

(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
2023 年 12 月 28 日 (28.12.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/246325 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/28 (2006.01) *C12N 15/85* (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01) *A61K 47/68* (2017.01)
C07K 19/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) *A61P 35/04* (2006.01)

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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SC, 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, ME, 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)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/092108

(22) 国际申请日: 2023 年 5 月 4 日 (04.05.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202210714822.0 2022年6月22日 (22.06.2022) CN

本国际公布:

(71) 申请人: 复旦大学 (FUDAN UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号,
Shanghai 200433 (CN)。

— 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))。

(72) 发明人: 余科 (YU, Ke); 中国上海市杨浦区邯郸路
220 号, Shanghai 200433 (CN)。 刘亮 (LIU, Liang);
中国上海市杨浦区邯郸路220号, Shanghai 200433
(CN)。 孟韬 (MENG, Tao); 中国上海市杨浦区邯
郸路220号, Shanghai 200433 (CN)。

(74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司
(XU & PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀
区真北路 958 号天地科技广场 1 号楼 106
室, Shanghai 200333 (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,
CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ,
IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ,
LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN,
MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,
PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: NANOBODY TARGETING CD73, NANOBODY-DRUG CONJUGATE, PREPARATION METHOD THEREFOR AND
USE THEREOF

(54) 发明名称: 靶向CD73的纳米抗体及纳米抗体-药物偶联物、其制备方法和用途

(57) Abstract: Disclosed are a nanobody (Nb) targeting CD73, a nanobody-drug conjugate (NDC), a preparation method therefor and
use thereof. The monoclonal nanobody and the corresponding NDC of the present invention can efficiently and specifically bind to
purified CD73 proteins, various tumor cells and CD73 on surfaces of immune cells and block the catalytic activity of a CD73 enzyme,
has very high affinity and very low immunogenicity, and has a remarkable anti-tumor effect.

(57) 摘要: 本发明公开了一种新的靶向CD73的纳米抗体(nanobody,Nb)及纳米抗体-药物偶联物(nanobody-drug
conjugate,NDC)、其制备方法和用途。本发明的单克隆纳米抗体以及相应的NDC能够高效、高特异
性地结合纯化的CD73蛋白、多种肿瘤细胞以及免疫细胞表面的CD73, 阻断CD73酶的催化活性,
其具有很高的亲和力及很低的免疫原性, 并且具有显著抗肿瘤作用。



WO 2023/246325 A1

靶向CD73的纳米抗体及纳米抗体-药物偶联物、其制备方法和用途

技术领域

- 5 本发明涉及医药领域，尤其涉及靶向CD73的纳米抗体(CD73-Nb)及CD73纳米抗体-药物偶联物(Nanobody-drug conjugate, CD73-NDC)、其制备方法和用途。

背景技术

- 10 近年来，针对肿瘤的治疗已经取得了显著进展，其中靶向治疗和免疫疗法为肿瘤治疗提供了新的思路，然而患者对药物的低响应率和快速耐药使得肿瘤的治疗依然面临大的挑战，因此寻找新的治疗靶点和药物成为治疗难治型肿瘤的方向。近期研究表明，肿瘤进展和耐药的发生往往与肿瘤的转移、复发和免疫抑制性的微环境有关，而CD73是与之密切相关的分子机制之一。

- 15 CD73异常表达于多种肿瘤，包括肺癌，乳腺癌，黑色素瘤和脑胶质瘤等，与肿瘤的转移、复发、耐药和免疫抑制密切相关。CD73是锚定于细胞膜表面的5'-核苷酸酶，是通过酶促反应将一磷酸腺苷脱磷酸(AMP)生成腺苷(ADO)的主要限速酶。腺苷通过结合相应的腺苷受体(A1AR、A2AR、A2BR、A3AR)参与体内多种生理和病理进程，包括形成免疫抑制性的微环境，如抑制T淋巴细胞的增殖和功能，抑制树突状细胞(dendritic cells, DC)的分化和成熟，影响巨噬细胞的极化，促进免疫抑制细胞如骨髓来源的抑制性细胞(Myeloid-derived suppressor cells, MDSC)释放抗炎细胞因子，如TGFβ、IL-10等。耐药是影响肿瘤治疗效果的极大障碍，研究表明CD73参与了肿瘤化疗药物、小分子靶向药物以及免疫检查点抑制剂的耐药。此外，CD73还参与了肿瘤的上皮间质转化、血管新生、转移和复发等进程。因此，通过靶向CD73，通过单药或联合用药，可为肿瘤治疗提供全新的策略。

- 25 单克隆抗体药物已经为癌症治疗带来了诸多改善，然而，传统单抗的分子量为150 kd，使其实体瘤的穿透性和药物分布受限，治疗效果还有待进一步提高。纳米抗体(Nb)是羊驼自然产生的仅由重链组成的抗体，其中，目标识别模块由单个可变区(VHH)组成，分子量仅为12-14 kd，有望克服传统单抗实体瘤穿透性低的缺陷。纳米抗体可与Fc等功能结构域、其他纳米体、或多肽标签或毒素进行连接。由于其体积小，具有更高的扩散率，血管通透性以及肿瘤穿透力等特点，比传统的单克隆抗体具有更均匀的组织分布。这些特性使它们特别适合于体内特定和有效的肿瘤靶向治疗。并且纳米抗体还具有免疫原性低、稳定性高、降解抗性高、原核生物表达生产成本低、产品表征容易等优势。不过，尽管众多潜在优势，基于纳米抗体的肿瘤治疗药物开发迄今尚处于早期探索研究阶段。

- 35 抗体-药物偶联物(Antibody-drug conjugate, ADC)，是利用单克隆抗体特异性识别肿瘤细胞表面特定抗原的特点，从而实现精准地将抗肿瘤药物(如小分子化疗药物等)递送到肿瘤靶细胞并释放，达到精准杀伤肿瘤的目的。ADC目前已用于靶向给药至肿瘤组织，但由于其分子量大，瘤内穿透力较弱等限制，导致在肿瘤内给药效果差异大，实体瘤应用不理想。并且ADC在体内的终末半衰期长，这可导致荷载毒素对正常组织或细胞产生不必要的毒性。而通过纳米抗体制备的纳米抗体-药物偶联物(nanobody-drug conjugate, NDC)不仅保留了传统ADC的优点，还具有血管通透性高、肿瘤穿透力强、到达靶细胞速度快，可以提高药物在肿瘤的累积，同时还可适度控制药物的血浆暴露量及半衰期，有助于进一步提高对实体瘤治疗效果和整体治疗窗，有望成为最具潜力的一类全新的抗肿瘤药物。

