



(10) 申请公布号 CN 119343375 A

(43) 申请公布日 2025.01.21

(21) 申请号 202380044238.1

(22) 申请日 2023.03.30

(30) 优先权数据

63/325578 2022.03.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.11.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/016917 2023.03.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/192489 EN 2023.10.05

(71) 申请人 安得泰医药有限公司

地址 美国马萨诸塞州贝弗利市邓纳姆岭路
5650单元

申请人 安普生物医药科技(深圳)有限公司

(72) 发明人 赵新燕 胡昌云

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理师 彭鲲鹏 刘瑾

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

权利要求书8页 说明书92页

序列表(电子公布) 附图7页

(54) 发明名称

抗腺苷受体(A2RA)抗体及其用途

(57) 摘要

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

1. 结合人腺苷A2A受体 (A2aR) 的分离的抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变 (VH) 结构域,所述重链可变结构域从N端到C端包含三个重链互补决定区 (complementarity-determining region, CDR):HCDR1、HCDR2和HCDR3;和轻链可变 (VL) 结构域,所述轻链可变结构域从N端到C端包含三个轻链互补决定区 (CDR):LCDR1、LCDR2和LCDR3;其中

(a) HCDR1包含氨基酸序列GFX₁FTX₂X₃WMN (SEQ ID NO:),其中X₁为A或T,X₂为R或S;和X₃为F或Y;

(b) HCDR2包含氨基酸序列RIDPX₄DSEX₅X₆YX₇X₈KFWX₉ (SEQ ID NO:),其中X₄为S或Y,X₅为A或T,X₆为H或Q,X₇为A、H或N,X₈为A或H,和X₉为D或G;

(c) HCDR3包含氨基酸序列GRSLYKGDY (SEQ ID NO:10) 或LRSLYKGDY (SEQ ID NO:11);

(d) LCDR1包含氨基酸序列RSSQSX₁₁VHX₁₂NGNTYLE (SEQ ID NO:),其中X₁₁为L或I,和X₁₂为R或S;

(e) LCDR2包含氨基酸序列KVSNRFS (SEQ ID NO:14);和

(f) LCDR3包含氨基酸序列FQGSHVPLT (SEQ ID NO:15) 或YQGSHVPLT (SEQ ID NO:16);

其中所述抗体或其抗原结合片段包含轻链框架区4 (light chain framework region 4, LFR4),其包含氨基酸序列FGGGTKVEIK (SEQ ID NO:50)。

2. 根据权利要求1所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中

(a) HCDR1包含选自SEQ ID NOs:1、2和3所示的氨基酸序列;

(b) HCDR2包含选自SEQ ID NOs:4-9和89所示的氨基酸序列;

(c) HCDR3包含SEQ ID NO:10或11所示的氨基酸序列;

(d) LCDR1包含SEQ ID NO:12或13所示的氨基酸序列;

(e) LCDR2包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列;和

(f) LCDR3包含SEQ ID NO:15或16所示的氨基酸序列。

3. 根据权利要求2所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含:

(a) 包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR2,以及包含SEQ ID NO:15所示氨基酸序列的LCDR3;

(b) 包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR2,以及包含SEQ ID NO:15所示氨基酸序列的LCDR3;

(c) 包含SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:13所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR2,以及包含SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的LCDR3;

(d) 包含SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:13所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR2,以及包含SEQ ID NO:16所示氨基酸序

列的LCDR3;

(e) 包含SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR2,以及包含SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的LCDR3;

(f) 包含SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:9所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR2,以及包含SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的LCDR3;或

(g) 包含SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:89所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR2,以及包含SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的LCDR3。

4. 结合人腺苷A2A受体 (A2aR) 的分离的抗体或其抗原结合片段,其包含重链可变(VH)结构域,所述重链可变结构域从N端到C端包含三个重链互补决定区(CDR):HCDR1、HCDR2和HCDR3;和

轻链可变(VL)结构域,所述轻链可变结构域从N端到C端包含三个轻链互补决定区(CDR):LCDR1、LCDR2和LCDR3;其中

(a) HCDR1包含氨基酸序列GFX₁FTX₂X₃WMN (SEQ ID NO:),其中X₁为A或T,X₂为R或S;和X₃为F或Y;

(b) HCDR2包含选自RIDPYDSETQYAHKFW (SEQ ID NO:5)、RIDPSDSEAHYAHKFWG (SEQ ID NO:7)、RIDPSDSETHYNAKFWG (SEQ ID NO:9)、和RIDPSDSETHYAHKFWG (SEQ ID NO:89)的氨基酸序列;

(c) HCDR3包含氨基酸序列GRSLYGKGDY (SEQ ID NO:10)或LRSLYGKGDY (SEQ ID NO:11);

(d) LCDR1包含氨基酸序列RSSQSX₁₁VHX₁₂NGNTYLE (SEQ ID NO:),其中X₁₁为L或I,和X₁₂为R或S;

(e) LCDR2包含氨基酸序列KVSNRFS (SEQ ID NO:14);和

(f) LCDR3包含氨基酸序列FQGSHVPLT (SEQ ID NO:15)或YQGSHVPLT (SEQ ID NO:16)。

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

(a) HCDR1包含选自SEQ ID NOs:1、2和3所示的氨基酸序列;

(b) HCDR2包含选自SEQ ID NOs:5、7、9和89所示的氨基酸序列;

(c) HCDR3包含SEQ ID NO:10或11所示的氨基酸序列;

(d) LCDR1包含SEQ ID NO:12或13所示的氨基酸序列;

(e) LCDR2包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列;和

(f) LCDR3包含SEQ ID NO:15或16所示的氨基酸序列。

6. 根据权利要求4所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含:

(a) 包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR2,以及包含SEQ ID NO:15所示氨基酸序

列的LCDR3;

(b) 包含SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:13所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR2,以及包含SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的LCDR3;

(c) 包含SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:9所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR2,以及包含SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的LCDR3;或

(d) 包含SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:89所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR2,以及包含SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的LCDR3。

7. 根据权利要求5或6所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其还包含轻链框架区4(LFR4),其包含氨基酸序列FGGGTKVEIK(SEQ ID NO:50)。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其还包含:

(a) 重链框架区1(HFR1),其包含氨基酸序列X14-V-Q-L-V-Q-S-G-A-E-V-K-K-P-G-A-S-V-K-V-S-C-K-X15-S(SEQ ID NO:)或E-V-Q-L-V-Q-S-G-A-E-V-K-K-P-G-E-S-L-R-I-S-C-K-X16-S(SEQ ID NO:),其中X14为E或Q,X15为A或T,和X16为A或T;

(b) 重链框架区2(HFR2),其包含氨基酸序列W-V-R-Q-X17-P-G-X18-G-L-E-W-X19-G(SEQ ID NO:),其中X17为A或M,X18为K或Q,和X19为I或M;

(c) 重链框架区3(HFR3),其包含氨基酸序列R-X20-T-X21-T-X22-D-X23-S-X24-S-T-V-Y-M-E-L-S-S-L-R-S-E-D-T-A-V-Y-Y-C(SEQ ID NO:)或HATLSVDKSSSTVYLQWSSLKASDTAMYIC(SEQ ID NO:29),其中X20为A或V,X21为L或M,X22为R或V,X23 K或T,和X24为S;和

(d) 重链框架区4(HFR4),其包含氨基酸序列WGQGTTVTVSS(SEQ ID NO:32)或WGHGTTVTVSS(SEQ ID NO:33)。

9. 根据权利要求8所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中

(a) HFR1包含选自SEQ ID NOs:17-21所示的氨基酸序列;

(b) HFR2包含选自SEQ ID NOs:22、23和24所示的氨基酸序列;

(c) HFR3包含选自SEQ ID NOs:25-31所示的氨基酸序列;和

(d) HFR4包含SEQ ID NOs:32或33所示的氨基酸序列。

10. 根据权利要求9所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区从N端到C端包含HFR1-HCDR1-HFR2-HCDR2-HFR3-HCDR3-HFR4的结构,其中HFR1、HFR2、HFR3和HFR4分别包含:

(a) SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、和SEQ ID NO:32所示的序列;

(b) SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:26、和SEQ ID NO:32所示的序列;

(c) SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:26、和SEQ ID NO:32所示的序列;

(d) SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:27、和SEQ ID NO:32所示的序列;

(e) SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:28、和SEQ ID NO:32所示的序列;

- (f) SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:29、和SEQ ID NO:32所示的序列；
- (g) SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、和SEQ ID NO:33所示的序列；
- (h) SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:26、和SEQ ID NO:33所示的序列；
- (i) SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:27、和SEQ ID NO:33、所示的序列；
- (j) SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:28、和SEQ ID NO:33所示的序列；
- (k) SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:29、和SEQ ID NO:33所示的序列；
- (l) SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:26、和SEQ ID NO:32所示的序列；
- (m) SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:30、和SEQ ID NO:32所示的序列；
- (n) SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:31、和SEQ ID NO:32所示的序列；或
- (o) SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:29、和SEQ ID NO:32所示的序列。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其还包含:

(a) 轻链框架区1(LFR1),其包含氨基酸序列D-X26-V-M-T-Q-X27-P-X28-S-L-X29-V-X30-X31-G-X32-P-A-S-I-S-C(SEQ ID NO:)或DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC(SEQ ID NO:),其中X26为I或V,X27为S或T,X28为D、L、或P,X29为A、P、或S,X30为N、S、或T,X31为L或P,和X32为E或Q;

(b) 轻链框架区2(LFR2),其包含氨基酸序列W-X33-X34-Q-X35-P-G-Q-X36-P-X37-X38-L-I-Y(SEQ ID NO:),其中X33为F或Y,X34为L或Q,X35为K或R,X36为P或S,X37为K,Q或R,和X38为L或R;和

(c) 轻链框架区3(LFR3),其包含氨基酸序列G-V-P-D-R-F-S-G-S-G-S-G-X39-D-F-T-L-X40-I-S-X41-X42-X43-A-E-D-V-X44-V-Y-Y-C(SEQ ID NO:),其中X39为S或T,X40为K或T,X41为R,S或W,X42为L或V,X43为E或Q,和X44为A或G。

12. 根据权利要求11所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中

- (a) LFR1包含选自SEQ ID NOs:34-41所示的氨基酸序列;
- (b) LFR2包含选自SEQ ID NOs:42-46所示的氨基酸序列;和
- (c) LFR3包含选自SEQ ID NOs:47、48和49所示的氨基酸序列。

13. 根据权利要求12所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述轻链可变区从N端到C端包含LFR1-LCDR1-LFR2-LCDR2-LFR3-LCDR3-LFR4的结构,其中LFR1、LFR2、LFR3和LFR4分别包含:

- (a) SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:50所示的序列;
- (b) SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:50所示的序列;
- (c) SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:50所示的序列;
- (d) SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:50所示的序列;
- (e) SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48和SEQ ID NO:50所示的序列;
- (f) SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:50所示的序列;
- (g) SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:50所示的序列;
- (h) SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50所示的序列;
- (i) SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50所示的序列;或
- (j) SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:50所示的序列。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体

包含:

(a) 重链可变区 (heavy chain variable region, HCVR), 所述重链可变区包含选自SEQ ID N0s: 51-70所示的氨基酸序列; 和

(b) 轻链可变区 (light chain variable region, LCVR), 所述轻链可变区包含选自SEQ ID N0s: 71-88所示的氨基酸序列。

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

重链可变 (VH) 结构域, 所述重链可变结构域从N端到C端包含三个重链互补决定区 (CDR): HCDR1、HCDR2和HCDR3; 和

轻链可变 (VL) 结构域, 所述轻链可变结构域从N端到C端包含三个轻链互补决定区 (CDR): LCDR1、LCDR2和LCDR3; 其中

(a) HCDR1包含与选自SEQ ID N0s: 1、2和3所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;

(b) HCDR2包含与选自SEQ ID N0s: 4-9和89所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;

(c) HCDR3包含与SEQ ID N0: 10或11所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;

(d) LCDR1包含与选自SEQ ID N0s: 12和13所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;

(e) LCDR2包含与SEQ ID N0: 14所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列; 和

(f) LCDR3包含与选自SEQ ID N0s: 15和16所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列; 和

其中所述抗体或其抗原结合片段包含轻链框架区4 (FR4), 其包含与序列FGGGTKVEIK (SEQ ID N0: 50) 具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列。

16. 根据权利要求15所述的分离的抗体或其抗原结合片段,

其中, 重链可变 (VH) 结构域从N端到C端包含四个框架区 (FR): HFR1、HFR2、HFR3、HFR4; 和

轻链可变 (VL) 结构域从N端到C端包含四个框架区 (FR): LFR1、LFR2、LFR3、LFR4, 其中

(a) HFR1包含与选自SEQ ID N0s: 17-21所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;

(b) HFR2包含与选自SEQ ID N0s: 22、23和24所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;

(c) HFR3包含与选自SEQ ID N0s: 25-31所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;

(d) HFR4包含与选自SEQ ID N0s: 32和33所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;

(e) LFR1包含与选自SEQ ID N0s: 34-41所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;

(f) LFR2包含与选自SEQ ID NOs:42-46所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;和

(g) LFR3包含与选自SEQ ID NOs:47、48和49所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列。

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

(a) 重链可变区 (HCVR),所述重链可变区包含与选自SEQ ID NOs:51-70所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;和

(b) 轻链可变区 (LCVR),所述轻链可变区包含与选自SEQ ID NOs:71-88所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列。

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

(a) 包含SEQ ID NO:60所示的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:80所示的氨基酸序列的轻链;

(b) 包含SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列的轻链;

(c) 包含SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:80所示的氨基酸序列的轻链;

(d) 包含SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:83所示的氨基酸序列的轻链;

(e) 包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列的轻链;或

(f) 包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:87所示的氨基酸序列的轻链。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的分离抗体或其抗原结合片段,其中所述重链和/或轻链的N端为焦谷氨酸 (pE) 残基。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的分离抗体或其抗原结合片段,其中

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

(ii) 所述抗体抑制A2aR的活性;

(iii) 所述抗体改善免疫应答;

(iv) 所述抗体特异性地结合细胞表面人A2aR;

(v) 所述抗体降低组织中的cAMP浓度;

(vi) 所述抗体降低蛋白激酶A的活性;

(vii) 所述抗体降低A2aR信号通路中cAMP响应元件的磷酸化;

(viii) 所述抗体特异性地结合人和/或食蟹猴A2aR;或

(viii) 所述抗体诱导A2aR内吞。

21. 分离的抗体或其抗原结合片段,其与权利要求1至20中任一项所述的抗体或其抗原结合片段竞争结合人A2aR。

22. 根据权利要求1至21中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是人源化抗体或嵌合抗体。

23. 根据权利要求1至22中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含选

自IgA、IgD、IgE、IgG和IgM类的重链恒定区。

24. 根据权利要求23所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链恒定区为IgG类恒定区,其中所述IgG选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

25. 根据权利要求23或24所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链恒定区为人重链恒定区。

26. 根据权利要求1至25中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或抗原结合片段包含人轻链恒定区。

27. 分离的多核苷酸,其编码权利要求1至25中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、其HCVR、其LCVR、其轻链、其重链或其抗原结合片段。

28. 表达载体,其包含权利要求27所述的多核苷酸。

29. 重组细胞,其包含权利要求27所述的多核苷酸或权利要求28所述的表达载体。

30. 制备多肽的方法,包括在权利要求29所述的重组细胞中表达所述多肽,任选地,所述方法还包括分离已表达的多肽,其中所述多肽选自权利要求1至26中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、其HCVR、其LCVR、其轻链、其重链和其抗原结合片段。

31. 药物组合物,其包含权利要求1至26中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,以及可药用载体或稀释剂。

32. 根据权利要求31所述的药物组合物,其中所述药物组合物包含有效剂量的所述抗体或其抗原结合片段,使其 (a) 特异性结合细胞表面人或食蟹猴A2aR; (b) 降低组织中的cAMP浓度; (c) 抑制人A2aR的活性; (d) 降低A2aR信号通路的cAMP反应元件的磷酸化; (e) 改善免疫细胞的免疫应答; (f) 降低蛋白激酶A活性;或 (g) 实现 (a) - (f) 的任意组合。

33. 抑制细胞表面表达的A2aR的活性的方法,包括使细胞与权利要求1至26中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,或权利要求31或32所述的药物组合物接触,从而抑制细胞中的A2aR活性。

34. 在对象中增强免疫应答的方法,包括向所述对象施用权利要求1至26中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段或权利要求31或32所述的药物组合物,从而增强所述对象的免疫应答。

35. 在对象中抑制肿瘤生长的方法,包括向所述对象施用权利要求1至26中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段或权利要求31或32所述的药物组合物,从而抑制肿瘤的生长。

36. 在对象中的方法,包括向所述对象施用权利要求1至26中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段或权利要求31或32所述的药物组合物,从而治疗癌症。

37. 根据权利要求33至36中任一项所述的方法,其中所述方法激活T细胞并引导其杀死肿瘤靶细胞。

38. 根据权利要求33至37中任一项所述的方法,其还包括向所述对象施用其他治疗药剂。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中所述其他治疗药剂包括抗肿瘤剂、放疗、化疗剂、手术、癌症疫苗、免疫细胞刺激受体的激动剂、细胞因子、细胞治疗,或检查点抑制剂。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中所述检查点抑制剂选自CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、TIGIT、LAG-3、TIM-3、B7-H3、B7-H4、CD73、PVRIG/PVRL2、神经突变蛋白、BTLA、CECAM-1、

CECAM-5、CECAM6、IL-1R8、VISTA、LAIR1、LILRB1、LILRB2、LILRB3、LILRB4、LILRB5、CD47、SIRPa、CD200R、CD96、CD112R、2B4、TGF β -R、KIR、NKG2A、SEMA4D、Ax1、MerTK、GAS6、TNFR2、GARP、CCR8、IDO、NOX2、SIGLEC7、SIGLEC15的抑制剂,和/或其任意组合。

41. 根据权利要求40所述的方法,其中所述抑制剂抑制PD-1和PD-L1之间的相互作用,所述抑制剂选自帕博利珠单抗、纳武利尤单抗、阿特殊单抗、阿维鲁单抗、度伐利尤单抗、BMS-936559、信迪利单抗、特瑞普利单抗、替雷利珠单抗、卡瑞利珠单抗、恩沃利单抗、舒格利单抗、派安普利单抗、卡度尼利单抗、磺胺间甲氧嘧啶和磺胺甲二唑。

42. 根据权利要求40所述的方法,其中所述CTLA4抑制剂选自伊匹单抗、卡度尼利单抗、YH001(祐和医药)、ADG116和ADG126(天演药业)。

43. 根据权利要求39所述的方法,其中所述其他治疗药剂为免疫细胞刺激受体的激动剂,所述刺激受体选自:OX40、CD2、CD27、CD3、ICAM-1、LFA-1、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD28、CD30、CD40、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、NKG2D、SLAMF7、NKp46、NKp80、CD160及其任意组合。

44. 根据权利要求38至43中任一项所述的方法,其中所述其他治疗药剂与所述抗体或其抗原结合片段被配制在相同的药物组合物中。

45. 根据权利要求38至43中任一项所述的方法,其中所述其他治疗药剂与所述抗体或其抗原结合片段被配制在不同的药物组合物中。

46. 根据权利要求38至43和45中任一项所述的方法,其中在施用所述抗体或其抗原结合片段之前和/或之后施用所述其他治疗药剂。

47. 根据权利要求38至46中任一项所述的方法,其中同时施用所述其他治疗药剂与所述抗体或其抗原结合片段。

48. 药剂盒,其包含权利要求1至26中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段,或权利要求31或32所述的药物组合物。

49. 根据权利要求48所述的药剂盒,其还包含其他治疗药剂。

抗腺苷受体 (A2RA) 抗体及其用途

[0001] 本申请要求于2022年3月30日提交的美国临时申请63/325,578的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

[0002] 本申请与于2021年9月30日提交的国际专利申请PCT/US21/52819相关。上述申请的全部内容通过引用明确并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及抗体,尤其涉及可用于治疗多种疾病(包括癌症)的腺苷受体A2aR的抗体。

背景技术

[0004] 免疫系统在肿瘤细胞的识别和消除中起着重要作用。肿瘤细胞利用各种机制来逃避免疫介导的肿瘤细胞损毁。在这些通路中,肿瘤细胞利用腺苷(一种效应T细胞功能的高效抑制剂)受体信号通路来提高腺苷水平和对腺苷的反应性以规避免疫防御。

[0005] 腺苷是一种嘌呤核苷,由三磷酸腺苷(ATP)降解产生。在不利条件下(如缺氧、局部缺血、炎症或癌症),腺苷在细胞外的水平显著增加。腺苷一旦被释放,其通过与四种已知的G蛋白偶联受体(即腺苷A1受体亚型(A1R)、腺苷A2A受体亚型(A2aR)、腺苷A2B受体亚型(A2bR)和腺苷A3受体亚型(A3R))的作用来激活细胞信号通路。

[0006] 腺苷水平主要受CD39和CD73的活性控制。CD39和CD73是两种胞外酶,其在两步反应中协同作用,将促炎性ATP转化为免疫抑制性腺苷。CD39将ATP水解成AMP,AMP进一步被CD73水解成腺苷,腺苷可以很容易地进入大多数细胞。此外,当肿瘤细胞因代谢或缺氧应激而发生细胞死亡时,其将细胞内储存的ATP(通常无法透过细胞)释放到细胞外空间。

[0007] 在肿瘤微环境中,CD73产生的腺苷可促进肿瘤细胞的生长和存活,同时抑制抗肿瘤免疫反应。癌细胞在肿瘤组织中高水平表达CD73,并且CD73的积累与乳腺癌和卵巢癌患者的低总生存率和低无复发生存率有关。CD73和腺苷支持癌细胞中促生长新血管的形成、以及癌细胞的转移和存活。腺苷结合T细胞上的A2A(或A_{2A})受体(A2aR)并激活细胞内信号传导级联反应,从而抑制T细胞的激活和功能。A2aR是G蛋白偶联受体腺苷受体组的一员,并且是细胞外腺苷的一种抗炎效应物质,主要在脑和淋巴组织细胞中表达,该组受体还包括A1R、A2bR和A3R。

[0008] 肿瘤微环境中异常高浓度的腺苷会激活A2aR,并引发可以使肿瘤逃避免疫识别的负反馈回路。具体而言,腺苷介导的A2aR的激活使肿瘤能够通过以下方式来逃逸免疫监视:抑制IFN γ 的产生,抑制多种抗肿瘤免疫细胞(包括CD8⁺T细胞、树突细胞、自然杀伤细胞和M1巨噬细胞)的活性,同时增强免疫抑制细胞类(包括骨髓来源的抑制细胞(MDSCs)和T调节(T_{reg})细胞)的活性。肿瘤细胞上的A2aRs的激活被认为还可以促进肿瘤细胞转移。

[0009] 尽管一些A2A受体的小分子拮抗剂已进入治疗帕金森病和癌症的临床试验阶段,但在癌症治疗方面仍缺乏用生物药候选药物来阻断A2aR。用A2aR拮抗剂(例如ZM241385)处理的小鼠显示,由于对效应T细胞的免疫抑制降低,肿瘤生长显著延迟。A2aR敲除小鼠显示

出更强的肿瘤排斥性,进一步凸显了这一点。此外,与阻断单一PD-1/PD-L1或CTLA-4通路相比,将小分子拮抗剂阻断A2aR与单克隆抗体抑制PD-1/PD-L1或CTLA-4相结合使用,对提高免疫反应有协同作用。

[0010] 因此,在肿瘤微环境中调节A2aR的活性、腺苷的浓度和/或CD39/CD73的表达以及激活效应免疫细胞是一种极具吸引力的治疗策略,其可以限制肿瘤进展、改善抗肿瘤免疫反应、避免治疗引起的免疫偏差,并可能限制对正常组织的毒性。本领域需要通过调节(例如抑制)免疫细胞的A2aR活性来治疗癌症的组合物和方法。

发明内容

[0011] 本发明提供一种抗原结合分子(例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段)用于通过特异性结合A2aR来调节(例如增强或抑制)A2aR的活性。所述A2aR可以在细胞表面上,例如哺乳动物细胞(例如哺乳动物的免疫细胞(如小鼠免疫细胞、食蟹猴免疫细胞或人免疫细胞))。本发明还提供了将本发明的抗原结合分子(例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段)用于调节(例如抑制)A2aR活性的方法,或用于治疗受益于调节(例如抑制)A2aR活性的对象(例如患有或易于患有A2aR相关疾病的对象)的方法。在某些实施方案中,本发明的抗原结合分子(例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段)是人源化的。

[0012] 因此,一方面,本发明提供了一种结合人腺苷A2A受体(A2aR)的分离的抗原结合分子,例如抗体或其抗原结合片段。所述抗体包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区从N端到C端包含三个重链互补决定区(complementarity-determining region, CDR):HCDR1、HCDR2和HCDR3;和所述轻链可变区从N端到C端包含三个轻链互补决定区(CDR):LCDR1、LCDR2和LCDR3。其中,(a)HCDR1包含氨基酸序列GFX₁FTX₂X₃WMN(SEQ ID NO:),其中X₁为A或T,X₂为R或S;和X₃为F或Y;(b)HCDR2包含氨基酸序列RIDPX₄DSEX₅X₆YX₇X₈KFWX₉(SEQ ID NO:),其中X₄为S或Y,X₅为A或T,X₆为H或Q,X₇为A、H或N,X₈为A或H,和X₉为D或G;(c)HCDR3包含氨基酸序列GRSLYGKGDY(SEQ ID NO:10)或LRSLYGKGDY(SEQ ID NO:11);(d)LCDR1包含氨基酸序列RSSQSX₁₁VHX₁₂NGNTYLE(SEQ ID NO:),其中X₁₁为L或I,和X₁₂为R或S;(e)LCDR2包含氨基酸序列KVSNRFS(SEQ ID NO:14);和(f)LCDR3包含氨基酸序列FQGSHVPLT(SEQ ID NO:15)或YQGSHVPLT(SEQ ID NO:16);其中所述抗体或其抗原结合片段包含轻链框架区4(light chain framework region 4,LFR4),其包含氨基酸序列FGGGTKVEIK(SEQ ID NO:50)。在一个实施方案中,(a)HCDR1包含选自SEQ ID NOs:1、2和3所示的氨基酸序列;(b)HCDR2包含选自SEQ ID NOs:4-9和89所示的氨基酸序列;(c)HCDR3包含SEQ ID NO:10或11所示的氨基酸序列;(d)LCDR1包含SEQ ID NO:12或13所示的氨基酸序列;(e)LCDR2包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列;和(f)LCDR3包含SEQ ID NO:15或16所示的氨基酸序列。

[0013] 在另一个实施方案中,所述分离的抗体或其抗原结合片段包含:(a)包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR2,包含SEQ ID NO:15所示氨基酸序列的LCDR3;(b)包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR2,以及包含SEQ ID NO:15所示氨基酸序列的LCDR3;(c)包含SEQ

ID NO:2所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:13所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR2,以及包含SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的LCDR3; (d) 包含SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:13所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR2,以及包含SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的LCDR3; (e) 包含SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:8所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR2,以及包含SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的LCDR3; (f) 包含SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:9所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR2,以及包含SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的LCDR3;或 (g) 包含SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:89所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR2,以及包含SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的LCDR3。

[0014] 在另一个方面中,本发明提供了结合人腺苷A_{2A}受体 (A_{2aR}) 的抗原结合分子,例如分离的抗体或其抗原结合片段。所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变 (VH) 结构域和轻链可变 (VL) 结构域,所述重链可变结构域从N端到C端包含三个重链互补性决定区 (CDR) : HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变结构域从N端到C端包含三个轻链互补性决定区 (CDR) : LCDR1、LCDR2和LCDR3。其中, (a) HCDR1包含氨基酸序列GFX₁FTX₂X₃WMN (SEQ ID NO:), 其中X₁为A或T, X₂为R或S; 和X₃为F或Y; (b) HCDR2包含选自RIDPYDSETQYAHKFW (SEQ ID NO:5)、RIDPSDSEAHYAHKFWG (SEQ ID NO:7)、RIDPSDSETHYNAKFWG (SEQ ID NO:9)、和RIDPSDSETHYAHKFWG (SEQ ID NO:89) 的氨基酸序列; (c) HCDR3包含氨基酸序列GRSLYGKGDY (SEQ ID NO:10) 或LRSLYGKGDY (SEQ ID NO:11); (d) LCDR1包含氨基酸序列RSSQSX₁₁VHX₁₂NGNTYLE (SEQ ID NO:), 其中X₁₁为L或I, 和X₁₂为R或S; (e) LCDR2包含氨基酸序列KVSNRFS (SEQ ID NO:14); 和 (f) LCDR3包含氨基酸序列FQGSHVPLT (SEQ ID NO:15) 或YQGSHVPLT (SEQ ID NO:16)。在一个实施方案中, (a) HCDR1包含选自SEQ ID NOs:1、2和3所示的氨基酸序列; (b) HCDR2包含选自SEQ ID NOs:5、7、9和89所示的氨基酸序列; (c) HCDR3包含SEQ ID NO:10或11所示的氨基酸序列; (d) LCDR1包含SEQ ID NO:12或13所示的氨基酸序列; (e) LCDR2包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列; 和 (f) LCDR3包含SEQ ID NO:15或16所示的氨基酸序列。

[0015] 在另一个实施方案中,所述分离的抗体或其抗原结合片段包含: (a) 包含SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR2,以及包含SEQ ID NO:15所示氨基酸序列的LCDR3; (b) 包含SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:13所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR2,以及包含SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的LCDR3; (c) 包含

SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:9所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR2,以及包含SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的LCDR3;或(d)包含SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的HCDR1,包含SEQ ID NO:89所示氨基酸序列的HCDR2,包含SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的HCDR3,包含SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的LCDR1,包含SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的LCDR2,以及包含SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的LCDR3。在又一个实施方案中,所述分离的抗体或其抗原结合片段还包含轻链框架区(FR4),其包含氨基酸序列FGGGTKVEIK(SEQ ID NO:50)。

[0016] 在本发明的多个方面的一个实施方案及其任一实施方案中,根据权利要求1至6中任一项所述的分离的抗体或其抗原结合片段还包含:(a)重链框架区1(HFR1),其包含氨基酸序列X14-V-Q-L-V-Q-S-G-A-E-V-K-K-P-G-A-S-V-K-V-S-C-K-X15-S(SEQ ID NO:)或E-V-Q-L-V-Q-S-G-A-E-V-K-K-P-G-E-S-L-R-I-S-C-K-X16-S(SEQ ID NO:),其中X14为E或Q,X15为A或T,和X16为A或T;(b)重链框架区2(HFR2),其包含氨基酸序列W-V-R-Q-X17-P-G-X18-G-L-E-W-X19-G(SEQ ID NO:),其中X17为A或M,X18为K或Q,和X19为I或M;(c)重链框架区3(HFR3),其包含氨基酸序列R-X20-T-X21-T-X22-D-X23-S-X24-S-T-V-Y-M-E-L-S-S-L-R-S-E-D-T-A-V-Y-Y-C(SEQ ID NO:)或HATLSVDKSSSTVYLQWSSLKASDTAMYYC(SEQ ID NO:29),其中X20为A或V,X21为L或M,X22为R或V,X23 K或T,和X24为S;和(d)重链框架区4(HFR4),其包含氨基酸序列WGQGTTVTVSS(SEQ ID NO:32)或WGHGTTVTVSS(SEQ ID NO:33)。在另一个实施方案中,(a)HFR1包含选自SEQ ID NOs:17-21的氨基酸序列;(b)HFR2包含选自SEQ ID NOs:22、23和24的氨基酸序列;(c)HFR3包含选自SEQ ID NOs:26-31的氨基酸序列;和(d)HFR4包含SEQ ID NOs:32或33所示的氨基酸序列。

[0017] 在另一个实施方案中,所述分离的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其从N端到C端包含HFR1-HCDR1-HFR2-HCDR2-HFR3-HCDR3-HFR4的结构,其中HFR1、HFR2、HFR3和HFR4分别包含:(a)SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、和SEQ ID NO:32所示的序列;(b)SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:26、和SEQ ID NO:32所示的序列;(c)SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:26、和SEQ ID NO:32所示的序列;(d)SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:27、和SEQ ID NO:32所示的序列;(e)SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:28、和SEQ ID NO:32所示的序列;(f)SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:29、和SEQ ID NO:32所示的序列;(g)SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:25、和SEQ ID NO:33所示的序列;(h)SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:26、和SEQ ID NO:33所示的序列;(i)SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:27、和SEQ ID NO:33、所示的序列;(j)SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:28、和SEQ ID NO:33所示的序列;(k)SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:29、和SEQ ID NO:33所示的序列;(l)SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:26、和SEQ ID NO:32所示的序列;(m)SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:30、和SEQ ID NO:32所示的序列;(n)SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:31、和SEQ ID NO:32所示的序列;或(o)SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:29、和SEQ ID NO:32所示的序列。

[0018] 在本发明的多个方面的一个实施方案及其任一实施方案中,所述的分离的抗体或其抗原结合片段包含:(a)轻链框架区1(LFR1),其包含氨基酸序列D-X26-V-M-T-Q-X27-P-

X28-S-L-X29-V-X30-X31-G-X32-P-A-S-I-S-C(SEQ ID NO:)或DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC(SEQ ID NO:36),其中X26为I或V,X27为S或T,X28为D、L、或P,X29为A、P、或S,X30为N、S、或T,X31为L或P,和X32为E或Q;(b)轻链框架区2(LFR2),其包含氨基酸序列W-X33-X34-Q-X35-P-G-Q-X36-P-X37-X38-L-I-Y(SEQ ID NO:),其中X33为F或Y,X34为L或Q,X35为K或R,X36为P或S,X37为K,Q或R,和X38为L或R;和(c)轻链框架区3(LFR3),其包含氨基酸序列

G-V-P-D-R-F-S-G-S-G-S-G-X39-D-F-T-L-X40-I-S-X41-X42-X43-A-E-D-V-X44-V-Y-Y-C(SEQ ID NO:),其中X39为S或T,X40为K或T,X41为R、S、或W,X42为L或V,X43为E或Q,和X44为A或G。在一个实施方案中,(a)LFR1包含选自SEQ ID NOs:34-41所示的氨基酸序列;(b)LFR2包含选自SEQ ID NOs:42-46所示的氨基酸序列;和(c)LFR3包含选自SEQ ID NOs:47、48和49所示的氨基酸序列。

[0019] 在另一个实施方案中,所述的分离的抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区,其从N端到C端包含LFR1-LCDR1-LFR2-LCDR2-LFR3-LCDR3-LFR4的结构,其中LFR1、LFR2、LFR3和LFR4分别包含:(a)SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:50所示的序列;(b)SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:50所示的序列;(c)SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:50所示的序列;(d)SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:50所示的序列;(e)SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:48和SEQ ID NO:50所示的序列;(f)SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:50所示的序列;(g)SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:50所示的序列;(h)SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50所示的序列;(i)SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:49和SEQ ID NO:50所示的序列;或(j)SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:47和SEQ ID NO:50所示的序列。

[0020] 在一个实施方案中,所述分离的抗体或其抗原结合片段包含:(a)重链可变区(HCVR),所述重链可变区包含选自SEQ ID NOs:51-70所示的氨基酸序列;和(b)轻链可变区(LCVR),所述轻链可变区包含选自SEQ ID NOs:71-88所示的氨基酸序列。

[0021] 在一个方面中,本发明提供抗原结合分子,例如结合人腺苷A2A受体(A2aR)的分离的抗体或其抗原结合片段。所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变(VH)结构域,所述重链可变结构域从N端到C端包含三个重链互补决定区(CDR):HCDR1、HCDR2和HCDR3;和轻链可变(VL)结构域,所述轻链可变结构域从N端到C端包含三个轻链互补决定区(CDR):LCDR1、LCDR2和LCDR3;其中(a)HCDR1包含与选自SEQ ID NOs:1、2和3所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;(b)HCDR2包含与选自SEQ ID NOs:4-9和89所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;(c)HCDR3包含与SEQ ID NO:10或11所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;(d)LCDR1包含与选自SEQ ID NOs:12和13所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;(e)LCDR2包含与SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;和(f)LCDR3包含与选自SEQ ID NOs:15和16所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;和其中所述抗体或其抗原结合片段包含轻链框架区4(FR4),其包含与序列FGGGTKVEIK(SEQ ID NO:50)具有约80%、

85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列。在一个实施方案中,所述重链可变(VH)结构域从N端到C端包含四个框架区(FR):HFR1、HFR2、HFR3、HFR4;和所述轻链可变(VL)结构域从N端到C端包含四个框架区(FR):LFR1、LFR2、LFR3、LFR4,其中(a)HFR1包含与选自SEQ ID NOs:17-21所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;(b)HFR2包含与选自SEQ ID NOs:22、23和24所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;(c)HFR3包含与选自SEQ ID NOs:25-31所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;(d)HFR4包含与选自SEQ ID NOs:32和33所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;(e)LFR1包含与选自SEQ ID NOs:34-41所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;(f)LFR2包含与选自SEQ ID NOs:42-46所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;和(g)LFR3包含与选自SEQ ID NOs:47、48和49所示的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列。

[0022] 在一个方面中,本发明提供抗原结合分子,例如结合人腺苷A2A受体(A2aR)的分离的抗体或其抗原结合片段。所述抗体或其抗原结合片段包含:(a)重链可变区(HCVR),所述重链可变区包含与选自SEQ ID NOs:51-70的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;和(b)轻链可变区(LCVR),所述轻链可变区包含与选自SEQ ID NOs:71-88具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列。

[0023] 在一个方面中,本发明提供抗原结合分子,例如结合人腺苷A2A受体(A2aR)的分离的抗体或其抗原结合片段。所述抗体或其抗原结合片段包含:(a)包含SEQ ID NO:60所示的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:80所示的氨基酸序列的轻链;(b)包含SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:78所示的氨基酸序列的轻链;(c)包含SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:80所示的氨基酸序列的轻链;(d)包含SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:83所示的氨基酸序列的轻链;(e)包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:86所示的氨基酸序列的轻链;或(f)包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:87所示的氨基酸序列的轻链。

[0024] 在本发明的多个方面的一个实施方案及其任一实施方案中,所述的分离抗体或其抗原结合片段的重链和/或轻链的N端为焦谷氨酸(pE)残基。在另一个实施方案中,A2aR为人A2aR。

[0025] 在另一个实施方案中,所述的分离抗体或其抗原结合片段(i)与选自1B5-3D7、3F6-9G5和3F8-12E9的单克隆抗体竞争结合人A2aR;(ii)抑制A2aR的活性;(iii)改善免疫应答;(iv)特异性地结合细胞表面人A2aR;(v)降低组织中的cAMP浓度;(vi)降低蛋白激酶A的活性;(vii)降低A2aR信号通路中cAMP响应元件的磷酸化;(viii)特异性地结合人和/或食蟹猴A2aR;(ix)诱导A2aR内吞;或(x)实现(i)-(ix)任意组合。

[0026] 在一个实施方案中,用实施例2和5中所述的基于流式细胞术的测定法或与其基本

相似的测定法来测定所述抗体与A2aR或细胞表面A2aR的结合。在另一个实施方案中,用本领域已知的测定法来测定所述抗体对A2aR或细胞表面A2aR的竞争结合,所述测定法包括例如Harms等人在Microtiter plate-based antibody-competition assay to determine binding affinities and plasma/blood stability of CXCR4 ligands,Scientific Reports,2020:10:16036,doi.org/10.1038/s41598-020-73012-4中描述的测定法,或与其实质上相似的测定法。在又一个实施方案中,用实施例3中描述的测定法或与其基本相似的测定法来测定cAMP浓度的降低。在又一个实施方案中,用实施例4中描述的测定法或与其基本相似的测定法来测定对A2aR活性的抑制。在一个实施方案中,用Karege等人在Anon-radioactive assay for the cAMP-dependent protein kinase activity in rat brain homogenates and age-related changes in hippocampus and cortex,Brain Res., 2001Jun 8;903(1-2):86-93,doi:10.1016/s0006-8993(01)02409-x中描述的方法或与其实质上相似的方法来测定蛋白激酶A活性的降低和/或A2aR信号通路的cAMP反应元件磷酸化的减少。在另一个实施方案中,用本领域熟知的方法测定免疫应答的增强。例如,用在实施例6中描述的测定法或与之基本相似的测定法来测定,例如,活化的免疫细胞产生的炎性细胞因子的增加、组织中炎性细胞因子浓度的提高、以及活化的CD25⁺和/或CD69⁺CD4⁺T细胞和细胞毒性CD8⁺T细胞的数量增加。

[0027] 在一个方面中,本发明提供抗原结合分子,例如分离的抗体或其抗原结合片段,其与本发明前述任一方面及其任一实施方案所述的抗体或其抗原结合片段竞争结合人A2aR。

[0028] 在一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段是人源化的抗体或嵌合抗体。在另一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段包含选自IgA、IgD、IgE、IgG或IgM类的重链恒定区。在又一个实施方案中,所述重链恒定区是IgG类的恒定区,其中所述IgG选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在又一个实施方案中,所述重链恒定区为人重链恒定区。

