



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111542539 B

(45) 授权公告日 2023. 10. 20

(21) 申请号 201880064186.3

A61K 39/00 (2006.01)

(22) 申请日 2018.10.05

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111542539 A

CN 110382544 A, 2019.10.25
WO 2009095478 A1, 2009.08.06
CN 104244977 A, 2014.12.24
WO 2017064043 A1, 2017.04.20
CN 111372606 A, 2020.07.03
CN 106852149 A, 2017.06.13
CN 114127121 A, 2022.03.01
CN 113784981 A, 2021.12.10
US 6387645 B1, 2002.05.14

(43) 申请公布日 2020.08.14

(30) 优先权数据
62/568,812 2017.10.06 US
62/686,143 2018.06.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.04.01

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/077217 2018.10.05

(87) PCT国际申请的公布数据
WO2019/068907 EN 2019.04.11

(73) 专利权人 先天制药公司
地址 法国马赛

Sebastian Fm Häusler .Anti-CD39 and anti-CD73 antibodies A1 and 7G2 improve targeted therapy in ovarian cancer by blocking adenosine-dependent immune evasion.《American Journal of translational research》.2014,第6卷(第2期),第129-139页.

(72) 发明人 S·尚特克斯 N·戈尔丁
C·帕图雷 I·普罗特 B·罗西

DavidAllard.Targeting the CD73-adenosine axis in immuno-oncology.《Immunology Letters》.2019,第5卷第31-39页.

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
专利代理师 王永伟

韩凌等.CD39和CD73在CD4+CD25highFoxp3+调节性T细胞发挥免疫抑制功能中的作用研究.《现代免疫学》.2017,(第2期),第101-106页.

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 9/14 (2006.01)

审查员 龙添珍

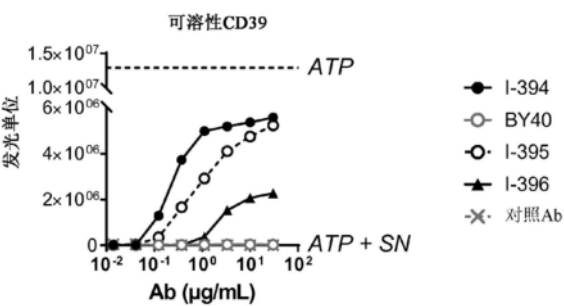
权利要求书1页 说明书76页
序列表36页 附图18页

(54) 发明名称

通过CD39/CD73轴恢复T细胞活性

(57) 摘要

本发明涉及使用抑制可溶性人类CD39的酶活性的化合物治疗癌症的方法,包含(但不限于)治疗表征为CD73表达性细胞的癌症。



1. 能够结合可溶性细胞外结构域人类CD39 (NTPDase1) 蛋白并抑制其ATP酶活性的抗体和中和人类CD73的5'-外核苷酸酶活性的抗体在制备用于治疗人类个体中的癌症的药物组合中的应用, 所述治疗包括施用: (a) 能够结合可溶性细胞外结构域人类CD39 (NTPDase1) 蛋白并抑制其ATP酶活性的所述抗体, 其中所述抗体包括由氨基酸序列DYNMH (SEQ ID NO:8) 组成的HCDR1; 由氨基酸序列YIVPLNGGSTFNQKFKG (SEQ ID NO:9) 组成的HCDR2; 由氨基酸序列GGTRFAY (SEQ ID NO:10) 组成的HCDR3; 由氨基酸序列RASESVDNFGVSFMY (SEQ ID NO:11) 组成的LCDR1; 由氨基酸序列GASNQGS (SEQ ID NO:12) 组成的LCDR2区; 和由氨基酸序列QQTKEVPYT (SEQ ID NO:13) 组成的LCDR3区,

和 (b) 中和人类CD73的5'-外核苷酸酶活性的所述抗体,

其中所述癌症是CD73阳性癌症, 其是已知表征为在肿瘤或肿瘤环境中存在CD73表达性细胞的癌症。

2. 能够结合可溶性细胞外结构域人类CD39 (NTPDase1) 蛋白并抑制其ATP酶活性的抗体在制备用于治疗患有CD73阳性癌症的个体中的应用, 其中所述抗体包括由氨基酸序列DYNMH (SEQ ID NO:8) 组成的HCDR1; 由氨基酸序列YIVPLNGGSTFNQKFKG (SEQ ID NO:9) 组成的HCDR2; 由氨基酸序列GGTRFAY (SEQ ID NO:10) 组成的HCDR3; 由氨基酸序列RASESVDNFGVSFMY (SEQ ID NO:11) 组成的LCDR1; 由氨基酸序列GASNQGS (SEQ ID NO:12) 组成的LCDR2区; 和由氨基酸序列QQTKEVPYT (SEQ ID NO:13) 组成的LCDR3区。

3. 根据权利要求1或2所述的应用, 其中能够结合可溶性细胞外结构域人类CD39 (NTPDase1) 蛋白并抑制其ATP酶活性的所述抗体和中和CD73的5'-外核苷酸酶活性的所述抗体被调配成用于单独施用及并行地或依序地施用。

4. 根据权利要求1-2中任一项所述的应用, 其中能够结合可溶性细胞外结构域人类CD39 (NTPDase1) 蛋白并抑制其ATP酶活性的所述抗体缺乏Fc结构域或包括经修饰以降低所述Fc结构域与Fc γ 受体之间的结合的Fc结构域。

5. 根据权利要求1-2中任一项所述的应用, 其中中和CD73的5'-外核苷酸酶活性的所述抗体缺乏Fc结构域或包括经修饰以降低所述Fc结构域与Fc γ 受体之间的结合的Fc结构域。

6. 根据权利要求1-2中任一项所述的应用, 其中所述个体包括表征为高CD73表达性细胞量的肿瘤组织和/或肿瘤邻近组织。

7. 根据权利要求1-2中任一项所述的应用, 其中所述个体患有在利用抑制人类CD73多肽的试剂的预先治疗之后已进展或复发的癌症。

8. 根据权利要求1-2中任一项所述的应用, 其中所述个体具有实体肿瘤。

9. 根据权利要求1-2中任一项所述的应用, 其中所述个体患有卵巢癌。

10. 根据权利要求1-2中任一项所述的应用, 其中所述个体患有胃癌。

11. 根据权利要求1-2中任一项所述的应用, 其中所述个体患有肺癌。

12. 根据权利要求1-2中任一项所述的应用, 其中所述个体患有结肠癌。

13. 根据权利要求1-2中任一项所述的应用, 其中所述个体患有食道癌。

通过CD39/CD73轴恢复T细胞活性

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年10月6日提交的美国临时申请第US 62/568,812号和2018年6月18日提交的第US 62/686,143号的权益；两个均以全文引用的方式并入本文中；包含任何附图。

[0003] 序列表参考

[0004] 本申请与电子格式的序列表一起提交。序列表以2018年10月5日创建的名为“CD39-7_ST25”的文件提供，其大小为73KB。序列表的电子格式的信息以全文引用的方式并入本文中。

技术领域

[0005] 本发明涉及CD39中和剂治疗癌症的用途。

背景技术

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

[0007] CD73(胞外-5'-核苷酸酶)是通常表达于内皮细胞和造血细胞亚型上的70kDa糖基化磷脂酰肌醇(GPI)锚定蛋白。CD73表达已报道在一系列肿瘤细胞中，尤其包含白血病、膀胱癌、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、卵巢癌、黑素瘤、前列腺癌、甲状腺癌、食道癌和乳癌。CD73表达还与黑素瘤和乳癌中的转移前(prometastatic)表型相关联。

[0008] 特定结合CD73的抗体可为小分子提供对CD73具有更大选择率的替代物。然而，所测试抗体通常仅示出部分地抑制CD73的酶活性。已经证明利用结合鼠类CD73的抗体的治疗可抑制小鼠的乳房肿瘤生长和癌转移(Stagg, 等人(2010)《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》104:1547-1552)。然而，抗体通常不与人类和小鼠CD73交叉反应，这使CD73的抗体和生物学功能研究变得复杂。已经证明A2A受体的基因缺失可能诱导T细胞依赖性肿瘤排斥(Ohta, 等人，(2006)《美国国家科学院院刊》103:13132-13137)。使用siRNA的基因敲低(knock-down)或CD73在肿瘤细胞上的过度表达可调节肿瘤生长和癌转移(Beavis等人(2013)《美国国家科学院院刊》110:14711-716;Stagg等人(2010),同上;Jin等人(2010)《癌症研究(Cancer Res.)》70:2245-55)。CD73-/-小鼠受保护免于移植和自发性肿瘤(Stagg等人(2010)《癌症研究》71:2892-2900)。在人体内，高CD73表达可以是癌症的负面预测(Loi等人(2013)《美国国家科学院院刊》110:11091-11096)。已报道结合CD73的抗

体,例如已报道克隆株AD2(小鼠IgG1同种型)通过使受体聚集且内化在功能上阻断CD73但具有对酶活性的最小影响。Sachsenmeier等人((2012)J.《生物医学筛选(Biomed.Screening)》17:993-998)和(Rust等人(2013)《分子癌症(Mol.Cancer)》12:11)也报道了诱导胞内内化的抗体。近年来,W02016/055609和W02016/131950已公开阻断可溶性和细胞表面CD73两个的抗体,以及W02017/064043;W02016/075099和W02016/081748公开通过诱导细胞(例如,肿瘤细胞)中的CD73的胞内内化来抑制细胞表面CD73的抗体。

[0009] CD73连同CD39调节三磷酸腺苷(ATP)代谢。CD39(NTPDase-1)将ATP转化为AMP,其中仅释出痕量ADP,而CD73催化将AMP转化成腺苷。CD39⁺Treg的数量在一些人类癌症中增加,并且CD39⁺Treg在促进肿瘤生长和转移中的重要性已经使用几个体内模型得到证实。然而,CD39也由肿瘤细胞表达,并且CD39⁺肿瘤细胞可以通过腺苷途径介导免疫抑制。癌细胞中的CD39显示ATP酶活性,并且与CD73一起生成腺苷。CD73⁺CD39⁺癌细胞以CD39依赖性和腺苷依赖性方式抑制CD4和CD8⁺T细胞的增殖以及细胞毒性效应CD8⁺T细胞(CTL)的生成。结合并抑制CD39的抗体公开于W02009/095478中。Hayes等人,(2015)《美国转译研究期刊(Am.J.Transl.Res.)》7(6):1181-1188利用据称也被阻断的抗CD39,但所述抗体也结合Fc γ R并有效应子功能。

[0010] Hausler等人(2014)《美国转译研究期刊》6(2):129-139报道了介导ADCC(通过结合各自诱导NK细胞介导的靶细胞裂解的Fc γ 受体的能力)的抗CD39和CD73的抗体,且报道了所述抗体中的每一种还使得部分的减小腺苷的生成。然而,当针对降低腺苷的产生而一起测试抗CD39和CD73抗体时,不存在抗体组合的附加作用。

[0011] CD39在不同细胞类型,包含免疫细胞和肿瘤细胞上的表达,结合使用不实际上阻断CD39或不是纯阻断剂的抗体,为评估抗体的潜在活性创造了复杂的环境。使用蛋白试剂(例如抗体)阻断酶活性位点通常已知为困难的。因此需要理解抗体是否可抑制CD39的ATP酶活性且如何抑制CD39的ATP酶活性,和如何设计改良分子。

[0012] 因此,尽管关注靶向CD39和CD73,但仍待确定减小腺苷生成的最有效方式。

发明内容

[0013] 本发明尤其由以下发现产生:不同于已知中和抗CD39抗体(其在与CD73阻断组合使用时实质上并未减小免疫抑制),中和可溶性CD39蛋白的抗体在与CD73阻断组合使用时提供免疫抑制的显著降低。

[0014] 通过抑制可溶性CD39的ATP酶活性,抗CD39抗体减小可用于CD73的底物库,其继而很大程度上增强了抑制CD73的酶活性的试剂功效,这可能是因为抑制CD73的试剂受限于其完全抑制CD73活性的能力。相比之下,抑制膜结合的CD39但不抑制可溶性CD39的抗体并未增强抑制CD73的酶活性的试剂功效。

[0015] 此外,在增大浓度下,中和可溶性CD39的抗体提供实质上完全抑制CD39/CD73轴的分解活性。中和可溶性CD39的抗体的作用是在存在显著ATP量的情况下观测到,例如可在存在将ATP外源地添加于分析系统(体外)的情况下观测到,或可在例如实体肿瘤或具有CD39/CD73轴的高分解活性的一般肿瘤的肿瘤(例如,表征为CD73多肽和/或CD73多肽表达性细胞的肿瘤)中出现。中和可溶性CD39的抗体可因此有利地用于表征为CD73多肽和/或CD73多肽表达性细胞的肿瘤,或与增大CD73表达(例如,化学治疗剂蒽环霉素(anthracyclines))或

引起ATP生成(例如,化学治疗剂)的试剂组合使用。

[0016] 另外,通过中和可溶性和膜结合的CD39的ATP酶活性,抗体准许保护增强抗肿瘤免疫性的可获得ATP库(ATP是免疫刺激的)。抗CD39抗体可因此有利地与诱导从肿瘤细胞细胞外释放ATP的治疗剂,尤其诱导免疫原性癌症细胞死亡的试剂或治疗(例如,化学治疗剂、放射治疗)组合使用。抗CD39抗体将不仅防止释出的ATP增大CD73底物库(和最终腺苷),而且将保护释出ATP以便增进其免疫刺激功能。

[0017] 因此,在一个方面中,本发明提供通过结合并中和可溶性CD39的抗体和抑制CD73的试剂组合使用来增强抗肿瘤免疫反应的改良方法。

[0018] 在另一方面中,本发明提供通过使用结合并中和可溶性CD39的抗体(在存在或不存在与抑制CD73的试剂的组合治疗下)增强抗肿瘤免疫反应的改良方法,其用于治疗表征为存在CD73蛋白的癌症(例如,具有可溶性CD73和/或CD73表达性细胞的肿瘤,CD73阳性肿瘤)。

[0019] 不希望受理论所束缚,相信中和细胞表面处的膜结合CD39的抗体通过抑制膜结合CD39(memCD39)的结构域运动起作用,然而不以类似方式影响可溶性CD39蛋白(sCD39)的活性。已报道memCD39以均一多聚体(例如,四聚合物和/或其它多聚体,除了单体形式外)形式出现,而sCD39是单体,且此外,memCD39中的跨膜结构域经历位于与活性位点的功能关系之下的动态动作(Schulte am Esch等人1999《生物化学(Biochem.)》38(8):2248-58)。仅阻断memCD39的抗体可识别酶活性位点外部的CD39且在不阻断CD39的单体形式的情况下防止多聚化。阻断多聚化可减小酶活性,且已报道CD39多聚化实质上增强了ATP酶活性。相比之下,还阻断sCD39的抗体可干扰CD39底物且抑制酶的单体形式。这类抗体也可防止memCD39的多聚化,由此提供抑制CD39的酶活性的第二机制。在存在ATP的情况下(例如,如在肿瘤环境中),通过在不阻断sCD39的情况下防止多聚化来部分地抑制CD39可产生足够残余AMP以阻止对抑制CD73的试剂的任何可检测附加作用,这是因为残余AMP可引起CD73介导的足以介导免疫抑制的腺苷产生。

[0020] 因此,结合并抑制可溶性CD39(例如,单体sCD39)的ATP酶活性的抗体可有利地用于通过中和膜结合的且可溶性CD39蛋白(溶液中的细胞外结构域蛋白)两个来实现个体中CD39活性的更大中和,进而减小免疫抑制,例如用于治疗癌症和/或传染病。

[0021] 因此,在一个方面中,提供一种治疗,其包括向患有CD73阳性癌症的个体施用中和sCD39的抑制性活性的抗体。在一个实施例中,提供一种用于治疗或预防患有CD73阳性癌症的个体体内的癌症或传染病的方法,所述方法包括向个体施用特异性结合并抑制单体人类CD39蛋白(例如,可溶性CD39和/或单体memCD39)的ATP酶活性的试剂。在一个实施例中,CD73阳性癌症是已知通常表征为在肿瘤或肿瘤环境中存在可溶性CD73蛋白和/或CD73表达性细胞的癌症。在一个实施例中,CD73阳性癌症表征为经确定包括CD73表达性细胞的肿瘤。在一个实施例中,CD73阳性癌症表征为包括表达CD73的恶性细胞的肿瘤组织。在一个实施例中,CD73阳性癌症表征为肿瘤组织或肿瘤邻近组织,所述组织表征为CD73表达性免疫细胞(例如,非恶性免疫细胞)浸润。在一个实施例中,CD73阳性癌症是白血病、神经胶质瘤或胶质母细胞瘤或膀胱癌、乳房癌、结肠癌、食道癌、肾脏癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、前列腺癌、胰脏癌、胃癌、子宫颈癌、甲状腺癌、头部和颈部癌(头颈部鳞状细胞癌)和皮肤癌(例如,黑素瘤)。在一个实施例中,治疗进一步包括向个体施用中和CD73蛋白的抑制性活性的

试剂。任选地,患有CD73阳性癌症的个体另外用诱导从肿瘤细胞细胞外释放ATP的试剂,尤其诱导免疫原性癌细胞死亡的试剂或治疗(例如,化学治疗剂、放射治疗)进行治疗。任选地,患有CD73阳性癌症的个体另外用诱导或增加CD73表达的试剂进行治疗。

[0022] 在另一方面中,本文提供用于治疗患有癌症的个体的抗CD39抗体(例如,具有本文中所述的其它特征)的用途,其中所述治疗包括向个体施用抗CD39抗体以及用于抑制CD73活性的构件。在一个实施例中,提供一种用于治疗患有癌症的个体的抗CD39抗体(例如,具有本文中所述的其它特征),其中所述治疗包括向个体施用抗CD39抗体以及药物组合物,所述药物组合物包括(a)用于抑制CD73活性的构件(例如,试剂或治疗、蛋白试剂、抗体试剂、核酸试剂或小分子试剂)和(b)药学上可接受的载剂。

[0023] 在另一方面中,本文提供结合CD39且抑制可溶性(细胞外结构域)人类CD39蛋白的酶活性(ATP酶活性)的抗体结合抑制CD73活性的试剂的用途。结合可溶性CD39的抗体另外强有力地抑制细胞膜结合CD39酶(如细胞表面处表达的CD39)的酶活性(ATP酶活性)。单体(例如,可溶性和膜结合的CD39)和多聚CD39(例如,膜结合的CD39)两个的中和结合抑制CD73活性的试剂可特别有利于治疗CD73阳性癌症。在一个实施例中,CD73阳性癌症是已知通常表征为在肿瘤或肿瘤环境中存在可溶性CD73蛋白和/或CD73表达性细胞的癌症。在一个实施例中,CD73阳性癌症表征为经确定包括CD73表达性细胞的肿瘤。在一个实施例中,CD73阳性癌症表征为包括表达CD73的恶性细胞的肿瘤组织。在一个实施例中,CD73阳性癌症表征为肿瘤组织或肿瘤邻近组织,所述组织表征为CD73表达性免疫细胞(例如,非恶性免疫细胞)浸润。在一个实施例中,CD73阳性癌症是白血病、神经胶质瘤或胶质母细胞瘤或膀胱癌、乳房癌、结肠癌、食道癌、肾脏癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、前列腺癌、胰脏癌、胃癌、子宫颈癌、甲状腺癌、头部和颈部癌(头颈部鳞状细胞癌)和皮肤癌(例如,黑素瘤)。

[0024] 单体(例如,可溶性和膜结合的CD39)和多聚CD39(例如,膜结合的CD39)两个的中和可特别有利于增强CD73抑制剂在以下治疗环境中的活性:其中这类CD73抑制剂是次最佳活性,例如其中在肿瘤组织内(例如,在CD73阳性肿瘤中)寻求CD73抑制,其中CD73抑制剂并不能够以使肿瘤组织中的CD73饱和和/或提供肿瘤组织中CD73抑制的 EC_{50} 、 EC_{70} 或 EC_{100} 的剂量或疗法施用(例如,在CD73阳性肿瘤中;以提供小于(或不大于)1、5、10 μ g/ml的肿瘤浓度的剂量)充分时段(例如,1、2、3、4、6或8周,或更久);其中CD73抑制剂并未完全抑制CD73活性(例如,并不抑制可溶性CD73的抗CD73抗体;依赖于诱导CD73下调/胞内内化以介导酶活性的抑制的抗CD73抗体);或更一般有利于治疗表征为细胞在肿瘤或肿瘤邻近组织(例如,神经胶质瘤或胶质母细胞瘤,或膀胱癌、乳房癌、结肠癌、食道癌、肾脏癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、子宫癌、前列腺癌、胰脏癌、胃癌、子宫颈癌、甲状腺癌、头部和颈部癌(头颈部鳞状细胞癌)和皮肤癌(例如,黑素瘤))中的显著CD73表达量的癌症。

[0025] 在一个实施例中,提供一种用于治疗或预防个体体内的癌症或传染病的方法,所述方法包括向个体施用:(a)结合可溶性CD39蛋白(sCD39)并抑制其ATP酶活性的试剂,和(b)抑制人类CD73多肽的活性的试剂。

[0026] 在一个实施例中,提供一种用于治疗或预防个体体内的癌症或传染病的方法,所述方法包括向个体施用:(a)结合单体人类CD39蛋白(例如,可溶性CD39和/或单体memCD39)并抑制其ATP酶活性的试剂,和(b)抑制人类CD73多肽的活性的试剂。

[0027] 在本文中的任何实施例的一个方面中,抑制或中和CD39蛋白的ATP酶活性的化合

物是或包括结合CD39蛋白的抗体或抗体片段(例如,单特异性抗体、双特异性或多特异性抗体)。

[0028] 在一个方面中,提供一种治疗,其包括向个体施用中和sCD39的抑制性活性的抗体和中和CD73的抑制性活性的试剂的组合。

[0029] 在一个方面中,提供一种治疗,其包括向个体施用中和sCD39的抑制性活性的抗体,所述个体对利用中和CD73的抑制性活性的试剂治疗具有耐药性或对利用中和CD73的抑制性活性的试剂治疗的反应具有不良预后。在一个实施例中,个体患有CD73阳性癌症。

[0030] 在一个方面中,提供一种用于使个体对利用中和CD73的抑制性活性的试剂的治疗敏感的方法,所述方法包括向个体施用中和sCD39的抑制性活性的抗体。

[0031] 在一个方面中,提供一种组合物,其包括抑制人类sCD39多肽的抗体和抑制人类CD73多肽的试剂,任选地抗体。在一个方面中,组合物用于治疗或预防癌症,任选地实体肿瘤、任选地血液恶性病、任选地表征为表达CD73的恶性细胞的血液恶性病、任选地白血病、任选地表征为恶性细胞的癌症、任选地表征为表达CD73多肽的肿瘤或肿瘤邻近组织中的恶性和/或非恶性细胞的癌症。

[0032] 抗体将适用于抑制AMP(和上游ATP和ADP)分解代谢成腺苷,例如减小每一步骤处可获得的腺苷前体库,且最终降低肿瘤微环境中腺苷的浓度。这些抗体将因此适用于逆转CD39和/或CD73和/或腺苷对T细胞、B细胞和表达腺苷受体的其它细胞的免疫抑制作用,例如用于治疗癌症。在一个实施例中,抗体中和腺苷介导的对T细胞中的增殖、细胞因子产生、细胞毒性和/或NF κ B活性的抑制。在一个实施例中,本发明的方法适用于增大或增强个体中的抗肿瘤免疫性,用于减小免疫抑制,用于活化和/或增强免疫效应细胞,任选地CD8+肿瘤浸润性T细胞或NK细胞的活性,和/或用于降低肿瘤环境中腺苷的量和/或浓度。

[0033] 在一个实施例中,提供活化或增强个体中免疫效应细胞,任选地CD8+肿瘤浸润性T细胞或NK细胞的活性的方法,和/或一种降低肿瘤环境中腺苷的量和/或浓度的方法,所述方法包括向个体施用:(a)治疗活性量的结合人类sCD39多肽并抑制其酶活性(ATP酶活性)的化合物,和(b)治疗活性量的抑制人类CD73多肽的酶活性的化合物。在一个实施例中,提供活化、增强个体中肿瘤浸润性T或NK细胞的活性且/或增大其增殖的方法,所述方法包括向个体施用:(a)治疗活性量的结合人类sCD39多肽并抑制其酶活性(ATP酶活性)的化合物,和(b)治疗活性量的抑制人类CD73多肽的化合物。

[0034] 在本文中任一实施例的一个方面中,抑制人类CD73多肽的化合物是抑制CD73的酶活性的抗CD73抗体。在另一实施例中,抗CD73抗体通过引起细胞表面表达CD73增大和/或诱导其胞内内化,或更通常来说细胞表面表达CD73的下调来抑制CD73的5'-外核苷酸酶活性且/或至少部分取决于其中和CD73的能力。在一个实施例中,抑制CD73的酶活性的抗CD73抗体是实质上不能够中和或抑制可溶性CD73的酶活性的抗体,任选地在抗体以较高(例如,10倍)过量的抗体:酶提供时。在一个实施例中,抑制CD73的酶活性的抗CD73抗体是能够中和可溶性CD73的酶活性的抗体,任选地在抗体能够以较高(例如,10倍)过量抗体:酶中和可溶性CD73的酶活性时。在一个实施例中,抑制人类CD73多肽的化合物是有机分子,任选地小分子有机化合物,任选地具有以下分子量的有机化合物:不超过3000g/mol、任选地不超过2000g/mol,任选地不超过1000g/mol;任选地具有以下分子量的有机化合物:在100g/mol与300g/mol之间,在100g/mol与1000g/mol之间,任选地至少300g/mol、400g/mol、500g/mol、

600g/mol、700g/mol、800g/mol、900g/mol、1000g/mol或2000g/mol。

[0035] 在一个实施例中,提供一种用于治疗或预防个体体内的癌症的方法,所述方法包括向个体施用治疗活性量的试剂,所述试剂能够:(i)结合可溶性CD39蛋白(sCD39)并抑制其ATP酶活性,且(ii)结合人类CD73多肽并抑制其5'-外核苷酸酶活性(例如,表达这类CD73多肽的细胞中)。

[0036] 在本文中的任一实施例的一个方面中,sCD39蛋白可表征为缺乏在膜结合的CD39中发现的两个跨膜结构域(即,在N末端和C末端附近的跨膜结构域)。在一个实施例中,sCD39是在循环中,例如在人类个体中发现的非膜结合sCD39蛋白。在一个实施例中,sCD39包括SEQ ID NO:5的氨基酸序列或由其组成(任选地进一步包括C末端标签或另一种非CD39衍生的氨基酸序列),例如如本文中的实例中产生的sCD39蛋白。在一个实施例中,例如根据本文公开的方法,蛋白质、抗体或抗体片段在与sCD39一起温育于溶液中时,会抑制或中和sCD39的ATP酶活性。在一个实施例中,蛋白质、抗体或抗体片段以可溶性(细胞外结构域蛋白质)和膜结合形式两种特异性结合人类CD39蛋白。

[0037] 在本文中的任一实施例的一个方面中,癌症是实体肿瘤。在一个实施例中,癌症是恶性血液肿瘤。在本文中的任一实施例的一个方面中,癌症表征为肿瘤或肿瘤邻近组织中表达可检测CD73蛋白的细胞(例如,肿瘤环境中的恶性细胞和/或非恶性细胞)。

[0038] 在本文中的任一实施例的一个方面中,个体可特定是人类。

[0039] 在一个实施例中,将抗CD39抗体以足以中和外围和/或肿瘤微环境中CD39(sCD39和/或memCD39)的活性的量和频率施用到患有癌症的个体。在一个实施例中,将抗体以足以降低肿瘤微环境中AMP和/或腺苷的生成和/或浓度的量和频率施用。在一个实施例中,将抗体以足以中和由肿瘤细胞表达的CD39的活性的量和频率施用。在一个实施例中,将抗体以足以中和由白细胞或淋巴细胞,例如CD4 T细胞、CD8 T细胞、TReg细胞和/或B细胞表达的CD39的活性的量和频率施用。

[0040] 在一个实施例中,将抑制CD73的活性的试剂以足以中和外围和/或肿瘤微环境中CD73(可溶性CD73蛋白和/或膜结合的CD73)的活性的量和频率施用到患有癌症的个体。在一个实施例中,将抗体以足以中和由肿瘤环境中存在的肿瘤细胞或非肿瘤细胞表达的CD73的活性的量和频率施用。在一个实施例中,将抗体以足以中和由CD4 T细胞、CD8 T细胞和/或B细胞表达的CD73的活性的量和频率施用。

[0041] 在一个实施例中,将抗CD39抗体和抑制CD73的活性的试剂以足以降低肿瘤微环境中腺苷的生成和/或浓度的量和频率施用。在一个实施例中,将抗体以足以增大肿瘤微环境中ATP的生成和/或浓度的量和频率施用。

[0042] 在一个实施例中,将抗CD39抗体和抑制CD73的活性的试剂各自施用至少一个施用周期,施用周期包括抗CD39抗体和抑制CD73的活性的试剂的至少第一次和第二次(以及任选地第3次、第4次、第5次、第6次、第7次和/或第8次或进一步)施用。

[0043] 在一个实施例中,癌症是晚期和/或顽固性实体肿瘤。在一个实施例中,癌症是晚期和/或顽固性实体肿瘤。在一个非限制性实施例中,癌症(例如,晚期顽固性实体肿瘤)选自以下组成的组:非小细胞肺癌(NSCLC)、肾癌、胰腺或食道腺癌、乳癌、肾细胞癌瘤(RCC)、黑素瘤、结肠直肠癌和卵巢癌(和任选地本文中所述的另一癌症类型)。

[0044] 在某些任选的方面中,抗CD39试剂可用于治疗患有表征为免疫抑制的,任选地缺

失肿瘤的免疫浸润或不足免疫浸润,任选地缺失抗肿瘤免疫性或不足抗肿瘤免疫性的癌症或肿瘤的个体体内的癌症。

[0045] 在某些任选的方面中,抗CD39试剂可用于治疗具有不良疾病预后,尤其对利用中和CD73的试剂治疗的反应的不良预后的个体体内的癌症。举例来说,基于一个或多个预测因素,具有不良疾病预后的个体处于较高发展风险下。在一个实施例中,预测因数包括一个或多个基因中存在或不存在突变。在一个实施例中,预测因数包括免疫效应细胞上的一种或多种基因或蛋白质或实例抑制性或活化受体的表达量。在一个实施例中,预测因数包括循环中或肿瘤环境中表达CD73和/或CD39的细胞存在(例如,数量),和/或循环中或肿瘤环境中细胞上的CD73和/或CD39的表达量;在一个实施例中,细胞是肿瘤细胞;在一个实施例中,细胞是白细胞,例如B细胞、调节性T细胞(Treg)。CD73和/或CD39的升高表达和/或CD73和/或CD39表达性细胞的升高数量的存在可表明个体对用中和CD73的抗体治疗的反应具有不良预后。

[0046] 在某些任选的方面中,抗CD39试剂可用于治疗无反应的,或对利用中和CD73的试剂的治疗经历部分地或不完全反应,或疾病已在利用中和CD73的抗体的治疗之后复发或发展的个体体内的癌症。

[0047] 在一个实施例中,抗CD39试剂与分别具有SEQ ID NO:52和53的重链和轻链的抗体竞争以结合于CD39上的表位或决定簇。试剂可以是例如人类或人类化抗CD39抗体。在一个实施例中,抗CD39抗体分别包括:重链,其包括与SEQ ID NO:52的重链氨基酸序列至少60%、70%、75%、80%、85%或90%相同的氨基酸序列;和轻链,其包括与SEQ ID NO:53的轻链氨基酸序列至少60%、70%、75%、80%、85%或90%相同的氨基酸序列。

[0048] 在某些任选方面中,可以通过评定患者是否为对于CD73中和剂的较差反应者(对反应具有不良预后)将患者标识为用CD39中和剂和CD73中和剂(例如,本文公开的任一试剂)治疗。较差反应者可以用CD39中和剂和CD73中和剂的组合治疗。

[0049] 在某些任选方面中,可以通过评定循环和/或肿瘤样品(例如,肿瘤组织和/或肿瘤邻近组织)中存在升高的CD73多肽表达量和/或CD73表达性细胞数量将患者标识为利用CD39中和剂(和任选地另一CD73中和剂)治疗。

[0050] 在某些任选方面中,可以通过评定循环和/或肿瘤样品(例如,肿瘤组织和/或肿瘤邻近组织)中存在升高的CD39多肽表达量和/或CD39表达性细胞数量将患者标识为利用CD39中和剂和CD73中和剂治疗。

[0051] 在其它实施例中,提供药物组合物和试剂盒以及用于使用所述药物组合物和试剂盒的方法。在一个实施例中,提供一种药物组合物,其包括中和人类CD39多肽的ATP酶活性的化合物和中和CD73多肽的5'-外核苷酸酶活性的试剂。在一个实施例中,提供一种试剂盒,其包括中和人类CD39多肽的抑制性活性的化合物和中和CD73多肽的5'-外核苷酸酶活性的试剂。

[0052] 在本文提供的本发明的描述中将更加充分地描述这些方面,并且额外的方面、特征和优点将是显而易见的。

附图说明

[0053] 图1示出了代表性的筛选结果,其示出了与阳性对照I-394抗体相比的抗体I-397、

I-398和I-399。

[0054] 图2A示出了抗体BY40、I-394、I-395和I-396抑制细胞膜结合的CD39,与BY40相比,I-394和I-395两种在所有浓度下示出更高的效力以及对细胞CD39的更大的最大抑制作用。图2B示出了与阴性对照(BY40)和阳性对照(I-394)抗体相比,抗体I-395和I-396两种均抑制可溶性CD39。

[0055] 图3A示出了突变体5(M5)、15(M15)和19(M19)中突变的残基在CD39蛋白表面上的位置。图3B示出了针对不同抗体,结合于突变体5、15和19的结果。

[0056] 图4示出了通过流式细胞术评估的抗体I-394与表达人类CD39的细胞的结合。I-394结合表达人类CD39的细胞(CH0-huCD39)、表达食蟹猴CD39的细胞(CH0-cyCD39)和Ramos淋巴瘤细胞,但不结合表达鼠类CD39的细胞(CH0-moCD39)。

[0057] 图5示出了抗体I-394在阻断肿瘤(Ramos)细胞、表达人类CD39的细胞(CH0-huCD39)和表达食蟹猴CD39的细胞(CH0-cyCD39)中的CD39酶活性方面是高度有效的,如通过对与存在的ATP量成比例的发光单位进行定量所评估。

[0058] 图6示出了抗体I-394在阻断可溶性重组人类CD39蛋白的酶活性方面是高度有效的,如通过对与存在的ATP量成比例的发光单位进行定量所评估。

[0059] 图7示出了抗体I-394结合人类CD39,但不结合任何人类同种型CD39-L1、-L2、-L3或-L4,如ELISA测定中所评估。

[0060] 图8示出了用于评估ATP介导的DC活化对CD4 T细胞活化的影响的实验程序,洗涤ATP活化的DC,且随后与同种异体CD4 T细胞(比率1个MoDC/4个T细胞)一起温育5天,用于混合淋巴细胞反应(MLR)。通过CD25表达和通过流式细胞术进行Cell Trace Violet稀释来分析T细胞活化和增殖。

[0061] 图9示出了moDC上的HLA-DR表达,并且图10示出了moDC上的CD83表达。这些图示出抗CD39阻断抗体I-394和CD39的化学抑制剂在0.125mM、0.25mM或0.5mM中的每一种下导致moDC活化。然而,抗CD39抗体BY40或抗CD73抗体不能支持ATP诱导的树突细胞(DC)活化,这表明抗体不能充分阻断酶活性以避免ATP分解代谢。从上到下的图例对应于图表中从左到右的条形图。

[0062] 示出CD25表达的图11示出了在ATP存在下活化的MoDC能够在MLR测定中诱导T细胞活化和增殖;通过抗CD39阻断抗体I-394增强ATP介导的MoDC活化会导致更高的T细胞增殖和活化。从上到下的图例对应于图表中从左到右的条形图。

[0063] 图12A示出了在添加ATP存在下,在3个不同剂量的抗sCD39抗体:0.01μg/ml、0.1μg/ml和1μg/ml下,CD4T细胞增殖上的抗CD73抗体的剂量范围。能够中和可溶性人类CD39的抗CD39抗体示出了抗CD73抗体在恢复CD4 T细胞增殖中的较强增强。图12B示出了在添加ATP存在下,CD8T细胞增殖上的抗CD73抗体的剂量范围,抗sCD39抗体示出了抗CD73抗体在恢复CD8T细胞增殖中的较强增强。

[0064] 图13A、13B及13C示出了考虑疾病阶段和时间,将人类癌症样品中的CD39和CD73基因表达与生存率相关联的研究。图13A示出了卵巢癌中的结果,尤其癌症样品中较低CD39表达与卵巢癌中的较高生存机率相关;还示出了高表达CD73与卵巢癌中的较低生存机率的相关性。图13B示出了食道癌中的结果,尤其癌症样品中的较低CD39表达与食道癌中的较高生存机率相关;还示出了高表达CD73与食道癌中的较低生存机率的相关性。图13C示出了胃腺

癌中的结果,尤其癌症样品中的较低CD39表达与胃癌中的较高生存机率相关;还示出了高表达CD73与胃癌中的较低生存机率的相关性。

具体实施方式

[0065] 定义

[0066] 如说明书中所使用,“一(a或an)”可以意味着一个或多个。如权利要求书中所使用,当结合词语“包括(comprising)”使用时,词语“一(a或an)”可以意味着一个或超过一个。如本文中所使用,“另一(another)”可以意指至少第二个或更多个。

[0067] 当使用“包括”时,这一词语可任选地经“主要由…组成(consisting essentially of)”或“由…组成(consisting of)”置换。

[0068] 由NT5E基因编码的人类CD73,又称为胞外-5'-核苷酸酶和5-引物核糖核苷酸磷酸水解酶EC 3.1.3.5,展现5'-核苷酸酶,尤其AMP-核苷酶、NAD-核苷酶和NMN-核苷酶活性。CD73催化在中性pH下将嘌呤5-引物单核苷酸转化成核苷,优选的底物是AMP。酶由2个相同的70-kD亚基的二聚体组成,所述亚基由糖基磷脂酰肌醇键结合到质膜的外部表面。人类CD73前蛋白(单体)的氨基酸序列,包含氨基酸1到26处的信号序列,在基因库中以登陆号NP_002517示出,其全部公开内容通过引用并入本文中,并且如下:

```
MCPRAARAPA TLLLAGAVL WPAAGAWELT ILHTNDVHSR LEQTSSEDSSK CVNASRCMGG
VARLFTKVQQ IRRAPNVLL LDAGDQYQGT IWFTVYKGAE VAHFMNALRY DAMALGNHEF
DNGVEGLIEP LLKEAKFPIL SANIKAKGPL ASQISGLYLP YKVLPGVDEV VGIVGYTSKE
TPFLSNPGTN LVFEDEITAL QPEVDKLKTL NVNKIIALGH SGFEMDKLIA QKVRGVDVVV
GGHSNTFLYT GNPPSKEVPA GKYPFIVTSD DGRKVPVQA YAFGKYLGYL KIEFDERGNV
ISSHGNPILL NSSIPEDPSI KADINKWRIK LDNYSTQELG KTIVYLDGSS QSCRFRECNM
GNLICDAMIN NNLRHTDEMF WNHVSMCILN GGGIRSPIDE RNNGTITWEN LAAVLPGGT
FDLVQLKGST LKKA FEHSVH RYGQSTGEFL QVGGIHVVDY LSRKPGDRVV KLDVLCTKCR
VPSYDPLKMD EVYKVILPNF LANGGDGFQM IKDELLRHDS GDQDINVVST YISKMKVIYP
AVEGRIKFST GSHCHGSFSL IFLSLWAVIF VLYQ
```

(SEQ ID NO: 1)。

[0070] 在本文上下文中,当提及CD73多肽时,“抑制(inhibit/inhibiting)”、“中和(neutralize/neutralizing)”(例如,“中和CD73”、“中和CD73的活性”或“中和CD73的酶活性”等等)是指其中CD73的5'-核苷酸酶(5'-外核苷酸酶)活性受到抑制的过程。这尤其包括抑制CD73介导的腺苷生成,即抑制CD73介导的AMP分解代谢成腺苷。这可以在例如无细胞测定中进行测量,所述无细胞测定测量测试化合物直接或间接抑制AMP转化成腺苷的能力。在一个实施例中,抗体制剂导致AMP转化成腺苷降低至少50%、AMP转化成腺苷降低至少70%、或ATP转化成腺苷降低至少80%,例如,参考本文所述的测定。

[0071] 人类CD39,也称为NTPdase1、ENTPD1、ATPDase和血管ATP二磷酸水解酶,展现ATP酶活性。CD39是将细胞外ATP和ADP水解成AMP的膜结合蛋白,其通过另一种酶(5-引物核苷酸酶)进一步转化成腺苷。人类CD39成熟多肽链的氨基酸序列在基因库中以登录号P49961示出,其全部公开内容通过引用并入本文,并且如下:

[0072] medtkesnvktfcsknailailgfssiiaviavllavgltnkalpenvkygividagsshtslyiykwp

aekendtgvvhqveecrvkgpgiskfvqkvneigiyltdcmerareviprsqhqetpvyulgatagmrlrmeseel
adrldvverslsnypfdfqgariitgqeegaygwitinyllgkfsqktrwfsivpyetnnqetfgaldlggastq
vtfvpqnqtiespdnalqfrlygkdynvythsflcygkdqalwqklakdiqvasneilrdpcfhpgykkvvnvsdl
yktptckrfemtlpfqqfeiqgignyqqchqsilelfnstycpysqcafngiflpplqgdfgafsfafyvmkflnl
tsekvsqekvtemmkkfcaqpweeiktsyagvkekylseycfsgtyilslllqgyhftadswehihfigkiqgsda
gwtlgymlnltnmipaeqplstplshstyvflmvlfsllvftvaiigllifhkpsyfkwkdmv

[0073] (SEQ ID NO:2)。

[0074] 在本文上下文中,当提及CD39多肽时,“抑制(inhibit/inhibiting)”、“中和(neutralize/neutralizing)”(例如,“中和CD39”、“中和CD39的活性”或“中和CD39的酶活性”)是指其中CD39的ATP水解(ATP酶)活性受到抑制的过程。这尤其包括抑制CD39介导的AMP和/或ADP生成,即,抑制CD39介导的ATP分解代谢成AMP和/或ADP。这可以例如在细胞测定中测量,所述细胞测定测量测试化合物直接或间接抑制ATP转化成AMP和/或ADP的能力。举例来说,如本文中所述,可以评估ATP的消失和/或AMP的生成。在一个实施例中,抗体制剂导致ATP转化成AMP降低至少60%、ATP转化成AMP降低至少70%、或ATP转化成AMP降低至少80%或90%,例如,参考本文所述的测定(例如,ATP的消失和/或AMP的生成)。

[0075] 关于试剂和特定活性(例如,结合于细胞,抑制酶活性,活化或抑制免疫细胞)的“EC50”是指产生50%关于这类活性的最大反应或效果的试剂的有效浓度。关于试剂和特定活性的“EC100”是指产生关于这类活性的实质上最大反应的试剂的有效浓度。

[0076] 如本文中所用,术语“抗体”是指多克隆和单克隆抗体。根据重链中恒定结构域的类型,将抗体指定为以下五大类中的一种:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。这些中的几种进一步分为亚类或同种型,如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等。示范性免疫球蛋白(抗体)结构单元包括四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链构成,每对具有一个“轻”(约25kDa)和一个“重”链(约50-70kDa)。每条链的N-末端限定了约100个到110个或更多个氨基酸的可变区,其主要负责抗原识别。术语可变轻链(V_L)和可变重链(V_H)分别是指这些轻链和重链。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为“ α ”、“ δ ”、“ ϵ ”、“ γ ”和“ μ ”。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的。IgG是本文中使用的示范性抗体类别,因为它们是在生理情况中最常见的抗体,并且因为它们最容易在实验室环境中制备。任选地,抗体是单克隆抗体。抗体的具体实例是人源化、嵌合、人类或其它人类合适的抗体。“抗体”还包含任何本文中所述抗体的任何片段或衍生物。

[0077] 术语“特异性结合”意指抗体可以优选地在竞争性结合测定中结合于结合配偶体,例如CD39、CD73,如使用其中蛋白质、表位的重组形式,或存在于分离靶细胞表面上的天然蛋白质所评估的。竞争性结合测定和用于确定特异性结合的其它方法是所属领域中众所周知的。举例来说,可通过放射性标记,如质谱分析的物理方法或使用例如细胞荧光分析(例如,FACSscan)测定到的直接或间接荧光标记来检测结合。高于通过对照所见量的结合,非特异性试剂表明试剂结合于目标。

[0078] 当称一种抗体与一种特定单克隆抗体“竞争”时,其意味着所述抗体使用重组分子(例如,CD39、CD73)或表面表达分子(例如,CD39、CD73)在结合测定中与单克隆抗体竞争。举例来说,如果测试抗体在结合测定中降低具有抗体11E1、6E1、3C12或8C7中的任一个的重链可变区和轻链可变区的抗体与CD73多肽或CD73表达性细胞的结合,则称抗体相应地与这类

抗体“竞争”。举例来说,如果测试抗体在结合测定中降低具有SEQ ID NO:6的重链和SEQ ID NO:7的轻链的抗体与CD39多肽或CD39表达性细胞的结合,则称抗体相应地与这类抗体“竞争”。

[0079] 如本文中所用,术语“亲和力”是指抗体与表位结合的强度。抗体的亲和力由解离常数 K_d 给出,定义为 $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$,其中 $[Ab-Ag]$ 是抗体-抗原复合物的摩尔浓度, $[Ab]$ 是未结合抗体的摩尔浓度,并且 $[Ag]$ 是未结合抗原的摩尔浓度。亲和力常数 K_a 由 $1/K_d$ 定义。用于确定mAb的亲和力的方法可以在以下中找到:Harlow等人,《抗体:实验室手册(Antibodies: A Laboratory Manual)》,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),冷泉港(Cold Spring Harbor),纽约,(1988),Coligan等人编辑,《免疫学实验指南(Current Protocols in Immunology)》,格林出版协会和Wiley Interscience,纽约,(1992,1993)以及Muller,《酶学方法(Meth.Enzymol.)》92:589-601(1983),所述参考通过引用全部并入本文。所属领域熟知的用于确定mAb的亲和力的一种标准方法是使用表面等离子共振(SPR)筛选(如通过用BIAcore™ SPR分析装置分析)。

[0080] 在本文的上下文中,“决定簇”表示与多肽相互作用或结合的位点。

[0081] 术语“表位”是指抗原决定簇,并且是抗体结合的抗原上的区域或区。蛋白质表位可包括直接参与结合的氨基酸残基以及由特异性抗原结合抗体或肽有效阻断的氨基酸残基,即抗体的“足迹”内的氨基酸残基。它是复杂抗原分子上最简单的形式或最小的结构区域,其可以与例如抗体或受体组合。表位可以是线性的或构象的/结构的。术语“线性表位”定义为由氨基酸的线性序列(一级结构)上连续的氨基酸残基构成的表位。术语“构象或结构表位”定义为由不完全连续的氨基酸残基构成的表位,并且因此代表通过折叠分子而彼此接近的氨基酸线性序列的分离部分(二级、三级和/或四级结构)。构象表位取决于3维结构。因此,术语“构象”通常与“结构”可互换使用。

[0082] 关于CD73或CD39表达表达性细胞的术语“缺失(deplete/depleting)”意味着导致杀灭、消除、裂解或诱导这类杀灭、消除或裂解,以便不利地影响样品中或个体体内存在的这类CD73或CD39表达性细胞的数量、过程、方法或化合物。