综上所述，基于CD73在肿瘤发展和复发耐药等机制中的重要作用，开发靶向CD73-Nb及CD73-NDC药物能够为临床上单独或联合治疗CD73异常表达的肿瘤患者提供新的治疗策略。

5 发明内容

本发明的目的在于提供一种靶向CD73的纳米抗体及纳米抗体-药物偶联物、其制备方法和用途。

10 在本发明的第一方面，提供了一种靶向 CD73 的纳米抗体，所述纳米抗体的 VHH 链的互补决定区 CDR 为选自下组的一种或多种：

(1) SEQ ID NO.1所示的CDR1，
SEQ ID NO.2所示的CDR2，和
SEQ ID NO.3所示的CDR3；

或者，

15 (2) SEQ ID NO.5所示的CDR1，
SEQ ID NO.6所示的CDR2，和
SEQ ID NO.7所示的CDR3；

或者，

20 (3) SEQ ID NO.9所示的CDR1，
SEQ ID NO.10所示的CDR2，和
SEQ ID NO.11所示的CDR3，

或者，

25 (4) SEQ ID NO.13所示的CDR1，
SEQ ID NO.14所示的CDR2，和
SEQ ID NO.15所示的CDR3，

或者，

30 (5) SEQ ID NO.17所示的CDR1，
SEQ ID NO.18所示的CDR2，和
SEQ ID NO.19所示的CDR3，

或者，

(6) SEQ ID NO.21所示的CDR1，
SEQ ID NO.22所示的CDR2，和
SEQ ID NO.23所示的CDR3，

或者，

35 (7) SEQ ID NO.25所示的CDR1，
SEQ ID NO.26所示的CDR2，和
SEQ ID NO.27所示的CDR3，

或者，

40 (8) SEQ ID NO.29所示的CDR1，
SEQ ID NO.30所示的CDR2，和
SEQ ID NO.31所示的CDR3，

或者，

(9) SEQ ID NO.33所示的CDR1，
SEQ ID NO.34所示的CDR2，和

SEQ ID NO.35所示的CDR3。

在另一优选例中，上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的，并能够保留CD73结合亲和力的衍生序列。

- 5 在另一优选例中，所述的纳米抗体VHH链的CDR区包含与SEQ ID NO:1-36中任一具有至少80%、优选地至少90%、更优选地至少95%、甚至更优选地至少99%的序列相似性的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述的纳米抗体VHH链CDR区的氨基酸序列与SEQ ID NO:1-36中任一相比包含一个或多个氨基酸取代，优选保守氨基酸取代。

- 10 在另一优选例中，所述 VHH 链包含选自以下组合的 CDR1、CDR2 和 CDR3：

(1)SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3 所示的互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3(对应纳米抗体 3-D7 的 CDR)；或

(2)SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7 所示的互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3(对应纳米抗体 5-E11 的 CDR)；或

- 15 (3)SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.10、SEQ ID NO.11 所示的互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3(对应纳米抗体 4-D04 的 CDR)；或

(4)SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.14、SEQ ID NO.15 所示的互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3(对应纳米抗体 4-B02 的 CDR)；或

- 20 (5)SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.18、SEQ ID NO.19 所示的互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3(对应纳米抗体 1-E7 的 CDR)；或

(6)SEQ ID NO.21、SEQ ID NO.22、SEQ ID NO.23 所示的互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3(对应纳米抗体 2-B10 的 CDR)；或

(7)SEQ ID NO.25、SEQ ID NO.26、SEQ ID NO.27 所示的互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3(对应纳米抗体 2-G9 的 CDR)；或

- 25 (8)SEQ ID NO.29、SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.31 所示的互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3(对应纳米抗体 3-A3 的 CDR)；或

(9)SEQ ID NO.33、SEQ ID NO.34、SEQ ID NO.35 所示的互补决定区 CDR1、CDR2、CDR3(对应纳米抗体 3-F1 的 CDR)。

- 30 在另一优选例中，所述的 CDR1、CDR2 和 CDR3 由 VHH 链的框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 所隔开。

在另一优选例中，所述纳米抗体的VHH链还包括框架区(FR)。

在另一优选例中，所述的框架区FR为人源、鼠源、兔源或骆驼源。

在另一优选例中，所述的框架区FR包括人源的FR区、鼠源或骆驼源的FR区。

- 35 在另一优选例中，所述靶向CD73的纳米抗体的VHH链具有如SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.16、SEQ ID NO.20、SEQ ID NO.24、SEQ ID NO.28、SEQ ID NO.32或SEQ ID NO.36所示的氨基酸序列。

- 40 在本发明的第二方面，提供了一种靶向CD73的抗体，所述抗体包括一个或多个如本发明第一方面所述的靶向CD73的纳米抗体的VHH链。

在另一优选例中，所述靶向CD73的纳米抗体的VHH链具有如SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.16、SEQ ID NO.20、SEQ ID NO.24、SEQ ID NO.28、SEQ ID NO.32或SEQ ID NO.36所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述抗体为单体、二价抗体、和/或多价抗体。

在另一优选例中，所述抗体为动物源抗体、人源化抗体、嵌合抗体或嵌合抗原受体抗体（CAR）。

在另一优选例中，所述人源化抗体的CDR区包含1、2、或3个氨基酸的变化。

5 在另一优选例中，所述的动物为非人哺乳动物，较佳地为鼠、羊、兔、骆驼。

在另一优选例中，所述的抗体为双链抗体、或单链抗体。

在另一优选例中，所述的抗体为单克隆抗体。

在另一优选例中，所述的抗体是部分或全人源化的单克隆抗体。

10 在另一优选例中，所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量，不超过初始氨基酸序列总氨基酸数量的40%，较佳地为20%，更佳地为10%。

在另一优选例中，所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量为1-7个，较佳地为1-3个，更佳地为1个。

在另一优选例中，所述经过添加、缺失、修饰和/或取代的至少一个氨基酸序列为同源性为至少80%的氨基酸序列。

15 在另一优选例中，所述经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的衍生序列具有抑制细胞表面CD73或重组CD73蛋白酶催化功能。

在另一优选例中，所述的抗体为药物偶联物形式。

20 在另一优选例中，所述纳米抗体对人CD73蛋白胞外区(CD73-ECD) ELISA结合亲和力EC₅₀为0.014~0.07μg/mL (0.175~0.875nM)，或者经ForteBio表面等离子体共振（SPR）测定的结合常数KD值为0.795~1.997nM。

