(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116529265 A
(43)申请公布日 2023.08.01

(21)申请号 202180079159.5
(22)申请日 2021.12.10
(66)本国优先权数据
202011445512.0 2020.12.11 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.05.30
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2021/136950 2021.12.10
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/122004 ZH 2022.06.16
(71)申请人 上海华奥泰生物药业股份有限公司
地址 201203 上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区蔡伦路538号2幢1楼
申请人 华博生物医药技术(上海)有限公司
(72)发明人 徐锦根 朱向阳 于海佳 韦小越 童玲 陈时
(74)专利代理机构 上海巅石知识产权代理事务所(普通合伙) 31309
专利代理师 蒋舫玮 张琤
(51)Int.Cl.
C07K 16/40(2006.01)

(54)发明名称

CD73的抗原结合蛋白及其应用

(57)摘要

提供一种分离的抗原结合蛋白,其能够结合CD73。所述分离的抗原结合蛋白包含HCDR3,所述HCDR3包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。还提供所述抗原结合蛋白的制备方法和应用。

CN 116529265 A

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2022 年 6 月 16 日 (16.06.2022)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2022/122004 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) *G01N 33/573* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/136950

(22) 国际申请日: 2021 年 12 月 10 日 (10.12.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202011445512.0 2020年12月11日 (11.12.2020) CN

(71) 申请人: 上海华奥泰生物药业股份有限公司 (**SHANGHAI HUAOTA BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区蔡伦路538号2幢1楼, Shanghai 201203 (CN)。 华博生物医药技术（上海）有限公司 (**HUABO BIOPHARM (SHANGHAI) CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区蔡伦路538号1幢1楼, Shanghai 201203 (CN)。

(72) 发明人: 徐锦根 (**XU, Jingen**); 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区蔡伦路538号2幢1楼, Shanghai 201203 (CN)。 朱向阳 (**ZHU, Xiangyang**); 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区蔡伦路538号2幢1楼, Shanghai 201203 (CN)。 于海佳 (**YU, Haijia**); 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区蔡伦路538号2幢1楼, Shanghai 201203 (CN)。 韦小越 (**WEI, Xiaoyue**); 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区蔡伦路538号2幢1楼, Shanghai 201203 (CN)。 童玲 (**TONG, Ling**); 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区蔡伦路538号2幢1楼, Shanghai 201203 (CN)。 陈时 (**CHEN, Shi**); 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区蔡伦路538号2幢1楼, Shanghai 201203 (CN)。

(74) 代理人: 上海巅石知识产权代理事务所（普通合伙） (**SHANGHAI DIANSHI PARTNERS, P.C.**); 中国上海市浦东新区盛夏路608号2号103/蒋舫玮, 张琤, Shanghai 201210 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。
— 包括说明书序列表部分 (细则5.2(a))。

(54) **Title:** CD73 ANTIGEN-BINDING PROTEIN AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: CD73的抗原结合蛋白及其应用

(57) **Abstract:** Provided is an isolated antigen-binding protein, capable of binding to CD73. The isolated antigen-binding protein contains HCDR3, and the HCDR3 comprises the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 3. Also provided are a preparation method for the antigen-binding protein, and an application of the antigen-binding protein.

(57) 摘要: 提供一种分离的抗原结合蛋白，其能够结合CD73。所述分离的抗原结合蛋白包含HCDR3，所述HCDR3包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列。还提供所述抗原结合蛋白的制备方法和应用。

WO 2022/122004 A1

CD73 的抗原结合蛋白及其应用

技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体的涉及一种 CD73 的抗原结合蛋白及其应用。

背景技术

CD73，也称 NT5E，是一种分子量约为 70Kd 的细胞外 5-核酸酶(NT5E)，通过糖磷脂酰肌醇(GPI)锚定于细胞表面，主要以二聚体形式存在。在正常生理状态下，CD73 可表达于多种组织或器官，如肝脏，大肠，肾脏，脾脏，肺，卵巢，淋巴结等组织。

大量临床前研究结果显示，CD73 在多种肿瘤细胞表面异常高表达，包括脑胶质瘤，乳腺癌，黑色素瘤，非小细胞肺癌，膀胱癌，卵巢癌，结直肠癌等，且临床数据显示 CD73 的高表达与肿瘤病人的不良预后密切相关，因此 CD73 可作为多种肿瘤临床治疗及预后的潜在靶标。

但是，目前市面上尚未有针对人 CD73 的抗体或小分子药物问世，迫切需要开发更多的靶向肿瘤 CD73 的药物，为治疗 CD73 异常表达的癌症提供新的思路和前景。

发明内容

本申请提供了一种分离的抗原结合蛋白，其表现出一种或多种期望的功能特性，例如其能够特异性结合 CD73 或其功能活性片段；其能够阻止或减少 CD73 的活化；当与所述 CD73 结合后，所述分离的抗原结合蛋白能够与 CD73 的第 143-157 位氨基酸或与其对应的 CD73 序列、第 178-191 位氨基酸或与其对应的 CD73 序列和第 381-386 位氨基酸或与其对应的 CD73 序列中的至少一个氨基酸残基相结合；能够抑制 CD73 的酶活性；以及能够诱导细胞表面 CD73 的内吞。本申请还提供编码所述分离的抗原结合蛋白的核酸分子、表达载体、宿主细胞和制备所述分离的抗原结合蛋白的方法。本申请所述分离的抗原结合蛋白可以用于预防和/或治疗疾病和/或病症，例如肿瘤。

一方面，本申请提供了一种分离的抗原结合蛋白，其包含 HCDR3，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白包含 HCDR2，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白包含HCDR1，所述HCDR1包含SEQ ID NO: 1所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白包含LCDR3，所述LCDR3包含SEQ ID NO: 6所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白包含LCDR2，所述LCDR2包含SEQ ID NO: 5所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白包含LCDR1，所述LCDR1包含SEQ ID NO: 4所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白包含H-FR1，所述H-FR1的C末端与所述HCDR1的N末端直接或间接相连，且所述H-FR1包含SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 15或SEQ ID NO: 19所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白包含H-FR2，所述H-FR2位于所述HCDR1与所述HCDR2之间，且所述H-FR2包含SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 16或SEQ ID NO: 21所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白包含H-FR3，所述H-FR3位于所述HCDR2与所述HCDR3之间，且所述H-FR3包含SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 20或SEQ ID NO: 22所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白包含H-FR4，所述H-FR4的N末端与所述HCDR3的C末端相连，且所述H-FR4包含SEQ ID NO: 10或SEQ ID NO: 18所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白包含L-FR1，所述L-FR1的C末端与所述LCDR1的N末端直接或间接相连，且所述L-FR1包含SEQ ID NO: 11或SEQ ID NO: 23所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白包含L-FR2，所述L-FR2位于所述LCDR1与所述LCDR2之间，且所述L-FR2包含SEQ ID NO: 12或SEQ ID NO: 24所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白包含L-FR3，所述L-FR3位于所述LCDR2与所述LCDR3之间，且所述L-FR3包含SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 27或SEQ ID NO: 28所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白包含L-FR4，所述L-FR4的N末端与所述

LCDR3 的 C 末端相连，且所述 L-FR4 包含 SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白包含 VH，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 33 或 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白包含 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34 或 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白包含选自下述的任一组 VH 和 VL：

1）所述 VH 包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列；

2）所述 VH 包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列；

3）所述 VH 包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列；

4）所述 VH 包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列；

5）所述 VH 包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列；以及

6）所述 VH 包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白包含抗体重链恒定区。

在某些实施方式中，所述抗体重链恒定区源自人抗体重链恒定区。

在某些实施方式中，所述抗体重链恒定区源自人 IgG 重链恒定区。

在某些实施方式中，所述抗体重链恒定区源自人 IgG1 重链恒定区。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白包含抗体轻链恒定区。

在某些实施方式中，所述抗体轻链恒定区源自人 Igκ 恒定区。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白包含抗体或其抗原结合片段。

在某些实施方式中，所述抗原结合片段包括 Fab，Fab’，Fv 片段，$F(ab')_2$，$F(ab)_2$，scFv，di-scFv 和/或 dAb。

在某些实施方式中，所述抗体选自下组中的一种或多种：单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白能够特异性结合CD73或其功能活性片段。

在某些实施方式中，所述 CD73 包括人 CD73 和/或猴 CD73。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白能够阻止或减少 CD73 的活化。

在某些实施方式中，当与所述 CD73 结合时，所述分离的抗原结合蛋白与 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列的第 143-157 位氨基酸或与其对应的 CD73 序列、SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列的第 178-191 位氨基酸或与其对应的 CD73 序列和 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列的第 381-386 位氨基酸或与其对应的 CD73 序列中的至少一个氨基酸残基相结合。

在某些实施方式中，所述第 143-157 位氨基酸或与其对应的 CD73 序列位于所述 CD73 的 N 端结构域，所述第 178-191 位氨基酸或与其对应的 CD73 序列位于所述 CD73 的 N 端结构域，且所述第 381-386 位氨基酸或与其对应的 CD73 序列位于所述 CD73 的 C 端结构域。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白能够抑制 CD73 的酶活性。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白能够诱导细胞表面 CD73 的内吞。

另一方面，本申请还提供了一种多肽分子，其包含所述分离的抗原结合蛋白。

在某些实施方式中，所述多肽分子包含融合蛋白。

另一方面，本申请还提供了一种分离的核酸分子，其编码所述分离的额抗原结合蛋白或所述多肽分子。

另一方面，本申请还提供了一种载体，其包含所述核酸分子。

另一方面，本申请还提供了一种细胞，其包含所述核酸分子和/或所述载体。

另一方面，本申请还提供了一种免疫缀合物，其包含所述分离的抗原结合蛋白。

另一方面，本申请还提供了一种药物组合物，其包含所述分离的抗原结合蛋白，所述的多肽分子、所述的核酸分子、所述的载体、所述的细胞和/或所述的免疫缀合物，以及任选地药学上可接受的载剂。

另一方面，本申请还提供了一种制备所述分离的抗原结合蛋白的方法，其包括在使得所述分离的抗原结合蛋白表达的条件下，培养所述的细胞。

另一方面，本申请还提供了所述分离的抗原结合蛋白、所述多肽分子、所述核酸分子、所述载体、所述细胞、所述免疫缀合物和/或所述药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于预防和/或治疗疾病和/或病症。

另一方面，本申请还提供了预防和/或治疗疾病和/或病症的方法，所述方法可以包括向有需要的受试者施用本申请所述分离的抗原结合蛋白、所述多肽分子、所述核酸分子、所述载体、所述细胞、所述免疫缀合物和/或所述药物组合物。

另一方面，本申请所述分离的抗原结合蛋白、所述多肽分子、所述核酸分子、所述载体、所述细胞、所述免疫缀合物和/或所述药物组合物，其可以用于预防和/或治疗疾病和/或病症。

在某些实施方式中，所述疾病和/或病症是 CD73 介导的疾病和/或病症。

在某些实施方式中，所述疾病和/或病症包括肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括实体瘤和/或血液瘤。

在某些实施方式中，所述疾病和/或病症包括乳腺癌。

另一方面，本申请还提供了检测样品中 CD73 的方法，其包括施用所述分离的抗原结合蛋白、所述多肽分子、所述核酸分子、所述载体、所述细胞、所述免疫缀合物和/或所述药物组合物。

另一方面，本申请还提供了检测样品中 CD73 的试剂或试剂盒，其包含所述分离的抗原结合蛋白、所述多肽分子、所述核酸分子、所述载体、所述细胞、所述免疫缀合物和/或所述药物组合物。

另一方面，本申请还提供了所述分离的抗原结合蛋白、所述多肽分子、所述核酸分子、所述载体、所述细胞、所述免疫缀合物和/或所述药物组合物在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测样品中 CD73 的存在和/或含量。

本领域技术人员能够从下文的详细描述中容易地洞察到本申请的其它方面和优势。下文的详细描述中仅显示和描述了本申请的示例性实施方式。如本领域技术人员将认识到的，本申请的内容使得本领域技术人员能够对所公开的具体实施方式进行改动而不脱离本申请所涉及发明的精神和范围。相应地，本申请的附图和说明书中的描述仅仅是示例性的，而非为限制性的。

附图说明

本申请所涉及的发明的具体特征如所附权利要求书所显示。通过参考下文中详细描述的示例性实施方式和附图能够更好地理解本申请所涉及发明的特点和优势。对附图简要说明书如下：

图 1 显示的是本申请所述抗原结合蛋白 900581、900565 与细胞表面 CD73 的结合活性。

图 2 显示的是本申请所述抗原结合蛋白 900581、900694-900698 与细胞表面 CD73 的结合活性。

图 3 显示的是本申请所述抗原结合蛋白 900581、900694-900698 对重组 CD73 的酶活性的抑制。

图 4 显示的是本申请所述抗原结合蛋白 900581、900565 对细胞表面 CD73 的酶活性的抑制。

图 5 显示的是本申请所述抗原结合蛋白 900581、900697 和 900698 对细胞表面 CD73 的酶活性的抑制。

图 6 显示的是本申请所述抗原结合蛋白 900581 诱导细胞表面 CD73 内吞的效率。

图 7 显示的是本申请所述抗原结合蛋白结合表位的结构模型。

图 8A-8C 显示的是本申请所述抗原结合蛋白与 900609 的竞争结合活性。

图 9 显示的是本申请所述抗原结合蛋白的体内治疗肿瘤的效果。

图 10 显示的是本申请所述抗原结合蛋白的体内治疗肿瘤的效果。

具体实施方式

以下由特定的具体实施例说明本申请发明的实施方式，熟悉此技术的人士可由本说明书所公开的内容容易地了解本申请发明的其他优点及效果。

术语定义

在本申请中，术语“CD73”也称“NT5E”、“分化簇 73”、“5’-核苷酸酶（5’-NT）”或“胞外 5’-核苷酸酶”。所述术语涵盖“全长”、未加工的 CD73 以及由细胞加工所产生的任何形式的 CD73。在本申请中，术语“CD73”包括全长野生型 CD73 及其突变体、片段、变体、同种型和同源物。在某些实施方式中，所述 CD73 可以包括人 CD73。例如针对人 CD73 的序列可以见 Uniprot 登录号 P21589 下。在本申请中，所述 CD73 可以包含如 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列。

在本申请中，术语“分离的”通常指从天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分，那么可能是其所处的天然环境发生了改变，或从天然环境下分离出该物质，或二者情况均有发生。例如，某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽，而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”不排除混有人工或合成的物质，也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

在本申请中，术语“分离的抗原结合蛋白”通常指脱离了其天然存在状态的具有抗原结合能力的蛋白。该“分离的抗原结合蛋白”可以包含结合抗原的部分和任选地，允许抗原结合部分采用促进所述抗原结合部分结合抗原的构象的框架或构架部分。抗原结合蛋白可以包含例如抗体来源的蛋白框架区（FR）或具有移植的 CDR 或 CDR 衍生物的备选蛋白框架区或人工

框架区。此类框架包括，但不限于包含被引入例如以稳定抗原结合蛋白的三维结构的突变的抗体来源的框架区以及包含例如生物相容性聚合物的完全合成的框架区。参见例如Korndorfer等，2003,Proteins:Structure,Function,andBioinformatics,53(1):121-129(2003); Roque等，Biotechnol. Prog. 20:639-654(2004)。抗原结合蛋白的实例包括但不限于：人抗体、人源化抗体；嵌合抗体；重组抗体；单链抗体；双功能抗体；三功能抗体；四功能抗体；Fab，Fab'，Fv片段，$F(ab')_2$，$F(ab)_2$，scFv，di-scFv，dAb，IgD抗体；IgE抗体；IgM抗体；IgG1抗体；IgG2抗体；IgG3抗体；或IgG4抗体以及其片段。

在本申请中，术语"CDR"也称"互补决定区"，通常指抗体可变结构域中的区域，其序列是高度可变的和/或形成结构定义环。通常，抗体包括六个CDR；在VH中三个(HCDR1、HCDR2、HCDR3)，和在VL中三个(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。在某些实施方案中，仅由重链组成的天然存在的骆驼抗体在缺乏轻链的情况下，其功能也能够正常且稳定。参见，例如，Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993); Sheriff et al, Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996)。抗体CDR可以通过多种编码系统来确定，如CCG、Kabat、Chothia、IMGT、综合考虑Kabat/Chothia等。这些编码系统为本领域内已知，具体可参见，例如，http://www.bioinf.org.uk/abs/index.html#kabatnum。例如，所述抗原结合蛋白的氨基酸序列编号可以按照IMGT编号方案（IMGT, the international ImMunoGeneTics information system@imgt.cines.fr；http：//imgt.cines.fr；Lefranc等, 1999, Nucleic Acids Res. 27: 209-212；Ruiz等,2000 Nucleic Acids Res. 28: 219-221；Lefranc等, 2001, Nucleic Acids Res. 29:207-209；Lefranc等, 2003, Nucleic Acids Res. 31: 307-310；Lefranc等, 2005, DevComp Immunol 29: 185-203）。例如，所述抗原结合蛋白的CDR可以根据Kabat编号系统确定(参见例如Kabat EA &Wu TT(1971)Ann NY AcadSci 190:382-391和Kabat EAet al.,(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,FifthEdition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242)。

在本申请中，术语"FR"通常指抗体可变结构域的更高度保守的部分，其被称为框架区。通常，天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个FR区，即在VH中四个(H-FR1，H-FR2，H-FR3和H-FR4)，和在VL中四个(L-FR1，L-FR2，L-FR3和L-FR4)。

在本申请中，术语"可变结构域"与"可变区"可以互换使用，通常指抗体重链和/或轻链的一部分。重链和轻链的可变结构域可以分别称为"V_H"和"V_L"（或者分别称为"VH"和"VL"）。这些结构域通常是抗体的变化最大的部分(相对于相同类型的其它抗体)，且包含抗原结合位点。