[0083] 与“细胞内内化”可互换使用的术语“内化”是指与将分子从细胞的细胞外表面转移到细胞的细胞内表面的过程相关联的分子、生物化学和细胞事件。负责分子细胞内内化的过程是众所周知的,并且尤其可能涉及细胞外分子(如激素、抗体和小有机分子)的内化;膜相关分子(如细胞表面受体);以及结合细胞外分子的膜相关分子的复合物(例如,结合跨膜受体的配体或结合膜相关分子的抗体)。因此,“诱导和/或增加内化”包括其中引发细胞内内化和/或增加细胞内内化的速率和/或程度的事件。

[0084] 术语“试剂”在本文中用于表示化学化合物,化学化合物、生物大分子或由生物材料制成的提取物的混合物。术语“治疗剂”是指具有生物活性的试剂。

[0085] 出于本文中的目的,“人类化”或“人类”抗体是指其中一种或多种人类免疫球蛋白的恒定和可变框架区与动物免疫球蛋白的结合区,例如CDR融合的抗体。设计这类抗体以维持衍生结合区的非人抗体的结合特异性,但避免针对非人类抗体的免疫反应。这类抗体可以从转基因小鼠或已经被“工程化”以响应抗原攻击产生特异性人类抗体的其它动物中获得(参见,例如,Green等人(1994)《自然遗传学(Nature Genet)》7:13;Lonberg等人(1994)《自然(Nature)》368:856;Taylor等人(1994)《国际免疫药理学(Int Immun)》6:579,其全部

教导通过引用并入本文)。完全人类抗体也可以通过遗传或染色体转染方法以及噬菌体展示技术构建,所有这些都属于领域已知的(参见,例如,McCafferty等人(1990)《自然》348:552-553)。人类抗体也可以通过体外活化的B细胞生成(参见,例如,美国专利第5,567,610号和第5,229,275号,其通过引用以其整体并入)。

[0086] “嵌合抗体”是抗体分子,其中(a)恒定区或其部分被改变、替换或交换,使得抗原结合位点(可变区)连接到不同或改变类别、效应子功能和/或物种、或赋予嵌合抗体新特性的完全不同分子(例如酶、毒素、激素、生长因子、药物等)的恒定区;或(b)可变区或其部分利用具有不同或改变的抗原特异性的可变区改变、替换或交换。

[0087] 当在本文中使用时,术语“高变区”是指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区通常包括来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如,轻链可变结构域中的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)以及重链可变结构域中的31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3);Kabat等人,1991)和/或来自“高变环”的那些残基(例如,轻链可变结构域中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)以及重链可变结构域中的26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3);Chothia和Lesk,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol)》1987;196:901-917),或用于确定负责抗原结合的必需氨基酸的类似系统。通常,这一区域中氨基酸残基的编号通过Kabat等人,同上所述的方法进行。如“Kabat位置”、“如Kabat中的可变结构域残基编号”和“根据Kabat”的短语在本文中是指用于重链可变结构域或轻链可变结构域的这一编号系统。使用Kabat编号系统,肽的实际线性氨基酸序列可以含有较少或额外的氨基酸,对应于可变结构域的FR或CDR的缩短或插入。举例来说,重链可变结构域可以包含在CDR H2的残基52之后的单个氨基酸插入物(根据Kabat的残基52a)和在重链FR残基82之后的插入残基(例如,根据Kabat的残基82a、82b和82c等)。通过将抗体的序列的同源区与“标准”Kabat编号序列比对,可以确定给定抗体的Kabat残基编号。

[0088] 如本文中所用,“框架”或“FR”残基是指除了定义为CDR的那些区之外的抗体可变结构域的区。每一抗体可变结构域框架可以进一步细分为由CDR分开的连续区(FR1、FR2、FR3和FR4)。

[0089] 术语“Fc结构域”、“Fc部分”和“Fc区”是指抗体重链的C末端片段,例如,来自人类 γ (gamma)重链的约氨基酸(aa)230到约aa 450,或其其它类型的抗体重链中的对应序列(例如,人类抗体的 α 、 δ 、 ϵ 和 μ),或其天然存在的同种异型。除非另有说明,否则在本公开中使用普遍接受的免疫球蛋白的Kabat氨基酸编号(参见Kabat等人(1991)《具有免疫学意义的蛋白质序列(Sequences of Protein of Immunological Interest)》,第5版,美国公共卫生署(United States Public Health Service),美国国立卫生研究院(National Institute of Health),马里兰州贝塞斯达(Bethesda,MD))。

[0090] 术语“分离的”、“纯化的”或“生物学上纯的”是指实质上或基本上不含在其天然状态下发现的通常伴随其的组分材料。纯度和均匀性通常使用分析化学技术,如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法确定。作为制剂中存在的主要物种的蛋白质是实质上纯化的。

[0091] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用以指氨基酸残基的聚合物。术语适用于氨基酸聚合物(其中一个或多个氨基酸残基是对应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物),以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。

[0092] 当参考例如细胞、或核酸、蛋白质或载体一起使用时,术语“重组”表明已经通过引入异源核酸或蛋白质、或天然核酸或蛋白质的改变修饰了细胞、核酸、蛋白质或载体,或细胞衍生自如此修饰的细胞。因此,例如,重组细胞表达在细胞的天然(非重组)形式内未发现的基因,或表达以其它方式异常表达、表达不足或根本不表达的天然基因。

[0093] 在本文的上下文中,术语“结合”多肽或表位的抗体表示以特异性和/或亲和力结合所述决定簇的抗体。

[0094] 当在两个或更多个多肽的序列之间的关系中使用时,术语“同一性”或“相同的”是指多肽之间的序列相关性程度,如通过两个或更多个氨基酸残基串之间的匹配数确定。“同一性”测量两个或更多个序列中的较小序列之间相同匹配的百分比,其中间隙比对(如果存在)由特定数学模型或计算机程序(即“算法”)解决。通过已知方法可以容易地计算相关多肽的同一性。这类方法包含但不限于以下中描述的那些:《计算分子生物学(Computational Molecular Biology)》,Lesk,A.M.编辑,牛津大学出版社(Oxford University Press),纽约,1988;《生物计算:信息学和基因组计划(Biocomputing:Informatics and Genome Projects)》,Smith,D.W.编辑,学术出版社(Academic Press),纽约,1993;《序列数据的计算机分析(Computer Analysis of Sequence Data)》,第1部分,Griffin,A.M.和Griffin,H.G.编辑,胡马纳出版社(Humana Press),新泽西州(New Jersey),1994;《分子生物学中的序列分析(Sequence Analysis in Molecular Biology)》,von Heinje,G.,学术出版社,1987;《序列分析引物(Sequence Analysis Primer)》,Gribskov,M.和Devereux,J.编辑,M.Stockton Press,纽约,1991;和Carillo等人,《工业与应用数学学会应用数学杂志(SIAM J.Applied Math.)》48,1073(1988)。

[0095] 设计用于确定同一性的方法以给出测试序列之间的最大匹配。在公开可用的计算机程序中描述了确定同一性的方法。用于确定两个序列之间的同一性的计算机程序方法包含GCG程序包,包含GAP(Devereux等人,《核酸研究(Nucl.Acids.Res.)》12,387(1984);遗传学计算机组,威斯康星大学(University of Wisconsin),麦迪逊,威斯康星州(Madison,Wis)),BLASTP、BLASTN和FASTA(Altschul等人,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》215,403-410(1990))。BLASTX程序可从国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)和其它来源公开获得(BLAST Manual,Altschul等人,NCB/NLM/NIH Bethesda,Md.20894;Altschul等人,同上)。众所周知的史密斯沃特曼算法(Smith Waterman algorithm)也可以用于确定同一性。

[0096] 抑制sCD39蛋白的试剂

[0097] 根据本文中使用的结合并抑制CD39的试剂可以是结合可溶性CD39蛋白(sCD39)并抑制或中和其ATP酶活性的抗原结合域或包括这类抗原结合域的蛋白质,任选地抗体或抗体片段。在一个实施例中,sCD39蛋白缺少在膜结合CD39中发现的两个跨膜结构域(即,N末端和C末端附近的跨膜结构域)。在一个实施例中,sCD39是在循环中,例如在人类个体中发现的非膜结合sCD39蛋白。在一个实施例中,sCD39包括SEQ ID NO:5的氨基酸序列或由其组成(任选地进一步包括C末端标签或另一种非CD39衍生的氨基酸序列)。在一个实施例中,例如,根据本文公开的方法,蛋白质、抗体或抗体片段在与sCD39一起温育于溶液中时,会抑制sCD39的ATP酶活性。在一个实施例中,蛋白质、抗体或抗体片段以可溶性(细胞外结构域蛋白质)和膜结合形式两种特异性结合人类CD39蛋白。

[0098] 中和sCD39(和memCD39)的活性的抗体除了用作二价结合剂之外,还可有效作为单价结合剂,无论其靶向除了sCD39之外的memCD39。因此,在一个实施例中,抑制CD39的试剂可以是单价结合到人类CD39蛋白(sCD39和任选地另一memCD39)且中和其酶(ATP酶)活性的抗原结合蛋白。抗原结合蛋白可任选地特定用作结合于单一CD39蛋白和/或携带能够结合于CD39蛋白的单个抗原结合域。在一个实施例中,提供单价结合人类CD39蛋白(sCD39和/或memCD39)且中和其酶(ATP酶)活性的抗体片段,任选地F(ab)片段、单链抗体、scFv、多特异性抗体。在一个实施例中,单价结合到人类CD39蛋白的CD39中和抗原结合蛋白是多特异性抗原结合蛋白,例如多特异性抗体、双特异性抗体、三特异性抗体等。在一个实施例中,单价结合人类CD39蛋白的CD39中和抗原结合蛋白进一步结合人类CD73蛋白并抑制其酶活性。在一个实施例中,提供单价结合人类CD39蛋白的CD39中和抗原结合蛋白的用途,所述CD39中和抗原结合蛋白包括结合CD39(sCD39和/或memCD39)的第一(或单个)抗原结合结构域和结合并抑制CD73蛋白的第二(和任选地其它)抗原结合结构域。

[0099] 在一个实施例中,抗CD39抗体并未增加或诱导细胞表面表达的CD39的细胞内内化,或更通常来说下调细胞表面表达的CD39和/或并未依赖于其CD39抑制性活性。

[0100] 在一个方面中,抗CD39抗体能够:(a)抑制细胞表面处表达的膜结合CD39蛋白(例如,包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列)的酶活性,且(b)抑制可溶性CD39蛋白(例如,具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列)的酶活性。

[0101] 在一个实施例中,抗CD39抗体并未实质上结合(例如,通过其Fc结构域)人类Fc γ 受体(例如,CD16、CD32a、CD32b、CD64)和/或C1q,且/或并未实质上将ADCC和/或CDC朝向CD39表达性细胞引导。任选地,抗体保留(例如,人类IgG同种型的)Fc结构域且保持结合于人类FcRn。

[0102] 在一个实施例中,CD39中和抗体可表征为能够导致sCD39多肽和/或单体CD39多肽的ATP酶活性降低,任选地导致由可溶性单体人类CD39蛋白(例如由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成的CD39蛋白)生成的AMP降低至少50%、60%、70%、80%或90%。

[0103] 在一个实施例中,CD39中和抗体可表征为能够造成CD39的细胞ATP酶活性降低,任选地造成由CD39表达性细胞生成的AMP降低至少50%、60%、70%、80%或90%。在一个实施例中,CD39中和抗体可表征为由细胞表达的CD39的ATP酶活性的抑制EC₅₀(例如,由CD39表达性细胞生成的AMP的抑制EC₅₀)不超过1 μ g/ml,任选地不超过0.5 μ g/ml,任选地不超过0.2 μ g/ml。

[0104] 抗原结合化合物可以如本文进一步描述产生,且在任何所需阶段评估其通过可溶性CD39蛋白和任选地进一步通过CD39表达性细胞抑制CD39的酶活性的能力,尤其阻断sCD39的ATP酶活性的能力和减小ADP和AMP(且连同CD73、腺苷)的产生的能力,且继而恢复淋巴细胞活化和/或增殖的活性的能力和/或缓解腺苷介导的抑制淋巴细胞活化和/或增殖的能力。

[0105] 可例如在检测ATP的消失(水解)和/或AMP的生成的测定中评估抗体的抑制性活性(例如,免疫增强潜力)。

[0106] 可在将测试抗体与可溶性CD39蛋白(例如,具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的CD39蛋白,如实例中1中产生,任选地进一步包括纯化标签或其它功能性或非功能性非CD39衍生氨基酸序列)一起温育后通过检测ATP来测试抗体抑制可溶性重组人类CD39蛋白的能力。参

见例如实例1。简单点说,可在剂量范围的测试抗体与实例1中所描述的可溶性重组人类CD39蛋白在37℃下一起温育1小时的分析中使用Cell Titer Glo™ (Promega) 定量ATP。在添加CTG试剂之前,将20μM ATP添加到培养板在37℃下保持额外30分钟。在暗处5min的较短温育期后使用Enspire™光度计定量发射光。

[0107] 可在将测试抗体与细胞(例如,Ramos细胞、经CD39转染的细胞等)一起温育后通过检测ATP来测试抗体抑制表达CD39蛋白的细胞的能力。参见例如实例1。细胞可在37℃下与测试抗体一起温育1小时。随后在37℃下将细胞与20μM ATP一起温育额外1小时。培养板在400g下离心2min且将细胞上清液转移到荧光微板(白色孔)中。将CTG添加到上清液且在暗处温育5min后使用Enspire™光度计定量发射光。通过比较仅具有ATP(最大发光)的抗体和ATP连同细胞(最小发光)的抗体存在下的发射光确定抗CD39抗体功效。

[0108] 在抗体存在下,ATP水解成AMP的降低和/或ATP的增加和/或AMP生成的降低表明抗体抑制CD39。在一个实施例中,抗体制剂能够造成由细胞表达的CD39多肽的酶活性降低至少60%,优选地抗体造成细胞中CD39多肽的酶活性降低至少70%、80%或90%,如通过在将表达CD39多肽的细胞(例如,Ramos细胞)与测试抗体(例如,如本文中的实例中)一起温育后使用Cell Titer Glo™ (Promega) 检测ATP所评估。在一个实施例中,抗体表征为造成由细胞表达的CD39多肽的酶活性降低的 EC_{50} (例如,如通过检测ATP所评估)不超过通过本文所述的抗CD39抗体(例如I-394、I-395、I-396或I-399)观测到的 EC_{50} ,任选地大于本文所述的抗CD39抗体(例如I-394、I-395、I-396或I-399)的 EC_{50} 的不超过2-对数或1-对数的 EC_{50} 。

[0109] 在一个实施例中,抗体制剂能够造成可溶性重组CD39多肽的酶活性降低至少60%,优选地可溶性重组CD39多肽的酶活性降低至少70%、80%或90%,如通过在将可溶性重组CD39多肽与测试抗体(例如,如实例1中)一起温育后使用Cell Titer Glo™ (Promega) 检测ATP所评估。

[0110] 也可以在间接测定中测量抗体的活性调节免疫细胞(例如,腺苷受体表达表达性免疫细胞;A2A受体表达性细胞)的活性的能力,例如减轻腺苷介导的淋巴细胞活性的抑制作用、或引起淋巴细胞活性的活化。这可以例如使用细胞因子释放测定来解决。在另一实例中,可以在间接测定中评估抗体调节淋巴细胞增殖的能力。

[0111] 在一个实例中,提供一种用于产生或标识能够在本公开的方法中使用的抗CD39抗体或抗原结合结构域(例如,用于治疗CD73阳性癌症,与抑制CD73的酶活性的试剂组合使用)的方法,所述方法包括以下步骤:

[0112] (a) 提供结合人类CD39多肽的多个抗体,

[0113] 使抗体中的每一种接触可溶性细胞外结构域CD39蛋白并且评定其ATP酶活性的中和,且

[0114] (c) 选择引起ATP酶活性的中和达至少70%,任选地80%或任选地90%的步骤(b)的抗体。

[0115] 任选地,所述方法进一步包括以下步骤:

[0116] (d) 评定步骤(c)中选定的抗体增强试剂的活性的能力,所述试剂抑制CD73蛋白的酶活性;和

[0117] (e) 选择步骤(d)的增强试剂的活性的抗体,所述试剂抑制CD73蛋白的酶活性。

[0118] 任选地,步骤(d)包括使步骤(c)中选定的抗体和抑制CD73蛋白的酶活性的试剂接

触细胞,任选地人类T细胞、任选地CD4⁺ T细胞、任选地CD8⁺ T细胞,并且评定细胞的活化和/或增殖。任选地,在ATP(例如,外源添加的ATP)存在下进行测定。

[0119] 任选地,在本文中的任何实施例中,中和抗CD39抗体结合细胞表面(memCD39)处表达的sCD39和CD39两个上存在的抗原决定簇。

[0120] 任选地,在本文中的任一实施例中,中和抗CD39抗体竞争结合于由抗体I-394、I-395、I-396、I-397、I-398或I-399结合的CD39上的表位(例如,与具有I-394、I-395、I-396、I-397、I-398或I-399中的任一个的重链和轻链CDR或可变区的抗体竞争以结合于CD39多肽上的表位)。

[0121] 任选地,在本文中的任一实施例中,中和抗CD39抗体与单克隆抗体I-394、I-395、I-396、I-397、I-398或I-399结合相同的表位和/或竞争以结合于CD39多肽,例如与具有I-394、I-395、I-396、I-397、I-398或I-399的重链和轻链CDR或可变区的抗体竞争以结合于CD39多肽。在一个实施例中,中和抗CD39抗体与分别具有SEQ ID NO:6和7的VH和VL区的抗体结合相同的表位和/或竞争以结合于CD39多肽。

[0122] 任选地,在本文中的任一实施例中,抗CD39抗体结合包括一个、两个或三个选自以下组成的组的氨基酸残基的表位:由I-394、I-395、I-396、I-397、I-398或I-399结合的CD39上的氨基酸残基。

[0123] 任选地,在本文中的任一实施例中,结合分子(例如,抗CD39抗体)包括:可变重链结构域(V_H),其包括如本文中所述的轻链CDR1、2和3;和可变轻链结构域(V_L),其包括如本文所述的重链CDR1、2和3;或氨基酸序列,其中CDR(或重链和/或轻链CDR集合)具有与所述CDR(或所述重链和/或轻链CDR集合)至少60%、70%、80%、85%、90%或95%氨基酸同一性。在本文中的实施例中的任一个的一个方面中,抗体可包括:重链,其包括抗体I-394、I-395、I-396、I-397、I-398或I-399的重链可变区(VH)的三个CDR;和轻链,其包括抗体I-394、I-395、I-396、I-397、I-398或I-399的轻链可变区(VL)的三个CDR。

[0124] 任选地,在本文中的任一实施例中,抗CD39抗体可表征为包括重链,其包括与如本文中所述的重链(例如,SEQ ID NO:52的重链)至少60%、70%、80%、85%、90%或95%氨基酸同一性的氨基酸序列;和轻链,其包括与如本文中所述的轻链(例如,SEQ ID NO:53的轻链)至少60%、70%、80%、85%、90%或95%氨基酸同一性的氨基酸序列。

[0125] 任选地,在本文中的任一实施例中,抗CD39抗体可表征为本文公开的抗体中的任一个的功能保守性变体。“功能保守性变体”是其中蛋白质或酶中的给定氨基酸残基已改变但未改变多肽的整体构形和功能的那些变体,包含(但不限于)以具有类似性质(例如极性、氢键结潜能、酸性、碱性、疏水性、芳香族等)的氨基酸替代氨基酸。除表明为保守性的氨基酸以外的氨基酸的蛋白质可不同,使得类似功能的任何两种蛋白质之间的蛋白质或氨基酸序列类似性百分比可变化且可以是(例如)70%到99%,如根据对准流程,如通过团簇方法确定,其中类似性是基于MEGALIGN算法。“功能保守性变体”还包含具有如通过BLAST或FASTA算法确定的至少60%氨基酸同一性,优选地至少75%,更优选地至少85%,另外优选地至少90%,并且甚至更优选地至少95%,并且与和其进行比较的天然或亲体蛋白质具有相同或实质上类似的性质或功能的多肽。

[0126] 任选地,在本文中的任一实施例中,抗CD39抗体包括经修饰(与相同同种型的野生型Fc结构域相比)以减小Fc结构域与人类CD16A、CD16B、CD32A、CD32B和/或CD64多肽之间的

结合的人类Fc结构域,任选地其中抗体包括:(i)重链,其包括SEQ ID NO:6的重链可变区的CDR 1、2和3;和(ii)轻链,其包括SEQ ID NO:7的轻链可变区的CDR 1、2和3。在一个方面中,Fc结构域经修饰(与相同同种型的野生型Fc结构域相比)以减小Fc结构域与人类C1q多肽之间的结合。在一个实施例中,抗体在重链恒定区中的任何一个、二个、三个、四个、五个或更多个残基处包括氨基酸取代,所述残基选自以下组成的组:220、226、229、233、234、235、236、237、238、243、264、268、297、298、299、309、310、318、320、322、327、330和331(Kabat EU编号)。在一个实施例中,抗体在重链恒定区中的任何三个、四个、五个或更多个残基处具有氨基酸取代,所述残基选自以下组成的组:234、235、237、322、330和331。在一个实施例中,抗体包括Fc结构域,其包括SEQ ID NO:59-62中的任一个的氨基酸序列。

[0127] 在一个实施例中,抗体包括重链恒定区,其包括以下氨基酸序列,或与其至少90%、95%或99%相同但保留Kabat位置234、235和331(带下划线的)处的氨基酸残基的氨基酸序列:

[0128] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:59)。

[0129] 在一个实施例中,抗体包括重链恒定区,其包括以下氨基酸序列,或与其至少90%、95%或99%相同但保留Kabat位置234、235和331(带下划线的)处的氨基酸残基的氨基酸序列:

[0130] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:60)。

[0131] 在一个实施例中,抗体包括重链恒定区,其包括以下氨基酸序列,或与其至少90%、95%或99%相同但保留Kabat位置234、235、237、330和331(带下划线的)处的氨基酸残基的氨基酸序列:

[0132] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:61)。

[0133] 在一个实施例中,抗体包括重链恒定区,其包括以下氨基酸序列,或与其至少90%、95%或99%相同但保留Kabat位置234、235、237和331(带下划线的)处的氨基酸残基的氨基酸序列:

[0134] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTIS

KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:62)。

[0135] 在一个方面中,抗CD39抗体与抗体I-394、I-395、I-396、I-397、I-398或I-399结合相同的表位。在一个实施例中,抗体结合于CD39的表位,其至少部分地与抗体I-394、I-395、I-396、I-397、I-398或I-399结合的表位重叠或包含其中的至少一个残基。可将抗体结合的残基指定存在于CD39多肽的表面上,例如细胞表面上表达的CD39多肽中。

[0136] 可测量抗CD39抗体与用CD39突变体转染的细胞的结合且将其与抗CD39抗体结合野生型CD39多肽(例如,SEQ ID NO:2)的能力相比。抗CD39抗体与突变体CD39多肽(例如,表1的突变体)之间的结合降低意味着结合亲和力降低(例如,如通过已知方法,如表达特定突变体的细胞的FACS测试,或通过结合突变体多肽的Biacore测试所测量)和/或抗CD39抗体的总结合能力的降低(例如,如通过抗CD39抗体浓度对比多肽浓度的曲线图中Bmax的降低所证明)。结合的显著降低表明,当抗CD39抗体结合CD39时,突变残基直接参与结合抗CD39抗体或与结合蛋白紧密接近。

[0137] 在一些实施例中,结合的显著降低意味着相对于抗体与野生型CD39多肽之间的结合,抗CD39抗体与突变体CD39多肽之间的结合亲和力和/或能力降低大于40%、大于50%、大于55%、大于60%、大于65%、大于70%、大于75%、大于80%、大于85%、大于90%或大于95%。在某些实施例中,结合降低到可检测限度以下。在一些实施例中,当抗CD39抗体与突变体CD39多肽的结合小于抗CD39抗体与野生型CD39多肽之间观察到的结合的50%(例如,小于45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%或10%)时,证明结合显著降低。

[0138] 在一些实施例中,抗CD39抗体对突变体CD39多肽显示出显著更低的结合,其中包括抗体I-394、I-395、I-396、I-397、I-398或I-399所结合的氨基酸残基的区段中的残基被不同氨基酸取代。

[0139] 在一些实施例中,提供结合抗体I-394、I-395、I-396、I-397、I-398或I-399所结合的CD39上的表位的抗CD39抗体(例如,除I-394之外)。

[0140] 在一个方面中,抗体结合CD39上的表位,其包括选自以下组成的组的氨基酸残基(例如,残基中的一个、两个或三个):R138、M139和E142(参考SEQ ID NO:2)。

[0141] 在一个方面中,抗CD39抗体展现了与CD39多肽的结合降低(例如,实质上完全丧失结合),与野生型CD39多肽(SEQ ID NO:2的CD39多肽)相比,所述CD39多肽在选自以下组成的组的残基中的一个、两个或三个处具有突变:R138、M139和E142(参考SEQ ID NO:2),任选地,突变体CD39多肽具有突变:R138A、M139A和E142K。在一个任选的方面中,抗体并未丧失结合于表1的除突变体19以外的突变体CD39多肽中的任一个。在另一任选的方面中,抗CD39抗体展现了与CD39多肽的结合降低(任选地降低但实质上未完全丧失结合;或任选地实质上完全丧失结合),与野生型CD39多肽(SEQ ID NO:2的CD39多肽)相比,所述CD39多肽在选自以下组成的组的残基中的一个、两个、三个或四个处具有突变:Q96、N99、E143和R147(参考SEQ ID NO:2),任选地,突变体CD39多肽具有突变:Q96A、N99A、E143A和R147E。

[0142] 在一个方面中,抗体结合CD39上的表位,其包括选自以下组成的组的氨基酸残基(例如,残基中的一个、两个、三个或四个):Q96、N99、E143和R147(参考SEQ ID NO:2)。在一个方面中,在每一种情况下,相对于抗体与包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列的野生型CD39多肽之间的结合,抗体与突变体CD39多肽的结合降低(例如,实质上完全丧失结合),所述突变

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

[0143] 在一个方面中,抗体结合CD39上的表位,其包括(a)选自以下组成的组的氨基酸残基(例如,残基中的一个、两个或三个):R138、M139和E142(参考SEQ ID NO:2);和(b)选自以下组成的组的氨基酸残基(例如,残基中的一个、两个、三个或四个):Q96、N99、E143和R147。

[0144] 在一个方面中,在每一中情况下,与野生型CD39多肽(SEQ ID NO:2的CD39多肽)相比,抗CD39抗体展现对(a)和(b)两个的结合降低(例如,实质上完全丧失):所述(a)CD39多肽在选自以下组成的组的残基中的一个、两个、三个或四个处具有突变:Q96、N99、E143和R147(参考SEQ ID NO:2);和所述(b)CD39多肽在选自以下组成的组的残基中的一个、两个或三个处具有突变:R138、M139和E142(参考SEQ ID NO:2)。任选地,(a)的突变体CD39多肽具有突变:Q96A、N99A、E143A和R147E。任选地,(b)的突变体CD39多肽具有突变:R138A、M139A和E142K。任选地,抗体并未丧失结合于表1的除突变体5和19以外的突变体CD39多肽中的任一个。

[0145] 在一个方面中,抗体结合CD39上的表位,其包括选自以下组成的组的氨基酸残基(例如,残基中的一个、两个、三个或四个):K87、E100和D107(参考SEQ ID NO:2)。

[0146] 在一个方面中,抗CD39抗体展现了与CD39多肽的结合降低(例如,实质上完全丧失结合),与野生型CD39多肽(SEQ ID NO:2的CD39多肽)相比,所述CD39多肽在选自以下组成的组的残基中的一个、两个、三个或四个处具有突变:K87、E100和D107(参考SEQ ID NO:2),任选地,突变体CD39多肽具有突变:K87A、E100A和D107A。任选地,抗体并未丧失结合于表1的除突变体15以外的突变体CD39多肽中的任一个。

[0147] 在一个方面中,抗体结合CD39上的表位,其包括选自以下组成的组的氨基酸残基(例如,残基中的一个、两个、三个或四个):N371、L372、E375、K376和V377(参考SEQ ID NO:2)。

[0148] 在一个方面中,抗CD39抗体展现了与CD39多肽的结合降低(例如,实质上完全丧失),与野生型CD39多肽(SEQ ID NO:2的CD39多肽)相比,所述CD39多肽在选自以下组成的组的残基中的一个、两个、三个、四个或五个处具有突变:N371、L372、E375、K376和V377(参考SEQ ID NO:2),任选地,突变体CD39多肽具有突变:N371K、L372K、E375A、K376G和V377S,以及残基376与377之间的缬氨酸插入。任选地,抗体并未丧失结合于表1的除突变体11以外的突变体CD39多肽中的任一个。

[0149] 抗CD39抗体可以例如包括I-394的:HCDR1,其包括氨基酸序列:DYNMH(SEQ ID NO:8),或其至少4个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;HCDR2,其包括氨基酸序列:YIVPLNGGSTFNQKFKG(SEQ ID NO:9),或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;HCDR3,其包括氨基酸序列:GGTRFAY(SEQ ID NO:10),或其至少4个、5个或6个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;LCDR1,其包括氨基酸序列:RASESVDNFGVSFMY(SEQ ID NO:11),或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;LCDR2区,其包括氨基酸序列:GASNQGS(SEQ ID NO:12),或其至少4个、5个或6个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的

一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代；和/或LCDR3区，其包括氨基酸序列：QQTKVEPYT (SEQ ID NO:13)，或其至少4个、5个、6个、7个或8个连续氨基酸的序列，任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以缺失或被不同的氨基酸取代。CDR位置可以根据Kabat编号。

[0150] 抑制人类sCD39蛋白的酶活性的抗体的示范性抗CD39 VH和VL对是抗体I-394的VH和VL对，以下列出了其重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:6)，且以下列出了其轻链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:7)。根据Kabat编号的CDR在SEQ ID NO:6和7中带下划线。任选地，VH和VL包括 (例如，经修饰以并入) 人类受体框架。在一个实施例中，本公开的抗CD39抗体包括具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区的VH CDR1、CDR2和/或CDR3 (例如，根据Kabat编号)。在一个实施例中，本公开的抗CD39抗体包括具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链可变区的VL CDR1、CDR2和/或CDR3 (例如，根据Kabat编号)。

[0151] I-394VH:

[0152] EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYNMHVVKQSHGRTLEWIGYIVPLNGGSTFNQKFKGRA TLTVNTSSRTAYMELRSLTSEDSAAYYCARGGTRFAYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO:6)。

[0153] I-394VL:

[0154] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNFGVSFMYWFQQKPGQPPNLLIYGASNQGSQGVPARFRG SSGSGTDFSLNIHPMEADDTAMYFCQQTKVEPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:7)。

[0155] 根据本公开的另一示范性抗CD39 VH和VL对是抗体I-395的VH和VL对，以下列出了其重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:14)，并且以下列出了其轻链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:15)。根据Kabat编号的CDR在SEQ ID NO:14和15中带下划线。任选地，VH和VL包括 (例如，被修饰以并入) 人类受体框架。在一个实施例中，本公开的抗CD39抗体包括具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链可变区的VH CDR1、CDR2和/或CDR3 (例如，根据Kabat编号)。在一个实施例中，本公开的抗CD39抗体包括具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的轻链可变区的VL CDR1、CDR2和/或CDR3 (例如，根据Kabat编号)。

[0156] I-395VH:

[0157] EVQLQQSGPELVKPGASVRMSCKASGYTFTDYNMHVVKKNHGKGLEWIGYINPNNGGTTYNQKFKGKAT LTVNTSSKTAYMELRSLTSEDSAVYYCTRGGTRFASWGQGLVTVSA

[0158] (SEQ ID NO:14)。

[0159] I-395VL:

[0160] NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMYWFQQKPGQPPKLLIYAASTQGSGVPARFSGS GSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPFTFGSGTKLEIK

[0161] (SEQ ID NO:15)。

[0162] 抗CD39抗体可以例如包括：I-395的HCDR1，其包括氨基酸序列：DYNMH (SEQ ID NO:16)，或其至少4个连续氨基酸的序列，任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代；I-395的HCDR2，其包括氨基酸序列：YINPNNGGTTYNQKFKG (SEQ ID NO:17)，或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列，任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代；I-395的HCDR3，其包括氨基酸序列：GGTRFAS (SEQ ID NO:18)，或其至少4个、5个、6个连续氨基酸的序列，任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代；I-395的LCDR1，其包括氨基酸序列：

RASESVDNYGISFMY (SEQ ID NO:19), 或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列, 任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代; I-395的LCDR2区, 其包括氨基酸序列: AASTQGS (SEQ ID NO:20), 或其至少4个、5个或6个连续氨基酸的序列, 任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代; 和/或I-395的LCDR3区, 其包括氨基酸序列: QQSKEVPFT (SEQ ID NO:21), 或其至少4个、5个、6个、7个或8个连续氨基酸的序列, 任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以缺失或被不同的氨基酸取代。CDR位置可以根据Kabat编号。

[0163] 根据本公开的另一示范性抗CD39 VH和VL对是抗体I-396的VH和VL对, 以下列出了其重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:22), 并且以下列出了其轻链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:23)。根据Kabat编号的CDR在SEQ ID NO:22和23中带下划线。任选地, VH和VL包括 (例如, 被修饰以并入) 人类受体框架。在一个实施例中, 本公开的抗CD39抗体包括具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的重链可变区的VH CDR1、CDR2和/或CDR3 (例如, 根据Kabat编号)。在一个实施例中, 本公开的抗CD39抗体包括具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的轻链可变区的VL CDR1、CDR2和/或CDR3 (例如, 根据Kabat编号)。

[0164] I-396VH:

[0165] EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCLVSGFNKDTYINWVKRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQ GKAT
MTSDTSSNTAYLHLSSTSDSSAVYYCARWGYDDEEADYFDSWGQGTTTLTVSS

[0166] (SEQ ID NO:22)。

[0167] I-396VL:

[0168] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYAASNQSGV PARFSGS
GSGTDFSLNILPMEEVDAA MYFCHQSKEVPWTFGGGTKLEIK

[0169] (SEQ ID NO:23)。

[0170] 抗CD39抗体可以例如包括I-396的: HCDR1, 其包括氨基酸序列: DTYIN (SEQ ID NO:24), 或其至少4个连续氨基酸的序列, 任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代; HCDR2, 其包括氨基酸序列: RIDPANGNTKYDPKFQG (SEQ ID NO:25), 或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列, 任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代; HCDR3, 其包括氨基酸序列: WGYDDEEADYFDS (SEQ ID NO:26), 或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列, 任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代; LCDR1, 其包括氨基酸序列: RASESVDNYGISFMN (SEQ ID NO:27), 或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列, 任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代; LCDR2区, 其包括氨基酸序列: AASNQGS (SEQ ID NO:28), 或其至少4个、5个或6个连续氨基酸的序列, 任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代; 和/或LCDR3区, 其包括氨基酸序列: HQSKEVPWT (SEQ ID NO:29), 或其至少4个、5个、6个、7个或8个连续氨基酸的序列, 任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以缺失或被不同的氨基酸取代。CDR位置可以根据Kabat编号。

[0171] 根据本公开的另一示范性抗CD39 VH和VL对是抗体I-399的VH和VL对, 以下列出了其重链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:30), 并且以下列出了其轻链可变区的氨基酸序列 (SEQ ID NO:31)。根据Kabat编号的CDR在SEQ ID NO:30和31中带下划线。任选地, VH和VL包

括(例如,经修饰以并入)人类受体框架。在一个实施例中,本公开的抗CD39抗体包括具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的重链可变区的VH CDR1、CDR2和/或CDR3(例如,根据Kabat编号)。在一个实施例中,本公开的抗CD39抗体包括具有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的轻链可变区的VL CDR1、CDR2和/或CDR3(例如,根据Kabat编号)。

[0172] I-399VH:

[0173] PVQLQQPGAEEVMPGASVKLSCKASGYTFTSFWMNWMRQPGQGLEWIGEIDPSDFYTNSNQRFK GKAT
LTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGDFGWYFDVWGTGTSVTSS

[0174] (SEQ ID NO:30)。

[0175] I-399VL:

[0176] EIVLTQSPTTMTSSPGEKITFTCSASSSINSNYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNLASGVPTFRSGSGSG
TSYSLTIGTMEAEDVATYYCQQGSSLPRTFGGGTKLEIK

[0177] (SEQ ID NO:31)。

[0178] 抗CD39抗体可以例如包括I-399的:HC DR1,其包括氨基酸序列:SFWMN(SEQ ID NO:32),或其至少4个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;HC DR2,其包括氨基酸序列:EIDPSDFYTNSNQRFKG(SEQ ID NO:33),或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;HC DR3,其包括氨基酸序列:GDFGWYFDV(SEQ ID NO:34),或其至少4个、5个或6个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;LC DR1,其包括氨基酸序列:SASSSINSNYLH(SEQ ID NO:35),或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;LC DR2区,其包括氨基酸序列:RTSNLAS(SEQ ID NO:36),或其至少4个、5个或6个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;和/或LC DR3区,其包括氨基酸序列:QQGSSLPRT(SEQ ID NO:37),或其至少4个、5个、6个、7个或8个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以缺失或被不同的氨基酸取代。CDR位置可以根据Kabat编号。

[0179] 在I-394、I-395、I-396和I-399抗体中的任一个中,HC DR1、2、3和LC DR1、2、3序列(每个CDR独立地,或所有CDR)可以被指定为Kabat编号系统中的那些(如通过下划线在VH和VL序列中所表明)、Chothia编号系统中的那些、或IMGT编号系统中的那些、或任何其它合适的编号系统。

[0180] 在任何方面中,指定的可变区,FR和/或CDR序列可以包括一个或多个序列修饰,例如取代(1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多个序列修饰)。在一个实施例中,取代是保守修饰。

[0181] 在另一方面中,抗CD39化合物包括VH结构域,其与本文公开的抗体的VH结构域具有至少约60%、70%或80%的序列同一性,任选地至少约85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性。另一方面,抗CD39抗体包括VL结构域,其与本文公开的抗体的VL结构域具有至少约60%、70%或80%的序列同一性,任选地至少约85%、90%、95%、97%、98%或99%的同一性。

[0182] 抑制CD73的试剂

[0183] 抑制或中和CD73酶的胞外-5'-核苷酸酶活性可有利地影响使用结合CD73且抑制CD73酶的胞外-5'-核苷酸酶活性的试剂(例如,小分子有机化合物、抗体、融合到Fc结构域的多肽、免疫粘附素等)。

[0184] CD73二聚体的每一亚基由以下组成:两个结构性结构域:N末端结构域(残基27-317,参考Knapp等人(2012)编号)和C末端结构域(残基337-549),其中CD73的较大N末端结构域含有金属离子结合位点且具有四层化a/b-b-b-a结构,其包含两个包夹的混合b片。C末端结构域含有底物结合位点和二聚合界面,且具有组合物的四层状结构a/b-b-a-b。两个结构域通过包括较小铰链区的单个螺旋线(残基318-336)连接,其使得酶能够经历较大结构域运动且进而在开放式构形与密闭式构形之间切换。密闭式构形中观测到的活性位点位于N末端结构域与C末端结构域之间的界面处且由两个结构域的残基形成。参见例如Knapp等人(2012)《结构20(Structure 20)》,2161-2173,其公开内容通过引用并入本文中。

[0185] 所属领域中已知用以通过不同作用机制来抑制CD73的胞外-5'核苷酸酶活性的多种不同CD73结合剂。小分子试剂(如嘌呤)和ADP类似物(如不可水解ADP类似物APCP)(腺苷5'-[α , β -亚甲基]二磷酸盐)充当ADP的竞争性抑制剂(例如,通过结合CD73的ADP结合位点)。其它试剂(包含抗体和小分子试剂两种)可充当非竞争性抑制剂。举例来说,已报道了抗体(如BMS-986179)通过诱导CD73的细胞内内化来抑制CD73的酶活性(参见例如PCT公开第W02016/081748号)。在其它实例中,小分子和/或抗体试剂两种可例如通过在导致损害酶活性所需的结构域运动的位点处结合CD73来充当立体异位抑制剂。举例来说,计算生物学准许设计组合固定架构(如五或六元芳环)的呈可靶向CD73的二聚合界面的基于三分支链分子的小分子,进而非竞争性地抑制CD73(参见Rahimova等人(2018)《PLOS演算生物学(PLOS Computational Biology)》;<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005943>)并且报道了2-烷氧基-3-(磺酰基芳基氨基亚甲基)- \square 克烷-4-酮衍生物作为非竞争性抑制剂(参见Al-Rashida和Iqbal(2014)《医学研究综述(Med Res Rev)》34:703-743)。抗体MEDI9447(奥勒单抗(oleclumab);也参见PCT公开第W02016/075099号)在空间上阻断CD73且防止CD73采用催化活性构形(参见Geoghegan等人(2016)mAbs 8:454-467)。也已报道了充当细胞膜结合CD73的非竞争性抑制剂(且不依赖内化)且另外抑制可溶性CD73的酶活性的抗体可另外任选地进一步抑制可溶性CD73多肽且不依赖内化(参见PCT公开第W02016/055609号)。其它试剂可包含基于核酸(例如RNA)的CD73表达抑制剂。

[0186] 据报道抑制CD73的酶活性的抗体试剂的实例公开于PCT公开第W02016/055609号;第W02016/131950号;第W02017/064043号;第W02017/100670号;第W02016/075099号和第W02016/081748号中,其公开内容通过引用并入本文中。据报道抑制CD73的酶活性的小分子有机化合物的实例公开于PCT公开第W02015/049447号和第W02015/164573号(嘌呤衍生物);第W02018094148号;第W02017/120508号;第W02017/153952号和第W02017/098421号中,其公开内容通过引用并入本文中。

[0187] 抗体优选地结合在细胞(包含肿瘤细胞)表面上表达的CD73上存在的表位,且抑制CD73酶(例如,在细胞表面处表达的膜结合CD73蛋白)的酶(胞外-5'核苷酸酶)活性。在一个实施例中,这些抗体可用作纯CD73阻断抗体,例如其抑制在细胞表面处表达的膜结合CD73蛋白的酶活性而不实质上结合Fc γ 受体和/或不实质上将ADCC朝向CD73表达性细胞引导。

任选地,抗体保持Fc结构域且保持结合于人类FcRn。任选地,抗体包括经修饰Fc结构域,例如以降低蛋白酶敏感性(例如,针对肿瘤环境中的蛋白酶(如MMP))和/或降低结合于人类Fc γ 受体(例如,CD16)。

[0188] 任选地,将抗体以有效抑制CD73的酶活性的量施用所需时段,例如1周、2周、一个月直到下一次后续施用抗CD73抗体。

[0189] 抗CD73抗体的实例提供于PCT公开第W02017/064043号;第W02017/100670号;第W02016/075099号和第W02016/081748号中。

[0190] 在一个实例中,根据本公开使用的抗CD73抗体通过引起或诱导细胞表面表达的CD73的细胞内内化,或更一般来说下调细胞表面表达的CD73来中和CD73的酶活性。抗体BMS-986179(PCT公开第W02016/081748号)是这类抗体的实例;抗体通过结合于CD73上的构象表位起作用;其中抗体结合于包含人类CD73(参考SEQ ID NO:1)的区段65-83和157-172中的氨基酸残基的位点。

[0191] 在一个方面中,抗CD73抗体可结合CD73上的表位,其不仅在不结合于底物时存在于呈“开放性”构形的CD73上且还在结合于底物(例如,天然底物(如AMP)或结合活性位点的抑制剂或其它化合物(如AMP类似物腺苷5'- $(\alpha,\beta$ -亚甲基)二磷酸盐(APCP)))时存在于呈“密闭式”构形的CD73上。在一个方面中,抗CD73抗体并未与CD73的底物竞争以结合于CD73多肽。CD73的底物的实例包含例如天然底物(如AMP)或结合活性位点的抑制剂或其它化合物(如AMP类似物腺苷5'- $(\alpha,\beta$ -亚甲基)二磷酸盐(APCP))。

[0192] 在一个实施例中,这些抗体并未抑制呈可溶性重组CD73蛋白状的CD73的酶活性,例如当抗体呈其不能够形成寡聚物的设定/构形时,例如当将所述抗体以实质上摩尔过量(例如,至少10倍、20倍、100倍等)提供到CD73多肽二聚体时,抗体不能够抑制可溶性人类二聚CD73多肽的酶活性。举例来说,当抗体呈不能够形成寡聚物的设定/构形形式时,通过导致CD73(例如,BMS-986179)的细胞内内化抑制CD73的抗体或经设计以抑制膜结合CD73但不一定抑制可溶性CD73的抗体(例如,奥勒单抗和/或人类化1E9抗体)可能不能够抑制可溶性人类二聚CD73多肽的酶活性。由于残余CD73酶活性可导致足够的腺苷生成以介导免疫抑制效果,因此为介导治疗效果,较高的抗体介导的酶阻断量是有利的。利用抑制sCD39的抗体的组合的本文中的治疗方法及组合物可以特别适用于增强这类抗体的活性。

[0193] 在一个实施例中,抗CD73抗体是MEDI9447(奥勒单抗;参见PCT公开第W02016/075099号)或与其共享CD73上的共同决定簇或表位位点的抗体。在一个实施例中,治疗性抗CD73抗体是BMS-986179(参见PCT公开第W02016/081748号)或与其共享CD73上的共同决定簇或表位位点的抗体。在一个实施例中,治疗性抗CD73抗体是人类化1E9(参见PCT公开第W02017/100670号)或与其共享CD73上的共同决定簇或表位位点的抗体。

[0194] 在一个实例中,根据本公开使用的抗CD73抗体并未导致细胞表面表达的CD73的细胞内内化或更通常来说下调细胞表面表达的CD73和/或并未取决于其CD73中和活性。这类抗体的实例描述于PCT公开第W02016/075099号(例如,抗体MEDI9447、奥勒单抗)、第W02016/055609号(例如,抗体11E1、6E1、3C12和8C7)和W02016/131950。奥勒单抗在氨基酸区段158-171和206-211中的残基,例如残基V170 K206和N211处结合于CD73(参考SEQ ID NO:1)。抗体11E1、6E1、3C12和8C7丧失结合于在残基K136处具有取代的CD73突变体(参考SEQ ID NO:1的CD73多肽)。抗体11E1、6E1、3C12和8C7还丧失结合于在残基A99、E129、K133、

E134和A135处具有取代的突变体(参考SEQ ID NO:1的CD73多肽),以及在残基K97、E125、Q153和K330处具有取代的突变体(参考SEQ ID NO:1的CD73多肽)。

[0195] 根据本公开使用的抗CD73抗体可任选地抑制呈可溶性重组CD73蛋白状的CD73的酶活性(例如,当抗体呈不能够形成寡聚物的设定/构形时,例如当将抗体以实质上摩尔过量(例如,至少10倍、20倍、100倍等)提供到CD73多肽二聚体时,抗体能够抑制可溶性人类二聚CD73多肽的酶活性)。抗体11E1、6E1、3C12和8C7是这类抗体的实例。使用可用于标识这类CD73功能阻断抗体的可溶性CD73的测定提供于PCT公开第W02016/055609号和第W02016/131950号中。这类抗体在与抑制sCD39的抗体组合使用时可提供最高的抑制腺苷生成和/或免疫抑制程度。

[0196] 因此,抗体可以是CD73多肽的立体异位抑制剂,例如抗体结合细胞(包含但不限于肿瘤细胞)表面处表达的人类CD73多肽,且抑制CD73多肽的酶(胞外-5'核苷酸酶)活性,且干扰CD73多肽的底物结合CD73多肽的能力。