在另一优选例中，所述抗体具有选自下组的一个或多个特性：

- 25 (a) 抑制CD73催化腺苷一磷酸（AMP）水解生成腺苷的活性；
(b) 特异结合肿瘤细胞，和/或肿瘤微环境中的免疫/基质细胞的CD73；
(c) 抑制肿瘤/肿瘤微环境CD73催化AMP水解的活性；
(d) 抑制肿瘤细胞迁移或转移；
(e) 抑制肿瘤生长，提高联合用药的抗肿瘤疗效；
(f) 促进免疫细胞的增殖存活及功能，从而提高肿瘤免疫的效果；
(g) 结合肿瘤细胞后被内吞至细胞内溶酶体。

30 在本发明的第三方面，提供了一种多特异性抗体，所述的多特异性抗体包含：本发明第一方面所述的靶向CD73的纳米抗体或本发明第二方面所述的靶向CD73的抗体。

35 在另一优选例中，多特异性抗体还包括靶向选自下组的靶点的第二抗原结合区：EGFR、TGFβ、BCMA、B7H6、GUCY2C、DLL3、CD38、CD123、CD19、CD20、CD22、B7-H3、GPC3、HER2、PMSA、CD28、4-1BB、OX40、CD40、CD27、CD3、CTLA4、PD1、PDL1、BCMA、GLP-1、Trop2、TIGIT、LAG-3、FGL1、TLR7，或其组合。

在另一优选例中，所述的第二抗原结合区为纳米抗体。

在另一优选例中，所述多特异性抗体包括一个或多个第二抗原结合区。

在另一优选例中，所述多特异性抗体还包含抗体的Fc段。

40 在另一优选例中，所述抗原结合区为抗体或抗体片段，所述抗体片段包括：(i) Fab片段；(ii) F(ab')₂片段；(iii) Fd片段；(iv) Fv片段；(v) 单链Fv(scFv)分子；(vi) dAb片段。

本发明的第四方面，提供了一种重组蛋白，所述的重组蛋白具有：

(i) 如本发明第一方面所述的靶向CD73的纳米抗体、或如本发明第二方面所述的抗

CD73抗体；以及

(ii) 任选的具有治疗功能的多肽分子或片段；和/或

(iii) 任选的提升蛋白理化性质或成药性的功能域。

在另一优选例中，所述提升蛋白理化性质或成药性包括延长靶向CD73的纳米抗体的半衰期。

在另一优选例中，所述重组蛋白还包括：(iv) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

在另一优选例中，所述的标签序列选自下组：6His标签、GGGS序列、FLAG标签。

在另一优选例中，所述的重组蛋白为单体、二聚体、或多聚体。

在另一优选例中，所述具有治疗功能的多肽分子或片段包括但不限于：靶向EGFR、TGFβ、BCMA、B7H6、GUCY2C、DLL3、CD38、CD123、CD19、CD20、CD22、B7-H3、GPC3、HER2、PMSA、CD28、4-1BB、OX40、CD40、CD27、CD3、CTLA4、PD1、PDL1、BCMA、GLP-1、Trop2、TIGIT、LAG-3、FGL1、TLR7的多肽分子或片段。

在另一优选例中，所述具有治疗功能的多肽分子或片段包括但不限于：胰岛素、IL-2、干扰素、降钙素、GHRH肽、肠肽类似物、白蛋白、抗体片段、细胞因子。

在另一优选例中，所述的重组蛋白(或多肽)包括融合蛋白。

在另一优选例中，所述的融合蛋白包括多特异性抗体、嵌合抗体。

在另一优选例中，所述提升蛋白理化性质或成药性的功能域包括Fc段、抗白蛋白纳米抗体(HLE)、白蛋白结合域(ABD)。

在另一优选例中，所述的融合蛋白从N-C端具有如下元件：

A-B；

其中，A元件为靶向CD73的纳米抗体；B元件为Fc段或白蛋白；

“-”代表肽键。

在另一优选例中，所述靶向CD73的纳米抗体的VHH链选自下组：SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.16、SEQ ID NO.20、SEQ ID NO.24、SEQ ID NO.28、SEQ ID NO.32或SEQ ID NO.36所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述Fc段为人IgG Fc段。

在另一优选例中，所述Fc段的氨基酸序列选自下组：SEQ ID NO.37、SEQ ID NO.38、SEQ ID NO.39、SEQ ID NO.40、SEQ ID NO.41、SEQ ID NO.42所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述的融合蛋白选自下组：3-D7、5-E11、4-D04、4-B02、1-E7、2-B10、2-G9、3-A3、3-F1、3-D7-FC1、3-D7-FC2、3-D7-FC3、5-E11-FC1、5-E11-FC2、5-E11-FC3、3-D7-HLE、3-D7-ABD、5-E11-ABD。

本发明的第五方面，提供了一种CAR构建物，所述的CAR构建物的抗原结合区域为如本发明第一方面所述的纳米抗体的VHH链。

本发明的第六方面，提供了一种重组的免疫细胞，所述的免疫细胞表达外源的如本发明的第五方面所述的CAR构建物。

在另一优选例中，所述的免疫细胞选自下组：NK细胞、T细胞。

在另一优选例中，所述的免疫细胞来自人或非人哺乳动物(如鼠)。

本发明的第七方面，提供了一种免疫偶联物，所述的免疫偶联物含有：

(a) 抗体部分，所述抗体部分为本发明第一方面所述的靶向CD73的纳米抗体或本发明第二方面所述的靶向CD73的抗体；和

(b) 与所述纳米抗体部分偶联的偶联部分, 所述偶联部分选自下组: 可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、酶、蛋白降解剂、寡核苷酸或其组合。

在另一优选例中, 所述免疫偶联物为纳米抗体药物偶联物。

5 在另一优选例中, 所述的纳米抗体部分与所述的偶联部分通过化学键或接头进行偶联。

在另一优选例中, 所述的偶联部分为化学标记和生物标记。

在另一优选例中, 所述化学标记为同位素、免疫毒素和/或化学药物。

在另一优选例中, 所述生物标记为生物素、亲和素或酶标记。

在另一优选例中, 所述偶联部分为药物或毒素。

10 在另一优选例中, 所述的药物为细胞毒性药物。

在另一优选例中, 所述的细胞毒性药物选自下组: 抗微管蛋白药物、DNA 小沟结合试剂、DNA 复制抑制剂、烷化试剂、抗生素、叶酸拮抗物、抗代谢药物、化疗增敏剂、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱、或其组合。