[0029] 在另一个方面中,本发明提供分离的多核苷酸。所述分离的多核苷酸编码任意方面及其任意实施方案的抗体或其抗原结合片段、其HCVR、其LCVR、其轻链、其重链或其抗原结合片段。

[0030] 在又一个方面中,本发明提供表达载体,其包含本发明的任意多核苷酸。

[0031] 在又一个方面中,本发明提供重组细胞,其包含本发明的任意多核苷酸或任意表达载体。

[0032] 在一个方面中,本发明提供制备多肽的方法,所述多肽选自任意方面及其任意实施方案的抗体及其抗原结合片段,其HCVR、其LCVR、其轻链、其重链和其抗原结合片段。所述方法包括在本发明的重组细胞中表达所述多肽,任选地,所述方法还包括分离已表达的多肽。

[0033] 在另一个实施方案中,本发明提供药物组合物。所述药物组合物包含本发明的多个方面及其任意实施方案的抗体及其抗原结合片段,以及可药用的载体或稀释剂。在一个实施方案中,所述药物组合物包含有效量的所述抗体或其抗原结合片段,使其(a)特异性结合细胞表面人或食蟹猴A2aR;(b)降低组织中的cAMP浓度;(c)抑制人A2aR的活性;(d)降低A2aR信号通路的cAMP反应元件的磷酸化;(e)改善免疫细胞的免疫应答;(f)降低蛋白激酶A活性;或(g)实现(a)-(f)的任意组合。

[0034] 在一个方面中,本发明提供抑制细胞表面表达的A2aR的活性的方法。所述方法包

括使细胞与本发明的多个方面及其任意实施方案的分离的抗体或其抗原结合片段,或者与本发明的多个方面及其任意实施方案的药物组合物接触,从而抑制细胞中的A2aR活性。在一个实施方案中,所述细胞是在对象内部的。在另一个实施方案中,所述对象是人。在又一个实施方案中,所述对象患有癌症。在一个实施方案中,所述方法用于在对象中治疗癌症。

[0035] 在另一个方面中,本发明提供在对象中增强免疫应答的方法。所述方法包括向所述对象施用本发明的多个方面及其任意实施方案的分离的抗体或其抗原结合片段,或本发明的多个方面及其任意实施方案的药物组合物,从而增强所述对象的免疫应答。在一个实施方案中,所述对象是人。在另一个实施方案中,所述对象患有癌症。在一个实施方案中,所述方法用于在对象中治疗癌症。

[0036] 在又一个方面中,本发明提供在对象中抑制肿瘤生长的方法。所述方法包括向所述对象施用本发明的多个方面及其任意实施方案的分离的抗体或其抗原结合片段,或本发明的多个方面及其任意实施方案的药物组合物,从而抑制肿瘤的生长。在一个实施方案中,所述对象是人。在另一个实施方案中,所述方法用于在对象中治疗癌症。

[0037] 在又一个方面中,本发明提供在对象中治疗癌症的方法,其包括向所述对象施用本发明的多个方面及其任意实施方案的分离的抗体或其抗原结合片段,或本发明的多个方面及其任意实施方案的药物组合物,从而治疗癌症。

[0038] 在本发明多个方面的一个实施方案中,所述方法激活T细胞并引导其杀死肿瘤靶细胞。

[0039] 在本发明多个方面的一个实施方案中,所述方法还包括向所述对象施用其他治疗药剂。

[0040] 在一个实施方案中,所述其他治疗药剂包括抗肿瘤剂、放疗、化疗剂、手术、癌症疫苗、免疫细胞刺激受体的激动剂、细胞因子、细胞治疗,或检查点抑制剂。

[0041] 在另一个实施方案中,所述检查点抑制剂选自CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、TIGIT、LAG-3、TIM-3、B7-H3、B7-H4、CD73、PVRIG/PVRL2、神经突蛋白、BTLA、CECAM-1、CECAM-5、CECAM6、IL-1R8、VISTA、LAIR1、LILRB1、LILRB2、LILRB3、LILRB4、LILRB5、CD47、SIRPα、CD200R、CD96、CD112R、2B4、TGFβ-R、KIR、NKG2A、SEMA4D、Ax1、MerTK、GAS6、TNFR2、GARP、CCR8、IDO、NOX2、SIGLEC7、SIGLEC15的抑制剂,和/或其任意组合。

[0042] 在又一个实施方案中,所述抑制剂抑制PD-1和PD-L1之间的相互作用,所述抑制剂选自帕博利珠单抗、纳武利尤单抗、阿特珠单抗、阿维鲁单抗、度伐利尤单抗、BMS-936559、信迪利单抗、特瑞普利单抗、替雷利珠单抗、卡瑞利珠单抗、恩沃利单抗、舒格利单抗、派安普利单抗、卡度尼利单抗、磺胺间甲氧嘧啶和磺胺甲二唑。

[0043] 在又一个实施方案中,所述CTLA4抑制剂选自伊匹单抗、卡度尼利单抗、YH001(祐和医药)、ADG116和ADG126(天演药业)。

[0044] 在一个实施方案中,所述其他治疗药剂为免疫细胞刺激受体的激动剂,所述刺激受体选自:OX40、CD2、CD27、CD3、ICAM-1、LFA-1、ICOS(CD278)、4-1BB(CD137)、GITR、CD28、CD30、CD40、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、NKG2D、SLAMF7、NKp46、NKp80、CD160及其任意组合。

[0045] 在另一个实施方案中,所述其他治疗药剂与所述抗体或其抗原结合片段被配制在同一药物组合物中。

[0046] 在又一个实施方案中,所述其他治疗药剂与所述抗体或其抗原结合片段被配制在不同的药物组合物中。

[0047] 在一个实施方案中,在施用所述抗体或其抗原结合片段之前和/或之后施用所述其他治疗药剂。在另一个实施方案中,同时施用所述其他治疗药剂与所述抗体或其抗原结合片段。

[0048] 在一个方面中,本发明提供药剂盒。所述药剂盒包含本发明的多个方面及其任意实施方案的分离的抗体或其抗原结合片段,或本发明的多个方面及其任意实施方案的药物组合物。在一个实施方案中,所述药剂盒包含其他治疗药剂。

附图说明

[0049] 图1A和1B示出了本发明的示例性人源化的抗A2aR抗体和3F6-9G5抗体(‘601公布)阻断了细胞表面表达的人A2aR活性。RLU(Relative Light Unit):相对光单位。Hu3F6-VH3/VL5:Hu3F6-H3/Hu3F6-L5,Hu3F6-VH5/VL5:Hu3F6-H5/Hu3F6-L5。

[0050] 图2显示出本发明的示例性人源化抗A2aR抗体和3F6-9G5抗体(‘601公布)在结合细胞表面A2aR之后诱导内吞。MFI(Mean Fluorescence Intensity):平均荧光强度。Hu3F6-VH3/VL5:Hu3F6-H3/Hu3F6-L5,Hu3F6-VH5/VL5:Hu3F6-H5/Hu3F6-L5。

[0051] 图3显示出本发明的示例性人源化抗A2aR抗体和3F6-9G5抗体(‘601公布)与表达人A2aR的细胞孵育之后被定位于细胞内部。Hu3F6-VH3/VL5:Hu3F6-H3/Hu3F6-L5;Hu3F6-VH5/VL5:Hu3F6-H5/Hu3F6-L5。

[0052] 图4A和4B显示出本发明的示例性人源化抗A2aR抗体和3F6-9G5抗体(‘601公布)与多种人和食蟹猴CD4⁺和CD8⁺T细胞结合。Hu3F6-VH3/VL5:Hu3F6-H3/Hu3F6-L5;Hu3F6-VH5/VL5:Hu3F6-H5/Hu3F6-L5。

[0053] 图5A和5B显示出在0.1 μ M NECA的存在下,本发明的示例性人源化抗A2aR抗体和3F6-9G5抗体(‘601公布)可恢复由免疫磁珠(Dynabeads)活化的CD4⁺T细胞胞内IFN γ 和IL2产生。NECA是一种A2aR激动剂,其可诱导免疫抑制,例如抑制T细胞功能。Hu3F6-VH3/VL5:Hu3F6-H3/Hu3F6-L5;Hu3F6-VH5/VL5:Hu3F6-H5/Hu3F6-L5。

具体实施方式

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

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

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

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

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

[0059] 一、定义

[0060] 为了可以更容易地理解本发明,首先定义某些术语。此外,应当注意,每当列举参数的值或值的范围时,都旨在表示列举值的值和范围中间值也为本发明的一部分。

[0061] 除非本文另有说明或与上下文明显矛盾,在描述本发明的上下文中(特别是在权利要求的上下文中)使用的术语“一个”和“一种”和“所述”和类似的指示词应被解释为涵盖单数和复数(即,一个或更多个)。除非另有说明,术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应解释为开放式术语(即意为“包括但不限于”)。除非本文另有说明,本文对数值范围的列举仅旨在用作单独引用每个被引用的单独的值或引用每个落在该范围内的单独的值的简写方法,并且每个单独的值如同其被单独地列举一样被并入说明书中。

[0062] 当使用短语“在一个实施方案中”、“在另一个实施方案中”、“在其他实施方案中”、“在一些实施方案中”或“在某些实施方案中”时,本公开应被理解为包括定义其所述不同实施方案的任意特征的组合,除非这些特征不能相互组合、或这些特征相互排斥或在此明确放弃。

[0063] 术语“大约”或“约”如应用于一个或更多个本文中提供的值时,是指类似于所述参考值的值。在一些实施方案中,除非另有说明或在其他情况下从上下文中可以明显看出,术语“大约”或“约”是指落入所述参考值的任一方向上(大于或小于)15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、或更小以内的值的范围。在一些实施方案中,“大约”或“约”可理解为与平均值相差约2个标准差。在一些实施方案中,“大约”或“约”是指高达并包括 $\pm 10\%$ (例如, $\pm 10\%$ 、 $\pm 9\%$ 、 $\pm 8\%$ 、 $\pm 7\%$ 、 $\pm 6\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 4\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 2\%$ 、 $\pm 1\%$ 或更低)。在一些实施方案中,“大约”或“约”表示 $\pm 5\%$ 。当“大约”或“约”存在一系列数字或范围之前时,应理解“大约/约”可修饰该系列或范围中的每个数字。

[0064] 范围在本文中可表示为从“约”一个特定值,和/或至“约”另一个特定值。当表示这样的范围时,另一个实施方案包括从一个所述特定值和/或到另一个所述特定值。类似地,当通过使用先行词“约”将值表示为近似值时,应理解为所述特定值构成另一个实施方案。还应当理解,每个范围的端点相对于另一个端点既是显著的,又是独立的。还应当理解,本文公开了大量的值,每个值除了该值本身之外也包含该特定值的“约”值。例如,如果值“10”被公开,则也公开了“约10”。还可理解,当公开值时,“小于或等于”(该值)、“大于或等于”(该值)和值之间的可能范围也被公开,正如本领域技术人员所适当理解的一样。例如,如果

值“10”被公开,则也公开了“小于或等于10”以及“大于或等于10”。

[0065] 本文所使用的术语“施用”是指向对象提供一种药剂,例如抗体。在一些实施方案中,“施用”是指向对象以生理学和/或(例如,和)药理学上有用的方式来提供抗体或抗体偶联物(例如,为了治疗对象的病症)。施用途径的非限制性实例包括静脉内、肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内或鞘内途径。在一些实施方案中,施用途径是经皮下的。

[0066] 本文所使用的术语“药剂”是指任何物质、化合物(例如分子)、超分子复合物、材料或其组合或混合物。化合物可以由化学式、化学结构或序列表示的任何试剂。药剂的实例包括,例如,小分子、多肽、核酸(例如,RNAi试剂、反义寡核苷酸、核酸适配体)、脂质、多糖等。通常,可以使用本领域已知的任何合适的方法获得药剂。普通技术人员将基于例如药剂的性质选择合适的方法。药剂可至少部分纯化。在一些实施方案中,药剂可以作为组合物的一部分被提供,在各种实施方案中,除了所述药剂之外,所述组合物可包含例如抗衡离子、水性或非水性稀释剂或载体、缓冲剂、防腐剂或其他成分。在一些实施方案中,药剂可以盐、酯、水合物或溶剂化物的形式被提供。在一些实施方案中,药剂是可透过细胞的,其在例如被细胞吸收并在细胞内作用(例如在哺乳动物细胞内作用以产生生物效应)的典型药剂的范围内。某些化合物可以以特定的几何或立体异构形式存在。这样的化合物包括顺式和反式异构体、E-和Z-异构体、R-和S-对映体、非对映体、(D)-异构体、(L)-异构体、(-)-和(+)-异构体,其外消旋混合物及其其他混合物,除非另有说明,这样的化合物包括在本公开的各种实施方案中。某些化合物可以以多种或质子化状态存在,可具有多种构型,可作为溶剂化物存在(例如,与水(即水合物)或普通溶剂)和/或可具有不同的结晶形式(例如,多晶型物)或不同的互变异构形式。本公开在适用的情况下包括表现出此类替代性质子化状态、构型、溶剂化物和形式的实施方案。

[0067] 在某些实施例中,根据上下文理解,“药剂”还包括治疗方法,例如放射治疗、化学治疗或手术。

[0068] 术语“氨基酸”是指二十种常见的天然氨基酸。天然氨基酸包括丙氨酸(Ala;A)、精氨酸(Arg;R)、天冬酰胺(Asn;N)、天冬氨酸(Asp;D)、半胱氨酸(Cys;C);谷氨酸(Glu;E)、谷氨酰胺(Gln;Q)、甘氨酸(Gly;G);组氨酸(His;H)、异亮氨酸(He;I)、亮氨酸(Leu;L)、赖氨酸(Lys;K)、甲硫氨酸(Met;M)、苯丙氨酸(Phe;F)、脯氨酸(Pro;P)、丝氨酸(Ser;S)、苏氨酸(Thr;T)、色氨酸(Trp;W)、酪氨酸(Tyr;Y)和缬氨酸(Val;V)。

[0069] 术语“拮抗剂”或“抑制剂”是指防止、阻断、抑制、中和或降低另一分子(例如受体)的生物活性或作用的物质。

[0070] 术语“激动剂”是指促进(即诱导、引起、增强或提高)另一分子的生物活性或作用的物质。术语激动剂包括结合受体的物质(例如抗体)以及促进受体功能但不与其结合的物质(例如通过激活相关蛋白来促进受体功能)。

[0071] 本文中所使用的术语“抗体”是指包含至少一个互补决定区(CDR)的任何抗原结合分子或分子复合物,其特异性结合特定抗原(例如A2aR)或与其相互作用。术语“抗体”包括包含四条多肽链(即通过二硫键相互连接的两条重(H)链和两条轻(L)链)的免疫球蛋白分子,及其多聚体(例如IgM)。每条重链包含重链可变区(本文缩写为HCVR、V_H或V_H)和重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域,即C_H1或CH1、C_H2或CH2、以及C_H3或CH3。每条轻链包含轻链可变区(本文缩写为LCVR、V_L或V_L)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域(CL或C_L)。

V_H 和 V_L 区域可以进一步细分出高变区,称为互补决定区(CDR),其间散布有更保守的区域,称为框架区(FR)。重链框架区在本文中缩写为HFR,轻链框架区在本文中缩写为LFR。每个 V_H 和 V_L 由三个CDR和四个FR组成,从氨基末端到羧基末端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本发明的不同实施方案中,抗A2aR抗体(或其抗原结合片段)的FR可与鼠或人种系序列相同,或者可以是经天然或人工修饰的。氨基酸共有序列可基于两个或多个CDR的并排分析来定义。

[0072] 本文所使用的术语“抗体”还包括完整抗体分子的抗原结合片段。本文所使用的术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”等包括特异性结合抗原以形成一个复合物的任何天然存在的、可通过酶法获得的、合成的或基因工程得到的多肽或糖蛋白。可使用任何合适的标准技术,例如蛋白酶解或重组基因工程技术(包括操纵和表达编码抗体可变区和任选恒定区的DNA),从完整的抗体分子中衍生获得抗体的抗原结合片段。这样的DNA是已知的和/或易于获得的,例如商业来源、DNA文库(包括例如噬菌体-抗体文库),或者可以被合成。可以通过化学或分子生物学技术对所述DNA进行测序和操纵,例如,将一个或多个可变区和/或恒定区排列成合适的构型,或引入密码子,产生半胱氨酸残基,修饰、添加或删除氨基酸等。

[0073] 抗原结合片段的非限制性实例包括:(i) Fab片段;(ii) F(ab')₂片段;(iii) Fd片段;(iv) Fv片段;(v) 单链Fv(scFv)分子;(vi) dAb片段;以及(vii) 最小识别单元,其由模拟抗体高变区(例如分离的互补决定区(CDR),例如CDR3肽)或受限的FR3-CDR3-FR4肽的氨基酸残基组成。其他工程化的分子,例如结构域特异性抗体、单结构域抗体、结构域缺失抗体、嵌合抗体、CDR移植抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微型抗体、纳米抗体(例如单价纳米抗体、二价纳米抗体等),小模块免疫药物(small modular immunopharmaceutical, SMIP)和鲨鱼可变IgNAR结构域也包括在本文所用的表述“抗原结合片段”中。

[0074] 抗体的抗原结合片段通常包含至少一个可变结构域。所述可变结构域可具有任何大小或任何氨基酸组成,并且通常包含至少一个与一个或多个框架序列相邻或与框架序列同框的CDR。在含有 V_H 结构域与 V_L 结构域相连的抗原结合片段中, V_H 和 V_L 结构域可以以任何合适的排列方式彼此相对定位。例如,可变区可以是二聚体并且含有 V_H - V_H 、 V_H - V_L 或 V_L - V_L 二聚体。或者,抗体的抗原结合片段可含有单体 V_H 或 V_L 结构域。

[0075] 在某些实施方案中,抗体的抗原结合片段可含有与至少一个恒定结构域共价连接的至少一个可变结构域。本发明抗体的抗原结合片段包含的可变结构域和恒定结构域的非限制性示例性构型包括:(i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ;和(xiv) V_L - C_L 。在可变结构域和恒定结构域的任意构型中(包括上面列出的任意示例性构型),可变结构域和恒定结构域可彼此直接连接或者可以通过完整或部分铰链或接头区连接。铰链区可包含至少2(例如5、10、15、20、40、60或更多)个氨基酸,从而形成单个多肽分子中相邻可变和/或恒定结构域之间的柔性或半柔性连接。此外,抗原结合片段可以包含以上所列的任意可变结构域和恒定结构域构型的同源二聚体或异源二聚体(或其他多聚体),其彼此之间非共价连接和/或其与一个或多个单体 V_H 或 V_L 结构域非共价连接(例如通过二硫键连接)。当用单独的结构域之间的连字符(如CH2-CH3)来描述多肽结构域排列时,应理解所列结构域的顺序是从N端到C端。

[0076] 与完整的抗体分子一样,抗原结合片段可以是单特异性或多特异性(例如,双特异性)。抗体的多特异性抗原结合片段通常包含至少两个不同的可变结构域,其中每个可变结构域都能够特异性结合单独的抗原或同一抗原上的不同表位。通过使用本领域可用的常规技术,任何多特异性抗体形式(包括本文公开的示例性双特异性抗体形式)都可适用于本发明抗体的抗原结合片段的情况。

[0077] 本发明所述的抗体可以是分离的抗体。本文所用的“分离的”分子,例如分离的抗体或分离的多肽,是指已从其天然环境的至少一种组分中鉴定和分离和/或回收的分子,例如抗体。例如,已从生物体的至少一种成分,或从天然存在或天然产生抗体的组织或细胞中分离或去除的分子(例如抗体)是用于本发明目的的“分离的”分子(例如抗体)。分离的分子(例如抗体)还包括重组细胞内的原位分子(例如抗体)。在某些实施方案中,分离的分子(例如抗体)是已经经过至少一个纯化或分离步骤的分子(例如抗体)。根据某些实施方案,分离的分子(例如抗体)可基本上不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0078] 本发明还包括结合A2aR的单臂抗体。本文所用的“单臂抗体”是指包含单个抗体重链和单个抗体轻链的抗原结合分子。本发明所述的单臂抗体可包含如表1至19中所列的任意HCVR/LCVR或CDR氨基酸序列。

[0079] 与抗原结合分子或抗原结合结构域来源的相应种系序列相比,本文所述的抗A2aR抗体或其抗原结合结构域可在其重链和轻链可变域的框架区和/或CDR区包括一个或多个氨基酸的替换、插入和/或缺失。通过将本文公开的氨基酸序列与可从例如公共抗体序列数据库获得的种系序列进行比较,可以容易地确定此类突变。本发明包括由本文公开的任意氨基酸序列获得的抗体及其抗原结合结构域,其中一个或多个框架区和/或CDR区内的一个或多个氨基酸突变为抗体来源的种系序列中的相应残基,或另一人种系序列的相应残基,或相应种系残基的保守氨基酸取代(此类序列变化在本文中统称为“种系突变”)。本领域普通技术人员以本文公开的重链和轻链可变区序列为起始,可以容易地制备大量抗体和抗原结合片段,其包含一个或多个个体种系突变或其组合。在某些实施方案中, V_H 和/或 V_L 结构域内的所有框架区和/或CDR残基突变回抗体来源的原始种系序列中的残基。在其他实施方案中,仅某些残基突变回原始种系序列,例如,仅在FR1的前8个氨基酸内或在FR4的后8个氨基酸内的突变残基,或仅在CDR1,CDR2或CDR3内的突变残基。在其他实施方案中,一个或多个框架区和/或CDR残基突变为不同种系序列(即不同于抗体来源的种系序列的种系序列)的相应残基。此外,本发明的抗体或其抗原结合结构域可以在框架区和/或CDR区内包含两个或更多个种系突变的任意组合,例如,其中某些单独的残基突变为特定种系序列的相应残基,而与原始种系序列不同的某些其他残基被保留或突变为不同种系序列的相应残基。一旦获得含有一个或多个种系突变的抗体或其抗原结合片段,可以很容易地对其测试一种或多种期望特性,例如改进的结合特异性、增加的结合亲和力、改进或增强的拮抗或激动生物学特性(视情况而定)、降低的免疫原性等。以这种一般方式获得的抗体或其抗原结合片段包括在本发明内。

[0080] 本发明还包括包含本文公开的任意HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的变体的抗A2aR抗体。本发明此方面包括的示例性变体包括本文公开的具有一个或多个保守取代的任意HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列的变体。例如,本发明包括一种抗A2aR抗体和抗原结合蛋白,其具有的HCVR、LCVR和/或CDR氨基酸序列相对于本文表中列出的任意HCVR、LCVR和/或

CDR氨基酸序列来说,包含10个或更少、8个或更少、6个或更少、4个或更少等的保守氨基酸取代。

[0081] 轻链分为kappa或lambda (κ, λ)。每个重链类别都可以与kappa或lambda轻链结合。一般来说,轻链和重链彼此共价键合,当免疫球蛋白由杂交瘤,B细胞或基因工程宿主细胞产生时,两条重链的“尾”部通过共价二硫键或非共价键彼此相互键合。在重链中,其氨基酸序列是从Y构型分叉末端的N端到每条链底部的C端。

[0082] 本文所使用的术语“轻链恒定区”和“CL”在本文中可互换使用,指源自抗体轻链的氨基酸序列。优选地,轻链恒定区包含恒定 κ 结构域或恒定 λ 结构域中的至少一种。

[0083] 本文所用的术语“重链恒定区”包括源自免疫球蛋白重链的氨基酸序列。包含重链恒定区的多肽包含以下组中的至少一个:CH1结构域、铰链(例如铰链区的上部、中部和/或下部)结构域、CH2结构域、CH3结构域,或其变体或其片段。例如,本公开使用的抗原结合多肽可以包括包含CH1结构域的多肽链;包含CH1结构域、至少部分铰链结构域和CH2结构域的多肽链;包含CH1结构域和CH3结构域的多肽链;包含CH1结构域、至少部分铰链结构域和CH3结构域的多肽链,或包含CH1结构域、至少部分铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域的多肽链。在一些实施方案中,本发明的多肽包括包含CH3结构域的多肽链。此外,本公开使用的抗体可缺少至少一部分CH2结构域(例如,全部或部分CH2结构域)。应当理解,重链恒定区可以是经修饰的,使其在氨基酸序列上不同于天然存在的免疫球蛋白分子。

[0084] 本文公开的抗体的重链恒定区可源自不同的免疫球蛋白分子。例如,多肽的重链恒定区可包含来源于IgG1分子的CH1结构域和来源于IgG3分子的铰链区。在另一个实例中,重链恒定区可包含部分来源于IgG1分子且部分来源于IgG3分子的铰链区。在另一个实例中,重链部分可包含部分来源于IgG1分子且部分来源于IgG4分子的嵌合铰链。

[0085] “轻链-重链对”是指轻链和重链的集合,其中轻链和重链可通过轻链的CL结构域和重链的CH1结构域之间的二硫键形成二聚体。

[0086] 各种免疫球蛋白类的恒定区的亚基结构和三维构型是众所周知的。本文所用的术语“VH结构域”包括免疫球蛋白重链的N端可变结构域,术语“CH1结构域”包括免疫球蛋白重链的第一个(最N端)恒定区结构域。所述CH1结构域与所述VH结构域相邻并且是免疫球蛋白重链分子铰链区的N端。

[0087] 本文所用的术语“CH2结构域”包括从抗体的例如约残基244位延伸至残基360位的重链分子部分,其中编号使用常规编号方案(残基244至360,Kabat编号系统;或残基231-340,EU编号系统)。所述CH2结构域的独特之处在于其不与另一个结构域紧密配对。相反,一个完整的天然IgG分子的两个CH2结构域之间插入有两个N-连接的支链糖链。CH3结构域从CH2结构域延伸到IgG分子的C端,包含约108个残基。

[0088] 本文所使用的术语“铰链区”包括将CH1结构域连接到CH2结构域的重链分子的部分。所述铰链区包含约25个残基并且是柔性的,因此允许两个N端抗原结合区独立活动。铰链区可被细分为三个不同的结构域:上铰链域、中铰链域和下铰链域。

[0089] 本文所使用的术语“二硫键”包括在两个硫原子之间形成的共价键。半胱氨酸包含一个可与第二硫醇基形成二硫键或桥的硫醇基。在大多数天然存在的IgG分子中,CH1和CL区通过二硫键连接,两条重链通过对应于位点239和242(Kabat编号系统)的两个二硫键连接,在EU编号系统中是位点226或229。

[0090] 术语“抗体”包括可在生物化学上区分的各种宽泛类别的多肽。本领域技术人员将理解,重链被分类为alpha、delta、epsilon、gamma和mu(或 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ)和其中的一些子类(例如 γ 1- γ 4)。这条链的性质决定了抗体的“类别”分别为IgG、IgM、IgA、IgD或IgE。免疫球蛋白亚类(同种型)例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等已得到很好的表征,且已知可赋予功能特化。鉴于本公开内容,这些类别和同种型中的每一个的修饰形式对于本领域技术人员来说是容易辨别的,因此包括在本公开的范围。所有免疫球蛋白类别都在本公开的范围,以下讨论一般针对IgG类的免疫球蛋白分子。

[0091] 本公开的抗体包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、三特异性抗体、人抗体、人源化抗体、灵长类抗体、嵌合抗体和单链抗体。本文公开的抗体可来自任何动物来源,包括鸟类和哺乳动物。优选地,所述抗体是人、鼠、驴、兔、山羊、豚鼠、骆驼、美洲驼、马或鸡的抗体。在一些实施方案中,可变区可以是来源于水族(例如,来自鲨鱼)。

[0092] 本文所使用的术语“人源化抗体”是指基因工程化的非人抗体,其包含人抗体恒定域和被修饰的与人可变域具有高度序列同源性的非人可变域。这可以通过将形成抗原结合位点的六个非人抗体互补决定区(CDR)移植到同源人受体框架区(FR)上来实现。为了重建亲本抗体的结合亲和力和特异性,需要将亲本抗体(即非人抗体)的框架区残基替换为人框架区残基(回复突变)。结构同源性建模可有助于识别框架区中对抗体结合特性很重要的氨基酸残基。因此,人源化抗体可包含非人CDR序列,主要是任选地包含对非人氨基酸序列的一个或多个氨基酸回复突变的人框架区,和全人恒定区。任选地,可应用另外的氨基酸(其不一定是回复突变)修饰以获得具有优选特征例如亲和力和生化特性的人源化抗体。

[0093] 本文所用的短语“嵌合抗体”是指其中重链和/或轻链的一部分与来源于特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列基本相同、相同或同源,而该链的其余部分与来源于另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列基本相同、相同或同源的抗体,以及这样的抗体的片段,只要其表现出期望的生物活性即可。在某些实施方案中,嵌合抗体包括从第一物种获得或来源于其的免疫活性区或位点,例如重链可变区和/或轻链可变区,以及从第二物种获得的恒定区(可以是完整的、部分的或根据本公开内容而修饰的)。在某些实施方案中,靶结合区或位点是非人来源的(例如小鼠或灵长类动物),并且恒定区是人源的。人源化抗体是特别的一类嵌合抗体。

[0094] “可变单链片段”或“scFv”是指免疫球蛋白重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的融合蛋白。在一些方面,区域通过10至约25个氨基酸的短连接肽连接。所述连接肽为了柔性可以是富含甘氨酸的,为了溶解度也可以是富含丝氨酸或苏氨酸的,并且可将VH的N端与VL的C端连接,反之亦然。尽管该蛋白中去除了恒定区并引入了连接肽,其仍保留了原始免疫球蛋白的特异性。

[0095] 关于IgG,标准免疫球蛋白分子包含两条相同的分子量约为23,000Da的轻链多肽,和两条相同的分子量为53,000-70,000Da的重链多肽。这4条链通常通过“Y”构型中的二硫键连接,其中轻链包围重链,从“Y”口开始,延续经过可变区。

[0096] 术语“生物活性”是指分子的任何生物特性(无论是天然存在于体内,还是通过重组手段提供或实现的)。生物活性包括但不限于与受体结合、诱导细胞增殖、抑制细胞生长、诱导其他细胞因子、诱导细胞凋亡和酶活性。

[0097] 术语“偶联物”或“抗体偶联物”是指与一种或多种药剂连接的抗体。抗体可以通过共价键或接头与药剂共价连接。在某些实施方案中,接头与抗体共价结合,也与药剂共价结合。在某些实施方案中,接头通过非共价方式与抗体和/或药剂连接。在某些实施方案中,接头通过共价键与药剂连接,并通过特异性结合与抗体连接。在某些实施方案中,接头是可以特异性结合抗体的部分,例如,与抗体的Fc区结合的抗体。在某些实施方案中,偶联物包含通过非共价方式与一种或多种药剂连接的抗体。

[0098] 术语“对照”或“参考”在指一种物质时,是指一种用作标准或比较点的组成,其他测试结果是针对该组成进行测量的。在某些实施方案中,“对照”或“参考”是一种已知不含分析物(“阴性对照”)或含有分析物(“阳性对照”)的组成。阳性对照可包含已知浓度的分析物。“对照”和“阳性对照”可指包含已知浓度分析物的组成。“阳性对照”可用于建立测定性能特征,是药剂(例如分析物)完整性的可用指标。在某些实施方案中,适当的“对照”或“参考”是指其中只改变一种元素,以确定该元素的作用。在某些实施方案中,对照是指在处理(例如用本文所述的RNAi试剂)之前的靶基因(例如在细胞或对象内)水平。

[0099] 术语“对照”或“参考”也意指测量的基线水平,取决于使用该术语的上下文。测量的基线水平是标准或比较点,测量结果是针对其进行比较的。在某些实施方案中,“对照”或“参考”是指在细胞、组织、器官或对象未经药剂(例如RNAi试剂)处理的情况下,所述细胞、组织、器官或对象中某些生物活性或物质的测量水平,例如基因的表达水平、该基因的mRNA拷贝数或由该基因编码的蛋白质的水平。在一些实施方案中,“对照”或“参考”是指在一组健康对象(例如在某些地理或人口限制内或任何其它可适合于研究某些疾病或病症的限制内的一般人群,该人群不患有某些疾病或病症,例如肝病)中,细胞、组织、器官或对象中某种生物活性或物质(例如肝脏的某种酶活性)的平均测量水平。

[0100] 术语“对照”可用于“对照个体”,“对照个体”是具有相似病症的个体,例如,患有与接受治疗的个体相同的细胞增殖性疾病的个体,其年龄与接受治疗的个体大约相同(以确保疾病的阶段在治疗个体和对照个体中具有可比性)。接受治疗的个体(也称为“患者”或“对象”)可以是患有细胞增殖性疾病的胎儿、婴儿、儿童、青少年或成年人。

[0101] 术语“参考”也可用于“参考序列”。术语“参考序列”是指用作序列比较的基础的序列,例如核酸序列或氨基酸序列。

[0102] 术语“表位”是指与称为互补位的抗体分子可变区中的特异性抗原结合位点相互作用的抗原决定簇。单一抗原可具有多于一个表位。因此,不同的抗体可结合抗原的不同区域,并可具有不同的生物学效应。表位可以是构象的或线性的。构象表位由线性多肽链的不同片段在空间的并列氨基酸产生。线性表位是由多肽链中相邻的氨基酸残基产生。在某些情况下,表位可包括抗原上的糖、磷酸基或磺酰基部分。

[0103] 术语“免疫偶联物”是指连接有药剂的抗体。在某些实施方案中,免疫偶联物中的药剂是治疗药剂或诊断试剂。在某些实施方案中,药剂是肽或小分子药物。肽或小分子药物可与恒重链的C端或可变轻链和/或重链的N端连接。

[0104] 术语“免疫偶联物”是指通过共价连接与肽或小分子药物融合的抗体。肽或小分子药物可与恒定重链的C端或可变轻链和/或重链的N端连接。

[0105] 在本文中使用的术语“改善”、“提高”或“降低”表示相对于基线/对照/参考测量的值或参数,例如在本文描述的治疗开始前在细胞或组织中的测量,或在没有本文描述的治

疗的情况下在细胞或组织中的测量,在开始本文描述的治疗之前在同一个体中的测量,或在没有本文描述的治疗的情况下在对照个体中的测量(或来源于多个对照个体的标准测量,例如多个对照个体的平均值)。

[0106] 在描述药剂活性水平的上下文中,术语“抑制”、“降低”和“减少”指的是这种水平在统计学上显著降低。可以降低,例如,至少10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%,或低于检测方法的检测水平。

[0107] 术语“预防”是指在对象中减少疾病症状的发生。如上所述,所述预防可以是完全的(没有可检测到的症状)或部分的,使得观察到的症状比没有治疗时可能出现的症状要少。

[0108] 本文所使用的术语“重组”,当与多肽或多核苷酸有关时,是指不是天然存在的多肽或多核苷酸,其可通过以通常不会一起出现的排列方式组合多核苷酸或多肽而产生。本文所使用的术语“重组细胞”是指包含一种或更多种(例如两种、几种)异源多核苷酸的非天然存在的宿主细胞。术语“宿主细胞”意指任何易受核酸构建体或表达载体转化、转染、转导等影响的细胞类型。

[0109] 短语“小分子药物”是指分子实体,通常是有机或有机金属,其不是聚合物,具有药用活性,并且分子量小于约2kDa、小于约1kDa、小于约900Da,小于约800Da或小于约700Da。该术语包括除了蛋白质或核酸之外的大多数被称为“药物”的药用化合物,但小肽或核酸类似物可以被认为是小分子药物。实例包括化疗抗癌药和酶抑制剂。小分子药物可以通过合成、半合成(即从天然存在的前体)或生物方法获得。

[0110] 本文所使用的术语“特异性结合”或“特异性地结合”是指在结合发生的环境中区分可能的结合对象的能力。在一些实施方案中,当其他潜在抗体存在时,与一种特定抗原相互作用,例如优先相互作用的抗体被称为“特异性结合”与其相互作用的抗原。在一些实施方案中,通过检测或确定抗体与其靶向抗原之间的结合程度来评估特异性结合。在一些实施方案中,通过检测或确定抗体-抗原复合物的解离程度来评估特异性结合。在一些实施方案中,通过检测或确定抗体与另一种抗体与其靶标之间的替代相互作用竞争的能力来评估特异性结合。在一些实施例中,通过在一定浓度范围内进行此类检测或测定来评估特异性结合。通常,抗体通过其抗原结合结构域结合表位,并且该结合需要抗原结合结构域和表位之间的某种互补性。因此,当抗体通过其抗原结合结构域与表位结合比其与随机的、不相关的表位结合更容易时,所述抗体被称为“特异性结合”该表位。术语“特异性”在本文中用于限定特定抗体结合特定表位的相对亲和力。例如,与抗体“B”相比,抗体“A”可以被认为对给定表位具有更高的特异性,或者与相关表位“D”相比,抗体“A”可以被认为对结合表位“C”具有更高的特异性。在一些实施方案中,如果抗体或其抗原结合片段与抗原形成的复合物的解离常数(Kd)为 10^{-6} M或更小、 10^{-7} M或更小、 10^{-8} M或更小、 10^{-9} M或更小,或 10^{-10} M或更小,则所述抗体或抗体片段对抗原“具有特异性”。在某些实施方案中,使用实施例4-7描述的测定法,或基本相似的方法来测定抗原结合分子与细胞表面表达的人A2aR的优先结合来显示抗原结合分子(例如抗人A2aR抗体或其抗原结合片段)的特异性结合。

[0111] 本文所使用术语“对象”是指哺乳动物。在某些实施方案中,对象为非人灵长类动物或啮齿类动物。在某些实施方案中,对象是人。在某些实施方案中,对象是患者,例如,患有或疑似患有某种疾病的人患者。在一些实施方案中,对象是患有或疑似患有TAZ疾病或

TAZ相关疾病的人患者。

[0112] 当提及核酸或其片段时,术语“基本相同”或“实质相似”表示当与另一核酸(或其互补链)进行适当的核苷酸插入或缺失最佳比对时,存在与该核苷酸序列至少约95%的相同,更优选至少约96%、97%、98%或99%的核苷酸碱基相同,其通过任意众所周知的序列相同算法测定,例如FASTA、BLAST或Gap法,如下讨论。在某些情况下,与参考核酸分子具有基本相同的核酸分子可以编码具有与参考核酸分子编码的多肽相同或基本相似的氨基酸序列的多肽。

[0113] 当应用于多肽时,术语“基本相同”、“实质相似”、“基本相似性”或“基本相似”是指当通过程序例如GAP或BESTFIT使用默认间隙权重进行最佳比对时,两个肽序列共享至少95%的序列相同,甚至更优选至少98%或99%的序列相同。优选地,不相同的残基位点因保守氨基酸取代而不同。“保守氨基酸取代”是指一个氨基酸残基被另一个具有相似化学性质(例如,电荷或疏水性)侧链(R基团)的氨基酸残基取代。一般来说,保守的氨基酸取代不会实质改变蛋白质的功能特性。在两个或更多个氨基酸序列因保守取代而彼此不同的情况下,可以上调序列相同百分比或相似度以校正取代的保守性。进行这种调整的方法是本领域技术人员所熟知的。参见,例如,Pearson(1994)MethodsMol.Biol.24:307-331。具有相似化学性质侧链的氨基酸组的实例包括:(1)脂肪族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;(2)脂肪族羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;(3)含酰胺侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;(4)芳香族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;(5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;(6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸,(7)含硫侧链:半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保守氨基酸取代组是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。或者,保守替换是在Gonnet等人(1992)Science 256:1443-1445中公开的PAM250对数似然矩阵中具有正值的任何变化。“适度保守”替换是在PAM250对数似然矩阵中具有非负值的任何变化。

[0114] 多肽的序列相似性,也称为序列同一性,通常使用序列分析软件测定。蛋白质分析软件使用分配给各种替换、删除和其他修饰(包括保守氨基酸替换)的相似性度量来匹配相似序列。例如,GCG软件包含诸如Gap和Bestfit等程序,这些程序可以使用默认参数来确定密切相关的多肽(例如来自不同生物物种的同源多肽,或野生型蛋白质与其突变蛋白的同源性多肽)之间的序列同源性或序列同一性。参见,例如,GCG版本6.1。多肽序列也可以通过FASTA使用默认或推荐参数进行比较,这是GCG版本6.1中的一个程序。FASTA(例如,FASTA2和FASTA3)提供查询和搜索序列之间最佳重叠区域的比对和序列相同百分比(Pearson(2000)同上)。当将本发明的序列与包含来自不同生物体的大量序列的数据库进行比较时,另一种优选算法是使用默认参数的计算机程序BLAST,尤其是BLASTP或TBLASTN。参见,例如,Altschul等人,(1990)J.Mol.Biol.215:403-410和Altschul等人,(1997)Nucleic Acids Res.25:3389-402。术语“序列同一性”也指一对核酸或多肽分子之间的比较,例如,两个核苷酸序列之间的相关性。通常,比对序列以获得最高阶的匹配度。

[0115] 术语“治疗”是指改善与疾病或病症相关的一种或更多种症状。因此,这些术语指的是在治疗或改善损伤、疾病、病理或病症方面取得成功的任何标志,包括预防或延迟疾病或病症的一种或多种症状发作;降低疾病或病症的一种或多种症状的严重程度或频率;任何客观或主观参数,例如减排;缓解;症状减轻或患者更能忍受损伤、病理或病症;退化或衰

