



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201632555 A

(43) 公開日：中華民國 105 (2016) 年 09 月 16 日

(21) 申請案號：104137067

(22) 申請日：中華民國 104 (2015) 年 11 月 10 日

(51) Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)
A61P35/00 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

(30) 優先權：2014/11/10 美國 62/077,486
2015/04/14 美國 62/147,329
2015/07/06 美國 62/188,999(71) 申請人：梅迪繆思有限公司 (英國) MEDIMMUNE LIMITED (GB)
英國(72) 發明人：明特 羅夫 MINTER, RALPH (GB)；魯斯特 史蒂芬 RUST, STEVEN (US)；古
拉德 山卓因 GUILLARD, SANDRINE (GB)；傑姆特思 盧茲 U JERMUTUS,
LUTZ U (DE)；海 卡爾 HAY, CARL (US)；薩奇聖梅爾 克里斯
SACHSENMEIER, KRIS (US)；梭特 艾林 SULT, ERIN (US)；黃 棋惠 HUANG,
QIHUI (US)；帕芙里客 彼得 PAVLIK, PETER (US)；丹舒羅德 梅麗莎
DAMSCHRODER, MELISSA (US)；鄭 禮 CHENG, LI (US)；黛迪里奇 剛朵
DIEDRICH, GUNDO (DE)；里歐思 朵里亞 強納森 RIOS-DORIA, JONATHAN
(US)；漢蒙德 史考特 HAMMOND, SCOTT (US)；何林斯沃圖 羅伯特 E
HOLLINGSWORTH, ROBERT E (US)；杜爾翰 尼可拉斯 DURHAM, NICHOLAS
(US)；李奧 晶晶 LEOW, CHING CHING (US)；安東尼山蜜 瑪利
ANTONY SAMY, MARY (IN)；喬格根 詹姆士 GEOGHEGAN, JAMES (US)；盧
曉君 LU, XIAOJUN (CN)；羅森泰 金 ROSENTHAL, KIM (US)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：48 項 圖式數：33 共 325 頁

(54) 名稱

對 CD 73 具專一性之結合分子及其用途

BINDING MOLECULES SPECIFIC FOR CD73 AND USES THEREOF

(57) 摘要

本發明提供抗-CD73 結合分子，例如抗體及其抗原結合片段。亦提供包含所揭示之組合物的醫藥調配物，及用於診斷及治療與 CD73 表現相關之疾病(例如癌症)的方法。該等疾病可例如利用以下治療：使用本文中所揭示之抗-CD73 結合分子(例如結合 CD73 之裸抗體或抗體-藥物結合物)的直接療法，使用其他抗原結合抗癌劑(諸如免疫檢查點抑制劑，例如抗-CTLA-4 及抗-PD-1 單株抗體)的輔助療法，及/或抗-CD73 分子在化學療法之前、之後或同時投與的組合療法。

The present disclosure provides anti-CD73 binding molecules, e.g., antibodies and antigen binding fragments thereof. Also provided are pharmaceutical formulations comprising the disclosed compositions, and methods for the diagnosis and treatment of diseases associated with CD73-expression, e.g., cancer. Such diseases can be treated, e.g., by direct therapy with the anti-CD73 binding molecules disclosed herein (e.g., naked antibodies or antibody-drug conjugates that bind CD73), by adjuvant therapy with other antigen-

binding anticancer agents such as immune checkpoint inhibitors (e.g., anti-CTLA-4 and anti-PD-1 monoclonal antibodies), and/or by combination therapies where the anti-CD73 molecules are administered before, after, or concurrently with chemotherapy.

指定代表圖：

抗體介導之細胞毒性FabZAP試劑內化至MDA-MB-231細胞及4T1細胞中

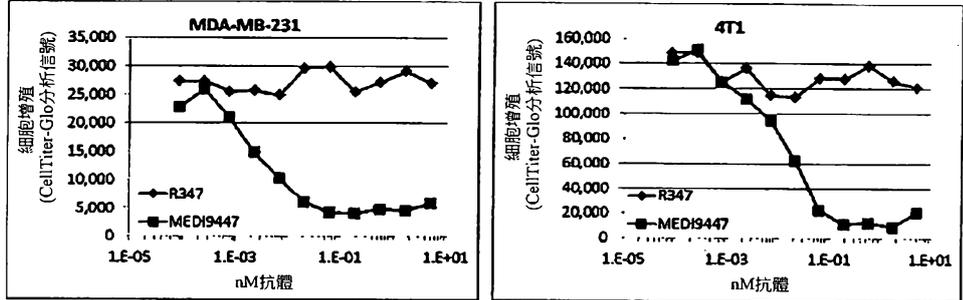


圖2

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

對CD73具專一性之結合分子及其用途

BINDING MOLECULES SPECIFIC FOR CD73 AND USES
THEREOF

【先前技術】

CD73或外-5'-核苷酸酶(5'-NT)在許多組織中廣泛表現。此蛋白經由糖基化磷脂醯肌醇(GPI)鍵錨定至細胞膜，具有外酶活性且起信號轉導作用。CD73之主要功能為將細胞通常不可滲透的細胞外核苷酸(例如5'-AMP)轉化成易於進入大部分細胞之其相應核苷(例如腺苷)。已展示出腺苷利用AMP之去磷酸化的CD73製造在許多組織中調節腺苷受體接合，指示腺苷在細胞保護、細胞生長、血管生成及免疫抑制中起作用且亦起腫瘤發生作用。

腫瘤細胞上之CD73表現在數種類型癌症中有所報導，包括結腸直腸癌、胰臟癌、膀胱癌、白血病、淋巴瘤、膠質瘤、神經膠母細胞瘤、黑素瘤、卵巢癌、甲狀腺癌、食道癌、前列腺癌及乳癌。CD73表現升高亦與腫瘤侵襲性、癌轉移及患者生存時間縮短相關。CD73產生免疫抑制環境，其特徵為腺苷含量增加，此促進癌症之發展及進展。值得注意的是，CD73表現已與黑素瘤及乳癌中之促轉移表型相關的。

免疫檢查點抑制劑保持作為癌症治療劑之極大可能性。儘管如此，來自免疫檢查點抑制之臨床益處適中。一種可能的解釋為腫瘤使用非重疊免疫抑制機制來促進免疫逃脫。因此，迫切需要用於減少腫瘤介導之免疫抑制的改進之組合物及方法。

【發明內容】

本發明提供專一性結合至CD73的經分離之結合分子或其抗原結合片段。在一些態樣中，該等CD73結合分子為例如抗體或其抗原結合片段。在特定實施例中，本發明之抗-CD73抗體(例如MEDI9447)適用於減少腫瘤介導之免疫抑制。相應地，本發明亦提供治療組合，該等治療組合提供抗-CD73抗體(例如MEDI9447)及靶向癌症免疫循環之其他態樣的其他藥劑(亦即抗-PD-1或抗-PD-L1抗體；抗-CTLA4抗體、A2aR拮抗劑、STAT-3抑制劑)，且使用該等組合之方法適用於減少腫瘤介導之免疫抑制。

在一個態樣中，本發明提供一種專一性結合至CD73抗原決定基的經分離之結合分子或其抗原結合片段，其中該結合分子專一性結合至與具有選自以下各者之抗體的重鏈可變區(V_H)及輕鏈可變區(V_L)之抗體或其抗原結合片段相同的CD73抗原決定基：CD730002、CD730003、CD730004、CD730008、CD730010、CD730011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047或CD730058。

在另一態樣中，本發明提供一種經分離之結合分子或其抗原結合片段，其專一性結合至CD73，且競爭性地抑制CD73由包含CD730002、CD730003、CD730004、CD730008、CD730010、CD730011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047或CD730058之V_H及V_L的抗體或其抗原結合片段結合。

在另一態樣中，本發明提供一種專一性結合至CD73的經分離之結合分子或其抗原結合片段，其包含抗體V_L，其中該V_L具有胺基酸序列：

[FW₁]SGSLSNIGRNX₁VN[FW₂]LX₂NX₃RX₄X₅[FW₃]ATWDDSX₆X₇
GWX₈[FW₄]

其中[FW₁]、[FW₂]、[FW₃]及[FW₄]表示V_L構架區，且其中X₁表示

胺基酸殘基脯胺酸(P)、麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)；X₂表示胺基酸殘基天冬醯胺(N)或天冬胺酸(D)；

X₃表示胺基酸殘基麩醯胺酸(Q)或白胺酸(L)；

X₄表示胺基酸殘基白胺酸(L)或脯胺酸(P)；

X₅表示胺基酸殘基甘胺酸(G)或絲胺酸(S)；

X₆表示胺基酸殘基白胺酸(L)或組胺酸(H)；

X₇表示胺基酸殘基離胺酸(K)、脯胺酸(P)、異白胺酸(I)或天冬醯胺(N)；且

X₈表示胺基酸殘基白胺酸(L)或蘇胺酸(T)。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，如技術方案6之經分離之結合分子或其抗原結合片段，其中FW₁包含SEQ ID NO: 25或26，FW₂包含SEQ ID NO: 27或28，FW₃包含SEQ ID NO: 29，且FW₄包含SEQ ID NO: 30。

在另一態樣中，本發明提供一種專一性結合至CD73的經分離之結合分子或其抗原結合片段，其包含抗體V_H，其中該V_H具有胺基酸序列：

[FW₅]SYAX₉S[FW₆]X₁₀IX₁₁GSX₁₂GX₁₃TYADSVK[FW₇]LGYX₁₄
X₁₅X₁₆DX₁₇ [FW₈]

其中[FW₅]、[FW₆]、[FW₇]及[FW₈]表示VH構架區，且其中

X₉表示胺基酸殘基甲硫胺酸(M)或酪胺酸(Y)；

X₁₀表示胺基酸殘基白胺酸(L)或丙胺酸(A)；

X₁₁表示胺基酸殘基色胺酸(W)或絲胺酸(S)；

X₁₂表示胺基酸殘基色胺酸(W)或甘胺酸(G)；

X₁₃表示胺基酸殘基絲胺酸(S)或精胺酸(R)；

X₁₄表示胺基酸殘基甘胺酸(G)或絲胺酸(S)；

X₁₅表示胺基酸殘基精胺酸(R)或蘇胺酸(T)；

X₁₆表示胺基酸殘基纈胺酸(V)或異白胺酸(I)；且

X₁₇表示胺基酸殘基酪胺酸(Y)、離胺酸(K)、甲硫胺酸(M)、白胺酸(L)或麩胺酸(E)。

在另一態樣中，本發明提供一種專一性結合至CD73的經分離之結合分子或其抗原結合片段，其包含抗體V_L及抗體V_H，其中該V_L包含胺基酸序列：

[FW₁]SGSLSNIGRNX₁VN[FW₂]LX₂NX₃RX₄X₅[FW₃]ATWDDSX₆X₇
GWX₈[FW₄]

其中[FW₁]、[FW₂]、[FW₃]及[FW₄]表示V_L構架區，且其中

X₁表示胺基酸殘基脯胺酸(P)、麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)；

X₂表示胺基酸殘基天冬醯胺(N)或天冬胺酸(D)；

X₃表示胺基酸殘基麩醯胺酸(Q)或白胺酸(L)；

X₄表示胺基酸殘基白胺酸(L)或脯胺酸(P)；

X₅表示胺基酸殘基甘胺酸(G)或絲胺酸(S)；

X₆表示胺基酸殘基白胺酸(L)或組胺酸(H)；

X₇表示胺基酸殘基離胺酸(K)、脯胺酸(P)、異白胺酸(I)或天冬醯胺(N)；且

X₈表示胺基酸殘基白胺酸(L)或蘇胺酸(T)；

且其中該V_H包含胺基酸序列：

[FW₅]SYAX₉S[FW₆]X₁₀IX₁₁G SX₁₂GX₁₃TY YADSVKG[FW₇]LGYX₁₄
X₁₅X₁₆DX₁₇ [FW₈]

其中[FW₅]、[FW₆]、[FW₇]及[FW₈]表示V_H構架區，且其中

X₉表示胺基酸殘基甲硫胺酸(M)或酪胺酸(Y)；

X₁₀表示胺基酸殘基白胺酸(L)或丙胺酸(A)；

X₁₁表示胺基酸殘基色胺酸(W)或絲胺酸(S)；

X₁₂表示胺基酸殘基色胺酸(W)或甘胺酸(G)；

X₁₃表示胺基酸殘基絲胺酸(S)或精胺酸(R)；

X₁₄表示胺基酸殘基甘胺酸(G)或絲胺酸(S)；

X₁₅表示胺基酸殘基精胺酸(R)或蘇胺酸(T)；

X₁₆表示胺基酸殘基纈胺酸(V)或異白胺酸(I)；且

X₁₇表示胺基酸殘基酪胺酸(Y)、離胺酸(K)、甲硫胺酸(M)、白胺酸(L)或麩胺酸(E)。

在另一態樣中，本發明提供一種專一性結合至CD73的經分離之結合分子或其抗原結合片段，其具有抗體V_L，其中該V_L具有與以下各者一致或與以下各者除四、三、二或一個胺基酸取代之外其他一致的V_L互補決定區-2(VL-CDR2)胺基酸序列：SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51或SEQ ID NO: 52。

在另一態樣中，本發明提供一種專一性結合至CD73的經分離之結合分子或其抗原結合片段，其具有抗體V_L，其中該V_L具有與以下各者一致或與以下各者除四、三、二或一個胺基酸取代之外其他一致的互補決定區-3(VL-CDR3)胺基酸序列：SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55或SEQ ID NO: 56。

在另一態樣中，本發明提供一種專一性結合至CD73的經分離之結合分子或其抗原結合片段，其具有抗體V_H，其中該V_H具有與以下各者一致或與以下各者除四、三、二或一個胺基酸取代之外其他一致的互補決定區-1(VH-CDR1)胺基酸序列：SEQ ID NO: 35或SEQ ID NO: 36。

在另一態樣中，本發明提供一種專一性結合至CD73的經分離之結合分子或其抗原結合片段，其具有抗體V_H，其中該V_H具有與以下各者一致或與以下各者除四、三、二或一個胺基酸取代之外其他一致的互補決定區-2(VH-CDR2)胺基酸序列：SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39或SEQ ID NO: 40。

在另一態樣中，本發明提供一種專一性結合至CD73的經分離之結合分子或其抗原結合片段，其具有抗體V_H，其中該V_H具有與以下各者一致或與以下各者除四、三、二或一個胺基酸取代之外其他一致的互補決定區-3(VH-CDR3)胺基酸序列：SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 44或SEQ ID NO: 45。

在另一態樣中，本發明提供一種專一性結合至CD73的經分離之結合分子或其抗原結合片段，其具有抗體V_L，其中該V_L具有分別與以下各者一致或與以下各者除VL-CDR中之一或多者中的四、三、二或一個胺基酸取代之外其他一致的VL-CDR1、VL-CDR2及VL-CDR3胺基酸序列：SEQ ID NO: 46、49及53；SEQ ID NO: 47、49及53；SEQ ID NO: 47、49及54；SEQ ID NO: 46、50及54；SEQ ID NO: 46、51及55；SEQ ID NO: 48、52及54；SEQ ID NO: 46、49及56；SEQ ID NO: 47、49及56；SEQ ID NO: 46、50及56；SEQ ID NO: 46、51及56；或SEQ ID NO: 48、52及56。

在另一態樣中，本發明提供一種專一性結合至CD73的經分離之結合分子或其抗原結合片段，其具有抗體V_H，其中該V_H具有分別與以下各者一致或與以下各者除VH-CDR中之一或多者中的四、三、二或一個胺基酸取代之外其他一致的VH-CDR1、VH-CDR2及VH-CDR3胺基酸序列：SEQ ID NO: 35、37及41；SEQ ID NO: 36、37及42；SEQ ID NO: 36、38及43；SEQ ID NO: 36、39及44；SEQ ID NO: 36、40及44；SEQ ID NO: 35、37及45；SEQ ID NO: 36、37及45；SEQ ID NO: 36、38及45；SEQ ID NO: 36、39及45；或SEQ ID NO: 36、40及45。

在另一態樣中，本發明提供一種專一性結合至CD73的經分離之抗體或其抗原結合片段，其具有V_L及V_H，該V_L及該V_H具有分別與以下各者一致或與以下各者除一或多個CDR中的四、三、二或一個胺基

酸取代之外其他一致的 VL-CDR1、VL-CRD2、VL-CDR3、VH-CDR1、VH-CDR2及VH-CDR3胺基酸序列：SEQ ID NO: 46、49、53、35、37及41；SEQ ID NO: 47、49、53、35、37及41；SEQ ID NO: 47、49、54、36、37及42；SEQ ID NO: 46、50、54、36、38及43；SEQ ID NO: 46、51、55、36、39及44；SEQ ID NO: 48、52、54、36、40及44；SEQ ID NO: 46、49、56、35、37及41；SEQ ID NO: 46、49、53、35、37及45；SEQ ID NO: 47、49、56、36、37及45；SEQ ID NO: 46、50、56、36、38及45；SEQ ID NO: 46、51、56、36、39及45；SEQ ID NO: 48、52、56、36、40及45；或SEQ ID NO: 46、49、56、35、37及45。

在另一態樣中，本發明提供一種專一性結合至CD73的經分離之結合分子或其抗原結合片段，其具有抗體V_L及抗體V_H，其中該V_L具有與選自以下各者之參考胺基酸序列至少約90%至約100%一致的胺基酸序列：SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 69及SEQ ID NO: 70。

在另一態樣中，本發明提供一種專一性結合至CD73的經分離之結合分子或其抗原結合片段，其具有抗體V_L及抗體V_H，其中該V_H具有與選自以下各者之參考胺基酸序列至少約90%至約100%一致的胺基酸序列：SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 76、SEQ ID NO: 77、SEQ ID NO: 78、SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 81、SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 83及SEQ ID NO: 84。

在另一態樣中，本發明提供一種專一性結合至CD73的經分離之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或抗原結合片段具有V_L，該V_L

具有與選自以下各者之參考胺基酸序列至少約90%至約100%一致的序列：SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 69及SEQ ID NO: 70，且其中該抗體或抗原結合片段具有V_H，該V_H具有與選自以下各者之參考胺基酸序列至少約90%至約100%一致的序列：SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 76、SEQ ID NO: 77、SEQ ID NO: 78、SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 81、SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 83及SEQ ID NO: 84。

在另一態樣中，本發明提供一種經分離之抗體或其抗原結合片段，其具有基本上由SEQ ID NO: 57組成之V_L及基本上由SEQ ID NO: 71組成之V_H。

在另一態樣中，本發明提供一種經分離之抗體或其抗原結合片段，其具有基本上由SEQ ID NO: 68組成之V_L及基本上由SEQ ID NO: 82組成之V_H。

在另一態樣中，本發明提供一種經分離之抗體或其抗原結合片段，其具有由SEQ ID NO: 57組成之V_L及由SEQ ID NO: 71組成之V_H。

在另一態樣中，本發明提供一種經分離之抗體或其抗原結合片段，其具有由SEQ ID NO: 68組成之V_L及由SEQ ID NO: 82組成之V_H。

在另一態樣中，本發明提供一種組合物，其含有本發明之經分離之抗體或其抗原結合片段及載劑。

在另一態樣中，本發明提供一種核酸，其具有編碼本發明之經分離之抗體或其抗原結合片段的序列。

在另一態樣中，本發明提供一種組合物，其包括本發明之核酸。

在另一態樣中，本發明提供一種載體，其含有本發明之核酸。

在另一態樣中，本發明提供一種宿主細胞，其包含本發明之核酸序列、組合物或載體。

在另一態樣中，本發明提供一種製造本發明之抗體或其抗原結合片段的方法，其涉及培養含有本發明之核酸序列、組合物或載體的細胞；以及分離該抗體或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種診斷試劑，其含有經標記的本發明之經分離之抗體或抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種套組，其含有本發明之經分離之抗體或其抗原結合片段、組合物或診斷試劑。

在另一態樣中，本發明提供一種抑制表現CD73之細胞之生長的方法，其涉及使該細胞與本發明之抗體或其抗原結合片段接觸。

在另一態樣中，本發明提供一種治療有需要之個體之癌症的方法，其涉及向該個體投與治療有效量之本發明之抗體或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種治療個體之癌症的方法，其涉及向該個體投與治療有效量之第一藥劑(其為本發明之抗體或抗原結合片段)以及治療有效量之第二藥劑(其為除該第一藥劑以外的抗癌劑)。

在另一態樣中，本發明提供一種治療方法，其涉及向鑑別為具有CD73表現相對於參考物增加之腫瘤的個體投與抗-CD73抗體或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種治療方法，其涉及向鑑別為具有CD73表現相比於參考物增加之腫瘤的個體投與抗-CD73抗體或其抗原結合片段及抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種治療方法，其涉及向鑑別為具有CD73表現相比於參考物增加之腫瘤的個體投與MEDI9447或Phen0203 hIgG1或其抗原結合片段及派立珠單抗(pembrolizumab)(Keytruda®)或

尼沃單抗(nivolumab)(Opdiva®)或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種治療方法，其涉及向鑑別為具有CD73表現相比於參考物增加之腫瘤的個體投與MEDI9447或Phen0203 hIgG1或其抗原結合片段及MEDI4736或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種治療方法，其涉及向鑑別為具有CD73表現相比於參考物增加之腫瘤的個體投與MEDI9447或Phen0203 hIgG1或其抗原結合片段及曲美單抗(tremelimumab)或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種鑑別患有對抗-CD73療法起反應之癌症之個體的方法，該方法涉及偵測該個體之腫瘤細胞或血細胞中的CD73表現或活性相對於參考物增加之含量，藉此將該癌症鑑別為對抗-CD73療法起反應。

在另一態樣中，本發明提供一種鑑別患有對抗-CD73療法以及抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4療法中之一或多者起反應之癌症之個體的方法，該方法涉及偵測該個體之腫瘤細胞或血細胞中的CD73表現或活性相對於參考物增加之含量，藉此將該癌症鑑別為對抗-CD73療法以及抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4療法中之一或多者起反應。

在另一態樣中，本發明提供一種鑑別患有對抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4療法起反應之癌症之個體的方法，該方法涉及偵測該個體之腫瘤細胞或血細胞中的CD73表現或活性相對於參考物減少之含量，藉此將該癌症鑑別為對抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4療法起反應。

在另一態樣中，本發明提供一種抑制個體之腫瘤生長的方法，該方法涉及向有需要之個體投與抗-CD73抗體或其抗原結合片段以及抗-PD-1抗體、抗-PD-L1抗體、抗-CTLA4抗體中之一或多者或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種增加個體之抗腫瘤免疫反應的方法，該方法涉及向有需要之個體向該個體投與抗-CD73抗體或其抗原結合片段以及抗-PD-1抗體、抗-PD-L1抗體、抗-CTLA4抗體中之一或多者或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種治療個體之腫瘤的方法，該方法涉及向有需要之個體投與抗-CD73抗體或其抗原結合片段以及抗-PD-1抗體、抗-PD-L1抗體、抗-CTLA4抗體中之一或多者或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種醫藥調配物，其含有有效量之抗-CD73抗體或其抗原結合片段及抗-PD-1抗體或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種醫藥調配物，其含有有效量之MEDI9447或其抗原結合片段及派立珠單抗(Keytruda®)或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種醫藥調配物，其含有有效量之MEDI9447或其抗原結合片段及尼沃單抗(Opdiva®)或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種醫藥調配物，其含有有效量之Phen0203 hIgG1或其抗原結合片段及派立珠單抗(Keytruda®)或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種醫藥調配物，其含有有效量之Phen0203 hIgG1或其抗原結合片段及尼沃單抗(Opdiva®)或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種醫藥調配物，其含有有效量之抗-CD73抗體或其抗原結合片段及抗-PD-L1抗體或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種醫藥調配物，其含有有效量之MEDI9447或其抗原結合片段及MEDI4736或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種醫藥調配物，其含有有效量之Phen0203 hIgG1或其抗原結合片段及MEDI4736或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種醫藥調配物，其含有有效量之抗-CD73抗體或其抗原結合片段及抗-CTLA4抗體或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種醫藥調配物，其含有有效量之MEDI9447或其抗原結合片段及曲美單抗或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種醫藥調配物，其含有有效量之MEDI9447或其抗原結合片段及伊派利單抗(ipilimumab)或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種醫藥調配物，其含有有效量之Phen0203 hIgG1或其抗原結合片段及曲美單抗或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種醫藥調配物，其含有有效量之Phen0203 hIgG1或其抗原結合片段及伊派利單抗或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種用於增加抗腫瘤活性之套組，該套組包含抗-CD73抗體或其抗原結合片段及抗-PD-1抗體或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種用於增加抗腫瘤活性之套組，該套組包含抗-CD73抗體或其抗原結合片段及抗-PD-L1抗體或其抗原結合片段。

在另一態樣中，本發明提供一種用於增加抗腫瘤活性之套組，該套組包含抗-CD73抗體或其抗原結合片段及抗-CTLA4抗體或其抗原結合片段。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，CD730002之VL及VH分別為或包括SEQ ID NO: 1及2，且CD730010之VL及VH分別為或包括SEQ ID NO: 3及4。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，經分離之結合分子

或其抗原結合片段包括抗體或其抗原結合片段。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，結合分子為親和力成熟的。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，FW5為或包括SEQ ID NO: 31，FW6為或包括SEQ ID NO: 32，FW7為或包括SEQ ID NO: 33且FW8為或包括SEQ ID NO: 34。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，FW1為或包括SEQ ID NO: 25或26，FW2為或包括SEQ ID NO: 27或28，FW3為或包括SEQ ID NO: 29，FW4為或包括SEQ ID NO: 30，FW5為或包括SEQ ID NO: 31，FW6為或包括SEQ ID NO: 32，FW7為或包括SEQ ID NO: 33且FW8為或包括SEQ ID NO: 34。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，該VL包括與以下各者一致或與以下各者除四、三、二或一個胺基酸取代之外其他一致的VL互補決定區-1(VL-CDR1)胺基酸序列：SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 47或SEQ ID NO: 48。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，經分離之抗體或其抗原結合片段具有：具有SEQ ID NO: 57之VL及具有SEQ ID NO: 71之VH。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，經分離之抗體或其抗原結合片段具有：具有SEQ ID NO: 68之VL及具有SEQ ID NO: 82之VH。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，經分離之抗體或其抗原結合片段包括重鏈恆定區或其片段。

在各種實施例中，重鏈恆定區或其片段為IgG恆定區，包括例如IgG1恆定區、IgG2恆定區、IgG3恆定區或IgG4恆定區。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，經分離之抗體或其

抗原結合片段包括選自人類 κ 恆定區及人類 λ 恆定區之輕鏈恆定區。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，IgG恆定區相對於野生型IgG恆定區具有一或多個胺基酸取代，其中經修飾的IgG與具有野生型IgG恆定區之IgG的半衰期相比具有延長的半衰期。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，IgG恆定區具有在位置251-257、285-290、308-314、385-389及428-436處之胺基酸殘基的一或多個胺基酸取代，其中編號係根據如Kabat中所列之EU指數。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，至少一個IgG恆定區胺基酸取代係選自：

(a)位置252處之胺基酸經酪胺酸(Y)、苯丙胺酸(F)、色胺酸(W)或蘇胺酸(T)取代；

(b)位置254處之胺基酸經蘇胺酸(T)取代；

(c)位置256處之胺基酸經絲胺酸(S)、精胺酸(R)、麩醯胺酸(Q)、麩胺酸(E)、天冬胺酸(D)或蘇胺酸(T)取代；

(d)位置257處之胺基酸經白胺酸(L)取代；

(e)位置309處之胺基酸經脯胺酸(P)取代；

(f)位置311處之胺基酸經絲胺酸(S)取代；

(g)位置428處之胺基酸經蘇胺酸(T)、白胺酸(L)、苯丙胺酸(F)或絲胺酸(S)取代；

(h)位置433處之胺基酸經精胺酸(R)、絲胺酸(S)、異白胺酸(I)、脯胺酸(P)或麩醯胺酸(Q)取代；

(i)位置434處之胺基酸經色胺酸(W)、甲硫胺酸(M)、絲胺酸(S)、組胺酸(H)、苯丙胺酸(F)或酪胺酸取代；及

(j)該等取代中之兩者或兩者以上之組合，

其中編號係根據如Kabat中所列之EU指數。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，人類IgG恆定區相

對於野生型人類IgG恆定區在位置252、254及256處具有胺基酸取代，其中

- (a)位置252處之胺基酸經酪胺酸(Y)取代，
 - (b)位置254處之胺基酸經蘇胺酸(T)取代，且
 - (c)位置256處之胺基酸經麩胺酸(E)取代，
- 其中編號係根據如Kabat中所列之EU指數。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，位置434處之胺基酸經選自色胺酸(W)、甲硫胺酸(M)、酪胺酸(Y)及絲胺酸(S)之胺基酸取代，且其中編號係根據如Kabat中所列之EU指數。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，位置428處之胺基酸經選自蘇胺酸(T)、白胺酸(L)、苯丙胺酸(F)及絲胺酸(S)之胺基酸取代，且其中編號係根據如Kabat中所列之EU指數。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，位置257處之胺基酸經白胺酸(L)取代，且Kabat位置434處之胺基酸經酪胺酸(Y)取代，且其中編號係根據如Kabat中所列之EU指數。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，Kabat位置428處之胺基酸經白胺酸(L)取代，且Kabat位置434處之胺基酸經絲胺酸(S)取代。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，人類IgG恆定區相對於野生型人類IgG恆定區在位置252、254及256處具有胺基酸取代，其中編號係根據如Kabat中所列之EU指數，且其中

- (a)位置252處之胺基酸經酪胺酸(Y)取代，
- (b)位置254處之胺基酸經蘇胺酸(T)取代，且
- (c)位置256之胺基酸經麩胺酸(E)取代。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，該抗體為完全人類抗體、人類化抗體、嵌合抗體、單株抗體、多株抗體、重組抗體、多

專一性抗體或其抗原結合片段。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，抗原結合片段為 Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv 或 sc(Fv)₂。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，經分離之抗體或其抗原結合片段結合於至少一種異源藥劑(包括例如抗癌劑)。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，本發明之組合物進一步含有抗癌劑。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，經分離之抗體或其抗原結合片段不誘導抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，經分離之抗體或其抗原結合片段為 CD73 之拮抗劑。

在各種實施例中，經分離之抗體或其抗原結合片段為選自 MB-MDA-231、4T1、MK1 或所述細胞中之兩者或兩者以上的組合之細胞中的 CD73 之拮抗劑。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，CD73 為人類 CD73。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，抗體或抗原結合片段與 CD73 結合可減少細胞增殖。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，CD73 之抗體或抗原結合片段可結合於人類 CD73、食蟹獼猴 CD73 及小鼠 CD73。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，該癌症選自結腸直腸癌、胰臟癌、膀胱癌、白血病、淋巴瘤、膠質瘤、神經膠母細胞瘤、黑素瘤、卵巢癌、甲狀腺癌、食道癌、前列腺癌及乳癌。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，該癌症具有促轉移表型，包括黑素瘤或乳癌。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，個體為人類。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，第一藥劑與第二藥劑之組合具有優異的抗腫瘤活性；可為相加性或協同性的。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，第二藥劑為抗體或其抗原結合片段。

在各種實施例中，第二藥劑專一性結合至PD-1(計畫性死亡1蛋白)、PD-L1(計畫性死亡1蛋白配位體1)、PD-L2(計畫性死亡1蛋白配位體2)或CTLA-4(細胞毒性T淋巴細胞抗原4蛋白)。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，第二藥劑為抗-CTLA-4抗體或其抗原結合片段，包括例如伊派利單抗、曲美單抗(替西單抗(ticilimumab)、CP-675,206)或其抗原結合片段。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，第二藥劑為抗-PD-1抗體或其抗原結合片段，包括例如派立珠單抗(Keytruda®、拉立珠單抗(lambrolizumab)、MK-3475)、尼沃單抗(Opdiva®、BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538)、AMP-224或其抗原結合片段。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，第二藥劑為抗-PD-L1抗體或其抗原結合片段，包括例如MEDI4736、BMS-936559、MPDL3280A或其抗原結合片段。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，抗-CD73抗體為MEDI9447、Phen0203 hIgG1或其抗原結合片段。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，個體正在經歷、已經歷或將經歷抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4療法。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4療法涉及分別投與抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4抗體或其抗原結合片段。

在各種實施例中，抗-PD-1抗體為派立珠單抗(Keytruda®、拉立珠單抗、MK-3475)、尼沃單抗(Opdiva®、BMS-936558、MDX-

1106、ONO-4538)、AMP-224或其抗原結合片段。

在各種實施例中，抗-PD-L1抗體為MEDI4736、BMS-936559、MPDL3280A或其抗原結合片段。

在各種實施例中，抗-CTLA-4抗體為伊派利單抗、曲美單抗(替西單抗、CP-675,206)或其抗原結合片段。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，腫瘤為結腸癌、黑素瘤、乳癌、淋巴瘤、非小細胞肺癌、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤及伯基特氏淋巴瘤、卵巢癌、乳癌、頭頸癌或胰臟癌。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，在腫瘤樣品、血液樣品或淋巴樣品中偵測到CD73表現或活性。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，在腫瘤細胞或周邊血液細胞中偵測到CD73表現，包括淋巴或骨髓細胞子集(亦即B淋巴細胞、CD4+、FoxP3+淋巴細胞或骨髓衍生之抑制細胞(MDSC)中之一或多者)。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，利用流式細胞測量術、免疫組織化學(IHC)偵測到樣品中之CD73表現或CD73酶活性或可溶性CD73含量。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段及抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4抗體或其抗原結合片段同時投與。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，該方法誘導或增加腫瘤專一性免疫反應。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，該方法降低AMP/CD73/腺苷路徑之免疫抑制作用。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，腫瘤為CD73過度表現腫瘤。

在另一態樣中，本發明提供一種專一性結合至CD73的經分離之結合分子或其抗原結合片段，其具有抗體VL及抗體VH，其專一性結合至具有一或多個對應於Val144、Lys180及Asn185之胺基酸的CD73蛋白之抗原決定基。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，經分離之結合分子或其抗原結合進一步含有一或多個對應於Tyr135、Lys136及Asn187的胺基酸。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，經分離之結合分子或其抗原結合片段含有對應於Tyr135、Lys136及Asn187之胺基酸。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，經分離之結合分子或其抗原結合片段含有對應於Tyr135、Lys136、Asn187、Tyr135、Lys136及Asn187之胺基酸。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，經分離之結合分子或其抗原結合片段結合CD73蛋白之以下區域中之一或多者中的抗原決定基：Tyr132-Val144及/或Lys180-Asn187。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，經分離之結合分子或其抗原結合片段含有或為在Tyr132-Val144及/或Lys180-Asn187處之胺基酸序列中。

在另一態樣中，本發明提供一種CD73蛋白之表面上的構形抗原決定基，其具有一或多個對應於Val144、Lys180及Asn185之胺基酸，其中含有該抗原決定基之CD73蛋白可由單株抗體MEDI9447或其抗原結合片段、變異體、類似物或衍生物專一性結合。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，構形抗原決定基進一步含有一或多個對應於Tyr135、Lys136及Asn187之胺基酸。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，構形抗原決定基含有對應於Tyr135、Lys136及Asn187之胺基酸。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，構形抗原決定基含有對應於Tyr135、Lys136、Asn187、Tyr135、Lys136及Asn187之胺基酸。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，構形抗原決定基在CD73蛋白之以下區域中之一或多者中：Tyr132-Val144及/或Lys180-Asn187。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，構形抗原決定基含有或為在Tyr132-Val144及/或Lys180-Asn187處之胺基酸序列中。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，MEDI9447結合呈非活性或催化活性狀態或開放或關閉狀態之CD73蛋白。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，CD73蛋白為人類CD73。

在本文中所敘述之任何態樣之各種實施例中，經分離之結合分子或其抗原結合片段，其中VL及VH為MED19447之VL及VH。

本發明所定義之組合物及物品經分離或以其他方式結合下文所提供之實例製造。本發明之其他特徵及優勢將自以下實施方式及申請專利範圍顯而易見。

【圖式簡單說明】

圖1A展示MEDI9447 VH域之核苷酸序列及胺基酸轉譯，且CDR基於Kabat編號規約展示。

圖1B展示MEDI9447 VL域之核苷酸序列及胺基酸轉譯，且CDR基於Kabat編號規約展示。

圖1C展示MEDI9447 VH與最接近的人類VH及JH生殖系序列之比較。基於Kabat編號規約之CDR經突出顯示，且與生殖系序列不同之殘基經加框。

圖1D展示MEDI9447 VL與最接近的人類VL及JL生殖系序列之比較。

對。基於Kabat編號規約之CDR經突出顯示，且與生殖系序列不同之殘基經加框。

圖2提供展示抗體介導之細胞毒性FabZAP試劑內化至MDA-MB-231細胞及4T1細胞中的兩張圖，其中該等抗體為MEDI9447且對照抗體R347。

圖3A為展示抗-CD73抗體MEDI9447對5'外核苷酸酶之抑制的圖式。

圖3B為展示抗-CD73抗體CD370010對AMP水解之抑制的圖式。

圖4為展示MEDI9447抑制CT26同基因型腫瘤模型中之腫瘤生長的圖式。鼠類CT26腫瘤細胞皮下植入在雌性Balb/C小鼠之右側腹上。允許腫瘤生長3天，且用MEDI9447或同型對照處理，每週兩次，持續兩週。在第16天，收集腫瘤以用於流式細胞測量術分析。

圖5為展示MEDI9447抑制腫瘤浸潤性骨髓衍生之抑制細胞(MDSC)的圖式。在研究第16天，將經MEDI9447處理之負載CT26腫瘤的小鼠處死，且收集腫瘤。將腫瘤解離成單細胞，針對CD45及MDSC標記物染色，且利用流式細胞測量術分析。

圖6包括展示MEDI9447 mIgG1、抗-PD-1或組合對腫瘤體積之影響的六張蛛網圖。對照抗體包括rIgG2a，其為對大腸桿菌 β -半乳糖(β -Gal)具專一性之大鼠IgG2a對照單株大鼠抗體，及同型對照鼠類IgG1。繪製出每組動物中之個別動物的腫瘤體積直至研究第40天。到40天研究期結束時，沒有對照組小鼠為無腫瘤的。單獨抗-CD73處理在研究結束時產生10%無腫瘤的動物。在研究結束時，抗-PD1處理亦僅產生10%無腫瘤的動物。引人注目的是，抗-CD73與抗-PD處理之組合產生60%無腫瘤的小鼠。到研究結束時，對照組小鼠中無一者為無腫瘤的。

圖7為展示MEDI9447 mIgG1、抗-PD1或組合對生存率之影響的

圖式。

圖8為展示MEDI9447與抗-PD-1之組合當與單獨任一藥劑相比時在結腸直腸癌腫瘤中顯著增強腫瘤生長抑制($p < 0.05$)的圖式。小鼠經同基因型MC38-OVA結腸直腸癌細胞皮下注射，且每週兩次用單獨10 mg/kg的MEDI9447或10 mg/kg抗-PD-1抗體或兩種抗體的組合處理。每週兩次量測腫瘤體積。

圖9為展示抗-PD-1誘生富CD73腫瘤微環境的圖式，如利用自負載腫瘤小鼠分離之腫瘤細胞上的CD73表現所量測。小鼠($n=4$)經同基因型CT26結腸直腸細胞皮下注射，且每週兩次用10 mg/kg抗-PD-1或無關同型對照抗體處理。在第一次處理後一天，分離腫瘤，解離細胞且利用流式細胞測量術分析表面表型。

圖10為展示抗-PD-1誘生富CD73腫瘤微環境的圖式，如利用自負載腫瘤小鼠分離之骨髓衍生之抑制細胞(MDSC)上的CD73表現所量測。小鼠($n=4$)經同基因型CT26結腸直腸細胞皮下注射，且每週兩次用10 mg/kg抗-PD-1或無關同型對照抗體處理。在第一次處理後一天，分離腫瘤，分離腫瘤細胞，收集周邊全血細胞，且利用流式細胞測量術分析表面CD73表現。

圖11為展示抗-PD-1誘生富CD73腫瘤微環境的圖式，如利用自負載腫瘤小鼠分離之 $CD4^+$ 、 $FoxP3^+$ 淋巴細胞上的CD73表現所量測。小鼠($n=4$)經同基因型CT26結腸直腸細胞皮下注射，且每週兩次用10 mg/kg抗-PD-1或無關同型對照抗體處理。在第一次處理後三天，分離腫瘤，收集周邊全血細胞，且利用流式細胞測量術分析表面CD73表現。

圖12為展示MEDI9447與抗-PD-L1之組合當與單獨任一藥劑相比時在黑素瘤腫瘤中顯著增強腫瘤生長抑制($p < 0.05$)的圖式。小鼠用同基因型B16F10黑素瘤細胞皮下注射，且每週兩次用單獨10 mg/kg的

MEDI9447或10 mg/kg抗-PD-L1抗體或兩種抗體的組合處理。每週兩次量測腫瘤體積。

圖13為展示MEDI9447與抗-PD-L1之組合當與單獨任一藥劑相比時在淋巴瘤腫瘤中顯著增強腫瘤生長抑制($p < 0.01$)的圖式。小鼠用同基因型EG7-OVA淋巴瘤細胞皮下注射，且每週兩次用單獨10 mg/kg的MEDI9447或10 mg/kg抗-PD-L1抗體或兩種抗體的組合處理。每週兩次量測腫瘤體積。

圖14為展示抗-PD-L1誘生富CD73腫瘤微環境的圖式，如利用引流淋巴結B淋巴細胞上之CD73的表面表現所量測。小鼠($n=4$)經同基因型CT26結腸直腸細胞皮下注射，且每週兩次用10 mg/kg抗-PD-L1或無關同型對照抗體處理。在第一次處理後一天，自引流淋巴結分離細胞，且利用流式細胞測量術分析表面表型。

圖15為展示抗-PD-L1誘生富CD73腫瘤微環境的圖式，如利用腫瘤浸潤性CD4⁺、FoxP3⁺淋巴細胞上之CD73的表面表現所量測。小鼠($n=4$)經同基因型CT26結腸直腸細胞皮下注射，且每週兩次用10 mg/kg抗-PD-L1或無關同型對照抗體處理。在第一次處理後三天，分離腫瘤，解離細胞且利用流式細胞測量術分析表面表型。

圖16A及16B為展示單獨或與抗-PD-L1組合之MEDI9447減少腫瘤浸潤性淋巴細胞上之CD73表現。負載結腸直腸CT26同基因型腫瘤之小鼠每週兩次(第12天及D16)用單獨30 mg/kg MEDI9447或30 mg/kg抗-PD-L1或MEDI9447及抗-PD-L1兩者之組合處理。在第17天，收集腫瘤，且利用流式細胞測量術分析表面CD73表現。腫瘤上之CD73表現浸潤(A)CD4⁺ FoxP3⁺ Treg及(B)CD8⁺ T細胞。

圖17A及17B為展示單獨或與抗-PD-L1組合之MEDI9447降低(A)腫瘤細胞及(B)周邊全血細胞上之CD73活性的曲線。負載結腸直腸CT26同基因型腫瘤之小鼠每週兩次(第12天及D16)用單獨30 mg/kg

MEDI9447或30 mg/kg抗-PD-L1或MEDI9447及抗-PD-L1兩者之組合處理。在第17天，收集腫瘤及周邊全血細胞，且藉由使用Cell-Titre Glo針對酶活性分析表面CD73表現。

圖18為一組描繪經MEDI9447及對CTLA4、OX40、PD-1及PD-L1具專一性之抗體或融合蛋白處理之周邊血液單核細胞之細胞激素概況的曲線。原代人類周邊血液單核細胞與MEDI9447及/或對指定目標具專一性之抗體或融合蛋白一起在混合白血球反應中培育72小時。利用ELISA定量一式兩份上清液中之細胞激素(IFN- γ 、IL-1 β 、TNF- α)。所示資料表示抗-CD73抗體與4種不同搭配物藥劑之最佳劑量組合。抗-PD-1及抗-CD73組合展示顯著($p < 0.05$)協同作用，如利用布利斯表面反應方法(Zhao等人)所測定。細胞激素概況指示骨髓及淋巴譜系均受影響。大於50個供體對已經測試。

圖19A及19B描繪在與MEDI9447之複合物中CD73之氫氙交換MS(HDX-MS)分析結果。圖19A描繪氫-氙交換熱圖，其展示當結合於MEDI9447時經歷氙攝取減少之CD73的彼等區(N端至C端)。抗體結合與未結合之CD73之間的相對交換描繪為隨暴露時間而變，交換減少為紅色，交換增加為藍色，而無變化為白色。在位置132-143及182-187處之N端區展現最高程度的差異交換。圖8B展示CD73單體之晶體結構，描繪N端域(黃色)中之HDX鑑別之結合界面(藍綠色)的位置。CD73連接子區域及C端域分別以橙色及藍色表示。

圖20A-20E描繪氫氙交換MS(HDX-MS)分析結果，指示在游離對比結合狀態中經歷差異氫交換之CD73及MEDI9447的區域。圖20A描繪表示涵蓋132-143區之肽中的相對氙攝取(質量變化(道爾頓))隨氙暴露時間而變的圖。圖20B描繪表示涵蓋182-187區之肽中的相對氙攝取(質量變化(道爾頓))隨氙暴露時間而變的圖。在圖20A及20B中，對於單獨CD73之攝取以正方形展示，且對於結合於MEDI9447 Fab之CD73

的攝取以紅色展示。肽序列、位置及質量指示在圖框中。為了縮窄含有展示氫交換變化之序列且將預測形成抗原決定基之區域，比較重疊肽之相對質量變化。舉例而言，跨越位置173-186之肽呈現差異交換，而跨越173-181之肽中無差異。由此，推斷182上游殘基未經有差異地標記。圖20C描繪MEDI9447 Fab重鏈之DynamX差異表。圖20D描繪MEDI9447 Fab輕鏈之DynamX差異表。對於圖20C及20D，每一資料點指示CD73+Fab複合物(y軸上之正值)與單獨Fab(y軸上之負值)之間的氬攝取差異。垂直條表示跨越暴露時間點之攝取差異總和。指示當Fab結合於CD73時展示較低相對攝取之CDR。圖9E描繪單獨CD73(y軸上之負值)對比結合於Fab之CD73(y軸上之正值)之DynamX差異表。指示區域E1(aa 132-143)及E2(aa 182-187)。水平軸對應於自N端至C端(左至右)之所分析的肽。點線覆疊在圖表上，展示1.6道爾頓，98%置信區間截斷，對於統計學上顯著之變化。

圖21A-21H描繪展示存在於CD73之N端域中的MEDI9447抗原決定基之感測器晶片資料。圖21A為描繪野生型CD73蛋白之感測器晶片資料的圖式。野生型CD73蛋白固定在HTG感測器晶片上，且利用表面電漿子共振(SPR)量測MEDI9447稀釋液(5 nM至0.3 nM)之結合。圖21B為描繪N端域調換之CD73蛋白之感測器晶片資料的圖式。N端域調換之CD73蛋白固定在HTG感測器晶片上，且利用SPR量測MEDI9447稀釋液(5 nM至0.3 nM)之結合。當N端域經調換時，MEDI9447不結合於CD73。圖21C為描繪N端及C端域調換之CD73蛋白之感測器晶片資料的圖式。N端及C端域調換之CD73蛋白固定在HTG感測器晶片上，且利用SPR量測MEDI9447稀釋液(5 nM至0.3 nM)之結合。當N端及C端域均經調換時，MEDI9447不結合於CD73。圖21D為描繪連接子區域調換之CD73蛋白之感測器晶片資料的圖式。連接子區域調換之CD73蛋白固定在HTG感測器晶片上，且利用SPR量測

MEDI9447稀釋液(5 nM至0.3 nM)之結合。僅調換連接子區域不影響結合。圖21E為描繪C端域調換之CD73蛋白之感測器晶片資料的圖式。C端域調換之CD73蛋白固定在HTG感測器晶片上，且利用SPR量測MEDI9447稀釋液(5 nM至0.3 nM)之結合。僅調換C端域不影響結合。圖21F為描繪界面E1(aa 132-143)調換之CD73蛋白之感測器晶片資料的圖式。界面E1(aa 132-143)調換之CD73蛋白固定在HTG感測器晶片上，且利用SPR量測MEDI9447稀釋液(5 nM至0.3 nM)之結合。圖21G為描繪界面E2(aa 182-187)調換之CD73蛋白之感測器晶片資料的圖式。界面E2(aa 182-187)調換之CD73蛋白固定在HTG感測器晶片上，且利用SPR量測MEDI9447稀釋液(5 nM至0.3 nM)之結合。圖21H為描繪界面E1(aa 132-143)及界面E2(aa 182-187)調換之CD73蛋白之感測器晶片資料的圖式。界面E1(aa 132-143)及界面E2(aa 182-187)調換之CD73蛋白固定在HTG感測器晶片上，且利用SPR量測MEDI9447稀釋液(5 nM至0.3 nM)之結合。對於圖21F-21H，調換HDX界面E1(aa 132-143)(圖21F)與調換單獨(圖21G)或與E1組合(圖21H)之HDX界面E2(aa 182-187)相反對結合具有輕微影響。在圖21A-21H中，感測器圖譜及覆疊擬合以匹配顏色展示。每一結合分析之動力學量測值提供在表16處。

圖22描繪人類於雞CD73蛋白序列之比對。僅展示成熟蛋白序列。在雞序列中突出顯示非保守殘基。註釋在雞與人類之間調換以生成基因剔除變異體之區域(例如DS1a、DS1b等)。

圖23描繪MEDI9447與CD73變異體之結合。圖23為展示MEDI9447與CD73變異體之結合的資料表。以藍色突出顯示之變異體的 K_D 相比於WT或KO親本構築體改變>2倍。*動力學量測值來源於2:1異質配位體適配。**編號對應於雞序列(人類中129=133、140=144及181=185)。

圖24A-24F描繪MEDI9447抗原決定基位於N端域之頂端。圖13A展示結合於一組CD73變異體(參見圖22及23)之MEDI9447的評估揭露構成相互作用位點之六個位置。三個最有影響的殘基(突出顯示框)中之兩個位於HDX界面區域(以藍色突出顯示)外部。三個較不重要的殘基(粉紅色框)位於HDX界面中。圖24B為展示將N185及V144(K180為保守的)基因嵌入至含有雞N端域及C端域序列之CD73構築體中恢復結合至小於20倍野生型CD73的 K_D (5 nM至0.3 nM之MEDI9447稀釋液；與圖10B比較)。圖24C描繪位於CD73之N端域中之抗原決定基殘基的近視圖。對結合最重要之殘基突出展示，且影響較小的位置(Y135、K136及N187)為粉紅色。HDX界面以藍色覆疊。圖24D描繪展示抗原決定基形成接近連續結合表面的表面表示。圖24E描繪CD73之開放構形的晶體結構，展示在N端域之頂端、側向表面處之抗原決定基的位置。圖24F展示抗原決定基之位置遠離受質結合位點(以球體描繪之腺苷)及鋅離子(灰色球面)配位位點(藍綠色的側鏈)。在所有晶體結構中，CD73 N端域、連接子區域及C端域分別以黃色、橙色及藍色描繪。

圖25A-25C展示出MEDI9447為AMP之CD73水解的非競爭性抑制劑。圖25A為描繪在MEDI9447或同型匹配之對照單抗存在下量測的AMP之CD73磷酸水解之動力學的圖式。圖25B為展示MEDI9447充當非競爭性抑制劑(因為其與受質濃度無關地等效抑制水解)的圖式。相比之下，APCP(CD73之已知競爭性抑制劑)增加 K_m 但不增加 V_{max} 。圖25C為描繪MEDI9447 IgG、Fab或對照IgG對AMP之CD73水解之抑制的劑量反應的圖式。MEDI9447 IgG以與CD73二聚物(箭頭)1:1莫耳化學計量達至最大抑制。在其中MEDI9447 IgG過量(>10 nM)之較高濃度下，觀察到損失抑制或「卡鉤作用」。MEDI9447 Fab及對照IgG不抑制CD73。所有實驗均使用如本文所述的CellTiterGlo分析進行

(RLU，相對光單位)。

圖26A-26C展示出抗-CD73單抗(純系0069)結合視CD73 N端域及C端域殘基而定。圖26A為展示組胺酸標記之CD73之感測器晶片資料的圖式。組胺酸標記之CD73固定在HIS2生物感測器上，且單抗A之結合利用生物層干擾測量法(BLI)量測。單抗A對WT CD7(藍色感測器圖譜)、N端域調換基因剔除CD73(KO_1-291，綠色感測器圖譜)及C端域調換基因剔除CD7(KO_311-523藍綠色感測器圖譜)之結合展示出單抗結合受N端域及C端域兩者中之殘基影響。圖26B為開放及關閉CD73之晶體結構，展示突出顯示之單抗A結合熱點(aa 114-134及153-170)的位置，其位於N端域及C端域界面附近(N端域為黃色、連接子為橙色，且C端域為藍色)。映射係基於來自圖26A及26C之結合資料。圖26C展示單抗A與CD73之不同域調換基因剔除變異體的結合感測器圖譜。調換子區DS2c(aa 114-134)或DS3a(aa 153-170)基因剔除結合。所有結合分析均如本文所述在Octet QK384儀器上進行。

圖27A-27C展示出MEDI9447抑制CD73過渡至構形活性結構。圖27A為展示野生型CD73之生物感測器資料的圖式。野生型CD73固定在HIS2生物感測器上，且MEDI9447(藍色感測器圖譜)及抗-CD73單抗A(棕色感測器圖譜)之結合利用BLI在Octet QK384上量測。當CD73與 Zn^{2+} 及APCP一起預培育時，MEDI9447保持結合(黑色感測器圖譜)，但單抗A結合損失(橙色感測器圖譜)。圖27B為展示以下之圖式：儘管 Zn^{2+} 及APCP與CD73一起預培育導致單抗A結合損失(橙色感測器圖譜)，但在添加 Zn^{2+} 及APCP之前與MEDI9447一起預培育恢復結合(紫色感測器圖譜)。單抗A與單獨CD73及與MEDI9447(但非 Zn^{2+} 及APCP)一起預培育之CD73的結合分別以藍色及棕色感測器圖譜展示。圖27C展示所提出之模型，描繪MEDI9447如何防止CD73採用由 Zn^{2+} 及APCP誘導之完全關閉的活性構形。MEDI9447可限制過渡至對單抗A具有

