ile Thr Cys	
[1826]		20
[1827]	<210>	91
[1828]	<211>	22
[1829]	<212>	PRT
[1830]	<213>	人工序列
[1831]	<220>	
[1832]	<221>	来源
[1833]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[1834]		肽"
[1835]	<400>	91
[1836]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln	
[1837]	1	5 10 15
[1838]	Thr Ala Ser Ile Thr Cys	
[1839]		20
[1840]	<210>	92
[1841]	<211>	15
[1842]	<212>	PRT
[1843]	<213>	人工序列
[1844]	<220>	
[1845]	<221>	来源
[1846]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[1847]		肽"

[1848]	<400> 92
[1849]	Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
[1850]	1 5 10 15
[1851]	<210> 93
[1852]	<211> 32
[1853]	<212> PRT
[1854]	<213> 人工序列
[1855]	<220>
[1856]	<221> 来源
[1857]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[1858]	多肽"
[1859]	<400> 93
[1860]	Arg Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
[1861]	1 5 10 15
[1862]	Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Leu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys
[1863]	20 25 30
[1864]	<210> 94
[1865]	<211> 32
[1866]	<212> PRT
[1867]	<213> 人工序列
[1868]	<220>
[1869]	<221> 来源
[1870]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[1871]	多肽"
[1872]	<400> 94
[1873]	Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
[1874]	1 5 10 15
[1875]	Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
[1876]	20 25 30
[1877]	<210> 95
[1878]	<211> 17
[1879]	<212> PRT
[1880]	<213> 人工序列
[1881]	<220>
[1882]	<221> 来源
[1883]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[1884]	肽"
[1885]	<400> 95
[1886]	Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
[1887]	1 5 10 15
[1888]	Arg
[1889]	<210> 96

[1890]	<211>	10
[1891]	<212>	PRT
[1892]	<213>	人工序列
[1893]	<220>	
[1894]	<221>	来源
[1895]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[1896]		肽"
[1897]	<400>	96
[1898]	Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val	
[1899]	1	5 10
[1900]	<210>	97
[1901]	<211>	11
[1902]	<212>	PRT
[1903]	<213>	人工序列
[1904]	<220>	
[1905]	<221>	来源
[1906]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[1907]		肽"
[1908]	<400>	97
[1909]	Ser Gly Asp Lys Val Gly Asp Lys Tyr Ala Ser	
[1910]	1	5 10
[1911]	<210>	98
[1912]	<211>	7
[1913]	<212>	PRT
[1914]	<213>	人工序列
[1915]	<220>	
[1916]	<221>	来源
[1917]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[1918]		肽"
[1919]	<400>	98
[1920]	Glu Asp Thr Lys Arg Pro Ser	
[1921]	1	5
[1922]	<210>	99
[1923]	<211>	7
[1924]	<212>	PRT
[1925]	<213>	人工序列
[1926]	<220>	
[1927]	<221>	来源
[1928]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[1929]		肽"
[1930]	<400>	99
[1931]	Glu Asp Thr Lys Arg Leu Ser	

[1932]	1	5
[1933]	<210>	100
[1934]	<211>	9
[1935]	<212>	PRT
[1936]	<213>	人工序列
[1937]	<220>	
[1938]	<221>	来源
[1939]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[1940]		肽"
[1941]	<400>	100
[1942]	Gln Ala Trp Asp Thr Ser Phe Trp Val	
[1943]	1	5
[1944]	<210>	101
[1945]	<211>	122
[1946]	<212>	PRT
[1947]	<213>	人工序列
[1948]	<220>	
[1949]	<221>	来源
[1950]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[1951]		多肽"
[1952]	<400>	101
[1953]	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	
[1954]	1	5 10 15
[1955]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Arg Phe Ser Asp Phe	
[1956]	20	25 30
[1957]	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[1958]	35	40 45
[1959]	Ala Gly Ile Ser Tyr Asp Gly Gly Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
[1960]	50	55 60
[1961]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Asn Asn Thr Leu Tyr	
[1962]	65	70 75 80
[1963]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[1964]	85	90 95
[1965]	Ala Lys Asp His Gly Tyr Ser Gly Tyr Tyr Gly His Leu Asp Tyr Trp	
[1966]	100	105 110
[1967]	Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
[1968]	115	120
[1969]	<210>	102
[1970]	<211>	110
[1971]	<212>	PRT
[1972]	<213>	人工序列
[1973]	<220>	

[1974]	<221>	来源
[1975]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[1976]		多肽"
[1977]	<400>	102
[1978]	Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln	
[1979]	1	5 10 15
[1980]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn	
[1981]		20 25 30
[1982]	Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu	
[1983]		35 40 45
[1984]	Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser	
[1985]		50 55 60
[1986]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln	
[1987]	65	70 75 80
[1988]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu	
[1989]		85 90 95
[1990]	Asn Gly Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
[1991]		100 105 110
[1992]	<210>	103
[1993]	<211>	128
[1994]	<212>	PRT
[1995]	<213>	人工序列
[1996]	<220>	
[1997]	<221>	来源
[1998]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[1999]		多肽"
[2000]	<400>	103
[2001]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[2002]	1	5 10 15
[2003]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
[2004]		20 25 30
[2005]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[2006]		35 40 45
[2007]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
[2008]		50 55 60
[2009]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
[2010]	65	70 75 80
[2011]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[2012]		85 90 95
[2013]	Ala Lys Asp Arg Pro Asn Tyr Tyr Gly Ala Ser Gly Ser Tyr Tyr Lys	
[2014]		100 105 110
[2015]	Gln Gly Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser	

[2016]	115	120	125
[2017]	<210> 104		
[2018]	<211> 110		
[2019]	<212> PRT		
[2020]	<213> 人工序列		
[2021]	<220>		
[2022]	<221> 来源		
[2023]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[2024]	多肽"		
[2025]	<400> 104		
[2026]	Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Gln		
[2027]	1 5 10 15		
[2028]	Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Lys		
[2029]	20 25 30		
[2030]	Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Lys Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val		
[2031]	35 40 45		
[2032]	Ile Tyr Glu Asp Thr Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser		
[2033]	50 55 60		
[2034]	Gly Ser Ile Asp Ile Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly		
[2035]	65 70 75 80		
[2036]	Leu Arg Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser		
[2037]	85 90 95		
[2038]	Thr Asn Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu		
[2039]	100 105 110		
[2040]	<210> 105		
[2041]	<211> 117		
[2042]	<212> PRT		
[2043]	<213> 人工序列		
[2044]	<220>		
[2045]	<221> 来源		
[2046]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[2047]	多肽"		
[2048]	<400> 105		
[2049]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[2050]	1 5 10 15		
[2051]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
[2052]	20 25 30		
[2053]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[2054]	35 40 45		
[2055]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[2056]	50 55 60		
[2057]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		

[2058]	65	70	75	80
[2059]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[2060]	85	90	95	
[2061]	Ala Arg Gly Asn Tyr Gly Asn Leu Asp His Trp Gly Lys Gly Thr Leu			
[2062]	100	105	110	
[2063]	Val Thr Val Ser Ser			
[2064]	115			
[2065]	<210> 106			
[2066]	<211> 106			
[2067]	<212> PRT			
[2068]	<213> 人工序列			
[2069]	<220>			
[2070]	<221> 来源			
[2071]	<223> /注解="人工序列的说明:合成			
[2072]	多肽"			
[2073]	<400> 106			
[2074]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln			
[2075]	1	5	10	15
[2076]	Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Val Gly Asp Lys Tyr Ala			
[2077]	20	25	30	
[2078]	Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr			
[2079]	35	40	45	
[2080]	Gln Asp Arg Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser			
[2081]	50	55	60	
[2082]	Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Pro Met			
[2083]	65	70	75	80
[2084]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser His Trp Val			
[2085]	85	90	95	
[2086]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu			
[2087]	100	105		
[2088]	<210> 107			
[2089]	<211> 119			
[2090]	<212> PRT			
[2091]	<213> 人工序列			
[2092]	<220>			
[2093]	<221> 来源			
[2094]	<223> /注解="人工序列的说明:合成			
[2095]	多肽"			
[2096]	<400> 107			
[2097]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[2098]	1	5	10	15
[2099]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr			

[2100]	20	25	30
[2101]	Ile Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[2102]	35	40	45
[2103]	Ser Ser Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ala Thr Ile Tyr Ala Asp Ser Val		
[2104]	50	55	60
[2105]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[2106]	65	70	75
[2107]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys		
[2108]	85	90	95
[2109]	Ala Lys Asp His Leu Gly Gly His Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly		
[2110]	100	105	110
[2111]	Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
[2112]	115		
[2113]	<210> 108		
[2114]	<211> 107		
[2115]	<212> PRT		
[2116]	<213> 人工序列		
[2117]	<220>		
[2118]	<221> 来源		
[2119]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[2120]	多肽"		
[2121]	<400> 108		
[2122]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[2123]	1	5	10
[2124]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr		
[2125]	20	25	30
[2126]	Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile		
[2127]	35	40	45
[2128]	Phe Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly		
[2129]	50	55	60
[2130]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[2131]	65	70	75
[2132]	Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu		
[2133]	85	90	95
[2134]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[2135]	100	105	
[2136]	<210> 109		
[2137]	<211> 120		
[2138]	<212> PRT		
[2139]	<213> 人工序列		
[2140]	<220>		
[2141]	<221> 来源		

[2142]	<223> /注解="人工序列的说明:合成															
[2143]	多肽"															
[2144]	<400> 109															
[2145]	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
[2146]	1				5						10				15	
[2147]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Glu	Tyr
[2148]				20						25					30	
[2149]	Gln	Met	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
[2150]			35					40							45	
[2151]	Ser	Tyr	Ile	Arg	Ser	Ser	Gly	Gly	Gln	Thr	Ile	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
[2152]		50					55						60			
[2153]	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
[2154]	65					70					75				80	
[2155]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[2156]				85						90					95	
[2157]	Ala	Arg	Arg	Thr	Tyr	Ser	Ser	Gly	Trp	His	Ile	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
[2158]				100						105					110	
[2159]	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
[2160]			115						120							
[2161]	<210> 110															
[2162]	<211> 107															
[2163]	<212> PRT															
[2164]	<213> 人工序列															
[2165]	<220>															
[2166]	<221> 来源															
[2167]	<223> /注解="人工序列的说明:合成															
[2168]	多肽"															
[2169]	<400> 110															
[2170]	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
[2171]	1				5						10				15	
[2172]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Arg	Tyr
[2173]				20							25				30	
[2174]	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
[2175]			35						40						45	
[2176]	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
[2177]		50					55						60			
[2178]	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Leu
[2179]	65					70					75				80	
[2180]	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Arg	Thr	Pro	Leu
[2181]				85						90					95	
[2182]	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Gln					
[2183]				100						105						

[2184]	<210>	111
[2185]	<211>	119
[2186]	<212>	PRT
[2187]	<213>	人工序列
[2188]	<220>	
[2189]	<221>	来源
[2190]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[2191]		多肽"
[2192]	<400>	111
[2193]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[2194]	1	5 10 15
[2195]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
[2196]	20	25 30
[2197]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[2198]	35	40 45
[2199]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
[2200]	50	55 60
[2201]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
[2202]	65	70 75 80
[2203]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[2204]	85	90 95
[2205]	Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly	
[2206]	100	105 110
[2207]	Thr Met Val Thr Val Ser Ser	
[2208]	115	
[2209]	<210>	112
[2210]	<211>	106
[2211]	<212>	PRT
[2212]	<213>	人工序列
[2213]	<220>	
[2214]	<221>	来源
[2215]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[2216]		多肽"
[2217]	<400>	112
[2218]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln	
[2219]	1	5 10 15
[2220]	Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Val Gly Asp Lys Tyr Ala	
[2221]	20	25 30
[2222]	Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr	
[2223]	35	40 45
[2224]	Glu Asp Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser	
[2225]	50	55 60

[2226]	Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
[2227]	65 70 75 80
[2228]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Thr Ser Phe Trp Val
[2229]	85 90 95
[2230]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[2231]	100 105
[2232]	<210> 113
[2233]	<211> 119
[2234]	<212> PRT
[2235]	<213> 人工序列
[2236]	<220>
[2237]	<221> 来源
[2238]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[2239]	多肽"
[2240]	<400> 113
[2241]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[2242]	1 5 10 15
[2243]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Val
[2244]	20 25 30
[2245]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[2246]	35 40 45
[2247]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[2248]	50 55 60
[2249]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[2250]	65 70 75 80
[2251]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[2252]	85 90 95
[2253]	Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
[2254]	100 105 110
[2255]	Thr Met Val Thr Val Ser Ser
[2256]	115
[2257]	<210> 114
[2258]	<211> 119
[2259]	<212> PRT
[2260]	<213> 人工序列
[2261]	<220>
[2262]	<221> 来源
[2263]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[2264]	多肽"
[2265]	<400> 114
[2266]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[2267]	1 5 10 15

[2268]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[2269]	20 25 30
[2270]	Ala Arg Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[2271]	35 40 45
[2272]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[2273]	50 55 60
[2274]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[2275]	65 70 75 80
[2276]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[2277]	85 90 95
[2278]	Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
[2279]	100 105 110
[2280]	Thr Met Val Thr Val Ser Ser
[2281]	115
[2282]	<210> 115
[2283]	<211> 119
[2284]	<212> PRT
[2285]	<213> 人工序列
[2286]	<220>
[2287]	<221> 来源
[2288]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[2289]	多肽"
[2290]	<400> 115
[2291]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[2292]	1 5 10 15
[2293]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[2294]	20 25 30
[2295]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[2296]	35 40 45
[2297]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[2298]	50 55 60
[2299]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[2300]	65 70 75 80
[2301]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[2302]	85 90 95
[2303]	Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
[2304]	100 105 110
[2305]	Thr Met Val Thr Val Ser Ser
[2306]	115
[2307]	<210> 116
[2308]	<211> 119
[2309]	<212> PRT

[2310]	<213>	人工序列
[2311]	<220>	
[2312]	<221>	来源
[2313]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[2314]		多肽"
[2315]	<400>	116
[2316]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[2317]	1 5 10 15	
[2318]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
[2319]	20 25 30	
[2320]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[2321]	35 40 45	
[2322]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val	
[2323]	50 55 60	
[2324]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
[2325]	65 70 75 80	
[2326]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[2327]	85 90 95	
[2328]	Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly	
[2329]	100 105 110	
[2330]	Thr Met Val Thr Val Ser Ser	
[2331]	115	
[2332]	<210>	117
[2333]	<211>	119
[2334]	<212>	PRT
[2335]	<213>	人工序列
[2336]	<220>	
[2337]	<221>	来源
[2338]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[2339]		多肽"
[2340]	<400>	117
[2341]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[2342]	1 5 10 15	
[2343]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
[2344]	20 25 30	
[2345]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[2346]	35 40 45	
[2347]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
[2348]	50 55 60	
[2349]	Lys Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
[2350]	65 70 75 80	
[2351]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	

[2352]	85	90	95
[2353]	Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly		
[2354]	100	105	110
[2355]	Thr Met Val Thr Val Ser Ser		
[2356]	115		
[2357]	<210> 118		
[2358]	<211> 107		
[2359]	<212> PRT		
[2360]	<213> 人工序列		
[2361]	<220>		
[2362]	<221> 来源		
[2363]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[2364]	多肽"		
[2365]	<400> 118		
[2366]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln		
[2367]	1 5 10 15		
[2368]	Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Val Gly Asp Lys Tyr Ala		
[2369]	20 25 30		
[2370]	Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr		
[2371]	35 40 45		
[2372]	Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser		
[2373]	50 55 60		
[2374]	Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met		
[2375]	65 70 75 80		
[2376]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Thr Ser Phe Trp Val		
[2377]	85 90 95		
[2378]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Leu		
[2379]	100 105		
[2380]	<210> 119		
[2381]	<211> 108		
[2382]	<212> PRT		
[2383]	<213> 人工序列		
[2384]	<220>		
[2385]	<221> 来源		
[2386]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[2387]	多肽"		
[2388]	<400> 119		
[2389]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln		
[2390]	1 5 10 15		
[2391]	Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Val Gly Asp Lys Tyr Ala		
[2392]	20 25 30		
[2393]	Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr		

[2394]	35	40	45
[2395]	Glu Asp Thr Lys Tyr Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser		
[2396]	50	55	60
[2397]	Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met		
[2398]	65	70	75
[2399]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Thr Ser Phe Trp Val		
[2400]	85	90	95
[2401]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Val Leu		
[2402]	100	105	
[2403]	<210> 120		
[2404]	<211> 107		
[2405]	<212> PRT		
[2406]	<213> 人工序列		
[2407]	<220>		
[2408]	<221> 来源		
[2409]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[2410]	多肽"		
[2411]	<400> 120		
[2412]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln		
[2413]	1	5	10
[2414]	Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Val Gly Asp Lys Tyr Ala		
[2415]	20	25	30
[2416]	Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Val Leu Val Ile Tyr Glu		
[2417]	35	40	45
[2418]	Asp Thr Lys Arg His Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn		
[2419]	50	55	60
[2420]	Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp		
[2421]	65	70	75
[2422]	Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Thr Ser Phe Trp Val Phe		
[2423]	85	90	95
[2424]	Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Val Leu		
[2425]	100	105	
[2426]	<210> 121		
[2427]	<211> 108		
[2428]	<212> PRT		
[2429]	<213> 人工序列		
[2430]	<220>		
[2431]	<221> 来源		
[2432]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[2433]	多肽"		
[2434]	<400> 121		
[2435]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln		

[2436]	1	5	10	15
[2437]	Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Val Gly Asp Lys Tyr Ala			
[2438]	20	25	30	
[2439]	Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr			
[2440]	35	40	45	
[2441]	Glu Asp Thr Lys Arg Leu Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser			
[2442]	50	55	60	
[2443]	Asn Arg Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met			
[2444]	65	70	75	80
[2445]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Thr Ser Phe Trp Val			
[2446]	85	90	95	
[2447]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Val Leu			
[2448]	100	105		
[2449]	<210> 122			
[2450]	<211> 32			
[2451]	<212> PRT			
[2452]	<213> 人工序列			
[2453]	<220>			
[2454]	<221> 来源			
[2455]	<223> /注解="人工序列的说明:合成			
[2456]	多肽"			
[2457]	<400> 122			
[2458]	Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Arg Gly Asn Thr Ala Thr			
[2459]	1	5	10	15
[2460]	Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys			
[2461]	20	25	30	
[2462]	<210> 123			
[2463]	<211> 5			
[2464]	<212> PRT			
[2465]	<213> 人工序列			
[2466]	<220>			
[2467]	<221> 来源			
[2468]	<223> /注解="人工序列的说明:合成			
[2469]	肽"			
[2470]	<400> 123			
[2471]	Ser Val Ala Met Ser			
[2472]	1	5		
[2473]	<210> 124			
[2474]	<211> 5			
[2475]	<212> PRT			
[2476]	<213> 人工序列			
[2477]	<220>			

[2478]	<221>	来源
[2479]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[2480]		肽"
[2481]	<400>	124
[2482]		Ser Tyr Ala Arg Ser
[2483]	1	5
[2484]	<210>	125
[2485]	<211>	17
[2486]	<212>	PRT
[2487]	<213>	人工序列
[2488]	<220>	
[2489]	<221>	来源
[2490]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[2491]		肽"
[2492]	<400>	125
[2493]		Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
[2494]	1	5 10 15
[2495]		Gly
[2496]	<210>	126
[2497]	<211>	17
[2498]	<212>	PRT
[2499]	<213>	人工序列
[2500]	<220>	
[2501]	<221>	来源
[2502]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[2503]		肽"
[2504]	<400>	126
[2505]		Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys
[2506]	1	5 10 15
[2507]		Gly
[2508]	<210>	127
[2509]	<211>	7
[2510]	<212>	PRT
[2511]	<213>	人工序列
[2512]	<220>	
[2513]	<221>	来源
[2514]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[2515]		肽"
[2516]	<400>	127
[2517]		Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
[2518]	1	5
[2519]	<210>	128

[2520]	<211> 7
[2521]	<212> PRT
[2522]	<213> 人工序列
[2523]	<220>
[2524]	<221> 来源
[2525]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[2526]	肽"
[2527]	<400> 128
[2528]	Glu Asp Thr Lys Tyr Pro Ser
[2529]	1 5
[2530]	<210> 129
[2531]	<211> 7
[2532]	<212> PRT
[2533]	<213> 人工序列
[2534]	<220>
[2535]	<221> 来源
[2536]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[2537]	肽"
[2538]	<400> 129
[2539]	Glu Asp Thr Lys Arg Leu Ser
[2540]	1 5
[2541]	<210> 130
[2542]	<211> 139
[2543]	<212> PRT
[2544]	<213> 人工序列
[2545]	<220>
[2546]	<221> 来源
[2547]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[2548]	多肽"
[2549]	<400> 130
[2550]	Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
[2551]	1 5 10 15
[2552]	Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys
[2553]	20 25 30
[2554]	Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln
[2555]	35 40 45
[2556]	Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
[2557]	50 55 60
[2558]	Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
[2559]	65 70 75 80
[2560]	Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
[2561]	85 90 95

[2562]	Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
[2563]	100 105 110
[2564]	Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
[2565]	115 120 125
[2566]	Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
[2567]	130 135
[2568]	<210> 131
[2569]	<211> 167
[2570]	<212> PRT
[2571]	<213> 人工序列
[2572]	<220>
[2573]	<221> 来源
[2574]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[2575]	多肽"
[2576]	<400> 131
[2577]	Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
[2578]	1 5 10 15
[2579]	Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
[2580]	20 25 30
[2581]	Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn
[2582]	35 40 45
[2583]	Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
[2584]	50 55 60
[2585]	Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
[2586]	65 70 75 80
[2587]	Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu
[2588]	85 90 95
[2589]	Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
[2590]	100 105 110
[2591]	Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
[2592]	115 120 125
[2593]	Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
[2594]	130 135 140
[2595]	Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
[2596]	145 150 155 160
[2597]	Ala Leu Thr Ser Gly Val His
[2598]	165
[2599]	<210> 132
[2600]	<211> 10
[2601]	<212> PRT
[2602]	<213> 人工序列
[2603]	<220>

[2604]	<221>	来源
[2605]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[2606]		肽"
[2607]	<400>	132
[2608]		Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
[2609]	1	5 10
[2610]	<210>	133
[2611]	<211>	15
[2612]	<212>	PRT
[2613]	<213>	人工序列
[2614]	<220>	
[2615]	<221>	来源
[2616]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[2617]		肽"
[2618]	<400>	133
[2619]		Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[2620]	1	5 10 15
[2621]	<210>	134
[2622]	<211>	16
[2623]	<212>	PRT
[2624]	<213>	人工序列
[2625]	<220>	
[2626]	<221>	来源
[2627]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[2628]		肽"
[2629]	<400>	134
[2630]		Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
[2631]	1	5 10 15
[2632]	<210>	135
[2633]	<211>	11
[2634]	<212>	PRT
[2635]	<213>	人工序列
[2636]	<220>	
[2637]	<221>	来源
[2638]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[2639]		肽"
[2640]	<400>	135
[2641]		Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp
[2642]	1	5 10
[2643]	<210>	136
[2644]	<211>	7
[2645]	<212>	PRT

[2646]	<213>	人工序列
[2647]	<220>	
[2648]	<221>	来源
[2649]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[2650]		肽"
[2651]	<400>	136
[2652]	Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser	
[2653]	1	5
[2654]	<210>	137
[2655]	<211>	9
[2656]	<212>	PRT
[2657]	<213>	人工序列
[2658]	<220>	
[2659]	<221>	来源
[2660]	<223>	/注解="人工序列的说明:合成
[2661]		肽"
[2662]	<400>	137
[2663]	Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr	
[2664]	1	5
[2665]	<210>	138
[2666]	<211>	108
[2667]	<212>	PRT
[2668]	<213>	智人
[2669]	<400>	138
[2670]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	
[2671]	1	5 10 15
[2672]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser	
[2673]		20 25 30
[2674]	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu	
[2675]		35 40 45
[2676]	Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser	
[2677]		50 55 60
[2678]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu	
[2679]		65 70 75 80
[2680]	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro	
[2681]		85 90 95
[2682]	Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[2683]		100 105
[2684]	<210>	139
[2685]	<211>	121
[2686]	<212>	PRT
[2687]	<213>	智人

[2688]	<400> 139
[2689]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[2690]	1 5 10 15
[2691]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
[2692]	20 25 30
[2693]	Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[2694]	35 40 45
[2695]	Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
[2696]	50 55 60
[2697]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
[2698]	65 70 75 80
[2699]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[2700]	85 90 95
[2701]	Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
[2702]	100 105 110
[2703]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[2704]	115 120
[2705]	<210> 140
[2706]	<211> 5
[2707]	<212> PRT
[2708]	<213> 智人
[2709]	<400> 140
[2710]	Arg Tyr Trp Met Ser
[2711]	1 5
[2712]	<210> 141
[2713]	<211> 17
[2714]	<212> PRT
[2715]	<213> 智人
[2716]	<400> 141
[2717]	Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
[2718]	1 5 10 15
[2719]	Gly
[2720]	<210> 142
[2721]	<211> 12
[2722]	<212> PRT
[2723]	<213> 智人
[2724]	<400> 142
[2725]	Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr
[2726]	1 5 10
[2727]	<210> 143
[2728]	<211> 12
[2729]	<212> PRT

- [2730] <213> 智人
- [2731] <400> 143
- [2732] Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
- [2733] 1 5 10
- [2734] <210> 144
- [2735] <211> 7
- [2736] <212> PRT
- [2737] <213> 智人
- [2738] <400> 144
- [2739] Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr
- [2740] 1 5
- [2741] <210> 145
- [2742] <211> 9
- [2743] <212> PRT
- [2744] <213> 智人
- [2745] <400> 145
- [2746] Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro Trp Thr
- [2747] 1 5
- [2748] <210> 146
- [2749] <211> 110
- [2750] <212> PRT
- [2751] <213> 人工序列
- [2752] <220>
- [2753] <221> 来源
- [2754] <223> /注解="人工序列的说明:合成
- [2755] 多肽"
- [2756] <220>
- [2757] <221> 尚未归类的特征
- [2758] <222> (1) .. (22)
- [2759] <223> /注解="此区可涵盖 'LPVLTQPPSVSGTPGQRTISC' 或
- [2760] 'QSVLTQPPSASGTPGQRTISC' "
- [2761] <220>
- [2762] <221> 变体
- [2763] <222> (1) .. (1)
- [2764] <223> /替代="Gln"
- [2765] <220>
- [2766] <221> 变体
- [2767] <222> (2) .. (2)
- [2768] <223> /替代="Ser"
- [2769] <220>
- [2770] <221> 变体
- [2771] <222> (10) .. (10)