15 特别有用的细胞毒性药物类的例子包括, 例如, DNA 小沟结合试剂、DNA 烷基化试剂、和微管蛋白抑制剂、典型的细胞毒性药物包括、例如奥瑞他汀(auristatins)、喜树碱(camptothecins)、多卡霉素/倍癌霉素(duocarmycins)、依托泊甙(etoposides)、美登木素(maytansines)和美登素类化合物(maytansinoids)(例如 DM1 和 DM4)、紫杉烷(taxanes)、苯二氮卓类(benzodiazepines)或者含有苯二氮卓的药物(benzodiazepine containing drugs)(例如吡咯并[1,4]苯二氮卓类(PBDs), 吲哚啉苯并二氮卓类(indolinobenzodiazepines)和噁唑啉烷并苯并二氮卓类(oxazolidinobenzodiazepines))、长春花生物碱(vinca alkaloids)、或其组合。

20 在另一优选例中, 所述的毒素选自下组:

25 耳他汀类(例如, 耳他汀 E、耳他汀 F、MMAE 和 MMAF)、金霉素、类美坦西醇、蓖麻毒素、蓖麻毒素 A-链、考布他汀、多卡米星、多拉司他汀、阿霉素、柔红霉素、紫杉醇、顺铂、cc1065、溴化乙锭、丝裂霉素、依托泊甙、替诺泊甙(tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙素、二羟基炭疽菌素二酮、放线菌素、白喉毒素、假单胞菌外毒素(PE)A、PE40、相思豆毒素、相思豆毒素 A 链、蒴莲根毒素 A 链、 α -八叠球菌、白树毒素、迈托毒素(mitogellin)、局限曲菌素(retstrictocin)、酚霉素、依诺霉素、麻疯树毒蛋白(curicin)、巴豆毒素、卡奇霉素、肥皂草(Saponaia officinalis)抑制剂、糖皮质激素、或其组合。

30 在另一优选例中, 所述偶联部分为可检测标记物。

在另一优选例中, 所述可检测标记物包括放射性核素, 所述的放射性核素包括:

35 (i) 诊断用同位素, 所述的诊断用同位素选自下组: Tc-99m、Ga-68、F-18、I-123、I-125、I-131、In-111、Ga-67、Cu-64、Zr-89、C-11、Lu-177、Re-188、或其组合; 和/或

40 (ii) 治疗用同位素, 所述的治疗用同位素选自下组: Lu-177、Y-90、Ac-225、As-211、Bi-212、Bi-213、Cs-137、Cr-51、Co-60、Dy-165、Er-169、Fm-255、Au-198、Ho-166、I-125、I-131、Ir-192、Fe-59、Pb-212、Mo-99、Pd-103、P-32、K-42、Re-186、Re-188、Sm-153、Ra223、Ru-106、Na24、Sr89、Tb-149、Th-227、Xe-133 Yb-169、Yb-177、或其组合。

在另一优选例中, 所述蛋白降解剂为肿瘤相关蛋白的降解剂, 所述肿瘤相关蛋白选自下组: EGFR、NF- κ B、RIPK2、BCR-ABL、HER2、c-Met、TBK1、CDK、ALK、Akt、CK2、ERK1/2、FLT3、PI3K、BTK、TRK、Fak、BRD、AR、ER、MetAp-2、BCL-XL、Sirt2、HDAC6、Pirin、SMAD3、ARNT、PCAF/GCN5、Tau、EZH2、IRAK4、

STAT3FRS2、RAS（例如KRAS、HRAS和NRAS）。

在另一优选例中，所述KRAS包括KRAS-G12C、KRAS-G12D。

在另一优选例中，所述蛋白降解剂包括PROTAC（蛋白降解靶向嵌合体）。

在另一优选例中，所述PROTAC靶向EGFR、KRAS（包括KRAS-G12C、
5 KRAS-G12D）。

在另一优选例中，所述寡核苷酸包括反义寡核苷酸（ASO）、小干扰RNA（siRNA）、微小RNA（miRNA）、小激活RNA（saRNA）、信使RNA（mRNA）或RNA适配（Aptamer）。

在另一优选例中，所述偶联物选自：荧光或发光标记物、放射性标记物、MRI（磁
10 共振成像）或CT（电子计算机X射线断层扫描技术）造影剂、或能够产生可检测产物的酶、放射性核素、生物毒素、细胞因子（如IL-2等）、抗体、抗体Fc片段、抗体scFv片段、金纳米颗粒/纳米棒、病毒颗粒、脂质体、纳米磁粒、前药激活酶（例如，DT-心肌黄酶（DTD）或联苯基水解酶-样蛋白质（BPHL））、化疗剂（例如，顺铂）或任何形式的纳米颗粒等。

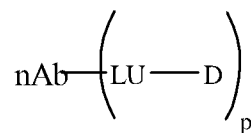
15 在另一优选例中，所述免疫偶联物含有：多价（如二价）的如本发明的第一方面所述的靶向CD73的纳米抗体或本发明的第二方面所述的靶向CD73的抗体。

在另一优选例中，所述多价是指，在所述免疫偶联物的氨基酸序列中包含多个重复的如本发明的第一方面所述的靶向CD73的纳米抗体或本发明的第二方面所述的靶向CD73的抗体。

20 在另一优选例中，所述的检测为体内检测或体外检测。

在另一优选例中，所述免疫偶联物用于诊断和/或治疗表达CD73蛋白的肿瘤。

在另一优选例中，所述抗体药物偶联物ADC如下分子式所示：



25 其中：

nAb是靶向CD73的纳米抗体，

LU是接头（又称连接子）；

D是药物；

而且下标p是选自1-8的值。

30 在另一优选例中，LU选自马来酰亚胺基己酰基（MC）、马来酰亚胺（MAL）、琥珀酰亚胺基4-（N-马来酰亚胺甲基）环己烷-1-甲酸酯（SMCC）接头与抗体部分连接，并包含缬氨酸-瓜氨酸（VC）、缬氨酸-丙氨酸（VA）、甘氨酸-甘氨酸-苯丙氨酸-甘氨酸（GGFG）、丙氨酸-丙氨酸-丙氨酸（AAA）、对氨基苄氧基羰基（PAB）、聚乙二醇（PEG）的一种或多种的连接子。

35 在另一优选例中，其中所述抗体通过与选自下组的部分反应共价结合至所述接头：马来酰亚胺基己酰基（MC）、马来酰亚胺（MAL）、琥珀酰亚胺基4-（N-马来酰亚胺甲基）环己烷-1-甲酸酯（SMCC）等。