[0197] 本文中描述的示范性抗体结合于CD73上的表位,当CD73以CD73二聚体形式存在时,所述表位存在于相同面上,例如潜在地允许抗体双价结合于一个CD73二聚体,尤其在结合位点进一步分开的“密闭式”位置中。鉴于结合于配体结合的CD73,当结合于AMP时,本文中所述的抗体可适用于结合于CD73,例如在治疗之前上游ADP和/或AMP以显著量存在的肿瘤环境中)。肿瘤微环境可表征为任何适合的参数,例如较高ADP含量(例如,由染色细胞生产),由基质和细胞浸润(例如,TReg细胞)上的CD39占据以产生较高AMP含量,以及更一般来说表征为AMP、腺苷,CD39表达或CD39表达性细胞的存在或含量,CD73表达或CD73表达性细胞的存在或含量,腺苷受体表达或腺苷受体表达性细胞的存在或含量。因此,肿瘤环境中的CD73分子可呈底物结合的构形形式且结合并抑制除了非底物结合CD73之外的底物结合细胞CD73(例如,与如AMP的底物一起预温育的表达CD73的细胞)的能力可提供体内抑制CD73的更大能力。任选地,可在治疗之前在肿瘤环境中评估ADP或AMP(和/或ATP或腺苷)的含量。抗体可特别有利于治疗在肿瘤样品中具有显著量(例如,较高量,与参考物相比)的ADP、AMP、ATP或腺苷的个体。

[0198] 示范性抗体可结合在细胞表面处表达且抑制CD73多肽的酶(胞外-5'核苷酸酶)活性的人类CD73多肽,其中抗体能够双价结合于单个CD73多肽二聚体(可溶性CD73多肽二聚体或通过细胞表达的CD73多肽二聚体)。任选地,抗体通过第一抗原结合结构域结合于二聚体内的第一CD73多肽且通过第二抗原结合结构域结合于第二CD73多肽。

[0199] 示范性抗体可结合在细胞表面处表达的人类CD73多肽且抑制CD73多肽的酶(胞外-5'核苷酸酶)活性,其中抗体能够结合呈底物结合构形形式的CD73多肽。

[0200] 可根据试剂(CD73结合的化合物、抗CD73抗体)抑制CD73的酶活性,尤其阻断CD73的5'-核苷酸酶活性和降低由CD73表达性细胞产生腺苷且继而恢复淋巴细胞的活性和/或减轻腺苷介导的淋巴细胞抑制的能力来评估并且选择所述试剂。

[0201] 当直接(例如,通过测量底物和产物,即AMP、腺苷和/或磷酸盐)或间接检测到AMP转化成腺苷(和/或其抑制)时,可在无细胞测定中使用重组可溶性人类CD73(呈二聚体状)和AMP测试抗体抑制CD73的酶活性的能力。在一个实例中,在测试化合物与重组CD73一起温育之前和之后通过HPLC检测AMP和/或腺苷。重组CD73描述于例如W02016/055609和W02016/131950中。

[0202] 还可以多个其它方式中的任一种评估抗体的抑制性活性。举例来说,在间接测定中,使用基于荧光素酶的试剂(例如,获自Promega的CellTiter-Glo®系统)检测AMP的消失。通过AMP抑制测定中的荧光素酶反应。将CD73酶添加到反应物中降解了AMP,且减轻抑制,产生可检测信号。

[0203] 使用可溶性CD73的测定可有利地影响在将抗体以实质上摩尔过量(例如,10倍、20倍、50倍、100倍等)提供到CD73多肽二聚体的条件下的测试。当将抗体以摩尔过量提供到酶时,抗CD73抗体将不再能够形成抗体和CD73二聚体的多聚复合物,随后可选择保持抑制CD73的酶活性的抗体。

[0204] 也可在细胞测定(使用表达CD73的细胞)中替代地或另外测试抗体抑制CD73的5'-外核苷酸酶酶活性的能力。有利的是,抗体可首先在无细胞测定中进行测试或筛检以标识阻断酶活性的抗体以降低选择通过导致CD73的内化来抑制CD73的抗体的可能性,且随后在细胞测定中作为经纯化抗体进行测试。可如W02016/055609中所示进行细胞测定。举例来说,在抗CD73抗体存在下将CD73表达性细胞系(例如,MDA-MB-231细胞系)接种于平底96孔板中并且进行温育。将AMP添加到细胞中且在4℃下进行温育(以避免CD73下调)。随后离心培育板且将上清液转移到平底96孔板中。随后定量通过将AMP水解成腺苷产生的游离磷酸盐。在抗体存在下AMP水解成腺苷的降低表明抗体抑制细胞CD73。

[0205] 在一个实施例中,抗体制剂致使CD73多肽的酶活性降低至少50%,优选地CD73多肽(例如,可溶性均二聚CD73多肽;由细胞表达的CD73)的酶活性降低至少60%、70%或80%。

[0206] 还可在间接测定中测量抗体的活性调节淋巴细胞的活性,例如减轻腺苷介导的淋巴细胞活性的抑制或致使淋巴细胞活性活化的能力。这可以例如使用细胞因子释放测定来解决。在另一实例中,可以在间接测定中评估抗体调节淋巴细胞增殖的能力。

[0207] 可以测试抗体内化CD73或诱导CD73下调的能力,例如是否通过内化CD73或诱导CD73从细胞表面脱落。抗CD73抗体是否在结合哺乳动物细胞上的CD73之后内化,或CD73多肽是否经历细胞内内化(例如,在由抗体结合之后)可通过各种测定确定,所述测定包含W02016/055609中描述的那些测定,例如其公开内容通过引用并入本文中。

[0208] 在一个实例中,当抗体呈不能够形成寡聚物的设定/构形式时,例如当将所述抗体以实质上摩尔过量(例如,至少10倍、20倍、100倍等)提供到CD73多肽二聚体时,可根据抑制可溶性人类二聚CD73多肽的酶活性的能力选择所述抗体。当将抗体以实质上摩尔过量提供到CD73多肽二聚体时,通过引起寡聚起作用的抗体无法抑制CD73。此外,抗体结合当CD73在细胞表面处表达时所维持的CD73上的表位。通过使用这一测定,还可标识抗体双价结合于单个CD73二聚体;这类抗体可在CD73表达性细胞中具有改良的体外和体内CD73结合和CD73阻断活性。通过这些方法标识的抗体随后在细胞酶活性测定中使用经纯化抗体进行测试,且发现其中和细胞CD73的酶活性。通过诱导内化抑制CD73或丧失显著结合于细胞CD73的抗体不太有效且不能够中和酶活性,充其量提供仅部分地抑制细胞中的CD73的酶活性。

[0209] 由这些抗体结合的CD73上的表位存在于如通过一系列细胞(例如癌细胞、CD4 T细胞、CD8 T细胞、B细胞、经转染的细胞)表达的CD73多肽上且以如通过流式细胞测量术确定的高亲和力结合。举例来说,抗体可表征为EC₅₀(如通过流式细胞测量术测定),所述EC₅₀与本文所述的抗CD73抗体(例如,抗体6E1)的EC₅₀相当或不超过2-对数,任选地1-对数更大,或

不超过5 μ g/ml、任选地不超过2 μ g/ml、不超过1 μ g/ml、不超过0.5 μ g/ml、不超过0.1 μ g/ml或不超过0.05 μ g/ml,以结合于在其表面处表达CD73多肽的细胞。在一个实施例中,细胞是在其表面处表达CD73的细胞。在一个实施例中,细胞是在其表面处内源性表达CD73的细胞,例如癌细胞、白血病细胞、膀胱癌细胞、神经胶质瘤细胞、成胶质细胞瘤细胞、卵巢癌细胞、黑色素瘤细胞、前列腺癌细胞、甲状腺癌细胞、食道癌细胞或乳癌细胞。

[0210] 在一个实施例中,CD73中和抗体可表征为能够导致细胞的CD73的5'-外核苷酸酶活性降低至少60%、75%或80%。在一个实施例中,CD73中和抗体可表征为抑制由细胞表达的CD73的5'-外核苷酸酶活性的EC₅₀,所述EC₅₀与本文所述的抗体的EC₅₀相当、或不超过本文所述的抗体的EC₅₀,比本文所述的抗CD73抗体(例如,抗体6E1)的EC₅₀大不超过2-对数,任选地1-对数,或不超过1 μ g/ml、任选地不超过0.5 μ g/ml、任选地不超过0.2 μ g/ml。

[0211] 任选地,通过量化AMP水解成腺苷评定MDA-MB-231细胞中的5'外核苷酸酶活性的中和来确定由细胞表达的CD73的5'-外核苷酸酶活性的抑制(参见,例如W02016/055609的实例5)。

[0212] 由本文公开的中和抗体结合的CD73上的表位并未引起细胞上的CD73表达的下调(并且,例如并未导致抗体-CD73复合物的聚集和内化),包含在使用以二价方式结合CD73的全长抗体时。因此,抗CD73抗体在细胞表面处保持与CD73结合。鉴于CD73的宽广组织表达,并未触发CD73下调和/或内化的抗体可在肿瘤微环境中提供改良药理学性质和更大量的抗体。

[0213] 在一个实施例中,提供分离抗体,其特异性结合人类CD73(例如,包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽)且中和溶液中的均二聚人类CD73多肽的5'-外核苷酸酶活性。在一个实施例中,提供结合可溶性人类CD73多肽并抑制其酶活性的抗体,尤其中和CD73介导的AMP分解代谢成腺苷的抗体。在一个实施例中,抗体以二价方式结合CD73。在一个实施例中,抗体是非耗乏性抗体,例如Fc沉默抗体。在一个实施例中,抗体中和溶液中的CD73且不依赖于诱导CD73多肽:抗CD73抗体寡聚物。

[0214] 在一个实施例中,抗体特异性结合细胞表面处的人类CD73且能够中和可溶性人类CD73多肽的5'-外核苷酸酶活性。在一个实施例中,抗体并不诱导可溶性CD73的寡聚。

[0215] 在一个实施例中,抗体特异性结合细胞表面处的人类CD73且能够中和细胞CD73(通过细胞表达的CD73)的5'-外核苷酸酶活性。在一个实施例中,抗体特异性结合细胞表面处的人类CD73且中和其5'-外核苷酸酶活性,并且在结合于CD73之后并不内化到CD73表达性细胞中。抗体并不引起CD73的多聚化和子序列内化。在一个实施例中,抗体结合溶液中的重组人类CD73多肽且能够抑制其酶活性,其中所述抗体并不内化到CD73表达性细胞中。在一个实施例中,非内化抗体以二价方式结合CD73。在一个实施例中,抗体是非耗乏性抗体,例如Fc沉默抗体。抗体能够中和溶液中的二聚人类CD73多肽的5'-外核苷酸酶活性,此外并不依赖于诱导CD73多肽抗CD73抗体的寡聚物。

[0216] 在一个实施例中,抗体特异性地双价结合于人类CD73多肽且抑制细胞人类CD73(和任选地另一重组可溶性人类CD73)的酶活性,其中所述抗体并不内化到CD73表达性细胞中。优选地,抗体实质上缺少Fc γ 受体结合(例如,通过其Fc结构域)。

[0217] 在一个实施例中,抗体特异性地结合于人类CD73多肽且抑制细胞人类CD73(和任选地另一重组可溶性人类CD73)的酶活性,其中所述抗体增大或诱发CD73表达性细胞中的

CD73的细胞内内化。优选地,抗体实质上缺少Fc γ 受体结合(例如,通过其Fc结构域)。

[0218] 在一个方面中,抗体特异性地结合与AMP一起预温育的细胞的表面处的人类CD73且能够中和其5'-外核苷酸酶活性。任选地,通过量化AMP水解成腺苷评定MDA-MB-231细胞中的5'-外核苷酸酶活性的中和来确定中和5'-外核苷酸酶活性(参见,例如W02016/055609的实例5)。

[0219] 任选地,抗CD73抗体可结合于存在于可溶性CD73和在细胞表面处表达的CD73两个上的共同抗原决定簇。

[0220] 任选地,抗CD73抗体结合在CD73呈“开放性”构形时(在CD73活性位点并未经底物(例如AMP、APCP)占据/结合时)存在于其上且在CD73呈“密闭式”构形形式时(当CD73活性位点经底物(例如AMP、APCP)占据/结合时)存在于“密闭式”CD73上的共同抗原决定簇。

[0221] 在一个方面中,抗CD73抗体结合CD73二聚体内的每一CD73多肽链内的抗原决定簇,例如其中抗原决定簇存在于CD73二聚体的共同面上。

[0222] 在一个方面中,抗CD73抗体已降低结合于在区段158-171中的残基处和/或在区段206-211中的残基处具有氨基酸取代的CD73多肽,例如在任何一个或多个残基V170 K206和N211处具有氨基酸取代的CD73多肽(参考SEQ ID NO:1)。

[0223] 在一个方面中,抗CD73抗体已降低结合于在区段65-83中的残基处和/或在区段157-172中的残基处具有氨基酸取代的CD73多肽(参考SEQ ID NO:1)。

[0224] 在一个方面中,抗CD73抗体结合CD73上的表位,其包括残基K136(参考SEQ ID NO:1)。

[0225] 在一个方面中,抗CD73抗体结合CD73上的表位,其包括选自以下组成的组的残基中的一个、两个、三个或四个:K97、E125、Q153和K330(参考SEQ ID NO:1)。

[0226] 在一个方面中,抗CD73抗体结合结合CD73上的表位,其包括选自以下组成的组的残基中的一个、两个、三个、四个或五个:A99、E129、K133、E134和A135(参考SEQ ID NO:1)。

[0227] 在一个方面中,抗CD73抗体至少部分地结合于人类CD73蛋白(例如,CD73均二聚体蛋白)上的氨基酸残基的结构域或区段内,其包括氨基酸残基K97、A99、E125、E129、K133、E134、A135、K136、Q153和K330(参考SEQ ID NO:1)。在一个方面中,抗CD73抗体结合CD73上的表位,其包括选自以下组成的组的残基中的一个、两个、三个、四个或五个或更多个:K97、A99、E125、E129、K133、E134、A135、K136、Q153和K330(参考SEQ ID NO:1)。

[0228] 在一个方面中,抗CD73抗体已降低结合于在残基K136处具有突变的CD73多肽(参考SEQ ID NO:1);任选地,突变体CD73多肽具有突变:K136A。

[0229] 在一个方面中,抗CD73抗体已降低结合于在选自以下组成的组的残基处具有突变的CD73多肽:K97、E125 Q153和K330(参考SEQ ID NO:1),任选地,突变体CD73多肽具有突变:K97A、E125A、Q153A和/或K330A(例如,K97A、E125A和K330A;K97A、E125A和/或Q153A)。

[0230] 在一个方面中,抗CD73抗体已降低结合于在选自以下组成的组的残基处具有突变的CD73多肽:A99、E129、K133、E134和A135(参考SEQ ID NO:1);任选地,突变体CD73多肽具有突变:A99S、E129A、K133A、E134N和A135S。

[0231] 在一个方面中,抗CD73抗体竞争结合于CD73上的表位,所述CD73由奥勒单抗、人类化1E9、BMS-986179、11E1、8C7、3C12和/或6E1结合,(例如,与具有所述抗体的重链和轻链CDR或可变区的抗体竞争结合于CD73多肽上的表位)。

[0232] 在本文中的实施例中的任一个的一个方面中,抗原结合化合物结合相同表位和/或与单克隆抗体11E1、8C7、3C12和/或6E1竞争结合于CD73多肽上的表位(例如,与具有11E1、8C7、3C12或6E1中的任一个的重链和轻链CDR或可变区的抗体竞争结合于CD73多肽)。在一个实施例中,抗原结合化合物与选自以下组成的组的抗体结合相同表位和/或与所述抗体竞争结合于CD73多肽上的表位:

[0233] (a)分别具有SEQ ID NO:3和4(6E1)的VH和VL区的抗体;

[0234] (b)分别具有SEQ ID NO:40和41(11E1)的VH和VL区的抗体;

[0235] (c)分别具有SEQ ID NO:42和43(8C7)的VH和VL区的抗体;和

[0236] (d)分别具有SEQ ID NO:44和45(3C12)的VH和VL区的抗体。

[0237] 在一个实施例中,抗CD73抗体结合包括一个、两个或三个氨基酸残基的表位,所述氨基酸残基选自由11E1、6E1、3C12或8C7结合的CD73上的氨基酸残基组成的组。

[0238] 在本文中的实施例中的任一个的一个方面中,抗体可具有重和/或轻链,所述重和/或轻链具有选自由以下组成的抗体群的抗体的个别重和/或轻链的一个、两个或三个CDR:奥勒单抗、人类化1E9、BMS-986179、11E1、6E1、3C12和8C7。

[0239] 在本文中的实施例中的任一个中,抗CD73抗体可表征为结合于细胞(例如,肿瘤细胞,表达CD73的细胞,例如MDA-MB-231肿瘤细胞系或表达CD73的重组宿主细胞,如W02016/055609中所示)表面上表达的人类CD73多肽,且任选地另外其中抗体以如通过流式细胞测量术测定的高亲和力结合。举例来说,抗体可表征为不超过5 μ g/ml,任选地不超过1 μ g/ml,不超过0.5 μ g/ml,不超过0.1 μ g/ml或不超过0.05 μ g/ml的体外EC₅₀(如通过流式细胞测量术测定),以结合于在其表面处表达CD73多肽的细胞,例如表达CD73的肿瘤细胞、在其表面处表达CD73多肽的细胞、表达CD73的淋巴细胞等。任选地,抗原结合化合物具有不超过1 μ g/ml,任选地不超过0.5 μ g/ml,不超过0.1 μ g/ml或不超过0.05 μ g/ml的体外EC₅₀,以结合于(i)在其表面处表达人类CD73(例如,具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽)的细胞和/或(ii)在其表面处表达人类非人类灵长类CD73(例如,食蟹猴CD73)的细胞。

[0240] 在本文中的实施例中的任一个的一个方面中,抗CD73抗体是包括两条重链和两条轻链的四聚抗体,所述重链包括人类同种型的Fc区且实质上缺失结合于人类Fc γ 受体(例如,CD16A、CD16B、CD32A、CD32B和/或CD64)。在一个方面中,抗CD73抗体包括Fc结构域,其经修饰(与同一同种型的野生型Fc结构域相比)以降低Fc结构域与人类CD16A、CD16B、CD32A、CD32B和/或CD64多肽之间的结合。在一个实施例中,抗体在重链恒定区中的任何一个、二个、三个、四个、五个或更多个残基处包括氨基酸取代,所述残基选自以下组成的组:220、226、229、233、234、235、236、237、238、243、264、268、297、298、299、309、310、318、320、322、327、330和331(Kabat EU编号)。在一个实施例中,抗体在重链恒定区中的任何三个、四个、五个或更多个残基处具有氨基酸取代,所述残基选自以下组成的组:234、235、237、322、330和331。在一个实施例中,抗体包括Fc结构域,其包括SEQ ID NO:59-62中的任一个的氨基酸序列。

[0241] 表A中列出抗体11E1、6E1、3C12和8C7的重链和轻链可变区的氨基酸序列。在一特定实施例中,本公开提供与单克隆抗体11E1、6E1、3C12或8C7结合相同或实质上相同的表位或决定簇的抗体;任选地抗体包括抗体11E1、6E1、3C12或8C7的高变区。在本文中的实施例中的任一个中,抗体11E1可表征为编码其的氨基酸序列和/或核酸序列。在一个实施例中,

单克隆抗体包括11E1、6E1、3C12或8C7的Fab或F(ab')₂部分。还提供单克隆抗体,其包括11E1、6E1、3C12或8C7的重链可变区。根据一个实施例,单克隆抗体包括11E1、6E1、3C12或8C7的重链可变区的三个CDR(例如,根据Kabat、Chothia或IGMT编号)。还提供单克隆抗体,其进一步包括11E1、6E1、3C12或8C7的可变轻链可变区或11E1、6E1、3C12或8C7的轻链可变区的CDR中的一个、两个或三个(例如,根据Kabat、Chothia或IGMT编号)。任选地,所述轻链或重链CDR中的任何一个或多个可含有一个、两个、三个、四个或五个或更多个氨基酸修饰(例如,取代、插入或缺失)。任选地,提供一种抗体,其中包括抗体11E1、6E1、3C12或8C7的抗原结合区的部分或全部的轻和/或重链可变区中的任一个融合到人类IgG类型的免疫球蛋白恒定区,任选地人类恒定区,任选地人类IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型。在一个实施例中,人类恒定区任选地进一步包括氨基酸取代以降低效应子功能(结合于人类Fc γ 受体)。在一个实施例中,人类恒定区(任选地铰链区)任选地进一步包括氨基酸取代以增加或诱导CD73的细胞内内化。

[0242] 抗CD73抗体可以例如包括:6E1的HCDR1,其包括氨基酸序列:SYNMY (SEQ ID NO: 46),或其至少4个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;6E1的HCDR2,其包括氨基酸序列:YIDPYNGGSSYNQKFKG (SEQ ID NO: 47),或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;6E1的HCDR3,其包括氨基酸序列:GYNNYKAWFAY (SEQ ID NO: 48),或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;6E1的LCDR1,其包括氨基酸序列:KASQSVTNDVA (SEQ ID NO: 49),或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;6E1的LCDR2,其包括氨基酸序列:YASNRYT (SEQ ID NO: 50),或其至少4个、5个或6个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以被不同的氨基酸取代;和/或6E1的LCDR3,其包括氨基酸序列:QQDYSSLT (SEQ ID NO: 51),或其至少4个、5个、6个、7个或8个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个氨基酸可以缺失或被不同的氨基酸取代。CDR位置可以根据Kabat编号。

[0243] 在本文中的实施例中的任一个的另一方面中,重链和轻链的CDR 1、2和/或3中的任一个可表征为其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列和/或具有与对应SEQ ID NO中所列出的特定CDR或CDR集合共享至少50%、60%、70%、80%、85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。

[0244] 在抗体(例如11E1、8C7、3C12或6E1)中的任一个中,具体可变区和CDR序列可以包括序列修饰,例如取代(1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多个序列修饰)。在一个实施例中,重链和轻链的CDR 1、2和/或3包括一个、两个、三个或更多个氨基酸取代,其中经取代的残基是存在于人类来源序列中的残基。在一个实施例中,取代是保守修饰。保守序列修饰是指并未显著地影响或改变含有氨基酸序列的抗体的结合特征的氨基酸修饰。这类保守性修饰包含氨基酸取代、添加和缺失。可通过所属领域中已知的标准技术,如定点突变诱发和PCR介导的突变诱发将修饰引入到抗体中。保守氨基酸取代通常是其中氨基酸残基经具有带类似物理化学性质的侧链的氨基酸残基置换的氨基酸取代。具体可变区和CDR序列可以包括一个、两个、三个、四个或更多个氨基酸插入、缺失或取代。当进行取代时,优选的取

代将是保守修饰。所属领域中已经界定了具有类似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包含具有以下侧链的氨基酸：碱性侧链（例如，赖氨酸、精氨酸、组氨酸）、酸性侧链（例如，天冬氨酸、谷氨酸）、不带电极性侧链（例如，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸）、非极性侧链（例如，丙氨酸、缬氨酸、白氨酸、异白氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸）、 β -分支链侧链（例如，苏氨酸、缬氨酸、异白氨酸）和芳族侧链（例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）。因此，抗体的CDR区内的一个或多个氨基酸残基可以经来自相同侧链家族的其它氨基酸残基置换且可使用本文中所述的测定测试所改变抗体的保留功能（即，本文中阐述的性质）。

[0245] 下表A中列出抗体的可变区的序列（如果存在前导子序列，那么可规定任一抗体链在紧接着前导子序列的端的氨基酸位置处开始）。在本文中的任一实施例中，VL或VH序列可以经规定或编号以便含有或缺失信号肽或其任何部分。具有表A中指示的VH和VL序列的抗体的HCDR1、2、3和LCDR1、2、3可任选地规定为所有（或每一，独立地）是Kabat编号系统，Chothia编号系统，IMGT编号系统或任何其它合适的编号系统。

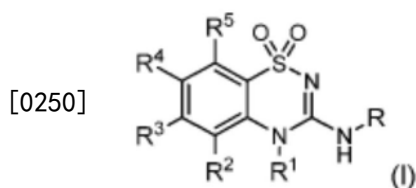
[0246] 表A

	SEQ ID NO:	抗 CD73 抗体的氨基酸序列
6E1 VH	3	EFQLQQSGPELVKPGASVKVSKASGYAFTSYNMYWVKQSHGKRLEWIGYIDPYNGGSSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNLTSEDSAVYYCARGYNNYKAWFAYWGQGLTVSA
6E1 VL	4	SIVMTQTPKFLVLSAGDRVTITCKASQSVTNDVAWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFITSTMQAEDLAVYFCQQDYSSLTFGAGTKLELK
11E1 VH	40	EIQLQQSGPELVKPGASVKVSKASGYAFTSYNMYWVKQSHGKSLEWIGYIDPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNLTSEDSAVYYCARGYGYNYKAWFAYWGQGLTVSA
11E1 VL	41	DAVMTQTPKFLVLSAGDRVTITCKASQSVTNDVAWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFITSTVQAEDLAVYFCQQDYSSLTFGAGTKLELK
8C7 VH	42	EVQLQQSGPELVKPGASVKVSKASGYAFASYNMNVKQSHGKSLDWIGYIDPYNGGSSYNLTFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNLTSEDSAVYYCARGYGYNYKAWFAYWGQGLTVSAASTKGP
8C7 VL	43	SIVMTPTPKFLVLSAGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLIYYASTRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFITSTVQAEDLAVYFCQQDYSSLTFGAGTKLELKRTVAAP
3C12 VH	44	QIQLQQSGPELVKPGASVKVSKASGYAFASYNMNVKQSHGKSLDWIGYIDPYNGGSSYNLTFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNLTSEDSAVYYCARGYGYNYKAWFAYWGQGLTVSAASTKGP
3C12 VL	45	DVVMTQTPKFLVLSAGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLIYYASTRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFITSTVQAEDLAVYFCQQDYSSLTFGAGTKLELKRTVAAP

[0247] 在一个实施例中，将抗体以足以抑制肿瘤微环境中CD73的活性的量和频率施用到患有癌症的个体。在一个实施例中，将抗体以足以降低肿瘤微环境中腺苷的生成和/或浓度的量和频率施用。在一个实施例中，将抗体以足以增大肿瘤微环境中ATP的生成和/或浓度的量和频率施用。在一个实施例中，将抗体以足以中和由肿瘤细胞表达的CD73的活性的量和频率施用。在一个实施例中，将抗体以足以中和由CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞和/或B细胞表达的CD73的活性的量和频率施用。

[0248] 在一个实施例中，CD73的小分子抑制剂结合于CD73的二聚合界面且充当非竞争性

抑制剂。在另一实施例中,CD73的小分子抑制剂结合CD73的底物(ADP)结合位点。在一个实施例中,抑制剂包括嘌呤衍生物部分。在一个实施例中,抑制剂包括根据W02017/098421式(I)的部分:



[0251] 其中R选自:

[0252] 芳基,

[0253] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的芳基:

[0254] 氟基、

[0255] 氯基,

[0256] 溴基,

[0257] 碘基,

[0258] C₁₋₆烷基,

[0259] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的C₁₋₆烷基:氟基、氯基、溴基、碘基、侧氧基、C₁₋₄烷氧基、-OH、-COOH、-NH₂-N(H)C₁₋₄烷基、-N(C₁₋₄烷基)₂和-CN,

[0260] 环烷基,

[0261] C₁₋₄烷氧基,

[0262] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的C₁₋₄烷氧基:氟基、氯基、溴基、侧氧基、-OH和-CN,

[0263] -CN,

[0264] 侧氧基,

[0265] -OH,

[0266] -O芳基,

[0267] -C(O)OC(CH₃)₃,

[0268] -COOH,

[0269] -C₁₋₄烷基OC₁₋₄烷基,

[0270] -NO₂,

[0271] -NH₂,

[0272] -N(H)C₁₋₄烷基,

[0273] -N(C₁₋₄烷基)₂,

[0274] -C₁₋₄烷基NHBoc,

[0275] -N(H)芳基,

[0276] -N(H)C(O)芳基,

[0277] -N(H)OC(O)C₁₋₄烷基,

[0278] -N(H)C(O)C₁₋₄烷基,

[0279] -N(H)S(O)₂C₁₋₄烷基,

[0280] -N(H)S(O)₂芳基,

- [0281] $-N(H)S(O)_2$ 环烷基,
- [0282] $-N(H)S(O)_2CH_2$ 芳基,和
- [0283] $-SO_2NH_2$,
- [0284] 杂芳基,
- [0285] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的杂芳基:
- [0286] 氟基,
- [0287] 氯基,
- [0288] 溴基,
- [0289] 碘基,
- [0290] C_{1-6} 烷基,
- [0291] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的 C_{1-6} 烷基:氟基、氯基、溴基、碘基、侧氧基、 C_{1-4} 烷氧基、 $-OH$ 、 $-COOH$ 、 $-NH_2$,
- [0292] $-N(H)C_{1-4}$ 烷基, $-N(C_{1-4}烷基)_2$ 和 $-CN$,环烷基,
- [0293] C_{1-4} 烷氧基,
- [0294] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基:氟基、氯基、溴基、侧氧基、 $-OH$ 和 $-CN$,
- [0295] $-CN$,
- [0296] 侧氧基,
- [0297] $-OH$,
- [0298] $-O$ 芳基,
- [0299] $-C(O)OC(CH_3)_3$,
- [0300] $-COOH$,
- [0301] $-C_{1-4}烷基OC_{1-4}烷基$,
- [0302] $-NO_2$,
- [0303] $-NH_2$,
- [0304] $-N(H)C_{1-4}烷基$,
- [0305] $-N(C_{1-4}烷基)_2$,
- [0306] $-C_{1-4}烷基NHBoc$,
- [0307] $-N(H)$ 芳基,
- [0308] $-N(H)C(O)$ 芳基,
- [0309] $-N(H)OC(O)C_{1-4}烷基$,
- [0310] $-N(H)C(O)C_{1-4}烷基$,
- [0311] $-N(H)S(O)_2C_{1-4}烷基$,
- [0312] $-N(H)S(O)_2$ 芳基,
- [0313] $-N(H)S(O)_2$ 环烷基,
- [0314] $-N(H)S(O)_2CH_2$ 芳基,和
- [0315] SO_2NH_2 ,
- [0316] 双环杂芳基,
- [0317] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的双环杂芳基:

- [0318] 氟基，
[0319] 氯基，
[0320] 溴基，
[0321] 碘基，
[0322] C_{1-6} 烷基，
[0323] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的 C_{1-6} 烷基：氟基、氯基、溴基、碘基、侧氧基、 C_{1-4} 烷氧基、-OH，-COOH，-NH₂，
[0324] -N(H) C_{1-4} 烷基，-N(C_{1-4} 烷基)₂和-CN，环烷基，
[0325] C_{1-4} 烷氧基，
[0326] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基：氟基、氯基、溴基、侧氧基、-OH和-CN，
[0327] -CN，
[0328] 侧氧基，
[0329] -OH，
[0330] -O芳基，
[0331] -C(O)OC(CH₃)₃，
[0332] -COOH，
[0333] - C_{1-4} 烷基OC C_{1-4} 烷基，
[0334] -NO₂，
[0335] -NH₂，
[0336] -N(H) C_{1-4} 烷基，
[0337] -N(C_{1-4} 烷基)₂，
[0338] - C_{1-4} 烷基NHBoc，
[0339] -N(H)芳基，
[0340] -N(H)C(O)芳基，
[0341] -N(H)OC(O) C_{1-4} 烷基，
[0342] -N(H)C(O) C_{1-4} 烷基，
[0343] -N(H)S(O)₂ C_{1-4} 烷基，
[0344] -N(H)S(O)₂芳基
[0345] -N(H)S(O)₂环烷基，
[0346] -N(H)S(O)₂CH₂芳基，和
[0347] SO₂NH₂，
[0348] 环烷基，和
[0349] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的环烷基：
[0350] 氟基，
[0351] 氯基，
[0352] 溴基，
[0353] 碘基，
[0354] C_{1-6} 烷基，

- [0355] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的 C_{1-6} 烷基：氟基、氯基、溴基、碘基、侧氧基、 C_{1-4} 烷氧基、-OH、-COOH、-NH₂，
- [0356] -N(H) C_{1-4} 烷基，-N(C_{1-4} 烷基)₂和-CN，环烷基，
- [0357] C_{1-4} 烷氧基，
- [0358] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基：氟基、氯基、溴基、侧氧基、-OH和-CN，
- [0359] -CN，
- [0360] 侧氧基，
- [0361] -OH，
- [0362] -O芳基，
- [0363] -C(O)OC(CH₃)₃，
- [0364] -COOH，
- [0365] - C_{1-4} 烷基OC C_{1-4} 烷基，
- [0366] -NO₂，
- [0367] -NH₂，
- [0368] -N(H) C_{1-4} 烷基，
- [0369] -N(C_{1-4} 烷基)₂，
- [0370] - C_{1-4} 烷基NHBoc，
- [0371] -N(H)芳基，
- [0372] -N(H)C(O)芳基，
- [0373] -N(H)OC(O) C_{1-4} 烷基，
- [0374] -N(H)C(O) C_{1-4} 烷基，
- [0375] -N(H)S(O)₂ C_{1-4} 烷基，
- [0376] -N(H)S(O)₂芳基，
- [0377] -N(H)S(O)₂环烷基，
- [0378] -N(H)S(O)₂CH₂芳基，和
- [0379] SO₂NH₂；
- [0380] R¹选自以下：
- [0381] 氢，
- [0382] C_{1-4} 烷基，且
- [0383] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的 C_{1-4} 烷基：氟基、氯基、-OH和-NH₂；
- [0384] R²选自以下：
- [0385] 氢，
- [0386] 氟基，
- [0387] 氯基，
- [0388] 溴基，
- [0389] 碘基，
- [0390] -OH，
- [0391] -CN，

- [0392] C_{1-6} 烷基，
- [0393] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的 C_{1-4} 烷基：氟基、氯基、溴基、碘基、 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 烷氧基、-OH、-COOH、-CF₃，
- [0394] - C_{1-4} 烷基OC C_{1-4} 烷基，-NO₂，-NH₂和-CN，
- [0395] C_{1-4} 烷氧基，
- [0396] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基：氟基、氯基和溴基，以及
- [0397] -OC(O) C_{1-4} 烷基；
- [0398] R³选自以下：
- [0399] 氢，
- [0400] 氟基，
- [0401] 氯基，
- [0402] 溴基，
- [0403] 碘基，
- [0404] -OH，
- [0405] -CN，
- [0406] C_{1-6} 烷基，
- [0407] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的 C_{1-4} 烷基：氟基、氯基、溴基、碘基、 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 烷氧基、-OH、-COOH、-CF₃，
- [0408] - C_{1-4} 烷基OC C_{1-4} 烷基，-NO₂，-NH₂和-CN，
- [0409] C_{1-4} 烷氧基，
- [0410] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基：氟基、氯基和溴基，以及
- [0411] -OC(O) C_{1-4} 烷基；
- [0412] R⁴选自以下：
- [0413] 氢，
- [0414] 氟基，
- [0415] 氯基，
- [0416] 溴基，
- [0417] 碘基，
- [0418] -OH，
- [0419] -CN，
- [0420] C_{1-6} 烷基，
- [0421] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的 C_{1-4} 烷基：氟基、氯基、溴基、碘基、 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 烷氧基、-OH、-COOH、-CF₃，
- [0422] - C_{1-4} 烷基OC C_{1-4} 烷基，-NO₂，-NH₂和-CN，
- [0423] C_{1-4} 烷氧基，
- [0424] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基：氟基、氯基和溴基，以及

[0425] $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基,且

[0426] R^5 选自以下:

[0427] 氢,

[0428] 氟基,

[0429] 氯基,

[0430] 溴基,

[0431] 碘基,

[0432] $-\text{OH}$,

[0433] $-\text{CN}$,

[0434] C_{1-6} 烷基

[0435] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的 C_{1-4} 烷基:氟基、氯基、溴基、碘基、 C_{1-4} 烷基、 C_{1-4} 烷氧基、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CF}_3$,

[0436] $-\text{C}_{1-4}$ 烷基 OC_{1-4} 烷基, $-\text{NO}_2$, $-\text{NH}_2$ 和 $-\text{CN}$,

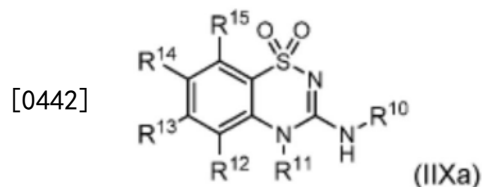
[0437] C_{1-4} 烷氧基,

[0438] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基:氟基、氯基和溴基,以及

[0439] $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_{1-4}$ 烷基;

[0440] 和其药学上可接受的盐。

[0441] 任选地,上文的式(I)化合物由下式(IIIXa)表示:



[0443] 其中:

[0444] R^{10} 选自以下:

[0445] 芳基,

[0446] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的芳基:

[0447] 氟基

[0448] 氯基,

[0449] 溴基,

[0450] 碘基,

[0451] C_{1-6} 烷基

[0452] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的 C_{1-6} 烷基:氟基、氯基、溴基、碘基、侧氧基、 C_{1-4} 烷氧基、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{NH}_2$,

[0453] $-\text{N}(\text{H})\text{C}_{1-4}$ 烷基, $-\text{N}(\text{C}_{1-4}\text{烷基})_2$ 和 $-\text{CN}$,环烷基,

[0454] C_{1-4} 烷氧基,

[0455] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基:氟基、氯基、溴基、侧氧基、 $-\text{OH}$ 和 $-\text{CN}$,

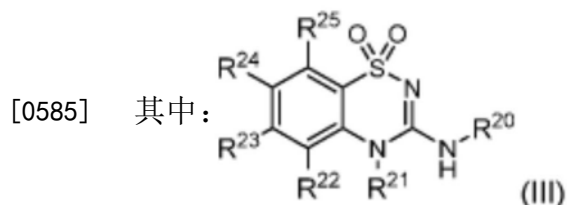
[0456] $-\text{CN}$,

- [0457] 侧氧基，
[0458] -OH，
[0459] -O芳基，
[0460] -C(O)OC(CH₃)₃，
[0461] -COOH，
[0462] -C₁₋₄烷基OC₁₋₄烷基，
[0463] -NO₂，
[0464] -NH₂，
[0465] -N(H)C₁₋₄烷基，
[0466] -N(C₁₋₄烷基)₂，
[0467] -C₁₋₄烷基NHBoc，
[0468] -N(H)芳基
[0469] -N(H)C(O)芳基，
[0470] -N(H)OC(O)C₁₋₄烷基，
[0471] -N(H)C(O)C₁₋₄烷基，
[0472] -N(H)S(O)₂C₁₋₄烷基，
[0473] -N(H)S(O)₂芳基
[0474] -N(H)S(O)₂环烷基，
[0475] -N(H)S(O)₂CH₂芳基，和
[0476] SO₂NH₂，
[0477] 杂芳基，
[0478] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的杂芳基：
[0479] 氟基，
[0480] 氯基，
[0481] 溴基，
[0482] C₁₋₆烷基，
[0483] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的C₁₋₆烷基：氟基、氯基、溴基、侧氧基、C₁₋₄烷氧基、-OH，
[0484] -COOH，-NH₂，
[0485] -N(H)C₁₋₄烷基，-N(C₁₋₄烷基)₂和-CN，环烷基，
[0486] C₁₋₄烷氧基，
[0487] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的C₁₋₄烷氧基：氟基、氯基、溴基、侧氧基、-OH和-CN，
[0488] 侧氧基，
[0489] -OH，
[0490] -COOH，
[0491] -NO₂，
[0492] -NH₂，
[0493] -N(H)C₁₋₄烷基，和

- [0494] $-N(C_{1-4}\text{烷基})_2$,
- [0495] 双环杂芳基,
- [0496] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的双环杂芳基:
- [0497] 氟基,
- [0498] 氯基,
- [0499] 溴基,
- [0500] C_{1-6} 烷基
- [0501] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的 C_{1-6} 烷基:氟基、氯基、溴基、侧氧基、 C_{1-4} 烷氧基、-OH,
- [0502] $-COOH$, $-NH_2$,
- [0503] $-N(H)C_{1-4}$ 烷基, $-N(C_{1-4}\text{烷基})_2$ 和-CN, 环烷基,
- [0504] C_{1-4} 烷氧基,
- [0505] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基:氟基、氯基、溴基、侧氧基、-OH和-CN,
- [0506] 侧氧基,
- [0507] -OH,
- [0508] $-COOH$,
- [0509] $-NO_2$,
- [0510] $-NH_2$,
- [0511] $-N(H)C_{1-4}$ 烷基, 和
- [0512] $-N(C_{1-4}\text{烷基})_2$,
- [0513] 环烷基, 和
- [0514] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的环烷基:
- [0515] 氟基,
- [0516] 氯基,
- [0517] 溴基,
- [0518] C_{1-6} 烷基,
- [0519] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的 C_{1-6} 烷基:氟基、氯基、溴基、侧氧基、 C_{1-4} 烷氧基、-OH,
- [0520] $-COOH$ 、 $-NH_2$ 、 $-N(H)C_{1-4}$ 烷基、 $-N(C_{1-4}\text{烷基})_2$ 和-CN,
- [0521] 环烷基,
- [0522] C_{1-4} 烷氧基,
- [0523] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基:氟基、氯基、溴基、侧氧基、-OH和-CN,
- [0524] 侧氧基,
- [0525] -OH,
- [0526] $-COOH$,
- [0527] $-NO_2$,
- [0528] $-NH_2$,

- [0529] $-N(H)C_{1-4}$ 烷基, 和
- [0530] $-N(C_{1-4}\text{烷基})_2$;
- [0531] R^{11} 选自以下:
- [0532] 氢, 和
- [0533] C_{1-4} 烷基;
- [0534] R^{12} 选自以下:
- [0535] 氢,
- [0536] 氟基,
- [0537] 氯基,
- [0538] 溴基,
- [0539] 碘基
- [0540] $-OH$,
- [0541] C_{1-6} 烷基,
- [0542] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的 C_{1-4} 烷基: 氟基、氯基和溴基,
- [0543] C_{1-4} 烷氧基,
- [0544] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基: 氟基、氯基和溴基, 以及
- [0545] $-OC(O)C_{1-4}$ 烷基;
- [0546] R^{13} 选自以下:
- [0547] 氢,
- [0548] 氟基,
- [0549] 氯基
- [0550] 溴基
- [0551] 碘基,
- [0552] $-OH$,
- [0553] C_{1-6} 烷基,
- [0554] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的 C_{1-4} 烷基: 氟基、氯基和溴基,
- [0555] C_{1-4} 烷氧基,
- [0556] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基: 氟基、氯基和溴基, 以及
- [0557] $-OC(O)C_{1-4}$ 烷基;
- [0558] R^{14} 选自以下:
- [0559] 氢,
- [0560] 氟基,
- [0561] 氯基,
- [0562] 溴基,
- [0563] 碘基,
- [0564] $-OH$,
- [0565] $-CN$,

- [0566] C_{1-6} 烷基，
 [0567] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的 C_{1-4} 烷基：氟基、氯基和溴基，
 [0568] C_{1-4} 烷氧基，
 [0569] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基：氟基、氯基和溴基，以及-OC(O) C_{1-4} 烷基；且
 [0570] R^{15} 选自以下：
 [0571] 氢，
 [0572] 氟基，
 [0573] 氯基，
 [0574] 溴基，
 [0575] 碘基，
 [0576] -OH，
 [0577] -CN，
 [0578] C_{1-6} 烷基
 [0579] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的 C_{1-4} 烷基：氟基、氯基和溴基，
 [0580] C_{1-4} 烷氧基，
 [0581] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基：氟基、氯基和溴基，以及
 [0582] -OC(O) C_{1-4} 烷基；
 [0583] 和其药学上可接受的盐。
 [0584] 任选地，化合物由下式(III)表示：

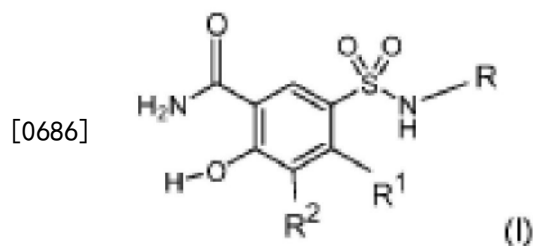


- [0586] R^{20} 选自以下：
 [0587] 苯基，
 [0588] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的苯基：
 [0589] 氟基，
 [0590] 氯基，
 [0591] 溴基，
 [0592] 碘基，
 [0593] C_{1-6} 烷基，
 [0594] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的 C_{1-6} 烷基：氟基、氯基、溴基、碘基、侧氧基、 C_{1-4} 烷氧基、-OH、-COOH、-NH₂、-N(H) C_{1-4} 烷基、-N(C_{1-4} 烷基)₂和-CN，环烷基，
 [0595] C_{1-4} 烷氧基，
 [0596] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基：氟基、氯基、溴基、侧氧基、-OH和-CN，

- [0597] -CN,
- [0598] 侧氧基
- [0599] -OH,
- [0600] -O芳基,
- [0601] -C(O)OC(CH₃)₃,
- [0602] -COOH,
- [0603] -C₁₋₄烷基OC₁₋₄烷基,
- [0604] -NO₂,
- [0605] -NH₂,
- [0606] -N(H)C₁₋₄烷基,
- [0607] -N(C₁₋₄烷基)₂,
- [0608] -C₁₋₄烷基NHBoc,
- [0609] -N(H)烷基,
- [0610] -N(H)C(O)芳基,
- [0611] -N(H)OC(O)C₁₋₄烷基,
- [0612] -N(H)C(O)C₁₋₄烷基
- [0613] -N(H)S(O)2C₁₋₄烷基,
- [0614] -N(H)S(O)2芳基
- [0615] -N(H)S(O)2环烷基,
- [0616] -N(H)S(O)2CH₂芳基,和
- [0617] SO₂NH₂,
- [0618] 杂芳基,
- [0619] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的杂芳基:
- [0620] 氟基,
- [0621] 氯基,
- [0622] 溴基,
- [0623] C₁₋₆烷基,
- [0624] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的C₁₋₆烷基:氟基、氯基、溴基、碘基、侧氧基、C₁₋₄烷氧基、-OH、-COOH、-NH₂、-N(H)CH₃、-N(CH₃)₂和-CN,
- [0625] C₁₋₄烷氧基,
- [0626] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的C₁₋₄烷氧基:氟基、氯基、溴基、侧氧基、-OH和-CN,
- [0627] 侧氧基,
- [0628] -OH,
- [0629] -NH₂,
- [0630] -N(H)CH₃,和
- [0631] -N(CH₃)₂,
- [0632] 双环杂芳基,和
- [0633] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的双环杂芳基:

- [0634] 氟基，
[0635] 氯基，
[0636] 溴基，
[0637] C_{1-6} 烷基，
[0638] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的 C_{1-6} 烷基：氟基、氯基、溴基、碘基、侧氧基、 C_{1-4} 烷氧基、-OH、-COOH、-NH₂、-N(H)CH₃、-N(CH₃)₂和-CN，
[0639] C_{1-4} 烷氧基，
[0640] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基：氟基、氯基、溴基、侧氧基、-OH和-CN，
[0641] 侧氧基，
[0642] -OH，
[0643] -NH₂，
[0644] -N(H)CH₃，和
[0645] -N(CH₃)₂；
[0646] R^{21} 选自以下：
[0647] 氢，和
[0648] C_{1-4} 烷基；
[0649] R^{22} 选自以下：
[0650] 氢，
[0651] 氟基，
[0652] 氯基，
[0653] 溴基，
[0654] -OH，
[0655] -CN，
[0656] C_{1-4} 烷基
[0657] C_{1-4} 烷氧基和-OC(O) C_{1-4} 烷基；
[0658] R^{23} 选自以下：
[0659] 氢，氟基，
[0660] 氯基，
[0661] 溴基
[0662] -OH，
[0663] -CN，
[0664] C_{1-4} 烷基，
[0665] C_{1-4} 烷氧基，和
[0666] -OC(O) C_{1-4} 烷基；
[0667] R^{24} 选自以下：
[0668] 氢，氟基
[0669] 氯基，
[0670] 溴基