退的速度减慢;退化终点虚弱减轻;和/或改善患者的身心健康。“治疗”还可包括预防性治疗。

[0116] 短语“向有需要的患者”、“向需要治疗的患者”或“需要治疗的对象”包括在细胞增殖性疾病的治疗中,将受益于施用本公开的抗体的对象(例如哺乳动物对象)。

[0117] 术语“治疗有效量”、“药理有效量”、“生理有效量”或“有效量”可互换使用,是指足以改善疾病或病症的至少一种症状的活性剂的量。例如,对于给定的参数,治疗有效量将显示增加或减少至少5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%、95%、99%或至少100%。疗效也可表示为增加或减少“倍”数。例如,治疗有效量可具有比对照至少1.2倍、1.5倍、2倍、5倍或更多的效果。精确的量将取决于许多因素,例如特定的活性剂、组合物的组分和物理特性、预期的患者群体、患者的考虑因素,包括体重、性别等,并且可容易地由本领域技术人员基于此处提供的信息或相关文献中提供的其他信息确定。

[0118] 本文所使用的术语“变体”是指通过在前体多肽或多核苷酸(例如,“亲本”多肽或多核苷酸)中将插入、替换或删除一个或多个氨基酸或核苷酸合并而得到的多肽(例如抗体)或多核苷酸。在某些实施方案中,变体多肽或多核苷酸具有与亲本多肽或多核苷酸的全氨基酸或核苷酸序列至少约85%的氨基酸或核苷酸序列相同,例如约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%的氨基酸或核苷酸序列相同。蛋白质或肽的变体基本上保持蛋白质的结构、功能或活性。例如,抗体的变体保持特异性结合其抗原的功能或活性和/或调节,例如抑制抗原活性。在多核苷酸的情况下,其变体保持其亲本多核苷酸的功能或活性。例如,变体多核苷酸可以编码与亲本多核苷酸编码的多肽具有相似功能或活性的蛋白质或肽。

[0119] 本文所使用的术语“A2aR”是指腺苷型A2A受体。除非另有说明(例如具体提及人A2aR),术语“A2aR”包括来自例如人、灵长类动物、啮齿动物、犬科动物、猫科动物、马科动物和牛科动物的所有哺乳动物物种的天然A2aR。A2aR的核苷酸和氨基酸序列是已知的并且可见于例如GenBank Accession Nos.NP_000666.2、NP_033760.2、XP_038954384.1、EHH65694.1、EAW59658.1、XP_015313061.1、NP_445746.3、和XP_001095531.1,其每一个的全部内容都通过引用并入本文。

[0120] 以下是示例性人A2aR氨基酸序列:

```
MPIMGSSVYITVELAIAVLAILGNVLCWAVWLNLSNLQNVNTNYFVVS
AAADIAVGVLAIPFAITISTGFCAACHGCLFIACFVLVLTQSSIFSLLAIAI
DRYIAIRIPLRYNGLVTGTRAKGIIAICWVLSFAIGLTPMLGWNNCGQPK
EGKNHSQGCQEGQVACLFDVVPNMVMVYFNFFACVLVPLLLMLGV
YLRIFLAARRQLKQMESQPLPGERARSTLQKEVHAAKSLAIIVGLFALC
WLPLHIINCFTFFCPDCSHAPLWMLYLAIVLSHTNSVVNPFYAYRIREF
RQTFRKIIRSHVLRQQEPFKAAGTSARVLAAHGSDGEQVSLRLNGHPP
GVWANGSAPHPERRPNGYALGLVSGGSAQESQGNTGLPDVELLSHELKVCPEPPGLDDPLAQDGAGVS
```

(SEQ ID NO:)

[0121] 示例性人A2aR氨基酸序列在下方示出:

```
VPIMGSSVYITVELAIAVLAILGNVLCWAVWLNLSNLQNVNTNYFVV
SLAAADIAVGVLAIPFAITISTGFCAACHGCLFIACFVLVLTQSSIFSL
```

ATAIDRYIAIRIPLRYNGLVTGTRAKGIIAICWVLSFAIGLTPMLGWNN
CGQPKEGKNHSQCGEGQVACLFEDEVVPMNYMVYFNFFACVLVPL
LLMLGVYLRIFLAARRQLKQMESQPLPGERARSTLQKEVHAAKSL
AIIIVGLFALCWLPLHIINCFTFFCPDCNHAPLWMLYLAIVLSHTNSVV
NPFIIYAYRIRREFRQTFRKIIRSHVLRQQEPFKAAGTSARVLAAHGSDG
EQVSLRLNGHPPGVWANGSAPHPERRPNGYALGLVSGGSTQESQGN
TSLPDVELLSHELKGVCPPEPGLDDPLAQGGAGVS
(SEQ ID NO:)

[0122] 术语“抗A2aR抗体”或“A2aR抗体”是指特异性结合A2aR的抗体或多肽。在某些实施方案中,抗A2aR抗体能够抑制A2aR生物活性和/或抑制A2aR介导的下游信号通路。抗A2aR抗体包括含有一个或更多个CDR或可变区形式的抗原结合结构域的抗体或多肽。在某些实施方案中,本发明的抗A2aR抗体(以任何程度,包括显著地)阻断、拮抗、抑制或降低A2aR生物活性,包括由A2aR介导的下游事件,例如A2aR结合和下游信号传导、肿瘤生长的刺激、抗肿瘤免疫应答的抑制和免疫功能低下疾病状态下的免疫抑制。

[0123] 本文所使用的术语“A2aR疾病”或“A2aR相关疾病”是指由A2aR表达和/或活性引起或与之相关的疾病或紊乱。术语“A2aR疾病”或“A2aR相关疾病”包括受益于A2aR基因表达、复制或蛋白活性的调节(如抑制)的疾病、紊乱或病症。在某些实施方案中,A2aR疾病或A2aR相关疾病是癌症。

[0124] 二、A2aR抗体和抗原结合分子

[0125] 本发明提供一种特异性结合A2aR的A2aR抗原结合分子。本文所使用的术语“抗原结合分子”是指特异性结合特定抗原的蛋白质、多肽或分子复合物,其包含或由至少一个互补决定区(CDR)组成,所述互补决定区单独存在或与一个或多个其他CDR和/或框架区组合(FRs)。正如本文别处所定义的术语,在某些实施方案中,抗原结合分子是抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,本发明所述的抗原结合分子抑制A2aR的一种或多种生物学功能。

[0126] 1. 人源化的嵌合抗原结合分子

[0127] 本发明提供嵌合抗原结合分子,例如可特异性地结合A2aR的嵌合抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,本发明提供人源化的A2aR抗原结合分子,例如人源化抗体或其抗原结合片段。

[0128] 本发明涵盖人源化抗体。使非人抗体人源化的多个方法是本领域已知的。例如,人源化抗体可具有引入的来自非人来源的一个或更多个氨基酸。这些非人源氨基酸残基通常被称为“导入”残基,通常来自“导入”可变结构域。人源化基本上可以按照Winter和共事者(Jones等人(1986年),

《Nature》321:522-525;Riechmann等人(1988年),《Nature》332:323-327;Verhoeyen等人(1988年),《Science》239:1534-1536)的方法进行,即用人抗体的相应序列替换超变异区序列。因此,这样的“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利No.4,816,567),其中实质上小于完整人可变结构域的部分被来自非人物种的相应序列替换。在实践中,人源化抗体是典型的人抗体,其中一些超变量区残基和可能的一些FR残基被啮齿类动物抗体中类似位点的残基替换。

[0129] 用于制造人源化抗体的人可变结构域(轻链的和重链的)的选择对于降低抗原性是重要的。根据所谓的“最佳拟合”法,针对已知的人可变结构域序列的整个文库来筛选啮齿动物抗体的可变结构域的序列。将最接近于啮齿动物序列的人序列视作人源化抗体的人框架(FR)。参见例如Sims et al. (1993) *J Immunol.* 151:2296; Chothia et al. (1987) *J Mol. Biol.* 196:901。另一方法使用了来源于轻或重链的特定亚群的所有的人抗体的共有序列的特定框架。同一框架可用于几种不同的人源化抗体。参见例如Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta et al. (1993) *J Immunol.*, 151:2623。

[0130] 还通常期望抗体在保留其对抗原的高亲和力以及其他有利的生物学特性的情况下被人源化。为了实现这一目标,根据下述方法来制备人源化抗体,即利用亲本和人源化序列的三维模型,通过分析亲本序列和各种概念人源化产物的过程来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型是普遍可获得的,且为本领域技术人员所熟悉。可以说明并展示所选择的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构造结构的计算机程序也是可获得的。对这些显示的检测可以分析残基在候选免疫球蛋白序列功能中可能的作用,即对影响候选免疫球蛋白结合抗原能力的残基进行分析。以此方式,可以选择并组合接受序列和导入序列来获得FR残基,以达到所需的抗体特性,例如增加对(多个)靶抗原的亲和力。一般而言,超变异区残基直接且最基本地影响抗原的结合。

[0131] 本发明涵盖具有不同“水平”或“程度”的人源化的嵌合抗体。在某些实施方案中,本发明的嵌合抗体是“完全”人源化的,即重链和轻链可变区中的所有FR区都包含与相应的人FR序列基本相同或相同的序列。在某些实施方案中,本发明的嵌合抗体是“部分”人源化的,例如,重链和轻链可变区中的1、2、3、4、5、6或7个FR区包含与相应的人FR序列基本相同或相同的序列,而其余FR区包含与其他物种的相应FR序列基本相同或相同的序列,例如,小鼠、大鼠、兔、鸡和中国仓鼠的FR序列。

[0132] 在某些实施方案中,A2aR是人A2aR。示例性人A2aR具有SEQ ID NO: [[xx]]所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述A2aR是食蟹猴A2aR。示例性食蟹猴A2aR具有SEQ ID NO: [[xx]]所示的氨基酸序列。

[0133] 2. 示例性抗原结合分子的序列

[0134] A2aR抗原结合分子可以是单克隆抗体的形式;一种或更多种含有一个或多个A2aR抗原结合结构域的多肽片段的形式;或者是一种或多种编码一个或多个A2aR结合结构域的核酸的形式。在某些实施方案中,本发明提供人源化的A2aR抗体或其抗原结合片段。人源化抗体由国际专利公开No. W02022/072601 (国际专利申请PCT/US21/52819的601公布,于2021年9月30日提交)中公开的抗体人源化而成。人源化抗体的重链可变区和轻链可变区(“可变区”)命名如下。来源于601公布中的克隆1B5-3D7的可变区被称为“Hu1B5-Hn”和“Hu1B5-Ln”(分别代表重链可变区和轻链可变区)。来源于601公布中的克隆3F6-9G5的可变区被称为“Hu3F6-Hn”和“Hu3F6-Ln”(分别代表重链可变区和轻链可变区)。来源于601公布中的克隆3F8-12E9的可变区被称为“Hu3F8-Hn”和“Hu3F8-Ln”(分别代表重链可变区和轻链可变区)。上述命名法中“Hn”和“Ln”中的字母“n”是指数字。每个重链和轻链命名末端的数字“n”仅供识别之用。因此,如果一条重链和一条轻链具有除了“H”和“L”(分别象征重链和轻链)之外,完全相同的其他命名,那么命名对于这两条特定的重链和轻链所形成的抗体的任何功能或特性没有任何意义。例如,除“H”和“L”之外,Hu1B5-H1和Hu1B5-L1的命名完全相

同,这些命名末尾的数字“1”仅供识别之用。由Hu1B5-H1和Hu1B5-L1形成的抗体等同于由Hu1B5-H1和其他轻链(例如Hu1B5-L2)形成的抗体。抗体可用其重链和轻链以“克隆-Hm/克隆-Ln”的格式来表示,其中“m”可与“n”相同或不同。例如,Hu3F6-H3/Hu3F6-L5表示的抗体意指其由重链Hu3F6-H3和轻链Hu3F6-L5组成,这两条链均来源于601公布中的克隆3F6-9G5。

[0135] 在本发明的多个示例性实施方案中,抗原结合分子,例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段,包含(1)重链可变区和(2)轻链可变区,所述重链可变区包含三个互补决定区(HCDR):HCDR1、HCDR2和HCDR3,其中HCDR1具有与选自SEQ ID NOs:1、2和3的氨基酸序列有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;HCDR2具有与选自SEQ ID NOs:4至9以及89的氨基酸序列有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;HCDR3具有与SEQ ID NO:10或11所示的氨基酸序列有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;所述轻链可变区包含三个互补决定区(LCDR):LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中LCDR1具有与选自SEQ ID NOs:12和13的氨基酸序列有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;LCDR2具有与SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;以及LCDR3具有与选自SEQ ID NOs:15或16的氨基酸序列有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列;其中所述抗原结合分子特异性结合人A2aR。对应于本发明公开的示例性抗人A2aR单克隆抗体的示例性HCDR和LCDR的氨基酸序列如表1和2所示。

[0136] CDR的氨基酸序列边界可由本领域技术人员使用多种已知编号方案中的任意一种来确定,包括Kabat等人所描述的方案,同上(“Kabat”编号方案);Al-Lazikani等人,1997, J.Mol.Biol.,273:927-948所描述的方案(“Chothia”编号方案);MacCallum等人,1996, J.Mol.Biol.262:732-745所描述的方案(“Contact”编号方案);Lefranc等人, Dev.Comp.Immunol.,2003,27:55-77所描述的方案(“IMGT”编号方案);和Honegge和Pluckthun,J.Mol.Biol,2001,309:657-70所描述的方案(“Aho”编号方案);其中每一个方案都通过引用整体并入本文。CDR的氨基酸序列边界也可通过结合两种编号方案(例如Kabat和IMGT编号方案)来确定。表1示出了本发明的示例性抗体的重链CDR序列,其中CDR序列是通过将基于Kabat和IMGT编号方案的CDR结合来定义的。表2示出了本发明的示例性抗体的轻链CDR序列,其中CDR序列是通过将基于Kabat和IMGT编号方案的CDR结合来定义的。在表1和表2中,1B5和1B5-2指的是来源于‘601公布的克隆1B5-3D7的CDR。3F6和3F6-2指的是来源于‘601公布的克隆3F6-9G5的CDR。3F8和3F8-2指的是来源于‘601公布的克隆3F8-12E9的CDR。

[0137] 在某些实施方案中,本发明涉及抗原结合分子,例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段,其包含基于Kabat和IMGT编号方案或其组合而定义的CDR。因此,在某些实施方案中,本发明涉及抗原结合分子,例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段,其包含(1)具有与选自表1中列出的HCDR1序列的氨基酸序列约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的或者较之包含有1、2或3个突变的氨基酸序列的HCDR1;(2)具有与选自表1中列出的HCDR2序列的氨基酸序列约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的或者较之包含有1、2、3、4、5或6个突变的氨基酸序列的HCDR2;

(3) 具有与选自表1中列出的HCDR3序列的氨基酸序列约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的或者较之包含有1或2个突变的氨基酸序列的HCDR3; (4) 具有与选自表2中列出的LCDR1序列的氨基酸序列约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的或者较之包含有1或2个突变的氨基酸序列的LCDR1; (5) 具有与选自表2中列出的LCDR2序列的氨基酸序列约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的或者较之包含有1或2个突变的氨基酸序列的LCDR2; 以及 (6) 具有与选自表2中列出的LCDR3序列的氨基酸序列约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的或者较之包含有1或2个突变的氨基酸序列的LCDR3。本文所使用术语“突变”是指与参考相比氨基酸序列的变化或差异(替换、插入或缺失)。在某些实施方案中,突变是一种保守替换。

[0138] 本文所使用的CDR中的“位点”是指从CDR的N端开始计数的氨基酸。例如,HCDR1中的位点1是指HCDR1中的第一个氨基酸。因此,在mAB 1B5中,基于结合了Kabat和IMGT编号方案的编号方案的HCDR1的位点1是甘氨酸(G)。

[0139] 如表1和表2所示出的,CDR的某些位点较为保守。例如,表1中HCDR1的第一个位点高度保守,其含有“G”。另一方面,CDR中的某些位点保守性较低。例如,表1中HCDR1的第三个位点保守性较低,其可以是“A”或“T”。在某些实施方案中,突变发生于CDR中一个或多个保守性较低的位点。

[0140] 表1: 示例性抗体的重链CDR的氨基酸序列(Kabat与IMGT编号方案的组合)

	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
1B5	GFTFTRFWMN	1	RIDPYDSETQYNHKFWD	4	GRSLYGKGDY	10
1B5-2	GFTFTRFWMN	1	RIDPYDSETQYAHKFWD	5	GRSLYGKGDY	10
3F6	GFAFTSYWMN	2	RIDPSDSEAHYHHKFWG	6	LRSLYGKGDY	11
3F6-2	GFAFTSYWMN	2	RIDPSDSEAHYAHKFWG	7	LRSLYGKGDY	11
3F8	GFTFTRYWMN	3	RIDPSDSETHYNHKFWG	8	LRSLYGKGDY	11
3F8-2	GFTFTRYWMN	3	RIDPSDSETHYNAKFWG	9	LRSLYGKGDY	11
3F8-3	GFTFTRYWMN	3	RIDPSDSETHYAHKFWG	89	LRSLYGKGDY	11
N/A	GFX ₁ FTX ₂ X ₃ WMN		RIDPX ₄ DSEX ₅ X ₆ YX ₇ X ₈ KFWX ₉		X ₁₀ RSLYGKGDY	

[0141] 如本文中所使用的,X₁为A或T,X₂为R或S,X₃为F或Y,X₄为S或Y,X₅为A或T,X₆为H或Q,X₇为A,H或N,X₈为A或H,X₉为D或G,以及X₁₀为G或L。

[0142] 表2: 示例性抗原结合分子的轻链CDR的氨基酸序列(Kabat与IMGT编号方案的组合)

	LCDR1	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
1B5 & 1B5-2	RSSQSIVHSNGNTYLE	12	KVSNRFS	14	FQGSHVPLT	15
3F6 & 3F6-2	RSSQSLVHRNGNTYLE	13	KVSNRFS	14	YQGSHVPLT	16
3F8 & 3F8-2 & 3F8-3	RSSQSIVHSNGNTYLE	12	KVSNRFS	14	YQGSHVPLT	16
N/A	RSSQSX ₁₁ VHX ₁₂ NGNTYLE				X ₁₃ QGSHVPLT	

[0143] 如本文中所使用的, X₁₁为L或I, X₁₂为R或S, 以及X₁₃为F或Y。

[0144] 在某些实施方案中, 本发明提供人源化抗体。表3至8示出了本发明的示例性人源化抗体或其抗原结合片段的CDR和FR序列。

表3: 1B5-3D7来源的抗体重链可变区结构域的氨基酸序列

	FR1	SEQ ID NO	HCDR1	SEQ ID NO	FR2	SEQ ID NO	HCDR2	SEQ ID NO	FR3	SEQ ID NO	HCDR3	SEQ ID NO	FR4	SEQ ID NO
Hu1B 5-H1	QVQL VQSG AEVK KPGAS VKVS CKAS	17	GFTFTR FWMN	1	WVRQA PGQGLE WMG	22	RIDPYDS ETQYNH KFWD	4	RVTMTRD TSTSTVY MELSSLRS EDTAVYY C	25	GRSLYGK GDY	10	WGQG TTVTV SS	32
Hu1B 5-H2	EVQL VQSG AEVK KPGAS VKVS CKTS	18	GFTFTR FWMN	1	WVRQA PGQGLE WMG	22	RIDPYDS ETQYNH KFWD	4	RVTMTVD TSTSTVY MELSSLRS EDTAVYY C	26	GRSLYGK GDY	10	WGQG TTVTV SS	32
Hu1B 5-H2. 1	EVQL VQSG AEVK KPGAS VKVS CKTS	18	GFTFTR FWMN	1	WVRQA PGQGLE WIG	23	RIDPYDS ETQYNH KFWD	4	RVTMTVD TSTSTVY MELSSLRS EDTAVYY C	26	GRSLYGK GDY	10	WGQG TTVTV SS	32
Hu1B 5-H3	EVQL VQSG AEVK KPGAS VKVS CKTS	18	GFTFTR FWMN	1	WVRQA PGQGLE WIG	23	RIDPYDS ETQYNH KFWD	4	RATLTVD TSSSTVY MELSSLRS EDTAVYY C	27	GRSLYGK GDY	10	WGQG TTVTV SS	32

Hu1B 5-H4	EVQL	18	GFTFTR FWMN	1	WVRQA	23	RIDPYDS	4	RATLTVD	28	GRSLYGK GDY	10	WGQG	32
	VQSG				PGQGLE		ETQYNH		MELSSLRS				TTVTV	
	AEVK				WIG		KFWD		EDTAVYY				SS	
	KPGAS								C					
	VKVS													
CKTS														
Hu1B 5-H5	EVQL	18	GFTFTR FWMN	1	WVRQA	23	RIDPYDS	5	RATLTVD	28	GRSLYGK GDY	10	WGQG	32
	VQSG				PGQGLE		ETQYAH		MELSSLRS				TTVTV	
	AEVK				WIG		KFWD		EDTAVYY				SS	
	KPGAS								C					
	VKVS													
CKTS														
Hu1B 5-H6	EVQLV	19	GFTFTR FWMN	1	WVRQM	24	RIDPYDS	4	HATLSVD	29	GRSLYGK GDY	10	WGQG	32
	QSGA				PGKGLE		ETQYNH		QWSSLKA				TTVTV	
	EVKK				WIG		KFWD		SDTAMYY				SS	
	PGESL								C					
	RISCK													
TS														

表4: 1B5-3D7来源的抗体轻链可变区结构域的氨基酸序列

	FR1	SEQ ID NO	LCDR1 ID NO	SEQ ID NO	FR2	SEQ ID NO	LCDR2 ID NO	SEQ ID NO	FR3	SEQ ID NO	LCDR3 ID NO	SEQ ID NO	FR4	SEQ ID NO
Hu1B 5-L1	DVVMT QSPLSL PVTLG QPASIS C	34	RSSQSI VHSN GNTYL E	12	WFQQR PGQSPR RLIY	42	KVSNRFS	14	GVPDRF SGSGSG TDFTLK ISRVEA EDVGV YYC	47	FQGSHV PLT	15	FGGGT KVEIK	50
Hu1B 5-L2	DVVMT QSPLSL PVTLG QPASIS C	34	RSSQSI VHSN GNTYL E	12	WYQQR PGQSPR RLIY	43	KVSNRFS	14	GVPDRF SGSGSG TDFTLK ISRVEA EDVGV YYC	47	FQGSHV PLT	15	FGGGT KVEIK	50
Hu1B 5-L3	DVVMT QSPLSL PVTLG QPASIS C	34	RSSQSI VHSN GNTYL E	12	WYQQR PGQSPR LLIY	44	KVSNRFS	14	GVPDRF SGSGSG TDFTLK ISRVEA EDVGV YYC	47	FQGSHV PLT	15	FGGGT KVEIK	50
Hu1B 5-L4	DVVMT QSPLSL PVTPG EPASIS C	35	RSSQSI VHSN GNTYL E	12	WYLQK PGQSPQ LLIY	45	KVSNRFS	14	GVPDRF SGSGSG TDFTLKI SRVEAE DVGVI YC	47	FQGSHV PLT	15	FGGGT KVEIK	50

Hu1B 5-L5	DIVMT	36	RSSQSI	12	WYQQK	46	KVSNRFS	14	GVPDRF	48	FQGSHV	15	FGGGT	50
	QSPDS		VHSN		PGQPPK		TDFTLTI		PLT		KVEIK			
	LAVSL		GNTYL		LLIY		SSLQAE							
	GERATI		E				DVAVYY							
	NC						C							

表5:3F6-9G5来源的抗体重链可变区结构域的氨基酸序列

	FR1	SEQ ID NO:	HCD R1	SEQ ID NO:	FR2	SEQ ID NO:	HCD R2	SEQ ID NO:	FR3	SEQ ID NO:	HCD R3	SEQ ID NO:	FR4	SEQ ID NO:
Hu3F6-H1	QVQLV QSGAEV KPKGAS VKVSCK AS	17	GFA FTSY WM N	2	WVRQA PGQGLE WMG	22	EAHYHH KFWG	6	RVTMTRDTS TSTVYMELS SLRSED TAV YYC	25	LRSLY GKGDY	11	WGHG TTVTV SS	33
Hu3F6-H2	EVQLVQ SGAEVK KPGASV KVSCKT S	18	GFA FTSY WM N	2	WVRQA PGQGLE WMG	22	EAHYHH KFWG	6	RVTMTVDTS TSTVYMELS SLRSED TAV YYC	26	LRSLY GKGDY	11	WGHG TTVTV SS	33
Hu3F6-H3	EVQLVQ SGAEVK KPGASV KVSCKT S	18	GFA FTSY WM N	2	WVRQA PGQGLE WIG	23	EAHYHH KFWG	6	RATLTV DTS SSTVYMELS SLRSED TAV YYC	27	LRSLY GKGDY	11	WGHG TTVTV SS	33
Hu3F6-	EVQLVQ	18	GFA	2	WVRQA	23	RIDPSDS	6	RATLTV DKS	28	LRSLY	11	WGHG	33

H4	SGAEVK KPGASV KVSCKT S		FTSY WM N		PGQGLE WIG		EAHYHH KFWG		SSTVYMELS SLRSED TAV YYC		GKGDY		TTVTV SS	
Hu3F6- H5	EVQLVQ SGAEVK KPGASV KVSCKT S	18	GFA FTSY WM N	2	WVRQA PGQGLE WIG	23	RIDPSDS EAHYAH KFWG	7	RATLTVDKS SSTVYMELS SLRSED TAV YYC	28	LRSLY GKGDY	11	TTVTV SS	33
Hu3F6- H6	EVQLVQ SGAEVK KPGESL RISCKA S	20	GFA FTSY WM N	2	WVRQM PGKGLE WIG	24	RIDPSDS EAHYHH KFWG	6	HATLSVDKS SSTVYLQWS SLKASDTAM YYC	29	LRSLY GKGDY	11	TTVTV SS	33

表6:3F6-9G5来源的抗体轻链可变区结构域的氨基酸序列

	FR1	SEQ ID NO:	LCDR1	SEQ ID NO:	FR2	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	FR3	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:	FR4	SEQ ID NO:
Hu3F6-L1	DVVMT QSPLSLP VTLGQP ASISC	34	RSSQS LVHRN GNTYL E	13	WFQQR GQSPRR LIY	42	KVSNRF S	14	GVPDRFS GSGSGTD FTLKISRV EAEDVGV YYC	47	YQGS H VPLT	16	FGGG TKVE IK	50
Hu3F6-L2	DVVMT QSPLSLP VTLGQP ASISC	34	RSSQS LVHRN GNTYL E	13	WYQQR PGQSPR RLIY	43	KVSNRF S	14	GVPDRFS GSGSGTD FTLKISRV EAEDVGV	47	YQGS H VPLT	16	FGGG TKVE IK	50

								YYC						
Hu3F 6-L3	DVVMT QSPLSLP VTLGQP ASISC	34	RSSQS LVHRN GNTYL E	13	WYQQR PGQSPR LLIY	44	KVSNRF S	14	GVPDRFS GSGSGTD FTLKISR V EAEDVGV YYC	47	YQGS H VPLT	16	FGGG TKVE IK	50
Hu3F 6-L4	DIVMTQ TPLSLS VTPGQP ASISC	37	RSSQS LVHRN GNTYL E	13	WYLQK PGQSPQ LLIY	45	KVSNRF S	14	GVPDRFS GSGSGTD FTLKISR V EAEDVGV YYC	47	YQGS H VPLT	16	FGGG TKVE IK	50
Hu3F 6-L5	DVVMT QTPLSL SVTPGQ PASISC	38	RSSQS LVHRN GNTYL E	13	WYLQK PGQSPQ LLIY	45	KVSNRF S	14	GVPDRFS GSGSGTD FTLKISR V EAEDVGV YYC	47	YQGS H VPLT	16	FGGG TKVE IK	50
Hu3F 6-L6	DIVMTQ TPPSLPV NPGEPA SISC	39	RSSQS LVHRN GNTYL E	13	WYLQK PGQSPQ LLIY	45	KVSNRF S	14	GVPDRFS GSGSGSD FTLKISW V VEAEDVG VYYC	49	YQGS H VPLT	16	FGGG TKVE IK	50
Hu3F 6-L7	DVVMT QTPPSLP VNPGE P ASISC	40	RSSQS LVHRN GNTYL E	13	WYLQK PGQSPQ LLIY	45	KVSNRF S	14	GVPDRFS GSGSGSD FTLKISW V VEAEDVG VYYC	49	YQGS H VPLT	16	FGGG TKVE IK	50
Hu3F 6-L8	DVVMT QSPLSLP	35	RSSQS LVHRN	13	WYLQK PGQSPQ	45	KVSNRF S	14	GVPDRFS GSGSGTD	47	YQGS H VPLT	16	FGGG TKVE	50
	VTPGEP ASISC		GNTYL E		LLIY				FTLKISR V EAEDVGV YYC				IK	

表7:3F8-12E9来源的抗体重链可变区结构域的氨基酸序列

	FR1	SEQ ID NO:	HCDR1	SEQ ID NO:	FR2	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	FR3	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:	FR4	SEQ ID NO:
Hu3F8 -H1	QVQLVQ SGAEVK KPGASV KVSCKA S	17	GFTFT RYWM N	3	WVR QAPG QGLE WMG	22	RIDPSD SETHYN HKFWG	8	RVTMTRD TSTSTVY MELSSLR SEDTAVY YC	25	LRSLY GKGD Y	11	WGQG TTVTV SS	32
Hu3F8 -H2	EVQLVQ SGAEVK KPGASV KVSCKA S	21	GFTFT RYWM N	3	WVR QAPG QGLE WMG	22	RIDPSD SETHYN HKFWG	8	RVTMTVD TSTSTVY MELSSLR SEDTAVY YC	26	LRSLY GKGD Y	11	WGQG TTVTV SS	32
Hu3F8 -H3	EVQLVQ SGAEVK KPGASV KVSCKA S	21	GFTFT RYWM N	3	WVR QAPG QGLE WIG	23	RIDPSD SETHYN HKFWG	8	RATLTVD TSTSTVY MELSSLR SEDTAVY YC	30	LRSLY GKGD Y	11	WGQG TTVTV SS	32
Hu3F8 -H4	EVQLVQ SGAEVK KPGASV KVSCKA S	21	GFTFT RYWM N	3	WVR QAPG QGLE WIG	23	RIDPSD SETHYN HKFWG	8	RATLTVD KSTSTVY MELSSLR SEDTAVY YC	31	LRSLY GKGD Y	11	WGQG TTVTV SS	32

Hu3F8 -H5	EVQLVQ								RATLTVD					
	SGAEVK		GFTFT		WVR		RIDPSD		KSTSTVY		LRSLY		WGQG	
	KPGASV	21	RYWM	3	QAPG	23	SETHYN	9	MELSSLR	31	GKGD	11	TTVTV	32
	KVSCKA		N		QGLE		AKFWG		SEDTAVY		Y		SS	
	S				WIG				YC					
Hu3F8 -H5.1	EVQLVQ								RATLTVD					
	SGAEVK		GFTFT		WVR		RIDPSD		KSTSTVY		LRSLY		WGQG	
	KPGASV	21	RYWM	3	QAPG	23	SETHYA	89	MELSSLR	31	GKGD	11	TTVTV	32
	KVSCKA		N		QGLE		HKFWG		SEDTAVY		Y		SS	
	S				WIG				YC					
Hu3F8 -H6	EVQLVQ								HATLSVD					
	SGAEVK		GFTFT		WVR		RIDPSD		KSSSTVY		LRSLY		WGQG	
	KPGESL	20	RYWM	3	QMP	24	SETHYN	8	LQWSSLK	29	GKGD	11	TTVTV	32
	RISCKAS		N		GKGL		HKFWG		ASDTAMY		Y		SS	
					EWIG				YC					

表8: 3F8-12E9来源的抗体轻链可变区结构域的氨基酸序列

	FR1	SEQ ID NO:	LCDR1	SEQ ID NO:	FR2	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	FR3	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:	FR4	SEQ ID NO:
Hu3F8-L1	DVVMTQS		RSSQSI		WFQQR		KVSNR		GVPDRFSGS				FGGG	
	PLSLPVTL	34	VHSNG	12	PGQSPR	42	FS	14	GSGTDFTLK	47	YQGS	16	TKVE	50
	GQPASISC		NTYLE		RLIY				ISRVEAEDV		HVPLT		IK	
									GVYYC					
Hu3F8-L2	DVVMTQS		RSSQSI		WYQQR		KVSNR		GVPDRFSGS				FGGG	
	PLSLPVTL	34	VHSNG	12	PGQSPR	43	FS	14	GSGTDFTLK	47	YQGS	16	TKVE	50
	GQPASISC		NTYLE		RLIY				ISRVEAEDV		HVPLT		IK	
									GVYYC					

Hu3F 8-L3	DVVMTQS		RSSQSI		WYQQR		KVSNR		GVPDRFSGS		YQGS		FGGG	
	PLSLPVTL	34	VHSNG	12	PGQSPR	44	FS	14	GSGTDFTLK	47	HVPLT	16	TKVE	50
	GQPASISC		NTYLE		LLIY				ISRVEAEDV				IK	
									GVYYC					
Hu3F 8-L4	DIVMTQS		RSSQSI		WYLQK		KVSNR		GVPDRFSGS		YQGS		FGGG	
	PLSLPVTP	41	VHSNG	12	PGQSPQ	45	FS	14	GSGTDFTLK	47	HVPLT	16	TKVE	50
	GEPASISC		NTYLE		LLIY				ISRVEAEDV				IK	
									GVYYC					
Hu3F 8-L5	DVVMTQS		RSSQSI		WYLQK		KVSNR		GVPDRFSGS		YQGS		FGGG	
	PLSLPVTP	35	VHSNG	12	PGQSPQ	45	FS	14	GSGTDFTLK	47	HVPLT	16	TKVE	50
	GEPASISC		NTYLE		LLIY				ISRVEAEDV				IK	
									GVYYC					

[0145] 表9至16示出了本发明的一些示例性抗体的FR序列。

表9:重链FR1的氨基酸序列

重链	序列	SEQ ID NO
Hu1B5-H1 ¹	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	17
Hu1B5-H2 ²	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTS	18
Hu1B5-H6	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKTS	19
Hu3F6-H6 ³	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKAS	20
Hu3F8-H2 ⁴	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS	21
	X14-V-Q-L-V-Q-S-G-A-E-V-K-K-P-G-A-S-V-K-V-S-C-K-X15-S (SEQ ID NO:) (不包括 SEQ ID NOs: 19 和 20) E-V-Q-L-V-Q-S-G-A-E-V-K-K-P-G-E-S-L-R-I-S-C-K-X16-S (SEQ ID NO:) (仅 SEQ ID NOs: 19 和 20)	

[0146] ¹代表Hu3F6-H1和Hu3F8-H1。

[0147] ²代表Hu1B5-H2.1、Hu1B5-H3、Hu1B5-H4、Hu1B5-H5、Hu3F6-H2、Hu3F6-H3、Hu3F6-H4和Hu3F6-H5。

[0148] ³代表Hu3F8-H6。

[0149] ⁴代表Hu3F8-H2、Hu3F8-H3、Hu3F8-H4、Hu3F8-H5和Hu3F8-5.1。

[0150] 如本文中所使用的，X14为E或Q，X15为A或T，以及X16为A或T。

表10:重链FR2的氨基酸序列

重链	序列	SEQ ID NO
Hu1B5-H1 ¹	WVRQAPGQGLEWMG	22

Hu1B5-H2.1 ²	WVRQAPGQGLEWIG	23
Hu1B5-H6 ³	WVRQMPGKGLEWIG	24
	W-V-R-Q-X17-P-G-X18-G-L-E-W-X19-G	

[0151] ¹代表Hu1B5-H2、Hu1B5-H2、Hu3F6-H1、Hu3F6-H2、Hu3F8-H1和Hu3F8-H2。

[0152] ²代表Hu1B5-3、Hu1B5-H4、Hu1B5-H5、Hu3F6-H3、Hu3F6-H4、Hu3F6-H5、Hu3F8-H3、Hu3F8-H4、Hu3F8-H5和Hu3F8-H5.1。

[0153] ³代表Hu3F6-H6和Hu3F8-H6。

[0154] 如本文中所使用的，X17为A或M，X18为K或Q，以及X19为I或M。

表11:重链FR3的氨基酸序列

重链	序列	SEQ ID NO:
Hu1B5-H1 ¹	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYC	25
Hu1B5-H2 ²	RVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYC	26
Hu1B5-H3 ³	RATLTVDTSSSTVYMELSSLRSEDVAVYYC	27
Hu1B5-H4 ⁴	RATLTVDKSSSTVYMELSSLRSEDVAVYYC	28
Hu1B5-H6 ⁵	HATLSVDKSSSTVYLQWSSLKASDTAMYYC	29
Hu3F8-H3	RATLTVDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYC	30
Hu3F8-H4 ⁶	RATLTVDKSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYC	31
	R-X20-T-X21-T-X22-D-X23-S-X24-S-T-V-Y-M-E-L-S-S-L-R-S-E-D-T-A-V-Y-Y-C (不包括 SEQ ID NO: 29)	

[0155] ¹代表Hu3F6-H1和Hu3F8-H1。

[0156] ²代表Hu1B5-H2.1、Hu3F6-H2和Hu3F8-H2。

[0157] ³代表Hu3F6-H3。

[0158] ⁴代表Hu1B5-H5、Hu3F6-H4和Hu3F6-H5。

[0159] ⁵代表Hu3F6-H6和Hu3F8-H6。

[0160] ⁶代表Hu3F8-H5和Hu3F8-H5.1。

[0161] 如本文中所使用的，X20为A或V，X21为L或M，X22为R或V，X23为K或T，以及X24为S或T。

表12:重链FR4的氨基酸序列

重链	序列	SEQ ID NO:
Hu1B5-H1 ¹	WGQGTTVTVSS	32
Hu3F6-H1 ²	WGHGTTVTVSS	33
	W-G-X25-G-T-T-V-T-V-S-S	

[0162] ¹代表来源于1B5-3D7和3F8-12E9的重链。

[0163] ²代表来源于3F6-9G5的重链。

[0164] 如本文中所使用的, X25为H或Q。

表13:轻链FR1的氨基酸序列

轻链	序列	SEQ ID NO
Hu1B5-L1 ¹	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC	34
Hu1B5-L4 ²	DVVMTQSPLSLPVTGPGEASISC	35
Hu1B5-L5	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	36
Hu3F6-L4	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISC	37
Hu3F6-L5	DVVMTQTPLSLSVTPGQPASISC	38
Hu3F6-L6	DIVMTQTPPSLPVNPGEPASISC	39
Hu3F6-L7	DVVMTQTPPSLPVNPGEPASISC	40
Hu3F8-L4	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISC	41
	D-X26-V-M-T-Q-X27-P-X28-S-L-X29-V-X30-X31-G-X32-P-A-S-I-S-C (不包括 SEQ ID NO: 36)	

[0165] ¹代表Hu1B5-L2、Hu1B5-L3、Hu3F6-L1、Hu3F6-L2、Hu3F6-L3、Hu3F8-L1、Hu3F8-L2和Hu3F8-L3。

[0166] ²代表Hu3F6-L8和Hu3F8-L5。

[0167] 如本文中所使用的, X26为I或V, X27为S或T, X28为D、L或P, X29为A、P或S, X30为N、S或T, X31为L或P, 以及X32为E或Q。

表14:轻链FR2的氨基酸序列

轻链	序列	SEQ ID NO
Hu1B5-L1 ¹	WFQQRPGQSPRRLIY	42
Hu1B5-L2 ²	WYQQRPGQSPRRLIY	43
Hu1B5-L3 ³	WYQQRPGQSPRLLIY	44
Hu1B5-L4 ⁴	WYLQKPGQSPQLLIY	45
Hu1B5-L5	WYQQKPGQPPKLLIY	46
	W-X33-X34-Q-X35-P-G-Q-X36-P-X37-X38-L-I-Y	

[0168] ¹代表Hu3F6-L1和Hu3F8-L1。

[0169] ²代表Hu3F6-L2和Hu3F8-L2。

[0170] ³代表Hu3F6-L3和Hu3F8-L3。

[0171] ⁴代表Hu3F6-L4、Hu3F6-L5、Hu3F6-L6、Hu3F6-L7、Hu3F6-L8、Hu3F8-L4和Hu3F8-L5。

[0172] 如本文中所使用的, X33为F或Y, X34为L或Q, X35为K或R, X36为P或S, X37为K、Q或R, 以及X38为L或R。

表15:轻链FR3的氨基酸序列

轻链	序列	SEQ ID NO
Hu1B5-L1 ¹	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC	47
Hu1B5-L5	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC	48
Hu3F6-L6 ²	GVPDRFSGSGSGSDFTLKISWVEAEDVGVYYC	49
	G-V-P-D-R-F-S-G-S-G-S-G-X39-D-F-T-L-X40-I-S-X41-X42-X43-A-E-D-V-X44-V-Y-Y-C	