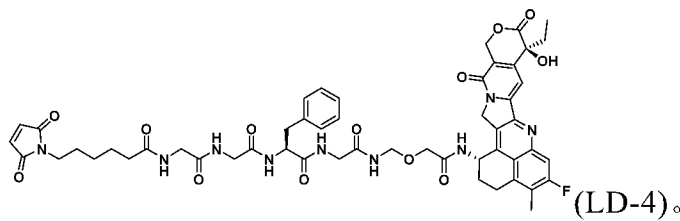
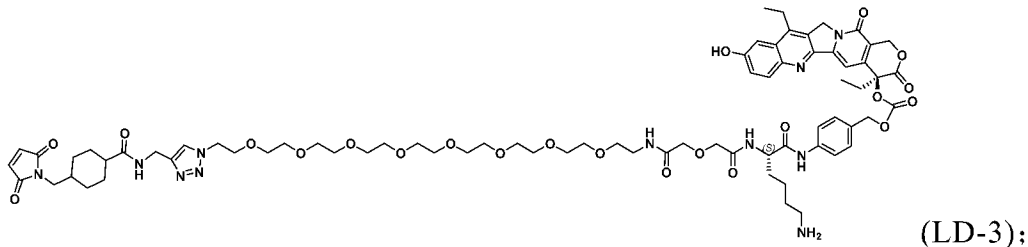
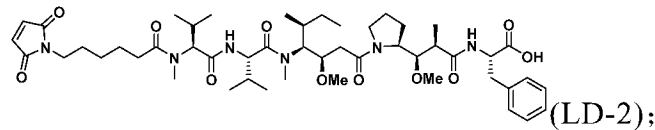
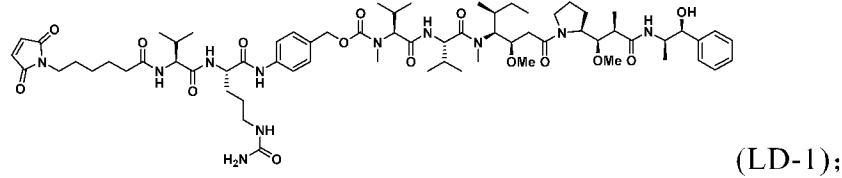
在另一优选例中，其中D选自下组具有抗肿瘤活性的化合物：

40 （i）微管蛋白抑制剂，如美登素衍生物（DM1、DM4），单甲基奥瑞他汀 E（MMAE）、单甲基奥瑞他汀 F（MMAF）；

（ii）作用于DNA毒素，如倍癌霉素（duocarmycin）、吡咯并苯二氮卓（PBD）；

(iii) 拓扑异构酶抑制剂, 喜树碱、SN38、依喜替康、Dxd。

在另一优选例中, 其中所述 LU-D 化合物选自下组:



本发明的第八方面, 提供了一种药物组合物, 所述的药物组合物包含:

(i) 如本发明的第一方面所述的靶向 CD73 的纳米抗体、如本发明的第二方面所述的靶向 CD73 的抗体、如本发明的第三方面的多特异性抗体、如本发明的第四方面所述的重组蛋白、如本发明的第六方面所述的重组的免疫细胞或如本发明的第七方面所述的免疫偶联物;

(ii) 药学上可接受的载体。

在另一优选例中, 所述的药物组合物包括单方药物、复方药物、或协同药物。

在另一优选例中, 所述的药物组合物还包含其他生物活性物质, 如治疗肿瘤的药物。

在另一优选例中, 所述的药物组合物的施用方式选自下组: 皮下注射、皮内注射、肌肉注射、静脉注射、腹腔注射、微针注射、口服、或口鼻腔喷入和雾化吸入。

在另一优选例中, 所述的药物组合物的剂型选自下组: 液态、固体、或凝胶态。

在另一优选例中, 所述的药物组合物为液态制剂。

在另一优选例中, 所述的药物组合物为注射剂。

本发明的第九方面, 提供了一种活性成分的用途, 所述的活性成分选自下组: 如本发明的第一方面所述的靶向 CD73 的纳米抗体、如本发明的第二方面所述的靶向 CD73 的抗体、如本发明的第三方面的多特异性抗体、如本发明的第四方面所述的重组蛋白、如本发明的第六方面所述的重组的免疫细胞、如本发明的第七方面所述的免疫偶联物、或其组合, 所述活性成分用于(a)制备检测试剂、检测板或试剂盒; 和/或(b)制备预防和/或治疗 CD73 相关疾病的药物。

在另一优选例中，所述检测试剂、检测板或试剂盒用于：

- (1)检测样品中的 CD73 蛋白；和/或
- (2)检测肿瘤细胞中内源性的 CD73 蛋白；和/或
- (3)检测表达 CD73 蛋白的肿瘤细胞。

5 在另一优选例中，所述的检测类型，包括但不限于用于流式检测、细胞免疫荧光检测、酶联免疫吸附检测、免疫印迹检测等。

在另一优选例中，所述的检测试剂、检测板或试剂盒用于诊断 CD73 相关疾病。

在另一优选例中，所述的药物用于治疗或预防 CD73 高表达的肿瘤、肿瘤迁移、或肿瘤耐药。

10 在另一优选例中，所述的肿瘤耐药包括：肿瘤免疫治疗药物的耐药、肿瘤靶向治疗药物的耐药、常规肿瘤化疗的耐药，放射治疗的不敏感。

在另一优选例中，所述的药物用于选自下组的用途：

- (a) 抑制 CD73 催化腺苷一磷酸（AMP）水解生成腺苷的活性；
- (b) 特异结合肿瘤细胞，和/或肿瘤微环境中的免疫/基质细胞的 CD73；
- 15 (c) 抑制肿瘤/肿瘤微环境 CD73 催化 AMP 水解的活性；
- (d) 抑制肿瘤细胞迁移或转移；
- (e) 抑制肿瘤生长，提高联合用药的抗肿瘤疗效；
- (f) 促进免疫细胞的增殖、存活及功能，从而提高肿瘤免疫的效果。

20 在另一优选例中，所述 CD73 相关疾病选自下组：癌症、自身免疫疾病、代谢相关疾病、感染疾病、或其组合。

在另一优选例中，所述 CD73 相关的疾病包括：肿瘤的发生、生长和/或转移。

在另一优选例中，所述的癌症包括实体瘤、血液瘤。

在另一优选例中，所述的癌症为 CD73 高表达的肿瘤。

25 在另一优选例中，所述的 CD73 高表达的肿瘤选自下组：乳腺癌、肺癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌、直肠癌、脑胶质瘤、黑色素瘤、白血病、淋巴瘤、或其组合。

在另一优选例中，所述的癌症为耐药性肿瘤。

在另一优选例中，所述的 CD73 高表达的肿瘤指肿瘤组织中 CD73 转录本和/或蛋白的水平 L1 与正常组织中转录本和/或蛋白的水平 L0 之比， $L1/L0 \geq 2$ ，较佳地 ≥ 3 。