- [2772] <223> /替代="Ala"
[2773] <220>
[2774] <221> 变体
[2775] <222> (33) .. (33)
[2776] <223> /替代="Glu"或"Asp"
[2777] <220>
[2778] <221> 尚未归类的特征
[2779] <222> (36) .. (50)
[2780] <223> /注解="此区可涵盖 'WYKQVPGTAPKLLIY' 或
[2781] 'WYQQLPGTAPKLLIY'"
[2782] <220>
[2783] <221> 变体
[2784] <222> (38) .. (38)
[2785] <223> /替代="Gln"
[2786] <220>
[2787] <221> 变体
[2788] <222> (40) .. (40)
[2789] <223> /替代="Leu"
[2790] <220>
[2791] <221> 变体
[2792] <222> (52) .. (52)
[2793] <223> /替代="Asp"
[2794] <220>
[2795] <221> 变体
[2796] <222> (54) .. (54)
[2797] <223> /替代="Leu"
[2798] <220>
[2799] <221> 变体
[2800] <222> (56) .. (56)
[2801] <223> /替代="Pro"
[2802] <220>
[2803] <221> 变体
[2804] <222> (57) .. (57)
[2805] <223> /替代="Ser"
[2806] <220>
[2807] <221> 变体
[2808] <222> (96) .. (96)
[2809] <223> /替代="His"
[2810] <220>
[2811] <221> 变体
[2812] <222> (97) .. (97)
[2813] <223> /替代="Pro"或"Ile"或"Asn"

[2814]	<220>
[2815]	<221> 变体
[2816]	<222> (100) .. (100)
[2817]	<223> /替代="Thr"
[2818]	<220>
[2819]	<221> 尚未归类的特征
[2820]	<222> (1) .. (110)
[2821]	<223> /注解="该序列中给出的变体残基
[2822]	对于变体位置的注释中的那些没
[2823]	有偏好"
[2824]	<400> 146
[2825]	Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Thr Pro Gly Gln
[2826]	1 5 10 15
[2827]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
[2828]	20 25 30
[2829]	Pro Val Asn Trp Tyr Lys Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
[2830]	35 40 45
[2831]	Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Leu Gly Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
[2832]	50 55 60
[2833]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
[2834]	65 70 75 80
[2835]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
[2836]	85 90 95
[2837]	Lys Gly Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[2838]	100 105 110
[2839]	<210> 147
[2840]	<211> 117
[2841]	<212> PRT
[2842]	<213> 人工序列
[2843]	<220>
[2844]	<221> 来源
[2845]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[2846]	多肽"
[2847]	<220>
[2848]	<221> 变体
[2849]	<222> (34) .. (34)
[2850]	<223> /替代="Tyr"
[2851]	<220>
[2852]	<221> 变体
[2853]	<222> (50) .. (50)
[2854]	<223> /替代="Ala"
[2855]	<220>

176

[2898]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[2899]	65 70 75 80
[2900]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[2901]	85 90 95
[2902]	Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu
[2903]	100 105 110
[2904]	Val Thr Val Ser Ser
[2905]	115
[2906]	<210> 148
[2907]	<211> 574
[2908]	<212> PRT
[2909]	<213> 智人
[2910]	<400> 148
[2911]	Met Cys Pro Arg Ala Ala Arg Ala Pro Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu
[2912]	1 5 10 15
[2913]	Gly Ala Val Leu Trp Pro Ala Ala Gly Ala Trp Glu Leu Thr Ile Leu
[2914]	20 25 30
[2915]	His Thr Asn Asp Val His Ser Arg Leu Glu Gln Thr Ser Glu Asp Ser
[2916]	35 40 45
[2917]	Ser Lys Cys Val Asn Ala Ser Arg Cys Met Gly Gly Val Ala Arg Leu
[2918]	50 55 60
[2919]	Phe Thr Lys Val Gln Gln Ile Arg Arg Ala Glu Pro Asn Val Leu Leu
[2920]	65 70 75 80
[2921]	Leu Asp Ala Gly Asp Gln Tyr Gln Gly Thr Ile Trp Phe Thr Val Tyr
[2922]	85 90 95
[2923]	Lys Gly Ala Glu Val Ala His Phe Met Asn Ala Leu Arg Tyr Asp Ala
[2924]	100 105 110
[2925]	Met Ala Leu Gly Asn His Glu Phe Asp Asn Gly Val Glu Gly Leu Ile
[2926]	115 120 125
[2927]	Glu Pro Leu Leu Lys Glu Ala Lys Phe Pro Ile Leu Ser Ala Asn Ile
[2928]	130 135 140
[2929]	Lys Ala Lys Gly Pro Leu Ala Ser Gln Ile Ser Gly Leu Tyr Leu Pro
[2930]	145 150 155 160
[2931]	Tyr Lys Val Leu Pro Val Gly Asp Glu Val Val Gly Ile Val Gly Tyr
[2932]	165 170 175
[2933]	Thr Ser Lys Glu Thr Pro Phe Leu Ser Asn Pro Gly Thr Asn Leu Val
[2934]	180 185 190
[2935]	Phe Glu Asp Glu Ile Thr Ala Leu Gln Pro Glu Val Asp Lys Leu Lys
[2936]	195 200 205
[2937]	Thr Leu Asn Val Asn Lys Ile Ile Ala Leu Gly His Ser Gly Phe Glu
[2938]	210 215 220
[2939]	Met Asp Lys Leu Ile Ala Gln Lys Val Arg Gly Val Asp Val Val Val

[2940]	225	230	235	240
[2941]	Gly Gly His Ser Asn Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Asn Pro Pro Ser Lys			
[2942]		245	250	255
[2943]	Glu Val Pro Ala Gly Lys Tyr Pro Phe Ile Val Thr Ser Asp Asp Gly			
[2944]		260	265	270
[2945]	Arg Lys Val Pro Val Val Gln Ala Tyr Ala Phe Gly Lys Tyr Leu Gly			
[2946]		275	280	285
[2947]	Tyr Leu Lys Ile Glu Phe Asp Glu Arg Gly Asn Val Ile Ser Ser His			
[2948]	290	295	300	
[2949]	Gly Asn Pro Ile Leu Leu Asn Ser Ser Ile Pro Glu Asp Pro Ser Ile			
[2950]	305	310	315	320
[2951]	Lys Ala Asp Ile Asn Lys Trp Arg Ile Lys Leu Asp Asn Tyr Ser Thr			
[2952]		325	330	335
[2953]	Gln Glu Leu Gly Lys Thr Ile Val Tyr Leu Asp Gly Ser Ser Gln Ser			
[2954]		340	345	350
[2955]	Cys Arg Phe Arg Glu Cys Asn Met Gly Asn Leu Ile Cys Asp Ala Met			
[2956]		355	360	365
[2957]	Ile Asn Asn Asn Leu Arg His Thr Asp Glu Met Phe Trp Asn His Val			
[2958]	370	375	380	
[2959]	Ser Met Cys Ile Leu Asn Gly Gly Gly Ile Arg Ser Pro Ile Asp Glu			
[2960]	385	390	395	400
[2961]	Arg Asn Asn Gly Thr Ile Thr Trp Glu Asn Leu Ala Ala Val Leu Pro			
[2962]		405	410	415
[2963]	Phe Gly Gly Thr Phe Asp Leu Val Gln Leu Lys Gly Ser Thr Leu Lys			
[2964]		420	425	430
[2965]	Lys Ala Phe Glu His Ser Val His Arg Tyr Gly Gln Ser Thr Gly Glu			
[2966]		435	440	445
[2967]	Phe Leu Gln Val Gly Gly Ile His Val Val Tyr Asp Leu Ser Arg Lys			
[2968]	450	455	460	
[2969]	Pro Gly Asp Arg Val Val Lys Leu Asp Val Leu Cys Thr Lys Cys Arg			
[2970]	465	470	475	480
[2971]	Val Pro Ser Tyr Asp Pro Leu Lys Met Asp Glu Val Tyr Lys Val Ile			
[2972]		485	490	495
[2973]	Leu Pro Asn Phe Leu Ala Asn Gly Gly Asp Gly Phe Gln Met Ile Lys			
[2974]		500	505	510
[2975]	Asp Glu Leu Leu Arg His Asp Ser Gly Asp Gln Asp Ile Asn Val Val			
[2976]		515	520	525
[2977]	Ser Thr Tyr Ile Ser Lys Met Lys Val Ile Tyr Pro Ala Val Glu Gly			
[2978]	530	535	540	
[2979]	Arg Ile Lys Phe Ser Thr Gly Ser His Cys His Gly Ser Phe Ser Leu			
[2980]	545	550	555	560
[2981]	Ile Phe Leu Ser Leu Trp Ala Val Ile Phe Val Leu Tyr Gln			

[2982]		565	570
[2983]	<210>	149	
[2984]	<211>	223	
[2985]	<212>	PRT	
[2986]	<213>	智人	
[2987]	<400>	149	
[2988]	Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala		
[2989]	1	5	10 15
[2990]	Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro		
[2991]		20	25 30
[2992]	Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala		
[2993]		35	40 45
[2994]	Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly		
[2995]	50	55	60
[2996]	Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln		
[2997]	65	70	75 80
[2998]	Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr		
[2999]		85	90 95
[3000]	Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val		
[3001]		100	105 110
[3002]	Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile		
[3003]		115	120 125
[3004]	Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly		
[3005]	130	135	140
[3006]	Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser		
[3007]	145	150	155 160
[3008]	Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe		
[3009]		165	170 175
[3010]	Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys		
[3011]		180	185 190
[3012]	Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu		
[3013]		195	200 205
[3014]	Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn		
[3015]	210	215	220
[3016]	<210>	150	
[3017]	<211>	288	
[3018]	<212>	PRT	
[3019]	<213>	智人	
[3020]	<400>	150	
[3021]	Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln		
[3022]	1	5	10 15
[3023]	Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp		

[3024]	20	25	30
[3025]	Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp		
[3026]	35	40	45
[3027]	Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val		
[3028]	50	55	60
[3029]	Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala		
[3030]	65	70	75
[3031]	Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg		
[3032]	85	90	95
[3033]	Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg		
[3034]	100	105	110
[3035]	Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu		
[3036]	115	120	125
[3037]	Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val		
[3038]	130	135	140
[3039]	Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro		
[3040]	145	150	155
[3041]	Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly		
[3042]	165	170	175
[3043]	Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys		
[3044]	180	185	190
[3045]	Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro		
[3046]	195	200	205
[3047]	Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly		
[3048]	210	215	220
[3049]	Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro		
[3050]	225	230	235
[3051]	Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly		
[3052]	245	250	255
[3053]	Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg		
[3054]	260	265	270
[3055]	Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu		
[3056]	275	280	285
[3057]	<210> 151		
[3058]	<211> 176		
[3059]	<212> PRT		
[3060]	<213> 智人		
[3061]	<400> 151		
[3062]	Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu		
[3063]	1	5	10
[3064]	Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro		
[3065]	20	25	30

[3066]	Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys
[3067]	35 40 45
[3068]	Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys
[3069]	50 55 60
[3070]	Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr
[3071]	65 70 75 80
[3072]	Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr
[3073]	85 90 95
[3074]	Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile
[3075]	100 105 110
[3076]	Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His Leu Val
[3077]	115 120 125
[3078]	Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile
[3079]	130 135 140
[3080]	Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile
[3081]	145 150 155 160
[3082]	Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu Glu Thr
[3083]	165 170 175
[3084]	<210> 152
[3085]	<211> 13
[3086]	<212> PRT
[3087]	<213> 人工序列
[3088]	<220>
[3089]	<221> 来源
[3090]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[3091]	肽"
[3092]	<220>
[3093]	<221> 变体
[3094]	<222> (11) .. (11)
[3095]	<223> /替代="Glu"或"Asp"
[3096]	<220>
[3097]	<221> 尚未归类的特征
[3098]	<222> (1) .. (13)
[3099]	<223> /注解="该序列中给出的变体残基
[3100]	对于变体位置的注释中的那些没
[3101]	有偏好"
[3102]	<400> 152
[3103]	Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn Pro Val Asn
[3104]	1 5 10
[3105]	<210> 153
[3106]	<211> 7
[3107]	<212> PRT

- [3108] <213> 人工序列
[3109] <220>
[3110] <221> 来源
[3111] <223> /注解="人工序列的说明:合成
[3112] 肽"
[3113] <220>
[3114] <221> 变体
[3115] <222> (2) .. (2)
[3116] <223> /替代="Asp"
[3117] <220>
[3118] <221> 变体
[3119] <222> (4) .. (4)
[3120] <223> /替代="Leu"
[3121] <220>
[3122] <221> 变体
[3123] <222> (6) .. (6)
[3124] <223> /替代="Pro"
[3125] <220>
[3126] <221> 变体
[3127] <222> (7) .. (7)
[3128] <223> /替代="Ser"
[3129] <220>
[3130] <221> 尚未归类的特征
[3131] <222> (1) .. (7)
[3132] <223> /注解="该序列中给出的变体残基
[3133] 对于变体位置的注释中的那些没
[3134] 有偏好"
[3135] <400> 153
[3136] Leu Asn Asn Gln Arg Leu Gly
[3137] 1 5
[3138] <210> 154
[3139] <211> 11
[3140] <212> PRT
[3141] <213> 人工序列
[3142] <220>
[3143] <221> 来源
[3144] <223> /注解="人工序列的说明:合成
[3145] 肽"
[3146] <220>
[3147] <221> 变体
[3148] <222> (7) .. (7)
[3149] <223> /替代="His"

[3150]	<220>
[3151]	<221> 变体
[3152]	<222> (8) .. (8)
[3153]	<223> /替代="Pro"或"Ile"或"Asn"
[3154]	<220>
[3155]	<221> 变体
[3156]	<222> (11) .. (11)
[3157]	<223> /替代="Thr"
[3158]	<220>
[3159]	<221> 尚未归类的特征
[3160]	<222> (1) .. (11)
[3161]	<223> /注解="该序列中给出的变体残基
[3162]	对于变体位置的注释中的那些没
[3163]	有偏好"
[3164]	<400> 154
[3165]	Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Lys Gly Trp Leu
[3166]	1 5 10
[3167]	<210> 155
[3168]	<211> 5
[3169]	<212> PRT
[3170]	<213> 人工序列
[3171]	<220>
[3172]	<221> 来源
[3173]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[3174]	肽"
[3175]	<220>
[3176]	<221> 变体
[3177]	<222> (4) .. (4)
[3178]	<223> /替代="Tyr"
[3179]	<220>
[3180]	<221> 尚未归类的特征
[3181]	<222> (1) .. (5)
[3182]	<223> /注解="该序列中给出的变体残基
[3183]	对于变体位置的注释中的那些没
[3184]	有偏好"
[3185]	<400> 155
[3186]	Ser Tyr Ala Met Ser
[3187]	1 5
[3188]	<210> 156
[3189]	<211> 17
[3190]	<212> PRT
[3191]	<213> 人工序列

- [3192] <220>
- [3193] <221> 来源
- [3194] <223> /注解="人工序列的说明:合成
- [3195] 肽"
- [3196] <220>
- [3197] <221> 变体
- [3198] <222> (1) .. (1)
- [3199] <223> /替代="Ala"
- [3200] <220>
- [3201] <221> 变体
- [3202] <222> (3) .. (3)
- [3203] <223> /替代="Ser"
- [3204] <220>
- [3205] <221> 变体
- [3206] <222> (6) .. (6)
- [3207] <223> /替代="Gly"
- [3208] <220>
- [3209] <221> 变体
- [3210] <222> (8) .. (8)
- [3211] <223> /替代="Arg"
- [3212] <220>
- [3213] <221> 尚未归类的特征
- [3214] <222> (1) .. (17)
- [3215] <223> /注解="该序列中给出的变体残基
- [3216] 对于变体位置的注释中的那些没
- [3217] 有偏好"
- [3218] <400> 156
- [3219] Leu Ile Trp Gly Ser Trp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
- [3220] 1 5 10 15
- [3221] Gly
- [3222] <210> 157
- [3223] <211> 8
- [3224] <212> PRT
- [3225] <213> 人工序列
- [3226] <220>
- [3227] <221> 来源
- [3228] <223> /注解="人工序列的说明:合成
- [3229] 肽"
- [3230] <220>
- [3231] <221> 变体
- [3232] <222> (4) .. (4)
- [3233] <223> /替代="Ser"

- [3234] <220>
[3235] <221> 变体
[3236] <222> (5) .. (5)
[3237] <223> /替代="Thr"
[3238] <220>
[3239] <221> 变体
[3240] <222> (6) .. (6)
[3241] <223> /替代="Ile"
[3242] <220>
[3243] <221> 变体
[3244] <222> (8) .. (8)
[3245] <223> /替代="Lys"或"Met"或"Leu"或"Glu"
[3246] <220>
[3247] <221> 尚未归类的特征
[3248] <222> (1) .. (8)
[3249] <223> /注解="该序列中给出的变体残基
[3250] 对于变体位置的注释中的那些没
[3251] 有偏好"
[3252] <400> 157
[3253] Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Tyr
[3254] 1 5
[3255] <210> 158
[3256] <211> 7
[3257] <212> PRT
[3258] <213> 人工序列
[3259] <220>
[3260] <221> 来源
[3261] <223> /注解="人工序列的说明:合成
[3262] 肽"
[3263] <220>
[3264] <221> 变体
[3265] <222> (3) .. (3)
[3266] <223> /替代="Thr"
[3267] <220>
[3268] <221> 变体
[3269] <222> (5) .. (5)
[3270] <223> /替代="Tyr"
[3271] <220>
[3272] <221> 变体
[3273] <222> (6) .. (6)
[3274] <223> /替代="Pro"或"Leu"
[3275] <220>

- [3276] <221> 尚未归类的特征
[3277] <222> (1) .. (7)
[3278] <223> /注解="该序列中给出的变体残基
[3279] 对于变体位置的注释中的那些没
[3280] 有偏好"
[3281] <400> 158
[3282] Glu Asp Ser Lys Arg His Ser
[3283] 1 5
[3284] <210> 159
[3285] <211> 5
[3286] <212> PRT
[3287] <213> 人工序列
[3288] <220>
[3289] <221> 来源
[3290] <223> /注解="人工序列的说明:合成
[3291] 肽"
[3292] <220>
[3293] <221> 变体
[3294] <222> (2) .. (2)
[3295] <223> /替代="Val"
[3296] <220>
[3297] <221> 变体
[3298] <222> (4) .. (4)
[3299] <223> /替代="Arg"
[3300] <220>
[3301] <221> 尚未归类的特征
[3302] <222> (1) .. (5)
[3303] <223> /注解="该序列中给出的变体残基
[3304] 对于变体位置的注释中的那些没
[3305] 有偏好"
[3306] <400> 159
[3307] Ser Tyr Ala Met Ser
[3308] 1 5
[3309] <210> 160
[3310] <211> 17
[3311] <212> PRT
[3312] <213> 人工序列
[3313] <220>
[3314] <221> 来源
[3315] <223> /注解="人工序列的说明:合成
[3316] 肽"
[3317] <220>

- [3318] <221> 变体
- [3319] <222> (9) .. (9)
- [3320] <223> /替代="Pro"
- [3321] <220>
- [3322] <221> 变体
- [3323] <222> (12) .. (12)
- [3324] <223> /替代="Gly"
- [3325] <220>
- [3326] <221> 变体
- [3327] <222> (17) .. (17)
- [3328] <223> /替代="Arg"
- [3329] <220>
- [3330] <221> 尚未归类的特征
- [3331] <222> (1) .. (17)
- [3332] <223> /注解="该序列中给出的变体残基
对于变体位置的注释中的那些没
有偏好"
- [3333]
- [3334]
- [3335] <400> 160
- [3336] Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
- [3337] 1 5 10 15
- [3338] Gly
- [3339] <210> 161
- [3340] <211> 8
- [3341] <212> PRT
- [3342] <213> 人工序列
- [3343] <220>
- [3344] <221> 来源
- [3345] <223> /注解="人工序列的说明:合成
肽"
- [3346]
- [3347] <400> 161
- [3348] Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met
- [3349] 1 5
- [3350] <210> 162
- [3351] <211> 106
- [3352] <212> PRT
- [3353] <213> 人工序列
- [3354] <220>
- [3355] <221> 来源
- [3356] <223> /注解="人工序列的说明:合成
多肽"
- [3357]
- [3358] <220>
- [3359] <221> 尚未归类的特征

- [3360] <222> (1) .. (22)
- [3361] <223> /注解="此区可涵盖 'QSVLTQPPSVSVSPGQTATITC' 或
- [3362] 'QSVLTQPPSVSVSPGQTASITC' "
- [3363] <220>
- [3364] <221> 变体
- [3365] <222> (19) .. (19)
- [3366] <223> /替代="Ser"
- [3367] <220>
- [3368] <221> 变体
- [3369] <222> (51) .. (51)
- [3370] <223> /替代="Leu"
- [3371] <220>
- [3372] <221> 变体
- [3373] <222> (53) .. (53)
- [3374] <223> /替代="Tyr"
- [3375] <220>
- [3376] <221> 变体
- [3377] <222> (54) .. (54)
- [3378] <223> /替代="Pro"或"Leu"
- [3379] <220>
- [3380] <221> 变体
- [3381] <222> (56) .. (56)
- [3382] <223> /替代="Gly"
- [3383] <220>
- [3384] <221> 变体
- [3385] <222> (66) .. (66)
- [3386] <223> /替代="Arg"
- [3387] <220>
- [3388] <221> 变体
- [3389] <222> (80) .. (80)
- [3390] <223> /替代="Met"
- [3391] <220>
- [3392] <221> 变体
- [3393] <222> (86) .. (86)
- [3394] <223> /替代="Tyr"
- [3395] <220>
- [3396] <221> 尚未归类的特征
- [3397] <222> (56) .. (87)
- [3398] <223> /注解="此区可涵盖
- [3399] 'RIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYFC,'
- [3400] 'GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC' 或
- [3401] 'GIPERFSGSNRGNTATLTISGTQAMDEADYYC' "

[3402]	<220>
[3403]	<221> 尚未归类的特征
[3404]	<222> (1) .. (106)
[3405]	<223> /注解="该序列中给出的变体残基
[3406]	对于变体位置的注释中的那些没
[3407]	有偏好"
[3408]	<400> 162
[3409]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
[3410]	1 5 10 15
[3411]	Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Val Gly Asp Lys Tyr Ala
[3412]	20 25 30
[3413]	Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
[3414]	35 40 45
[3415]	Glu Asp Pro Lys Arg His Ser Arg Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
[3416]	50 55 60
[3417]	Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Leu
[3418]	65 70 75 80
[3419]	Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Ala Trp Asp Thr Ser Phe Trp Val
[3420]	85 90 95
[3421]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[3422]	100 105
[3423]	<210> 163
[3424]	<211> 117
[3425]	<212> PRT
[3426]	<213> 人工序列
[3427]	<220>
[3428]	<221> 来源
[3429]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[3430]	多肽"
[3431]	<220>
[3432]	<221> 变体
[3433]	<222> (32) .. (32)
[3434]	<223> /替代="Val"
[3435]	<220>
[3436]	<221> 变体
[3437]	<222> (34) .. (34)
[3438]	<223> /替代="Arg"
[3439]	<220>
[3440]	<221> 变体
[3441]	<222> (58) .. (58)
[3442]	<223> /替代="Pro"
[3443]	<220>

[3444]	<221> 变体
[3445]	<222> (61) .. (61)
[3446]	<223> /替代="Gly"
[3447]	<220>
[3448]	<221> 变体
[3449]	<222> (66) .. (66)
[3450]	<223> /替代="Arg"
[3451]	<220>
[3452]	<221> 尚未归类的特征
[3453]	<222> (1) .. (117)
[3454]	<223> /注解="该序列中给出的变体残基
[3455]	对于变体位置的注释中的那些没
[3456]	有偏好"
[3457]	<400> 163
[3458]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[3459]	1 5 10 15
[3460]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[3461]	20 25 30
[3462]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[3463]	35 40 45
[3464]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[3465]	50 55 60
[3466]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[3467]	65 70 75 80
[3468]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[3469]	85 90 95
[3470]	Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Trp Gly Gln Gly Thr Met
[3471]	100 105 110
[3472]	Val Thr Val Ser Ser
[3473]	115
[3474]	<210> 164
[3475]	<211> 6
[3476]	<212> PRT
[3477]	<213> 人工序列
[3478]	<220>
[3479]	<221> 来源
[3480]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[3481]	6xHis标签"
[3482]	<400> 164
[3483]	His His His His His His
[3484]	1 5
[3485]	<210> 165

[3486]	<211>	115
[3487]	<212>	PRT
[3488]	<213>	智人
[3489]	<400>	165
[3490]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[3491]	1	5 10 15
[3492]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	
[3493]		20 25 30
[3494]	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[3495]		35 40 45
[3496]	Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
[3497]		50 55 60
[3498]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
[3499]	65	70 75 80
[3500]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[3501]		85 90 95
[3502]	Ala Lys Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr	
[3503]		100 105 110
[3504]	Val Ser Ser	
[3505]		115
[3506]	<210>	166
[3507]	<211>	108
[3508]	<212>	PRT
[3509]	<213>	智人
[3510]	<400>	166
[3511]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln	
[3512]	1	5 10 15
[3513]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn	
[3514]		20 25 30
[3515]	Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu	
[3516]		35 40 45
[3517]	Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser	
[3518]		50 55 60
[3519]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln	
[3520]	65	70 75 80
[3521]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu	
[3522]		85 90 95
[3523]	Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu	
[3524]		100 105
[3525]	<210>	167
[3526]	<211>	526
[3527]	<212>	PRT