在本申请中，术语“可变”通常指在抗体之间可变结构域的某些区段在序列上可能存在较大差异。可变结构域介导抗原结合并决定特定抗体对其特定抗原的特异性。然而，可变性并非在整个可变结构域范围内均匀分布。它通常集中在轻链和重链可变结构域中称为高变区(CDR 或 HVR)的三个区段中。可变结构域的更高度保守的部分称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个 FR 区，大多数采用 β-折叠构型，通过三个 CDR 连接，其形成环形连接，并且在一些情况下形成 β-折叠结构的一部分。每条链中的 CDR 通过 FR 区紧密靠近地保持在一起，并且来自另一条链的 CDR 一同促进抗体的抗原结合位点的形成(参见 Kabat et al, Sequences of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991))。

在本申请中，术语“抗体”通常指免疫球蛋白或其片段或其衍生物，涵盖包括抗原结合位点的任何多肽，无论其是在体外还是体内产生的。该术语包括但不限于多克隆的、单克隆的、单特异性的、多特异性的、非特异性的、人源化的、单链的、嵌合的、合成的、重组的、杂化的、突变的和移植的抗体。除非另外被术语“完整的”修饰，如在“完整的抗体”中，为了本发明的目的，术语“抗体”也包括抗体片段，比如 Fab、$F(ab')_2$、Fv、scFv、Fd、dAb 和保持抗原结合功能(例如，特异性结合人 CD73)的其它抗体片段。通常，这样的片段应当包括抗原结合结构域。基本的 4 链抗体单元是由两个相同的轻(L)链和两个相同的重(H)链组成的异四聚体糖蛋白。IgM 抗体由 5 个基本的异四聚体单元与另外一个称为 J 链的多肽组成，且含有 10 个抗原结合位点，而 IgA 抗体包括 2-5 个可以与 J 链相结合聚合形成多价组合的基本 4 链单元。就 IgG 而言，4 链单元一般为约 150,000 道尔顿。每个 L 链通过一个共价二硫键与 H 链连接，而两个 H 链通过一个或多个取决于 H 链同种型的二硫键相互连接。每个 H 和 L 链还具有规则间隔的链内二硫化桥键。每个 H 链在 N 末端具有可变结构域(VH)，对于 α 和 γ 链各自继之以三个恒定结构域(CH)、对于 μ 和 ε 同种型继之以四个 CH 结构域。每个 L 链在 N 末端具有可变结构域(VL)，在其另一端具有恒定结构域。VL 与 VH 对应，且 CL 与重链的第一恒定结构域(CH1)相对应。特定的氨基酸残基被认为在轻链和重链可变结构域之间形成界面。VH 和 VL 配对一起形成单个抗原结合位点。对于不同类别抗体的结构和性质，参见例如 Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parsolw (eds), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994，第 71 页和第 6 章。来自任何脊椎动物物种的 L 链可以基于其恒定结构域的氨基酸序列被分为两种明显不同的类型中的一种，称为 κ 和 λ。根据重链(CH)恒定结构域的氨基酸序列，可以将免疫球蛋白分为不同的类别或同种型。目前存在五类免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，具有分别被命名为 α、δ、ε、γ 和 μ 的重链。

在本申请中，术语“抗原结合片段”通常指具有特异结合抗原（例如，CD73）能力的一个或多个片段。在本申请中，所述抗原结合片段可以包括 Fab，Fab’，$F(ab)_2$、Fv 片段、$F(ab')_2$，scFv，di-scFv 和/或 dAb。

在本申请中，术语“Fab”通常指抗体的抗原结合片段。如上所述，可以使用木瓜蛋白酶消化完整的抗体。抗体经木瓜蛋白酶消化后产生两个相同的抗原结合片段，即“Fab”片段，和残余的“Fc”片段(即 Fc 区，同上)。Fab 片段可以由一条完整的 L 链与一条重链的可变区和该 H 链(V_H)的第一恒定区(C_H1)组成。

在本申请中，术语“Fab′片段”通常指人单克隆抗体的单价抗原结合片段，该片段比 Fab 片段稍大。例如，Fab′片段可以包括所有轻链，所有重链可变区以及重链的所有或部分第一和第二恒定区。例如，Fab′片段还可包括重链的部分或所有的 220-330 个氨基酸残基。

在本申请中，术语“F(ab')2”通常指通过胃蛋白酶消化完整抗体所产生的抗体片段。F(ab')2 片段含有由二硫键维持在一起的两个 Fab 片段和部分铰链区。F(ab')2 片段具有二价抗原结合活性并且能够交联抗原。

在本申请中，术语“Fv 片段”通常指人单克隆抗体的单价抗原结合片段，包括所有或部分重链可变区和轻链可变区，并且缺乏重链恒定区和轻链恒定区。重链可变区和轻链可变区包括例如 CDR。例如，Fv 片段包括重链和轻链的约 110 个氨基酸的所有或部分氨基端可变区。

在本申请中，术语“scFv”通常指包含至少一个包括轻链的可变区抗体片段和至少一个包括重链的可变区的抗体片段的融合蛋白，其中所述轻链和重链可变区是邻接的(例如经由合成接头例如短的柔性多肽接头)，并且能够以单链多肽形式表达，且其中所述 scFv 保留其所来源的完整抗体的特异性。除非特别说明，否则如本申请中使用的那样，scFv 可以以任何顺序(例如相对于多肽的 N 末端和 C 末端)具有所述的 VL 和 VH 可变区，scFv 可以包括 VL-接头-VH 或可以包括 VH-接头-VL。

在本申请中，术语“dAb”通常是指具有 VH 域、VL 域或具有 VH 域或 VL 域的抗原结合片段，参考例如 Ward 等人(Nature,1989Oct 12；341(6242)：544-6)，参考 Holt 等人,Trends Biotechnol.,2003,21(11)：484-490；以及参考例如 WO 06/030220、WO 06/003388 和 DomantisLtd 的其它公布的专利申请。

在本申请中，术语“单克隆抗体”通常指单分子组成的抗体分子制备物。单克隆抗体通常针对单个抗原位点具有高度特异性。而且，与常规多克隆抗体制剂（通常具有针对不同决定簇的不同抗体）不同，各单克隆抗体是针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性之外，单克隆抗体的优点在于它们可以通过杂交瘤培养合成，不受其他免疫球蛋白污染。修饰语“单

克隆”表示从基本上同质的抗体群体获得的抗体的特征，并且不被解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如，本申请使用的单克隆抗体可以在杂交瘤细胞中制备，或者可以通过重组DNA方法制备。

在本申请中，术语“嵌合抗体”通常是指其中可变区源自一个物种，而恒定区源自另一个物种的抗体。通常，可变区源自实验动物诸如啮齿动物的抗体（“亲本抗体”），且恒定区源自人类抗体，使得所得嵌合抗体与亲本（例如小鼠来源）抗体相比，在人类个体中引发不良免疫反应的可能性降低。

在本申请中，术语“人源化抗体”通常是指非人抗体（例如小鼠抗体）的CDR区以外的部分或全部有的氨基酸被源自人免疫球蛋白的相应的氨基酸置换的抗体。在CDR区中，氨基酸的小的添加、缺失、插入、置换或修饰也可以是允许的，只要它们仍保留抗体结合特定抗原的能力。人源化抗体可任选地包含人类免疫球蛋白恒定区的至少一部分。“人源化抗体”保留类似于原始抗体的抗原特异性。非人（例如鼠）抗体的“人源化”形式可以最低限度地包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在某些情形中，可以将人免疫球蛋白（受体抗体）中的CDR区残基用具有所期望性质、亲和力和/或能力的非人物种（供体抗体）（诸如小鼠，大鼠，家兔或非人灵长类动物）的CDR区残基替换。在某些情形中，可以将人免疫球蛋白的FR区残基用相应的非人残基替换。此外，人源化抗体可包含在受体抗体中或在供体抗体中没有的氨基酸修饰。进行这些修饰可以是为了进一步改进抗体的性能，诸如结合亲和力。

术语“全人源抗体”通常指仅包含人类免疫球蛋白蛋白质序列的抗体。如果其是在小鼠中、在小鼠细胞中或在衍生自小鼠细胞的杂交瘤中生产，那么全人源抗体可能含有鼠糖链。类似地，“小鼠抗体”或“大鼠抗体”分别指仅包含小鼠或大鼠免疫球蛋白序列的抗体。可通过噬菌体展示或其它分子生物学方法，在人体内、在具有人类免疫球蛋白种系序列的转基因动物体内生成全人源抗体。可用于制造抗体的示例性技术在美国专利：6,150,584、6,458,592、6,420,140中描述。其它技术，如使用文库，是本领域已知的。

在本申请中，术语“多肽分子”和“多肽”、“肽”可以互换使用，通常指氨基酸残基的聚合物。术语“融合蛋白”通常指具有至少两个共价连接在一起的部分的多肽。其中每个部分可以是具有不同特性的多肽。该特性可以是生物学性质，例如体外或体内活性。该性质也可以是简单的化学或物理性质，例如与靶分子的结合，反应的催化等。这两个部分可以通过单个肽键或通过肽接头直接连接。

在本申请中，术语“核酸分子”通常指任何长度的分离形式的核苷酸，脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸，或从其天然环境分离的或人工合成的类似物。

在本申请中，术语“载体”通常指可将编码某蛋白的多聚核苷酸插入其中并使蛋白获得表达的一种核酸运载工具。载体可通过转化、转导或转染宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞内表达得以表达。举例来说，载体可以包括：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体如酵母人工染色体（YAC）、细菌人工染色体（BAC）或 P1 来源的人工染色体（PAC）；噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。用作载体的动物病毒种类可以包括逆转录酶病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（如 SV40）。一种载体可能含有多种控制表达的元件，包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。载体还有可能包括有协助其进入细胞的成分，如病毒颗粒、脂质体或蛋白外壳，但不仅仅只有这些物质。

在本申请中，术语“细胞”通常指可以是或已经是受试者质粒或载体的接受者的单个细胞、细胞系或细胞培养物，其包括本发明所述的核酸分子或本发明所述的载体。细胞可以包括单个细胞的后代。由于天然、偶然或有意的突变，后代可以不一定与原始母细胞完全相同(在总 DNA 互补体的形态上或在基因组上)。细胞可包括用本申请所述的载体在体外转染的细胞。细胞可以是细菌细胞(例如，大肠杆菌)、酵母细胞或其它真核细胞，例如 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、CHO-K1 细胞、LNCAP 细胞、HeLa 细胞、HEK293 细胞、COS-1 细胞、NS0 细胞。在某些实施方案中，细胞为哺乳动物细胞。在某些实施方案中，哺乳动物细胞为 HEK293 细胞。

在本申请中，术语“免疫缀合物”通常指所述其他试剂（例如，化疗剂、放射性元素、细胞生长抑制剂和细胞毒性剂）与所述抗体或其抗原结合片段缀合（例如，通过连接分子共价相连）而形成的缀合物，该缀合物可以通过所述抗体或其抗原结合片段与靶细胞上的抗原特异性结合，将所述其他试剂递送至靶细胞（例如，肿瘤细胞）。

在本申请中，术语“药物组合物”通常指用于预防/治疗疾病或病症的组合物。所述药物组合物可以包含本申请所述的分离的抗原结合蛋白、本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体和/或本申请所述的细胞，以及任选地药学上可接受的佐剂。此外，所述药物组合物还可以包含一种或多种(药学上有效的)载剂、稳定剂、赋形剂、稀释剂、增溶剂、表面活性剂、乳化剂和/或防腐剂的合适的制剂。组合物的可接受成分在所用剂量和浓度下优选地对接受者无毒。本发明的药物组合物包括但不限于液体、冷冻和冻干组合物。

在本申请中，术语“药学上可接受的载剂”通常包括药剂学可接受的载体、赋形剂或稳定剂，它们在所采用的剂量和浓度对暴露于其的细胞或哺乳动物是无毒的。生理学可接受的载

体可包括例如缓冲剂，抗氧化剂，低分子量（少于约 10 个残基）多肽，蛋白质，亲水性聚合物，氨基酸，单糖，二糖和其它碳水化合物，螯合剂，糖醇，成盐反荷离子，例如钠；和/或非离子表面活性剂。

在本申请中，术语“特异性结合”或“特异性的”通常指可测量的和可再现的相互作用，例如靶标和抗体之间的结合，可在分子(包括生物分子)的异质群体存在的情况决定靶标的存在。例如，特异性结合靶标(其可以为表位)的抗体可以是以比它结合其它靶标更大的亲和性、亲合力、更容易、和/或以更大的持续时间结合该靶标的抗体。在某些实施方案中，抗体特异性结合蛋白质上的表位，所述表位在不同种属的蛋白质中是保守的。在某些实施方案中，特异性结合可以包括但不要求排他性地结合。

在本申请中，术语“受试者”通常指人类或非人类动物，包括但不限于猫、狗、马、猪、奶牛、羊、兔、小鼠、大鼠或猴。

术语“肿瘤”通常指任何新的病理性的组织增生。肿瘤细胞可以局部地或通过血流和淋巴系统扩散到身体其他部分。在本申请中，所述肿瘤可以包括良性肿瘤和恶性肿瘤。在本申请中，所述肿瘤可以包括实体瘤和/或血液瘤。在本申请中，所述肿瘤可以包括癌症。在本申请中，所述肿瘤的实例包括但不限于：脑胶质瘤、乳腺癌、黑色素瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌、卵巢癌和结直肠癌。

在本申请中，术语“活化”通常指从无活性状态向有活性状态的转化。在某些实施方式中，阻止或减少 CD73 的活化可以指阻止或减少 CD73 从无催化活性的开放构象向催化活性的封闭构象的转化。

在本申请中，术语“减少”通常指与原水平相比，在数量和/或程度上的降低。例如，所述减少 CD73 的活化可以指与所述分离的抗原结合蛋白不存在的情况下相比，将 CD73 的活化减少至少约 0.5 倍、至少约 1 倍、至少约 1.5 倍、至少约 2 倍、至少约 5 倍、至少约 10 倍、至少约 20 倍、至少约 30 倍、至少约 40 倍、至少约 50 倍、至少约 60 倍、至少约 70 倍、至少约 80 倍、至少约 90 倍或至少约 100 倍。

在本申请中，涉及的蛋白质、多肽和/或氨基酸序列，还应理解为至少包含以下的范围：与该所述蛋白质或多肽具备相同或类似功能的变体或同源物。

在本申请中，所述变体可以为，例如在所述蛋白质和/或所述多肽（例如，特异性结合 CD73 蛋白的抗体或其片段）的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或多个氨基酸的蛋白质或多肽。例如，所述功能性变体可包含已经通过至少 1 个，例如 1-30 个、1-20 个或 1-10 个，又例如 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个氨基酸取代、缺失和/或插入而具有氨基酸改变的蛋

白质或多肽。所述功能性变体可基本上保持改变（例如取代、缺失或添加）之前的所述蛋白质或所述多肽的生物学特性。例如，所述功能性变体可保持改变之前的所述蛋白质或所述多肽的至少 60%，70%，80%，90%，或 100%的生物学活性（例如抗原结合能力）。例如，所述取代可以为保守取代。

在本申请中，所述同源物可以为与所述蛋白质和/或所述多肽（例如，特异性结合 CD73 蛋白的抗体或其片段）的氨基酸序列具有至少约 85%（例如，具有至少约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或更高的）序列同源性的蛋白质或多肽。

在本申请中，所述同源性通常是指两个或多个序列之间的相似性、类似或关联。可以通过以下方式计算“序列同源性百分比”：将两条待比对的序列在比较窗中进行比较，确定两条序列中存在相同核酸碱基（例如，A、T、C、G、I）或相同氨基酸残基（例如，Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys 和 Met）的位置的数目以得到匹配位置的数目，将匹配位置的数目除以比较窗中的总位置数（即，窗大小），并且将结果乘以 100，以产生序列同源性百分比。为了确定序列同源性百分数而进行的比对，可以按本领域已知的多种方式实现，例如，使用可公开获得的计算机软件如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign（DNASTAR）软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适宜参数，包括为实现正在比较的全长序列范围内或目标序列区域内最大比对所需要的任何算法。所述同源性也可以通过以下的方法测定：FASTA 和 BLAST。对 FASTA 算法的描述可以参见 W. R. Pearson 和 D. J. Lipman 的“用于生物学序列比较的改进的工具”，美国国家科学院院刊（Proc. Natl. Acad. Sci.），85：2444-2448，1988；和 D. J. Lipman 和 W. R. Pearson 的“快速灵敏的蛋白质相似性搜索”，Science，227：1435-1441，1989。对 BLAST 算法的描述可参见 S. Altschul、W. Gish、W. Miller、E. W. Myers 和 D. Lipman 的“一种基本的局部对比（alignment）搜索工具”，分子生物学杂志，215：403-410，1990。

在本申请中，术语“包括”通常是指包含、总括、含有或包涵的含义。在某些情况下，也表示“为”、“由……组成”的含义。

在本申请中，术语“约”通常是指在指定数值以上或以下 0.5%-10%的范围内变动，例如在指定数值以上或以下 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%、6%、6.5%、7%、7.5%、8%、8.5%、9%、9.5%、或 10%的范围内变动。