[0173] ¹代表Hu1B5-L2、Hu1B5-L3、Hu1B5-L4、Hu3F6-L1、Hu3F6-L2、Hu3F6-L3、Hu3F6-L4、Hu3F6-L5、Hu3F6-L8、Hu3F8-L1、Hu3F8-L2、Hu3F8-L3、Hu3F8-L4、和Hu3F8-L5。

[0174] ²代表Hu3F6-L7。

[0175] 如本文中所使用的, X39为S或T, X40为K或T, X41为R、S或W, X42为L或V, X43为E或Q, 以及X44为A或G。

表16:轻链FR4的氨基酸序列

轻链	序列	SEQ ID NO:
Hu1B5-L1 ¹	FGGGTKVEIK	50

[0176] ¹代表全部轻链。

[0177] 在一些实施方案中, 所述抗体或其抗原结合片段包含: (1) 重链可变区 (HCVR), 其包含与选自SEQ ID NOs: 51至70的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列; 和 (2) 轻链可变区 (LCVR), 其包含与选自SEQ ID NOs: 71至88的氨基酸序列具有约80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%至约100%相同的氨基酸序列, 其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合人A2aR。表18和19示出了本发明公开的示例性抗人A2aR单克隆抗体的示例性HCVR和LCVR的氨基酸序列。表19和20分别示出了编码本发明示例性抗人A2aR抗体的HCVR和LCVR的DNA的示例性核苷酸序列。

表17: 示例性抗原结合分子的HCVR的氨基酸序列

重链	序列	SEQ ID NO:
Hu1B5-H1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFTRFWMNWVRQAPGQGLEW MGRIDPYDSETQYNHKFWDRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYC GRSLYGKGDYWGQGTITVSS	51
Hu1B5-H2	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKTSGFTFTRFWMNWVRQAPGQGLEW MGRIDPYDSETQYNHKFWDRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYC GRSLYGKGDYWGQGTITVSS	52
Hu1B5-H2.1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKTSGFTFTRFWMNWVRQAPGQGLEWI GRIDPYDSETQYNHKFWDRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCG RSLYGKGDYWGQGTITVSS	53
Hu1B5-H3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKTSGFTFTRFWMNWVRQAPGQGLEWI GRIDPYDSETQYNHKFWDRATLTVDTSSTVYMELSSLRSEDVAVYYCGR	54

	SLYGKGDYWGQTTVTVSS	
Hu1B5-H4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKTSGFTFTRFWMNWVRQAPGQGLEWI GRIDPYDSETQYNHKFWDRATLTVDKSSSTVYMELSSLRSEDTAVYYCGR SLYGKGDYWGQTTVTVSS	55
Hu1B5-H5	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKTSGFTFTRFWMNWVRQAPGQGLEWI GRIDPYDSETQYAHKFWDRATLTVDKSSSTVYMELSSLRSEDTAVYYCGR SLYGKGDYWGQTTVTVSS	56
Hu1B5-H6	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKTSGFTFTRFWMNWVRQMPGKGLEWIG RIDPYDSETQYNHKFWDHATLSVDKSSSTVYLQWSSLKASDTAMYYCGR SLYGKGDYWGQTTVTVSS	57
Hu3F6-H1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGFAFTSYWMNWVRQAPGQGLEW MGRIDPSDSEAHYHHKFWGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC LRSLYGKGDYWGHGTTVTVSS	58
Hu3F6-H2	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKTSGFAFTSYWMNWVRQAPGQGLEW MGRIDPSDSEAHYHHKFWGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC LRSLYGKGDYWGHGTTVTVSS	59
Hu3F6-H3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKTSGFAFTSYWMNWVRQAPGQGLEWI GRIDPSDSEAHYHHKFWGRATLTVDTSSTVYMELSSLRSEDTAVYYCLR SLYGKGDYWGHGTTVTVSS	60
Hu3F6-H4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKTSGFAFTSYWMNWVRQAPGQGLEWI GRIDPSDSEAHYHHKFWGRATLTVDKSSSTVYMELSSLRSEDTAVYYCLR SLYGKGDYWGHGTTVTVSS	61
Hu3F6-H5	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKTSGFAFTSYWMNWVRQAPGQGLEWI GRIDPSDSEAHYAHKFWGRATLTVDKSSSTVYMELSSLRSEDTAVYYCLR SLYGKGDYWGHGTTVTVSS	62
Hu3F6-H6	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGFAFTSYWMNWVRQMPGKGLEWIG RIDPSDSEAHYHHKFWGHATLSVDKSSSTVYLQWSSLKASDTAMYYCLR SLYGKGDYWGHGTTVTVSS	63

Hu3F8-H1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFTFTRYWMNWVRQAPGQGLEW MGRIDPSDSETHYNHKFWGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYC LRSLYGKGDYWGQGT TVTVSS	64
Hu3F8-H2	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFTFTRYWMNWVRQAPGQGLEW MGRIDPSDSETHYNHKFWGRVTMTVDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYC LRSLYGKGDYWGQGT TVTVSS	65
Hu3F8-H3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFTFTRYWMNWVRQAPGQGLEWI GRIDPSDSETHYNHKFWGRATLTVDSTSTVYMESSLRSED TAVYYCLRS LYGKGDYWGQGT TVTVSS	66
Hu3F8-H4	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFTFTRYWMNWVRQAPGQGLEWI GRIDPSDSETHYNHKFWGRATLTVDKSTSTVYMESSLRSED TAVYYCLR SLYGKGDYWGQGT TVTVSS	67
Hu3F8-H5	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFTFTRYWMNWVRQAPGQGLEWI GRIDPSDSETHYNAKFWRATLTVDKSTSTVYMESSLRSED TAVYYCLR SLYGKGDYWGQGT TVTVSS	68
Hu3F8-H5.1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFTFTRYWMNWVRQAPGQGLEWI GRIDPSDSETHYAHKFWRATLTVDKSTSTVYMESSLRSED TAVYYCLRS LYGKGDYWGQGT TVTVSS	69
Hu3F8-H6	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGFTFTRYWMNWVRQMPGKGLEWIG RIDPSDSETHYNHKFWGHATLSVDKSSSTVYLQWSSLKASDT AMYYCLR SLYGKGDYWGQGT TVTVSS	70

表18: 示例性抗原结合分子的焦谷氨酰化HCVR的氨基酸序列

重链	序列	SEQ ID NO:
Hu1B5-H1	pEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGFTFTRFWMNWVRQAPGQGL LEWMGRIDPYDSETQYNHKFWDRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCGRSLYGKGDYWGQGT TVTVSS	

Hu1B5-H2	pEVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKTSGFTFTRFWMNWVRQAPGQG LEWMGRIDPYDSETQYNH KFWDRVTMTVDTSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCGRSLYGKGDYWG QGTTVTVSS	
Hu1B5-H2.1	pEVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKTSGFTFTRFWMNWVRQAPGQG LEWIGRIDPYDSETQYNH KFWDRVTMTVDTSTSTVY MELSSLRSED AVYYCGRSLYGKGDYWG QGTTVTVSS	
Hu1B5-H3	pEVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKTSGFTFTRFWMNWVRQAPGQG LEWIGRIDPYDSETQYNH KFWDRATLTVDTSSSTVY MELSSLRSED VYYCGRSLYGKGDYWG QGTTVTVSS	
Hu1B5-H4	pEVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKTSGFTFTRFWMNWVRQAPGQG LEWIGRIDPYDSETQYNH KFWDRATLTVDKSSSTVY MELSSLRSED AVYYCGRSLYGKGDYWG QGTTVTVSS	
Hu1B5-H5	pEVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKTSGFTFTRFWMNWVRQAPGQG LEWIGRIDPYDSETQYAH KFWDRATLTVDKSSSTVY MELSSLRSED VYYCGRSLYGKGDYWG QGTTVTVSS	
Hu1B5-H6	pEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKTSGFTFTRFWMNWVRQMPGKGL EWIGRIDPYDSETQYNH KFWDHATLSVDKSSSTVYLQWSS LKASDTA MYYCGRSLYGKGDYWG QGTTVTVSS	
Hu3F6-H1	pEVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGFAFTSYWMNWVRQAPGQG LEWMGRIDPSDSEAHYH HKFWGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCLRSLYGKGDYWG HGTTVTVSS	
Hu3F6-H2	pEVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKTSGFAFTSYWMNWVRQAPGQG LEWMGRIDPSDSEAHYH HKFWGRVTMTVDTSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCLRSLYGKGDYWG HGTTVTVSS	
Hu3F6-H3	pEVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKTSGFAFTSYWMNWVRQAPGQG LEWIGRIDPSDSEAHYH HKFWGRATLTVDTSSSTVY MELSSLRSED VYYCLRSLYGKGDYWG HGTTVTVSS	
Hu3F6-H4	pEVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKTSGFAFTSYWMNWVRQAPGQG	

	LEWIGRIDPSDSEAHYHHKFWGRATLTVDKSSSTVYMELSSLRSED VYYCLRSLYGKGDYWGHGTTTVSS	
Hu3F6-H5	pEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKTSGFAFTSYWMNWVRQAPGQG LEWIGRIDPSDSEAHYAHKFWGRATLTVDKSSSTVYMELSSLRSED VYYCLRSLYGKGDYWGHGTTTVSS	
Hu3F6-H6	pEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGFAFTSYWMNWVRQMPGKGL EWIGRIDPSDSEAHYHHKFWGHATLSVDKSSSTVYLQWSSLKASDTA MYYCLRSLYGKGDYWGHGTTTVSS	
Hu3F8-H1	pEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFTRYWMNWVRQAPGQG LEWMGRIDPSDSETHYNHKFWGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCLRSLYGKGDYWGQGTTVTVSS	
Hu3F8-H2	pEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFTRYWMNWVRQAPGQG LEWMGRIDPSDSETHYNHKFWGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCLRSLYGKGDYWGQGTTVTVSS	
Hu3F8-H3	pEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFTRYWMNWVRQAPGQG LEWIGRIDPSDSETHYNHKFWGRATLTVDTSTSTVYMELSSLRSED VYYCLRSLYGKGDYWGQGTTVTVSS	
Hu3F8-H4	pEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFTRYWMNWVRQAPGQG LEWIGRIDPSDSETHYNHKFWGRATLTVDKSTSTVYMELSSLRSED VYYCLRSLYGKGDYWGQGTTVTVSS	
Hu3F8-H5	pEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFTRYWMNWVRQAPGQG LEWIGRIDPSDSETHYNAKFWGRATLTVDKSTSTVYMELSSLRSED VYYCLRSLYGKGDYWGQGTTVTVSS	
Hu3F8-H5.1	pEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGFTFTRYWMNWVRQAPGQG LEWIGRIDPSDSETHYAHKFWGRATLTVDKSTSTVYMELSSLRSED VYYCLRSLYGKGDYWGQGTTVTVSS	
Hu3F8-H6	pEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKASGFTFTRYWMNWVRQMPGKGL EWIGRIDPSDSETHYNHKFWGHATLSVDKSSSTVYLQWSSLKASDTA MYYCLRSLYGKGDYWGQGTTVTVSS	
	MYYCLRSLYGKGDYWGQGTTVTVSS	

表19: 示例性抗原结合分子的LCVR的氨基酸序列

轻链	序列	SEQ ID NO:
Hu1B5-L1	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWFQQRPGQSPRRL IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFG GGTKVEIK	71
Hu1B5-L2	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYQQRPGQSPRRL IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFG GGTKVEIK	72
Hu1B5-L3	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYQQRPGQSPRLL IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFG GGTKVEIK	73
Hu1B5-L4	DVVMTQSPLSLPVTGPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLL IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFG GGTKVEIK	74
Hu1B5-L5	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSIVHSNGNTYLEWYQQKPGQPPKLL IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCFQGSHVPLTFGG GTKVEIK	75
Hu3F6-L1	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNGNTYLEWFQQRPGQSPRR LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCYQGSHVPLTF GGGTKVEIK	76
Hu3F6-L2	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNGNTYLEWYQQRPGQSPRR LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCYQGSHVPLTF GGGTKVEIK	77
Hu3F6-L3	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHRNGNTYLEWYQQRPGQSPRL LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCYQGSHVPLTF	78

	GGGTKVEIK	
Hu3F6-L4	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHRNGNTYLEWYLQKPGQSPQLL IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCYQGSHVPLTFG GGGTKVEIK	79
Hu3F6-L5	DVVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHRNGNTYLEWYLQKPGQSPQL LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCYQGSHVPLTF GGGTKVEIK	80
Hu3F6-L6	DIVMTQTPPSLPVNPGEPASISCRSSQSLVHRNGNTYLEWYLQKPGQSPQLL IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGSDFTLKISWVEAEDVGVYYCYQGSHVPLTF GGGTKVEIK	81
Hu3F6-L7	DVVMTQTTPSLPVNPGEPASISCRSSQSLVHRNGNTYLEWYLQKPGQSPQL LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGSDFTLKISWVEAEDVGVYYCYQGSHVPLT FGGGTKVEIK	82
Hu3F6-L8	DVVMTQSPLSLPVTGEPASISCRSSQSLVHRNGNTYLEWYLQKPGQSPQLL IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCYQGSHVPLTFG GGTKVEIK	83
Hu3F8-L1	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWFQQRPGQSPRRL IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCYQGSHVPLTFG GGTKVEIK	84
Hu3F8-L2	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYQQRPGQSPRRL IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCYQGSHVPLTFG GGTKVEIK	85
Hu3F8-L3	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYQQRPGQSPRRL IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCYQGSHVPLTFG GGTKVEIK	86
Hu3F8-L4	DIVMTQSPLSLPVTGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLI YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCYQGSHVPLTFG GGTKVEIK	87

Hu3F8-L5	DVVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLL IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCYQGSHVPLTFG GGTKVEIK	88
----------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

表20: 编码示例性抗原结合分子的HCVR的核苷酸序列

重链	序列	SEQ ID NO:
Hu1B5-H1	CAGG TTCAGCTGG TTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCTG TGAAGGTGTCCTGCAAGGCCTCTGGCTTACCTTACCAGATTCTGGATGAA CTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATGGGCAGAATCGA CCCCTACGACTCCGAGACACAGTACAACCACAAGTTCTGGGACCGCGTGAC CATGACCAGAGACACCTCTACCTCCACCGTGTACATGGAAGTGTCCAGCCTG AGATCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGGCAGATCTCTGTACGGCAAG GGCGATTATTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTGTCTCT	
Hu1B5-H2	GAAGTGCAGCTGG TTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCT GTGAAGGTGTCCTGCAAGACCTCCGGCTTACCTTACCAGATTCTGGATGA ACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATGGGCAGAATCG ACCCTACGACTCCGAGACACAGTACAACCACAAGTTCTGGGACAGAGTGA CCATGACCGTGGACACCTCCACCAGCACCGTGTACATGGAAGTGTCCAGCCT GAGATCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGGCAGATCTCTGTACGGCAAG GGCGATTATTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTGTCTCT	
Hu1B5-H2.1	GAAGTGCAGCTGG TTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCT GTGAAGGTGTCCTGCAAGACCTCCGGCTTACCTTACCAGATTCTGGATGA ACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTCGAGTGGATCGGCAGAATCG ACCCTACGACTCCGAGACACAGTACAACCACAAGTTCTGGGACAGAGTGA CCATGACCGTGGACACCTCCACCAGCACCGTGTACATGGAAGTGTCCAGCCT GAGATCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGGCAGATCTCTGTACGGCAAG GGCGATTATTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTGTCTCT	

Hu1B5-H3	<p>GAAGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCT GTGAAGGTGTCCTGCAAGACCTCCGGCTTCACCTTCACCAGATTCTGGATGA ACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTCGAGTGGATCGGCAGAATCG ACCCTACGACTCCGAGACACAGTACAACCACAAGTTCTGGGACAGAGCTAC CCTGACCGTGGACACCTCCTCCTCCACCGTGTACATGGAAGTGTCCAGCCTG AGATCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGGCAGATCTCTGTACGGCAAGG GCGATTATTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTGTCTCT</p>	
Hu1B5-H4	<p>GAAGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCT GTGAAGGTGTCCTGCAAGACCTCCGGCTTCACCTTCACCAGATTCTGGATGA ACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTCGAGTGGATCGGCAGAATCG ACCCTACGACTCCGAGACACAGTACAACCACAAGTTCTGGGACAGAGCTAC CCTGACCGTGGACAAGTCTCCTCCTCCACCGTGTACATGGAAGTGTCCAGCCTG AGATCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGGCAGATCTCTGTACGGCAAGG GCGATTATTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTGTCTCT</p>	
Hu1B5-H5	<p>GAAGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCT GTGAAGGTGTCCTGCAAGACCTCCGGCTTCACCTTCACCAGATTCTGGATGA ACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTCGAGTGGATCGGCAGAATCG ACCCTACGACTCCGAGACACAGTACGCCACAAGTTCTGGGACAGAGCTAC CCTGACCGTGGACAAGTCTCCTCCTCCACCGTGTACATGGAAGTGTCCAGCCTG AGATCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGGCAGATCTCTGTACGGCAAGG GCGATTATTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTGTCTCT</p>	
Hu1B5-H6	<p>GAAGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCTGGCGAGTCC CTGCGGATCTCCTGCAAGACCTCTGGCTTCACCTTCACCAGATTCTGGATGAA CTGGGTCCGACAGATGCCCGCAAAGGCCTGGAATGGATCGGCAGAATCGAC CCCTACGACTCCGAGACACAGTACAACCACAAGTTCTGGGACCACGTACCC TGTCCTGGACAAGTCTCCTCTACCGTGTACCTGCAGTGGTCTCTCTGAAG GCCTCTGACACCGCCATGTACTACTGCGGCAGATCCCTGTACGGCAAGGGCG ATTATTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTGTCTCT</p>	
Hu3F6-	<p>CAGGTTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCTG</p>	

<p>H1</p>	<p>TGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTTCGCCTCACCTCCTACTGGATGAAC TGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATGGGCAGAATCGAC CCCTCTGACTCTGAGGCCACTACCACCACAAGTTCTGGGGCAGAGTGACCA TGACCAGAGACACCTCCACCAGCACCGTGTACATGGAAGTGTCCAGCCTGAG ATCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCCTGAGAAGCCTGTACGGCAAGGGC GATTATTGGGGCCATGGCACCACAGTGACCGTGTCTCT</p>	
<p>Hu3F6- H2</p>	<p>GAAGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCT GTGAAGGTGTCCTGCAAGACCTCTGGCTTCGCCTCACCTCCTACTGGATGA ACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATGGGCAGAATCG ACCCTCTGACTCTGAGGCCACTACCACCACAAGTTCTGGGGCAGAGTGAC CATGACCGTGGACACCTCTACCTCCACCCTGTACATGGAAGTGTCCAGCCTG AGATCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCCTGAGAAGCCTGTACGGCAAGG GCGATTATTGGGGCCATGGCACCACAGTGACCGTGTCTCT</p>	
<p>Hu3F6- H3</p>	<p>GAAGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCT GTGAAGGTGTCCTGCAAGACCTCTGGCTTCGCCTCACCTCCTACTGGATGA ACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTCGAGTGGATCGGCAGAATCG ACCCTTCTGACAGCGAGGCCACTACCACCACAAGTTCTGGGGCAGAGCTAC CCTGACCGTGGACACCTCTTCCCTCCACCCTGTACATGGAAGTGTCCAGCCTG AGATCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCCTGAGAAGCCTGTACGGCAAGG GCGATTATTGGGGCCATGGCACCACAGTGACCGTGTCTCT</p>	
<p>Hu3F6- H4</p>	<p>GAAGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCT GTGAAGGTGTCCTGCAAGACCTCTGGCTTCGCCTCACCTCCTACTGGATGA ACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTCGAGTGGATCGGCAGAATCG ACCCTTCTGACAGCGAGGCCACTACCACCACAAGTTCTGGGGCAGAGCTAC CCTGACCGTGGACAAGTCTTCCCTCCACCCTGTACATGGAAGTGTCCAGCCTG AGATCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCCTGAGAAGCCTGTACGGCAAGG GCGATTATTGGGGCCATGGCACCACAGTGACCGTGTCTCT</p>	
<p>Hu3F6- H5</p>	<p>GAAGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCT GTGAAGGTGTCCTGCAAGACCTCTGGCTTCGCCTCACCTCCTACTGGATGA</p>	

	<p>ACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTCGAGTGGATCGGCAGAATCG ACCCTTCTGACAGCGAGGCCACTACGCCACAAGTTTTGGGGCAGAGCTAC CCTGACCGTGGACAAGTCTCCTCCACCGTGTACATGGAAGTGTCCAGCCTG AGATCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCCTGAGAAGCCTGTACGGCAAGG GCGATTATTGGGGCCATGGCACCACAGTGACCGTGTCTCT</p>	
Hu3F6- H6	<p>GAAGTGCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCTGGCGAGTCC CTGCGGATCTCTTGAAGGCTTCTGGCTTCGCCTTCACCTCTACTGGATGAA CTGGGTCCGACAGATGCCTGGCAAAGGCCTGGAATGGATCGGCCGGATCGAC CCTTCTGATAGCGAGGCTCACTACCACCACAAGTTCTGGGGCCACGCTACCCT GTCTGTGGACAAGTCTCCTCCACCGTGTACCTGCAGTGGTCTCTCTGAAG GCCTCTGACACCGCCATGTACTACTGCCTGAGATCCCTGTACGGCAAGGGCG ACTATTGGGGCCATGGCACCACAGTGACAGTGTCTCT</p>	
Hu3F8- H1	<p>CAGGTGCAGCTGGTGCAATCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCT GTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCTCTGGCTTCACCTTCACCAGATACTGGATGA ACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATGGGCAGAATCG ACCCTCCGACTCCGAGACACACTACAACCACAAGTTCTGGGGCAGAGTGA CCATGACCAGAGACACCTCCACCAGCACCGTGTACATGGAAGTGTCCAGCCT GAGATCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCCTGAGAAGCCTGTACGGCAAG GCGATTATTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTGTCTCT</p>	
Hu3F8- H2	<p>GAAGTGCAGCTGGTGCAATCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCT GTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCTCTGGCTTCACCTTCACCAGATACTGGATGA ACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATGGGCAGAATCG ACCCTCCGACTCCGAGACACACTACAACCACAAGTTCTGGGGCAGAGTGA CCATGACCGTGGACACCTCTACCTCCACCGTGTACATGGAAGTGTCCAGCCTG AGATCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCCTGAGAAGCCTGTACGGCAAGG GCGATTATTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTGTCTCT</p>	
Hu3F8- H3	<p>GAAGTGCAGCTGGTGCAATCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCT GTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCTCTGGCTTCACCTTCACCAGATACTGGATGA ACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTCGAGTGGATCGGCAGAATCG</p>	

	<p>ACCCCTCCGACTCCGAGACACACTACAACCACAAGTTCTGGGGCAGAGCTAC CCTGACCGTGGACACCTCTACCTCCACCGTGTACATGGAAGTGTCCAGCCTG AGATCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCCTGAGAAGCCTGTACGGCAAGG GCGATTATTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTGTCTCT</p>	
Hu3F8- H4	<p>GAAGTGCAGCTGGTGCAATCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCT GTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCTCTGGCTTCACCTTCACCAGATACTGGATGA ACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTCGAGTGGATCGGCAGAATCG ACCCTCCGACTCCGAGACACACTACAACCACAAGTTCTGGGGCAGAGCTAC CCTGACCGTGGACAAGTCTACCTCCACCGTGTACATGGAAGTGTCCAGCCTG AGATCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCCTGAGAAGCCTGTACGGCAAGG GCGATTATTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTGTCTCT</p>	
Hu3F8- H5	<p>GAAGTGCAGCTGGTGCAATCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCT GTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCTCTGGCTTCACCTTCACCAGATACTGGATGA ACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTCGAGTGGATCGGCAGAATCG ACCCTCCGACTCCGAGACACACTACAACGCCAAGTTCTGGGGCAGAGCTAC CCTGACCGTGGACAAGTCTACCTCCACCGTGTACATGGAAGTGTCCAGCCTG AGATCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCCTGAGAAGCCTGTACGGCAAGG GCGATTATTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTGTCTCT</p>	
Hu3F8- H5.1	<p>GAAGTGCAGCTGGTGCAATCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCTGGCGCCTCT GTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCTCTGGCTTCACCTTCACCAGATACTGGATGA ACTGGGTCCGACAGGCTCCTGGACAGGGACTCGAGTGGATCGGCAGAATCG ACCCTCCGACTCCGAGACACACTACGCCACAAGTTCTGGGGCAGAGCTAC CCTGACCGTGGACAAGTCTACCTCCACCGTGTACATGGAAGTGTCCAGCCTG AGATCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCCTGAGAAGCCTGTACGGCAAGG GCGATTATTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTGTCTCT</p>	
Hu3F8- H6	<p>GAAGTGCAGCTGGTGCAATCTGGCGCCGAAGTGAAGAAGCCTGGCGAGTCC CTGCGGATCTCTGCAAGGCCTCTGGCTTCACCTTCACCAGATACTGGATGAA CTGGGTCCGACAGATGCCCGCAAAGGCCTGGAATGGATCGGCAGAATCGAC CCCTCCGACTCCGAGACACACTACAACCACAAGTTCTGGGGCCACGCTACCC</p>	

	TGTCCGTGGACAAGTCTAGCTCCACCGTGTACCTGCAGTGGTCCTCTCTGAA GGCTTCCGACACCGCCATGTACTACTGCCTGAGATCCCTGTACGGCAAGGGC GATTATTGGGGCCAGGGCACCACAGTGACAGTGTCTCT	
--	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

表21:编码示例性抗原结合分子的LCVR的核苷酸序列

轻链	序列	SEQ ID NO:
Hu1B5 -L1	GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACATTGGGACAGCCTG CCTCCATCTCTTGCCGGTCCTCTCAGTCCATCGTGCACTCCAACGGCAACACCTAC CTGGAATGGTTCCAGCAGCGGCCTGGCCAGTCTCCTAGACGGCTGATCTACAAGG TGTCCAACCGGTTCTCTGGCGTGCCCGACAGATTTCCGGCTCTGGCTCTGGCACC GACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACT GCTTCCAAGGCTCTCACGTGCCCTGACATTTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAAAT CAAG	
Hu1B5 -L2	GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACATTGGGACAGCCTG CCTCCATCTCTTGCCGGTCCTCTCAGTCCATCGTGCACTCCAACGGCAACACCTAC CTGGAATGGTATCAGCAGCGGCCTGGCCAGTCTCCTAGACGGCTGATCTACAAGG TGTCCAACCGGTTCTCTGGCGTGCCCGACAGATTTCCGGCTCTGGCTCTGGCACC GACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACT GCTTCCAAGGCTCTCACGTGCCCTGACATTTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAAAT CAAG	
Hu1B5 -L3	GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACATTGGGACAGCCTG CCTCCATCTCTTGCCGGTCCTCTCAGTCCATCGTGCACTCCAACGGCAACACCTAC CTGGAATGGTATCAGCAGCGGCCTGGCCAGTCTCCTAGACTGCTGATCTACAAGGT GTCCAACCGGTTCTCTGGCGTGCCCGACAGATTTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCG ACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTG CTTCCAAGGCTCTCACGTGCCCTGACATTTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAAATC AAG	

<p>Hu1B5 -L4</p>	<p>GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACACCTGGCGAGCCTG CTTCCATCTCCTGCAGATCCTCTCAGTCCATCGTGCACCTCCAACGGCAACACCTAC CTGGAATGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTACAAGGT GTCCAACCGGTTCTCTGGCGTGCCCGACAGATTTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCG ACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTG CTTCCAAGGCTCTCACGTGCCCTGACATTTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAAATC AAG</p>	
<p>Hu1B5 -L5</p>	<p>GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACAGCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGAG CCACCATCAACTGCCGGTCTCTCAGTCCATCGTGCACCTCCAACGGCAACACCTAC CTGGAATGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGATCTACAAGG TGTCCAACCGGTTCTCTGGCGTGCCCGACAGATTTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCC GACTTTACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTG CTTCCAAGGCTCCCACGTGCCACTGACATTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATC AAG</p>	
<p>Hu3F6 -L1</p>	<p>GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACATTGGGACAGCCTG CCTCCATCTCTTGCCGGTCTCTCAGTCTCTGGTGCACAGAAACGGCAACACCTAC CTGGAATGGTTCAGCAGCGGCCTGGCCAGTCTCCTAGACGGCTGATCTACAAGG TGTCCAACCGGTTCTCTGGCGTGCCCGACAGATTTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCC GACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACT GTTACCAGGGCTCTCACGTGCCCTGACATTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAAT CAAG</p>	
<p>Hu3F6 -L2</p>	<p>GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACATTGGGACAGCCTG CCTCCATCTCTTGCCGGTCTCTCAGTCTCTGGTGCACAGAAACGGCAACACCTAC CTGGAATGGTATCAGCAGCGGCCTGGCCAGTCTCCTAGACGGCTGATCTACAAGG TGTCCAACCGGTTCTCTGGCGTGCCCGACAGATTTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCC GACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACT GTTACCAGGGCTCTCACGTGCCCTGACATTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAAT CAAG</p>	
<p>Hu3F6</p>	<p>GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACATTGGGACAGCCTG</p>	

-L3	<p>CCTCCATCTCTTGCCGGTCTCTCAGTCTCTGGTGCACAGAAACGGCAACACCTAC CTGGAATGGTATCAGCAGCGGCCTGGCCAGTCTCCTAGACTGCTGATCTACAAGGT GTCCAACCGGTTCTCTGGCGTGCCCGACAGATTTTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCG ACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTG TTACCAGGGCTCTCACGTGCCCTGACATTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATC</p> <p style="text-align: center;">AAG</p>	
Hu3F6 -L4	<p>GACATCGTGATGACCCAGACACCTCTGAGCCTGAGCGTGACACCTGGACAGCCTG CCTCCATCTCTGCAGATCCTCTCAGTCCCTGGTGCACAGAAACGGCAACACCTAC CTGGAATGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTACAAGGT GTCCAACCGGTTCTCTGGCGTGCCCGACAGATTTTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCG ACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTG TTACCAGGGCTCTCACGTGCCCTGACATTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATC</p> <p style="text-align: center;">AAG</p>	
Hu3F6 -L5	<p>GACGTGGTCATGACACAGACCCCTCTGAGCCTGTCTGTGACCCCTGGACAGCCTG CCTCCATCTCTGCAGATCCTCTCAGTCCCTGGTGCACAGAAACGGCAACACCTAC CTGGAATGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTACAAGGT GTCCAACCGGTTCTCTGGCGTGCCCGACAGATTTTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCG ACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTG TTACCAGGGCTCTCACGTGCCCTGACATTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATC</p> <p style="text-align: center;">AAG</p>	
Hu3F6 -L6	<p>GACATCGTGATGACCCAGACACCTCCTAGCCTGCCTGTGAATCCTGGCGAGCCTGC CTCCATCTCTGCAGATCTTCTCAGTCTCTGGTGCACCGGAACGGCAACACCTACC TGGAATGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTACAAGGTG TCCAACCGGTTCTCTGGCGTGCCCGACAGATTTTCCGGCTCCGGCTCTGGATCCGA CTTTACCCTGAAGATCTCTGGGTGCAAGCCGAGGATGTGGGCGTGTACTACTGCT ACCAGGGCTCTCATGTGCCCTGACATTTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAAATCAA</p> <p style="text-align: center;">G</p>	
Hu3F6 -L7	<p>GACGTGGTCATGACACAGACCCCTCCAAGCCTGCCTGTGAATCCTGGCGAGCCTG CCTCCATCTCTGCAGATCTTCTCAGTCTCTGGTGCACCGGAACGGCAACACCTAC</p>	

	<p>CTGGAATGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTACAAGGT GTCCAACCGGTTCTCTGGCGTGCCCGACAGATTTTCCGGCTCCGGCTCTGGATCCG ACTTTACCCTGAAGATCTCCTGGGTCTGAAGCCGAGGATGTGGGCGTGTACTACTGC TACCAGGGCTCTCATGTGCCCTGACATTTGGCGGCGGAACAAAGGTGGAAATCA</p> <p style="text-align: center;">AG</p>	
Hu3F6 -L8	<p>GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACACCTGGCGAGCCTG CTTCCATCTCCTGCAGATCCTCTCAGTCTCTGGTGCACCGGAACGGCAACACCTAC CTGGAATGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCTCCTCAGCTGCTGATCTACAAGGT GTCCAACCGGTTCTCTGGCGTGCCCGACAGATTTTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCG ACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTG TTACCAGGGCTCTCACGTGCCCTGACATTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATC</p> <p style="text-align: center;">AAG</p>	
Hu3F8 -L1	<p>GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACATTGGGACAGCCTG CCTCCATCTCTTGCCGGTCCTCTCAGTCCATCGTGCACTCCAACGGCAACACCTAC CTGGAATGGTTCCAGCAGCGGCCTGGCCAGTCTCCTAGACGGCTGATCTACAAGG TGTTCCAACCGGTTCTCTGGCGTGCCCGACAGATTTTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCC GACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACT GTTACCAGGGCTCTCACGTGCCCTGACATTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAAT</p> <p style="text-align: center;">CAAG</p>	
Hu3F8 -L2	<p>GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACATTGGGACAGCCTG CCTCCATCTCTTGCCGGTCCTCTCAGTCCATCGTGCACTCCAACGGCAACACCTAC CTGGAATGGTATCAGCAGCGGCCTGGCCAGTCTCCTAGACGGCTGATCTACAAGG TGTTCCAACCGGTTCTCTGGCGTGCCCGACAGATTTTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCC GACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACT GTTACCAGGGCTCTCACGTGCCCTGACATTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAAT</p> <p style="text-align: center;">CAAG</p>	
Hu3F8 -L3	<p>GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACATTGGGACAGCCTG CCTCCATCTCTTGCCGGTCCTCTCAGTCCATCGTGCACTCCAACGGCAACACCTAC CTGGAATGGTATCAGCAGCGGCCTGGCCAGTCTCCTAGACTGCTGATCTACAAGGT</p>	

	<p>GTCCAACCGGTTCTCTGGCGTGCCCGACAGATTTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCG ACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACTG TTACCAGGGCTCTCACGTGCCCCTGACATTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATC</p> <p style="text-align: center;">AAG</p>	
Hu3F8 -L4	<p>GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAAGTCTGAGCCTGCCTGTGACACCTGGCGAGCCTG CTTCCATCTCCTGCAGATCCTCTCAGTCCATCGTGACTCCAACGGCAACACCTAC CTGGAATGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGAGTCCACAGCTGCTGATCTACAAGG TGTCCAACCGGTTCTCTGGCGTGCCCGACAGATTTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCC GACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACT GTTACCAGGGCTCTCACGTGCCCCTGACATTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAAT</p> <p style="text-align: center;">CAAG</p>	
Hu3F8 -L5	<p>GACGTGGTCATGACACAGAGCCCTCTGAGCCTGCCTGTGACACCTGGCGAGCCTG CTTCCATCTCCTGCAGATCCTCTCAGTCCATCGTGACTCCAACGGCAACACCTAC CTGGAATGGTATCTGCAGAAGCCCGGCCAGTCTCCACAGCTGCTGATCTACAAGG TGTCCAACCGGTTCTCTGGCGTGCCCGACAGATTTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCC GACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTGTACTACT GTTACCAGGGCTCTCACGTGCCCCTGACATTTGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAAT</p> <p style="text-align: center;">CAAG</p>	

[0178] 在某些实施方案中,本发明的抗原结合分子,例如抗体或其抗原结合片段,在翻译后被修饰。翻译后修饰的实例包括通过羧肽酶在重链C端切割赖氨酸;将重链和轻链N端的谷氨酰胺或谷氨酸通过以下修饰为焦谷氨酸:焦谷氨酰化、糖基化、氧化、脱酰胺、和糖化,已知这种翻译后修饰发生在各种抗体中(参见Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008, Vol. 97, p. 2426-2447, 其整体通过引用并入本文)。经历翻译后修饰的抗原结合分子例如抗体或其抗原结合片段的实例包括重链可变区的N端已被焦谷氨酰化和/或重链C端的赖氨酸已经缺失的抗原结合分子,例如抗体或其抗原结合片段。N端经焦谷氨酰化的示例性抗原结合分子的序列列于表7中。当被用于表示多肽中的氨基酸时,本文中所使用的“pE”是指焦谷氨酸。

[0179] 2. 抗原结合分子的变体

[0180] 在某些实施方案中,本发明所述的A2aR抗原结合分子,例如所述抗A2aR抗体,可以是单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体、Fab、F(ab')₂、scFv或包含本文所述的包含另外的结合特异性的多特异性抗体。

[0181] 因此,在某些实施方案中,本文所述的抗A2aR抗体可与包含一种或更多种修饰的Fc连接,通常以改变抗体的一种或更多种功能特性,例如血清半衰期、补体结合、Fc受体结合,和/或抗原依赖性细胞毒性。此外,本文所述的抗体可以是经化学修饰的(例如,将一个或多个化学部分连接至抗体上),或者被修饰以改变其糖基化,以改变抗体的一种或更多

种功能特性。更具体地,在某些实施方案中,本发明所述的抗体可包含Fc区中的修饰,以产生具有以下特点的Fc变体:(a)提高或降低的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC), (b)提高或降低的补体介导的细胞毒性(CDC), (c)提高或降低的对C1q的亲合力,和/或(d)相对于亲本Fc提高或降低的对Fc受体的亲合力。这样的Fc区变体通常在Fc区中包含至少一个氨基酸修饰。将氨基酸修饰组合是十分可取的。例如,Fc区变体可包含其中例如本文所标识的特定Fc区位点的两个、三个、四个、五个等替换。

[0182] 对于需要效应子功能的用途,可使用某些效应功能增强型Fc。在一些实施方案中,当抗体旨在诱导ADCC时,可使用ADCC增强型的IgG1S239D、A330L、I332E或S298A、E333A、K334A或F243L、R292P、Y300L、V305I和P396L。在某些实施方案中,为了增强“Y”形二价抗体的ADCC,将L234Y、L235Q、G236W、S239M、H268D、D270E、S298A等替换引入至一条重链中,并且将D270E、K326D、A330M、K334E等替换引入至另一条重链中。

[0183] 在一些实施方案中,当抗体旨在诱导ADCP时,可使用ADCP增强型的G236A、S239D和I332E。在某些实施方案中,当抗体旨在诱导CDC时,可使用CDC增强型的K326W、E333S或S267E、H268F、S324T或E345R、E430G和S440Y。

[0184] 对于需要完全避免效应子功能的用途,例如,当单独的抗原结合足以产生期望的治疗效果,并且效应子功能仅导致不期望的副作用(或增加其风险)时,可使用IgG4抗体或无ADCC效应的IgG1 L234F、L235E、P331S或L234A、L235A和P239G,或者可设计缺少Fc区或其大部分的抗体或片段,或者可使Fc突变以完全消除糖基化(例如,N297A、N297Q或N297G)。或者,可生成成人IgG2(CH1结构域和铰链区)和人IgG4(CH2和CH3结构域)的杂交构建体,其缺乏效应子功能,并且缺少结合Fc γ R

(如IgG2)和激活补体(如IgG4)的能力。当使用IgG4恒定结构域时,通常优选包含模拟IgG1铰链序列的S228P替换和防止Fab臂交换从而稳定IgG4分子的R409K突变,从而减少正在接受治疗的患者中治疗性抗体和内源性IgG4之间的Fab臂交换。

[0185] 在某些实施方案中,可以修饰所述抗A2aR抗体或其片段以提供延长的生物半衰期。可采用各种方法来进行,包括例如用于提高Fc区对FcRn的结合亲和力的方法。在一个实施方案中,改变抗体的CH1或CL区域以包含来自IgG的Fc区CH2结构域的两个环的补救受体结合表位,如美国专利5,869,046及6,121,022中所描述的。Fc区的残基编号是Kabat的EU索引的残基编号。参考残基编号来提供本文公开的序列变体,所述残基编号后为替代了天然存在的氨基酸的氨基酸,任选地前面是该位点的天然存在的残基。在给定位点可存在多个氨基酸的情况下,例如,如果天然存在的同种型之间的序列不同,或者如果在该位点有可被替换的多个突变,则它们由斜线分隔(例如,“X/Y/Z”)。

[0186] 提高与FcRn的结合和/或改善药代动力学特性的示例性Fc变体包括位点259、308和434的替换,包括例如259I、308F、428L、428M、434S、434H、434F、434Y和434M。提高Fc与FcRn结合的其他变体包括:250E、250Q、428L、428F、250Q/428L(Hinton等人,2004, J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216, Hinton等人,2006 Journal of Immunology 176:346-356), 256A, 272A, 305A, 307A, 311A, 312A, 378Q, 380A, 382A, 434A(Shields等人,(2001) J. Biol. Chem., 276(9):6591-6604), 252F, 252Y, 252W, 254T, 256Q, 256E, 256D, 433R, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H