- [0671] -OH,
- [0672] -CN,
- [0673] C₁₋₄烷基,
- [0674] C₁₋₄烷氧基,和-OC(O)C₁₋₄烷基;且
- [0675] R²⁵选自以下:
- [0676] 氢,氟基,
- [0677] 氯基,
- [0678] 溴基,
- [0679] -OH,
- [0680] -CN,
- [0681] C₁₋₄烷基
- [0682] C₁₋₄烷氧基,和
- [0683] -OC(O)C₁₋₄烷基;
- [0684] 和其药学上可接受的盐。
- [0685] 在一个实施例中,CD73抑制剂是根据PCT公开第W02017/153952号的公开内容的小分子有机化合物,例如根据下式(I)的化合物:



- [0687] 其中:
- [0688] R选自以下:
- [0689] 芳基,
- [0690] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的芳基:
- [0691] 氟基,
- [0692] 氯基,
- [0693] 溴基,
- [0694] 碘基,
- [0695] C₁₋₆烷基,
- [0696] 经独立地选自以下的1到9个取代基取代的C₁₋₆烷基:氟基、氯基、溴基、碘基、侧氧基、C₁₋₄烷氧基、-OH、-COOH、-NR³¹⁰R³²⁰,
- [0697] -N(H)C₁₋₄烷基,-N(C₁₋₄烷基)₂和-CN,
- [0698] 环烷基,
- [0699] 杂芳基,
- [0700] C₁₋₆烷氧基,
- [0701] 经独立地选自以下的1到9个取代基取代的C₁₋₆烷氧基:氟基、氯基、溴基、侧氧基、-OH、苯基和-CN,

- [0702] -CN,
- [0703] 侧氧基,
- [0704] -OH,
- [0705] -O环烷基,
- [0706] -O苯基,
- [0707] -C(O)OC(CH₃)₃,
- [0708] -COOH,
- [0709] -C₁₋₄烷基OC₁₋₄烷基,
- [0710] -NO₂,
- [0711] -NH₂,
- [0712] -N(H)C₁₋₄烷基,
- [0713] 经独立地选自以下的1到9个取代基取代的-N(H)C₁₋₄烷基:氟基、氯基、溴基、侧氧基、-OH和-CN,
- [0714] -N(C₁₋₄烷基)₂,
- [0715] -C₁₋₄烷基NHBoc,
- [0716] -N(H)芳基,
- [0717] -N(H)C(O)芳基
- [0718] -N(H)OC(O)C₁₋₄烷基,
- [0719] -N(H)C(O)C₁₋₄烷基,
- [0720] -N(H)S(O)₂C₁₋₄烷基,
- [0721] -N(H)S(O)₂环烷基,
- [0722] -N(H)S(O)₂苯基,
- [0723] -SC₁₋₆烷基,
- [0724] 经独立地选自以下的1到9个取代基取代的-SC₁₋₆烷基:氟基、氯基、溴基、侧氧基、-OH和-CN,
- [0725] -SO₂NH₂,以及
- [0726] 杂芳基,
- [0727] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的杂芳基:
- [0728] 氟基,
- [0729] 氯基,
- [0730] 溴基,
- [0731] 碘基,
- [0732] C₁₋₆烷基,
- [0733] 经独立地选自以下的1到9个取代基取代的C₁₋₆烷基:氟基、氯基、溴基、碘基、侧氧基、-OH、-NR³¹⁰R³²⁰和-CN、芳基,
- [0734] C₁₋₄烷氧基,
- [0735] -CN,
- [0736] 侧氧基,
- [0737] -OH,

- [0738] -COOH,
- [0739] -NO₂,
- [0740] -IMH₂, 和
- [0741] SO₂NH₂,
- [0742] 双环杂芳基,
- [0743] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的双环杂芳基:
- [0744] 氟基,
- [0745] 氯基,
- [0746] 溴基,
- [0747] 碘基,
- [0748] C₁₋₆烷基,
- [0749] 经独立地选自以下的1到9个取代基取代的C₁₋₆烷基: 氟基、氯基、溴基、碘基、侧氧基、-OH、-COOH、-NR³¹⁰R³²⁰和-CN,
- [0750] -C(O)OC₁₋₆烷基,
- [0751] 环烷基,
- [0752] 芳基
- [0753] C₁₋₄烷氧基,
- [0754] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的C₁₋₄烷氧基: 氟基、氯基、溴基、侧氧基、-OH和-CN,
- [0755] -CN,
- [0756] 侧氧基,
- [0757] -OH,
- [0758] -O苯基,
- [0759] -COOH,
- [0760] -NO₂,
- [0761] -NH₂,
- [0762] -N(H)C₁₋₄烷基,
- [0763] -N(C₁₋₄烷基)₂,
- [0764] -N(H)芳基, 和
- [0765] -N(H)C(O)芳基, 且
- [0766] R¹和R²独立地选自以下:
- [0767] 氢,
- [0768] C₁₋₆烷基,
- [0769] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的C₁₋₆烷基: 氟基、氯基、侧氧基、-OH和-NH₂,
- [0770] 氟基,
- [0771] 氯基,
- [0772] 溴基,
- [0773] 碘基,

[0774] -N(H)C₁₋₆烷基,

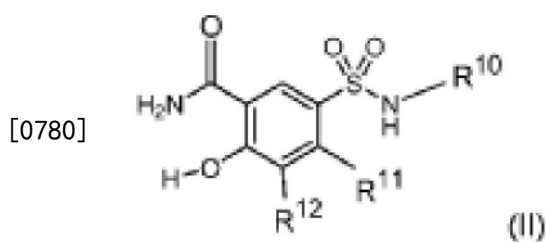
[0775] 经独立地选自以下的1到9个取代基取代的-N(H)C₁₋₆烷基:氟基、氯基、侧氧基、-OH、-NH₂、苯基、经取代的苯基、杂芳基和经取代的杂芳基;

[0776] 其中,

[0777] R³¹⁰和R³²⁰独立地选自氢和C₁-C₄烷基,或R³¹⁰和R³²⁰连同其附接的氮一起形成含有至多一个选自氧和氮的其它杂原子的5元到6元杂环;

[0778] 或其药学上可接受的盐。

[0779] 任选地,上文的式(I)由下式(II)表示:



[0781] 其中

[0782] R¹⁰选自以下:

[0783] 芳基,

[0784] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的芳基:

[0785] 氟基,

[0786] 氯基,

[0787] 溴基,

[0788] C₁₋₆烷基,

[0789] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的C₁₋₆烷基:氟基、氯基、溴基、碘基、侧氧基、C₁₋₄烷氧基、-OH、-COOH和-NR³¹¹R³²¹,

[0790] 环烷基,

[0791] 杂芳基,

[0792] C₁₋₆烷氧基,

[0793] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的C₁₋₆烷氧基:氟基、氯基、溴基、侧氧基、-OH、苯基和-CN,

[0794] -CN,

[0795] 侧氧基,

[0796] -OH,

[0797] -O环烷基,

[0798] -O苯基,

[0799] -COOH,

[0800] -NO₂,

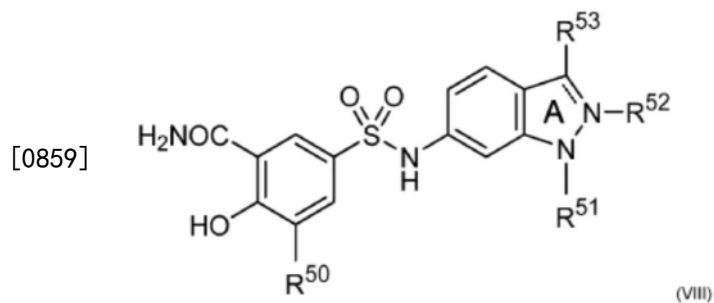
[0801] -NH₂,

[0802] -N(H)C₁₋₄烷基,

[0803] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的-N(H)C₁₋₄烷基:氟基、氯基、溴基、侧氧基、-OH和-CN,

- [0804] $-N(C_{1-4}\text{烷基})_2$,
- [0805] $-N(H)\text{芳基}$,
- [0806] $-N(H)C(O)\text{芳基}$,
- [0807] $-N(H)OC(O)C_{1-4}\text{烷基}$,
- [0808] $-N(H)C(O)C_{1-4}\text{烷基}$,
- [0809] $-N(H)S(O)_2C_{1-4}\text{烷基}$,
- [0810] $-N(H)S(O)_2\text{环烷基}$,
- [0811] $-N(H)S(O)_2\text{苯基}$,
- [0812] $-SC_{1-6}\text{烷基}$
- [0813] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的 $-SC_{1-6}\text{烷基}$: 氟基、氯基、溴基、侧氧基、 $-OH$ 和 $-CN$, 以及
- [0814] $-SO_2NH_2$,
- [0815] 杂芳基,
- [0816] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的杂芳基:
- [0817] 氟基,
- [0818] 氯基,
- [0819] 溴基,
- [0820] 碘基,
- [0821] $C_{1-6}\text{烷基}$,
- [0822] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的 $C_{1-6}\text{烷基}$: 氟基、氯基、溴基、碘基、侧氧基、 $-OH$ 、 $-NR^{311}R^{321}$ 和 $-CN$,
- [0823] 芳基,
- [0824] $C_{1-4}\text{烷氧基}$,
- [0825] $-CN$,
- [0826] 侧氧基,
- [0827] $-OH$,
- [0828] $-COOH$,
- [0829] $-NO_2$,
- [0830] $-IMH_2$, 和
- [0831] SO_2NH_2 ,
- [0832] 双环杂芳基,
- [0833] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的双环杂芳基:
- [0834] 氟基,
- [0835] 氯基,
- [0836] 溴基,
- [0837] 碘基,
- [0838] $C_{1-6}\text{烷基}$,
- [0839] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的 $C_{1-6}\text{烷基}$: 氟基、氯基、溴基、碘基、侧氧基、 $-OH$ 、 $-COOH$ 、 $-NR^{311}R^{321}$ 和 $-CN$,

- [0840] $-C(O)OC_{1-6}$ 烷基，
- [0841] 环烷基，
- [0842] 芳基，
- [0843] C_{1-4} 烷氧基，
- [0844] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的 C_{1-4} 烷氧基：氟基、氯基、溴基、侧氧基、 $-OH$ 和 $-CN$ 、 $-CN$ 、侧氧基、 $-OH$ 、 $-O$ 苯基、 $-COOH$ 、 $-NO_2$ 、 $-IMH_2$ 和 $-N(H)C_{1-4}$ 烷基；且
- [0845] R^{11} 和 R^{12} 独立地选自以下：
- [0846] 氢，
- [0847] C_{1-6} 烷基，
- [0848] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的 C_{1-6} 烷基：氟基、氯基、侧氧基、 $-OH$ 和 $-NH_2$ ，
- [0849] 氟基，
- [0850] 氯基，
- [0851] 溴基，
- [0852] 碘基，
- [0853] $-N(H)C_{1-6}$ 烷基，
- [0854] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的 $-N(H)C_{1-6}$ 烷基：氟基、氯基、侧氧基、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、苯基、经取代的苯基、杂芳基和经取代的杂芳基；
- [0855] 其中
- [0856] R^{311} 和 R^{321} 独立地选自氢和 C_1-C_4 烷基， R^{311} 和 R^{321} 连同其附接的氮一起形成含有至多一个选自氧和氮的其它杂原子的5元到6元杂环；
- [0857] 或其药学上可接受的盐。
- [0858] 任选地，化合物由下式(VIII)表示：



- [0860] 其中：
- [0861] A环含有由点线指示的任选的双键，
- [0862] R^{50} 选自以下：
- [0863] 氢，
- [0864] C_{1-6} 烷基，
- [0865] 经独立地选自以下的一个到五个取代基取代的 C_{1-6} 烷基：氟基、氯基、侧氧基、 $-OH$ 和 $-NH_2$ ，
- [0866] 氟基，
- [0867] 氯基，

- [0868] 溴基，
- [0869] 碘基，和
- [0870] $-N(H)C_{1-6}$ 烷基；
- [0871] R^{51} 选自以下：
- [0872] 氢，
- [0873] 氟基，
- [0874] 氯基，
- [0875] C_{1-6} 烷基，
- [0876] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的 C_{1-6} 烷基：氟基和-OH，
- [0877] C_{1-6} 烷氧基，
- [0878] 经独立地选自以下的1到3个取代基取代的 C_{1-6} 烷氧基：氟基、氯基、溴基、侧氧基、-OH、-CN和苯基、-OH，以及
- [0879] $-C(O)OC_{1-6}$ 烷基；
- [0880] R^{52} 不存在或选自以下：
- [0881] 氢，
- [0882] 氟基，
- [0883] 氯基，
- [0884] C_{1-6} 烷基，
- [0885] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的 C_{1-6} 烷基：氟基和-OH，
- [0886] C_{1-6} 烷氧基，
- [0887] 经独立地选自以下的1到3个取代基取代的 C_{1-6} 烷氧基：氟基、氯基、溴基、侧氧基、-OH、-CN和苯基，
- [0888] -OH，和
- [0889] $-C(O)OC_{1-6}$ 烷基，且
- [0890] R^{53} 选自以下：
- [0891] 氢，
- [0892] 氟基，
- [0893] 氯基，
- [0894] C_{1-6} 烷基，
- [0895] 经独立地选自以下的1到5个取代基取代的 C_{1-6} 烷基：氟基和-OH，
- [0896] C_{1-6} 烷氧基，
- [0897] 经独立地选自以下的1到3个取代基取代的 C_{1-6} 烷氧基：氟基、氯基、溴基、侧氧基、-OH、-CN和苯基，
- [0898] -OH，和
- [0899] $-C(O)OC_{1-6}$ 烷基；
- [0900] 和其药学上可接受的盐；
- [0901] 限制条件为当 R^{52} 不存在时，A环不含由点线指示的双键。
- [0902] 抑制CD73的酶活性的小分子有机试剂的其它实例是基于嘌呤的试剂。举例来说，抑制CD73的酶活性的试剂可以是W02015/164573的式I化合物，或例如以下中的任一个：

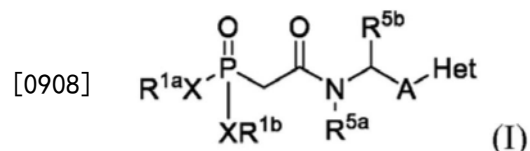
[0903] (1-((5-(6-氨基-2-氯基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)-2-乙氧基-2-氧代乙基)膦酸;

[0904] (1-(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-2-氯基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)-2-乙氧基-2-氧代乙基)膦酸;或

[0905] ((R)-1-(((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-2-氯基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)-2-乙氧基-2-氧代乙基)膦酸;

[0906] 或其药学上可接受的盐。

[0907] 在其它实例中,抑制CD73的酶活性的小分子有机试剂包括W02018/094148的式I的部分:



[0909] 其中

[0910] R^{1a} 和 R^{1b} 独立地选自以下组成的组:氢、任选经取代的 C_1 - C_6 烷基、任选经取代的芳基、任选经取代的 $-C(R^{2a}R^{2b})$ -芳基,

[0911] $-C(R^{2a}R^{2b})$ - $O-C(O)-OR^3$ 、 $-C(R^{2a}R^{2b})$ - $O-C(O)R^3$ 和 $-C(R^{2a}R^{2b})C(O)OR^3$;

[0912] 任选地, R^{1a} 和 R^{1b} 基团组合以形成5元到6元杂环环;

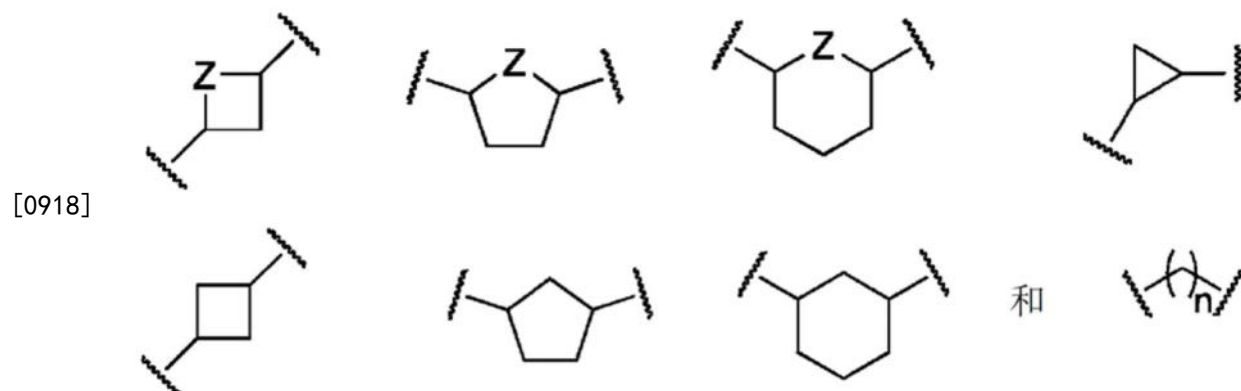
[0913] 每一 R^{2a} 和 R^{2b} 独立地选自以下组成的组:H和任选经取代的 C_1 - C_6 烷基;

[0914] 每一 R^3 独立地选自以下组成的组:H、 C_1 - C_6 烷基、 C_1 - C_4 烷氧基(C_1 - C_4)烷基和任选经取代的芳基;

[0915] R^{5a} 和 R^{5b} 独立地选自以下组成的组:H、任选经取代的 C_1 - C_6 烷基、 $-C(O)OR^3$ 、 C_3 - C_6 环烷基(C_1 - C_6)烷基芳基(C_1 - C_6)烷基, C_3 - C_6 环烷基和芳基;

[0916] 每一X选自以下组成的组:O、H和S;

[0917] A选自以下组成的组:



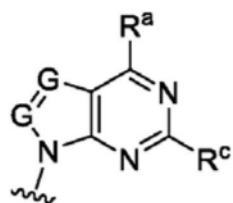
[0919] 其中的每一个任选地经1到5个 R^6 取代基取代,且其中,下标n是0到3的整数;

[0920] Z选自以下组成的组:NH、 NR^6 及O;

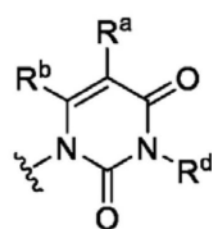
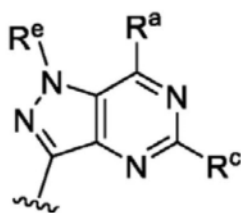
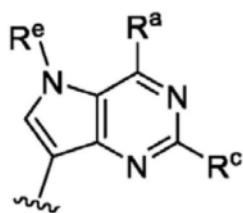
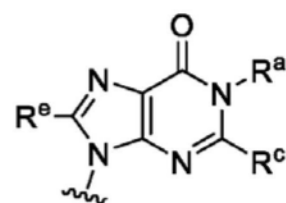
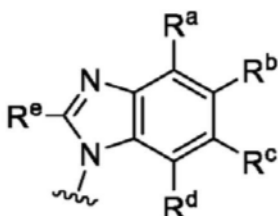
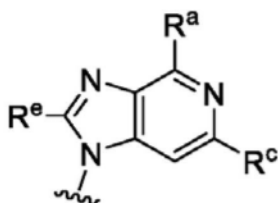
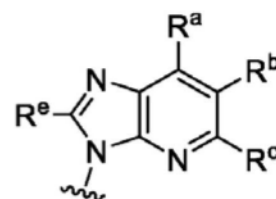
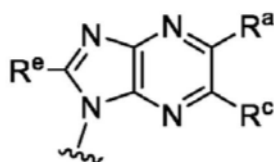
[0921] 每一 R^6 独立地选自以下组成的组: CH_3 、 OR^8 、CN、F,且

[0922] 任选经取代的 C_1 - C_6 烷基;或邻接环顶点上的两个 R^6 基团任选地接合在一起以形成具有至少一个杂原子作为环顶点的5元到6元环;和

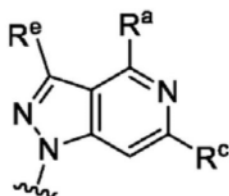
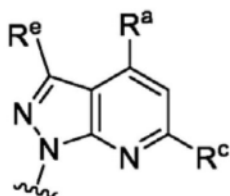
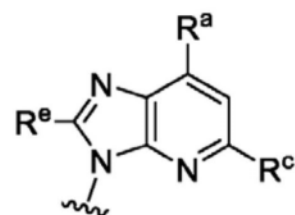
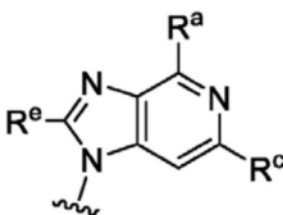
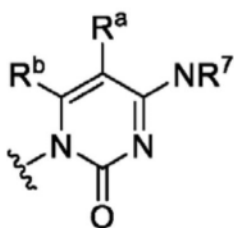
[0923] Het选自以下组成的组:



[0924]



[0925]



[0926] 其中波浪线指示与化合物的剩余部分的附接点,其中每一G(当存在时)独立地选自以下组成的组:N和CR^e,且其中:

[0927] R^a选自以下组成的组:H、NH₂、NHR^{7a}、NHC(O)R^{7a}、NR^{7a}R^{7b}、R^{7a}、OH、SR^{7a}和OR^{7a};

[0928] R^b选自以下组成的组:H、卤素、NH₂、NHR^{7a}、NR^{7a}R^{7b}、R^{7a}、OH,且

[0929] R^c和R^d独立地选自以下组成的组:H、卤素、卤烷基、NH₂、NHR^{7a}、NR^{7a}R^{7b}、R^{7a}、OH、OR^{7a}、SR^{7a}、SO₂R^{7a}、-X¹NH₂、-X¹NHR^{7a}、-X¹NR^{7a}R^{7b}、-X¹OH、-X¹OR^{7a}、-X¹SR^{7a}和-X¹SO₂R^{7a};

[0930] 每个R^e独立地选自以下组成的组:H、卤素和任选经取代的C₁₋₆烷基;

[0931] 每个R⁸独立地选自以下组成的组:H和-C(O)-C₁₋₆烷基;

[0932] 每个X¹是C₁₋₄亚烷基;且

[0933] 每个R^{7a}和R^{7b}独立地选自以下组成的组:任选经取代的C₁₋₁₀烷基、任选经取代的C₂₋₁₀烯基、任选经取代的C₂₋₁₀炔基、任选经取代的C₃₋₇环烷基、任选经取代的C₃₋₇环烷基C₁₋₄烷基、任选经取代的4-7元环杂烷基、任选经取代的4-7元环杂烷基C₁₋₄烷基、任选

经取代的芳基、任选经取代的芳基 C_1 - C_4 烷基、任选经取代的芳基 C_2 - C_4 炔基、任选经取代的芳基 C_2 - C_4 炔基、任选经取代的杂芳基、任选经取代的杂芳基 C_1 - C_4 烷基、任选经取代的杂芳基 C_1 - C_4 烯基和任选经取代的杂芳基 C_2 - C_4 烯基；或 R^{7a} 和 R^{7b} （在附接到相同氮原子时）任选地接合在一起以形成4元到7元杂环环，任选地融合到芳基环。

[0934] 产生抗体

[0935] 抗CD73和抗CD39抗体可通过所属领域中已知的多种技术中的任一种产生。通常，其通过非人类动物（例如小鼠）免疫接种分别包括CD73或CD39多肽的免疫原或通过筛选具有CD73或CD39多肽的候选结合结构域文库来产生。CD39或CD73多肽可以分别地包括人类CD39或CD73多肽的全长序列或其片段或衍生物（通常免疫原性片段），即包括暴露在表达CD39或CD73多肽的细胞表面上的表位的一部分多肽。这类片段通常含有成熟多肽序列的至少约7个连续氨基酸，甚至更优地其至少约10个连续氨基酸。片段通常实质上来源于受体的细胞外结构域。在一个实施例中，免疫原包括脂膜中，通常在细胞表面处的野生型人类CD39或CD73多肽。在一具体实施例中，免疫原包括完整细胞，具体来说完整的人类细胞，任选地经治疗或裂解。在另一实施例中，多肽是重组CD39或CD73多肽。

[0936] 用抗原使非人类哺乳动物免疫的步骤可以所属领域熟知的任何方式进行，以刺激小鼠中抗体的产生（参见，例如，E. Harlow和D. Lane,《抗体：实验室手册 (Antibodies: A Laboratory Manual.)》，纽约冷泉港冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), (1988)，其全部公开内容通过引用并入本文）。任选地利用佐剂，如完整或不完整的弗氏佐剂 (Freund's adjuvant) 使免疫原悬浮或溶解于缓冲液中。用于确定免疫原的量、缓冲剂类型和佐剂量的方法是所属领域的技术人员熟知的且不得以任何方式限制。这些参数对于不同免疫原可能不同，但容易地阐明。

[0937] 类似地，足以刺激抗体产生的免疫接种的位置和频率也是所属领域中熟知的。在通常的免疫方案中，在第1天向非人类动物腹膜内注射抗原且约一周后再次进行。这之后大约第20天任选地利用佐剂，如不完整弗氏佐剂恢复注射抗原。所述恢复注射经静脉内进行且可重复连续数天。这之后第40天静脉内或腹膜内以辅助剂注射，通常无佐剂。这一方案在约40天后会引起产生抗原特异性抗体产生的B细胞。也可使用其它方案，只要其引起B细胞的产生，所述B细胞表达针对免疫中使用的抗原的抗体。

[0938] 对于单克隆抗体，将脾细胞与免疫非人类哺乳动物和那些脾细胞与永生细胞的后续融合体分离以便形成产生抗体的杂交瘤。将脾细胞与非人类哺乳动物分离是所属领域中所熟知的且通常涉及从麻醉的非人类哺乳动物去除脾，将其切割成较小块且通过细胞过滤器的尼龙网将脾细胞从脾包膜挤压到适合的缓冲液中以便产生单个细胞悬浮液。将细胞洗涤，离心且再悬浮于溶解任何红细胞的缓冲液中。将溶液再次离心且使丸粒中的残存淋巴细胞最终再悬浮于新制缓冲液中。

[0939] 一旦分离且存在于单细胞悬浮液中，那么淋巴细胞可以融合到永生细胞系。这通常是小鼠骨髓瘤细胞系，但所属领域中已知适用于形成杂交瘤的多种其它永生细胞系。鼠类骨髓瘤株包含（但不限于）来源于MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤（获自Salk Institute Cell Distribution Center, 美国圣地亚哥 (San Diego, U.S.A.)），X63 Ag8653和SP-2细胞（获自美国菌种保存中心 (American Type Culture Collection), 美国马里兰州洛克维尔 (Rockville, Maryland U.S.A.)）的那些骨髓瘤株。使用聚乙二醇或其类似物影响融合体。随

后,所得杂交瘤在含有一种或多种抑制未融合亲本骨髓瘤细胞的生长或生存的基质的选择性培养基中生长。举例来说,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT),那么杂交瘤的培养基通常将包括次黄嘌呤、氨基喋呤(aminopterin)和胸苷(HAT培养基),这些物质防止HGPRT缺陷型细胞的生长。

[0940] 杂交瘤通常在巨噬细胞的饲养层上生长。巨噬细胞优选地来自用于分离脾细胞的非人类哺乳动物的同胎仔畜且通常在接种杂交瘤之前数天通过不完整弗氏佐剂或其类似物预致敏。融合方法描述于Goding,“《单克隆抗体:原理及实践(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice)》,”第59-103页(学术出版社,1986),其公开内容以引用的方式并入本文中。

[0941] 允许细胞在选择培养基中生长充分时间以用于集落形成和抗体产生。这通常在约7与约14天之间。

[0942] 随后分析杂交瘤集落的特异性结合CD39或CD73多肽基因产物的抗体产生。测定通常是色度ELISA型测定,但可采用可适用于杂交瘤生长的孔的任何测定。其它测定包含放射免疫分析或荧光激活细胞分选术。检测对于所需抗体产生为阳性的孔以确定是否存在一种或多种独立集落。如果存在超过一种集落,那么细胞可再次克隆并生长以确保仅单个细胞已引起集落产生所需抗体。通常,还将测试抗体结合CD39或CD73多肽,例如CD39或CD73表达性细胞的能力。

[0943] 证实产生单克隆抗体的杂交瘤可以较大量在适合的培养基,如DMEM或RPMI-1640中生长。替代地,杂交瘤细胞可以腹水瘤在动物中体内生长。

[0944] 在充分生长以产生所需单克隆抗体后,将含有单克隆抗体的生长培养基(或腹水流体)与细胞分离且纯化存在于其中的单克隆抗体。纯化通常通过凝胶电泳、渗析层析法,使用蛋白A或蛋白G-琼脂糖,或连接到固体支持物(如琼脂糖或琼脂糖珠粒)的抗小鼠Ig实现(所有描述于例如《抗体纯化手册(the Antibody Purification Handbook)》,《生物学》,公开第18-1037-46号,AC版中,其公开内容特此以引用方式并入)。结合的抗体通常通过使用低pH缓冲液(pH 3.0或更小的甘氨酸或乙酸缓冲液)从蛋白A/蛋白G管柱洗脱,并伴随立即中和含抗体部分。这些部分经合并、渗析且视需要浓缩。

[0945] 具有单个明显集落的阳性孔通常经再次克隆和再次分析以保证检测且产生仅一个单克隆抗体。

[0946] 抗体还可通过选择免疫球蛋白的组合文库产生,如例如(Ward等人《自然》,341(1989)第544页,其整个公开内容以引用的方式并入本文中)中公开。

[0947] 结合所关注抗原的一种或多种抗体,即CD39或CD73,具体地说关于CD73与单克隆抗体11E1、8C7或6E1实质上或基本上相同的表位或具体地说关于CD39与单克隆抗体I-394、I-395、I-396或I-399实质上或基本上相同的表位的识别可以使用多种免疫筛选测定中的任一种容易地测定,其中可以评估抗体竞争。多个这类测定常规地实践且是所属领域中所熟知的(参见例如1997年8月26颁布的美国专利第5,660,827号,其通过引用特定并入本文中)。应理解,不以标识抗体所需的任何方式实际地确定本文所述的抗体所结合的表位,所述抗体与本文中所述的单克隆抗体结合相同或实质上相同的表位。

[0948] 举例来说,当待检测的测试抗体源自不同源动物,或甚至属于不同Ig同种型时,可采用单一竞争测定,其中对照(例如I-394、I-395、I-396和I-399)和测试抗体混合(或预吸

附)且施加到含有CD39或CD73多肽的样品。基于蛋白质印迹法和BIAcore分析的使用的方案适用于这类竞争研究。

[0949] 在某些实施例中,在施加到CD39抗原样品之前将对照抗体(例如,I-394、I-395、I-396或I-399例如)与不同量的测试抗体(例如,约1:10或约1:100)预混合一段时间。在其它实施例中,对照和不同量的测试抗体可仅仅在暴露于CD39抗原样品期间混合。只要我们可区分结合与游离抗体(例如,通过使用分离或洗涤技术来消除未结合抗体)且区分I-394、I-395、I-396或I-399与测试抗体(例如,通过使用物种特异性或同种型特异性第二抗体或通过可检测标记特异性地标记I-394、I-395、I-396或I-399),那么我们可以确定测试抗体是否降低I-394、I-395、I-396或I-399与抗原的结合,从而表明测试抗体竞争结合CD39上与I-394、I-395、I-396或I-399相同的位点。在完全不相关抗体不存在的情况下,(标记)对照抗体的结合可充当高对照值。低对照值可以通过将标记(I-394、I-395、I-396或I-399)抗体与恰好相同类型(I-394、I-395、I-396或I-399)的未标记抗体一起温育,其中竞争将出现且降低标记抗体的结合。在测试测定中,标记抗体反应度在测试抗体存在下的显著降低指示识别实质上相同表位的测试抗体,即,与标记(I-394、I-395、I-396或I-399)抗体“交叉反应”或竞争的测试抗体。以I-394、I-395、I-396或I-399:测试抗体在约1:10与约1:100之间的任何比率将I-394、I-395、I-396或I-399与CD39抗原的结合降低至少约50%,如至少约60%,或更优选地至少约80%或90%(例如,约65-100%)的任何测试抗体被视为竞争结合与I-394、I-395、I-396或I-399实质上相同表位或决定簇的抗体。优选地,这类测试抗体将降低I-394、I-395、I-396或I-399与CD39抗原的结合达至少约90%(例如,约95%)

[0950] 竞争还可通过(例如)流式细胞术测试评估。在这类测试中,携带给定CD39多肽的细胞可以首先与例如I-394、I-395、I-396或I-399一起温育(或CD73多肽与11E1、8C7、3C12或6E1一起温育),且随后与用荧光染料或生物素标记的测试抗体一起温育。如果在与饱和量的I-394、I-395、I-396或I-399一起预温育之后获得的结合是抗体不与I-394、I-395、I-396或I-399一起预温育所获得的结合(如通过荧光测量)的约80%、优选地约50%、约40%或更小(例如,约30%、20%或10%),那么称抗体与I-394、I-395、I-396或I-399竞争。替代地,如果通过细胞上的标记I-394、I-395、I-396或I-399抗体(通过荧光染料或生物素)与饱和量的测试抗体一起预温育获得的结合是不与测试抗体一起预温育所获得的结合的约80%、优选地约50%、约40%或更小(例如,约30%、20%或10%),那么称抗体与I-394、I-395、I-396或I-399竞争。

[0951] 还可采用单一竞争测定,其中测试抗体以饱和浓度预吸附且施加到其上固定了CD39抗原(或用于抗CD73抗体的CD73)的表面。单一竞争测定中的表面优选地是BIAcore芯片(或适用于表面等离子共振分析的其它介质)。随后使对照抗体(例如,I-394、I-395、I-396或I-399)与CD39饱和浓度下的表面接触且测量对照抗体的CD39和表面结合。将对照抗体的这一结合与在测试抗体不存在下的对照抗体与含CD39表面的结合进行比较。在测试测定中,在测试抗体存在下,含CD39表面与对照抗体的结合的显著降低可以表明测试抗体竞争结合与对照抗体相同的决定簇或表位,使得测试抗体与对照抗体“交叉反应”。将对照(如I-394、I-395、I-396或I-399)抗体与CD39抗原的结合降低至少约30%或更多,优选地约40%的任何测试抗体可以被视为结合与对照(如I-394、I-395、I-396或I-399)实质上相同表位或决定簇的抗体。优选地,此类测试抗体将降低对照抗体(例如,I-394、I-395、I-396或

I-399)与CD39抗原的结合至少约50%(例如,至少约60%、至少约70%或更多)。应了解,对照和测试抗体的次序可以反转,即,对照抗体可以首先结合表面且此后在竞争测定中使测试抗体与表面接触。优选地,对CD73抗原具有较高亲和力的抗体首先结合于表面,因为将预期对于第二抗体(假定抗体交叉反应)所见的结合降低将具有更大量值。这类测定的其它实例提供于例如Sauna(1995)《免疫学方法杂志(J. Immunol. Methods)》183:33-41,其公开内容通过引用并入本文中。

[0952] 在一个实施例中,在免疫测定中验证抗体以分别测试其分别结合CD39或CD73表达性细胞的能力。举例来说,进行血液样品或肿瘤活检且收集肿瘤细胞或肿瘤浸润性细胞。随后使用所属领域的技术人员熟知的标准方法评估给定抗体结合细胞的能力。抗体可结合例如来自显著百分比的个体或患者(例如,10%、20%、30%、40%、50%或更大)的显著比例(例如,20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或更大)的已知分别表达CD39或CD73的细胞,例如肿瘤细胞。抗体可用于确定患者中恶性细胞的存在或量的诊断性目的,例如用作评估患者是否适用于利用抗CD73试剂治疗的生物标志物或用于本文中描述的治疗方法。为评估抗体与细胞的结合,可直接或间接标记抗体。当间接标记时,通常添加标记的次级抗体。

[0953] 可以所属领域技术人员已知的方式进行抗体是否在表位区内结合确定。作为这类作图/表征方法的一个实例,抗CD73或抗CD39抗体的表位区可以通过使用相应CD73或CD39蛋白中暴露的胺/羧基的化学修饰的表位“足印”来确定。这类足印技术的一个具体实例是使用HXMS(通过质谱法检测的氢-氘交换),其中发生受体和配体蛋白酰胺质子的氢/氘交换、结合和反向交换,其中参与蛋白质结合的主链酰胺基受到保护免于反向交换,并且因此将保持氘代。这时可以通过消化蛋白水解、快速微孔高效液相色谱分离和/或电喷雾电离质谱法标识相关区域。参见,例如,Ehring H,《分析生物化学(Analytical Biochemistry)》,第267(2)卷第252-259页(1999)Engen,J.R.和Smith,D.L.(2001)《分析化学(Anal. Chem.)》73,256A-265A。合适的表位标识技术的另一实例是核磁共振表位作图(NMR),其中通常比较信号在游离抗原和与抗原结合肽复合的抗原(如抗体)的二维NMR光谱中的位置。通常用¹⁵N选择性地同位素标记抗原,使得在NMR光谱中仅看到对应于抗原的信号,并且看不到来自抗原结合肽的信号。源自参与与抗原结合肽相互作用的氨基酸的抗原信号通常将在复合物的光谱中移位(与游离抗原的光谱相比),并且可以所述方式标识参与结合的氨基酸。参见,例如,Ernst Schering Res Found Workshop.2004;(44):149-67;Huang等人,《分子生物学期刊(Journal of Molecular Biology)》第281(1)卷第61-67页(1998);以及Saito和Patterson,《方法(Methods.)》1996年6月;9(3):516-24。

[0954] 也可以使用质谱法进行表位作图/表征。参见,例如,Downard,《质谱学杂志(J Mass Spectrom.)》2000年4月;35(4):493-503以及Kislar和Downard,《分析化学(Anal Chem.)》1999年5月1日;71(9):1792-1801。蛋白酶消化技术也可以用于表位作图和标识的背景下。抗原决定簇相关区域/序列可以通过蛋白酶消化确定,例如通过以约1:50的比率使用胰蛋白酶与CD73或在pH 7-8下过夜消化(o/n digestion),随后进行用于肽标识的质谱(MS)分析。随后可以通过将经历胰蛋白酶消化的样品和与抗体一起温育,并且随后经历例如胰蛋白酶消化的样品进行比较,标识受抗CD73或抗CD39结合剂保护免受胰蛋白酶裂解的肽(从而揭示粘合剂的足迹)。其它酶(如胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶等)也可以或替代性地用于类似的表位表征方法中。此外,酶消化可以提供用于分析潜在抗原决定簇序列是否在

CD73或CD39多肽的未表面暴露的区域内的快速方法,并且因此,在免疫原性/抗原性方面最可能不相关。

[0955] 定点诱变是可用于阐明结合表位的另一种技术。举例来说,在“丙氨酸扫描”中,蛋白质区段内的每个残基用丙氨酸残基取代,并且测量结合亲和力的结果。如果突变导致结合亲和力显著降低,那么其很可能参与结合。对结构表位具有特异性的单克隆抗体(即,不结合未折叠蛋白质的抗体)可以用于验证丙氨酸取代不影响蛋白质的总体折叠。参见,例如,Claackson和Wells,《科学(Science)》1995;267:383-386;以及Wells,《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》1996;93:1-6。

[0956] 电子显微镜也可以用于表位“足印”。举例来说,Wang等人,《自然》1992;355:275-278使用冷冻电镜术、三维图像重建和X射线晶体学的协调应用,以确定Fab片段在天然豇豆花叶病毒的衣壳表面上的物理足迹。

[0957] 用于表位评估的其它形式的“无标记”测定包含表面等离子共振(SPR,BIACORE)和反射干涉光谱(RifS)。参见,例如,Fägerstam等人,《分子识别杂志(Journal Of Molecular Recognition)》1990;3:208-14;Nice等人,《色谱杂志(J.Chroma-togr.)》1993;646:159-168;Leipert等人,《应用化学国际版(Angew.Chem.Int.Ed.)》1998;37:3308-3311;Kröger等人,《生物传感器和生物电子学(Biosensors and Bioelectronics)》2002;17:937-944。

[0958] 还应注意,可以在本文所述的示范性竞争测定中的一种或多种测定中,标识结合与抗体相同或实质上相同的表位的抗体。

[0959] 通常,本文提供的抗CD73或抗CD39抗体对相应CD73(例如,呈CD73均二聚体状)或CD39多肽的亲合力在约 10^4 到约 10^{11}M^{-1} (例如,约 10^8 到约 10^{10}M^{-1})范围内。举例来说,在一具体方面,抗CD73或抗CD39抗体分别关于CD73或CD39的平均解离常数(K_D)小于 $1 \times 10^{-9}\text{M}$,如通过例如表面等离子共振(SPR)筛选(如通过用BIAcore™SPR分析装置的分析)所测定。在一更具体的示范性方面,抗CD73或抗CD39抗体分别对于CD73或CD39的KD为约 $1 \times 10^{-8}\text{M}$ 到约 $1 \times 10^{-10}\text{M}$,或约 $1 \times 10^{-9}\text{M}$ 到约 $1 \times 10^{-11}\text{M}$ 。在一个实施例中,结合是单价结合。在一个实施例中,结合是二价结合。

[0960] 抗体可以表征为例如平均KD不大于约100、60、10、5或1纳摩尔(即,更好的亲和力和),优选地亚纳摩尔或任选地不大于约500、200、100或10皮摩尔。可以例如通过将重组产生的人类CD73或CD39蛋白固定在芯片表面上,随后在溶液中施加待测抗体以确定KD。在一个实施例中,方法进一步包括从(b)选择能够与抗体11E1、8C7、3C12或6E1竞争结合CD73或能够与抗体I-394、I-395、I-396或I-399竞争结合CD39的抗体。

[0961] 在实施例中的任一个的一个方面,根据本方法制备的抗体是单克隆抗体。在另一方面,用于根据本文方法产生抗体的非人类动物是哺乳动物,如啮齿动物、牛、猪、家禽、马、兔、山羊或绵羊。

[0962] 从杂交瘤中分离编码结合CD73或CD39多肽上存在的表位的抗体的DNA,并且将其置于合适的表达载体中,以转染到合适的宿主中。随后,将宿主用于重组产生抗体或其变体,如所述单克隆抗体的人类化版本、抗体的活性片段、包括抗体的抗原识别部分的嵌合抗体、或包括可检测部分的版本。

[0963] 编码本公开的单克隆抗体,例如抗体I-394、I-395、I-396或I-399、11E1、8C7、3C12

或6E1的DNA可以容易地分离,并且使用常规方法测序(例如,通过使用能够特异性地结合于编码鼠类抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。一旦分离,就可以将DNA放入表达载体中,然后将其转染到不会另外产生免疫球蛋白的宿主细胞,如大肠杆菌细胞、猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞中,由此在重组宿主细胞中实现单克隆抗体的合成。如本说明书中其它地方所述,可以修饰这类DNA序列以用于任何大量目的,例如用于人类化抗体、产生片段或衍生物、或用于修饰抗体的序列,例如在抗原结合位点中,以优化抗体的结合特异性。编码抗体的DNA在细菌中的重组表达是所属领域熟知的(参见,例如,Skerra等人,《免疫学最新观点(Curr.Opinion in Immunol.)》5,第256页(1993);和Pluckthun,《免疫学(Immunol.)》130,第151页(1992)。

[0964] 抗体的片段和衍生物(除非另外说明或与上下文明显地相矛盾,否则如本申请中所使用,通过术语“抗体(antibody/antibodies)”涵盖)可以通过所属领域中已知的技术产生。“片段”包括完整抗体的一部分,一般是抗原结合位点或可变区。抗体片段的实例包含Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂及Fv片段;双功能抗体;任何抗体片段,即具有由连续氨基酸残基的一个不间断的序列组成的一级结构的多肽(在本文中被称作“单链抗体片段”或“单链多肽”),包含(但不限于)(1)单链Fv分子;(2)单链多肽,仅含有一个轻链可变结构域,或其片段,所述片段含有轻链可变结构域的三个CDR,且无相关重链部分;和(3)单链多肽,其含有仅一个重链可变区或其片段,所述片段含有重链可变区的三个CDR且无相关轻链部分;和由抗体片段形成的多特异性(例如,双特异性)抗体尤其包含纳米抗体、结构域抗体、单结构域抗体或“dAb”。

[0965] 在一个方面中,试剂是选自完全人抗体、人类化抗体和嵌合抗体的抗体。

[0966] 在一个方面中,试剂是包括选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的恒定结构域的抗体片段。在一个方面中,试剂是选自以下的抗体片段:Fab片段、Fab'片段、Fab'-SH片段、F(ab)₂片段、F(ab')₂片段、Fv片段、重链Ig(大羊驼或骆驼Ig)、V_H片段、单个结构域Fv和单链抗体片段。在一个方面中,试剂是合成或半合成抗体衍生的分子,其选自:scFv、dsFv、微型抗体、双功能抗体、三功能抗体、κ主体、IgNAR;和多特异性抗体。在一个方面中,抗体呈至少部分地纯化形式。在一个方面中,抗体呈实质上分离的形式。

[0967] 如抗体的抗CD39或抗CD73试剂可以掺入药物调配物中,所述药物调配物包括1mg/ml到500mg/ml的浓度,其中所述调配物的pH为2.0到10.0。调配物可以进一步包括缓冲系统、一种或多种防腐剂、一种或多种张力剂、一种或多种螯合剂、稳定剂和表面活性剂。在一个实施例中,药物调配物是含水调配物,即包括水的调配物。此类调配物通常是溶液或悬浮液。在另一实施例中,药物调配物是水溶液。术语“含水调配物”定义为包括至少50%w/w水的调配物。同样,术语“水溶液”定义为包括至少50%w/w水的溶液,并且术语“水性悬浮液”定义为包括至少50%w/w水的悬浮液。

[0968] 在另一实施例中,药物调配物是冻干调配物,医师或患者在使用之前加入溶剂和/或稀释剂。

[0969] 在另一实施例中,药物调配物是无需任何预先溶解即可使用的干燥调配物(例如,冷冻干燥或喷雾干燥)。

[0970] 另一方面,药物调配物包括此类抗体的水溶液和缓冲液,其中抗体以1mg/ml或更高的浓度存在,并且其中所述调配物的pH为约2.0到约10.0。

[0971] 在另一实施例中,调配物的pH处于选自由以下组成的列表的范围内:约2.0到约10.0、约3.0到约9.0、约4.0到约8.5、约5.0到约8.0和约5.5到约7.5。

[0972] 在另一实施例中,缓冲剂选自以下组成的组:乙酸钠、碳酸钠、柠檬酸盐、甘氨酸、组氨酸、甘氨酸、赖氨酸、精氨酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸钠和三(羟甲基)-氨基甲烷、二甘氨酸、三甘氨酸、苹果酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、酒石酸、天冬氨酸或其混合物。这些特定缓冲液中的每一种构成本发明的替代性实施例。

[0973] 在另一实施例中,调配物进一步包括药学上可接受的防腐剂。在另一实施例中,调配物进一步包括等渗剂。在另一实施例中,调配物还包括螯合剂。在本发明的另一实施例中,调配物进一步包括稳定剂。在另一实施例中,调配物进一步包括表面活性剂。为方便起见,参考《雷明顿:药学技术与实践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy)》,第19版,1995。

[0974] 本发明的肽药物调配物中可能存在其它成分。这类附加成分可以包含润湿剂、乳化剂、抗氧化剂、填充剂、张力调节剂、螯合剂、金属离子、油质媒剂、蛋白质(例如人类血清白蛋白、明胶或蛋白质)和两性离子(例如氨基酸,如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸)。当然,这类额外的成分不应对本发明的药物调配物的总体稳定性产生不利影响。