发明详述

分离的抗原结合蛋白

抗体的 CDR 又称互补决定区，是可变区的一部分。该区域的氨基酸残基可以与抗原或抗原表位接触。抗体 CDR 可以通过多种编码系统来确定，如 CCG、Kabat、Chothia、IMGT、综合考虑 Kabat/Chothia 等。这些编码系统为本领域内已知，具体可参见，例如，http://www.bioinf.org.uk/abs/index.html#kabatnum。本领域技术人员可以根据抗体的序列和结构，用不同的编码系统确定出 CDR 区。使用不同的编码系统，CDR 区可能存在差别。在本申请中，所述 CDR 涵盖根据任何 CDR 划分方式划分得到的 CDR 序列；也涵盖其变体，所述变体包括所述 CDR 的氨基酸序列经过取代、缺失和/或添加一个或多个氨基酸。例如 1-30 个、1-20 个或 1-10 个，又例如 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个或 9 个氨基酸取代、缺失和/或插入；也涵盖其同源物，所述同源物可以为与所述 CDR 的氨基酸序列具有至少约 85%（例如，具有至少约 85%、约 90%、约 91%、约 92%、约 93%、约 94%、约 95%、约 96%、约 97%、约 98%、约 99%或更高的）序列同源性的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述 CDR 由 IMGT 编号方案来确定。

一方面，本申请提供了一种分离的抗原结合蛋白，其包含 HCDR3，所述 HCDR3 可以包含如 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白还可以包含 HCDR2，所述 HCDR2 可以包含如 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白还可以包含 HCDR1，所述 HCDR1 可以包含如 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含 HCDR3，HCDR2 和 HCDR1。例如，所述分离的抗原结合蛋白的 HCDR3 可以包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列，HCDR2 可以包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，且 HCDR1 可以包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含 LCDR3，所述 LCDR3 可以包含如 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白还可以包含 LCDR2，所述 LCDR2 可以包含如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白还可以包含 LCDR1，所述 LCDR1 可以包含如 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含 LCDR3，LCDR2 和 LCDR1。例如，所

述分离的抗原结合蛋白的 LCDR3 可以包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列，LCDR2 可以包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列，且 LCDR1 可以包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含 HCDR3，HCDR2， HCDR1，LCDR3，LCDR2 和 LCDR1。例如，本申请所述的分离的抗原结合蛋白 HCDR3 可以包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列，HCDR2 可以包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，HCDR1 可以包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列，LCDR3 可以包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列，LCDR2 可以包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列，且 LCDR1 可以包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含 H-FR1，所述 H-FR1 的 C 末端可以与所述 HCDR1 的 N 末端直接或间接相连，所述 H-FR1 可以包含如 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 15 或 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含 H-FR2，所述 H-FR2 可以位于所述 HCDR1 与所述 HCDR2 之间，所述 H-FR2 可以包含如 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 16 或 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含 H-FR3，所述 H-FR3 可以位于所述 HCDR2 与所述 HCDR3 之间，所述 H-FR3 可以包含如 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 20 或 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含 H-FR4，所述 H-FR4 的 N 末端可以与所述 HCDR3 的 C 末端相连，所述 H-FR4 可以包含如 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述抗原结合蛋白可以包含 H-FR1，H-FR2，H-FR3 和 H-FR4。例如，所述分离的抗原结合蛋白的 H-FR1，H-FR2，H-FR3 和 H-FR4 可分别依次包含 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列。例如，所述分离的抗原结合蛋白的 H-FR1，H-FR2，H-FR3 和 H-FR4 可分别依次包含 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。例如，所述分离的抗原结合蛋白的 H-FR1，H-FR2，H-FR3 和 H-FR4 可分别依次包含 SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。例如，所述分离的抗原结合蛋白的 H-FR1，H-FR2，H-FR3 和 H-FR4 可分别依次包含 SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含 L-FR1，所述 L-FR1 的 C 末端可以与所

述 LCDR1 的 N 末端直接或间接相连，所述 L-FR1 可以包含如 SEQ ID NO: 11 或 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含 L-FR2，所述 L-FR2 可以位于所述 LCDR1 与所述 LCDR2 之间，所述 L-FR2 可以包含如 SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含 L-FR3，所述 L-FR3 可以位于所述 LCDR2 与所述 LCDR3 之间，所述 L-FR3 可以包含如 SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 27 或 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含 L-FR4，所述 L-FR4 的 N 末端可以与所述 LCDR3 的 C 末端相连，所述 L-FR4 可以包含如 SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含 L-FR1，L-FR2，L-FR3 和 L-FR4。例如，所述分离的抗原结合蛋白的 L-FR1，L-FR2，L-FR3 和 L-FR4 可分别依次包含 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列。例如，所述分离的抗原结合蛋白的 L-FR1，L-FR2，L-FR3 和 L-FR4 可分别依次包含 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25 和 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列。例如，所述分离的抗原结合蛋白的 L-FR1，L-FR2，L-FR3 和 L-FR4 可分别依次包含 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 27 和 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列。例如，所述分离的抗原结合蛋白的 L-FR1，L-FR2，L-FR3 和 L-FR4 可分别依次包含 SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 28 和 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可包含 VH，所述 VH 可以包含 SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 33 或 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可包含 VL，所述 VL 可以包含 SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34 或 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可包含所述 VH 和 VL。在某些实施方式中，所述 VH 可以包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列，且所述 VL 可以包含 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述 VH 可以包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列，且所述 VL 可以包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述 VH 可以包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列，且所述 VL 可以包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述 VH 可以包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列，且所述 VL

可以包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述 VH 可以包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列，且所述 VL 可以包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述 VH 可以包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列，且所述 VL 可以包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含本申请所述的 VH 中的至少一个 CDR。在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含本申请所述的 VL 中的至少一个 CDR。所述 CDR 可以根据任何划分方式划分得到。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含本申请所述 VH 中的 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3。所述 VH 可以包含 SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 33 或 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含本申请所述 VL 中的 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3。所述 VL 可以包含 SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34 或 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包括抗体重链恒定区。所述抗体重链恒定区可以源自人 IgG 重链恒定区。在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白可以包括抗体重链恒定区，且所述抗体重链恒定区可以源自人 IgG1 重链恒定区。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包括抗体轻链恒定区。所述抗体轻链恒定区可以源自人 Igκ 恒定区。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白可以包含抗体或其抗原结合片段。

在某些实施方式中，所述抗原结合片段可以包括 Fab，Fab’，Fv 片段，$F(ab')_2$，$F(ab)_2$，scFv，di-scFv 和/或 dAb。

在某些实施方式中，所述抗体可以包括单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体和/或全人源抗体。

例如，所述嵌合抗体的 VH 可以包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列，且所述嵌合抗体的 VL 可以包含 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列。

例如，所述人源化抗体的 VH 可以包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列，且所述人源化抗体的 VL 可以包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列。

例如，所述人源化抗体的 VH 可以包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列，且所述人源化抗体的 VL 可以包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

例如，所述人源化抗体的 VH 可以包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列，且所述人源

化抗体的 VL 可以包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。

例如，所述人源化抗体的 VH 可以包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列，且所述人源化抗体的 VL 可以包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。

例如，所述人源化抗体的 VH 可以包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列，且所述人源化抗体的 VL 可以包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

此外，需要说明的是，本申请所述分离的抗原结合蛋白可以包含与其存在一个或多个保守序列修饰的重链和/或轻链序列。所谓“保守序列修饰”是指不会显著影响或改变抗体结合特性的氨基酸修饰。这样的保守修饰包括氨基酸替换、添加和删除。可以通过领域内已知的标准技术，例如点突变和 PCR 介导的突变，将修饰引入本申请所述分离的抗原结合蛋白中。保守氨基酸替换是氨基酸残基用具有相似侧链的氨基酸残基进行替换。具有相似侧链的氨基酸残基组在领域内已知。这些氨基酸残基组包括具有碱性侧链（例如，赖氨酸、精氨酸、组氨酸）、酸性侧链（例如，天冬氨酸、谷氨酸）、不带电极性侧链（例如，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸）、非极性侧链（例如，丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸）、β-支链侧链（例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）和芳香族侧链（例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）的氨基酸。在某些实施方式中，本申请所述分离的抗原结合蛋白的 CDR 区中的一个或多个氨基酸残基可以用同侧链组的其他氨基酸残基替换。本领域内的技术人员知道，一些保守序列修改不会使抗原结合性消失，具体可以参见，例如，Brummell et al.，（1993） Biochem 32:1180-8; de Wildt et al.，（1997） Prot. Eng. 10:835-41; Komissarov et al.，（1997） J. Biol. Chem. 272:26864-26870; Hall et al.，（1992） J. Immunol. 149:1605-12; Kelley and O'Connell（1993） Biochem.32:6862-35; Adib-Conquy et al.，（1998） Int. Immunol.10:341-6 and Beers et al.，（2000） Clin. Can. Res. 6:2835-43。

可以通过本领域已知的各种测定鉴别、筛选或表征本申请所述的 CD73 抗原结合蛋白。

例如，可通过已知方法诸如酶联免疫吸附测定（ELISA）、免疫印迹（例如，蛋白质印迹）、流式细胞术（例如，FACS）、免疫组织化学、免疫荧光等来测试本申请抗原结合蛋白或融合蛋白的抗原结合活性。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白能够特异性结合 CD73 或其功能活性片段。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白可以通过 Biacore 进行亲和力筛选。所述分离的抗原结合蛋白可以以 5×10^{-9}M 或更低的 KD 与 CD73 蛋白相结合，例如，本申请所述的抗原结合蛋白可以以小于约 4×10^{-9}M、小于约 3×10^{-9}M、小于约 2×10^{-9}M、小于约 1×10^{-9}M、

小于约 7×10^{-10}M、小于约 6×10^{-10}M、小于约 5×10^{-10}M、小于约 4×10^{-10}M、小于约 3×10^{-10}M、小于约 2×10^{-10}M、小于约 1×10^{-10}M、小于约 9×10^{-11}M、小于约 5×10^{-11}M、小于约 2×10^{-11}M 的 KD 结合 CD73。在某些实施方式中，本申请也包括使用 FACS 方法测定抗原结合蛋白与抗原的结合活性。例如，本申请所述抗原结合蛋白可以以小于或等于约 0.5μg/mL、小于或等于约 0.4μg/mL、小于或等于约 0.3μg/mL、小于或等于约 0.2μg/mL、小于或等于约 0.1μg/mL 的 EC50 值与细胞表面人 CD73 结合。例如，本申请所述抗原结合蛋白可以以小于或等于约 0.4μg/mL、小于或等于约 0.3μg/mL、小于或等于约 0.2μg/mL、小于或等于约 0.1μg/mL 的 EC50 值与细胞表面人 CD73 结合。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白能够结合 CD73。在某些情形中，本申请所述的抗原结合蛋白还可以与猴的 CD73 交叉反应。例如，通过 FACS 所检测的。在本申请中，“交叉反应”通常指抗体与来自其他物种的同源蛋白反应的能力。

在某些实施方式中，本申请所述分离的抗原结合蛋白不与小鼠和/或大鼠的 CD73 结合。

例如，可以通过 ELISA 方法检测效价。例如，可以使用 FACS 检测检测所述分离的抗原结合蛋白的结合活性或功能活性。例如，可以对所述分离的抗原结合蛋白进行亲和力检测。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白能够阻止或减少 CD73 的活化。例如，所述分离的抗原结合蛋白能够阻止或减少 CD73 由无催化活性的开放构象向催化活性的封闭构象的转化。例如，所述分离的抗原结合蛋白能够将 CD73 催化中心封闭，从而抑制 CD73 的酶活。

在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白的结合表位可以通过氢氘交换质谱（HDX-MS）测定。在某些实施方式中，所述分离的抗原结合蛋白与 CPI-006 抗体（Corvus）具有竞争结合活性。

在本申请中，当与所述 CD73 相结合时，所述分离的抗原结合蛋白与 CD73 N 端结构域的 143-NIKAKGPLASQISGL-157 区域（SEQ ID NO: 37）或与其对应的 CD73 序列，178-SKETPFLSNPGTNL-191 区域（SEQ ID NO: 38）或与其对应的 CD73 序列，以及 CD73 C 端结构域的 381-WNHVSM-386 的区域（SEQ ID NO: 39）或与其对应的 CD73 序列中的至少一个氨基酸残基相结合。

在本申请中，“与其对应的 CD73 序列”可以指其同源物（或者来自其他物种的 CD73）中相应位置处的氨基酸序列。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白能够抑制 CD73 的酶活性。例如，所述分离的抗原结合蛋白可以对重组 CD73 具有酶活性抑制的效果。例如，所述分离的抗原结合蛋白可以对人 CD73 具有酶活性抑制的效果。本申请所述酶活性可以通过本领域常用的任何方法检测

得到。所述酶活性的检测可以包括将 CD73 抗原结合蛋白与重组 CD73 蛋白混匀，加入 AMP 和 ATP，将 CellTiter-Glo®底物加入 CellTiter-Glo®缓冲液，混匀并平衡至室温反应，进行全波长检测。例如，所述分离的抗原结合蛋白可以以小于或等于约 0.8μg/mL、小于或等于约 0.7μg/mL、小于或等于约 0.6μg/mL、小于或等于约 0.5μg/mL、小于或等于约 0.4μg/mL、小于或等于约 0.3μg/mL、小于或等于约 0.2μg/mL 的 EC50 值抑制重组 CD73 蛋白的酶活性。例如，所述分离的抗原结合蛋白可以以小于或等于约 6μg/mL、小于或等于约 5μg/mL、小于或等于约 4μg/mL、小于或等于约 3μg/mL、小于或等于约 2μg/mL、小于或等于约 1μg/mL、小于或等于约 0.5μg/mL 的 EC50 值抑制细胞膜上 CD73 蛋白的酶活性。

在本申请中，所述分离的抗原结合蛋白能够诱导细胞表面 CD73 的内吞。在某些实施方式中，可以通过荧光标记的方法判断蛋白的内吞情况。例如，可以使用流式细胞术检测细胞的荧光强度获得所述抗原结合蛋白诱导细胞表面 CD73 内吞的效率。在某些情形下，所述分离的抗原结合蛋白可以以约 50%或更高的效率诱导 CD73 的内吞。

多肽分子、核酸分子、载体、细胞、免疫缀合物和药物组合物

另一方面，本申请提供了多肽分子，其可以包含本申请所述的分离的抗原结合蛋白。

在某些实施方式中，所述多肽分子可以包含融合蛋白。在某些实施方式中，所述多肽分子可以为融合蛋白。

另一方面，本申请提供了分离的核酸分子，其可以编码本申请所述的分离的抗原结合蛋白。例如，其可以是通过以下方法产生或合成的：（i）在体外扩增的，例如通过聚合酶链式反应（PCR）扩增产生的；（ii）通过克隆重组产生的；（iii）纯化的，例如通过酶切和凝胶电泳分级分离；或者（iv）合成的，例如通过化学合成。

另一方面，本申请提供了一种载体，其可以包含本申请所述的核酸分子。此外，所述载体中还可包含其他基因，例如允许在适当的宿主细胞中和在适当的条件下选择该载体的标记基因。此外，所述载体还可包含允许编码区在适当宿主中正确表达的表达控制元件。这样的控制元件为本领域技术人员所熟知的，例如，可包括启动子、核糖体结合位点、增强子和调节基因转录或 mRNA 翻译的其他控制元件等。所述载体可通过转化、转导或转染宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞内表达得以表达。所述载体可以包括，例如质粒、粘粒、病毒、噬菌体或者在例如遗传工程中通常使用的其他载体。例如，所述载体为表达载体。此外，所述载体还可以包括有协助其进入细胞的成分，如病毒颗粒、脂质体或蛋白外壳，但不仅仅只有这些物质。

另一方面，本申请提供了一种细胞，其可以包含本申请所述的核酸分子或本申请所述的

载体。在某些实施方式中，每种或每个宿主细胞可包含一个或一种本申请所述的核酸分子或载体。在某些实施方式中，每种或每个宿主细胞可包含多个（例如，2 个或以上）或多种（例如，2 种或以上）本申请所述的核酸分子或载体。例如，可将本申请所述的载体引入所述宿主细胞中，例如真核细胞，如来自植物的细胞、真菌或酵母细胞等。在某些实施方式中，所述细胞可以是细菌细胞（例如，大肠杆菌）、酵母细胞或其它真核细胞，例如 COS 细胞、中国仓鼠卵巢（CHO）细胞、CHO-K1 细胞、LNCAP 细胞、HeLa 细胞、293T 细胞、COS-1 细胞、SP2/0 细胞、NS0 细胞或骨髓瘤细胞。可通过本领域已知的方法将本申请所述的载体引入所述宿主细胞中，例如电穿孔、lipofectine 转染、lipofectamin 转染等。

另一方面，本申请还提供了免疫缀合物，其可以包含本申请所述的分离的抗原结合蛋白。

在某些实施方式中，可以将本申请所述的分离的抗原结合蛋白或其片段与另一试剂，如化学治疗剂、毒素、免疫治疗剂、成像探针、分光镜探针等的连接。该连接可以通过一个或多个共价键，或非共价相互作用，并且可以包括螯合作用。可以使用多种接头（所述接头可以为本领域所知）以形成免疫缀合物。此外，可以以融合蛋白质的形式提供免疫缀合物，其可以由编码免疫缀合物的多核苷酸表达。所述免疫缀合物还可以包含例如抗体-药物缀合物（ADC）。合适的药物可以包括细胞毒素、烷化剂、DNA 小沟结合分子、DNA 嵌入剂、DNA 交联剂、组蛋白去乙酰化酶抑制剂、核输出抑制剂、蛋白酶体抑制剂、拓扑异构酶 I 或 II 的抑制剂、热激蛋白抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、抗生素和抗有丝分裂剂。在 ADC 中，抗体和治疗剂可以通过接头交联，该接头可切割，例如肽类接头、二硫类接头或腙类接头。

另一方面，本申请还提供了药物组合物，其可以包含本申请所述的分离的抗原结合蛋白、本申请所述的多肽分子、本申请所述的免疫缀合物、本申请所述的核酸分子、本申请所述的载体和/或本申请所述的细胞，以及任选地药学上可接受的载剂。