[3528]	<213> 人工序列															
[3529]	<220>															
[3530]	<221> 来源															
[3531]	<223> /注解="人工序列的说明:合成															
[3532]	多肽"															
[3533]	<400> 167															
[3534]	Trp	Glu	Leu	Thr	Ile	Leu	His	Thr	Asn	Asp	Val	His	Ser	Arg	Leu	Glu
[3535]	1				5					10					15	
[3536]	Gln	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ser	Lys	Cys	Val	Asn	Ala	Ser	Arg	Cys	Met
[3537]				20					25					30		
[3538]	Gly	Gly	Val	Ala	Arg	Leu	Phe	Thr	Lys	Val	Gln	Gln	Ile	Arg	Arg	Ala
[3539]			35					40					45			
[3540]	Glu	Pro	Asn	Val	Leu	Leu	Leu	Asp	Ala	Gly	Asp	Gln	Tyr	Gln	Gly	Thr
[3541]		50					55					60				
[3542]	Ile	Trp	Phe	Thr	Val	Tyr	Lys	Gly	Ala	Glu	Val	Ala	His	Phe	Met	Asn
[3543]	65				70					75					80	
[3544]	Ala	Leu	Arg	Tyr	Asp	Ala	Met	Ala	Leu	Gly	Asn	His	Glu	Phe	Asp	Asn
[3545]				85					90					95		
[3546]	Gly	Val	Glu	Gly	Leu	Ile	Glu	Pro	Leu	Leu	Lys	Glu	Ala	Lys	Phe	Pro
[3547]			100					105					110			
[3548]	Ile	Leu	Ser	Ala	Asn	Ile	Lys	Ala	Lys	Gly	Pro	Leu	Ala	Ser	Gln	Ile
[3549]			115				120						125			
[3550]	Ser	Gly	Leu	Tyr	Leu	Pro	Tyr	Lys	Val	Leu	Pro	Val	Gly	Asp	Glu	Val
[3551]		130					135					140				
[3552]	Val	Gly	Ile	Val	Gly	Tyr	Thr	Ser	Lys	Glu	Thr	Pro	Phe	Leu	Ser	Asn
[3553]	145				150					155				160		
[3554]	Pro	Gly	Thr	Asn	Leu	Val	Phe	Glu	Asp	Glu	Ile	Thr	Ala	Leu	Gln	Pro
[3555]				165					170					175		
[3556]	Glu	Val	Asp	Lys	Leu	Lys	Thr	Leu	Asn	Val	Asn	Lys	Ile	Ile	Ala	Leu
[3557]			180					185					190			
[3558]	Gly	His	Ser	Gly	Phe	Glu	Met	Asp	Lys	Leu	Ile	Ala	Gln	Lys	Val	Arg
[3559]		195					200						205			
[3560]	Gly	Val	Asp	Val	Val	Val	Gly	Gly	His	Ser	Asn	Thr	Phe	Leu	Tyr	Thr
[3561]		210					215					220				
[3562]	Gly	Asn	Pro	Pro	Ser	Lys	Glu	Val	Pro	Ala	Gly	Lys	Tyr	Pro	Phe	Ile
[3563]	225				230					235				240		
[3564]	Val	Thr	Ser	Asp	Asp	Gly	Arg	Lys	Val	Pro	Val	Val	Gln	Ala	Tyr	Ala
[3565]				245					250					255		
[3566]	Phe	Gly	Lys	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Leu	Lys	Ile	Glu	Phe	Asp	Glu	Arg	Gly
[3567]			260					265					270			
[3568]	Asn	Val	Ile	Ser	Ser	His	Gly	Asn	Pro	Ile	Leu	Leu	Asn	Ser	Ser	Ile
[3569]		275					280						285			

[3570]	Pro Glu Asp Pro Ser Ile Lys Ala Asp Ile Asn Lys Trp Arg Ile Lys
[3571]	290 295 300
[3572]	Leu Asp Asn Tyr Ser Thr Gln Glu Leu Gly Lys Thr Ile Val Tyr Leu
[3573]	305 310 315 320
[3574]	Asp Gly Ser Ser Gln Ser Cys Arg Phe Arg Glu Cys Asn Met Gly Asn
[3575]	325 330 335
[3576]	Leu Ile Cys Asp Ala Met Ile Asn Asn Asn Leu Arg His Ala Asp Glu
[3577]	340 345 350
[3578]	Met Phe Trp Asn His Val Ser Met Cys Ile Leu Asn Gly Gly Gly Ile
[3579]	355 360 365
[3580]	Arg Ser Pro Ile Asp Glu Arg Asn Asn Gly Thr Ile Thr Trp Glu Asn
[3581]	370 375 380
[3582]	Leu Ala Ala Val Leu Pro Phe Gly Gly Thr Phe Asp Leu Val Gln Leu
[3583]	385 390 395 400
[3584]	Lys Gly Ser Thr Leu Lys Lys Ala Phe Glu His Ser Val His Arg Tyr
[3585]	405 410 415
[3586]	Gly Gln Ser Thr Gly Glu Phe Leu Gln Val Gly Gly Ile His Val Val
[3587]	420 425 430
[3588]	Tyr Asp Leu Ser Arg Lys Pro Gly Asp Arg Val Val Lys Leu Asp Val
[3589]	435 440 445
[3590]	Leu Cys Thr Lys Cys Arg Val Pro Ser Tyr Asp Pro Leu Lys Met Asp
[3591]	450 455 460
[3592]	Glu Val Tyr Lys Val Ile Leu Pro Asn Phe Leu Ala Asn Gly Gly Asp
[3593]	465 470 475 480
[3594]	Gly Phe Gln Met Ile Lys Asp Glu Leu Leu Arg His Asp Ser Gly Asp
[3595]	485 490 495
[3596]	Gln Gly Ile Asn Val Val Ser Thr Tyr Ile Ser Lys Met Lys Val Ile
[3597]	500 505 510
[3598]	Tyr Pro Ala Val Glu Gly Arg Ile Lys Phe Ser Thr Gly Ser
[3599]	515 520 525
[3600]	<210> 168
[3601]	<211> 17
[3602]	<212> PRT
[3603]	<213> 人工序列
[3604]	<220>
[3605]	<221> 来源
[3606]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[3607]	肽"
[3608]	<400> 168
[3609]	Ser Ala Asn Ile Lys Ala Lys Gly Pro Leu Ala Ser Gln Ile Ser Gly
[3610]	1 5 10 15
[3611]	Leu

[3612] <210> 169
[3613] <211> 12
[3614] <212> PRT
[3615] <213> 人工序列
[3616] <220>
[3617] <221> 来源
[3618] <223> /注解="人工序列的说明:合成
[3619] 肽"
[3620] <400> 169
[3621] Val Leu Pro Val Lys Val Leu Pro Val Gly Asp Glu
[3622] 1 5 10
[3623] <210> 170
[3624] <211> 10
[3625] <212> PRT
[3626] <213> 人工序列
[3627] <220>
[3628] <221> 来源
[3629] <223> /注解="人工序列的说明:合成
[3630] 肽"
[3631] <400> 170
[3632] Leu Pro Tyr Lys Val Leu Pro Val Gly Asp
[3633] 1 5 10
[3634] <210> 171
[3635] <211> 7
[3636] <212> PRT
[3637] <213> 人工序列
[3638] <220>
[3639] <221> 来源
[3640] <223> /注解="人工序列的说明:合成
[3641] 肽"
[3642] <400> 171
[3643] Glu Val Val Gly Ile Val Gly
[3644] 1 5
[3645] <210> 172
[3646] <211> 9
[3647] <212> PRT
[3648] <213> 人工序列
[3649] <220>
[3650] <221> 来源
[3651] <223> /注解="人工序列的说明:合成
[3652] 肽"
[3653] <400> 172

[3654]	Ala Leu Gln Pro Glu Val Asp Lys Leu
[3655]	1 5
[3656]	<210> 173
[3657]	<211> 14
[3658]	<212> PRT
[3659]	<213> 人工序列
[3660]	<220>
[3661]	<221> 来源
[3662]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[3663]	肽"
[3664]	<400> 173
[3665]	Ala Leu Gln Pro Glu Val Asp Lys Leu Lys Thr Leu Asn Val
[3666]	1 5 10
[3667]	<210> 174
[3668]	<211> 12
[3669]	<212> PRT
[3670]	<213> 人工序列
[3671]	<220>
[3672]	<221> 来源
[3673]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[3674]	肽"
[3675]	<400> 174
[3676]	Lys Leu Lys Thr Leu Asn Val Asn Lys Ile Ile Ala
[3677]	1 5 10
[3678]	<210> 175
[3679]	<211> 11
[3680]	<212> PRT
[3681]	<213> 人工序列
[3682]	<220>
[3683]	<221> 来源
[3684]	<223> /注解="人工序列的说明:合成
[3685]	肽"
[3686]	<400> 175
[3687]	Asn Lys Ile Ile Ala Leu Gly His Ser Gly Phe
[3688]	1 5 10
[3689]	<210> 176
[3690]	<211> 523
[3691]	<212> PRT
[3692]	<213> 智人
[3693]	<400> 176
[3694]	Trp Glu Leu Thr Ile Leu His Thr Asn Asp Val His Ser Arg Leu Glu
[3695]	1 5 10 15

[3696]	Gln Thr Ser Glu Asp Ser Ser Lys Cys Val Asn Ala Ser Arg Cys Met		
[3697]		20	25 30
[3698]	Gly Gly Val Ala Arg Leu Phe Thr Lys Val Gln Gln Ile Arg Arg Ala		
[3699]		35	40 45
[3700]	Glu Pro Asn Val Leu Leu Leu Asp Ala Gly Asp Gln Tyr Gln Gly Thr		
[3701]		50	55 60
[3702]	Ile Trp Phe Thr Val Tyr Lys Gly Ala Glu Val Ala His Phe Met Asn		
[3703]		65	70 75 80
[3704]	Ala Leu Arg Tyr Asp Ala Met Ala Leu Gly Asn His Glu Phe Asp Asn		
[3705]		85	90 95
[3706]	Gly Val Glu Gly Leu Ile Glu Pro Leu Leu Lys Glu Ala Lys Phe Pro		
[3707]		100	105 110
[3708]	Ile Leu Ser Ala Asn Ile Lys Ala Lys Gly Pro Leu Ala Ser Gln Ile		
[3709]		115	120 125
[3710]	Ser Gly Leu Tyr Leu Pro Tyr Lys Val Leu Pro Val Gly Asp Glu Val		
[3711]		130	135 140
[3712]	Val Gly Ile Val Gly Tyr Thr Ser Lys Glu Thr Pro Phe Leu Ser Asn		
[3713]		145	150 155 160
[3714]	Pro Gly Thr Asn Leu Val Phe Glu Asp Glu Ile Thr Ala Leu Gln Pro		
[3715]		165	170 175
[3716]	Glu Val Asp Lys Leu Lys Thr Leu Asn Val Asn Lys Ile Ile Ala Leu		
[3717]		180	185 190
[3718]	Gly His Ser Gly Phe Glu Met Asp Lys Leu Ile Ala Gln Lys Val Arg		
[3719]		195	200 205
[3720]	Gly Val Asp Val Val Val Gly Gly His Ser Asn Thr Phe Leu Tyr Thr		
[3721]		210	215 220
[3722]	Gly Asn Pro Pro Ser Lys Glu Val Pro Ala Gly Lys Tyr Pro Phe Ile		
[3723]		225	230 235 240
[3724]	Val Thr Ser Asp Asp Gly Arg Lys Val Pro Val Val Gln Ala Tyr Ala		
[3725]		245	250 255
[3726]	Phe Gly Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu Lys Ile Glu Phe Asp Glu Arg Gly		
[3727]		260	265 270
[3728]	Asn Val Ile Ser Ser His Gly Asn Pro Ile Leu Leu Asn Ser Ser Ile		
[3729]		275	280 285
[3730]	Pro Glu Asp Pro Ser Ile Lys Ala Asp Ile Asn Lys Trp Arg Ile Lys		
[3731]		290	295 300
[3732]	Leu Asp Asn Tyr Ser Thr Gln Glu Leu Gly Lys Thr Ile Val Tyr Leu		
[3733]		305	310 315 320
[3734]	Asp Gly Ser Ser Gln Ser Cys Arg Phe Arg Glu Cys Asn Met Gly Asn		
[3735]		325	330 335
[3736]	Leu Ile Cys Asp Ala Met Ile Asn Asn Asn Leu Arg His Ala Asp Glu		
[3737]		340	345 350

[3738]	Met Phe Trp Asn His Val Ser Met Cys Ile Leu Asn Gly Gly Gly Ile		
[3739]	355	360	365
[3740]	Arg Ser Pro Ile Asp Glu Arg Asn Asn Gly Thr Ile Thr Trp Glu Asn		
[3741]	370	375	380
[3742]	Leu Ala Ala Val Leu Pro Phe Gly Gly Thr Phe Asp Leu Val Gln Leu		
[3743]	385	390	395
[3744]	Lys Gly Ser Thr Leu Lys Lys Ala Phe Glu His Ser Val His Arg Tyr		
[3745]	405	410	415
[3746]	Gly Gln Ser Thr Gly Glu Phe Leu Gln Val Gly Gly Ile His Val Val		
[3747]	420	425	430
[3748]	Tyr Asp Leu Ser Arg Lys Pro Gly Asp Arg Val Val Lys Leu Asp Val		
[3749]	435	440	445
[3750]	Leu Cys Thr Lys Cys Arg Val Pro Ser Tyr Asp Pro Leu Lys Met Asp		
[3751]	450	455	460
[3752]	Glu Val Tyr Lys Val Ile Leu Pro Asn Phe Leu Ala Asn Gly Gly Asp		
[3753]	465	470	475
[3754]	Gly Phe Gln Met Ile Lys Asp Glu Leu Leu Arg His Asp Ser Gly Asp		
[3755]	485	490	495
[3756]	Gln Asp Ile Asn Val Val Ser Thr Tyr Ile Ser Lys Met Lys Val Ile		
[3757]	500	505	510
[3758]	Tyr Pro Ala Val Glu Gly Arg Ile Lys Phe Ser		
[3759]	515	520	
[3760]	<210> 177		
[3761]	<211> 519		
[3762]	<212> PRT		
[3763]	<213> 原鸡		
[3764]	<400> 177		
[3765]	Leu Arg Leu Arg Leu Leu His Thr Asn Asp Val His Ala His Val Glu		
[3766]	1	5	10
[3767]	Ala Arg Gly Cys Ala Glu Gly Pro Arg Gly Cys Phe Gly Gly Val Ala		
[3768]	20	25	30
[3769]	Arg Arg Ala Ala Arg Val Ala Ala Glu Arg Ala Ala Gln Arg Asn Val		
[3770]	35	40	45
[3771]	Leu Leu Leu Asp Ala Gly Asp Gln Tyr Gln Gly Ser Val Trp Phe Ser		
[3772]	50	55	60
[3773]	Arg Phe Lys Gly Gln Glu Ala Val His Phe Met Asn Leu Leu Arg Tyr		
[3774]	65	70	75
[3775]	Asp Ala Met Ala Leu Gly Asn His Glu Phe Asp Glu Gly Val Arg Gly		
[3776]	85	90	95
[3777]	Leu Leu Asn Pro Leu Leu Arg Asn Ala Ser Phe Ala Ile Leu Ser Ala		
[3778]	100	105	110
[3779]	Asn Ile Lys Gly Lys Thr Pro Leu Gly Asn Gln Met Met Lys Tyr Val		

[3780]	115	120	125
[3781]	His Pro Tyr Lys Ile Leu His Ile Asp Ser Glu Lys Ile Gly Ile Val		
[3782]	130	135	140
[3783]	Gly Tyr Thr Thr Gln Glu Thr Ser Phe Leu Ser Gln Pro Gly Asn Asp		
[3784]	145	150	155
[3785]	Val Ile Phe Glu Asp Glu Ile Glu Ala Leu Gln Val Gln Val Asn Lys		
[3786]	165	170	175
[3787]	Leu Thr Ala Met Gly Val Asn Lys Ile Ile Ala Leu Gly His Ser Gly		
[3788]	180	185	190
[3789]	Phe Thr Val Asp Ile Asn Ile Ala Gln Lys Val Lys Gly Val Asp Val		
[3790]	195	200	205
[3791]	Val Ile Gly Gly His Thr Asn Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Thr Pro Pro		
[3792]	210	215	220
[3793]	Ser Thr Glu Gln Pro Ala Gly Pro Tyr Pro Phe Met Val Asp Ser Asp		
[3794]	225	230	235
[3795]	Asp Gly Arg Lys Val Pro Val Val Gln Ala Tyr Ala Tyr Gly Lys Tyr		
[3796]	245	250	255
[3797]	Leu Gly Tyr Leu Asn Val Thr Phe Asp Glu Lys Gly Asn Val Val Glu		
[3798]	260	265	270
[3799]	Ala Val Gly Asn Pro Ile Leu Leu Asp Ser Ser Val Pro Glu Asp Glu		
[3800]	275	280	285
[3801]	Gln Ile Lys Glu Glu Val Glu Lys Trp Arg Lys Asn Leu Gly Asn Tyr		
[3802]	290	295	300
[3803]	Ser Lys Glu Ile Gly Thr Thr Ser Val Tyr Leu Asn Gly Thr Ser Glu		
[3804]	305	310	315
[3805]	Ala Cys Arg Phe Gln Glu Cys Asn Met Gly Asn Leu Leu Cys Asp Ala		
[3806]	325	330	335
[3807]	Met Leu Tyr Glu Asn Val Arg Arg Pro Asp Arg Lys Ser Trp Asn His		
[3808]	340	345	350
[3809]	Val Ser Leu Cys Ile Leu Asn Gly Gly Gly Ile Arg Ala Ser Ile Asp		
[3810]	355	360	365
[3811]	Glu Arg Asn Ala Asn Gly Ser Ile Thr Met Glu Asp Leu Leu Ser Val		
[3812]	370	375	380
[3813]	Leu Pro Phe Gly Gly Arg Phe Asp Leu Val Thr Leu Lys Gly Ser Thr		
[3814]	385	390	395
[3815]	Leu Lys Glu Ala Phe Glu His Ser Val Arg Arg Tyr Gly Arg Gly Thr		
[3816]	405	410	415
[3817]	Gly Glu Leu Leu Gln Val Gly Gly Ile His Val Val Tyr Asp Leu Ser		
[3818]	420	425	430
[3819]	Arg Ala Pro Gly His Arg Ala Val Ser Ile Glu Val Leu Cys Thr Ala		
[3820]	435	440	445
[3821]	Cys Arg Val Pro Ala Tyr Val Pro Leu Glu Met Asp Glu Val Tyr Asn		

[3822]	450	455	460
[3823]	Val Thr Leu Pro Ser Tyr Met Leu Phe Gly Gly Asp Gly Tyr Tyr Met		
[3824]	465	470	475 480
[3825]	Leu Arg Asp Asn His Ile Thr Tyr Ser Lys Gly Glu Pro Asp Ile Glu		
[3826]		485	490 495
[3827]	Val Val Ser Arg Tyr Leu Asp Arg Met Lys Arg Val Tyr Pro Ala Val		
[3828]		500	505 510
[3829]	Glu Gly Arg Ile Lys Phe Ser		
[3830]	515		
[3831]	<210> 178		
[3832]	<211> 60		
[3833]	<212> PRT		
[3834]	<213> 人工序列		
[3835]	<220>		
[3836]	<221> 来源		
[3837]	<223> /注解="人工序列的说明:合成		
[3838]	多肽"		
[3839]	<400> 178		
[3840]	Ser Gly Leu Tyr Leu Pro Tyr Lys Val Leu Pro Val Gly Asp Glu Val		
[3841]	1	5	10 15
[3842]	Val Gly Ile Val Gly Tyr Thr Ser Lys Glu Thr Pro Phe Leu Ser Asn		
[3843]		20	25 30
[3844]	Pro Gly Thr Asn Leu Val Phe Glu Asp Glu Ile Thr Ala Leu Gln Pro		
[3845]		35	40 45
[3846]	Glu Val Asp Lys Leu Lys Thr Leu Asn Val Asn Lys		
[3847]	50	55	60

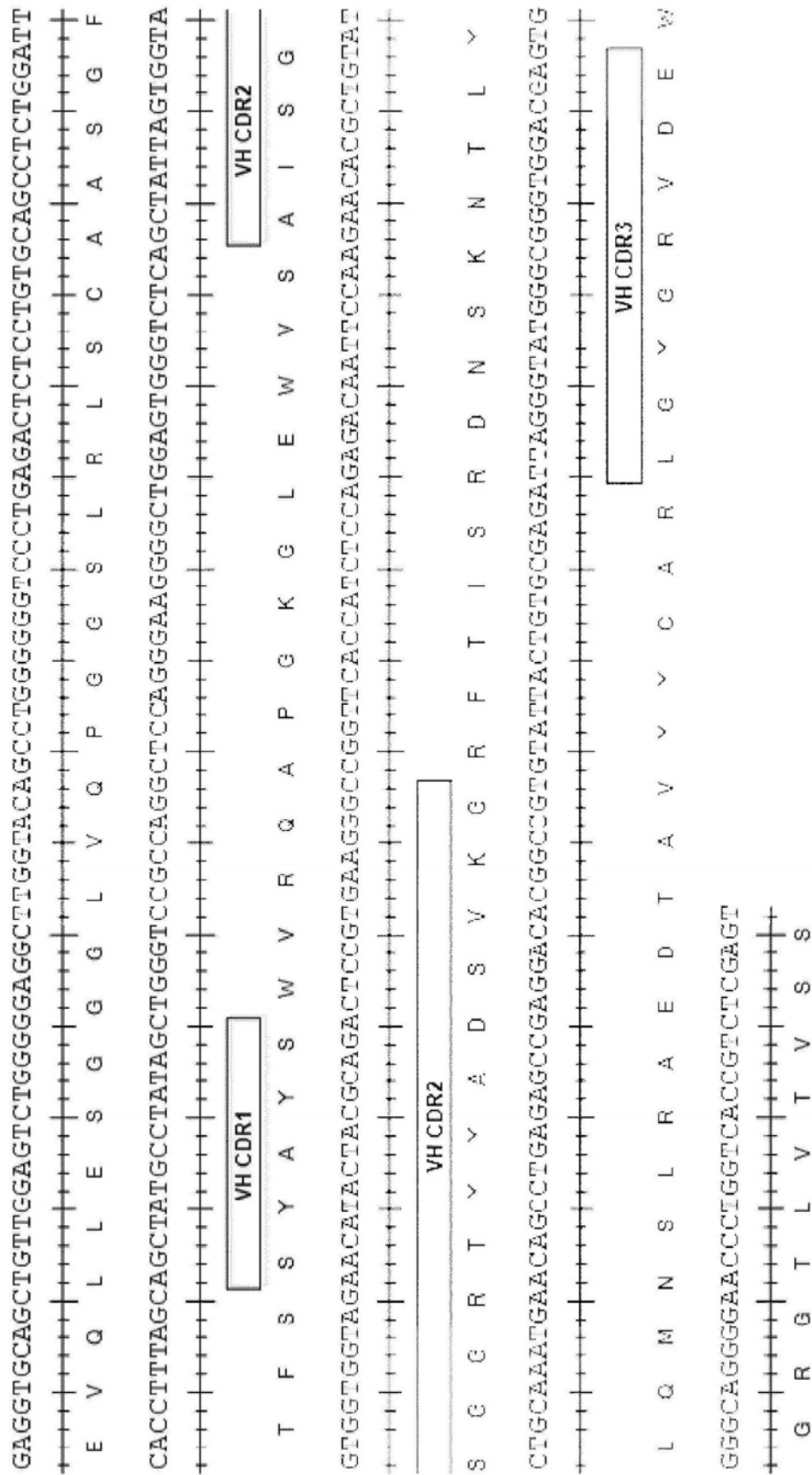


图1A

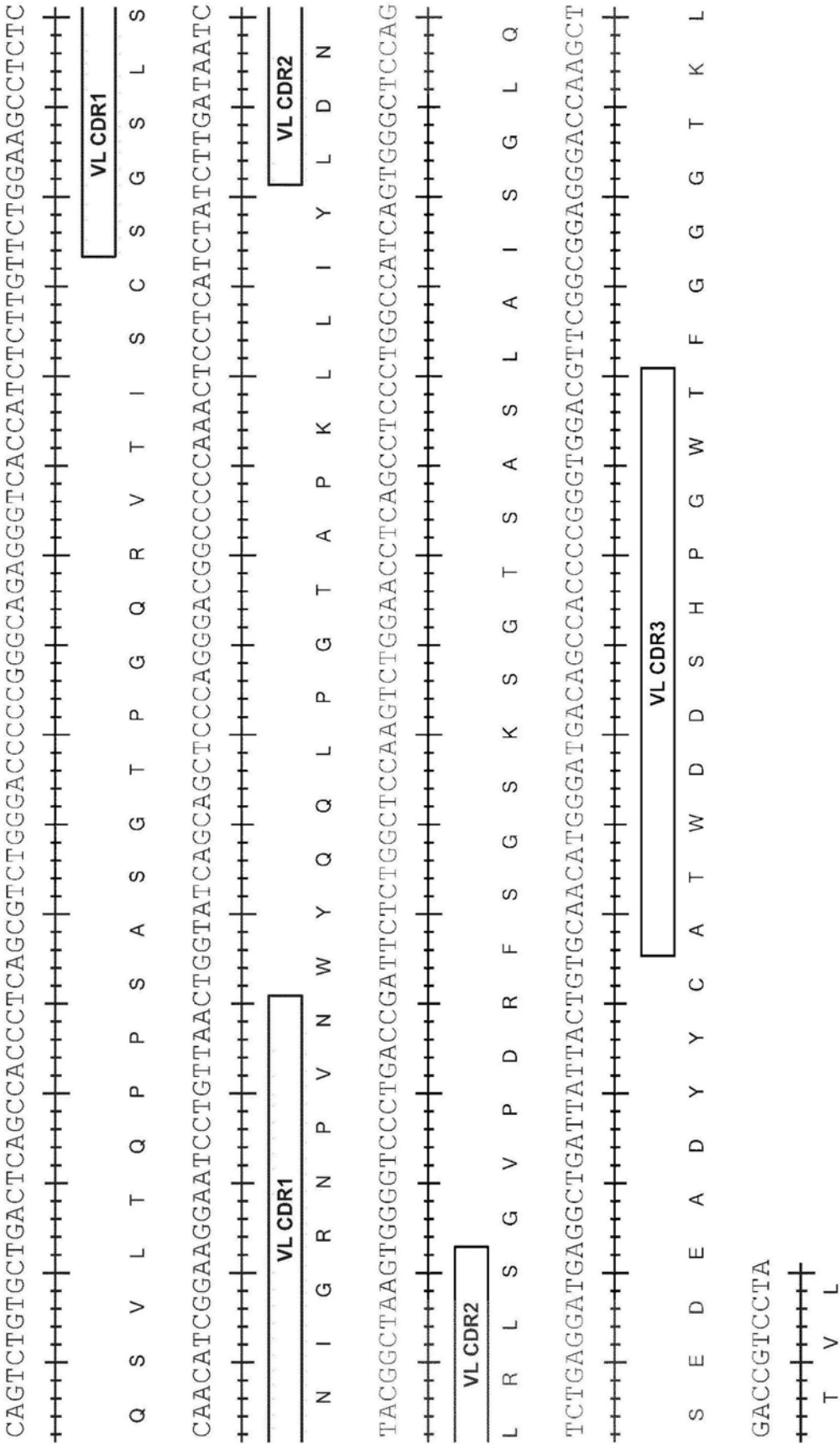


图1B

卡巴特位置： IGHV3-23*01 / IGHJ2*01 MEDI9447 VH	* * * * *																																			CDR 1					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	a	b	c	d		
	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	-	-	-	-		
	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	Y	S	-	-	-	-		
卡巴特位置： IGHV3-23*01 / IGHJ2*01 MEDI9447 VH	* * * * *																																			CDR 2					
	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	a	b	c	d	e	f	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68		
	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	A	I	S	G	-	-	-	-	-	S	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T		
	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	A	I	S	G	-	-	-	-	-	S	G	G	R	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T		
卡巴特位置： IGHV3-23*01 / IGHJ2*01 MEDI9447 VH	* * * * *																																			CDR 3					
	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	a	b	c	d	e	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	a	b		
	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	-	-	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	K	.	.	Y	W	Y	F	-	-			
	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	-	-	R	A	E	D	T	A	V	Y	C	A	R	L	G	Y	G	R	V	-	-			
卡巴特位置： IGHV3-23*01 / IGHJ2*01 MEDI9447 VH	*																																								
	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o	p	q	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113													
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