30 本发明的第十方面，提供了一种多核苷酸，其特征在于，所述的多核苷酸编码选自下组的多肽：

(1) 本发明的第一方面所述的靶向CD73的纳米抗体、本发明的第二方面所述的靶向CD73的抗体、或如本发明的第三方面的多特异性抗体；

(2) 如本发明的第四方面所述的重组蛋白；或

35 (3) 如本发明的第五方面所述的CAR构建物。

在另一优选例中，所述多核苷酸包括RNA、DNA或cDNA。

本发明的第十一方面，提供了一种载体，其特征在于，所述的载体含有如本发明的第十方面所述的多核苷酸。

40 在另一优选例中，所述的载体包括：细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒、或其他载体。

本发明的第十二方面，提供了一种遗传工程化的宿主细胞，其特征在于，所述的宿主细胞含有本发明的第十一方面所述的载体或基因组中整合有本发明的第十方面

所述的多核苷酸。

本发明的第十三方面，提供了一种体外检测(包括诊断性或非诊断性)样品中CD73的方法，其特征在于，所述方法包括步骤：

- 5 (1) 在体外，将所述样品与本发明的第一方面所述的靶向CD73的纳米抗体、本发明的第二方面所述的靶向CD73的抗体或如本发明的第七方面所述的免疫偶联物接触；
- (2) 检测是否形成抗原-抗体复合物，其中形成复合物就表示样品中存在CD73。
- 10 在另一优选例中，所述的检测包括诊断性的或非诊断性的。

15 本发明的第十四方面，提供了一种检测板，所述的检测板包括：基片(支撑板)和测试条，所述的测试条含有本发明第一方面所述的靶向CD73的纳米抗体或本发明第二方面所述的靶向CD73的抗体或本发明第七方面所述的免疫偶联物。

15 本发明的第十五方面，提供了一种试剂盒，所述试剂盒中包括：

- (1) 第一容器，所述第一容器中含有本发明第一方面所述的靶向CD73的纳米抗体或本发明第二方面所述的靶向CD73的抗体；和/或
- 20 (2) 第二容器，所述第二容器中含有抗本发明第一方面所述的靶向CD73的纳米抗体或本发明第二方面所述的靶向CD73的抗体的二抗；
- 或者，所述试剂盒含有本发明第十四方面所述的检测板。

本发明的第十六方面，提供了一种重组多肽的制备方法，其特征在于，所述方法包括：

- 25 (a) 在适合表达的条件下，培养本发明的第十二方面所述的宿主细胞；
- (b) 从培养物中分离出重组多肽，所述的重组多肽是如本发明的第一方面所述的靶向CD73的纳米抗体、如本发明的第二方面所述的靶向CD73的抗体、如本发明的第三方面的多特异性抗体、如本发明的第四方面所述的重组蛋白。

30 本发明的第十七方面，提供了一种治疗CD73相关疾病的方法，其特征在于，所述方法包括：给需要的对象施用如本发明的第一方面所述的靶向CD73的纳米抗体、如本发明的第二方面所述的靶向CD73的抗体、如本发明的第三方面的多特异性抗体、如本发明的第四方面所述的重组蛋白、如本发明的第六方面所述的重组的免疫细胞、如本发明的第七方面所述的免疫偶联物、如本发明的第八方面所述的药物组合物、或其组合。

35 在另一优选例中，所述的方法还包括：给需要的对象施用其他药物或治疗方法进行联合治疗。

在另一优选例中，所述的其他药物或治疗方法包括：抗肿瘤免疫治疗药物、肿瘤靶向药物、肿瘤化疗药物、肿瘤放射治疗。

40 在另一优选例中，所述的抗肿瘤免疫治疗药物包括PD-1、PD-L1单抗。

在本发明的第十八方面，提供了一种制备嵌合抗体的方法，包括步骤：

将本发明第一方面所述的靶向CD73的纳米抗体的羊驼来源的VHH序列的核苷酸序列克隆入含有人抗体恒定区的核苷酸序列的表达载体后，通过转染动物细胞表达人

-羊驼嵌合抗体。

在本发明的第十九方面，提供了一种制备人源化抗体的方法，包括步骤：

将本发明第一方面所述的靶向CD73的纳米抗体的VHH链的CDR区的核苷酸序列植入含人源抗体FR区的核苷酸序列模板，再将其克隆入含有人抗体恒定区的表达载体后，通过转染动物细胞表达人源化抗体。

在本发明的第二十方面，提供了一种抑制肿瘤细胞生长和迁移的方法，包括步骤：给需要的对象施用本发明的第一方面所述的靶向CD73的纳米抗体、本发明的第二方面所述的靶向CD73的抗体或本发明所述的纳米抗体-药物偶联物、或所述纳米抗体的CAR-T细胞、或其组合。

在本发明的第二十一方面，提供了一种抑制肿瘤在模型动物体内生长的方法，包括步骤：给需要的对象施用本发明的第一方面所述的靶向CD73的纳米抗体、本发明的第二方面所述的靶向CD73的抗体、本发明所述的纳米抗体-药物偶联物、或所述纳米抗体的CAR-T细胞。

在另一优选例中，所述药物可以实施单独给药，或组合用药包括肿瘤免疫疗法、肿瘤靶向药物、细胞毒药物、放射治疗。

在本发明的第二十二方面，提供了一种本发明的第七方面所述的纳米抗体-药物偶联物的制备方法，包括步骤：

(1) 用抗体与还原试剂在缓冲液中反应，得到经还原后的抗体；

(2) 用式DL连接子-药物缀合物与步骤(1)中得到的经还原后的抗体在缓冲液与有机溶剂混合液中进行交联（偶联），得到具有不同DAR值的抗体-药物偶联物1a、1b、1c或1d。

在另一优选例中，所述制备方法的交联反应如图24所示。

在另一优选例中，所述步骤（1）中所述抗体经还原试剂还原，从而使抗体链间二硫键被还原，产生巯基基团。

在另一优选例中，所述步骤（1）中还原试剂为三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)、beta-巯基乙醇、beta-巯基乙胺盐酸盐、或二硫苏糖醇(DTT)。

在另一优选例中，所述的缓冲液选自下组：磷酸二氢钾-氢氧化钠(KH₂PO₄-NaOH)/氯化钠(NaCl)/二乙基三胺五乙酸(DTPA)缓冲液、磷酸氢二钠-柠檬酸/氯化钠(NaCl)/二乙基三胺五乙酸(DTPA)、硼酸-硼砂/氯化钠(NaCl)/二乙基三胺五乙酸(DTPA)、组氨酸-氢氧化钠/氯化钠(NaCl)/二乙基三胺五乙酸(DTPA)，和PBS/二乙基三胺五乙酸(DTPA)。