在某些实施方案中，所述药物组合物还可以包含一种或多种(药学上有效的)佐剂、稳定剂、赋形剂、稀释剂、增溶剂、表面活性剂、乳化剂和/或防腐剂的合适的制剂。组合物的可接受成分在所用剂量和浓度下优选地对接受者无毒。本发明的药物组合物包括但不限于液体、冷冻和冻干组合物。

在某些实施方案中，所述药物组合物还可含有多于一种活性化合物，通常为不会不利地影响彼此的具有互补活性的那些活性化合物。此类药物的类型和有效量可以取决于例如制剂中存在的拮抗剂的量和类型，以及受试者的临床参数。

在某些实施方案中，所述药学上可接受的载剂可以包括与药物给药相容的任何和所有的溶剂、分散介质、包衣、等渗剂和吸收延迟剂，通常安全、无毒。

在某些实施方案中，所述药物组合物可以包含肠胃外、经皮、腔内、动脉内、鞘内和/或鼻内施用或直接注射到组织中。例如，所述药物组合物可以通过输注或注射施用于患者或者受试者。在某些实施方案中，所述药物组合物的施用可以通过不同的方式进行，例如静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、局部或真皮内施用。在某些实施方案中，所述药物组合物可以不间断施用。所述不间断（或连续）施用可以通过患者佩戴的小泵系统来实现，以测量流入患者体内的治疗剂，如 WO2015/036583 所述。

制备方法

另一方面，本申请提供了制备所述的抗原结合蛋白的方法。所述方法可包括，在使得所述的抗原结合蛋白表达的条件下，培养所述本申请所述的宿主细胞。例如，可通过使用适当的培养基、适当的温度和培养时间等，这些方法是本领域普通技术人员所了解的。

任何适于产生单克隆抗体的方法都可用于产生本申请的抗原结合蛋白。例如，可以用连接或天然存在的 CD73 或其片段，免疫动物。可以使用合适的免疫接种方法，包括佐剂、免疫刺激剂、重复加强免疫接种，可以使用一种或多种途径。例如，可以使用杂交瘤制备方法，获取已经过免疫的小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行融合，经过 HAT 筛选出杂交瘤细胞株。

任何合适形式的 CD73 都可以作为免疫原（抗原），用于产生对 CD73 特异的非人抗体，筛选所述抗体的生物学活性。例如，激发免疫原可以是全长的成熟人 CD73，包括天然的同源二聚体，或含单个/多个表位的肽。免疫原可以单独使用，或与本领域已知的一种或多种免疫原性增强剂组合使用。

嵌合人源抗体可以选自任何种类的免疫球蛋白，包括 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在本申请中，抗体可以是 IgG 抗体，可以使用 IgG1 亚型。可以通过用下文实施例中描述的生物学测定筛选抗体实现必需恒定结构域序列的优化，以产生所需生物学活性。同样，任一类轻链都可以在本申请的化合物和方法中使用。例如，本申请的化合物和方法中可以使用 κ 链或其变体。

方法和用途

另一方面，本申请提供了所述分离的抗原结合蛋白、所述多肽分子、所述核酸分子、所述载体、所述细胞、所述免疫缀合物和/或所述药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于预防和/或治疗疾病和/或病症。

另一方面，本申请还提供了预防和/或治疗疾病和/或病症的方法，所述方法可以包括向有需要的受试者施用本申请所述分离的抗原结合蛋白、所述多肽分子、所述核酸分子、所述载

体、所述细胞、所述免疫缀合物和/或所述药物组合物。

在本申请中，所述使用可以通过不同方式进行，例如静脉内、瘤内、腹膜内、皮下、肌肉内、局部或真皮内施用。

另一方面，本申请所述分离的抗原结合蛋白、所述多肽分子、所述核酸分子、所述载体、所述细胞、所述免疫缀合物和/或所述药物组合物，其可以用于预防和/或治疗疾病和/或病症。

在本申请中，所述疾病和/或病症可以是 CD73 介导的疾病和/或病症。

在本申请中，所述疾病和/或病症包括肿瘤。

在本申请中，所述肿瘤包括实体瘤和/或血液瘤。

在本申请中，所述疾病和/或病症包括乳腺癌。

另一方面，本申请还提供了检测样品中 CD73 的方法，所述方法包括施用所述分离的抗原结合蛋白、所述多肽分子、所述核酸分子、所述载体、所述细胞、所述免疫缀合物和/或所述药物组合物。

在某些情形中，所述检测样品中 CD73 的方法是体外方法。在某些情形中，所述检测样品中 CD73 的方法为非治疗目的。在某些情形中，所述检测样品中 CD73 的方法不是诊断方法。

另一方面，本申请还提供了检测样品中 CD73 的试剂或试剂盒，其包含所述分离的抗原结合蛋白、所述多肽分子、所述核酸分子、所述载体、所述细胞、所述免疫缀合物和/或所述药物组合物。

另一方面，本申请还提供了所述分离的抗原结合蛋白、所述多肽分子、所述核酸分子、所述载体、所述细胞、所述免疫缀合物和/或所述药物组合物在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测样品中 CD73 的存在和/或含量。

不欲被任何理论所限，下文中的实施例仅仅是为了阐释本申请的融合蛋白、制备方法和用途等，而不用于限制本申请发明的范围。

实施例

实施例 1 抗人 CD73 的鼠源抗原结合蛋白的制备方法

1.1 制备产生鼠源抗原结合蛋白的杂交瘤细胞

制备鼠源单克隆抗原结合蛋白的方法采用 Kohler 和 Milstein 1975 年发明的杂交瘤制备技术(Nature，1975，256：495-497)。首先将人 CD73 带有 His 标签蛋白（Met 1-Lys 547）作为免疫抗原，一部分使用弗氏佐剂：Freund's Adjuvant, Complete(Sigma cat no.F5881，别名:FCA)

与 Freund's Adjuvant, Incomplete (Sigma cat no.F5506，别名：FICA)进行免疫，另一部分使用 Quick Antibody - Mouse 5w(博奥龙 cat no.KX0210041)佐剂，分别对多只 BALB/c、CD1 小鼠进行多点皮下免疫。经过三次免疫后取血清用 ELISA 法检测效价，FACS 检测结合活性及功能活性。最终挑选最佳小鼠获取脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行融合。经过 HAT 筛选出杂交瘤细胞株，取细胞培养上清用 FACS 检测方法，筛选出特异性结合人 CD73、猴 CD73 的单克隆杂交瘤细胞株，再次筛选出具有抑制 CD73 酶活性的单克隆细胞株，并对筛选出的单克隆细胞株进行亲和力(Biacore)筛选，最终得到表达人 CD73 抗原结合蛋白的单克隆杂交瘤细胞株进行序列分析，筛选数据列举见表 1。

表 1 杂交瘤筛选

克隆号	结合活性检测		功能活性	亲和力（KD）
	人 CD73（MFI 值）	猴 CD73（MFI 值）		
3A9	2421	1221	15.06	7.84E-10
115B10	6387	3266	17.88	2.94E-09
14E10	5429	2413	25.91	3.61E-09
36B3	5095	2000	17.01	6.97E-10
47F6	5406	2215	31.73	2.08E-09
72A4	5109	2218	22.09	3.15E-09
100G9	5161	2277	17.55	3.09E-09
124A9	5031	3116	9.91	2.16E-09
125A7	5628	2566	9.19	2.97E-09
127B3	4505	2044	23.81	1.96E-09
132C5	5137	2778	22.33	4.38E-09
144A9	5925	2900	11.29	3.15E-09
148F9	5325	2551	11.96	1.88E-09
151A6	3402	1318	14.63	2.32E-09
160B5	5133	2761	18.56	1.85E-09

经过高通量筛选，最终得到的单克隆杂交瘤细胞株具有高亲和力，可以与人和猴都具有结合活性。

实施例 2 抗 CD73 抗原结合蛋白可变区基因测序以及各抗原结合蛋白的制备

2.1 杂交瘤细胞中抗原结合蛋白的可变区基因测序及克隆

基于 TAKARA 的 5'RACE 技术原理，克隆出由杂交瘤细胞株 3A9 表达的小鼠抗原结合

蛋白可变区的 cDNA 序列。简言之，用 SMARTer 5'RACE 合成试剂盒(TAKARA，#634859)按说明书合成重链和轻链的可变区基因特异性 cDNA。用 PCR 引物修饰 cDNA 序列的 5'和 3'端，所述引物设计成为分别在重链和轻链可变区 cDNA 上增加合适的前导序列，使所得 PCR 产物能够通过无缝克隆的方法克隆到现有重组抗原结合蛋白表达的重链载体 pHB-Fc 和轻链载体 pHB-Cκ 上。pHB-Fc 表达载体上含有人 IgG1 重链恒定区基因序列，其中 CH2 上带有抗原结合蛋白 ADCC 敲除（knock out，KO）效应的 L234A 和 L235A（Eu numbering）突变；pHB-Cκ 载体上含有人 κ 轻链恒定区基因序列。将重链和轻链可变区 PCR 扩增产物通过 In-fusion 克隆试剂（TAKARA, #639650）克隆到表达载体上，并转化到 E.coli DH5α 大肠杆菌感受态细胞（益生生技，#FYE607-80VL）中。通过挑选单克隆菌落进行 Sanger 以及 NGS 测序，经分析获得抗原结合蛋白可变区序列。 其中 3A9 表达的抗 CD73 抗原结合蛋白可变区序列如下：

3A9 VH SEQ ID NO：29

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSKYAMSWVRQSPEKRLEWVAEISSGGGYINYP DTVTGRFTISRDNAKNTLYLEMSSLRSGDTAMYYCARAIYYYGSSYNYYAMDYWGQGTS VTVSS

3A9 VL SEQ ID NO：30

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAEAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPD RFTGSGSGTDFTLTIGNVQSEDLADYFCQQYSSYPLTFGGGTKLEIK

其中，下划线区为 CDRs(IMGT 定义，各 CDR 列表如下)：

表 2. 鼠源 CD73 抗原结合蛋白 CDR 序列

结构域		序列	SEQ ID NO.
VH	CDR1	GFTFSKYA	1
	CDR2	ISSGGGYI	2
	CDR3	ARAIYYYGSSYNYYAMDY	3
VL	CDR1	QDVGTA	4
	CDR2	WAS	5
	CDR3	QQYSSYPLT	6

2.2 抗原结合蛋白的表达

将实施例 2.1 中所得表达载体经过大肠杆菌扩增，用去内毒素质粒抽提试剂盒（天根生化科技（北京）有限公司，#DP117）制备25量质粒，用于瞬时转染表达抗原结合蛋白。表达

所用的宿主细胞为 CHO-S 细胞（赛默飞，#R80007）。通过将制备所得的两种重链载体分别和轻链载体一起，与聚醚酰亚胺（PEI，Polysciences，# 24765-1）混合形成脂质体复合物后，转染 CHO-S 细胞，放入培养箱中培养 5-7 天。离心收集细胞培养液上清，通过 Protein A 亲和层析柱纯化得到人鼠抗原结合蛋白（3A9 表达的抗原结合蛋白编号为 900581）。

2.3 **抗原结合蛋白 900694-900698 的制备**

抗原结合蛋白的人源化采用 3D 建模的方法：先对鼠源抗原结合蛋白进行三维结构建模，选出最优结构模型，具体为分别使用 Discovery Studio 和 Schrödinger Antibody Modeling，采用同源建模方法选取 5-10 个最优结构解，Loop 区域一般使用同源建模方法建模，如 CDR 氨基酸序列比对结果显示低于 50% Identity，则使用从头建模方法搭建 CDR3 结构模型。使用 PDB BLAST 调取序列最接近的 10 个抗体晶体结构模型（结构分辨率高于 2.5 埃），对比自动建模模型，选取最优的结构模型。然后将抗原结合蛋白的可变区序列与 NCBI IgBlast 数据库中的可用序列比较，通过鉴定和分析，最终确定了适合在其上构建 CDR 移植重链和轻链的人源构架区（FR 区）。

改造时，根据人抗体 FR 区保守的氨基酸残基以及抗体 FR 区中重要的氨基酸残基，设计改造位点，对本申请抗原结合蛋白 900581 的重轻链的可变区分别进行人源化突变设计，设计的人源化序列应满足不影响抗体结构稳定性，不影响抗原结合蛋白与抗原结合，不引入糖基化、磷酸化等蛋白修饰位点，不引入易被氧化、氨基化等位点，增强结构稳定性等要求。经分析本次针对 900581 的鼠源抗原结合蛋白序列共设计了 3 条人源化重链序列以及 3 条人源化轻链序列，并将人源化点突变抗原结合蛋白表达质粒分别经 CHO-S 细胞表达，纯化后得到人源化抗原结合蛋白。利用 ELISA，Biacore 和流式细胞术等检测方法，对人源化抗原结合蛋白的受体结合能力，功能抑制活性和非特异结合特性，热稳定性等指标进行筛选，获得了 5 个性能优异的人源化抗 CD73 抗原结合蛋白。所获得人源化抗 CD73 抗原结合蛋白的蛋白号以及相应的 VH 和 VL 序列下所示：

900694 VH SEQ ID NO: 31

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMSWVRQAPGKGLEWVAEISSGGGYINYP
DTVTGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAIYYYGSSYNYYAMDYWGQGTT
VTVSS

900694 VL SEQ ID NO: 32

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVGTAEAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPDR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSYPLTFGQGTKLEIK

900695 以及 900697 VH SEQ ID NO: 33

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMSWVRQAPGKGLEWVAEISSGGGYINY ADSVTGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAIYYYGSSYNYYAMDYWGQGT TVTVSS

900695 以及 **900698** VL SEQ ID NO: 34

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVGTAEAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSYPLTFGQGTKLEIK

900696 以及 **900698** VH SEQ ID NO: 35

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMSWIRQAPGKGLEWVAEISSGGGYINYA DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAIYYYGSSYNYYAMDYWGQGTT VTVSS

900696 以及 **900697** VL SEQ ID NO: 36

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVGTAEAWYQQKPGKAPKLLIYWASTLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSYPLTFGQGTKLEIK

其中，下划线区为 CDRs（IMGT 定义），900694，900695，900696，900697 以及 900698 分别为 5 个抗 CD73 人源化抗原结合蛋白编号。

实施例 3 抗 CD73 抗原结合蛋白对细胞表面人 CD73 的结合活性检测

抗 CD73 抗原结合蛋白 900581、900565 以及 900581 抗原结合蛋白的人源化抗原结合蛋白 900694，900695，900696，900697 以及 900698 与细胞表面人 CD73 的细胞(CHOK1-huCD73-3F4，华博生物)的结合活性检测。其中嵌合抗体 900565 来源于杂交瘤细胞株 115B10。900565 的重链可变区（VH）氨基酸序列如 SEQ ID NO: 41 所示，900565 的轻链可变区（VL）氨基酸序列如 SEQ ID NO: 42 所示。

所有抗原结合蛋白均用含 1%BSA 的 PBS 溶液（1%BSA/PBS）稀释至 30μg/ml，再 3 倍稀释 11 个梯度，每孔 20μL 加入 96 孔 U 型板中，同步设定阴性对照(只加 1%BSA/PBS)。取对数生长期内表达人 CD73 的细胞（CHOK1-huCD73-3F4，华博生物）悬液，离心（1000rpm×5min)弃培养液，用 1%BSA/PBS 重悬至活细胞密度为 1×10^6/mL，每孔 20μL（2×10^4 个细胞）加入已有抗 CD73 抗原结合蛋白的 96 孔 U 型板中室温反应 30min。将反应后的 96 孔 U 型板用 1%BSA/PBS 重悬，离心（300g×3min）弃上层液，如此洗涤 1 遍，加入 1:200 稀释的 PE-羊抗人-Fc（Jackson ImmunoResearch，#109-115-098），室温避光反应 15min；将反应后的 96 孔 U 型板用 1%BSA/PBS 重悬，离心(300g×3min)弃上层液，如此洗涤 3 遍，最终用每孔 100μL 1%BSA/PBS 重悬，用流式细胞仪（BD，#CantoII）检测 PE 通道的荧光强度。

900581 抗原结合蛋白结合活力结果见图 1 及表 3，900694-900698 抗原结合蛋白结合活力

结果见图 2 及表 4，结果表明 900581 抗原结合蛋白与细胞表面表达人 CD73 的细胞（CHOK1-huCD73-3F4，华博生物）有很好的亲和力，900694-900698 与 900581 的结合活性相当。

表 3. 900581、900565 对细胞表面人 CD73 结合活性

抗原结合蛋白	900581	900565
EC50(μg/mL)	0.4258	2.141

表 4. 900581、900694-900698 对细胞表面人 CD73 结合活性

抗原结合蛋白	900581	900694	900695	900696	900697	900698
EC50(μg/mL)	0.3466	0.6461	0.5942	0.6840	0.5176	0.6879

实施例 4 抗 CD73 抗原结合蛋白对重组 CD73 酶活性抑制的效果检测

900581 以及 900694，900695，900696，900697 以及 900698 对重组 CD73 蛋白（ACRO，#CD3-H52H7-100μg）蛋白酶活性抑制的效果检测。具体操作如下：用 TM Buffer(ROCKLAND，#MB-059)将系列 CD73 抗原结合蛋白稀释成 120μg/mL，再 5 倍稀释 10 个梯度，25 μL /well 加入 96 孔板中。再用 TM Buffer（ROCKLAND，#MB-059）将重组 CD73 蛋白稀释至 0.3μg/ml，各 25 μL/well 加入 96 孔板中，混匀。然后将稀释好的 AMP 和 ATP 进行 1:1 混合，50 μL/well 加入上述 96 孔板中，反应 15min。最后将 CellTiter-Glo®底物加入 CellTiter-Glo®缓冲液，混匀并平衡至室温，然后加入待测孔，100μL/well，室温反应 10min，全波长检测。