(Dall'Acqua等人,(2002) J. Immunol., 169:5171-5180, Dall'Acqua等人,(2006)

J. Biol. Chem., 281:23514-23524, 以及美国专利 8,367,805)。

[0187] IgG Fc 中的某些保守残基 (I253、H310、Q311、H433、N434) 的修饰, 例如 N434A 变体 (Yeung 等人, (2009) J. Immunol. 182:7663), 可作为提高与 FcRn 的亲合力的一种方式, 从而延长抗体在循环中的半衰期 (WO 98/023289)。包含 M428L 和 N434S 的组合 Fc 变体已显示可提高与 FcRn 的结合并将血清半衰期延长至五倍 (Zalevsky 等人, (2010) Nat. Biotechnol. 28:157)。包含 T307A、E380A 和 N434A 修饰组合的 Fc 变体也延长了 IgG1 抗体的半衰期 (Petkova 等人, (2006) Int. Immunol. 18:1759)。另外, 包含 M252Y-M428L、M428L-N434H、M428L-N434F、M428L-N434Y、M428L-N434A、M428L-N434M 和 M428L-N434S 组合的 Fc 变体也可延长半衰期 (US2006/173170)。此外, 据报道, 包含 M252Y、S254T 和 T256E 组合的 Fc 变体可将半衰期延长近 4 倍 (Dall'Acqua 等人, (2006) J. Biol. Chem. 281:23514)。

[0188] 在某些实施方案中, 本发明所述的 A2aR 抗原结合分子是双特异性抗体, 其包含: 特异性结合 A2aR 的第一靶向结构域和特异性结合 A2aR 中另一个表位的或另一种蛋白质的第二靶向结构域。在一些实施方案中, 所述第一靶向结构域包含本发明所述的任意 A2aR 抗体的抗原结合片段。

[0189] 在某些实施方案中, 本发明所述的抗原结合分子 (例如抗 A2aR 抗体或其抗原结合片段) 化学偶联至一种或多种治疗活性肽和/或小分子药物上。所述肽或小分子药物可以连接到例如还原的 SH 基团和/或碳水化合物侧链上。制备肽或小分子药物与抗体的共价或非共价偶联物的方法是本领域已知的并且任何这样的已知方法都可使用。

[0190] 在一些实施方案中, 所述肽或小分子药物通过二硫键连接到还原的抗体组分的铰链区上。或者, 可使用异双功能交联剂 (例如 N-琥珀酰 3-(2-吡啶基二硫代) 丙酸酯 (SPDP)) 来连接这样的药剂。这种偶联的通用技术是本领域所公知的。在一些实施方案中, 所述肽或小分子药物通过抗体 Fc 区中的碳水化合物部分进行偶联。碳水化合物基团可用于增加与硫醇基团结合的同一种药剂的负载, 或者碳水化合物部分可用于结合不同的治疗药剂或诊断剂。用于通过抗体碳水化合物部分将肽抑制剂或小分子药物与抗体偶联的方法是本领域技术人员所公知的。例如, 在一个实施方案中, 所述方法涉及使具有氧化的碳水化合物部分的抗体组分与具有至少一个游离胺官能团的载体聚合物反应。所述反应引起初始席夫碱 (亚胺) 连接, 其可通过还原成仲胺而稳定以形成最终的偶联物。美国专利公开 2014/0356385 中描述了将小分子药物和肽与抗体偶联的示例性方法。

[0191] 所述 A2aR 抗体 (包括其片段及其多特异性形式) 的大小范围可为 50kD 至 300kD、50kD 至 250kD、60kD 至 250kD、80kD 至 250kD、100kD 至 250kD、125kD 至 250kD、150kD 至 250kD、60kD 至 225kD、75kD 至 225kD、100kD 至 225kD、125kD 至 225kD、150kD 至 225kD、60kD 至 200kD、75kD 至 200kD、100kD 至 200kD、125kD 至 200kD、150kD 至 200kD、60kD 至 150kD、75kD 至 150kD、100kD 至 150kD、60kD 至 125kD、75kD 至 125kD、75kD 至 100kD, 或上述范围中列出的整数的任意组合所包含的任意范围, 或由上述范围之间的整数的任意组合指定的任意范围。

[0192] 3. 抗体和抗原结合分子的生物学特性

[0193] 本发明包括结合人和食蟹猴 A2aR 的抗体及其抗原结合片段。

[0194] 本发明包括 A2aR 抗原结合分子, 例如 A2aR 抗体或其抗原结合片段, 其能够特异性结合在细胞表面上表达的人和食蟹猴 A2aR 并抑制 A2aR 活性或功能。根据某些实施方案, 所述抗原结合分子阻断细胞表面表达的人 A2aR 与 A2aR 激动剂之间的相互作用。可通过实施例

3中描述的测定法或基本上类似的测定法来评估A2aR抗原结合蛋白(例如A2aR抗体或其抗原结合片段)抑制A2aR活性的程度。本发明包括抗原结合分子,例如抗体,其阻断在细胞表面表达的人A2aR与A2aR激动剂之间的相互作用,且用实施例3中所示的测定法或基本上类似的测定法测得其 IC_{50} 值为0.7nM至约20nM,或更低。

[0195] 4. 物种选择性和物种交叉反应

[0196] 根据某些实施方案,本发明提供结合人A2aR但不结合来自其他物种的A2aR的抗原结合分子。本发明还包括结合人A2aR以及来自一种或更多种非人物种(例如非人灵长类动物)的A2aR的抗原结合分子。

[0197] 根据本发明的某些示例性实施方案,所提供的抗原结合分子可结合人A2aR并可结合或不结合(视情况而定)来自小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、沙鼠、猪、猫、狗、兔子、山羊、绵羊、牛、马、骆驼、食蟹猴、狨猴、恒河猴和黑猩猩中一种或更多种A2aR。例如,在本发明的特别的示例性实施方案中,本发明提供包含结合人A2aR和非人灵长类动物(例如食蟹猴)A2aR的抗原结合结构域的抗原结合分子。

[0198] 三、抗A2aR抗原结合分子的治疗用途

[0199] 本发明所述的抗A2aR抗原结合分子(包括抗体、其抗原结合片段和其多特异性抗体)具有数种体外、体内和离体用途,所述用途与在癌症治疗中通过阻断经腺苷的信号传导和其他信号通路来增强免疫应答相关。不希望受任何理论的束缚,假设本发明所述的抗原结合分子(例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段)结合细胞表面表达的A2aR并抑制其活性,A2aR活性的抑制导致例如细胞内cAMP浓度降低。因此,本发明所述的抗原结合分子(和包含其的治疗组合物),尤其可用于治疗任何可获益于抑制A2aR活性(例如刺激和/或激活免疫应答)的疾病或病症。鉴于A2aR的广泛表达以及腺苷和A2aR介导的多样效应,本发明所述的抗A2aR抗原结合分子(例如抗体或其抗原结合片段)可单独使用或与多种活性药剂结合使用,用于治疗范围广泛的疾病或病症,包括多种癌症。

[0200] 因此,本发明提供降低细胞内cAMP浓度的方法,包括使细胞与本发明所述的抗原结合分子(例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段)接触。可通过实施例4中描述的方法或基本上相似的方法来测量细胞内cAMP浓度的降低。在某些实施方案中,本发明所述的方法使细胞内cAMP的浓度与基线水平相比降低了至少约10%、约20%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%,或更多。

[0201] 在一些实施方案中,将本发明所述的抗原结合分子(例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段)施用于(体外)培养的细胞或施用于人对象(体内或离体),以增强针对多种疾病的免疫力。因此,在一个实施方案中,在有此需要的对象中刺激免疫应答的方法包括向对象施用本文所述的抗A2aR抗体、其抗原结合片段(例如抗A2aR的HCVR和LCVR)或多特异性抗A2aR抗体,以增强、刺激、上调对象体内的免疫应答,例如抑制肿瘤生长、刺激抗肿瘤T细胞免疫和/或刺激抗微生物免疫。

[0202] 在一个方面中,增强对象免疫应答(例如,T细胞应答)的方法包括向对象施用本文所述的抗A2aR抗体,以增强对象体内的免疫应答(例如,T细胞应答)。在一些实施方案中,所述对象是荷瘤对象,其针对肿瘤的免疫应答得到增强。肿瘤可以是实体瘤或液体瘤,例如血液恶性病。在某些实施方案中,所述肿瘤是免疫原性肿瘤。在另一些实施方案中,肿瘤是非免疫原性的。在另一些实施方案中,所述对象是携带病原体的对象,其针对病原体的免疫应

答由于施用本文所述的抗A2aR抗体而得到增强。所述免疫应答包括但不限于:a)促进效应T细胞功能;b)降低Treg活性;c)防止Treg扩增;d)增强NK细胞功能;或者e)促进抗原呈递细胞的1型激活。

[0203] 在某些实施方案中,与基线水平相比,本发明所述的方法增加免疫应答至少约10%、约20%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约1倍、约2倍、约4倍或更多。

[0204] 优选的对象包括需要增强免疫应答的人患者。所述方法特别适用于治疗患有可通过增强免疫应答(例如,T细胞介导的免疫应答)而治疗的病症的人患者。所述方法特别适用于治疗癌症、慢性感染和慢性炎症性疾病。优选地,本文所述的用于本公开的方法的抗体是人抗体或人源化抗体。

[0205] 在一个实施方案中,抑制对象体内肿瘤细胞生长的方法包括向对象施用本文所述的抗A2aR抗体,从而抑制对象体内肿瘤的生长。可以通过多种方法测定对肿瘤生长的抑制。可通过多种方法来测量肿瘤生长的抑制。可使用以下方法来测量肿瘤生长:例如Talkington,A and Durrett,R, Estimating Tumor Growth Rates in vivo, Bull Math Biol., 2015 Oct.: 77(10): 1934-54中描述的方法(可在<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4764475/>获取,其全部内容通过引用并入本文)。也可以通过肿瘤大小的减小来测定对肿瘤生长的抑制。在某些实施方案中,与基线水平相比,本发明所述的方法抑制肿瘤生长至少约10%、约20%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或更多。

[0206] 在某些实施方案中,本发明所述的抗原结合分子,例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段,可用于降低肿瘤微环境中的免疫抑制。可通过多种方法来测量这种降低。例如,可通过肿瘤中某些生物标志物(例如PD-L1、CD73、IL-10或TGF- β)的存在和/或丰度来测量肿瘤微环境中的免疫抑制水平。也可通过肿瘤中CD8+细胞毒性T细胞与调节性T(T_{reg})细胞的比例来测定免疫抑制水平。一般而言,免疫抑制会降低CD8+细胞毒性T细胞与 T_{reg} 的比例。在某些实施方案中,本发明所述的抗原结合分子,例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段,使肿瘤微环境中的免疫抑制水平与基线水平相比降低至少约10%、约20%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或更多。

[0207] 本文还包括从患有肿瘤(例如癌性肿瘤)的对象的肿瘤微环境中清除 T_{reg} 细胞的方法,包括向所述对象施用治疗有效量的本文所述的抗A2aR抗体,其包含在肿瘤微环境中刺激清除 T_{reg} 细胞的Fc。例如,Fc可以是具有合适的效应功能或增强的效应功能(由一种或多种激活Fc受体赋予)的Fc。

[0208] 在某些优选的实施方案中,在肿瘤微环境中发生 T_{reg} 清除而 T_{eff} 没有被显著清除或抑制,并且在肿瘤微环境外均没有发生显著的 T_{eff} 和 T_{reg} 细胞的清除或抑制。在某些实施方案中,所述对象的肿瘤微环境中 T_{reg} 细胞上的A2aR水平高于 T_{eff} 细胞上的A2aR水平。在某些实施方案中,抗A2aR抗体可清除肿瘤中的 T_{regs} 和/或肿瘤浸润淋巴细胞(TILs)中的 T_{regs} 。

[0209] 在某些优选的实施方案中,所述对象患有细胞增殖性疾病或癌症。用本发明所述的抗原结合分子(例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段)阻断通过A2aR的腺苷信号传导可在对象中增强针对癌细胞的免疫应答。因此,本发明提供用于治疗患有癌症的对象的方法,包括向所述对象施用本文所述的抗A2aR抗原结合分子,例如抗体或其抗原结合片段,使对象得到治疗,例如,抑制或减少癌性肿瘤的生长和/或使肿瘤消退。所述抗A2aR抗体可单独用于抑制癌性肿瘤的生长。或者,所述抗A2aR抗体可与一种或更多种其他靶向性活性药剂联

合使用,例如其他抗癌靶标、免疫原性剂、标准癌症治疗或其他抗体,如下所述。本发明所述的抗原结合分子可用于治疗例如原发性和/或转移性肿瘤。本发明还包括在对象中治疗残留癌的方法。本文所使用的术语“残留癌”是指在用抗癌疗法治疗后,在对象中存在或持续存在的一种或多种癌细胞。

[0210] 因此,在一个方面中,治疗癌症的方法包括向有此需要的对象施用治疗有效量的本文所述的抗A2aR抗体。优选地,所述抗体抑制人A2aR的活性并且包含本文所述的一个或更多个HCVR和LCVR。此外,用于该方法的所述抗A2aR抗原结合分子(例如抗体)可包括其嵌合或人源化的非人抗A2aR抗体。可通过多种方法测定治疗癌症的效力。例如,可通过存活率的改善或肿瘤尺寸的减小来测定治疗癌症的效力。在某些实施方案中,本发明所述的方法使治疗癌症的效力与基线水平相比提高至少约10%、约20%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%,约1倍、约2倍、约4倍或更多。在癌症治疗的背景下,如果本发明所述的A2aR抗原结合分子是唯一的治疗药剂,则所述基线水平是指使用安慰剂的疗效;如果本发明所述的A2aR抗原结合分子与其他治疗药剂联合使用,则所述基线水平是指使用安慰剂或其他治疗药剂的疗效。

[0211] 可被本发明所述的抗体抑制生长的癌症的包括多种,尤其是对使用其他抗体或化学治疗药剂的单一治疗无响应或倾向于无响应的癌症。用于治疗癌症的非限制性实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、鳞状非小细胞肺癌(NSCLC)、非NSCLC、神经胶质瘤、胃肠癌、肾癌(例如透明细胞癌)、卵巢癌、肝癌、结直肠癌、子宫内膜癌、肾癌(例如肾细胞癌(RCC))、前列腺癌(例如激素难治性前列腺癌)、甲状腺癌、神经母细胞瘤、胰腺癌、胶质母细胞瘤(多形性胶质母细胞瘤)、宫颈癌、胃癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌和头颈癌、胃癌、生殖细胞瘤、小儿肉瘤、鼻窦自然杀伤细胞、黑色素瘤(例如转移性恶性黑色素瘤(例如皮肤或眼内恶性黑色素瘤))、骨癌、皮肤癌、子宫癌、肛门区癌症、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、儿童实体瘤、输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊髓轴肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症(包括石棉诱发的癌症、病毒相关癌症(例如人乳头瘤病毒(HPV)相关肿瘤)和血液系统恶性病(其源于两种主要血细胞谱系中的任一者,即骨髓细胞系(产生粒细胞、红细胞、血小板、巨噬细胞和肥大细胞)或淋巴细胞系(产生B、T、NK和浆细胞),例如所有类型的白血病、淋巴瘤和骨髓瘤(例如急性、慢性、淋巴细胞和/或骨髓性白血病,例如急性白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴性白血病(CLL)慢性髓性白血病(CIVIL)、未分化AML(M0)、成髓细胞白血病(M1)、成髓细胞白血病(M2;细胞成熟)、早幼粒细胞白血病(M3或M3变体[M3V])、粒单核细胞白血病(M4或伴嗜酸性粒细胞增多的M4变体[M4E])、单核细胞白血病(M5)、红白血病(M6)、巨核细胞白血病(M7)、孤立性粒细胞肉瘤和绿色瘤;淋巴瘤(例如霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞样淋巴瘤、单核细胞样B细胞淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤、间变性(例如,Ki 1+)大细胞淋巴瘤、成人T细胞淋巴瘤/白血病、套细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤、肠T细胞淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、前体T淋巴母细胞淋巴瘤、T淋巴母细胞淋巴瘤/白血病(T-Lb1y/T-ALL)、外周T细胞淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤、移植后淋巴组织增生性疾病、真组

织细胞淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、原发性渗出性淋巴瘤、淋巴母细胞淋巴瘤(LBL)、淋巴系造血肿瘤、急性淋巴细胞白血病、弥漫性大B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、滤泡性淋巴瘤、弥漫性组织细胞淋巴瘤(DHL)、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤(CTLC)(或称为蕈样肉芽肿或Sezary综合征)和伴有华氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)的淋巴浆细胞样淋巴瘤(LPL);骨髓瘤(例如IgG骨髓瘤、轻链骨髓瘤、非分泌性骨髓瘤、冒烟型骨髓瘤(也称为惰性骨髓瘤)、孤立性浆细胞瘤和多发性骨髓瘤)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、毛细胞淋巴瘤;髓系造血肿瘤,间充质来源肿瘤(包括纤维肉瘤和横纹肌肉瘤);精原细胞瘤,畸胎瘤,中枢和周围神经肿瘤(包括星形细胞瘤,神经鞘瘤);间充质来源肿瘤(包括纤维肉瘤、横纹肌肉瘤和骨肉瘤);和其他肿瘤(包括黑色素瘤、色素性干皮病、角化棘皮瘤、精原细胞瘤、甲状腺滤泡癌和畸胎瘤)、淋巴谱系造血肿瘤(例如T细胞和B细胞肿瘤,包括但不限于T细胞疾病,例如T-幼淋巴细胞白血病(T-PLL),包括小细胞和脑样细胞类型;优选T细胞类型的大颗粒淋巴细胞白血病(LGL);a/d T-NHL肝脾淋巴瘤;外周/胸腺后T细胞淋巴瘤(多形性和免疫母细胞亚型);血管中心(鼻腔)T细胞淋巴瘤);头颈癌、肾癌、直肠癌、甲状腺癌;急性髓性淋巴瘤,以及所述癌症的任意组合。本文所述的方法也可用于治疗转移性癌症、难治性癌症(例如,先前的免疫治疗(例如使用阻断CTLA-4或PD-1的抗体)难以治疗的癌症)和复发性癌症。

[0212] 在一些实施方案中,相对于当前护理标准来说,用本发明所述的抗A2aR抗体和/或其他活性剂治疗癌症患者可产生长期持久的响应,包括至少1、2、3、4、5、10年或更长时间的长期存活和/或至少1、2、3、4、5、10年或更长时间的无复发存活。在某些实施方案中,用本发明所述的抗A2aR抗体和/或其他活性剂治疗癌症对象可防止癌症复发或使癌症复发延迟例如1、2、3、4、5、10年或更长时间。所述抗A2aR治疗可用作主要或二线治疗。

[0213] 骨髓移植目前被用于治疗多种造血来源的肿瘤。这种治疗的后果是产生移植物抗宿主病,而抑制A2aR可降低移植物抗肿瘤反应,从而提高供体移植的肿瘤特异性T细胞的有效性。

[0214] 在一些实施方案中,在抗A2aR抗体存在下的离体激活和抗原特异性T细胞的扩增以及这些细胞向接受处的过继转移可增加过继转移的T细胞的频率和活性,以刺激抗原特异性T细胞对抗癌症或病毒感染。

[0215] 本文所述的用于在体内、离体或体外施用本发明所述抗原结合分子,例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段(例如人源化的单克隆抗体,多特异性抗体和免疫偶联物)的合适的途径是本领域公知的并且可由普通技术人员选择。例如,所述抗体组合物可通过肠胃外注射(例如,静脉内或皮下)来施用。如下文进一步描述的,合适的剂量取决于对象的年龄和体重以及所述抗体组合物的浓度和/或配方。

[0216] 神经退行性疾病与增加的A2aR活性有关。因此,在某些实施方案中,本发明提供治疗神经退行性疾病的方法,包括向有此需要的对象施用本发明所述的抗原结合分子,例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段,从而治疗神经退行性疾病。

[0217] 术语“细胞增殖性病征”是指以细胞异常增殖为特征的病症。增殖性疾病并不意味着对细胞生长速率的任何限制,而仅表示丧失对生长和细胞分裂的正常控制。因此,在一些实施方案中,增殖性病征的细胞可以具有与正常细胞相同的细胞分裂速率但不响应限制这

种生长的信号。“细胞增殖性疾病”的范围包括瘤、癌症或肿瘤。

[0218] 术语“癌症”是指以具有侵入周围组织和/或转移到新定植位点的能力的细胞增殖为特征的多种恶性肿瘤中的任意一种,其包括癌、肉瘤、腺癌、黑色素瘤、白血病、淋巴瘤、生殖细胞肿瘤和母细胞瘤,包括实体癌和淋巴样癌。可根据本发明所述的组合物和方法治疗的示例性癌症包括脑癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、头颈癌、肾癌、肺癌、非小细胞肺癌、间皮瘤、卵巢癌、前列腺癌、胃和子宫癌、白血病和髓母细胞瘤。

[0219] 术语“癌”是指上皮细胞趋向于浸润周围组织并引起转移的恶性生长。示例性癌包括,例如如腺泡癌(acinar carcinoma)、腺泡状癌(acinous carcinoma)、腺囊性癌(adenocystic carcinoma)、腺样囊性癌(adenoid cystic carcinoma)、腺癌(carcinoma adenomatosum)、肾上腺皮质癌、肺泡癌、肺泡细胞癌、基底细胞癌(basal cell carcinoma)、基底细胞癌(carcinoma basocellulare)、基底细胞样癌(basaloid carcinoma)、基底鳞状细胞癌(basosquamous cell carcinoma)、细支气管肺泡癌(bronchioalveolar carcinoma)、支气管癌(bronchiolar carcinoma)、支气管源性癌(bronchogenic carcinoma)、脑样癌(cerebriform carcinoma)、肝内胆管细胞癌(cholangiocellular carcinoma)、绒毛膜癌(chorionic carcinoma)、胶样癌(colloid carcinoma)、粉刺癌(comedo carcinoma)、子宫体癌(corpus carcinoma)、筛状癌(cribriform carcinoma)、胸廓癌(carcinoma en cuirasse)、皮肤癌(carcinoma cutaneum)、柱状细胞癌(cylindrical carcinoma)、柱状细胞癌(cylindrical cell carcinoma)、导管癌、硬癌(carcinoma durum)、胚胎性癌(embryonal carcinoma)、髓样癌(encephaloid carcinoma)、表皮样癌(epiennoid carcinoma)、腺样上皮癌(carcinoma epitheliale adenoides)、外植癌(exophytic carcinoma)、溃疡性癌(carcinoma ex ulcere)、纤维性癌(carcinoma fibrosum)、胶状癌(gelatiniform carcinoma)、胶样癌(gelatinous carcinoma)、巨大细胞癌(giant cell carcinoma)、巨细胞癌(carcinoma gigantocellulare)、腺癌(glandular carcinoma)、颗粒细胞癌、毛母质癌(hair-matrix carcinoma)、多血癌(hematoid carcinoma)、肝细胞癌(hepatocellular carcinoma)、大嗜酸细胞癌(Hurthle cell carcinoma)、透明质癌(hyaline carcinoma)、类肾透明细胞癌(hypemephroid carcinoma)、幼稚型胚胎性癌(infantile embryonal carcinoma)、原位癌、表皮内癌(intraepidermal carcinoma)、上皮内癌(intraepithelial carcinoma)、克龙派切尔癌(Krompecher's carcinoma)、Kulchitzky细胞癌(Kulchitzky-cell carcinoma)、大细胞癌(large-cell carcinoma)、豆状癌(lenticular carcinoma)、豆状腺癌(carcinoma lenticulare)、脂瘤癌(lipomatous carcinoma)、淋巴上皮癌(lymphoepithelial carcinoma)、髓样癌(carcinoma medullare)、髓样癌(medullary carcinoma)、黑色素癌(melanotic carcinoma)、软癌(carcinoma molle)、粘液癌(mucinous carcinoma)、粘液癌(carcinoma muciparum)、粘液细胞癌(carcinoma mucocellulare)、粘液表皮样癌(mucoepidermoid carcinoma)、粘液癌(carcinoma mucosum)、粘液癌(mucous carcinoma)、粘液瘤样癌(carcinoma myxomatodes)、鼻咽癌(naspharyngeal carcinoma)、燕麦细胞癌(oat cell carcinoma)、骨化性癌(carcinoma ossificans)、类骨质癌(osteoid carcinoma)、胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma)、乳头状癌(papillary carcinoma)、门脉周癌(periportal carcinoma)、

浸润前期癌(preinvasive carcinoma)、棘细胞癌(prickle cell carcinoma)、软糊状癌(pultaceous carcinoma)、肾的肾细胞癌(renal cell carcinoma of kidney)、储备细胞癌(reserve cell carcinoma)、肉瘤样癌(carcinoma sarcomatodes)、施奈德癌(schneiderian carcinoma)、硬性癌(scirrhou carcinoma)、阴囊癌(carcinoma scroti)、印戒细胞癌(signet-ring cell carcinoma)、单纯癌(carcinoma simplex)、小细胞癌(small-cell carcinoma)、马铃薯状癌(solanoid carcinoma)、球状细胞癌(spheroidal cell carcinoma)、梭形细胞癌(spindle cell carcinoma)、髓样癌(carcinoma spongiosum)、鳞癌(squamous carcinoma)、鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma)、绳捆癌(string carcinoma)、血管扩张性癌(carcinoma telangiectaticum)、血管扩张性癌(carcinoma telangiectodes)、移行细胞癌(transitional cell carcinoma)、结节性皮癌(carcinoma tuberosum)、结节性皮癌(tuberous carcinoma)、疣状癌(verrucous carcinoma)和绒毛状癌(carcinoma villosum)。

[0220] 术语“肉瘤”是指由胚胎结缔组织之类的物质构成的肿瘤,通常由嵌入纤维状或均质物质中的紧密堆积的细胞组成。示例性的肉瘤包括,例如,软骨肉瘤、纤维肉瘤、淋巴肉瘤、黑素肉瘤、粘液肉瘤、骨肉瘤、阿伯内西肉瘤(Abemethy's sarcoma)、脂肪肉瘤(adipose sarcoma)、脂肪肉瘤(lipo sarcoma)、腺泡状软组织肉瘤(alveolar soft part sarcoma)、成釉细胞肉瘤、葡萄状肉瘤(botryoid sarcoma)、绿色瘤肉瘤、绒毛膜癌、胚胎性肉瘤(embryonal sarcoma)、维尔姆斯肿瘤肉瘤(Wilms' tumor sarcoma)、子宫内膜肉瘤(endometrial sarcoma)、间质肉瘤(stromal sarcoma)、尤因肉瘤(Ewing's sarcoma)、筋膜肉瘤(fascial sarcoma)、纤维母细胞肉瘤(fibroblastic sarcoma)、巨细胞肉瘤(giant cell sarcoma)、粒细胞肉瘤(granulocytic sarcoma)、霍奇金肉瘤(Hodgkin's sarcoma)、特发性多发性色素沉着出血性肉瘤(idiopathic multiple pigmented hemorrhagic sarcoma)、B细胞免疫母细胞肉瘤(immunoblastic sarcoma of B cells)、淋巴瘤(例如,非霍奇金淋巴瘤)、T细胞免疫母细胞肉瘤(immunoblastic sarcoma of T-cells)、詹森肉瘤(Jensen's sarcoma)、卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)、肝巨噬细胞肉瘤(Kupffer cell sarcoma)、血管肉瘤(angiosarcoma)、白血病性肉瘤(leukosarcoma)、恶性间叶肉瘤(malignant mesenchymoma sarcoma)、骨膜外肉瘤(parosteal sarcoma)、网织红细胞肉瘤(reticulocytic sarcoma)、劳斯肉瘤(Rous sarcoma)、浆液囊性肉瘤(serocystic sarcoma)、滑膜肉瘤和毛细血管扩张性肉瘤(telangiectatic sarcoma)。

[0221] 术语“黑色素瘤”是指由皮肤和其他器官的黑色素细胞体系产生的肿瘤。黑色素瘤包括,例如,肢端雀斑样痣黑色素瘤(acral-lentiginous melanoma)、无黑色素性黑色素瘤(amelanotic melanoma)、良性幼年黑色素瘤(benign juvenile melanoma)、克劳德曼黑色素瘤(Cloudman's melanoma)、S91黑色素瘤、哈-帕二氏黑色素瘤(Harding-Passey melanoma)、幼年黑色素瘤(juvenile melanoma)、恶性雀斑样痣黑色素瘤(lentigo maligna melanoma)、恶性黑色素瘤(malignant melanoma)、结节性黑色素瘤(nodular melanoma)、甲下黑色素瘤(subungual melanoma)和浅表扩散性黑色素瘤(superficial spreading melanoma)。

[0222] 术语“淋巴瘤”是指影响造血和淋巴组织的癌症,其产生于淋巴细胞(主要存在于淋巴结、脾脏、胸腺和骨髓中的血细胞)。淋巴瘤的两种主要类型是非霍奇金淋巴瘤和霍奇

金病。霍奇金病约占所有确诊淋巴瘤的15%。这是一种与里德-斯德伯格氏恶性B淋巴细胞(Reed-Sternberg malignant B lymphocytes)相关的癌症。非霍奇金淋巴瘤(NHL)可以根据癌症的生长速度和涉及的细胞类型进行分类。有具有侵袭性(高级)和惰性(低级)的NHL类型。根据涉及的细胞类型而言,有B细胞和T细胞的NHL。示例性B细胞淋巴瘤包括但不限于小淋巴细胞淋巴瘤、被套细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、边缘区淋巴瘤、黏膜相关淋巴组织结外淋巴瘤(extranodal (MALT) lymphoma)、淋巴结单核细胞样B细胞淋巴瘤(nodal

(monocytoid B-cell) lymphoma)、脾淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、淋巴母细胞淋巴瘤、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤(immunoblastic large cell lymphoma)或前体B淋巴母细胞淋巴瘤(precursor B-lymphoblastic lymphoma)。示例性的T细胞淋巴瘤包括但不限于皮肤T细胞淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤、蕈样肉芽肿和前体T淋巴母细胞淋巴瘤。

[0223] 术语“白血病”是指造血器官的进行性恶性疾病,通常以白细胞及其前体在血液和骨髓中的异常增殖和发育为特征。示例性的白血病包括,例如,急性非淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、急性粒细胞性白血病、慢性粒细胞性白血病、急性早幼粒细胞性白血病、成年T细胞性白血病、非白血性白血病(aleukemic leukemia)、非白血球性白血病(aleukocytic leukemia)、嗜碱性白血病(basophilic leukemia)、母细胞性白血病、牛白血病、慢性髓细胞性白血病、皮肤白血病、胚胎白血病(embryonal leukemia)、嗜酸性白血病(eosinophilic leukemia)、格罗斯白血病(Gross' leukemia)、毛细胞性白血病、成血性白血病(hemoblastic leukemia)、成血细胞性白血病(hemocytoblastic leukemia)、组织细胞性白血病、干细胞性白血病、急性单核细胞性白血病、白细胞减少性白血病、淋巴白血病(lymphatic leukemia)、成淋巴细胞性白血病(lymphoblastic leukemia)、淋巴细胞性白血病、成淋巴性白血病(lymphogenous leukemia)、淋巴样白血病(lymphoid leukemia)、淋巴肉瘤细胞性白血病、肥大细胞性白血病、巨核细胞性白血病、小成髓细胞性白血病、单核细胞性白血病、成髓性白血病(myeloblastic leukemia)、髓细胞性白血病、髓样粒细胞性白血病(myeloid granulocytic leukemia)、髓单核细胞性白血病(myelomonocytic leukemia)、内格利型(Naegeli)白血病、浆细胞白血病(plasma cell leukemia)、浆细胞性白血病(plasmacytic leukemia)、早幼粒细胞性白血病、李德尔细胞性白血病(Rieder cell leukemia)、希林氏白血病(Schilling's leukemia)、干细胞性白血病、亚白血性白血病和未分化细胞性白血病。

[0224] 其他癌症包括,例如,多发性骨髓瘤、神经母细胞瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、横纹肌肉瘤、原发性血小板增多症、原发性巨球蛋白血症、小细胞肺癌、原发性脑肿瘤、胃癌、结肠癌、恶性胰腺岛叶瘤、恶性类癌、癌前皮肤病变、睾丸癌、甲状腺癌、神经母细胞瘤、食道癌、泌尿生殖道癌、恶性高钙血症、宫颈癌、子宫内膜癌和肾上腺皮质癌。

[0225] 四、联合治疗

[0226] 在另一个方面中,本发明提供治疗组合物和联合治疗,用于在对象中增强抗原特异性T细胞应答、降低免疫抑制和/或减缓肿瘤生长。本发明包括包含任意(例如本文中)示例性抗原结合分子与一种或更多种其他治疗药剂组合的组合物和治疗制剂,和包括向有此需要的对象施用这样的组合物的治疗方法。本文所使用的术语“其他治疗药剂”是指可用于治疗疾病或病症的任意药剂,和用于治疗某些疾病或病症的任意方法。例如,当放射治疗和

手术与本发明所述的抗原结合分子例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段组合使用时,其被视为“其他治疗药剂”。

[0227] 在某些实施方案中,所述其他治疗药剂可以是不同于本发明所述的抗原结合分子(例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段)的A2aR拮抗剂。示例性A2aR拮抗剂包括但不限于AZD4635 (AstraZeneca)、NIR178 (Novartis)、AB928 (Arcus)、CPI-444 (Corvus)、EOS850 (iTeos)和MK-3814 (Merck Sharp和Dolme)。

[0228] 在一个实施方案中,所述其他治疗药剂可以抗体或其抗体片段的形式施用,针对另一种腺苷信号通路的成员,例如A1aR拮抗剂、A2bR拮抗剂、A3R拮抗剂、CD39拮抗剂、CD73拮抗剂,或其组合。示例性CD39拮抗剂包括但不限于示例性抗CD39抗体及其抗原结合部位(美国专利10,738,128、10,662,253和10,556,959中有所描述)。示例性小分子CD73拮抗剂包括但不限于AB421、MEDI9447和BMS-986179。示例性抗CD73抗体及其抗原结合位点在专利10,766,966、10,584,169、10,556,968和10,167,343中有所描述。

[0229] 在一些实施方案中,本发明所述的抗A2aR抗原结合分子,例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段,与一种或更多种其他治疗药剂共同施用,其中所述其他治疗药剂具有有效刺激免疫应答和/或细胞凋亡的量,以进一步增强、刺激或上调对象体内的免疫应答和/或细胞凋亡。此外,所述一种或更多种其他有治疗活性的药剂在用抗A2aR抗体治疗之前或之后施用。

[0230] 在某些实施方案中,本文所述的抗A2aR抗体与一种或更多种其他活性药剂(例如抗癌抗体或多肽、化学治疗药剂和放射毒剂)联合施用或同时联合施用。在另一些实施方案中,本文所述的抗A2aR抗体与标准癌症治疗(例如手术或放射)联合施用或同时联合施用。

[0231] 所述抗A2aR抗体与这些活性药剂或治疗方式的共同施用可解决以下临床缺陷:耐药性、导致肿瘤细胞不与抗体反应的抗原性的变化,以及毒性(通过施用较低剂量的一个或更多个药剂)。A2aR抑制特别适合与其他情况下难起效的化学治疗方案联合使用。在这些情况下,其有可能实现增强的效力,同时减少所施用的化疗药剂的剂量(Mokyr等人,(1998) Cancer Research 58:5301-5304)。用放射治疗或化学治疗抑制A2aR的基本原理是基于放射治疗和大多化学治疗化合物的细胞毒作用促进细胞死亡,这可进一步导致抗原呈递通路中肿瘤抗原水平的升高。通过细胞死亡与A2aR抑制相加或协同作用的其他组合疗法包括手术和激素剥夺或抑制。这些方案中的每一个都进一步在宿主中产生肿瘤抗原来源。

[0232] 在一些实施方案中,本文所述的抗A2aR抗体与另一种活性药剂连接成免疫复合物、免疫偶联物或融合蛋白的形式。或者,所述抗A2aR抗体可以与其他活性药剂分开施用。在这种情况下,所述抗A2aR抗体和其他拮抗剂可以在其他活性药剂之前、之后或与其同时施用,或者可与其他已知治疗(例如其他抗癌剂、放射等)共同施用。因此,本发明提供组合物和方法,用于提供两种或更多种抗癌药剂,其通过不同的机制相加或协同作用,以在人癌细胞中有益地提供细胞毒和免疫保护作用。

[0233] 例如,在一些实施方案中,本文所述的抗A2aR抗体可与以下抗癌剂组合:例如烷化剂;蒽环类抗生素;抗代谢物;解毒剂;干扰素;多克隆或单克隆抗体;EGFR抑制剂;HER2抑制剂;组蛋白脱乙酰酶抑制剂;激素;有丝分裂抑制剂;磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)抑制剂;Akt抑制剂;哺乳动物雷帕霉素靶标(mTOR)抑制剂;蛋白酶体抑制剂;聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)抑制剂;Ras/MAPK通路抑制剂;中心体去簇剂;多激酶抑制剂;丝氨酸/苏氨酸激酶抑

制剂;酪氨酸激酶抑制剂;VEGF/VEGFR抑制剂;紫杉烷或紫杉烷衍生物、芳香酶抑制剂、蒽环类药物、微管靶向药物、拓扑异构酶毒性药物、分子靶标或酶(例如激酶或蛋白质甲基转移酶)的抑制剂、胞苷类似物或其组合。

[0234] 示例性烷化剂包括但不限于环磷酰胺(Cytosan;Neosar)、苯丁酸氮芥(Leukeran)、马法兰(Alkeran)、卡莫司汀(BiCNU)、白消安(Busulfex)、洛莫司汀(CeeNU)、达卡巴嗪(DTIC-Dome)、奥沙利铂(Eloxatin)、卡莫司汀(Gliadel)、异环磷酰胺>Ifex)、二氯甲基二乙胺(Mustargen)、白消安(Myleran)、卡铂(Paraplatin)、顺铂(CDDP、Platinol)、替莫唑胺(Temodar)、噻替哌(Thioplex)、苯达莫司汀(Treanda)、或链脲菌素(Zanosar)。

[0235] 示例性的蒽环类抗生素包括但不限于阿霉素(Adriamycin)、阿霉素脂质体(Doxil)、米托蒽醌(Novantrone)、博来霉素(Blenoxane)、柔红霉素(Cerubidine)、柔红霉素脂质体(DaunoXome)、更生霉素(Cosmegen)、表柔比星(Ellence)、伊达比星(Idamycin)、普卡霉素(Mithracin)、丝裂霉素(Mutamycin)、喷司他丁(Nipent)、或戊柔比星(Valstar)。

[0236] 示例性的抗代谢物包括但不限于氟尿嘧啶(Adrucil)、卡培他滨(希罗达)、羟基脲(Hydrea)、巯嘌呤(Purinethol)、培美曲塞(Alimta)、氟达拉滨(Fludara)、奈拉滨(Arranon)、克拉屈滨(Cladribine Novaplus)、氯法拉滨(Clolar)、阿糖胞苷(Cytosar-U)、地西他滨(Dacogen)、阿糖胞苷脂质体(DepoCyt)、羟基脲(Droxia);普拉曲沙(Folotyn)、氟尿苷(FUDR)、吉西他滨(Gemzar)、克拉屈滨(Leustatin)、氟达拉滨(Oforta)、甲氨蝶呤(MTX、Rheumatrex)、甲氨蝶呤(Trexall)、硫鸟嘌呤(Tablod)、TS-1或阿糖胞苷(Tarabine PFS)。

[0237] 示例性解毒剂包括但不限于氨磷汀(Ethyol)或美司钠(Mesnex)。

[0238] 示例性干扰素包括但不限于干扰素 α (α)-2b(Intron A)或干扰素 α -2a(Roferon-A)。

[0239] 示例性的多克隆或单克隆抗体包括但不限于曲妥珠单抗(Herceptin);奥法木单抗(Arzerra);贝伐珠单抗(阿瓦斯汀);利妥昔单抗(Rituxan);西妥昔单抗(Erbix);帕尼单抗(维克替比);托西莫单抗/碘131托西莫单抗(Bexxar);阿伦单抗(Campath);替伊莫单抗(Zevalin;In-111;Y-90Zevalin);吉妥珠单抗(Mylotarg);依库珠单抗(Soliris)或者地舒单抗。

[0240] 示例性的EGFR抑制剂包括但不限于吉非替尼(Iressa);拉帕替尼(Tykerb);西妥昔单抗(Erbix);厄洛替尼(Tarceva);帕尼单抗(Vectibix);PKI-166;卡奈替尼(CI-1033);马妥珠单抗(Emd7200)或EKB-569。

[0241] 示例性的HER2抑制剂包括但不限于曲妥珠单抗(Herceptin);拉帕替尼(Tykerb)或AC-480。

[0242] 示例性组蛋白脱乙酰酶抑制剂包括但不限于伏立诺他(Zolinza)、丙戊酸、罗米地辛、恩替诺特、艾贝司他、吉维诺司他(givinostat)和莫塞替诺特(mocetinostat)。