較低親和力之中間狀態。

圖28A及28B展示利用如本文所述之BLI所量測在不同條件下MEDI9447或單抗A與CD73之結合，除非下文另外說明。圖28A為描繪抗-CD73單抗A與固定在HIS2生物感測器上之組胺酸標記之野生型CD73的結合的圖式。在100秒基線之後，所捕獲之CD73與 Zn^{2+} 、APCP及/或EDTA一起培育900秒，且接著生物感測器在30 nM單抗A中培育600秒以量測結合。單抗A結合於CD73(藍色感測器圖譜)但非與 Zn^{2+} 及APCP一起預培育之CD73(紫色感測器圖譜)。單抗A維持結合於與APCP及EDTA(綠色感測器圖譜)或 Zn^{2+} 、APCP及EDTA(金色感測器圖譜)一起預培育之CD73。EDTA之螯合作用展示出當CD73與 Zn^{2+} 及APCP一起培育時二價陽離子為單抗A結合損失所需。圖28B為展示MEDI9447 Fab或對照IgG不解救單抗A與和 Zn^{2+} 及APCP一起預培育之CD73的結合的圖式。如圖27B中進行分析。MEDI9447 Fab或同型匹配之對照IgG與CD73一起預培育，隨後添加 Zn^{2+} 及APCP。固定在生物感測器上之單抗A結合於單獨CD73(藍色感測器圖譜)、與MEDI9447 Fab(淺藍色感測器圖譜)或對照IgG(黑色感測器圖譜)一起預培育之CD73，但非與 Zn^{2+} 及APCP一起培育之CD73、或在添加 Zn^{2+} 及APCP之前與CD73一起預培育之Fab(金色感測器圖譜)或對照IgG(紫色感測器圖譜)。

圖29A及29B展示出抗-CD73單抗B結合視子區DS2b(aa 92-134)或DS2c(aa 114-134)中之殘基而定。圖29A為展示對應於圖30A-30C之SEC-MALS資料的表。對於CD73及MEDI9447或單抗B之每一混合物，展示所形成之複合物的相應的SEC滯留時間、Mw及多分散性。圖29B描繪CD73上之單抗B之結合熱點的測定。固定在HIS2生物感測器上之結合於CD73變異體之單抗B根據本文中方法如對於圖26A-26C中的單抗A(純系0069)所述利用BLI量測。結合感測器圖譜展示出調換

子區DS2b(aa 92-134)或DS2c(aa 114-134)基因剔除單抗B之結合。

圖30A-30C展示出MEDI9447在可溶性CD73分子之間形成二聚物間橋接。CD73與不同量之MEDI9447或抗-CD73單抗B一起培育，且利用SEC-MALS分析。展示出SEC UV層析圖，其中蛋白滯留時間在x軸上，且利用MALS測定之莫耳質量在y軸上。圖30A為層析圖，展示在1:1莫耳比(綠色跡線)下，MEDI9447與約1.7(^)及約6.6(+) μ 道爾頓之CD73形成複合物。相當大小之複合物以較低MEDI9447:CD73比率(0.5:1呈藍色，0.1:1呈洋紅色)形成。單獨MEDI9447及CD73分別由黑色及紅色UV跡線表示。圖30B為CD73二聚物之晶體結構的自上而下視圖，展示單抗B結合熱點(紫色)及MEDI9447抗原決定基(洋紅色及粉紅色)。單抗B結合於接近呈開放構形之二聚物之間的中央溝槽之位點。圖30C為層析圖，展示當CD73結合於單抗B時，形成約270-290 kD之單一主導性複合物(峰在約7.2 min處)。所示UV跡線表示1:1單抗B:CD73(紅色)、0.5:1(藍色)及0.1:1(綠色)。單獨單抗A及CD73分別呈洋紅色及黑色。

圖31A-31D描繪表面結合之CD73由MEDI9447之IgG及Fab形式抑制。圖31A為描繪MEDI9447 IgG、Fab或對照抗體對固定之CD73之AMP水解之抑制的圖式。CD73經由C端組胺酸標記固定至鍍塗佈之微量滴定盤，且使用如本文所述的孔雀綠分析量測MEDI9447 IgG、Fab或對照抗體對AMP水解之抑制。MEDI9447 IgG(但非對照IgG)以劑量依賴性方式抑制AMP之CD73水解。MEDI9447 Fab亦抑制CD73活性，但程度低得多。圖31B描繪包含結合於抗-xFd抗體(xFd，紅色)之MEDI9447 Fab(綠色)的複合物。當MEDI9447 Fab(綠色)結合於抗-xFd抗體(xFd，紅色)之一個臂且另一臂結合於非專一性多株Fab(pFab，橙色)時，抑制增加至與MEDI9447 IgG相當之程度(Fab+xFd+pFab相對於MEDI9447 IgG及MEDI9947 IgG+xFd+pFab)(參見圖31A)。圖31C為

描繪MEDI9447 IgG、Fab或對照抗體對GPI錨定之CD73之AMP水解之抑制的圖式。利用CellTiterGlo分析量測MDA-MB-231細胞中之內源性表現之CD73的酶活性。與固定之重組CD73相似，MEDI9447 IgG與Fab相比抑制AMP水解達至較大程度，但藉由與抗-Fd抗體形成複合物來增加MEDI9447 Fab之有效大小會增強抑制。圖31D為描繪MEDI9447 IgG、Fab或對照抗體對可溶性CD73(sCD73)之AMP水解之抑制的圖式。為了測試xFd+MEDI9447是否可抑制可溶性CD73，使用孔雀石綠色分析量測AMP水解。單獨或結合於單一xFd臂之MEDI9447 Fab不抑制可溶性CD73活性。相比之下，MEDI9947 Fab結合至兩個xFd臂(MEDI9447 Fab+xFd)賦予二價，引起CD73抑制。

圖32為展示MEDI9447 IgG及Fab抑制AMP之CD73水解的圖式。如本文所述，使用孔雀綠分析在增加濃度之抗體之存在下量測CD73活性。觀察到MEDI9447 IgG以劑量依賴性方式抑制CD73水解活性，且無卡鉤作用或抑制損失。MEDI9447 Fab亦抑制CD73功能，但達至較低程度之最大抑制。實驗進行兩次，結果相當。展示來自僅一次實驗之資料。

圖33描繪展示MEDI9447對CD73水解活性之抑制經由雙重機制發生之模型。MEDI9447IgG(綠色)藉由形成會防止構形過渡至關閉狀態之二聚物間橋接來抑制可溶性CD73。單價結合之IgG或Fab不抑制可溶性CD73。當CD73為表面結合型時，抑制可經由鄰近CD73二聚物之橋接或來自單價結合之IgG或Fab/xFd(紅色)複合物之空間阻礙而發生。

【實施方式】

本發明提供專一性結合至CD73的經分離之結合分子或其抗原結合片段。在一些態樣中，此類分子為專一性結合至CD73的抗體及其抗原結合片段。亦提供包含抗-CD73抗體或其抗原結合片段之相關聚

核苷酸、載體、醫藥組合物。亦提供製造本文所揭示之抗-CD73抗體及抗原結合片段的方法以及使用其之方法，例如診斷方法及治療個體之癌症的方法(作為直接療法、輔助療法或組合療法)。本發明亦提供由本文所揭示之CD73結合分子獲得的抗體-藥物結合物。另外，本發明提供治療組合，該等治療組合提供抗-CD73抗體(例如MEDI9447)及靶向癌症免疫循環之其他態樣的一或多種藥劑，諸如抗-PD-1抗體、抗-PD-L1抗體(例如MEDI4736)、抗-CTLA4抗體；以及使用該等組合用於減少腫瘤介導之免疫抑制的方法。

為了使本發明更易於理解，首先對某些術語進行定義。在通篇實施方式中，闡述其他定義。

I. 定義

在詳細描述本發明之前，應瞭解本發明不限於特定組合物或方法步驟，因而可改變。除非上下文另外明確指示，否則如本說明書及隨附申請專利範圍中所使用，單數形式「一(a/an)」及「該(the)」包括複數個指示物。術語「一(a)」(或「一(an)」)以及術語「一或多個/種」及「至少一個/種」在本文中可互換使用。

此外，本文所用之「及/或」應視為兩種指定特徵或組分中之每一者具有或不具有另一者之特定揭示內容。因此，諸如本文「A及/或B」之短語中所用之術語「及/或」意欲包括「A及B」、「A或B」、「A」(單獨)及「B」(單獨)。同樣，諸如「A、B及/或C」之短語中所用之術語「及/或」意欲涵蓋以下態樣中之每一者：A、B及C；A、B或C；A或C；A或B；B或C；A及C；A及B；B及C；A (單獨)；B (單獨)；及C (單獨)。

除非另外規定，否則本文中所用之所有技術及科學術語均具有與本發明所屬領域之一般技術者通常所理解相同之含義。舉例而言，the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-

Show, 第2版, 2002, CRC Press ; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 第3版, 1999, Academic Press ; 及the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, 修訂版, 2000, Oxford University Press , 向此項技術者提供本發明中所用之許多術語的通用辭典。

單位、字首及符號以其國際單位體系(Système International de Unites, SI)接受之形式表示。數值範圍包括界定該範圍之數字。除非另外指示, 否則胺基酸序列以胺基至羧基取向自左向右書寫。本文所提供之標題不限制各種態樣, 其可整體上參考本說明書。因此, 下文緊接著定義之術語由整個說明書更充分定義。

應瞭解每當本文中用語言「包含」描述態樣時, 則亦提供用術語「由……組成」及/或「基本上由……組成」所描述之類似態樣。

胺基酸在本文中可由其通常已知之三字母符號或由IUPAC-IUB生物化學命名法委員會(Biochemical Nomenclature Commission)所推薦之單字母符號來提及。類似地, 核苷酸由其通常接受之單字母密碼來提及。

如本文所用之術語「CD73多肽」係指CD73(分化簇73)蛋白, 在文獻中亦稱為5'-核苷酸酶(5'-NT)或外-5'-核苷酸酶, 其由NT5E基因編碼。參見例如Misumi等人 Eur. J. Biochem. 191(3): 563-9 (1990)。CD73之人類及鼠類形式之相應序列分別以寄存編號P21589及Q61503在Uniprot資料庫處可獲得。在定義任何CD73抗體抗原決定基中, 所用胺基酸編號表示不含有信號序列殘基之成熟CD73蛋白之胺基酸殘基。因此, 舉例而言, 抗體結合胺基酸Val144、Lys180及Asn185係指在信號序列裂解之後的胺基酸位置, 亦即, 成熟蛋白中之胺基酸。

以下提供例示性CD73多肽:

>sp|P21589|5NTD_人類 5'-核苷酸酶 OS=智人(Homo sapiens)
GN=NT5E PE=1 SV=1

MCPRAARAPATLLLLALGAVLWPAAGAWELTILHTNDVHSRLEQTSSESSKCVNASRCMGG
 VARLFTKVQQIRRAEPNVLLLDAGDQYQGTIWFVYKGAEVAHFMNALRYDAMALGNHEF
 DNGVEGLIEPLLKEAKFPILSANIKAKGPLASQISGLYLPYKVLVPGDEVVGVIGYTSKE
 TFFLSNPGTNLVFEDEITALQPEVDKLTNLVVKI IALGHSGFEMDKLIAQKVRGVDVVV
 GGHSNTFLYTGNPPSKEVPAGKYPPFIVTSDDGRKVPVQAYAFGKYLGYLKIEFDERGNV
 ISSHGNPILLNSSIPEDPSIKADINKWRIKLDNYSTQELGKTIVYLDGSSQSCRFRECNM
 GNLICDAMINNNLRHTDEMFWNHVSMCILNGGGIRSPIDERNNGTITWENLA AVL PFGGT
 FDLVQLKGSTLKKAFEHSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDL SRKPGDRVVKLDVLCCKCR
 VPSYDPLKMDDEVYKVLNPNFLANGDGFQMIKDELLRHDSGDQDINVVSTYISKMKVIYP
 AVEGRIKFSTGSHCHGSFSLIFLSLWAVIFVLYQ

已鑑別出 CD73 之可溶性及膜結合形式。參見 Klemens 等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172(3):1371-7 (1990)。另外, 已鑑別出數種不同的同功異構酶。參見 Rosi 等人 *Life Sci.* 62(25):2257-66 (1998)。全長 CD73 蛋白包含 574 個胺基酸。成熟 CD73 蛋白在前肽之信號序列(位置 1 至 26)及 C 端區(位置 550-574)移除之後產生。另外, 在替代性拼接之後, CD73 之同功異型物 2 中之胺基酸 404 至 453 經移除。亦已知天然變異體, 例如變異體 C358Y、變異體 T376A 及變異體 M379T。參見 Misumi 等人, *Eur. J. Biochem.* 191:563-569 (1990); Otsuki 等人 *DNA Res.* 12:117-126 (2005); Mungall 等人 *Nature* 425:805-811 (2003); Hansen 等人 *Gene* 167:307-312 (1995); Klemens 等人 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172:1371-1377 (1990); Knapp 等人 *Structure* 20:2161-2173 (2012); 或 St. Hilaire 等人 *N. Engl. J. Med.* 364:432-442 (2011), 其均以全文引用的方式併入本文中。

引起患者之組織液(尤其血清)中的 CD73 含量變化的典型疾病為: 組織創傷; 由心肌梗塞或中風、器官移植或其他外科手術引起之再灌注損傷; 癌症或癌轉移; 或由前述創傷或再灌注損傷或由包括過敏病況、自體免疫疾病及發炎疾病之慢性病況引起的發炎性病況。作為該等慢性病況之實例可提及關節炎、過敏病況(諸如哮喘)、發炎性病況(諸如發炎性腸道疾病或皮膚之發炎性病況)、牛皮癬、帕金森氏病(Parkinson's disease)、阿茲海默氏病(Alzheimer's disease)、自體免

疫疾病、I型或II型糖尿病、動脈粥樣硬化、多發性硬化症、克羅恩氏病(Crohn's disease)、或歸因於器官移植的排斥反應。特定言之，發炎疾病全身性發炎反應症候群(SIRS)、急性肺損傷(ALI)、多器官衰竭(MOF)、缺血性再灌注損傷(IRI)及不良藥物反應(ADRS)引起組織液CD73蛋白的改變。因此，本文所揭示之CD73結合分子可例如用於治療或診斷癌症(例如結腸癌、黑素瘤、乳癌、淋巴瘤、非小細胞肺癌、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)、非霍奇金氏淋巴瘤及伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、卵巢癌、乳癌、頭頸癌及胰臟癌)。另外，使用本文所揭示之CD73結合分子量測來自患者之樣品(例如組織液)中的CD73含量可用於監測上述疾病之發展，以便評估療法中之功效，從而選取患者用特定療法治療，或採用醫學決策，例如開始、結束、中斷或修改某一治療。

術語「抑制(inhibit)」、「阻斷」、「抑制(suppress)」及其語法變化形式在本文中可互換使用且係指生物活性之任何統計學上顯著之降低，包括該活性之完全阻斷。舉例而言，「抑制」可指生物活性降低約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。因此，當術語「抑制(inhibition)」或「抑制(suppression)」應用於描述例如對CD73之酶活性的作用時，該術語係指相對於未處理(對照)細胞中之CD73介導之5'-核苷酸酶活性，抗-CD73抗體或其抗原結合片段在統計學上顯著降低CD73之5'-核苷酸酶活性(異化腺苷單磷酸酯AMP至腺苷之水解)的能力。表現CD73之細胞可為天然存在之細胞或細胞株(例如癌細胞)或可藉由將編碼CD73之核酸引入宿主細胞而以重組方式產生。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段可在統計學上顯著降低生物體液中之CD73之可溶形式的5'-核苷酸酶活性。在一個態樣中，抗-CD73結合分子(例如抗體或其抗原結合片段)抑制CD73介導之5'-核苷酸酶活性至少10%、至少15%、或至少20%、至少

25%、或至少30%、至少35%、或至少40%、至少45%、或至少50%、至少55%、或至少60%、至少65%、或至少70%、至少75%、或至少80%、至少85%、或至少90%、至少95%、或約100%，如例如利用下文實例中所述之方法及/或此項技術中已知之方法所測定。

如本文所用的術語「抑制CD73活性」係指抗-CD73結合分子(例如抗體或其抗原結合片段)在統計學上顯著降低表現CD73之細胞或含有CD73之樣品中之CD73依賴性5'-核苷酸酶活性的能力。在一些態樣中，CD73活性之抑制可為相對於在不存在抗-CD73結合分子(例如抗體或其抗原結合片段)之情況(對照條件)下量測的CD73活性，當細胞或樣品與本發明之抗-CD73結合分子(例如抗體或其抗原結合片段)接觸時降低至少10%、或至少15%、或至少20%、或至少25%、或至少30%、或至少35%、或至少40%、或至少45%、或至少50%、或至少55%、或至少60%、或至少65%、或至少70%、或至少75%、或至少80%、或至少85%、或至少90%、或至少95%、或約100%。

術語「抗體」或「免疫球蛋白」在本文中可互換使用，包括整個抗體及其任何抗原結合片段或單鏈。

典型抗體包含由二硫鍵互連之至少兩條重(H)鏈及兩條輕(L)鏈。每一重鏈包含重鏈可變區(本文中簡化為V_H或V_H)及重鏈恆定區。重鏈恆定區包含三個域CH1、CH2及CH3。每一輕鏈包含輕鏈可變區(本文中簡化為V_L或V_L)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包含一個域CL。V_H及V_L區可進一步再分成高變區，稱為互補決定區(CDR)，其中散置有更保守的區域，稱為構架區(FW)。每個V_H及V_L包含三個CDR及四個FW，自胺基端至羧基端依以下順序排列：FW1、CDR1、FW2、CDR2、FW3、CDR3、FW4。重鏈及輕鏈之可變區含有與抗原相互作用之結合域。抗體之恆定區可介導免疫球蛋白結合至宿主組織或因子，包括免疫系統之各種細胞(例如效應細胞)及經典補體系統之第一

組分(C1q)。本發明之例示性抗體包括抗-CD73抗體(原始及生殖系化)、親和力最佳化純系、缺乏ADCC之最佳化抗體、結合抗體(例如ADC)及其他最佳化抗體(例如血清半衰期最佳化抗體，包括例如YTE突變，參見Dall'Acqua等人, J. Biol. Chem. 281:23514-24 (2006)及美國專利第7,083,784號，該等文獻以全文引用的方式併入本文中)。

術語「生殖系化」意謂抗體中特定位置之胺基酸回復突變為生殖系中之彼等胺基酸。

術語「抗體」意謂經由免疫球蛋白分子之可變區內的至少一個抗原識別位點，識別且專一性結合於目標，諸如蛋白質、多肽、肽、碳水化合物、聚核苷酸、脂質或上述各者之組合的免疫球蛋白分子。如本文所用，術語「抗體」涵蓋完整多株抗體、完整單株抗體、抗體片段(諸如Fab、Fab'、F(ab')₂及Fv片段)、單鏈Fv(scFv)突變體、多專一性抗體(諸如由至少兩種完整抗體產生的雙專一性抗體)、嵌合抗體、人類化抗體、人類抗體、包含抗體之抗原決定部分的融合蛋白，及包含抗原識別位點的任何其他經修飾之免疫球蛋白分子，只要該等抗體展現所需生物活性。

抗體可基於免疫球蛋白重鏈恆定域身分(分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ)而為免疫球蛋白之五個主要類別：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，或其亞類(同型)(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)中的任一者。免疫球蛋白之不同類別具有不同且熟知之次單位結構及三維組態。抗體可為裸抗體或與諸如毒素、放射性同位素等其他分子結合以形成ADC。

「阻斷」抗體或「拮抗劑」抗體為抑制或減少其所結合之抗原(諸如CD73)之生物活性的抗體。在一特定態樣中，阻斷抗體或拮抗劑抗體實質上或完全抑制抗原之生物活性。理想地，生物活性降低至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少

40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或甚至100%。

術語「CD73抗體」、「結合於CD73之抗體」或「抗-CD73」係指抗體或其抗原結合片段，其能夠以足夠親和力結合CD73，使得該分子適用作靶向CD73中之治療劑或診斷試劑。抗-CD73抗體與不相關的非CD73蛋白之結合程度小於約10%的抗體與CD73之結合，如例如利用放射免疫分析(RIA)、BIAcore™(使用重組CD73作為分析物且抗體作為配位體，或反過來)或此項技術中已知的其他結合分析量測。在某些態樣中，結合於CD73之抗體的解離常數(K_D) $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ pM}$ 、 $\leq 1 \text{ pM}$ 或 $\leq 0.1 \text{ pM}$ 。術語「抗-CD73」亦廣泛地涵蓋包含例如結合至骨架中之本文所揭示之抗體之CDR的分子。因此，短語「專一性結合至CD73的經分離之結合分子或其抗原結合片段」將不僅指抗體及其抗原結合片段，而且將指包含例如結合本文所揭示之抗體之CDR的一或多個骨架(諸如來自纖維結合蛋白或肌腱蛋白-3之纖維結合蛋白III域)的分子。參見例如美國專利公開案第20150098955號，其以全文引用的方式併入本文中。

在一個實施例中，抗-CD73抗體係指呈IgG1-TM形式之抗體，使得IgG1 Fc域包含突變L234、L235E及P331，結合可溶性及細胞表面呈現之CD73，且抑制CD73酶活性。圖1A-1D提供MEDI9447 VH及VL域之核苷酸及胺基酸序列。

「CTLA4多肽」意謂與GenBank寄存號AAL07473.1或其具有T細胞抑制活性之片段具有至少85%胺基酸序列一致性的多肽。以下提供AAL07473.1之序列：

CTLA4多肽序列[智人]

```
gi|15778586|gb|AAL07473.1|AF414120_1
MACLGFQRHKAQLNLATRTWPCTLLFPLLFI PVFCKAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVR
VTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSI CTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPY
LGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPEPE
CEKQFQPYFIPIN
```

「CTLA4核酸分子」意謂編碼CTLA4多肽之聚核苷酸。例示性CTLA4核酸分子序列以GenBank寄存編號AAL07473提供。

「抗-CTLA4抗體」意謂選擇性地結合CTLA4多肽之抗體。例示性抗-CTLA4抗體例如描述在美國專利第6,682,736號、第7,109,003號、第7,123,281號、第7,411,057號、第7,824,679號、第8,143,379號、第7,807,797號及第8,491,895號(其中，曲美單抗為11.2.1)，該等專利以引用的方式併入本文中。曲美單抗為例示性抗-CTLA4抗體。曲美單抗序列提供於以下本文序列表中(SEQ ID NO: 130-137)。

「PD-1多肽」意謂與NCBI寄存編號NP_005009具有至少約85%胺基酸一致性且具有PD-L1及/或PD-L2結合活性之多肽或其片段。以下提供NP_005009之序列。

PD-1多肽序列

NCBI寄存編號NP_005009

```
mqipgapwpv vwavlqlgwr pgwfldspdr pwnpptfspa llvvtgedna tftcsfsnts
esfvlnwyrmspsnqtdkla afpedrsqpg qdcrfrvtql pngrdfhmsv vrarrndsgt
ylcgaislap kaqikeslra elrvterrae vptahpspsp rpagqfqtlv vgvvggllgs
lvllvwvlav icsraargti garrtgqplk edpsavpvfs vdygeldfqw rektpeppvp
cvpeqtayat ivfpsgmgtg sparrgsadg prsaqqlrpe dghcswpl
```

「PD-1核酸分子」意謂編碼PD-1多肽之聚核苷酸。例示性PD-1核酸分子序列以NCBI寄存編號NM_005018提供。

「抗-PD-1抗體」意謂選擇性地結合PD-1多肽之抗體或其抗原結合片段。例示性抗-PD-1抗體包括例如派立珠單抗(KEYTRUDA®、拉立珠單抗、MK-3475)、尼沃單抗(OPDIVA®、BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538)或AMP-224。

「PD-L1多肽」意謂與NCBI寄存編號NP_001254635具有至少約

85%、95%或100%胺基酸一致性且具有PD-1及CD80結合活性之多肽或其片段。以下提供NP_001254635之序列。

PD-L1多肽序列

NCBI寄存編號NP_001254635

```
mrifavfifm tywhllnapy nkinqrilvv dpvtsehelt cqaegyphae viwtssdhqv
lsgkttttns kreeklfnvt stlrinnttn eifyctfrri dpeenhtael vipelplahp
pnerthlvil gaillclgva ltfifrlrkg rmmdvkkgci qdtnskkqsd thleet
```

「PD-1核酸分子」意謂編碼PD-L1多肽之聚核苷酸。例示性PD-1核酸分子序列以NCBI寄存編號NM_001267706提供。

「抗-PD-L1抗體」意謂選擇性地結合PD-L1多肽之抗體或其抗原結合片段。例示性抗-PD-L1抗體例如描述在US20130034559/US8779108及US20140356353，其以引用的方式併入本文中。MEDI4736為例示性PD-L1抗體。MEDI4736之序列提供於以下本文序列表中(SEQ ID NO: 138-145)。

術語「抗原結合片段」係指包含完整抗體之一部分的分子且尤其指包含完整抗體之抗原決定可變區之分子。此項技術中已知抗體之抗原結合功能可利用全長抗體之片段進行。抗體片段之實例包括(但不限於)Fab、Fab'、F(ab')₂及Fv片段、線性抗體、單鏈抗體及由抗體片段形成之多專一性抗體。

「單株抗體」係指參與單一抗原決定子或抗原決定基之高度專一性識別及結合的均質抗體群體。此與多株抗體形成對比，多株抗體典型地包括針對不同抗原決定子之不同抗體。

術語「單株抗體」涵蓋完整與全長單株抗體以及抗體片段(諸如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、單鏈可變片段(scFv)、包含抗體部分之融合蛋白及包含抗原識別位點的任何其他經修飾之免疫球蛋白分子。此外，「單株抗體」係指以多種方式，包括(但不限於)利用融合瘤、噬菌體選擇、重組表現及轉殖基因動物(例如人類抗體在轉殖基因小鼠

中之表現)製備之該等抗體。

術語「人類化抗體」係指來源於非人類(例如鼠類)免疫球蛋白的抗體，其已經工程改造以含有最小非人類(例如鼠類)序列。通常，人類化抗體為其中來自CDR之殘基經來自非人類物種(例如小鼠、大鼠、兔或倉鼠)之CDR之殘基置換的人類免疫球蛋白，其具有所需專一性、親和力及能力(Jones等人，1986, *Nature*, 321:522-525；Riechmann等人，1988, *Nature*, 332:323-327；Verhoeyen等人，1988, *Science*, 239:1534-1536)。在一些情況下，人類免疫球蛋白之構架(FW)胺基酸殘基經具有所需專一性及/或親和力及/或能力之非人類物種之抗體中的相應殘基置換。

人類化抗體可利用Fv構架區及/或所置換之非人類殘基內之其他殘基之取代而進一步修飾，以優化及最佳化抗體專一性、親和力及/或能力。一般而言，人類化抗體將包含至少一個及通常兩個或三個含有對應於非人類免疫球蛋白之所有或實質上所有CDR區之可變域的實質上全部，而所有或實質上所有FR區域為人類免疫球蛋白共同序列之FR區。人類化抗體亦可包含免疫球蛋白恆定區或域(Fc)之至少一部分，通常人類免疫球蛋白恆定區或域之至少一部分。用於產生人類化抗體之方法的實例描述於美國專利第5,225,539號或第5,639,641號中。

抗體之「可變區」係指單獨或組合形式之抗體輕鏈之可變區或抗體重鏈之可變區。重鏈及輕鏈之可變區各由四個由三個CDR區連接之FW區組成。每條鏈中的CDR利用FW區緊密地固持在一起，且與來自其他鏈之CDR一起促進抗體之抗原結合位點的形成。確定CDR的技術至少有兩種：(1)基於交叉物種序列變化性之方法(亦即Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (第5版, 1991, 美國國家衛生研究院(National Institutes of Health), Bethesda Md.))；及(2)基

於抗原-抗體複合物之結晶學研究之方法(Al-lazikani等人, (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948))。此外, 該兩種方法之組合有時用於此項技術中來確定CDR。

提及可變域中之殘基(大致為輕鏈之殘基1至107及重鏈之殘基1至113)時, 一般使用Kabat編號系統(例如Kabat等人, *Sequences of Immunological Interest*, 第5版, 美國國家衛生研究院公共健康服務部, Bethesda, Md. (1991))。

短語「如Kabat中之胺基酸位置編號」、「Kabat位置」及其語法變體係指Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版 美國國家衛生研究院公共健康服務部, Bethesda, Md. (1991)中用於抗體編譯之重鏈可變域或輕鏈可變域之編號系統。使用此編號系統, 實際線性胺基酸序列可含有對應於可變域之FW或CDR之縮短或插入的更少或額外胺基酸。舉例而言, 重鏈可變域可在H2之殘基52後包括單一胺基酸插入序列(根據Kabat, 殘基52a)且在重鏈FW殘基82後包括插入之殘基(例如根據Kabat, 殘基82a、82b及82c等)。

表1

環	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B (Kabat編號)	H26-H32..34
H1	H31-H35	H26-H35 (Chothia編號)	H26-H32
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

對於給定抗體, 可藉由將抗體序列之同源區與「標準」Kabat編號序列比對來確定殘基之Kabat編號。而Chothia提及結構環之位置(Chothia及Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。使用Kabat編號規約進行編號時, Chothia CDR-H1環末端在H32與H34之間變化, 此視

環的長度而定(此原因為Kabat編號方案將插入置於H35A及H35B；若既不存在35A、亦不存在35B，則環末端位於32；若僅存在35A，則環末端位於33；若35A與35B均存在，則環末端位於34)。AbM高變區代表Kabat CDR與Chothia結構環之間的折衷，且用於Oxford Molecular的AbM抗體模型化軟體中。

IMGT(ImMunoGeneTics)亦為包括CDR之免疫球蛋白可變區提供一種編號系統。參見例如Lefranc, M.P.等人, *Dev. Comp. Immunol.* 27: 55-77(2003)，該文獻以引用的方式併入本文中。IMGT編號系統係基於超過5,000個序列之比對、結構資料及高變環之表徵且允許所有物種之可變及CDR區容易比較。根據IMGT編號方案，VH-CDR1處於位置26至35，VH-CDR2處於位置51至57，VH-CDR3處於位置93至102，VL-CDR1處於位置27至32，VL-CDR2處於位置50至52，且VL-CDR3處於位置89至97。

EU指數或EU編號系統係基於所測序之第一人類IgG(EU抗體)之依序編號。由於此規約之最常見參考為Kabat sequence manual(Kabat等人, 1991)，故EU指數有時錯誤地與Kabat指數同義使用。EU指數不提供插入及缺失，且因此在一些情況下，跨越IgG子類及物種之IgG位置的比較可不明確，尤其在鉸鏈區中。儘管如此，該規約在許多Fc結構功能研究中在實現Fc區之間的簡單比較方面已足夠。因此，在本說明書中用於Fc區中之取代及插入的編號方案為如Kabat中之EU指數。相比之下，在本說明書中用於可變區(VH及VL)之編號方案為常規Kabat編號。

如整個說明書中所用，所述VH CDR序列對應於經典Kabat編號位置，亦即，Kabat VH-CDR1在位置31-35處，VH-CDR2為位置50-65，且VH-CDR3在位置95-102處。VL-CDR1、VL-CDR2及VL-CDR3亦對應於經典Kabat編號位置，亦即分別為位置24-34、50-56及89-

97。

如本文中所使用，Fc區包括包含除第一恆定區免疫球蛋白域外之抗體恆定區之多肽。因此，Fc係指IgA、IgD及IgG之最後兩個恆定區免疫球蛋白域，及IgE及IgM之最後三個恆定區免疫球蛋白域，及此等域之可撓性鉸鏈N端。對於IgA及IgM，Fc可包括J鏈。對於IgG，Fc包含免疫球蛋白域C γ 2及C γ 3(C γ 2及C γ 3)以及C γ 1(C γ 1)與C γ 2(C γ 2)之間的鉸鏈。

雖然Fc區之邊界可改變，但人類IgG重鏈Fc區通常界定為包含殘基C226或P230至其羧基端，其中編號系根據如Kabat中所列之EU指數(Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版美國國家衛生研究院公共健康服務部, Bethesda, Md. (1991))。Fc可指分離之此區或在抗體、抗體片段或Fc融合蛋白之情形下的此區。已在許多不同Fc位置處觀察到多形現象，包括(但不限於)如由EU指數所編號之位置270、272、312、315、356及358，且因此所提出之序列與先前技術中之序列之間可存在微小差異。

術語「人類抗體」意謂由人類產生之抗體，或使用此項技術中已知之任何技術(例如培養細胞中之重組表現或轉殖基因動物中之表現)製備的具有對應於由人類產生之抗體之胺基酸序列的抗體。因此，術語人類抗體亦涵蓋胺基酸序列對應於最初由人類產生(或其經工程改造之變異體或衍生物)但在非人類系統中表現(例如藉由化學合成產生；以重組方式在微生物、哺乳動物或昆蟲細胞中表現；或在動物個體中表現)之抗體的抗體。因此，自人類個體或自人類細胞(例如表現重組抗體或其片段之融合瘤或細胞株)獲得且隨後在例如小鼠之動物中表現的抗體視為人類抗體。人類抗體之此定義包括完整或全長抗體、其片段，及/或包含至少一種人類重鏈及/或輕鏈多肽的抗體，諸如包含鼠類輕鏈及人類重鏈多肽之抗體。

術語「嵌合抗體」係指其中免疫球蛋白分子之胺基酸序列來源於兩種或兩種以上動物物種之抗體。通常，輕鏈與重鏈之可變區對應於來源於一種哺乳動物物種(例如小鼠、大鼠、兔等)之具有所需專一性及/或親和力及/或能力之抗體的可變區，而恆定區與來源於另一物種(通常人類)之抗體中之序列同源以避免在該物種中引發免疫反應。

如本文中所使用之術語「抗原決定基」係指能夠結合於本文所揭示之CD73抗體或CD73結合分子的抗原蛋白質決定子。抗原決定基通常由諸如胺基酸或糖側鏈之分子之化學活性表面基團組成，且通常具有特定三維結構特徵，以及荷質比特徵。識別抗原決定基之抗體或結合分子的一部分稱為互補位。蛋白質抗原之抗原決定基基於其結構及與互補位之相互作用劃分成兩個類別：構形抗原決定基及線性抗原決定基。構形抗原決定基由抗原胺基酸序列之非連續部分構成。此等抗原決定基與互補位基於3-D表面特徵及抗原之形狀或三級結構而相互作用。相比之下，線性抗原決定基與互補位基於其一級結構而相互作用。線性抗原決定基由來自抗原之胺基酸的連續序列形成。

術語「抗體結合位點」係指包含互補抗體所專一性結合之連續或非連續位點(亦即抗原決定基)之抗原(例如CD73)中的區域。因此，抗體結合位點可含有抗原中之其他區域，其超出抗原決定基且可決定諸如結合親和力及/或穩定性之特性或影響諸如抗原酶活性或二聚之特性。因此，即使兩種抗體結合於抗原內之相同抗原決定基，若抗體分子與抗原決定基外部之胺基酸建立起不同的分子間接觸，則此類抗體視為結合於不同抗體結合位點。

「結合親和力」通常係指分子(例如抗體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如抗原)之間的非共價相互作用力之總和強度。除非另有說明，否則如本文所用，「結合親和力」係指反映結合對(例如抗體與抗原)成員之間1:1相互作用之固有結合親和力。分子X對其搭配物Y之

親和力一般可由解離常數(K_D)表示。可利用此項技術中已知之常用方法(包括本文所描述之方法)量測親和力。低親和力抗體一般緩慢結合抗原且傾向於容易解離，而高親和力抗體一般較快結合抗原且傾向於較長時間保持結合狀態。此項技術中已知多種量測結合親和力的方法，其中任一者可用於本發明之目的。

除非另有說明，否則「效能」通常表示為 IC_{50} 值，以nM為單位。 IC_{50} 為抗原結合分子之中位抑制濃度。在功能分析中， IC_{50} 為使生物反應降低其最大值之50%的濃度。在配位體結合研究中， IC_{50} 為使受體結合減少最大專一性結合水準之50%的濃度。 IC_{50} 可利用此項技術中已知之任何數目個方式計算。效能之提高可藉由例如相對於親本抗體(例如在生殖系之前的親本抗體或在親和力最佳化之前的親本抗體)量測來測定。

相較於親本抗體，本發明之抗體或多肽的效能提高倍數可為至少約2倍、至少約4倍、至少約6倍、至少約8倍、至少約10倍、至少約15倍、至少約20倍、至少約25倍、至少約30倍、至少約40倍、至少約50倍、至少約60倍、至少約70倍、至少約80倍、至少約90倍、至少約100倍、至少約110倍、至少約120倍、至少約130倍、至少約140倍、至少約150倍、至少約160倍、至少約170倍，或至少約180倍或180倍以上。

「抗體依賴性細胞介導之細胞毒性」或「ADCC」係指一種細胞毒性形式，其中結合至存在於某些細胞毒性細胞(例如天然殺手(NK)細胞、嗜中性白血球及巨噬細胞)上之Fc受體(FcR)的分泌性免疫球蛋白使得此等細胞毒性效應細胞能夠專一性結合至攜帶抗原之目標細胞且隨後用細胞毒素殺死目標細胞。針對目標細胞之表面的特定高親和力IgG抗體「武裝」細胞毒性細胞且為此類殺滅絕對需要。目標細胞之溶解在細胞外，需要直接的細胞與細胞接觸且不涉及補體。預期除

抗體之外，能夠專一性結合於具有抗原之目標細胞的包含Fc區之其他蛋白質，特別Fc融合蛋白將能夠實現細胞介導之細胞毒性。為了簡單起見，由Fc融合蛋白活性引起的細胞介導性細胞毒性在本文中亦稱作ADCC活性。

「分離」之多肽、抗體、聚核苷酸、載體、細胞或組合物為呈自然界中未發現之形式的多肽、抗體、聚核苷酸、載體、細胞或組合物。分離之多肽、抗體、聚核苷酸、載體、細胞或組合物包括已在一定程度上純化，使得其不再呈自然界中所發現之形式的彼等物。在一些態樣中，分離之抗體、聚核苷酸、載體、細胞或組合物為實質上純的。

術語「個體」係指任何動物(例如哺乳動物)，包括(但不限於)人類、非人類靈長類動物、嚙齒動物及其類似動物，其將為特定治療之接受體。通常，關於人類個體之術語「個體」及「患者」在本文中可互換使用。

術語「醫藥組合物」係指一種製劑，其呈允許活性成分(例如本文所揭示之抗-CD73結合分子)之生物活性有效的形式且不含對組合物將投與之個體具有不可接受之毒性的其他組分。此類組合物可為無菌的。

如本文所揭示之抗-CD73結合分子的「有效量」為足以進行特定陳述之目的之量。「有效量」可憑經驗且以與所述用途相關的常規方式確定。

術語「治療有效量」係指本文所揭示之抗-CD73結合分子或其他藥物有效「治療」個體或哺乳動物之疾病或病症的量。

「標記」一詞當在本文中使用时係指與本文所揭示之抗-CD73結合分子直接或間接融合(例如基因融合)或結合(例如化學結合)以便產生「經標記」抗-CD73結合分子的可偵測化合物或組合物。標記本身

可偵測(例如放射性同位素標記或螢光標記)，或在酶標記之情況下，可催化受質化合物或組合物發生可偵測的化學變化。

諸如「可衍生基團」及「可衍生官能基」之術語可互換使用且指能夠反應以允許在本文所揭示之抗-CD73結合分子(例如CD73抗體)與另一物質之間形成共價鍵的官能基。在一些態樣中，該等物質為治療劑(例如細胞毒素)、可偵測標記、聚合物(例如PEG)等。例示性可衍生基團包括硫醇、羥基、胺基、羧基及醯胺以及其經修飾形式，諸如經活化或經保護形式。

諸如「治療(treating)」或「治療(treatment)」或「治療(to treat)」或「緩解(alleviating)」或「緩解(to alleviate)」之術語係指以下兩者：(1)經診斷之病理性病況或病症治癒、減緩、症狀減輕及/或進展停止的治療性量度；及(2)防止及/或減慢目標病理性病況或病症發展的預防性或防治性量度。因此，需要治療的彼等者包括已經患有病症之彼等者；易於患有病症之彼等者；及其中待預防病症之彼等者。在某些態樣中，若患者展示某一類型癌症例如總體、部分或瞬時緩解，則根據本發明之方法，成功「治療」個體之癌症。

術語「癌症」、「腫瘤」、「癌性」及「惡性」係指或描述哺乳動物中通常以不受調控之細胞生長為特徵之生理病況。癌症之實例包括(但不限於)癌瘤，包括腺癌、淋巴瘤、母細胞瘤、黑素瘤、肉瘤及白血病。此類癌症之更特定實例包括鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、腸胃癌、霍奇金氏淋巴瘤及非霍奇金氏淋巴瘤、胰臟癌、神經膠母細胞瘤、神經膠質瘤、宮頸癌、卵巢癌、肝癌(諸如肝癌瘤及肝癌)、膀胱癌、乳癌(包括激素介導之乳癌，參見例如Innes等人(2006) *Br. J. Cancer* 94:1057-1065)、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌、骨髓瘤(諸如多發性骨髓瘤)、唾液腺癌、腎癌(諸如腎細胞癌及威耳姆士腫瘤(Wilms' tumor))、基底細胞癌、黑素瘤、前列腺癌、外陰

癌、甲狀腺癌、睪丸癌、食道癌、各種類型之頭頸癌及黏液來源癌(諸如黏液性卵巢癌)、膽管癌(肝)及腎乳頭狀癌。在一些態樣中，如本文中所使用之術語癌症特指表現CD73之癌症。在一些特定態樣中，術語癌症係指CD73表現量低之癌症。在一些態樣中，如本文所用之術語癌症特指表現CD73之癌症(例如結腸癌、乳癌、淋巴瘤、非小細胞癌瘤)。

如本文中可互換使用，「聚核苷酸」或「核酸」係指任何長度之核苷酸之聚合物且包括DNA及RNA。核苷酸可為去氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、經修飾之核苷酸或鹼及/或其類似物或任何可利用DNA或RNA聚合酶併入聚合物中之受質。聚核苷酸可包含經修飾之核苷酸，諸如甲基化核苷酸及其類似物。前述描述適用於本文中所提及之所有聚核苷酸，包括RNA及DNA。

術語「載體」意指構築體，其能夠在宿主細胞中傳遞、且在一些態樣中表現一或多種相關基因或序列。載體之實例包括(但不限於)病毒載體、裸DNA或RNA表現載體、質體、黏質體或噬菌體載體、與陽離子縮合劑結合之DNA或RNA表現載體、囊封於脂質體中之DNA或RNA表現載體，及某些真核細胞，諸如生產細胞。

術語「多肽」、「肽」及「蛋白質」在本文中可互換使用，係指任何長度之胺基酸之聚合物。聚合物可為直鏈或分支鏈，其可包含經修飾之胺基酸，且其可間雜有非胺基酸。該等術語亦涵蓋已經天然修飾或藉由干預修飾之胺基酸聚合物；例如雙硫鍵形成、糖基化、脂質化、乙醯化、磷酸化，或任何其他操縱或修飾，諸如與標記組分結合。該定義亦包括例如含有胺基酸之一或多種類似物(包括例如非天然胺基酸等)之多肽，以及此項技術中已知之其他修飾。應瞭解，因為本發明之多肽基於抗體，所以在某些態樣中，多肽可以單一鏈或締合鏈形式存在。

「重組」多肽或蛋白質係指經由重組DNA技術產生之多肽或蛋白質。在經工程改造之寄主細胞中表現之以重組方式產生的多肽及蛋白質視為經分離，已利用任何適合的技術分離、分級分離或部分或實質上純化之天然或重組多肽亦視為經分離。本文所揭示之多肽可使用此項技術中已知之方法以重組方式產生。或者，本文所揭示之蛋白質及肽可化學合成。

術語「胺基酸取代」係指用另一胺基酸殘基置換親本序列中存在之胺基酸殘基。胺基酸可例如經由化學肽合成或經由此項技術中已知之重組方法取代於親本序列中。因此，提及「在位置X取代」或「在位置X取代」係指在位置X存在之胺基酸經替代性胺基酸殘基取代。在一些態樣中，取代模式可根據模式AXY描述，其中A為對應於在位置X天然存在之胺基酸的單字母密碼，且Y為取代胺基酸殘基。在其他態樣中，取代模式可根據模式XY描述，其中Y為對應於取代在位置X天然存在之胺基酸的胺基酸殘基之單字母密碼。

「保守性胺基酸取代」為胺基酸殘基經具有類似側鏈之胺基酸殘基置換之取代。此項技術中已定義具有類似側鏈之胺基酸殘基家族，包括鹼性側鏈(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、酸性側鏈(例如天冬胺酸、麩胺酸)、不帶電極性側鏈(例如甘胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸)、非極性側鏈(例如丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸)、 β 分支鏈側鏈(例如蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及芳族側鏈(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)。因此，若多肽中之胺基酸經來自相同側鏈家族之另一胺基酸置換，則取代視為保守。在另一態樣中，一串胺基酸可經側鏈家族成員之順序及/或組成不同之結構上類似之一串保守置換。

非保守性胺基酸取代包括以下取代，其中(i)用具有正電性側鏈

之殘基(例如Arg、His或Lys)取代負電性殘基(例如Glu或Asp)或經負電性殘基(例如Glu或Asp)取代；(ii)用親水性殘基(例如Ser或Thr)取代疏水性殘基(例如Ala、Leu、Ile、Phe或Val)或經疏水性殘基(例如Ala、Leu、Ile、Phe或Val)取代；(iii)用半胱胺酸或脯胺酸取代任何其他殘基或經任何其他殘基取代；或(iv)用具有龐大疏水性或芳族側鏈之殘基(例如Val、His、Ile或Trp)取代具有較小側鏈之殘基(例如Ala、Ser)或無側鏈之殘基(例如Gly)或經具有較小側鏈之殘基(例如Ala、Ser)或無側鏈之殘基(例如Gly)取代。

其他取代可容易由一般技術者鑑別。舉例而言，對於胺基酸丙胺酸，取代可取自D-丙胺酸、甘胺酸、 β -丙胺酸、L-半胱胺酸及D-半胱胺酸中之任一者。對於離胺酸，置換可為D-離胺酸、精胺酸、D-精胺酸、高精胺酸、甲硫胺酸、D-甲硫胺酸、鳥胺酸或D-鳥胺酸中之任一者。一般而言，可預期誘發分離多肽之特性改變的功能上重要區域之取代為以下取代，其中(i)例如絲胺酸或蘇胺酸之極性殘基取代例如白胺酸、異白胺酸、苯丙胺酸或丙胺酸之疏水性殘基(或經其取代)；(ii)半胱胺酸殘基取代任何其他殘基(或經其取代)；(iii)例如離胺酸、精胺酸或組胺酸之具有正電性側鏈之殘基取代例如麩胺酸或天冬胺酸之具有負電性側鏈之殘基(或經其取代)；或(iv)例如苯丙胺酸之具有龐大側鏈之殘基取代例如甘胺酸之不具有此類側鏈之殘基(或經其取代)。以上非保守性取代之可改變蛋白質之功能特性的可能性亦與取代相對於蛋白質之功能上重要區域之位置相關：因此一些非保守性取代可對生物特性幾乎無或無作用。

術語「胺基酸插入」係指新胺基酸殘基引入親本序列中存在之兩個胺基酸殘基之間。胺基酸可例如經由化學肽合成或經由此項技術中已知之重組方法插入親本序列中。因此，如本文所使用，短語「位置X與Y之間的插入」或「Kabat位置X與Y之間的插入」(其中X及Y對

應於胺基酸位置(例如位置239與240之間的半胱胺酸胺基酸插入)係指胺基酸插入位置X與Y之間，且亦指核酸序列中編碼胺基酸之密碼子插入編碼位置X及Y之胺基酸的密碼子之間。插入模式可根據模式AXins描述，其中A為對應於插入之胺基酸的單字母密碼，且X為在插入之前的位置。

術語兩個多肽或聚核苷酸序列之間的「序列一致性百分比」係指考慮到為使兩個序列最佳比對而必須引入之添加或缺失(亦即間隙)，在比較窗口上序列所共享之一致匹配位置的數目。匹配位置為在目標及參考序列中呈現一致核苷酸或胺基酸的任何位置。目標序列中呈現之間隙不計數，因為間隙不為核苷酸或胺基酸。同樣，參考序列中呈現之間隙不計數，因為目標序列核苷酸或胺基酸計數，不為來自參考序列之核苷酸或胺基酸。

序列一致性百分比藉由以下方式計算：測定兩個序列中存在之一致胺基酸殘基或核酸鹼基的位置數獲得匹配位置數，將匹配位置數除以比較窗中之總位置數且將結果乘以100獲得序列一致性百分比。兩個序列之間的序列比較及序列一致性百分比之測定可使用容易進行線上使用及下載之軟體實現。適合之軟體程式可自各種來源獲得，且用於比對蛋白質與核苷酸序列。一種確定序列一致性百分比之適合程式為bl2seq，可自U.S. government's National Center for Biotechnology Information BLAST網站(blast.ncbi.nlm.nih.gov)獲得之程式之BLAST套件一部分。Bl2seq使用BLASTN或BLASTP演算法執行兩個序列之間的比較。BLASTN用於比較核酸序列，而BLASTP用於比較胺基酸序列。其他適合之程式為例如Needle、Stretcher、Water或Matcher (生物信息學程式之EMBOSS套件一部分)且亦可自European Bioinformatics Institute (EBI)在www.ebi.ac.uk/Tools/psa獲得。

與聚核苷酸或多肽參考序列比對之單一聚核苷酸或多肽目標序

列內不同區域可各具有其自身序列一致性百分比。應指出，序列一致性百分比值四捨五入至小數點後一位。舉例而言，80.11、80.12、80.13及80.14四捨五入為80.1，而80.15、80.16、80.17、80.18及80.19四捨五入為80.2。亦注意，長度值將總是為整數。

在某些態樣中，第一胺基酸序列相對於第二序列胺基酸之一致性百分比「X」計算為 $100 \times (Y/Z)$ ，其中Y為在第一及第二序列之比對中評分為一致匹配之胺基酸殘基數目(如藉由目視檢查或特定序列比對程式比對)且Z為第二序列中殘基總數。若第一序列之長度比第二序列長，則第一序列相對於第二序列之一致性百分比將高於第二序列相對於第一序列之一致性百分比。

熟習此項技術者將瞭解用於序列一致性百分比計算之序列比對的產生不限於僅僅由一級序列資料驅動之二元序列-序列比較。序列比對可來源於多個序列比對。一種產生多個序列比對之適合程式為ClustalW2，可自www.clustal.org獲得。另一適合程式為MUSCLE，可自www.drive5.com/muscle/獲得。或者可利用ClustalW2及MUSCLE，例如來自EBI。

亦將瞭解，序列比對可藉由將序列資料與來自異質來源之資料(諸如結構資料(例如晶體學蛋白結構)、功能資料(例如突變位置)或系統發生資料)整合來生成。整合異質的資料以生成多個序列比對之適合的程式為T-Coffee，可在www.tcoffee.org獲得且或者例如獲自EBI。應瞭解用於計算序列一致性百分比之最終比對可自動或人工計算。

如本文相對於輕鏈(VL)及重鏈(VH)可變區所用的術語「共同序列」係指基於關於VL或VH鏈中之胺基酸殘基能夠在對抗原結合無損害之情況下修飾的資訊定義的複合或通用VL或VH序列。因此，在VL或VH鏈之「共同序列」中，某些胺基酸位置由在該位置處之多個可能的胺基酸中之一者殘基佔據。舉例而言，若精胺酸(R)或絲胺酸(S)

出現在特定位置處，則共同序列中之該特定位置可為精胺酸或絲胺酸(R或S)。VH及VL鏈之共同序列可例如利用以下各者定義：體外親和力成熟(例如使用簡併編碼引物隨機化特定CDR中之每一胺基酸位置)、抗體CDR中之胺基酸殘基的掃描突變誘發(例如丙胺酸掃描突變誘發)或此項技術中已知之任何其他方法，接著評估突變體與抗原之結合以判定突變之胺基酸位置是否影響抗原結合。在一些態樣中，突變在CDR區中引入。在其他態樣中，突變在構架區中引入。在一些其他態樣中，突變在CDR及構架區中引入。

II. CD73結合分子

本發明提供專一性結合CD73(例如人類CD73)之CD73結合分子(例如抗體及其抗原結合片段)。CD73之全長胺基酸(aa)及核苷酸(nt)序列為此項技術中已知的(參見例如人類CD73之UniProt寄存編號P21589，或小鼠CD73之UniProt寄存編號Q61503)。在一些態樣中，抗-CD73結合分子為人類抗體(例如純系10.3抗體、純系2C5抗體、MEDI9447)。在某些態樣中，CD73結合分子為抗體或其抗原結合片段。

在一些態樣中，CD73結合分子(例如抗體或其抗原結合片段)包含Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、單鏈Fv或scFv、二硫鍵連接之Fv、V-NAR域、IgNar、胞內抗體、IgG CH2、微型抗體、F(ab')₃、四功能抗體、三功能抗體、雙功能抗體、單域抗體、DVD-Ig、Fcab、mAb²、(scFv)₂或scFv-Fc。在一些態樣中，抗體為IgG類型，例如IgG1類型。

在一些態樣中，抗-CD73抗體(例如MEDI9447、純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段包含重鏈恆定區或其片段。在一些特定態樣中，重鏈恆定區為IgG恆定區。IgG恆定區可包含選自由κ恆定區及λ恆定區組成之群的輕鏈恆定區。

在某些態樣中，本文所揭示之抗-CD73抗體或其抗原結合片段與

親本抗體(例如CD730010抗體或CD730002抗體)相比經修飾。在一些態樣中，親本抗體為CD730010。在其他態樣中，親本抗體為CD730002。在其他態樣中，親本抗體為CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069。修飾可包括相比於親本抗體(例如CD730010或CD730002)在CDR區中及/或在FW區中之突變。

短語「CD730002抗體」係指包含兩個包含SEQ ID NO: 1之胺基酸序列的VL域及兩個包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列的VH域的IgG1。

短語「CD730004抗體」係指包含兩個包含SEQ ID NO: 104之胺基酸序列的VL域及兩個包含SEQ ID NO: 103之胺基酸序列的VH域的IgG1。

短語「CD730008抗體」係指包含兩個包含SEQ ID NO: 106之胺基酸序列的VL域及兩個包含SEQ ID NO: 107之胺基酸序列的VH域的IgG1。

短語「CD730010抗體」係指包含兩個包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列的VL域及兩個包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列的VH域的IgG1。

短語「CD730011抗體」係指包含兩個包含SEQ ID NO: 5之胺基酸序列的VL域及兩個包含SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的VH域的IgG1。

短語「CD730021抗體」係指包含兩個包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列的VL域及兩個包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列的VH域的IgG1。

短語「CD730042抗體」係指包含兩個包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列的VL域及兩個包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列的VH域的

IgG1。

短語「CD730046抗體」係指包含兩個包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列的VL域及兩個包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列的VH域的IgG1。

短語「CD730047抗體」係指包含兩個包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列的VL域及兩個包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列的VH域的IgG1。