图1C

	CDR 1																																											
卡巴特位置：	*	*																																										
IGLV1-44*01 / IGLJ3*01	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	a	b	c	d	e	f	g	h	28	29	30	31	32	33	34		
MEDI9447 VL	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	N	-	-	-	-	-	-	-	-	I	G	S	N	T	V	N	
	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	L	S	N	-	-	-	-	-	-	-	I	G	R	N	P	V	N	
卡巴特位置：	*	*	CDR 2																																									
IGLV1-44*01 / IGLJ3*01	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	a	b	c	d	e	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	a	b	69		
MEDI9447 VL	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	Y	S	N	-	-	-	-	-	N	Q	R	P	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	-	-	T		
	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	Y	L	D	-	-	-	-	-	N	L	R	L	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	K	S	G	-	-	T		
卡巴特位置：	*	CDR 3																																										
IGLV1-44*01 / IGLJ3*01	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	a	b	c	d	e	f	g	h	i	96	97	98	99	100	101	102		
MEDI9447 VL	S	A	S	L	A	I	S	G	L	Q	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C	A	A	W	D	D	S	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	V	F	G	G	T
	S	A	S	L	A	I	S	G	L	Q	S	E	D	E	A	D	Y	Y	C	A	T	W	D	D	S	H	P	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	T	F	G	G	T
卡巴特位置：	103	104	105	106	a	b	c	107																																				
IGLV1-44*01 / IGLJ3*01	K	L	T	V	-	-	-	L																																				
MEDI9447 VL	K	L	T	V	-	-	-	L																																				