[0243] 示例性激素包括但不限于他莫昔芬(Soltamox;Nolvadex);雷洛昔芬(Evista);甲地孕酮(Megace);亮丙瑞林(Lupron;Lupron Depot;Eligard;Viadur);氟维司群(Faslodex);来曲唑(Femara);曲普瑞林(Trelstar LA;Trelstar Depot);依西美坦(Aromasin);戈舍瑞林(Zoladex);比卡鲁胺(Casodex);阿那曲唑(Arimidex);氟甲睾酮(Androxy;Halotestin);甲羟孕酮(Provera;Depo-Provera);雌莫司汀(Emcyt);氟他胺

(Eulexin);托瑞米芬(Fareston);地加瑞克(Firmagon);尼鲁米特(Nilandron);阿巴瑞克(Plenaxis);或睾内酯(Teslac)。

[0244] 示例性的有丝分裂抑制剂包括但不限于紫杉醇(Taxol;Onxol;Abraxane);多西紫杉醇(Taxotere);长春新碱(Oncovin;Vincasar PFS);长春碱(Velban);依托泊苷(Toposar;Etopophos;VePesid);替尼泊苷(Vumon);伊沙匹隆(Ixempra);诺考达唑;埃博霉素;长春瑞滨(Navelbine);喜树碱(CPT);伊立替康(Camptosar);拓扑替康(Hycamtin);安吡啶或片螺素D(lamellarin D,LAM-D)。

[0245] 示例性磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)抑制剂包括渥曼青霉素(一种PI3K的不可逆抑制剂)、去甲氧绿胶霉素(demethoxyviridin,一种渥曼青霉素的衍生物)、LY294002(一种PI3K的可逆抑制剂);BKM120(Buparlisib);艾代拉里斯(一种PI3K Delta抑制剂);杜韦利西布(IPI-145,一种PI3K delta和gamma抑制剂);阿培利西(BYL719,一种 α 特异性PI3K抑制剂);TGR 1202(以前称为RP5264,一种口服PI3K δ 抑制剂);和库潘尼西(BAY 80-6946,一种主要是PI3K α , δ 亚型的抑制剂)。

[0246] 示例性Akt抑制剂包括但不限于米替福新、AZD5363、GDC-0068、MK2206、哌立福新、RX-0201、PBI-05204、GSK2141795和SR13668。

[0247] 示例性MTOR抑制剂包括但不限于依维莫司(Afinitor)或替西罗莫司(Torisel);雷帕鸣(rapamune),利罗莫司(ridaforolimus);地磷莫司(deforolimus,AP23573)、AZD8055(AstraZeneca)、OSI-027(OSI)、INK-128、BEZ235、PI-103、Torin1、PP242、PP30、Ku-0063794、WAY-600、WYE-687、WYE-354和CC-223。

[0248] 示例性蛋白酶体抑制剂包括但不限于硼替佐米(PS-341)、伊沙佐米(MLN 2238)、MLN 9708、德兰佐米(CEP-18770)、卡非佐米(PR-171)、YU101、奥普佐米(ONX-0912)、马里佐米(NPI-0052)和双硫仑。

[0249] 示例性PARP抑制剂包括但不限于奥拉帕尼、伊尼帕尼(iniparib)、维利帕尼、BMN-673、BSI-201、AG014699、ABT-888、GPI21016、MK4827、INO-1001、CEP-9722、PJ-34、Tiq-A、Phen、PF-01367338及其组合。

[0250] 示例性Ras/MAPK通路抑制剂包括但不限于曲美替尼、司美替尼、考比替尼、CI-1040、PD0325901、AS703026、R04987655、R05068760、AZD6244、GSK1120212、TAK-733、U0126、MEK1627和GDC-0973。

[0251] 示例性中心体去簇剂包括但不限于灰黄霉素;那可汀、那可汀衍生物,例如溴化那可汀(例如,9-溴那可汀)、还原溴那可汀(RBN)、N-(3-溴苄基)那可汀、氨基那可汀及其水溶性衍生物;CW069;菲衍生聚(ADP-核糖)聚合酶抑制剂,PJ-34;N2-(3-吡啶基甲基)-5-硝基-2-呋喃酰胺、N2-(2-噻吩甲基)-5-硝基-2-呋喃酰胺和N2-苄基-5-硝基-2-呋喃酰胺。

[0252] 示例性多激酶抑制剂包括但不限于瑞戈非尼;索拉非尼(Nexavar);舒尼替尼(Sutent);BIBW 2992;E7080;Zd6474;PKC-412;莫特塞尼;或AP24534。

[0253] 示例性的丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂包括但不限于,鲁伯斯塔;伊瑞/法舒地尔(eril/easudil)盐酸盐;夫拉平度;塞利西利(CYC202;Roscovitrine);SNS-032(BMS-387032);Pkc412;苔藓抑素;KAI-9803;SF1126;VX-680;Azd1152;Array-142886(AZD-6244);SCIO-469;GW681323;CC-401;CEP-1347或PD 332991。

[0254] 示例性酪氨酸激酶抑制剂包括但不限于厄洛替尼(Tarceva);吉非替尼(Iressa);

伊马替尼(Gleevec);索拉非尼(Nexavar);舒尼替尼(Sutent);曲妥珠单抗(Herceptin);贝伐珠单抗(Avastin);利妥昔单抗(Rituxan);拉帕替尼(Tykerb);西妥昔单抗(Erbitux);帕尼单抗(Vectibix);依维莫司(Afinitor);阿伦单抗(Campath);吉妥单抗(Mylootarg);替西罗莫司(Torisel);帕唑帕尼(Votrient);达沙替尼(Sprycel);尼洛替尼(Tasigna);瓦他拉尼(Ptk787;ZK222584);CEP-701;SU5614;MLN518;XL999;VX-322;Azd0530;BMS-354825;SKI-606CP-690;AG-490;WHI-P154;WHI-P131;AC-220;或AMG888。

[0255] 示例性的VEGF/VEGFR抑制剂包括但不限于贝伐珠单抗(Avastin);索拉非尼(Nexavar);舒尼替尼(Sutent);雷珠单抗;培加他尼;或凡德替尼。

[0256] 示例性微管靶向药物包括但不限于紫杉醇、多西紫杉醇、长春新碱、长春碱、诺考达唑、埃博霉素和长春瑞滨。

[0257] 示例性拓扑异构酶毒性药物包括但不限于替尼泊苷、依托泊苷、阿霉素、喜树碱、柔红霉素、更生霉素、米托蒽醌、安吡啶、表柔比星和伊达比星。

[0258] 示例性紫杉烷或紫杉烷衍生物包括但不限于紫杉醇和多西紫杉醇。

[0259] 示例性一般化学治疗药剂、抗肿瘤剂、抗增殖剂包括但不限于六甲蜜胺(Hexalen);异维A酸(Accutane;Amnesteem;Claravis;Sotret);维A酸(Vesanoid);阿扎胞苷(Vidaza);硼替佐米(Velcade);天冬酰胺酶(Elspar);左旋咪唑(Ergamisol);米托坦(Lysodren);甲基苄肼(Matulane);培门冬酶(Oncaspar);地尼白介素diftitox(Ontak);卟吩姆(porfimer, Photofrin);阿地白介素(Proleukin);来那度胺(Revlimid);贝沙罗汀(Targretin);沙利度胺(Thalomid);替西罗莫司(Torisel);三氧化二砷(Trisenox);维替泊芬(Visudyne);含羞草素(Leucenol);(1M替加氟-0.4M 5-氯-2,4-二羟基嘧啶-1M氧酸钾)或洛伐他汀。

[0260] 在某些实施方案中,A2aR抑制与CD3刺激联合进行(例如,通过与表达膜CD3的细胞共孵育),CD3刺激在抗A2aR抗体治疗之前、同时或之后。例如,在一个实施方案中,增强抗原特异性T细胞应答的方法包括使T细胞与本文所述的抗A2aR抗体和表达CD3的细胞接触,使得抗原特异性T细胞应答增强,A2aR介导的免疫抑制降低。抗原特异性T细胞应答的任何合适的指标都可用于测量抗原特异性T细胞应答。这样的合适指标的非限制性实例包括在抗体的存在下T细胞增殖提高和/或在抗体的存在下细胞因子产生增加。在一个优选的实施方案中,所述抗原特异性T细胞的白介素-2和/或干扰素- γ 的产生得到增强。

[0261] 在一些实施方案中,本文所述的抗A2aR抗体还可与双特异性抗体联合使用,所述双特异性抗体将表达Fc α 或Fc γ 受体的效应细胞靶向至肿瘤细胞(参见例如美国专利5,922,845和5,837,243)。这样的双特异性抗体可用于靶向两种不同的抗原。例如,抗Fc受体/抗肿瘤抗原(例如Her-2/neu)的双特异性抗体已被用于将巨噬细胞靶向肿瘤部位。这种靶向可更有效地激活肿瘤特异性响应。这些响应的T细胞臂会因A2aR的抑制而增强。或者,可使用结合肿瘤抗原和树突细胞特异性细胞表面标记物的双特异性抗体将抗原直接递送至DC。

[0262] 在所有上述方法中,A2aR抑制可与以下其他形式的免疫治疗相结合:例如细胞因子治疗(例如,干扰素、GM-CSF、G-CSF、IL-2),或利用了两种不同结合特异性的双特异性抗体治疗,以提供增强的肿瘤抗原呈递。

[0263] 在一些实施方案中,用于任意前述治疗方法、用于抗原结合分子或药物组合物的

所述其他治疗药剂是选自以下的免疫刺激剂：(a) 阻断免疫细胞抑制性受体(免疫检查点)信号传导的药剂或其配体(免疫检查点抑制剂)或编码这样的药剂的核酸；(b) 免疫细胞刺激受体的激动剂或编码这种激动剂的核酸；(c) 细胞因子或编码细胞因子的核酸；(d) 溶瘤病毒或编码溶瘤病毒的核酸；(e) 表达嵌合抗原受体的T细胞；(f) 双特异性或多特异性T细胞靶向抗体或编码这样的抗体的核酸；(g) 抗TGF- β 抗体或编码这样的抗体的核酸；(h) TGF- β 诱捕器或编码这样的诱捕器的核酸；

(i) 癌症相关抗原的疫苗,包括这样的抗原或编码这样的抗原的核酸,(j) 细胞治疗,和(k) 以上的组合。在一些实施方案中,所述其他治疗药剂是阻断免疫细胞的抑制性受体或其配体的信号传导的药剂或编码这样的药剂的核酸,所述抑制性受体或其配体选自PD-1、PD-L1、TIGIT、CTLA-4、PD-L2、LAG-3、TIM-3、B7-H3、B7-H4、CD73、PVRIG/PVRL2、神经突蛋白、BTLA、CECAM-1、CECAM-5、CECAM6、IL-1R8、VISTA、LAIR1、LILRB1、LILRB2、LILRB3、LILRB4、LILRB5、CD47、SIRPa、CD200R、CD96、CD112R、2B4、TGF β -R、KIR、NKG2A、SEMA4D、Ax1、MerTK、GAS6、TNFR2、GARP、CCR8、IDO、NOX2、SIGLEC7、SIGLEC15及其组合。在一些实施方案中,所述其他治疗药剂是免疫细胞刺激受体的激动剂或编码这样的激动剂的核酸,所述激动剂选自OX40、CD2、CD3、CD7、CD16、CD27、CD28、CD30、CD40、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)、4-1BB (CD 137)、GITR、BAFFR、HVEM、LIGHT、KG2C、SLAMF7、NKG2C、NKG2D、NKp46、NKp80、CD160及其组合。在一些实施方案中,所述其他治疗药剂是细胞因子或编码选自IL-2、IL-5、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21及其组合的细胞因子的核酸。在一些实施方案中,所述其他治疗药剂是溶瘤病毒或编码选自单纯疱疹病毒、水泡性口炎病毒、腺病毒、新城疫病毒、牛痘病毒、马拉巴病毒及其组合的溶瘤病毒的核酸。在一些实施方案中,所述其他治疗药剂是细胞治疗。细胞治疗可包括具有嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor, CAR)的T细胞、NK细胞或巨噬细胞。在一些实施方案中,所述细胞治疗包括双特异性或多特异性T细胞靶向抗体。

[0264] 本文所使用术语“免疫检查点蛋白”是指在免疫细胞(例如T细胞)上表达的受体和/或其配体。配体与受体的结合可减少或抑制免疫细胞的免疫应答。免疫检查点抑制剂是一种减少或抑制配体与受体结合的药剂。

[0265] 本文所使用术语“免疫细胞的刺激受体”是指免疫细胞上的受体,该受体在与其配体结合之后可增强免疫细胞的免疫应答。

[0266] 在某些实施方案中,本发明提供了在对象中治疗疾病或病症(例如癌症)的方法。所述方法包括本发明的抗原结合分子,例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段,单独或与第二次的一种或更多种其他治疗药剂组合施用至对象,其中对象先前已接受过第一次的一种或更多种其他治疗药剂的治疗。在某些实施方案中,用第一次的一种或更多种治疗药剂在对象中治疗疾病时可能表现出低功效。例如,用所述第一次的一种或更多种治疗药剂进行的治疗可以用抗PD1抗体进行的治疗,对象可能对其表现出抗性。在一些实施方案中,所述第二次的一种或更多种其他治疗药剂与所述第一次的一种或更多种其他治疗药剂相同。在一些实施方案中,所述第二次的一种或更多种其他治疗药剂与所述第一次的一种或更多种其他治疗药剂不同。

[0267] 在某些实施方案中,所述免疫检查点抑制剂是特异性地与免疫检查点相互作用的抗体。在一些实施方案中,所述其他治疗药剂包括免疫刺激剂。在一些方面中,所述免疫检

查点抑制剂选自抗PD-1抗体(例如,帕博利珠单抗或纳武利尤单抗),和抗PD-L抗体(例如,阿替利珠单抗),和抗CTLA-4抗体(例如,伊匹单抗),及其组合。在一些方面中,所述免疫检查点抑制剂是帕博利珠单抗。在一些方面中,所述免疫检查点抑制剂是纳武利尤单抗。在一些方面中,所述免疫检查点抑制剂是阿替利珠单抗。

[0268] 在一些实施方案中,所述其他治疗药剂是抑制PD-1和PD-L1之间相互作用的药剂。在一些方面中,所述抑制PD-1和PD-L1之间相互作用的其他治疗药剂选自抗体、拟肽和小分子。在一些方面中,所述抑制PD-1和PD-L1之间相互作用的其他治疗药剂选自帕博利珠单抗、纳武利尤单抗、阿替利珠单抗、阿维鲁单抗、度伐利尤单抗、BMS-936559、信迪利单抗、特瑞普利单抗、替雷利珠单抗、卡瑞利珠单抗、恩沃利单抗、舒格利单抗、派安普利单抗、卡度尼利单抗、磺胺间甲氧嘧啶和磺胺甲二唑。

[0269] 在一些实施方案中,所述抗A2aR抗体与免疫原性药剂组合或同时施用。免疫原性药剂的非限制性实例包括癌细胞、肿瘤疫苗和纯化的肿瘤抗原(包括重组蛋白、肽和碳水化合物分子);溶瘤病毒;转染了编码免疫刺激细胞因子等的基因的细胞。

[0270] 在某些实施方案中,所述抗A2aR抗体与目标抗原或已知存在于待治疗的对象(例如,携带肿瘤或携带病毒的对象)体内的抗原一起施用以增强抗原特异性免疫。当抗A2aR抗体与另一药剂一起施用时,两者可分开或同时施用。

[0271] 在某些实施方案中,可通过将任何本文所述的抗A2aR抗体中的一种或更多种与目的抗原(例如疫苗)共同施用来增强抗原特异性免疫应答。因此,在一个实施方案中,用于在对象体内增强对抗原的免疫应答的方法包括向对象施用:(i)抗原;和(ii)基于A2aR的抗体,从而增强对象对抗原的免疫应答。所述抗原可以是,例如肿瘤抗原、病毒抗原、细菌抗原或来自病原体的抗原。这样的抗原的非限制性实例包括上文部分描述的抗原,例如上文讨论的肿瘤抗原(或肿瘤疫苗),或来自病毒、细菌或上文描述的其他病原体的抗原。

[0272] 考虑到与活性剂组合物有关的协同益处,在某些实施方案中,抗A2aR抗体和其他活性药剂各自以相对于其单一治疗中使用的剂量的亚治疗剂量施用于有需要的对象。

[0273] 在某些实施方案中,A2aR抑制与标准癌症治疗(例如手术、放射治疗和化学治疗)进行联合。在这些情况下,有可能减少化疗药剂的施用剂量。据信,A2aR抑制和化学治疗的联合使用可加剧细胞凋亡并提高肿瘤抗原呈递以实现细胞毒性免疫。其他协同联合治疗包括A2aR抑制与放射治疗、手术或激素剥夺或抑制相结合。这些方案中的每一个都在宿主中产生肿瘤抗原来源。

[0274] 所述其他治疗药剂可在施用本发明所述的抗原结合分子之前、同时或之后进行施用;(出于本公开的目的,这样的施用方案被认为是抗原结合分子与另外的治疗活性成分“联合”施用)。

[0275] 本发明包括药物组合物,其中本发明所述的抗原结合分子与一种或更多种本文所述的其他治疗药剂被共同配制。

[0276] 五、用于表达抗A2aR抗体的核酸和宿主细胞

[0277] 在另一个方面中,本发明提供编码本发明所述的抗原结合分子(例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段)的核酸,以及包含这样的核酸的表达载体。在一些实施方案中,核酸编码根据本文所述的实施方案的抗体或片段的HCVR和/或LCVR片段,或者编码本文所述的任何其他抗体和抗体片段。

[0278] 可使用常规方法(例如,通过使用能够特异性地与编码单克隆抗体重链和轻链的基因结合的寡核苷酸探针)将编码单克隆抗体中抗原结合位点的DNA从杂交瘤细胞中分离并测序。或者,可通过直接蛋白质测序来确定目标免疫球蛋白的氨基酸序列,并且可根据通用密码子表来设计合适的编码核苷酸序列。在其他情况下,抗原结合位点的核苷酸和氨基酸序列或其他免疫球蛋白序列,包括恒定区、铰链区等,都可从本领域公知的公开来源获得。

[0279] 表达载体可用于在体外培养的细胞中合成本公开所述的抗体,或者其可直接施用于患者以在体内或离体表达本公开所述的抗体。本文所使用的“表达载体”是指病毒或非病毒载体,其包含编码一个或多个本公开所述抗体的多核苷酸,其形式适合在宿主细胞中表达多核苷酸以用于抗体制备目的或作为治疗药剂直接施用。

[0280] 当一个核酸序列被置于与另一个核酸序列的功能关系中时,称一个核酸序列“可操作地连接”另一个核酸序列。例如,如果前序列或信号肽的DNA表达参与多肽分泌的前蛋白,则所述前序列或信号肽的DNA可操作地连接多肽的DNA;如果启动子或增强子影响序列的转录,则所述启动子或增强子可操作地连接编码序列;或者如果核糖体结合位点被定位以便于翻译,则所述核糖体结合位点可操作地连接编码序列。通常,“可操作地连接”是指被连接的DNA序列是连续的,并且在信号肽存在的情况下,其是连续的并且处于读取阶段。然而,增强子不必是连续的。连接是通过在方便的限制性位点上连接来完成的。如果不存在这样的位点,则可根据常规做法使用合成的寡核苷酸衔接子或接头。

[0281] 用于表达本公开所述抗体的核酸序列通常包含从成熟蛋白中去除的N端信号肽序列。由于信号肽序列可影响表达水平,多核苷酸可编码多种不同的N端信号肽序列中的任意一种。本领域技术人员应当理解,表达载体的设计可取决于以下因素:待转化的宿主细胞的选择、目标蛋白质的表达水平等。

[0282] 上述“调节序列”是指在一种或更多种宿主生物体中表达可操作连接的编码序列所必需的DNA序列。术语“调节序列”旨在包括启动子、增强子和其他表达控制元件(例如,聚腺苷酸化信号)。调节序列包括在许多类型的宿主细胞中指导核苷酸序列组成型表达的调节序列,或者仅在某些宿主细胞中指导核苷酸序列表达的调节序列(例如,组织特异性调节序列)。表达载体通常含有用于转录终止的序列,并且可另外含有一种或更多种对mRNA稳定性有积极影响的元件。

[0283] 所述表达载体包含一种或更多种转录调节元件,包括启动子和/或增强子,用于指导本公开所述抗体的表达。启动子包含DNA序列,其功能是从对于转录起始位点的相对固定的位置启动转录。启动子包含对于RNA聚合酶和转录因子的基本相互作用所需的核心元件,并且可与其他上游元件和响应元件一起操作。

[0284] 本文所使用的术语“启动子”应广义解释以包括例如来自基因组基因的转录调控元件(TREs)或其嵌合TREs,包括TATA盒或用于精确转录起始的起始元件,含或不含其他TREs(即,上游激活序列、转录因子结合位点、增强子和沉默子),其调节可操作连接的基因的激活或抑制以响应发育和/或外部刺激,以及反式作用调节蛋白或核酸。启动子可包含基因组片段或者其可包含一个或多个TRE组合在一起的嵌合体。

[0285] 优选的启动子是能够在目标靶细胞中指导高水平表达的启动子。所述启动子可包括组成型启动子(例如,HCMV、SV40、延伸因子-1 α (EF-1 α)),或在特定目标细胞类型中表现

出优先表达的启动子。增强子通常是指远离转录起始位点发挥作用的DNA序列,其可位于转录单位的5'或3'端。此外,增强子可落在内含子内以及编码序列内。其长度通常在10至300bp之间,并且以顺式方式发挥作用。增强子的功能是提高和/或调节附近启动子的转录。优选的增强子包括在产生抗体的细胞中指导高水平表达的增强子。可将细胞或组织特异性转录调控元件(TRE)并入表达载体中,以使表达限制在期望的细胞类型中。Po1 III启动子(H1或U6)特别可用于表达可表达siRNA的shRNA。可设计表达载体以促进本公开所述抗体在一种或更多种细胞类型中的表达。

[0286] siRNA是一种双链RNA,可对其进行改造以诱导mRNA的序列特异性转录后的基因沉默。合成的siRNA在结构上模拟通常在细胞中由Dicer酶加工而产生的siRNA类型。当用表达载体表达时,所述表达载体被改造以将处理过的转录短双链发夹样RNA(shRNA)转录为细胞内的靶向siRNA。可使用公知的算法设计并使用常规的DNA/RNA合成仪合成siRNA和shRNA。

[0287] 为了进行本公开的抗体的独立的链的共表达,可并入合适的剪接供体和剪接受体序列以表达两种产物。或者,内部核糖体结合序列(IRES)或2A肽序列可用于由一个启动子表达多种产物。IRES提供了核糖体可与之结合的结构,其不需要位于mRNA的5'端。因此,其可指导核糖体在mRNA中的第二个起始密码子处开始翻译,使得单个mRNA产生不止一种多肽。2A肽包含短序列,所述短序列介导2A位点上游和下游肽的共翻译自裂解,使得等摩尔量的单个转录物产生两种不同的蛋白质。CHYSEL是2A肽的非限制性实例,其使得翻译中的真核核糖体释放其正在合成的增长的多肽链,而不与mRNA解离。所述核糖体继续翻译,从而产生第二个多肽。

[0288] 表达载体可包括病毒载体或非病毒载体。病毒载体可来源于腺相关病毒(AAV)、腺病毒、疱疹病毒、牛痘病毒、脊髓灰质炎病毒、痘病毒、逆转录病毒(包括慢病毒,例如HIV-1和HIV-2)、辛德毕斯(Sindbis)病毒和其他RNA病毒、甲病毒、星状病毒、冠状病毒、正粘病毒、乳多空病毒、副粘病毒、细小病毒、微小核糖核酸病毒、披膜病毒(togaviruses)等。非病毒载体只是一种“裸”表达载体,其没有与病毒衍生成分(例如,衣壳和/或包膜)包装在一起。

[0289] 在某些情况下,可通过使用病毒载体固有的或工程化到病毒载体中的靶向特性来改造这些载体以靶向某些疾病或细胞群。特定细胞可被“靶向”用于多核苷酸的递送以及表达。在这种情况下,因此术语“靶向”是指使用衣壳、包膜蛋白、抗体形式的内源性或异源性结合剂对特定细胞进行递送,或指使用组织特异性调节元件来限制到特定的细胞子集的表达,或两者均有。

[0290] 在一些实施方案中,抗体链的表达处于调节元件(例如组织特异性或普遍存在的启动子)的控制之下。在一些实施方案中,普遍存在的启动子(例如CMV启动子、CMV-鸡 β -肌动蛋白杂交(CAG)启动子、组织特异性或肿瘤特异性启动子)控制特定抗体重链或轻链或单链衍生物的表达。

[0291] 既可通过直接注射裸DNA,也可通过将编码抗体的多核苷酸封装在脂质体、微粒、微胶囊、病毒样颗粒或红细胞影中,将非病毒表达载体用于非病毒基因的转移。可通过化学偶联将这样的组合物进一步连接至靶向结构域,以促进核酸的靶向递送至和/或进入期望的目标细胞。此外,质粒载体可与合成基因转移分子(例如聚合DNA结合阳离子例如聚赖氨酸、鱼精蛋白和白蛋白)一起孵育,并与细胞靶向配体(例如脱唾液酸类粘蛋白、胰岛素、半

乳糖、乳糖或转铁蛋白)连接。

[0292] 或者,可应用裸DNA。可通过压缩或者使用可生物降解的乳胶珠子来改善裸DNA的摄取效率。可通过处理珠子以提高疏水性并从而促进破坏核内体以及释放DNA到细胞质中来进一步改善这种递送。

[0293] 六、用于生产抗A2aR抗体的方法

[0294] 在另一个方面中,本发明提供转化有编码抗A2aR HCVR和/或LCVR的核酸或表达载体的宿主细胞。所述宿主细胞可以是能够表达以下的任何细菌或真核细胞:编码抗A2aRHCVR和/或LCVR的核酸或表达载体,或本文所述的任何其他共同施用的抗体或拮抗剂。

[0295] 在另一个方面中,制备本公开所述的抗体的方法包括在允许产生抗体或其片段的条件下培养转化有编码抗A2aRHCVR和/或LCVR的核酸或表达载体的宿主细胞,以及细胞中纯化抗体。

[0296] 在另一个方面中,本发明提供用于制备抗体的方法,包括培养可瞬时或稳定表达编码抗体中的一条或更多条多肽链的一种或更多种构建体的细胞;以及从培养的细胞中纯化抗体。可使用任何能够产生功能性抗体的细胞。在优选的实施方案中,所述表达抗体的细胞是真核或哺乳动物来源细胞,优选人细胞。多种组织细胞类型的细胞可用于表达抗体。在另一些实施方案中,所述细胞是酵母细胞、昆虫细胞或细菌细胞。优选地,用表达抗体的载体稳定转化所述产生抗体的细胞。

[0297] 可通过任何常规方法将一种或更多种编码抗体重链或轻链的表达载体引入细胞,所述常规方法包括例如裸DNA技术、阳离子脂质介导的转染、聚合物介导的转染、肽介导的转染、病毒介导的感染、物理或化学试剂或处理、电穿孔等。此外,可用一种或更多种表达抗体的表达载体连同有助于选择表达抗体的稳定转化的克隆的选择标记一起转染细胞。可根据本领域已知的技术收集和/或纯化由这样的细胞产生的抗体,例如离心、层析等。

[0298] 适用于哺乳动物细胞的选择性标记的实例包括二氢叶酸还原酶(DHFR)、胸苷激酶、新霉素、新霉素类似物G418、氢霉素和嘌呤霉素。当这样的选择标记成功转移到哺乳动物宿主细胞中时,经转化的哺乳动物宿主细胞可在选择压力下存活。有两类广泛使用的不同的选择方案。第一类是基于细胞的新陈代谢和使用缺乏独立于补充培养基生长的能力的突变细胞系。两个实例为CHO DHFR-细胞和小鼠LTV细胞。如果不添加胸苷或次黄嘌呤等营养物质,这些细胞就无法生长。因为这些细胞缺乏完整核苷酸合成途径所必需的某些基因,所以除非在补充培养基中提供缺失的核苷酸,否则它们无法存活。补充培养基的另一种方法是将完整的DHFR或TK基因引入缺乏相应基因的细胞中,从而改变它们的生长需求。未用DHFR或TK基因转化的个体细胞将无法在未补充的培养基中存活。

[0299] 第二类是显性选择,其指的是在任何细胞类型中都可使用的选择方案,不需要使用突变细胞系。在这些方案中,通常使用药物来阻止宿主细胞的生长。具有新基因的细胞会表达传递耐药性的蛋白质,并会在选择中存活下来。这样的显性选择的实例包括使用药物新霉素、麦考酚酸或潮霉素。在这三个实例中,真核生物控制下的细菌基因分别对适宜的药物G418或新霉素(遗传霉素)、xgpt(麦考酚酸)或潮霉素传递耐药性。其他药物包括新霉素类似物G418和嘌呤霉素。

[0300] 示例性表达抗体的细胞包括人T淋巴细胞白血病细胞(Jurkat)、人胚肾(HEK) 293细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、小鼠WEHI纤维肉瘤细胞,以及单细胞原生动物物种,例如利

什曼原虫 (*Leishmania tarentolae*)。此外,可使用用c-myc或其他永生化剂永生化的原代细胞来产生稳定转化的产生抗体的细胞系。

[0301] 在一个实施方案中,所述细胞系包括稳定转化的利什曼原虫细胞系,例如利什曼原虫 (*Leishmania tarentolae*)。已知利什曼原虫可提供强大的、快速生长的单细胞宿主,其可用于高水平表达表现出哺乳动物型糖基化模式的真核蛋白质。可商业购买利什曼原虫真核表达试剂盒 (Jena Bioscience GmbH, 耶拿, 德国)。

[0302] 在一些实施方案中,每升培养物中,所述细胞系表达至少1mg、至少2mg、至少5mg、至少10mg、至少20mg、至少50mg或至少100mg的抗体。

[0303] 本发明所述的抗体可在任何合适的培养基 (例如RPMI、DMEM和AIM V[®]) 中培养和维持,然后从抗体表达细胞中分离。可使用常规蛋白质纯化方法 (例如亲和纯化、层析等) 纯化抗体,包括使用蛋白质-A或蛋白质-G免疫亲和纯化。在一些实施方案中,将抗体改造以使其分泌至培养物上清中用于从中分离。

[0304] 七、药物组合物和给药方法

[0305] 在一个方面中,本发明的药物组合物包含本文所述的抗原结合分子 (例如A2aR抗体或其抗原结合片段),以及药学上可接受的载体。在另一些实施方案中,所述A2aR抗体或其抗原结合片段与药学上可接受的载体联合施用。如本文所述,抗A2aR组合物可包含一种或更多种不同抗体、一种或更多种多特异性抗体、一种或更多种融合蛋白、一种或更多种免疫偶联物或其组合。

[0306] 本发明提供药物组合物,其包含本发明所述的抗原结合分子。本发明所述的药物组合物与合适的载体、赋形剂和其他药剂一起配制,所述其他药剂可改善转移、递送、耐受性等。多种合适的制剂可见于药物化学家已知的处方集:Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA。这些制剂包括,例如,散剂、糊剂、软膏剂、胶冻剂、蜡剂、油剂、脂质、含脂质 (阳离子或阴离子) 的囊泡 (例如LIPOFECTIN[™], Life Technologies, Carlsbad, CA)、DNA偶联物、无水吸收糊剂、水包油和油包水乳剂、碳蜡乳剂 (多种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶剂和含有碳蜡的半固体混合物。另见Powell等人,

“Compendium of excipients for parenteral formulations” PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311。

[0307] 施用于患者的抗原结合分子的剂量可根据患者的年龄和体型、目标疾病、病症、施用途径等而变化。优选剂量通常根据体重或体表面积计算。当本发明所述的双特异性抗原结合分子是出于治疗的目的而用于成年患者时,有利的方案是以约0.01至约20mg/kg体重的单剂量静脉内施用本发明所述的双特异性抗原结合分子,更优选约0.02至约7、约0.03至约5或约0.05至约3mg/kg体重。根据病情的严重程度,可调整治疗的频率和持续时间。可凭经验确定施用双特异性抗原结合分子的有效剂量和时间安排;例如,可通过定期评估来监测患者的病情进展,并相应地调整剂量。此外,可使用本领域公知的方法进行剂量的种间缩放 (例如, Mordenti等人, 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351)。

[0308] 已知多种递送系统并且其可用于施用本发明的药物组合物,例如,包封于脂质体、微粒、微囊、能够表达突变病毒的重组细胞、受体介导的内吞作用 (参见,例如, Wu等人, 1987, J. BioI. Chem. 262:4429-4432)。导入方法包括但不限于皮内、肌内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和经口途径。可通过任何方便的途径施用所述组合物,例如通过输注或

推注注射,通过经由上皮或粘膜皮肤内层(例如,口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收,并且可与其他生物活性剂一起施用。施用可以是全身或局部施用。

[0309] 可用标准针和注射器皮下或静脉内递送本发明所述的药物组合物。此外,关于皮下递送,笔式递送装置容易应用于递送本发明所述的药物组合物。这种笔式递送装置可以是可重复使用的或一次性的。可重复使用的笔式递送装置通常使用包含药物组合物的可更换药筒。一旦药筒内的所有药物组合物都已被施用并且药筒已空,则可容易地丢弃空药筒并替换上包含药物组合物的新药筒。然后可以重复使用笔式递送装置。在一次性笔式递送装置中,没有可更换的药筒。相反,一次性笔式递送装置预填充有药物组合物,其保存在装置内的储器中。一旦储器中的药物组合物被清空,整个装置就被丢弃。

[0310] 在某些情况下,所述药物组合物可以以控制释放系统递送。在一个实施方案中,可以使用泵(参见Langer,同上;Sefton,1987,CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.14:201)。在另一个实施方案中,可以使用聚合物材料;参见,Medical Applications of Controlled Release,Langer and Wise

(eds.),1974,CRC Pres.,Boca Raton,Florida。在又一个实施方案中,可以将控制释放系统放置于组合物的靶标附近,因此仅需要全身剂量的一部分即可(参见,例如,Goodson,1984,in Medical Applications of Controlled Release,同上,第2卷,第115-138页)。在Langer,1990,Science249:1527-1533的综述中讨论了其他控制释放系统。

[0311] 所述注射剂可以包括用于静脉内、皮下、皮内和肌内注射、滴注等的剂型。这些注射剂可以通过公知的方法制备。例如,可通过例如将上述抗体或其盐溶解、悬浮或乳化在常规用于注射的无菌水性介质或油性介质中来制备可注射制剂。注射用的水性介质包括例如生理盐水、含有葡萄糖和其他助剂等的等渗溶液等,其可与以下适当的增溶剂组合使用:例如醇类(例如乙醇)、多元醇(例如,丙二醇、聚乙二醇)、非离子表面活性剂(例如,聚山梨酯80、HCO-50(聚氧乙烯(50mol)氢化蓖麻油的加合物))等。油性介质包括例如芝麻油、大豆油等,其可与苯甲酸苄酯、苯甲醇等增溶剂组合使用。制备的注射剂最好装在合适的安瓿瓶中。

[0312] 有利地,将上述用于经口或肠胃外使用的药物组合物制备成适合于活性成分剂量的单位剂量的剂型。这样的单位剂量剂型包括例如片剂、丸剂、胶囊剂、注射剂(安瓿)、栓剂等。上述抗体的含量通常为单位剂量中每个剂型约5至约500mg;特别是在注射剂形式中,优选含有约5至约100mg的上述抗体,对于其他剂型,优选含有约10至约250mg。

[0313] 在另一个方面中,用于治疗细胞增殖性病症(例如癌症、慢性感染或免疫受损疾病状态)的方法包括向有此需要的对象施用含有本文所述的抗A2aR抗体或其抗原结合片段与药学上可接受的载体的组合的药物组合物。在一些实施方案中,所述方法恢复、加强或增强有此需要的对象的淋巴细胞活性。在某些优选的实施方案中,所述抗体或片段是降低或消除了A2aR的信号传导的人或人源化抗A2aR抗体。

[0314] 在一些实施方案中,施用所述药物组合物提高患有疾病患者的淋巴细胞(例如T细胞)的活性,其中提高的淋巴细胞活性是有益的,或所述疾病是由免疫抑制、免疫抑制细胞、或例如CD4 T细胞、CD8 T细胞、B细胞产生的腺苷引起或以此为特征的。本文所述的方法特别有用,例如,在患有实体瘤的患者中,肿瘤微环境(和其中产生的腺苷)可有助于减少免疫系统的识别(免疫逃逸)。例如,肿瘤可以以表达(或过度表达)A2aR的免疫细胞为特征,例如

CD4 T细胞、CD8 T细胞、T-regs、B细胞。

[0315] 在某些实施方案中,所述方法和组合物用于治疗多种癌症和其他增殖性疾病。由于这些方法可用于降低可抑制淋巴细胞的抗肿瘤活性的腺苷水平,适用于非常广泛的癌症,特别是实体瘤,已知所述实体瘤肿瘤微环境中的腺苷抑制抗肿瘤免疫应答。

[0316] 使用本发明所述的抗原结合分子(例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段)用于治疗的非限制性癌症包括例如肝癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、乳腺癌、肺癌、非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)、去势抵抗性前列腺癌(CRPC)、黑色素瘤、子宫癌、结肠癌、直肠癌、肛门癌、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、非霍奇金淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、儿童实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾脏或输尿管、肾盂癌、中枢神经系统(central nervous system, CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊柱轴肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、环境诱发的癌症(包括由石棉诱发的癌症)、血液恶性肿瘤,包括例如多发性骨髓瘤、B细胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤/原发性纵隔B细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、急性骨髓性淋巴瘤、慢性骨髓性白血病、慢性淋巴性白血病,滤泡性淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、免疫母细胞大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、蕈样肉芽肿、间变性大细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤和前体T淋巴母细胞淋巴瘤,或这些癌症的任意组合。本公开还适用于转移性癌症的治疗。可以在治疗之前、期间或之后测试或选择患者的一种或多种上述临床属性。

[0317] 在一个实施方案中,施用有效量的所述抗A2aR抗体以在个体中实现和/或维持(例如,持续1、2、3、4周,和/或直到之后施用抗原结合化合物)其血液浓度至少是 EC_{50} ,任选地 EC_{70} ,任选地基本上 EC_{100} ,用于中和A2aR的酶活性。在一个实施方案中,抗A2aR抗体的活性量是实现在个体血管外组织中的A2aR酶活性的中和的 EC_{50} ,任选地 EC_{70} ,任选地基本上 EC_{100} 的有效量。在一个实施方案中,抗A2aR抗体的活性量是在个体中实现(或维持)抑制中和A2aR酶活性 EC_{50} ,任选地 EC_{70} ,任选地基本上 EC_{100} 的有效量。

[0318] 任选地,在一个实施方案中,与一些通过ADCC消除表达A2aR的肿瘤细胞的抗体(其可,例如以在等于或显著低于提供受体饱和的浓度下发挥全部功效)相反,所述抗A2aR抗体主要是一种阻断剂(没有实质性的Fc γ 受体介导的活性),并且以中和A2aR的酶活性的有效量施用一段理想的时间(例如,1周、2周、一个月),直到下一次连续施用抗A2aR抗体。

[0319] 在一个实施方案中,施用有效量的所述抗A2aR抗体以实现和/或维持(例如,持续1、2、3、4周,和/或直到之后的抗A2aR抗体的施用)其在个体中抑制A2aR介导的AMP到腺苷的分解代谢的至少 EC_{50} ,任选地 EC_{70} ,任选地基本上 EC_{100} 的血液浓度。在一个实施方案中,所述抗A2aR抗体的量是实现(或维持)其在个体的血管外组织中抑制A2aR介导的AMP分解代谢为腺苷的 EC_{50} ,任选地 EC_{70} ,任选地基本上 EC_{100} 的有效量。

[0320] 在一个实施方案中,本发明提供用于在个体中治疗或预防个体癌症的方法,所述方法包括向患有疾病的个体施用一定量的抗A2aR抗体,所述抗体的量可达到或维持指定时间段内的循环浓度,任选地在目标血管外组织(例如肿瘤或肿瘤环境)中,其浓度高于循环中表达A2aR的细胞达到50%、70%或完全(例如90%)受体饱和的浓度(例如在PBMC中评估的)。任选地,所达到的浓度比特定受体饱和的浓度高至少20%、50%或100%。

[0321] 在一个实施方案中,本发明提供用于治疗或预防个体癌症的方法,所述方法包括向个体施用一定量的抗A2aR抗体,所述抗体的量是在循环中,任选地在目标血管外组织(例如,肿瘤或肿瘤环境)中达到或维持一段特定时间的浓度,其高于用于结合表达A2aR的细胞的 EC_{50} ,任选地 EC_{70} ,或任选地 EC_{100} 。任选地,达到的浓度比用于结合表达A2aR的细胞的 EC_{50} ,任选地 EC_{70} ,或任选地 EC_{100} 高至少20%、50%或100%。

[0322] 在任意实施方案中,例如所述抗体用于结合人PBMC中A2aR表达细胞的 EC_{50} ,任选地 EC_{70} ,或任选地 EC_{100} 在0.5-100ng/ml之间,任选地1-100ng/ml,任选地30-100ng/ml,例如,约30-90ng/ml。例如,所述 EC_{50} 可以是约30、37、39、43、57、58、61、62、90、95、143ng/ml。