900581，900694，900695，900696，900697 以及 900698 对重组 CD73 蛋白（ACRO，#CD3-H52H7-100μg）酶活性抑制的结果见图 3 以及表 5，结果表明 900694，900695，900696，900697 和 900698 与 900581 抗原结合蛋白对重组 CD73 蛋白酶活性抑制的效果相当。

表 5. 900581、900694-900698 对重组 CD73 蛋白酶活性抑制

抗原结合蛋白	900581	900694	900695	900696	900697	900698
EC50(μg/mL)	0.2621	0.6812	0.7460	0.7509	0.5854	0.5876

实施例 5 抗 CD73 抗原结合蛋白对细胞膜上 CD73 酶活性抑制的效果检测

所有抗原结合蛋白均用 PBS 溶液稀释至 30μg/ml，再以 5 倍比例稀释 6 个梯度。取对数

生长期内表达人 CD73 的细胞（CHOK1-huCD73-3F4，华博生物）悬液，用培养基制备成 4X10^5/ml 细胞悬液，每孔 100ul（约 40000 个细胞）加入 96 孔 U 型板中,1500rpm×5min 离心，去上清。然后用系列稀释的抗原结合蛋白重悬细胞，每孔加入 100ul，混匀，37℃孵育 20min。孵育结束后，1500rpm 离心 5min，去上清，200ul/well PBS 洗涤 1 遍，然后用 100μL /well 180μM AMP 重悬，37℃孵育 60min。孵育结束后，1500rpm×5min 离心，取 50μL /well 上清，转移至 96 孔黑板中，再加入 50ul/well 配制好的 ATP，混匀，37℃反应 15min。最后将 CellTiter-Glo® 底物加入 CellTiter-Glo®缓冲液，混匀并平衡至室温，然后加入待测孔，100μL /well，室温反应 10min，全波长检测。酶活性的百分比按照如下所述进行评估：残余 CD73 的活性为：(CHOK1-huCD73-3F4 细胞 +Ab+ATP+AMP)-(ATP+AMP)/(CHOK1-huCD73-3F4 细胞 +ATP+AMP)-(ATP+AMP)*100。

抗 CD73 嵌合抗体 900581，900565 对 CD73 的细胞（CHOK1-huCD73-3F4，华博生物）酶活性抑制的效果见图 4 以及表 6，900581，900697 以及 900698 对 CD73 的细胞（CHOK1-huCD73-3F4，华博生物）酶活性抑制的效果见图 5 以及表 7，结果表明 900697，900698 与 900581 对细胞膜上 CD73 酶活性抑制的效果基本一致。

表 6. 900581、900565 对细胞膜上 CD73 酶活性抑制

抗原结合蛋白	900581	900565
EC50(μg/mL)	0.9437	1.625

表 7. 900581、900697、900698 对细胞膜上 CD73 酶活性抑制

抗原结合蛋白	900581	900697	900698
EC50(μg/mL)	1.853	1.972	1.431

实施例 6 抗 CD73 抗原结合蛋白与人 CD73 的结合亲和力检测

900581，900694，900695，900696，900697 以及 900698 与人 CD73 蛋白（厂家：ACRO Biosystems，货号：CD3-H52H7）的结合动力学实验运用 Biacore （GE，型号为 T200）检测，实验缓冲液为 HBS-EP+（pH7.4），protein A 芯片（厂家：GE, 货号：29-1275-56)。

设置样品仓和流路温度为 25℃，protein A 芯片分别捕获抗原结合蛋白作为配体固定约 100RU。人 CD73 蛋白用实验缓冲液稀释至 50nM， 25nM，12.5nM，6.25nM，3.12nM，1.57nM 一系列浓度作为分析物，并以实验缓冲液作为 0 浓度对照，30μL /min 流速下，结合 120s，解

离 600s。10mM Glycine pH 1.5 在 50μL/min 流速下，再生 60s 多循环动力学检测。采用 1:1 结合模型，选用 Fit local 模式拟合出结合速率常数（ka），解离速率常数（kd）和解离平衡速率常数（KD），拟合结果见表 8，显示所有抗原结合蛋白均与人 CD73 蛋白结合，且大部分抗原结合蛋白与人 CD73 蛋白的结合亲和力无显著差异。

表 8：900581、900694-900698 对人 CD73 蛋白的结合亲和力检测

Ligand	Analyte	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
900581	人 CD73	2.67E+05	4.39E-04	1.65E-9
900694	人 CD73	3.29E+05	4.93E-04	1.50E-9
900695	人 CD73	2.95E+04	6.03E-05	2.04E-9
900696	人 CD73	2.19E+05	9.28E-04	4.23E-9
900697	人 CD73	3.80E+05	4.92E-04	1.29E-9
900698	人 CD73	3.39E+05	1.06E-03	3.12E-9

实施例 7 抗 CD73 抗原结合蛋白与不同种属 CD73（人、小鼠、大鼠、猴）的结合亲和力检测

900581，900694，900695，900696，900697 以及 900698 分别与人 CD73 蛋白（厂家：ACRO Biosystems，货号：CD3-H52H7），小鼠 CD73/NT5E（厂家：ACRO Biosystems，货号：CD3-M52H9），大鼠 CD73（厂家：Novoprotein，货号：CB16）和猴 CD73（厂家：Novoprotein，货号：CI21）的结合动力学实验运用 Biacore（GE，型号为 T200）检测，使用 protein A 芯片（厂家：GE，货号：29-1275-56），实验缓冲液为 HBS-EP+（pH7.4）。

设置样品仓和流路温度为 25℃，Protein A 芯片分别捕获抗原结合蛋白作为配体固定为约 100RU。人 CD73 蛋白/猴 CD73/大鼠 CD73/小鼠 CD73 分别用实验缓冲液稀释至 50nM，25nM，12.5nM，6.25nM，3.12nM，1.57nM 一系列浓度作为分析物，并以实验缓冲液作为 0 浓度对照，30μL/min 流速下，结合 120s，解离 600s。10mM Glycine pH 1.5 在 50μL/min 流速下，再生 60s 多循环动力学检测。采用 1:1 结合模型，选用 Fit local 模式拟合出结合速率常数（ka），

解离速率常数（kd）和解离平衡速率常数（KD），拟合结果见表 9，显示上述抗原结合蛋白均与人 CD73，猴 CD73（厂家：Novoprotein，货号：CI21）都能结合，且大部分抗原结合蛋白与人、猴 CD73 蛋白的结合亲和力无显著差异，同时所有抗原结合蛋白均不与小鼠（厂家：ACRO Biosystems，货号：CD3-M52H9）和大鼠（厂家：Novoprotein，货号：CB16）的 CD73 蛋白结合。

表 9：900581、900694-900698 对猴 CD73 蛋白的结合亲和力检测

Ligand	Analyte	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
900581	猴 CD73	3.49E+05	3.58E-04	1.05E-9
900694	猴 CD73	5.78E+05	1.17E-04	2.03E-9
900695	猴 CD73	1.80E+05	1.48E-04	8.22E-10
900696	猴 CD73	3.54E+05	2.14E-04	6.04E-10
900697	猴 CD73	6.41E+04	1.37E-04	2.13E-9
900698	猴 CD73	1.08E+05	1.15E-04	1.41E-9

实施例 8 抗 CD73 抗原结合蛋白诱导细胞表面 CD73 内吞能力的检测

将对照蛋白 900222、嵌合蛋白 900581 以及人源化蛋白 900697、900698 蛋白用 PBS 溶液稀释至 1μg/ml，每个浓度重复 2 孔。其中，对照蛋白 900222 序列来源于百时美施贵宝公司的 CD73 抗体专利 US20190284293A1 中的 mAb-CD73.4-IgG2 抗体序列。取对数生长期内的 Calu6 细胞，将细胞制备成 2×10^5/ml 细胞悬液，每孔 100μL（约 20000 个细胞）加入 96 孔 U 型板中，300g×3min 离心，去上清。再用稀释的抗原结合蛋白重悬细胞，100μL /well，混匀，4℃孵育 30min。孵育结束后，300g×3min 离心，去上清，1%BSA 重悬，一半 37℃孵育，另一半 4℃孵育，孵育时间为 5h。孵育结束后，取出对应时间的孔，300g×3min 离心去上清，加入 PE anti-huIgG Fc（1:200），50μL/孔，混匀，4℃反应 30min。孵育结束后，洗 2 遍，300g×3min，流式检测荧光强度。抗 CD73 抗原结合蛋白诱导的细胞表面 CD73 内吞检测结果如下表 10 以

及图 6 所示，结果表明嵌合蛋白 900581 以及人源化蛋白 900697、900698 蛋白诱导 CD73 内吞的效果显著优于对照蛋白 900222，且人源化蛋白 900697 以及 900698 的诱导内吞效果又比嵌合体 900581 要好。

表 10. 抗 CD73 抗原结合蛋白诱导细胞表面 CD73 内吞效率

抗原结合蛋白	900222	900581	900697	900698
内吞效率（%）	44.18	78.75	98.17	96.35

实施例 9 抗 CD73 抗原结合蛋白的结合表位鉴定

9.1 **氢氘交换质谱（HDX-MS）测定 900581 抗原结合蛋白的结合表位**

将 5~10μM 抗原或抗原结合蛋白或抗原-结合蛋白复合物（1:1 molar ratio）（50mM HEPES，pH 7.4,150mM NaCl，4mM TCEP）分别在 4℃下放置 1 小时，使之形成复合物的稳定状态。在 4℃，之后将 5μL 样品稀释到 20μL D_2O（氘）中并放置到不同的 HDX 时间点进入质谱分析 （例如，0,10, 60, 300 ,900 秒）。氢氘交换一段时间后，通过与 25μL 冰冷的 4M 盐酸胍和 1%三氟乙酸混合来终止反应。在停止反应后立即将样品管置于干冰上直至样品注入 HDX LEAP PAL3.0 平台。注射后到全自动氢氘交换平台后，样品以 120μL/ min 流速通过固定的胃蛋白酶柱，并将酶解的肽段捕获在 C18 捕获柱上并脱盐。在 8 分钟内，用 2.1mm×5cm C18 柱（1.9μm Hypersil Gold，Thermo Fisher）以 4-40%乙腈和 0.3%甲酸的线性梯度分离脱盐的肽段。在样品处理过程中，蛋白质酶解和肽段分离均在 4℃下进行。使用 Orbitrap 质谱仪（Orbitrap Fusion™ Tribrid™ Mass Spectrometer，Thermo Fisher）获得氢氘交换的质谱数据，测量的分辨率为 65,000（m/z 400）。每一个样品在每一个时间点都有三次 HDX 测定（triplicates）。

氢氘交换质谱（HDX-MS）测定结果表明 900581 的结合表位主要包括 CD73 N 端结构域的 143-NIKAKGPLASQISGL-157 区域（SEQ ID NO: 37），178-SKETPFLSNPGTNL-191 区域（SEQ ID NO: 38），以及 CD73 C 端结构域的 381-WNHVSM-386 的区域（SEQ ID NO: 39），将该三段非连续区域定位到 CD73 的三维结构模型上时，发现该表位处于 CD73 催化活性中心边缘，具体如图 7 所示。当 900581 结合在该表位时可以将 CD73 催化中心非常高效地封闭，从而最大效率地抑制 CD73 的酶活。查阅专利和文献表明目前本公司的 900581 是迄今为止首次报道的结合在 CD73 催化中心周围的并给出具体表位信息的治疗性抗原结合蛋白。

9.2 **非水解形式的 AMP 类似物 APCP 竞争结合实验验证 900581 抗原结合蛋白的结合表位**

CD73 结合底物 AMP 之后会发生从开放构象到封闭构象的构型改变，采用 AMP 非水解形式的类似物 APCP 替代 AMP 之后，由于 APCP 无法水解生成腺苷，从而可以将 CD73 锁定在封闭构象的催化中间状态。随着 APCP 浓度的增加，处于封闭构象的催化中间状态的 CD73 比例会相应增加，对于结合在催化区域的抗原结合蛋白，则结合上去的比例会相应减少，而结合在非催化区域的抗原结合蛋白结合上去的比例则不会变化。该方法具体操作如下：将细胞用 1%BSA 制备成 1E6/ml 细胞悬液，每孔 20μL 加入 96 孔 U 型板中。将 APCP 用 1%BSA 分别稀释成 30nM/30μM，20μL/well 加入上述 96 孔 U 型板中，混匀，室温放置 30min。将待测抗原结合蛋白稀释至 90μg/ml，再分别 3 倍稀释 10 个梯度。将系列稀释的抗原结合蛋白加入上述 96 孔 U 型板中，20μL/well，混匀，室温放置 30min。孵育结束后，300g×3min 离心，去上清，再 20μL/well 加入二抗 PE 羊抗人 IgG Fc（1:200），混匀，室温放置 15min；孵育结束后，洗涤 2 遍，300g×3min，流式检测 PE-MFI。

检测结果如图 8A-8C 所示，其中 900609 是 Corvus 公司的被证明结合在催化中心周围的 CPI-006 抗体，TNP 是阴性对照抗体。结果表明 900581 抗原结合蛋白的表现和 CPI-006 抗体类似，随着 APCP 浓度的增加结合到 CD73 上的抗原结合蛋白比例会逐渐降低，从而进一步证明 900581 结合在 CD73 催化活性中心周围。

实施例 10 抗 CD73 抗原结合蛋白的体内治疗肿瘤的效果检测

10.1

本实验利用 CD73 人源化小鼠建立 MDA-MB-231 三阴性乳腺癌动物模型并测试受试抗体的药效。首先，将 MDA-MB-231（ATCC 库）细胞（2E6 个）100μl 接种于 CD73 人源化小鼠中建立 CD73 人源化小鼠 MDA-MB-231 三阴性乳腺癌动物模型，成瘤小鼠根据小鼠肿瘤体积和体重平均分配到 4 个实验组中，每组 6 只，腹腔注射给药，每周给药 2 次共给药 6 次。具体给药方案见下表。其中，900201 为阴性对照抗体，不与 CD73 抗原结合。900201 的重链（HC）氨基酸序列如 SEQ ID NO: 43 所示，900201 的轻链（LC）氨基酸序列如 SEQ ID NO: 44 所示。

结果显示 900581、900697 以及 900698 能够显著抑制 MDA-MB-231 三阴性乳腺癌的生长，同时对小鼠的体重生长指标没有影响。而阴性对照抗体 900201 则不能抑制肿瘤的生长。

表 11 给药方案

组别	受试品	动物数（只）	给药途径	给药频率 a	给药次数
G1	900201	6	i.p.	BIW	6

G2	900581	6	i.p.	BIW	6
G3	900697	6	i.p.	BIW	6
G4	900698	6	i.p.	BIW	6

10.2

利用 NPG 小鼠建立 MDA-MB-231 三阴性乳腺癌动物模型并测试受试抗体的药效。用于本实验的人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 以 L-15 培养基添加 10% FBS 培养于含无 CO_2 的 37℃培养箱。细胞连续培养十代之前，将约含 5.0×10^6 MDA-MB-231 细胞混悬于 100 μL PBS 中，和等体积 Matrigel 混匀后，通过皮下注射接种于 NPG 人源化小鼠背部右边靠近腋下，接种体积为 200 μL 左右。接种前用 2 - 5%异氟烷将小鼠麻醉。在接种当天，经尾静脉注射 1.0×10^7 PBMC（100μL），当肿瘤生长到平均约 50 - 80 mm^3 左右时，18 只荷瘤小鼠将根据肿瘤体积和体重被随机分成 3 组，每组 6 只。分组当天进行给药,具体给药方案见表 12。其中，900201 为阴性对照抗体，不与 CD73 抗原结合。900201 的重链（HC）氨基酸序列如 SEQ ID NO: 43 所示，900201 的轻链（LC）氨基酸序列如 SEQ ID NO: 44 所示。Oleclumab 为阿斯利康开发的抗 CD73 单克隆抗体。

结果如下表 12 和图 9 所示，oleclumab 以及 900698 能够显著抑制 MDA-MB-231 三阴性乳腺癌的生长，而阴性对照抗体 900201 则不能抑制肿瘤的生长。

表 12 三阴性乳腺癌模型给药方案

组别	受试品	动物数（只）	给药剂量（mg/kg）	给药途径	给药频率 [a]	给药次数
G1	900201	6	5	i.p.	BIW	8
G2	oleclumab	6	5	i.p.	BIW	8
G4	900698	6	5	i.p.	BIW	8

实施例 11 抗 CD73 抗原结合蛋白的体内治疗胰腺癌的效果检测

本实验利用 NPG 小鼠建立 BxPC-3 胰腺癌动物模型并测试受试抗体的药效。用于本实验的人胰腺癌细胞 BxPC-3，以 RPMI-1640 培养基添加 10% FBS 培养于含 5% CO_2 的 37℃培养箱。细胞连续培养十代之前，将约含 1×10^7 BxPC-3 细胞的 PBS 100μL 和等体积 Matrigel 混

匀后，通过皮下注射接种于 18 只 NPG 小鼠背部右边靠近腋下，接种体积为 200 μL 左右。接种前用 2 - 5%异氟烷将小鼠麻醉。在接种当天，经尾静脉注射 1.0×10^7 PBMC（100μL），当肿瘤生长到平均约 50 - 80 mm^3 左右时，18 只荷瘤小鼠将根据肿瘤体积和体重被随机分成 3 组，每组 6 只。分组当天进行给药,具体给药方案见表 13。其中，900543 为阴性对照抗体（900543 是 900201 的 ADCC 敲除型），不与 CD73 抗原结合。900543 的重链（HC）氨基酸序列如 SEQ ID NO: 47 所示，900543 的轻链（LC）氨基酸序列如 SEQ ID NO: 44 所示。Oleclumab 为阿斯利康开发的抗 CD73 单克隆抗体。