短語「CD730068抗體」係指包含兩個包含SEQ ID NO: 108之胺基酸序列的VL域及兩個包含SEQ ID NO: 107之胺基酸序列的VH域的IgG1。

短語「CD730069抗體」係指包含兩個包含SEQ ID NO: 110之胺基酸序列的VL域及兩個包含SEQ ID NO: 109之胺基酸序列的VH域的IgG1。

(i) CD730010衍生之抗-CD73抗體

在某些態樣中，本發明之抗-CD73抗體包含對CD730010抗體之輕鏈之CDR1及/或CDR2及/或CDR3的修飾，包括(但不限於)：

1)輕鏈CDR1，其包含共同序列SGSLSNIGRN X_1 VN，其中 X_1 表示胺基酸殘基脯胺酸(P)、麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)；及/或

2)輕鏈CDR2，其包含共同序列L X_2 N X_3 R X_4 X_5 ，其中 X_2 表示胺基酸殘基天冬醯胺酸(N)或天冬胺酸(D)， X_3 表示胺基酸殘基麩醯胺酸(Q)或白胺酸(L)， X_4 表示胺基酸殘基白胺酸(L)或脯胺酸(P)，且 X_5 表示胺基酸殘基甘胺酸(G)或絲胺酸(S)；及/或

3)輕鏈CDR3，其包含共同序列ATWDD SX_6 X_7 GW X_8 ，其中 X_6 表示胺基酸殘基白胺酸(L)或組胺酸(H)， X_7 表示胺基酸殘基離胺酸(K)、脯胺酸(P)、異白胺酸(I)或天冬醯胺(N)，且 X_8 表示胺基酸殘基白胺酸(L)或蘇胺酸(T)。

在某些態樣中，本發明之抗-CD73抗體包含對CD730010抗體之重鏈之CDR1及/或CDR2及/或CDR3的修飾，包括(但不限於)：

1)重鏈CDR1，其包含共同序列SYAX₉S，其中X₉表示胺基酸殘基甲硫胺酸(M)或酪胺酸(Y)；及/或

2)重鏈CDR2，其包含共同序列X₁₀IX₁₁GSX₁₂GX₁₃TYADSVKG，其中X₁₀表示胺基酸殘基白胺酸(L)或丙胺酸(A)，X₁₁表示胺基酸殘基色胺酸(W)或絲胺酸(S)，X₁₂表示胺基酸殘基色胺酸(W)或甘胺酸(G)，且X₁₃表示胺基酸殘基絲胺酸(S)或精胺酸(R)；及/或

3)重鏈CDR3，其包含共同序列LGYX₁₄X₁₅X₁₆DX₁₇，其中X₁₄表示胺基酸殘基甘胺酸(G)或絲胺酸(S)，X₁₅表示胺基酸殘基精胺酸(R)或蘇胺酸(T)，X₁₆表示胺基酸殘基纈胺酸(V)或異白胺酸(I)，且X₁₇表示胺基酸殘基酪胺酸(Y)、離胺酸(K)、甲硫胺酸(M)、白胺酸(L)或麩胺酸(E)。

在一個態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL區，該VL區包含共同胺基酸序列：

[FW₁]SGSLSNIGRNX₁VN[FW₂]LX₂NX₃RX₄X₅[FW₃]ATWDDSX₆
X₇GWX₈[FW₄]

其中[FW₁]、[FW₂]、[FW₃]及[FW₄]分別表示VL構架區1(SEQ ID NO: 25或26)、VL構架區2(SEQ ID NO: 27或28)、VL構架區3(SEQ ID NO: 29)及VL構架區4(SEQ ID NO: 30)之胺基酸殘基，且其中

X₁表示胺基酸殘基脯胺酸(P)、麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)；

X₂表示胺基酸殘基天冬醯胺酸(N)或天冬胺酸(D)；

X₃表示胺基酸殘基麩醯胺酸(Q)或白胺酸(L)；

X₄表示胺基酸殘基白胺酸(L)或脯胺酸(P)；

X₅表示胺基酸殘基甘胺酸(G)或絲胺酸(S)；

X₆表示胺基酸殘基白胺酸(L)或組胺酸(H)；

X₇表示胺基酸殘基離胺酸(K)、脯胺酸(P)、異白胺酸(I)或天冬醯胺酸(N)；及

X₈表示胺基酸殘基白胺酸(L)或蘇胺酸(T)。

在一個態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH區，該VH區包含共同胺基酸序列：

[FW₅]SYAX₉S[FW₆]X₁₀IX₁₁GSX₁₂GX₁₃TYADSVKGF[FW₇]LGYX₁₄
X₁₅X₁₆DX₁₇ [FW₈]

其中[FW₅]、[FW₆]、[FW₇]及[FW₈]分別表示VH構架區1(SEQ ID NO: 31)、VH構架區2(SEQ ID NO: 32)、VH構架區3(SEQ ID NO: 33)及VH構架區4(SEQ ID NO: 34)之胺基酸殘基，且其中

X₉表示胺基酸殘基甲硫胺酸(M)或酪胺酸(Y)；

X₁₀表示胺基酸殘基白胺酸(L)或丙胺酸(A)；

X₁₁表示胺基酸殘基色胺酸(W)或絲胺酸(S)；

X₁₂表示胺基酸殘基色胺酸(W)或甘胺酸(G)；

X₁₃表示胺基酸殘基絲胺酸(S)或精胺酸(R)；

X₁₄表示胺基酸殘基甘胺酸(G)或絲胺酸(S)；

X₁₅表示胺基酸殘基精胺酸(R)或蘇胺酸(T)；

X₁₆表示胺基酸殘基纈胺酸(V)或異白胺酸(I)；

X₁₇表示胺基酸殘基酪胺酸(Y)、離胺酸(K)、甲硫胺酸(M)、白胺酸(L)或麩胺酸(E)。

在一個態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL區，該VL區包含共同胺基酸序列：

[FW₁]SGSLSNIGRNX₁VN[FW₂]LX₂NX₃RX₄X₅[FW₃]ATWDDSX₆
X₇GWX₈[FW₄]

其中[FW₁]、[FW₂]、[FW₃]及[FW₄]分別表示VL構架區1(SEQ ID NO: 25或26)、VL構架區2(SEQ ID NO: 27或28)、VL構架區3(SEQ ID

NO: 29)及VL構架區4(SEQ ID NO: 30)之胺基酸殘基，且其中

X₁表示胺基酸殘基脯胺酸(P)、麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)；

X₂表示胺基酸殘基天冬醯胺(N)或天冬胺酸(D)；

X₃表示胺基酸殘基麩醯胺酸(Q)或白胺酸(L)；

X₄表示胺基酸殘基白胺酸(L)或脯胺酸(P)；

X₅表示胺基酸殘基甘胺酸(G)或絲胺酸(S)；

X₆表示胺基酸殘基白胺酸(L)或組胺酸(H)；

X₇表示胺基酸殘基離胺酸(K)、脯胺酸(P)、異白胺酸(I)或天冬醯胺(N)；且

X₈表示胺基酸殘基白胺酸(L)或蘇胺酸(T)；

且其中抗-CD73抗體或其抗原結合片段進一步包含VH區，該VH區包含共同胺基酸序列：

[FW₅]SYAX₉S[FW₆]X₁₀IX₁₁GSX₁₂GX₁₃TYADSVKG[FW₇]LGYX₁₄
X₁₅X₁₆DX₁₇ [FW₈]

其中[FW₅]、[FW₆]、[FW₇]及[FW₈]分別表示VH構架區1(SEQ ID NO: 31)、VH構架區2(SEQ ID NO: 32)、VH構架區3(SEQ ID NO: 33)及VH構架區4(SEQ ID NO: 34)之胺基酸殘基，且其中

X₉表示胺基酸殘基甲硫胺酸(M)或酪胺酸(Y)；

X₁₀表示胺基酸殘基白胺酸(L)或丙胺酸(A)；

X₁₁表示胺基酸殘基色胺酸(W)或絲胺酸(S)；

X₁₂表示胺基酸殘基色胺酸(W)或甘胺酸(G)；

X₁₃表示胺基酸殘基絲胺酸(S)或精胺酸(R)；

X₁₄表示胺基酸殘基甘胺酸(G)或絲胺酸(S)；

X₁₅表示胺基酸殘基精胺酸(R)或蘇胺酸(T)；

X₁₆表示胺基酸殘基纈胺酸(V)或異白胺酸(I)；

X₁₇表示胺基酸殘基酪胺酸(Y)、離胺酸(K)、甲硫胺酸(M)、白胺

酸(L)或麩胺酸(E)。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL-CDR1，其由選自由SEQ ID NO: 46、47及48組成之群的序列組成。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL-CDR1，其包含選自由SEQ ID NO: 46、47及48組成之群的序列。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL-CDR2，其由選自由SEQ ID NO: 49、50、51及52組成之群的序列組成。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL-CDR2，其包含選自由SEQ ID NO: 49、50、51及52組成之群的序列。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL-CDR3，其由選自由SEQ ID NO: 53、54、55及56組成之群的序列組成。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL-CDR3，其包含選自由SEQ ID NO: 53、54、55及56組成之群的序列。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH-CDR1，其由選自由SEQ ID NO: 35及36組成之群的序列組成。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH-CDR1，其包含選自由SEQ ID NO: 35及36組成之群的序列。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH-CDR2，其由選自由SEQ ID NO: 37、38、39及40組成之群的序列組成。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH-CDR2，其包含選自由SEQ ID NO: 37、38、39及40組成之群的序列。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH-CDR3，其由選自由SEQ ID NO: 41、42、43、44及45組成之群的序列組成。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH-CDR3，其包含選自由SEQ ID NO: 41、42、43、44及45組成之群的序列。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL-CDR1，

其由選自由SEQ ID NO: 46、47及48組成之群的序列組成，除了一、二、三或四個胺基酸取代。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL-CDR1，其包含選自由SEQ ID NO: 46、47及48組成之群的序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL-CDR2，其由選自由SEQ ID NO: 49、50、51及52組成之群的序列組成，除了一、二、三或四個胺基酸取代。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL-CDR2，其包含選自由SEQ ID NO: 49、50、51及52組成之群的序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL-CDR3，其由選自由SEQ ID NO: 53、54、55及56組成之群的序列組成，除了一、二、三或四個胺基酸取代。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL-CDR3，其包含選自由SEQ ID NO: 53、54、55及56組成之群的序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH-CDR1，其由選自由SEQ ID NO: 35及36組成之群的序列組成，除了一、二、三或四個胺基酸取代。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH-CDR1，其包含選自由SEQ ID NO: 35及36組成之群的序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH-CDR2，其由選自由SEQ ID NO: 37、38、39及40組成之群的序列組成，除了一、二、三或四個胺基酸取代。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH-CDR2，其包含選自由SEQ ID NO: 37、38、39及40組成之群的序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH-CDR3，其由選自由SEQ ID NO: 41、42、43、44及45組成之群的序列組成，

除了一、二、三或四個胺基酸取代。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH-CDR3，其包含選自由SEQ ID NO: 41、42、43、44及45組成之群的序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含：VL-CDR1，其由選自由SEQ ID NO: 46、47及48組成之群的序列組成；VL-CDR2，其由選自由SEQ ID NO: 49、50、51及52組成之群的序列組成；及VL-CDR3，其由選自由SEQ ID NO: 53、54、55及56組成之群的序列組成。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含：VL-CDR1，其包含選自由SEQ ID NO: 46、47及48組成之群的序列；VL-CDR2，其包含選自由SEQ ID NO: 49、50、51及52組成之群的序列；及VL-CDR3，其包含選自由SEQ ID NO: 53、54、55及56組成之群的序列。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含：VH-CDR1，其由選自由SEQ ID NO: 35及36組成之群的序列組成；VH-CDR2，其由選自由SEQ ID NO: 37、38、39及40組成之群的序列組成；及VH-CDR3，其由選自由SEQ ID NO: 41、42、43、44及45組成之群的序列組成。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含：VH-CDR1，其包含選自由SEQ ID NO: 35及36組成之群的序列；VH-CDR2，其包含選自由SEQ ID NO: 37、38、39及40組成之群的序列；及VH-CDR3，其包含選自由SEQ ID NO: 41、42、43、44及45組成之群的序列。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含：VL-CDR1，其由選自由SEQ ID NO: 46、47及48組成之群的序列組成，除了一、二、三或四個胺基酸取代；VL-CDR2，其由選自由SEQ ID NO: 49、50、51及52組成之群的序列組成，除了一、二、三或四個胺基酸取代；及VL-CDR3，其由選自由SEQ ID NO: 53、54、55及56組

成之群的序列組成，除了一、二、三或四個胺基酸取代。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含：VL-CDR1，其包含選自由SEQ ID NO: 46、47及48組成之群的序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代；VL-CDR2，其包含選自由SEQ ID NO: 49、50、51及52組成之群的序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代；及VL-CDR3，其包含選自由SEQ ID NO: 53、54、55及56組成之群的序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含：VH-CDR1，其由選自由SEQ ID NO: 35及36組成之群的序列組成，除了一、二、三或四個胺基酸取代；VH-CDR2，其由選自由SEQ ID NO: 37、38、39及40組成之群的序列組成，除了一、二、三或四個胺基酸取代；及VH-CDR3，其由選自由SEQ ID NO: 41、42、43、44及45組成之群的序列組成，除了一、二、三或四個胺基酸取代。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含：VH-CDR1，其包含選自由SEQ ID NO: 35及36組成之群的序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代；VH-CDR2，其包含選自由SEQ ID NO: 37、38、39及40組成之群的序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代；及VH-CDR3，其包含選自由SEQ ID NO: 41、42、43、44及45組成之群的序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代。

在某些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含對重鏈及/或輕鏈之CDR1及/或CDR2及/或CDR3的修飾，且進一步包含對重鏈及/或輕鏈之FW1及/或FW2及/或FW3及/或FW4的修飾。

在一些態樣中，FW₁包含SEQ ID NO: 25或26，FW₂包含SEQ ID NO: 27或28，FW₃包含SEQ ID NO: 29，FW₄包含SEQ ID NO: 30，FW₅包含SEQ ID NO: 31，FW₆包含SEQ ID NO: 32，FW₇包含SEQ ID NO: 33，且FW₈包含SEQ ID NO: 34。

在一些態樣中，FW₁包含SEQ ID NO: 25或26，除了一、二、三或四個胺基酸取代；FW₂包含SEQ ID NO: 27或28，除了一、二、三或四個胺基酸取代；FW₃包含SEQ ID NO: 29，除了一、二、三或四個胺基酸取代；FW₄包含SEQ ID NO: 30，除了一、二、三或四個胺基酸取代；FW₅包含SEQ ID NO: 31，除了一、二、三或四個胺基酸取代；FW₆包含SEQ ID NO: 32，除了一、二、三或四個胺基酸取代；FW₇包含SEQ ID NO: 33，除了一、二、三或四個胺基酸取代；且FW₈包含SEQ ID NO: 34。

在某些態樣中，抗-CD733抗體或其抗原結合片段包含VL及VH，該VL及該VH包含一致或除一或多個CDR中的一、二、三或四個胺基酸取代之外其他一致的VL-CDR1、VL-CRD2、VL-CDR3、VH-CDR1、VH-CDR2及VH-CDR3胺基酸序列，其中該VL-CDR1、VL-CRD2、VL-CDR3、VH-CDR1、VH-CDR2及VH-CDR3分別為：

SEQ ID NO: 46、49、53、35、37及41；或

SEQ ID NO: 47、49、53、35、37及41；或

SEQ ID NO: 47、49、54、36、37及42；或

SEQ ID NO: 46、50、54、36、38及43；或

SEQ ID NO: 46、51、55、36、39及44；或

SEQ ID NO: 48、52、54、36、40及44；或

SEQ ID NO: 46、49、56、35、37及41；或

SEQ ID NO: 46、49、53、35、37及45；或

SEQ ID NO: 47、49、56、36、37及45；或

SEQ ID NO: 46、50、56、36、38及45；或

SEQ ID NO: 46、51、56、36、39及45；或

SEQ ID NO: 48、52、56、36、40及45；或

SEQ ID NO: 46、49、56、35、37及45。

在某些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含抗體VL及抗體VH，其中該VL包含與選自由以下各者組成之群的參考胺基酸序列至少約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%一致的胺基酸序列：SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 69及SEQ ID NO: 70。

在其他態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含抗體VL及抗體VH，其中該VH包含與選自由以下各者組成之群的參考胺基酸序列至少約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%一致的胺基酸序列：SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 76、SEQ ID NO: 77、SEQ ID NO: 78、SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 81、SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 83及SEQ ID NO: 84。

在其他態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL，該VL包含與選自由以下各者組成之群的參考胺基酸序列至少約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%一致的序列：SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 69及SEQ ID NO: 70；且進一步包含VH，該VH包含與選自由以下各者組成之群的參考胺基酸序列至少約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%一致的序列：SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 76、SEQ ID NO: 77、SEQ ID NO: 78、SEQ ID NO: 79、SEQ ID NO: 80、SEQ ID NO: 81、

SEQ ID NO: 82、SEQ ID NO: 83及SEQ ID NO: 84。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含：包含SEQ ID NO: 68之序列的VL及包含SEQ ID NO: 82之序列的VH。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含由SEQ ID NO: 68之序列組成的VL及由SEQ ID NO: 82之序列組成的VH。

「純系10.3抗體」(亦稱為「73combo3」或「MEDI9447」)為IgG1，其包含兩條SEQ ID NO: 68(包含三個CDR，CDR1、CDR2及CDR3，分別具有SEQ ID NO: 46、51及56之序列)的CD730010衍生之輕鏈(VL)及兩條SEQ ID NO: 82(包含三個CDR，CDR1、CDR2及CDR3，分別具有SEQ ID NO: 36、39及45之序列)的CD730010衍生之重鏈(VH)。

在某些態樣中，本文所揭示之抗-CD73抗體或其抗原結合片段以與包含SEQ ID NO: 82的10.3重鏈VH及SEQ ID NO: 68的10.3輕鏈VL之10.3抗體實質上相同或較好的親和力結合CD73。

(ii)CD730002衍生之抗-CD73抗體

在某些態樣中，本發明之抗-CD73抗體包含對CD730002抗體之輕鏈之CDR1及/或CDR2及/或CDR3的修飾，包括(但不限於)：

1)輕鏈CDR1，其包含序列SGDKVGDKYAS；及/或

2)輕鏈CDR2，其包含共同序列EDX₁₈KX₁₉X₂₀S，其中X₁₈表示胺基酸殘基絲胺酸(S)或蘇胺酸(T)，X₁₉表示胺基酸殘基精胺酸(R)或酪胺酸(Y)，且X₂₀表示胺基酸殘基組胺酸(H)、脯胺酸(P)或白胺酸(L)；及/或

3)輕鏈CDR3，其包含序列QAWDTSFWV。

在某些態樣中，本發明之抗-CD73抗體包含對CD730002之重鏈之CDR1及/或CDR2及/或CDR3的修飾，包括(但不限於)：

1)重鏈CDR1，其包含序列SX₂₁A X₂₂S，其中X₂₁表示胺基酸殘基

酪胺酸(Y)或纈胺酸(V)，且X₂₂表示胺基酸殘基甲硫胺酸(M)或精胺酸(R)；及/或

2)重鏈CDR2，其包含序列AISGSGGSX₂₃YY X₂₄DSVKX₂₅，其中X₂₃表示胺基酸殘基蘇胺酸(T)或脯胺酸(P)；X₂₄表示胺基酸殘基丙胺酸(A)或G(甘胺酸)；且X₂₅表示胺基酸殘基甘胺酸(G)或精胺酸(R)；及/或

3)重鏈CDR3，其包含序列DKGYWYM。

在一個態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL區，該VL區包含共同胺基酸序列：

[FW₉]SGDKVGDKYAS[FW₁₀]EDX₁₈KX₁₉X₂₀S[FW₁₁]QAWDTSFW
V[FW₁₂]

其中[FW₉]、[FW₁₀]、[FW₁₁]及[FW₁₂]分別表示VL構架區1(SEQ ID NO: 90或91)、VL構架區2(SEQ ID NO: 92)、VL構架區3(SEQ ID NO: 93、94或122)及VL構架區4(SEQ ID NO: 30)之胺基酸殘基；且其中X₁₈表示胺基酸殘基脯胺酸(P)或白胺酸(L)；X₁₉表示胺基酸殘基精胺酸(R)或酪胺酸(Y)；且X₂₀表示胺基酸殘基組胺酸(H)、脯胺酸(P)或白胺酸(L)。

在一個態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH區，該VH區包含共同胺基酸序列：

[FW₁₃]SX₂₁AX₂₂S[FW₁₄]AISGSGGSX₂₃YYX₂₄DSVKX₂₅[FW₁₅]DK
GYYWYM[FW₁₆]

其中[FW₁₃]、[FW₁₄]、[FW₁₅]及[FW₁₆]分別表示VH構架區1(SEQ ID NO: 31)、VH構架區2(SEQ ID NO: 32)、VH構架區3(SEQ ID NO: 33)及VH構架區4(SEQ ID NO: 89)之胺基酸殘基；且其中X₂₁表示胺基酸殘基酪胺酸(Y)或纈胺酸(V)；X₂₂表示胺基酸殘基甲硫胺酸(M)或精胺酸(R)；X₂₃表示胺基酸殘基蘇胺酸(T)或脯胺酸(P)；X₂₄表示胺基酸

殘基丙胺酸(A)或G(甘胺酸)；且X₂₅表示胺基酸殘基甘胺酸(G)或精胺酸(R)。

在一個態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL區，該VL區包含共同胺基酸序列：

[FW₉]SGDKVGDKYAS[FW₁₀]EDX₁₈KX₁₉X₂₀S[FW₁₁]QAWDTSFW
V[FW₁₂]

其中[FW₉]、[FW₁₀]、[FW₁₁]及[FW₁₂]分別表示VL構架區1(SEQ ID NO: 90或91)、VL構架區2(SEQ ID NO: 92)、VL構架區3(SEQ ID NO: 93、94或122)及VL構架區4(SEQ ID NO: 30)之胺基酸殘基；且其中X₁₈表示胺基酸殘基脯胺酸(P)或白胺酸(L)；X₁₉表示胺基酸殘基精胺酸(R)或酪胺酸(Y)；且X₂₀表示胺基酸殘基組胺酸(H)、脯胺酸(P)或白胺酸(L)，且其中抗-CD73抗體或其抗原結合片段進一步包含VH區，該VH區包含共同胺基酸序列：

[FW₁₃]SX₂₁AX₂₂S[FW₁₄]AISGSGGSX₂₃YYX₂₄DSVKX₂₅[FW₁₅]DK
GYYWYM[FW₁₆]

其中[FW₁₃]、[FW₁₄]、[FW₁₅]及[FW₁₆]分別表示VH構架區1(SEQ ID NO: 31)、VH構架區2(SEQ ID NO: 32)、VH構架區3(SEQ ID NO: 33)及VH構架區4(SEQ ID NO: 89)之胺基酸殘基；且其中X₂₁表示胺基酸殘基酪胺酸(Y)或纈胺酸(V)；X₂₂表示胺基酸殘基甲硫胺酸(M)或精胺酸(R)；X₂₃表示胺基酸殘基蘇胺酸(T)或脯胺酸(P)；X₂₄表示胺基酸殘基丙胺酸(A)或G(甘胺酸)；且X₂₅表示胺基酸殘基甘胺酸(G)或精胺酸(R)。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL-CDR1，其由以下組成：由SEQ ID NO: 97組成之序列。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL-CDR1，其包含由SEQ ID NO: 97組成之序列。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL-CDR2，其由選自由SEQ ID NO: 98、99、127、128及129組成之群的序列組成。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL-CDR2，其包含選自由SEQ ID NO: 98、99、127、128及129組成之群的序列。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL-CDR3，其由以下組成：由SEQ ID NO: 100組成之序列。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL-CDR3，其包含由SEQ ID NO: 100組成之序列。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH-CDR1，其由以下序列組成；選自由SEQ ID NO: 35、123及124組成之群的序列。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH-CDR1，其包含選自由SEQ ID NO: 35、123及124組成之群的序列。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH-CDR2，其由選自由SEQ ID NO: 37、95、125及126組成之群的序列組成。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH-CDR2，其包含選自由SEQ ID NO: 37、95、125及126組成之群的序列。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH-CDR3，其由以下組成：由SEQ ID NO: 96組成之序列。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH-CDR3，其包含由SEQ ID NO: 96組成之序列。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL-CDR1，其由以下組成：由SEQ ID NO: 97組成之序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL-CDR1，其包含由SEQ ID NO: 97組成之序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL-CDR2，

其由選自由SEQ ID NO: 98、99、127、128及129組成之群的序列組成，除了一、二、三或四個胺基酸取代。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL-CDR2，其包含選自由SEQ ID NO: 98、99、127、128及129組成之群的序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL-CDR3，其由以下組成：由SEQ ID NO: 100組成之序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL-CDR3，其包含由SEQ ID NO: 100組成之序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH-CDR1，其由以下序列組成；選自由SEQ ID NO: 35、123及124組成之群的序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH-CDR1，其包含選自由SEQ ID NO: 35、123及124組成之群的序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH-CDR2，其由選自由SEQ ID NO: 37、95、125及126組成之群的序列組成，除了一、二、三或四個胺基酸取代。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH-CDR2，其包含選自由SEQ ID NO: 37、95、125及126組成之群的序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH-CDR3，其由以下組成：由SEQ ID NO: 96組成之序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VH-CDR3，其包含由SEQ ID NO: 96組成之序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含：VL-

CDR1，其由以下組成：由SEQ ID NO: 97組成之序列；VL-CDR2，其由選自由SEQ ID NO: 98、99、127、128及129組成之群的序列組成；及VL-CDR3，其由以下組成：由SEQ ID NO: 100組成之序列。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含：VL-CDR1，其包含由SEQ ID NO: 97組成之序列；VL-CDR2，其包含選自由SEQ ID NO: 98、99、127、128及129組成之群的序列；及VL-CDR3，其包含由SEQ ID NO: 100組成之序列。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含：VH-CDR1，其由選自由SEQ ID NO: 35、123及124組成之群的序列組成；VH-CDR2，其由選自由SEQ ID NO: 37、95、125及126組成之群的序列組成；及VH-CDR3，其由以下組成：由SEQ ID NO: 96組成之序列。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含：VH-CDR1，其包含選自由SEQ ID NO: 35、123及124組成之群的序列；VH-CDR2，其包含選自由SEQ ID NO: 37、95、125及126組成之群的序列；VH-CDR3，其包含由SEQ ID NO: 96組成之序列。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含：VL-CDR1，其由以下組成：由SEQ ID NO: 97組成之序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代；VL-CDR2，其由選自由SEQ ID NO: 98、99、127、128及129組成之群的序列組成，除了一、二、三或四個胺基酸取代；及VL-CDR3，其由以下組成：由SEQ ID NO: 100組成之序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含：VL-CDR1，其包含由SEQ ID NO: 97組成之序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代；VL-CDR2，其包含選自由SEQ ID NO: 98、99、127、128及129組成之群的序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代；及VL-CDR3，其包含由SEQ ID NO: 100組成之序列，除了一、二、三或

四個胺基酸取代。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含：VH-CDR1，其由選自由SEQ ID NO: 35、123及124組成之群的序列組成，除了一、二、三或四個胺基酸取代；VH-CDR2，其由選自由SEQ ID NO: 37、95、125及126組成之群的序列組成，除了一、二、三或四個胺基酸取代；及VH-CDR3，其由以下組成：由SEQ ID NO: 96組成之序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含：VH-CDR1，其包含選自由SEQ ID NO: 35、123及124組成之群的序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代；VH-CDR2，其包含選自由SEQ ID NO: 37、95、125及126組成之群的序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代；VH-CDR3，其包含由SEQ ID NO: 96組成之序列，除了一、二、三或四個胺基酸取代。

在某些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含對重鏈及/或輕鏈之CDR1及/或CDR2及/或CDR3的修飾，且進一步包含對重鏈及/或輕鏈之FW1及/或FW2及/或FW3及/或FW4的修飾。

在一些態樣中，FW₉包含SEQ ID NO: 90或91，FW₁₀包含SEQ ID NO: 92，FW₁₁包含SEQ ID NO: 93、94或122，FW₁₂包含SEQ ID NO: 30，FW₁₃包含SEQ ID NO: 31，FW₁₄包含SEQ ID NO: 32，FW₁₅包含SEQ ID NO: 33，且FW₁₆包含SEQ ID NO: 89。

在一些態樣中，FW₉包含SEQ ID NO: 90或91，除了一、二、三或四個胺基酸取代；FW₁₀包含SEQ ID NO: 92，除了一、二、三或四個胺基酸取代；FW₁₁包含SEQ ID NO: 93、94或122，除了一、二、三或四個胺基酸取代；FW₁₂包含SEQ ID NO: 30，除了一、二、三或四個胺基酸取代；FW₁₃包含SEQ ID NO: 31，除了一、二、三或四個胺基酸取代；FW₁₄包含SEQ ID NO: 32，除了一、二、三或四個胺基酸

取代；FW₁₅包含SEQ ID NO: 33，除了一、二、三或四個胺基酸取代；且FW₁₆包含SEQ ID NO: 89。

在某些態樣中，抗-CD733抗體或其抗原結合片段包含VL及VH，該VL及該VH包含一致或除一或多個CDR中的一、二、三或四個胺基酸取代之外其他一致的VL-CDR1、VL-CRD2、VL-CDR3、VH-CDR1、VH-CDR2及VH-CDR3胺基酸序列，其中該VL-CDR1、VL-CRD2、VL-CDR3、VH-CDR1、VH-CDR2及VH-CDR3分別為：

SEQ ID NO: 97、98、100、35、37及96；或

SEQ ID NO: 97、99、100、35、95及96；或

SEQ ID NO: 97、98、100、35、37及96；或

SEQ ID NO: 97、99、100、123、37及96；或

SEQ ID NO: 97、99、100、124、37及96；或

SEQ ID NO: 97、99、100、35、125及96；或

SEQ ID NO: 97、99、100、35、126及96；或

SEQ ID NO: 97、99、100、35、95及96；或

SEQ ID NO: 97、127、100、35、95及96；或

SEQ ID NO: 97、128、100、35、95及96；或

SEQ ID NO: 97、129、100、35、95及96；或

SEQ ID NO: 97、99、100、35、95及96。

在某些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含抗體VL及抗體VH，其中該VL包含與選自由以下各者組成之群的參考胺基酸序列至少約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%一致的胺基酸序列：SEQ ID NO: 86、88、112、118、119、120及121。

在其他態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含抗體VL及抗體VH，其中該VH包含與選自由以下各者組成之群的參考胺基酸序列

至少約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%一致的胺基酸序列：SEQ ID NO: 85、87、111、113、114、115、116及117。

在其他態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL，該VL包含與選自由以下各者組成之群的參考胺基酸序列至少約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%一致的序列：SEQ ID NO: 86、88、112、118、119、120及121；且進一步包含VH，該VH包含與選自由以下各者組成之群的參考胺基酸序列至少約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%一致的序列：SEQ ID NO: 85、87、111、113、114、115、116及117。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含：包含SEQ ID NO: 88之序列的VL及包含SEQ ID NO: 87之序列的VH。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含由SEQ ID NO: 87之序列組成的VL及由SEQ ID NO: 87之序列組成的VH。

「純系2C5抗體」為IgG1，其包含兩條SEQ ID NO: 88(包含三個CDR，CDR1、CDR2及CDR3，分別具有SEQ ID NO: 97、99及100之序列)的CD730002衍生之輕鏈(VL)及SEQ ID NO: 87(包含三個CDR，CDR1、CDR2及CDR3，分別具有SEQ ID NO: 35、95及96之序列)的CD7300002衍生之重鏈(VH)。

在某些態樣中，本文所揭示之抗-CD73抗體或其抗原結合片段以與包含SEQ ID NO:87的2C5重鏈VH及SEQ ID NO: 88的2C5輕鏈VL之2C5抗體實質上相同或較好的親和力結合CD73。

(iii)具有除CD730002或CD730010以外的親本抗體之抗-CD73抗體

在其他態樣中，本文所揭示之抗-CD73抗體或抗原結合片段的親本抗體為CD730004(亦即包含SEQ ID NO: 104之VL及SEQ ID NO: 103

之VH的抗-CD73抗體)、CD730008(亦即包含SEQ ID NO: 106之VL及SEQ ID NO: 107之VH的抗-CD73抗體)、CD7300011(亦即包含SEQ ID NO: 5之VL及SEQ ID NO: 6之VH的抗-CD73抗體)、CD730021(亦即包含SEQ ID NO: 7之VL及SEQ ID NO: 8之VH的抗-CD73抗體)、CD730042(亦即包含SEQ ID NO: 9之VL及SEQ ID NO: 10之VH的抗-CD73抗體)、CD730046(亦即包含SEQ ID NO: 11之VL及SEQ ID NO: 12之VH的抗-CD73抗體)、CD730047(亦即包含SEQ ID NO: 13之VL及SEQ ID NO: 14之VH的抗-CD73抗體)、CD730068(亦即包含SEQ ID NO: 108之VL及SEQ ID NO: 107之VH的抗-CD73抗體)、或CD730069(亦即包含SEQ ID NO: 110之VL及SEQ ID NO: 109之VH的抗-CD73抗體)。親本抗體之修飾可包括相比於親本抗體(例如CD730004)在CDR區中及/或在FW區中之突變。

在某些態樣中，抗-CD73抗體包含對CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之輕鏈之CDR1及/或CDR2及/或CDR3的修飾。

在某些態樣中，抗-CD73抗體包含對CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之重鏈之CDR1及/或CDR2及/或CDR3的修飾。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含來自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VL-CDR1。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含來自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VL-CDR2。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含來自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、

CD730068或CD730069之VL-CDR3。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含來自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VH-CDR1。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含來自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VH-CDR2。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含來自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VH-CDR3。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含來自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VL-CDR1，除了一、二、三或四個胺基酸取代。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含來自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VL-CDR2，除了一、二、三或四個胺基酸取代。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含來自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VL-CDR3，除了一、二、三或四個胺基酸取代。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含來自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VH-CDR1，除了一、二、三或四個胺基酸取代。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含來自CD730004、CD730008、CD7300011、

CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068 或 CD730069之VH-CDR2，除了一、二、三或四個胺基酸取代。在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含來自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VH-CDR3，除了一、二、三或四個胺基酸取代。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含：來自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VL-CDR1；來自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VL-CDR2；及來自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VL-CDR3。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含：來自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VH-CDR1；來自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VH-CDR2；及來自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VH-CDR3。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含：來自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VL-CDR1，除了一、二、三或四個胺基酸取代；來自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VL-CDR2，除了一、二、三或四個胺基酸取

代；及來自 CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VL-CDR3，除了一、二、三或四個胺基酸取代。

在一些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含：來自 CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VH-CDR1，除了一、二、三或四個胺基酸取代；來自 CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VH-CDR2，除了一、二、三或四個胺基酸取代；及來自 CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VH-CDR3，除了一、二、三或四個胺基酸取代。

在某些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含對來自 CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之重鏈及/或輕鏈之CDR1及/或CDR2及/或CDR3的修飾，且進一步包含對來自 CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之重鏈及/或輕鏈之FW1及/或FW2及/或FW3及/或FW4的修飾。

在某些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL及VH，該VL及該VH包含一致或除一或多個CDR中的一、二、三或四個胺基酸取代之外其他一致的VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3、VH-CDR1、VH-CDR2及VH-CDR3胺基酸序列，其中該VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3、VH-CDR1、VH-CDR2及VH-CDR3係來自 CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069。

在某些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含抗體VL及抗體VH，其中該VL包含與選自以下各者之參考胺基酸序列至少約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%一致的胺基酸序列：來自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VL序列。

在其他態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含抗體VL及抗體VH，其中該VH包含與選自以下各者之參考胺基酸序列至少約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%一致的胺基酸序列：來自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VH序列。

在其他態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含VL，該VL包含與選自以下各者之參考胺基酸序列至少約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%一致的序列：來自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VL序列，且進一步包含VH，該VH包含與選自以下各者之參考胺基酸序列至少約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%一致的序列：來自CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069之VH序列。

在某些態樣中，本文所揭示之抗-CD73抗體或其抗原結合片段以與CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069抗體實質上相同或較好的親和力結合CD73。

(iv)經混合及匹配之抗-CD73抗體

本文所揭示之來自抗-CD73結合分子之VH及VL序列(例如CD730002、CD730004、CD730008、CD730010、CD730011、CD73021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068或CD730069)或該等序列之變異體的VH及VL(例如純系10 GL9、純系10 P32E、純系10 C1、純系10 C2、純系10 D3、純系10 G10、純系10 HPT、純系10 GRVE、純系10 combo1、純系10 combo2、純系10 combo3、純系10 combo5或純系combo6)可「經混合及匹配」,以形成其他抗-CD73結合分子。

在某些態樣中,10.3抗體及2C5抗體之VH序列經混合及匹配。在另一態樣中,10.03抗體及2C5抗體之VL序列可經混合及匹配。另外或替代地,本文所揭示之純系10(CD730010)變異體之VL及/或VH序列可經混合及匹配。另外或替代地,本文所揭示之純系2(CD730002)變異體的VL及/或VH序列可經混合及匹配。另外或替代地,本文所揭示之純系10(CD730010)及純系2(CD730002)變異體的VL及/或VH序列可經混合及匹配。

在一些態樣中,VL及/或VH混合及匹配可在自分組在相同抗原決定基組中之抗體衍生的序列之間進行(參見實例2)。如本文所用,術語「抗原決定基組」係指抗體或其抗原結合片段之分群,其結合相同抗原決定基或重疊抗原決定基,或彼此競爭結合相同抗原決定基或重疊抗原決定基。例如來自CD730003、CD730010、CD730021、CD730042、CD730046及CD730047之序列,其中屬於「抗原決定基組B」之全部抗體可在經匹配中混合。在其他態樣中,VL及/或VH混合及匹配可在自分組在不同抗原決定基組中之抗-CD73抗體衍生的序列之間進行。因此,來自屬於「抗原決定基組B」之抗體的序列可與來自「抗原決定基組A」(CD730002、CD730004、CD730008及

CD730011)或「抗原決定基組C」(CD730068及CD730069)中之抗-CD73抗體的序列混合及匹配。

(v)突變體抗-CD73抗體

在某些態樣中，本文所揭示之抗-CD73抗體(例如MEDI9447、純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段包含突變，該等突變改進結合於人類FcRn且改進抗-CD73抗體或其抗原結合片段之半衰期。在一些態樣中，該等突變為位置252中之甲硫胺酸(M)至酪胺酸(Y)突變、位置254中之絲胺酸(S)至蘇胺酸(T)突變以及位置256中之蘇胺酸(T)至麩胺酸(E)突變，根據如Kabat中之EU指數編號(Kabat等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 美國國家衛生研究院美國公共健康服務部, Washington, D.C.)，引入至IgG1之恆定域中。參見美國專利第7,658,921號，以引用的方式併入本文中。此類型突變體IgG(稱為「YTE突變體」)已展示出相比於相同抗體之野生型式呈現約四倍延長之半衰期(Dall'Acqua等人, J. Biol. Chem. 281:23514-24 (2006))。在一些態樣中，包含IgG恆定域之抗-CD73抗體或其抗原結合片段包含在位置251-257、285-290、308-314、385-389及428-436(根據如Kabat中之EU指數編號)處之胺基酸殘基的一或多個胺基酸取代，其中該等突變延長抗-CD73抗體或其抗原結合片段之血清半衰期。

在一些態樣中，YTE突變體進一步包含在IgG恆定域之位置434(根據如Kabat中之EU指數編號)處使用選自由色胺酸(W)、甲硫胺酸(M)、酪胺酸(Y)及絲胺酸(S)組成之群的胺基酸之取代。在其他態樣中，YTE突變體進一步包含在IgG恆定域之位置434(根據如Kabat中之EU指數編號)處使用選自由色胺酸(W)、甲硫胺酸(M)、酪胺酸(Y)及絲胺酸(S)組成之群的胺基酸之取代，及在IgG恆定域之位置428(根據如Kabat中之EU指數編號)處使用選自由蘇胺酸(T)、白胺酸(L)、苯

丙胺酸(F)及絲胺酸(S)組成之群的胺基酸之取代。

在又其他態樣中，YTE突變體進一步包含在IgG恆定域之位置434(根據如Kabat中之EU指數編號)處使用酪胺酸(Y)之取代，及在IgG恆定域之位置257(根據如Kabat中之EU指數編號)處使用白胺酸(L)之取代。在一些態樣中，YTE突變體進一步包含在IgG恆定域之位置434(根據如Kabat中之EU指數編號)處使用絲胺酸(S)之取代，及在IgG恆定域之位置428(根據如Kabat中之EU指數編號)處使用白胺酸(L)之取代。

在一特定態樣中，本文所揭示之抗-CD73抗體(例如MEDI9447、純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段包含IgG1恆定域，該IgG1恆定域包含在IgG1恆定域之位置252中甲硫胺酸(M)至酪胺酸(Y)突變、在位置254中絲胺酸(S)至蘇胺酸(T)突變，及在位置256中蘇胺酸(T)至麩胺酸(E)突變，根據如Kabat中之EU指數編號。

在某些態樣中，本文所揭示之抗-CD73抗體(例如MEDI9447、純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段包含至少一個選自由以下各者組成之群的IgG恆定域胺基酸取代：

(a)位置252處之胺基酸經酪胺酸(Y)、苯丙胺酸(F)、色胺酸(W)或蘇胺酸(T)取代；

(b)位置254處之胺基酸經蘇胺酸(T)取代；

(c)位置256處之胺基酸經絲胺酸(S)、精胺酸(R)、麩醯胺酸(Q)、麩胺酸(E)、天冬胺酸(D)或蘇胺酸(T)取代；

(d)位置257處之胺基酸經白胺酸(L)取代；

(e)位置309處之胺基酸經脯胺酸(P)取代；

(f)位置311處之胺基酸經絲胺酸(S)取代；

(g)位置428處之胺基酸經蘇胺酸(T)、白胺酸(L)、苯丙胺酸(F)或絲胺酸(S)取代；

(h)位置433處之胺基酸經精胺酸(R)、絲胺酸(S)、異白胺酸(I)、脯胺酸(P)或麩醯胺酸(Q)取代；

(i)位置434處之胺基酸經色胺酸(W)、甲硫胺酸(M)、絲胺酸(S)、組胺酸(H)、苯丙胺酸(F)或酪胺酸取代；及

(j)該等取代中之兩者或兩者以上之組合，

其中該等位置根據如Kabat中之EU指數編號，且其中經修飾之IgG與具有野生型IgG恆定域之IgG的血清半衰期相比具有延長的血清半衰期。

在一些態樣中，本文所揭示之抗-CD73抗體(例如MEDI9447、純系10.3抗體或純系2C5抗體)的VH及/或VL胺基酸序列或其抗原結合片段可與上述VH及VL序列85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相似，且包含1、2、3、4、5個或5個以上保守取代。VH及VL區分別與SEQ ID NO: 71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、87、111、113、114、115、116或117之VH區及/或SEQ ID NO: 57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、86、88、112、118、119、120或121之VL區具有較高(亦即80%或80%以上)序列相似性或序列一致性的CD73抗體可藉由以下方式獲得：對編碼SEQ ID NO: 57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120或121之核酸分子進行突變誘發(例如定點或PCR介導之突變誘發)，接著使用本文中描述之功能性分析針對所保留的功能測試經編碼經改變之抗體。

在一些態樣中，本文所揭示之抗-CD73抗體的Fc域或包含本文所揭示之抗體的CD73結合片段之融合蛋白的Fc域與Fc受體的結合減少，從而減少細胞毒性，例如經由ADCC。在一些態樣中，抗體或Fc

融合蛋白之Fc域與Fc受體之結合增加，從而增加細胞毒性，例如經由ADCC。在一些態樣中，抗體或Fc融合蛋白之Fc域包含在一或多個選自由以下各者組成之群的位置處的非天然產生的ADCC降低胺基酸殘基：234、235、236、237、238、239、240、241、243、244、245、247、251、252、254、255、256、262、263、264、265、266、267、269、279、280、284、292、296、297、298、299、305、313、316、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、339、341、343、370、373、378、392、416、419、421、440及443，如利用如Kabat中所列之EU指數編號。能夠降低抗體之ADCC活性的許多特定突變為此項技術中已知的且包括例如234F、235E、235F、235Q(或235Y)、239A、332Q、331S及其組合。舉例而言，參見美國專利第5,624,821號、第5,648,260號、第7,597,889號、第8,961,967號、第7,371,826號、第7,785,791號、第7,790,858號、美國專利公開案第20140378663號、第20130071390號、第20110212087號、第20150118227號、第20060194290號、第20060194291號、第20080274105號、第20080274506號、第US20130089541號及第US20130108623號中所述之突變，該等文獻以全文引用的方式併入本文中。效應功能ADCC降低之抗體亦包括具有Fc區殘基238、265、269、270、297、327及329中之一或多者之取代的抗體(參見例如美國專利第6,737,056號)。該等Fc突變體亦包括在胺基酸位置265、269、270、297及327中之兩者或兩者以上處具有取代的Fc突變體，包括殘基265及297取代成丙胺酸之Fc突變體(參見例如美國專利第7,332,581號)。視情況，可併入降低ADCC及CDC兩者之突變。在一些態樣中，包含降低或消除ADCC及/或CDC之突變的本文所揭示之抗-CD73抗體或其抗原結合片段可用於生成抗體藥物結合物(ADC)。

在一個態樣中，本發明提供一種抗-CD73抗體，其中抗體為

IgG1、IgG2或IgG3且在一或多個選自由234、235及331(如利用如Kabat中所列之EU指數編號)組成之群的位置處包含至少一種修飾。在再一特定態樣中，Fc區為IgG1、IgG2或IgG3 Fc區，且非天然產生之胺基酸係選自由以下各者組成之群：234F、235E、235F、235Q(或235Y)、239A、332Q、331S、332Q，如利用如Kabat中所列之EU指數編號。

在另一態樣中，本發明提供一種抗-CD73抗體，其中抗體為IgG4且在一或多個選自由228及235(如利用如Kabat中所列之EU指數編號)組成之群的位置處包含至少一種修飾。在再一特定態樣中，Fc區為IgG4 Fc區，且非天然存在之胺基酸係選自由228P、235E及235Y(如利用如Kabat中所列之EU指數編號)組成之群。在特定態樣中，本發明提供一種抗-CD73抗體，其中抗體為IgG1、IgG2或IgG3，且在以下位置處包含修飾：(i)234F、235E及331S；(ii)234F、235F及331S；(iii)234F、235Q及322Q。在另一特定態樣中，本發明提供一種抗-CD73抗體，其中抗體為IgG4，且包含修飾228P及235E。

III. 抗原決定基競爭性CD73結合分子

在另一態樣中，本發明提供CD73結合分子，其結合於與本文中描述之各種抗-CD73抗體所結合相同的抗原決定基，例如結合於與MEDI9447、純系10.3抗體相同的抗原決定基、或與純系2C5抗體相同的抗原決定基之分子。

該等抗體可基於其在標準CD73結合分析(例如流式細胞測量術分析、表面電漿子共振或溶液分析)中與本文所揭示之抗-CD73抗體(諸如CD730010抗體、CD730002抗體、CD730004抗體及其抗原結合片段)交叉競爭(例如以統計學上顯著之方式競爭性地抑制結合)的能力鑑別。

因此，在一個態樣中，本發明提供抗-CD73抗體及其抗原結合片

段(例如人類單株抗體)，其與另一抗-CD73抗體或其抗原結合片段(諸如CD730010抗體、CD730002抗體、CD730004抗體、其變異體(例如MEDI9447、純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段)競爭結合於CD73。測試抗體抑制例如CD730010抗體(或純系10.3抗體或其抗原結合片段)或CD730002抗體(或純系2C5抗體或其抗原結合片段)之結合的能力展示出，測試抗體可與該抗體競爭結合於CD73；根據非限制性理論，該抗體可結合於CD73上與和其競爭之抗-CD73抗體或其抗原結合片段相同或相關(例如結構上相似或空間上接近)的抗原決定基。在一個態樣中，結合於CD73上與例如CD730010抗體(或純系10.3抗體或其抗原結合片段)或CD730002抗體(或純系2C5抗體或其抗原結合片段)相同的抗原決定基之抗-CD73抗體或其抗原結合片段為人類單株抗體。

如本文所述，直接抑制CD73之酶活性的MEDI9447(單株抗體)之抗原決定基經鑑別，以闡明MEDI9447之作用機制。抗原決定基存在於CD73之N端域的頂部表面(遠離受質結合及活性位點殘基的區域)。結構及機制研究展現出，MEDI9447經由防止CD73採用催化活性構形之雙重機制拮抗-CD73。此等結果提供關於精細映射之抗原決定基的首次報導，該抗原決定基可經靶向以達成CD73之選擇性、強力及非競爭性抑制，作為調節腫瘤微環境中之腺苷信號傳導的方式。

使用氫-氘交換(HDX)質譜(MS)及突變誘發策略，吾人定義MEDI9447之抗原決定基且檢查抗體結合對整體CD73結構之潛在作用。抗體結合於會實現AMP水解之非競爭性抑制的CD73之N端域中的位點。在各種態樣中，抗原決定基包含一或多個對應於V144、K180及N185之CD73胺基酸殘基。在各種態樣中，抗原決定基另外包含一或多個對應於CD73之Y135、K136及N187的CD73胺基酸殘基。值得注意地，抗原決定基經置放使得抗體結合阻礙CD73自開放構形

轉化成催化活性的關閉構像。此外，吾人之研究展示出，MEDI9447可經由利用與CD73相互作用之抗體價數介導之抑制的雙重機制抑制錨定及可溶CD73兩者。

IV. 抗-CD73抗體之功能特徵

抗體針對抗原的親和力或親合力可以實驗方式，使用此項技術中熟知的任何適合方法測定，例如流式細胞術、酶聯免疫吸附分析(ELISA)，或放射免疫分析(RIA)，或動力學(例如BIACORE™分析)。可容易使用直接結合分析以及競爭性結合分析形式。(參見例如Berzofsky等人，「Antibody-Antigen Interactions」，於Fundamental Immunology, Paul, W. E.編，Raven Press: New York, N.Y. (1984)；Kuby, Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, N.Y. (1992)；及其中描述之方法。若在不同條件(例如鹽濃度、pH、溫度)下量測，則特定抗體-抗原相互作用之所量測之親和力可變化。因此，親和力及其他抗原結合參數(例如 K_D 或 K_d 、 K_{on} 、 K_{off})用抗體及抗原之標準化溶液及如此項技術中已知的標準化緩衝液及諸如本文所述之緩衝液進行量測。

此項技術中亦已知，使用表面電漿子共振分析(例如BIACORE™)量測之親和力可視反應物中之哪一者結合於晶片而變化。就此而言，親和力可使用其中靶向抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)固定至晶片上之形式(稱為「IgG向下」形式)或使用其中目標蛋白(例如CD73)固定至晶片上之形式(稱為例如「CD73向下」形式)量測。

在本發明之一個態樣中，抗-CD73抗體(例如MEDI9447、純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段以小於 10^{-6} M、或小於 10^{-7} M、或小於 10^{-8} M、或小於 10^{-9} M、或小於 10^{-10} M、或小於 10^{-11} M、或小於 10^{-12} M、或小於 10^{-13} M的解離常數或 $k_d(k_{off}/k_{on})$ 專一性結合CD73及/或其抗原片段。

在另一態樣中，抗-CD73抗體(例如MEDI9447、純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段以小於 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、或小於 $2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 之 K_{off} 結合於CD73及/或其抗原片段。在其他態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段以小於 10^{-3} s^{-1} 、小於 $5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、小於 10^{-4} s^{-1} 、小於 $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、小於 10^{-5} s^{-1} 、小於 $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 、小於 10^{-6} s^{-1} 、小於 $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 、小於小於 $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 、小於 10^{-8} s^{-1} 、小於 $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ 、小於 10^{-9} s^{-1} 、小於 $5 \times 10^{-9} \text{ s}^{-1}$ 、或小於 10^{-10} s^{-1} 的 K_{off} 結合於CD73及其抗原片段。

在另一態樣中，抗-CD73抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段以至少 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、至少 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、至少 $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、或至少 $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、或至少 $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 的締合速率常數或 k_{on} 速率結合於CD73及/或其抗原片段。

在一些態樣中，抗-CD73抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段以至少約60 pM、至少約70 pM、至少約80 pM、至少約90 pM、至少約100 pM、至少約110 pM、至少約120 pM、至少約130 pM、至少約140 pM、至少約150 pM、至少約160 pM、或至少約170 pM的 K_{D} 結合於MB-MDA-231細胞之表面上的CD73，如利用流式細胞測量術所量測。在一個特定態樣中，抗-CD73抗體為純系10.3抗體，且其以約150 pM的 K_{D} 結合於MB-MDA-231細胞之表面上的CD73，如利用流式細胞測量術所量測。在另一特定態樣中，抗-CD73抗體為純系2C5抗體，且其以約80 pM的 K_{D} 結合於MB-MDA-231細胞之表面上的CD73，如利用流式細胞測量術所量測。

在一些態樣中，抗-CD73抗體(例如MEDI9447、純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段以至少約40 pM、至少約50 pM、至少約60 pM、至少約70 pM、至少約80 pM、至少約90 pM、至少約100 pM、至少約120 pM、或至少約130 pM的 K_{D} 結合於鼠類3T1細胞之表

面上的CD73，如利用流式細胞測量術所量測。在一個特定態樣中，抗-CD73抗體為純系10.3抗體，且其以約110 pM的 K_D 結合於鼠類3T1細胞之表面上的CD73，如利用流式細胞測量術所量測。在另一特定態樣中，抗-CD73抗體為純系2C5抗體，且其以約55 pM的 K_D 結合於鼠類3T1細胞之表面上的CD73，如利用流式細胞測量術所量測。

在一些態樣中，抗-CD73抗體(例如MEDI9447、純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段以至少約40 pM、至少約50 pM、至少約60 pM、至少約70 pM、至少約80 pM、至少約90 pM、或至少約100 pM的 K_D 結合於食蟹獼猴MK-1細胞之表面上的CD73，如利用流式細胞測量術所量測。在一個特定態樣中，抗-CD73抗體為純系10.3抗體，且其以約80 pM的 K_D 結合於食蟹獼猴MK-1細胞之表面上的CD73，如利用流式細胞測量術所量測。在另一特定態樣中，抗-CD73抗體為純系2C5抗體，且其以約60 pM的 K_D 結合於食蟹獼猴MK-1細胞之表面上的CD73，如利用流式細胞測量術所量測。