[0975] 施用根据本发明的药物组合物可以通过数种施用途径,例如静脉内。合适的抗体调配物还可以通过检验经历其它已经研发治疗性单克隆抗体来确定。已经证明几种单克隆抗体在临床情况下是有效的,如美罗华(Rituxan)(利妥昔单抗(Rituximab))、赫赛汀(Herceptin)(曲妥珠单抗(Trastuzumab))、索雷尔(Xolair)(奥马珠单抗(Omalizumab))、百克沙(Bexxar)(托西莫单抗(Tositumomab))、坎帕斯(CamPATH)(阿仑单抗(Alemtuzumab))、泽娃灵(Zevalin)、Oncolym和类似的调配物可以与本发明的抗体一起使用。

[0976] 还提供试剂盒,其包含以适用于先前方法的治疗有效量含有抗CD39抗体、抗CD73抗体和药学上可接受的载剂的药物组合物。试剂盒任选地还可以包含说明书,例如包括施用排程,以允许从业者(例如,医师、护士或患者)施用其中含有的组合物以将组合物施用到患有癌症(例如,实体肿瘤)的患者。试剂盒还可以包含注射器。

[0977] 任选地,试剂盒包含单剂量药物组合物的多个包装,其各自含有有效量的抗CD39或抗CD73抗体以根据上文提供的方法单一施用。用于施用药物组合物必须的仪器或装置也可包含在试剂盒中。举例来说,试剂盒可提供一种或多种含有一定量的抗CD39抗体的预填充注射器和含有一定量的抗CD73抗体的注射器,或含有抗CD39和抗CD73抗体两个量的注射器。

[0978] 在一个实施例中,本发明提供一种用于治疗人类患者的癌症的试剂盒,所述试剂盒包括:

[0979] (a)一定量的中和sCD39的活性的抗CD39抗体,任选地其中抗体包括抗体I-394、I-395、I-396或I-399的重链可变区的高变区(例如,CDR1、CDR2和CDR3结构域),和抗体I-394、I-395、I-396或I-399的轻链可变区的高变区(例如,CDR1、CDR2和CDR3结构域);

[0980] (b)一定量的结合CD73且中和CD73的活性的试剂,任选地其中试剂是抗CD73抗体;和

[0981] (c) 任选地,用于以本文所描述的任何方法使用抗CD39抗体和CD73结合剂的说明书。

[0982] 恶性肿瘤的诊断、预测和治疗

[0983] 描述适用于诊断、预后、监测、治疗和预防个体的癌症的方法。虽然本文中所述的治疗方案和方法特别适用于治疗实体肿瘤,但本文中所述的治疗方案和方法还可用于多种血液癌。本发明的方法和组合物用于例如治疗多种癌症和其它增殖疾病,包含(但不限于): 癌瘤,包含膀胱癌瘤、乳房癌瘤、结肠癌瘤、肾脏癌瘤、肝癌瘤、肺癌瘤、卵巢癌瘤、子宫癌瘤、前列腺癌瘤、胰脏癌瘤、胃癌瘤、子宫颈癌瘤、甲状腺癌瘤、头部和颈部癌瘤(头颈部鳞状细胞癌)和皮肤癌瘤(例如,黑素瘤);淋巴谱系的造血肿瘤,包含白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞性白血病、急性淋巴母细胞白血病、B细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkins lymphoma)、非霍奇金氏淋巴瘤、毛状细胞淋巴瘤和伯基特淋巴瘤(Burkett's lymphoma)以及多发性骨髓瘤;骨髓谱系的造血肿瘤,包含急性和慢性骨髓性白血病、前髓细胞白血病和骨髓发育不良综合症;间叶细胞源肿瘤,包含纤维肉瘤和横纹肌肉瘤;其它肿瘤,包含黑素瘤、精原细胞瘤、畸胎瘤、神经母细胞瘤和神经胶质瘤;中心和外围神经系统的肿瘤,包含星形细胞瘤、神经母细胞瘤、神经胶质瘤和神经鞘瘤;间叶细胞源的肿瘤,包含纤维肉瘤、面颈部横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma)和骨肉瘤;和其它肿瘤,包含黑素瘤、着色性干皮病、角化棘皮瘤、精原细胞瘤和甲状腺滤泡状癌。

[0984] 在一个实施例中,本文中所述的抗CD39抗体可以有利地用于治疗CD73阳性的癌症。因此,提供一种用于治疗或预防患有CD73阳性癌症的个体体内的癌症或传染病的方法,所述方法包括向个体施用结合单体人类CD39蛋白(例如,可溶性CD39和/或单体memCD39)且抑制其ATP酶活性的试剂。在一个实施例中,本公开提供一种用于治疗或预防个体体内的CD73阳性癌症的方法,所述方法包括:向个体施用结合可溶性人类CD39蛋白并抑制其活性的抗体。在一个实施例中,抗体结合单体人类CD39蛋白并抑制其ATP酶活性。

[0985] CD73阳性癌症是已知一般表征为肿瘤或肿瘤环境中存在CD73表达性细胞的癌症。因此,患有癌症的个体可在存在或不存在评估肿瘤微环境中细胞上(例如,肿瘤细胞、CD4 T细胞、CD8 T细胞、B细胞上)CD73表达的预先检测步骤下用抗CD39抗体治疗。

[0986] 任选地,治疗方法可包括检测来自个体的肿瘤的生物样品中(例如,癌症组织、癌症的近侧或外围组织、癌症邻近组织、邻近非肿瘤组织或正常邻近组织中)的CD73核酸或多肽的步骤。生物样品表征为CD73多肽,例如包括表达CD73的细胞的确定表明患有癌症的患者可强烈受益于利用抑制sCD39的试剂(任选地进一步结合抑制CD73的试剂)的治疗。患有适用于根据本公开的治疗的癌症的患者可确定为患有明显地表达CD73;以高水平(例如,与参考值相比,与健康个体相比,以对应于对利用抗CD73试剂治疗是较差反应者的个体的量,以对应于其肿瘤对一种或多种免疫疗法具有抵抗性的个体的量)表达CD73,示出了高强度的抗CD73抗体染色的肿瘤。

[0987] 在一个实施例中,所述方法包括测定生物样品中CD73核酸或多肽的表达量且将所述量与对应于健康个体的参考量进行比较。生物样品包括以与参考量相比增加的量表达CD73核酸或多肽的细胞的确定表明患者患有可以用抗CD39抗体治疗的癌症。任选地,检测生物样品中的CD73多肽包括检测恶性细胞、CD4 T细胞、CD8T细胞、B细胞的表面上表达的CD73多肽。在一个实施例中,生物样品包括明显地表达CD73核酸或多肽的细胞的确定表明

患者患有可以用抗CD39抗体治疗的癌症。当参考CD73多肽时，“明显地表达”意味着CD73多肽在取自给定患者的大量的细胞中表达。虽然术语“明显地表达”的定义并不结合精确百分比值，但在一些实例中，据说“明显地表达”的受体将存在于至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或更多的取自患者的肿瘤细胞或肿瘤组织或肿瘤邻近组织样品（例如，切片）中的细胞中。

[0988] 确定个体是否患有表征为表达CD73多肽的细胞的癌症可例如包括从个体获得生物样品（例如，通过进行切片），其包括来自癌症环境（例如，肿瘤或肿瘤邻近组织）的细胞；使所述细胞与结合CD73多肽的抗体接触；且检测细胞是否在其表面上表达CD73。任选地，确定个体是否具有表达CD73的细胞包括进行免疫组织化学测定。

[0989] 在一个实施例中，本公开提供一种用于治疗或预防有需要个体体内的癌症的方法，所述方法包括：

[0990] a) 检测肿瘤环境中，任选地肿瘤内和/或邻近组织内的CD73多肽（例如，CD73表达性细胞），且

[0991] b) 在确定肿瘤环境任选地以与参考量相比增加的量包括CD73之后，向个体施用药物组合物，其包括(a) 用于抑制CD39的活性的构件（例如，试剂或治疗、蛋白试剂、抗体试剂、核酸试剂或小分子试剂）和(b) 药学上可接受的载剂。在一个实施例中，试剂是结合可溶性人类CD39蛋白并抑制其活性的抗体。任选地，所述方法进一步包括向个体施用（即，除了CD39抑制剂之外）结合人类CD73蛋白并抑制其活性的试剂。任选地，所述方法进一步包括向个体施用除了CD39抑制剂之外的诱发从肿瘤细胞细胞外释放ATP和/或诱发肿瘤细胞的死亡的治疗（例如，试剂），其是放射疗法或包括化学治疗剂的组合物。任选地，检测肿瘤环境内的CD73多肽或CD73表达性细胞包括从个体获得包括癌症组织和/或癌症的近侧或外围组织（例如，癌症邻近组织、邻近非肿瘤组织或正常邻近组织）的生物样品，且检测CD73多肽或CD73表达性细胞的量。CD73表达性细胞可包括例如肿瘤细胞、CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、B细胞。

[0992] 本文提供的用于治疗癌症的组合疗法涉及施用中和抗CD39试剂（例如，抗体）和CD73中和剂（例如，抗体）以治疗罹患癌症的个体。在一个实施例中，本发明提供组合使用的抗CD39抗体和抗CD73抗体，以治疗具有实体肿瘤（例如，实体肿瘤、晚期顽固性实体肿瘤）的个体或具有血液肿瘤的个体。

[0993] 如本文中所使用，辅助或组合施用（共施用）包含以相同或不同剂型同时施用化合物或单独施用化合物（例如，连续施用）。因此，可以单一调配物形式同时施用抗CD39和抗CD73抗体。替代地，抗CD39和抗CD73抗体可以调配成用于单独施用和并行地或依序地施用。

[0994] 患有癌症的患者可以在存在或不存在评估肿瘤ATP酶活性、5'-外核苷酸酶活性、肿瘤腺苷积聚（例如，瘤内腺苷浓度）和/或细胞上（例如，循环和/或肿瘤浸润性白细胞、T Reg细胞、B细胞和/或肿瘤细胞上）的CD39和/或CD73表达的预先检测步骤下用抗CD39试剂和抗CD73试剂治疗。任选地，治疗方法可包括检测来自具有肿瘤的个体的生物样品（例如，包括肿瘤组织和/或肿瘤邻近组织的样品）中肿瘤ATP酶活性和/或肿瘤腺苷积聚（例如，升高的瘤内腺苷浓度）的步骤。生物样品具有例如与参考相比的升高的肿瘤ATP酶活性或肿瘤腺苷积聚（例如，瘤内腺苷浓度）的确定表明患有癌症的个体可强烈受益于利用抑制CD39的试剂以及抑制CD73的试剂的治疗。任选地，治疗方法可包括检测来自个体的肿瘤的生物样

品中的(例如,肿瘤细胞上的)CD39核酸或多肽的步骤。生物样品表达CD39(例如,肿瘤细胞、肿瘤浸润性细胞或一般地Treg细胞表达CD39,细胞以高含量表达CD39,较高数量的细胞为CD39阳性,高强度染色抗CD39抗体,与参考相比)的确定表明患有癌症的个体可强烈受益于利用抑制可溶性CD39蛋白的试剂任选地以及抑制CD73的试剂的治疗。

[0995] 任选地,治疗方法可包括检测来自个体的生物样品中的CD39核酸或多肽的步骤。生物样品的实例包含任何合适的生物流体(例如血清、淋巴、血液)、细胞样品或组织样品。生物样品中的细胞(例如,癌细胞、淋巴细胞,例如Treg细胞、B细胞、T细胞)以高含量表达CD39,样品中较高数量的细胞是CD39阳性或示出高强度抗CD39抗体染色(与参考相比)的任何确定可以表明患有癌症的个体可强烈受益于利用抑制CD39的试剂以及抑制CD73的试剂的治疗。在一个实施例中,治疗方法可包括检测来自个体的肿瘤的生物样品中的(例如,肿瘤浸润性细胞上的)CD39核酸或多肽的步骤。

[0996] 在治疗方法中,抗CD39抗体和CD73中和剂(例如,抗CD73抗体)可以单独地、一起或依序地或以混合液形式施用。在一些实施例中,在施用CD73中和剂之前施用抗CD39抗体。举例来说,可以在施用CD73中和剂之前大致0到30天施用抗CD39抗体。在一些实施例中,在施用CD73中和剂之前约30分钟到约2周、约30分钟到约1周、约1小时到约2小时、约2小时到约4小时、约4小时到约6小时、约6小时到约8小时、约8小时到1天或约1到5天施用抗CD39抗体。在一些实施例中,并行地进行施用抗CD39抗体和施用CD73中和剂。在一些实施例中,在施用抗CD73抗体之后施用抗CD39抗体。举例来说,可以在施用CD73中和剂之后大致0到30天施用抗CD39抗体。在一些实施例中,在施用CD73中和剂之后约30分钟到约2周、约30分钟到约1周、约1小时到约2小时、约2小时到约4小时、约4小时到约6小时、约6小时到约8小时、约8小时到1天或约1到5天施用抗CD39抗体。

[0997] 用于治疗患有癌症的人类的合适治疗方案包含(例如)向患者施用有效量的抑制CD39的活性的抗体和中和人类CD73的活性的抗体中的每一种,其中所述方法包括至少一个施用周期,其中抗CD39抗体的至少一个剂量是以每千克体重1-20毫克的剂量施用且抗CD73抗体的至少一个剂量是以每千克体重1-20毫克的剂量施用。在一个实施例中,施用周期在2周与8周之间。

[0998] 在一个实施例中,所述方法包括至少一个施用周期,其中周期是八周或更少的时段,其中对于至少一个周期中的每一个,抗CD39抗体的两个、三个或四个剂量是以每千克体重1-20毫克的剂量施用,且抗CD73抗体的两个、三个或四个剂量是以每千克体重1-20毫克的剂量施用。

[0999] 在一个实施例中,将抗CD39抗体以对中和sCD39和/或memCD39的酶活性有效的量施用所需时段,例如1周、2周、一个月,直到下一次后续施用抗CD39抗体。在一个实施例中,将抗体以提供至少等于抑制sCD39蛋白的ATP酶活性的 EC_{50} 、 EC_{70} 或 EC_{100} 的抗体血液浓度的剂量和/或频率施用,任选地其中浓度维持至少1周、2周、一个月或直到下一次后续施用抗CD39抗体。

[1000] 在一个实施例中,抗CD73抗体和抗CD39抗体通过静脉内施用。在一个实施例中,抗CD73抗体和抗CD39抗体在同一天,任选地另外约每两周一次,任选地另外通过静脉内施用。

[1001] 在本文中的任一实施例中,治疗可包括向个体施用中和CD39的酶活性的抗CD39抗体至少一个施用周期,其中将抗CD39抗体以在抗CD39抗体的两个后续施用之间实现对应于

至少体外 EC_{50} (例如, 0.01与0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间的 EC_{50}), 任选地 EC_{70} 或任选地 EC_{100} (中和CD39的酶活性(例如, 0.05与1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间, 0.1与1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间的 EC_{100})) 的血液(血清)或血管外组织(例如, 肿瘤环境)中的浓度和/或维持所述浓度的有效量至少一次, 任选地至少两次施用。体外 EC_{50} 、 EC_{70} 或 EC_{100} 可例如根据本文公开的用于测试抗CD39抗体的中和活性的方法来确定。可例如将抗体以实现和/或维持循环中或血管外组织(例如, 肿瘤环境)中至少约0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度的量施用。举例来说, 为实现血管外组织中0.05与1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间或0.1与1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间的浓度, 将抗CD39抗体以有效实现循环中0.5与10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间或1与10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间的抗CD39抗体浓度的量施用。任选地, 将抗CD39抗体至少两次且以在抗CD39抗体的两个后续施用之间和/或在整个施用周期中有效维持抗CD39抗体的浓度(至少前述浓度)的量施用至少1周、2周、3周、4周。

[1002] 在本文中的任一实施例中, 治疗可包括向个体施用中和CD73的酶活性的抗CD73抗体至少一个施用周期, 其中将抗CD73抗体以在抗CD73抗体的两个后续施用之间实现对应于至少体外 EC_{50} (例如, 0.01与0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间的 EC_{50}), 任选地 EC_{70} 或任选地 EC_{100} (中和CD73的酶活性(例如, 0.05与1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间, 0.1与1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间的 EC_{100})) 的血液(血清)或血管外组织(例如, 肿瘤环境)中的浓度和/或维持所述浓度的有效量施用至少一次, 任选地至少两次。可例如将抗体以实现和/或维持循环中或血管外组织(例如, 肿瘤环境)中至少约0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度的量施用。举例来说, 为实现血管外组织中0.05与1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间或0.1与1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间的浓度, 将抗CD73抗体以有效实现循环中0.5与10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间或1与10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间的抗CD73抗体浓度的量施用。任选地, 将抗CD73抗体至少两次且以在抗CD73抗体的两个后续施用之间和/或在整个施用周期中有效维持抗CD73抗体的浓度(至少前述浓度)的量施用至少1周、2周、3周、4周。

[1003] 在某些方面中, 抗CD39试剂和抗CD73试剂可用于治疗具有表征为一种或多种耗竭和/或免疫抑制标志物的免疫效应细胞的个体体内的癌症。

[1004] 在某些方面, 抗CD39试剂(任选地以及抗CD73试剂或任选地不与抗CD73试剂的治疗组合)可用于治疗个体体内的癌症, 所述个体具有对抗CD73试剂的反应的不良疾病预后, 例如由指示缺乏充分抗肿瘤免疫反应、指示免疫耗竭和/或指示免疫抑制的一个或多个标志物证明的不良预后, 尤其对利用中和CD73的试剂(例如, 抗CD73抗体)治疗的反应的不良预后。基于一种或多种预测因素, 具有不良疾病预后的个体例如处于较高发展风险下。在一个实施例中, 预测因数包括具有或缺乏一个或多个基因突变。在一个实施例中, 预测因数包括一种或多种基因或蛋白(例如, 基因标签)的表达量。

[1005] 在一个实施例中, 预测因数包括循环中或肿瘤环境中表达CD39和/或CD73的细胞存在(例如, 数量), 和/或循环中或肿瘤环境中细胞上的CD39和/或CD73的表达量; 在一个实施例中, 细胞是肿瘤细胞; 在一个实施例中, 细胞是白细胞, 例如B细胞、调节性T细胞(Treg)。CD39和/或CD73的高表达和/或CD39和/或CD73表达性细胞的升高量的存在可表明个体对用中和CD73的抗体的治疗的反应具有不良预后。

[1006] 在一个方面中, 抗CD39试剂可用于治疗无反应的, 或对利用中和CD73的试剂(例如, 抗CD73抗体)的治疗经历部分地或不完整反应, 或疾病已在利用中和CD73的试剂的治疗之后发展的个体体内的癌症。在一个实施例中, 个体用抗CD39试剂进行治疗而不与中和CD73的试剂组合治疗(例如, 以抗CD39单药疗法形式, 或抗CD39抗体和除中和CD73的试剂以

外的第二治疗剂的组合形式)。在另一实施例中,个体用抗CD39试剂以及中和CD73的试剂进行治疗。

[1007] 在一个方面中,抗CD39试剂可用于治疗对抑制CTLA-4或PD-1轴的试剂(例如,抗体)的反应具有不良预后,或是无反应者,或对利用抑制CTLA-4或PD-1轴的试剂(例如,抗体)的治疗经历部分或不完整反应,或疾病在利用抑制CTLA-4或PD-1轴的试剂(例如,抗体)治疗之后发展的个体体内的癌症。在一个实施例中,个体用抗CD39试剂进行治疗而不与中和CD73的试剂组合治疗(例如,以抗CD39单药疗法形式,或抗CD39抗体和除中和CD73的抗体以外的第二治疗剂的组合形式)。在另一实施例中,个体用抗CD39试剂以及中和CD73的抗体进行治疗。

[1008] 抗CD39抗体组合物,任选地进一步组合结合且抑制CD73的试剂可任选地是利用一种或多种其它治疗或治疗剂的组合(进一步组合)治疗。这类治疗剂包含(但不限于)抗癌剂和化学治疗剂。

[1009] 在一个实施例中,另外的治疗剂是诱导肿瘤细胞死亡的试剂或治疗,例如能够诱导从肿瘤细胞细胞外释放ATP的试剂或治疗,诱导免疫原性癌症细胞死亡的试剂或治疗。细胞外ATP在压力(机械、低渗或低氧)的情况下或在细胞死亡的情况下从肿瘤细胞中释放。坏死有利于通过释放总细胞含量被动释放ATP,然而细胞凋亡有利于通过活化分解及活化Panexin1(ATP转运蛋白)的卡斯蛋白酶3和9释放ATP。诱导从肿瘤细胞中细胞外释放ATP的试剂的实例可以包含化疗、放射疗法,并且更一般来说,诱导细胞凋亡且进而有利于ATP释放的试剂。诱导细胞外释放ATP的试剂已示出诱导免疫原性细胞死亡。举例来说,实质性ATP释放是通过蒽环霉素(anthracyclines)、奥沙利铂(oxaliplatin)、顺铂和X射线诱发。诱导细胞外释放ATP的试剂的其它实例可以包含紫杉烷、蒽环霉素、喜树碱、埃博霉素、丝裂霉素、风车子抑素(combretastatins)、长春花生物碱、氮芥、类美登素(maytansinoids)、刺孢霉素(calicheamycins)、倍癌霉素、微管溶素、海兔毒素(dolastatins)和奥瑞他汀(auristatins)、烯二炔、毒伞毒素(amatoxins)、吡咯并苯并二氮呋、乙烯亚胺、放射性同位素、治疗性蛋白质和肽以及毒素或其片段。试剂可以呈任何合适的构形或调配物形式,包含例如呈游离化合物形式或呈共轭物的部分形式。试剂可适宜地共轭到靶向部分,如呈免疫共轭物形式。术语“免疫共轭物”和“抗体共轭物”可互换地使用且是指抗原结合剂,例如抗体结合蛋白或共轭到另一部分(例如,细胞毒性剂)的抗体。包括共轭到细胞毒性剂的抗原结合剂的免疫共轭物还可被称作“抗体药物共轭物”或“ADC”。

[1010] 在一个实施例中,另外的治疗剂是抑制CTLA-4或PD-1轴(即,抑制PD-1或PD-L1)的试剂(例如,抗体)。结合CTLA-4、PD1或PD-L1的抗体可例如以示范性的剂量和/或频率使用,这类试剂用作单药疗法,例如如下所述。

[1011] 在一个实施例中,第二或额外的第二治疗剂是抑制CTLA-4或PD-1轴(即,抑制PD-1或PD-L1)的试剂(例如,抗体)。结合CTLA-4、PD1或PD-L1的抗体可例如以示范性剂量和/或频率使用,这类试剂用作单药疗法,例如如下所述。

[1012] PD-1是CD28受体家族的抑制性成员,所述家族还包含CD28、CTLA-4、ICOS和BTLA。PD-1表达在活化的B细胞、T细胞和骨髓细胞上(Okazaki等人(2002)《免疫学当前观点(Curr.Opin.Immunol.)》14:391779-82;Bennett等人(2003)《免疫学杂志(J Immunol)》170:711-8)。已经标识了PD-1的两种配体:PD-L1和PD-L2,其已示出在与PD-1结合后下调T

细胞活化(Freeman等人(2000)《实验医学杂志(J Exp Med)》192:1027-34;Latchman等人(2001)《自然·免疫学(Nat Immunol)》2:261-8;Carter等人(2002)《欧洲免疫学杂志(Eur J Immunol)》32:634-43)。PD-L1在多种人类癌症中是充裕的(Dong等人(2002)《自然医学(Nat.Med.)》8:787-9)。PD-1与PD-L1之间的相互作用引起肿瘤浸润淋巴细胞的减少,T细胞受体介导的增殖降低和癌细胞的免疫逃避。免疫抑制可以通过抑制PD-1与PD-L1的局部相互作用反转,且当同样阻断PD-1与PD-L2的相互作用时,效果累加。阻断PD-1可有利地涉及使用防止PD-L1诱导的PD-1信号传导的抗体,例如通过阻断与其天然配体PD-L1的相互作用。在一个方面,抗体结合PD-1(抗PD-1抗体);这类抗体可阻断PD-1与PD-L1之间和/或PD-1与PD-L2之间的相互作用。在另一方面,抗体结合PD-L1(抗PD-L1抗体)且阻断PD-1与PD-L1之间的相互作用。

[1013] 当前存在出售或临床评估的至少六种阻断PD-1/PD-L1路径的试剂,这些试剂中的任一种可适用于与本公开的抗CD73抗体组合。一种试剂是BMS-936558(纳武单抗/ONO-4538,Bristol-Myers Squibb;先前的MDX-1106)。纳武单抗(商标名**Opdivo®**)是FDA审批通过的完全人类IgG4抗PD-L1 mAb,其抑制PD-L1配体与PD-1和CD80两个的结合且在W0 2006/121168中描述为抗体5C4,其公开内容通过引用并入本文中。对于黑素瘤患者,在3mg/kg剂量下观测到最显著OR,但对于其它癌症类型,在10mg/kg下观测到最显著OR。纳武单抗一般每3周以10mg/kg给药直到癌症发展。

[1014] 另一试剂是度伐单抗(durvalumab)(**Imfinzi®**,MEDI-4736),由AstraZeneca/Medimmune开发且描述于W02011/066389和US2013/034559中的抗PD-L1。

[1015] 另一试剂是MK-3475(来自Merck的人类IgG4抗PD1 mAb),还被称作拉立珠单抗(lambrolizumab)或派立珠单抗(商标名**Keytruda®**)已经FDA审批通过用于治疗黑素瘤且正测试用于其它癌症中。派立珠单抗以每2周或3周2mg/kg或10mg/kg进行测试直到疾病发展。

[1016] 另一试剂是阿特珠单抗(**Tecentriq®**,MPDL3280A/RG7446,罗氏(Roche)基因泰克(Genentech)),一种含有经设计以通过最小化Fc γ R结合和随之发生的抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)来优化功效和安全性的经工程改造Fc结构域的人类抗PD-L1 mAb。将 ≤ 1 、10、15和25mg/kg剂量的MPDL3280A每3周施用持续至多1年。在阶段3试验中,在NSCLC中通过静脉内输注每三周以1200mg施用MPDL3280A。

[1017] 其它已知PD-1抗体和其它PD-1抑制剂包含西米普利单抗(cemiplimab)(赛诺菲(Sanofi)及雷杰纳荣(Regeneron)制药)、MGA012(Macrogenics公司和Incyte公司)、匹利珠单抗(pidlizumab)(CT-011;CureTech)(来自CureTech/Teva的人类化IgG1抗PD1mAb,参见例如W02009/101611)、AMP-224(B7-DC/IgG1融合蛋白,GSK授权)、描述于W0 2012/145493中的AMP-514、抗体YW243.55。描述于W02010/077634中的S70(抗PD-L1),MDX-1105(又称为BMS-936559)是描述于W02007/005874中的由Bristol-Myers Squibb研发的抗PD-L1抗体,和描述于W02006/121168、W02009/014708、W02009/114335和W02013/019906中的抗体和抑制剂,其公开内容特此以引用之方式并入。抗PD1抗体的其它实例公开于W02015/085847中(上海恒瑞制药公司)还可使用与这些抗体中的任一种竞争以结合于PD-1或PD-L1的抗体。

[1018] CTLA-4(细胞毒素T淋巴细胞相关蛋白4),又称为CD152,是CD28受体家族的另一抑

制性成员,且表达于T细胞上。结合且抑制CTLA-4的抗体是所属领域中已知的。在一个实例中,抗体是伊派利单抗(商标名Yervoy®,Bristol-Myers Squibb),一种人类IgG抗体。在一个实例中,抗体是曲美单抗(CP-675,206;Medimmune/AstraZeneca)。用于Yervoy的示范性施用方案是每三周在90分钟内静脉内3mg/kg。在一个实例中,与本公开的抗CD73抗体组合使用的抗体是与伊派利单抗或曲美单抗竞争以结合于CTLA-4的抗体。

[1019] 实例

[1020] 方法

[1021] CD39突变体的生成

[1022] 通过PCR生成CD39突变体。扩增的序列在琼脂糖凝胶上电泳,并且使用Macherey Nagel PCR Clean-Up Gel Extraction试剂盒(参考740609)纯化。然后用ClonTechInFusion系统将每种突变体生成的纯化PCR产物连接到表达载体中。将含有突变序列的载体制备成Miniprep并且测序。测序之后,使用Promega PureYield™ Plasmid Midiprep系统,将含有突变序列的载体制备成Midiprep。HEK293T细胞在DMEM培养基(Invitrogen)中生长,使用Invitrogen的Lipofectamine 2000用载体转染,并且在测试转基因表达之前,在37℃下在CO2培养箱中温育48小时。在Hek-293T细胞中转染突变体,如下表所示。使用SEQ ID NO:2的编号示出下表1中的靶向氨基酸突变。

[1023] 表1

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

[1025] 可溶性huCD39的克隆、生产和纯化

[1026] 分子生物学

[1027] 使用以下引物TACGACTCACAAGCTTGCCGCCACCATGGAAGATACAAAGGAGTC(SEQ ID NO:38)(正向)和CCGCCCCGACTCTAGATCACTTGTCATCGTCATCTTTGTAATCGA CATAGGTGGAGTGGGAGAG(SEQ ID NO:56)(反向),从人类PBMC cDNA克隆huCD39蛋白。然后使用InFusion克隆系统,

将纯化PCR产物克隆到表达载体中。在蛋白质的C末端部分加入M2标签(SEQ ID NO:39中带下划线的FLAG标签)用于纯化步骤;应当理解,在任何实施例中,(例如,SEQ ID NO:54的)CD39细胞外结构域蛋白可以任选地被指定为缺少M2标签。

[1028] huCD39蛋白的表达和纯化

[1029] 在验证克隆的序列之后,对CHO细胞进行核转染,并且随后亚克隆产生库以获得产生huCD39蛋白的细胞克隆。收获来自在滚筒中生长的huCD39克隆的上清液,并且使用M2色谱柱纯化,并且使用M2肽洗脱。然后将纯化蛋白质装载到S200尺寸排阻色谱柱上。在TBS pH7.5缓冲液中调配对应于单体的纯化蛋白质。没有M2标签的CD39-M2细胞外结构域重组蛋白的氨基酸序列如下:

[1030] MEDTKESNVKTFCSKNILAILGFSSIIAIVALLAVGLTQNKALPENVKYGIVLDAGSSHTSLYIYKWPA
EKENDTGCVVHQVEECRVKGPISKVFQKVNEIGIYLTDCMERAREVIPRSQHQETPVYLGATAGMRLLRMESEELAD
RVL DVVERSLSNYPDFDQGARIITGQEEGAYGWITINYLLGKFSQKTRWFSIVPYETNNQETFGALDLGGASTQVTF
VPQNQTIESPDNALQFRLYGKDYNVYTHSFLCYGKDQALWQKLAKDIQVASNEILRDPCFHPGYKKVVNVSDLYKTP
CTKRFEMTLPFQQFEIQGIGNYQQCHQSILELFNTSYCPYSQCAFNGIFLPPLQGDFGAFSAFYFVMKFLNLTSEKV
SQEKVTEMMKKFCAQPWEEIKTSYAGVKEKYLSEYCFSGTYILSLLLQGYHFTADSWEHIHFIGIKIQGSDAGWTLGY
MLNLTNMIPAEQPLSTPLSHSTYV

[1031] (SEQ ID NO:5)。

[1032] 具有M2标签的CD39-M2细胞外结构域重组蛋白的最终氨基酸序列如下:MEDTKESN
VKTFCSKNILAILGFSSIIAIVALLAVGLTQNKALPENVKYGIVLDAGSSHTSLYIYKWPAEKENDTGCVVHQVEECR
VKGPISKVFQKVNEIGIYLTDCMERAREVIPRSQHQETPVYLGATAGMRLLRMESEELADRVLDVVERSLSNYPFD
FQGARIITGQEEGAYGWITINYLLGKFSQKTRWFSIVPYETNNQETFGALDLGGASTQVTFVPQNQTIESPDNALQF
RLYGKDYNVYTHSFLCYGKDQALWQKLAKDIQVASNEILRDPCFHPGYKKVVNVSDLYKTPCTKRFEMTLPFQQFEI
QGIGNYQQCHQSILELFNTSYCPYSQCAFNGIFLPPLQGDFGAFSAFYFVMKFLNLTSEKVSQEKVTEMMKKFCAQP
WEEIKTSYAGVKEKYLSEYCFSGTYILSLLLQGYHFTADSWEHIHFIGIKIQGSDAGWTLGYMLNLTNMIPAEQPLST
PLSHSTYVDYKDDDDK

[1033] (SEQ ID NO:54)。

[1034] 抑制可溶性CD39的酶活性

[1035] 使用Cell Titer Glo™(Promega,参考G7571)(其允许通过使用生成与存在的ATP量成比例的发光信号的试剂评估ATP水解)评估抗体对产生的可溶性CD39蛋白的酶活性的抑制。以这种方式,可以评估可溶性CD39-介导的ATP水解的抑制。简单来说,在37℃下,将100μg/ml到 6×10^{-3} μg/ml剂量范围的抗CD39抗体与400ng/ml具有方法部分(SEQ ID NO:54)中所描述的氨基酸序列的可溶性重组人类CD39蛋白一起温育1小时。在加入CTG(Cell Titer Glo)试剂之前,在37℃下将20μM ATP加入培养板中持续另外30分钟。在黑暗中短暂温育5分钟之后,使用Enspire™发光计对发射光进行定量。通过将抗体存在下的发射光与单独的ATP(最大光发射)以及与可溶性CD39蛋白一起的ATP(最小光发射)进行比较,确定抗CD39抗体功效。

[1036] 抑制细胞CD39的酶活性

[1037] 使用Cell Titer Glo™(Promega,参考G7571)(其允许通过使用生成与存在的ATP量成比例的发光信号的试剂评估ATP水解)评估抗体对CD39表达性细胞中CD39酶活性的抑

制。因此设计测定,以允许评估对细胞培养上清液中CD39水解的ATP的抑制。简单点说,在37℃下,将 5×10^4 个Ramos人类淋巴瘤细胞、 5×10^3 个人类CD39、食蟹猴CD39和小鼠CD39表达性CHO细胞与30μg/ml到 5×10^{-4} μg/ml的抗CD39抗体一起温育1小时。然后在37℃下,将细胞与20μM ATP再温育1小时。将培养板在400g下离心2分钟,并且将50μl细胞上清液转移在发光微板(白色孔)中。将50μl CellTiter-Glo®试剂(CTG)加入到上清液中,并且在黑暗中温育5分钟之后,使用Enspire™发光计对发射光进行定量。通过将抗体存在下的发射光与单独的ATP(最大光发射)以及与细胞一起的ATP(最小光发射)进行比较,确定抗CD39抗体功效。

[1038] 抗体的生成:小鼠中的免疫和筛选

[1039] 为了获得抗人类CD39抗体,用上述重组人类CD39-M2细胞外结构域重组蛋白免疫Balb/c小鼠。小鼠以腹腔注射方式接受一次50μg CD39蛋白和完全弗氏佐剂乳液的初次免疫,以腹腔注射方式接受50μg CD39蛋白和不完全弗氏佐剂乳液进行第2次免疫,并且最后以静脉注射方式接受10μg CD39蛋白加强免疫。免疫脾细胞在用X63.Ag8.653永生化B细胞增强之后3天融合,并且在照射脾细胞的存在下培养。将杂交瘤接种含有半固体甲基纤维素的培养基中,并且使用clonepix 2设备(分子仪器公司(Molecular Devices))挑取生长的克隆。

[1040] 实例1:已知的中和CD39 mAb的表位作图

[1041] 为了深入了解抑制细胞CD39的酶(ATP酶)活性的抗体功能,我们研究了抗体结合的表位,据报道,所述抗体在细胞测定中抑制CD39的ATP酶活性:在PCT公开第W02009/095478号中公开的BY40。

[1042] 为了定义抗CD39抗体的表位,我们设计了CD39突变体,其由CD39表面上方的分子表面暴露的氨基酸取代定义。使用SEQ ID NO:2的编号,突变体在Hek-293T细胞中转染,如表1中所示。

[1043] 通过流式细胞术在20个生成的突变体上测试I-394的剂量范围(10-2.5-0.625-0.1563-0.0391-0.0098-0.0024-0.0006μg/ml)。BY40抗体均完全丧失与表达CD39的突变体5的细胞的结合,而不丧失与任何其它突变体的结合。突变体5在残基Q96、N99、E143和R147处含有氨基酸取代。图3A中示出了突变体5在CD39表面上的位置。

[1044] 实例2:已知的中和CD39 mAb不能抑制重组可溶性CD39蛋白的ATP酶活性

[1045] 据报道在细胞测定中抑制CD39的ATP酶活性的两种抗体(BY40和BY12)被评估,以确定是否能够抑制重组可溶性CD39蛋白的ATP酶活性。使用Cell Titer Glo™(Promega,参考G7571),评估抗体对如上所述产生的可溶性CD39蛋白的酶活性的抑制。如上所述评估了抗体对细胞CD39蛋白的酶活性的抑制。

[1046] 正如所料,BY40抑制细胞中CD39蛋白的ATP酶活性。然而,BY40不能抑制可溶性CD39蛋白的酶活性。图2B示出了BY40与本文标识的新抗体的对比。

[1047] 实例3:筛选新的mAb以阻断sCD39活性

[1048] 进行了一系列免疫,以便寻找中和sCD39的ATP酶活性的抗体。为了获得抗人类CD39抗体,用上述重组人类CD39-M2细胞外结构域重组蛋白使动物免疫。使用不同方案并在不同动物中,总共进行15个免疫系列。包含不同的小鼠品系、大鼠和兔子。

[1049] 在初始免疫方案中,初步筛选涉及使用野生型CHO和CHO表达性huCD39细胞系,通过流式细胞术测试生长克隆的上清液(SN)。分别用0.1μM和0.005μM CFSE对细胞进行染色。

对于流式细胞术筛选,所有细胞均匀混合,并且用APC标记的山羊抗小鼠多克隆抗体(pAb)揭示上清液中反应抗体的存在。对于结合huCD39的抗体,随后使用上文研发且描述的筛选测定(方法)筛选抑制可溶性CD39的酶活性的上清液。

[1050] 结果示出虽然可以获得许多特异性CD39结合抗体,但是来自任何这些免疫的抗体均未示出对可溶性CD39的酶活性的任何抑制。一种可能性是CD39上的显性表位不包含合适地定位在所述CD39的催化位点处或附近的任何表位。鉴于可用于抑制细胞CD39的少数抗体以及使用抗体抑制酶的催化位点的已知困难,缺乏中和sCD39的抗体可能表明不可能获得抑制可溶性(细胞外结构域)CD39的抗体。其它可能性涉及非功能性筛选测定和/或不正确折叠或功能性可溶性CD39蛋白,特别是因为缺乏可以抑制可溶性CD39的任何抗体阻碍了sCD39阻断测定的验证。

[1051] 鉴于不存在能够抑制可溶性CD39的抗体,用筛选方案进行另一免疫,所述筛选方案设计成有利于生成结合如抗体BY40的表位所标识的CD39的活性位点的抗体。简单点说,初始筛选涉及使用野生型CHO和CHO表达性huCD39细胞系通过流式细胞术测试生长克隆的上清液(SN),如前述免疫,随后筛选与野生型CD39相比,丧失对表达CD39突变体5的Hek-293T细胞的结合,如表1中所示。突变体5在残基Q96、N99、E143和R147处具有取代。然而,结果再次示出虽然可以获得许多特异性CD39结合抗体,其示出与突变体5的结合丧失,但来自任何初始免疫的抗体均未示出对可溶性CD39的酶活性的任何抑制。

[1052] 实例4:标识作为表位定向筛选的一部分抑制sCD39活性的第一抗体

[1053] 我们试图标识不结合Q96、N99、E143和R147区(由突变体5定义)的抗CD39抗体,以便具有不与BY40样抗体竞争的抗体。不需要具有阻断CD39的ATP酶活性的任何能力的这类抗体可以用于抑制结合BY40结合位点的细胞CD39的抗体的药理学研究,例如,在抑制细胞CD39的BY40或BY40样抗体的存在下,检测细胞上的游离CD39蛋白并对其进行定量。

[1054] 从实例3的免疫结果开始,其中筛选丧失了与CD39突变体5结合的杂交瘤,选择示出未丧失与CD39突变体5的结合的杂交瘤。这种杂交瘤(I-394)属于更广泛的库,可能是由于表明与突变体5的结合可能部分降低的不确定数据,但I-394并未丧失与突变体5的结合,并且因此最初没有保留。

[1055] 在抑制可溶性CD39的酶活性的进一步免疫上清液的持续筛选的上下文中,已经克隆且产生的抗体I-394包含作为对照。令人惊讶的是,尽管抗体I-394未在表位定向筛选中所保留的克隆当中,但这一抗体在上述测定(方法)中示出对可溶性CD39的酶活性的较强抑制。

[1056] 产生具有IgG1同种型的人类恒定区,以及具有突变L234A/L235E/G237A/A330S/P331S(Kabat EU编号)的经修饰Fc结构域的I-394,这导致缺乏与人类Fc γ 受体CD16A、CD16B、CD32A、CD32B和CD64的结合,简单点说,将I-394抗体的VH和Vk序列(分别在SEQ ID NO:6和7中示出的VH和Vk可变区)克隆到含有huIgG1恒定结构域的表达载体中,所述恒定结构域分别具有上述突变和huCk恒定结构域。将两种所获载体共转染到CHO细胞系中。建立的细胞库用于在CHO培养基中产生抗体。随后使用蛋白A纯化抗体。以下示出I-394的相应重链和轻链可变结构域的氨基酸序列(加下划线的Kabat CDR)。

[1057] I-394重链可变结构域序列:

[1058] EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYNMHWVKQSHGRTLEWIGYIVPLNGGSTFNQKFKG R

ATLTVNTSSRTAYMELRSLTSEDSAAYYCARGGTRFAYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO:6)。

[1059] I-394轻链可变结构域序列:

[1060] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASEVDNFGVSFMYWFQQKPGQPPNLLIYGASNQSGVPARF R
GSGSGTDFSLNIHPMEADDTAMYFCQQTKEVPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:7)。

[1061] 以下示出具有人类IgG1恒定区的I-394及L234A/L235E/G237A/A330S/P331S取代
(保持N297连接糖基化)的重链和轻链序列:

[1062] I-394重链序列:

[1063] EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYNMHWVKQSHGRTLEWIGYIVPLNGGSTFNQKFKGRAT
LTVNTSSRTAYMELRSLTSEDSAAYYCARGGTRFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTH
TCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[1064] (SEQ ID NO:52)。

[1065] I-394轻链序列:

[1066] DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASEVDNFGVSFMYWFQQKPGQPPNLLIYGASNQSGVPARFRGS
GSGTDFSLNIHPMEADDTAMYFCQQTKEVPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[1067] (SEQ ID NO:53)。

[1068] 随后测试抗体I-394与CD39突变体结合的丧失,所述CD39突变体通过CD39表面上
方的分子表面处暴露的氨基酸取代定义。使用SEQ ID NO:2的编号,突变体在Hek-293T细胞
中转染,如表1中所示。通过流式细胞术,在20种突变体上测试抗体I-394的剂量范围。如图
3B所示,I-394示出完全丧失与表达CD39的突变体19的细胞的结合。突变体19包含残基
R138、M139和E142处的取代。因此,I-394的核心表位包含一个或多个(或所有)残基R138、
M139和E142。

[1069] 与先前丧失与突变体5的结合并具有抑制细胞CD39但不抑制溶解性CD39的能力的
抗体BY40不同,抗体I-394丧失与邻近突变体19的结合,与突变体5的结合强烈减少(但与突
变体5具有一定残余结合)。有趣的是,突变体19的残基与残基5的残基非常接近或邻近,使
得I-394可以代表与BY40相比的表位移位。因此,抗体I-394为抗CD39抗体呈现了有价值
的新表位,其允许抑制可溶性CD39蛋白的ATP酶活性。还提供特异性阳性对照,其允许验证和
测试筛选测定,以检测中和可溶性CD39蛋白的ATP酶活性的其它抗体。

[1070] 实例5:用于sCD39中和mAb的非表位定向筛选

[1071] 基于表明抗体介导的可溶性CD39的抑制是可能的实例4的结果,重新讨论使用实
例3的不同方案的不同免疫的融合,以寻找中和sCD39的ATP酶活性的抗体。

[1072] 随后评估用于筛选ATP酶抑制的不同方法。在一个实验中,使用I-394抗体刺激来
自实例3的免疫的杂交瘤的上清液,发现其抑制可溶性CD39的ATP酶活性的能力是阴性的。
向上清液中添加此I-394不能恢复阴性上清液抑制CD39的ATP酶活性的能力。随后使用蛋白
A包被的珠粒从阴性上清液中纯化抗体I-394,并且我们观察到纯化的I-394再次能够抑制
ATP酶活性的恢复。

[1073] 鉴于上述结果,开发新的免疫和筛选方案,其中使用野生型CHO和CHO表达性huCD39细胞系,通过流式细胞术筛选来自新的和过去免疫的生长克隆,而不评估可溶性CD39或细胞CD39 ATP酶活性的抑制,并且没有表位的筛选偏差。虽然一些杂交瘤可获得与突变体5或19丧失结合的数据,但这类数据不用于克隆选择,而仅保留用于在ATP酶阻断测定中出现阴性结果的情况下拯救杂交瘤用于克隆目的。选择并克隆结合CD39的杂交瘤,并且随后根据以下方案使用蛋白A进行纯化:

[1074] -向300 μ l杂交瘤上清液中加入10 μ l蛋白A珠粒

[1075] -加入NaCl到最终浓度为1,5M

[1076] -在4 $^{\circ}$ C下将试管旋转3-4h

[1077] -以1500rpm离心1min

[1078] -消除上清液,并且用1ml TBS进行三次洗涤

[1079] -在第三次洗涤之后,消除所有TBS

[1080] -加入50 μ l柠檬酸盐0.1M pH3,匀质化并且在室温下温育5min

[1081] -以1500rpm离心珠粒1min

[1082] -收获50 μ l洗脱液,并且快速加入450 μ l TBS,并且存储在4 $^{\circ}$ C下

[1083] 随后在对比测定中筛选所获得抗体抑制CD39的ATP酶活性达到与I-394类似程度的能力。用于抑制可溶性和细胞CD39的酶活性的测定如上文所述(方法)。令人惊讶的是,在通过这种方式产生的示范性抗体中,几种示出了对可溶性CD39的抑制(以及对细胞CD39的抑制)。图1示出了代表性的筛选结果,其示出了与阳性对照I-394抗体相比的抗体I-397、I-398和I-399。类似地,来自不同免疫的抗体I-395和I-396抑制可溶性CD39蛋白的酶活性。图2A和2B示出了抗体I-395和I-396的结果,其中更大量的抗体可用于可溶性和细胞CD39中和两个的额外实验。图2A示出了与BY40和I-394抗体相比,抗体I-395和I-396两个都抑制细胞膜结合的CD39,与BY40相比,I-394和I-395两个都示出了更高的效力和对细胞CD39的最大抑制。图2B示出了与BY40和I-394抗体相比,抗体I-395和I-396两个均抑制可溶性CD39。虽然BY40在任何浓度下都不抑制可溶性CD39,但I-394、I-395和I-396都抑制可溶性CD39,其中I-394示出最大效力,接着是I-395,并且随后是具有较低效力的I-396。

[1084] 所获得结果提高了杂交瘤上清液中的一个或多个因子在细胞培养物和可溶性CD39测定中快速水解ATP的可能性,使得在使用常规方法筛选抗体时未检测到ATP的信号。可溶性因子可以是CD39或一些其它酶,例如由融合配偶体产生的。