结果如下表 13 和图 10 所示，oleclumab 以及 900698 能够显著抑制 BxPC-3 胰腺癌的生长，而阴性对照抗体 900543 则不能抑制肿瘤的生长。

表 13 胰腺癌模型给药方案

组别	受试品	动物数（只）	给药剂量（mg/kg）	给药途径	给药频率 a	给药次数
G1’	900543	6	5	i.p.	BIW	8
G2	oleclumab	6	5	i.p.	BIW	8
G4	900698	6	5	i.p.	BIW	8

在本申请提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本申请的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本申请作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求 书

1. 分离的抗原结合蛋白，其包含 HCDR3，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。
2. 根据权利要求 1 所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 HCDR2，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。
3. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 HCDR1，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 LCDR3，所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。
5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 LCDR2，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。
6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 LCDR1，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。
7. 根据权利要求 3-6 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 H-FR1，所述 H-FR1 的 C 末端与所述 HCDR1 的 N 末端直接或间接相连，且所述 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 15 或 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。
8. 根据权利要求 2-7 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 H-FR2，所述 H-FR2 位于所述 HCDR1 与所述 HCDR2 之间，且所述 H-FR2 包含 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 16 或 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。
9. 根据权利要求 2-8 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 H-FR3，所述 H-FR3 位于所述 HCDR2 与所述 HCDR3 之间，且所述 H-FR3 包含 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 20 或 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列。
10. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 H-FR4，所述 H-FR4 的 N 末端与所述 HCDR3 的 C 末端相连，且所述 H-FR4 包含 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。
11. 根据权利要求 6-10 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 L-FR1，所述 L-FR1 的 C 末端与所述 LCDR1 的 N 末端直接或间接相连，且所述 L-FR1 包含 SEQ ID NO: 11 或 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列。
12. 根据权利要求 6-11 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 L-FR2，所述 L-FR2 位于所述 LCDR1 与所述 LCDR2 之间，且所述 L-FR2 包含 SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。
13. 根据权利要求 5-12 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 L-FR3，所述 L-FR3 位

于所述 LCDR2 与所述 LCDR3 之间，且所述 L-FR3 包含 SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 27 或 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列。

14. 根据权利要求 4-13 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 L-FR4，所述 L-FR4 的 N 末端与所述 LCDR3 的 C 末端相连，且所述 L-FR4 包含 SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列。

15. 根据权利要求 6-14 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列，且所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。

16. 根据权利要求 1-15 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 VH，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 33 或 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列。

17. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34 或 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。

18. 根据权利要求 17 所述的分离的抗原结合蛋白，其包含选自下述的任一组 VH 和 VL：

    1）所述 VH 包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 30 所示的氨基酸序列；

    2）所述 VH 包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列；

    3）所述 VH 包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列；

    4）所述 VH 包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列；

    5）所述 VH 包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列；以及

    6）所述 VH 包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列，且所述 VL 包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

19. 根据权利要求 1-18 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含抗体重链恒定区。

20. 根据权利要求 19 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述抗体重链恒定区源自人抗体重链恒定区。

21. 根据权利要求 19-20 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述抗体重链恒定区源自

人 IgG 重链恒定区。

22. 根据权利要求 19-21 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述抗体重链恒定区源自人 IgG1 重链恒定区。
23. 根据权利要求 1-22 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包括抗体轻链恒定区。
24. 根据权利要求 23 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述抗体轻链恒定区源自人 Igκ 恒定区。
25. 根据权利要求 1-24 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其包含抗体或其抗原结合片段。
26. 根据权利要求 25 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述抗原结合片段包括 Fab，Fab'，Fv 片段，$F(ab')_2$，$F(ab)_2$，scFv，di-scFv 和/或 dAb。
27. 根据权利要求 25-26 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述抗体选自下组中的一种或多种：单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体和全人源抗体。
28. 根据权利要求 1-27 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其能够特异性结合 CD73 或其功能活性片段。
29. 根据权利要求 28 所述的分离的抗原结合蛋白，所述 CD73 包括人 CD73 和/或猴 CD73。
30. 根据权利要求 1-29 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其能够阻止或减少 CD73 的活化。
31. 根据权利要求 28-30 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，当与所述 CD73 结合时，所述分离的抗原结合蛋白与 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列的第 143-157 位氨基酸或与其对应的 CD73 序列、SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列的第 178-191 位氨基酸或与其对应的 CD73 序列和 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸序列的第 381-386 位氨基酸或与其对应的 CD73 序列中的至少一个氨基酸残基相结合。
32. 根据权利要求 31 所述的分离的抗原结合蛋白，其中所述第 143-157 位氨基酸或与其对应的 CD73 序列位于所述 CD73 的 N 端结构域，所述第 178-191 位氨基酸或与其对应的 CD73 序列位于所述 CD73 的 N 端结构域，且其中所述第 381-386 位氨基酸或与其对应的 CD73 序列位于所述 CD73 的 C 端结构域。
33. 根据权利要求 1-32 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其能够抑制 CD73 的酶活性。
34. 根据权利要求 1-33 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白，其能够诱导细胞表面 CD73 的内吞。
35. 多肽分子，其包含权利要求 1-34 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白。
36. 根据权利要求 35 所述的多肽分子，其包含融合蛋白。
37. 分离的核酸分子，其编码权利要求 1-34 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白或权利要求

35-36 中任一项所述的多肽分子。

38. 载体，其包含权利要求 37 中所述的核酸分子。

39. 细胞，其包含权利要求 37 中所述的核酸分子和/或权利要求 38 所述的载体。

40. 免疫缀合物，其包含权利要求 1-34 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白。

41. 药物组合物，其包含权利要求 1-34 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白、权利要求 35-36 中任一项所述的多肽分子、权利要求 37 所述的核酸分子、权利要求 38 所述的载体、权利要求 39 所述的细胞和/或权利要求 40 所述的免疫缀合物，以及任选地药学上可接受的载剂。

42. 制备权利要求 1-34 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白的方法，所述方法包括在使得所述分离的抗原结合蛋白表达的条件下，培养权利要求 39 所述的细胞。

43. 权利要求 1-34 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白、权利要求 35-36 中任一项所述的多肽分子、权利要求 37 所述的核酸分子、权利要求 38 所述的载体、权利要求 39 所述的细胞、权利要求 40 所述的免疫缀合物和/或权利要求 41 所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于预防和/或治疗疾病和/或病症。

44. 根据权利要求 43 所述的用途，其中所述疾病和/或病症是 CD73 介导的疾病和/或病症。

45. 根据权利要求 43-44 中任一项所述的用途，其中所述疾病和/或病症包括肿瘤。

46. 根据权利要求 45 所述的用途，其中所述肿瘤包括实体瘤和/或血液瘤。

47. 根据权利要求 43-46 中任一项所述的用途，其中所述疾病和/或病症包括乳腺癌。

48. 检测样品中 CD73 的方法，所述方法包括施用权利要求 1-34 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白、权利要求 35-36 中任一项所述的多肽分子、权利要求 37 所述的核酸分子、权利要求 38 所述的载体、权利要求 39 所述的细胞、权利要求 40 所述的免疫缀合物和/或权利要求 41 所述的药物组合物。

49. 检测样品中 CD73 的试剂或试剂盒，其包含权利要求 1-34 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白、权利要求 35-36 中任一项所述的多肽分子、权利要求 37 所述的核酸分子、权利要求 38 所述的载体、权利要求 39 所述的细胞、权利要求 40 所述的免疫缀合物和/或权利要求 41 所述的药物组合物。

50. 权利要求 1-34 中任一项所述的分离的抗原结合蛋白、权利要求 35-36 中任一项所述的多肽分子、权利要求 37 所述的核酸分子、权利要求 38 所述的载体、权利要求 39 所述的细胞、权利要求 40 所述的免疫缀合物和/或权利要求 41 所述的药物组合物在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测样品中 CD73 的存在和/或含量。

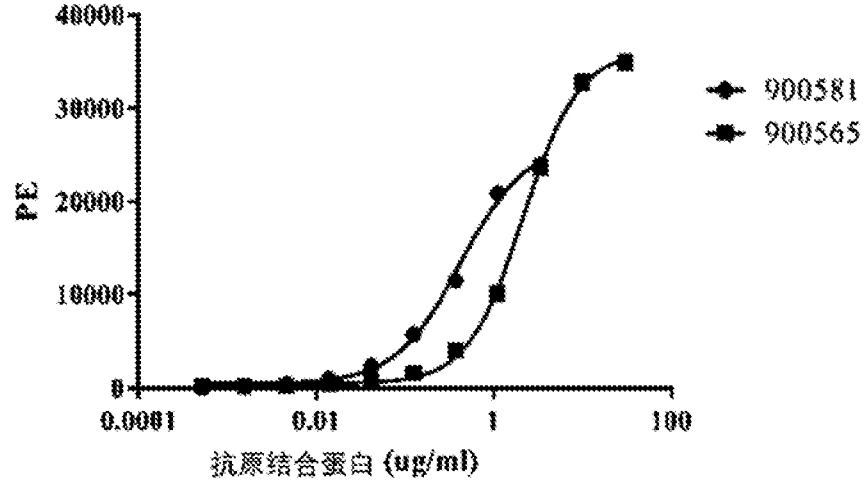

40000
30000
20000
10000
0
PE
0.0001
0.01
1
100
抗原结合蛋白 (ug/ml)
900581
900565

图 1

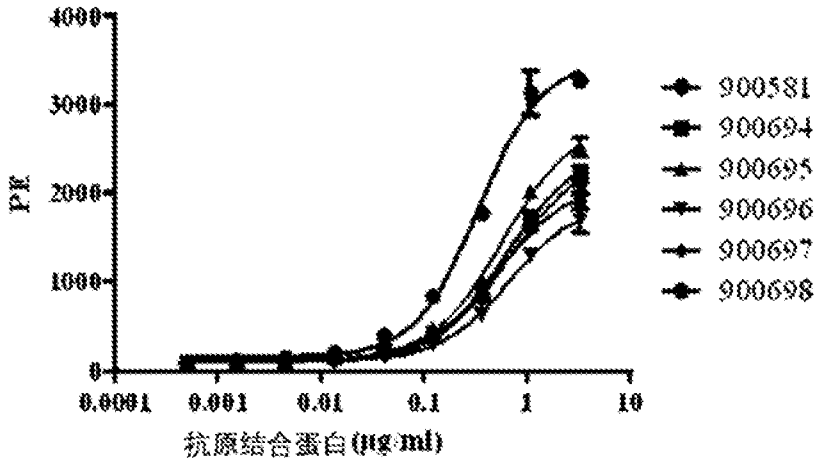

4000
3000
2000
1000
0
PE
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
抗原结合蛋白(ug/ml)
900581
900694
900695
900696
900697
900698

图 2

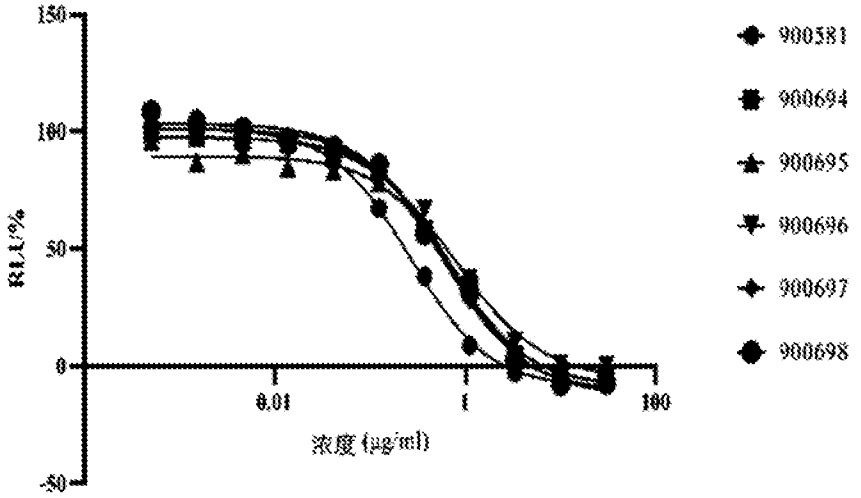

150
100
50
0
-50
RLU%
0.01
1
100
浓度 (μg/ml)
900581
900694
900695
900696
900697
900698

图 3

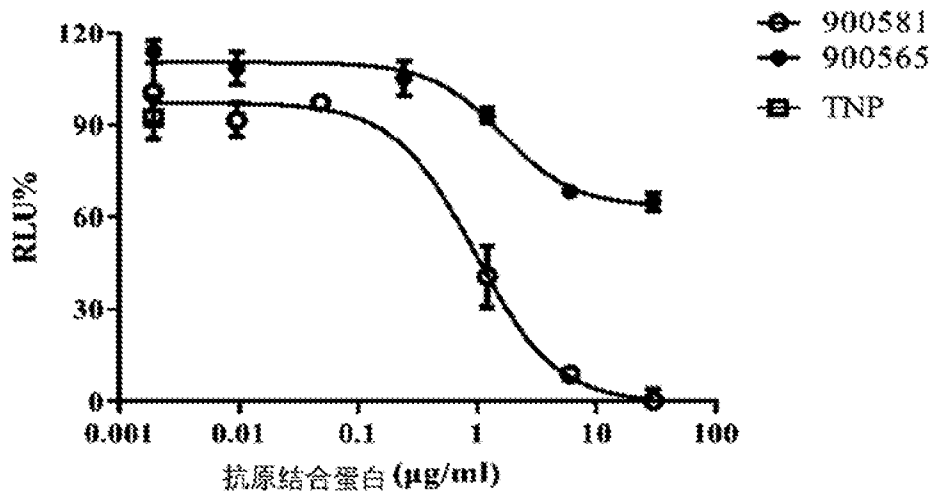

120
90
60
30
0
RLU%
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗原结合蛋白 (μg/ml)
900581
900565
TNP

图 4

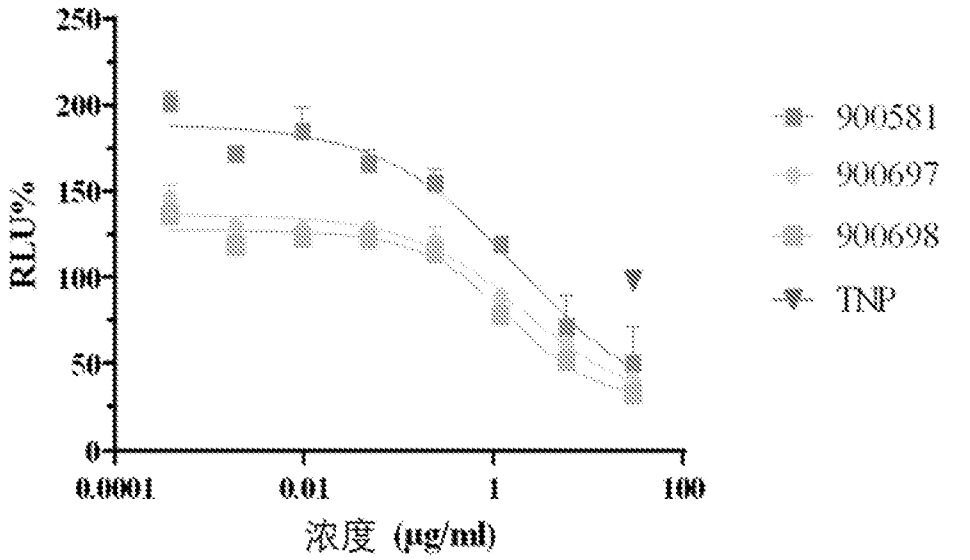

250
200
150
100
50
0
RLU%
0.0001
0.01
1
100
浓度 (μg/ml)
900581
900697
900698
TNP

图 5

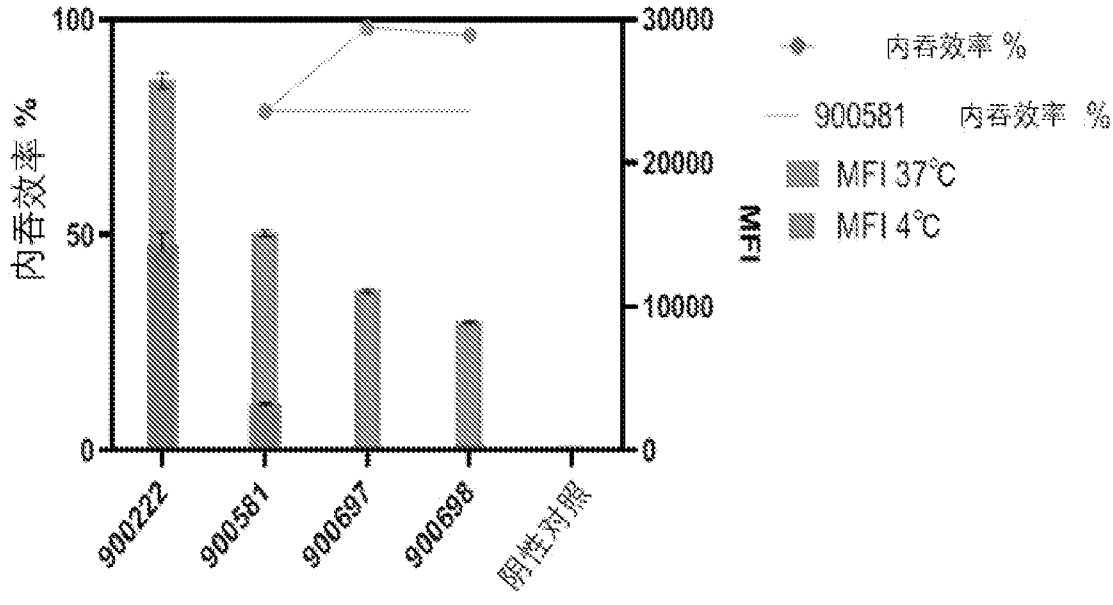

100
50
0
内吞效率 %
30000
20000
10000
0
MFI
900222
900581
900697
900698
阴性对照
内吞效率 %
900581 内吞效率 %
MFI 37℃
MFI 4℃