在另一优选例中，所述的步骤(2)中，有机溶剂在反应液中的体积占比不超过15%。

在另一优选例中，所述的步骤(2)中的有机溶剂选自下组：乙腈(ACN)、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基乙酰胺(DMA)、二甲基亚砜(DMSO)。

再加入连接子药物(预先10mg/ml溶在乙腈(ACN)、二甲亚砜(DMSO)、二甲基甲酰胺(DMF)或二乙基乙酰胺(DMA)中)，并保证反应液中有有机溶剂的体积占比不超过15%，偶联反应于0-37°C搅动2-4小时。若采用TCEP还原，也可不需除去剩余TCEP，直接加入取代马来酰亚胺类化合物进行偶联。

采用脱盐柱将偶联反应混合物用琥珀酸钠/NaCl缓冲液或组氨酸-醋酸/蔗糖凝胶过滤纯化，根据UV280 紫外吸收值收集出峰样品。或超滤数遍。然后过滤除菌，所得产物低温保存。

所得抗体药物偶联物的药物抗体偶联比(DAR)较为均一。对于DAR有一定差别的

NDC, 如需要获得均一性更好的样品, 可进一步利用但不限于以下方法进行分离纯化: 疏水作用层析方法(HIC)、分子排阻色谱法(SEC)、离子交换层析(IEC)。

应理解, 在本发明范围内中, 本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合, 从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅, 在此不再一一累述。

附图说明

图1为表面等离子体共振 (SPR) 分析测定4个嵌合纳米抗体3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02与人CD73-ECD的结合亲和力常数 (KD)。

图2为3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02对CD73-ECD的ELISA结合亲和力(Binding affinity EC_{50})。

图3为3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02对重组人CD73酶催化功能的抑制活性(IC_{50})。

图4为3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02对MDA-MB-231 (图4A) 或NCI-H1299 (图4B) 细胞表面CD73的结合亲和力(Binding affinity EC_{50})检测结果。

图5为3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02对PC9 (图5A) 和NCI-H1975 (图5B) 细胞表面CD73的结合亲和力(Binding affinity EC_{50})检测结果。

图6为3-D7, 4-D04, 5-E11, 4-B02对SW1573 (图6A) 和NCI-H1373 (图6B) 细胞表面CD73的结合亲和力(Binding affinity EC_{50})检测结果。

图7为3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02对HCC-44细胞表面CD73的结合亲和力(Binding affinity EC_{50})检测结果。

图8为3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02对MDA-MB-231细胞表面CD73酶催化功能的抑制活性, 展示抑制曲线和 IC_{50} 值。

图9为3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02能有效逆转腺苷单磷酸(AMP)对人T淋巴细胞的增殖抑制作用。试验采用分选获得CD3⁺人T细胞, 将其培养5天后统计细胞增殖率和 EC_{50} 值。

图10为3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02能有效逆转AMP对人T淋巴细胞INF-g表达的抑制作用。试验采用分选获得CD3⁺人T细胞, 将其培养5天后检测T细胞培养上清。

图11为嵌合纳米抗体1-B11、1-E7、2-B10、2-G9、3-A3、3-F1与人CD73-ECD的ELISA结合活性, 采用HEK293F细胞瞬转培养2天后的上清100 μ L、10 μ L、1 μ L进行检测。

图12为嵌合纳米抗体1-B11、1-E7、2-B10、2-G9、3-A3、3-F1与MDA-MB-231细胞表面CD73的结合活性, 采用HEK293F细胞瞬转培养2天后的上清100 μ L、10 μ L、1 μ L进行检测。

图13为嵌合纳米抗体3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02与MDA-MB-231细胞结合导致内吞(Internalization)至细胞内溶酶体。所述抗体(5 μ g/mL)和细胞孵育4 $^{\circ}$ C 1小时, 或37 $^{\circ}$ C 4小时后置于荧光显微镜显微镜观察结果。

图14为嵌合纳米抗体-药物偶联物(NDC)3-D7-MMAE, 5-E11-MMAE以及对照物Hu001-MMAE (CD73-ADC) 对乳腺癌细胞MDA-MB-453 (图14A) 和MDA-MB-231 (图14B) 的增殖抑制活性的检测结果。

图15为3-D7-MMAE, 5-E11-MMAE以及对照物Hu001-MMAE对肺癌细胞PC9 (图15A) 和NCI-H1975 (图15B) 的增殖抑制活性的检测结果。

图16为3-D7-MMAE, 5-E11-MMAE以及对照物Hu001-MMAE对肺癌细胞NCI-H441 (图16A) 和SW1573 (图16B) 的增殖抑制活性的检测结果。

图17A为人T淋巴细胞与不同浓度的3-D7-MMAE, 5-E11-MMAE孵育5天后读取固定体积的活细胞数, 以增殖率(相对于溶媒/缓冲液)绘制抑制曲线图;图17B为3-D7-MMAE, 5-E11-MMAE能有效逆转腺苷单磷酸(AMP)对人T淋巴细胞的增殖抑制作用。试验采用分选获得CD3⁺人T淋巴细胞, 将其培养5天后统计细胞增殖率。

5 图18为3-D7-MMAE和5-E11-MMAE能有效逆转AMP对人T淋巴细胞INF-g表达的抑制作用。试验采用分选获得CD3⁺人T细胞, 将其培养5天后检测T细胞培养上清。

图19A为嵌合纳米抗体3-D7表达纯化后的SDS-PAGE, 对应SEQ NO. 37, SEQ NO.38, SEQ NO.39; 图19B为3-D7重组融合蛋白纯化后的SDS-PAGE, 对应 SEQ NO.43, SEQ NO.44。

10 图20A为嵌合纳米抗体5-E11表达纯化后的SDS-PAGE, 对应SEQ NO.40, SEQ NO.41, SEQ NO.42; 图20B为5-E11重组融合蛋白纯化后的SDS-PAGE, 对应SEQ NO.45。

图21为嵌合纳米抗体3-D7-vc-MMAE的质谱图。

图22为嵌合纳米抗体5-E11-vc-MMAE的质谱图。

15 图23为嵌合纳米抗体4-D04-vc-MMAE的质谱图。

图24为本发明的纳米抗体-药物偶联物的制备方法的交联反应式, 其中, 具有不同DAR值的抗体-药物偶联物分别如1a、1b、1c或1d所示。

具体实施方式

20 本发明人通过广泛而深入的研究, 经对羊驼(Alpaca)进行免疫和建库, 大量筛选噬菌体展示库及酵母展示库, 获得了3-D7、5-E11、4-D04、4-B02等多个纳米抗体。所述抗体能高特异性的结合人CD73蛋白, ELISA测定其EC₅₀分别为0.070μg/mL, 0.052μg/mL, 0.035μg/mL, 0.014μg/mL; 所述抗体对重组表达或细胞来源的人CD73酶均具有高效的抑制活性; 能有效逆转AMP对人T淋巴细胞的增殖抑制作用。此外,