[1085] 随后克隆抗体,进行修饰以具有带突变L234A/L235E/G237A/A330S/P331S(Kabat EU编号)的IgG1 Fc结构域的人类恒定区,其导致缺乏与人类Fc γ 受体CD16A、CD16B、CD32A、CD32B和CD64的结合,以与本文对I-394所示的方式相同。随后可以对所得抗体进行滴定,并且随后进行更详细的活性评估,如实例7-9所示(滴定、抑制ATP酶活性),以评估EC₅₀和IC₅₀测定,以根据效力对抗体进行分级。

[1086] 实例6:sCD39中和mAb的表位作图

[1087] 如实例4中所示,I-394示出完全丧失与表达CD39的突变体19的细胞的结合,但不会丧失与突变体5的结合。为了定义实例5的其它抗CD39抗体的表位,如实例1和表1中所述,测试它们与CD39突变体组的结合丧失。如表1中所示,使用SEQ ID NO:2的编号,使突变体在Hek-293T细胞中转染。通过流式细胞术在20个生成的突变体上测试测试抗体的剂量范围

(10-2.5-0.625-0.1563-0.0391-0.0098-0.0024-0.0006 μ g/ml)。

[1088] 结果示出了实例5中选择的抗体抑制可溶性CD39的能力代表几种不同的表位。在实例5中示出对可溶性细胞外CD39进行抑制的抗体中,抗体I-395是以下抗体的实例,所述抗体显示与在残基Q96、N99、E143和R147处具有取代的突变体5丧失结合,以及与在残基R138、M139和E142处具有取代的突变体19丧失结合。突变体19包含残基R138、M139和E142处的取代。因此,I-395的CD39上的核心表位包括残基Q96、N99、E143和R147中的一个、两个、三个或四个残基以及残基R138、M139和E142中的一个、两个或三个残基。

[1089] 另一方面,抗体I-398是以下抗体的实例,所述抗体显示与在残基R138、M139和E142处具有取代的突变体19丧失结合,但并未降低或丧失与在残基Q96、N99、E143和R147处具有取代的突变体5的结合。

[1090] 实例5中示出对可溶性细胞外CD39进行抑制的其它抗体具有非常不同的表位,并且没有示出与突变体5或19中的任一种丧失结合,从而表明可溶性CD39也可以通过结合sCD39上的其它位点而被抑制。对于一些抗体,与表1的20种突变体之一丧失结合允许CD39上的结合位点的定位,而对于其它抗体,结合位点仍然待确定,因为它们不会丧失与20种突变体中的任何突变体的结合。在实例5中示出抑制可溶性CD39的ATP酶活性的抗体中,抗体I-396示出与具有取代K87A、E100A和D107A的突变体15丧失结合,而不丧失与其它20种突变体中的任何突变体的结合。因此,这一抗体的CD39上的核心表位包括一个或多个(或所有)残基K87、E100和D107。抗体I-399示出了与具有取代N371K、L372K、E375A、K376G、V377A以及K376与V377之间插入的缬氨酸(在表1中称为“插入377V”)的突变体11丧失结合,而不丧失与其它20个突变体中的任何突变体的结合。因此,这一抗体的CD39上的核心表位包括一个或多个(或所有)残基N371、L372、E375、K376和V377。图3A示出了突变体5(M5)、15(M15)和19(M19)中突变的残基在CD39蛋白表面上的位置。图3B示出了针对不同抗体,结合于突变体5、15和19的结果。

[1091] 因此,结果示出了可以针对不同表位获得抑制可溶性CD39的抗体。表位包含由突变体19的一个或多个残基定义的表位,其位于BY40或BY40样抗体的结合位点附近,其仅抑制细胞CD39但不抑制可溶性CD39(其丧失与突变体5的结合);由突变体19的一个或多个残基,但也部分地由突变体5定义的表位,表明与BY40或BY40样抗体相比,可能有较小的移位;由突变体19的一个或多个残基,而不由突变体5的残基定义的表位;以及其它表位,如由突变体11的一个或多个残基或突变体15的一个或多个残基,或者进一步由与任何突变体5、15或19(表位的定位有待确定)的结合没有任何降低的其它抗体定义的那些表位。

[1092] 实例7:通过流式细胞术在CD39表达性细胞上进行抗体滴定

[1093] 在两个重复实验中,测试抗体I-394与表达人类CD39的CHO细胞、表达食蟹猴(cynomolgus)(食蟹猴(macacafascicularis))CD39的CHO细胞、表达鼠类CD39的CHO细胞和人类Ramos淋巴瘤细胞(ATCCTM,参考CRL-1596)的结合。使细胞与30 μ g/ml到5 $\times 10^{-4}$ μ g/ml各种浓度的未经过标记的抗CD39抗体一起在4 $^{\circ}$ C下温育30分钟。洗涤之后,将细胞与经过山羊抗小鼠H+L标记的第二抗体在4 $^{\circ}$ C下温育30min。

[1094] 结果示出在图4中。抗体I-394结合表达人类CD39的细胞(CHO-huCD39)、表达食蟹猴CD39的细胞(CHO-cyCD39)和Ramos淋巴瘤细胞,但不结合表达鼠类CD39的细胞(CHO-moCD39)。I-394在相应的第一和第二组实验中以EC₅₀值0.16 μ g/ml和0.19 μ g/ml结合Ramos细

胞。几种其它抗CD39抗体示出结合Ramos细胞的可比较的EC₅₀值。

[1095] 实例8:抑制细胞ATP酶活性的IC₅₀测定

[1096] 如上所述(方法),使用用于抑制细胞CD39的酶活性的测定评估抗体I-394对CD39表达性细胞中CD39的ATP酶活性的抑制。

[1097] 结果示出在图5中。I-394在阻断肿瘤(Ramos)细胞中的CD39酶活性方面非常有效,与所有其它测试的抗体相比具有更高的效力。I-394还阻断表达人类CD39的细胞(CH0-huCD39)和表达食蟹猴CD39的细胞(CH0-cyCD39)中的CD39酶活性。表达鼠类CD39的细胞(CH0-moCD39)示出为阴性对照。计算的IC₅₀(对由50,000个Ramos细胞表达的CD39的酶活性的50%的抑制)是0.05μg/ml。实现的最大抑制率为81.6%。同种型对照无效。

[1098] 实例9:抑制重组可溶性CD39蛋白的ATP酶活性的IC₅₀测定

[1099] 如上所述(方法),使用用于抑制可溶性CD39的酶活性的测定评估抗体I-394对可溶性CD39蛋白的ATP酶活性的抑制。结果示出在图6中。I-394抑制可溶性CD39蛋白的酶活性。相比之下,抗体BY40不抑制可溶性CD39蛋白的酶活性。计算的IC₅₀是0.003μg/ml。实现的最大抑制率为74.9%。

[1100] 实例10:CD39-L1、L2、L3、L4同种型上的ELISA滴定

[1101] 测试抗体I-394与具有以下所示的氨基酸序列的重组人类CD39同种型(REC-huCD39同种型)的结合,在4℃下将其以500ng/ml或1μg/ml涂布在96孔板中的PBS 1X中过夜。将孔在TBS Tween 20中洗涤,并且在室温下在TBS阻断缓冲液中进一步饱和2h。将剂量范围浓度的一级抗体在TBS阻断缓冲液中在室温下温育2h。将孔在TBS Tween 20中洗涤。将次级抗体(TBS阻断缓冲液中的GAM-HRP或GAH-HRP)在室温下温育1h,并且用TMB显示。在Enspire™上在OD=450下测量光密度。

[1102] 克隆的huCD39(血管同种型)的氨基酸序列:

[1103] 人类CD39-L1,也称为NTPDase2或ENTPD2:

1 MAGKVRSLLP PLLLAAGLA GLLLLCVPTR DVREPPALKY GIVLDAGSSH TSMFIYKWPA
61 DKENDTGIVG QHSSCDVPGG GISSYADNPS GASQSLVGCL EQALQDVPKE RHAGTPLYLG
121 ATAGMRLNL TNPEASTSVL MAVTHTLTQY PFDFRGARIL SGQEEGVFGW VTANYLLENF
181 IKYGWVGRWF RPRKGTLGAM DLGGASTQIT FETTSPAEDR ASEVQLHLYG QHYRVYTHSF
[1104] 241 LCYGRDQVLQ RLLASALQTH GFHPCWPRGF STQVLLGDVY QSPCTMAQRP QNFNSSARVS
301 LSGSSDPHLC RDLVSGLFSF SSCPF SRCSE NGVFQPPVAG NFVAFAFFY TVDFLRTSMG
361 LPVATLQOLE AAANVCNQT WAQQLLSRGY GFDERAFGGV IFQKKAADTA VGWALGYMLN
421 LTNLIPADPP GLRKGTDFFS WVVLLLLFAS ALLALVLLL RQVHS AKLPS TI

(SEQ ID NO: 55)。

[1105] 人类CD39-L2,也称为NTPDase6或ENTPD6:

1 MKKGIRYETS RKTSYIFQQP QHGPWQTRMR KISNHGSLRV AKVAYPLGLC VGVFIYVAYI
[1106] 61 KWHRATATQA FFSITRAAPG ARWGQQAHS LGTAADGHEV FYGIMFDAGS TGTRVHVVFQF
121 TRPPRETPTL THETFKALKP GLSAYADDVE KSAQGIRELL DVAQDIPFD FWKATPLVLK

181 ATAGLRLLPG EKAQKLLQKV KEVFKASPFL VGDDCVSIMN GTDEGVSAWI TINFLTGSLK
241 TPGGSSVGML DLGGGSTQIA FLPRVEGTLQ ASPPGYLTAL RMFNRTYKLY SYSYLGLGLM
301 SARLAILGGV EGQPAKDGKE LVSPCLSPSF KGEWEHAEVT YRVSGQKAAA SLHELCAARV
[1107] 361 SEVLQNRVHR TEEVKHVDIFY AFSYYYDLAA GVGLIDAEKG GSLVVGDFEI AAKYVCRTLE
421 TQPQSSPFSC MDLTYVSLLL QEFGFPRSKV LKLTRKIDNV ETSWALGAIF HYIDSLNRQK
481 SPAS

(SEQ ID NO:56)。

[1108] 人类CD39-L3,也称为NTPDase3或ENTPD3:

1 MFTVLTRQPC EQAGLKALYR TPTIIALVVL LVSIVVLVSI TVIQIHKQEV LPPGLKYGIV
61 LDAGSSRTTV YVYQWPAAKE NNTGVVSQTF KCSVKGSGIS SYGNNPDVDF RAEEECMQKV
121 KGQVPSHLHG STPIHLGATA GMRLRLQNE TAANEVLESI QSYFKSQPFD FRGAQIIISGQ
181 EEGVYGWITA NYLMGNFLEK NLWHMWVPHV GVETTGAIDL GGASTQISFV AGEKMDLNTS
241 DIMQVSLYGY VYTLYTHSFQ CYGRNEAEKK FLAMLLQNSP TKNHLTNPCY PRDYSISFTM
[1109] 301 GHVFDLCTV DQRPESYNPN DVITFEGTGD PSLCKEKKVAS IFDFKACHDQ ETCSFDGVYQ
361 PKIKGPFVAF AGFYITASAL NLSGSFSLDT FNSSTWNFCS QNWSQLPLLL PKFDEVYARS
421 YCFSANYIYH LFVNGYKFTE ETWPQIHFEK EVGNSSIAWS LGYMLSLTNQ IPAESPLIRL
481 PIEPPVFVGT LAFFTAAALL CLAFLAYLCS ATRRKRHSEH AFDHAVDSD

(SEQ ID NO: 57)。

[1110] 人类CD39-L4,也称为NTPDase5或ENTPD5:

1 MATSWGTVFF MLVSCVCSA VSHRNQQTWF EGIFLSSMCP INVSASTLYG IMFDAGSTGT
61 RIHVTYFVQK MPGQLPILEG EVFDSVKPGL SAFVDQPKQG AETVQGLLEV AKDSIPRSHW
121 KKTPVVLKAT AGLRLLPEHK AKALLFEVKE IFRKSPFLVP KGSVSIMDGS DEGILAWVTV
181 NFLTGQLHGH RQETVGTLDL GGASTQITFL PQFEKTLEQT PRGYLTSEFEM FNSTYKLYTH
241 SYLGFGFKAA RLATLGALET EGTDGHTFRS ACLPRWLEAE WIFGGVKYQY GGNQEGEVGF
[1111] 301 EPCYAEVLRV VRGKLHQPEE VQRGSFYAFS YYYDRAVDTD MIDYEKGGIL KVEDFERKAR
361 EVCDNLENFT SGSPFLCMDL SYITALLKDG FGFADSTVLQ LTKKVNNIET GWALGATFHL
421 LQSLGISH

(SEQ ID NO: 58)。

[1112] I-394结合CD39,但不结合任何同种型CD39-L1、-L2、-L3或-L4。同种型对照抗体(IC)不结合任何CD39或CD39-L分子。结果示出在图7中。

[1113] 实例11:树突细胞的活化

[1114] 虽然ATP具有促炎活性,但相信CD39介导的ATP分解代谢能够损害树突细胞(DC)活化,从而改变对肿瘤抗原更广泛的适应性免疫反应。为了评估使用抗CD39抗体的CD39阻断是否能够在ATP的存在下克服CD39介导的树突细胞(DC)活化的改变,我们在ATP的存在下,将单核细胞衍生的DC(moDC)与抗CD39抗体一起温育。

[1115] 简单点说,从人类健康血液中纯化人类单核细胞,并且在GM-CSF和IL-4的存在下在6天内分化成MoDC。随后在24小时内ATP(Sigma, 0.25-1mM)的存在下活化MoDC,并且通过流式细胞术分析CD80、CD83和HLA-DR表达来评估DC活化。在一些情况下,MoDC在CD39抑制剂:ARL6716(Tocris, 250μM)、CD73抑制剂:APCP(Tocris 50μM)、抗CD39阻断抗体I-394或BY40(对于BY40,参见W02009/095478)、或抗CD73阻断抗体的存在下,预温育1小时。LPS

(Invivogen, 10ng/ml) 用作阳性对照。为了评估ATP介导的DC活化对CD4 T细胞活化的所得效果,洗涤ATP活化的DC,并且随后与同种异体CD4 T细胞(比率1个MoDC/4个T细胞)一起温育5天,用于混合淋巴细胞反应(MLR)。通过CD25表达和通过流式细胞术进行Cell Trace Violet稀释来分析T细胞活化和增殖(图8)。

[1116] 结果示出在图9、10和11中。在阴性对照(培养基)的存在下,在1mM ATP的存在下观察到moDC活化,然而0.125mM、0.25mM或0.5mM的ATP不允许moDC活化。认为添加CD39的化学抑制剂是通过结合活性位点而完全阻断CD39酶活性,导致在0.125mM、0.25mM或0.5mM中的每一种下的moDC活化。然而,抗CD39抗体,如BY40或抗CD73抗体不能支持ATP诱导的树突细胞(DC)活化,这表明抗体不能充分阻断酶活性以避免ATP分解代谢。令人惊讶的是,实质上完全阻断CD39的ATP酶活性,并且因此可以允许ATP积累的抗CD39阻断抗体I-394(图中以浓度10 μ g/ml示出)允许moDC活化,如在0.125mM、0.25mM或0.5mM中的每一个处通过HLA-DR或CD83表达评估(图9和10)。有趣的是,在ATP存在下活化的MoDC能够在MLR测定中诱导更好的T细胞活化和增殖。此外,通过抗CD39阻断抗体I-394增强ATP介导的MoDC活化导致更高的T细胞增殖和活化(图11)。

[1117] 评估CD39抑制剂在ATP的存在下活化DC的能力提供一种标识和评价能够实现CD39的高度抑制的抗CD39抗体的方法。此外,使用抗CD39抗体减轻CD39对DC施加的免疫抑制作用的可能性可以增强针对抗原的适应性免疫反应,特别是对肿瘤细胞。此外,当用于增强化学治疗剂的免疫原性作用时,这类抗CD39抗体可能特别令人关注。许多引起肿瘤细胞坏死的化学治疗剂能够诱导ATP;与抗CD39抗体组合使用可能对于增强这些环境中的抗肿瘤反应特别有用。

[1118] 实例12:抑制重组可溶性CD39蛋白的ATP酶活性的抗体在ATP存在下强烈增强了CD73阻断。

[1119] T细胞增殖测定

[1120] 自EFS获得来自健康供体的外周血液,且通过Ficoll梯度分离单核细胞。在通过制造商提供TDS之后,通过收集细胞沉淀且利用Cell Trace染料(Thermofisher)进行染色来通过52%Percoll梯度进一步富集淋巴细胞。将 5×10^4 到 1×10^5 个染色细胞分布在96圆底板中,在37 $^{\circ}$ C下与抗huCD73抗体(抗体6E1)和/或抗huCD39 Ab(本文中所述的I-394)一起温育1小时并且通过添加抗CD3/抗CD28包被珠粒(珠粒:细胞=1:4;Life Technologies)进行激活3到5天。通过添加ATP(200 μ M)实现T细胞增殖的抑制。通过定量增强T细胞亚群中的染料稀释液通过流式细胞术评定T细胞增殖和Ab阻断AMP的免疫抑制作用的能力。

[1121] 使用GraphPad Prism软件以图表形式绘制增强T细胞与抗CD73 Ab浓度的百分比。

[1122] 结果

[1123] 测试抗体在添加ATP存在下恢复CD4或CD8T细胞增殖的能力,意图将条件表示为可在肿瘤环境中发现。在剂量范围中以与抗CD73或抗CD39抗体中的另一个的3个不同剂量测试抗CD73和CD39中的每一个。抗CD39抗体I-394强烈增强抗CD73抗体在恢复CD4或CD8T细胞增殖中的作用,使得在与抗CD39抗体组合使用时,甚至低浓度的抗CD73抗体(例如,低于0.01 μ g/ml、低于0.001 μ g/ml并且甚至低于0.001 μ g/ml)也强烈增强CD4或CD8T细胞增殖。此外,当以单独剂量范围且无抗CD73测试时,抗CD39抗体I-394在0.1 μ g/ml和1 μ g/ml的浓度下引起CD4或CD8T细胞增殖的显著提高。图12A示出了在3个不同剂量的抗CD39抗体I-394:

0.01 μ g/ml、0.1 μ g/ml和1 μ g/ml下,抗CD73抗体6E1对CD4T细胞增殖的剂量范围。能够中和可溶性和/或单体人类CD39的抗CD39抗体示出了抗CD73抗体在恢复CD4 T细胞增殖中的效果的较强增强。在抗CD73抗体是次最佳活性的浓度(对应于在利用抗CD73抗体的治疗疗程期间在肿瘤组织中可观测的浓度范围)下,效果尤其强烈。在0.01 μ g/ml浓度下,抗CD39抗体提供抗CD73抗体的效力的大致1对数增加,且在0.1 μ g/ml的浓度下,抗CD39抗体提供抗CD73抗体的效力的大致4对数增加。因此,抗CD39抗体可适用于增强尤其肿瘤组织中,例如携带CD73表达性细胞的肿瘤中的抗CD73抗体的活性。此外,虽然测试的抗CD73抗体(能够中和可溶性CD73蛋白质)具有恢复CD4 T细胞增殖的较高能力,但其它抗体具有较低效力(例如,如在酶抑制测定中,T细胞增殖测定或其它合适的测定中评估)且依靠与抗sCD39抗体组合可甚至更加有益。图12B示出了抗CD73抗体关于CD8T细胞增殖的剂量范围。同样地,抗CD39抗体示出了抗CD73抗体在恢复CD8T细胞增殖中的强烈协同作用和/或附加效果。在抗CD73抗体是次最佳活性的浓度(对应于在利用抗CD73抗体的治疗疗程期间在肿瘤组织中可观测的浓度范围)下,效果尤其强烈。

[1124] 基于33种癌症类型中关键基因组变化的多维图使用癌症基因组图谱(Cancer Genome Atlas)(国家癌症研究所(National Cancer Institute)与国家人类基因组研究学会(National Human Genome Research Institute)之间的合作)进行CD39和CD73基因表达的研究。考虑表达量(表明为较高或较低),考虑疾病阶段和时间。对于每一种癌症和每一个基因(CD39/ENTPD1和CD73/NT5E),根据Cox回归的p值将患者分为2组(较高和较低基因表达)(每组必须含有至少10%患者)。针对每2个组绘制生存率机率曲线。针对卵巢癌和胃腺癌样品观测到较低与较高CD39表达之间的统计生存率差异,其中较高表达CD39展现较低生存率。还观测到对于食道鳞状癌和肺鳞状细胞癌样品的趋势。结果示出在图13A-13C中,其示出了人类癌症(分别是图13A、13B和13C中的卵巢、食道和胃癌)中较低CD39表达与较高生存率机率相关,而较高表达CD73与较低生存率机率相关(卵巢、食道和胃癌)。

[1125] 本文引用的所有参考文献,包含出版物、专利申请和专利均通过引用以其整体并入本文,其程度如同每个参考文献被单独且具体地指出通过引用并入,并且在本文中完整地阐述(在法律允许的最大范围内),不论是否单独提供本文其它地方参考的特定文件的并入。

[1126] 除非另有说明,否则本文提供的所有精确值均代表对应的近似值(例如,关于特定因子或测量提供的所有确切示范性值可以视为还提供对应的近似测量,在适当的情况下由“约”修饰)。当“约”结合数字使用时,这可以规定为包含对应于规定数字的 $\pm 10\%$ 的值。

[1127] 本文中使用的如“包括”、“具有”、“包含”或“含有”等术语的本发明的任何方面或实施例的描述旨在提供对本文中“由所述一个或多个特定元素组成”、“基本上由所述一个或多个特定元素组成”或“实质上包括所述一个或多个特定元素”的类似方面或实施例的支持,除非另有说明或明确与上下文矛盾(例如,本文描述的包括特定元素的组合物应理解为还描述由所述元素组成的组合物,除非另有说明或明确与上下文矛盾)。

[1128] 除非另外声明,否则本文提供的任何和所有实例或示范性语言(例如,“如”)的使用仅旨在更好地阐明本发明,并且不对本发明的范围构成限制。本说明书中的任何语言都不应被解释为将任何未要求保护的元素指示为实践本发明所必须的。

[0001]	序列表															
[0002]	<110> 先天制药公司 (INNATE PHARMA)															
[0003]	<120> 通过CD39/CD73轴恢复T细胞活性															
[0004]	<130> CD39-7															
[0005]	<150> US 62/686,143															
[0006]	<151> 2018-06-18															
[0007]	<150> US 62/568,812															
[0008]	<151> 2017-10-06															
[0009]	<160> 62															
[0010]	<170> PatentIn version 3.5															
[0011]	<210> 1															
[0012]	<211> 574															
[0013]	<212> PRT															
[0014]	<213> 智人															
[0015]	<400> 1															
[0016]	Met	Cys	Pro	Arg	Ala	Ala	Arg	Ala	Pro	Ala	Thr	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu
[0017]	1				5					10					15	
[0018]	Gly	Ala	Val	Leu	Trp	Pro	Ala	Ala	Gly	Ala	Trp	Glu	Leu	Thr	Ile	Leu
[0019]					20					25					30	
[0020]	His	Thr	Asn	Asp	Val	His	Ser	Arg	Leu	Glu	Gln	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser
[0021]					35					40					45	
[0022]	Ser	Lys	Cys	Val	Asn	Ala	Ser	Arg	Cys	Met	Gly	Gly	Val	Ala	Arg	Leu
[0023]		50							55						60	
[0024]	Phe	Thr	Lys	Val	Gln	Gln	Ile	Arg	Arg	Ala	Glu	Pro	Asn	Val	Leu	Leu
[0025]	65						70					75				80
[0026]	Leu	Asp	Ala	Gly	Asp	Gln	Tyr	Gln	Gly	Thr	Ile	Trp	Phe	Thr	Val	Tyr
[0027]					85					90					95	
[0028]	Lys	Gly	Ala	Glu	Val	Ala	His	Phe	Met	Asn	Ala	Leu	Arg	Tyr	Asp	Ala
[0029]					100					105					110	
[0030]	Met	Ala	Leu	Gly	Asn	His	Glu	Phe	Asp	Asn	Gly	Val	Glu	Gly	Leu	Ile
[0031]					115					120					125	
[0032]	Glu	Pro	Leu	Leu	Lys	Glu	Ala	Lys	Phe	Pro	Ile	Leu	Ser	Ala	Asn	Ile
[0033]			130						135						140	
[0034]	Lys	Ala	Lys	Gly	Pro	Leu	Ala	Ser	Gln	Ile	Ser	Gly	Leu	Tyr	Leu	Pro
[0035]	145						150					155				160
[0036]	Tyr	Lys	Val	Leu	Pro	Val	Gly	Asp	Glu	Val	Val	Gly	Ile	Val	Gly	Tyr
[0037]					165					170					175	
[0038]	Thr	Ser	Lys	Glu	Thr	Pro	Phe	Leu	Ser	Asn	Pro	Gly	Thr	Asn	Leu	Val

[0039]	180	185	190
[0040]	Phe Glu Asp Glu Ile Thr Ala Leu Gln Pro Glu Val Asp Lys Leu Lys		
[0041]	195	200	205
[0042]	Thr Leu Asn Val Asn Lys Ile Ile Ala Leu Gly His Ser Gly Phe Glu		
[0043]	210	215	220
[0044]	Met Asp Lys Leu Ile Ala Gln Lys Val Arg Gly Val Asp Val Val Val		
[0045]	225	230	235
[0046]	Gly Gly His Ser Asn Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Asn Pro Pro Ser Lys		
[0047]	245	250	255
[0048]	Glu Val Pro Ala Gly Lys Tyr Pro Phe Ile Val Thr Ser Asp Asp Gly		
[0049]	260	265	270
[0050]	Arg Lys Val Pro Val Val Gln Ala Tyr Ala Phe Gly Lys Tyr Leu Gly		
[0051]	275	280	285
[0052]	Tyr Leu Lys Ile Glu Phe Asp Glu Arg Gly Asn Val Ile Ser Ser His		
[0053]	290	295	300
[0054]	Gly Asn Pro Ile Leu Leu Asn Ser Ser Ile Pro Glu Asp Pro Ser Ile		
[0055]	305	310	315
[0056]	Lys Ala Asp Ile Asn Lys Trp Arg Ile Lys Leu Asp Asn Tyr Ser Thr		
[0057]	325	330	335
[0058]	Gln Glu Leu Gly Lys Thr Ile Val Tyr Leu Asp Gly Ser Ser Gln Ser		
[0059]	340	345	350
[0060]	Cys Arg Phe Arg Glu Cys Asn Met Gly Asn Leu Ile Cys Asp Ala Met		
[0061]	355	360	365
[0062]	Ile Asn Asn Asn Leu Arg His Thr Asp Glu Met Phe Trp Asn His Val		
[0063]	370	375	380
[0064]	Ser Met Cys Ile Leu Asn Gly Gly Gly Ile Arg Ser Pro Ile Asp Glu		
[0065]	385	390	395
[0066]	Arg Asn Asn Gly Thr Ile Thr Trp Glu Asn Leu Ala Ala Val Leu Pro		
[0067]	405	410	415
[0068]	Phe Gly Gly Thr Phe Asp Leu Val Gln Leu Lys Gly Ser Thr Leu Lys		
[0069]	420	425	430
[0070]	Lys Ala Phe Glu His Ser Val His Arg Tyr Gly Gln Ser Thr Gly Glu		
[0071]	435	440	445
[0072]	Phe Leu Gln Val Gly Gly Ile His Val Val Tyr Asp Leu Ser Arg Lys		
[0073]	450	455	460
[0074]	Pro Gly Asp Arg Val Val Lys Leu Asp Val Leu Cys Thr Lys Cys Arg		
[0075]	465	470	475
[0076]	Val Pro Ser Tyr Asp Pro Leu Lys Met Asp Glu Val Tyr Lys Val Ile		
[0077]	485	490	495

[0078]	Leu Pro Asn Phe Leu Ala Asn Gly Gly Asp Gly Phe Gln Met Ile Lys
[0079]	500 505 510
[0080]	Asp Glu Leu Leu Arg His Asp Ser Gly Asp Gln Asp Ile Asn Val Val
[0081]	515 520 525
[0082]	Ser Thr Tyr Ile Ser Lys Met Lys Val Ile Tyr Pro Ala Val Glu Gly
[0083]	530 535 540
[0084]	Arg Ile Lys Phe Ser Thr Gly Ser His Cys His Gly Ser Phe Ser Leu
[0085]	545 550 555 560
[0086]	Ile Phe Leu Ser Leu Trp Ala Val Ile Phe Val Leu Tyr Gln
[0087]	565 570
[0088]	<210> 2
[0089]	<211> 510
[0090]	<212> PRT
[0091]	<213> 智人
[0092]	<400> 2
[0093]	Met Glu Asp Thr Lys Glu Ser Asn Val Lys Thr Phe Cys Ser Lys Asn
[0094]	1 5 10 15
[0095]	Ile Leu Ala Ile Leu Gly Phe Ser Ser Ile Ile Ala Val Ile Ala Leu
[0096]	20 25 30
[0097]	Leu Ala Val Gly Leu Thr Gln Asn Lys Ala Leu Pro Glu Asn Val Lys
[0098]	35 40 45
[0099]	Tyr Gly Ile Val Leu Asp Ala Gly Ser Ser His Thr Ser Leu Tyr Ile
[0100]	50 55 60
[0101]	Tyr Lys Trp Pro Ala Glu Lys Glu Asn Asp Thr Gly Val Val His Gln
[0102]	65 70 75 80
[0103]	Val Glu Glu Cys Arg Val Lys Gly Pro Gly Ile Ser Lys Phe Val Gln
[0104]	85 90 95
[0105]	Lys Val Asn Glu Ile Gly Ile Tyr Leu Thr Asp Cys Met Glu Arg Ala
[0106]	100 105 110
[0107]	Arg Glu Val Ile Pro Arg Ser Gln His Gln Glu Thr Pro Val Tyr Leu
[0108]	115 120 125
[0109]	Gly Ala Thr Ala Gly Met Arg Leu Leu Arg Met Glu Ser Glu Glu Leu
[0110]	130 135 140
[0111]	Ala Asp Arg Val Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Leu Ser Asn Tyr Pro
[0112]	145 150 155 160
[0113]	Phe Asp Phe Gln Gly Ala Arg Ile Ile Thr Gly Gln Glu Glu Gly Ala
[0114]	165 170 175
[0115]	Tyr Gly Trp Ile Thr Ile Asn Tyr Leu Leu Gly Lys Phe Ser Gln Lys
[0116]	180 185 190

[0117]	Thr	Arg	Trp	Phe	Ser	Ile	Val	Pro	Tyr	Glu	Thr	Asn	Asn	Gln	Glu	Thr
[0118]			195					200						205		
[0119]	Phe	Gly	Ala	Leu	Asp	Leu	Gly	Gly	Ala	Ser	Thr	Gln	Val	Thr	Phe	Val
[0120]			210					215						220		
[0121]	Pro	Gln	Asn	Gln	Thr	Ile	Glu	Ser	Pro	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Phe	Arg
[0122]	225						230				235					240
[0123]	Leu	Tyr	Gly	Lys	Asp	Tyr	Asn	Val	Tyr	Thr	His	Ser	Phe	Leu	Cys	Tyr
[0124]					245					250					255	
[0125]	Gly	Lys	Asp	Gln	Ala	Leu	Trp	Gln	Lys	Leu	Ala	Lys	Asp	Ile	Gln	Val
[0126]				260					265					270		
[0127]	Ala	Ser	Asn	Glu	Ile	Leu	Arg	Asp	Pro	Cys	Phe	His	Pro	Gly	Tyr	Lys
[0128]			275					280					285			
[0129]	Lys	Val	Val	Asn	Val	Ser	Asp	Leu	Tyr	Lys	Thr	Pro	Cys	Thr	Lys	Arg
[0130]		290					295					300				
[0131]	Phe	Glu	Met	Thr	Leu	Pro	Phe	Gln	Gln	Phe	Glu	Ile	Gln	Gly	Ile	Gly
[0132]	305					310					315					320
[0133]	Asn	Tyr	Gln	Gln	Cys	His	Gln	Ser	Ile	Leu	Glu	Leu	Phe	Asn	Thr	Ser
[0134]					325					330					335	
[0135]	Tyr	Cys	Pro	Tyr	Ser	Gln	Cys	Ala	Phe	Asn	Gly	Ile	Phe	Leu	Pro	Pro
[0136]				340					345					350		
[0137]	Leu	Gln	Gly	Asp	Phe	Gly	Ala	Phe	Ser	Ala	Phe	Tyr	Phe	Val	Met	Lys
[0138]			355					360					365			
[0139]	Phe	Leu	Asn	Leu	Thr	Ser	Glu	Lys	Val	Ser	Gln	Glu	Lys	Val	Thr	Glu
[0140]		370					375					380				
[0141]	Met	Met	Lys	Lys	Phe	Cys	Ala	Gln	Pro	Trp	Glu	Glu	Ile	Lys	Thr	Ser
[0142]	385					390					395					400
[0143]	Tyr	Ala	Gly	Val	Lys	Glu	Lys	Tyr	Leu	Ser	Glu	Tyr	Cys	Phe	Ser	Gly
[0144]				405					410						415	
[0145]	Thr	Tyr	Ile	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Gln	Gly	Tyr	His	Phe	Thr	Ala	Asp
[0146]				420					425					430		
[0147]	Ser	Trp	Glu	His	Ile	His	Phe	Ile	Gly	Lys	Ile	Gln	Gly	Ser	Asp	Ala
[0148]			435						440				445			
[0149]	Gly	Trp	Thr	Leu	Gly	Tyr	Met	Leu	Asn	Leu	Thr	Asn	Met	Ile	Pro	Ala
[0150]		450					455					460				
[0151]	Glu	Gln	Pro	Leu	Ser	Thr	Pro	Leu	Ser	His	Ser	Thr	Tyr	Val	Phe	Leu
[0152]	465					470					475					480
[0153]	Met	Val	Leu	Phe	Ser	Leu	Val	Leu	Phe	Thr	Val	Ala	Ile	Ile	Gly	Leu
[0154]					485					490					495	
[0155]	Leu	Ile	Phe	His	Lys	Pro	Ser	Tyr	Phe	Trp	Lys	Asp	Met	Val		

[0156]	500	505	510
[0157]	<210> 3		
[0158]	<211> 120		
[0159]	<212> PRT		
[0160]	<213> 小鼠		
[0161]	<400> 3		
[0162]	Glu Phe Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala		
[0163]	1 5 10 15		
[0164]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr		
[0165]	20 25 30		
[0166]	Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile		
[0167]	35 40 45		
[0168]	Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe		
[0169]	50 55 60		
[0170]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
[0171]	65 70 75 80		
[0172]	Met His Leu Asn Asn Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0173]	85 90 95		
[0174]	Ala Arg Gly Tyr Asn Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln		
[0175]	100 105 110		
[0176]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala		
[0177]	115 120		
[0178]	<210> 4		
[0179]	<211> 106		
[0180]	<212> PRT		
[0181]	<213> 小鼠		
[0182]	<400> 4		
[0183]	Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly		
[0184]	1 5 10 15		
[0185]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp		
[0186]	20 25 30		
[0187]	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile		
[0188]	35 40 45		
[0189]	Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly		
[0190]	50 55 60		
[0191]	Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Met Gln Ala		
[0192]	65 70 75 80		
[0193]	Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr		
[0194]	85 90 95		

[0195]	Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys		
[0196]	100	105	
[0197]	<210> 5		
[0198]	<211> 478		
[0199]	<212> PRT		
[0200]	<213> 智人		
[0201]	<400> 5		
[0202]	Met Glu Asp Thr Lys Glu Ser Asn Val Lys Thr Phe Cys Ser Lys Asn		
[0203]	1	5	10 15
[0204]	Ile Leu Ala Ile Leu Gly Phe Ser Ser Ile Ile Ala Val Ile Ala Leu		
[0205]	20	25	30
[0206]	Leu Ala Val Gly Leu Thr Gln Asn Lys Ala Leu Pro Glu Asn Val Lys		
[0207]	35	40	45
[0208]	Tyr Gly Ile Val Leu Asp Ala Gly Ser Ser His Thr Ser Leu Tyr Ile		
[0209]	50	55	60
[0210]	Tyr Lys Trp Pro Ala Glu Lys Glu Asn Asp Thr Gly Val Val His Gln		
[0211]	65	70	75 80
[0212]	Val Glu Glu Cys Arg Val Lys Gly Pro Gly Ile Ser Lys Phe Val Gln		
[0213]	85	90	95
[0214]	Lys Val Asn Glu Ile Gly Ile Tyr Leu Thr Asp Cys Met Glu Arg Ala		
[0215]	100	105	110
[0216]	Arg Glu Val Ile Pro Arg Ser Gln His Gln Glu Thr Pro Val Tyr Leu		
[0217]	115	120	125
[0218]	Gly Ala Thr Ala Gly Met Arg Leu Leu Arg Met Glu Ser Glu Glu Leu		
[0219]	130	135	140
[0220]	Ala Asp Arg Val Leu Asp Val Val Glu Arg Ser Leu Ser Asn Tyr Pro		
[0221]	145	150	155 160
[0222]	Phe Asp Phe Gln Gly Ala Arg Ile Ile Thr Gly Gln Glu Glu Gly Ala		
[0223]	165	170	175
[0224]	Tyr Gly Trp Ile Thr Ile Asn Tyr Leu Leu Gly Lys Phe Ser Gln Lys		
[0225]	180	185	190
[0226]	Thr Arg Trp Phe Ser Ile Val Pro Tyr Glu Thr Asn Asn Gln Glu Thr		
[0227]	195	200	205
[0228]	Phe Gly Ala Leu Asp Leu Gly Gly Ala Ser Thr Gln Val Thr Phe Val		
[0229]	210	215	220
[0230]	Pro Gln Asn Gln Thr Ile Glu Ser Pro Asp Asn Ala Leu Gln Phe Arg		
[0231]	225	230	235 240
[0232]	Leu Tyr Gly Lys Asp Tyr Asn Val Tyr Thr His Ser Phe Leu Cys Tyr		
[0233]	245	250	255

[0234]	Gly	Lys	Asp	Gln	Ala	Leu	Trp	Gln	Lys	Leu	Ala	Lys	Asp	Ile	Gln	Val
[0235]				260					265					270		
[0236]	Ala	Ser	Asn	Glu	Ile	Leu	Arg	Asp	Pro	Cys	Phe	His	Pro	Gly	Tyr	Lys
[0237]			275					280					285			
[0238]	Lys	Val	Val	Asn	Val	Ser	Asp	Leu	Tyr	Lys	Thr	Pro	Cys	Thr	Lys	Arg
[0239]		290						295				300				
[0240]	Phe	Glu	Met	Thr	Leu	Pro	Phe	Gln	Gln	Phe	Glu	Ile	Gln	Gly	Ile	Gly
[0241]	305					310					315					320
[0242]	Asn	Tyr	Gln	Gln	Cys	His	Gln	Ser	Ile	Leu	Glu	Leu	Phe	Asn	Thr	Ser
[0243]				325						330					335	
[0244]	Tyr	Cys	Pro	Tyr	Ser	Gln	Cys	Ala	Phe	Asn	Gly	Ile	Phe	Leu	Pro	Pro
[0245]			340						345					350		
[0246]	Leu	Gln	Gly	Asp	Phe	Gly	Ala	Phe	Ser	Ala	Phe	Tyr	Phe	Val	Met	Lys
[0247]		355						360					365			
[0248]	Phe	Leu	Asn	Leu	Thr	Ser	Glu	Lys	Val	Ser	Gln	Glu	Lys	Val	Thr	Glu
[0249]		370						375				380				
[0250]	Met	Met	Lys	Lys	Phe	Cys	Ala	Gln	Pro	Trp	Glu	Glu	Ile	Lys	Thr	Ser
[0251]	385					390					395					400
[0252]	Tyr	Ala	Gly	Val	Lys	Glu	Lys	Tyr	Leu	Ser	Glu	Tyr	Cys	Phe	Ser	Gly
[0253]				405						410					415	
[0254]	Thr	Tyr	Ile	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Gln	Gly	Tyr	His	Phe	Thr	Ala	Asp
[0255]				420						425				430		
[0256]	Ser	Trp	Glu	His	Ile	His	Phe	Ile	Gly	Lys	Ile	Gln	Gly	Ser	Asp	Ala
[0257]		435						440					445			
[0258]	Gly	Trp	Thr	Leu	Gly	Tyr	Met	Leu	Asn	Leu	Thr	Asn	Met	Ile	Pro	Ala
[0259]		450						455				460				
[0260]	Glu	Gln	Pro	Leu	Ser	Thr	Pro	Leu	Ser	His	Ser	Thr	Tyr	Val		
[0261]	465					470					475					
[0262]	<210>	6														
[0263]	<211>	116														
[0264]	<212>	PRT														
[0265]	<213>	小鼠														
[0266]	<400>	6														
[0267]	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
[0268]	1				5					10				15		
[0269]	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
[0270]			20						25				30			
[0271]	Asn	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Arg	Thr	Leu	Glu	Trp	Ile
[0272]		35						40					45			

[0273]	Gly Tyr Ile Val Pro Leu Asn Gly Gly Ser Thr Phe Asn Gln Lys Phe
[0274]	50 55 60
[0275]	Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asn Thr Ser Ser Arg Thr Ala Tyr
[0276]	65 70 75 80
[0277]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ala Tyr Tyr Cys
[0278]	85 90 95
[0279]	Ala Arg Gly Gly Thr Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
[0280]	100 105 110
[0281]	Thr Val Ser Ala
[0282]	115
[0283]	<210> 7
[0284]	<211> 111
[0285]	<212> PRT
[0286]	<213> 小鼠
[0287]	<400> 7
[0288]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[0289]	1 5 10 15
[0290]	Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe
[0291]	20 25 30
[0292]	Gly Val Ser Phe Met Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
[0293]	35 40 45
[0294]	Asn Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
[0295]	50 55 60
[0296]	Arg Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His
[0297]	65 70 75 80
[0298]	Pro Met Glu Ala Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Thr Lys
[0299]	85 90 95
[0300]	Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0301]	100 105 110
[0302]	<210> 8
[0303]	<211> 5
[0304]	<212> PRT
[0305]	<213> 小鼠
[0306]	<400> 8
[0307]	Asp Tyr Asn Met His
[0308]	1 5
[0309]	<210> 9
[0310]	<211> 17
[0311]	<212> PRT

[0312] <213> 小鼠
[0313] <400> 9
[0314] Tyr Ile Val Pro Leu Asn Gly Gly Ser Thr Phe Asn Gln Lys Phe Lys
[0315] 1 5 10 15
[0316] Gly
[0317] <210> 10
[0318] <211> 7
[0319] <212> PRT
[0320] <213> 小鼠
[0321] <400> 10
[0322] Gly Gly Thr Arg Phe Ala Tyr
[0323] 1 5
[0324] <210> 11
[0325] <211> 15
[0326] <212> PRT
[0327] <213> 小鼠
[0328] <400> 11
[0329] Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe Gly Val Ser Phe Met Tyr
[0330] 1 5 10 15
[0331] <210> 12
[0332] <211> 7
[0333] <212> PRT
[0334] <213> 小鼠
[0335] <400> 12
[0336] Gly Ala Ser Asn Gln Gly Ser
[0337] 1 5
[0338] <210> 13
[0339] <211> 9
[0340] <212> PRT
[0341] <213> 小鼠
[0342] <400> 13
[0343] Gln Gln Thr Lys Glu Val Pro Tyr Thr
[0344] 1 5
[0345] <210> 14
[0346] <211> 116
[0347] <212> PRT
[0348] <213> 小鼠
[0349] <400> 14
[0350] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

[0351]	1	5	10	15
[0352]	Ser Val Arg Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr			
[0353]	20	25	30	
[0354]	Asn Met His Trp Val Lys Lys Asn His Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
[0355]	35	40	45	
[0356]	Gly Tyr Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe			
[0357]	50	55	60	
[0358]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asn Thr Ser Ser Lys Thr Ala Tyr			
[0359]	65	70	75	80
[0360]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0361]	85	90	95	
[0362]	Thr Arg Gly Gly Thr Arg Phe Ala Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
[0363]	100	105	110	
[0364]	Thr Val Ser Ala			
[0365]	115			
[0366]	<210> 15			
[0367]	<211> 111			
[0368]	<212> PRT			
[0369]	<213> 小鼠			
[0370]	<400> 15			
[0371]	Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly			
[0372]	1	5	10	15
[0373]	Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr			
[0374]	20	25	30	
[0375]	Gly Ile Ser Phe Met Tyr Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro			
[0376]	35	40	45	
[0377]	Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala			
[0378]	50	55	60	
[0379]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His			
[0380]	65	70	75	80
[0381]	Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys			
[0382]	85	90	95	
[0383]	Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0384]	100	105	110	
[0385]	<210> 16			
[0386]	<211> 5			
[0387]	<212> PRT			
[0388]	<213> 小鼠			
[0389]	<400> 16			

[0390] Asp Tyr Asn Met His
 [0391] 1 5
 [0392] <210> 17
 [0393] <211> 17
 [0394] <212> PRT
 [0395] <213> 小鼠
 [0396] <400> 17
 [0397] Tyr Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 [0398] 1 5 10 15
 [0399] Gly
 [0400] <210> 18
 [0401] <211> 7
 [0402] <212> PRT
 [0403] <213> 小鼠
 [0404] <400> 18
 [0405] Gly Gly Thr Arg Phe Ala Ser
 [0406] 1 5
 [0407] <210> 19
 [0408] <211> 15
 [0409] <212> PRT
 [0410] <213> 小鼠
 [0411] <400> 19
 [0412] Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Tyr
 [0413] 1 5 10 15
 [0414] <210> 20
 [0415] <211> 7
 [0416] <212> PRT
 [0417] <213> 小鼠
 [0418] <400> 20
 [0419] Ala Ala Ser Thr Gln Gly Ser
 [0420] 1 5
 [0421] <210> 21
 [0422] <211> 9
 [0423] <212> PRT
 [0424] <213> 小鼠
 [0425] <400> 21
 [0426] Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Phe Thr
 [0427] 1 5
 [0428] <210> 22

[0468]	<210>	24
[0469]	<211>	5
[0470]	<212>	PRT
[0471]	<213>	小鼠
[0472]	<400>	24
[0473]	Asp Thr Tyr Ile Asn	
[0474]	1	5
[0475]	<210>	25
[0476]	<211>	17
[0477]	<212>	PRT
[0478]	<213>	小鼠
[0479]	<400>	25
[0480]	Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln	
[0481]	1	5 10 15
[0482]	Gly	
[0483]	<210>	26
[0484]	<211>	13
[0485]	<212>	PRT
[0486]	<213>	小鼠
[0487]	<400>	26
[0488]	Trp Gly Tyr Asp Asp Glu Glu Ala Asp Tyr Phe Asp Ser	
[0489]	1	5 10
[0490]	<210>	27
[0491]	<211>	15
[0492]	<212>	PRT
[0493]	<213>	小鼠
[0494]	<400>	27
[0495]	Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn	
[0496]	1	5 10 15
[0497]	<210>	28
[0498]	<211>	7
[0499]	<212>	PRT
[0500]	<213>	小鼠
[0501]	<400>	28
[0502]	Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser	
[0503]	1	5
[0504]	<210>	29
[0505]	<211>	9
[0506]	<212>	PRT

[0507] <213> 小鼠
 [0508] <400> 29
 [0509] His Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr
 [0510] 1 5
 [0511] <210> 30
 [0512] <211> 118
 [0513] <212> PRT
 [0514] <213> 小鼠
 [0515] <400> 30
 [0516] Pro Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Met Pro Gly Ala
 [0517] 1 5 10 15
 [0518] Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe
 [0519] 20 25 30
 [0520] Trp Met Asn Trp Met Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 [0521] 35 40 45
 [0522] Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Phe Tyr Thr Asn Ser Asn Gln Arg Phe
 [0523] 50 55 60
 [0524] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 [0525] 65 70 75 80
 [0526] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 [0527] 85 90 95
 [0528] Ala Arg Gly Asp Phe Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr
 [0529] 100 105 110
 [0530] Ser Val Thr Val Ser Ser
 [0531] 115
 [0532] <210> 31
 [0533] <211> 108
 [0534] <212> PRT
 [0535] <213> 小鼠
 [0536] <400> 31
 [0537] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr Met Thr Ser Ser Pro Gly
 [0538] 1 5 10 15
 [0539] Glu Lys Ile Thr Phe Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Asn Ser Asn
 [0540] 20 25 30
 [0541] Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Phe Ser Pro Lys Leu Leu
 [0542] 35 40 45
 [0543] Ile Tyr Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser
 [0544] 50 55 60
 [0545] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Gly Thr Met Glu