图 6

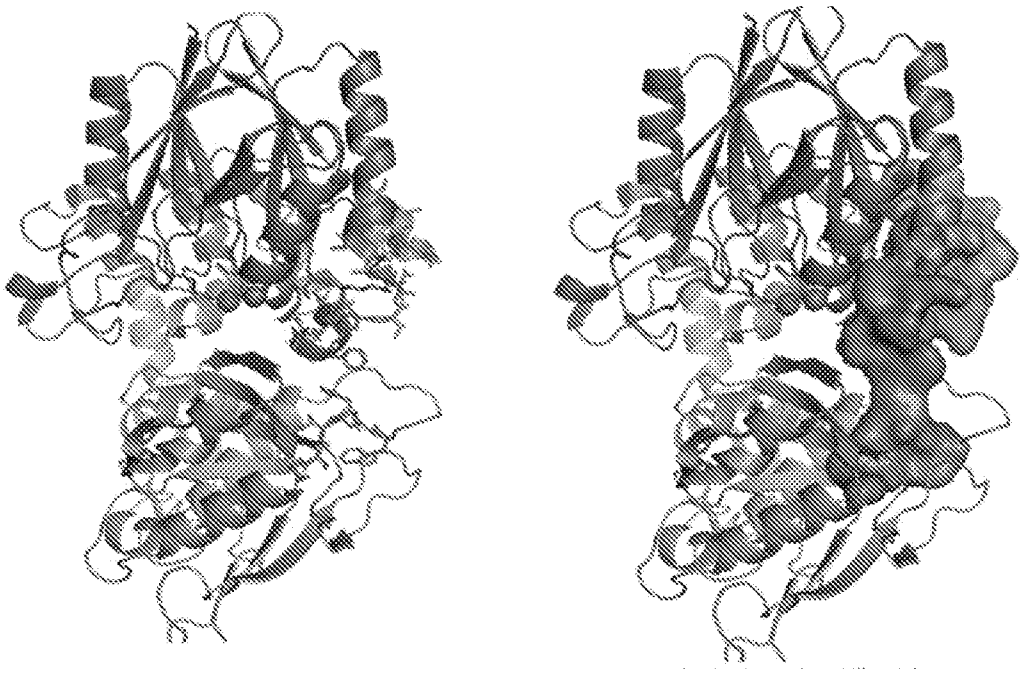


图 7

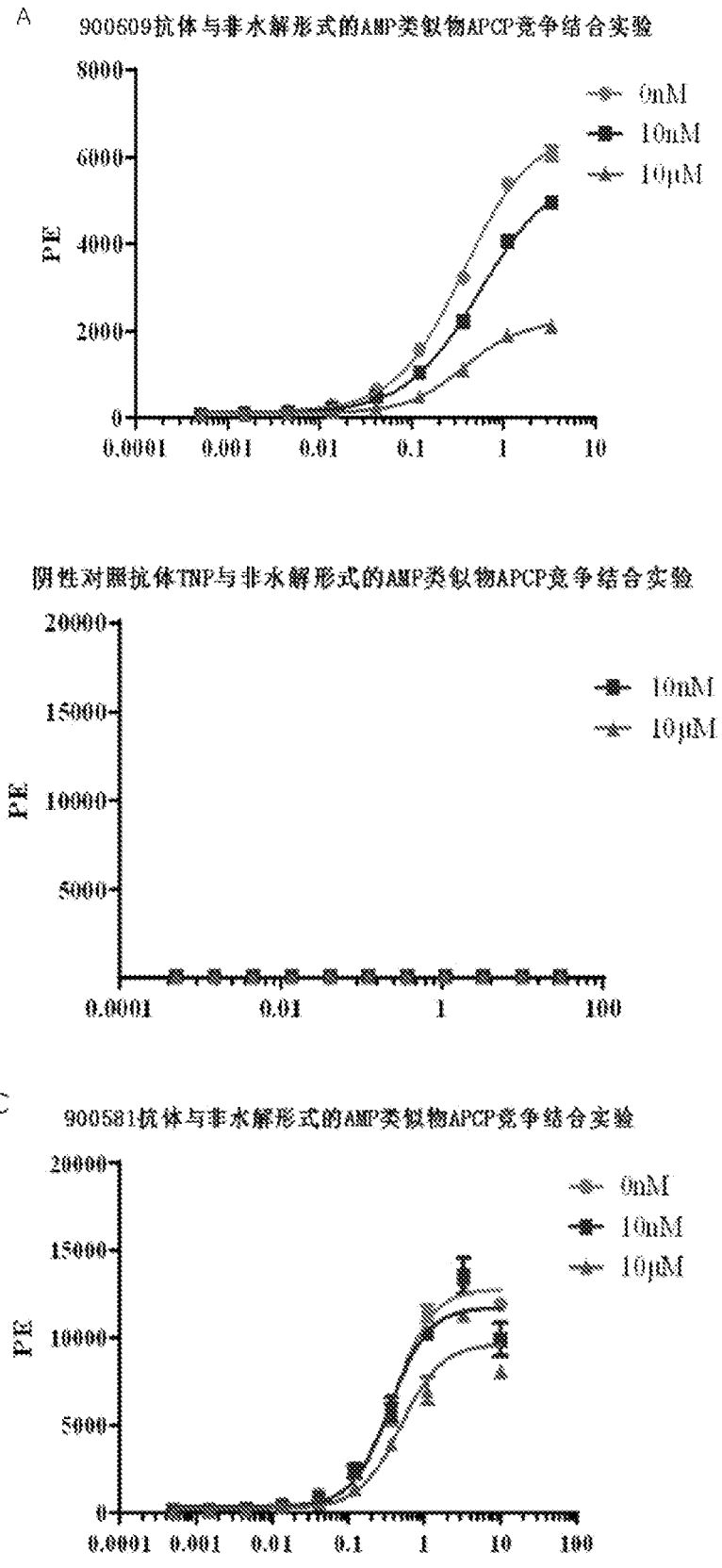

A
900609抗体与非水解形式的AMP类似物APCP竞争结合实验
PE
8000
6000
4000
2000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
0mM
10mM
10μM
B
阴性对照抗体TNP与非水解形式的AMP类似物APCP竞争结合实验
PE
20000
15000
10000
5000
0.0001
0.01
1
100
10mM
10μM
C
900581抗体与非水解形式的AMP类似物APCP竞争结合实验
PE
20000
15000
10000
5000
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
0mM
10mM
10μM

图 8

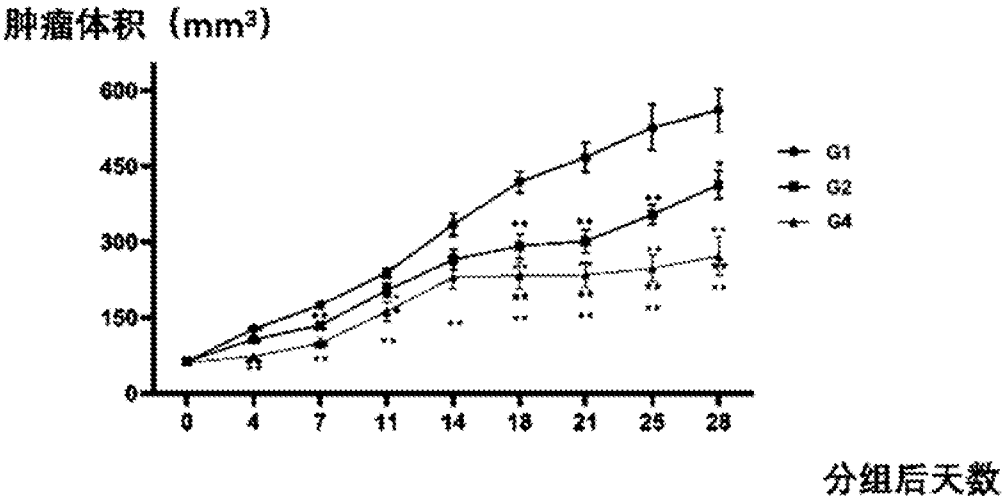

肿瘤体积（mm³）
600
450
300
150
0
0
4
7
11
14
18
21
25
28
G1
G2
G4
分组后天数

图 9

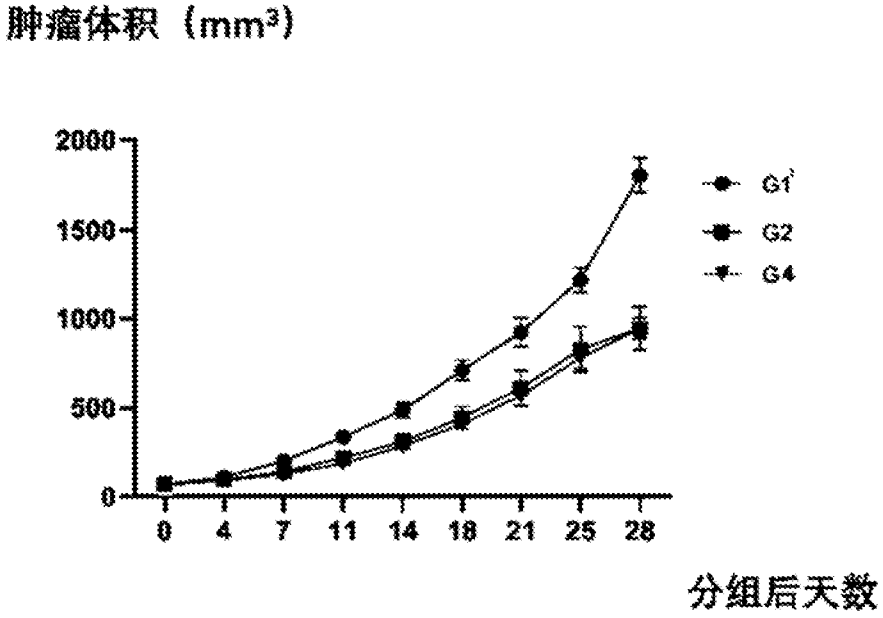

肿瘤体积（mm³）
2000
1500
1000
500
0
0
4
7
11
14
18
21
25
28
G1
G2
G4
分组后天数

图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/136950

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/40(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 45/06(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/573(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61P; A61K; G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, KRTXT, VEN, CNKI, 百度学术, pubmed, ISI web of science, STN, China Builogical Sequence Search System: 华奥泰生物, 徐锦根, CD73, SEQ ID NO: 1-6, 3A9, 900694, 900695, 900696, 900698, 900581, 900697, antibody+, cdr, NT5E, ecto-5'-nucleotidase, 5'-NT, 外5'-核苷酸酶, 抗体, 单抗, mab, 人源化, humaniz+, HCDR, LCDR, CDR,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 107001474 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO.) 01 August 2017 (2017-08-01) description paragraphs 6-15, 39, 153-155, 578, 584, 608-612, 624, 649, 683 and table 35	1-50
A	WO 2017100670 A1 (CORVUS PHARMACEUTICALS INC. et al.) 15 June 2017 (2017-06-15) entire document	1-50
A	WO 2018137598 A1 (I-MAB) 02 August 2018 (2018-08-02) entire document	1-50
A	WO 2020098599 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 22 May 2020 (2020-05-22) entire document	1-50
A	WO 2020143710 A1 (CHENGDU CONMED BIOSCIENCES CO., LTD.) 16 July 2020 (2020-07-16) entire document	1-50

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 February 2022	**01 March 2022**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/136950

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2018013611 A1 (CORVUS PHARMACEUTICALS, INC.) 18 January 2018 (2018-01-18) entire document	1-50
A	WO 2020097127 A2 (CORVUS PHARMACEUTICALS, INC.) 14 May 2020 (2020-05-14) entire document	1-50
A	WO 2017064043 A1 (INNATE PHARMA et al.) 20 April 2017 (2017-04-20) entire document	1-50
A	WO 2018215535 A1 (HELMHOLTZ ZENTRUM MUENCHEN - DEUTSCHES FORSCHUNGSZENTRUM FUR GESUNDHEIT UND UMWELT GMBH) 29 November 2018 (2018-11-29) entire document	1-50
A	WO 2020143836 A1 (SHANGHAI PHARMAEXPLORER CO., LTD.) 16 July 2020 (2020-07-16) entire document	1-50
A	WO 2016081748 A2 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 26 May 2016 (2016-05-26) entire document	1-50
A	WO 2016075099 A1 (MEDIMMUNE LIMITED) 19 May 2016 (2016-05-19) entire document	1-50
A	JIN, R. et al. "Dual Mechanisms of Novel CD73-Targeted Antibody and Antibody–Drug Conjugate in Inhibiting Lung Tumor Growth and Promoting Antitumor Immune-Effector Function" *MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS,* Vol. 19, No. 11, 17 September 2020 (2020-09-17), 2340-2352	1-50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2021/136950

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/136950

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 107001474 A	01 August 2017	CL 2018001414 A1	24 August 2018
		AR 102698 A1	15 March 2017
		IL 252353 D0	31 July 2017
		IL 252353 A	30 June 2021
		TW 202124451 A	01 July 2021
		EP 3725808 A1	21 October 2020
		US 2019062456 A1	28 February 2019
		US 2017253665 A1	07 September 2017
		US 10167343 B2	01 January 2019
		EA 201790986 A1	31 October 2017
		EA 035766 B1	07 August 2020
		ME 03806 B	20 April 2021
		EP 3221363 A2	27 September 2017
		EP 3221363 B1	06 May 2020
		HK 1244817 A1	17 August 2018
		ES 2807182 T3	22 February 2021
		SG CN 10201913004 U A	30 March 2020
		KR 20170080699 A	10 July 2017
		JP 2017537620 A	21 December 2017
		JP 6805142 B2	23 December 2020
		HU E050596 T2	28 December 2020
		SG 11201703192 S A	30 May 2017
		AU 2021215286 A1	09 September 2021
		CL 2017001296 A1	16 February 2018
		UY 36404 A	01 June 2016
		IL 283965 D0	29 July 2021
		LT 3221363 T	10 August 2020
		PT 3221363 T	23 July 2020
		BR 112017010110 A2	30 January 2018
		CA 2968357 A1	26 May 2016
		SI 3221363 T1	30 September 2020
		TN 2017000203 A1	19 October 2018
		WO 2016081748 A2	26 May 2016
		WO 2016081748 A3	15 September 2016
		TW 201625693 A	16 July 2016
		TW I711630 B	01 December 2020
		JP 2021061837 A	22 April 2021
		RS 60631 B1	30 September 2020
		MA 40309 A1	31 January 2018
		US 2016145350 A1	26 May 2016
		US 9605080 B2	28 March 2017
		HR P20201176 T1	13 November 2020
		US 2018127513 A1	10 May 2018
		US 10100129 B2	16 October 2018
		MX 2017006624 A	21 August 2017
		EA 202090956 A2	30 September 2020
		EA 202090956 A3	30 December 2020
		PH 12017500918 A1	20 November 2017
		CO 2017005845 A2	11 September 2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/136950

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2017100670 A1	15 June 2017	KR 20180134837 A	19 December 2018
		CN 109154611 A	04 January 2019
		EA 201891366 A1	28 December 2018
		CA 3007646 A1	15 June 2017
		IL 259927 D0	31 July 2018
		CL 2018001512 A1	08 March 2019
		AU 2016366548 A1	28 June 2018
		US 2021253727 A1	19 August 2021
		EP 3387442 A1	17 October 2018
		EP 3387442 A4	08 May 2019
		MX 2018006973 A	16 May 2019
		JP 2019503709 A	14 February 2019
		ZA 201803874 B	25 November 2020
		US 2019077873 A1	14 March 2019
		US 10822426 B2	03 November 2020
WO 2018137598 A1	02 August 2018	PE 20191208 A1	10 September 2019
		EA 201991099 A1	23 March 2020
		BR 112019012040 A2	12 November 2019
		CL 2019001756 A1	27 September 2019
		IL 267942 D0	26 September 2019
		KR 20180093088 A	20 August 2018
		KR 20190105122 A	11 September 2019
		KR 102156199 B1	17 September 2020
		CO 2019006657 A2	28 June 2019
		JP 2020515508 A	28 May 2020
		MX 2019008758 A	11 September 2019
		CA 3045376 A1	02 August 2018
		KR 20200108915 A	21 September 2020
		EP 3383916 A1	10 October 2018
		EP 3383916 A4	11 September 2019
		AU 2018213549 A1	06 June 2019
		CN 109476755 A	15 March 2019
		US 2019256598 A1	22 August 2019
		US 10584169 B2	10 March 2020
		PH 12019550087 A1	01 June 2020
		US 2020332005 A1	22 October 2020
WO 2020098599 A1	22 May 2020	AU 2019381219 A1	27 May 2021
		CA 3118775 A1	22 May 2020
		EP 3882268 A1	22 September 2021
		CN 112513089 A	16 March 2021
		TW 202017945 A	16 May 2020
		KR 20210093255 A	27 July 2021
WO 2020143710 A1	16 July 2020	CN 111499747 A	07 August 2020
		EP 3901175 A1	27 October 2021
WO 2018013611 A1	18 January 2018	EP 3481869 A1	15 May 2019
		EP 3481869 A4	26 February 2020
		US 2018009899 A1	11 January 2018
		US 10793636 B2	06 October 2020
		US 2021221905 A1	22 July 2021