图1D

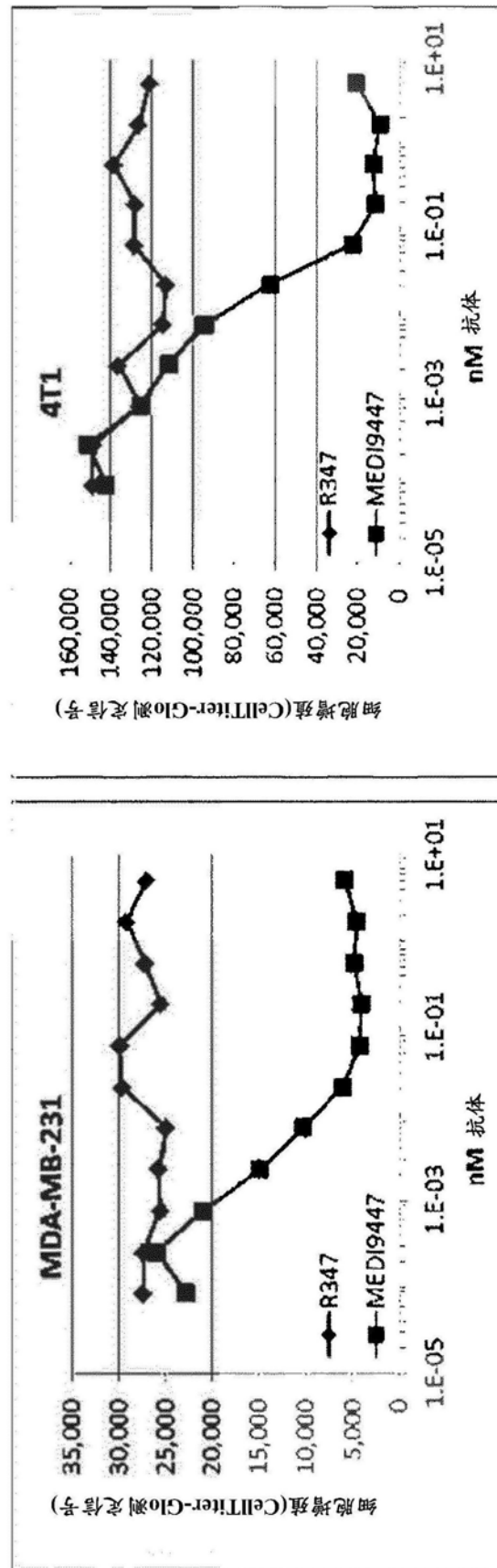


图2:细胞毒性FabZAP试剂经抗体介导内化至MDA-MB-231细胞和4T1细胞中

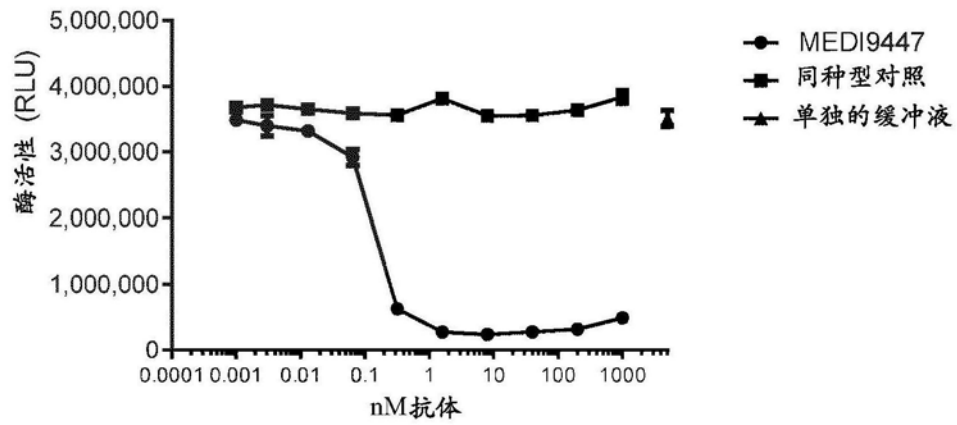


图3A:抗CD73抗体对5'外核苷酸酶的抑制

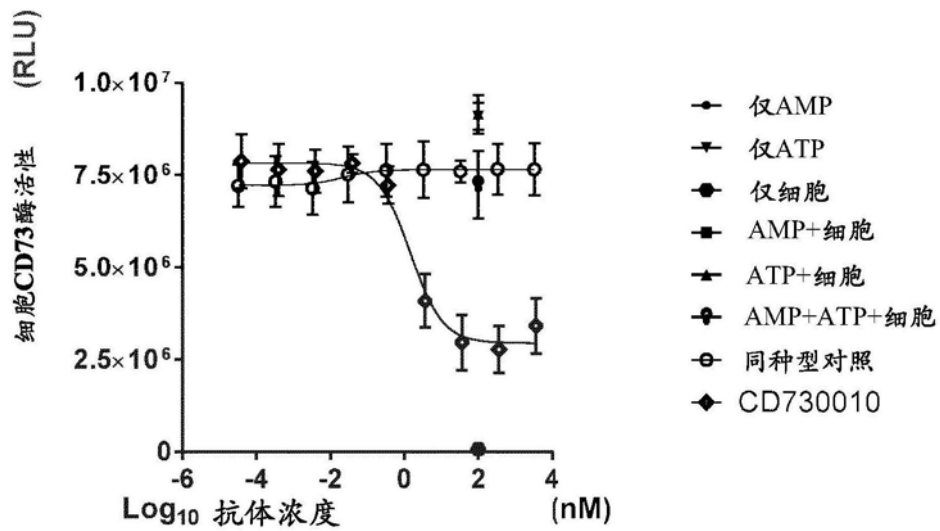


图3B 抗CD73抗体对AMP水解的抑制

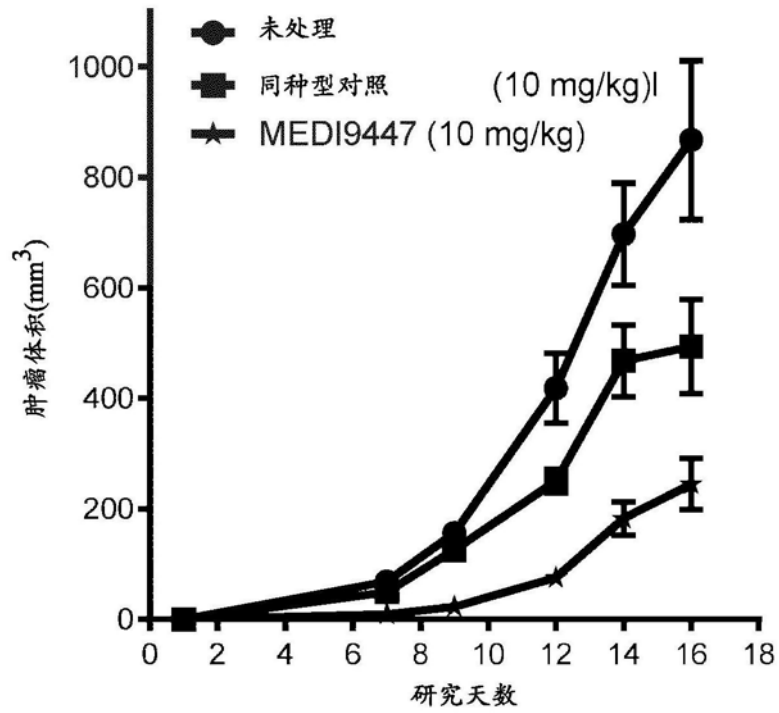


图4: MEDI9447抑制肿瘤生长

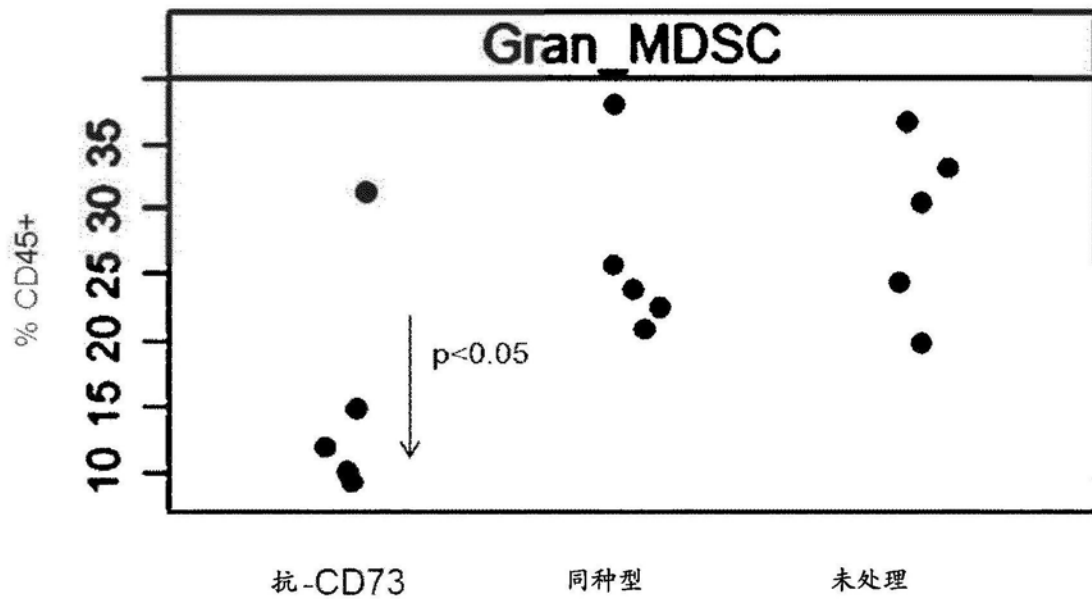


图5 MEDI9447抑制肿瘤浸润性MDSC

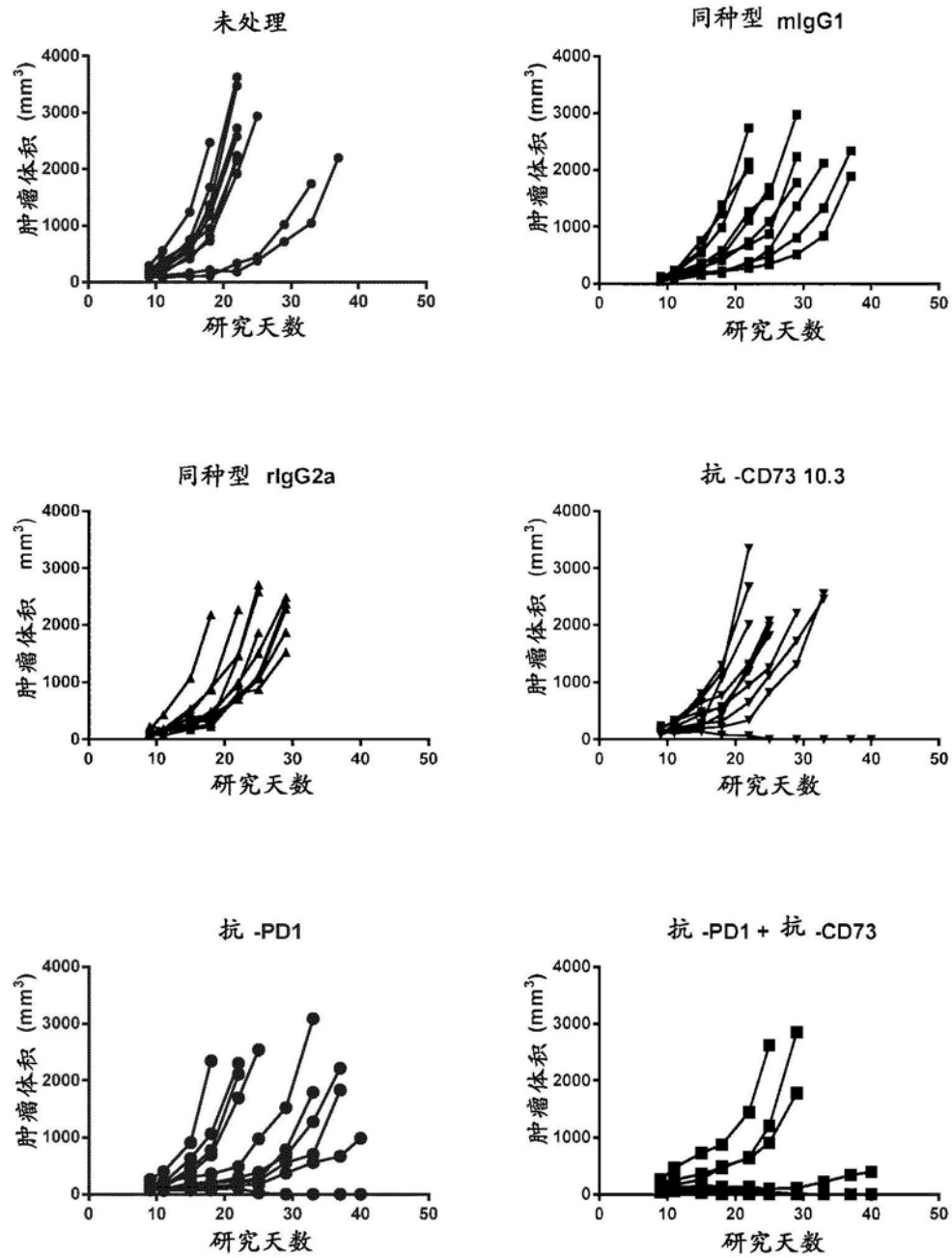


图6

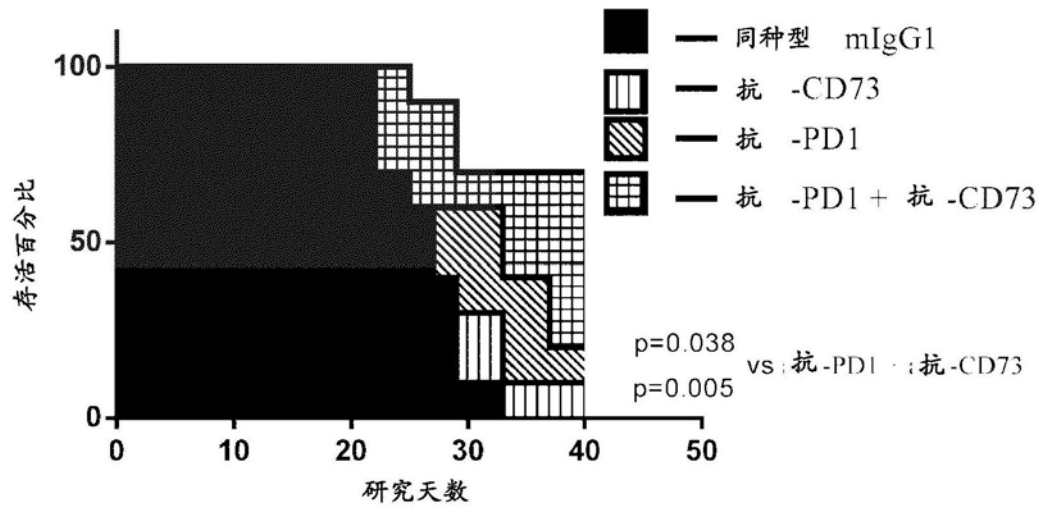


图7

用抗-PD-1和MEDI9447的组合处理的小鼠结肠直肠肿瘤

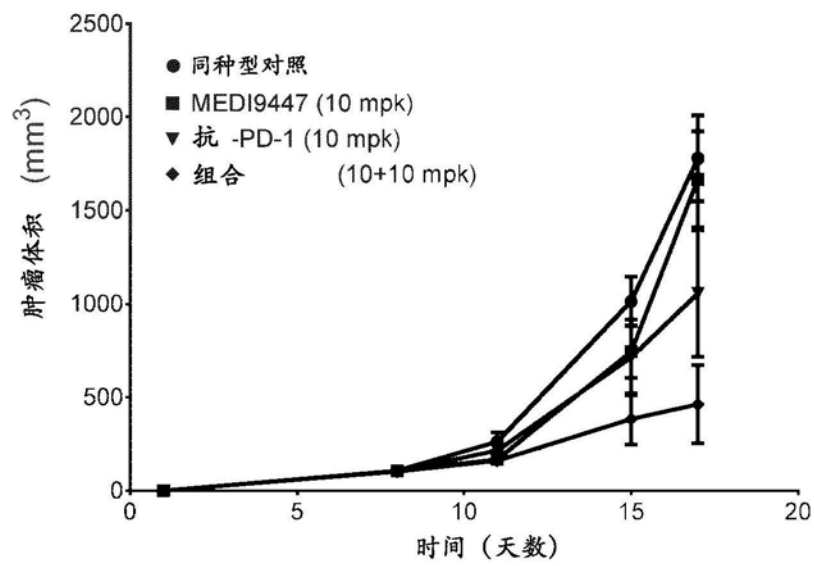


图8

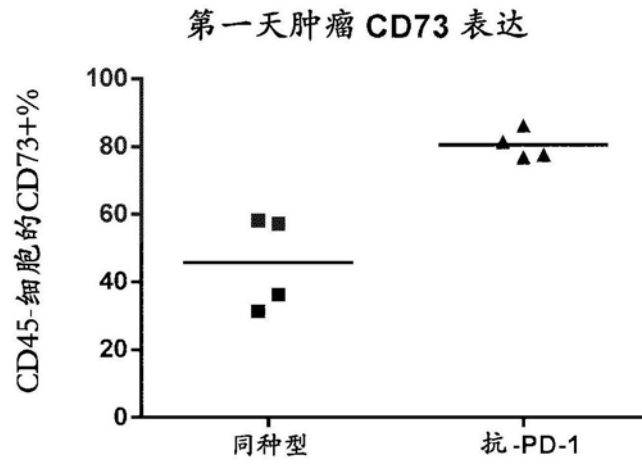


图9

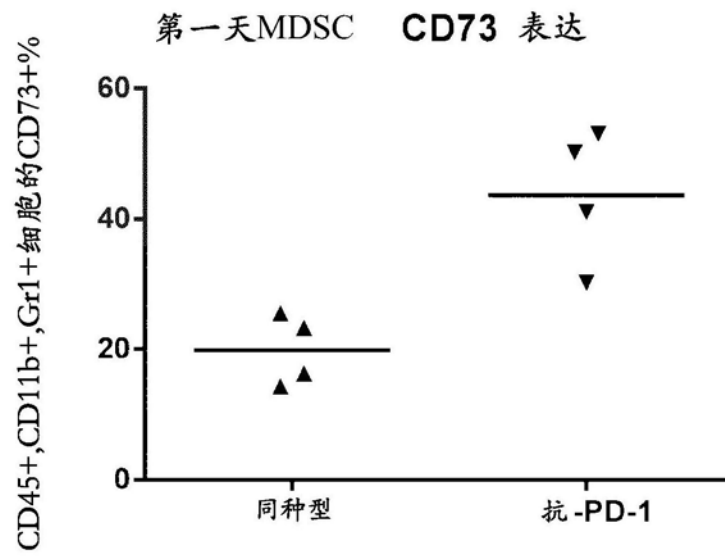


图10

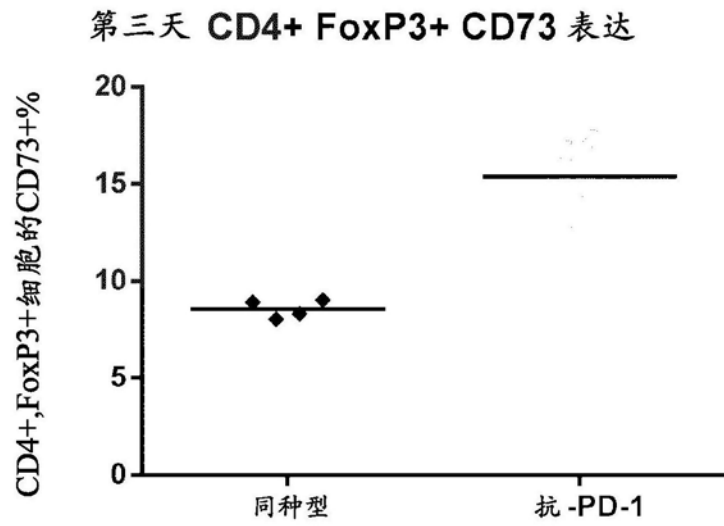


图11

用抗-PD-L1和MEDI9447的组合处理的小鼠黑色素瘤肿瘤

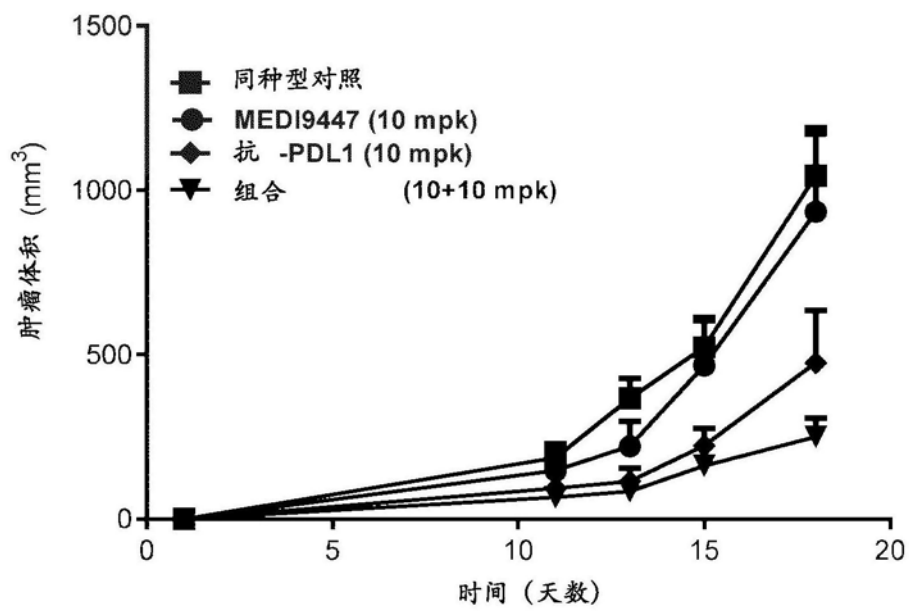


图12

用抗-PD-L1和MEDI9447的组合处理的小鼠淋巴瘤

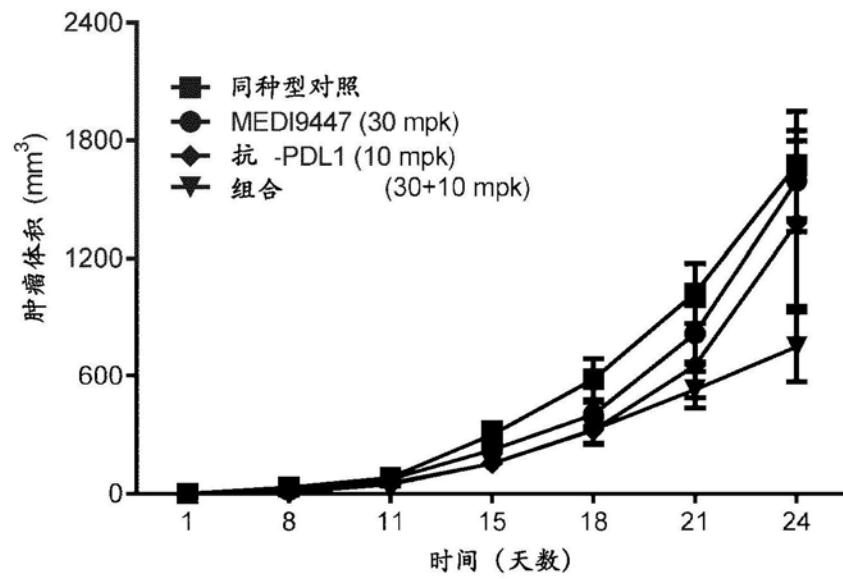


图13

第一天淋巴结B细胞

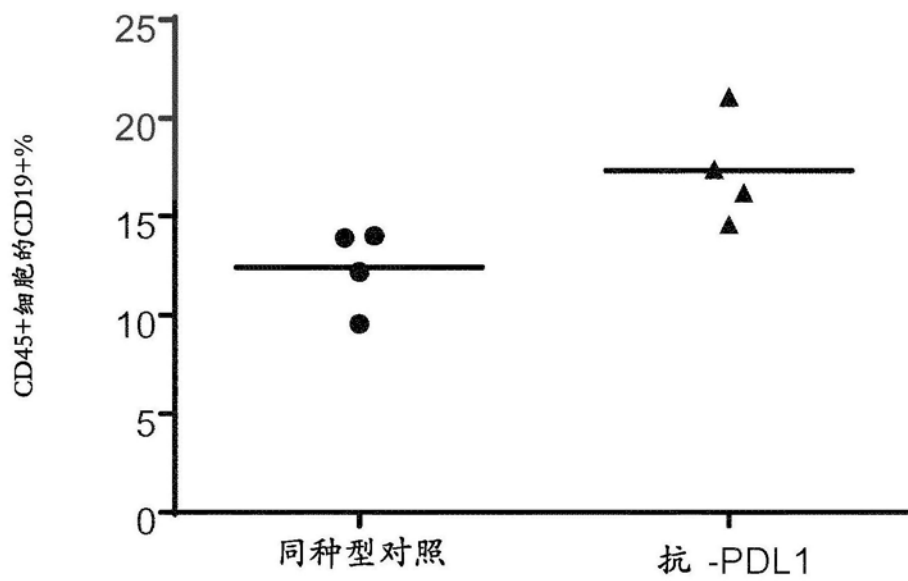


图14

第3天肿瘤CD4+FoxP3+ 细胞

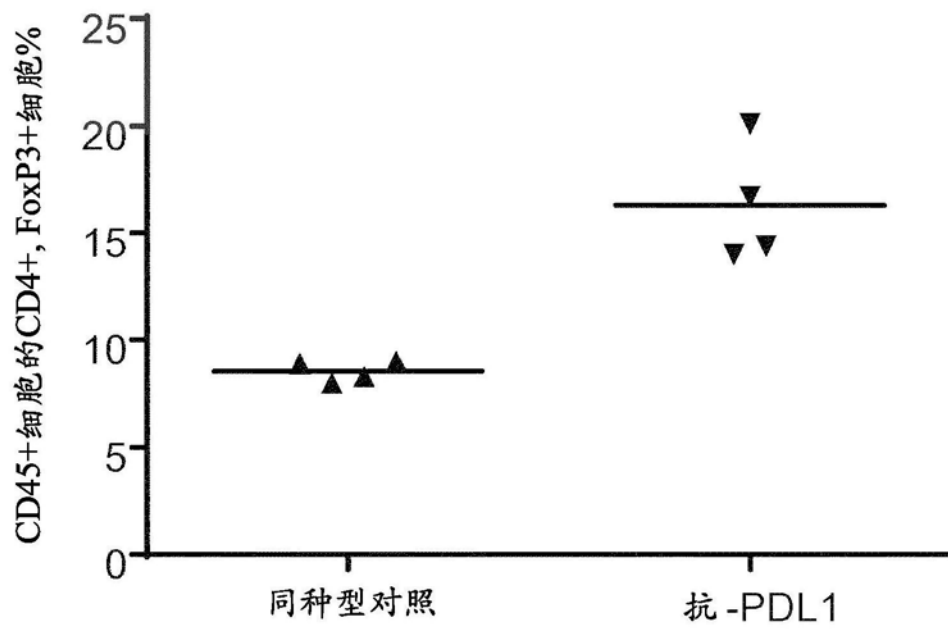


图15

CT26肿瘤中CD4+FoxP3+Treg上的CD73表达。

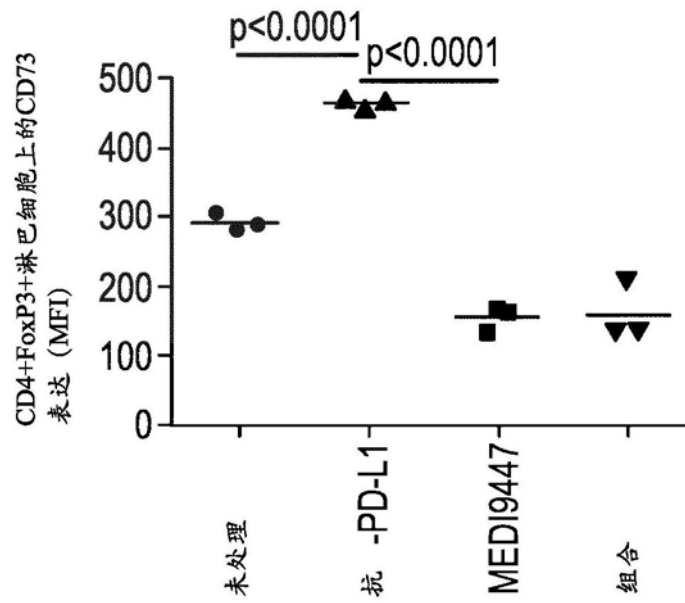


图16A

CT26肿瘤中CD8+T细胞上的CD73表达

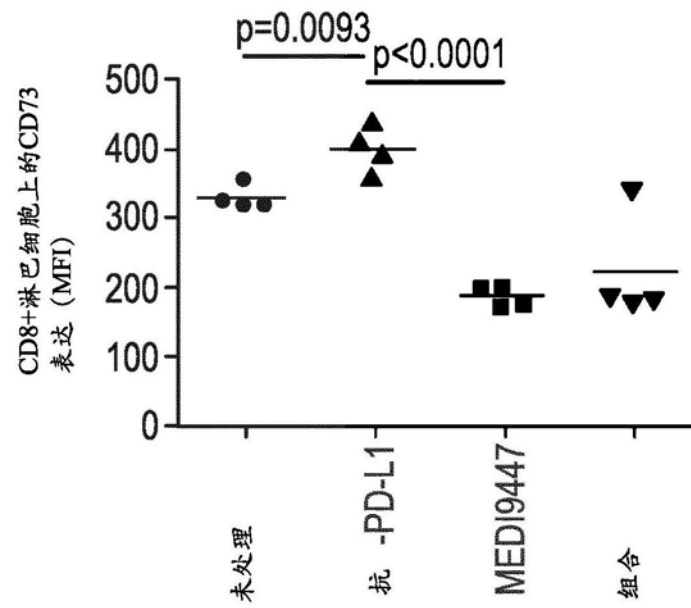


图16B

CT26肿瘤细胞上的CD73酶活性

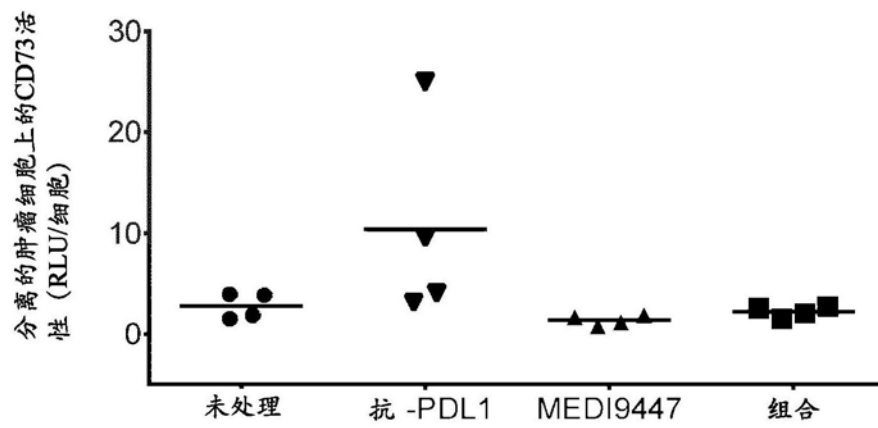


图17A

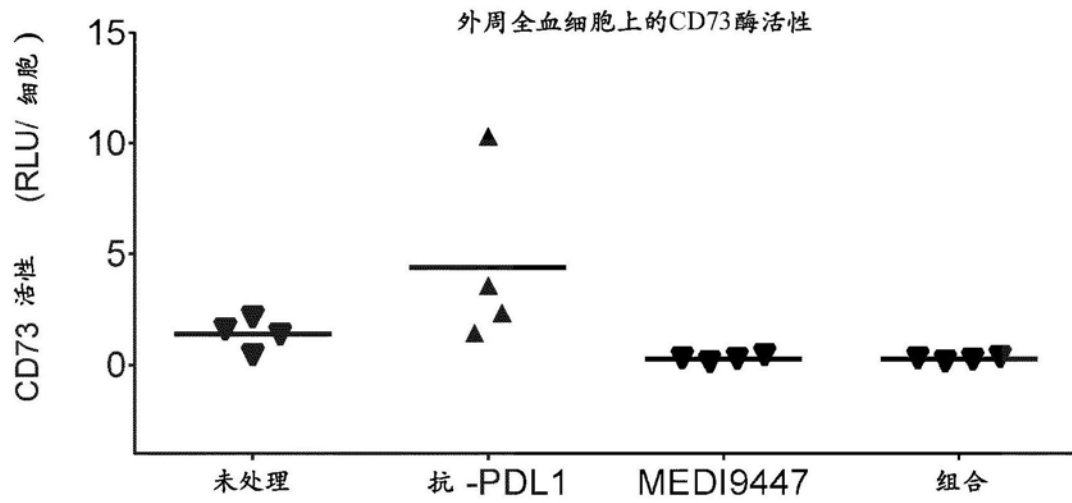


图17B

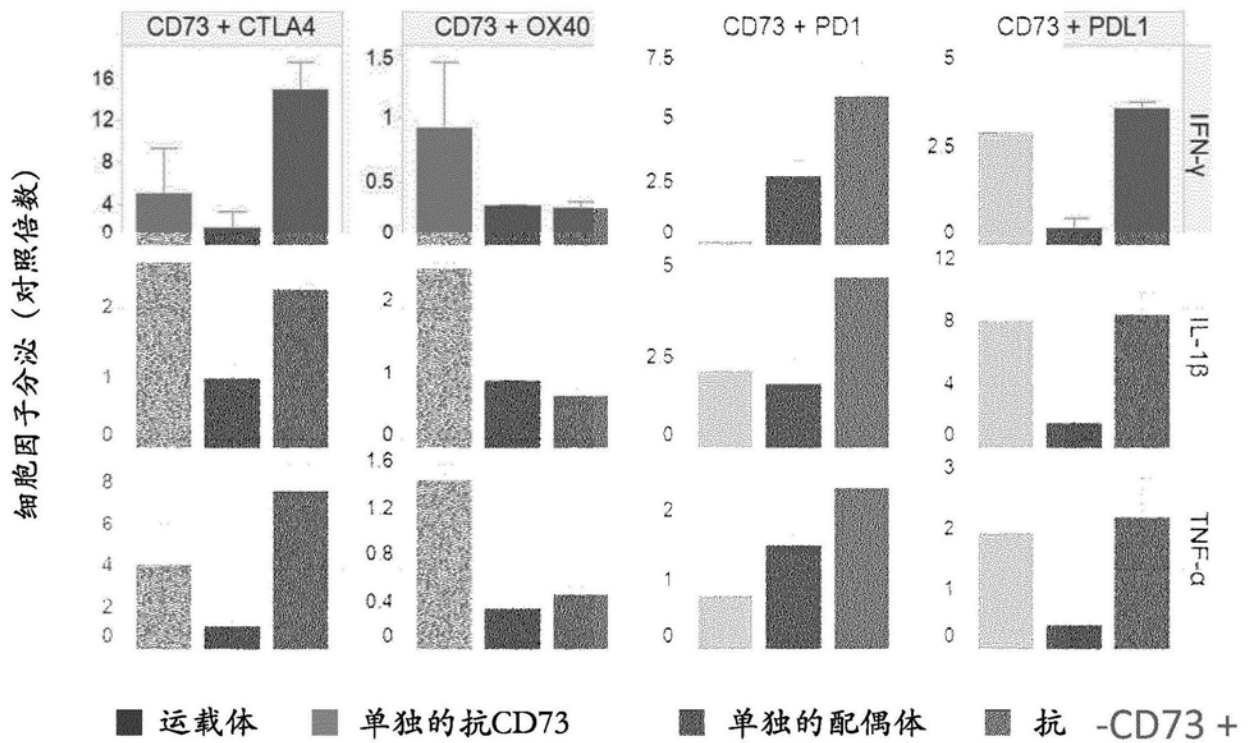


图18

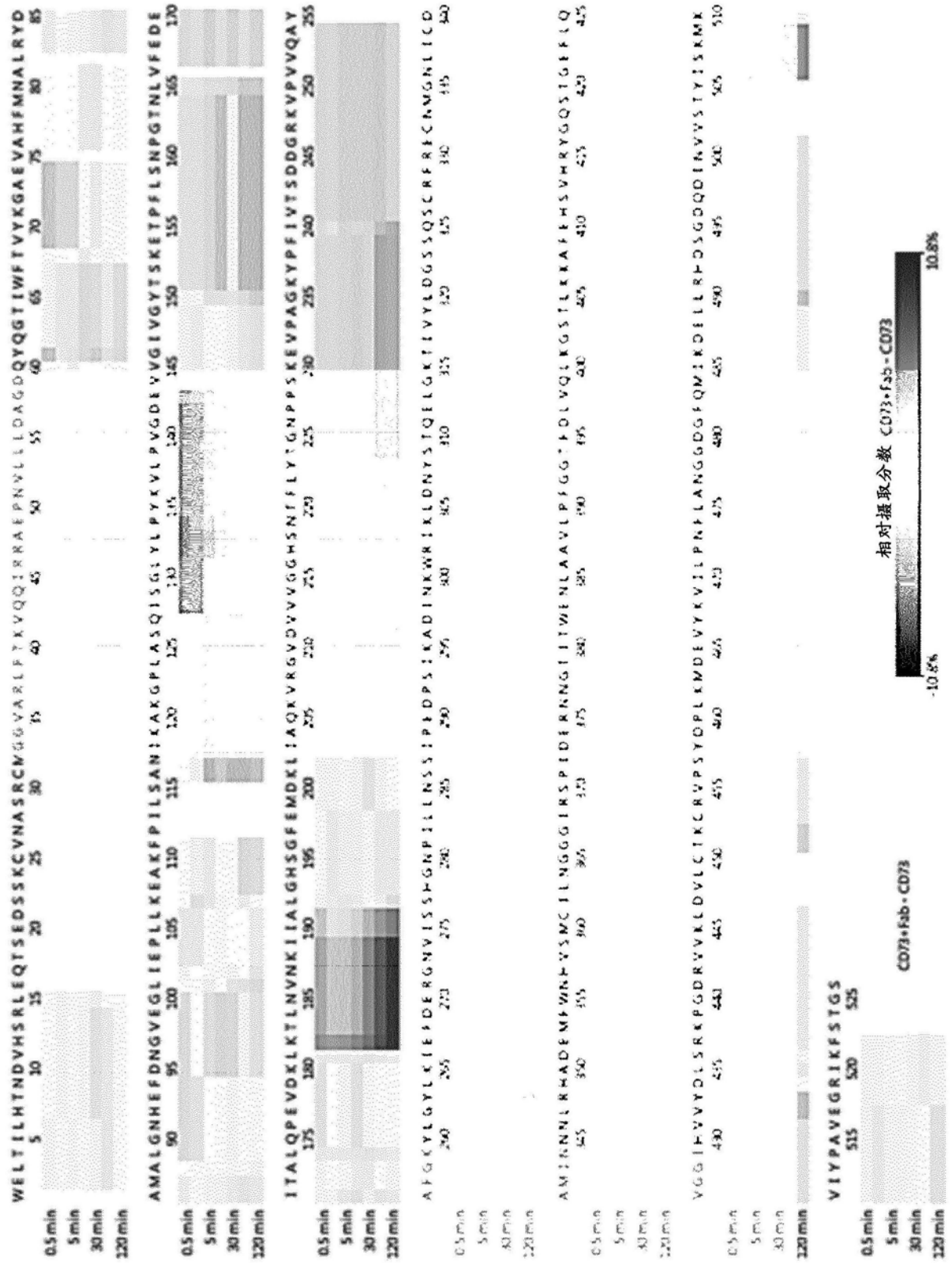


图19A

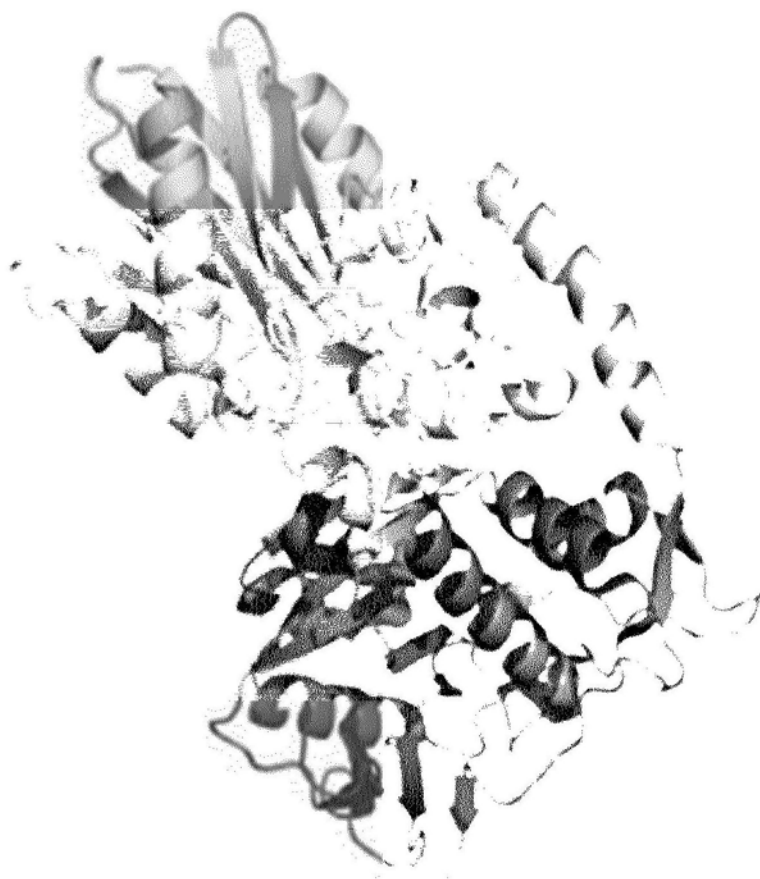


图19B

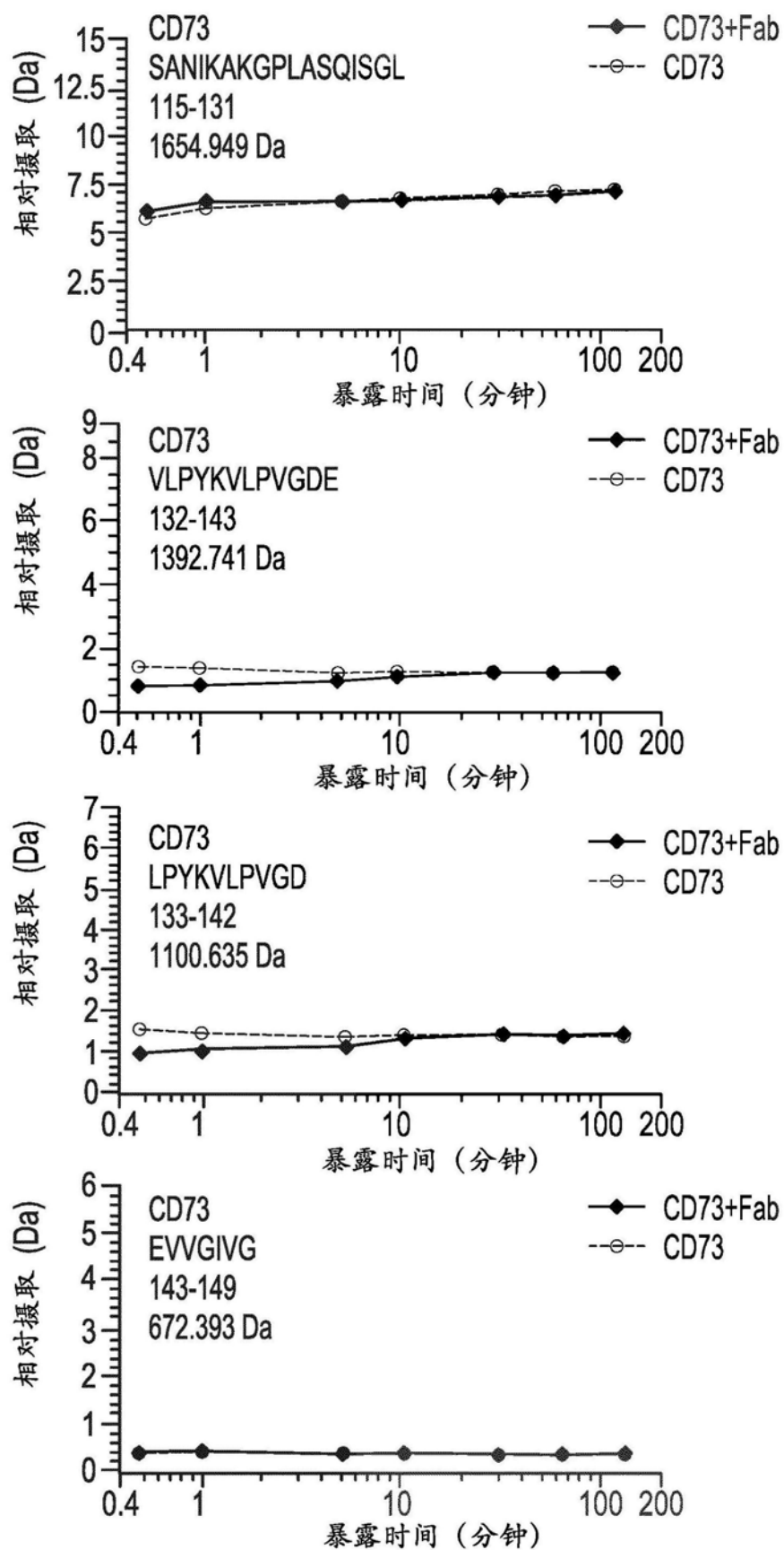


图20A

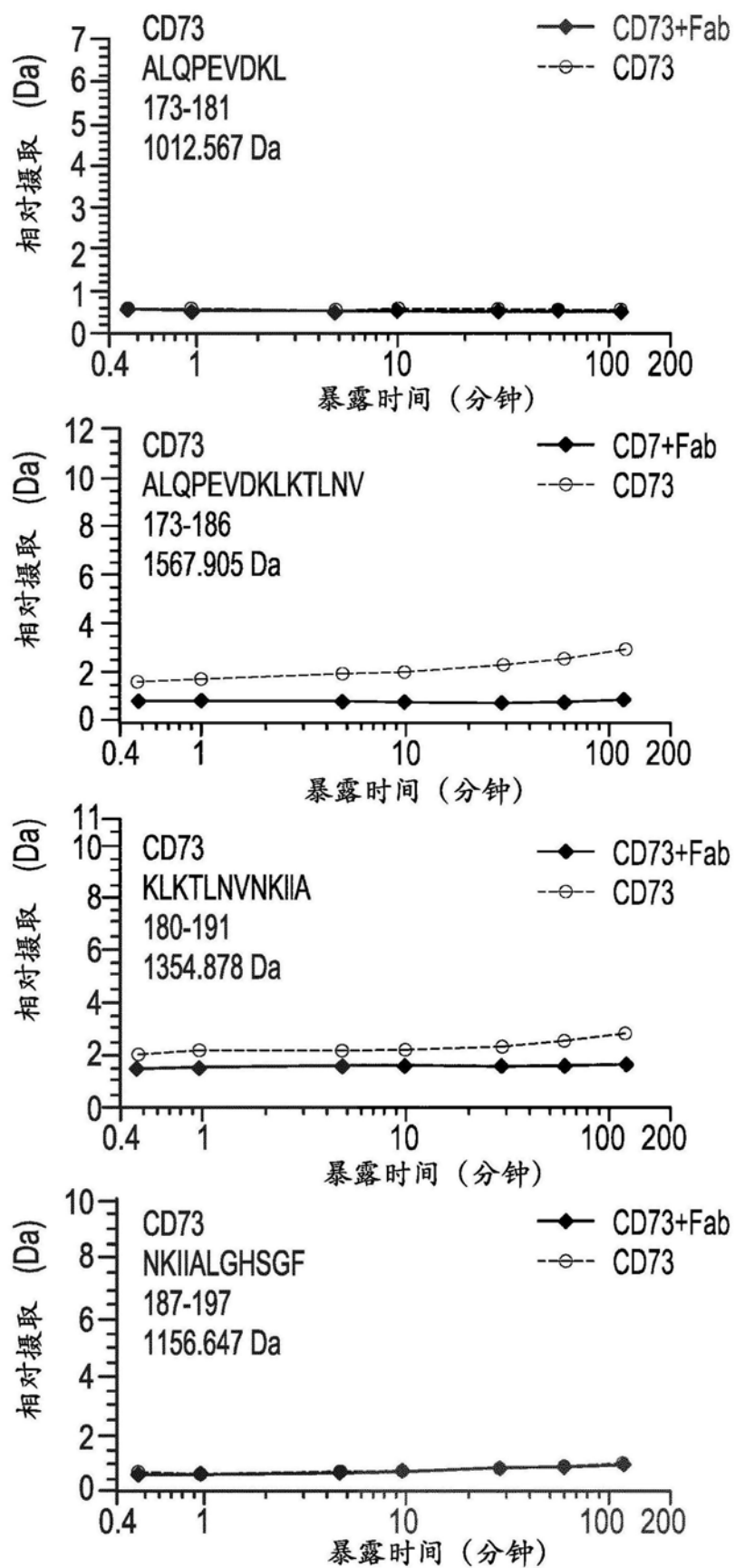


图20B

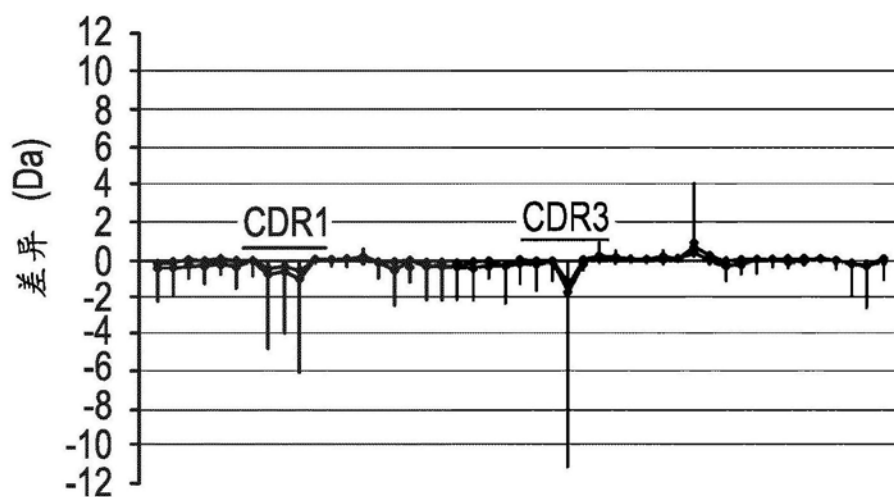


图20C

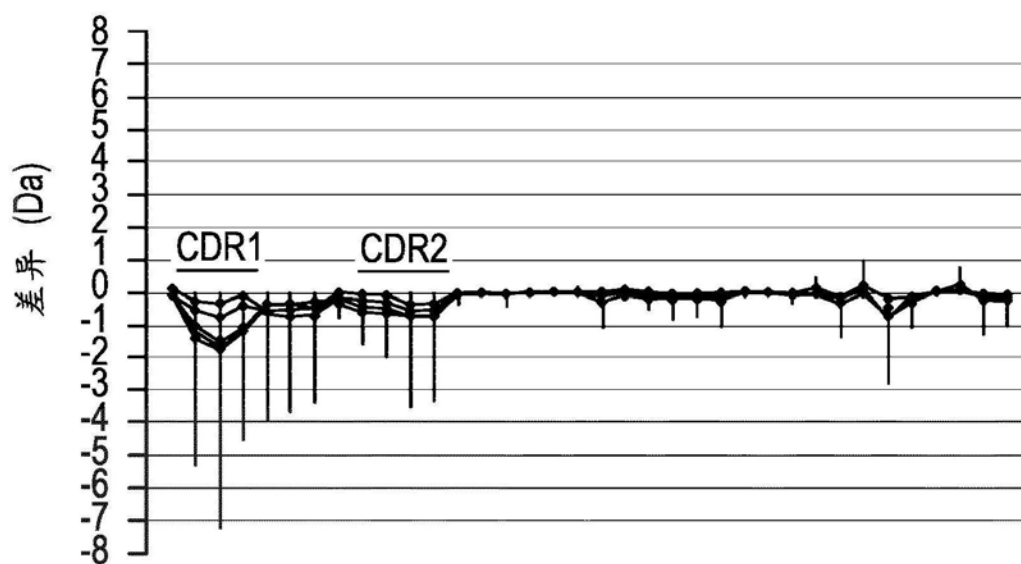


图20D

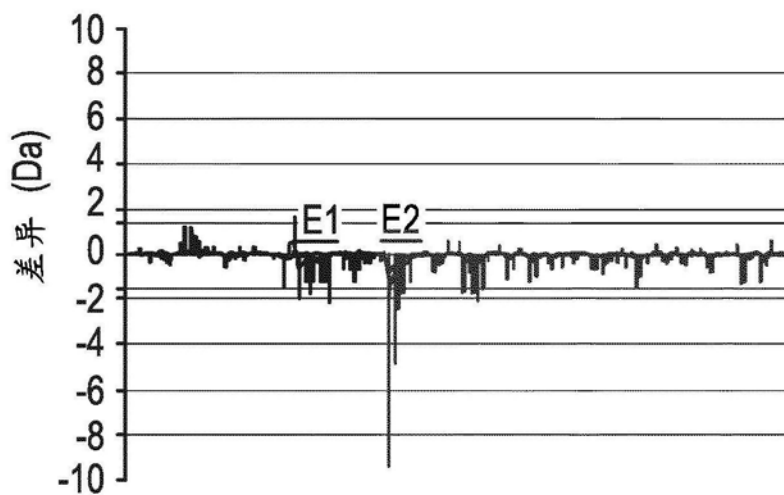


图20E

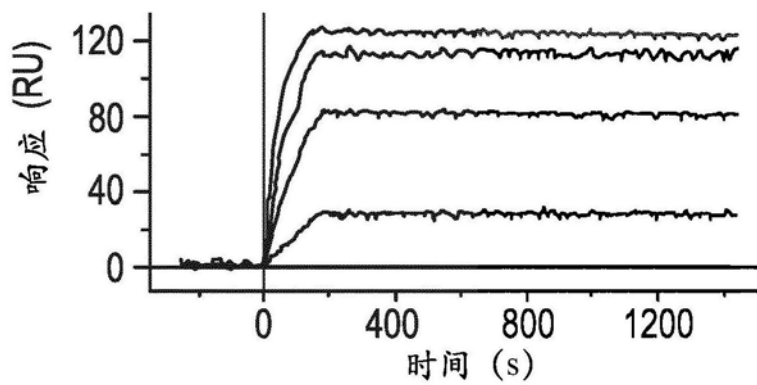


图21A

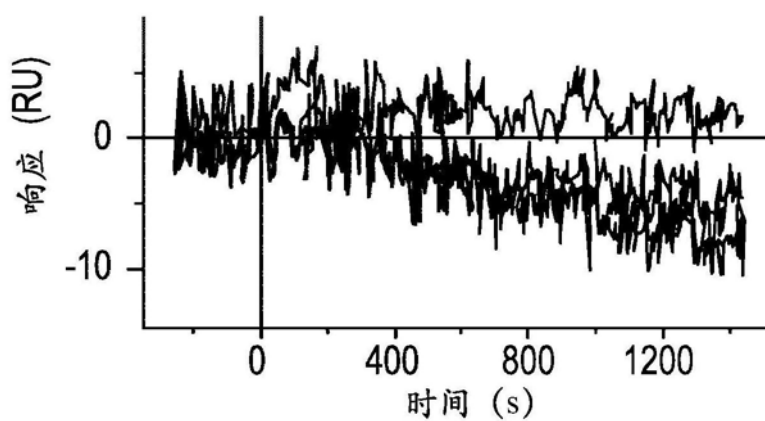


图21B

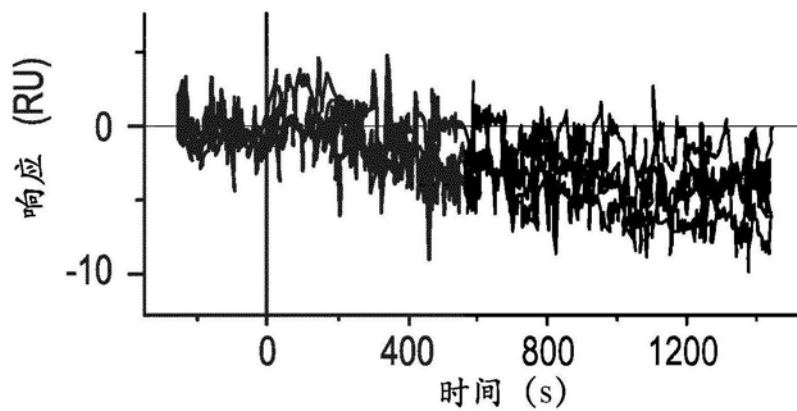


图21C

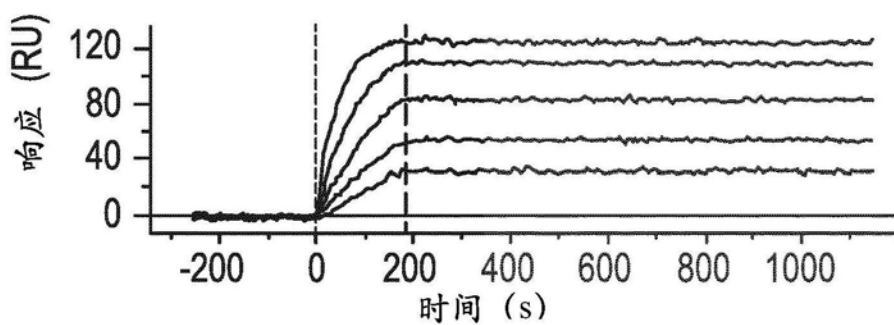


图21D

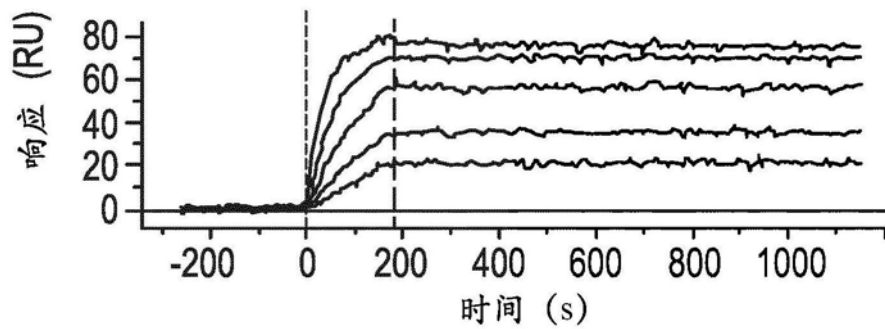


图21E

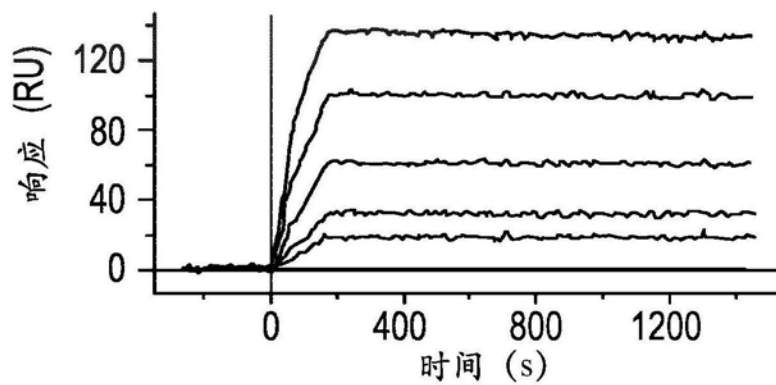


图21F

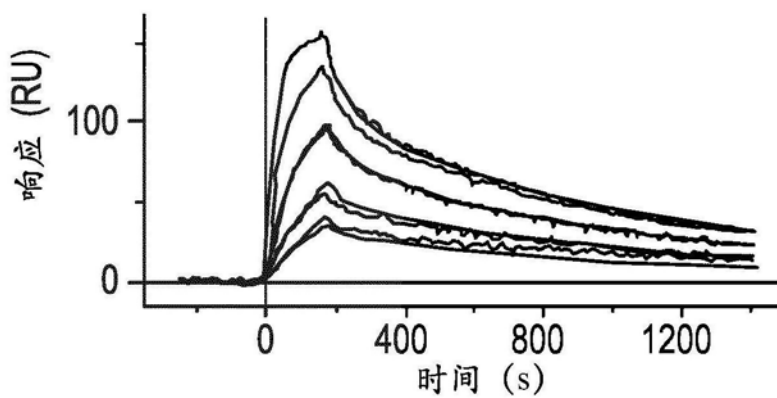


图21G

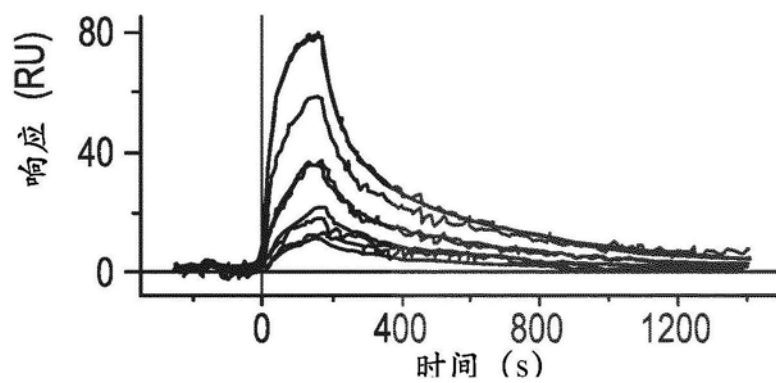


图21H

图例		 HDX-MX鉴定的界面	 AMP结合/催化位点
		 金属结合/催化位点残基	 过渡态稳定剂
		 N-糖基化位点	
N-端区1a			
位置		1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16	
人		W E L T I L H T N  V  S R L E	
鸡		L R L R L L H T N  V  A H V E	
N-端区1a			
位置		17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31	
人		Q T S E D S S K C V  A S R - C	
鸡		A R G - - - - C A E G P R G C	
N-端区1a			
位置		32 33 34	
人		M G G	
鸡		F G G	
N-端区1b			
位置		35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50	
人		V A R L F T K V Q Q I R R A E P	
鸡		V A R R A A R V A A E R A A Q R	
N-端区1b			
位置		51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66	
人		N V L L L D A G  Q Y Q G T I W	
鸡		N V L L L D A G  Q Y Q G S V W	
N-端区1b			
位置		67 68 69 70 71	
人		F T V Y K	
鸡		F S R F K	
N-端区2a			
位置		72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87	
人		G A E V A H F M N A L R Y D A M	
鸡		G Q E A V H F M N L L R Y D A M	
N-端区2a			
位置		88 89 90 91	
人		A L G  N	
鸡		A L G  N	

图22

N-端区	2b																	
位置		92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	
人		H	E	F	D	N	G	V	E	G	L		E	F	L	L	K	
鸡		H	E	F	D	E	G	V		G	L		F	F	L	L	R	
N-端区		2b																
位置		108	109	110	111	112	113											
人		E	A	K	F	P	I											
鸡		N	A	S	F	A	I											
N-端区		2c																
位置		114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	
人		L	S	A	N	I	K	A	K	G	F	L	A	S	Q	I	S	
鸡		L	S	A	N	I	K	G	K		F	L	L		Q	K	M	
N-端区		2c																
位置		130	131	132	133	134												
人		G	L	Y	L	P												
鸡		K	Y	V	H	P												
N-端区		2d																
位置		135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	
人		Y	K	V	L	P	V	G	D	E	V	V	G	I	V	G	Y	
鸡		Y	K	I	L	R	I	D	D	E			G	I	V	G	Y	
N-端区		2d																
位置		151	152															
人		T	S															
鸡		T	T															
N-端区		3a																
位置		153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	
人		K	E	T	P	F	L	S	N	P	G	T	N	L	V	F	E	
鸡		Q	E	T	S	F	L	S	V	P	G	D	D	L		F	E	
N-端区		3a																
位置		169	170															
人		D	E															
鸡		D	E															
N-端区		3b																
位置		171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	
人		I	T	A	L	Q	P	E	V	D	K	L	K	T	L	N	V	
鸡		I	E	A	L	Q	V	G	V	D	K	L	T	A	T	G	V	

图22续

N-端区	3b																
位置		187	188														
人		N	K														