[0546]	65	70	75	80
[0547]	Ala Glu Asp Val	Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Ser Leu Pro		
[0548]		85	90	95
[0549]	Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0550]		100	105	
[0551]	<210>	32		
[0552]	<211>	5		
[0553]	<212>	PRT		
[0554]	<213>	小鼠		
[0555]	<400>	32		
[0556]	Ser Phe Trp Met Asn			
[0557]	1	5		
[0558]	<210>	33		
[0559]	<211>	17		
[0560]	<212>	PRT		
[0561]	<213>	小鼠		
[0562]	<400>	33		
[0563]	Glu Ile Asp Pro Ser Asp Phe Tyr Thr Asn Ser Asn Gln Arg Phe Lys			
[0564]	1	5	10	15
[0565]	Gly			
[0566]	<210>	34		
[0567]	<211>	9		
[0568]	<212>	PRT		
[0569]	<213>	小鼠		
[0570]	<400>	34		
[0571]	Gly Asp Phe Gly Trp Tyr Phe Asp Val			
[0572]	1	5		
[0573]	<210>	35		
[0574]	<211>	12		
[0575]	<212>	PRT		
[0576]	<213>	小鼠		
[0577]	<400>	35		
[0578]	Ser Ala Ser Ser Ser Ile Asn Ser Asn Tyr Leu His			
[0579]	1	5	10	
[0580]	<210>	36		
[0581]	<211>	7		
[0582]	<212>	PRT		
[0583]	<213>	小鼠		
[0584]	<400>	36		

[0585] Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 [0586] 1 5
 [0587] <210> 37
 [0588] <211> 9
 [0589] <212> PRT
 [0590] <213> 小鼠
 [0591] <400> 37
 [0592] Gln Gln Gly Ser Ser Leu Pro Arg Thr
 [0593] 1 5
 [0594] <210> 38
 [0595] <211> 45
 [0596] <212> DNA
 [0597] <213> 智人
 [0598] <400> 38
 [0599] tacgactcac aagcttgccg ccaccatgga agatacaaag gagtc 45
 [0600] <210> 39
 [0601] <211> 64
 [0602] <212> DNA
 [0603] <213> 智人
 [0604] <400> 39
 [0605] ccgccccgac tctagatcac ttgtcatcgt catcttttgta atcgacatag gtggagtggg 60
 [0606] agag 64
 [0607] <210> 40
 [0608] <211> 120
 [0609] <212> PRT
 [0610] <213> 小鼠
 [0611] <400> 40
 [0612] Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 [0613] 1 5 10 15
 [0614] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Ser Tyr
 [0615] 20 25 30
 [0616] Asn Met Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 [0617] 35 40 45
 [0618] Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 [0619] 50 55 60
 [0620] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 [0621] 65 70 75 80
 [0622] Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0623] 85 90 95

[0624]	Ala Arg Gly Tyr Gly Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
[0625]	100 105 110
[0626]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
[0627]	115 120
[0628]	<210> 41
[0629]	<211> 106
[0630]	<212> PRT
[0631]	<213> 小鼠
[0632]	<400> 41
[0633]	Asp Ala Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
[0634]	1 5 10 15
[0635]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp
[0636]	20 25 30
[0637]	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
[0638]	35 40 45
[0639]	Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
[0640]	50 55 60
[0641]	Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala
[0642]	65 70 75 80
[0643]	Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr
[0644]	85 90 95
[0645]	Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
[0646]	100 105
[0647]	<210> 42
[0648]	<211> 126
[0649]	<212> PRT
[0650]	<213> 小鼠
[0651]	<400> 42
[0652]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0653]	1 5 10 15
[0654]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ala Ser Tyr
[0655]	20 25 30
[0656]	Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Asp Trp Ile
[0657]	35 40 45
[0658]	Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Leu Thr Phe
[0659]	50 55 60
[0660]	Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
[0661]	65 70 75 80
[0662]	Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

[0663]	85																90				95			
[0664]	Ala	Arg	Gly	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Lys	Ala	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln								
[0665]	100								105				110											
[0666]	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro										
[0667]	115								120				125											
[0668]	<210> 43																							
[0669]	<211> 112																							
[0670]	<212> PRT																							
[0671]	<213> 小鼠																							
[0672]	<400> 43																							
[0673]	Ser	Ile	Val	Met	Thr	Pro	Thr	Pro	Lys	Phe	Leu	Leu	Val	Ser	Ala	Gly								
[0674]	1	5				10				15														
[0675]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Asn	Asp								
[0676]	20								25				30											
[0677]	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile								
[0678]	35				40				45															
[0679]	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Thr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly								
[0680]	50				55				60															
[0681]	Ser	Gly	Tyr	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Thr	Val	Gln	Ala								
[0682]	65	70				75				80														
[0683]	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Asp	Tyr	Ser	Ser	Leu	Thr								
[0684]	85								90				95											
[0685]	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro								
[0686]	100								105				110											
[0687]	<210> 44																							
[0688]	<211> 126																							
[0689]	<212> PRT																							
[0690]	<213> 小鼠																							
[0691]	<400> 44																							
[0692]	Gln	Ile	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala								
[0693]	1	5				10				15														
[0694]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ala	Ser	Tyr								
[0695]	20								25				30											
[0696]	Asn	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu	Asp	Trp	Ile								
[0697]	35				40				45															
[0698]	Gly	Tyr	Ile	Asp	Pro	Tyr	Asn	Gly	Gly	Ser	Ser	Tyr	Asn	Leu	Thr	Phe								
[0699]	50				55				60															
[0700]	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Thr	Thr	Ala	Tyr								
[0701]	65	70				75				80														

[0702]	Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[0703]	85 90 95
[0704]	Ala Arg Gly Tyr Gly Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
[0705]	100 105 110
[0706]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro
[0707]	115 120 125
[0708]	<210> 45
[0709]	<211> 112
[0710]	<212> PRT
[0711]	<213> 小鼠
[0712]	<400> 45
[0713]	Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
[0714]	1 5 10 15
[0715]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
[0716]	20 25 30
[0717]	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
[0718]	35 40 45
[0719]	Tyr Tyr Ala Ser Thr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
[0720]	50 55 60
[0721]	Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala
[0722]	65 70 75 80
[0723]	Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr
[0724]	85 90 95
[0725]	Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
[0726]	100 105 110
[0727]	<210> 46
[0728]	<211> 5
[0729]	<212> PRT
[0730]	<213> 小鼠
[0731]	<400> 46
[0732]	Ser Tyr Asn Met Tyr
[0733]	1 5
[0734]	<210> 47
[0735]	<211> 17
[0736]	<212> PRT
[0737]	<213> 小鼠
[0738]	<400> 47
[0739]	Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
[0740]	1 5 10 15

[0741]	Gly
[0742]	<210> 48
[0743]	<211> 11
[0744]	<212> PRT
[0745]	<213> 小鼠
[0746]	<400> 48
[0747]	Gly Tyr Asn Asn Tyr Lys Ala Trp Phe Ala Tyr
[0748]	1 5 10
[0749]	<210> 49
[0750]	<211> 11
[0751]	<212> PRT
[0752]	<213> 小鼠
[0753]	<400> 49
[0754]	Lys Ala Ser Gln Ser Val Thr Asn Asp Val Ala
[0755]	1 5 10
[0756]	<210> 50
[0757]	<211> 7
[0758]	<212> PRT
[0759]	<213> 小鼠
[0760]	<400> 50
[0761]	Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
[0762]	1 5
[0763]	<210> 51
[0764]	<211> 8
[0765]	<212> PRT
[0766]	<213> 小鼠
[0767]	<400> 51
[0768]	Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Leu Thr
[0769]	1 5
[0770]	<210> 52
[0771]	<211> 446
[0772]	<212> PRT
[0773]	<213> 人工
[0774]	<220>
[0775]	<223> 嵌合智人小鼠
[0776]	<400> 52
[0777]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0778]	1 5 10 15
[0779]	Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

[0780]	20							25							30													
[0781]	Asn	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Arg	Thr	Leu	Glu	Trp	Ile												
[0782]	35							40							45													
[0783]	Gly	Tyr	Ile	Val	Pro	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Phe	Asn	Gln	Lys	Phe												
[0784]	50							55							60													
[0785]	Lys	Gly	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asn	Thr	Ser	Ser	Arg	Thr	Ala	Tyr												
[0786]	65							70							75							80						
[0787]	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Cys												
[0788]	85							90							95													
[0789]	Ala	Arg	Gly	Gly	Thr	Arg	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val												
[0790]	100							105							110													
[0791]	Thr	Val	Ser	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala												
[0792]	115							120							125													
[0793]	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu												
[0794]	130							135							140													
[0795]	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly												
[0796]	145							150							155							160						
[0797]	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser												
[0798]	165							170							175													
[0799]	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu												
[0800]	180							185							190													
[0801]	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr												
[0802]	195							200							205													
[0803]	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr												
[0804]	210							215							220													
[0805]	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe												
[0806]	225							230							235							240						
[0807]	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro												
[0808]	245							250							255													
[0809]	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val												
[0810]	260							265							270													
[0811]	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr												
[0812]	275							280							285													
[0813]	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val												
[0814]	290							295							300													
[0815]	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys												
[0816]	305							310							315							320						
[0817]	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser												
[0818]	325							330							335													

[0819]	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
[0820]				340				345						350		
[0821]	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
[0822]			355					360						365		
[0823]	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
[0824]		370						375					380			
[0825]	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
[0826]	385						390					395				400
[0827]	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
[0828]				405						410					415	
[0829]	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His
[0830]				420					425					430		
[0831]	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
[0832]			435					440						445		
[0833]	<210> 53															
[0834]	<211> 218															
[0835]	<212> PRT															
[0836]	<213> 人工															
[0837]	<220>															
[0838]	<223> 嵌合智人小鼠															
[0839]	<400> 53															
[0840]	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
[0841]	1			5					10					15		
[0842]	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Phe
[0843]			20						25					30		
[0844]	Gly	Val	Ser	Phe	Met	Tyr	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
[0845]		35						40					45			
[0846]	Asn	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Asn	Gln	Gly	Ser	Gly	Val	Pro	Ala
[0847]	50						55					60				
[0848]	Arg	Phe	Arg	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Ser	Leu	Asn	Ile	His
[0849]	65					70				75					80	
[0850]	Pro	Met	Glu	Ala	Asp	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Thr	Lys
[0851]				85						90					95	
[0852]	Glu	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg
[0853]			100						105					110		
[0854]	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln
[0855]			115						120					125		
[0856]	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr
[0857]	130							135					140			

[0858]	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser
[0859]	145					150				155						160
[0860]	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr
[0861]					165					170					175	
[0862]	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys
[0863]				180					185					190		
[0864]	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro
[0865]			195					200					205			
[0866]	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
[0867]		210					215									
[0868]	<210>	54														
[0869]	<211>	486														
[0870]	<212>	PRT														
[0871]	<213>	智人														
[0872]	<400>	54														
[0873]	Met	Glu	Asp	Thr	Lys	Glu	Ser	Asn	Val	Lys	Thr	Phe	Cys	Ser	Lys	Asn
[0874]	1				5					10					15	
[0875]	Ile	Leu	Ala	Ile	Leu	Gly	Phe	Ser	Ser	Ile	Ile	Ala	Val	Ile	Ala	Leu
[0876]				20					25					30		
[0877]	Leu	Ala	Val	Gly	Leu	Thr	Gln	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Glu	Asn	Val	Lys
[0878]			35					40					45			
[0879]	Tyr	Gly	Ile	Val	Leu	Asp	Ala	Gly	Ser	Ser	His	Thr	Ser	Leu	Tyr	Ile
[0880]		50					55					60				
[0881]	Tyr	Lys	Trp	Pro	Ala	Glu	Lys	Glu	Asn	Asp	Thr	Gly	Val	Val	His	Gln
[0882]	65					70					75					80
[0883]	Val	Glu	Glu	Cys	Arg	Val	Lys	Gly	Pro	Gly	Ile	Ser	Lys	Phe	Val	Gln
[0884]				85						90					95	
[0885]	Lys	Val	Asn	Glu	Ile	Gly	Ile	Tyr	Leu	Thr	Asp	Cys	Met	Glu	Arg	Ala
[0886]				100					105					110		
[0887]	Arg	Glu	Val	Ile	Pro	Arg	Ser	Gln	His	Gln	Glu	Thr	Pro	Val	Tyr	Leu
[0888]			115					120					125			
[0889]	Gly	Ala	Thr	Ala	Gly	Met	Arg	Leu	Leu	Arg	Met	Glu	Ser	Glu	Glu	Leu
[0890]		130					135					140				
[0891]	Ala	Asp	Arg	Val	Leu	Asp	Val	Val	Glu	Arg	Ser	Leu	Ser	Asn	Tyr	Pro
[0892]	145					150					155					160
[0893]	Phe	Asp	Phe	Gln	Gly	Ala	Arg	Ile	Ile	Thr	Gly	Gln	Glu	Glu	Gly	Ala
[0894]				165						170					175	
[0895]	Tyr	Gly	Trp	Ile	Thr	Ile	Asn	Tyr	Leu	Leu	Gly	Lys	Phe	Ser	Gln	Lys
[0896]				180					185					190		

[0897]	Thr Arg Trp Phe Ser Ile Val Pro Tyr Glu Thr Asn Asn Gln Glu Thr		
[0898]	195	200	205
[0899]	Phe Gly Ala Leu Asp Leu Gly Gly Ala Ser Thr Gln Val Thr Phe Val		
[0900]	210	215	220
[0901]	Pro Gln Asn Gln Thr Ile Glu Ser Pro Asp Asn Ala Leu Gln Phe Arg		
[0902]	225	230	235 240
[0903]	Leu Tyr Gly Lys Asp Tyr Asn Val Tyr Thr His Ser Phe Leu Cys Tyr		
[0904]	245	250	255
[0905]	Gly Lys Asp Gln Ala Leu Trp Gln Lys Leu Ala Lys Asp Ile Gln Val		
[0906]	260	265	270
[0907]	Ala Ser Asn Glu Ile Leu Arg Asp Pro Cys Phe His Pro Gly Tyr Lys		
[0908]	275	280	285
[0909]	Lys Val Val Asn Val Ser Asp Leu Tyr Lys Thr Pro Cys Thr Lys Arg		
[0910]	290	295	300
[0911]	Phe Glu Met Thr Leu Pro Phe Gln Gln Phe Glu Ile Gln Gly Ile Gly		
[0912]	305	310	315 320
[0913]	Asn Tyr Gln Gln Cys His Gln Ser Ile Leu Glu Leu Phe Asn Thr Ser		
[0914]	325	330	335
[0915]	Tyr Cys Pro Tyr Ser Gln Cys Ala Phe Asn Gly Ile Phe Leu Pro Pro		
[0916]	340	345	350
[0917]	Leu Gln Gly Asp Phe Gly Ala Phe Ser Ala Phe Tyr Phe Val Met Lys		
[0918]	355	360	365
[0919]	Phe Leu Asn Leu Thr Ser Glu Lys Val Ser Gln Glu Lys Val Thr Glu		
[0920]	370	375	380
[0921]	Met Met Lys Lys Phe Cys Ala Gln Pro Trp Glu Glu Ile Lys Thr Ser		
[0922]	385	390	395 400
[0923]	Tyr Ala Gly Val Lys Glu Lys Tyr Leu Ser Glu Tyr Cys Phe Ser Gly		
[0924]	405	410	415
[0925]	Thr Tyr Ile Leu Ser Leu Leu Leu Gln Gly Tyr His Phe Thr Ala Asp		
[0926]	420	425	430
[0927]	Ser Trp Glu His Ile His Phe Ile Gly Lys Ile Gln Gly Ser Asp Ala		
[0928]	435	440	445
[0929]	Gly Trp Thr Leu Gly Tyr Met Leu Asn Leu Thr Asn Met Ile Pro Ala		
[0930]	450	455	460
[0931]	Glu Gln Pro Leu Ser Thr Pro Leu Ser His Ser Thr Tyr Val Asp Tyr		
[0932]	465	470	475 480
[0933]	Lys Asp Asp Asp Asp Lys		
[0934]	485		
[0935]	<210> 55		

[0936] <211> 472
 [0937] <212> PRT
 [0938] <213> 智人
 [0939] <400> 55
 [0940] Met Ala Gly Lys Val Arg Ser Leu Leu Pro Pro Leu Leu Leu Ala Ala
 [0941] 1 5 10 15
 [0942] Ala Gly Leu Ala Gly Leu Leu Leu Cys Val Pro Thr Arg Asp Val
 [0943] 20 25 30
 [0944] Arg Glu Pro Pro Ala Leu Lys Tyr Gly Ile Val Leu Asp Ala Gly Ser
 [0945] 35 40 45
 [0946] Ser His Thr Ser Met Phe Ile Tyr Lys Trp Pro Ala Asp Lys Glu Asn
 [0947] 50 55 60
 [0948] Asp Thr Gly Ile Val Gly Gln His Ser Ser Cys Asp Val Pro Gly Gly
 [0949] 65 70 75 80
 [0950] Gly Ile Ser Ser Tyr Ala Asp Asn Pro Ser Gly Ala Ser Gln Ser Leu
 [0951] 85 90 95
 [0952] Val Gly Cys Leu Glu Gln Ala Leu Gln Asp Val Pro Lys Glu Arg His
 [0953] 100 105 110
 [0954] Ala Gly Thr Pro Leu Tyr Leu Gly Ala Thr Ala Gly Met Arg Leu Leu
 [0955] 115 120 125
 [0956] Asn Leu Thr Asn Pro Glu Ala Ser Thr Ser Val Leu Met Ala Val Thr
 [0957] 130 135 140
 [0958] His Thr Leu Thr Gln Tyr Pro Phe Asp Phe Arg Gly Ala Arg Ile Leu
 [0959] 145 150 155 160
 [0960] Ser Gly Gln Glu Glu Gly Val Phe Gly Trp Val Thr Ala Asn Tyr Leu
 [0961] 165 170 175
 [0962] Leu Glu Asn Phe Ile Lys Tyr Gly Trp Val Gly Arg Trp Phe Arg Pro
 [0963] 180 185 190
 [0964] Arg Lys Gly Thr Leu Gly Ala Met Asp Leu Gly Gly Ala Ser Thr Gln
 [0965] 195 200 205
 [0966] Ile Thr Phe Glu Thr Thr Ser Pro Ala Glu Asp Arg Ala Ser Glu Val
 [0967] 210 215 220
 [0968] Gln Leu His Leu Tyr Gly Gln His Tyr Arg Val Tyr Thr His Ser Phe
 [0969] 225 230 235 240
 [0970] Leu Cys Tyr Gly Arg Asp Gln Val Leu Gln Arg Leu Leu Ala Ser Ala
 [0971] 245 250 255
 [0972] Leu Gln Thr His Gly Phe His Pro Cys Trp Pro Arg Gly Phe Ser Thr
 [0973] 260 265 270
 [0974] Gln Val Leu Leu Gly Asp Val Tyr Gln Ser Pro Cys Thr Met Ala Gln

[0975]	275	280	285
[0976]	Arg Pro Gln Asn Phe Asn Ser Ser Ala Arg Val Ser Leu Ser Gly Ser		
[0977]	290	295	300
[0978]	Ser Asp Pro His Leu Cys Arg Asp Leu Val Ser Gly Leu Phe Ser Phe		
[0979]	305	310	315
[0980]	Ser Ser Cys Pro Phe Ser Arg Cys Ser Phe Asn Gly Val Phe Gln Pro		
[0981]	325	330	335
[0982]	Pro Val Ala Gly Asn Phe Val Ala Phe Ser Ala Phe Phe Tyr Thr Val		
[0983]	340	345	350
[0984]	Asp Phe Leu Arg Thr Ser Met Gly Leu Pro Val Ala Thr Leu Gln Gln		
[0985]	355	360	365
[0986]	Leu Glu Ala Ala Ala Val Asn Val Cys Asn Gln Thr Trp Ala Gln Gln		
[0987]	370	375	380
[0988]	Leu Leu Ser Arg Gly Tyr Gly Phe Asp Glu Arg Ala Phe Gly Gly Val		
[0989]	385	390	395
[0990]	Ile Phe Gln Lys Lys Ala Ala Asp Thr Ala Val Gly Trp Ala Leu Gly		
[0991]	405	410	415
[0992]	Tyr Met Leu Asn Leu Thr Asn Leu Ile Pro Ala Asp Pro Pro Gly Leu		
[0993]	420	425	430
[0994]	Arg Lys Gly Thr Asp Phe Ser Ser Trp Val Val Leu Leu Leu Leu Phe		
[0995]	435	440	445
[0996]	Ala Ser Ala Leu Leu Ala Ala Leu Val Leu Leu Leu Arg Gln Val His		
[0997]	450	455	460
[0998]	Ser Ala Lys Leu Pro Ser Thr Ile		
[0999]	465	470	
[1000]	<210> 56		
[1001]	<211> 484		
[1002]	<212> PRT		
[1003]	<213> 智人		
[1004]	<400> 56		
[1005]	Met Lys Lys Gly Ile Arg Tyr Glu Thr Ser Arg Lys Thr Ser Tyr Ile		
[1006]	1	5	10
[1007]	Phe Gln Gln Pro Gln His Gly Pro Trp Gln Thr Arg Met Arg Lys Ile		
[1008]	20	25	30
[1009]	Ser Asn His Gly Ser Leu Arg Val Ala Lys Val Ala Tyr Pro Leu Gly		
[1010]	35	40	45
[1011]	Leu Cys Val Gly Val Phe Ile Tyr Val Ala Tyr Ile Lys Trp His Arg		
[1012]	50	55	60
[1013]	Ala Thr Ala Thr Gln Ala Phe Phe Ser Ile Thr Arg Ala Ala Pro Gly		

[1014]	65	70	75	80
[1015]	Ala Arg Trp Gly Gln Gln Ala His Ser Pro Leu Gly Thr Ala Ala Asp			
[1016]		85	90	95
[1017]	Gly His Glu Val Phe Tyr Gly Ile Met Phe Asp Ala Gly Ser Thr Gly			
[1018]		100	105	110
[1019]	Thr Arg Val His Val Phe Gln Phe Thr Arg Pro Pro Arg Glu Thr Pro			
[1020]		115	120	125
[1021]	Thr Leu Thr His Glu Thr Phe Lys Ala Leu Lys Pro Gly Leu Ser Ala			
[1022]		130	135	140
[1023]	Tyr Ala Asp Asp Val Glu Lys Ser Ala Gln Gly Ile Arg Glu Leu Leu			
[1024]	145	150	155	160
[1025]	Asp Val Ala Lys Gln Asp Ile Pro Phe Asp Phe Trp Lys Ala Thr Pro			
[1026]		165	170	175
[1027]	Leu Val Leu Lys Ala Thr Ala Gly Leu Arg Leu Leu Pro Gly Glu Lys			
[1028]		180	185	190
[1029]	Ala Gln Lys Leu Leu Gln Lys Val Lys Glu Val Phe Lys Ala Ser Pro			
[1030]		195	200	205
[1031]	Phe Leu Val Gly Asp Asp Cys Val Ser Ile Met Asn Gly Thr Asp Glu			
[1032]		210	215	220
[1033]	Gly Val Ser Ala Trp Ile Thr Ile Asn Phe Leu Thr Gly Ser Leu Lys			
[1034]	225	230	235	240
[1035]	Thr Pro Gly Gly Ser Ser Val Gly Met Leu Asp Leu Gly Gly Gly Ser			
[1036]		245	250	255
[1037]	Thr Gln Ile Ala Phe Leu Pro Arg Val Glu Gly Thr Leu Gln Ala Ser			
[1038]		260	265	270
[1039]	Pro Pro Gly Tyr Leu Thr Ala Leu Arg Met Phe Asn Arg Thr Tyr Lys			
[1040]		275	280	285
[1041]	Leu Tyr Ser Tyr Ser Tyr Leu Gly Leu Gly Leu Met Ser Ala Arg Leu			
[1042]		290	295	300
[1043]	Ala Ile Leu Gly Gly Val Glu Gly Gln Pro Ala Lys Asp Gly Lys Glu			
[1044]	305	310	315	320
[1045]	Leu Val Ser Pro Cys Leu Ser Pro Ser Phe Lys Gly Glu Trp Glu His			
[1046]		325	330	335
[1047]	Ala Glu Val Thr Tyr Arg Val Ser Gly Gln Lys Ala Ala Ala Ser Leu			
[1048]		340	345	350
[1049]	His Glu Leu Cys Ala Ala Arg Val Ser Glu Val Leu Gln Asn Arg Val			
[1050]		355	360	365
[1051]	His Arg Thr Glu Glu Val Lys His Val Asp Phe Tyr Ala Phe Ser Tyr			
[1052]		370	375	380

[1053]	Tyr Tyr Asp Leu Ala Ala Gly Val Gly Leu Ile Asp Ala Glu Lys Gly
[1054]	385 390 395 400
[1055]	Gly Ser Leu Val Val Gly Asp Phe Glu Ile Ala Ala Lys Tyr Val Cys
[1056]	405 410 415
[1057]	Arg Thr Leu Glu Thr Gln Pro Gln Ser Ser Pro Phe Ser Cys Met Asp
[1058]	420 425 430
[1059]	Leu Thr Tyr Val Ser Leu Leu Leu Gln Glu Phe Gly Phe Pro Arg Ser
[1060]	435 440 445
[1061]	Lys Val Leu Lys Leu Thr Arg Lys Ile Asp Asn Val Glu Thr Ser Trp
[1062]	450 455 460
[1063]	Ala Leu Gly Ala Ile Phe His Tyr Ile Asp Ser Leu Asn Arg Gln Lys
[1064]	465 470 475 480
[1065]	Ser Pro Ala Ser
[1066]	<210> 57
[1067]	<211> 529
[1068]	<212> PRT
[1069]	<213> 智人
[1070]	<400> 57
[1071]	Met Phe Thr Val Leu Thr Arg Gln Pro Cys Glu Gln Ala Gly Leu Lys
[1072]	1 5 10 15
[1073]	Ala Leu Tyr Arg Thr Pro Thr Ile Ile Ala Leu Val Val Leu Leu Val
[1074]	20 25 30
[1075]	Ser Ile Val Val Leu Val Ser Ile Thr Val Ile Gln Ile His Lys Gln
[1076]	35 40 45
[1077]	Glu Val Leu Pro Pro Gly Leu Lys Tyr Gly Ile Val Leu Asp Ala Gly
[1078]	50 55 60
[1079]	Ser Ser Arg Thr Thr Val Tyr Val Tyr Gln Trp Pro Ala Glu Lys Glu
[1080]	65 70 75 80
[1081]	Asn Asn Thr Gly Val Val Ser Gln Thr Phe Lys Cys Ser Val Lys Gly
[1082]	85 90 95
[1083]	Ser Gly Ile Ser Ser Tyr Gly Asn Asn Pro Gln Asp Val Pro Arg Ala
[1084]	100 105 110
[1085]	Phe Glu Glu Cys Met Gln Lys Val Lys Gly Gln Val Pro Ser His Leu
[1086]	115 120 125
[1087]	His Gly Ser Thr Pro Ile His Leu Gly Ala Thr Ala Gly Met Arg Leu
[1088]	130 135 140
[1089]	Leu Arg Leu Gln Asn Glu Thr Ala Ala Asn Glu Val Leu Glu Ser Ile
[1090]	145 150 155 160
[1091]	Gln Ser Tyr Phe Lys Ser Gln Pro Phe Asp Phe Arg Gly Ala Gln Ile

[1092]		165		170		175
[1093]	Ile Ser Gly Gln Glu Glu Gly Val Tyr Gly Trp Ile Thr Ala Asn Tyr					
[1094]		180		185		190
[1095]	Leu Met Gly Asn Phe Leu Glu Lys Asn Leu Trp His Met Trp Val His					
[1096]		195		200		205
[1097]	Pro His Gly Val Glu Thr Thr Gly Ala Leu Asp Leu Gly Gly Ala Ser					
[1098]		210		215		220
[1099]	Thr Gln Ile Ser Phe Val Ala Gly Glu Lys Met Asp Leu Asn Thr Ser					
[1100]	225		230		235	240
[1101]	Asp Ile Met Gln Val Ser Leu Tyr Gly Tyr Val Tyr Thr Leu Tyr Thr					
[1102]		245		250		255
[1103]	His Ser Phe Gln Cys Tyr Gly Arg Asn Glu Ala Glu Lys Lys Phe Leu					
[1104]		260		265		270
[1105]	Ala Met Leu Leu Gln Asn Ser Pro Thr Lys Asn His Leu Thr Asn Pro					
[1106]		275		280		285
[1107]	Cys Tyr Pro Arg Asp Tyr Ser Ile Ser Phe Thr Met Gly His Val Phe					
[1108]		290		295		300
[1109]	Asp Ser Leu Cys Thr Val Asp Gln Arg Pro Glu Ser Tyr Asn Pro Asn					
[1110]	305		310		315	320
[1111]	Asp Val Ile Thr Phe Glu Gly Thr Gly Asp Pro Ser Leu Cys Lys Glu					
[1112]		325		330		335
[1113]	Lys Val Ala Ser Ile Phe Asp Phe Lys Ala Cys His Asp Gln Glu Thr					
[1114]		340		345		350
[1115]	Cys Ser Phe Asp Gly Val Tyr Gln Pro Lys Ile Lys Gly Pro Phe Val					
[1116]		355		360		365
[1117]	Ala Phe Ala Gly Phe Tyr Tyr Thr Ala Ser Ala Leu Asn Leu Ser Gly					
[1118]		370		375		380
[1119]	Ser Phe Ser Leu Asp Thr Phe Asn Ser Ser Thr Trp Asn Phe Cys Ser					
[1120]	385		390		395	400
[1121]	Gln Asn Trp Ser Gln Leu Pro Leu Leu Leu Pro Lys Phe Asp Glu Val					
[1122]		405		410		415
[1123]	Tyr Ala Arg Ser Tyr Cys Phe Ser Ala Asn Tyr Ile Tyr His Leu Phe					
[1124]		420		425		430
[1125]	Val Asn Gly Tyr Lys Phe Thr Glu Glu Thr Trp Pro Gln Ile His Phe					
[1126]		435		440		445
[1127]	Glu Lys Glu Val Gly Asn Ser Ser Ile Ala Trp Ser Leu Gly Tyr Met					
[1128]		450		455		460
[1129]	Leu Ser Leu Thr Asn Gln Ile Pro Ala Glu Ser Pro Leu Ile Arg Leu					
[1130]	465		470		475	480

[1131]	Pro	Ile	Glu	Pro	Pro	Val	Phe	Val	Gly	Thr	Leu	Ala	Phe	Phe	Thr	Ala
[1132]						485					490					495
[1133]	Ala	Ala	Leu	Leu	Cys	Leu	Ala	Phe	Leu	Ala	Tyr	Leu	Cys	Ser	Ala	Thr
[1134]						500					505					510
[1135]	Arg	Arg	Lys	Arg	His	Ser	Glu	His	Ala	Phe	Asp	His	Ala	Val	Asp	Ser
[1136]						515					520					525
[1137]	Asp															
[1138]	<210>	58														
[1139]	<211>	428														
[1140]	<212>	PRT														
[1141]	<213>	智人														
[1142]	<400>	58														
[1143]	Met	Ala	Thr	Ser	Trp	Gly	Thr	Val	Phe	Phe	Met	Leu	Val	Val	Ser	Cys
[1144]	1					5					10					15
[1145]	Val	Cys	Ser	Ala	Val	Ser	His	Arg	Asn	Gln	Gln	Thr	Trp	Phe	Glu	Gly
[1146]						20					25					30
[1147]	Ile	Phe	Leu	Ser	Ser	Met	Cys	Pro	Ile	Asn	Val	Ser	Ala	Ser	Thr	Leu
[1148]						35					40					45
[1149]	Tyr	Gly	Ile	Met	Phe	Asp	Ala	Gly	Ser	Thr	Gly	Thr	Arg	Ile	His	Val
[1150]						50					55					60
[1151]	Tyr	Thr	Phe	Val	Gln	Lys	Met	Pro	Gly	Gln	Leu	Pro	Ile	Leu	Glu	Gly
[1152]	65										70					80
[1153]	Glu	Val	Phe	Asp	Ser	Val	Lys	Pro	Gly	Leu	Ser	Ala	Phe	Val	Asp	Gln
[1154]						85					90					95
[1155]	Pro	Lys	Gln	Gly	Ala	Glu	Thr	Val	Gln	Gly	Leu	Leu	Glu	Val	Ala	Lys
[1156]						100					105					110
[1157]	Asp	Ser	Ile	Pro	Arg	Ser	His	Trp	Lys	Lys	Thr	Pro	Val	Val	Leu	Lys
[1158]						115					120					125
[1159]	Ala	Thr	Ala	Gly	Leu	Arg	Leu	Leu	Pro	Glu	His	Lys	Ala	Lys	Ala	Leu
[1160]						130					135					140
[1161]	Leu	Phe	Glu	Val	Lys	Glu	Ile	Phe	Arg	Lys	Ser	Pro	Phe	Leu	Val	Pro
[1162]	145										150					160
[1163]	Lys	Gly	Ser	Val	Ser	Ile	Met	Asp	Gly	Ser	Asp	Glu	Gly	Ile	Leu	Ala
[1164]						165					170					175
[1165]	Trp	Val	Thr	Val	Asn	Phe	Leu	Thr	Gly	Gln	Leu	His	Gly	His	Arg	Gln
[1166]						180					185					190
[1167]	Glu	Thr	Val	Gly	Thr	Leu	Asp	Leu	Gly	Gly	Ala	Ser	Thr	Gln	Ile	Thr
[1168]						195					200					205
[1169]	Phe	Leu	Pro	Gln	Phe	Glu	Lys	Thr	Leu	Glu	Gln	Thr	Pro	Arg	Gly	Tyr

[1170]	210	215	220
[1171]	Leu Thr Ser Phe Glu Met Phe Asn Ser Thr Tyr Lys Leu Tyr Thr His		
[1172]	225	230	235
[1173]	Ser Tyr Leu Gly Phe Gly Leu Lys Ala Ala Arg Leu Ala Thr Leu Gly		
[1174]	245	250	255
[1175]	Ala Leu Glu Thr Glu Gly Thr Asp Gly His Thr Phe Arg Ser Ala Cys		
[1176]	260	265	270
[1177]	Leu Pro Arg Trp Leu Glu Ala Glu Trp Ile Phe Gly Gly Val Lys Tyr		
[1178]	275	280	285
[1179]	Gln Tyr Gly Gly Asn Gln Glu Gly Glu Val Gly Phe Glu Pro Cys Tyr		
[1180]	290	295	300
[1181]	Ala Glu Val Leu Arg Val Val Arg Gly Lys Leu His Gln Pro Glu Glu		
[1182]	305	310	315
[1183]	Val Gln Arg Gly Ser Phe Tyr Ala Phe Ser Tyr Tyr Tyr Asp Arg Ala		
[1184]	325	330	335
[1185]	Val Asp Thr Asp Met Ile Asp Tyr Glu Lys Gly Gly Ile Leu Lys Val		
[1186]	340	345	350
[1187]	Glu Asp Phe Glu Arg Lys Ala Arg Glu Val Cys Asp Asn Leu Glu Asn		
[1188]	355	360	365
[1189]	Phe Thr Ser Gly Ser Pro Phe Leu Cys Met Asp Leu Ser Tyr Ile Thr		
[1190]	370	375	380
[1191]	Ala Leu Leu Lys Asp Gly Phe Gly Phe Ala Asp Ser Thr Val Leu Gln		
[1192]	385	390	395
[1193]	Leu Thr Lys Lys Val Asn Asn Ile Glu Thr Gly Trp Ala Leu Gly Ala		
[1194]	405	410	415
[1195]	Thr Phe His Leu Leu Gln Ser Leu Gly Ile Ser His		
[1196]	420	425	
[1197]	<210> 59		
[1198]	<211> 330		
[1199]	<212> PRT		
[1200]	<213> 智人		
[1201]	<400> 59		
[1202]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
[1203]	1	5	10
[1204]	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
[1205]	20	25	30
[1206]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
[1207]	35	40	45
[1208]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		

[1209]	50	55	60
[1210]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
[1211]	65	70	75
[1212]	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
[1213]	85	90	95
[1214]	Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
[1215]	100	105	110
[1216]	Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
[1217]	115	120	125
[1218]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
[1219]	130	135	140
[1220]	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
[1221]	145	150	155
[1222]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
[1223]	165	170	175
[1224]	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
[1225]	180	185	190
[1226]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
[1227]	195	200	205
[1228]	Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
[1229]	210	215	220
[1230]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
[1231]	225	230	235
[1232]	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
[1233]	245	250	255
[1234]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
[1235]	260	265	270
[1236]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
[1237]	275	280	285
[1238]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
[1239]	290	295	300
[1240]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
[1241]	305	310	315
[1242]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[1243]	325	330	
[1244]	<210> 60		
[1245]	<211> 330		
[1246]	<212> PRT		
[1247]	<213> 智人		

[1248]	<400>	60														
[1249]	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
[1250]	1				5					10					15	
[1251]	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
[1252]					20					25					30	
[1253]	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
[1254]					35					40					45	
[1255]	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
[1256]					50					55					60	
[1257]	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
[1258]	65									70						80
[1259]	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
[1260]						85					90					95
[1261]	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
[1262]						100					105				110	
[1263]	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
[1264]						115					120				125	
[1265]	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
[1266]						130									140	
[1267]	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
[1268]	145									150					155	160
[1269]	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
[1270]						165					170					175
[1271]	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
[1272]						180					185				190	
[1273]	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
[1274]						195					200				205	
[1275]	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
[1276]						210					215				220	
[1277]	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
[1278]	225									230					235	240
[1279]	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
[1280]						245					250					255
[1281]	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
[1282]						260					265				270	
[1283]	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
[1284]						275					280				285	
[1285]	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
[1286]						290					295				300	

[1287]	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
[1288]	305						310				315					320
[1289]	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
[1290]						325					330					
[1291]	<210>	61														
[1292]	<211>	330														
[1293]	<212>	PRT														
[1294]	<213>	智人														
[1295]	<400>	61														
[1296]	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
[1297]	1				5					10					15	
[1298]	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
[1299]				20					25					30		
[1300]	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
[1301]				35					40					45		
[1302]	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
[1303]		50					55						60			
[1304]	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
[1305]	65					70					75					80
[1306]	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
[1307]				85						90					95	
[1308]	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
[1309]				100						105				110		
[1310]	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
[1311]				115						120				125		
[1312]	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
[1313]		130								135				140		
[1314]	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
[1315]	145						150				155					160
[1316]	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
[1317]					165						170				175	
[1318]	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
[1319]				180						185				190		
[1320]	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
[1321]				195						200				205		
[1322]	Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
[1323]		210							215				220			
[1324]	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
[1325]	225						230					235				240

[1326]	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
[1327]					245					250					255	
[1328]	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
[1329]					260					265					270	
[1330]	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
[1331]					275					280					285	
[1332]	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
[1333]					290					295					300	
[1334]	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
[1335]	305															
[1336]	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
[1337]																
[1338]	<210>	62														
[1339]	<211>	330														
[1340]	<212>	PRT														
[1341]	<213>	智人														
[1342]	<400>	62														
[1343]	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
[1344]	1				5					10					15	
[1345]	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
[1346]					20					25					30	
[1347]	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
[1348]					35					40					45	
[1349]	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
[1350]					50					55					60	
[1351]	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
[1352]	65														75	
[1353]	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
[1354]																
[1355]	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
[1356]					100					105					110	
[1357]	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
[1358]					115					120					125	
[1359]	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
[1360]																
[1361]	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
[1362]	145															
[1363]	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
[1364]																

[1365]	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
[1366]				180				185					190			
[1367]	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
[1368]			195				200					205				
[1369]	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
[1370]		210					215					220				
[1371]	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
[1372]	225					230					235				240	
[1373]	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
[1374]				245					250					255		
[1375]	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
[1376]			260					265					270			
[1377]	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
[1378]		275					280					285				
[1379]	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
[1380]		290					295					300				
[1381]	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
[1382]	305					310					315				320	
[1383]	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
[1384]				325					330							