在一些態樣中，抗-CD73抗體(例如MEDI9447、純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段以至少約3 pM、至少約4 pM、至少約5 pM、至少約6 pM、至少約7 pM、至少約8 pM、至少約9 pM、或至少約10 pM的 K_D 結合於人類CD73，如利用表面電漿子共振(PROTEON®)所量測。在一個特定態樣中，抗-CD73抗體為純系10.3抗體，且其以約4 pM的 K_D 結合於人類CD73，如利用表面電漿子共振(PROTEON®)所量測。在另一特定態樣中，抗-CD73抗體為純系2C5抗體，且其以約9 pM的 K_D 結合於人類CD73，如利用表面電漿子共振(PROTEON®)所量測。

在一些態樣中，本文所揭示之抗-CD73抗體(例如MEDI9447、純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段以至少約1 pM、至少約2 pM、至少約3 pM、至少約4 pM、至少約5 pM、至少約6 pM、至少

約7 pM、至少約8 pM、至少約9 pM、至少約10 pM、至少約11 pM、至少約12 pM、至少約13 pM、至少約14 pM、至少約15 pM、至少約16 pM、至少約17 pM、至少約18 pM、至少約19 pM、至少約20 pM、至少約21 pM、至少約22 pM、至少約23 pM、至少約24 pM、或至少約25 pM的 K_D 結合於鼠類CD73，如利用表面電漿子共振(PROTEON®)所量測。在一個特定態樣中，抗-CD73抗體為純系10.3抗體，且其以約1 pM的 K_D 結合於鼠類CD73，如利用表面電漿子共振(PROTEON®)所量測。在另一特定態樣中，抗-CD73抗體為純系2C5抗體，且其以約22 pM的 K_D 結合於鼠類CD73，如利用表面電漿子共振(PROTEON®)所量測。

在一些態樣中，抗-CD73抗體(例如MEDI9447、純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段以至少約3 pM、至少約4 pM、至少約5 pM、至少約6 pM、至少約7 pM、至少約8 pM、至少約9 pM、或至少約10 pM的 K_D 結合於食蟹獼猴CD73，如利用表面電漿子共振(PROTEON®)所量測。在一個特定態樣中，抗-CD73抗體為純系10.3抗體，且其以約7 pM的 K_D 結合於食蟹獼猴CD73，如利用SPR(Proteon)所量測。在另一特定態樣中，抗-CD73抗體為純系2C5抗體，且其以約9 pM的 K_D 結合於食蟹獼猴CD73，如利用表面電漿子共振(PROTEON®)所量測。

在一些態樣中，抗-CD73抗體(例如MEDI9447、純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段以至少約40 pM、至少約50 pM、至少約60 pM、至少約70 pM、至少約80 pM、至少約90 pM、至少約100 pM、或至少約110 pM的 K_D 結合於人類CD73，如利用溶液結合所量測。在一個特定態樣中，抗-CD73抗體為純系10.3抗體，且其以約80 pM的 K_D 結合於人類CD73，如利用溶液結合所量測。在另一特定態樣中，抗-CD73抗體為純系2C5抗體，且其以約80 pM的 K_D 結合於人類

CD73，如利用溶液結合所量測。

在一些態樣中，抗-CD73抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段以至少約100 pM、至少約200 pM、至少約300 pM、至少約400 pM、至少約500 pM、至少約600 pM、至少約700 pM、至少約800 pM、至少約900 pM、至少約1000 pM、至少約1100 pM、至少約1200 pM、至少約1300 pM、至少約1400 pM、至少約1500 pM、至少約1600 pM、至少約、或至少約1700 pM的 K_D 結合於鼠類CD73，如利用溶液結合所量測。在一個特定態樣中，抗-CD73抗體為純系10.3抗體，且其以約130 pM的 K_D 結合於鼠類CD73，如利用溶液結合所量測。在另一特定態樣中，抗-CD73抗體為純系2C5抗體，且其以約1500 pM的 K_D 結合於鼠類CD73，如利用溶液結合所量測。

在一些態樣中，抗-CD73抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段以至少約60 pM、至少約70 pM、至少約80 pM、至少約90 pM、至少約100 pM、至少約110 pM、或至少約120 pM的 K_D 結合於食蟹獼猴CD73，如利用溶液結合所量測。在一個特定態樣中，抗-CD73抗體為純系10.3抗體，且其以約90 pM的 K_D 結合於食蟹獼猴CD73，如利用溶液結合所量測。在另一特定態樣中，抗-CD73抗體為純系2C5抗體，且其以約100 pM的 K_D 結合於食蟹獼猴CD73，如利用溶液結合所量測。在具體態樣中，MEDI9447以約 1×10^{-12} 、 5×10^{-12} 、 10×10^{-12} 、 100×10^{-12} 或 150×10^{-12} 的 K_D 結合CD73。

在一些態樣中，本文所揭示之CD73結合分子(例如抗-CD73抗體(例如MEDI9447、純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段)可減輕T細胞分裂之AMP介導的抑制。在其他態樣中，本文所揭示之CD73結合分子(例如抗-CD73抗體(例如MEDI9447、純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段)可解救 T_{reg} 的ATP誘導之 T_{eff} 抑制。

在一些態樣中，本文所揭示之CD73結合分子(例如抗-CD73抗體

或其抗原結合片段(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段)可顯著抑制同基因型腫瘤生長。在一個態樣中，腫瘤為非小細胞肺腫瘤、卵巢腫瘤、乳房腫瘤、頭頸腫瘤、胰臟腫瘤、結腸直腸癌腫瘤、黑素瘤腫瘤、淋巴瘤腫瘤。在一個態樣中，腫瘤為CT26小鼠同基因型CRC腫瘤、B16F10黑素瘤腫瘤、EG7-OVA淋巴瘤腫瘤或LL2(路易斯肺(Lewis Lung))腫瘤。在一些態樣中，CD73結合分子，例如本文所揭示之抗-CD73抗體或其抗原結合片段(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)可顯著抑制腫瘤生長，其中該腫瘤對使用抗-PD-1及/或抗-PD-L1及/或抗-PD-L2及/或抗-CTLA-4抗體之療法無反應。在一些態樣中，本文所揭示之CD73結合分子，例如抗-CD73抗體或其抗原結合片段(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)當以約1 mg/kg、約2 mg/kg、約3 mg/kg、約4 mg/kg、約5 mg/kg、約6 mg/kg、約7 mg/kg、約8 mg/kg、約9 mg/kg或約10 mg/kg的濃度投與時可顯著抑制腫瘤生長。

在一些態樣中，本文所揭示之CD73結合分子，例如抗-CD73抗體或其抗原結合片段(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)可在結合於細胞之後內化。在一些態樣中，CD73結合分子為抗體藥結合物(ADC)。

V. 製備抗-CD73抗體及抗原結合片段

單株抗-CD73抗體(例如MEDI9447、純系10.3抗體或純系2C5抗體)及其抗原結合片段可使用融合瘤方法(諸如由Kohler及Milstein (1975) *Nature* 256:495所述之方法)製備。使用融合瘤方法，如上所述使小鼠、倉鼠或其他適當宿主動物免疫以引發淋巴細胞產生將專一性結合於免疫抗原之抗體。淋巴細胞亦可在活體外免疫。免疫接種之後，將淋巴細胞分離且使用例如聚乙二醇將其與適合骨髓瘤細胞株融合以形成融合瘤細胞，接著可選擇而與不融合淋巴細胞及骨髓瘤細胞

分離。如利用免疫沈澱、免疫墨點法或利用活體外結合分析(例如放射免疫分析(RIA)；酶聯免疫吸附分析法(ELISA))所測定，產生專一性靶向所選抗原之單株抗體的融合瘤接著可在活體外培養物中使用標準方法(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986)或在動物活體內作為腹水腫瘤增殖。單株抗體接著可如上文針對多株抗體所述自培養基或腹水純化。

或者，抗-CD73單株抗體(例如MEDI9447、純系10.3抗體或純系2C5抗體)及其抗原結合片段亦可使用如例如美國專利第4,816,567號中所述之重組DNA方法製得。自成熟B細胞或融合瘤細胞中分離編碼單株抗體的聚核苷酸，諸如使用專一性擴增編碼抗體重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸引子進行RT-PCR來分離，且使用習知程序測定其序列。接著將編碼重鏈及輕鏈之經分離聚核苷酸選殖至適合表現載體中，當轉染至宿主細胞(諸如大腸桿菌(*E. coli*)細胞、猿猴COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞)中(否則不產生免疫球蛋白)時，宿主細胞產生單株抗體。此外，所需物種之重組抗-CD73單株抗體或其抗原結合片段可自如描述的表現所需物種之CDR的噬菌體呈現文庫分離(McCafferty等人, 1990, *Nature*, 348:552-554；Clarkson等人, 1991, *Nature*, 352:624-628；及Marks等人, 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597)。

編碼抗-CD73抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段之聚核苷酸可以許多不同方式使用重組DNA技術進一步修飾以生成替代抗體。在一些態樣中，例如小鼠單株抗體之輕鏈及重鏈之恆定域可取代(1)例如人類抗體之彼等區域以產生嵌合抗體或(2)非免疫球蛋白多肽以產生融合抗體。在一些態樣中，恆定區截短或移除以產生單株抗體之所需抗體片段。對可變區進行的定點或高密度突變誘發可用於最佳化單株抗體之專一性、親和力等。

在某些態樣中，抗-CD73抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段為人類抗體或其抗原結合片段。人類抗體可使用此項技術中已知之各種技術直接製備。可產生在活體外免疫接種或自產生針對目標抗原之抗體之免疫個體分離的永生化人類B淋巴細胞(參見例如Cole等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 第77頁 (1985); Boemer等人, 1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95; 及美國專利5,750,373)。

此外，抗-CD73人類抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段可選自噬菌體文庫，其中該噬菌體文庫表現人類抗體，如例如Vaughan等人, 1996, *Nat. Biotech.*, 14:309-314, Sheets等人, 1998, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.*, 95:6157-6162, Hoogenboom及Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381, 及Marks等人, 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581)中所述。用於產生及使用抗體噬菌體文庫之技術亦描述於美國專利第5,969,108號、第6,172,197號、第5,885,793號、第6,521,404號、第6,544,731號、第6,555,313號、第6,582,915號、第6,593,081號、第6,300,064號、第6,653,068號、第6,706,484號及第7,264,963號；及Rothe等人, 2007, *J. Mol. Bio.*, doi:10.1016/j.jmb.2007.12.018(其各自以全文引用的方式併入本文中)。

親和力成熟策略及鏈改組策略(Marks等人, 1992, *Bio/Technology* 10:779-783, 該文獻以全文引用的方式併入本文中)在此項技術中已知且可用以產生高親和力人類抗體或其抗原結合片段。

在一些態樣中，抗-CD73單株抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)可為人類化抗體。亦可使用對非人類或人類抗體進行工程改造、人類化或重塑的方法且在此項技術中已熟知。經人類化、重塑或經類似工程改造之抗體可具有一或多個來自非人類來源(例如(但不限於)小鼠、大鼠、兔、非人類靈長類動物或其他哺乳動物)之胺基酸殘

基。此等非人類胺基酸殘基經通常稱為「輸入」殘基之殘基置換，該等殘基通常取自已知人類序列之「輸入」可變域、恆定域或其他域。如此項技術中所知，此類輸入序列可用於降低免疫原性或減少、增強或修改結合、親和力、結合速率、解離速率、親合力、專一性、半衰期或任何其他適合特徵。一般而言，CDR殘基直接且最實質上與影響CD73結合有關。從而維持非人類或人類CDR序列的一部分或全部，而可變區及恆定區之非人類序列可經人類或其他胺基酸置換。

抗體視情況亦可為經人類化、重塑、工程改造的抗體或人類抗體，其經工程改造而保持針對CD73抗原的高親和力及其他有利生物特性。為實現此目標，人類化(或人類)或工程改造之抗-CD73抗體及重修表面抗體可視情況藉由使用親本、工程改造及人類化序列之三維模型分析親本序列及各種概念人類化及工程改造產物的方法製備。三維免疫球蛋白模型通常可獲得，且為熟習此項技術者所熟悉。可利用說明且顯示所選候選免疫球蛋白序列之可能三維構形結構的電腦程式。檢查此等顯示可分析殘基在候選免疫球蛋白序列之功能中的可能作用，亦即分析影響候選免疫球蛋白結合其抗原(諸如CD73)之能力的殘基。以此方式，可自共同序列及輸入序列選擇構架(FW)殘基且加以組合，以便達成所需抗體特徵，諸如對目標抗原之親和力增強。

抗-CD73抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段可使用任何已知的方法進行人類化、重塑或工程改造，諸如(但不限於)以下文獻中所述的方法：Jones等人，*Nature* 321:522 (1986)；Riechmann等人，*Nature* 332:323 (1988)；Verhoeyen等人，*Science* 239:1534 (1988)；Sims等人，*J. Immunol.* 151: 2296 (1993)；Chothia及Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987)；Carter等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:4285 (1992)；Presta等人，*J. Immunol.* 151:2623 (1993)；美國專利第5,639,641號、第5,723,323號、第5,976,862號、第

5,824,514 號、第 5,817,483 號、第 5,814,476 號、第 5,763,192 號、第 5,723,323 號、第 5,766,886 號、第 5,714,352 號、第 5,955,358 號、第 6,204,023 號、第 6,180,370 號、第 6,331,431 號、第 5,693,762 號、第 5,530,101 號、第 5,585,089 號、第 5,225,539 號、第 4,816,567 號、第 5,969,108 號、第 7,635,666 號、第 7,723,270 號、第 7,557,189 號、第 7,538,195 及第 7,342,110 號；國際申請案第 PCT/US98/16280 號、第 PCT/US91/05939 號、第 PCT/US94/01234 號、第 PCT/GB92/01755 號；國際專利申請公開案第 WO90/14443 號、第 WO90/14424 號、第 WO90/14430 號；及歐洲專利公開案第 EP 229246 號，各文獻以引用的方式完全併入本文中，包括其中所引用之參考文獻。

抗-CD73 人類化抗體及其抗原結合片段亦可於含有人類免疫球蛋白基因座的轉殖基因小鼠中產生，該等轉殖基因小鼠能夠在免疫接種後、在缺乏內源性免疫球蛋白產生的情況下產生人類抗體之完全譜系。此方法描述於美國專利第 5,545,807 號、第 5,545,806 號、第 5,569,825 號、第 5,625,126 號、第 5,633,425 號及第 5,661,016 號中。

在某些態樣中，提供抗-CD73 抗體片段(例如來自純系 10.3 抗體或來自純系 2C5 抗體之片段)。已知用於產生抗體片段的多種技術。傳統上，此等片段來源於完整抗體之蛋白分解消化(例如 Morimoto 等人, 1993, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117; Brennan 等人, 1985, *Science*, 229:81)。在某些實施例中，抗-CD73 抗體片段係以重組方式產生。Fab、Fv 及 scFv 抗體片段均可在大腸桿菌或其他宿主細胞中表現且自其中分泌，由此允許產生大量此等片段。此類抗-CD73 抗體片段亦可自上文所論述之抗體噬菌體文庫分離。抗-CD73 抗體片段亦可為線性抗體，如美國專利第 5,641,870 號中所述。產生抗體片段的其他技術(例如化學合成)對於熟習此項技術者而言將為顯而易見的。

根據本發明，可調適用於產生專一性針對CD73之單鏈抗體的技術(參見例如美國專利第4,946,778號)。另外，可調適用於構築Fab表現文庫的方法(參見例如Huse等人, *Science* 246:1275-1281 (1989))，以便快速且有效地鑑別對CD73具有所需專一性的單株Fab片段，或其衍生物、片段、類似物或同源物。抗體片段可利用此項技術中之技術產生，包括(但不限於)：(a)F(ab')₂片段，藉由胃蛋白酶消化抗體分子而產生；(b)Fab片段，藉由還原F(ab')₂片段之二硫橋鍵產生；(c)Fab片段，藉由用木瓜蛋白酶及還原劑處理抗體分子而產生；及(d)Fv片段。

本文所揭示之抗-CD73抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段可經修飾以便延長其血清半衰期。此可如下達成：例如，藉由使抗體或抗體片段中之適當區域突變而將救助受體結合性抗原決定基併入抗體或抗體片段中；或將抗原決定基併入肽標記中，接著在任一端或在中部與抗體或抗體片段融合(例如藉由DNA或肽合成)；或YTE突變。延長抗體或其抗原結合片段之血清半衰期的其他方法(例如與諸如PEG之異質分子結合)在此項技術中已知。

異結合物抗-CD73抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)及其抗原結合片段亦屬於本發明範疇內。異結合抗體由兩個共價接合抗體構成。已提出例如使免疫細胞靶向非所需細胞的此類抗體(參見例如美國專利第4,676,980號)。預期異結合物抗-CD73抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)及其抗原結合片段可使用已知的合成蛋白質化學方法(包括涉及交聯劑的彼等方法)活體外製備。舉例而言，免疫毒素可使用二硫化物交換反應或藉由形成硫醚鍵來構築。出於此目的之適合試劑之實例包括亞胺基硫醇酯及4-巰基丁醯亞胺甲酯。

在某些態樣中，本文所揭示之CD73結合分子，例如抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段可與其他治療劑(例如

呈組合療法)組合或其可稠合(例如基因融合，以形成融合蛋白)或結合(例如化學或酶結合)於至少一種異源部分。因此，本文所揭示之CD73結合分子，其可融合或結合於其他治療劑或毒素以形成免疫結合物及/或融合蛋白。本發明亦提供抗體-藥物結合物(ADC)，其包含已經衍生或連接(例如以化學方式或以重組方式)於另一分子(例如肽、小藥物分子、可偵測分子等)的本文所揭示之CD73結合分子中之至少一者。一般而言，抗-CD73抗體或其部分經衍生，使得其CD73結合未受衍生或標記不利地影響。因此，本發明之抗-CD73抗體及抗體部分意欲包括本文所描述之抗-CD73結合分子的完整與經修飾之形式。舉例而言，本文所揭示之抗-CD73結合分子或其CD73結合部分可在功能上連接(藉由化學偶合、基因融合、非共價締合或以其他方式)於一或多種其他分子實體，諸如細胞毒性劑、醫藥劑、偵測劑及/或可介導抗-CD73結合分子與另一分子之締合的蛋白質或肽(諸如抗生蛋白鏈菌素核心區域或聚組胺酸標記)。

一種類型衍生分子可藉由將兩種或兩種以上分子實體，例如本文所揭示之抗-CD73結合分子與治療劑(例如細胞毒素，諸如妥布賴森(tubulysin)或MEDI1508)交聯來產生。適合交聯劑包括異源雙官能交聯劑，亦即具有經適當間隔基分離之兩個不同反應性基團的交聯劑(例如間順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基丁二醯亞胺酯)；或同源雙官能交聯劑(例如辛二酸雙丁二醯亞胺酯)。此類交聯劑可購自例如Pierce Chemical Company, Rockford, IL。其他雙官能偶合劑包括N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(SPDP)、丁二醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺甲基)環己烷-1-甲酸酯、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、亞胺酯之雙官能衍生物(諸如己二酸二甲酯HCL)、活性酯(諸如辛二酸雙丁二醯亞胺基酯)、醛(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮苯甲醯基)己二胺)、雙重氮衍生物(諸如雙-(對重氮苯甲醯基)-乙二

胺)、二異氰酸酯(諸如2,6-二異氰酸仲苯甲酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。

另一類型衍生化分子可藉由併入可偵測標記來產生。適用之偵測試劑包括螢光化合物(例如螢光素、異硫氰酸螢光素、若丹明(rhodamine)、5-二甲胺-L-萘磺醯氯、藻紅素、鑷系元素磷光體及其類似物)、適用於偵測之酶(例如辣根過氧化酶、 β -半乳糖、螢光素酶、鹼性磷酸酶、葡萄糖氧化酶及其類似物)、藉由二級報導體識別之抗原決定基(例如白胺酸拉鏈對序列、二級抗體之結合位點、金屬結合域、抗原決定基標記等)。在一些態樣中,可偵測標記可由至少一個間隔臂附接。間隔臂可為各種長度以降低潛在位阻。

本文所揭示之抗-CD73結合分子亦可用放射性標記之胺基酸標記。放射性標記可用於診斷與治療之目的。舉例而言,放射性標記可用於藉由X射線或諸如正電子發射斷層攝影法(PET)之其他診斷技術偵測表現CD73之細胞。

此外,放射性標記可在治療上用作表現CD73之細胞的毒素,諸如引起不需要之免疫反應者。用於多肽之標記之實例包括(但不限於)以下放射性同位素或放射性核素: ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 及 ^{131}I 。在一些態樣中,抗-CD73結合分子可經在成像時可偵測之順磁、放射性或螢光離子標記。在一些態樣中,順磁離子為鉻(III)、錳(II)、鐵(III)、鐵(II)、鈷(II)、鎳(II)、銅(II)、釷(III)、釷(III)、鐳(III)、釷(III)、釷(II)、錒(III)、鐳(III)、釷(III)或鉍(III)。在其他態樣中,放射性離子為碘-123、鎳-99、銻-111、銻-188、銻-186、銅-67、碘-131、釷-90、碘-125、砒-211及鎵-67。在其他態樣中,抗-CD73結合分子經諸如鑷(III)、金(III)、鉛(II)及鉍(III)之X射線顯影劑標記。本文所揭示之抗-CD73結合分子亦可用例如聚合物(諸如聚乙二醇(PEG))、甲基、乙基或碳水化合物基團之化學基團衍生。此

等基團適用於改善抗體之生物特徵，例如延長血清半衰期或增加組織結合。

如本文所用，術語「細胞毒性劑」廣泛定義且係指抑制或防止細胞功能及/或導致細胞破壞(細胞死亡)，及/或發揮抗贅生性/抗增生作用之物質。舉例而言，細胞毒性劑可直接或間接防止贅生性腫瘤細胞發育、成熟或擴散。該術語亦包括僅產生細胞生長抑制作用且並非單純的細胞毒性作用的此類藥劑。該術語包括如下文所說明之化學治療劑以及其他CD73拮抗劑、抗血管生成劑、酪胺酸激酶抑制劑、蛋白激酶A抑制劑、細胞激素家族之成員、放射性同位素及毒素(諸如細菌、真菌、植物或動物來源之酶活性毒素)。

術語「化學治療劑」為包含天然或合成化合物之術語「細胞毒性劑」之子組。化學治療劑之實例包括烷基化劑，例如氮芥、伸乙亞胺化合物、烷基磺酸酯及具有烷基化作用之其他化合物(諸如亞硝基脲、順鉑及達卡巴嗪(dacarbazine))；抗代謝物，例如葉酸、嘌呤或嘧啶拮抗劑；有絲分裂抑制劑，例如長春花生物鹼(Vinca alkaloids)及鬼臼毒素之衍生物；細胞毒性抗生素及喜樹鹼衍生物。其他化學治療劑為阿米福汀(amifostine)(ETHYOL®)、順鉑、達卡巴嗪(DTIC)、放線菌素 d (dactinomycin)、二氯甲二乙胺(氮芥)、鏈脲菌素(streptozocin)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、卡莫司汀(carrnustine)(BCNU)、洛莫司汀(lomustine)(CCNU)、小紅莓(doxorubicin)(ADRIAMYCIN®)、小紅莓脂體(DOXIL®)、吉西他濱(gemcitabine)(GEMZAR®)、道諾黴素(daunorubicin)、道諾黴素脂體(DAUNOXOME®)、丙卡巴肼(procarbazine)、絲裂黴素(mitomycin)、阿糖胞苷(cytarabine)、依託泊苷(etoposide)、甲胺喋呤(methotrexate)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、長春鹼(vinblastine)、長春新鹼(vincristine)、博萊黴素(bleomycin)、太平洋紫杉醇

(paclitaxel)(TAXOL®)、多烯紫杉醇(docetaxel)(TAXOTERE®)、阿地介白素(aldesleukin)、天冬醯胺酶(asparaginase)、白消安(busulfan)、卡鉑(carboplatin)、克拉屈濱(cladribine)、喜樹鹼(camptothecin)、CPT-11、10- 羥基 -7- 乙基 - 喜樹鹼 (SN38)、吉非替尼(gefitinib)(IRESSA®)、達卡巴嗪、氟尿苷(floxuridine)、氟達拉賓(fludarabine)、羥基脲(hydroxyurea)、異環磷醯胺(ifosfamide)、伊達比星(idarubicin)、美司鈉(mesna)、干擾素 α 、干擾素 β 、伊立替康(irinotecan)、米托蒽醌(mitoxantrone)、拓朴替康(topotecan)、亮丙立德(leuprolide)、甲地孕酮(megestrol)、美法侖(melphalan)、巯基嘌呤(mercaptopurine)、普卡黴素(plicamycin)、米托坦(mitotane)、培門冬酶(pegaspargase)、噴司他丁(pentostatin)、哌泊溴烷(pipobroman)、普卡黴素(plicamycin)、鏈脲菌素(streptozocin)、他莫昔芬(tamoxifen)、替尼泊甙(teniposide)、睪內酯(testolactone)、硫鳥嘌呤(thioguanine)、噻替派(thiotepa)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard)、長春瑞賓(vinorelbine)、氯芥苯丁酸(chlorambucil)、芳香酶抑制劑以及其組合。

出於本發明之目的，應瞭解，經修飾之抗-CD73抗體或其抗原結合片段可包含提供用於抗體或多肽與CD73締合之任何類型的可變區。就此而言，可變區可包含或來源於任何類型的哺乳動物，其經誘導可建立體液性反應且產生針對所需腫瘤相關抗原的免疫球蛋白。因此，經修飾之抗-CD73抗體或其抗原結合片段之可變區可來源於例如人類、鼠類、非人類靈長類動物(例如食蟹獼猴、獼猴等)或狼。在一些態樣中，經修飾之抗-CD73抗體或其抗原結合片段的可變區與恆定區均為人類。在其他態樣中，相容性抗體(通常來源於非人類來源)之可變區可經工程改造或經特定定製以改良結合特性或降低分子的免疫原性。就此而言，可變區可經人類化或經由包含所輸入胺基酸序列而

以其他方式改變。

在某些態樣中，抗-CD73抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段之重鏈與輕鏈中的可變域藉由一或多個CDR之至少部分置換及必要時藉由部分構架區置換及序列變化來改變。雖然CDR可來源於類別或甚至子類與構架區所來源之抗體相同的抗體，但可設想CDR將來源於不同類別的抗體且在某些態樣中來源於不同物種的抗體。無需用來自供體可變區的全部CDR置換所有CDR以將一個可變域的抗原結合能力轉移至另一者。實情為，僅需轉移為維持抗原結合位點活性所必需的彼等殘基。鑒於美國專利第5,585,089號、第5,693,761號及第5,693,762號中所述之解釋，因此藉由進行常規實驗或藉由試誤法測試來獲得免疫原性降低的功能性抗體完全屬於熟習此項技術者之能力範圍內。

不論可變區的改變，熟習此項技術者將瞭解，經修飾之抗-CD73抗體(例如經修飾之純系10.3抗體或經修飾之純系2C5抗體)或其抗原結合片段將包含抗體(例如全長抗體或其免疫反應性片段)，其中一或多個恆定區域的至少一部分已缺失或以其他方式改變以便提供所需的生物化學特徵，諸如相較於免疫原性大致相同之包含原生或未改變恆定區的抗體，腫瘤局域化增強或血清半衰期縮短。在一些態樣中，經修飾之抗體之恆定區將包含人類恆定區。對與本文所揭示之抗-CD73分子相容之恆定區的修飾包含一或多個域中之一或多個胺基酸的添加、缺失或取代。亦即，本文所揭示之經修飾之抗體可包含對三個重鏈恆定域(CH1、CH2或CH3)中之一或多者及/或輕鏈恆定域(CL)的改變或修飾。在一些態樣中，涵蓋其中一或多個域部分缺失或完全缺失的經修飾之恆定區。在一些態樣中，經修飾之抗體將包含其中整個CH2域已移除的域缺失構築體或變異體(Δ CH2構築體)。在一些態樣中，省去的恆定區域可經短胺基酸間隔子(例如10個殘基)置換，從而

提供通常由缺失恆定區所賦予的一些分子可撓性。

此項技術中已知恆定區除其組態之外，亦介導若干效應功能。舉例而言，補體之C1組分結合至抗體使補體系統活化。補體活化在細胞病原體之調理及溶胞中具有重要作用。補體活化亦刺激發炎反應且亦可涉及自體免疫過敏性。此外，抗體經由Fc區結合至細胞，其中抗體Fc區上的Fc受體位點結合至細胞上的Fc受體(FcR)。專一性針對不同類別抗體的Fc受體存在多種，包括IgG(γ 受體)、IgE(η 受體)、IgA(α 受體)及IgM(μ 受體)。抗體結合至細胞表面上的Fc受體觸發多種重要且不同的生物反應，包括抗體所塗顆粒之吞噬及摧毀、免疫複合體之清除、殺手細胞對抗體所塗目標細胞之溶解(稱為抗體依賴性細胞介導之細胞毒性，或ADCC)、發炎性介體之釋放、免疫球蛋白產生之胎盤轉移及控制。

在某些態樣中，抗-CD73抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段提供改變的效應功能，效應功能改變又影響所投與之抗體或其抗原結合片段的生物學概況。舉例而言，恆定區域之缺失或不活化(經由點突變或其他方式)可減少循環中之經修飾之抗體與Fc受體的結合，藉此增強腫瘤局域化。在其他情況下，其可為，符合本發明的恆定區修飾緩和補體結合且由此縮短血清半衰期且減少所結合細胞毒素的非專一性結合。然而恆定區之其他修飾可用於消除二硫鍵聯或寡醣部分，從而因抗原專一性或抗體可撓性增強而局域化增強。類似地，根據本發明修飾恆定區可容易使用熟習此項技術者之範圍內熟知的生物化學或分子工程技術達成。

在某些態樣中，作為抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段的本文所揭示之CD73結合分子不具有一或多種效應功能。舉例而言，在一些態樣中，抗體或其抗原結合片段不具有抗體依賴性細胞之細胞毒性(ADCC)活性且/或不具有補體依賴性細胞毒性

(CDC)活性。在某些態樣中，抗-CD73抗體或其抗原結合片段不結合至Fc受體及/或補體因子。在某些態樣中，抗體或其抗原結合片段不具有效應功能。

應注意，在某些態樣中，抗-CD73經修飾之抗體或其抗原結合片段可經工程改造以使CH3域與相應經修飾之抗體或其片段之鉸鏈區直接融合。在其他構築體中，可能需要將肽間隔子插入鉸鏈區與經修飾之CH2及/或CH3域之間。舉例而言，可表現其中CH2域已缺失且剩餘CH3域(經修飾或未經修飾)經5至20個胺基酸間隔子與鉸鏈區連接的相容性構築體。可添加此類間隔子，例如以確保恆定域之調控元件保持自由且可接近或鉸鏈區保持可撓性。然而，應注意，在一些情況下，胺基酸間隔子可證明為免疫原性且引發針對構築體之不必要免疫反應。因此，在某些態樣中，添加至構築體之任何間隔子將相對為非免疫原性，或甚至完全省去，從而維持經修飾之抗體之所需生物化學品質。

除完整恆定區域之缺失之外，應瞭解，本發明之抗-CD73抗體及其抗原結合片段可藉由少數或甚至單個胺基酸之部分缺失或取代來提供。舉例而言，CH2域之選定區域中單個胺基酸之突變可足以實質上減少Fc結合且藉此增強腫瘤局域化。類似地，可能需要僅僅使控制待調節之效應功能(例如補體C1q結合)的一或多個恆定區域的一部分缺失。恆定區之此類部分缺失可改良抗體或其抗原結合片段的所選特徵(例如血清半衰期)，同時保留與本發明完整恆定區域有關的其他所需功能。此外，如提及上文，所揭示之抗-CD73抗體及其抗原結合片段之恆定區可經由增強所得構築體之概況之一或多個胺基酸的突變或取代而經修飾。就此而言，可中斷保守結合位點(例如Fc結合)所提供之活性，同時實質上維持經修飾之抗體或其抗原結合片段之組態及免疫原性概況。某些態樣可包含一或多個胺基酸添加至恆定區中以增強所

需特徵，諸如減少或增強效應功能或提供更多細胞毒素或碳水化合物連接。在此等態樣中，可能需要插入或複製來源於所選恆定區域的特定序列。

本發明亦提供與本文所闡述之嵌合、人類化或人類抗-CD73抗體或其抗原結合片段實質上同源的變異體及等效物。此等物可含有例如保守性取代突變，亦即一或多個胺基酸經相似胺基酸取代。舉例而言，保守性取代係指一個胺基酸經相同通用類別內之另一胺基酸取代，例如一個酸性胺基酸經另一酸性胺基酸取代、一個鹼性胺基酸經另一鹼性胺基酸取代，或一個中性胺基酸經另一中性胺基酸取代。保守胺基酸取代之意圖在此項技術中眾所周知。

抗-CD73抗體或其抗原結合片段可進一步加以修飾以含有通常不為蛋白質之一部分的其他化學部分。彼等衍生化部分可改良蛋白質之溶解性、生物學半衰期或吸收。該等部分亦可減少或消除蛋白質及其類似物之任何所需副作用。針對彼等部分之概述可發現於Remington's Pharmaceutical Sciences, 第20版, Mack Publishing Co., Easton, PA (2000)中。

VI. 編碼CD73結合分子之聚核苷酸

在某些態樣中，本發明涵蓋包含核酸序列的聚核苷酸，該等核酸序列編碼專一性結合CD73的多肽或其抗原結合片段。舉例而言，本發明提供包含核酸序列的聚核苷酸，該核酸序列編碼抗-CD73抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或編碼此類抗體之抗原結合片段。本發明之聚核苷酸可呈RNA形式或呈DNA形式。DNA包括cDNA、基因組DNA及合成DNA；且可為雙股或單股，且若單股，則可為編碼股或非編碼(反義)股。

在某些態樣中，分離聚核苷酸。在某些態樣中，聚核苷酸為實質上純的。在某些態樣中，聚核苷酸包含用於成熟多肽的編碼序列，

該成熟多肽與聚核苷酸在同一閱讀框架內融合，從而有助於例如宿主細胞表現及分泌多肽(例如前導序列充當用於控制多肽自細胞輸送的分泌序列)。具有前導序列之多肽為前蛋白且可具有由宿主細胞裂解以形成多肽之成熟形式的前導序列。聚核苷酸亦可編碼CD73結合前蛋白，該前蛋白為具有額外5'胺基酸殘基的成熟蛋白質。

在某些態樣中，聚核苷酸包含成熟CD73結合多肽(例如與標記序列在同一閱讀框架中融合的抗-CD73抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段，該標記序列使得例如所編碼之多肽得到純化)的編碼序列。舉例而言，標記序列可為pQE-9載體所供應的六組胺酸標記，以便在細菌宿主之情況下對與標記融合之成熟多肽達成純化，或當使用哺乳動物宿主(例如COS-7細胞)時，標記序列可為來源於流感紅血球凝集素蛋白質的血球凝集素(HA)標記。

本發明亦提供所述編碼例如本文所揭示之CD73結合分子(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)之CD73結合片段、類似物及衍生物之聚核苷酸的變異體。

聚核苷酸變異體可含有編碼區、非編碼區或兩者中之改變。在一些態樣中，聚核苷酸變異體含有產生沉默取代、添加或缺失，但不改變編碼多肽之特性或活性的改變。在一些態樣中，核苷酸變體藉由歸因於基因密碼簡併之沉默取代而產生。聚核苷酸變異體可出於多種原因產生，例如使特定宿主之密碼子表現最佳化(將人類mRNA中之密碼子改變成對於諸如大腸桿菌之細菌宿主為較佳的密碼子)。亦提供包含本文所述之聚核苷酸的載體及細胞。

在一些態樣中，編碼CD73結合分子(例如抗-CD73抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段))之DNA序列可藉由化學合成使用寡核苷酸合成儀構築。此類寡核苷酸可基於所需多肽之胺基酸序列且選擇在將產生所關注之重組多肽之宿主細胞中有利的彼等密

碼子來設計。可應用標準方法來合成編碼所關注之分離多肽的經分離之聚核苷酸序列。舉例而言，完整胺基酸序列可用於構築回復轉譯之基因。此外，可合成含有編碼特定分離多肽之核苷酸序列的DNA寡聚物。舉例而言，可合成編碼所需多肽之各部分的若干小寡核苷酸且接著接合。個別寡核苷酸通常含有5'或3'突出端用於互補性組裝。

一經組裝(藉由合成、定點突變誘發或其他方法)，可將編碼所關注之特定分離多肽的聚核苷酸序列插入表現載體中且可操作地連接至適用於在所需宿主中表現蛋白質之表現控制序列。正確組裝可例如依據核苷酸測序、限制酶圖譜及/或生物活性多肽在適合宿主中之表現來證實。如在此項技術中所熟知，為獲得經轉染基因在宿主中之高表現量，基因必須可操作地連接於在所選表現宿主中具有功能性之轉錄及轉譯表現控制序列。

在某些態樣中，使用重組表現載體擴增及表現編碼抗-CD73抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段的DNA。重組表現載體為可複製的DNA構築體，其具有編碼抗-CD73抗體或及其抗原結合片段之多肽鏈的合成或cDNA源DNA片段，該等合成或cDNA源DNA片段可操作地連接至來源於哺乳動物、微生物、病毒或昆蟲基因的適合轉錄或轉譯調控元件。

轉錄單元一般包含以下各者之組裝：(1)在基因表現方面具有調控作用的基因元件，例如轉錄啟動子或強化子；(2)轉錄成mRNA且轉譯成蛋白質之結構或編碼序列；及(3)適當轉錄及轉譯起始及終止序列，如下文所詳述。此類調控元件可包括控制轉錄的操縱序列。可另外併入通常由複製起點賦予之在宿主中複製之能力及促進識別轉型體之選擇基因。DNA區域當其在功能上彼此相關時可操作地連接。舉例而言，若信號肽(分泌前導序列)之DNA作為參與多肽分泌之前驅物表現，則其可操作地連接至多肽之DNA；若啟動子控制編碼序列之轉

錄，則其可操作地連接至該序列；或若核糖體結合位點經定位從而允許轉譯，則其可操作地連接至編碼序列。欲用於酵母表現系統中之結構元件包括能夠使宿主細胞達成細胞外分泌所轉譯蛋白質的前導序列。或者，在無前導或輸送序列下表現重組蛋白質的情況下，其可包括N端甲硫胺酸殘基。此殘基可視情況隨後自所表現之重組蛋白質裂解而得到最終產物。

表現控制序列及表現載體之選擇將視宿主之選擇而定。可使用多種表現宿主/載體組合。適用於真核主體之表現載體包括例如包含來自SV40、牛乳頭狀瘤病毒、腺病毒及巨細胞病毒之表現控制序列的載體。適用於細菌宿主之表現載體包括已知之細菌質體，諸如來自大腸桿菌之質體，包括pCR 1、pBR322、pMB9及其衍生物、更寬宿主範圍質體，諸如M13及絲狀單股DNA噬菌體。

適用於表現CD73結合分子(例如抗-CD73抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段)的宿主細胞包括在適當啟動子之控制下的原核生物、酵母、昆蟲或更高級真核細胞。原核生物包括革蘭氏陰性或革蘭氏陽性生物，例如大腸桿菌或桿菌。更高級真核細胞包括如下所述之哺乳動物來源的所建立細胞株。亦可使用無細胞轉譯系統。用於細菌、真菌、酵母及哺乳動物細胞宿主之適當選殖及表現載體由Pouwels等人 (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985)描述，其相關揭示內容以引用的方式併入本文中。關於蛋白質產生方法(包括抗體產生)的其他資訊可見於例如美國專利公開案第2008/0187954號、美國專利第6,413,746號、第6,660,501號及第7,932,087號中，其各以全文引用的方式併入本文中。

亦可有利地使用各種哺乳動物或昆蟲細胞培養系統來表現重組CD73結合分子，例如抗-CD73抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段。由於重組蛋白質一般正確摺疊、經適當修飾

且具有完全功能，因此此類蛋白質可在哺乳動物細胞中表現。

適合哺乳動物宿主細胞株之實例包括HEK-293及HEK-293T、Gluzman (Cell 23:175, 1981)所述之COS-7猴腎細胞株及其他細胞株，包括例如L細胞、C127、3T3、中國倉鼠卵巢(CHO)、NSO、海拉(HeLa)及BHK細胞株。哺乳動物表現載體可包含未轉錄元件，諸如複製起點、連接至待表現基因之適合啟動子及強化子，以及其他5'或3'側接未轉錄序列，以及5'或3'未轉譯序列，諸如必需的核糖體結合位點、聚腺苷酸化位點、剪接供體及接受體位點，以及轉錄終止序列。用於在昆蟲細胞中產生異源蛋白質的桿狀病毒系統回顧於Luckow及Summers, BioTechnology 6:47 (1988)中。

經轉型之宿主所產生的CD73結合分子(例如抗-CD73抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段)可根據任何適合方法純化。此類標準方法包括層析(例如離子交換、親和性及篩分管柱層析法)、離心、差異溶解性或用於蛋白質純化的任何其他標準技術。諸如六組胺酸、麥芽糖結合域、流感包膜序列及麩胱甘肽-S-轉移酶等親和性標記可連接至蛋白質，以藉由通過適當親和性管柱而容易純化。經分離之蛋白質亦可使用諸如蛋白分解、核磁共振及x射線結晶學之技術進行物理表徵。

舉例而言，來自分泌重組蛋白質至培養基中之系統的上清液可首先使用市售蛋白質濃縮過濾器(例如AMICON®或Millipore PELLICON®超濾單元)濃縮。濃縮步驟之後，可將濃縮物施加於適合純化基質上。或者，可使用陰離子交換樹脂，例如具有側接二乙胺基乙基(DEAE)基團之基質或受質。基質可為丙烯醯胺、瓊脂糖、聚葡萄糖、纖維素或常用於純化蛋白質之其他類型。或者，可使用陽離子交換步驟。適合陽離子交換劑包括包含磺丙基或羧甲基之各種不溶基質。最後，使用疏水性RP-HPLC介質(例如具有側接甲基或其他脂族

基的矽膠)的一或多個逆相高效液相層析(RP-HPLC)步驟可用於進一步純化CD73結合分子(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)。一些或所有前述純化步驟亦可以各種組合使用以提供均質重組蛋白質。

細菌培養物中所產生的重組CD73結合蛋白(例如抗-CD73抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段)可經分離，例如藉由首先自細胞集結粒中萃取，隨後進行一或多次濃縮、鹽析、水性離子交換或尺寸排阻層析步驟。可使用高效液相層析(HPLC)進行最後純化步驟。用於表現重組蛋白質的微生物細胞可藉由任何適宜方法(包括冷凍-解凍循環、音波處理、機械破碎或使用溶胞劑)來破碎。

此項技術中已知用於純化抗體及其他蛋白質的方法亦包括例如美國專利公開案第2008/0312425號、第2008/0177048號及第2009/0187005號中所述之彼等方法，各案以全文引用的方式併入本文中。

在某些態樣中，CD73結合分子為並非抗體的多肽。鑑別及產生以高親和力結合至蛋白質目標之非抗體多肽的多種方法在此項技術中已知。參見例如Skerra, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18:295-304 (2007); Hosse等人, *Protein Science*, 15:14-27 (2006); Gill等人, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17:653-658 (2006); Nygren, *FEBS J.*, 275:2668-76 (2008) 及Skerra, *FEBS J.*, 275:2677-83 (2008)，各文獻以全文引用的方式併入本文中。在某些態樣中，噬菌體呈現技術可用於鑑別/產生CD73結合性多肽。在某些態樣中，多肽包含選自由以下組成之群的類型的蛋白質骨架：蛋白質A、脂質運載蛋白、纖維結合蛋白域(例如纖維結合蛋白域，諸如肌腱蛋白-3 Fn III域)、錨蛋白共同重複域，及硫氧還蛋白。

VI. 使用治療性抗-CD73抗體的治療方法

本發明提供關於使用抗-CD73結合分子(例如抗體，包括其抗原

結合片段、變異體及衍生物(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體))治療患有與CD73表現或表現CD73之細胞有關之疾病(例如癌症)之患者的方法。在一些特定態樣中，該等癌症為肺癌、乳癌、卵巢癌、結腸直腸癌、膀胱癌、胰臟癌、腎癌、胃癌、前列腺癌、乳癌、肺結腸癌及淋巴瘤。

「表現CD73之細胞」意謂表現CD73之細胞。CD73可經由糖基磷脂酰肌醇錨定而為膜結合的且亦以可溶性蛋白形式存在。用於偵測細胞及其他適合樣品中之CD73表現的方法在此項技術中已熟知且包括(但不限於)免疫組織化學、流式細胞術、西方墨點法(Western blot)、ELISA及其類似方法。

儘管以下論述提及各種疾病及病症使用本發明之CD73結合分子(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)之診斷方法及治療，但本文所描述之方法亦適用於任何其他抗-CD73抗體及此等抗-CD73抗體之保留本文所揭示之抗-CD73抗體的所需特性(例如能夠專一性結合CD73且中和其5'-核苷酸酶活性)的抗原結合片段、變異體及衍生物(例如融合蛋白或結合物)。在一些態樣中，CD73結合分子為並不介導人類ADCC之人類或人類化抗體，或為經工程改造使得其並不介導ADCC之抗-CD73抗體。

在一些態樣中，CD73結合分子為CD730010抗體或其抗原結合片段、純系10.3抗體或其抗原結合片段、CD730002抗體或其抗原結合片段、純系2C5抗體或其抗原結合片段、或CD73004抗體或其抗原結合片段。在其他態樣中，CD73結合分子為純系10.3突變體抗體。在一些態樣中，CD73結合分子為純系10.3單株抗體。在一些態樣中，CD73結合分子為經工程改造以延長血清半衰期之純系10.3單株抗體。在其他態樣中，CD73結合分子為純系10.3 YTE突變體抗體。在其他態樣中，CD73結合分子為純系2C5突變體抗體。在一些態樣中，

CD73結合分子為純系2C5單株抗體。在一些態樣中，CD73結合分子為經工程改造以延長血清半衰期之純系2C5單株抗體。在其他態樣中，CD73結合分子為純系2C5 YTE突變體抗體。

在一個態樣中，治療包括向個體或患者施加或投與本發明之抗-CD73結合分子(例如抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段、變異體或衍生物)，或向來自個體或患者之經分離之組織或細胞株施加或投與抗-CD73結合分子，其中該個體或患者患有疾病、具有疾病症狀或易患疾病。在另一態樣中，治療亦意欲包括向個體或患者施加或投與包含本發明之抗-CD73結合分子(例如抗體或其抗原結合片段、變異體或衍生物)的醫藥組合物，或向來自個體或患者之分離組織或細胞株施加或投與包含抗-CD73結合分子之醫藥組合物，該個體或患者患有疾病，具有疾病症狀或易患疾病。

本發明之抗-CD73結合分子(例如抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段、變異體或衍生物)適用於治療各種癌症。在一個態樣中，本發明提供抗-CD73結合分子(例如抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段、變異體或衍生物)，其適用作藥物，尤其用於治療或預防癌症(例如結腸癌、黑素瘤、乳癌、淋巴瘤、或非小細胞肺癌、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、及伯基特氏淋巴瘤、卵巢癌、乳癌、頭頸癌及胰臟癌)。在一些態樣中，癌症呈現促轉移表型。在一些態樣中，呈現促轉移表型之癌症為黑素瘤或乳癌。在一些態樣中，癌症為轉移性癌症。在一些態樣中，本文所揭示之抗-CD73結合分子可觸發應變性抗腫瘤活性及/或抑制癌轉移。在一些具體態樣中，本文所揭示之抗-CD73結合分子可抑制乳癌之癌轉移。

根據本發明之方法，如本文中其他處所定義之至少一種抗-CD73結合分子(例如抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合

片段、變異體或衍生物)用於促進積極治療反應(相對於癌症)。相對於癌症治療而言的術語「積極治療反應」係指與此等抗-CD73結合分子(例如抗體或其抗原結合片段、變異體或衍生物)之活性有關之疾病的改善，及/或與疾病有關之症狀的改善。因此，舉例而言，疾病改善可以為完全反應為特徵。「完全反應」意指在校正任何先前測試結果的情況下不存在臨床上可偵測之疾病。或者，疾病改善可歸類為部分反應。「積極治療反應」涵蓋癌症之進展及/或持續時間的減少或抑制、癌症之嚴重度的降低或減輕、及/或其一或多種由投與本文所揭示之抗-CD73結合分子引起的症狀的減輕。

在特定態樣中，該等術語係指在投與本文所揭示之抗-CD73結合分子之後的一種、兩種或三種或三種以上結果：(1)癌細胞群體之穩定、減少或消除；(2)癌症生長之穩定或減少；(3)削弱癌症形成；(4)原發性、區域性及/或轉移性癌症之根除、移除或控制；(5)死亡率降低；(6)無疾病、無復發、無進展及/或總存活期、持續時間或速率增加；(7)反應速率、反應持久性、或有反應或緩解中之患者數目增加；(8)住院率降低；(9)住院時間長度下降；(10)癌症大小維持且不增加或增加小於10%、較佳小於5%、較佳小於4%、較佳小於2%；及(12)緩解中之患者數目增加。

臨床反應可使用篩選技術評估，諸如磁共振成像(MRI)掃描、x放射性感像、電腦化斷層攝影(CT)掃描、流式細胞術或螢光活化細胞分選儀(FACS)分析、組織學、大體病理學及血液化學，包括(但不限於)藉由ELISA、RIA、層析及類似方法可偵測到的變化。除此等積極治療反應之外，經歷使用抗-CD73結合分子(例如抗體或其抗原結合片段、變異體或衍生物)之療法的個體可經歷與疾病相關之症狀改善的有益作用。

本文所揭示之抗-CD73結合分子(例如抗體(例如純系10.3抗體或

純系2C5抗體)或其抗原結合片段、變異體或衍生物)可與用於癌症之任何已知療法組合使用，包括已知適用於、或已用於或目前用於治療癌症之任何藥劑或藥劑組合，該癌症例如為結腸癌、黑素瘤、乳癌、淋巴瘤、非小細胞肺癌、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、及伯基特氏淋巴瘤、卵巢癌、乳癌、頭頸癌及胰臟癌)。醫藥組合調配物或給藥方案之第二藥劑或藥劑組合較佳具有與本發明之抗體或多肽互補的活性，使得其不會不利地彼此影響。

抗癌劑包括用以治療惡性病(諸如癌生長)之藥物。藥物療法可單獨或與其他治療(諸如手術或放射療法)組合使用。視所涉及之器官之性質而定，若干類藥物可用於癌症治療。舉例而言，乳癌通常由雌激素刺激，且可用使性激素不活化之藥物治療。類似地，前列腺癌可用使雄激素，即雄性性激素不活化之藥物治療。用於本發明之某些方法中的抗癌劑尤其包括抗體(例如結合IGF-1R之抗體、結合EGFR之抗體、結合Her2之抗體、或結合cMET之抗體)、靶向IGF1R之小分子、靶向EGFR之小分子、靶向Her2之小分子、抗代謝物、烷基化劑、拓撲異構酶抑制劑、微管靶向劑、激酶抑制劑、蛋白質合成抑制劑、免疫治療劑、激素療法、糖皮質激素、芳香酶抑制劑、mTOR抑制劑、化學治療劑、蛋白激酶B抑制劑、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抑制劑、週期素依賴性激酶(CDK)抑制劑、RLr9、CD289、酶抑制劑、抗-TRAIL、MEK抑制劑等。

在特定態樣中，本文所揭示之CD73結合分子(例如抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段)可與靶向例如PD-1(計畫性死亡1蛋白)、其兩種配位體PD-L1(計畫性死亡配位體1)及/或PD-L2、或CTLA-4(細胞毒性T淋巴細胞抗原4蛋白)之抗體或抗體片段組合投與。參見例如Stagg等人 PNAS 107:1547-1552 (2010)；Jin等人 Cancer Res. 70(6): (2010)；Allard等人 Clin. Cancer Res. 19:5626

(2013)，其以全文引用的方式併入本文中。在一些態樣中，抗-CTLA-4抗體為伊派利單抗或其抗原結合片段。在其他態樣中，抗-CTLA-4抗體為曲美單抗(替西單抗、CP-675,206)或其抗原結合片段。在一些態樣中，抗-PD-1抗體為派立珠單抗(KEYTRUDA®，以前為拉立珠單抗，亦稱為MK-3475)或其抗原結合片段。在一些態樣中，抗-PD-1抗體為尼沃單抗(BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538、OPDIVA®)或其抗原結合片段。在一些態樣中，抗-PD-L1抗體為BMS-936559或其抗原結合片段。在其他態樣中，抗-PD-L1抗體為MPDL3280A。在其他態樣中，抗-PD-1抗體為AMP-224(抗-PD-1 Fc融合蛋白)或其抗原結合片段。在各種態樣中，抗-PD-L1抗體為MEDI4736或其抗原結合片段。

在一些態樣中，本文所揭示之CD73結合分子(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)可與抗-PD-1或抗-PD-L1抗體組合投與。在各種實施例中，投與抗-CD73抗體之濃度為約1 mg/kg、約2 mg/kg、約3 mg/kg、約4 mg/kg、約5 mg/kg、約6 mg/kg、約7 mg/kg、約8 mg/kg、約9 mg/kg、約10 mg/kg、約11 mg/kg、約12 mg/kg、約13 mg/kg、約14 mg/kg、約15 mg/kg、約16 mg/kg、約17 mg/kg、約18 mg/kg、約19 mg/kg、或約20 mg/kg。在一些態樣中，本文所揭示之CD73結合分子(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)可與抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4抗體組合投與，其中投與抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4抗體之濃度為約1 mg/kg、約2 mg/kg、約3 mg/kg、約4 mg/kg、約5 mg/kg、約6 mg/kg、約7 mg/kg、約8 mg/kg、約9 mg/kg、約10 mg/kg、約11 mg/kg、約12 mg/kg、約13 mg/kg、約14 mg/kg、約15 mg/kg、約16 mg/kg、約17 mg/kg、約18 mg/kg、約19 mg/kg、或約20 mg/kg。在一些態樣中，抗-CD73抗體及抗-PD-1抗體、抗-PD-L1或抗-CTLA4以約1:1、1:2、1:3或1:4之比率投與。在一些態樣中，抗-CD73

抗體及抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4抗體以約1:2之比率投與。在一特定態樣中，抗-CD73抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)之濃度為約10 mg/kg，且抗-PD-1抗體之濃度為約20 mg/kg。在一些態樣中，本文所揭示之CD73結合分子(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)可與抗-PD-1抗體組合投與。在一些態樣中，相較於未經治療個體或用單藥療法(例如抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4抗體，無抗-CD73抗體)治療之個體，投與包含本文所揭示之CD73結合分子(例如MEDI 9447、純系10.3抗體或純系2C5抗體)與抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4抗體組合的組合治療可使生存提高約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%或約100%。在一些態樣中，相較於未經治療個體或用單藥療法(例如抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4抗體，無抗-CD73抗體)治療之個體，投與包含本文所揭示之CD73結合分子(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)與抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4抗體組合的組合治療可使生存提高約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、或約10倍。