鸡		N	K														
N-端区	3c																
位置		189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204
人		I	I	A	L	G	H	S	G	F	E	M	D	K	L	I	A
鸡		I	I	A	L	G	H	S	G	F			D			I	A
N-端区	3c																
位置		205	206														
人		Q	K														
鸡		Q	K														
N-端区	3d																
位置		207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222
人		V	R	G	V	D	V	V	V	G	G	H	S	N	T	F	L
鸡		V	R	G	V	D	V	V		G	G	H		N	T	F	L
N-端区	3d																
位置		223	224														
人		Y	T														
鸡		Y	T														
N-端区	4																
位置		225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
人		G	N	P	P	S	K	E	V	F	A	G	K	Y	P	F	I
鸡		G	I	P	P	S	I	E	V	F	A	G	K	Y	P	F	I
N-端区	4																
位置		241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256
人		V	T	S	D	D	G	R	K	V	F	V	V	Q	A	Y	A
鸡		V	D	S	D	D	G	R	K	V	F	V	V	Q	A	Y	A
N-端区	4																
位置		257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272
人		F	G	K	Y	L	G	Y	L	K		E	F	D	E	R	G
鸡		Y	G	K	Y	L	G	Y	L	K			F	D	E	R	G
N-端区	4																
位置		273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288
人		N	V	I	S	S	H	G	N	F		L	L	N	S	S	I
鸡		N	V	V	E	A	V	G	N	F		L	L	Q	S	S	V

图22续

N-端区		4															
位置		289	290	291													
人		P	E	D													
鸡		P	E	D													
α螺旋接头																	
位置		292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307
人		P	S	I	K	A	D		N	K	W	R		K	L	D	N
鸡		E	Q	I	K	E	S	S	I	K	W	R		S	L	S	N
α螺旋接头																	
位置		308	309	310													
人		Y	S	T													
鸡		Y	S	-													
C-端结构域 1																	
位置		311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326
人		Q	E	L	G	K	T		V	Y	L	D	G	S	S	Q	S
鸡		K	E	I	G	I	T		V	Y	L	-	G		S	-	A
C-端结构域 1																	
位置		327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342
人		C	R	F	R	E	C	N	M	G	N	L		C	D	A	M
鸡		C	R	F	D	E	C	N	M	G	N	L		C	D	A	M
C-端结构域 1																	
位置		343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358
人		I	N	N	N	L	R	H	A	D	E	M	F	W	N	H	V
鸡		L	Y	E	N	V	R	N	-	D	-	-	N	W	N	H	V
C-端结构域 1																	
位置		359	360	361	362	363	364										
人		S	M	C	I	L	N										
鸡		S	L	C	I	L	N										
C-端结构域 2																	
位置		365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376		377	378	379
人		G	G	G	I	R	S	F		D	E	R	N		N	G	T
鸡		G	G	G	I	R	S			D	E	R	N		N	G	S
C-端结构域 2																	
位置		380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395
人		I	T	W	E	N	L	A	A	V	L	F	F	G	G	T	F
鸡		I	T	M	E	D	L	-	-	V	L	F	F	G	G	L	F

图22续

C-端结构域 2

位置	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411
人	D	L	V	Q	L	K	G	S	T	L	K	K	A	F	E	H
鸡	D	L	V	T	L	K	G	S	T	L	K	S	A	F	E	H

C-端结构域 2

位置	412	413	414	415	416	417
人	S	V	H	R	Y	G
鸡	S	V	R	R	Y	G

C-端结构域 3

位置	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433
人	Q	S	T	G	E	F	L	Q	V	G	G		H	V	V	Y
鸡	R	G	T	G	E	L	L	Q	V	G	G		H	V	V	Y

C-端结构域 3

位置	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449
人	D	L	S	R	K	P	G	D	R	V	V	K	L	D	V	L
鸡	D	L	S	R	A	P	G		R	V	V	L			V	L

C-端结构域 3

位置	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465
人	C	T	K	C	R	V	F	S	V	D	F	L	K	M	D	E
鸡	C	T	A	C	R	V	F	L	V		F	L	K	M	D	E

C-端结构域 3

位置	466	467	468	469	470	471
人	V	Y	K	V	I	L
鸡	V	Y	R	V	I	L

C-端结构域 4

位置	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487
人	P	N	F	L	A	N	G	G	D	G	F	Q	M	I	K	D
鸡	P	S	Y	M	L		G	G	D	G		L	M	L	R	D

C-端结构域 4

位置	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503
人	E	L	L	R	H	D	S	G	D	Q	D		N	V	V	S
鸡	N	H	I	T	Y	L	K	G			D		L	V	V	S

C-端结构域 4

位置	504	505	506	507	508
人	T	Y	I	S	K
鸡	R	Y	L	D	R

C-端结构域 4

位置	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523
人	M	K	V	I	Y	P	A	V	E	G	R		K	F	S
鸡	M	K	R	V	Y	P	A	V	E	G	R	L	K	F	S

图22续

CD73 C 构建体	KO转换/突变位置	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)
野生型人 CD73	WT huCD73	4.20E-12	4.63E+06	1.94E-05
KO_ N端+C端	KO_1-291+311-523		无结合	
KO_ N端	KO_1-291		无结合	
KO_ 接头	KO_292-310	4.14E-12	5.57E+06	2.31E-05
KO_ C端	KO_311-523	1.70E-12	4.75E+06	8.10E-06
HDX_E1	KO_132-143	9.90E-12	2.15E+06	2.12E-05
HDX_E2	KO_182-187*	2.83E-09	5.73E+06	1.62E-02
HDX_E1+E2	KO_132-143+182-187*	4.43E-09	4.76E+06	2.11E-02
V144K	V144K	8.14E-11	1.13E+06	9.18E-05
K180A	K180A	4.35E-11	3.45E+06	1.54E-04
N185G	N185G*	2.69E-11	9.11E+06	2.45E-04
V144K+K180A	V144K+K180A	2.68E-09	1.58E+06	4.25E-03
V144K+N185G	V144K+N185G		无结合	
K180A+N185G	K180A+N185G		无结合	

* 源自于2:1拟合的动力学值 (参见方法)

图23

[illegible]