[0323] 用于使用抗A2aR抗体来中和A2aR的酶活性的 EC_{50} 可以是,例如约0.01 μ g/ml和1 μ g/ml之间,任选地在0.1 μ g/ml和10 μ g/ml之间,任选地在0.1 μ g/ml和1 μ g/ml之间。例如,所述 EC_{50} 可以是约0.1 μ g/ml、约0.2 μ g/ml或约0.3 μ g/ml。因此,例如施用一定量的该抗A2aR抗体以达到和/或维持至少0.1 μ g/ml、任选至少0.2 μ g/ml、任选至少1 μ g/ml或任选至少2 μ g/ml的血液浓度。

[0324] 当对脉管系统外的组织靶向时(肿瘤环境,例如,在实体瘤的治疗中),通常需要与在循环中提供相应浓度的剂量相比大约10倍高的剂量。实现(和/或维持)循环(血液)中约1 μ g/ml、2 μ g/ml、10 μ g/ml或20 μ g/ml的浓度的抗A2aR抗体的施用量,预期可分别达到(和/或维持)约0.1 μ g/ml、0.2 μ g/ml、1 μ g/ml、2 μ g/ml的血管外组织(例如肿瘤组织)浓度。

[0325] 在一个实施方案中,例如施用一定量的抗A2aR抗体以达到和/或维持至少0.1 μ g/ml、任选至少0.2 μ g/ml、任选至少1 μ g/ml,或任选地至少2 μ g/ml的组织(例如肿瘤环境)浓度。所述抗体可以例如以一定的量施用,所述抗体的量可实现和/或维持至少约1 μ g/ml、2 μ g/ml、10 μ g/ml或20 μ g/ml的血液浓度,例如,1-100 μ g/ml、10-100 μ g/ml、1-50 μ g/ml、1-20 μ g/ml或1-10 μ g/ml。可调整施用量以在施用之后的指定时间段(例如,1、2、3、4周等)内维持所期望的浓度。

[0326] 在一些实施方案中,施用一定量的抗A2aR抗体以获得血液(血清)或血管外组织(例如,肿瘤环境)中用于中和A2aR的酶活性的至少 EC_{70} 或 EC_{100} 的浓度。所述抗体可以例如以一定的量施用,所述抗体的量可以实现和/或维持至少约1 μ g/ml、2 μ g/ml、10 μ g/ml或20 μ g/ml的血液或血管外组织(例如,肿瘤环境)浓度。

[0327] 给定A2aR抗体的 EC_{50} 、 EC_{70} 和 EC_{100} 的值可以例如在中和A2aR的酶活性的细胞测定中评估。中和A2aR的酶活性的“ EC_{50} ”是指可以产生最大中和酶活性的反应或作用的50%的抗A2aR抗体的浓度。中和A2aR的酶活性的“ EC_{70} ”是指产生最大反应或作用的70%的抗A2aR抗体的浓度。中和A2aR的酶活性的“ EC_{100} ”是指可以产生这种中和酶活性的最大反应或作用的抗A2aR抗体的有效浓度。在某些实施方案中,根据上下文, EC_{50} 、 EC_{70} 或 EC_{100} 可分别指代为 IC_{50} 、 IC_{70} 或 IC_{100} 以反映抗原结合分子(例如抗A2aR抗体或其抗原结合片段)抑制A2aR的活性。 IC_{xx} 是指抑制生物过程的xx%所需的药物浓度。

[0328] 在一些实施方案中,特别是对于实体瘤的治疗,设计所达到的浓度为使组织(在脉管系统之外,例如,在肿瘤或肿瘤环境中)中的浓度对应于中和酶活性的至少 EC_{50} ,任选地约为或至少约为 EC_{100} 。

[0329] 在一个实施方案中,抗A2aR抗体的量在1和20mg/kg体重之间。在一个实施方案中,每周、每两周、每月或每两个月给个体施用所述的量。

[0330] 在一个实施方案中,在有此需要的对象中治疗癌症的方法包括向个体施用有效量的本公开所述的抗A2aR抗体至少一个施用周期(任选地至少2、3、4或更多施用周期),其中所述周期是八周或更短的时间,其中对于至少一个周期中的每一个来说,以1-20mg/kg体重的剂量施用一剂、两剂、三剂或四剂抗A2aR抗体。在一个实施方案中,通过静脉内输注来施用所述抗A2aR抗体。

[0331] 用于治疗例如人对象的合适的治疗方案包括,例如,以本文公开的量向患者施用抗A2aR抗体,其中所述方法包括至少一个施用周期,在一个施用周期中施用至少一个剂量的抗A2aR抗体。任选地,施用至少2、3、4、5、6、7或8个剂量的抗A2aR抗体。在一个实施方案中,所述施用周期为2周至8周。

[0332] 在一个实施方案中,用于在个体中治疗或预防个体疾病(例如,癌症、实体瘤、血液肿瘤)的方法包括向个体施用抗A2aR抗体,所述抗体中和A2aR的酶促活性至少一个施用周期,所述施用周期包括至少第一次和第二次(以及任选地第3、4、5、6、7和/或8次或更多次)施用所述抗A2aR抗体,其中所述抗A2aR抗体以有效量施用,所述有效量使在两次连续施用之间抗A2aR抗体的血液(血清)浓度的量达到或维持在至少0.1 μ g/ml、至少0.2 μ g/ml、至少1 μ g/ml、至少2 μ g/ml,至少10 μ g/ml,至少20 μ g/ml,1-100 μ g/ml,1-50 μ g/ml,1-20 μ g/ml,1-10 μ g/ml或任意上述浓度之间的范围。

[0333] 在一个实施方案中,维持指定的连续血液浓度,其中所述血液浓度在指定时间段(例如,两次抗体施用之间、周数、1周、2周、3周、4周)内不会显著低于指定的血液浓度。换句话说,尽管血液浓度在指定时间段内会发生变化,但保持的指定血液浓度代表最小或“谷值”浓度。

[0334] 在一个实施方案中,抗A2aR抗体的治疗活性量的是指这样的抗体能够在血液和/或组织中提供(至少)EC₅₀浓度、任选地EC₇₀浓度、任选地EC₁₀₀浓度以在施用所述抗体后在一段时间内中和A2aR的酶活性的量,所述一段时间为至少约1周、约2周或约1个月。

[0335] 在使用本公开所述的抗A2aR抗体治疗之前或期间,可在患者肿瘤内和/或其附近评估细胞中A2aR、CD39和/或CD73的表达水平;A2aR表达细胞、CD39表达细胞和/或CD73表达细胞的百分比;和/或腺苷、ADP和/或AMP的水平,以评估患者是否适合治疗以及是否可能对治疗有响应。前述的水平或表达的提高可指示个体适合用(例如,可能受益于)本公开所述的抗A2aR抗体治疗。

[0336] 在一些实施方案中,评估患者肿瘤组织样品内和/或其附近的A2aR、CD39和/或CD73的表达水平以及腺苷、ADP和/或AMP的浓度的步骤包括从对象处获得人体组织的生物样品,所述人体组织选自癌症患者的组织,例如癌组织、癌附近或周围的组织、癌邻近组织、邻近非肿瘤组织或正常邻近组织,以及组织内A2aR、CD39和/或CD73的表达水平以及腺苷、ADP和/或AMP的浓度。患者体内的所述表达水平或核苷酸浓度可与参考水平(例如,健康个体的水平)进行比较。

[0337] 与治疗(或抗体给药)前的水平相比,施用(或抗体给药)后腺苷、ADP和/或AMP水平的降低可以表明个体正受益于本公开所述的抗A2aR抗体(包括但不限于抑制底物结合A2aR的抗体)的治疗。任选地,如果患者受益于用抗A2aR抗体的治疗,则方法可以进一步包括单独或与另一种活性剂组合向患者施用另外剂量的抗A2aR抗体(例如,继续治疗)。

[0338] 鉴于前述,在某些实施方案中,所述方法包括以下步骤:(a) 确定在肿瘤环境中,任

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

[0339] 在某些实施方案中,确定肿瘤环境中A2aR、CD39、CD73、腺苷、ADP和/或AMP的水平包括从对象处获得含有癌组织和/或接近或位于肿瘤周围的组织(例如,癌邻近组织、邻近非肿瘤组织或正常邻近组织)的生物样品,并检测A2aR表达细胞、CD39表达细胞和/或CD73表达细胞的水平和/或其相对百分比,和/或腺苷、ADP和/或AMP的水平。A2aR表达细胞、CD39表达细胞和/或CD73表达细胞可包括例如肿瘤细胞、CD4T细胞、CD8 T细胞、B细胞及其组合。可使用本领域普通技术人员公知的技术,通过与健康对象的参考水平或与治疗前的参考水平相比,评估A2aR、CD39、CD73的mRNA表达(通过例如RT-PCR法)或多肽表达(通过例如蛋白印迹法、免疫荧光染色法),以确定A2aR、CD39、CD73的表达水平。

[0340] 在评估或不评估肿瘤微环境(例如,肿瘤细胞、CD4 T细胞、CD8 T细胞,B细胞)中的A2aR、CD39、CD73、腺苷、ADP和/或AMP水平的情况下,都可使用抗A2aR抗体治疗患有癌症的对象。

[0341] 与参照相比,生物样品包括过表达A2aR、CD39和/或CD73的细胞,和/或含有高浓度的腺苷、ADP和/或AMP的细胞的确定结果表明对象患有癌症,所述癌症可受益于A2aR抑制剂的治疗。在一些实施方案中,术语“过表达”是指在取自给定患者的大量细胞中表达A2aR、CD39和/或CD73多肽,例如取自对象的至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或更多的肿瘤细胞或淋巴细胞。

[0342] 在一个实施方案中,用于在有此需要的对象中治疗或预防癌症的方法包括以下步骤:(a)检测肿瘤环境中,任选地在肿瘤内和/或邻近组织中的A2aR、CD39和/或CD73的细胞百分比和/或表达程度,并且在确定肿瘤环境包括过表达A2aR、CD39和/或CD73的细胞,任选地与合适的参考水平相比,A2aR、CD39和/或CD73的水平提高之后,(b)向对象施用抗A2aR抗体。在一个实施方案中,所述细胞是肿瘤细胞。在另一个实施方案中,肿瘤环境、肿瘤和/或邻近组织内的细胞是非恶性免疫细胞,例如T细胞。

[0343] 在一些实施方案中,确定肿瘤环境中A2aR、CD39和/或CD73的表达程度包括从个体获得生物样品,所述生物样品包含癌组织和/或接近癌或癌周围的组织(例如,癌邻近组织、邻近非肿瘤组织或正常邻近组织);使细胞与结合A2aR多肽、CD39多肽和/或CD73多肽的抗体接触,并检测A2aR、CD39和/或CD73的细胞百分比和/或表达程度。在某些实施方案中,使用免疫组化法通过A2aR、CD39和/或CD73的细胞表面表达来评估他们的表达。

[0344] 抗体组合物可作为单一治疗使用或与一种或更多种其他治疗药剂进行联合治疗,所述其他治疗药剂包括通常用于施用抗体的特定治疗目的的药剂。参见上面的“联合治疗”。通常以在其他治疗药剂治疗特定疾病或病症的单一疗法中通常使用的量和治疗方案施用该药剂。这样的治疗药剂包括但不限于抗癌剂和化学治疗药剂。

[0345] 如上所述,本文所述的使用药物组合物的方法包括向有此需要的对象施用有效量的本公开所述的药物组合物。

[0346] 可以采用任何合适的施用途径或模式来为患者提供治疗或预防有效剂量的抗体。示例性施用途径或模式包括肠胃外(例如静脉内、动脉内、肌内、皮下、瘤内)、经口、经表面(鼻腔、透皮、皮内或眼内)、粘膜(例如鼻腔、舌下、口腔、直肠、阴道),吸入、淋巴内、脊柱内、

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

[0347] 包含本公开所述的抗A2aR抗体的药物组合物可配制在任何药学上可接受的载体或赋形剂中。本文所用的术语“药学上可接受的载体”包括生理上相容的任意和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等张剂和吸收延迟剂等。药物组合物可包含合适的固相或凝胶相载体或赋形剂。示例性的载体或赋形剂包括但不限于碳酸钙、磷酸钙、多种糖、淀粉、纤维素衍生物、明胶和聚合物例如聚乙二醇。示例性的药学上可接受的载体包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合中的一种或更多种。在许多情况下，优选在组合物中包含等张剂，例如糖、多元醇例如甘露醇、山梨糖醇或氯化钠。药学上可接受的载体还可包含少量的辅助物质，例如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂，其可以提高治疗药剂的保质期或有效性。

[0348] 在某些优选的实施方案中，治疗活性剂可并入至适用于肠胃外给药的药物组合物中。可配制通过注射例如通过推注或连续输注而用于肠胃外施用的药物组合物。

[0349] 合适的缓冲剂包括但不限于琥珀酸钠、柠檬酸钠、磷酸钠或磷酸钾。浓度为0-300mM（对于液体剂型，最佳浓度为150mM）的氯化钠可用于改变溶液的毒性。冻干剂型可包含冷冻保护剂，主要是0-10%的蔗糖（最佳0.5-1.0%）。其他合适的冷冻保护剂包括海藻糖和乳糖。冻干剂型可以包含填充剂，主要是1-10%的甘露醇（最佳2-4%）。稳定剂可用于液体剂型和冻干剂型，主要是1-50mM的L-甲硫氨酸（最佳5-10mM）。其他合适的填充剂包括甘氨酸、精氨酸，以及0-0.05%的聚山梨醇酯-80（最佳0.005-0.01%）。其他表面活性剂包括但不限于聚山梨醇酯20和BRIJ表面活性剂。

[0350] 治疗药剂制剂可进行冻干并作为无菌粉末储存，优选在真空下储存，然后在注射之前在抑菌水（包含例如苯甲醇防腐剂）或无菌水中重构。所述药物组合物中的治疗药剂可以以“治疗有效量”或“预防有效量”进行配制。“治疗有效量”是指在必要的剂量和时间段内有效实现期望的治疗结果的量。抗体或有活性的药剂的治疗有效量可根据以下情况而变化：待治疗的病症、病症的严重程度和病程、施用方式、抗体或活性剂是出于预防目的还是治疗目的而施用、特定药剂的生物利用度、抗体在个体中引起所需反应的能力、先前治疗、患者的年龄、体重和性别、患者的临床病史和对抗体的响应、所用抗体的类型，主治医师的酌情决定等。治疗有效量也是治疗有益作用大于重组载体的任何毒性或有害作用的量。“预防有效量”是指在必要的剂量和时间段内有效实现期望的预防结果的量。

[0351] 优选地，在本文所述的抗体或其他活性剂中使用的多肽结构域源自相同的宿主，在所述宿主中施用所述多肽结构域以减少施用所述治疗药剂引起的炎症响应。如上所建议的，在一次或在一系列治疗中适当地向对象施用所述治疗药剂，并且可以在从诊断开始的任何时间向患者施用所述治疗药剂。所述A2aR抗体可以作为单独的治疗施用或与可用于治疗所讨论病症的其他活性剂或治疗联合施用。

[0352] 无论是一次还是多次施用，一般建议施用A2aR抗体（或其他活性剂）的治疗有效量或预防有效量在约1ng/kg体重/天至约100mg/kg体重/天的范围内。在一个具体实施方案中，各A2aR抗体或活性剂的施用范围为约1ng/kg体重/天至约10mg/kg体重/天，约1ng/kg体重/天至约1mg/kg体重/天，约1ng/kg体重/天至约100μg/kg体重/天，约1ng/kg体重/天至约10μg/kg体重/天，约1ng/kg体重/天至约1μg/kg体重/天，约1ng/kg体重/天至约100ng/kg体

重/天,约1ng/kg体重/天至约10ng/kg体重/天,约10ng/kg体重/天至约100mg/kg体重/天,约10ng/kg体重/天至约10mg/kg体重/天,约10ng/kg体重/天至约1mg/kg体重/天,约10ng/kg体重/天至约100 μ g/kg体重/天,约10ng/kg体重/天至约10 μ g/kg体重/天,约10ng/kg体重/天至约1 μ g/kg体重/天,10ng/kg体重/天至约100ng/kg体重/天,约100ng/kg体重/天至约100mg/kg体重/天,约100ng/kg体重/天至约10mg/kg体重/天,约100ng/kg体重/天至约1mg/kg体重/天,约100ng/kg体重/天至约100 μ g/kg体重/天,约100ng/kg体重/天至约10 μ g/kg体重/天,约100ng/kg体重/天至约1 μ g/kg体重/天,约1 μ g/kg体重/天至约100mg/kg体重/天,约1 μ g/kg体重/天至约10mg/kg体重/天,约1 μ g/kg体重/天至约1mg/kg体重/天,约1 μ g/kg体重/天至约100 μ g/kg体重/天,约1 μ g/kg体重/天至约10 μ g/kg体重/天,约10 μ g/kg体重/天至约100 mg/kg体重/天,约10 μ g/kg体重/天至约10mg/kg体重/天,约10 μ g/kg体重/天至约1mg/kg体重/天,约10 μ g/kg体重/天至约100 μ g/kg体重/天,约100 μ g/kg体重/天至约100mg/kg体重/天,约100 μ g/kg体重/天至约10mg/kg体重/天,约100 μ g/kg体重/天至约1mg/kg体重/天,约1mg/kg体重/天至约100mg/kg体重/天,约1mg/kg体重/天至约10mg/kg体重/天,约10mg/kg体重/天至约100mg/kg体重/天。

[0353] 在另一些实施方案中,所述A2aR抗体和/或活性剂的施用剂量为每三天500 μ g至20g或每三天25mg/kg体重的剂量。

[0354] 在另一些实施方案中,各A2aR抗体和/或活性剂在每次单独施用中的施用范围为约10ng至约100ng,约10ng至约1 μ g,约10ng至约10 μ g,约10ng至约100 μ g,约10ng至约1mg,约10ng至约10mg,约10ng至约100mg,约10ng至约1000mg,约10ng至约10,000mg,约100ng至约1 μ g,约100ng至约10 μ g,约100ng至约100 μ g,约100ng至约1mg,约100ng至约10mg,约100ng至约100mg,约100ng至约1000mg,约100ng至约10,000mg,约1 μ g至约10 μ g,约1 μ g至约100 μ g,约1 μ g至约1mg,约1 μ g至约10mg,约1 μ g至约100mg,约1 μ g至约1000mg,约1 μ g至约10,000mg,约10 μ g至约100 μ g,约10 μ g至约1mg,约10 μ g至约10mg,约10 μ g至约100mg,约10 μ g至约1000mg,约10 μ g至约10,000mg,约100 μ g至约1mg,约100 μ g至约10mg,约100 μ g至约100mg,约100 μ g至约1000mg,约100 μ g至约10,000mg,约1mg至约10mg,约1mg至约100mg,约1mg至约1000mg,约1mg至约10,000mg,约10mg至约100mg,约10mg至约1000mg,约10mg至约10,000mg,约100mg至约1000mg,约100mg至约10,000mg,或约1000mg至约10,000mg。可以每天、每2、3、4、5、6或7天,或每1、2、3或4周施用本公开所述的抗体。

[0355] 在另一些具体实施方案中,各A2aR抗体或活性剂的施用量可以为以下剂量:约0.0006mg/天、0.001mg/天、0.003mg/天、0.006mg/天、0.01mg/天、0.03mg/天、0.06mg/天、0.1mg/天、0.3mg/天、0.6mg/天、1mg/天、3mg/天、6mg/天、10mg/天、30mg/天、60mg/天、100mg/天、300mg/天、600mg/天、1000mg/天、2000mg/天、5000mg/天或10,000mg/天。

[0356] 在某些实施方案中,所述A2aR抗体和/或其他活性剂的编码序列被并入合适的表达载体(例如,病毒或非病毒载体)以在需要根据上述方法进行治疗的对象中表达有效量的A2aR抗体或其他活性剂。在包括施用例如一种或更多种重组AAV(rAAV)病毒的某些实施方案中,所述药物组合物可包含的rAAVs的量为每千克包含至少 10^{10} 、至少 10^{11} 、至少 10^{12} 、至少 10^{13} ,或至少 10^{14} 个基因组拷贝(GC)或重组病毒颗粒,或其任意范围。在某些实施方案中,所述药物组合物包含有效量的所述重组病毒,例如rAAV,其量为每个对象包含至少 10^{10} 、至少 10^{11} 、至少 10^{12} 、至少 10^{13} ,至少 10^{14} 、至少 10^{15} 个基因组拷贝或重组病毒颗粒基因组拷贝,或

其任意范围。

[0357] 可在适合任何特定细胞增殖病症或免疫受损疾病状态的一种或几种本领域接受的动物模型中测试剂量。

[0358] 递送方法还可包括使用与杀伤的病毒连接或未连接的聚阳离子浓缩DNA、配体连接的DNA、脂质体、真核细胞递送载体细胞、光聚合水凝胶材料的沉积、手持式基因转移粒子枪的使用、电离辐射、核电荷与细胞膜的中和或融合、粒子介导的基因转移等。

[0359] 八、抗体的诊断用途

[0360] 本发明所述的抗原结合分子(例如抗体或其抗原结合片段)也可用于检测和/或测量样品中的人或食蟹猴A2aR,或人或食蟹猴A2aR表达细胞,例如用于诊断目的。例如,抗A2aR抗体或其抗原结合片段可用于诊断以A2aR的异常表达(例如,过表达、表达不足、缺乏表达等)为特征的病症或疾病。对A2aR的示例性诊断测定包括,例如,使获自患者的样品与本发明所述的抗体接触,其中用可检测的标记或报告分子标记所述抗体。或者,可未标记的抗体与本身是可检测标记的二抗结合用于诊断应用。所述可检测的标记或报告分子可以是放射性同位素,例如³H、¹⁴C、¹⁸F、³²P、³⁵S或¹²⁵I;荧光或化学发光部分,例如异硫氰酸荧光素或罗丹明;或酶,例如碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、辣根过氧化物酶或荧光素酶。可用于检测或测定样品中A2aR的具体示例性测定法包括酶联免疫吸附测定法(ELISA)、放射免疫测定法(RIA)和荧光激活细胞分选法(FACS)。可用于本发明所述的A2aR诊断测定的样品包括可从患者处获得的任何组织或液体样品,其在正常或病理条件下含有可检测量的A2aR蛋白或其片段。通常,测量获自健康患者(例如未患有与异常A2aR水平或活性相关的疾病或病症的患者)的特定样品中的A2aR水平以初步建立A2aR的基线或标准水平。然后可以将该A2aR基线水平与从疑似患有A2aR相关疾病或病症的个体获得的样品中测得的A2aR水平进行比较。

[0361] 此外,可通过免疫亲和纯化,使用本文所述的抗A2aR抗体来纯化人A2aR。

[0362] 九、药剂盒

[0363] 本文所述的任意组合物,例如本发明所述的抗A2aR抗原结合分子,和/或其他治疗药剂,都可包含在药剂盒中。在非限制性实例中,所述药剂盒包含抗原结合分子,例如抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,所述药剂盒还包括本文的其他治疗药剂。

[0364] 所述药剂盒还可包含用于治疗疾病或病症的药剂或说明书。其还可包含一个或更多个缓冲剂。

[0365] 所述药剂盒的所述成分可以以水性介质或冻干形式包装。所述药剂盒的容器装置通常包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶子、注射器或其他容器装置,可将组分放置,优选地,适当地分装在所述容器装置中。如果所述药剂盒中有不止一种组分(标记药剂和标签可以包装在一起),则所述药剂盒通常还包含第二个、第三个或其他容器,所述另外的组分可单独地放入所述其他容器中。所述药剂盒还可以包含第二个容器装置,用于容纳无菌的药学上可接受的缓冲液和/或其他稀释剂。此外,小瓶中可包含组分的多种组合。本发明所述的药剂盒通常还包含用于容纳本发明所述的组合物(例如抗A2aR抗原结合分子和/或其他治疗药剂)的装置,以及密闭的用于商业销售的任意其他药剂容器。

[0366] 当药剂盒的组分以一种和/或更多种液体溶液的形式提供时,所述液体溶液是水溶液,特别优选无菌水溶液。此外,所述药剂盒的组分可以以干粉形式提供。当药剂和/或组分以干粉形式提供时,可以通过添加合适的溶剂来重构所述干粉。假定也可以在另一个容

器装置中提供溶剂。

[0367] 通过以下实施例进一步说明本发明,但其不应被解释为限制本发明。本申请全文引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容以及图和表均通过引用并入本文。

实施例

实施例1:示例性人源化抗A2aR单克隆抗体的产生

[0368] 使用‘601公布中所公开的三种小鼠抗人A2aR单克隆抗体1B5-3D7、3F6-9G5和3F8-12E9以产生示例性人源化抗A2aR单克隆抗体。基于小鼠抗A2aR单克隆抗体与人种系之间的序列相同,用IgBlast算法来选择最接近的人重链可变区(VH)种系和轻链可变区(VL)种系。对来自‘601公布中公开抗体的CDR区进行识别,并且基于Kabat编号和IMGT编号方案的组合对其进行定义(参见表1和表2)。将所选择的人种系的框架用作‘601公布中公开抗体的CDR的受体。已知游标区残基通过以下方式参与抗原结合:与抗原直接接触,影响CDR环,或者影响VH/VL界面的链-停靠。游标区残基的多个组合被反向突变为‘601公布中公开的亲本抗体的鼠源残基。

[0369] 为了确认人源化抗体保留有‘601公布中公开的亲本抗体的一种或更多种功能或特征(例如与人A2aR的特异性结合或对腺苷通路的抑制),CRO BonOpus Bioscience或BioIntron合成了各个人源化VH结构域和各个VL结构域,并将其分别框内克隆至含有人IgG1 FES(L234F、L235E、P331S)同型恒定结构域序列的HC质粒和含有人IgK同型恒定结构域序列的LC质粒中。对每个质粒进行测序和限制性酶消化以确认插入的人源化VH或VL结构域的序列和方向。然后使用Expi293转染试剂盒(Gibco,货号:A14524),按照制造商的手册和说明,将不同HC和LC质粒的基质组合成对转染至Expi293F细胞(Gibco)中。转染5天后,收集上清。将每份上清样品以90 μ l/孔的量装载至384孔板(Corning,货号:3575)中,并且用Gator Plus(Gator Bio)按照制造商推荐的方案用ProA探针对抗体浓度进行定量。基于使用Durvalumab(Imfinzi,商业抗PD-L1抗体药物)产生的标准曲线来计算每份上清液样品中的抗体浓度。然后对上清进行归一化,用于进一步表征。

[0370] 为了生产纯化的重组抗体,制备了转染级的各个人源化抗体变体或其衍生亲本克隆(1B5-3D7、3F6-9G5、3F8-12E9)的各对重链和轻链质粒。ExpiCHO细胞被用于瞬时转染。转染后5至7天收集上清液,通过CRO BioIntron来纯化IgG1 FES(L234F、L235E、P331S)抗体。

[0371] 在某些测试中,将‘601公布中的亲本抗体转化为嵌合抗体。为了产生嵌合抗体,合成了亲本抗体的VH结构域和VL结构域,并将其分别框架内克隆至含有人IgG1 FES(L234F、L235E、P331S)同种型恒定结构域序列的HC质粒和含有人IgK同种型恒定结构域序列的LC质粒中,用这种方法产生的抗体被称为嵌合抗体。例如,来源于克隆3F6-9G5的嵌合抗体可称为“嵌合3F6”或“嵌合3F6-9G5”。

实施例2:示例性人源化抗A2aR单克隆抗体与人A2aR的结合

[0372] 本研究旨在确认本发明的示例性人源化抗A2aR单克隆抗体是否结合在细胞表面表达的人A2aR。

[0373] (1) 经转染的Expi293F细胞上清中的示例性人源化抗A2aR单克隆抗体与人A2aR的结合

[0374] 简言之,从新鲜培养物中收集稳定过表达人A2aR的HEK293细胞(HEK-hA2aROCL, BPS Bioscience,货号:79381)。然后将细胞以10⁶/ml的浓度重新悬浮于FACS缓冲液(1x

DPBS/1%FBS)中。将100微升(μ l)细胞等分至96孔板的每个孔中。在离心之后,将各个孔中的细胞沉淀物重新悬浮于100 μ l归一化上清样品中,其中所述归一化上清样品含有1 μ g/ml人源化抗A2aR单克隆抗体变体,其是从经转染的Expi293细胞培养物中收集的。将上清液与细胞混合并在冰上孵育1小时。在用FACS缓冲液洗涤上清(含有已表达的抗体)与A2aR表达细胞的混合物之后,将100微升(μ l)以1:400稀释的PE-偶联的抗人Fc二抗(Jackson Immuno Research,货号:109-116-098)添加至每个孔中,随后在冰上孵育30分钟。在用FACS缓冲液洗涤之后,将经染色的细胞重新悬浮于150 μ l以1xDPBS缓冲液稀释(1:100)的7-AAD(Biolegend,货号:420404)中,并在黑暗中室温孵育5分钟,然后进行FACS分析。使用Guava 11HT或5HT(Luminex)来获得平均荧光强度(mean fluorescence intensity,MFI)。使用Flowjo软件来分析数据。

[0375] 下文表22至24汇总了上述测定的MFI值。如表22至24所示,示例性人源化抗A2aR抗体与在细胞表面表达的A2aR结合。MFI值越大,意味着示例性抗体与细胞表面表达的A2aR的结合越强。

表22:示例性人源化抗A2aR与细胞表面的人A2aR的结合(1B5-3D7来源的)

	Hu1B5-L1	Hu1B5-L2	Hu1B5-L3	Hu1B5-L4	Hu1B5-L5	1B5-3D7 LC
Hu1B5-H1	34	62	1836	1566	481	
Hu1B5-H2	165	243	1874	1632	728	
Hu1B5-H2.1	145	225	1861	1715	960	
Hu1B5-H3	152	231	1851	1552	686	
Hu1B5-H4	182	263	1861	1784	872	
Hu1B5-H5	82	283	1951	1713	823	
Hu1B5-H6	178	359	1913	1908	702	
1B5-3D7 HC						1961*

[0376] *:三个平行测试的平均值

表23:示例性人源化抗A2aR与细胞表面的人A2aR的结合(3F6-9G5来源的)

	Hu3F6- L1	Hu3F6- L2	Hu3F6- L3	Hu3F6- L4	Hu3F6- L5	Hu3F6- L6	Hu3F6- L7	Hu3F6- L8	3F6-9G5 LC
Hu3F6-H1	15	14	1599	1320	1498	313	290	1417	
Hu3F6-H2	13	146	1828	1594	1790	1575	1181	1712	
Hu3F6-H3	12	200	1928	1839	1902	1658	1508	1829	
Hu3F6-H4	21	255	1963	1450	1994	1965	1880	1707	
Hu3F6-H5	25	191	2091	1916	1848	1845	1892	1890	
Hu3F6-H6	27	17	2089	1997	1978	979	1173	1998	
3F6-9G5 HC									2044*

[0377] *:三个平行测试的平均值

表24: 示例性人源化抗A2aR与细胞表面的人A2aR的结合 (3F8-12E9来源的)

	Hu3F8-L1	Hu3F8-L2	Hu3F8-L3	Hu3F8-L4	Hu3F8-L5	3F8-12E9 LC
Hu3F8-H1	9	10	1810	1746	1791	
Hu3F8-H2	16	38	1805	1784	1771	
Hu3F8-H3	64	93	1865	1838	1853	
Hu3F8-H4	110	131	1909	1877	1887	
Hu3F8-H5	58	147	1836	1843	1902	
Hu3F8-H6	158	285	1875	1882	1899	
3F8-12E9 HC						1918*

[0378] *:四个平行测试的平均值

[0379] (2) 经纯化的由ExpiCHO细胞表达的示例性人源化抗A2aR单克隆抗体的结合

[0380] 简言之,从新鲜培养物中收集稳定过表达人A2aR的HEK293细胞(HEK-hA2aROCL, BPS Bioscience, 货号:79381)。然后将细胞以 2×10^6 /ml的浓度重新悬浮于FACS缓冲液(1x DPBS/2% FBS)中。将100微升(μ l)细胞等分至96孔板的每个孔中。在离心之后,将各个孔中的细胞沉淀物重新悬浮于经1:3连续稀释(起始浓度:3.3 μ g/mL,在FACS缓冲液(1xPBS, 2% FBS)中稀释)的纯化的示例性抗体(由ExpiCHO细胞表达并由CRO BioIntron进行纯化)中。将连续稀释的抗体与细胞混合并在冰上孵育30分钟。在用FACS缓冲液洗涤之后,将100微升(μ l)PE-偶联的抗人Fc二抗(以1:400稀释, Jackson Immuno Research, 货号:109-116-098)添加至每个孔中,随后在冰上孵育30分钟。在用FACS缓冲液洗涤之后,将经染色的细胞重新悬浮于200 μ l的7-AAD(Biolegend, 货号:420404,以1:100稀释于1xDPBS缓冲液中)中,并在黑暗中于室温孵育5分钟,然后在Guava 11HT或5HT(Luminex)上进行流式细胞术分析。获得了平均荧光强度(MFI)并且使用Flowjo软件来分析数据。

[0381] 下表25汇总了上述测定的EC50值。确认了本公开的示例性人源化抗A2aR抗体特异

性地与细胞表面表达的A2aR结合。使用亲本3F6-9G5和3F8-12E9抗体作为阳性对照。使用抗HEL同种型对照(BioIntron)作为阴性对照。

表25: 示例性人源化抗A2aR与细胞表面人A2aR的结合

抗体	EC ₅₀ (nM)
Hu3F6 VH2/VL3	0.65
Hu3F6 VH2/VL4	0.68
Hu3F6 VH2/VL5	0.53
Hu3F6 VH2/VL8	0.76
Hu3F6 VH3/VL3	0.64
Hu3F6 VH3/VL4	0.68
Hu3F6 VH3/VL5	0.57
Hu3F6 VH3/VL8	0.76
Hu3F6 VH5/VL3	0.5
Hu3F6 VH5/VL4	0.52
Hu3F6 VH5/VL5	0.59

Hu3F6 VH5/VL8	0.59
Hu3F8 VH1/VL5	0.85
Hu3F8 VH2/VL3	0.66
Hu3F8 VH2/VL5	0.9
Hu3F8 VH3/VL3	0.69
Hu3F8 VH3/VL5	0.83
Hu3F8 VH4/VL3	0.6
Hu3F8 VH4/VL4	0.79
Hu3F8 VH4/VL5	0.75
Hu3F8 VH5.1/VL3	0.62
Hu3F8 VH5.1/VL5	0.69
Hu3F8 VH6/VL3	0.59
Hu3F8 VH6/VL5	0.65
3F6-9G5*	0.71
3F8-12E9	0.48

[0382] *:7个平行测试的平均值

实施例3:人源化抗人A2aR单克隆抗体的体外阻断活性

[0383] A2aR的活性由Gs蛋白介导,其激活腺苷酸环化酶,引起细胞内cAMP的合成。cAMP的水平与各自的腺苷(激动剂)水平相关。可通过多种商业cAMP测定试剂盒来检测cAMP。本研究旨在确认几种示例性人源化抗体是否可阻断A2aR活性。

[0384] (1)经转染的Expi293F细胞上清中人源化抗人A2aR单克隆抗体的体外阻断活性

[0385] 简言之,用50 μ g/ml聚-D-赖氨酸(Gibco货号:A3890401)溶液按50 μ l/孔包被96孔组织培养透明平底板(Fisher Scientific),4 $^{\circ}$ C过夜。在用无菌无内毒素的水洗涤3次之后,将经包被的培养板(未盖板)置于生物安全柜中进行干燥。将稳定过表达人A2aR的HEK293细胞(BPS Bioscience)按5000个细胞/孔接种于200 μ l饥饿培养基(MEM(Hyclone货号:SH30024.01)+2%碳吸附型血清(Thermo Fisher货号:A3382101)+1%青霉素/链霉素)中,并在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂下培养过夜。在第二天,将包被的细胞用200 μ l温热的1xPBS洗涤3次。将含有1或2 μ g/ml人源化抗A2aR抗体(参见实施例1)的正常上清进行3倍连续稀释,然后以1:1的比例与诱导缓冲液(含有1000 μ M 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)(Millipore Sigma,货号:I7018)+200 μ M Ro 20-1724(Millipore Sigma,货号:B8279)的1x PBS)混合。然后将10微升(μ l)上清/诱导缓冲液混合物添加至各个孔中,并在37 $^{\circ}$ C下孵育15分钟,随后添加终浓度为300nM的NECA(Eurofins Scientific,货号:92-1191)(稳定的腺苷受体激动

剂)。然后将细胞在37℃, 5% CO₂下孵育1小时。使用cAMP-Glo™测定试剂盒(Promega, 货号: V1501), 根据制造商的手册和说明进行细胞裂解和cAMP检测。使用光度计读取结果(相对光单位, Relative Light Unit, RLU)。使用cAMP标准曲线和GraphPad Prism软件将RLU转换为cAMP(nM)。使用相应的亲本抗体1B5-3D7、3F6-9G5和3F8-12E9作为阳性对照。

[0386] 如表26至27所示, 示例性人源化抗A2aR抗体变体阻断了表达在细胞表面的人A2aR的活性, 其IC₅₀值为约0.7nM至约20nM。

表26: 示例性人源化抗A2aR变体(3F6-9G5来源的)的阻断活性的IC₅₀值(nM)

	Hu3F6-L3	Hu3F6-L4	Hu3F6-L5	Hu3F6-L8	3F6-9G5 LC
Hu3F6-H2	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
Hu3F6-H3	2.0	19.5	5.3	n.a.	
Hu3F6-H5	1.3	7.8	0.9	1.1	
3F6-9G5 HC					1.3*

[0387] *: 三个平行测试的平均值

表27: 示例性人源化抗A2aR变体(3F8-12E9来源的)的阻断活性的IC₅₀值(nM)

	Hu3F8-L3	Hu3F8-L4	Hu3F8-L5	3F8-12E9 LC
Hu3F8-H1	1.5	n.a.	1.4	
Hu3F8-H2	1.1	n.a.	1.8	
Hu3F8-H3	1.1	1.7	1.5	
Hu3F8-H4	0.7	1.0	1.5	
Hu3F8-H5	1.5	2.2	1.6	
Hu3F8-H6	1.2	2.3	1.5	
3F8-12E9 HC				1.0*

[0388] *: 三个平行测试的平均值

[0389] (2) 纯化的由ExpiCHO细胞表达的示例性人源化抗A2aR单克隆抗体的体外阻断活性

[0390] 简言之, 用50μg/ml聚-D-赖氨酸(Gibco货号:A3890401)溶液按50μl/孔包被96孔组织培养透明平底板(Fisher Scientific), 4℃过夜。在用无菌无内毒素的水洗涤3次之后, 将经包被的培养板(未盖板)置于生物安全柜中进行干燥。在聚-D-赖氨酸包被的平板上, 将新鲜解冻的过表达A2aR的HEK293细胞(BPS Bioscience)按10⁴个细胞/孔接种于100μl培养基中, 在37℃、5% CO₂孵育箱中培养24小时。在用温热的PBS洗涤一次之后, 添加100微升(μl)饥饿培养基(MEM(Hyclone货号:SH30024.01)+2%碳吸附血清(Thermo Fisher货号:A3382101)+1%青霉素/链霉素), 在37℃、5% CO₂下于孵育箱中过夜培养。第二天, 将饥饿的包被的细胞用200μl温热的1xPBS洗涤1次。制备人源化抗A2aR抗体(由CRO BioIntron在ExpiCHO细胞中生产)以及A2aR拮抗剂小分子抑制剂(small molecule inhibitor, SMI)

CPI-444 (MedChemExpress, 货号:HY-101978) 和AB928 (MedChemExpress, 货号:HY-129393) 的连续稀释物。将30微升 (μL) 的人源化抗A2aR抗体、亲本3F6-9G5或SMI添加至每个孔中,并在37°C孵育箱中孵育105分钟。在孵育的最后15分钟期间,将10微升 (μl) 的4×诱导缓冲液 (2mM IBMX 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX) (Millipore Sigma, 货号:I7018) 和400 μM Ro20-1724 (Millipore Sigma, 货号:B8279)) 添加至每个孔。在孵育之后,从每个孔中用滴管移出30微升 (μl) 培养基,并将10 μL 的10 μM 腺苷 (Alfa aesar, 货号:A10781) 或2.5 μM NECA (Eurofins Scientific, 货号:92-1191) 添加至每个孔,于孵育箱中在37°C, 5% CO₂下孵育1小时。使用cAMP-Glo™测定试剂盒 (Promega, 货号:V1501), 根据制造商的手册和说明进行细胞裂解和cAMP检测。使用SpectraMax 5酶标仪 (Molecular Device) 来读取平板以获得相对光单位 (RLU)。使用Prism软件分析数据。使用相同同种型的相应亲本抗体3F6-9G5或3F8-12E9作为阳性对照。