當組合療法包含投與抗-CD73結合分子與投與另一治療劑(例如抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4抗體)組合時，本文所揭示之方法涵蓋使用各別調配物或單一醫藥調配物之共同投藥及以任一次序連續投與。在一些態樣中，本文中描述之抗-CD73抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)與其他藥物組合投與，其中該抗體或其抗原結合片段、變異體或衍生物及該治療劑可依序、以任一次序或同時(亦即並行或在相同時段內)投與。

組合療法可提供「協同作用」且證實「協同性」，亦即當活性成分一起使用時所達成之效應大於由分開使用化合物所產生之效應的總和。協同效應可在活性成分如下時獲得：(1)於組合之單位劑量調配物中共調配及同時投與或傳遞；(2)以各別調配物形式交替或並行傳

遞；或(3)藉由一些其他方案。當以交替療法傳遞時，協同效應可在化合物例如藉由以各別注射器不同注射依序投與或傳遞時獲得。一般而言，在交替療法期間，依序(亦即連續)投與有效劑量之各活性成分，然而在組合療法中，一起投與有效劑量之兩種或兩種以上活性成分。

在其他態樣中，本文所揭示之CD73結合分子(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)可與酪胺酸激酶抑制劑組合投與。在一些其他特定態樣中，本文所揭示之CD73結合分子可與同EGFR及/或HER2/neu相關之酪胺酸激酶活性之抑制劑，例如拉帕替尼(lapatinib)組合投與。在一些態樣中，本文所揭示之CD73結合分子可與抗有絲分裂劑組合投與。在一些特定態樣中，本文所揭示之CD73結合分子可與使有絲分裂紡錘體微管組件穩定之藥劑(例如太平洋紫杉醇或多烯紫杉醇)組合投與。另一態樣為使用抗-CD73結合分子(例如抗體或其抗原結合片段、變異體或衍生物(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體))，以用於診斷監測組織中之蛋白含量作為臨床測試程序之一部分，例如以測定給定治療方案之功效。舉例而言，可藉由使抗體耦合至可偵測物質來促進偵測。

可偵測物質之實例包括各種酶、輔基、螢光物質、發光物質、生物發光物質及放射性物質。適合酶之實例包括辣根過氧化酶、鹼性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙醯膽鹼酯酶；適合輔基複合物之實例包括抗生蛋白鏈菌素/生物素和抗生物素蛋白/生物素；適合螢光物質之實例包括傘酮、螢光素、異硫氰酸螢光素、若丹明、二氯三嗪基胺螢光素、丹磺醯氯或藻紅素；發光物質之實例包括魯米諾(luminol)；生物發光物質之實例包括螢光素酶、螢光素和發光蛋白質；以及適合放射性物質之實例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。

VIII. 抗-CD73抗體治療組合及輔助療法

本發明提供關於使用包含抗-CD73結合分子(例如抗體，包括其抗原結合片段、變異體及衍生物(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體))之治療組合來治療患有癌症(包括結腸癌、黑素瘤、乳癌、淋巴瘤、非小細胞肺癌、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、卵巢癌、乳癌、頭頸癌及胰臟癌)之患者的方法。

儘管以下論述提及提供本發明之CD73結合分子(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)之治療組合，但本文所描述之方法亦適用於任何其他抗-CD73抗體及此等抗-CD73抗體之保留本文所揭示之抗-CD73抗體之所需特性(例如能夠專一性結合CD73且中和其5'-核苷酸酶活性)的抗原結合片段、變異體及衍生物(例如融合蛋白或結合物)。在一些態樣中，CD73結合分子為並不介導人類ADCC之人類或人類化抗體，或為經工程改造使得其並不介導ADCC之抗-CD73抗體。

使用本發明之組合(諸如抗-CD73抗體或其抗原結合片段與抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4抗體或其抗原結合片段之組合)治療具有實體腫瘤之患者可引起相加性或協同性效應。如本文所用，術語「協同性」係指與單一療法之相加性作用相比更有效的療法組合(例如抗-CD73抗體(例如MEDI9447)及抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4抗體之組合)。

療法組合(例如抗-CD73抗體(例如MEDI9447)及抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4抗體之組合)之協同效應允許向具有實體腫瘤之患者使用較低劑量之一或多種治療劑及/或較不頻繁地投與該治療劑。使用較低劑量治療劑及/或較不頻繁地投與該療法之能力降低與向個體投與該療法相關的毒性，且不降低該療法在治療實體腫瘤中之功效。另外，協同效應可使治療劑在管理、治療或減輕實體腫瘤方面之功效改善。治療劑組合之協同效應可避免或降低與使用任一單一療法相關的不良或非所需副作用。

在輔助療法中，抗-CD73抗體(例如MEDI9447)或其抗原結合片段及抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4抗體或其抗原結合片段之組合可視情況包括於同一醫藥組合物中，或可包括於各別醫藥組合物中。在此後一種情況中，包含抗-CD73抗體(例如MEDI9447)或其抗原結合片段之醫藥組合物適用於在投與包含抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4抗體或其抗原結合片段之醫藥組合物之前、同時或之後投與。在某些情況中，抗-CD73抗體(例如MEDI9447)或其抗原結合片段及抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4抗體以各別組合物形式在重疊時間下投與。

抗-CD73抗體(例如MEDI9447)或其抗原結合片段及抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4抗體或其抗原結合片段可向患者僅一次或不頻繁地投與，同時仍提供益處。在其他態樣中，投與患者額外追加劑量。可視患者之年齡、體重、臨床評定、腫瘤負荷及/或其他因素(包括主治醫師之判斷)而定以各種時間間隔投與追加劑量。

本文所提供之方法可降低或扼止腫瘤生長。在一些態樣中，降低或扼止可為統計學上顯著的。腫瘤生長降低可藉由與基線下患者腫瘤之生長、預期腫瘤生長、基於大型患者群體之預期腫瘤生長或對照群體之腫瘤生長比較來量測。在其他實施例中，本發明之方法提高生存率。

IX. 抗-PD-L1抗體

專一性結合且抑制PD-L1活性(例如結合於PD-1及/或CD80)之抗體適用於治療腫瘤。B7-H1(亦稱為PD-L1)為大小約53 kDa之I型跨膜蛋白。在人類中，B7-H1在許多免疫細胞類型上表現，包括活化及能力缺失/耗竭之T細胞、原生及活化B細胞、以及骨髓樹突狀細胞(DC)、單核細胞及肥大細胞。其亦在非免疫細胞上表現，包括胰臟之胰島、肝臟之庫普弗細胞(Kupffer cell)、血管內皮及所選上皮(例如呼吸道上皮及腎小管上皮)，其中其表現在發炎性事件期間增強。B7-H1

表現亦以增加之含量發現於許多腫瘤上，包括(但不限於)乳房癌、結腸癌、結腸直腸癌、肺癌、腎癌(包括腎細胞癌)、胃癌、膀胱癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肝細胞癌(HCC)及胰臟癌以及黑素瘤。

B7-H1已知結合兩種替代配位體，此等配位體中之第一者PD-1為50-55 kDa I型跨膜受體，其最初鑑別於經歷活化誘導之細胞凋亡的T細胞株中。PD-1表現在活化T細胞、B細胞及單核細胞以及免疫系統之其他細胞上且結合B7-H1(PD-L1)及相關B7-DC(PD-L2)兩者。第二者為B7家族成員B7-1，其表現在活化T細胞、B細胞、單核細胞及抗原呈現細胞上。

咸信經由PD-1/B7-H1軸的信號傳導會在免疫系統中藉由負面調節T細胞反應來提供重要的非冗餘功能。咸信腫瘤細胞上之B7-H1表現會有助於腫瘤逃避免疫系統之偵測及消除。B7-H1在此方面經由數種替代機制起作用，包括驅使腫瘤浸潤性T淋巴細胞耗盡及能力缺失，刺激免疫抑制性細胞激素分泌至腫瘤微環境中，刺激抑制性調節性T細胞功能，以及保護表現B7-H1之腫瘤細胞免於經腫瘤細胞專一性細胞毒性T細胞溶解。

MEDI4736為例示性抗-PD-L1抗體，其對B7-H1具選擇性，且阻礙B7-H1與PD-1及CD80受體之結合。MEDI4736可在活體外降低B7-H1介導之對人類T細胞活化的抑制且經由T細胞依賴性機制抑制異種移植模型中的腫瘤生長。可使用之其他藥劑包括抑制PD-L1及/或PD-1之藥劑(AB或其他)。

關於用於本文所提供之方法的MEDI4736(或其片段)之資訊可發現於US20130034559/US 8779108及US20140356353中，其各自揭示內容以全文引用的方式併入本文中。MEDI4736之片段可結晶(Fc)域在IgG1重鏈之恆定域中含有三重突變，其減少與補體組分C1q及負責介導抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)之Fcγ受體的結合。

用於本文中提供之方法的MEDI4736及其抗原結合片段包含重鏈及輕鏈或重鏈可變區及輕鏈可變區。在一特定態樣中，用於本文所提供之方法的MEDI4736或其抗原結合片段包含有包含SEQ ID NO: 130之胺基酸序列的輕鏈可變區及包含SEQ ID NO: 131之胺基酸序列的重鏈可變區。在一特定態樣中，用於本文中提供之方法的MEDI4736或其抗原結合片段包含重鏈可變區及輕鏈可變區，其中重鏈可變區包含Kabat定義之CDR1、CDR2及CDR3序列SEQ ID NO: 132-134，且其中輕鏈可變區包含Kabat定義之CDR1、CDR2及CDR3序列SEQ ID NO: 135-137。一般技術者應能容易地鑑別一般技術者已知的Chothia定義、Abm定義之CDR定義或其他CDR定義。在一特定態樣中，用於本文所提供之方法的MEDI4736或其抗原結合片段包含2.14H9OPT抗體之可變重鏈及可變輕鏈CDR序列，如US20130034559/US 8779108及US20140356353中所揭示，其各自揭示內容以全文引用的方式併入本文中。

X. 抗-CTLA4抗體

因此，在一個實施例中，本發明之治療組合包含CTLA4阻斷抗體(例如曲美單抗)及/或減少PD1/PD-L1相互作用之抗體。迄今為止獲得大量關注之兩種T細胞調節路徑經由細胞毒性T淋巴細胞抗原-4(CTLA4、CD152)及計畫性死亡配位體1(PD-L1，亦稱為B7H-1或CD274)發信號。

CTLA4表現在活化T細胞上且充當共抑制劑以在CD28介導之T細胞活化之後保持檢查中T細胞反應。咸信CTLA4在TCR接合之後調節原生及記憶T細胞之早期活化的幅度，且成為影響抗腫瘤免疫性及自體免疫性兩者之中樞抑制性路徑的一部分。CTLA4主要表現在T細胞上，且其配位體CD80(B71)及CD86(B7.2)之表現基本上受限於抗原呈遞細胞、T細胞及其他免疫介導細胞。已報導阻斷CTLA4信號傳導路

徑之拮抗性抗-CTLA4抗體會增強T細胞活化。FDA已在2011年批准一種此類抗體伊派利單抗用於治療轉移性黑素瘤。另一種抗-CTLA4抗體曲美單抗在階段III試驗中測試，用於治療晚期黑素瘤，但相較於標準照護療法(替莫唑胺(temozolomide)或達卡巴嗪(dacarbazine))在該時間下不顯著提高患者之總存活期。

關於用於本文所提供之方法的曲美單抗(或其抗原結合片段)之資訊可發現於US 6,682,736(其中其被稱作11.2.1)中，其揭示內容以全文引用的方式併入本文中。曲美單抗(亦稱為CP-675,206、CP-675、CP-675206及替西單抗)為人類IgG2單株抗體，其對CTLA4具高度選擇性，且阻礙CTLA4與CD80(B7.1)及CD86(B7.2)之結合。其已展示出會在活體外引起免疫活化，且一些用曲美單抗治療之患者已展示腫瘤消退。

用於本文所提供之方法的曲美單抗包含重鏈及輕鏈或重鏈可變區及輕鏈可變區。在一特定態樣中，用於本文所提供之方法的曲美單抗或其抗原結合片段包含輕鏈可變區及重鏈可變區。在一特定態樣中，用於本文所提供之方法的曲美單抗或其抗原結合片段包含本文中所鑑別之重鏈可變區及輕鏈可變區。一般技術者應能容易地鑑別一般技術者已知的Chothia定義、Abm定義之CDR定義或其他CDR定義。在一特定態樣中，用於本文所提供之方法的曲美單抗或其抗原結合片段包含11.2.1抗體之可變重鏈及可變輕鏈CDR序列，如US 6,682,736中所揭示，該文獻以全文引用的方式併入本文中。

XI. VII. 醫藥組合物及投藥方法

抗-CD73結合分子(例如抗體或其抗原結合片段、變異體或衍生物(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體))製備及投與有需要之個體的方法為熟習此項技術者所熟知或容易確定。抗-CD73結合分子(例如抗體或其抗原結合片段、變異體或衍生物)之投與途徑可為例如經口、非

經腸、藉由吸入或局部。如本文所用之術語非經腸包括例如靜脈內、動脈內、腹膜內、肌肉內、皮下、經直腸或經陰道投藥。然而，在與本文中之教示相容的其他方法中，本發明之抗-CD73結合分子(例如抗體或其抗原結合片段、變異體或衍生物)可直接遞送至有害細胞群位點，藉此增加患病組織於治療劑的暴露。

如本文中所論述，本發明之抗-CD73結合分子(例如抗體或其抗原結合片段、變異體或衍生物)(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)可以醫藥學上有效量投與，以便在活體內治療表現CD73之細胞介導之疾病，諸如某些類型之癌症。

包含抗-CD73結合分子(例如抗體或其抗原結合片段、變異體或衍生物(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體))與抗-PD-1、抗-PD-L1及/或抗-CTLA4抗體之組合的治療組合製備及投與有需要之個體的方法為熟習此項技術者所熟知或容易確定。其組合之投與途徑可為例如經口、非經腸、藉由吸入或局部。如本文所用之術語非經腸包括例如靜脈內、動脈內、腹膜內、肌肉內、皮下、經直腸或經陰道投藥。然而，在與本文中之教示相容的其他方法中，本發明之組合可直接遞送至有害細胞群位點，藉此增加患病組織於治療劑的暴露。如本文中所論述，抗-CD73抗體(例如MEDI9447)及抗-PD-1、抗-PD-L1及/或抗-CTLA4抗體組合可以醫藥學上有效量投與，以便在活體內治療表現CD73之細胞介導之疾病，諸如某些類型之癌症。

用於本發明之醫藥組合物可包含醫藥學上可接受之載劑，包括例如水、離子交換劑、蛋白質、緩衝物質及鹽。亦可存在防腐劑及其他添加劑。載劑可為溶劑或分散介質。適用於本文所揭示之治療性方法之調配物描述於 Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 第16版 (1980)中。

在任何情況下，無菌可注射溶液可藉由將需要量之本發明之活

性化合物(例如單獨或與其他活性劑組合之抗-CD73抗體、或其抗原結合片段、變異體或衍生物(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體))的治療組合併入適當溶劑中，隨後過濾殺菌來製備。此外，可將製劑封裝且以套組形式銷售。此類製品可具有標籤或包裝說明書，指示相關組合物適用於治療患有或易患疾病或病症之個體。

非經腸調配物可為單次劑量、輸注液或載入單次劑量，之後為維持劑量。此等組合物可以特定固定或可變之時間間隔，例如一天一次，或基於「按需要」來投與。

組合物可以單次劑量、多次劑量投與，或以輸注方式投與已確立之時段。亦可調節劑量方案以提供最佳所需反應(例如治療性或預防性反應)。

本發明組合物治療表現CD73之細胞介導之疾病(諸如某些類型癌症，包括例如結腸癌、黑素瘤、乳癌、淋巴瘤、非小細胞肺癌、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、及伯基特氏淋巴瘤、卵巢癌、乳癌、頭頸癌及胰臟癌)的治療有效劑量視許多不同因素而變化，包括投與方式、目標位點、患者之生理狀態、患者為人類還是動物、其他藥物投與以及預防性治療還是治療性治療。通常，患者為人類，但亦可治療非人類哺乳動物，包括轉殖基因哺乳動物。治療劑量可使用熟習此項技術者已知之常規方法來滴定以使安全性及功效最佳化。

鑒於本發明之揭示內容，本發明之至少一種抗-CD73結合分子(例如抗體或其結合片段、變異體或衍生物)(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或治療組合投與之量可容易藉由一般技術者在不進行過度實驗下確定。影響本發明之至少一種抗-CD73結合分子(例如抗體、其抗原結合片段、變異體或衍生物)或治療組合之投與模式及相應量的因素包括(但不限於)疾病嚴重程度、病史及經歷療法之個體的年齡、身高、體重、健康及身體情況。類似地，本發明之抗-CD73結合分子(例

如抗體、或其片段、變異體或衍生物)或治療組合投與之量將視投與模式及個體將經歷此藥劑之單次給藥還是多次給藥而定。

本發明亦提供本發明之抗-CD73結合分子(例如抗體或其抗原結合片段、變異體或衍生物(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體))或治療組合的用途，其用於製造供治療一種類型癌症(包括例如結腸癌、黑素瘤、乳癌、淋巴瘤、非小細胞肺癌、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、及伯基特氏淋巴瘤、卵巢癌、乳癌、頭頸癌及胰臟癌)用之藥物。

本發明亦提供抗-CD73結合分子(例如抗體或其抗原結合片段、變異體或衍生物(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體))之用途，其用於製造供治療個體以便治療一種類型癌症用之藥物。在某些態樣中，藥物用於已用至少一種其他療法預治療之個體。

「預治療(pretreated)」或「預治療(pretreatment)」意欲個體在接受包含抗-CD73結合分子(例如抗體或其抗原結合片段、變異體或衍生物(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體))之藥物之前已接受一或多種其他療法(例如經至少一種其他抗癌療法治療)。個體不一定為用一或多種先前療法進行之預治療之反應者。因此，接受包含抗-CD73結合分子(例如抗體或其抗原結合片段、變異體或衍生物)之藥物的個體可對先前療法之預治療或對預治療包含多個療法之一或多個先前療法起反應，或可能未能起反應。

本發明亦提供抗-CD73結合分子(例如抗體或其抗原結合片段、變異體或衍生物(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體))與至少一種其他療法之共同投與。抗-CD73抗體與至少一種其他療法可一起在單一組合物中共同投與，或可同時或在重疊時間在各別組合物中一起共同投與。在一些態樣中，抗-CD73抗體可與例如靶向PD-1(計畫性死亡1蛋白)之抗體共同投與。本發明亦提供抗-CD73結合分子(例如抗體或其

抗原結合片段、變異體或衍生物(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體))之用途，其用於製造供治療個體以便治療癌症用之藥物，其中抗-CD73結合分子在個體用至少一種其他療法治療之前投與。

VIII. 診斷

本發明進一步提供在診斷表現CD73之細胞介導之疾病(諸如某些類型癌症)期間適用的診斷方法，其涉及量測來自個體之組織或其他細胞或體液中CD73蛋白之表現量，且將所量測之表現量與正常組織或體液中之標準CD73表現量比較，由此與標準比較之表現量的增加指示病症。

本文所揭示之抗-CD73抗體及其抗原結合片段、變異體及衍生物(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)可用於使用熟習此項技術者已知之經典免疫組織化學方法，分析生物樣品中之CD73蛋白含量(例如參加Jalkanen等人, *J. Cell. Biol.* 101:976-985 (1985); Jalkanen等人, *J. Cell Biol.* 105:3087-3096 (1987))。其他適用於偵測CD73蛋白表現之基於其他抗體之方法包括免疫分析，諸如酶聯免疫吸附分析(ELISA)、免疫沈澱或西方墨點法。適合分析在本文中其他地方更詳細地描述。

「分析CD73多肽之表現量」意欲直接(例如藉由確定或評估絕對蛋白質含量)或相對(例如藉由相對於第二生物樣品中疾病相關之多肽含量比較)定性或定量量測或評估第一生物樣品中CD73多肽之含量。第一生物樣品中之CD73多肽表現量可量測或評估且與標準CD73多肽含量比較，標準係取自獲自未患病症之個體的第二生物樣品或藉由來自未患病症之個體群體之平均含量來確定。如此項技術中瞭解，一旦已知「標準」CD73多肽含量，其可重複用作比較標準。

「生物樣品」意指獲自個體、細胞株、組織培養物或潛在表現CD73之細胞之其他來源的任何生物樣品。自哺乳動物獲得組織活檢及體液的方法在此項技術中已熟知。

IX. 包含CD73結合分子之套組

本發明亦提供包含本文所描述之CD73結合分子中之至少一者(例如本文所揭示之抗-CD73抗體或其抗原結合片段、或該等分子之變異體或衍生物(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體))之套組，其可用於進行本文所描述之方法。在某些態樣中，套組在一或多個容器中包含至少一種經純化之抗-CD73抗體或其抗原結合片段。在一些態樣中，套組含有進行偵測分析所需及/或足夠進行偵測分析之所有組分，包括所有對照、進行分析之說明及用於分析及呈現結果之任何所需軟體。熟習此項技術者將容易認識到本發明之所揭示CD73結合分子(例如抗-CD73抗體或其抗原結合片段(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體))可容易併入此項技術中熟知之確定套組形式之一中。

X. 免疫分析

本文所揭示之抗-CD73結合分子(例如本文所揭示之抗-CD73抗體或其抗原結合片段、該等分子之變異體或衍生物(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體))可利用此項技術中已知之任何方法分析免疫專一性結合。可使用之免疫分析包括(但不限於)使用諸如西方墨點法、放射免疫分析、ELISA (酶聯結免疫吸附分析)、「夾心式」免疫分析、免疫沈澱分析、沈澱反應、凝膠擴散沈澱分析、免疫擴散分析、凝集分析、補體固定分析、免疫放射測定分析、螢光免疫分析、蛋白質A免疫分析之技術的競爭性及非競爭性分析系統，僅舉數例。此等分析為常規的且在此項技術中已熟知(參見例如 Ausubel 等人編，(1994) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc., NY) 第1卷，其以全文引用的方式併入本文中)。

CD73結合分子(例如抗-CD73抗體或其抗原結合片段及其變異體或衍生物(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體))可用於組織學上，如免疫螢光、免疫電子顯微法或非免疫分析中，以原位偵測CD73或其保

守變異體或肽片段。原位偵測可藉由自患者移除組織樣本，且向其施加標記之CD73結合分子(例如抗-CD73抗體或其抗原結合片段、其變異體或衍生物)，較佳藉由將標記之CD73結合分子(例如及抗體或片段)覆蓋至生物樣品上施加來實現。經由使用此類程序，可不僅確定CD73或保守變異體或肽片段之存在，亦可確定其在檢驗組織中之分佈。使用本發明，一般技術者將容易認識到各種組織學方法(諸如染色程序)中之任一者均可進行修改以實現此類原位偵測。

可根據熟知之方法確定既定批次之CD73結合分子(例如抗-CD73抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段、其變異體或衍生物)的結合活性。熟習此項技術者將能夠藉由採用常規實驗確定每次測定之操作及最佳分析條件。

適合於測定經分離之CD73結合分子(例如抗-CD73抗體(例如純系10.3抗體或純系2C5抗體)或其抗原結合片段、其變異體或經改變/突變體衍生物)之結合特徵的方法及試劑為此項技術中已知及/或可購得。設計用於此類動力學分析之設備及軟體可購得(例如BIAcore、BIAevaluation軟體，GE Healthcare；KinExa軟體，Sapidyne Instruments)。

除非另外指明，否則使用細胞生物學、細胞培養、分子生物學、轉殖基因生物學、微生物學、重組DNA及免疫學之習知技術實施本發明，此等習知技術屬於此項技術之技能範圍內。此等技術充分解釋於文獻中。參見例如Sambrook等人編，(1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (第2版；Cold Spring Harbor Laboratory Press)；Sambrook等人編，(1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY)；D. N. Glover編，(1985) *DNA Cloning*, 第I及II卷；Gait編，(1984) *Oligonucleotide Synthesis*；Mullis等人 美國專利第4,683,195號；Hames及Higgins編，(1984) *Nucleic*

Acid Hybridization ; Hames 及 Higgins 編 , (1984) Transcription And Translation; Freshney (1987) Culture Of Animal Cells (Alan R. Liss, Inc.) ; Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986) ; Perbal (1984) A Practical Guide To Molecular Cloning ; 論文 Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.) ; Miller 及 Calos 編 (1987) Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, (Cold Spring Harbor Laboratory) ; Wu 等人 編 , Methods In Enzymology, 第 154 及 155 卷 ; Mayer 及 Walker 編 , (1987) Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Academic Press, London) ; Weir 及 Blackwell 編 , (1986) Handbook Of Experimental Immunology, 第 I-IV 卷 ; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986) ; 及 Ausubel 等人 (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.) 。

抗體工程改造之一般原理闡述於 Borrebaeck 編 (1995) Antibody Engineering (第 2 版 ; Oxford Univ. Press) 中。蛋白質工程改造之一般原理闡述於 Rickwood 等人 編 (1995) Protein Engineering, A Practical Approach (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.) 中。抗體及抗體-半抗原結合之一般原理闡述於以下中 : Nisonoff (1984) Molecular Immunology (第 2 版 ; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.) ; 及 Steward (1984) Antibodies, Their Structure and Function (Chapman 及 Hall, New York, N.Y.)。另外，一般遵循如以下中，在此項技術中已知且未特別描述之免疫學中之標準方法 : Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York ; Stites 等人 編 (1994) Basic and Clinical Immunology (第 8 版 ; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) 以及 Mishell 及 Shiigi (編) (1980) Selected Methods in Cellular

Immunology (W.H. Freeman and Co., NY)中。

闡述免疫學之一般原理之標準參考文獻包括Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York ; Klein (1982) J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (John Wiley & Sons, NY) ; Kennett等人編, (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (Plenum Press, NY) ; Campbell (1984) 「 Monoclonal Antibody Technology 」, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Burden等人編, (Elsevier, Amsterdam) ; Goldsby等人編, (2000) Kuby Immunology (第4版; H. Freeman & Co.) ; Roitt等人 (2001) Immunology (第6版 ; London: Mosby) ; Abbas 等人 (2005) Cellular and Molecular Immunology (第5版; Elsevier Health Sciences Division) ; Kontermann 及Dubel (2001) Antibody Engineering (Springer Verlag) ; Sambrook及 Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press) ; Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall2003) ; Harlow 及Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press) ; Dieffenbach及Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press)。

上文所引述之所有參考文獻以及本文中所引述的所有參考文獻均以全文引用的方式併入本文中。

以下實例係為了說明，而非為了限制而提供。

實例

本發明之態樣可進一步參考以下非限制性實例定義，該等非限制性實例詳細描述本發明之某些抗體的製備及使用本發明之抗體的方法。熟習此項技術者將顯而易知，在不背離本發明之範疇的情況下，可對材料及方法作出許多修改。

CD73(分化簇73)(亦稱為外-5'-核苷酸酶(NT5E))為在腫瘤細胞以及正常基質細胞(諸如內皮細胞及某些白細胞)上發現的跨膜受體。CD73將腺苷單磷酸酯催化成腺苷及有機磷酸酯。腺苷受體之細胞外部分之結合經由環狀AMP發信號以抑制T細胞受體活化(由Linden及Cekic綜述, 2012)。咸信CD73在介導調節性B及T淋巴細胞之抑制功能(Saze等人, 2013)中以及在維持內皮完整性(由Jalkanen及Salmi綜述, 2008)中起作用。

除了其在正常生物學中之作用外, CD73及腺苷影響腫瘤生物學。腫瘤微環境中之細胞外腺苷之存在已描述為免疫抑制「光環」(Antonioli等人, 2013年)。與腺苷之此作用一致, 缺乏腺苷受體之基因剔除小鼠已展示出與正常小鼠相比更易於排斥腫瘤(Ohta等人, 2006)。咸信腫瘤中之細胞外腺苷之主要來源為CD73(Augusto等人, 2013)。與此假設以及使用A2A缺陷型小鼠之研究一致, 缺乏CD73之基因剔除小鼠當相比於正常小鼠時具有增加之抗腫瘤免疫性(Stagg等人, 2011)且展示出癌發生減少(Stagg等人, 2012)。特定言之, 咸信細胞外腺苷尤其介導調節性T細胞及骨髓衍生之抑制細胞(MDSCs)兩者之免疫抑制作用(由Antonioli等人綜述, 2013)。結合展示用小分子或抗體對CD73進行分子抑制可抑制腫瘤形成、生長及癌轉移(由Young等人綜述, 2014)的其他研究一起, 假設腫瘤利用CD73生成腺苷, 且藉此抑制抗腫瘤免疫性。因此, 選擇性結合且抑制CD73之外核苷酸酶活性之抗-CD73抗體可能適用於增強抗腫瘤免疫反應。

實例1：抗-CD73抗體之分離及鑑別

人類scFv噬菌體呈現庫用生物素化CD73細胞外域(ECD)淘選以分離結合於人類、食蟹獼猴及鼠類CD73之抗體。主要抗體CD730010顯示專一性結合於人類、鼠類及食蟹獼猴表現CD73之細胞(利用流式細胞測量術), 且抑制重組可溶性CD73 ECD以及呈現在細胞上之原生

CD73的活性。引發CD730010之親和力成熟以增強CD730010與人類CD73之結合親和力。

在親和力最佳化之前，試圖恢復CD730010與最接近人類生殖系序列同樣多之構架殘基(基於IMGT譜系)且不削弱親和力。如此做使最終抗體藥物在人類中之潛在免疫原性減到最少。VL域之所有構架殘基及VH域之除了一個構架殘基外的所有構架殘基可經恢復以匹配人類生殖系 IGLV1-44、IGLJ3、IGHV3-23及IGHJ2之胺基序列。CD730010之VH域之位置94(Kabat編號；Kabat, 1991)中的離胺酸可能不經恢復且不損失親和力。

生殖系化CD730010抗體之親和力及效能藉由生成CDR變異體之文庫且測試變異體對CD73之經改進結合來最佳化。將親和力改進最佳之數種突變組合以生成候選藥物MEDI9447。MEDI9447之核苷酸及推斷之胺基酸序列展示於圖1A-1D中。

CD73專一性scFv抗體自人類scFv噬菌體呈現文庫在一系列重複交替選擇循環中在由哺乳動物細胞自製之生物素化人類及鼠類CD73細胞外域(ECD)上分離，如Lloyd等人，PDS 22:159-68 (2009)先前所描述。將來自第2輪及第3輪選擇輸出之ScFv基因分批轉化至細菌scFv-Fc或Fab表現載體中。利用ELISA或均相時間分辨螢光(HTRF)針對攜帶可溶性scFv-Fc或Fab之細菌培養物上清液對人類、鼠類及食蟹獼猴CD73 ECD之結合來對其進行篩選。選擇顯示交叉反應性之最前面的命中物，進行DNA測序，且轉化成完整免疫球蛋白G1三重突變體抗體形式(「IgG-TM」，IgG1 Fc序列併有突變L234F、L235E及P331S)。IgG1 TM抗體在哺乳動物細胞中表現，藉由親和層析純化且基於其在結合及功能分析中之特徵分級。

實例2：抗-CD73抗體之抗原決定基分組

抗-CD73抗體彼此競爭結合於人類CD73 ECD之能力在Octet儀器

上評估，基本上如(Abdiche YN等人, Anal Biochem 386: 172-80 (2009)) 所述。將CD73 ECD蛋白及第一抗-CD73抗體預培育且添加至在抗生素鏈菌素感測器上捕獲之生物素化第二抗-CD73抗體中。若第一抗-CD73抗體阻礙CD73 ECD與第二抗-CD73抗體之結合，則將兩個抗體放入相同或重疊抗原決定基組中。若兩個抗體可同時結合於CD73 ECD，則將其放入非重疊抗原決定基組中。抗-CD73抗體之成對測試展示出其屬於3個非重疊抗原決定基組(表2)。

表2：抗-CD73抗體之抗原決定基組

抗原決定基組	抗體
A	CD730002、CD730004、CD730008、CD730011
B	CD730003、CD730010、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047
C	CD730068、CD730069

實例3：抗-CD73抗體與CD73之結合

抗-CD73抗體之結合親和力及專一性利用表面電漿子共振(SPR)及流式細胞測量術測定。

ProteOn XPR36儀器用於表徵MEDI9447與人類、鼠類及食蟹獼猴CD73 ECD之結合。MEDI9447使用抗人類Fc抗體進行親和力捕獲。CD73 ECD在移動相中。CD73與MEDI9447之締合及解離可用朗格繆爾(Langmuir)1:1模型準確描述。表3中展示之結果展現出MEDI9447與來自三種物種之CD73 ECD的親和力相當且在較低皮莫耳範圍內。

表3：利用表面電漿子共振測定之MEDI9447對CD73 ECD之親和力

分析物	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
人類CD73 ECD	2.57×10^6	1.06×10^{-5}	4.1×10^{-12}
鼠類CD73 ECD	2.41×10^6	2.32×10^{-6}	0.9×10^{-12}
食蟹獼猴CD73 ECD	2.71×10^6	1.76×10^{-5}	6.5×10^{-12}

k_a 締合速率常數； k_d 解離速率常數； K_D 解離常數

MEDI9447與人類、鼠類及食蟹獼猴細胞株上表現之原生CD73的結合利用流式細胞測量術表徵。細胞與各種濃度之MEDI9447一起培

育，且用螢光團標記之抗人類Fc抗體監測抗體結合。使用單位點結合等溫線模型非線性擬合中值螢光強度隨MEDI9447濃度而變之圖以計算平衡解離常數。利用流式細胞測量術之分析證實MEDI9447以相當的親和力與人類、鼠類及食蟹獼猴CD73結合(表4)，不過 K_D 值比利用SPR測定之該等值大13-126倍，可能由於重組與原生CD73之間的構形差異。

表4：利用流式細胞測量術測定之MEDI9447對原生CD73之親和力

分析物	K_D (M)
MDA-MB-231細胞(人類)	154×10^{-12}
4T1細胞(鼠類)	113×10^{-12}
MK-1細胞(食蟹獼猴)	84×10^{-12}

為了利用流式細胞測量術測定MEDI9447對人類CD73之專一性，發展細胞株。MDA-MB-231細胞(其為來源於胸膜積液之人類乳癌細胞)用人類CD73短髮夾RNA(shRNA)轉染以阻斷CD73之細胞表面表現的基因表現。Jurkat細胞(來源於伯基特淋巴瘤細胞之T細胞株)經表現人類CD73 mRNA之質體轉染以基因嵌入CD73之細胞表面表現。Jurkat細胞表現極少內源性CD73。

MEDI9447對人類CD73之專一性利用MEDI9447對高表現CD73之細胞株(MDA-MB-231)與對低表現細胞株(MDA-MB-231、CD73-shRNA)之結合的比率測定。MEDI9447對人類CD73之專一性亦利用高表現CD73之細胞株(Jurkat-CD73基因嵌入)與較低表現細胞株Jurkat之比率測定。

MEDI9447對鼠類CD73(mCD73)之專一性利用流式細胞測量術比較小鼠細胞株4T1(高mCD73表現)與阻斷基因表現之細胞株(4T1 mCD73-shRNA)來測定。另外，將MEDI9447對具有鼠類CD73基因嵌入之Jurkat細胞的專一性與野生型Jurkat細胞相比(無鼠類CD73)。

表5：MEDI9447對人類及小鼠CD73之專一性

MEDI9447之專一性	細胞株關係	平均螢光強度比率 (MFIR)
人類	MDA-MB-231 / MDA-MB-231(CD73-shRNA)	3.5
人類	Jurkat (CD73基因嵌入) / Jurkat	7.9
小鼠	4T1 / 4T1(mCD73 -shRNA)	3.9
小鼠	Jurkat (mCD73基因嵌入) / Jurkat	57.1

實例4：CD73利用抗-CD73抗體MEDI9447之內化

CD73之抗體介導之內化或脫落利用流式細胞測量術評估。MDA-MB-231細胞在100 nM MEDI9447或陰性對照抗體R347存在下在生長培養基中在37°C下培育0-4小時。細胞在冰冷的PBS中洗滌且再懸浮。細胞表面上CD73之存在藉由添加10 nM DyLight488標記之偵測抗體來偵測。將細胞培育15分鐘，洗滌且利用流式細胞測量術分析。偵測抗體結合於與MEDI9447抗原決定基不同之CD73的抗原決定基，且兩個抗體同時結合於CD73且無干擾。在與MEDI9447一起培育4小時之後，CD73之細胞表面表現下降至其原始值之73%，表明27% CD73在MEDI9447結合時內化或脫落(錯誤！找不到參照來源。)

表6：在與測試抗體一起培育之後保留在MDA-MB-231細胞之細胞表面上的CD73百分比

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

MEDI9447至細胞株MDA-MB-231(人類乳房癌)及4T1(鼠類乳房癌)中的內化使用作為FabZAP分析(Advanced Targeting Systems, San Diego CA)商業銷售的人類抗體內化套組評估。MEDI9447或陰性對照抗體R347之連續稀釋液與40 nM FabZAP試劑(結合至細胞毒性蛋

白皂草素之多株抗人類IgG抗體之Fab片段)一起預培育且接著添加至細胞株中。在培養3天後，使用作為CellTiter-Glo分析(Promega, Madison WI)商業銷售的發光細胞活力分析量測細胞增殖。此分析用於計算EC₅₀值及最大毒性。FabZAP試劑無法自行內化至細胞中。其結合於測試抗體(例如MEDI9447)且僅在測試抗體內化時具細胞毒性。MEDI9447引起FabZAP內化且以劑量依賴性方式抑制細胞增殖。

表7：細胞毒性FabZAP試劑之抗體介導之內化至MDA-MB-231細胞及4T1細胞中

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

經測試抗體及FabZAP試劑之連續稀釋液處理之MDA-MB-231細胞及4T1細胞的細胞增殖利用CellTiter-Glo分析量測(圖2)。將CellTiter-Glo分析中來自陰性對照抗體R347之信號自MEDI9447之信號減去，且藉由使用非線性回歸分析擬合劑量-反應曲線來計算EC₅₀值及最大毒性。

實例5：利用抗-CD73抗體MEDI9447抑制5'外核苷酸酶活性

在此研究中，MEDI9447之功能活性在使用人類非小細胞癌細胞株NCI-H322量測AMP之CD73催化之水解的活體外分析中測定。MEDI9447之調配物藉由將其儲備溶液在無血清RPMI培養基中稀釋至最終濃度1 μM來製備。R347之調配物藉由將其儲備溶液在RPMI中稀釋至最終濃度1 μM來製備。

NCI-H322細胞以1500 rpm離心5分鐘。移除上清液，且置換為無血清RPMI培養基。細胞懸浮液使用ViCell(Beckman, Coulter)細胞計數器計數。細胞以10,000個細胞/100 μL/孔接種至96孔盤中。添加50 μL 4×濃縮AMP(200 μM)。盤接著在37°C、5% CO₂下培育24小時。將盤離心，且將50 μL培養物上清液孔對孔地轉移至96孔不透光圓底盤

中。接著添加2×ATP。CellTiterGlo®(Promega)根據製造商說明書添加。5'外核苷酸酶之細胞酶抑制在多標記讀取器(Perkin-Elmer Envision Workstation)上量測。樣品使用Prism軟件分析。

MEDI9447在人類活體外系統中專一性抑制腺苷單磷酸酯(AMP)之脫磷酸。在表面表現之CD73之基於細胞的分析中，腺苷單磷酸酯至腺苷之轉化利用MEDI9447而非利用無關同型對照抗體以劑量依賴性方式降低(圖3)。圖3中描繪之結果使用表現CD73之NSCLC細胞獲得，該等細胞以10,000個細胞/孔接種至96孔非組織培養處理之盤(Falcon 3788)中之無添加劑的100 μL RPMI培養基中。抗體與AMP(200 μM最終濃度)一起一式兩份地添加，且盤在37°C、5% CO₂下培育24小時。盤接著以1500 rpm離心3分鐘。將上清液收集至新的96孔盤(Costar編號3605)中，且添加ATP達至最終濃度100 μM。CellTiter-Glo®試劑(Promega)1:1添加，且細胞CD73酶AMP磷酸化酶活性藉由使用Envision發光盤讀取器(Perkin Elmer)量測ATP含量來測定。僅含ATP及AMP之緩衝液用作陰性對照。重複分析，且圖3展示之結果代表使用其他人類癌細胞株之兩個相似實驗。

此等結果指示MEDI9447抑制癌細胞製造腺苷。咸信腺苷介導腫瘤在腫瘤微環境中之免疫抑制作用。

實例6：利用MEDI9447減少浸潤性骨髓衍生之抑制細胞

CT26細胞(其來源於鼠類結腸癌)藉由將 5×10^5 個懸浮於0.1 mL PBS中之細胞皮下(SC)注射至4至6週齡雌性小鼠之右側腹中來建立。小鼠用MEDI9447或用對照抗體處理。

每組10隻小鼠用於此研究。動物隨機分配至各組中。第1組中之動物未經處理，而第2組投與同型對照。MEDI9447投與第3組。測試物品在第3天開始每週兩次腹膜內投與。在第16天，對來自每組的5隻動物進行屍體解剖且分離腫瘤。

組名稱及劑量呈現在表8中。

表8：組名稱及劑量

組	動物數目(雌性)	處理	給藥天數	劑量(mg/kg) ^a	ROA
1	5	未經處理	N/A	N/A	N/A
2	5	同型	每週2次	20 mg/kg	IP
3	5	MEDI9447	每週2次	10 mg/kg	IP

N/A=不可用；ROA=投藥途徑。

在第1天、第7天、第9天、第12天、第14天及第16天利用測徑規量測腫瘤，且如下計算腫瘤體積：

$$(1)(\text{腫瘤體積長度(mm)} \times (\text{腫瘤體積寬度})^2(\text{mm}))/2$$

MEDI9447之抗癌作用表示為腫瘤生長抑制百分比，其如下計算：

$$(2)(\text{MEDI9447之平均腫瘤體積}/\text{R347-TM之平均腫瘤體積}) \times 100$$

分離腫瘤以用於流式細胞測量術。在研究第16天，自負載CT26腫瘤的小鼠剝離腫瘤。將腫瘤切成小片，且用膠原蛋白酶消化。在30分鐘培育之後，使消化之樣品通過70微米過濾器。離散細胞在4°C下以1000 rpm持續5分鐘集結，且再懸浮於螢光活化細胞分選(FACS)緩衝液中。細胞在Vi-Cell上使用預設設定計數。每孔接種 1×10^6 個細胞。細胞用抗-CD45(以偵測所有白血球)抗-GR1(以偵測MDSC)及抗-Ly6g(粒細胞樣MDSC)染色。資料在LSRII流式細胞儀上獲得。自MDSC分析獲得之顯著p值(若存在)呈現在圖4中，與描述統計(亦即平均值及標準偏差)相鄰。

MEDI9447抑制鼠類CT26同基因型Balb/C腫瘤模型中之腫瘤生長(圖4)。

MEDI9447降低鼠類CT26同基因型Balb/C腫瘤模型中之腫瘤浸潤性MDSC的比例(圖5)。

MEDI9447抑制CT26鼠類同基因型腫瘤之生長。另外，骨髓衍生

之抑制細胞在用MEDI9447處理之後在同基因型CT26結腸癌腫瘤腫瘤中減少。腫瘤內MDSC對腫瘤微環境具有免疫抑制作用，允許腫瘤生長增強。在用MEDI9447處理之後所觀察到的腫瘤內MDSC減少展示出用MEDI9447處理減少腫瘤免疫抑制的機制。

實例7：MEDI9447 mIgG1及抗-PD-1抗體之組合減少腫瘤生長且提高生存率。

同基因型腫瘤藉由將懸浮於HBSS中之0.1 ml 5×10^6 個CT26細胞/ml皮下(SC)注射至8至10週齡動物之右側腹中來建立。利用測徑規量測腫瘤，且使用下式計算腫瘤體積(TV)：

$$(1) TV = (L \times W^2) / 2$$

其中L為腫瘤長度(毫米)且W為腫瘤寬度(毫米)

小鼠基於體重隨機分組。無動物取代。60隻雌性Balb/c小鼠用於此研究。

動物隨機分配至6個組中。投與動物MEDI9447(mIgG1)。測試物品藉由在第3天開始每週兩次腹膜內(IP)注射來投與。組名稱及劑量呈現在表9中。

表9：組名稱及劑量

組	動物數目(雌性)	處理	給藥時程 (每週2次)	劑量 (mg/kg) ^a	ROA
1	10	未經處理	NA	NA	NA
2	10	同型mIgG1	4個劑量	10	ip
3	10	同型rIgG2a	4個劑量	10	ip
4	10	MEDI9447 mIgG1	4個劑量	10	ip
6	10	抗-PD1	4個劑量	0.5	ip
7	10	PD1 + MEDI9447	4個劑量	0.5 + 10	ip

F=雌性；IV=靜脈內；M=雄性；ROA=投藥途徑。

^a 劑量體積：10 mL/kg。

(a)活體內腫瘤抑制研究之結果

將CT26鼠類結腸癌瘤植入至同基因型Balb/C小鼠中且用抗-CD73(MEDI9447 mIgG1)、抗-PD1或組合處理。當相較於單獨抗-

CD73時，組合治療顯著抑制腫瘤生長($p=0.015$ ，ANOVA)(圖6)。繪製出每組動物中之個別動物的腫瘤體積直至研究第40天。到40天研究期結束時，沒有對照組小鼠為無腫瘤的。單獨抗-CD73處理在研究結束時產生10%無腫瘤的動物。在研究結束時，抗-PD1處理亦僅產生10%無腫瘤的動物。引人注目的是，抗-CD73與抗-PD處理之組合產生60%無腫瘤的小鼠。到研究結束時，對照組小鼠中無一者為無腫瘤的。在用抗-CD73(MEDI9447 mIgG1)、抗-PD1或抗-CD73與抗-PD1之組合處理之小鼠中量測CT26腫瘤。對小鼠進行量測直至研究第40天，且當腫瘤達至 2000 mm^3 時進行人道處死。當相較於單獨抗-CD73或抗-PD1處理時，抗-CD73與抗-PD1處理之組合共同引起生存率之統計學上顯著之提高(分別 p 值= 0.005 及 $p=0.038$ ，對數等級檢定)(圖7)。在第40天，相較於「未定義」，該組合之中值生存期延長25及33天(分別為抗-CD73及抗-PD1)(表10)。

表10：在研究第40天時之結果

處理	無腫瘤的小鼠(%)	生存率(%)
未經處理	0	0
同型mIgG1	0	0
同型rIgG2a	0	0
抗-CD73	10	10
抗-PD1	10	20
抗-CD73 + 抗-PD1	60	70

總體而言，抗-CD73抗體MEDI9447 mIgG1當與抗-PD-1抗體組合時在鼠類同基因型CT26結腸癌模型中展示出抗腫瘤活性增強。另外，抗-CD73與抗-PD處理之組合產生60%無腫瘤的小鼠。當相較於單獨抗-CD73或抗-PD1處理時，抗-CD73與抗-PD1處理之組合共同亦引起生存率之統計學上顯著之提高。

實例8：抗-PD-1誘生富CD73腫瘤微環境，如利用腫瘤細胞(圖9)、骨髓衍生之抑制細胞(MDSC)及腫瘤浸潤性CD4+、FoxP3+淋巴細

胞(圖15)上之CD73表現所量測。

同基因型腫瘤藉由皮下(SC)注射同基因型B16F10黑素瘤細胞或同基因型EG7-OVA淋巴瘤細胞來建立。小鼠每週兩次用MEDI9447(10 mg/kg)、抗-PD-L1抗體(10 mg/kg)或MEDI9447(10 mg/kg)與抗-PD-L1抗體(10 mg/kg)之組合處理。每週兩次量測腫瘤體積。以組合形式投與MEDI9447及抗-PD-L1顯著增強黑素瘤腫瘤(圖12)及淋巴瘤腫瘤(圖13)中之腫瘤生長抑制。

為了理解抗-PD-L1對腫瘤微環境之作用，研究淋巴細胞上之CD73表現。小鼠(n=4)經同基因型CT26結腸直腸細胞皮下注射，且每週兩次用10 mg/kg抗-PD-L1或無關同型對照抗體處理。在第一次處理後一天，自引流淋巴結分離細胞，且利用流式細胞測量術分析表面表型。在第一次處理後三天，分離腫瘤，解離細胞且利用流式細胞測量術分析表面表型。抗-PD-L1誘生富CD73腫瘤微環境，如利用引流淋巴結B淋巴細胞(圖14)上及腫瘤浸潤性CD4⁺、FoxP3⁺淋巴細胞(圖15)上之CD73之表面表現所量測。

負載結腸直腸CT26同基因型腫瘤之小鼠每週兩次用MEDI9447(30 mg/kg)或抗-PD-L1(30 mg/kg)或MEDI9447(30 mg/kg)及抗-PD-L1(30 mg/kg)之組合處理。在第16天，收集腫瘤及周邊全血細胞，且利用流式細胞測量術及酶活性分析表面CD73表現。單獨或與抗-PD-L1組合之MEDI9447減少周邊全血細胞(圖16)、腫瘤浸潤性CD4⁺、FoxP3⁺淋巴細胞(圖17)及腫瘤浸潤性CD8⁺淋巴細胞(圖18)上之CD73表現。單獨或與抗-PD-L1組合之MEDI9447亦減少腫瘤細胞上之CD73表現(圖19)。

MEDI9447及對CTLA4、OX40、PD-1及PD-L1具專一性之抗體或融合蛋白與原代人類周邊血液單核細胞一起在混合白血球反應中培育72小時。利用ELISA定量一式兩份上清液中之指定細胞激素。所示資

料表示抗-CD73抗體與4種不同搭配物藥劑之最佳劑量組合。抗-PD-1及抗-CD73組合展示顯著($p < 0.05$)協同作用(圖20)，如利用布利斯表面反應方法(Zhao等人)所測定。細胞激素概況指示骨髓及淋巴譜系均受影響。大於50個供體對已經測試。

總體而言，抗-PD-1及抗-PD-L1抗體形成在周邊中可偵測且藉由用抗-CD73抗體MEDI9447 mIgG1處理可逆的富CD73腫瘤微環境。特定言之，當負載此等腫瘤之小鼠用抗-PD-1或抗-PD-L1抗體處理時，CD73細胞表面表現量及酶活性在鼠類CT26腫瘤上顯著增加。此外，表現及活性量藉由用單獨或與抗-PD-L1抗體組合之抗-CD73抗體MEDI9447處理而減少。在兩種腫瘤中以及在循環周邊全血細胞中觀察到此等變化。因此，CD73表現及活性可用作抗-PDL1及抗-CD73治療兩者的藥效學標記物或用作用抗-PD-1或抗-PD-L1處理之腫瘤因不受調控之CD73表現及活性已「逃脫」的患者之分段的預測生物標記物。重要的是，抗-CD73抗體MEDI9447與抗-PD1或抗-PD-L1 MEDI 4736組合展示出抗腫瘤活性增強。

結合此等結果一起利用各種量度證實，抗-PD-1及抗-PD-L1抗體誘導「富CD73」腫瘤微環境且為將MEDI9447與靶向PD-1/PD-L1軸之療法組合提供有力的基本原理。

實例9：抗-CD730010抗體及抗體變異體

表11：親本抗-CD730010抗體及具有生殖系化胺基酸之抗體變異體之親和力

抗體變異體	VL位置中之胺基酸					VH位置中之胺基酸	EC50 [nM]
	1	2	11	37	39		
CD730010	L	P	V	K	V	R	69
CD730010 GL9	Q	S	A	Q	L	R	64
CD730010 GL10	L	P	V	K	V	K	205
CD730010 GL18	Q	S	A	Q	L	K	132

對於CD730002，最接近的生殖系基因為VH域之IGHV3-23及

IGHJ3以及VL域之IGLV3-1及IGLJ3。鑑別出在CDR區外之四個非生殖系殘基：VH中之R94，及VL中之T20、R57、L81及F87(Kabat編號)(表11)。CD730002 IgG1-TM表現載體中之核苷酸利用標準分子生物學技術回復突變，使得所得表現載體編碼此等位置中之生殖系胺基酸(VH中之K94，及VL中之S20、G57、M81及Y87)。使CD730002 IgG1-TM蛋白變異體表現，純化且利用流式細胞測量術測試對重組人類及鼠類CD73之結合。VL中之所有4個非生殖系胺基酸可變成其生殖系殘基而不削弱結合。然而，VH中之R94對於結合很重要且將其變成K會削弱結合。將變異體CD730002 SGMV(非生殖系化V，完全生殖系化VL)用作模板以便生成親和力最佳化之抗體變異體。

實例10：抗-CD73抗體CD730010GL9之親和力最佳化

CD730010GL9 IgG1-TM藉由篩選包含具有單胺基酸突變之變異體CDR序列的Fab文庫來最佳化。將六個CDR中之61個位置中之每一者個別地隨機化成19個胺基酸(除了半胱胺酸的所有天然胺基酸)，生成具有1159個獨特純系(每個位置19個胺基酸乘以61個位置)之理論多樣性的文庫。細菌Fab片段由文庫之4224個純系產生，且利用捕獲ELISA篩選對人類及鼠類CD73蛋白之結合(分析2)。選擇相較於親本CD730010 GL9 IgG1-TM結合信號增強之180個純系，且利用DNA測序鑑別VH或VL域中之突變。將細菌上清液中之Fab濃度標準化，且經標準化上清液對人類及鼠類CD73蛋白之結合利用直接ELISA評估(分析1)。表12列出所選之有益單胺基酸取代及其對與重組CD73蛋白之結合的作用。

表12：親和力改進之CD730010 GL9之單胺基酸變異體

CDR	胺基酸變化	ELISA信號，相較於親本抗體之改進倍數	
		人類CD73	鼠類CD73
L1	P32E	27.7	6.7
L1	P32D	11.7	6.5
H3	Y102K	9.9	7.4

L2	N51D	8.9	4.5
H2	G54N	8.9	7.1
H2	S52W	8.9	4.4
H3	Y102M	7.9	6.3
H3	Y102L	7.3	5.8
L2	S56G	7.1	5.6
L2	N51A	6.7	2.5
H3	Y102A	6.6	5.0
L1	P32G	6.1	5.8
L1	P32A	6.0	5.5
L2	Q53L	6.0	3.8
L2	Q53Y	5.8	2.3
L2	P55L	5.7	4.3
H2	S56R	5.6	4.9
L2	N51Q	4.2	2.3
H2	G54W	4.2	3.7
H2	A50L	4.2	3.0
L2	Q53F	4.1	2.7
H1	M34Y	3.9	2.9
L2	P55I	3.7	3.2
H3	Y102Q	3.6	3.0
L2	Q53W	3.1	2.7
L2	Q53H	2.4	1.9
L2	L50F	2.2	1.4
H1	S35H	1.8	1.1
H1	M34I	1.5	1.1