图24A

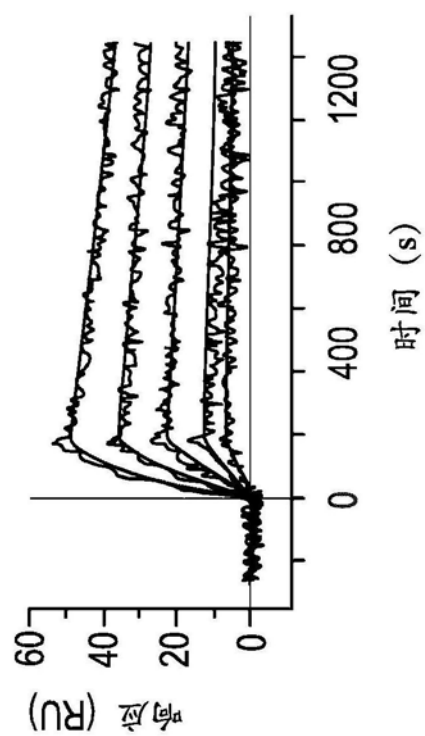


图24B

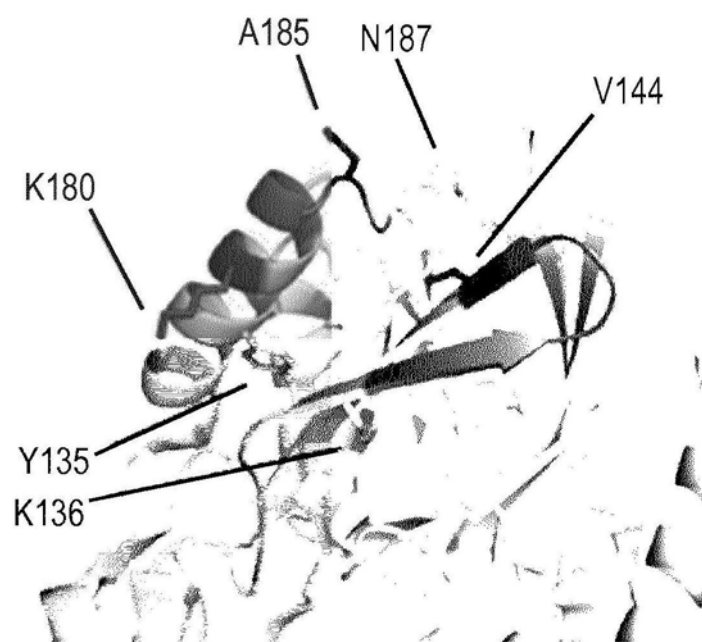


图24C

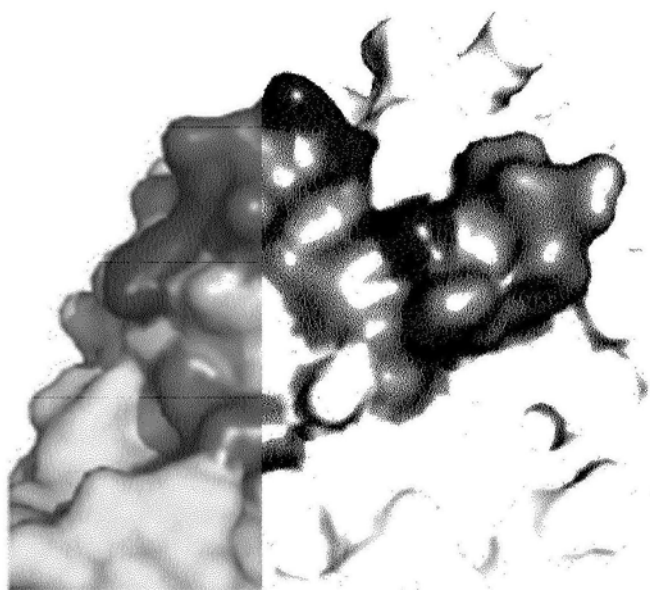


图24D

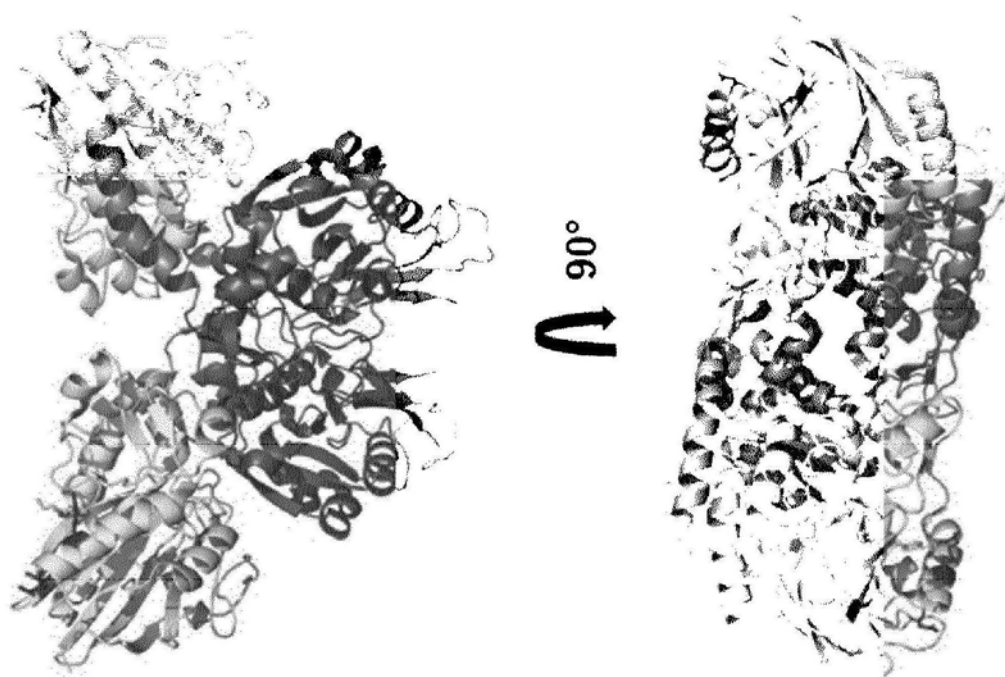


图24E

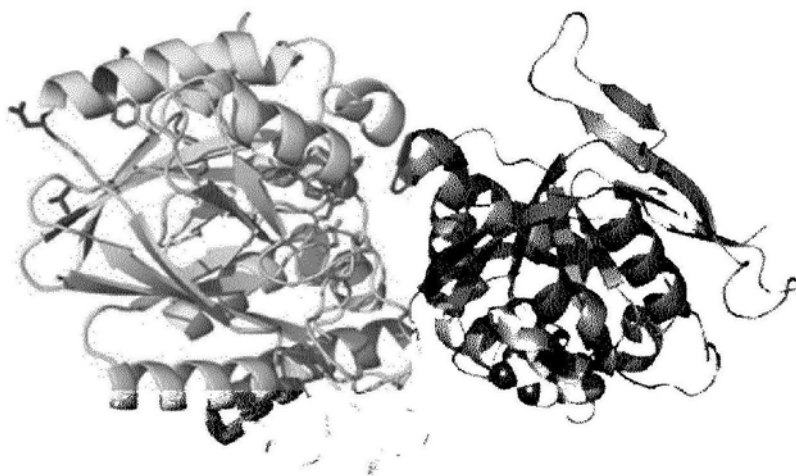


图24F

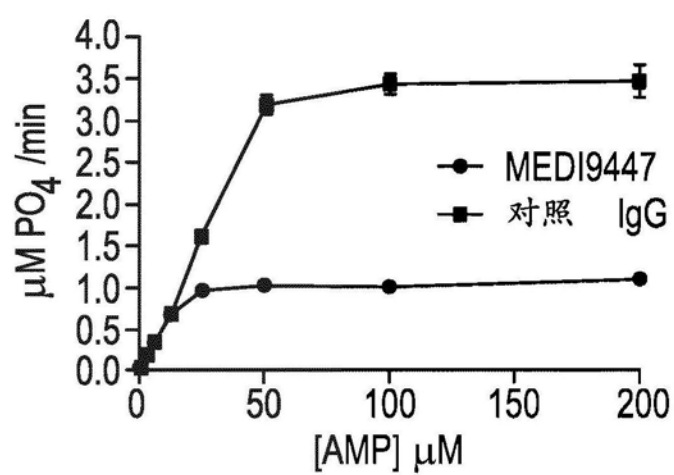


图25A

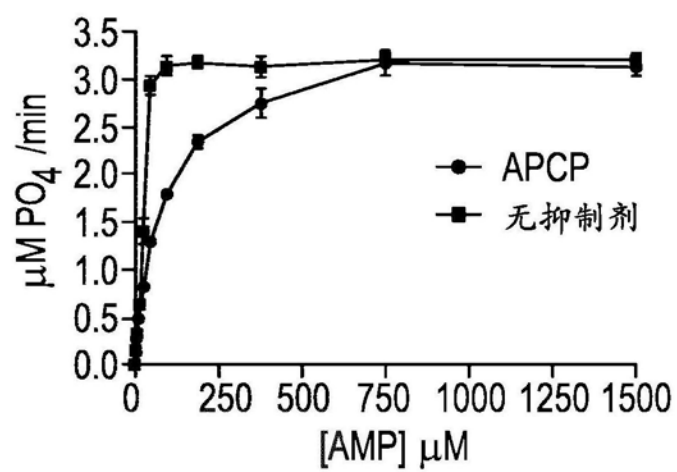


图25B

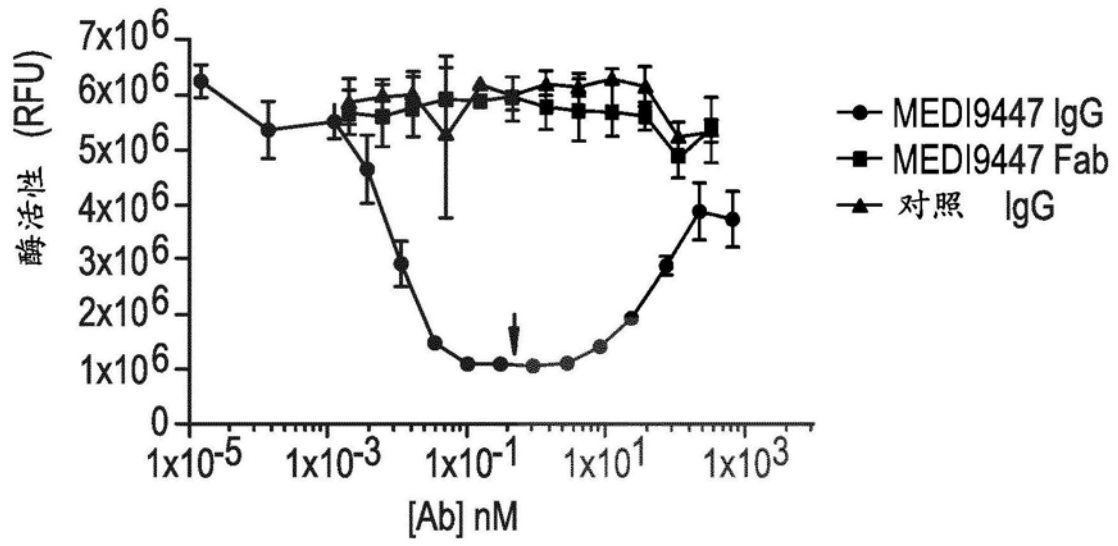


图25C

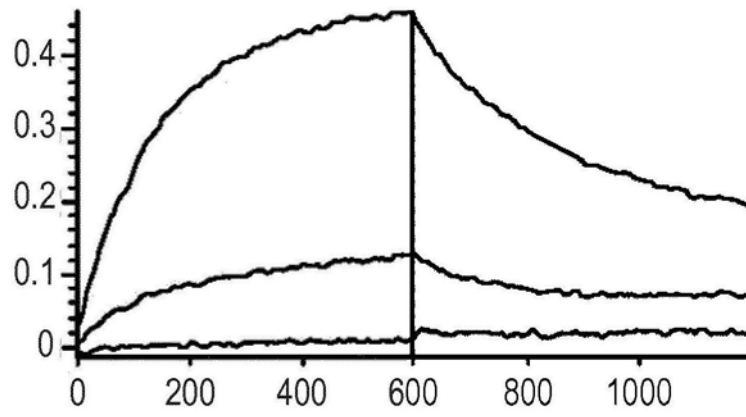


图26A

开放状态



闭合状态

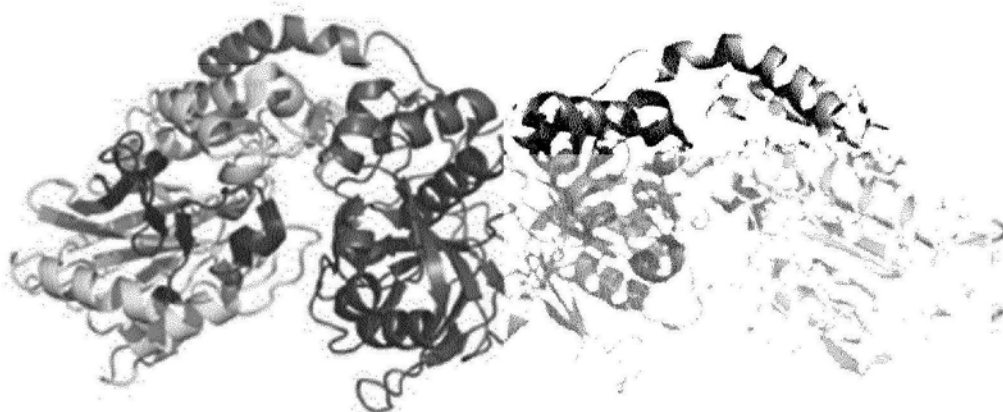


图26B

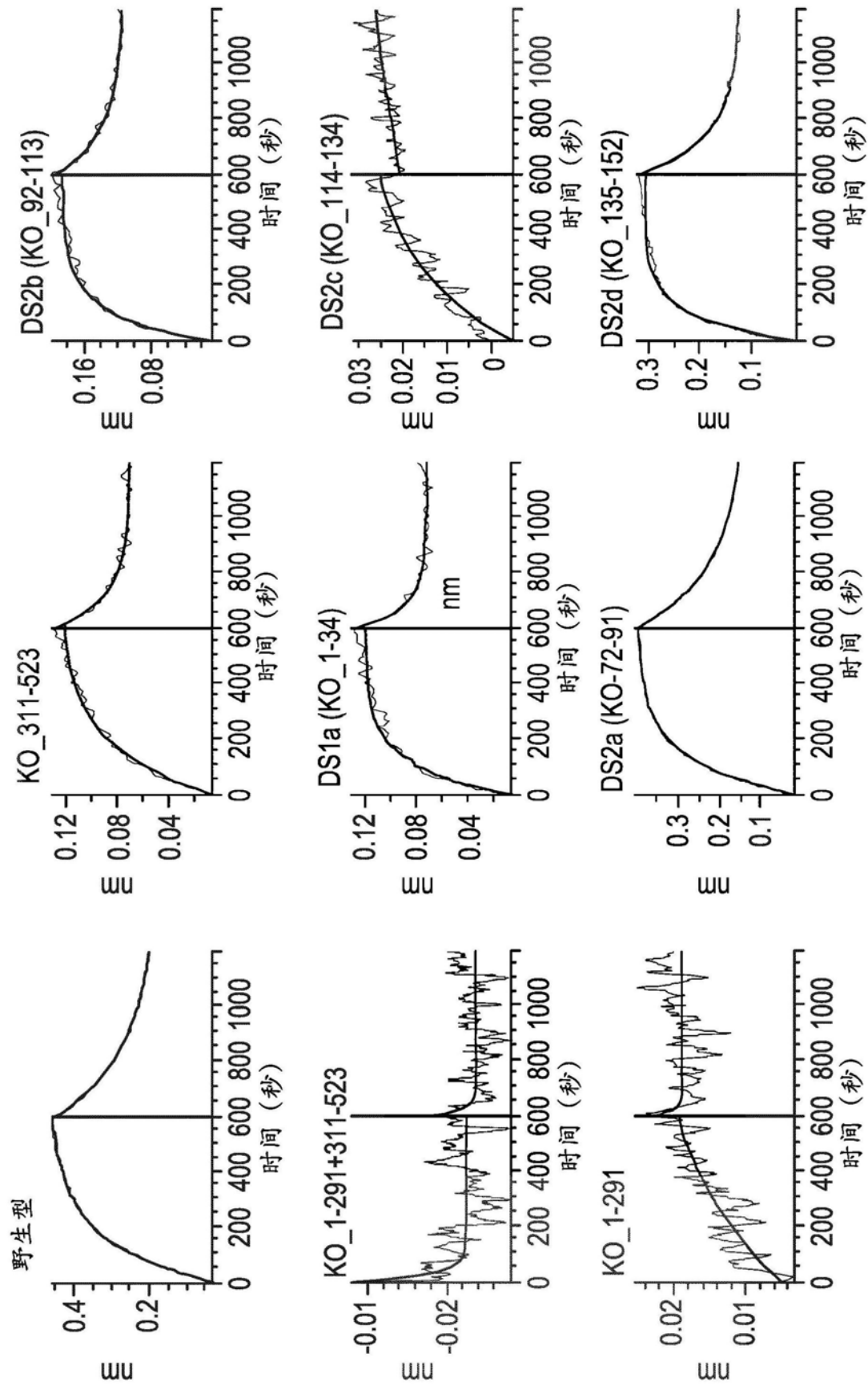


图26C

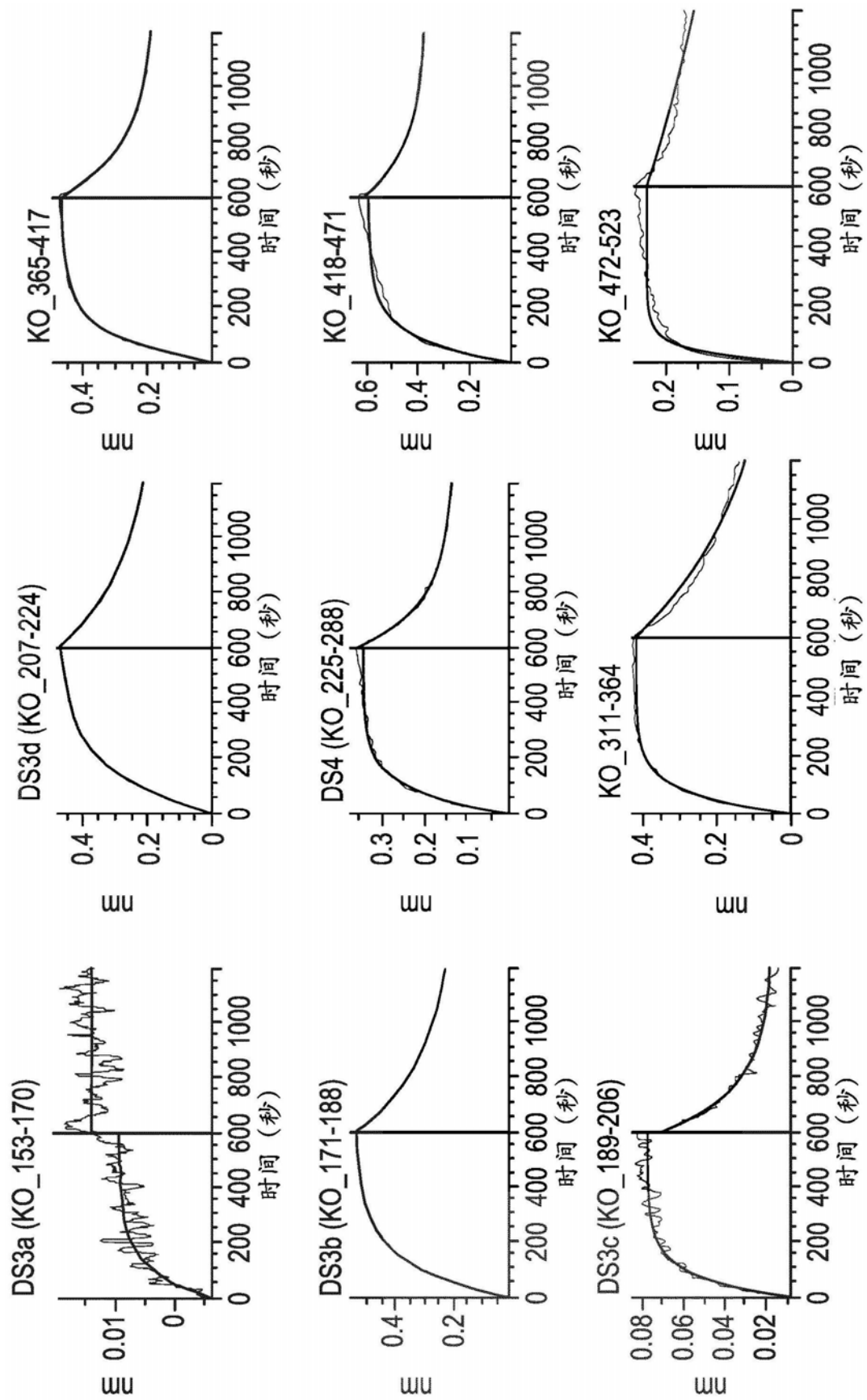


图26C续

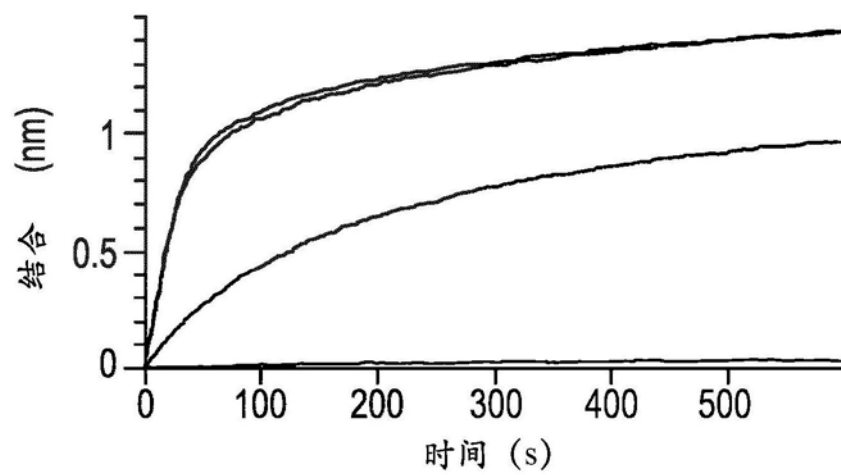


图27A

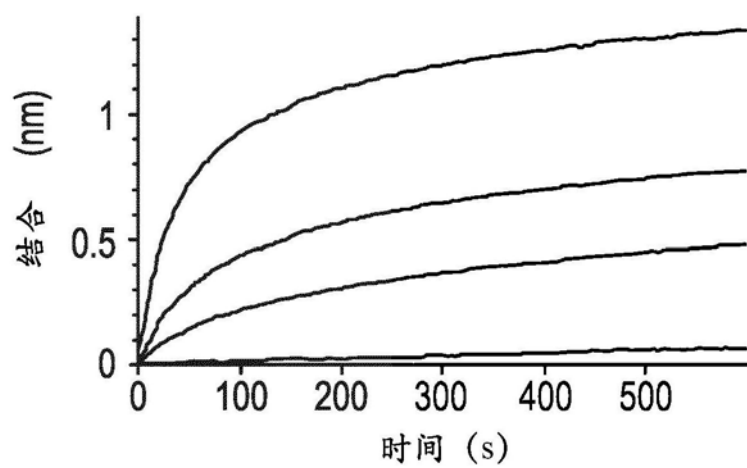


图27B



图27C

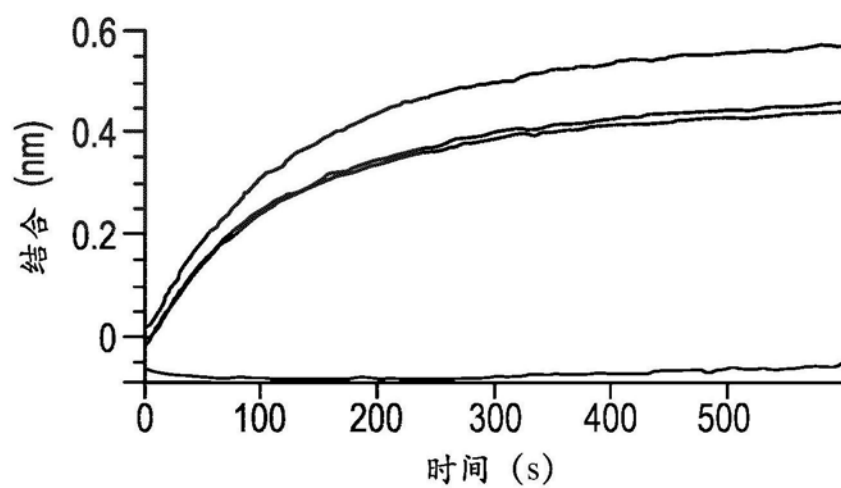


图28A

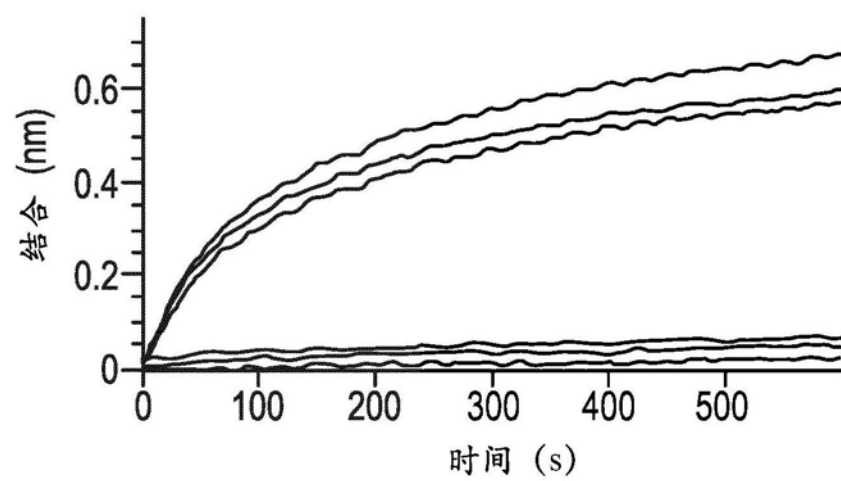


图28B

MED 9447: CD73 摩尔比			
1:0		0:1	
峰 1		峰 1	
SEC保留时间 (min)	8.6	8.6	
Mw (g/mol)	1.454E+05(±0.092%)	1.248E5 (±0.090%)	
多分散性 (Mw/Mn)	1.001 (±0.130%)	1.002 (±0.126%)	

1:1			
峰 1		峰 2	峰 3
SEC保留时间 (min)	5.7	6.2	8.5
Mw (g/mol)	1.736E+06 (±0.105%)	6.643E+05(±0.244%)	2.201E+05 (±0.869%)
多分散性 (Mw/Mn)	1.029 (±0.147%)	1.004 (±0.342%)	1.001 (±1.255%)

0.5:1			
峰 1		峰 2	峰 3
SEC保留时间 (min)	5.7	6.4	8.6
Mw (g/mol)	1.336E+06 (±0.120%)	5.452E+05 (±0.094%)	1.357E+05 (±0.114%)
多分散性 (Mw/Mn)	1.029 (±0.169%)	1.004 (±0.132%)	1.001 (±0.161%)

0.1:1			
峰 1		峰 2	峰 3
SEC保留时间 (min)	5.7	6.4	8.6
Mw (g/mol)	1.230E+06 (±0.093%)	5.298E+05 (±0.066%)	1.268E5 (±0.084%)
多分散性 (Mw/Mn)	1.015 (±0.129%)	1.002 (±0.094%)	1.002 (±0.118%)

图29A

mAb B:CD73 摩尔比			
1:0		0:1	
峰 1		峰 1	
SEC保留时间 (min)	8.2	8.6	
Mw (g/mol)	1.485E+05(±0.099%)	1.248E5 (±0.090%)	
多分散性 (Mw/Mn)	1.002 (±0.140%)	1.002 (±0.126%)	

1:1			
峰 1		峰 2	
SEC保留时间 (min)	6.6	7.1	
Mw (g/mol)	3.802E+05 (±0.075%)	2.965E+05 (±0.108%)	
多分散性 (Mw/Mn)	1.0000 (±0.106%)	1.000 (±0.153%)	

0.5:1			
峰 1		峰 2	
SEC保留时间 (min)	7.2	8.5	
Mw (g/mol)	2.935E+05 (±0.112%)	1.290E+05 (±0.086%)	
多分散性 (Mw/Mn)	1.000 (±0.159%)	1.000 (±0.122%)	

0.1:1			
峰 1		峰 2	
SEC保留时间 (min)	7.3	8.6	
Mw (g/mol)	2.716E+05 (±0.071%)	1.258E+05 (±0.098%)	
多分散性 (Mw/Mn)	1.000 (±0.100%)	1.002 (±0.139%)	