[0391] 如图1A、图1B和表28所示, 示例性人源化抗A2aR抗体变体和亲本3F6-9G5以相似的IC₅₀值阻断了表达在细胞表面的人A2aR的活性, 而SMI CPI-444和AB928则显示出高得多的IC₅₀值, 表明其在该测试中的阻断效力低得多。

表28: 示例性人源化抗A2aR变体和SMI的阻断活性的IC₅₀值 (nM)

IC50 (nM)	3F6-9G5	Hu3F6-H3/Hu3F6-L5	Hu3F6-H5/Hu3F6-L5	CPI-444	AB928
5 μM Adenosine	0.93	0.6	0.8	8	2.13
1.25 μM NECA	0.53	0.8	0.6	11.06	4.27

实施例4: 人源化抗人A2aR单克隆抗体的内吞

[0392] 本实施例旨在确认本公开的示例性人源化抗人A2aR单克隆抗体与细胞表面表达的A2aR形成的复合物的内吞。

[0393] (1) 基于流式细胞术的内吞测定

[0394] 将2x10⁵/孔新鲜培养的表达人A2aR的HEK293细胞 (BPS Bioscience) 与指定浓度 (1、0.5和0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的待测抗体在冰上孵育45分钟。使用亲本3F6作为阳性对照。在用FACS缓冲液洗涤之后, 将样品分成4组。将一组样品维持在冰上。其他三组样品置于37°C、5%CO₂培养箱中分别进一步孵育1、2和4小时。将全部四组样品用偶联PE的山羊-抗人Fc抗体 (1:400, Jackson Immuno Research, 货号:109-116-098) 染色30分钟, 然后用冷的FACS缓冲液洗涤。然后将细胞用1:100稀释的7-AAD

(Biolegend) 染色, 然后用2%的多聚甲醛 (稀释自10%多聚甲醛 (MilliporeSigma, 货号:R04586)) 进行固定。全部样品均在Guava 11HT或5HT (Luminex) 上分析。获得了平均荧光强度 (MFI), 并使用Flowjo软件分析数据。内吞率按照以下计算:

[0395] 内吞% = ((冰上样品的MFI) - (在37°C下孵育指定时间的样品的MFI) / (冰上样品的MFI)) × 100

[0396] 如图2所示, 在将两种示例性人源化抗人A2aR单克隆抗体与表达人A2aR的HEK293细胞在37°C下孵育了4小时的情况下, 其诱导的内吞水平最高 (以内吞百分数示出)。在相同的实验条件 (例如孵育时间) 下, 这两种示例性人源化抗A2aR单克隆抗体诱导的内吞水平与亲本3F6-9G5抗体相似。

[0397] (2) 基于pH敏感染料的内吞测定

[0398] Invitrogen™ Zenon™ pHrodo™ iFL RED人IgG标记试剂 (货号:Z25612) 是低pH敏感

性染料,按照制造商的说明,用其测定示例性抗A2aR抗体的内吞特性。与Zenon™pHrodo™iFL RED人IgG标记试剂偶联的抗体的内吞可以提高细胞中低pH胞内区的荧光信号,其提供了在荧光显微镜下使内吞可视化的方法。

[0399] 简言之,在FreeStyle CHO表达培养基(Gibco,货号:12451-014)中制备160nM抗体(约24 μ g/ml,25 μ l)溶液(4 \times),然后将其添加至96孔板的各个孔中。然后在FreeStyle CHO表达培养基中制备25微升(μ L)的Zenon™pHrodo™iFL IgG标记试剂的工作溶液(4 \times),然后将其添加至含有抗体的96孔板的各个孔中。将96孔板中的溶液进行混合并在室温下孵育5分钟,以形成标记复合物。然后,将50微升(μ l)的表达人A2aR的CHO细胞(2×10^6 /ml)添加至含有经标记抗体的各个孔中。然后在标准细胞培养条件下将细胞与标记复合物孵育24小时。在免疫荧光显微镜(Invitrogen EVOS细胞成像系统M5000)下成像分析内吞的抗体。使用EVOS成像系统(Invitrogen)对抗体的内吞进行成像。如图3所示,内吞诱导在代表图中是可视化的,这表明亲本3F6和人源化抗体变体Hu3F6-H3/Hu3F6-L5和Hu3F6-H5/Hu3F6-L5都可诱导内吞,而抗HEL同种型对照抗体则不能。Hoechst 33342(Invitrogen,货号:H3570)是一种流行的细胞渗透性核复染染料,可发出蓝色荧光,用其对细胞内部的凝聚核进行染色。在该测定中,SMI CPI-444和AB928没有诱导内吞(数据未显示)。

实施例5:人源化抗人A2aR抗体与人和食蟹猴原代细胞的结合以及与非人灵长类动物的交叉反应

[0400] 据报道,人类中的A2aR由T细胞和NK细胞表达。本研究旨在确认本发明的示例性人源化抗A2aR单克隆抗体与人和食蟹猴PBMC细胞表面的A2aR结合。

[0401] 人和食蟹猴PBMC分别购自Cytologics LLC(San Diego,CA)和iQ Biosciences(Berkeley,CA)。将在100 μ l FACS缓冲液(1 \times DPBS,2% FBS)中的 10^6 个人和/或食蟹猴PBMC与抗A2aR抗体在4 $^{\circ}$ C孵育30分钟。在洗涤之后,用偶联PE的山羊-抗人Fc抗体(1:400, Jackson ImmunoResearch Labs,货号:109-116-098)和其他食蟹猴表面标记物交叉反应的APC/cy7-抗-CD3(BD Bioscience,货号:557757)、BV421-抗-CD4(Biolegend,货号:317433)、BV650-抗-CD8(Biolegend,货号:301042)和BV711-anti-CD56(BD Bioscience,货号:742661)对样品进行染色。使用Zombie Green可固定活力染料(Biolegend,货号:423111),根据制造商的说明来定义活的免疫细胞亚群。在用FACS缓冲液洗涤之后,在FACS Aria(BD)上分析细胞。用Flowjo(Becton Dickinson)分析数据。

[0402] 如图4和表29至32所示,亲本3F6-9G5和两种示例性人源化抗人A2aR抗体与以下细胞结合:人T细胞的小亚群(CD3+CD8-CD4+CD4 T细胞和CD3+CD4-CD8+CD8 T细胞,图4A)、CD3-CD56+NK细胞和CD3+CD56+NKT细胞;而抗HEL同种型对照(Biointron)不与上述细胞结合。亲本3F6-9G5和两种示例性人源化抗人A2aR抗体还与食蟹猴T细胞(CD4+和CD8+二者,图4B)、NK细胞和NKT细胞发生交叉反应。

表29:示例性人源化抗A2aR抗体与CD4+T细胞的结合

A2aR+ CD4+ T 细胞%	3F6-9G5	Hu3F6-H3/ Hu3F6-L5	Hu3F6-H5/ Hu3F6-L5	Anti-HEL
人 1	0.67	0.43	0.50	0.083
人 2	0.48	0.44	0.52	0.012
食蟹猴 1	1.36	1.65	4.76	0.086
食蟹猴 2	3.26	1.20	10.6	0.099

表30: 示例性人源化抗A2aR抗体与CD8+T细胞的结合

A2aR+ CD8+ T 细胞%	3F6-9G5	Hu3F6-H3/ Hu3F6-L5	Hu3F6-H5/ Hu3F6-L5	Anti-HEL
人 1	0.06	0.04	0.05	0.005
人 2	0.03	0.04	0.03	0.002
食蟹猴 1	0.06	0.05	0.15	0.009
食蟹猴 2	0.14	0.11	0.41	0.007

表31: 示例性人源化抗A2aR抗体与NK细胞的结合

A2aR+ NK 细胞%	3F6-9G5	Hu3F6-H3/ Hu3F6-L5	Hu3F6-H5/ Hu3F6-L5	Anti-HEL
人 1	1.15	0.69	0.66	0.210
人 2	0.99	0.75	0.62	0.029
食蟹猴 1	3.34	6.52	5.71	0.460
食蟹猴 2	2.63	2.07	2.92	0.420

表32: 示例性人源化抗A2aR抗体与NKT细胞的结合

A2aR+ NKT 细胞%	3F6-9G5	Hu3F6-H3/ Hu3F6-L5	Hu3F6-H5/ Hu3F6-L5	Anti-HEL
人 1	0.62	0.46	0.42	0.110
人 2	0.47	0.55	0.48	0.058
食蟹猴 1	0.85	1.06	4.14	0.22
食蟹猴 2	1.14	0.45	4.28	0.045

实施例6:通过人源化抗人A2aR单克隆抗体恢复T细胞功能

[0403] 本研究旨在确认人源化抗体可恢复T细胞的活化和细胞因子的产生。

[0404] 将在完全IMDM培养基中的20万 (2×10^5) 个人外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 等分至96孔板的各个孔中,并将96孔板中细胞与指定浓度的抗体或小分子抑制剂预孵育90分钟。随后以磁珠:外周血单核细胞体积比1:4的比例(Beads: PBMC, v/v) 添加T细胞激活剂抗CD3/28免疫磁珠(dynabeads) (Gibco, 货号:11132D), 并且添加NECA(DiscoverX, 货号:92-1191, 终浓度为0.1 μ M)。将细胞在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂的孵育箱中培养24小时。然后收集细胞,在GolgiPlugTM蛋白转运抑制剂(BD Biosciences, 货号:555028) 存在下,根据制造商的手册用抗CD3/28免疫磁珠刺激细胞4小时。在此之后,根据制造商的手册将细胞与人TruStain FcX阻断剂(Biolegend, 货号:422302) 和True-Stain单核细胞阻断剂(Biolegend, 货号:426103) 孵育15分钟,然后将细胞用以下表面标志物进行染色:PE-抗-CD4(Biolegend, 货号:300550)、PerCP-cy5.5-抗-CD8(Biolegend, 货号:301032)、APC/cy7-抗-CD3(Biolegend, 货号:300426)、PE/cy7-抗-CD56(Biolegend, 货号:362509)、PE/cy7-抗-CD56(Biolegend, 货号:362509)、BV711-抗-CD25(Biolegend, 货号:302636) 和BV605-抗-CD69(Biolegend, 货号:31938)。在用FACS缓冲液进行洗涤之后,使用细胞内细胞因子染色试剂盒(BD Biosciences, 货号:555028),按照制造商的说明用BV421抗-IFN- γ (BD Bioscience, 货号:562988) 和APC抗-IL-2(BD Bioscience, 货号:551383) 对细胞进行染色。在FACS Aria III机器上分析经染色的样品。使用Flowjo软件分析数据。

[0405] 如图5A所示,证明了与小分子抑制剂AB928、AZD4635和CPI-444相比,示例性抗A2aR抗体Hu3F6-VH3/Hu3F6-VL5、Hu3F6-VH5/Hu3F6-VL5和亲本3F6-9G5抗体在恢复受NECA抑制的人CD4⁺ T产生IFN- γ 的方面表现出更高的效力。此外,如图5B所示,抗A2aR抗体在恢复受NECA抑制的人CD4⁺ T产生IL-2的方面的效力也高于小分子抑制剂AZD4635和CPI-444。

[0406] 如表33所示,示例性抗A2aR抗体Hu3F6-VH3/Hu3F6-VL5、Hu3F6-VH5/Hu3F6-VL和亲本3F6-9G5抗体不仅能使受NECA抑制的CD4⁺ T细胞的IFN- γ 和IL-2产生恢复(图5),而且还能使受NECA抑制的CD8⁺ T细胞的IFN- γ 和IL-2产生恢复;其效力高于小分子AB928、CPI-444和AZD4635。此外,这些抗体还能恢复NECA抑制的NK细胞的IFN- γ 和IL-2产生,其效力高于所测试的小分子抑制剂。

表33:由CD4⁺T细胞,CD8⁺T细胞和NK细胞分泌的IFN和IL2

细胞%		CD4 T 细胞		CD8 T 细胞		NK 细胞
		IFN γ +	IL-2+	IFN γ +	IL-2+	IFN γ +
无 NECA	仅培养基	5.39	12.9	14.7	3.1	14.5
NECA	3F6-9G5 (1 μ g/ml)	4.19	13.3	14.4	3.23	18.5
	Hu3F6-H3/Hu3F6-L5 (1 μ g/ml)	4.35	13.4	14.1	3.29	17.8
	Hu3F6-H5/Hu3F6-L5 (1 μ g/ml)	4.29	13.2	14.8	2.98	16.6
	AB928 (1 μ g/ml)	4.07	13.1	14.4	3.15	15
	AZD4635 (2 μ g/ml)	3.41	10.4	13.3	2.57	8.91
	CPI-444 (2 μ g/ml)	3.66	12.7	11.6	3.05	15.1
	anti-HEL (1 μ g/ml)	2.27	11.1	11.9	2.43	9.89
	仅培养基	2.74	10.8	11	2.52	7.59
	仅 DMSO	2.03	10.7	12.3	1.36	8.8

[0407] 如表34所示, 示例性抗A2aR抗体Hu3F6-VH3/Hu3F6-VL5、Hu3F6-VH5/Hu3F6-VL5和亲本3F6-9G5抗体恢复了受NECA抑制的CD4和CD8 T细胞的CD25和CD69表面标志物活化, 其效力与以1 μ g/ml使用的小分子AB928以及以2 μ g/ml使用的CPI-444和AZD4635相似。

表34: CD4+T细胞和CD8+T细胞的活化

细胞%		CD4 T 细胞		CD8 T 细胞	
		CD25+	CD69+	CD25+	CD69+
无 NECA	仅培养基	68.2	56.3	22.1	53.8
NECA	3F6-9G5 (1 µg/ml)	58.8	51.9	34.5	52.6
	Hu3F6-H3/Hu3F6-L5 (1 µg/ml)	61.5	57.9	36	54.5
	Hu3F6-H5/Hu3F6-L5 (1 µg/ml)	62.5	58.1	35.8	56.1
	AB928 (1 µg/ml)	59.7	57.6	32.7	55.3
	AZD4635 (2 µg/ml)	48.8	48.1	26	49.1
	CPI-444 (2 µg/ml)	62.9	52.3	35.9	52.3
	anti-HEL (1 µg/ml)	36.7	35.2	15.5	34.2
	仅培养基	43.7	42.6	14.9	39.4
	仅 DMSO	49.3	46.8	11.1	47.1

[0408] 以上描述是为了指导本领域的普通技术人员实践本发明,而不是为了详细说明所有显而易见的修改和变化,所述修改和变化在本领域技术人员阅读本说明书后将变得显而易见。然而,所有这些显而易见的修改和变化都应当包括在本发明的范围内,其由所附权利要求限定。除非上下文特别指出相反的情况,权利要求旨在以有效满足其预期目标的任何顺序覆盖要求保护的组分和步骤。

5 uM 腺苷

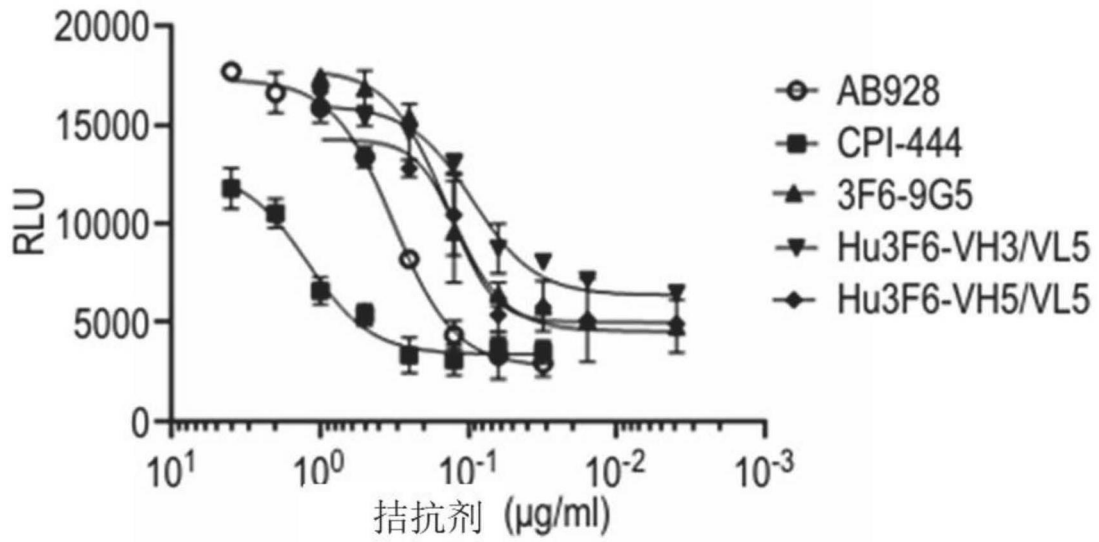


图1A

1.25 uM NECA

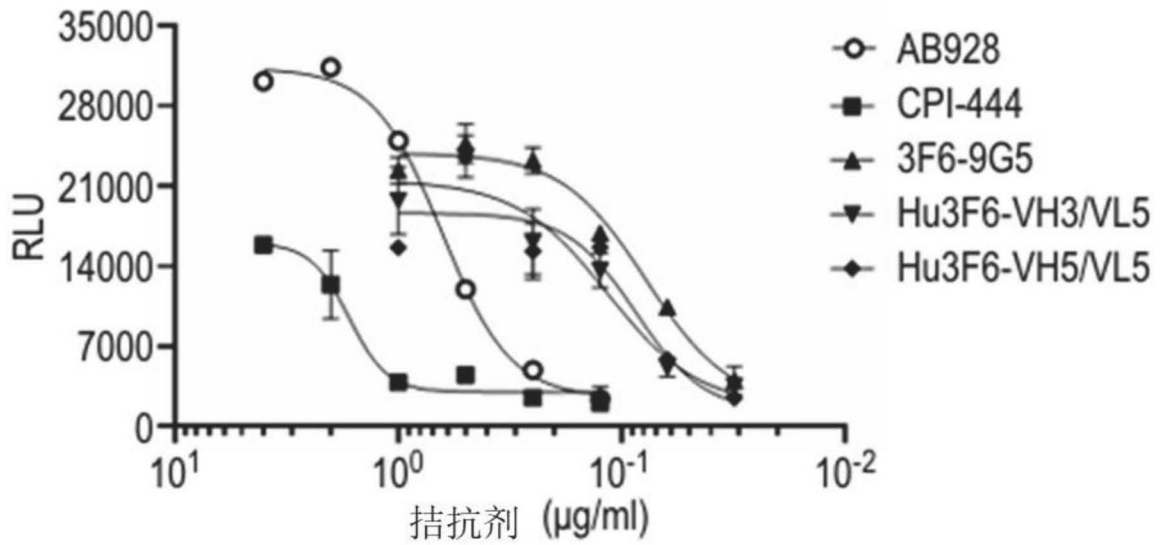


图1B

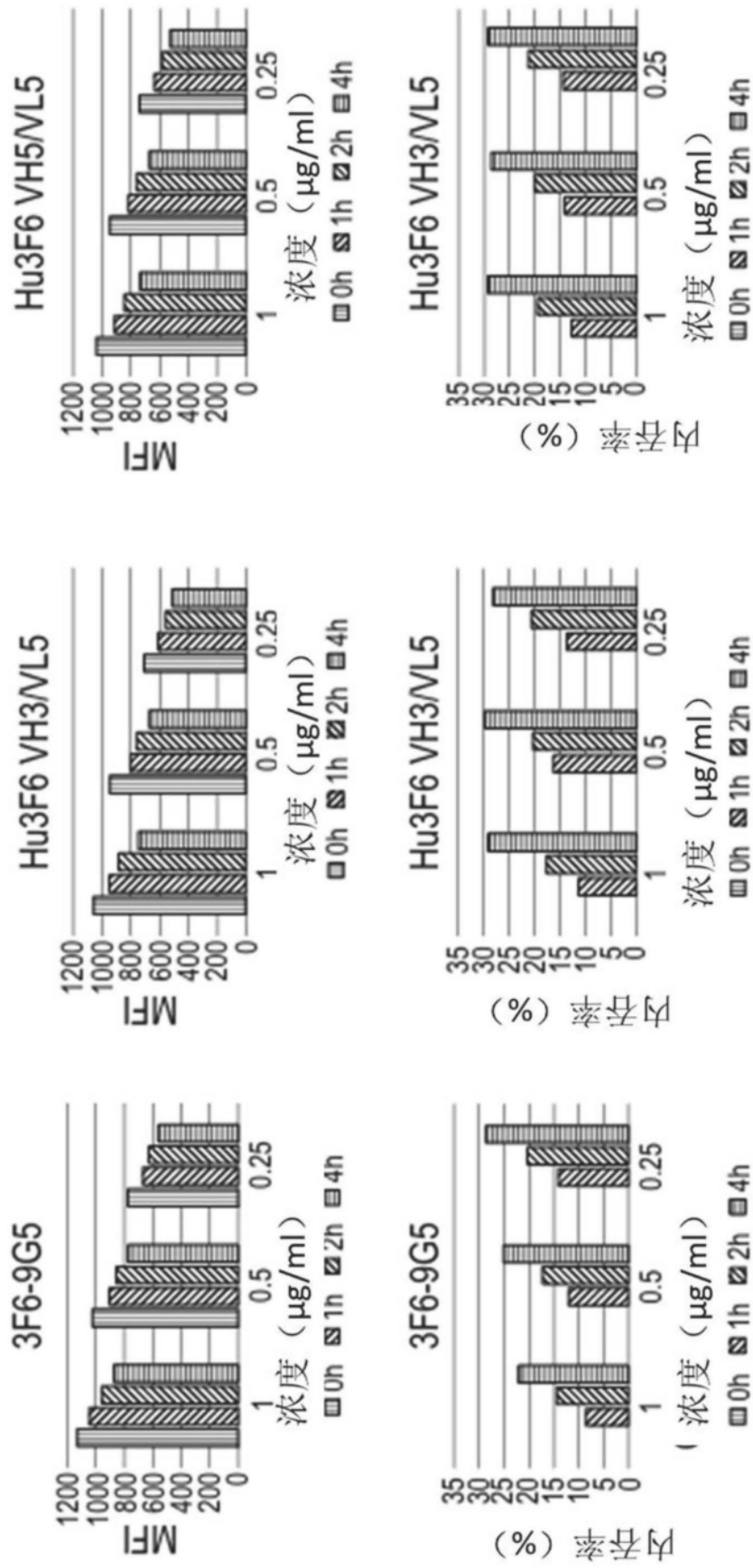


图2

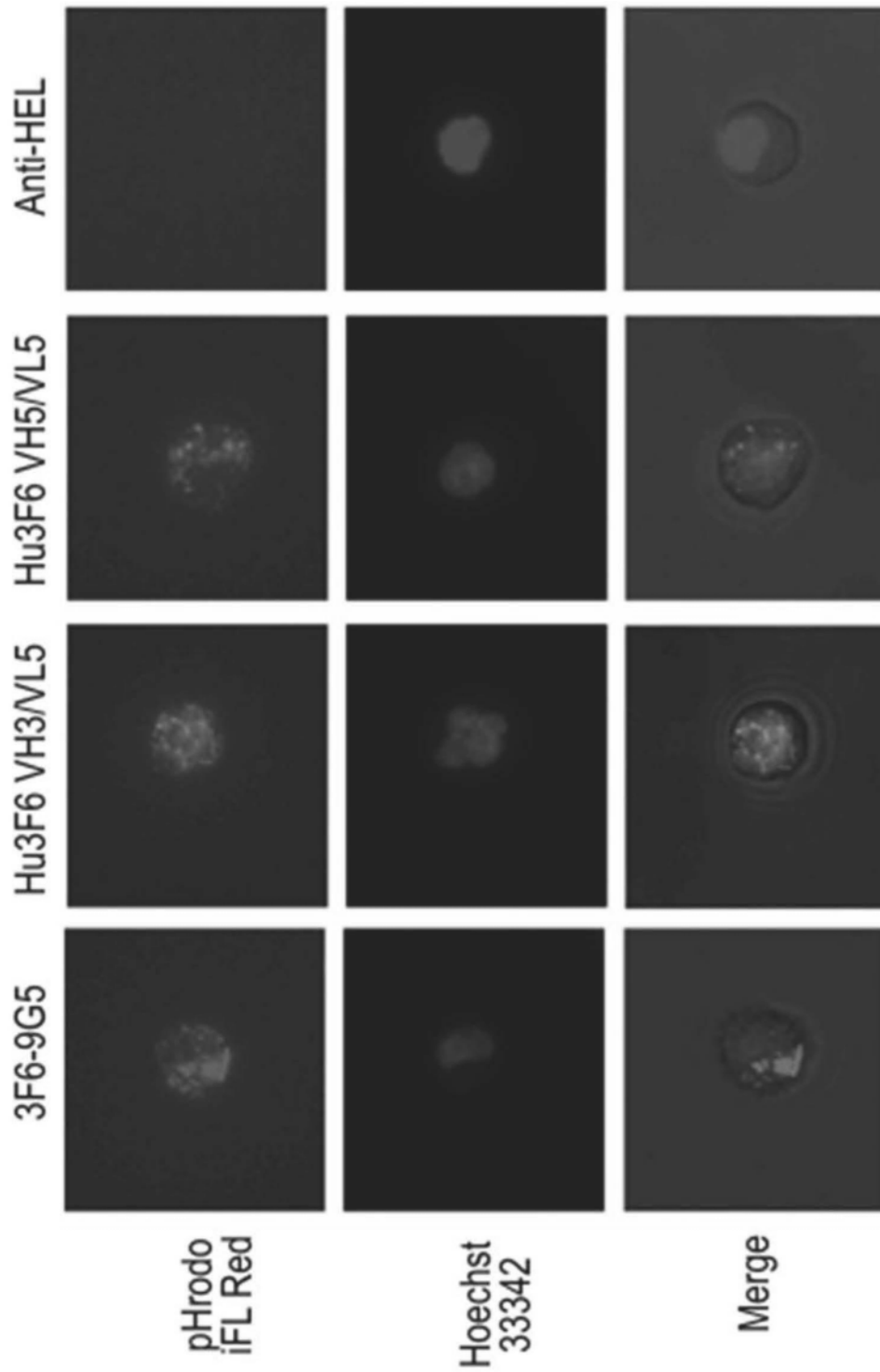


图3

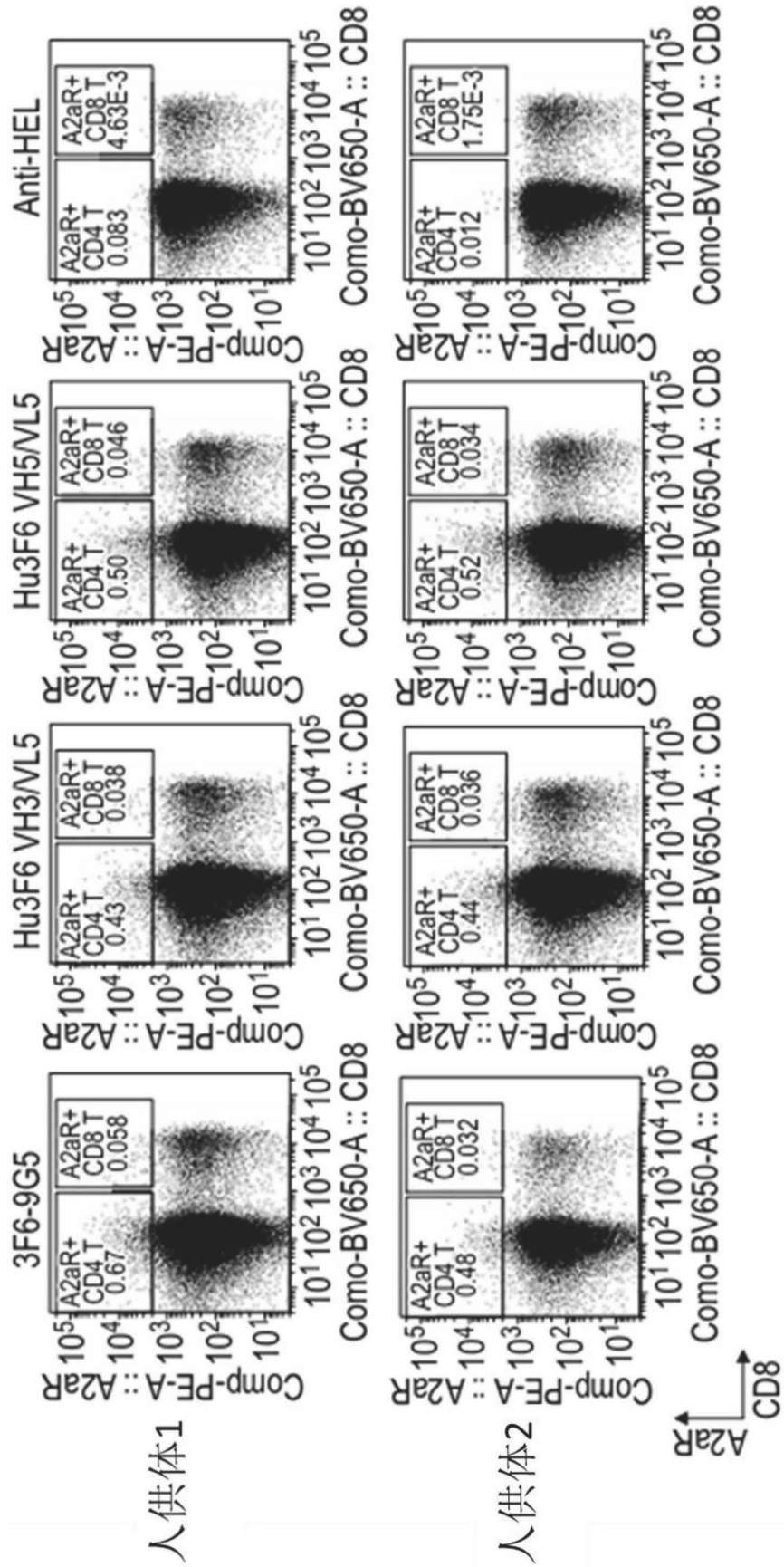


图4A

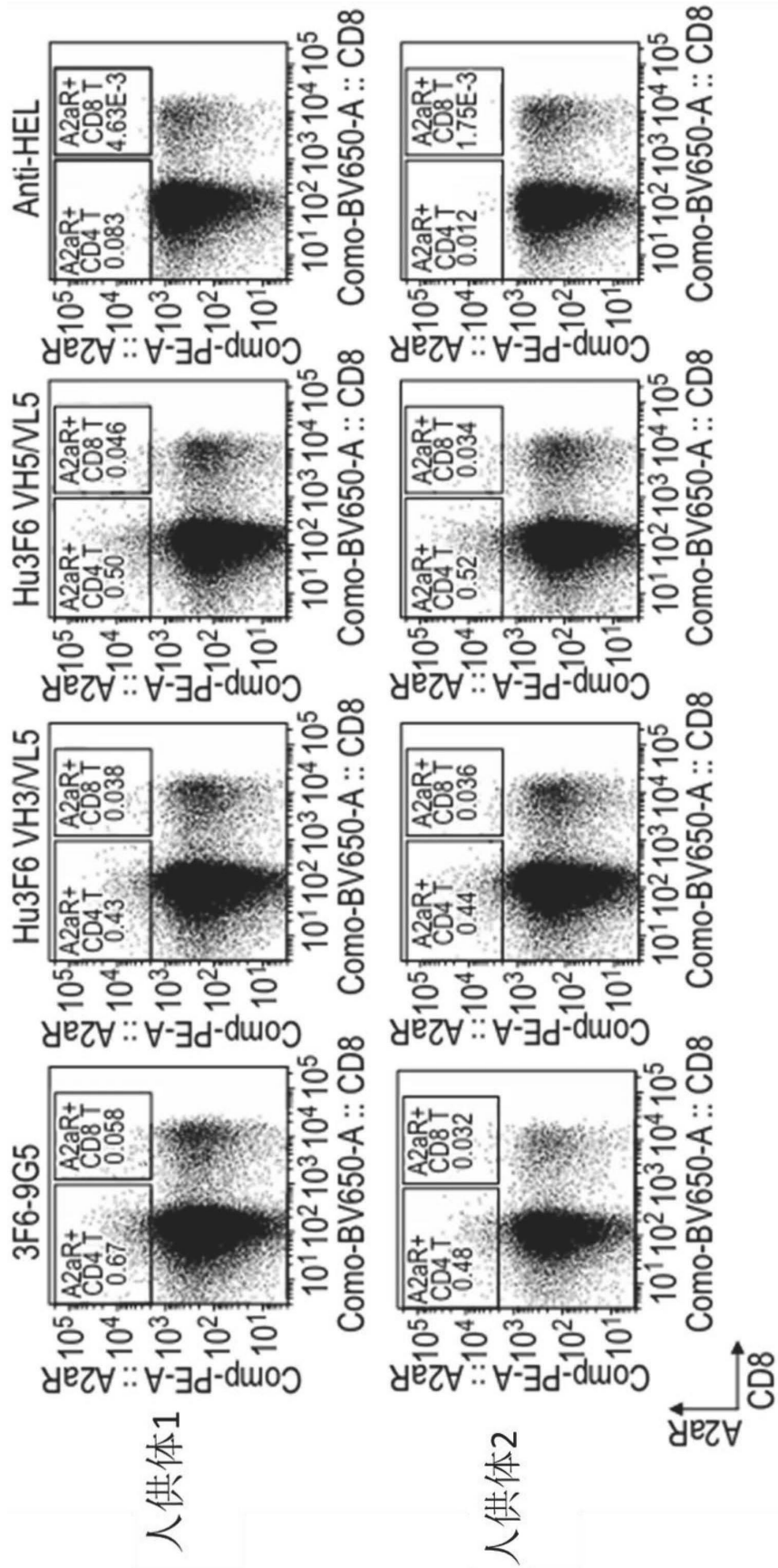


图4B

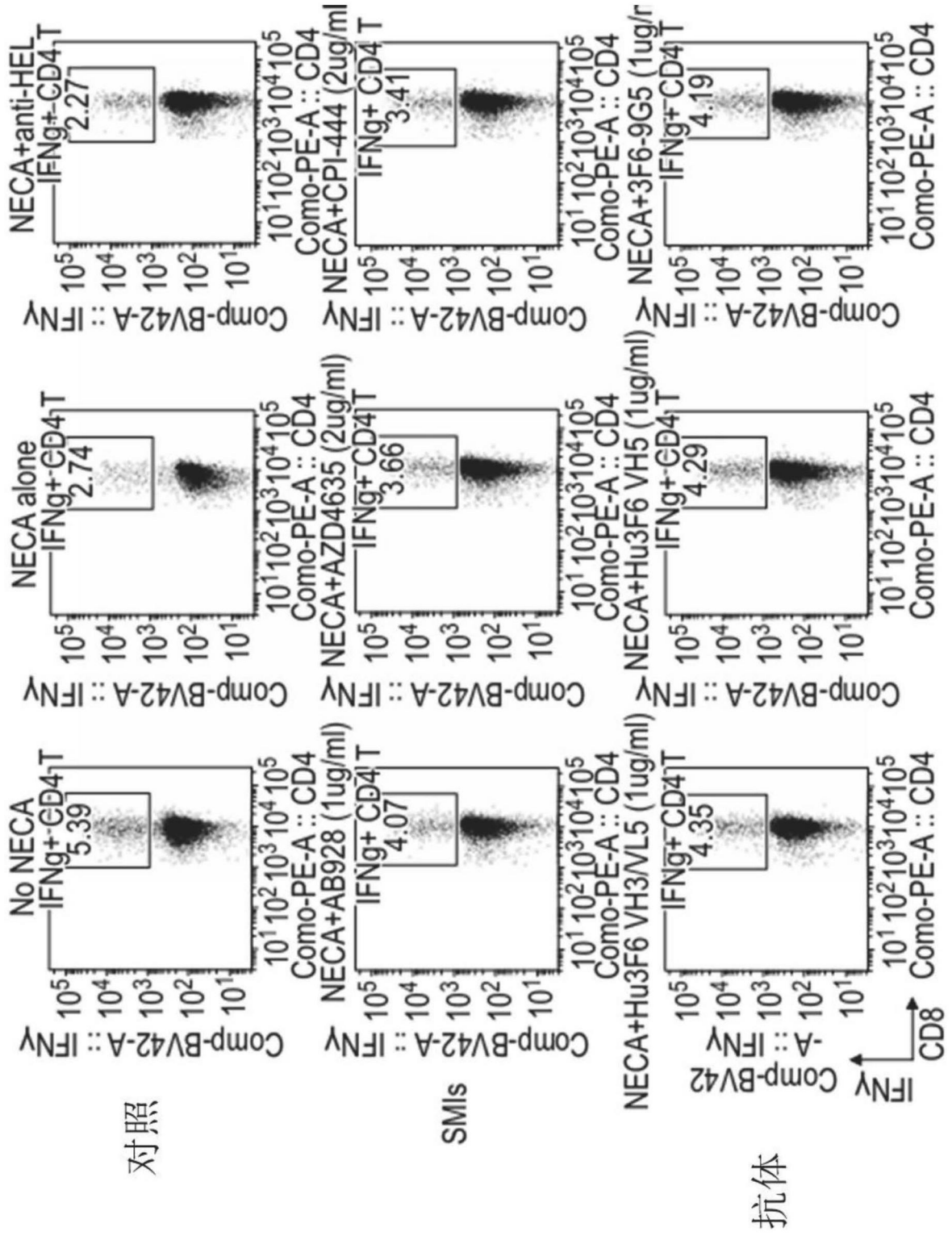


图5A

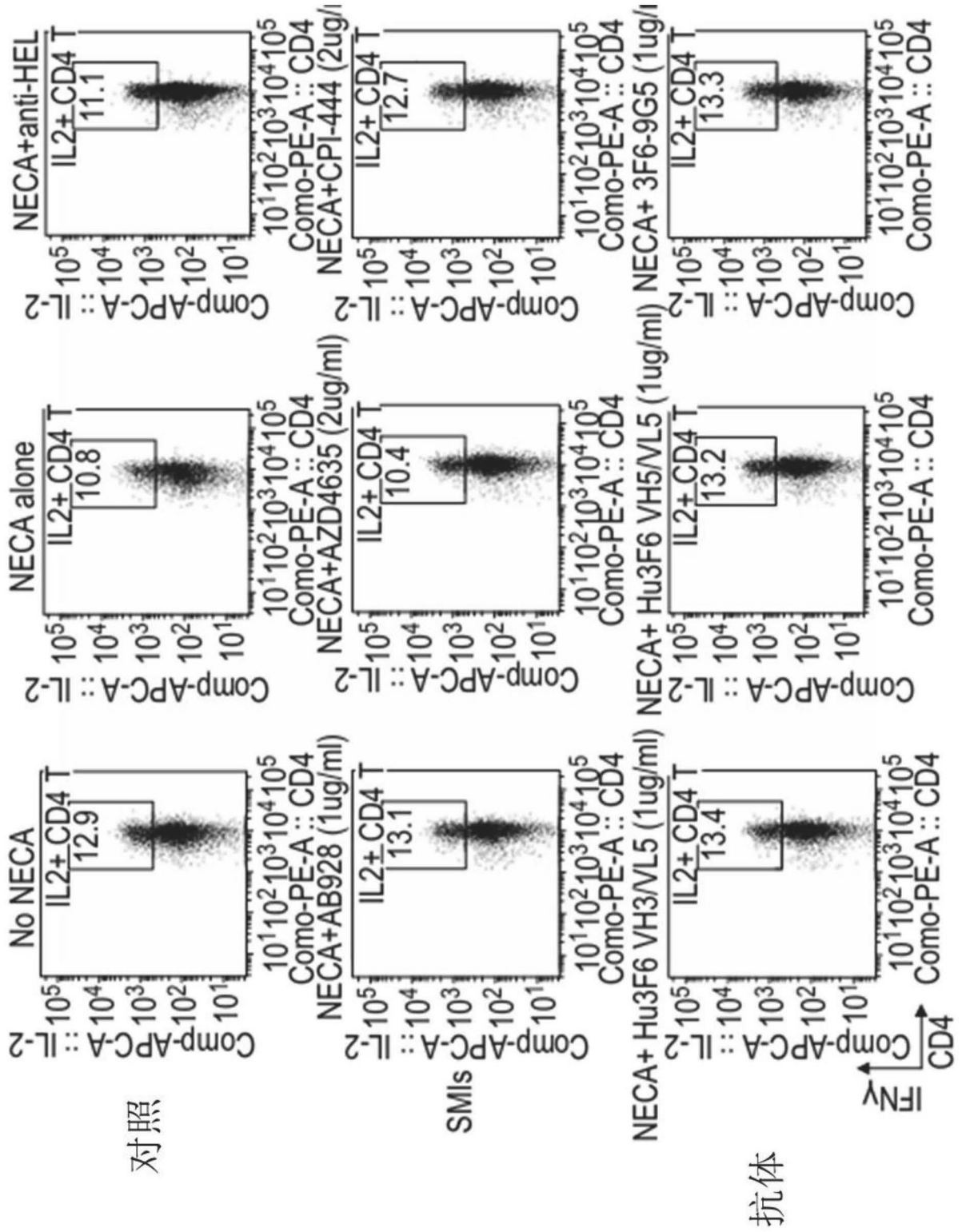


图5B