為了進一步改進抗-CD73抗體之親和力，將當相較於親本CD730010 GL9時結合改進之數種單胺基酸變化組合以形成組合性Fab文庫(分析4)。在大腸桿菌中產生組合性文庫之4224個純系之Fab片段，且利用捕獲ELISA篩選對人類及鼠類CD73蛋白之結合。選擇來自每一篩選分析之最前面的20個純系以便進一步表徵。將上清液中之Fab濃度標準化，且利用捕獲ELISA及直接ELISA測試經標準化上清液之連續稀釋液對人類及鼠類CD73之結合。純系C1、C2、D3及G10展示出與人類及鼠類CD73之較強結合，且選擇其以用於進一步表徵。

CD730010 GL9之抗原結合亦使用基於親和力之噬菌體選擇進行最佳化。來源於主要CD730010 GL9序列之大型scFv文庫藉由可變重鏈(VH)互補決定區3(CDR3)或可變輕(VL)鏈CDR3之寡核苷酸引導之突變誘發使用如所描述之標準分子生物學技術(Finch等人, JMB 411,

791-807 (2011))來形成。用生物素化人類及鼠類CD73細胞外域蛋白在一系列重複交替選擇循環中淘選文庫。將來自第3輪選擇輸出之ScFv基因分批轉化至細菌IgG表現載體中。針對含有可溶性IgG之細菌培養物上清液與人類及鼠類CD73之結合對其進行篩選。使相較於親本CD730010 GL9對CD73之結合顯著改進的IgG變異體經歷DNA測序。選擇兩種變異體GRVE及HPT用於進一步表徵。

為了產生進一步親和力改進，將自組合性Fab文庫及自基於親和力之噬菌體選擇鑑別出的有益突變組合，形成變異體73combo1至73combo6。

實例11：抗-CD73抗體CD730002SGMY之親和力最佳化

CD730002SGMY IgG1-TM藉由如對於CD730010GL9所述篩選包含具有單胺基酸突變之變異體CDR序列的Fab文庫來最佳化。鑑別出使得與重組CD73之結合信號增強的VH域中之五個胺基酸突變及VL域中之四個胺基酸突變。表13列出有益單胺基酸取代及其對與重組CD73之結合的作用。

表13：親和力改進之CD730002SGMY之單胺基酸變異體

CDR	胺基酸變化	FACS信號，相較於親本抗體之改進倍數
		MDA-MB-231細胞
H1	Y32V	1.2
H1	M34R	1.1
H2	T57P	1.5
H2	A60G	1.3
H2	G65R	1.3
L2	T52S	1.5
L2	R54Y	1.2
L2	P55L	1.9
L2	P55H	1.5

為了進一步改進抗-CD73抗體CD730002SGMY之親和力，製備具有一個在VH域中之有益胺基酸變化及一個在VL域中之有益胺基酸變化的IgG變異體。抗體變異體藉由瞬時轉染293F細胞來製備，且利用

流式細胞測量術篩選對MDA-MB-231細胞之結合。純系2C5與親本CD730002SGMY相比具有3倍較低的EC50值。

實例12：最佳化抗-CD73抗體之親和力

最佳化抗-CD73抗體(呈IgG1-TM形式)對人類、鼠類及食蟹獼猴CD73之親和力利用流式細胞測量術及表面電漿子共振(SPR)測定(表14)。最佳化抗體對來自三種物種之細胞及重組CD73具有pM親和力。

表14：抗-CD73抗體對人類、鼠類及食蟹獼猴CD73之親和力

	KD [pM]					
	流式細胞測量術			SPR (Proteon)		
	MB-MDA-231 (人類)	4T1 (鼠類)	MK-1 (食蟹獼猴)	人類 CD73	鼠類 CD73	食蟹獼猴 CD73
CD730010	8000	6100	ND	3580	2470	1920
CD730010GL9	8949	16365	16460	1640	ND	ND
P32E	178	145	110	63	35	27
C1	179	95	160	29	6	12
C2	158	67	105	23		
G10	354	259	258	9		
HPT	739	5812	1138	548		
GRVE	125	88	101	29		
73combo1 (C1+GRVE+HPT)	157	150	90	7	2	8
73combo2 (C2+GRVE+HPT)	166	64	74	5		
73combo3(D3+GRVE+HPT)	154	113	84	4	1	7
73combo5 (G10+GRVE+HPT)	169	205	78	7		
73combo6(GRVE+HPT)	166	82	107	15		
CD730002	52	50	52	7	40	15
CD730002 2C5	84	55	63	9	22	9

實例13：抗-CD73抗體之內化

抗-CD73抗體至細胞株MDA-MB-231及4T1中之內化使用FabZAP分析(Advanced Targeting Systems, San Diego CA)評估。細胞株在抗-CD73抗體及FabZAP試劑存在下培育。在3天之後，量測細胞增殖以計算EC50值及最大毒性(表15)。FACS資料展示出親和力最佳化之抗體之內化速率較低。

表15：抗-CD73抗體之內化

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

在另一實驗中，抗體至細胞株中之內化藉由分析抗-CD73抗體/皂草素結合物對CD73陽性細胞株之細胞毒性作用來評估(表15)。抗-CD73抗體使用S-HyNic及4FB化學物質(Solulink, San Diego CA)直接結合至皂草素毒素，且測定抑制細胞生長50%所需之抗體/皂草素結合物濃度。

表15：抗-CD73抗體之表徵

抗體	1/EC ₅₀ (nM)					
	結合			酶抑制		內化
	人類	小鼠	食蟹獼猴	rCD73	MDA-MB-231	MDA-MB-231
CD730002	1.0E-001	2.4E-002	2.0E-001	2.10E-02	1.20E+01	2.10E-02
CD730003	1.8E-004	2.3E-004	4.8E-005	2.00E-03	7.00E-03	2.00E-03
CD730004	2.3E-005	2.3E-004	2.0E-006	0.00E+00	6.00E-02	0.00E+00
CD730008	1.1E-003	5.8E-004	1.1E-003	0.00E+00	1.10E-01	0.00E+00
CD730010	3.4E-003	2.4E-003	3.3E-003	6.20E-03	3.30E-01	6.20E-03
CD730011	2.1E-003	1.5E-003	2.7E-003	0.00E+00	6.80E-04	0.00E+00
CD730021	8.5E-004	5.7E-004	1.2E-003	1.10E-03	9.50E-03	1.10E-03
CD730042	1.7E-003	0.0E+000	1.4E-003	0.00E+00	3.20E-03	0.00E+00
CD730046	4.1E-003	5.2E-003	1.0E-002	0.00E+00	8.10E-02	0.00E+00
CD730047	0.0E+000	0.0E+000	0.0E+000	1.00E-03	2.70E-02	1.00E-03
CD730068	ND	ND	ND	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
CD730069	ND	ND	ND	3.80E-02	1.30E-03	3.80E-02

實例14：抗人類CD73抗體Phen0203 hIgG1在活體外以濃度依賴性方式抑制AMP介導之CD4+CD25-T細胞增殖之抑制。

進行研究以測定抗-CD73抗體(Phen0203)在活體外減輕AMP介導之T細胞抑制之能力。在此活體外研究中，檢查抗人類CD73抗體(Phen0203 hIgG1)抑制CD73催化腺苷單磷酸酯成為腺苷及有機磷酸酯

之能力及對T細胞功能之後續影響。Phen0203 hIgG1與MEDI9447具有相似功能特性，包括在活體外抑制CD73之細胞及生物化學酶活性的能力。

Phen0203 hIgG1抗體為重鏈恆定區中未經工程改造的人類IgG1單抗。與MEDI9447相似，其亦選擇性地結合於人類CD73且抑制利用人類CD73之外核苷酸酶活性製造免疫抑制性腺苷。然而，Phen0203缺乏針對小鼠CD73之交叉反應性。

在針對AMP介導之T細胞抑制之分析中，將耗盡CD25⁺細胞之原代人類CD4⁺ T細胞自白血球錐之內含物分離且用作效應細胞；每一錐分開處理。簡言之，將來自白血球錐之內含物稀釋於PBS中，接著於Ficoll-Paque Plus(GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK)上分層且以400×g在制動器關閉情況下離心40分鐘。周邊血液單核細胞(PBMC)接著自界面分離且藉由以200×g離心10分鐘用PBS洗滌。丟棄上清液，且將細胞懸浮於PBS中。測定活細胞，接著以350×g持續5分鐘集結，且以5×10⁷個/mL的濃度懸浮於Robosep緩衝液(Stem Cell, Grenoble, France)中。CD4⁺ T細胞使用EasySep人類CD4⁺ T細胞增濃套組(Stem Cell, Grenoble, France)及RoboSep(Stem Cell, Grenoble, France)藉由陰性選擇自PBMC分離。將經純化之CD4⁺ T細胞集結，且以1.5×10⁷個/mL再懸浮於Robosep緩衝液中。Dynabeads CD25(Dynabeads調節性CD4⁺CD25⁺ T細胞套組之組分；Life Technologies, Paisley, UK)以200 μL/1.5×10⁷個細胞添加且在4°C下在連續混合下培育25分鐘。接著將細胞置放至DynaMag-15磁體(Life Technologies, Paisley, UK)中1分鐘，且將含有CD4⁺CD25⁻效應細胞之上清液轉移至新試管中。

經分離之效應細胞用CFSE探針(3 μM)使用CellTrace CFSE細胞增殖套組(Life Technologies, Paisley, UK)以在含有0.1% BSA之PBS中每毫升1×10⁶個細胞的細胞密度在37°C下以15分鐘培育期標記。細胞用

溫熱的X-Vivo 15培養基洗滌兩次且以 5×10^5 個細胞/mL懸浮在相同培養基中。經標記之效應細胞在 37°C 下藉由添加 $25 \mu\text{L}$ 抗-CD3及抗-CD28塗佈之微珠(Dynabeads人類T-活化劑CD3/CD28; Life Technologies, Paisley, UK)/ 1×10^6 個細胞及 60 IU/mL rhIL-2活化1小時。其後，將經活化 $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ 細胞(約50,000個於 $100 \mu\text{L}$ 中)添加至無菌圓底96孔盤之孔中。以下試劑之連續稀釋在X-Vivo 15培養基(Lonza, Slough, UK)中進行：測試物品Phen0203 hIgG1及R347對照抗體。

向盤中之細胞中依序添加 $50 \mu\text{L}$ 經稀釋試劑及含有 $400 \mu\text{M}$ 或 $800 \mu\text{M}$ AMP(Sigma-Aldrich, Gillingham, UK)之 $50 \mu\text{L}$ X-Vivo 15(Lonza, Slough, UK)。亦包括以下對照孔：無AMP之經活化經CFSE標記之 $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ 細胞(活化對照)；具有AMP但無測試/對照物品之經CFSE標記之 $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ 細胞(未經處理之對照)；及無AMP之未經活化(靜息對照)經CFSE標記之 $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ 細胞。該分析中之細胞藉由以 $100 \times g$ 離心2分鐘來輕緩集結，且在具有 $5\% \text{ CO}_2$ 之 37°C 加濕組織培養培育箱中置放72小時。

在培育72小時之後，細胞藉由以 $380 g$ 離心4分鐘來集結，用 $100 \mu\text{L}$ FACS緩衝液(eBioscience, Hatfield, UK)洗滌一次，且最後懸浮於 $100 \mu\text{L}$ 含有 3.7% 甲醛之PBS中以便在BD FACSCanto II(BD Biosciences, Oxford, UK)上進行流式細胞測量術分析。無AMP之靜息 $\text{CFSE}^+ \text{CD4}^+\text{CD25}^-$ 細胞孔用於鑑別已經歷細胞分裂之細胞(分裂細胞)。

發現CD73表現在 CD4^+ T細胞之子集上。在細胞外AMP存在下， CD73^+ T細胞具有啟動旁分泌/自分泌路徑之潛力，其涉及AMP利用CD73至腺苷之代謝，接著腺苷受體之活化及T細胞功能之後續調節。此CD73/腺苷路徑藉由使用由TCR信號傳導及rhIL-2活化之經純化之

CD4⁺CD25⁻原代人類T細胞在活體外模型化。T細胞增殖在100或200 μM細胞外AMP存在下經抑制。

Phen0203 hIgG1(抗人類CD73抗體)能夠在活體外以濃度依賴性方式抑制AMP介導之CD4⁺CD25⁻T細胞增殖之抑制。該等資料為靶向AMP/CD73/腺苷路徑之免疫抑制性作用的抗-CD73抗體方法提供科學基本原理。

實例15：MEDI9447抗原決定基及互補位定位

為了鑑別MEDI9447與CD73之結合界面，氫氙交換MS(HDX-MS)分析用單獨或呈複合物形式之MEDI9447 Fab及重組可溶性CD73(sCD73)進行(圖19A、19B及20A-20E)。近年來，已證實氫氙交換MS(HDX-MS)為定位蛋白-蛋白相互作用之位點以及表徵蛋白結構及構形動態中強大工具。藉由以由溶劑可接近性介導之方式利用蛋白區域之差異標記，已使用HDX-MS成功定位抗體抗原決定基。比較游離及複合CD73之間的氫交換動力學揭露位於sCD73之N端域中之兩個區域(胺基酸(aa)132-143及182-187)，該等區域展現出當結合於Fab時氫攝取減少(圖19A、20A及20B)。區域132-143(HDX_E1)展示出僅在最短暴露時間點下攝取之顯著變化。在較長暴露時間下，不存在交換差異。不受特定理論限制，此指示該位點僅部分經保護免遭溶劑。相比之下，區域182-187(HDX_E2)中之氫攝取差異程度隨暴露時間增加。不受特定理論限制，此與減少溶劑可接近性之高親和力蛋白-蛋白相互作用一致(圖19A)。Fab之分析展示出重鏈之互補決定區(CDR)1及3以及輕鏈之CDR1及CDR2當與CD73形成複合物時呈現出交換下降最大，指示此等區域為互補位之主要組分(圖20C及20D)。儘管CD73 aa 132-143(HDX_E1)及182-187(HDX_E2)在序列空間上為非連續的，但其在映射至CD73之摺疊結構上時為鄰近的(圖19B)。在CD73中之其他區域下觀察到氫交換差異。然而，大部分質量變化(包括含有已知

受質結合及活性位點殘基之肽的彼等)在統計學上不顯著(圖19A及20E)。

隨著HDX報導多肽主鏈溶劑暴露中之環境依賴性變化，需要驗證以區分開因抗原決定基-互補位界面中之主鏈掩蔽所致的氫交換差異與由抗體結合間接或變構誘導的構形改變。為了測定HDX_E1及HDX_E2是否構成MEDI9447抗原決定基，評估結合於域調換之嵌合CD73突變體的抗體(圖21A-21H及表16)。

表16：MEDI9447與CD73變異體之結合

CD73構築體	KO調換/突變位置	KD(M)	ka (1/Ms)	kd(1/s)
野生型人類CD73	野生型人類CD73	4.20E-12	4.83E+06	1.94E-05
KO_N端+C端	KO_1-291+311-523		無結合	
KO_N端	KO_1-291		無結合	
KO_連接子	KO_292-310	4.14E-12	5.57E+06	2.31E-05
KO_C端	KO_311-523	1.70E-12	4.75E+06	8.10E-06
HDX_E1	KO_132-143	9.90E-12	2.15E+06	2.12E-05
HDX_E2	KO_182-187*	2.83E-09	5.73E+06	1.62E-02
HDX_E1+E2	KO_132-143+182-187*	4.43E-09	4.76E+06	2.11E-02
V144K	V144K	8.14E-11	1.13E+06	9.18E-05
K180A	K180A	4.35E-11	3.45E+06	1.54E-04
N185G	N185G*	2.69E-11	9.11E+06	2.45E-04
V144K+K180A	V144K+K180A	2.68E-09	1.58E+06	4.25E-03
V144K+N185G	V144K+N185G		無結合	
K180A+N185G	K180A+N185G		無結合	

*動力學值來源於2:1適配。

域調換為藉此不結合相關抗體之目標蛋白(亦即人類CD73)之同系物用於生成顯露組成抗原決定基之彼等殘基之嵌合體的技術。與引入缺失相反，交換同系物之間的序列使總體破壞蛋白結構或防止蛋白表現之可能性減到最小。原雞(*Gallus gallus*，雞)CD73與成熟人類CD73共有約65%序列一致性(圖22)。當人類CD73 N端域(KO_1-291)或N端域及C端域兩者(KO_1-291+311-523)藉由用相應雞序列置換而經基因剔除時，調換之嵌合體與MEDI9447之結合丟失(圖21A-21H及表16)。相較於野生型(WT)蛋白，基因剔除僅C端域(aa 311-523)或 α 螺旋

連接子區域(aa 292-310)不影響結合(圖21A、21D、21E及表16)。此等結果與CD73之N端域中的抗原決定基位置一致。接著，分別及組合基因剔除每一HDX界面區域。MEDI9447與KO_HDX_E1之結合與WT CD73相當，不過締合速率 k_a 輕微下降(圖21F及表16)。相比之下，對KO_HDX_E2之結合親和力與WT CD73相比顯著較弱，由較快解離驅動(圖21F及表16)。基因剔除兩個區域(KO_HDX_E1+E2)使得與單獨區域E2相比結合僅少量下降(圖21G及表16)。此等發現指示儘管區域182-187(及在較低程度上132-143)含有對抗體結合很重要的殘基，但在HDX鑑別之界面外部的其他殘基構成抗原決定基。

為了充分定義MEDI9447抗原決定基，生成序列調換之嵌合體組，用相應雞序列置換人類CD73之N端域之約70 aa伸長部(圖22、23A及23B)。基因剔除單獨區域2(DS2)或3(DS3)減少結合，且兩個區域一起(DS2_3)調換基因剔除結合(圖23A及23B)。基因剔除區域4(DS4)或區域1(DS1a)之一部分(調換完整區域防止表現)不影響結合(圖23A及23B)。使用含有約20-30個aa調換區域之嵌合體的結合分析揭露子區DS2d(aa 135-152)及DS3b(aa 171-188)含有影響MEDI9447結合之殘基(圖23A及23B)。當子區2d之一部分(DS2dmod)與區域3b(DS2dmod_3b)調換時，結合丟失(圖23A及23B)。值得注意的是，這兩個子區涵蓋由HDX研究鑑別之界面(圖22)。兩個HDX區域一起調換不消除結合之觀察結果指示介導結合之其他殘基位於子區2d及3b中，而非在HDX鑑別之位點中。為了定位此等其他抗原決定基殘基，評估結合於含有單一點突變或點突變與區域調換之組合的CD73嵌合體組之抗體。亦對HDX界面中之殘基及空間接近HDX界面之殘基進行丙胺酸突變誘發，該等殘基在雞與人類CD73之間保守(圖22、23A及23B)。此等分析揭露V144、K180及N185為主要抗原決定基殘基，且N185為最重要的(圖23A、23B及24)。將N185G突變與K180A或

V144K組合消除結合，而突變K180及V144一起引起結合減少(圖23A及23B)。除了K180之外，已發現三個其他保守殘基Y135、K136及N187實現結合，但程度較小(圖23A、23B及24A)。此等後三個殘基之影響藉由將其在此域調換之KO背景情形下突變成丙胺酸來揭露；作為排他性點突變，其對親和力影響極小或無影響(圖23A及23B)。為了驗證V144、K180及N185為抗原決定基之重要組分，雞CD73用V144及N185置換(K180為保守的)。此三個殘基之存在賦予MEDI9947以亞奈莫耳親和力($K_D=79$ pM)結合(圖23A、23B及24B)。不受特定理論限制，此指示MEDI9447與CD73之結合主要由此三個胺基酸位置介導。值得注意的是，儘管HDX分析鑑別出結合界面之一般位置，但三個重要抗原決定基殘基中之兩個不含有在展現氫交換變化之肽中(圖20A及20B)。

將所鑑別之抗原決定基覆蓋至CD73之結構上展示出結合位點位於CD73之開放構形的頂端、側向表面(圖24C-24E)。N185位於N端域頂端附近，位於自含有K180之螺旋G向外延伸的環區域中(圖24C)。Y135及K136位於 β 股6上，且與K180相鄰。V144位於 β 股7中，與N187密切接觸(圖24C)。總體而言，此等殘基之側鏈形成接近連續結合表面(圖24D)。當查看CD73單體開放結構時，很明顯，抗原決定基在相對面上且在空間上遠離受質結合位點(圖24F)。另外，結合位點不涵蓋任何活性位點殘基，包括協調與 Zn^{2+} 輔因子相互作用之殘基(圖24F)。不受特定理論限制，預測MEDI9447不競爭AMP結合，但改為經由可能的變構機制(基於抗原決定基之位置)抑制CD73酶活性。

實例14：MEDI9447抑制CD73酶活性

為了表徵MEDI9447抑制模式，首先在MEDI9447或CD73之不可水解抑制劑APCP存在下檢查AMP之sCD73水解之動力學。MEDI9447非競爭性抑制sCD73，如由 V_{max} 降低(4.59 ± 0.26 相對於 1.21 ± 0.03)所證

明，與受質濃度無關(圖 25A)。相比之下，APCP增加米氏常數 K_m (75.85 ± 3.36 相對於 26.03 ± 3.87)，但不降低 V_{max} (3.35 ± 0.04 相對於 3.50 ± 0.11)，與 APCP 為 CD73 之競爭性抑制劑的先前發現一致(圖 25B)。此等結果展示出 MEDI9447 阻斷 sCD73 水解 AMP 之能力。另外，其指示 MEDI9447 不阻礙 AMP 受質之結合，此與抗原決定基之位置一致。

接著，測試隨呈 IgG 或 Fab 形式之 MEDI9447 之濃度增加而變的 sCD73 之抑制。MEDI9447 IgG 以劑量反應方式抑制 sCD73 活性，且最大抑制實現 IgG 與 sCD73 二聚物之間約 1:1 之莫耳比(圖 25C)。然而，當 IgG 相對於 sCD73 化學計量過量時，觀察到抑制損失(圖 25C)。已在其他免疫分析中觀察到此所謂的「卡鉤作用」，且其可由利用競爭限制目標抗原上之結合位點之相同 IgG 分子上之 Fab 臂驅動的單價抗體結合引起。與此觀察結果一致，MEDI9447 之 Fab 形式不抑制 sCD73 活性(圖 25C)。此等結果共同指示需要 MEDI9447 之二價相互作用來抑制 sCD73 功能。

實例 15：MEDI9447 防止 CD73 之構形過渡至關閉狀態

CD73 之先前結構性研究揭露 CD73 之酶活性需要「開放」與「關閉」構形之間的過渡。在開放狀態中，酶為不活化的，而在關閉狀態中，形成活性位點，實現受質水解。人類 CD73 之晶體結構之測定展示出，開放與關閉構象異構體之間的過渡需要 α 螺旋連接子區域之廣泛彎曲及旋轉，以允許 N 端域相對於 C 端域再定位，從而形成活性位點。假設 MEDI9447 之兩個 CD73 N 端域上之每一 Fab 臂之接合可形成橋接，其限制 CD73 自不活化的開放狀態過渡至催化活性的關閉狀態。為了測試 MEDI9447 是否抑制 CD73 構形過渡，使用抗體單抗 A，其經開發作為 CD73 構形之報導體。定位單抗 A 之結合界面展示出其與 CD73 之 N 端域及 C 端域兩者相互作用(圖 26A-26C)。考慮到結合區之位

置，假定抗原決定基將存在於CD73開放構象異構體中，但在關閉構象異構體中經破壞(圖26B)。為了測試此點，量測單抗A與開放的無受質sCD73及關閉sCD73之結合(圖27A-27C)。為了誘發關閉構形，將sCD73與 Zn^{2+} 及APCP一起預培育；此輔因子及不可水解受質先前用於生成人類CD73之關閉構象異構體之晶體結構。結合分析展示出，單抗A結合於開放sCD73，但結合在CD73與 Zn^{2+} 及APCP一起預培育時消除(圖27A)。不受特定理論限制，此發現與單抗A抗原決定基僅存在於CD73之開放結構中一致。相比之下，MEDI9447結合對CD73之不敏感，指示其可結合於無受質的或經結合的CD73(圖27A)。單抗A之結合損失視 Zn^{2+} 及APCP兩者而定(圖28A)。已建立單抗A結合報導CD73之構形狀態，接著測試MEDI9447對 Zn^{2+} /APCP誘導之CD73結構過渡之作用。單抗A結合於與MEDI9447一起預培育之sCD73，指示兩個抗體結合於不同抗原決定基(圖27B)。重要的是，當sCD73-MEDI9447複合物隨後與 Zn^{2+} 及APCP一起培育時，單抗A之結合得以維持(圖27B)。相比之下，對照IgG及MEDI9447之Fab形式當與sCD73預複合時在添加 Zn^{2+} 及APCP之前不恢復單抗A結合(圖28B)。此等結果支持以下假設：二價MEDI9447結合防止sCD73自開放狀態過渡至完全關閉的水解活性構形。單抗A結合在MEDI9447經結合時僅部分維持之觀察結果指示 Zn^{2+} 及APCP可誘發CD73採用催化不活化的中間態，其以較低親和力結合至報導抗體(圖27C)。

實例16：sCD73及MEDI9447形成二聚物間橋接複合物

所觀察到的MEDI9447抑制活性可經由單一CD73分子之N端域、二聚物間橋接、或經由各別CD73分子之二聚物內橋接發生。為了區分開此等情形，表徵在溶液中形成之複合物之大小。基於所量測之未結合的MEDI9447及CD73之質量(分別為145及125千道爾頓(kilodalton, kD))，抗體與CD73之二聚物間橋接1:1複合物之預測大小

將為約270 kD(圖29A)。當MEDI9447及sCD73以1:1莫耳比結合時，形成兩個複合物。主導性物質之重量平均莫耳質量(Mw)為約1.74兆道爾頓，而較不豐富的物質之Mw為約0.66 kD(圖30A)。最大複合物之Mw與含有七個CD73二聚物及六個IgG之寡聚物($7 \times 125 \text{ kD} + 6 \times 150 \text{ kD} = 1.745$ 兆道爾頓)一致。當MEDI9447為限制性(0.5:1, 0.1:1)時，形成Mw相當的複合物，但每一物質之豐度之相對差異較不明顯(圖30A)。與MEDI9447形成之複合物與和不同抗-CD73抗體單抗B形成之複合物相比。單抗B與域調換之CD73嵌合體組的結合分析展示出其結合於CD73之N端域中的區域，與MEDI9447相對比，該區域接近CD73單體之間形成的溝槽(圖29B及19B)。假定在此內部定位之表面處的結合可排除單抗B之Fab臂跨越CD73二聚物橋接。實際上，SEC-MALS展示出單抗B形成約270-295 kD(Mw接近對於1:1相互作用所預測之Mw)之複合物(圖30C)。總體而言，該等發現指示，MEDI9447在多個sCD73二聚物之間形成二聚物間橋接，且此等寡聚物之產生由抗原決定基帶來。

實例17：MEDI9447經由單價相互作用抑制錨定之CD73

儘管CD73在活體內自細胞表面脫落且以其可溶性形式保留酶活性，但大部分原生CD73以GPI錨定形式存在。鑒於此以及前述研究用CD73之可溶性形式進行的事實，有必要在CD73呈固定狀態之情況下表徵MEDI9447活性。在鍍塗佈之微量滴定盤上經由C端六個組胺酸標記捕獲重組CD73允許吾等分析固定CD73之酶活性，其在空間上以類似於細胞表面上GPI錨定之CD73之方式的方式定向。與吾人之先前結果相似，MEDI9447 IgG以劑量依賴性方式抑制AMP水解(圖31A)。然而，當抗體相對於CD73二聚物莫耳過量時，觀察到抑制或卡鉤作用不損失(圖31A及32)。出乎意料地，MEDI9447 Fab亦抑制CD73活性但與MEDI9447 IgG相比最大抑制較低(圖31A及32)。此等結果指示不

同於可溶性CD73，錨定之CD73可經由單價抗體相互作用經抑制。IgG與Fab之間的抑制差異提示抗體分子之大小可指示效能。為了對此進行研究，將MEDI9447 Fab與抗-xFd抗體(xFd)在使得xFd抗體之一個Fab臂結合MEDI9447 Fab而其他臂結合非專一性多株Fab(pFab)的條件下一起預培育(圖31B)。此複合物之形成有效增加MEDI9447 Fab之大小，同時維持對CD73之單價性。此xFd結合之Fab以與MEDI9447 IgG相等的程度抑制CD73活性(圖31A)。為了驗證此觀察結果，在人類上皮乳癌細胞株MBA-MD-231中量測內源性表現之CD73之抗體抑制。與固定之重組CD73相似，GPI錨定之CD73由MEDI9447 IgG強勢抑制，由MEDI9447 Fab適度抑制，且Fab預結合至xFd抗體增加最大抑制達至相當於IgG之程度(圖31C)。最後，測試結合於xFd抗體之一個或兩個臂之MEDI9447 Fab對sCD73之抑制。不同於表面結合之CD73，sCD73不由結合於單一xFd臂之MEDI9447 Fab抑制(圖31D)。然而，藉由MEDI9447 Fab結合至兩個xFd臂來賦予二價會引起與MEDI9447 IgG相當的sCD73抑制(圖31B及31D)。此等發現展示出表面錨定之CD73可藉由單價抗體結合來抑制且效能由抗體之大小介導。此與僅由MEDI9447經由二價相互作用抑制之sCD73形成直接對比。

實例18：MEDI9447利用雙重非競爭性作用機制抑制CD73構形變化及AMP水解

如本文所述，測定抑制CD73之酶活性的治療性單株抗體之抗原決定基及作用機制。此研究結果揭露CD73 N端域中之結合位點，該結合位點經由兩種不同的機制實現抑制。重要的是，此特徵賦予MEDI9447以非競爭性方式阻斷可溶性的及細胞表面錨定的CD73兩者之能力。

使用HDX-MS，鑑別CD73與MEDI9447 Fab之間的結合界面。歸因於來源於胃蛋白酶消化之相對較大的肽，利用交換分析鑑別之相互

作用位點相對較寬，橫跨總共十八個胺基酸跨越兩條非連續肽。域調換及突變誘發實驗展示出僅此等殘基之子集在抗體結合中有影響，且三個最有影響的胺基酸中之兩個(V144及K180)含於不展現差異氫交換之肽中。對此差異之一種解釋為雖然V144及K180側鏈可因與抗體CDR殘基接觸而經遮擋，但經歷氫交換之相關多肽主鏈醯胺氮原子可相對暴露於溶劑。HDX-MS結果亦展示出由aa 132-143構成之區域僅展現在最短暴露時間點下之交換動力學的顯著變化。不受特定理論限制，此指示在此區域處之結合相對較弱。實際上，發現會影響此區域中之結合的兩個殘基(Y135及K136)對MEDI9947親和力僅具有輕微作用(圖23A及23B)。相比之下，差異交換最顯著之區域(aa 182-187)含有對於結合最重要之殘基(N185)。缺乏共晶結構，無法正式排除一些低估為與MEDI9447之相互作用者的殘基確實與互補位形成接觸之可能性。然而，深入的突變體結合分析指示此等可能的殘基將最低限度地促進結合之熱動力學。由於重鏈CDR3在形成抗原接觸位點中很重要，故此CDR展現最大程度之差異交換。HDX結果亦指定，輕鏈對抗原結合很重要，尤其CDR1及2(圖20C及20D)。總體而言，此等結果突出HDX-MS在抗原決定基定位中之效用以及利用正交技術諸如突變誘發驗證預測之結合界面之重要性兩者。

抗原決定基在遠離CD73受質結合及活性位點殘基之N端域中之位置處的位置與展示MEDI9447具有非競爭性抑制模式之結果一致。基於單獨抗原決定基之足跡，吾人可假設該抗體充當典型變構抑制劑，誘導CD73中以防止水解活性的方式扭曲活性位點殘基之長範圍構形變化。然而，HDX-MS資料不揭露CD73結構中在結合界面以外之區域中的將支持此變構形式之顯著改變。或者，抗原決定基可表明MEDI9447結合會限制N端域中為催化活性所需要的環β股或α螺旋之移動。與此相反，已報導在CD73之開放與關閉結構之間N端域中的二

級或三級結構幾乎沒有或沒有差異。所發生的局部的域間構形變化限於連接子及C端域。

作為誘導結構變化之替代方案，認為抗原決定基之位置將很好地定位以實現將限制構形之必要變化的CD73二聚物之抗體橋接或交聯。此橋接觀念由展示出需要IgG來抑制CD73之可溶性形式以及MEDI9447形成含有多個CD73二聚物之複合物的資料所支持。此後一個結果與不形成二聚物間橋接之單抗B形成對比，突出MEDI9447抗原決定基在賦予此交聯活性中之重要性。合理地，若兩個CD73 N端域與同一IgG之Fab域結合，則此可以物理方式限制為酶採用其關閉的活性結構所需要之N端域及連接子區域的移動。經由使用充當CD73狀態之構形探針之單抗A，展示出，MEDI9447之結合抑制CD73採用如由 Zn^{2+} 及APCP誘導之完全關閉的構象異構體。當MEDI9447與CD73預複合時報導單抗A之中等結合量指示一些程度之構形過渡仍由 Zn^{2+} 及APCP誘導。單抗A結合減少可能反映其抗原決定基在此中間狀態中部分變形，但仍然足以得到結合。鑒於鉸鏈區之可撓性程度較高，不出人意料，即使當MEDI9447橋接CD73二聚物時，仍將存在一些歸因於受質結合之CD73結構變化。不受特定理論限制，難以設想結合之IgG將截獲呈完全剛性構形之CD73。

此工作之出人意料的结果在於除了經由二價相互作用橋接之外，MEDI9447亦可在其表面經由單價結合機制結合時抑制CD73。儘管起初使人迷惑，但錨定之CD73活性之第二種空間介導之阻礙機制與本文所描述之觀察結果一致。催化活性的GPI錨定之CD73之形成需要N端域向下旋轉至接近細胞表面的位置。原生CD73二聚物為約130 kDa。與IgG或Fab之大小(分別為約150 kD及約50 kD)相比，合理的是，結合於N端域之抗體可在空間上阻礙CD73完全旋轉至採用關閉構形。此機製得到兩個觀察結果支持。第一，Fab與IgG相比展現較低最

大抑制的事實與大小依賴性空間作用一致。Fab與IgG之間的不一致不大可能歸因於結合差異，因為Fab親和力仍為亞奈莫耳($K_D=327$ pM，資料未示出)。另外，藉由Fab之有效大小經由與xFd抗體結合而增加所帶來的效能提高亦有力支持大小而非價數或親合力依賴性的空間機制。支持此抑制模式之第二觀察結果為當CD73為表面結合時觀察不到利用MEDI9447 IgG之卡鉤作用或抑制損失。推測起來，此係由於抗體可經由雙價或單價相互作用阻斷AMP之錨定之CD73水解(圖33)。相比之下，當CD73可溶時，觀察到卡鉤作用，歸因於缺乏單價結合之IgG或Fab在空間上阻礙N端域旋轉所需之固相。

因此，提出一種模型，藉此MEDI9447經由與其抗原決定基整體連接之雙重抑制機制拮抗可溶性及GPI錨定之CD73功能(圖33)。儘管本文所描述之研究展示出MEDI9447可在活體內阻斷可溶性及結合之CD73兩者，但尚不知GPI錨定之CD73將經由一種還是兩種機制得以抑制。推測起來，細胞表面上之CD73的密度、定向及二聚物間距離將指示主導的抑制模式。鑒於大部分癌細胞過度表現CD73(此將提高二聚物緊密接近之可能性)，吾人預期MEDI9447將以雙價及單價相互作用兩種形式接合。在CD73表現將處於相對較低表面密度之正常的非腫瘤組織上，MEDI9447可主要經由空間阻礙模式抑制AMP水解。

自機制觀點來看，阻斷CD73為免疫腫瘤學策略，其與可比的目標(諸如PD-1及CTLA-4，對於其已有獲准藥物)之策略不同。自治療觀點來看，MEDI9447之活性為有利的。其非競爭性地抑制CD73，且因此，不必藉由阻斷活性位點來與內源性核苷酸競爭結合。此避免對其他具有結構上保守的活性位點之核苷酸/側面結合蛋白之可能的交叉反應性。另外，MEDI9447可經由單價或二價接合抑制可溶性及膜結合之CD73兩者。預期此等特徵均將有助於活體內功效。此治療性單抗單獨及與靶向互補免疫調節路徑之現有化學治療劑之組合均具有

治療癌症之免疫調節潛力。

上文描述的結果使用以下材料及方法進行。

分析1：直接ELISA

384孔ELISA盤經約1.5 ng/孔重組CD73蛋白塗佈，用1% BSA/0.1% Tween20/PBS阻斷，且與抗體樣品一起在室溫下培育90分鐘。此後在室溫下與山羊抗-Ig λ -辣根過氧化酶(HRP)結合物一起培育30分鐘。HRP活性用四甲基聯苯胺(TMB)受質偵測，且用1 M HCl停止反應。在450 nm下讀取盤。

分析2：捕獲ELISA

384孔ELISA盤經約3 ng/孔綿羊抗人類Fd抗體(用於篩選呈Fab形式之抗體)塗佈，用1% BSA/0.1% Tween20/PBS阻斷，且與樣品一起在室溫下培育90分鐘。接著在室溫下添加生物素化CD73蛋白持續1小時。此後在室溫下與抗生蛋白鏈菌素-辣根過氧化酶(HRP)結合物一起培育30分鐘。HRP活性用四甲基聯苯胺(TMB)受質偵測，且用1 M HCl停止反應。在450 nm下讀取盤。

約50 ng/孔生物素化重組CD73用於篩選具有單胺基酸突變之純系。為了自組合性文庫篩選純系，使用10 ng/孔生物素化重組CD73。

分析3：流式細胞測量術結合分析

所有流式細胞測量術實驗均在4°C下運作，且在PBS/1% FBS緩衝液中製備試劑。10,000個細胞與測試抗體一起在50 μ L體積中培育4小時。將細胞洗滌兩次，且在50 μ L山羊抗人類IgGFc-AlexaFluor647結合物中培育15分鐘。洗滌細胞，再懸浮於補充有Dapi之緩衝液中，且在流式細胞儀上分析。將由高Dapi染色鑑別之死細胞自分析排除。為了測定KD值，使用單位點結合等溫線模型非線性擬合中值螢光強度隨測試抗體濃度而變之圖。

分析4：生成具有單胺基酸變化之抗體文庫

CD730010 或 CD730002 之 CDR 密碼子之定點突變誘發使用 QuikChange Lightning 多重定點突變誘發套組 (Agilent) 及引子進行。每一密碼子用以密碼子 NNS 置換野生型密碼子之引子進行誘變。將經誘變之 VH 及 VL 基因選殖至 Fab 載體中以便細菌表現。大腸桿菌菌株 BL21(DE3) 用抗體文庫轉型，拾取個別菌落，且在 Magic 培養基 (Invitrogen) 中在室溫下培養 24 小時以產生細菌 Fab 片段。製備細菌上清液，且將其用於在 ELISA 結合分析中篩選抗體文庫。

分析 5：生成具有組合性胺基酸變化之抗體文庫

將 CD730010GL9 VH 及 VL 基因選殖至載體中以便細菌 Fab 表現。CD730010GL9 之 CDR 密碼子之定點突變誘發使用 QuikChange Lightning 多重定點突變誘發套組 (Agilent) 或重疊 PCR 及簡併引子進行。簡併引子經設計以編碼在同一位置處之所選胺基酸變化以及親本胺基酸。大腸桿菌菌株 BL21(DE3) 用 Fab 文庫轉型，個別菌落在 Magic 培養基 (Invitrogen) 中在室溫下培養 24 小時以產生細菌 Fab 片段。細菌上清液用於在 ELISA 結合分析中篩選抗體文庫。

分析 6：FabZAP 分析

1,000 個細胞/孔在 96 孔盤中在 RPMI/10% FBS 中培養。將開始於 5 nM 之抗-CD73 抗體之連續稀釋液與 FabZAP 試劑 (Advanced Targeting Systems, San Diego CA) 混合，且添加至細胞中。在 37°C 下培育 3 天之後，使用 CellTiter-Glo 分析 (Promega, Madison WI) 量測細胞增殖。

以下分析 (分析 7-11) 使用以下 CD73 及抗體試劑進行。

構築編碼重組成熟人類 CD73 (胺基酸位置 1-526) 之哺乳動物表現載體質體 (MedImmune)。為了達成 CD73 之可溶性分泌形式之表現，移除 GPI 錨定信號肽且置換為 C 端 6×組胺酸標記。CD73 序列編號係基於不含信號肽之成熟蛋白 (人類 *NT5E*，NCBI 參考序列 NP_002517.1)。編碼重組人類/雞嵌合域調換之「基因剔除」(KO) 突變體之質體使用編碼密碼子

最佳化之雞CD73 DNA序列(雞*NT5E*，NCBI參考序列XP_004940453.1)之合成DNA gBlocks(IDT, Inc.)生成。基於與人類CD73蛋白序列之比對，含有雞N端域之構築體之胺基酸編碼位置1對應於含有預測信號肽之不成熟雞CD73的位置20。全長KO DNA構築體利用人類CD73之gBlocks及PCR擴增子之單一重疊延伸PCR製得。所有構築體均含有C端6×組胺酸標記。人類及嵌合構築體中之單點及多點突變藉由使用Quick Change Lightning多重定點突變誘發套組(Stratagene)進行定點突變誘發製得。所有CD73構築體均在懸浮HEK293細胞中表現。組胺酸標記之野生型人類CD73(缺乏GPI錨定信號序列)由MedImmune蛋白科學組使用HisTrap鎳親和力管柱(GE Healthcare Life Sciences)純化。證實該蛋白為呈溶解狀態之二聚物，且莫耳質量為約125 kDa(參見圖18A及18B)。所有突變體CD73構築體均藉由使用293Fectin(Life Technologies)瞬時轉染懸浮HEK293細胞來表現。細胞在無血清293Freestyle培養基(Life Technologies)中在24孔深孔塊中生長及轉染。轉染後六天收集粗細胞上清液且經由0.45 μm 過濾器過濾以移除細胞殘渣，隨後使用。CD73變異體之上清液濃度藉由在Octet QK384生物層干擾測量法(BLI)儀器(FortéBio/Pall Life Sciences)上量測組胺酸標記之蛋白質與HIS2生物感測器(FortéBio/Pall Life Sciences)之結合來測定。濃度使用Octet資料分析軟體藉由將結合信號與由已知濃度之經純化的重組6×組胺酸標記之人類CD73的稀釋液生成之標準曲線比較來計算。MEDI9447(人類IgG1及小鼠IgG1形式)、單抗A(人類IgG1)及單抗B(人類IgG1)及MEDI9447 Fab(人類IgG1)由MedImmune蛋白科學及表現組表現及純化。IgGs在哺乳動物細胞中表現且藉由蛋白質A及尺寸排阻層析純化。為了產生MEDI9447 Fab，10 mg IgG在37°C下用固定之番木瓜酶(Thermo Scientific/Life Technologies)消化5小時，且Fab使用HiTrap Q管柱(GE Healthcare Life Sciences)純化。

分析7：HDX-MS分析

重組人類CD73及MEDI9447 Fab樣品以2 mg/mL的濃度製備。CD73+Fab複合物藉由以1:1之濃度比率預培育來形成。整個HDX實驗使用裝備有Leap自動化機器人之Waters HDX技術(Waters Corporation)進行。簡言之，1.25 μ L蛋白樣品在20°C下用H₂O或D₂O緩衝液(10 mM磷酸鹽，pH 7.0)稀釋二十倍。在不同培育時間(非氘化實驗之0秒，或氘化實驗之0.5、1、5、10、30、60及120分鐘)之後，標記之樣品藉由添加等體積冰冷的4.0 M胍鹽酸鹽(Pierce Biotechnology)、500 mM參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽(TCEP)(Pierce Biotechnology)(pH 2.4)之溶液來淬滅。其後緊接著，使用Poroszyme固定之胃蛋白酶筒柱(Applied Biosystems)在20°C下消化樣品。收集胃蛋白酶片段，且使用ACQUITY BEH C18 VanGuard預管柱(2.1 \times 5 mm，Waters)去鹽，且在0°C下溶離至ACQUITY BEH C18管柱(1.7 μ m，1.0 \times 100 mm，Waters)中。在管柱上分離之肽利用SYNAPT G2質譜儀(Waters)分析。在資料分析中，肽使用ProteinLynx Global Server軟體(Waters)鑑別，且每一胃蛋白酶肽自每一標記時間起之氘結合量使用DynamX(Waters)計算。對於每一蛋白，進行四次非氘化實驗及三次完全HDX實驗。顯著差值(\pm 1.6道爾頓)使用如先前所述之實驗不確定性及98%置信區間計算，除了使用彙集之標準偏差之變異性代替個別標準偏差之平均值。CD73+Fab複合物與CD73之間的相對攝取分率利用DynamX軟體(Waters)生成，且導出至PyMOL(Shrödinger, Inc.)中以便結構建模。人類CD73之所有結構圖及CD73之開放及關閉構形(PDB參考號分別為4H2F及4H2I)之報導晶體結構均使用PyMol生成。

分析8：SPR及BLI結合分析

MEDI9447與野生型及突變體CD73蛋白質之結合利用表面電漿子共振(SPR)使用ProteOn儀器(BioRad)量測。將CD73粗細胞上清液蛋白

樣品在PBS、0.005% Tween-20(pH 7.4)(BioRad)中稀釋至3 $\mu\text{g/ml}$ ，且在用10 mM NiSO_4 、10 mM MES(pH 6.0)(BioRad)預活化之HTG參NTA感測器晶片(BioRad)上固定至約400 RU。來自未經轉染細胞之等效稀釋之粗細胞上清液樣品作為參考通道對照包括在內。感測器圖譜藉由使在PBS、0.005% Tween-20(pH 7.4)中製備之MEDI9447之兩倍稀釋液(介於5 nM至0.31 nM範圍內)流動來進行記錄。在一些情況下，對於弱結合至MEDI9447之CD73變異體，抗體稀釋液介於20 nM至1.25 nM範圍內。抗體結合以100 $\mu\text{L/min}$ 之流動速率在3分鐘締合期及20分鐘解離期之情況下量測。藉由以30 $\mu\text{L/min}$ 之流動速率800 s注射300 mM EDTA(pH 8.5)(BioRad)，在每次運作之間再生感測器晶片表面。結合動力學使用ProteOn資料分析軟體分析。執行雙重參考，且除非另外提及，否則使用1:1朗格繆爾結合模型擬合資料。一些在胺基酸區域171-188中含有突變之CD73變異體較差地擬合1:1模型(亦即 Chi^2 值 $>R_{\text{max}}$ 之10%)。特別注意，此等變異體用非均質抗原(2:1)模型擬合。由於MEDI9447之高親和力(約4 pM)及ProteOn之靈敏度限制，當比較結合於CD73變異體之MEDI9447時，僅將所量測之動力學中 >2 倍之變化視為有意義的。由於CD73之分析形式(抗原固定)及二聚狀態， K_D 值可因親合力作用而放大。然而，預期此現象不會影響結合於不同CD73變異體之MEDI9447之評級。

定位抗-CD73抗體單抗A及單抗B之結合熱點藉由BLI使用Octet QK384儀器執行。所有蛋白質均在1 \times 動力學緩衝液(FortéBio/Pall Life Sciences)中製備。將來自粗細胞上清液之C端組胺酸標記之CD73變異體稀釋至6 $\mu\text{g/ml}$ 並且固定在HIS2生物感測器上達至0.8 nm之結合反應臨限值。在300秒基線步驟之後，將感測器浸漬至30 nM抗體中。締合及解離時間為600秒。將未經轉染細胞上清液參考對照包括在內以用於資料分析期間的背景結合減除。處理資料並且使用FortéBio資料

分析軟體製備圖式。

分析9：CD73酶活性分析

CD73催化之AMP水解成腺苷及無機磷酸酯藉由以下方式分析：定量無機磷酸鹽(孔雀綠分析(Malachite Green assay)；R&D Systems)，或量測由AMP抑制之螢光素之ATP依賴性氧化(CellTiterGlo分析；Promega)。資料圖式及酶動力學量測值(麥卡里斯-夢騰非線性回歸(Michaelis-Menten non-linear regression))使用Prism軟體(Graphpad)生成。實驗一式兩份或一式三份地執行。

對於可溶性重組CD73使用CellTiterGlo分析之量測，將400 pM重組CD73及各種濃度抗-CD73抗體在分析緩衝液(25 mM Tris pH 7.5、5 mM MgCl₂、0.005% Tween-20)中在37°C下培育1小時，隨後添加等體積之200 μM AMP/600 μM ATP(在分析緩衝液中)。在37°C下培育1小時後，樣品中之AMP濃度使用CellTiterGlo分析根據製造商之說明書測定。

對於可溶性重組CD73使用孔雀綠分析之量測，將1 nM重組CD73及1 nM抗體或40 μM腺苷5'-(α,β-亞甲基)二磷酸酯(APCP；Sigma-Aldrich)在分析緩衝液(25 mM Tris pH 7.5、5 mM MgCl₂、0.005% Tween-20)中在室溫下培育1小時。添加等體積之含400 μM AMP(針對抗-CD73抗體)或3 mM AMP(針對APCP)之分析緩衝液，並且將樣品在室溫下培育15分鐘。無機磷酸酯之濃度使用孔雀綠分析根據製造商之說明書測定。

對於固定之重組CD73之量測，將50 μL CD73(100 ng/mL)於補充有100 μg/mL BSA之分析緩衝液(25 mM Tris pH 7.5、5 mM MgCl₂、0.005% Tween-20)中固定在鍍塗佈之盤(Life Technologies)上。將未結合之CD73洗掉，並且添加50 μL抗-CD73抗體(於分析緩衝液中)。在室溫下培育1小時後，再次洗滌盤，添加100 μL 500 μM AMP(在分析緩衝液中)，且在室溫下培育樣品15分鐘。無機磷酸酯之濃度使用孔雀綠分析

根據製造商之說明書測定。在一些使用固定的及可溶性CD73兩者之實驗中，抗-CD73抗體(IgG及Fab)與10倍莫耳過量多株人類Fab片段(Bethyl Laboratories)及100倍莫耳過量綿羊抗人類IgG(Fd)(Meridian Life Sciences)一起預培育至少2小時，隨後添加至CD73中。

對於經培養細胞中之內源性CD73活性之量測，在96孔板中將每孔20,000個MDA-MB-231細胞接種在RPMI/10% FBS(Life Technologies)中。在過夜培育之後，各孔用無血清RPMI洗滌3次，且添加50 μ L抗體(在無血清RPMI中)。在37°C下培育30分鐘之後，每孔添加25 μ L 1.2 mM AMP(在無血清RPMI中)。將盤在37°C下培育3小時。將25 μ L細胞上清液及25 μ L 100 mM ATP混合，且樣品中之AMP濃度使用CellTiterGlo分析根據製造商的說明書測定。

分析10：CD73構型過渡之單抗A報導分析

MEDI9447及單抗A與經純化重組人類CD73之結合在Octet QK384儀器上執行。為了比較單抗A及MEDI9447之結合，將CD73在PBS(pH 7.4)(Life Technologies)加0.5%牛血清白蛋白(PBSB；Sigma-Aldrich)中稀釋至6 μ g/mL並且加載至HIS2生物感測器上達至1.0 nm之結合信號臨限值。接著將生物感測器轉移至單獨PBSB或具有10 μ M ZnCl₂(Sigma-Aldrich)、APCP及/或2 mM乙二胺四乙酸(EDTA)(Life Technologies)之PBSB中並且培育15分鐘。接著，將生物感測器轉移至含有在PBSB中稀釋至30 nM之MEDI9447或單抗A的PBSB中，並且量測抗體締合10分鐘。

為了測試MEDI9447在ZnCl₂及APCP存在下對CD73構形過渡之作用，將在PBS(pH 7.4)中稀釋至10 μ g/mL之單抗A固定在抗人類FcAHC生物感測器(FortéBio/Pall Life Sciences)上。在400 s固定步驟之後，將生物感測器在含50 μ g/mL非專一性多株人類IgG(Jackson ImmunoResearch Laboratories)之PBS(pH 7.4)中阻斷10分鐘。在4分鐘

基線步驟之後，藉由將生物感測器在含有在單獨PBS或含有10 μM ZnCl_2 及/或0.5 mM APCP之PBS中稀釋至250 nM(基於二聚物之分子量)之CD73的孔中培育600秒來量測單抗A結合。對於含有結合於CD73之MEDI9447之樣品，將在PBS中稀釋至250 nM之MEDI9447之小鼠IgG1型式(依次使用以避免結合於抗人類Fc生物感測器)與CD73一起在室溫下預培育15分鐘，隨後與 ZnCl_2 及APCP一起培育。MEDI9447 Fab及小鼠同型匹配對照IgG1(在MedImmune生成)以500 nM測試。所有分析步驟之振盪速度為1000 rpm。結合分析及資料圖式使用FortéBio資料分析軟體生成。

分析11：SEC-MALS分析

對於分析與CD73及MEDI9447或單抗B形成之複合物的實驗，將900皮莫耳CD73與稀釋至PBS(pH 7.4)中之900、450、90或0皮莫耳抗體一起培育。亦製備僅900皮莫耳抗體之另一樣品。將樣品在室溫下培育30分鐘，且接著將100 μL 每一樣品在HP 1100 HPLC(Agilent)上使用TSKgel G3000WxL 5 μm ，7.88 mm \times 30 cm管柱(Tosoh Bioscience, LLC)以1 mL/min之流動速率分離20分鐘。樣品操作緩衝液為0.1 M NaPi，0.1M NaSO_4 ，pH 6.8。在HPLC分離之後，所有樣品均使用Dawn Heleos II MALS偵測器及Optilab T-rEx折射率偵測器(Wyatt)分析。資料使用Astra軟體(Wyatt)分析。

對特定態樣之前述描述將因此充分揭示本發明之一般性質：在不脫離本發明之一般概念的情況下，其他人可藉由應用熟習此項技術者所瞭解之知識針對各種應用而容易地修改及/或調適該等特定態樣，而無需進行過度實驗。因此，基於本文所呈現之教示及指導，該等調適及修改意欲在所揭示態樣之等效物的意義及範圍內。應理解，本文之措辭或術語係出於描述而非限制之目的，使得本說明書之術語或措辭待由熟習此項技術者按照該等教示及該指導進行解譯。

序列表

>SEQ ID NO:1 CD730002 VL
 QSVLTQPPSVSVSPGQTATITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRPSRIPERFSGSNS
 GNTATLTISGTQALDEADYFCQAWDTSFVWVFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:2 CD730002 VH
 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV
 KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWVGQGMVTVSS

>SEQ ID NO:3 CD730010 VL
 LPVLTQPPSVSGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYKQVPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGS
 KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNGWLFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:4 CD730010 VH
 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV
 KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDYWGRGTLTVSS

>SEQ ID NO:5 CD730011 VL
 NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASKYVQWYQQRPGSSPMAVIYKDNQRSSGVPDRFSGS
 IDSSSNSASLTISGLKPEDEADYYCQSYDASNYYVFGTGTKVTVL

>SEQ ID NO:6 CD730011 VH
 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV
 KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGHGLYFDLWGQGTTVTVSS

>SEQ ID NO:7 CD730021 VL
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRPNIGGNTVNWYQQLPGAAPKLLIYSNSQRPSGVPDRFSGS
 KYGTSASLAISGLQSDDEADYYCGTWDDSLNGPVFGRGTKLTVL

>SEQ ID NO:8 CD730021 VH
 QVQLQESGPGLVRPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWAWVRQSPGKGLEWIGNIYYRGSTYYNPSL
 KSRVTMSVDM SKHQFSLKLSLNAADTAVYYCASLYSGTYVFDYWGRGTLTVSS

>SEQ ID NO:9 CD730042 VL
 QSVLTQPASVSGSPGQSITISCAGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYEGSKRPSGVSNRFS
 GSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTTR-STRVFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:10 CD730042 VH
 GVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSIKYYADS
 VKGRFTISRDD SKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCSTLSGSYGYFDYWGRGTLTVSS

>SEQ ID NO:11 CD730046 VL
 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVSWYQHLPGTAPQLLIYTNNHRPSGVPDRFSGSK
 SGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLSGYVFGTGTKVTVL

>SEQ ID NO:12 CD730046 VH
 QVQLVQSGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSIKYYADS
 VKGRFTISRDN SKNSLFLQMNSLRDDDTATYYCARGHLLRIGDIFYYSLDVWVGQGTTLTVSS

>SEQ ID NO:13 CD730047 VL
 QSVLTQPPSASGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQRLPGAAPQLLIYNNDRPSGIPDRFSGSK
 SGTSGSLVISGLQSEDEADYYCAAWDDSLSGNVFGTGTKVTVL

>SEQ ID NO:14 CD730047 VH

EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSIKYYADS
VKGRFAISRDNANTLYLQMNLSLRREDTAMYYCASGLTGVAGALGVWGRGTLVTVSS

>SEQ ID NO:15 CD730058 VL

QSVLTQPPSVSVSPGQTATITCSGDRLRNEFVSWYQQRPGQSPVVVIYQDIYRPSGIPDRFSGSKSG
NTATLTISGPQTVDEADYYCQAWDSNTVVFVGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:16 CD730058 VH:

QLQLQESGSLVKPSQTLSLICAVSGGSITSGGNAWNWIRQSPGAGLEWIGYIFSNGATYYNPSLE
SRVTISADTSKNQFSLTLTSVTAADTAVYYCARGDFWTGKGVFDPWGQGLTVTVSS

>SEQ ID NO:17 10.3AA_HC

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGRYYADSV
KGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARLGYGRVDEWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>SEQ ID NO:18 10.3Nt_HC

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC
CTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCTATAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGG
GAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGAACATACTACGCAGACT
CCGTGAAGGGCCGTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATG
AACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGATTAGGGTATGGGCGGG
TGGACGAGTGGGGCAGGGGAACCCTGGTCAACCGTCTCGAGTGCCTCGACCAAGGGCCCATC
CGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC
TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCTGACCAGCG
GCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAACCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAACAAGCCCAGC
AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATgcCCacCG
TGCCAGCACCTGAATTCGAGGGGGGAcCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCCaaGgACA
CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC
CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC
CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCGTCTCACCGTCTGCACCAG
GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCTCCAT
CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTcTACACCCTGCCCC
CATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT
CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCA
CGCCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA
GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC
TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA

>SEQ ID NO:19 10.3AA_LC

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRSLSGVPDRFSGS
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGKLTVLGQPKAAPS VTLFPPSSEELQA
NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSY
SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

>SEQ ID NO:20 10.3Nt-LC

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTC
TTGTTCTGGAAGCCTCTCCAACATCGGAAGGAATCCTGTAACTGGTATCAGCAGCTCCCAG
GGACGGCCCCAAACTCCTCATCTATCTTGATAATCTACGGCTAAGTGGGGTCCCTGACCGA
TTCTCTGGCTCCAAGTCTGGAACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGAT
GAGGCTGATTACTGTGCAACATGGGATGACAGCCACCCGGGTGGACGTTTCGGCGGAGG
GACCAAGCTGACCGTCTAGGTCAGCCCAAGGCGGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCT
CCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCG
GGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCA
CCACACCCTCCAACAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCC
TGAGCAGTGGAAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTG
GAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA

>SEQ ID NO:21 10.3AA_VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGRITYYADSV
KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGRVDEWGRGTLVTVSS

>SEQ ID NO:22 10.3Nt_VH

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC
CTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCTATAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGG
GAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGAACATACTACGCAGACT
CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATG
AACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTACTGTGCGAGATTAGGGTATGGGCGGG
TGGACGAGTGGGGCAGGGGAACCCTGGTACCCTCTCGAGT

>SEQ ID NO:23 10.3AA_VL

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLSGVPDRFSGS
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGKLTIVL

>SEQ ID NO:24 10.3Nt-VL

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTC
TTGTTCTGGAAGCCTCTCCAACATCGGAAGGAATCCTGTAACTGGTATCAGCAGCTCCCAG
GGACGGCCCCAAACTCCTCATCTATCTTGATAATCTACGGCTAAGTGGGGTCCCTGACCGA
TTCTCTGGCTCCAAGTCTGGAACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGAT
GAGGCTGATTACTGTGCAACATGGGATGACAGCCACCCGGGTGGACGTTTCGGCGGAGG
GACCAAGCTGACCGTCCTA

>SEQ ID NO:25 CD7300010 親本 FW1-VL

LPVLTQPPSVSGTPGQRVTISC

>SEQ ID NO:26 CD7300010 GL FW1-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC

>SEQ ID NO:27 CD7300010 親本 FW2-VL

WYKQVPGTAPKLLIY

>SEQ ID NO:28 CD7300010 GL FW2-VL

WYQQLPGTAPKLLIY

>SEQ ID NO:29 CD7300010 親本/GL FW3-VL

GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC

>SEQ ID NO:30 CD7300010親本/GL FW4-VL (亦為CD370002及2C5)
FGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:31 CD7300010親本/GL FW1-VH (亦為CD370002及2C5)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS

>SEQ ID NO:32 CD7300010親本/GL FW2-VH (亦為CD370002及2C5)
WVRQAPGKGLEWVS

>SEQ ID NO:33 CD7300010親本/GL FW3-VH (亦為CD370002及2C5)
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

>SEQ ID NO:34 CD7300010親本/GL FW4-VH
WGRGTLVTVSS

>SEQ ID NO:35 CD7300010 CDR1-VH (亦為CD370002及2C5)
SYAMS

>SEQ ID NO:36 CD7300010 CDR1-VH
SYAYS

>SEQ ID NO:37 CDR2-VH (亦為CD370002)
AISGSGGSTYYADSVKG

>SEQ ID NO:38 CDR2-VH
LIWGSWGSTYYADSVKG

>SEQ ID NO:39 CDR2-VH
AISGSGGRYYADSVKG

>SEQ ID NO:40 CDR2-VH
AISGSWGRTYYADSVKG

>SEQ ID NO:41 CDR3-VH
LGYSTIDY

>SEQ ID NO:42 CDR3-VH
LGYSTIDK

>SEQ ID NO:43 CDR3-VH
LGYSTIDM

>SEQ ID NO:44 CDR3-VH
LGYSTIDL

>SEQ ID NO:45 CDR3-VH
LGYGRVDE

>SEQ ID NO:46 CDR1-VL
SGSLSNIGRNPVN

>SEQ ID NO:47 CDR1-VL
SGSLSNIGRNEVN

>SEQ ID NO:48 CDR1-VL
SGSLSNIGRNDVN

>SEQ ID NO:49 CDR2-VL
LNNQRPS

>SEQ ID NO:50 CDR2-VL
LDNLRLG

>SEQ ID NO:51 CDR2-VL
LDNLRLS

>SEQ ID NO:52 CDR2-VL
LNNQRLG

>SEQ ID NO:53 CDR3-VL
ATWDDSLNGWL

>SEQ ID NO:54 CDR3-VL
ATWDDSLKGWL

>SEQ ID NO:55 CDR3-VL
ATWDDSLIGWL

>SEQ ID NO:56 CDR3-VL
ATWDDSHPGWT

>SEQ ID NO:57 CD730010-VL
LPVLTQPPSVSGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYKQVPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGS
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNGWLFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:58 CD730010GL9-VL
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGS
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNGWLFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:59 P32E-VL
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNEVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGS
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNGWLFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:60 C1-VL
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNEVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGS
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLKGWLFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:61 C2-VL
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLGGVPDRFSGS
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLKGWLFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:62 D3-VL
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLSGVPDRFSGS
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLIGWLFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:63 G10-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNDVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRLGGVPDRFSGS
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLKGWLFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:64 HPT-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGS
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:65 GRVE-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGS
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNGWLFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:66 73combo1 (C1+GRVE+HPT)-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNEVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGS
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:67 73combo2 (C2+GRVE+HPT)-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLLGGVPDRFSGS
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:68 73combo3(D3+GRVE+HPT)-VL [10.3]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLLSGVPDRFSGS
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:69 73combo5 (G10+GRVE+HPT)-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNDVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRLGGVPDRFSGS
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:70 73combo6(GRVE+HPT)-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGS
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:71 CD730010-VH

EVQLLES GGGLVQPGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDYWGRGTLTVSS

>SEQ ID NO:72 CD730010GL9-VH

EVQLLES GGGLVQPGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDYWGRGTLTVSS

>SEQ ID NO:73 P32E-VH

EVQLLES GGGLVQPGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDYWGRGTLTVSS

>SEQ ID NO:74 C1-VH

EVQLLES GGGLVQPGSLRLS CAASGFTFSSYAYS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDKWGRGTLTVSS

>SEQ ID NO:75 C2-VH

EVQLLES GGGLVQPGSLRLS CAASGFTFSSYAYS WVRQAPGKGLEWVSLIWGSWGSTYYADS
VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDMWGRGTLTVSS

>SEQ ID NO:76 D3-VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGRTYYADSV
KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDLWGRGTLVTVSS

>SEQ ID NO:77 G10-VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSWGRTYYADSV
KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDLWGRGTLVTVSS

>SEQ ID NO:78 HPT-VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV
KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDYWGRGTLVTVSS

>SEQ ID NO:79 GRVE-VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV
KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGRVDEWGRGTLVTVSS

>SEQ ID NO:80 73combo1 (C1+GRVE+HPT)-VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV
KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGRVDEWGRGTLVTVSS

>SEQ ID NO:81 73combo2 (C2+GRVE+HPT)-VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSLIWGSWGSTYYADS
VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGRVDEWGRGTLVTVSS

>SEQ ID NO:82 73combo3(D3+GRVE+HPT)-VH [10.3]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGRTYYADSV
KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGRVDEWGRGTLVTVSS

>SEQ ID NO:83 73combo5 (G10+GRVE+HPT)-VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSWGRTYYADSV
KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGRVDEWGRGTLVTVSS

>SEQ ID NO:84 73combo6(GRVE+HPT)-VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV
KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGRVDEWGRGTLVTVSS

>SEQ ID NO:85 CD730002VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV
KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWGQGMVTVSS

>SEQ ID NO:86 CD730002VL

QSVLTQPPSVSVSPGQTATITCSGDKVGDKYASWYQKPGQSPVLVIYEDTKRPSRIPERFSGSNS
GNTATLTISGTQALDEADYFCQAWDTSFWVFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:87 2C5VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV
KRRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWGQGMVTVSS

>SEQ ID NO:88 2C5VL

QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQKPGQSPVLVIYEDTKRLSGIPERFSGSNS
GNTATLTISGTQAMDEADYFCQAWDTSFWVFGGGTKLTVL

>SEQ ID NO:89 CD730002親本/2C5 FW4-VH
WGQGMVTVSS

>SEQ ID NO:90 CD730002親本FW1-VL
QSVLTQPPSVSVSPGQTATITC

>SEQ ID NO:91 CD7300002 2C5 FW1-VL
QSVLTQPPSVSVSPGQTASITC

>SEQ ID NO:92 CD730002親本/2C5 FW2-VL
WYQKPGQSPVLVIY

>SEQ ID NO:93 CD730002親本FW3-VL
RIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYFC

>SEQ ID NO:94 CD730002/2C5 FW3-VL
GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC

>SEQ ID NO:95 CD730002/2C5 CDR2-VH
AISGSGGSTYYADSVKR

>SEQ ID NO:96 CD730002親本/2C5 CDR3-VH
DKGYWYMDV

>SEQ ID NO:97 CD730002親本/2C5 CDR1-VL
SGDKVGDKYAS

>SEQ ID NO:98 CD730002親本CDR2-VL
EDTKRPS

>SEQ ID NO:99 CD730002 2C5 CDR2-VL
EDTKRLS

>SEQ ID NO:100 CD730002親本/2C5 CDR3-VL
QAWDTSFVW

>SEQ ID NO:101 Phen0203-VH
EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFRFSDFAMHWVRQAPGKGLEWVAGISYDGGNKYYAD
SVKGRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDHGYSYGHLDYWGRGTLTVSS

>SEQ ID NO:102 Phen0203-VL
QSVVTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGS
KSGTSASLAISGLQSEADYYCAAWDDSLNQRVFGTGKLTVL

>SEQ ID NO:103 CD730004-VH
EVQLLESGLLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV
KGRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRPNYYGASGSYKQGGDHWGQGMVTV
SS

>SEQ ID NO:104 CD730004-VL
NFMLTQPHSVSESPGQTVTISCTRSSGSLASKYVQWYQKRPSSPTTVIYEDTQRPSGVPDRFSGSI
DISSNSASLTISGLRTEADYYCQSYDSTNWWVFGGGTKVTVL

>SEQ ID NO:105 CD730008-VH
 EVQLETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV
 KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNYGNLDHWGKGLTVTVSS

>SEQ ID NO:106 CD730008-VL
 QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYQDRKRPSGIPERFSGSNS
 GNTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDSSHWFVGGGKTLTVL

>SEQ ID NO:107 CD730068-VH
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSNYIMGWVRQAPGKGLEWVSSISSGGATIYADSVK
 GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDMAVYYCAKDHGGHGMVWVGQTTTVTVSS

>SEQ ID NO:108 CD730068-VL
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLAWFQQKPGKAPKSLIFAASSLESGVPSKFSGSGS
 GTDFTLTISSLQPEDSATYYCQQYNSYPLTFGGGKTKVEIK

>SEQ ID NO:109 CD730069-VH
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSEYQMGWVRQAPGKGLEWVSYIRSSGGQTIYADSV
 KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRTYSSGWHIDYWGQGLTVTVSS

>SEQ ID NO:110 CD730069-VL
 DIQMTQSPDSLASVGDRTITCRASQISRYLNWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSG
 SGTDFSLTISSLQLEDFATYYCQQSYRTPLTFGGGKTKVEIQ

>SEQ ID NO:111純系2 SGMV-VH
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV
 KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWVGQGMVTVSS

>SEQ ID NO:112純系2 SGMV-VL
 QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRPSGIPERFSGSNS
 GNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFWVFGGKTLTVL

>SEQ ID NO:113 CDRH1 Y32V-VH
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSVAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV
 KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWVGQGMVTVSS

>SEQ ID NO:114 CDRH1 M34R-VH
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYARSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV
 KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWVGQGMVTVSS

>SEQ ID NO:115 CDRH2 T57P-VH
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSPYYADSV
 KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWVGQGMVTVSS

>SEQ ID NO:116 CDRH2 A60G -VH
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYGDSV
 KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWVGQGMVTVSS

>SEQ ID NO:117 CDRH2 G65R-VH
 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV
 KRRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWVGQGMVTVSS

>SEQ ID NO:118 CDRL2 T52S-VL
 QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSNS
 GNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFVWFVGGGTKLTVLL

>SEQ ID NO:119 CDRL2 R54Y-VL
 QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKYPSGIPERFSGSNS
 GNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFVWFVGGGTKLTVLVL

>SEQ ID NO:120 CDRL2 P55H-VL
 QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRHSGIPERFSGSNSG
 NTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFVWFVGGGTKLTVLVL

>SEQ ID NO:121 CDRL2 P55L-VL
 QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRLSGIPERFSGSNR
 GNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFVWFVGGGTKLTVLVL

>SEQ ID NO:122 2SGMY FW3-VL
 GIPERFSGSNRNTATLTISGTQAMDEADYYC

>SEQ ID NO:123 CDRH1 Y32V CDR1-VH
 SVAMS

>SEQ ID NO:124 CDRH1 M34R CDR1-VH
 SYARS

>SEQ ID NO:125 CDRH2 T57P CDR2-VH
 AISGSGGSPYYADSVKG

>SEQ ID NO:126 CDRH2 A60G CDR2-VH
 AISGSGGSTYYGDSVKG

>SEQ ID NO:127 CDRL2 T52S CDR2-VL
 EDSKRPS

>SEQ ID NO:128 CDRL2 R54H CDR2-VL
 EDTKYPS

>SEQ ID NO:129 CDRL2 P55H CDR2-VL
 EDTKRLS

>SEQ ID NO:130 曲美單抗VL來自U.S. 6,682,736
 PSSLSASVGDRTITCRASQSINSYLDWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGGTDFTLT
 ISSLQPEDFATYYCQYYSTPFTFGPGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYF
 REAKV

>SEQ ID NO:131 曲美單抗VH來自U.S. 6,682,736
 GVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVTWYDGSNKYYADSVKGRFTISR
 DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPRGATLYYYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVF
 PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH

>SEQ ID NO:132 曲美單抗VH CDR1來自U.S. 6,682,736
 GFTFSSYGMH

>SEQ ID NO:133 曲美單抗VH CDR2來自U.S. 6,682,736
VIWYDGSNKYYADSV

>SEQ ID NO:134 曲美單抗VH CDR3來自U.S. 6,682,736
DPRGATLYYYYYGMDV

>SEQ ID NO:135 曲美單抗VL CDR1來自U.S. 6,682,736
RASQSINSYLD

>SEQ ID NO:136 曲美單抗VL CDR2來自U.S. 6,682,736
AASSLQS

>SEQ ID NO:137 曲美單抗VL CDR3來自U.S. 6,682,736
QQYYSTPFT

>SEQ ID NO:138

US 20130034559_77 序列77來自US 20130034559 生物體：智人
EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSG
SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIK

>SEQ ID NO:139

US 20130034559_72 序列72來自US 20130034559 生物體：智人
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDS
VKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGLVTVSS

>SEQ ID NO:140 - VH CDR1

US 20130034559_73 序列73來自US 20130034559 生物體：智人
RYWMS

>SEQ ID NO:141 - VH CDR2

US 20130034559_74 序列74來自US 20130034559 生物體：智人
NIKQDGSEKYYVDSVKG

>SEQ ID NO:142 - VH CDR3

US 20130034559_75 序列75來自US 20130034559 生物體：智人
EGGWFGELAFDY

>SEQ ID NO:143 - VL CDR1

US 20130034559_78 序列78來自US 20130034559 生物體：智人
RASQRVSSSYLA

>SEQ ID NO:144 - VL CDR2

US 20130034559_79 序列79來自US 20130034559 生物體：智人
DASSRAT

>SEQ ID NO:145 - VL CDR3

US 20130034559_80 序列80來自US 20130034559 生物體：智人
QQYGSLPWT

【符號說明】

無

【補充序列表】

<110> 英商梅迪繆思有限公司

<120> 對CD73具專一性之結合分子及其用途

<130> CD73-100TW1

<140>

<141>

<150> 62/188,999

<151> 2015-07-06

<150> 62/147,329

<151> 2015-04-14

<150> 62/077,486

<151> 2014-11-10

<160> 178

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 1

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Val Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Glu Asp Thr Lys Arg Pro Ser Arg Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Leu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Ala Trp Asp Thr Ser Phe Trp Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 2

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 3

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 3

Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
 20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Lys Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 4
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 4
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 5
Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Lys
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Lys
20 25 30

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Met Ala Val
 35 40 45

Ile Tyr Lys Asp Asn Gln Arg Ser Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
 65 70 75 80

Leu Lys Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ala
 85 90 95

Ser Asn Tyr Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 6
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 6
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Gly His Gly Leu Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 7
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列



<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 7

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Pro Asn Ile Gly Gly Asn
20 25 30Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45Ile Tyr Ser Asn Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60Gly Ser Lys Tyr Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80Ser Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95Asn Gly Pro Val Phe Gly Arg Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 8

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Glu
1 5 10 15Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30Ser Tyr Tyr Trp Ala Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Tyr Arg Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Met Ser Lys His Gln Phe
65 70 75 80Ser Leu Lys Leu Ser Ser Leu Asn Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Ser Leu Tyr Ser Gly Thr Tyr Val Phe Asp Tyr Trp Gly Arg
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 9
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 9
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ala Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Arg
 85 90 95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 10
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 10
 Gly Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ala Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Thr Leu Ser Gly Ser Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Arg Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 11
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Thr Val Ser Trp Tyr Gln His Leu Pro Gly Thr Ala Pro Gln Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Thr Asn Asn His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 12
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 12

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Phe
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly His Leu Leu Arg Ile Gly Asp Ile Phe Tyr Tyr Ser Leu
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 13

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 13

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Arg Leu Pro Gly Ala Ala Pro Gln Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asn Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Gly Ser Leu Val Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95



Ser Gly Asn Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 14
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 14
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Arg Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Gly Leu Thr Gly Val Ala Gly Ala Leu Gly Val Trp Gly Arg
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 15
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 15
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly Asp Arg Leu Arg Asn Glu Phe Val
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Val Val Val Ile Tyr

35 40 45

Gln Asp Ile Tyr Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Lys Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Pro Gln Thr Val
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Asn Thr Val Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 16
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 16
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ser Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Ile Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Gly Asn Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Ala Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Phe Ser Asn Gly Ala Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Thr Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Asp Phe Trp Thr Gly Lys Gly Val Phe Asp Pro Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 17
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>



<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 17

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 18
<211> 1341
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 18
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttagc agctatgcct atagctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggtg gtggtggtag aacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcgtgat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagattaggg 300
 tatgggcggg tggacgagtg gggcagggga accctgggtca ccgtctcgag tgcgtcgacc 360
 aagggcccat ccgcttcc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420
 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc ctggaactca 480
 ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtctc aggactctac 540
 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagcc caaatcttgt 660
 gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaat tcgagggggg accgtcagtc 720
 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780
 tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac 840
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgctggagg agcagtaca cagcacgtac 900
 cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960
 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020
 gggcagcccc gagaaccaca ggtctacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag 1080
 aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1140
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200
 gacggctcct tcttctcta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260
 aacgtcttct catgtccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320
 ctctccctgt ctccgggtaa a 1341

<210> 19
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述 : 合成多肽

<400> 19
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
 20 25 30
 Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Leu Asp Asn Leu Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His
 85 90 95

Pro Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
 115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
 130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys
 145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
 165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
 180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
 195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210 215

<210> 20
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<400> 20
 cagctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
 tcttgttctg gaagcctctc caacatcgga aggaatcctg ttaactggta tcagcagctc 120
 ccagggacgg cccccaaact cctcatctat cttgataatc tacggctaag tggggtcctt 180
 gaccgattct ctggctccaa gtctggaacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccag 240
 tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca acatgggatg acagccaccc cgggtggacg 300
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtcagccca aggcggcgcc ctcggtcact 360
 ctgttcccgc cctcctctga ggagcttcaa gccacaagg ccacactggt gtgtctcata 420
 agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag 480
 gcgggagtgg agaccaccac accctcaaaa caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc 540
 tacctgagcc tgacgcctga gcagtggaag tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg 600

catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg gccctacag aatgttca

648

<210> 21
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 21
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 22
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(351)

<400> 22
 gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

48

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt agc agc tat
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

96

20	25	30	
gcc tat agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc			144
Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
tca gct att agt ggt agt ggt ggt aga aca tac tac gca gac tcc gtg			192
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
50	55	60	
aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat			240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	
ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt			288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
gcg aga tta ggg tat ggg cgg gtg gac gag tgg ggc agg gga acc ctg			336
Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu Trp Gly Arg Gly Thr Leu			
100	105	110	
gtc acc gtc tcg agt			351
Val Thr Val Ser Ser			
115			

<210> 23
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 23
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
 20 25 30
 Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Leu Asp Asn Leu Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His
 85 90 95
 Pro Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 24
 <211> 330

<212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 人工序列之描述：合成聚核苷酸

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(330)

<400> 24
 cag tct gtg ctg act cag cca ccc tca gcg tct ggg acc ccc ggg cag 48
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 agg gtc acc atc tct tgt tct gga agc ctc tcc aac atc gga agg aat 96
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
 20 25 30
 cct gtt aac tgg tat cag cag ctc cca ggg acg gcc ccc aaa ctc ctc 144
 Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 atc tat ctt gat aat cta cgg cta agt ggg gtc cct gac cga ttc tct 192
 Ile Tyr Leu Asp Asn Leu Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 ggc tcc aag tct gga acc tca gcc tcc ctg gcc atc agt ggg ctc cag 240
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 tct gag gat gag gct gat tat tac tgt gca aca tgg gat gac agc cac 288
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His
 85 90 95
 ccc ggg tgg acg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta 330
 Pro Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 25
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 25
 Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys
 20

<210> 26
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 26
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys
 20

<210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 27
 Trp Tyr Lys Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 28
 Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 29
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 29
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 30
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 30

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 1 5 10

<210> 31
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 31
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

<210> 32
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 32
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10

<210> 33
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 33
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 34
 Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 35
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 35
 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

<210> 36
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 36
 Ser Tyr Ala Tyr Ser
 1 5

<210> 37
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 37
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 38
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 38
 Leu Ile Trp Gly Ser Trp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 39
 <211> 17

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 39
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 40
Ala Ile Ser Gly Ser Trp Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 41
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 41
Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Tyr
1 5

<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 42
Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Lys
1 5

<210> 43
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 43
Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Met
1 5

<210> 44
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 44
Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Leu
1 5

<210> 45
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 45
Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu
1 5

<210> 46
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 46
Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn Pro Val Asn
1 5 10

<210> 47
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 47
Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn Glu Val Asn
1 5 10

<210> 48
<211> 13

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 48
Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn Asp Val Asn
1 5 10

<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 49
Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 50
Leu Asp Asn Leu Arg Leu Gly
1 5

<210> 51
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 51
Leu Asp Asn Leu Arg Leu Ser
1 5

<210> 52
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 52
Leu Asn Asn Gln Arg Leu Gly
1 5

<210> 53
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 53
Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Trp Leu
1 5 10

<210> 54
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 54
Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Lys Gly Trp Leu
1 5 10

<210> 55
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 55
Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Ile Gly Trp Leu
1 5 10

<210> 56
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 56
Ala Thr Trp Asp Asp Ser His Pro Gly Trp Thr
1 5 10

<210> 57
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 57

Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Lys Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 58
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 58
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 59

<211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 59

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
 20 25 30

Glu Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Asn Gly Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 60
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 60

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
 20 25 30

Glu Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Lys Gly Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 61
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 61
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Leu Asp Asn Leu Arg Leu Gly Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Lys Gly Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 62
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 62
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Leu Asp Asn Leu Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ile Gly Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 63

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 63

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
20 25 30

Asp Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Leu Gly Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Lys Gly Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 64

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 64

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His
85 90 95

Pro Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 65

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 65

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 66

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 66

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
20 25 30

Glu Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His
85 90 95

Pro Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 67

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 67

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Leu Asp Asn Leu Arg Leu Gly Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His
85 90 95

Pro Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 68
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 68
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
 20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Leu Asp Asn Leu Arg Leu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His
 85 90 95

Pro Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 69
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 69
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
 20 25 30

Asp Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Leu Gly Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50

55

60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His
85 90 95

Pro Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 70
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 70
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
20 25 30

Pro Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Leu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser His
85 90 95

Pro Gly Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 71
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 71
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 72
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 72
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 73
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 73
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 74
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 74
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Lys Trp Gly Arg Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 75
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 75
 Gly Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Leu Ile Trp Gly Ser Trp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Met Trp Gly Arg Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 76
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 76

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 77

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 77

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45Ser Ala Ile Ser Gly Ser Trp Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 78
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 78
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 79
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 79
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 80
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 80
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 81
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 81
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Leu Ile Trp Gly Ser Trp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 82
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 82
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 83
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 83
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Tyr Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Trp Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 84
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 84

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Arg Val Asp Glu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 85

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 85

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 86
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 86
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Val Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Glu Asp Thr Lys Arg Pro Ser Arg Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Leu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Ala Trp Asp Thr Ser Phe Trp Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 87
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 87
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 88
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 88
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Val Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Glu Asp Thr Lys Arg Leu Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Thr Ser Phe Trp Val
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 89
 <211> 11
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 89

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 90

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 90

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Thr Ile Thr Cys
20

<210> 91

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 91

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys
20

<210> 92

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 92

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 93

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 93

Arg Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Leu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 94

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 94

Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 95

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 95

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Arg

<210> 96

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 96

Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val
1 5 10

<210> 97

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 97
Ser Gly Asp Lys Val Gly Asp Lys Tyr Ala Ser
1 5 10

<210> 98
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 98
Glu Asp Thr Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 99
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 99
Glu Asp Thr Lys Arg Leu Ser
1 5

<210> 100
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 100
Gln Ala Trp Asp Thr Ser Phe Trp Val
1 5

<210> 101
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 101
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Arg Phe Ser Asp Phe
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Gly Ile Ser Tyr Asp Gly Gly Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Asn Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp His Gly Tyr Ser Gly Tyr Tyr Gly His Leu Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 102
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 102
 Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Asn Gly Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 103
 <211> 128
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 103

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Arg Pro Asn Tyr Tyr Gly Ala Ser Gly Ser Tyr Tyr Lys
100 105 110

Gln Gly Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 104

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 104

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Lys
20 25 30

Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Lys Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
35 40 45

Ile Tyr Glu Asp Thr Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Ile Asp Ile Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
65 70 75 80

Leu Arg Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser
85 90 95

Thr Asn Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 105
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 105
Glu Val Gln Leu Leu Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asn Tyr Gly Asn Leu Asp His Trp Gly Lys Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 106
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 106
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Val Gly Asp Lys Tyr Ala

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 108

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

Phe Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 109

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 109

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Glu Tyr
 20 25 30

Gln Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Tyr Ile Arg Ser Ser Gly Gly Gln Thr Ile Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Arg Thr Tyr Ser Ser Gly Trp His Ile Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 110
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 110
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Leu
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Arg Thr Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Gln
 100 105

<210> 111
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 111
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 112
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 112
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Val Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Glu Asp Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Thr Ser Phe Trp Val
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 113
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 113

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Val
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 114

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 114

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Arg Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 115
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 115
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 116
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 116
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 117
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 117
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 118
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 118
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Val Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Thr Ser Phe Trp Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Leu
100 105

<210> 119
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 119
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Val Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Glu Asp Thr Lys Tyr Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Thr Ser Phe Trp Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Val Leu
100 105

<210> 120
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 120
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Val Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Val Leu Val Ile Tyr Glu
35 40 45

Asp Thr Lys Arg His Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn
50 55 60

Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp
65 70 75 80

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Thr Ser Phe Trp Val Phe
85 90 95

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Val Leu
100 105

<210> 121
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 121
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Val Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Glu Asp Thr Lys Arg Leu Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Arg Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Thr Ser Phe Trp Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Val Leu
100 105

<210> 122
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 122
Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Arg Gly Asn Thr Ala Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 123
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 123
Ser Val Ala Met Ser
1 5

<210> 124
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 124
Ser Tyr Ala Arg Ser
1 5

<210> 125
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 125
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Pro Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 126
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 126
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 127
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 127
 Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 128
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 128
 Glu Asp Thr Lys Tyr Pro Ser
 1 5

<210> 129
 <211> 7

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 129
Glu Asp Thr Lys Arg Leu Ser
1 5

<210> 130
<211> 139
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 130
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
1 5 10 15

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys
20 25 30

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
50 55 60

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
85 90 95

Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
100 105 110

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
115 120 125

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
130 135

<210> 131
<211> 167
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 131

Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
1 5 10 15

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro
20 25 30

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn
35 40 45

Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
50 55 60

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
65 70 75 80

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu
85 90 95

Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165

<210> 132

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 132

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His
1 5 10

<210> 133

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 133
 Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

<210> 134
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 134
 Asp Pro Arg Gly Ala Thr Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10 15

<210> 135
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 135
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Tyr Leu Asp
 1 5 10

<210> 136
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 136
 Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 137
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 137
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Phe Thr
 1 5

<210> 138
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 138

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 139

<211> 121

<212> PRT

<213> 智人

<400> 139

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 140
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 140
 Arg Tyr Trp Met Ser
 1 5

<210> 141
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 141
 Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 142
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 142
 Glu Gly Gly Trp Phe Gly Glu Leu Ala Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 143
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 143
 Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 144
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 144
 Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 145
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 145
 Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro Trp Thr
 1 5

<210> 146
 <211> 110
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(22)

<223> 此區域可涵蓋『LPVLTQPPSVSGTPGQRVTISC』或
『QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC』

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Leu或Gln

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Pro或Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> Val或Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (33)..(33)

<223> Pro、Glu或Asp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (36)..(50)

<223> 此區域可涵蓋『WYKQVPGTAPKLLIY』或
『WYQQLPGTAPKLLIY』

<220>

<221> MOD_RES

<222> (38)..(38)

<223> Lys或Gln

<220>

<221> MOD_RES

<222> (40)..(40)

<223> Val或Leu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (52)..(52)

<223> Asn或Asp

<220>

<221> MOD_RES

<222> (54)..(54)

<223> Gln或Leu

<220>

<221> MOD_RES

<222> (56)..(56)

<223> Leu或Pro

<220>

<221> MOD_RES

<222> (57)..(57)
 <223> Gly或Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (96)..(96)
 <223> Leu或His

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (97)..(97)
 <223> Lys、Pro、Ile或Asn

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (100)..(100)
 <223> Leu或Thr

<400> 146
 Xaa Xaa Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Xaa Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn
 20 25 30

Xaa Val Asn Trp Tyr Xaa Gln Xaa Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Leu Xaa Asn Xaa Arg Xaa Xaa Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Xaa
 85 90 95

Xaa Gly Trp Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 147
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> Met或Tyr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (50)..(50)
 <223> Leu或Ala

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (52)..(52)
 <223> Trp或Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (55)..(55)
 <223> Trp或Gly

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (57)..(57)
 <223> Ser或Arg

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (102)..(102)
 <223> Gly或Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (103)..(103)
 <223> Arg或Thr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (104)..(104)
 <223> Val或Ile

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (106)..(106)
 <223> Tyr、Lys、Met、Leu或Glu

<400> 147
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Xaa Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Xaa Ile Xaa Gly Ser Xaa Gly Xaa Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Gly Tyr Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Trp Gly Arg Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 148
 <211> 574
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 148

Met Cys Pro Arg Ala Ala Arg Ala Pro Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Gly Ala Val Leu Trp Pro Ala Ala Gly Ala Trp Glu Leu Thr Ile Leu
 20 25 30

His Thr Asn Asp Val His Ser Arg Leu Glu Gln Thr Ser Glu Asp Ser
 35 40 45

Ser Lys Cys Val Asn Ala Ser Arg Cys Met Gly Gly Val Ala Arg Leu
 50 55 60

Phe Thr Lys Val Gln Gln Ile Arg Arg Ala Glu Pro Asn Val Leu Leu
 65 70 75 80

Leu Asp Ala Gly Asp Gln Tyr Gln Gly Thr Ile Trp Phe Thr Val Tyr
 85 90 95

Lys Gly Ala Glu Val Ala His Phe Met Asn Ala Leu Arg Tyr Asp Ala
 100 105 110

Met Ala Leu Gly Asn His Glu Phe Asp Asn Gly Val Glu Gly Leu Ile
 115 120 125

Glu Pro Leu Leu Lys Glu Ala Lys Phe Pro Ile Leu Ser Ala Asn Ile
 130 135 140

Lys Ala Lys Gly Pro Leu Ala Ser Gln Ile Ser Gly Leu Tyr Leu Pro
 145 150 155 160

Tyr Lys Val Leu Pro Val Gly Asp Glu Val Val Gly Ile Val Gly Tyr
 165 170 175

Thr Ser Lys Glu Thr Pro Phe Leu Ser Asn Pro Gly Thr Asn Leu Val
 180 185 190

Phe Glu Asp Glu Ile Thr Ala Leu Gln Pro Glu Val Asp Lys Leu Lys
 195 200 205

Thr Leu Asn Val Asn Lys Ile Ile Ala Leu Gly His Ser Gly Phe Glu
 210 215 220

Met Asp Lys Leu Ile Ala Gln Lys Val Arg Gly Val Asp Val Val Val
 225 230 235 240

Gly Gly His Ser Asn Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Asn Pro Pro Ser Lys
 245 250 255
 Glu Val Pro Ala Gly Lys Tyr Pro Phe Ile Val Thr Ser Asp Asp Gly
 260 265 270
 Arg Lys Val Pro Val Val Gln Ala Tyr Ala Phe Gly Lys Tyr Leu Gly
 275 280 285
 Tyr Leu Lys Ile Glu Phe Asp Glu Arg Gly Asn Val Ile Ser Ser His
 290 295 300
 Gly Asn Pro Ile Leu Leu Asn Ser Ser Ile Pro Glu Asp Pro Ser Ile
 305 310 315 320
 Lys Ala Asp Ile Asn Lys Trp Arg Ile Lys Leu Asp Asn Tyr Ser Thr
 325 330 335
 Gln Glu Leu Gly Lys Thr Ile Val Tyr Leu Asp Gly Ser Ser Gln Ser
 340 345 350
 Cys Arg Phe Arg Glu Cys Asn Met Gly Asn Leu Ile Cys Asp Ala Met
 355 360 365
 Ile Asn Asn Asn Leu Arg His Thr Asp Glu Met Phe Trp Asn His Val
 370 375 380
 Ser Met Cys Ile Leu Asn Gly Gly Gly Ile Arg Ser Pro Ile Asp Glu
 385 390 395 400
 Arg Asn Asn Gly Thr Ile Thr Trp Glu Asn Leu Ala Ala Val Leu Pro
 405 410 415
 Phe Gly Gly Thr Phe Asp Leu Val Gln Leu Lys Gly Ser Thr Leu Lys
 420 425 430
 Lys Ala Phe Glu His Ser Val His Arg Tyr Gly Gln Ser Thr Gly Glu
 435 440 445
 Phe Leu Gln Val Gly Gly Ile His Val Val Tyr Asp Leu Ser Arg Lys
 450 455 460
 Pro Gly Asp Arg Val Val Lys Leu Asp Val Leu Cys Thr Lys Cys Arg
 465 470 475 480
 Val Pro Ser Tyr Asp Pro Leu Lys Met Asp Glu Val Tyr Lys Val Ile
 485 490 495
 Leu Pro Asn Phe Leu Ala Asn Gly Gly Asp Gly Phe Gln Met Ile Lys
 500 505 510

Asp Glu Leu Leu Arg His Asp Ser Gly Asp Gln Asp Ile Asn Val Val
 515 520 525

Ser Thr Tyr Ile Ser Lys Met Lys Val Ile Tyr Pro Ala Val Glu Gly
 530 535 540

Arg Ile Lys Phe Ser Thr Gly Ser His Cys His Gly Ser Phe Ser Leu
 545 550 555 560

Ile Phe Leu Ser Leu Trp Ala Val Ile Phe Val Leu Tyr Gln
 565 570

<210> 149

<211> 223

<212> PRT

<213> 智人

<400> 149

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
 1 5 10 15

Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
 20 25 30

Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
 35 40 45

Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
 50 55 60

Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
 65 70 75 80

Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
 85 90 95

Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
 100 105 110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
 115 120 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly
 130 135 140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
 145 150 155 160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe
 165 170 175

Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys
 180 185 190
 Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu
 195 200 205
 Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
 210 215 220
 <210> 150
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 150
 Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
 1 5 10 15
 Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
 20 25 30
 Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
 35 40 45
 Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
 50 55 60
 Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
 65 70 75 80
 Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
 85 90 95
 Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
 100 105 110
 Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
 115 120 125
 Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
 130 135 140
 Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
 145 150 155 160
 Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
 165 170 175
 Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
 180 185 190
 Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro

Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu Glu Thr
 165 170 175

<210> 152
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Pro、Glu或Asp

<400> 152
 Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Arg Asn Xaa Val Asn
 1 5 10

<210> 153
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Asn或Asp

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Gln或Leu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Leu或Pro

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Gly或Ser

<400> 153
 Leu Xaa Asn Xaa Arg Xaa Xaa
 1 5

<210> 154
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> Leu或His

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Lys、Pro、Ile或Asn

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> Leu或Thr

<400> 154

Ala Thr Trp Asp Asp Ser Xaa Xaa Gly Trp Xaa
1 5 10

<210> 155

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Met或Tyr

<400> 155

Ser Tyr Ala Xaa Ser
1 5

<210> 156

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Leu或Ala

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Trp或Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Trp或Gly

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Ser或Arg

<400> 156

Xaa Ile Xaa Gly Ser Xaa Gly Xaa Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 157

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> Gly或Ser

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Arg或Thr

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Val或Ile

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> Tyr、Lys、Met、Leu或Glu

<400> 157

Leu Gly Tyr Xaa Xaa Xaa Asp Xaa
 1 5

<210> 158

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Ser或Thr

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Arg或Tyr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> His·Pro或Leu

<400> 158
 Glu Asp Xaa Lys Xaa Xaa Ser
 1 5

<210> 159
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Tyr或Val

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Met或Arg

<400> 159
 Ser Xaa Ala Xaa Ser
 1 5

<210> 160
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Thr或Pro

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> Ala或Gly

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)..(17)
 <223> Gly或Arg

<400> 160
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Xaa Tyr Tyr Xaa Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Xaa

<210> 161
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 161
 Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met
 1 5

<210> 162
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(22)
 <223> 此區域可涵蓋『QSVLTQPPSVSVSPGQTATITC』或
 『QSVLTQPPSVSVSPGQTASITC』

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (19)..(19)
 <223> Thr或Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (51)..(51)
 <223> Pro或Leu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (53)..(53)
 <223> Arg或Tyr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (54)..(54)
 <223> His、Pro或Leu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (56)..(56)
 <223> Arg或Gly

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (66)..(66)
 <223> Ser或Arg

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (80)..(80)
 <223> Leu或Met

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (86)..(86)
 <223> Phe或Tyr

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (56)..(87)
 <223> 此區域可涵蓋『RIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYFC』、
 『GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC』或
 『GIPERFSGSNRGNTATLTISGTQAMDEADYYC』

<400> 162
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Xaa Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Val Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
 35 40 45

Glu Asp Xaa Lys Xaa Xaa Ser Xaa Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Xaa Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Xaa
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Xaa Cys Gln Ala Trp Asp Thr Ser Phe Trp Val
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 163
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成多肽

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (32)..(32)
 <223> Tyr或Val

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> Met或Arg

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (58)..(58)
 <223> Thr或Pro

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (61)..(61)
 <223> Ala或Gly

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (66)..(66)
 <223> Gly或Arg

<400> 163
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Xaa
 20 25 30

Ala Xaa Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Xaa Tyr Tyr Xaa Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Xaa Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Tyr Trp Tyr Met Trp Gly Gln Gly Thr Met
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 164
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成6×His標籤

<400> 164
 His His His His His His
 1 5

<210> 165
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 165
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly



1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

 <210> 166
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 智人

 <400> 166
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30
 Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95
 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 167
 <211> 526

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 167

Trp Glu Leu Thr Ile Leu His Thr Asn Asp Val His Ser Arg Leu Glu
 1 5 10 15

Gln Thr Ser Glu Asp Ser Ser Lys Cys Val Asn Ala Ser Arg Cys Met
 20 25 30

Gly Gly Val Ala Arg Leu Phe Thr Lys Val Gln Gln Ile Arg Arg Ala
 35 40 45

Glu Pro Asn Val Leu Leu Leu Asp Ala Gly Asp Gln Tyr Gln Gly Thr
 50 55 60

Ile Trp Phe Thr Val Tyr Lys Gly Ala Glu Val Ala His Phe Met Asn
 65 70 75 80

Ala Leu Arg Tyr Asp Ala Met Ala Leu Gly Asn His Glu Phe Asp Asn
 85 90 95

Gly Val Glu Gly Leu Ile Glu Pro Leu Leu Lys Glu Ala Lys Phe Pro
 100 105 110

Ile Leu Ser Ala Asn Ile Lys Ala Lys Gly Pro Leu Ala Ser Gln Ile
 115 120 125

Ser Gly Leu Tyr Leu Pro Tyr Lys Val Leu Pro Val Gly Asp Glu Val
 130 135 140

Val Gly Ile Val Gly Tyr Thr Ser Lys Glu Thr Pro Phe Leu Ser Asn
 145 150 155 160

Pro Gly Thr Asn Leu Val Phe Glu Asp Glu Ile Thr Ala Leu Gln Pro
 165 170 175

Glu Val Asp Lys Leu Lys Thr Leu Asn Val Asn Lys Ile Ile Ala Leu
 180 185 190

Gly His Ser Gly Phe Glu Met Asp Lys Leu Ile Ala Gln Lys Val Arg
 195 200 205

Gly Val Asp Val Val Val Gly Gly His Ser Asn Thr Phe Leu Tyr Thr
 210 215 220

Gly Asn Pro Pro Ser Lys Glu Val Pro Ala Gly Lys Tyr Pro Phe Ile
 225 230 235 240

Val Thr Ser Asp Asp Gly Arg Lys Val Pro Val Val Gln Ala Tyr Ala
 245 250 255
 Phe Gly Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu Lys Ile Glu Phe Asp Glu Arg Gly
 260 265 270
 Asn Val Ile Ser Ser His Gly Asn Pro Ile Leu Leu Asn Ser Ser Ile
 275 280 285
 Pro Glu Asp Pro Ser Ile Lys Ala Asp Ile Asn Lys Trp Arg Ile Lys
 290 295 300
 Leu Asp Asn Tyr Ser Thr Gln Glu Leu Gly Lys Thr Ile Val Tyr Leu
 305 310 315 320
 Asp Gly Ser Ser Gln Ser Cys Arg Phe Arg Glu Cys Asn Met Gly Asn
 325 330 335
 Leu Ile Cys Asp Ala Met Ile Asn Asn Asn Leu Arg His Ala Asp Glu
 340 345 350
 Met Phe Trp Asn His Val Ser Met Cys Ile Leu Asn Gly Gly Gly Ile
 355 360 365
 Arg Ser Pro Ile Asp Glu Arg Asn Asn Gly Thr Ile Thr Trp Glu Asn
 370 375 380
 Leu Ala Ala Val Leu Pro Phe Gly Gly Thr Phe Asp Leu Val Gln Leu
 385 390 395 400
 Lys Gly Ser Thr Leu Lys Lys Ala Phe Glu His Ser Val His Arg Tyr
 405 410 415
 Gly Gln Ser Thr Gly Glu Phe Leu Gln Val Gly Gly Ile His Val Val
 420 425 430
 Tyr Asp Leu Ser Arg Lys Pro Gly Asp Arg Val Val Lys Leu Asp Val
 435 440 445
 Leu Cys Thr Lys Cys Arg Val Pro Ser Tyr Asp Pro Leu Lys Met Asp
 450 455 460
 Glu Val Tyr Lys Val Ile Leu Pro Asn Phe Leu Ala Asn Gly Gly Asp
 465 470 475 480
 Gly Phe Gln Met Ile Lys Asp Glu Leu Leu Arg His Asp Ser Gly Asp
 485 490 495
 Gln Gly Ile Asn Val Val Ser Thr Tyr Ile Ser Lys Met Lys Val Ile
 500 505 510

Tyr Pro Ala Val Glu Gly Arg Ile Lys Phe Ser Thr Gly Ser
 515 520 525

<210> 168
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 168
 Ser Ala Asn Ile Lys Ala Lys Gly Pro Leu Ala Ser Gln Ile Ser Gly
 1 5 10 15

Leu

<210> 169
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 169
 Val Leu Pro Val Lys Val Leu Pro Val Gly Asp Glu
 1 5 10

<210> 170
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 170
 Leu Pro Tyr Lys Val Leu Pro Val Gly Asp
 1 5 10

<210> 171
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 171
 Glu Val Val Gly Ile Val Gly
 1 5

<210> 172

<211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 172
 Ala Leu Gln Pro Glu Val Asp Lys Leu
 1 5

<210> 173
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 173
 Ala Leu Gln Pro Glu Val Asp Lys Leu Lys Thr Leu Asn Val
 1 5 10

<210> 174
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 174
 Lys Leu Lys Thr Leu Asn Val Asn Lys Ile Ile Ala
 1 5 10

<210> 175
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 175
 Asn Lys Ile Ile Ala Leu Gly His Ser Gly Phe
 1 5 10

<210> 176
 <211> 523
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 176
 Trp Glu Leu Thr Ile Leu His Thr Asn Asp Val His Ser Arg Leu Glu
 1 5 10 15

Gln Thr Ser Glu Asp Ser Ser Lys Cys Val Asn Ala Ser Arg Cys Met
 20 25 30

Gly Gly Val Ala Arg Leu Phe Thr Lys Val Gln Gln Ile Arg Arg Ala
 35 40 45
 Glu Pro Asn Val Leu Leu Leu Asp Ala Gly Asp Gln Tyr Gln Gly Thr
 50 55 60
 Ile Trp Phe Thr Val Tyr Lys Gly Ala Glu Val Ala His Phe Met Asn
 65 70 75 80
 Ala Leu Arg Tyr Asp Ala Met Ala Leu Gly Asn His Glu Phe Asp Asn
 85 90 95
 Gly Val Glu Gly Leu Ile Glu Pro Leu Leu Lys Glu Ala Lys Phe Pro
 100 105 110
 Ile Leu Ser Ala Asn Ile Lys Ala Lys Gly Pro Leu Ala Ser Gln Ile
 115 120 125
 Ser Gly Leu Tyr Leu Pro Tyr Lys Val Leu Pro Val Gly Asp Glu Val
 130 135 140
 Val Gly Ile Val Gly Tyr Thr Ser Lys Glu Thr Pro Phe Leu Ser Asn
 145 150 155 160
 Pro Gly Thr Asn Leu Val Phe Glu Asp Glu Ile Thr Ala Leu Gln Pro
 165 170 175
 Glu Val Asp Lys Leu Lys Thr Leu Asn Val Asn Lys Ile Ile Ala Leu
 180 185 190
 Gly His Ser Gly Phe Glu Met Asp Lys Leu Ile Ala Gln Lys Val Arg
 195 200 205
 Gly Val Asp Val Val Val Gly Gly His Ser Asn Thr Phe Leu Tyr Thr
 210 215 220
 Gly Asn Pro Pro Ser Lys Glu Val Pro Ala Gly Lys Tyr Pro Phe Ile
 225 230 235 240
 Val Thr Ser Asp Asp Gly Arg Lys Val Pro Val Val Gln Ala Tyr Ala
 245 250 255
 Phe Gly Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu Lys Ile Glu Phe Asp Glu Arg Gly
 260 265 270
 Asn Val Ile Ser Ser His Gly Asn Pro Ile Leu Leu Asn Ser Ser Ile
 275 280 285
 Pro Glu Asp Pro Ser Ile Lys Ala Asp Ile Asn Lys Trp Arg Ile Lys

Ala Arg Gly Cys Ala Glu Gly Pro Arg Gly Cys Phe Gly Gly Val Ala
 20 25 30
 Arg Arg Ala Ala Arg Val Ala Ala Glu Arg Ala Ala Gln Arg Asn Val
 35 40 45
 Leu Leu Leu Asp Ala Gly Asp Gln Tyr Gln Gly Ser Val Trp Phe Ser
 50 55 60
 Arg Phe Lys Gly Gln Glu Ala Val His Phe Met Asn Leu Leu Arg Tyr
 65 70 75 80
 Asp Ala Met Ala Leu Gly Asn His Glu Phe Asp Glu Gly Val Arg Gly
 85 90 95
 Leu Leu Asn Pro Leu Leu Arg Asn Ala Ser Phe Ala Ile Leu Ser Ala
 100 105 110
 Asn Ile Lys Gly Lys Thr Pro Leu Gly Asn Gln Met Met Lys Tyr Val
 115 120 125
 His Pro Tyr Lys Ile Leu His Ile Asp Ser Glu Lys Ile Gly Ile Val
 130 135 140
 Gly Tyr Thr Thr Gln Glu Thr Ser Phe Leu Ser Gln Pro Gly Asn Asp
 145 150 155 160
 Val Ile Phe Glu Asp Glu Ile Glu Ala Leu Gln Val Gln Val Asn Lys
 165 170 175
 Leu Thr Ala Met Gly Val Asn Lys Ile Ile Ala Leu Gly His Ser Gly
 180 185 190
 Phe Thr Val Asp Ile Asn Ile Ala Gln Lys Val Lys Gly Val Asp Val
 195 200 205
 Val Ile Gly Gly His Thr Asn Thr Phe Leu Tyr Thr Gly Thr Pro Pro
 210 215 220
 Ser Thr Glu Gln Pro Ala Gly Pro Tyr Pro Phe Met Val Asp Ser Asp
 225 230 235 240
 Asp Gly Arg Lys Val Pro Val Val Gln Ala Tyr Ala Tyr Gly Lys Tyr
 245 250 255
 Leu Gly Tyr Leu Asn Val Thr Phe Asp Glu Lys Gly Asn Val Val Glu
 260 265 270
 Ala Val Gly Asn Pro Ile Leu Leu Asp Ser Ser Val Pro Glu Asp Glu

<220>

<223> 人工序列之描述：合成多肽

<400> 178

Ser Gly Leu Tyr Leu Pro Tyr Lys Val Leu Pro Val Gly Asp Glu Val
1 5 10 15Val Gly Ile Val Gly Tyr Thr Ser Lys Glu Thr Pro Phe Leu Ser Asn
20 25 30Pro Gly Thr Asn Leu Val Phe Glu Asp Glu Ile Thr Ala Leu Gln Pro
35 40 45Glu Val Asp Lys Leu Lys Thr Leu Asn Val Asn Lys
50 55 60

201632555

發明摘要

※ 申請案號：104137067

※ 申請日：104.11.10

※IPC 分類：

C07K 16/58 (2006.01)

A61K 39/95 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】

對CD73具專一性之結合分子及其用途

BINDING MOLECULES SPECIFIC FOR CD73 AND USES
THEREOF

【中文】

本發明提供抗-CD73結合分子，例如抗體及其抗原結合片段。亦提供包含所揭示之組合物的醫藥調配物，及用於診斷及治療與CD73表現相關之疾病(例如癌症)的方法。該等疾病可例如利用以下治療：使用本文中所揭示之抗-CD73結合分子(例如結合CD73之裸抗體或抗體-藥物結合物)的直接療法，使用其他抗原結合抗癌劑(諸如免疫檢查點抑制劑，例如抗-CTLA-4及抗-PD-1單株抗體)的輔助療法，及/或抗-CD73分子在化學療法之前、之後或同時投與的組合療法。