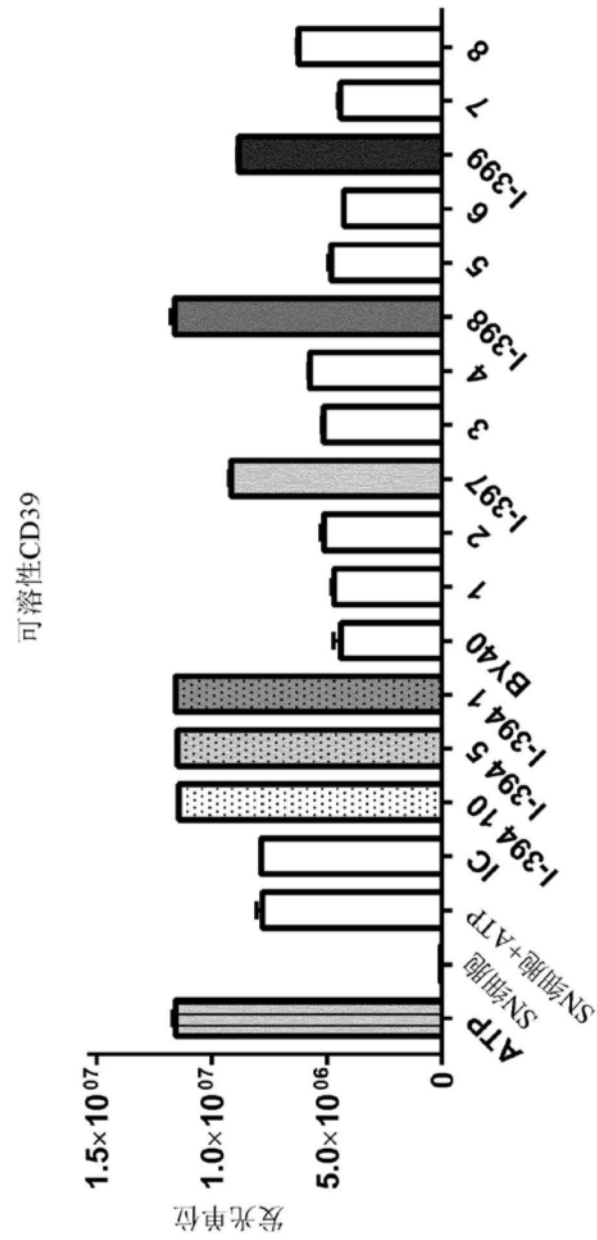


图1

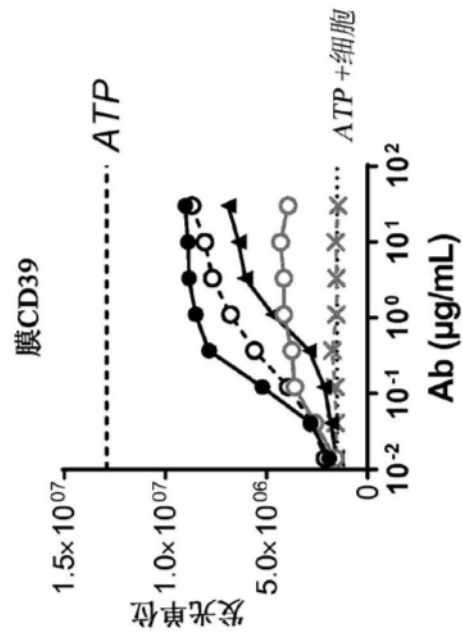


图2A

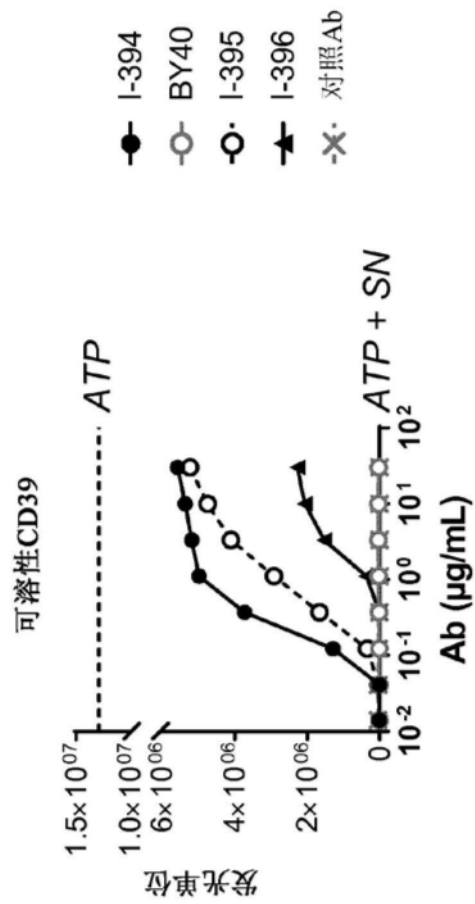


图2B

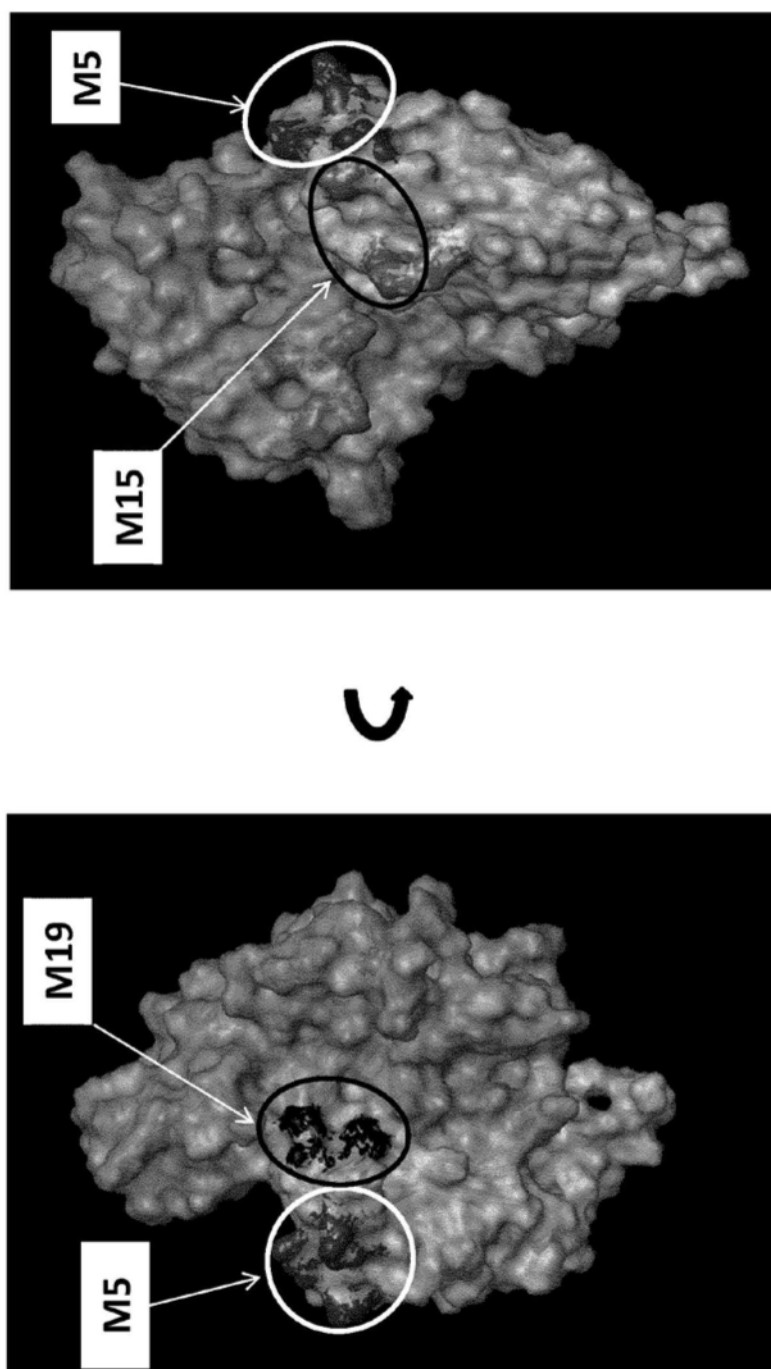


图3A

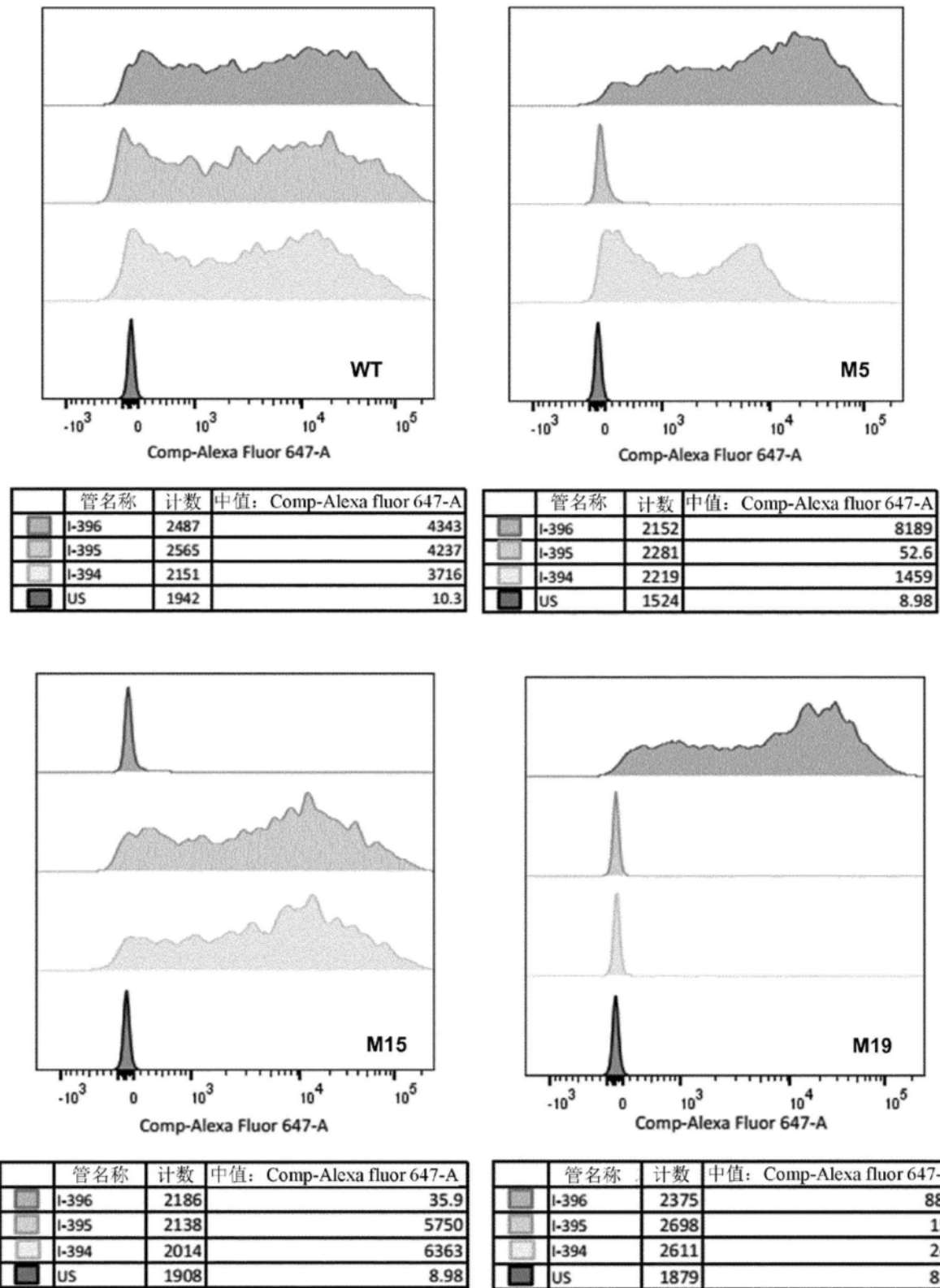


图3B

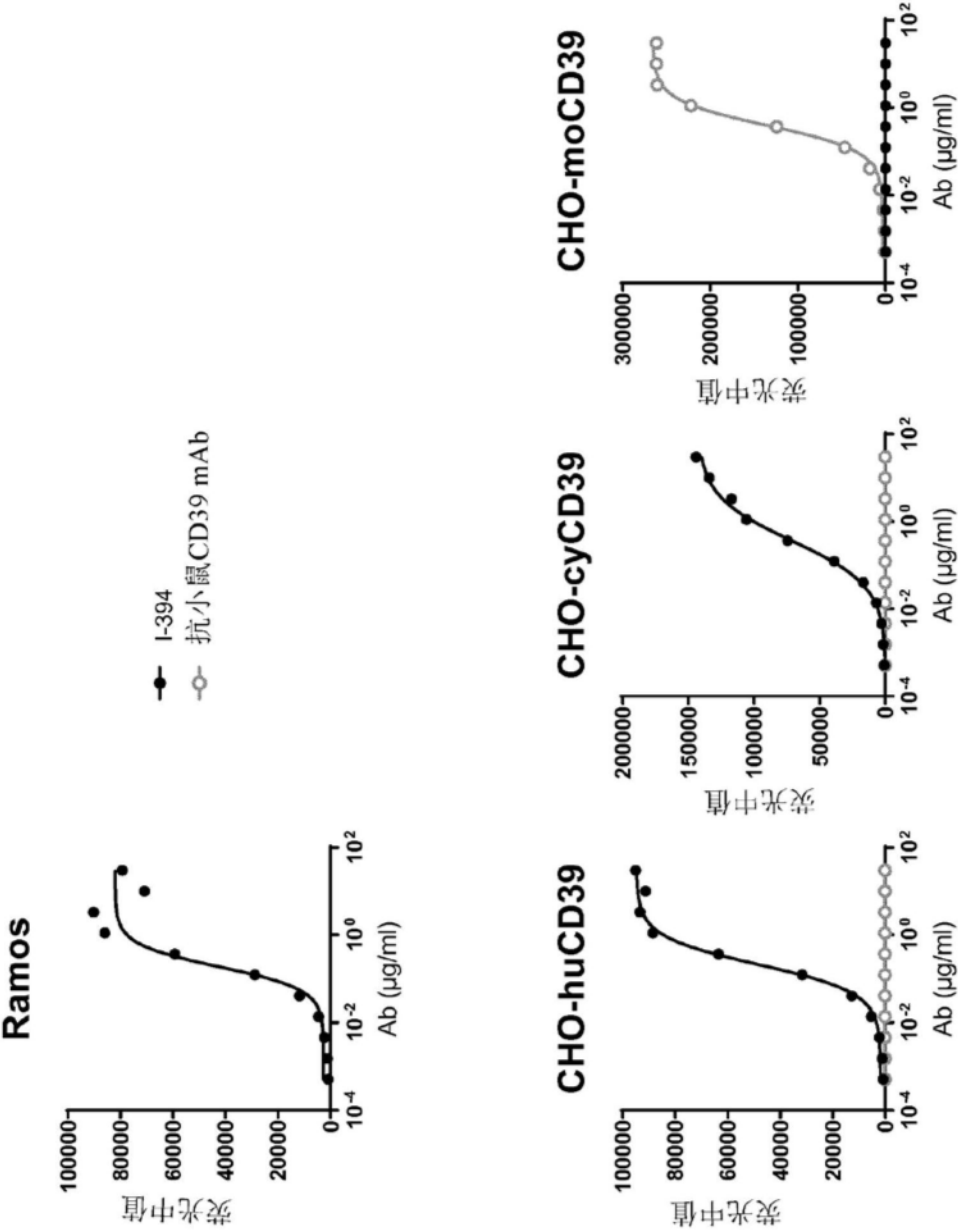


图4

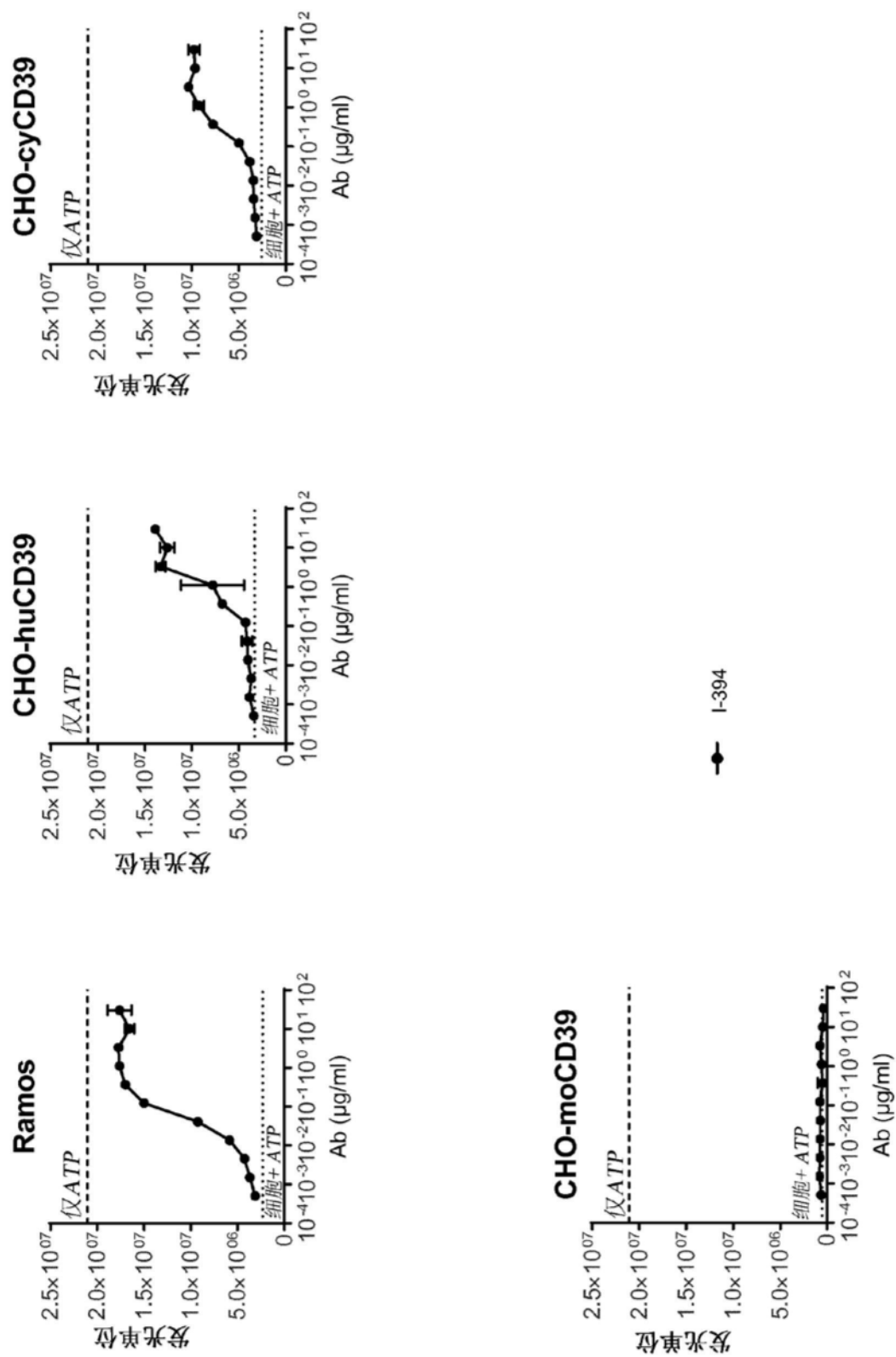


图5

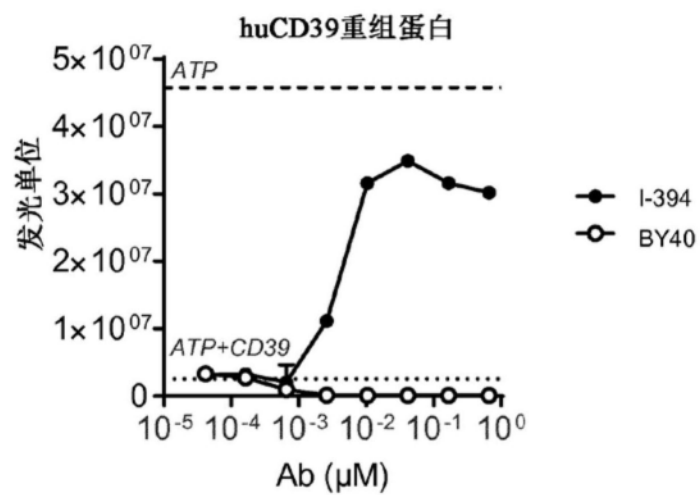


图6

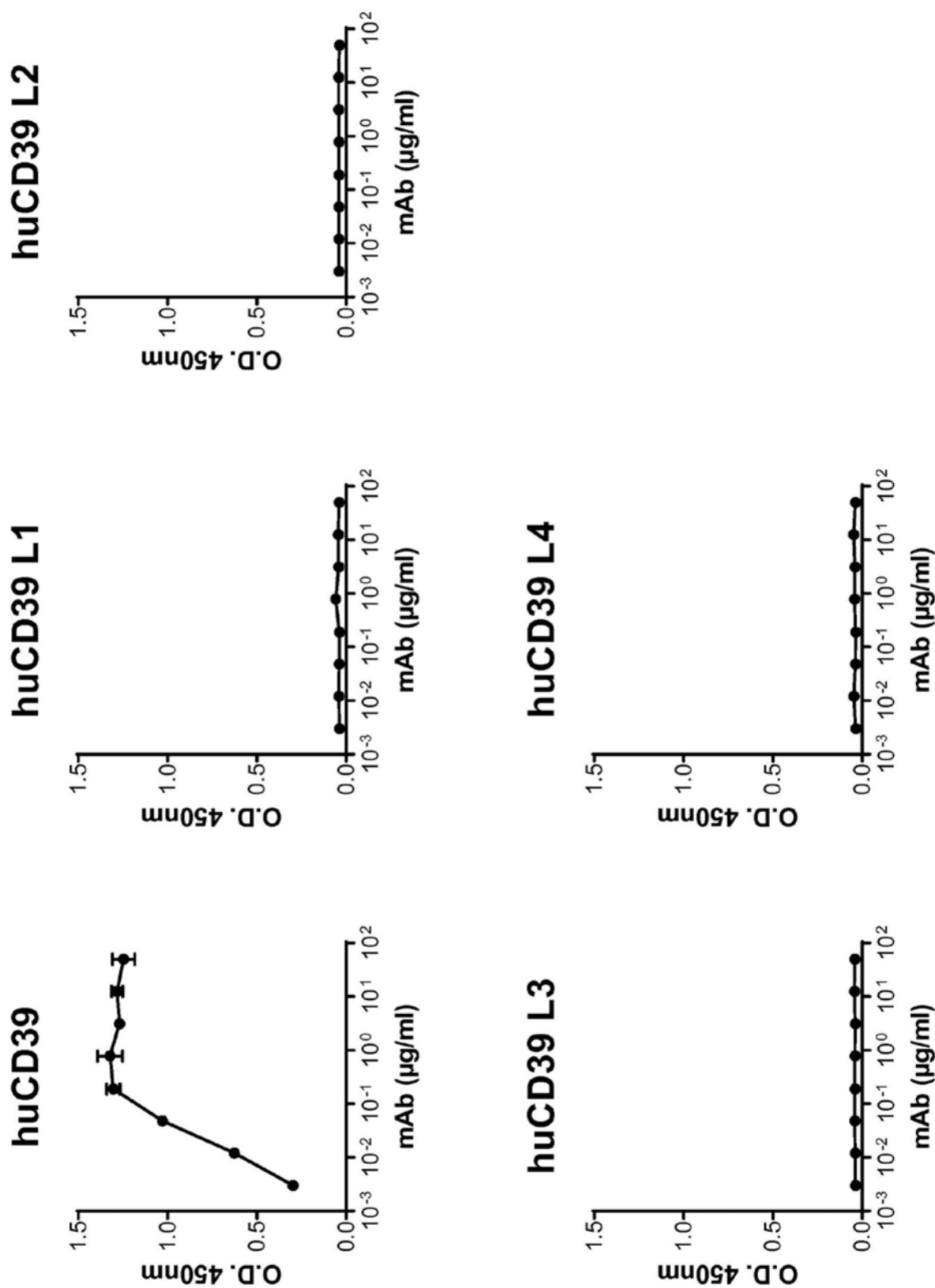


图7

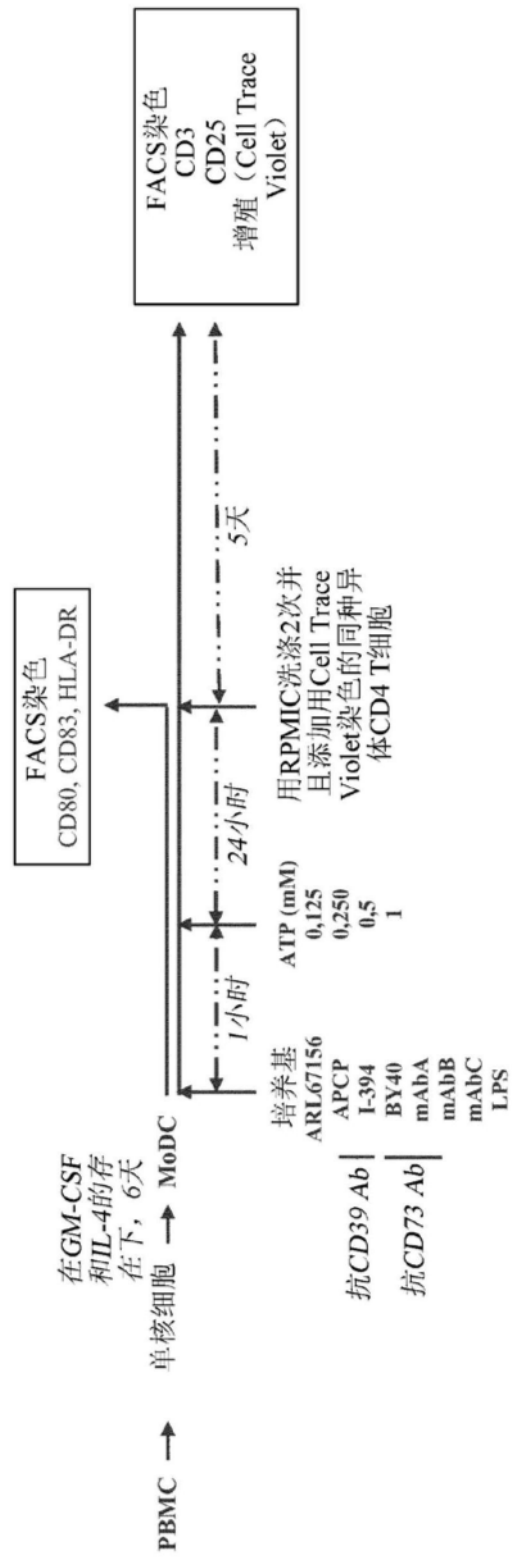


图8

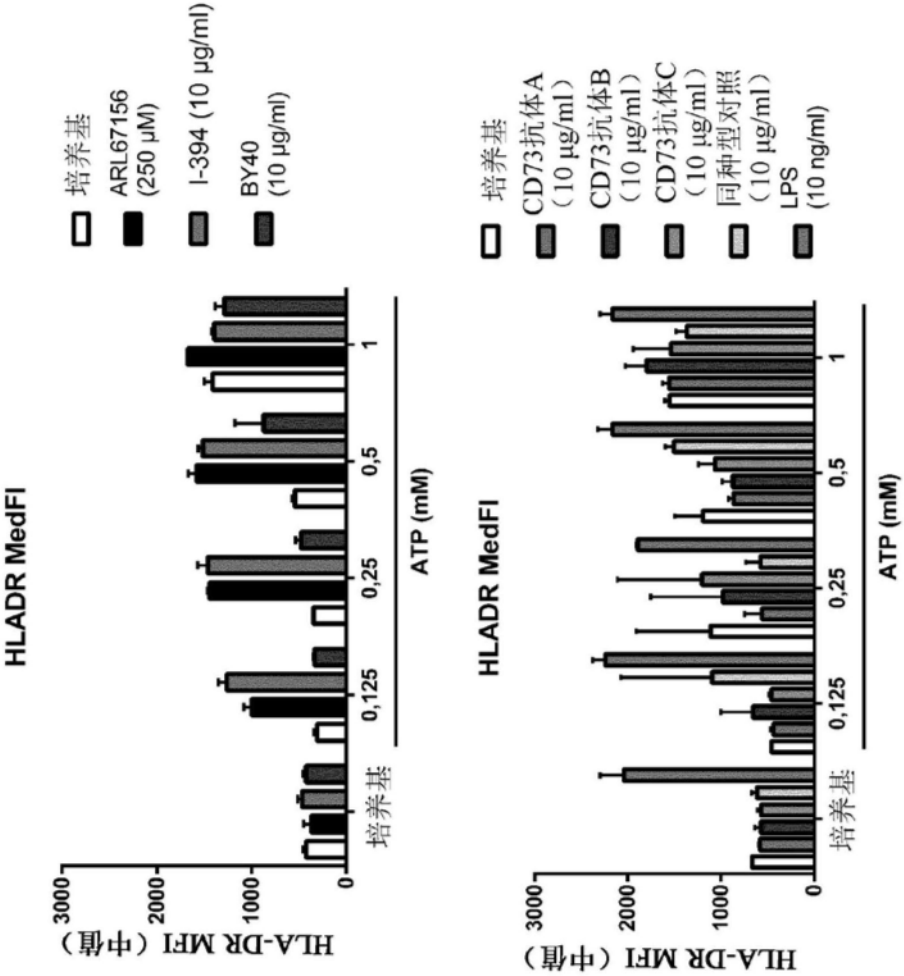


图9

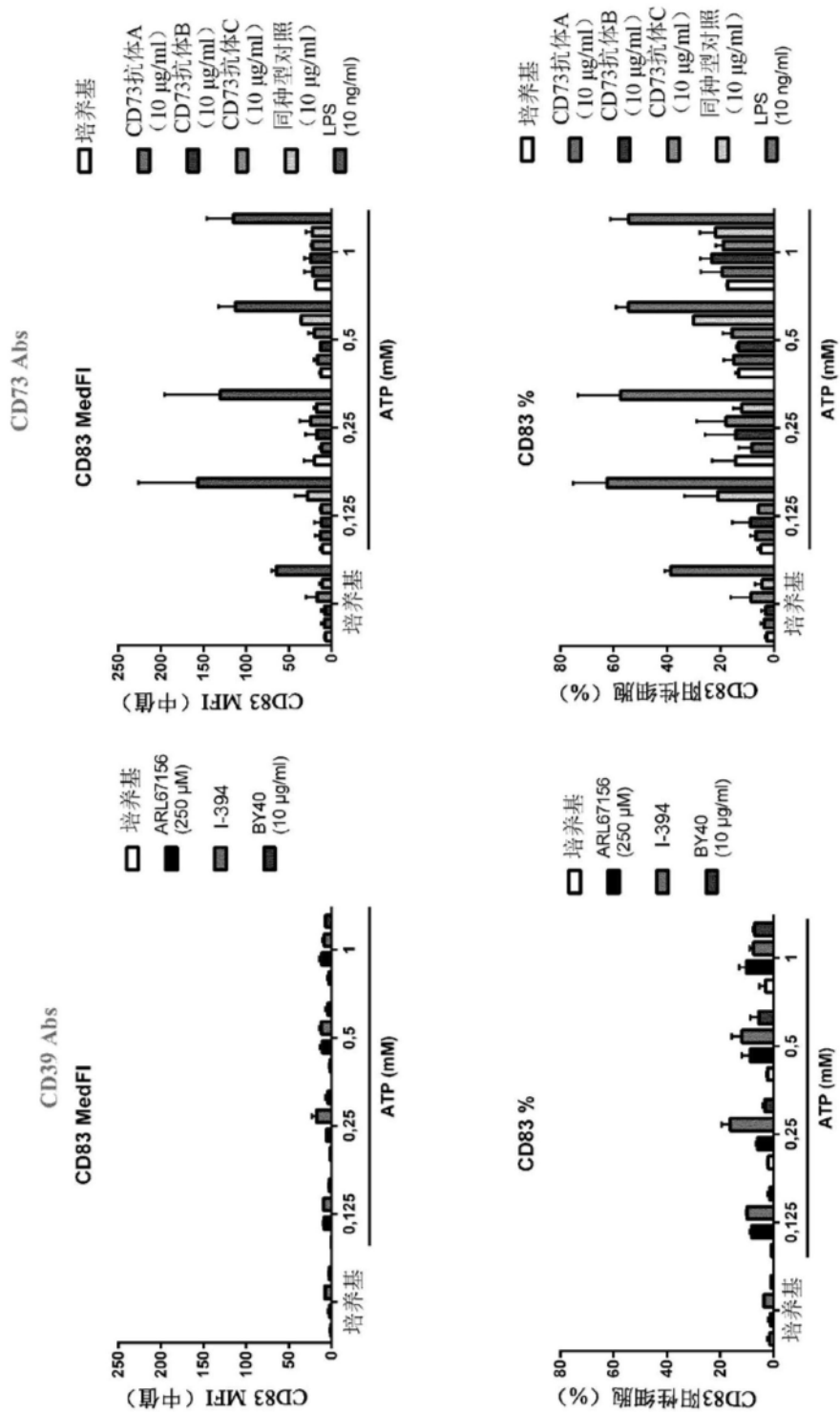


图10

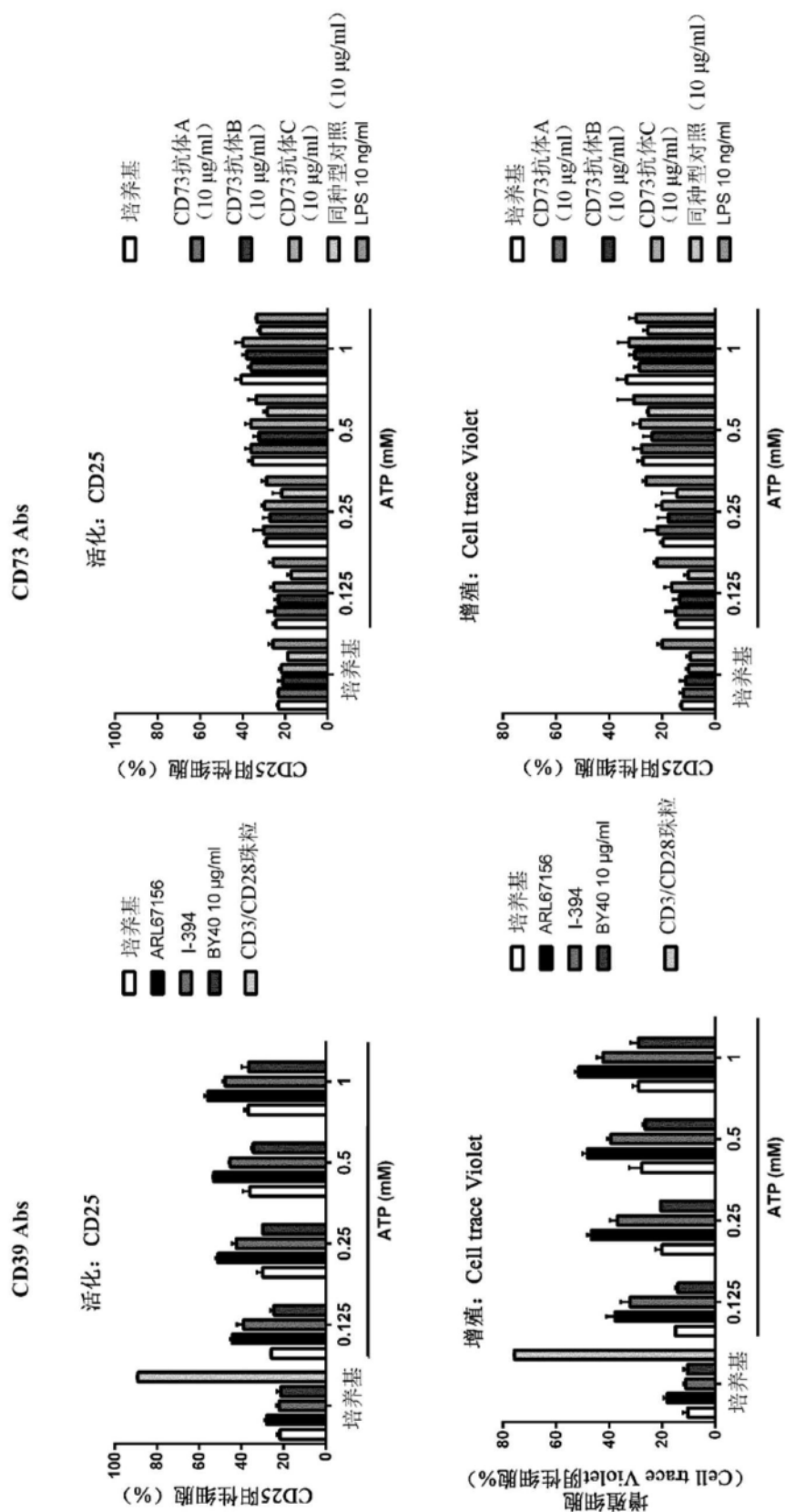


图11

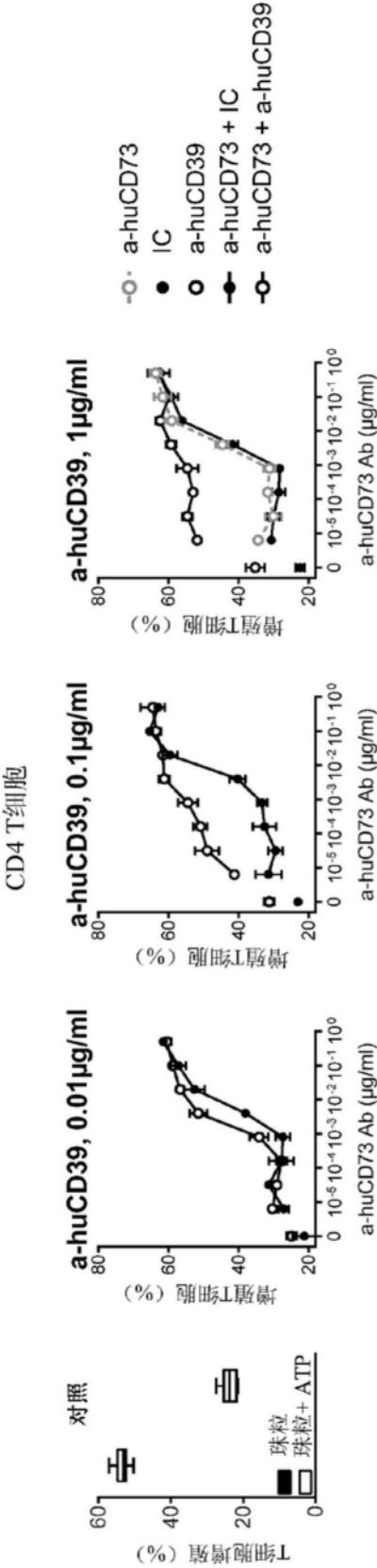


图12A

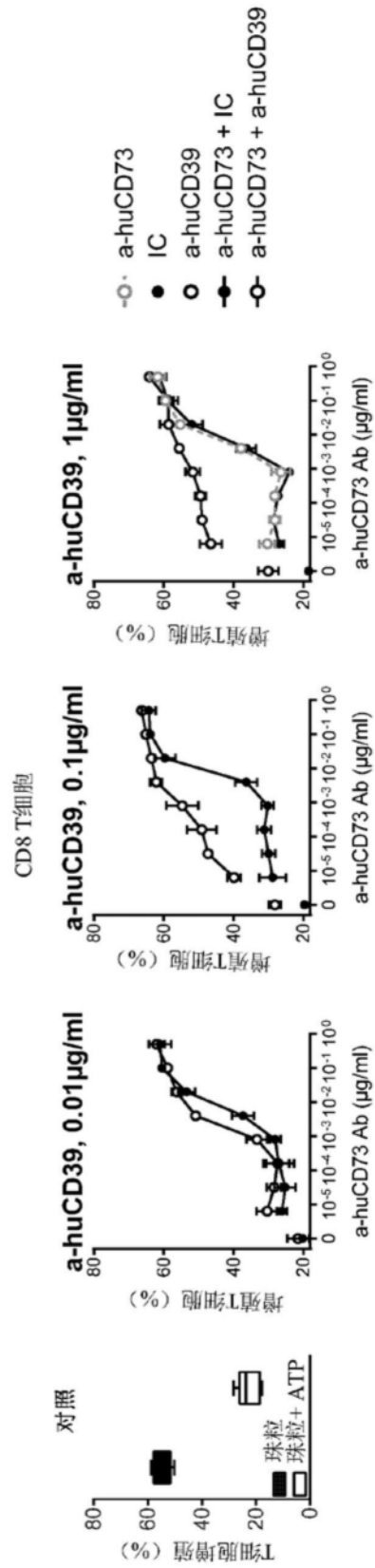


图12B

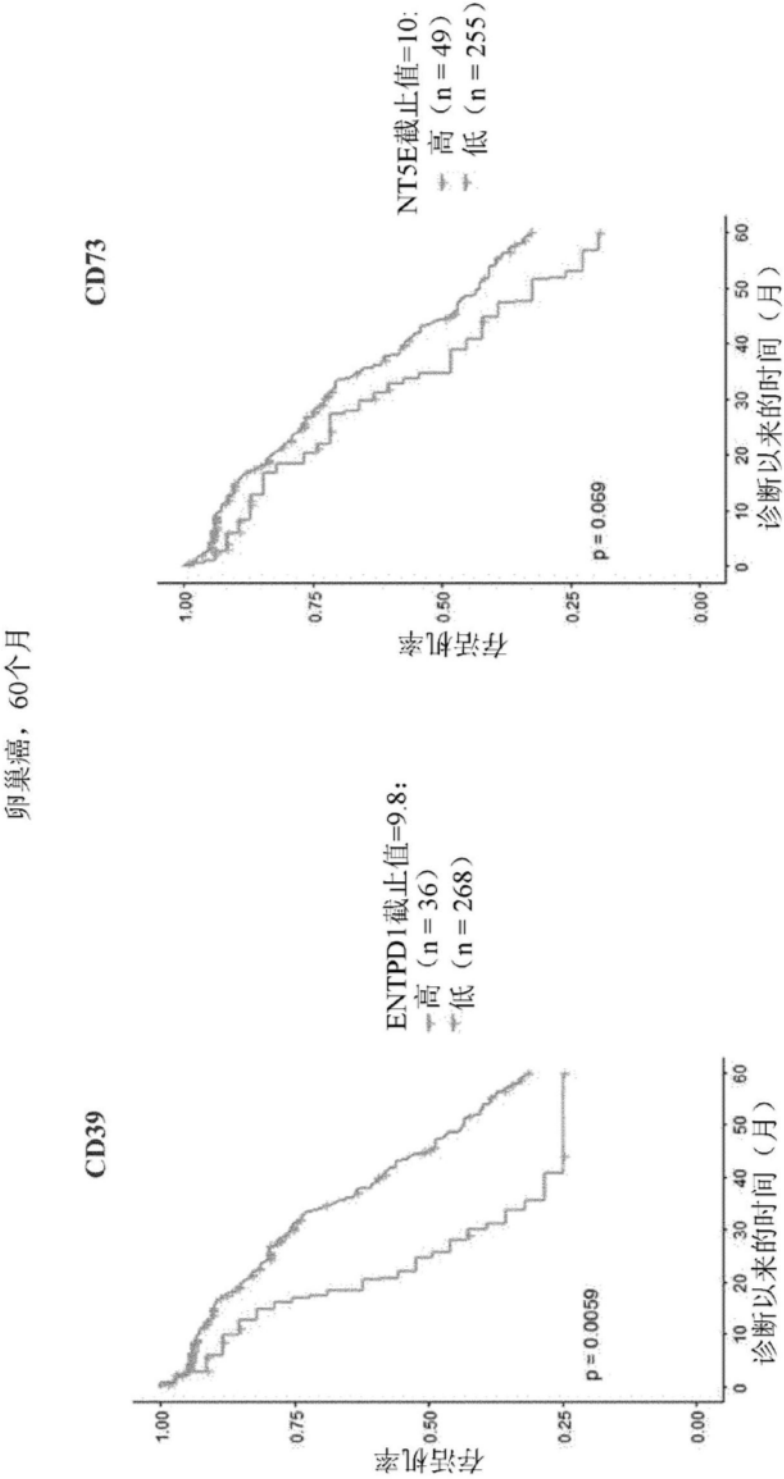
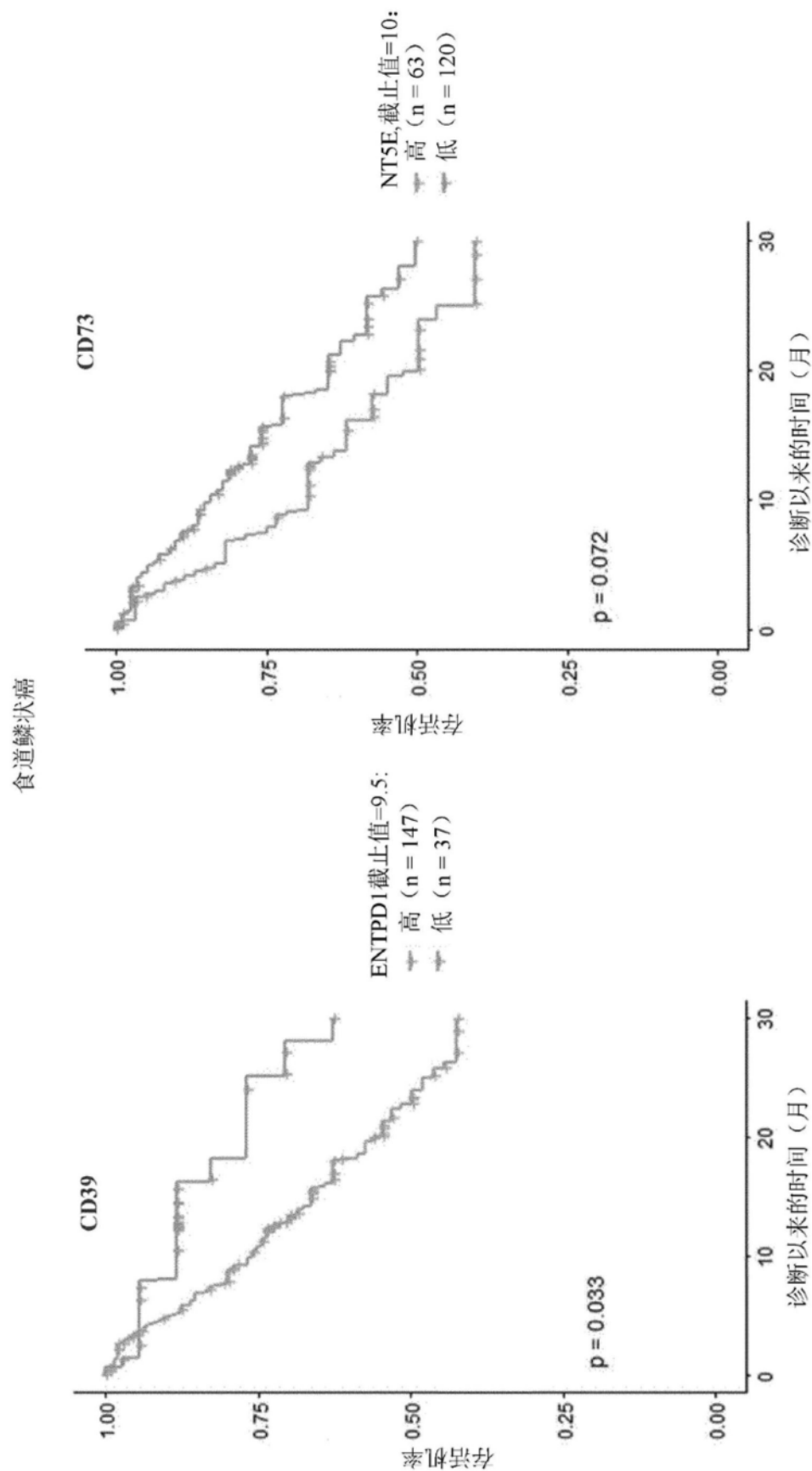


图13A



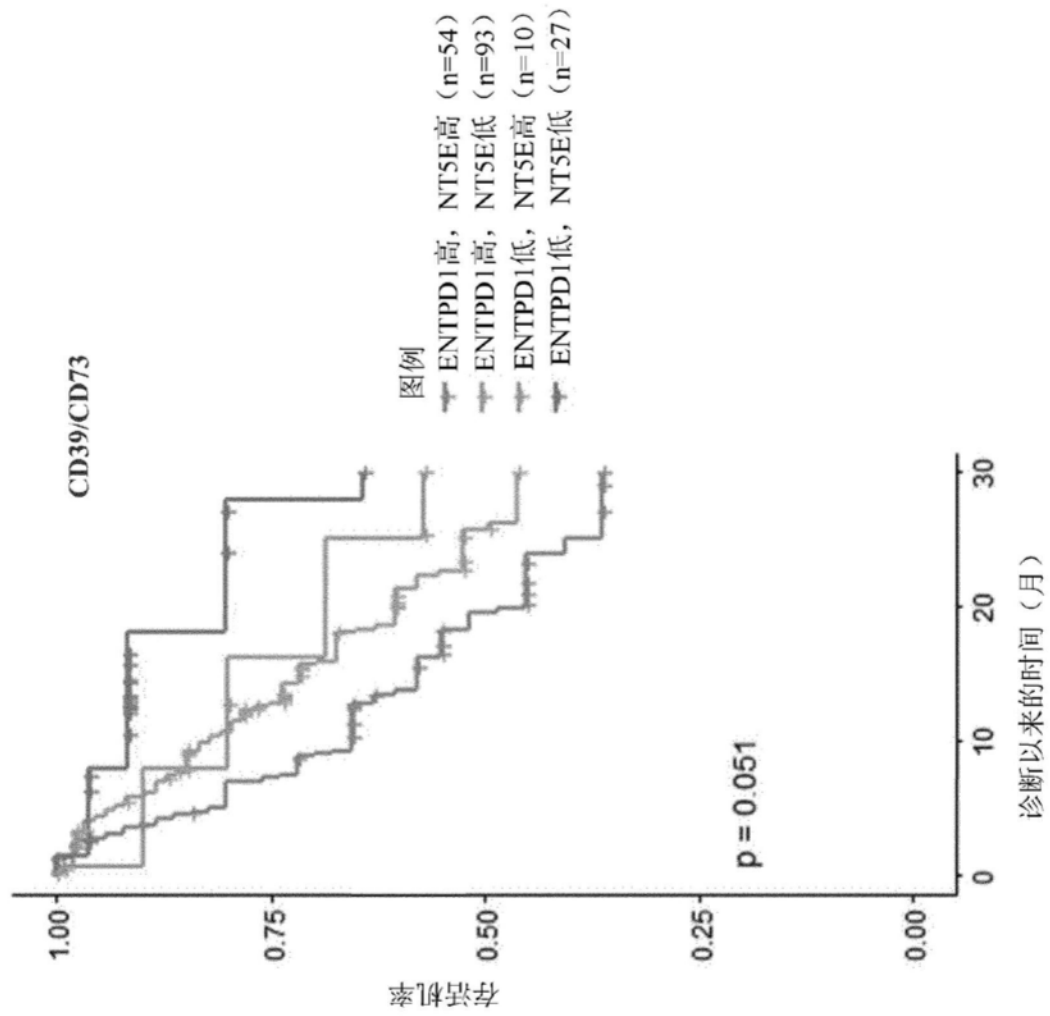


图13B

胃腺癌，24个月

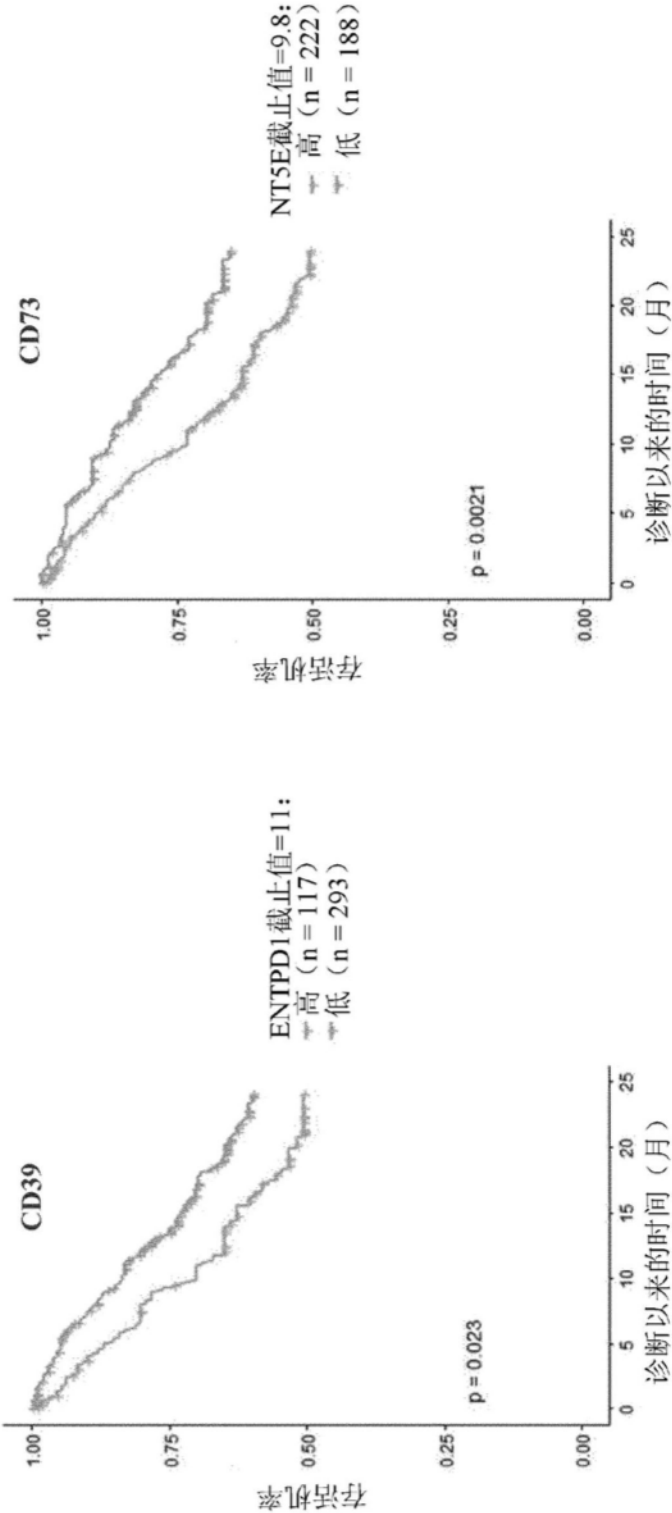


图13C