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/136950

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2020097127 A2	14 May 2020	KR 20210100099 A	13 August 2021
		CA 3118706 A1	14 May 2020
		WO 2020097127 A3	18 June 2020
		AU 2019377454 A1	27 May 2021
		IL 282852 D0	30 June 2021
		EP 3880710 A2	22 September 2021
WO 2017064043 A1	20 April 2017	US 2019225703 A1	25 July 2019
		US 11130817 B2	28 September 2021
		EP 3362475 A1	22 August 2018
WO 2018215535 A1	29 November 2018	US 2020148781 A1	14 May 2020
		EP 3630830 A1	08 April 2020
		CA 3063344 A1	29 November 2018
		CN 110753703 A	04 February 2020
WO 2020143836 A1	16 July 2020	CN 111434688 A	21 July 2020
		EP 3909982 A1	17 November 2021
		CN 113316591 A	27 August 2021
WO 2016081748 A2	26 May 2016	CL 2018001414 A1	24 August 2018
		AR 102698 A1	15 March 2017
		IL 252353 D0	31 July 2017
		IL 252353 A	30 June 2021
		TW 202124451 A	01 July 2021
		EP 3725808 A1	21 October 2020
		US 2019062456 A1	28 February 2019
		US 2017253665 A1	07 September 2017
		US 10167343 B2	01 January 2019
		EA 201790986 A1	31 October 2017
		EA 035766 B1	07 August 2020
		ME 03806 B	20 April 2021
		EP 3221363 A2	27 September 2017
		EP 3221363 B1	06 May 2020
		HK 1244817 A1	17 August 2018
		ES 2807182 T3	22 February 2021
		SG CN 10201913004 U A	30 March 2020
		KR 20170080699 A	10 July 2017
		JP 2017537620 A	21 December 2017
		JP 6805142 B2	23 December 2020
		HU E050596 T2	28 December 2020
		SG 11201703192 S A	30 May 2017
		AU 2021215286 A1	09 September 2021
		CL 2017001296 A1	16 February 2018
		UY 36404 A	01 June 2016
		IL 283965 D0	29 July 2021
		LT 3221363 T	10 August 2020
		PT 3221363 T	23 July 2020
		BR 112017010110 A2	30 January 2018
		CA 2968357 A1	26 May 2016
		SI 3221363 T1	30 September 2020
		TN 2017000203 A1	19 October 2018
		WO 2016081748 A3	15 September 2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/136950

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
		TW	201625693	A	16 July 2016
		TW	I711630	B	01 December 2020
		JP	2021061837	A	22 April 2021
		RS	60631	B1	30 September 2020
		MA	40309	A1	31 January 2018
		CN	107001474	A	01 August 2017
		US	2016145350	A1	26 May 2016
		US	9605080	B2	28 March 2017
		HR	P20201176	T1	13 November 2020
		US	2018127513	A1	10 May 2018
		US	10100129	B2	16 October 2018
		MX	2017006624	A	21 August 2017
		EA	202090956	A2	30 September 2020
		EA	202090956	A3	30 December 2020
		PH	12017500918	A1	20 November 2017
		CO	2017005845	A2	11 September 2017
WO 2016075099 A1	19 May 2016	ES	2877080	T3	16 November 2021
		US	2018194858	A1	12 July 2018
		US	10287362	B2	14 May 2019
		JP	2020195394	A	10 December 2020
		IL	251891	D0	29 June 2017
		IL	251891	A	25 March 2021
		SI	3218406	T1	31 August 2021
		HU	E054339	T2	30 August 2021
		CL	2017001154	A1	12 January 2018
		CN	112778418	A	11 May 2021
		PL	3218406	T3	04 October 2021
		DK	3218406	T3	21 June 2021
		US	2019292274	A1	26 September 2019
		US	10556968	B2	11 February 2020
		LT	3218406	T	25 June 2021
		US	2016194407	A1	07 July 2016
		US	9938356	B2	10 April 2018
		MX	2017005976	A	29 June 2017
		PT	3218406	T	17 June 2021
		KR	20170080607	A	10 July 2017
		RU	2017117596	A	17 December 2018
		RU	2017117596	A3	17 June 2019
		RU	2730665	C2	24 August 2020
		BR	112017009398	A2	15 May 2018
		JP	2018501197	A	18 January 2018
		JP	6755866	B2	16 September 2020
		GB	201519761	D0	23 December 2015
		GB	2537445	A	19 October 2016
		AU	2015345202	A1	18 May 2017
		AU	2015345202	B2	13 May 2021
		HR	P20210888	T1	23 July 2021
		RS	62003	B1	30 July 2021
		TW	201632555	A	16 September 2016
		TW	I710576	B	21 November 2020

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/136950

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
		CA	2967118	A1	19 May 2016
		EP	3901176	A4	27 October 2021
		EP	3901176	A1	27 October 2021
		CN	107001472	A	01 August 2017
		SG	11201703332 S	A	30 May 2017
		EP	3218406	A1	20 September 2017
		EP	3218406	B1	24 March 2021
		US	2020079877	A1	12 March 2020
		CL	2020003409	A1	02 July 2021

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/136950

A. 主题的分类

C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/40(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 45/06(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; G01N 33/573(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; C12N; A61P; A61K; G01N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNABS,CNTXT,WOTXT,USTXT,JPTXT,KRTXT,VEN,CNKI，百度学术，pubmed，ISI web of science，STN，中国生物序列检索系统：华奥泰生物,徐锦根,CD73,SEQ ID NO:1-6,3A9, 900694,900695,900696,900698,900581,900697,antibody+,cdr,NT5E,ecto-5'-nucleotidase,5'-NT,外5'-核苷酸酶,抗体,单抗,mab,人源化,humaniz+,HCDR,LCDR,CDR,

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 107001474 A (百时美施贵宝公司) 2017年8月1日 (2017-08-01) 说明书第6-15，39，153-155，578，584，608-612，624，649，683段及表35	1-50
A	WO 2017100670 A1 (CORVUS PHARMACEUTICALS INC.等) 2017年6月15日 (2017-06-15) 全文	1-50
A	WO 2018137598 A1 (I-MAB) 2018年8月2日 (2018-08-02) 全文	1-50
A	WO 2020098599 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.等) 2020年5月22日 (2020-05-22) 全文	1-50
A	WO 2020143710 A1 (CHENGDU CONMED BIOSCIENCES CO., LTD.) 2020年7月16日 (2020-07-16) 全文	1-50

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2022年2月15日	2022年3月1日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 孙谦 电话号码 86-(10)-53962101

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2018013611 A1 (CORVUS PHARMACEUTICALS, INC.) 2018年1月18日 (2018-01-18) 全文	1-50
A	WO 2020097127 A2 (CORVUS PHARMACEUTICALS, INC.) 2020年5月14日 (2020-05-14) 全文	1-50
A	WO 2017064043 A1 (INNATE PHARMA 等) 2017年4月20日 (2017-04-20) 全文	1-50
A	WO 2018215535 A1 (HELMHOLTZ ZENTRUM MUENCHEN - DEUTSCHES FORSCHUNGSZENTRUM FUR GESUNDHEIT UND UMWELT GMBH) 2018年11月29日 (2018-11-29) 全文	1-50
A	WO 2020143836 A1 (SHANGHAI PHARMAEXPLORER CO., LTD.) 2020年7月16日 (2020-07-16) 全文	1-50
A	WO 2016081748 A2 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 2016年5月26日 (2016-05-26) 全文	1-50
A	WO 2016075099 A1 (MEDIMMUNE LIMITED) 2016年5月19日 (2016-05-19) 全文	1-50
A	JIN, R. 等. "Dual Mechanisms of Novel CD73-Targeted Antibody and Antibody-Drug Conjugate in Inhibiting Lung Tumor Growth and Promoting Antitumor Immune-Effector Function" MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, 第19卷，第11期，2020年9月17日 (2020-09-17), 2340-2352	1-50

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2021/136950

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/136950

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	107001474	A	2017年8月1日	CL	2018001414	A1	2018年8月24日
				AR	102698	A1	2017年3月15日
				IL	252353	D0	2017年7月31日
				IL	252353	A	2021年6月30日
				TW	202124451	A	2021年7月1日
				EP	3725808	A1	2020年10月21日
				US	2019062456	A1	2019年2月28日
				US	2017253665	A1	2017年9月7日
				US	10167343	B2	2019年1月1日
				EA	201790986	A1	2017年10月31日
				EA	035766	B1	2020年8月7日
				ME	03806	B	2021年4月20日
				EP	3221363	A2	2017年9月27日
				EP	3221363	B1	2020年5月6日
				HK	1244817	A1	2018年8月17日
				ES	2807182	T3	2021年2月22日
				SG	10201913004U	A	2020年3月30日
				KR	20170080699	A	2017年7月10日
				JP	2017537620	A	2017年12月21日
				JP	6805142	B2	2020年12月23日
				HU	E050596	T2	2020年12月28日
				SG	11201703192S	A	2017年5月30日
				AU	2021215286	A1	2021年9月9日
				CL	2017001296	A1	2018年2月16日
				UY	36404	A	2016年6月1日
				IL	283965	D0	2021年7月29日
				LT	3221363	T	2020年8月10日
				PT	3221363	T	2020年7月23日
				BR	112017010110	A2	2018年1月30日
				CA	2968357	A1	2016年5月26日
				SI	3221363	T1	2020年9月30日
				TN	2017000203	A1	2018年10月19日
				WO	2016081748	A2	2016年5月26日
				WO	2016081748	A3	2016年9月15日
				TW	201625693	A	2016年7月16日
				TW	I711630	B	2020年12月1日
				JP	2021061837	A	2021年4月22日
				RS	60631	B1	2020年9月30日
				MA	40309	A1	2018年1月31日
				US	2016145350	A1	2016年5月26日
				US	9605080	B2	2017年3月28日
				HR	P20201176	T1	2020年11月13日
				US	2018127513	A1	2018年5月10日
				US	10100129	B2	2018年10月16日
				MX	2017006624	A	2017年8月21日
				EA	202090956	A2	2020年9月30日
				EA	202090956	A3	2020年12月30日
				PH	12017500918	A1	2017年11月20日
				CO	2017005845	A2	2017年9月11日
WO	2017100670	A1	2017年6月15日	KR	20180134837	A	2018年12月19日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/136950

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				CN	109154611	A	2019年1月4日
				EA	201891366	A1	2018年12月28日
				CA	3007646	A1	2017年6月15日
				IL	259927	D0	2018年7月31日
				CL	2018001512	A1	2019年3月8日
				AU	2016366548	A1	2018年6月28日
				US	2021253727	A1	2021年8月19日
				EP	3387442	A1	2018年10月17日
				EP	3387442	A4	2019年5月8日
				MX	2018006973	A	2019年5月16日
				JP	2019503709	A	2019年2月14日
				ZA	201803874	B	2020年11月25日
				US	2019077873	A1	2019年3月14日
				US	10822426	B2	2020年11月3日
WO	2018137598	A1	2018年8月2日	PE	20191208	A1	2019年9月10日
				EA	201991099	A1	2020年3月23日
				BR	112019012040	A2	2019年11月12日
				CL	2019001756	A1	2019年9月27日
				IL	267942	D0	2019年9月26日
				KR	20180093088	A	2018年8月20日
				KR	20190105122	A	2019年9月11日
				KR	102156199	B1	2020年9月17日
				CO	2019006657	A2	2019年6月28日
				JP	2020515508	A	2020年5月28日
				MX	2019008758	A	2019年9月11日
				CA	3045376	A1	2018年8月2日
				KR	20200108915	A	2020年9月21日
				EP	3383916	A1	2018年10月10日
				EP	3383916	A4	2019年9月11日
				AU	2018213549	A1	2019年6月6日
				CN	109476755	A	2019年3月15日
				US	2019256598	A1	2019年8月22日
				US	10584169	B2	2020年3月10日
				PH	12019550087	A1	2020年6月1日
				US	2020332005	A1	2020年10月22日
WO	2020098599	A1	2020年5月22日	AU	2019381219	A1	2021年5月27日
				CA	3118775	A1	2020年5月22日
				EP	3882268	A1	2021年9月22日
				CN	112513089	A	2021年3月16日
				TW	202017945	A	2020年5月16日
				KR	20210093255	A	2021年7月27日
WO	2020143710	A1	2020年7月16日	CN	111499747	A	2020年8月7日
				EP	3901175	A1	2021年10月27日
WO	2018013611	A1	2018年1月18日	EP	3481869	A1	2019年5月15日
				EP	3481869	A4	2020年2月26日
				US	2018009899	A1	2018年1月11日
				US	10793636	B2	2020年10月6日
				US	2021221905	A1	2021年7月22日
WO	2020097127	A2	2020年5月14日	KR	20210100099	A	2021年8月13日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/136950

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				CA	3118706	A1	2020年5月14日
				WO	2020097127	A3	2020年6月18日
				AU	2019377454	A1	2021年5月27日
				IL	282852	D0	2021年6月30日
				EP	3880710	A2	2021年9月22日
WO	2017064043	A1	2017年4月20日	US	2019225703	A1	2019年7月25日
				US	11130817	B2	2021年9月28日
				EP	3362475	A1	2018年8月22日
WO	2018215535	A1	2018年11月29日	US	2020148781	A1	2020年5月14日
				EP	3630830	A1	2020年4月8日
				CA	3063344	A1	2018年11月29日
				CN	110753703	A	2020年2月4日
WO	2020143836	A1	2020年7月16日	CN	111434688	A	2020年7月21日
				EP	3909982	A1	2021年11月17日
				CN	113316591	A	2021年8月27日
WO	2016081748	A2	2016年5月26日	CL	2018001414	A1	2018年8月24日
				AR	102698	A1	2017年3月15日
				IL	252353	D0	2017年7月31日
				IL	252353	A	2021年6月30日
				TW	202124451	A	2021年7月1日
				EP	3725808	A1	2020年10月21日
				US	2019062456	A1	2019年2月28日
				US	2017253665	A1	2017年9月7日
				US	10167343	B2	2019年1月1日
				EA	201790986	A1	2017年10月31日
				EA	035766	B1	2020年8月7日
				ME	03806	B	2021年4月20日
				EP	3221363	A2	2017年9月27日
				EP	3221363	B1	2020年5月6日
				HK	1244817	A1	2018年8月17日
				ES	2807182	T3	2021年2月22日
				SG	10201913004U	A	2020年3月30日
				KR	20170080699	A	2017年7月10日
				JP	2017537620	A	2017年12月21日
				JP	6805142	B2	2020年12月23日
				HU	E050596	T2	2020年12月28日
				SG	11201703192S	A	2017年5月30日
				AU	2021215286	A1	2021年9月9日
				CL	2017001296	A1	2018年2月16日
				UY	36404	A	2016年6月1日
				IL	283965	D0	2021年7月29日
				LT	3221363	T	2020年8月10日
				PT	3221363	T	2020年7月23日
				BR	112017010110	A2	2018年1月30日
				CA	2968357	A1	2016年5月26日
				SI	3221363	T1	2020年9月30日
				TN	2017000203	A1	2018年10月19日
				WO	2016081748	A3	2016年9月15日
				TW	201625693	A	2016年7月16日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/136950

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				TW	I711630	B	2020年12月1日
				JP	2021061837	A	2021年4月22日
				RS	60631	B1	2020年9月30日
				MA	40309	A1	2018年1月31日
				CN	107001474	A	2017年8月1日
				US	2016145350	A1	2016年5月26日
				US	9605080	B2	2017年3月28日
				HR	P20201176	T1	2020年11月13日
				US	2018127513	A1	2018年5月10日
				US	10100129	B2	2018年10月16日
				MX	2017006624	A	2017年8月21日
				EA	202090956	A2	2020年9月30日
				EA	202090956	A3	2020年12月30日
				PH	12017500918	A1	2017年11月20日
				CO	2017005845	A2	2017年9月11日
WO	2016075099	A1	2016年5月19日	ES	2877080	T3	2021年11月16日
				US	2018194858	A1	2018年7月12日
				US	10287362	B2	2019年5月14日
				JP	2020195394	A	2020年12月10日
				IL	251891	D0	2017年6月29日
				IL	251891	A	2021年3月25日
				SI	3218406	T1	2021年8月31日
				HU	E054339	T2	2021年8月30日
				CL	2017001154	A1	2018年1月12日
				CN	112778418	A	2021年5月11日
				PL	3218406	T3	2021年10月4日
				DK	3218406	T3	2021年6月21日
				US	2019292274	A1	2019年9月26日
				US	10556968	B2	2020年2月11日
				LT	3218406	T	2021年6月25日
				US	2016194407	A1	2016年7月7日
				US	9938356	B2	2018年4月10日
				MX	2017005976	A	2017年6月29日
				PT	3218406	T	2021年6月17日
				KR	20170080607	A	2017年7月10日
				RU	2017117596	A	2018年12月17日
				RU	2017117596	A3	2019年6月17日
				RU	2730665	C2	2020年8月24日
				BR	112017009398	A2	2018年5月15日
				JP	2018501197	A	2018年1月18日
				JP	6755866	B2	2020年9月16日
				GB	201519761	D0	2015年12月23日
				GB	2537445	A	2016年10月19日
				AU	2015345202	A1	2017年5月18日
				AU	2015345202	B2	2021年5月13日
				HR	P20210888	T1	2021年7月23日
				RS	62003	B1	2021年7月30日
				TW	201632555	A	2016年9月16日
				TW	I710576	B	2020年11月21日
				CA	2967118	A1	2016年5月19日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/136950

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
		EP	3901176	A4	2021年10月27日
		EP	3901176	A1	2021年10月27日
		CN	107001472	A	2017年8月1日
		SG	11201703332S	A	2017年5月30日
		EP	3218406	A1	2017年9月20日
		EP	3218406	B1	2021年3月24日
		US	2020079877	A1	2020年3月12日
		CL	2020003409	A1	2021年7月2日