【英文】

The present disclosure provides anti-CD73 binding molecules, e.g., antibodies and antigen binding fragments thereof. Also provided are pharmaceutical formulations comprising the disclosed compositions, and methods for the diagnosis and treatment of diseases associated with CD73-expression, e.g., cancer. Such diseases can be treated, e.g., by direct therapy with the anti-CD73 binding molecules disclosed herein (e.g., naked antibodies or antibody-drug conjugates that bind CD73), by adjuvant therapy with other antigen-binding anticancer agents such as immune checkpoint inhibitors (e.g., anti-CTLA-4 and anti-PD-1 monoclonal antibodies), and/or by combination therapies where the anti-CD73 molecules are administered before, after, or concurrently with chemotherapy.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（2）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）

申請專利範圍

1. 一種專一性結合至CD73的經分離之結合分子或其抗原結合片段，其包含抗體V_L，其中該V_L包含胺基酸序列：

[FW₁]SGSLSNIGRNX₁VN[FW₂]LX₂NX₃RX₄X₅[FW₃]ATWDDS
X₆X₇GWX₈[FW₄]

其中[FW₁]、[FW₂]、[FW₃]及[FW₄]表示V_L構架區，且其中X₁表示胺基酸殘基脯胺酸(P)、麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)；X₂表示胺基酸殘基天冬醯胺酸(N)或天冬胺酸(D)；

X₃表示胺基酸殘基麩醯胺酸(Q)或白胺酸(L)；

X₄表示胺基酸殘基白胺酸(L)或脯胺酸(P)；

X₅表示胺基酸殘基甘胺酸(G)或絲胺酸(S)；

X₆表示胺基酸殘基白胺酸(L)或組胺酸(H)；

X₇表示胺基酸殘基離胺酸(K)、脯胺酸(P)、異白胺酸(I)或天冬醯胺酸(N)；及

X₈表示胺基酸殘基白胺酸(L)或蘇胺酸(T)。

2. 如請求項1之經分離之結合分子或其抗原結合片段，其中FW₁包含SEQ ID NO: 25或26，FW₂包含SEQ ID NO: 27或28，FW₃包含SEQ ID NO: 29，且FW₄包含SEQ ID NO: 30。

3. 一種專一性結合至CD73的經分離之結合分子或其抗原結合片段，其包含抗體V_H，其中該V_H包含胺基酸序列：

[FW₅]SYAX₉S[FW₆]X₁₀IX₁₁GSX₁₂GX₁₃TYADSVKG[FW₇]LGY
X₁₄X₁₅X₁₆DX₁₇[FW₈]

其中[FW₅]、[FW₆]、[FW₇]及[FW₈]表示V_H構架區，且其中

X₉表示胺基酸殘基甲硫胺酸(M)或酪胺酸(Y)；

X₁₀表示胺基酸殘基白胺酸(L)或丙胺酸(A)；

X₁₁表示胺基酸殘基色胺酸(W)或絲胺酸(S)；

X₁₂表示胺基酸殘基色胺酸(W)或甘胺酸(G)；

X₁₃表示胺基酸殘基絲胺酸(S)或精胺酸(R)；

X₁₄表示胺基酸殘基甘胺酸(G)或絲胺酸(S)；

X₁₅表示胺基酸殘基精胺酸(R)或蘇胺酸(T)；

X₁₆表示胺基酸殘基纈胺酸(V)或異白胺酸(I)；及

X₁₇表示胺基酸殘基酪胺酸(Y)、離胺酸(K)、甲硫胺酸(M)、白胺酸(L)或麩胺酸(E)。

4. 如請求項3之經分離之結合分子或其抗原結合片段，其中FW₅包含SEQ ID NO: 31，FW₆包含SEQ ID NO: 32，FW₇包含SEQ ID NO: 33且FW₈包含SEQ ID NO: 34。

5. 一種專一性結合至CD73的經分離之結合分子或其抗原結合片段，其包含抗體V_L及抗體V_H，其中該V_L包含胺基酸序列：

[FW₁]SGSLSNIGRNX₁VN[FW₂]LX₂NX₃RX₄X₅[FW₃]ATWDDS
X₆X₇GWX₈[FW₄]

其中[FW₁]、[FW₂]、[FW₃]及[FW₄]表示V_L構架區，且其中

X₁表示胺基酸殘基脯胺酸(P)、麩胺酸(E)或天冬胺酸(D)；

X₂表示胺基酸殘基天冬醯胺酸(N)或天冬胺酸(D)；

X₃表示胺基酸殘基麩醯胺酸(Q)或白胺酸(L)；

X₄表示胺基酸殘基白胺酸(L)或脯胺酸(P)；

X₅表示胺基酸殘基甘胺酸(G)或絲胺酸(S)；

X₆表示胺基酸殘基白胺酸(L)或組胺酸(H)；

X₇表示胺基酸殘基離胺酸(K)、脯胺酸(P)、異白胺酸(I)或天冬醯胺酸(N)；及

X₈表示胺基酸殘基白胺酸(L)或蘇胺酸(T)；

且其中該V_H包含胺基酸序列：

[FW₅]SYAX₉S[FW₆]X₁₀IX₁₁GSX₁₂GX₁₃TYADSVKG[FW₇]LGY
X₁₄X₁₅X₁₆DX₁₇ [FW₈]

其中[FW₅]、[FW₆]、[FW₇]及[FW₈]表示VH構架區，且其中

X₉表示胺基酸殘基甲硫胺酸(M)或酪胺酸(Y)；

X₁₀表示胺基酸殘基白胺酸(L)或丙胺酸(A)；

X₁₁表示胺基酸殘基色胺酸(W)或絲胺酸(S)；

X₁₂表示胺基酸殘基色胺酸(W)或甘胺酸(G)；

X₁₃表示胺基酸殘基絲胺酸(S)或精胺酸(R)；

X₁₄表示胺基酸殘基甘胺酸(G)或絲胺酸(S)；

X₁₅表示胺基酸殘基精胺酸(R)或蘇胺酸(T)；

X₁₆表示胺基酸殘基纈胺酸(V)或異白胺酸(I)；及

X₁₇表示胺基酸殘基酪胺酸(Y)、離胺酸(K)、甲硫胺酸(M)、白胺酸(L)或麩胺酸(E)。

6. 如請求項5之經分離之結合分子或其抗原結合片段，其中FW₁包含SEQ ID NO: 25或26，FW₂包含SEQ ID NO: 27或28，FW₃包含SEQ ID NO: 29，FW₄包含SEQ ID NO: 30，FW₅包含SEQ ID NO: 31，FW₆包含SEQ ID NO: 32，FW₇包含SEQ ID NO: 33且FW₈包含SEQ ID NO: 34。
7. 如請求項1至6中任一項之經分離之結合分子或其抗原結合片段，其包含抗體或其抗原結合片段。
8. 一種專一性結合至CD73的經分離之結合分子或其抗原結合片段，其包含抗體V_L，其中該V_L包含VL-CDR1、VL-CDR2及VL-CDR3胺基酸序列分別與以下一致或與以下一致除了該等VL-CDR中之一或多者中的四、三、二或一個胺基酸取代之外：SEQ ID NO: 46、49及53；SEQ ID NO: 47、49及53；SEQ ID NO: 47、49及54；SEQ ID NO: 46、50及54；SEQ ID NO: 46、51及

55 ; SEQ ID NO: 48、52及54 ; SEQ ID NO: 46、49及56 ; SEQ ID NO: 47、49及56 ; SEQ ID NO: 46、50及56 ; SEQ ID NO: 46、51及56 ; 或SEQ ID NO: 48、52及56。

9. 一種專一性結合至CD73的經分離之結合分子或其抗原結合片段，其包含抗體 V_H ，其中該 V_H 包含VH-CDR1、VH-CDR2及VH-CDR3胺基酸序列分別與以下一致或與以下一致除了該等VH-CDR中之一或多者中的四、三、二或一個胺基酸取代之外：SEQ ID NO: 35、37及41；SEQ ID NO: 36、37及42；SEQ ID NO: 36、38及43；SEQ ID NO: 36、39及44；SEQ ID NO: 36、40及44；SEQ ID NO: 35、37及45；SEQ ID NO: 36、37及45；SEQ ID NO: 36、38及45；SEQ ID NO: 36、39及45；或SEQ ID NO: 36、40及45。
10. 如請求項8或9之經分離之結合分子或其抗原結合片段，其包含抗體或其抗原結合片段。
11. 一種專一性結合至CD73的經分離之抗體或其抗原結合片段，其包含 V_L 及 V_H ，該 V_L 及該 V_H 包含VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3、VH-CDR1、VH-CDR2及VH-CDR3胺基酸序列分別與以下一致或與以下一致除了一或多個CDR中的四、三、二或一個胺基酸取代之外：SEQ ID NO: 46、49、53、35、37及41；SEQ ID NO: 47、49、53、35、37及41；SEQ ID NO: 47、49、54、36、37及42；SEQ ID NO: 46、50、54、36、38及43；SEQ ID NO: 46、51、55、36、39及44；SEQ ID NO: 48、52、54、36、40及44；SEQ ID NO: 46、49、56、35、37及41；SEQ ID NO: 46、49、53、35、37及45；SEQ ID NO: 47、49、56、36、37及45；SEQ ID NO: 46、50、56、36、38及45；SEQ ID NO: 46、51、56、36、39及45；SEQ ID NO: 48、52、56、36、40及45；或

SEQ ID NO: 46、49、56、35、37及45。

12. 如請求項11之經分離之抗體或其抗原結合片段，其包含抗體或其抗原結合片段。
13. 一種經分離之抗體或其抗原結合片段，其包含：包含SEQ ID NO: 68之V_L及包含SEQ ID NO: 82之V_H。
14. 一種經分離之抗體或其抗原結合片段，其包含基本上由SEQ ID NO: 68組成之V_L及基本上由SEQ ID NO: 82組成之V_H。
15. 一種經分離之抗體或其抗原結合片段，其包含由SEQ ID NO: 68組成之V_L及由SEQ ID NO: 82組成之V_H。
16. 如請求項7之經分離之結合分子或其抗原結合片段，其包含重鏈恆定區或其片段。
17. 如請求項10之經分離之結合分子或其抗原結合片段，其包含重鏈恆定區或其片段。
18. 如請求項11至15中任一項之經分離之抗體或其抗原結合片段，其包含重鏈恆定區或其片段。
19. 一種核酸，其包含編碼如請求項7及10至18中任一項之經分離之抗體或其抗原結合片段的序列。
20. 一種宿主細胞，其包含如請求項19之核酸序列。
21. 一種製造如請求項7及10至18中任一項之抗體或其抗原結合片段的方法，其包含(a)培養如請求項20之細胞；以及(b)分離該抗體或其抗原結合片段。
22. 如請求項7之經分離之結合分子或其抗原結合片段，其為CD73之拮抗劑。
23. 如請求項10之經分離之結合分子或其抗原結合片段，其為CD73之拮抗劑。
24. 如請求項11至15中任一項之經分離之抗體或其抗原結合片段，其

為CD73之拮抗劑。

25. 如請求項22之經分離之結合分子或其抗原結合片段，其中該CD73為人類CD73。
26. 如請求項23之經分離之結合分子或其抗原結合片段，其中該CD73為人類CD73。
27. 如請求項24之經分離之抗體或其抗原結合片段，其中該CD73為人類CD73。
28. 一種如請求項7至27中任一項之抗體或其抗原結合片段的用途，其用於製造供治療癌症之藥物。
29. 如請求項28之用途，其中該癌症係選自由以下組成之群：結腸直腸癌、胰臟癌、膀胱癌、白血病、淋巴瘤、膠質瘤、神經膠母細胞瘤、黑素瘤、卵巢癌、甲狀腺癌、食道癌、前列腺癌及乳癌。
30. 一種抗-CD73抗體或其抗原結合片段之用途，其用於製造供治療鑑別為具有CD73表現相對於參考物增加之腫瘤之個體的藥物。
31. 如請求項30之用途，其中該抗-CD73抗體為MEDI9447或Phen0203 hIgG1。
32. 如請求項30或31之用途，其中該個體正經歷、已經歷或將經歷抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4療法。
33. 如請求項32之用途，其中該抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4療法包含投與抗-PD-1、抗-PD-L1或抗-CTLA4抗體或其抗原結合片段。
34. 如請求項33之用途，其中該抗-PD-1抗體為派立珠單抗(pembrolizumab)(KEYTRUDA®、拉立珠單抗(lambrolizumab)、MK-3475)、尼沃單抗(nivolumab)(OPDIVA®、BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538)、AMP-224或其抗原結合片段。

35. 如請求項33之用途，其中該抗-PD-L1抗體為MEDI4736、BMS-936559或MPDL3280A或其抗原結合片段。
36. 如請求項33之用途，其中該抗-CTLA-4抗體為伊派利單抗(ipilimumab)、曲美單抗(tremelimumab)(替西單抗(ticilimumab)、CP-675,206)或其抗原結合片段。
37. 一種醫藥調配物，其包含有效量之抗-CD73抗體或其抗原結合片段及抗-PD-L1抗體或其抗原結合片段。
38. 如請求項37之醫藥調配物，其中該抗-CD73抗體為MEDI9447、Phen0203 hIgG1或其抗原結合片段。
39. 如請求項37或38之醫藥調配物，其中該抗-PD-L1抗體為MEDI4736、BMS-936559或MPDL3280A或其抗原結合片段。
40. 一種醫藥調配物，其包含有效量之抗-CD73抗體或其抗原結合片段及抗-CTLA4抗體或其抗原結合片段。
41. 如請求項40之醫藥調配物，其中該抗-CD73抗體為MEDI9447、Phen0203 hIgG1或其抗原結合片段。
42. 如請求項40或41之醫藥調配物，其中該抗-CTLA4抗體為伊派利單抗或曲美單抗(替西單抗、CP-675,206)或其抗原結合片段。
43. 一種專一性結合至CD73的經分離之結合分子或其抗原結合片段，其具有抗體V_L及抗體V_H，其專一性結合至包含一或多個對應於Val144、Lys180及Asn185之胺基酸之CD73蛋白的抗原決定基。
44. 如請求項43之經分離之結合分子或其抗原結合片段，其進一步包含一或多個對應於Tyr135、Lys136及Asn187之胺基酸。
45. 如請求項43或44之經分離之結合分子或其抗原結合片段，其包含對應於Tyr135、Lys136及Asn187之胺基酸。
46. 如請求項43或44之經分離之結合分子或其抗原結合片段，其包

含對應於 Tyr135、Lys136、Asn185、Tyr135、Lys136及 Asn187之胺基酸。

47. 如請求項43或44之經分離之結合分子或其抗原結合片段，其結合 CD73 蛋白之以下一或多個區域中之抗原決定基：Tyr132-Val144及/或Lys180-Asn187。
48. 如請求項43或44之經分離之結合分子或其抗原結合片段，其包含在Tyr132-Val144及/或Lys180-Asn187之胺基酸序列。

圖式

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT
 E V Q L L E S G G O L V Q P Q G S L R L B C A A S O F
 CACCTTTAGCAGCTATGCCTATAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTA
 T F S S Y A Y S W V R Q A P G K G L E W V S A I S G
 GTGGTGGTAGAACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTAT
 S G G R T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
 CTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGATTACTGTGCGAGATTAGGGTATGGGCGGGTGGACGAGTG
 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R L G Y G R V D E W
 GGCAGGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT
 G R O T L V T V S S

圖1A

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCCTCTC
 Q S V L T O P P S A S G T P G O R V T I S C S G S L S
 CAACATCGGAAGGAATCCTGTTAACTGGTATCAGCAGCTCCCAGGGACGGCCCCAACTCCTCATCTATCTTGATAATC
 N I G R N P V N W Y Q O L P G T A P K L L I Y L D N
 TACGGCTAAGTGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGAACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGTCCAG
 L R L S G V P D R F S Q S K S Q T S A B L A I S G L Q
 TCTGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAACATGGGATGACAGCCACCCCGGTGGACGTTGGGCGGAGGACCAAGCT
 S E D E A D Y Y C A T W D D S H P Q W T F Q Q O T K L
 GACCGTCTA
 T V L

圖1B

Kabat位置： IGHV3-23*01 / IGHJ2*01 MED19447 VH	<p style="text-align: right;">. CDR 1</p> <p>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 a b c d</p> <p>E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S</p> <p>E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A Y S</p>
Kabat位置： IGHV3-23*01 / IGHJ2*01 MED19447 VH	<p style="text-align: right;">. CDR 2</p> <p>36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z</p> <p>W V R Q A P G K G L E W V S A I S G S G G S T Y Y A D S V K G R F T</p> <p>W V R Q A P G K G L E W V S A I S G S G G R T Y Y A D S V K G R F T</p>
Kabat位置： IGHV3-23*01 / IGHJ2*01 MED19447 VH	<p style="text-align: right;">. CDR 3</p> <p>60 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z</p> <p>I S R D N S K N T L Y L Q M N S L . . R A E D T A V Y Y C A K . . Y W Y F . .</p> <p>I S R D N S K N T L Y L Q M N S L . . R A E D T A V Y Y C A R L G Y G R V . .</p>
Kabat位置： IGHV3-23*01 / IGHJ2*01 MED19447 VH	<p style="text-align: right;">. CDR 4</p> <p>90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113</p> <p>. D L W G R G T L V T V S S</p> <p>. D E W G R G T L V T V S S</p>

圖1C

Kabat位置： IGLV1-44*01 / IGLJ3*01 MED19447 VL	<p style="text-align: right;">. CDR 1</p> <p>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z</p> <p>Q S V L T Q P P S . A S G T P G Q R V T I S C S G S S S N I G S N T V N</p> <p>Q S V L T Q P P S . A S G T P G Q R V T I S C S G S L S N I G R N P V N</p>
Kabat位置： IGLV1-44*01 / IGLJ3*01 MED19447 VL	<p style="text-align: right;">. CDR 2</p> <p>35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z</p> <p>W Y Q Q L P G T A P K L L I Y S N N Q R P S G V P D R F S G S K S G . . T</p> <p>W Y Q Q L P G T A P K L L I Y L D N L R L S G V P D R F S G S K S G . . T</p>
Kabat位置： IGLV1-44*01 / IGLJ3*01 MED19447 VL	<p style="text-align: right;">. CDR 3</p> <p>70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 a b c d e f g h i j k l m n o p q r s t u v w x y z</p> <p>S A S L A I S G L Q S E D E A D Y Y C A A W D D S L V V F G G G T</p> <p>S A S L A I S G L Q S E D E A D Y Y C A T W D D S H P G W T F G G G T</p>
Kabat位置： IGLV1-44*01 / IGLJ3*01 MED19447 VL	<p style="text-align: right;">. CDR 4</p> <p>100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040 1041 1042 1043 1044 1045 1046 1047 1048 1049 1050 1051 1052 1053 1054 1055 1056 1057 1058 1059 1060 1061 1062 1063 1064 1065 1066 1067 1068 1069 1070 1071 1072 1073 1074 1075 1076 1077 1078 1079 1080 1081 1082 1083 1084 1085 1086 1087 1088 1089 1090 1091 1092 1093 1094 1095 1096 1097 1098 1099 1100 1101 1102 1103 1104 1105 1106 1107 1108 1109 1110 1111 1112 1113 1114 1115 1116 1117 1118 1119 1120 1121 1122 1123 1124 1125 1126 1127 1128 1129 1130 1131 1132 1133 1134 1135 1136 1137 1138 1139 1140 1141 1142 1143 1144 1145 1146 1147 1148 1149 1150 1151 1152 1153 1154 1155 1156 1157 1158 1159 1160 1161 1162 1163 1164 1165 1166 1167 1168 1169 1170 1171 1172 1173 1174 1175 1176 1177 1178 1179 1180 1181 1182 1183 1184 1185 1186 1187 1188 1189 1190 1191 1192 1193 1194 1195 1196 1197 1198 1199 1200 1201 1202 1203 1204 1205 1206 1207 1208 1209 1210 1211 1212 1213 1214 1215 1216 1217 1218 1219 1220 1221 1222 1223 1224 1225 1226 1227 1228 1229 1230 1231 1232 1233 1234 1235 1236 1237 1238 1239 1240 1241 1242 1243 1244 1245 1246 1247 1248 1249 1250 1251 1252 1253 1254 1255 1256 1257 1258 1259 1260 1261 1262 1263 1264 1265 1266 1267 1268 1269 1270 1271 1272 1273 1274 1275 1276 1277 1278 1279 1280 1281 1282 1283 1284 1285 1286 1287 1288 1289 1290 1291 1292 1293 1294 1295 1296 1297 1298 1299 1300 1301 1302 1303 1304 1305 1306 1307 1308 1309 1310 1311 1312 1313 1314 1315 1316 1317 1318 1319 1320 1321 1322 1323 1324 1325 1326 1327 1328 1329 1330 1331 1332 1333 1334 1335 1336 1337 1338 1339 1340 1341 1342 1343 1344 1345 1346 1347 1348 1349 1350 1351 1352 1353 1354 1355 1356 1357 1358 1359 1360 1361 1362 1363 1364 1365 1366 1367 1368 1369 1370 1371 1372 1373 1374 1375 1376 1377 1378 1379 1380 1381 1382 1383 1384 1385 1386 1387 1388 1389 1390 1391 1392 1393 1394 1395 1396 1397 1398 1399 1400 1401 1402 1403 1404 1405 1406 1407 1408 1409 1410 1411 1412 1413 1414 1415 1416 1417 1418 1419 1420 1421 1422 1423 1424 1425 1426 1427 1428 1429 1430 1431 1432 1433 1434 1435 1436 1437 1438 1439 1440 1441 1442 1443 1444 1445 1446 1447 1448 1449 1450 1451 1452 1453 1454 1455 1456 1457 1458 1459 1460 1461 1462 1463 1464 1465 1466 1467 1468 1469 1470 1471 1472 1473 1474 1475 1476 1477 1478 1479 1480 1481 1482 1483 1484 1485 1486 1487 1488 1489 1490 1491 1492 1493 1494 1495 1496 1497 1498 1499 1500 1501 1502 1503 1504 1505 1506 1507 1508 1509 1510 1511 1512 1513 1514 1515 1516 1517 1518 1519 1520 1521 1522 1523 1524 1525 1526 1527 1528 1529 1530 1531 1532 1533 1534 1535 1536 1537 1538 1539 1540 1541 1542 1543 1544 1545 1546 1547 1548 1549 1550 1551 1552 1553 1554 1555 1556 1557 1558 1559 1560 1561 1562 1563 1564 1565 1566 1567 1568 1569 1570 1571 1572 1573 1574 1575 1576 1577 1578 1579 1580 1581 1582 1583 1584 1585 1586 1587 1588 1589 1590 1591 1592 1593 1594 1595 1596 1597 1598 1599 1600 1601 1602 1603 1604 1605 1606 1607 1608 1609 1610 1611 1612 1613 1614 1615 1616 1617 1618 1619 1620 1621 1622 1623 1624 1625 1626 1627 1628 1629 1630 1631 1632 1633 1634 1635 1636 1637 1638 1639 1640 1641 1642 1643 1644 1645 1646 1647 1648 1649 1650 1651 1652 1653 1654 1655 1656 1657 1658 1659 1660 1661 1662 1663 1664 1665 1666 1667 1668 1669 1670 1671 1672 1673 1674 1675 1676 1677 1678 1679 1680 1681 1682 1683 1684 1685 1686 1687 1688 1689 1690 1691 1692 1693 1694 1695 1696 1697 1698 1699 1700 1701 1702 1703 1704 1705 1706 1707 1708 1709 1710 1711 1712 1713 1714 1715 1716 1717 1718 1719 1720 1721 1722 1723 1724 1725 1726 1727 1728 1729 1730 1731 1732 1733 1734 1735 1736 1737 1738 1739 1740 1741 1742 1743 1744 1745 1746 1747 1748 1749 1750 1751 1752 1753 1754 1755 1756 1757 1758 1759 1760 1761 1762 1763 1764 1765 1766 1767 1768 1769 1770 1771 1772 1773 1774 1775 1776 1777 1778 1779 1780 1781 1782 1783 1784 1785 1786 1787 1788 1789 1790 1791 1792 1793 1794 1795 1796 1797 1798 1799 1800 1801 1802 1803 1804 1805 1806 1807 1808 1809 1810 1811 1812 1813 1814 1815 1816 1817 1818 1819 1820 1821 1822 1823 1824 1825 1826 1827 1828 1829 1830 1831 1832 1833 1834 1835 1836 1837 1838 1839 1840 1841 1842 1843 1844 1845 1846 1847 1848 1849 1850 1851 1852 1853 1854 1855 1856 1857 1858 1859 1860 1861 1862 1863 1864 1865 1866 1867 1868 1869 1870 1871 1872 1873 1874 1875 1876 1877 1878 1879 1880 1881 1882 1883 1884 1885 1886 1887 1888 1889 1890 1891 1892 1893 1894 1895 1896 1897 1898 1899 1900 1901 1902 1903 1904 1905 1906 1907 1908 1909 1910 1911 1912 1913 1914 1915 1916 1917 1918 1919 1920 1921 1922 1923 1924 1925 1926 1927 1928 1929 1930 1931 1932 1933 1934 1935 1936 1937 1938 1939 1940 1941 1942 1943 1944 1945 1946 1947 1948 1949 1950 1951 1952 1953 1954 1955 1956 1957 1958 1959 1960 1961 1962 1963 1964 1965 1966 1967 1968 1969 1970 1971 1972 1973 1974 1975 1976 1977 1978 1979 1980 1981 1982 1983 1984 1985 1986 1987 1988 1989 1990 1991 1992 1993 1994 1995 1996 1997 1998 1999 2000 2001 2002 2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020 2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040 2041 2042 2043 2044 2045 2046 2047 2048 2049 2050 2051 2052 2053 2054 2055 2056 2057 2058 2059 2060 2061 2062 2063 2064 2065 2066 2067 2068 2069 2070 2071 2072 2073 2074 2075 2076 2077 2078 2079 2080 2081 2082 2083 2084 2085 2086 2087 2088 2089 2090 2091 2092 2093 2094 2095 2096 2097 2098 2099 2100 2101 2102 2103 2104 2105 2106 2107 2108 2109 2110 2111 2112 2113 2114 2115 2116 2117 2118 2119 2120 2121 2122 2123 2124 2125 2126 2127 2128 2129 2130 2131 2132 2133 2134 2135 2136 2137 2138 2139 2140 2141 2142 2143 2144 2145 2146 2147 2148 2149 2150 2151 2152 2153 2154 2155 2156 2157 2158 2159 2160 2161 2162 2163 2164 2165 2166 2167 2168 2169 2170 2171 2172 2173 2174 2175 2176 2177 2178 2179 2180 2181 2182 2183 2184 2185 2186 2187 2188 2189 2190 2191 2192 2193 2194 2195 2196 2197 2198 2199 2200 2201 2202 2203 2204 2205 2206 2207 2208 2209 2210 2211 2212 2213 2214 2215 2216 2217 2218 2219 2220 2221 2222 2223 2224 2225 2226 2227 2228 2229 2230 2231 2232 2233 2234 2235 2236 2237 2238 2239 2240 2241 2242 2243 2244 2245 2246 2247 2248 2249 2250 2251 2252 2253 2254 2255 2256 2257 2258 2259 2260 2261 2262 2263 2264 2265 2266 2267 2268 2269 2270 2271 2272 2273 2274 2275 2276 2277 2278 2279 2280 2281 2282 2283 2284 2285 2286 2287 2288 2289 2290 2291 2292 2293 2294 2295 2296 2297 2298 2299 2300 2301 2302 2303 2304 2305 2306 2307 2308 2309 2310 2311 2312 2313 2314 2315 2316 2317 2318 2319 2320 2321 2322 2323 2324 2325 2326 2327 2328 2329 2330 2331 2332 2333 2334 2335 2336 2337 2338 2339 2340 2341 2342 2343 2344 2345 2346 2347 2348 2349 2350 2351 2352 2353 2354 2355 2356 2357 2358 2359 2360 2361 2362 </p>

抗體介導之細胞毒性FabZAP試劑內化至MDA-MB-231細胞及4T1細胞中

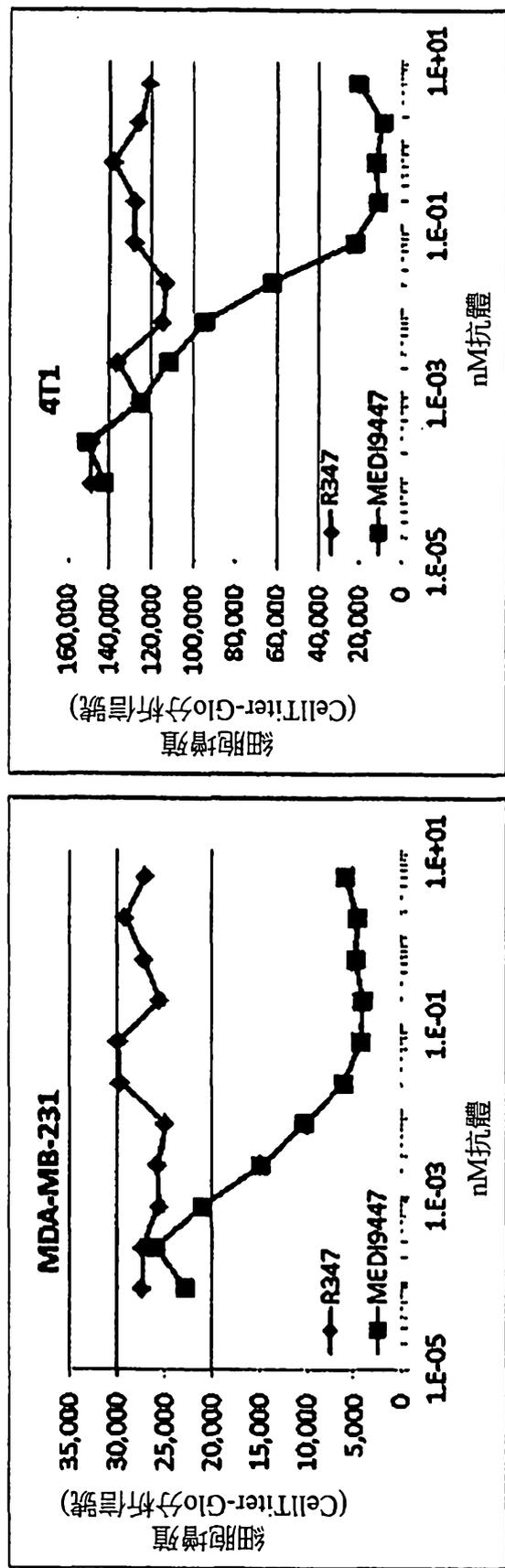


圖2

抗CD73抗體對5'外核苷酸酶之抑制

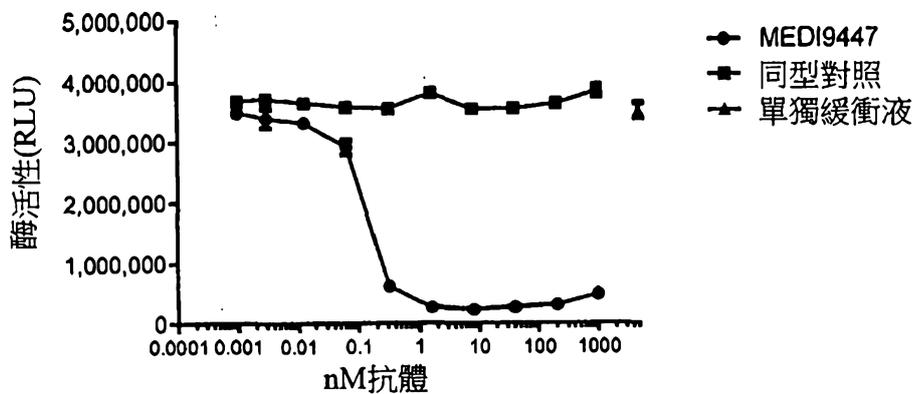


圖3A

抗CD73抗體對AMP水解之抑制

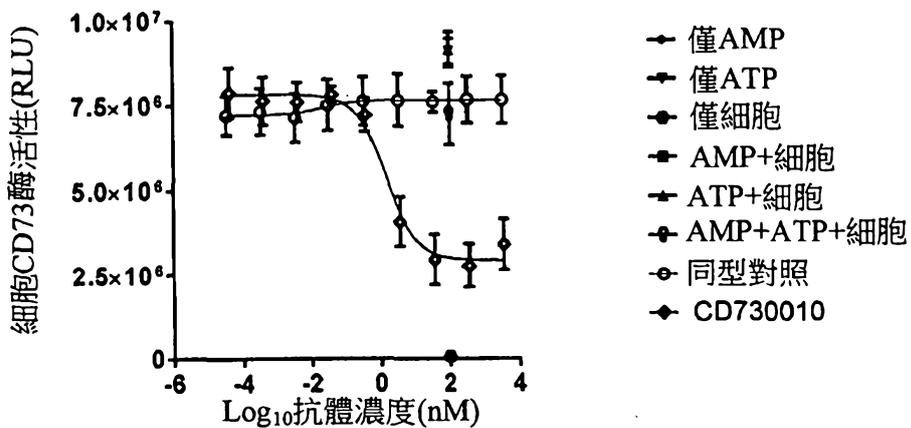


圖3B

MEDI9447抑制腫瘤生長

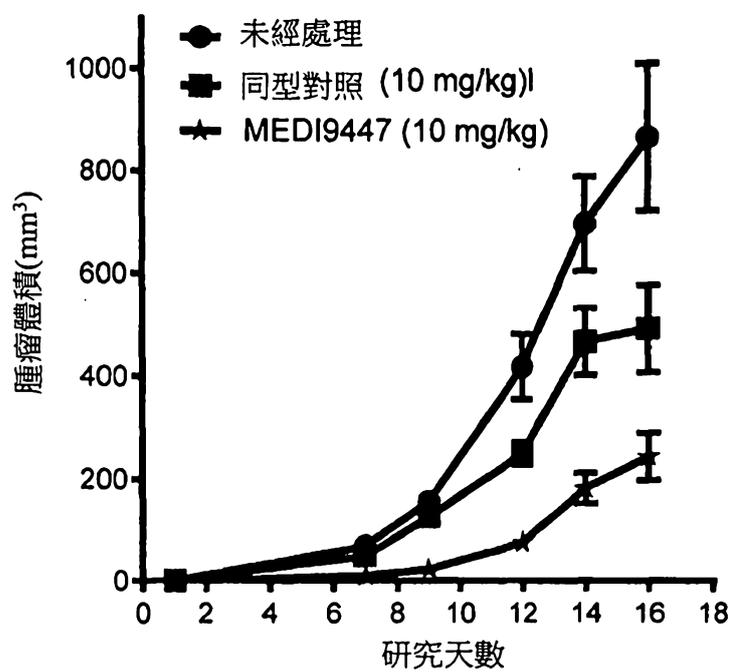


圖4

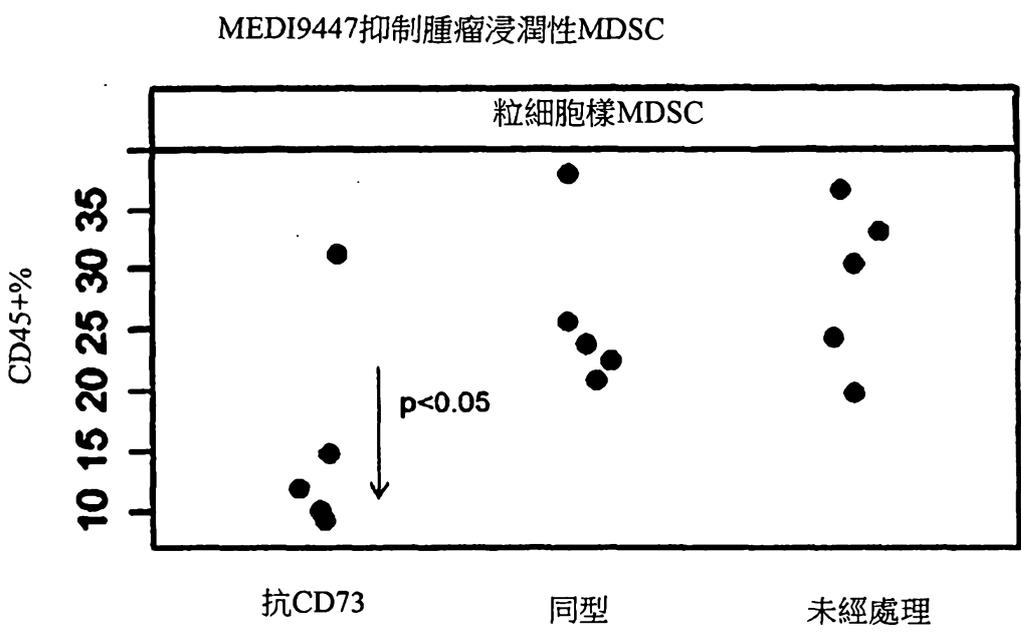


圖5

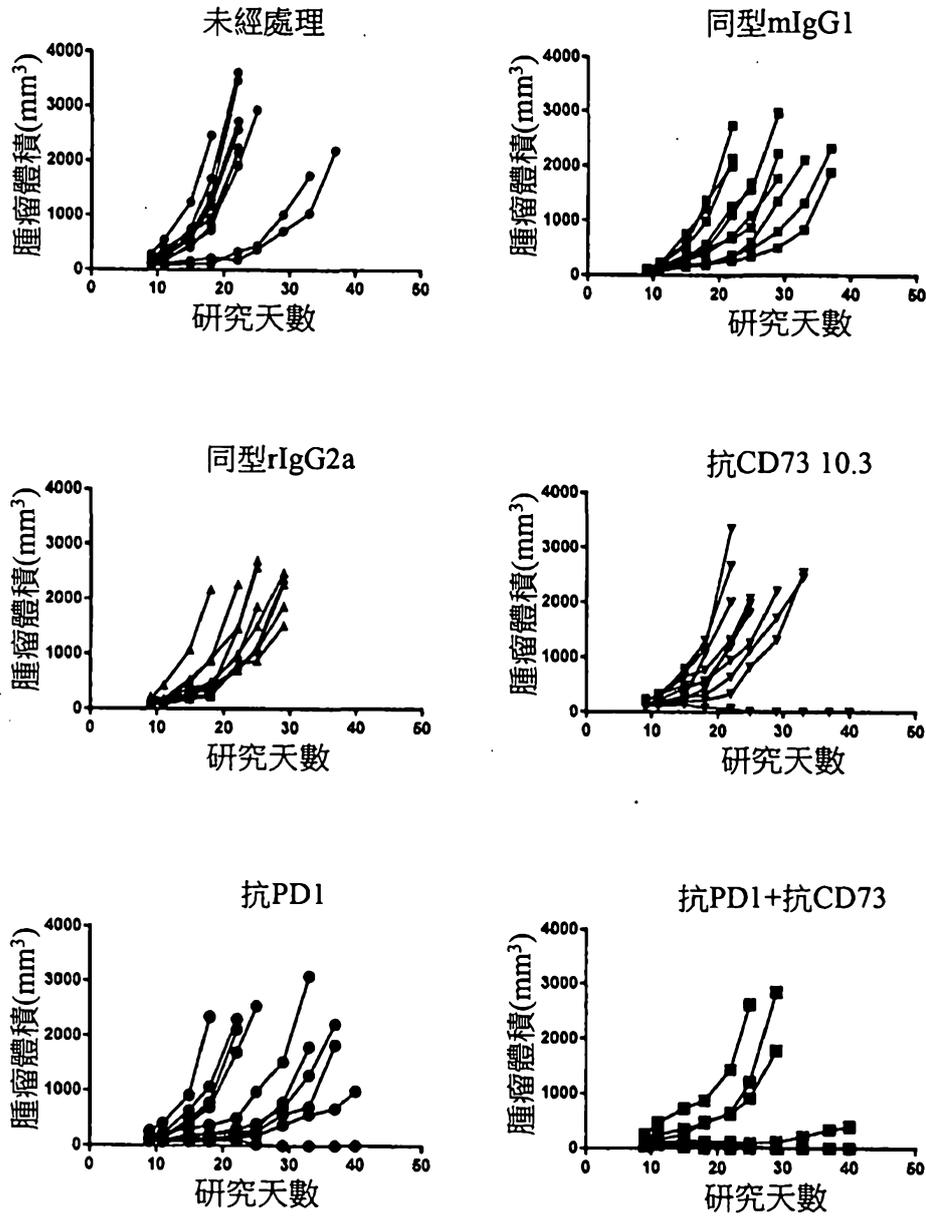


圖6

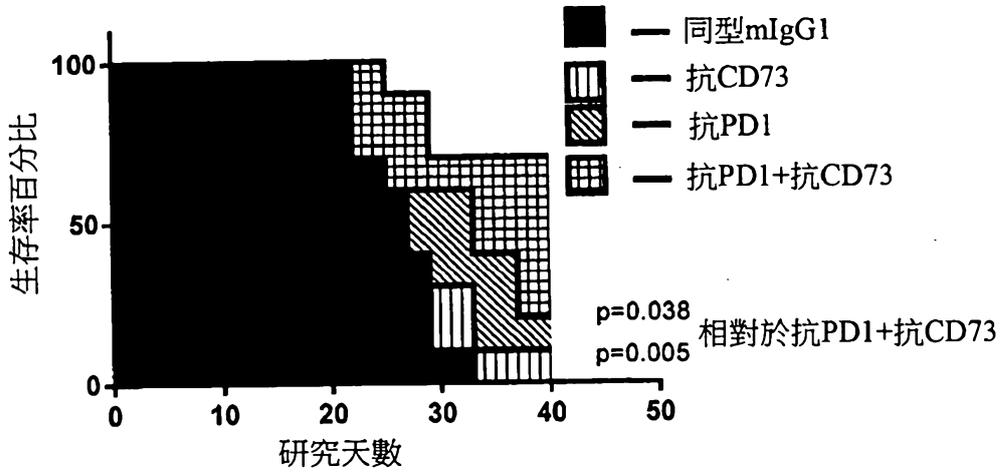


圖7

經抗PD-1及MEDI9447之組合處理的小鼠結腸直腸腫瘤

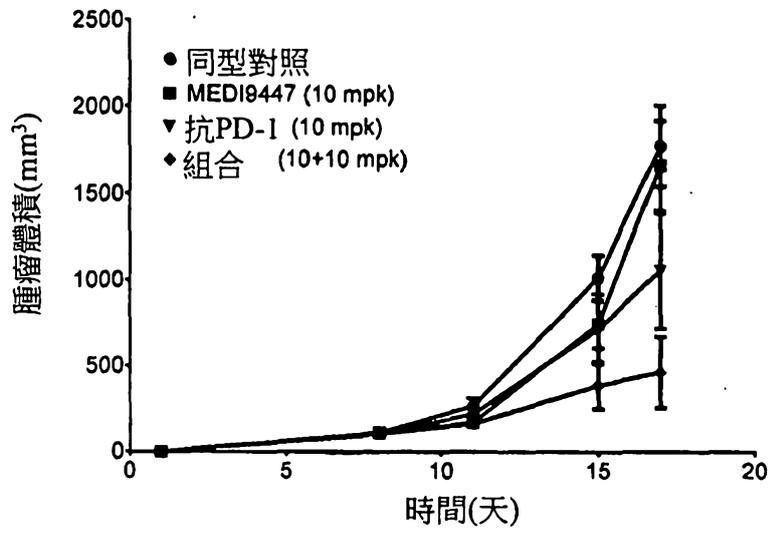


圖8

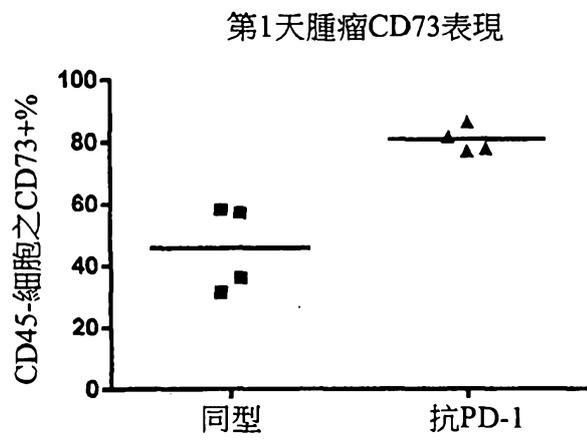


圖9

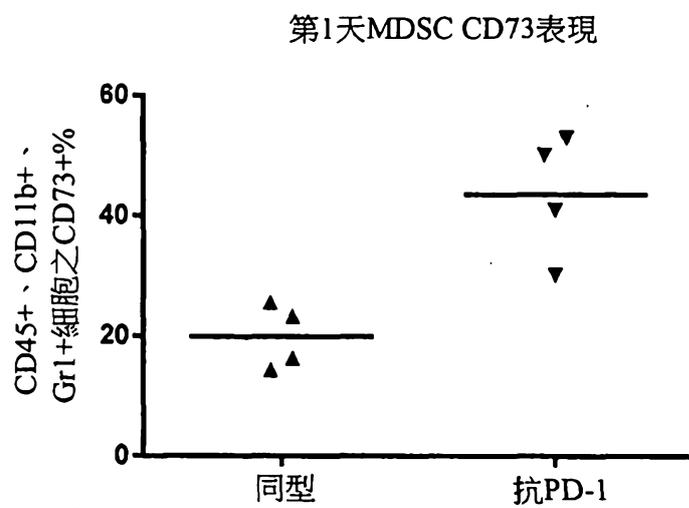


圖10

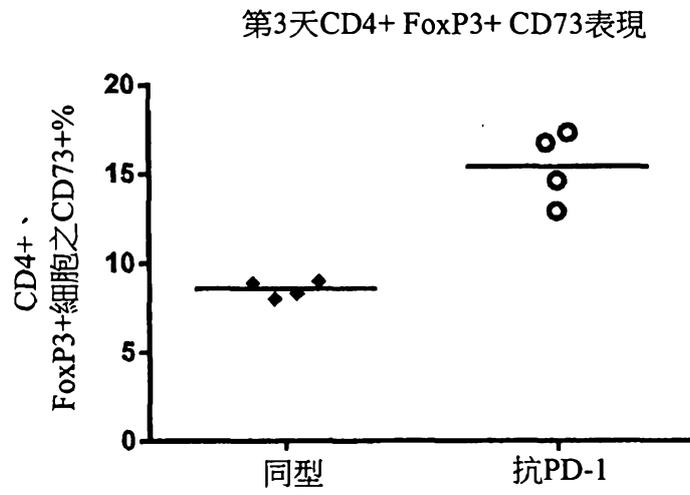


圖11

經抗PD-L1及MEDI9447之組合處理的小鼠黑素瘤腫瘤

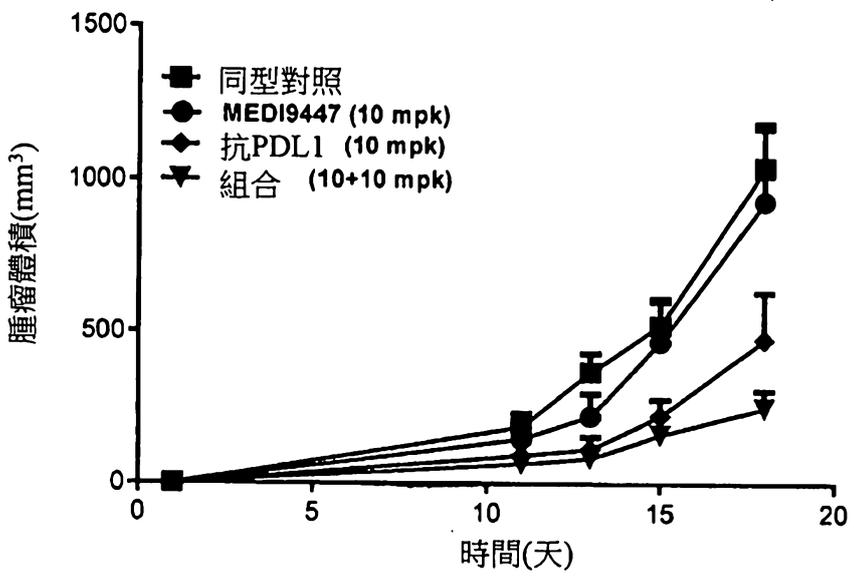


圖12

經抗PD-L1及MEDI9447之組合處理的小鼠淋巴瘤

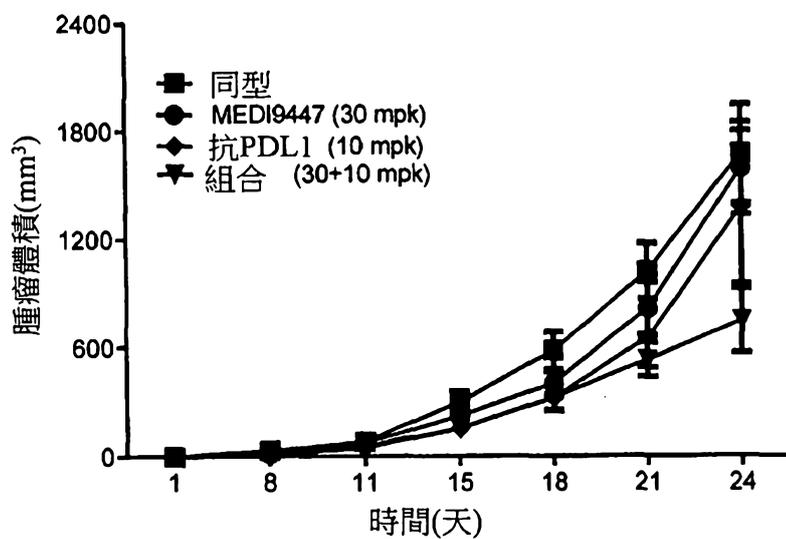


圖13

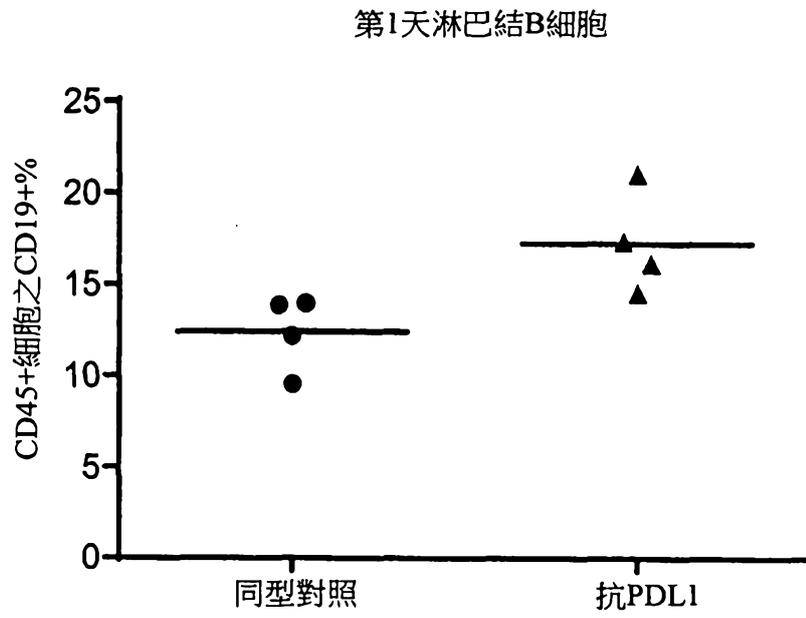


圖14

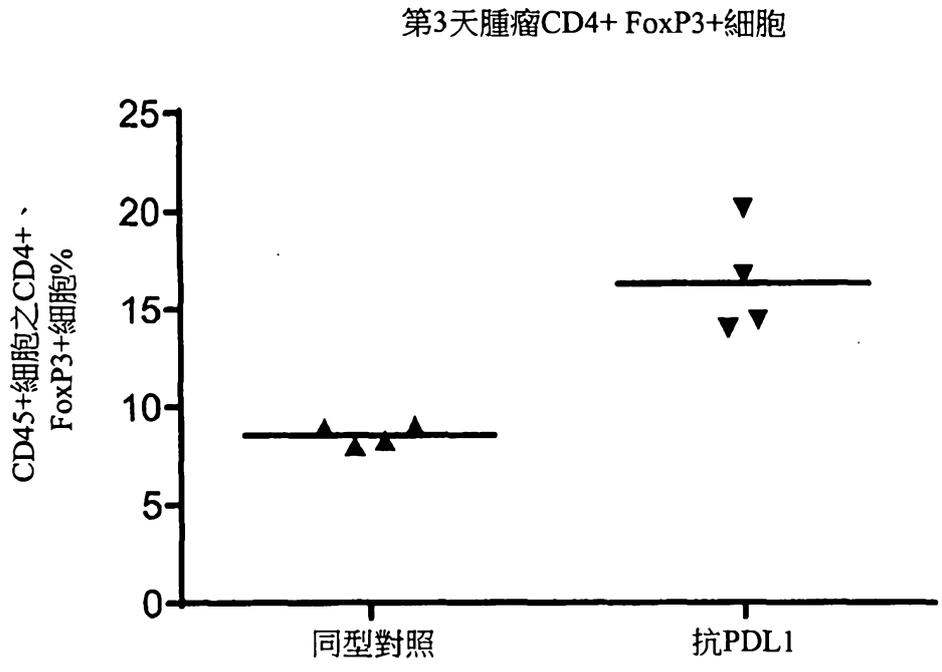


圖15

CT26腫瘤中的CD4+ FoxP3+Treg上之CD73表現

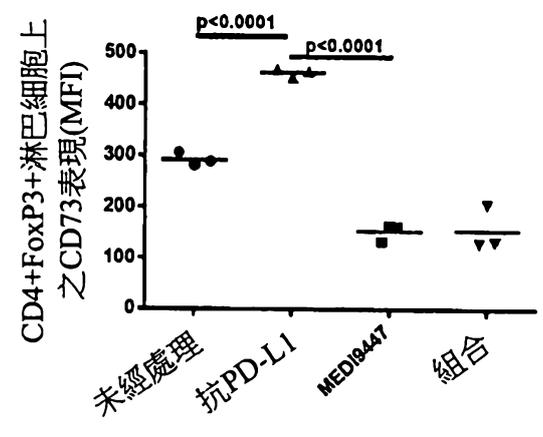


圖16A

CT26腫瘤中的CD8+ T細胞上之CD73表現

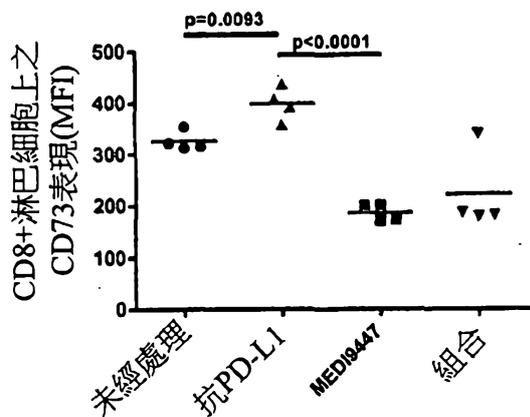


圖16B