图29A续

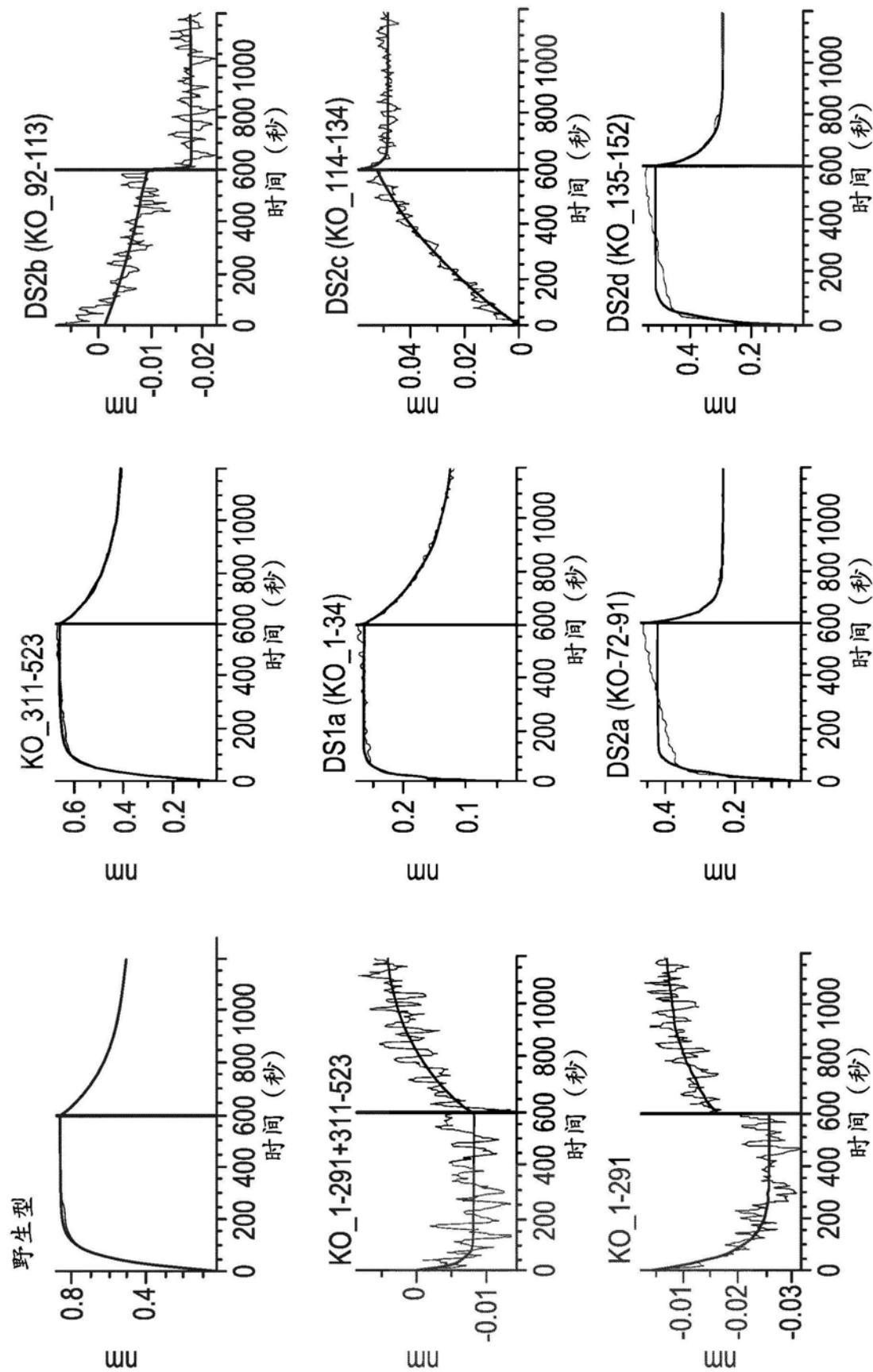


图29B

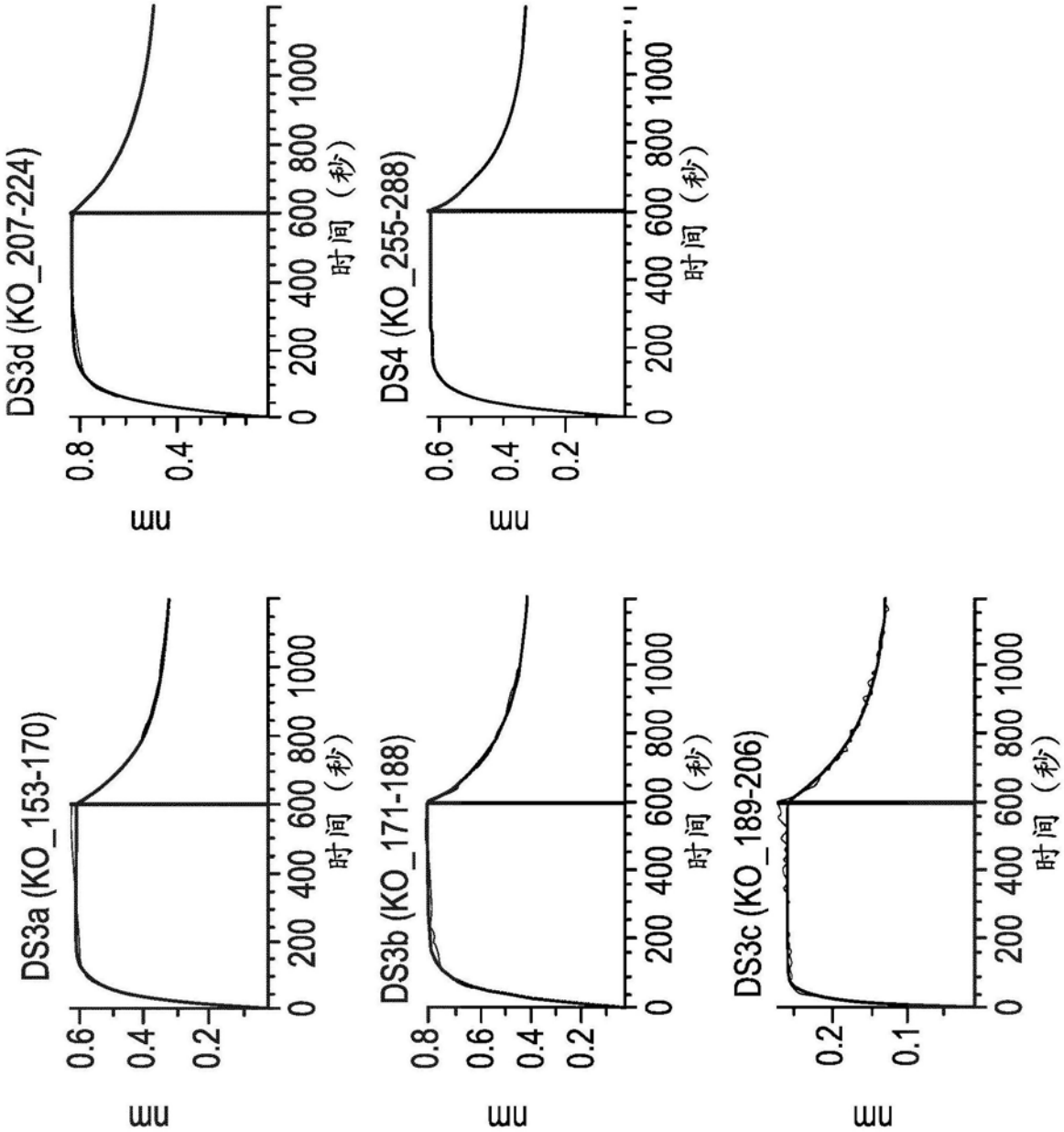


图29B续

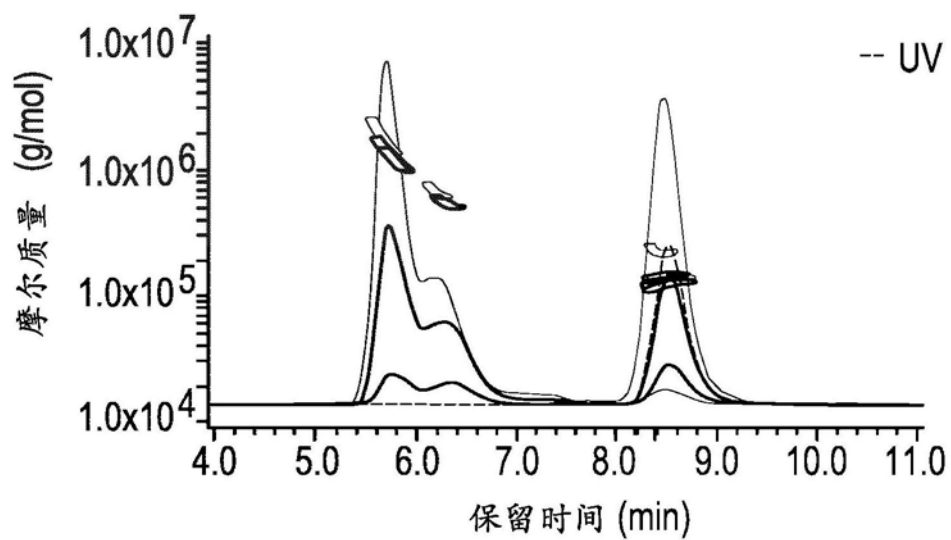


图30A

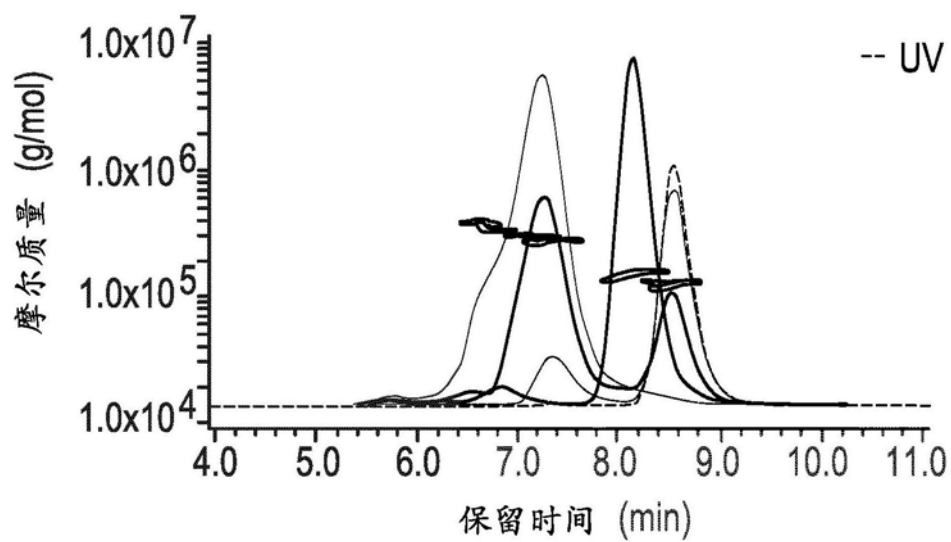


图30C

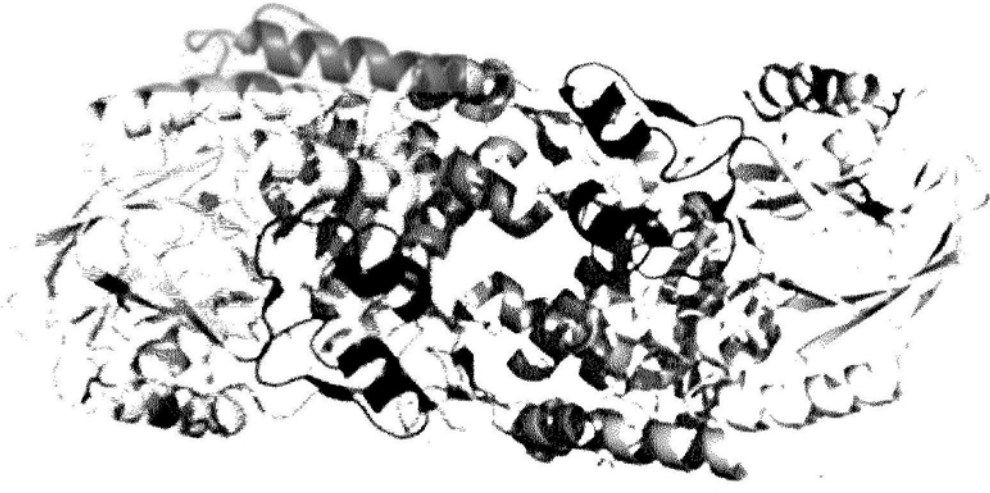


图30B

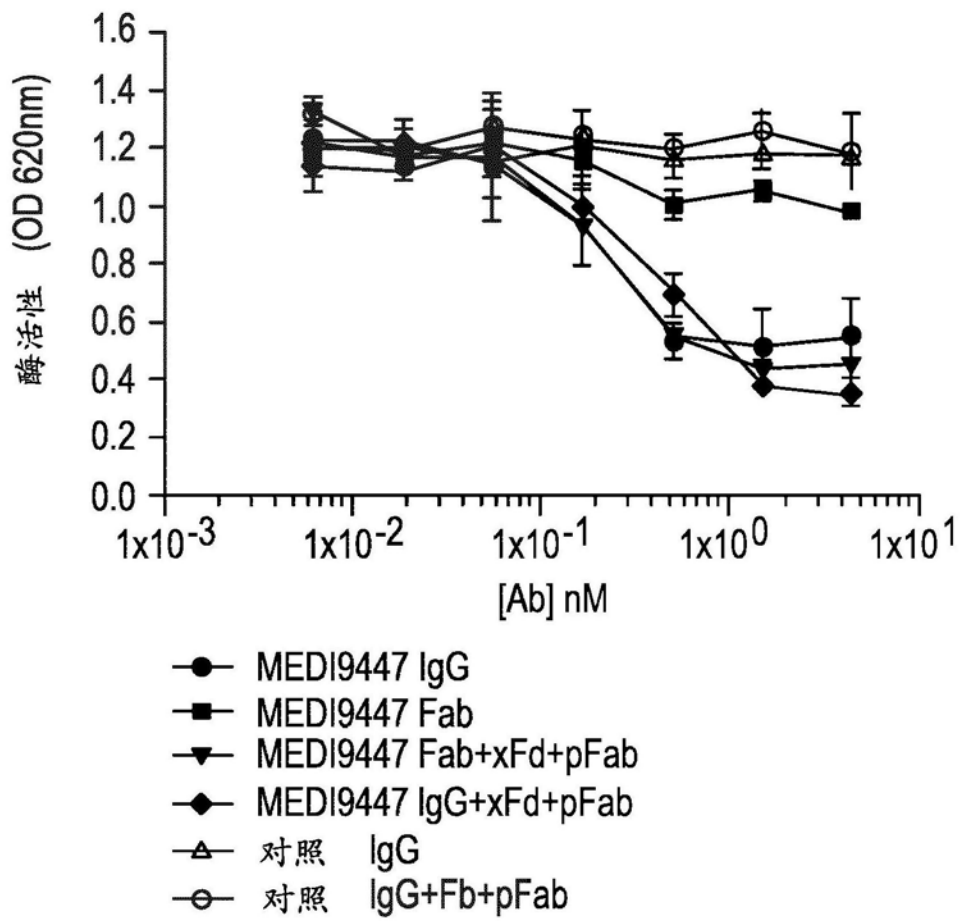


图31A



图31B

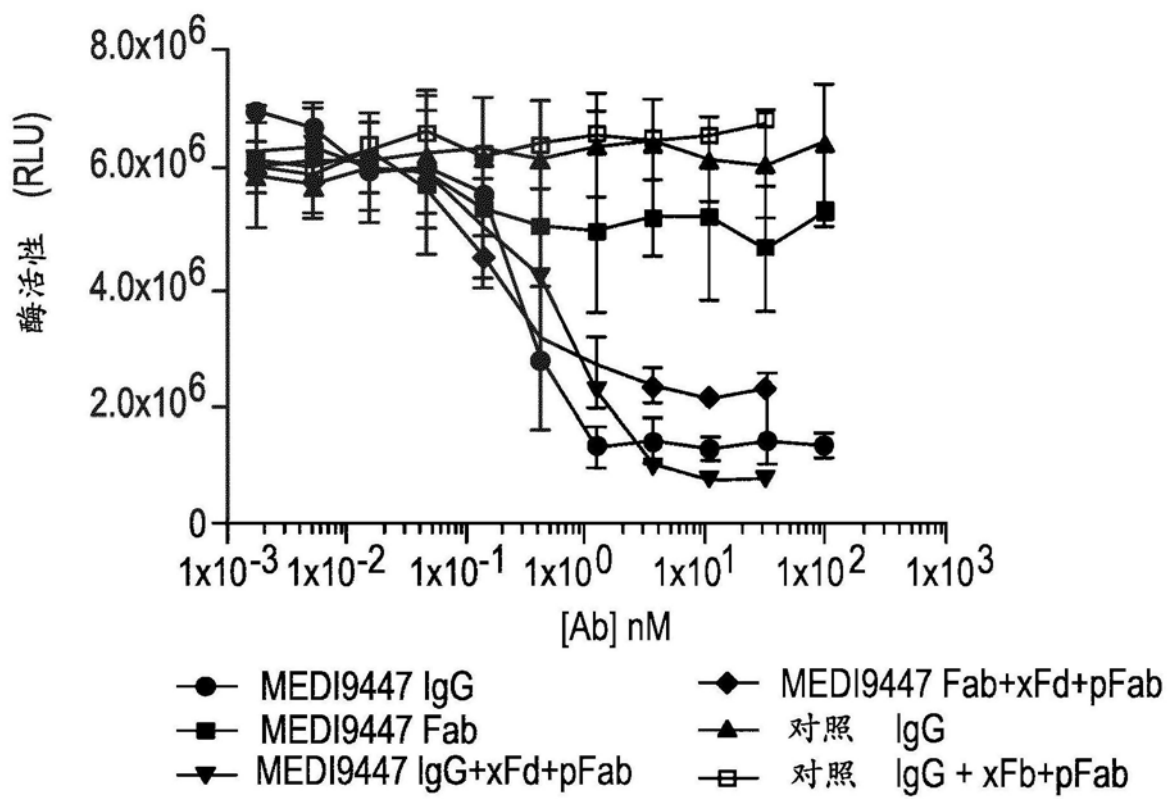


图31C

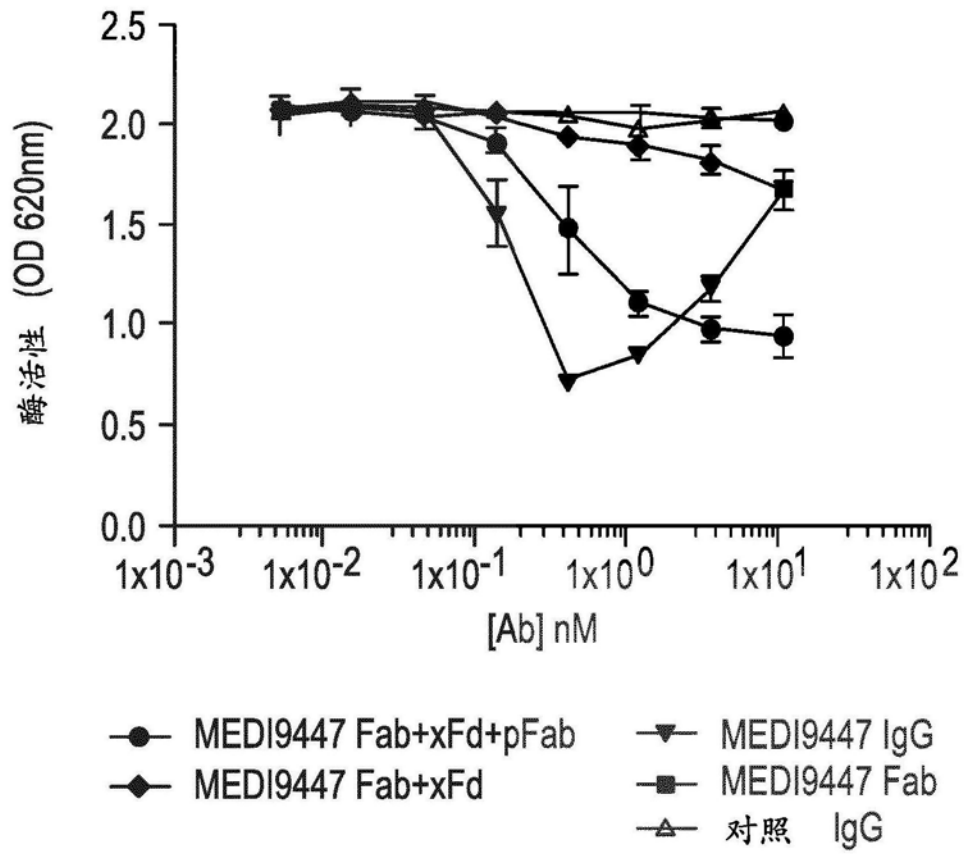


图31D

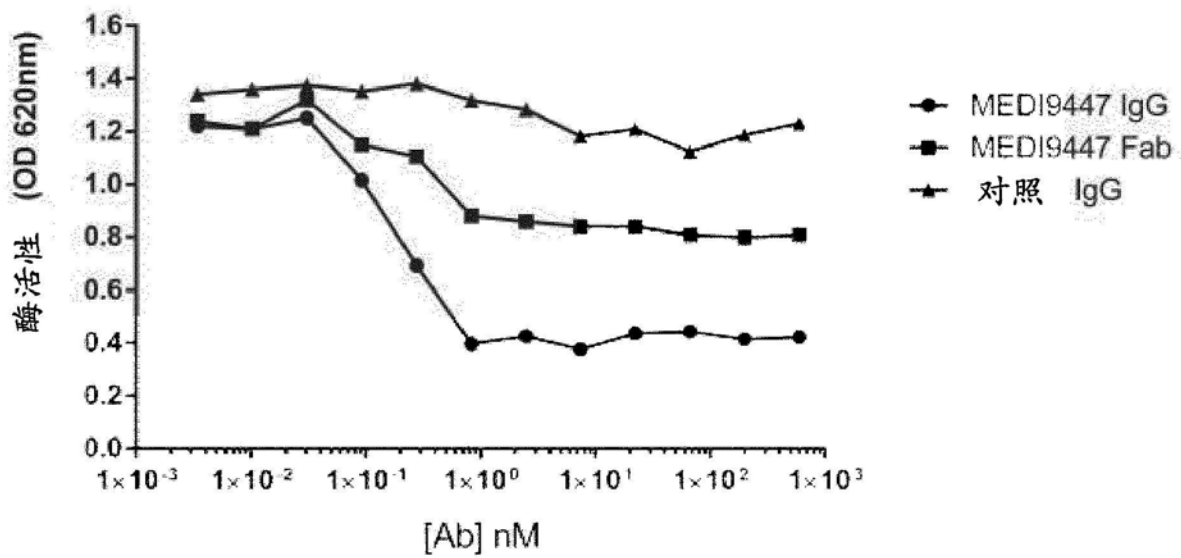


图32

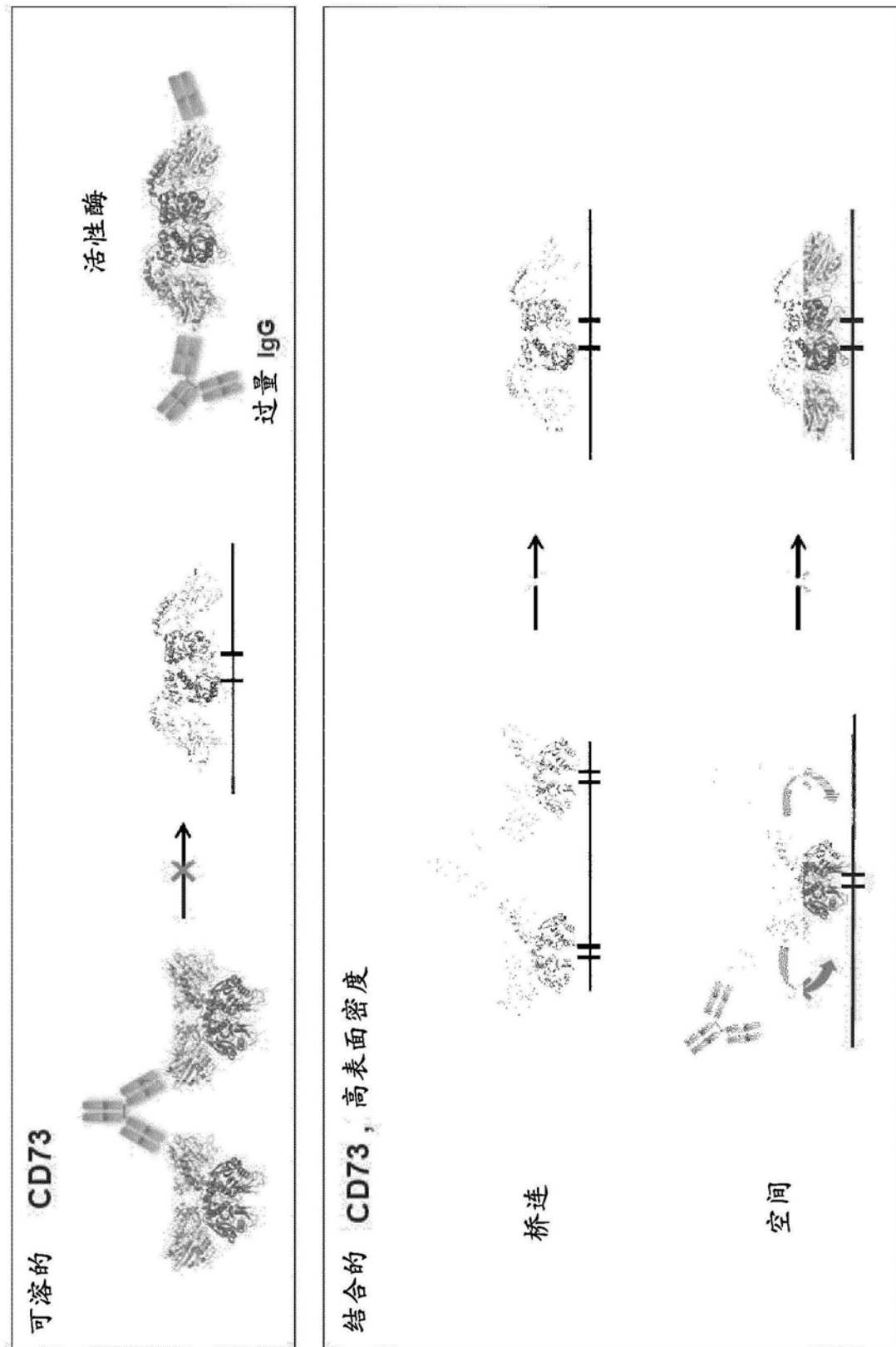


图33