25 基于3-D7, 5-E11, 4-D04设计的纳米抗体-药物偶联物(CD73-NDC), 不仅保留了与抗体上述一致的作用, 还能够特异性的杀死CD73中高表达的肿瘤, 从多方面均表现出了良好的抑瘤活性及调控免疫微环境的潜力。在此基础上完成了本发明。

术语

30 如本文所用, 术语“本发明纳米抗体”、“本发明的抗CD73纳米抗体”、“本发明CD73纳米抗体”可互换使用, 均指特异性识别和结合于CD73(包括人CD73)的纳米抗体。特别优选的是VHH链的氨基酸序列如SEQ ID NO.:1-40所示的纳米抗体。

如本文所用, 术语“抗体”或“免疫球蛋白”是有相同结构特征的约150000道尔顿的异四聚糖蛋白, 其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连, 而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区(VH), 其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区(VL), 另一端有恒定区; 轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对, 轻链的可变区与重链的可变区相对。特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

40 如本文所用, 术语“单域抗体(VHH)”、“纳米抗体”(nanobody)具有相同的含义, 指单克隆抗体重链的可变区, 构建仅由一个重链可变区组成的单域抗体(VHH), 它是具有完整功能的最小的抗原结合片段。通常先获得天然缺失轻链和重链恒定区1(CH1)的抗体后, 再克隆抗体重链的可变区, 构建仅由一个重链可变区组成的单域抗体(VHH)。

如本文所用, 术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同, 它形成了

各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而，可变性并不均匀地分布在抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区(CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个FR区，它们大致上呈 β -折叠构型，由形成连接环的三个 CDR 相连，在某些情况下可形成部分 β 折叠结构。每条链中的 CDR 通过 FR 区紧密地靠在一起并与另一链的 CDR 一起形成了抗体的抗原结合部位(参见 Kabat 等, NIH Publ. No. 91-3242, 卷 I, 647-669 页(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合，但是它们表现出不同的效应功能，例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。

如本领域技术人员所知，免疫偶联物及融合表达产物包括：药物、毒素、细胞因子(cytokine)、放射性核素、酶和其他诊断或治疗分子与本发明的抗体或其片段结合而形成的偶联物。本发明还包括与所述的抗 CD73 蛋白抗体或其片段结合的细胞表面标记物或抗原。

如本文所用，术语“重链可变区”与“V_H”可互换使用。

如本文所用，术语“可变区”与“互补决定区(complementarity determining region, CDR)”可互换使用。

在本发明的一个优选的实施方式中，所述抗体的重链可变区包括三个互补决定区 CDR1、CDR2、和 CDR3。

在本发明的一个优选的实施方式中，所述抗体的重链包括上述重链可变区和重链恒定区。

在本发明中，术语“本发明抗体”、“本发明蛋白”、或“本发明多肽”可互换使用，都指特异性结合 CD73 蛋白的多肽，例如具有重链可变区的蛋白或多肽。它们可含有或不含起始甲硫氨酸。

本发明还提供了具有本发明抗体的其他蛋白质或融合表达产物。具体地，本发明包括具有含可变区的重链的任何蛋白质或蛋白质偶联物及融合表达产物(即免疫偶联物及融合表达产物)，只要该可变区与本发明抗体的重链可变区相同或至少 90% 同源性，较佳地至少 95% 同源性。

一般，抗体的抗原结合特性可由位于重链可变区的 3 个特定区域来描述，称为可变区域(CDR)，将该段间隔成 4 个框架区域(FR)，4 个 FR 的氨基酸序列相对比较保守，不直接参与结合反应。这些 CDR 形成环状结构，通过其间的 FR 形成的 β 折叠在空间结构上相互靠近，重链上的 CDR 和相应轻链上的 CDR 构成了抗体的抗原结合位点。可以通过比较同类型的抗体的氨基酸序列来确定是哪些氨基酸构成了 FR 或 CDR 区域。

本发明抗体的重链的可变区特别令人感兴趣，因为它们中至少部分涉及结合抗原。因此，本发明包括那些具有带 CDR 的抗体重链可变区的分子，只要其 CDR 与此处鉴定的 CDR 具有 90% 以上(较佳地 95% 以上，最佳地 98% 以上)的同源性。

抗CD73的纳米抗体

本发明提供多款靶向CD73的高特异性和高亲和力的纳米抗体，其仅包括重链，所述重链含有重链可变区(VH)氨基酸序列(由表-1、表-2列出)。

优选地，重链可变区(VH)氨基酸序列具有以下多肽序列的CDR1、CDR2、CDR3：

a1) CDR1为SEQ ID NO.1: GFLLDYYV, SEQ ID NO.5: GFTLDYYN, SEQ ID NO.9: GFTLDYYN, SEQ ID NO.13: GFPLDYYS, SEQ ID NO.17: GFTLDYYN, SEQ ID NO.21: GFTLDDNA, SEQ ID NO.25: GFLLDYYT, SEQ ID NO.29: GFPLDYTY, SEQ ID NO.33: GFTLDYYT;

a2) CDR2为SEQ ID NO.2: ISGSDRST, SEQ ID NO.6: SSNSGGST, SEQ ID NO.10:

ISSSEGST, SEQ ID NO.14: IGSSDGST, SEQ ID NO.18: ISNSDGST, SEQ ID NO.22: MRTSDGDT, SEQ ID NO.26: ISSSDSSP, SEQ ID NO.30: ISSSDSSP, SEQ ID NO.34: IRSSDSSP;

a3) HCDR3 为 SEQ ID NO.3: AADPSPVTQAMCLPRFPVPY, SEQ ID NO.7: AAYRGWHPSLDARVYDY, SEQ ID NO.11: AADRYYYCSLHVSQYDY, SEQ ID NO.15: AALKYYYCSGHEAIYDY, SEQ ID NO.19: AAYRGWHPSLDARVYDY, SEQ ID NO.23: AAALGTYYSGFYYLAGDGMDY, SEQ ID NO.27: ALRANVYDY, SEQ ID NO.31: SLRANVYDY, SEQ ID NO.35: SLTANVYDY;

a4) 上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有CD73结合亲和力的序列。

在另一优选例中, 所述经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸序列所形成的序列优选为同源性为至少80%, 较佳地至少85%, 更佳地至少为90%, 最佳地至少95%的氨基酸序列。

优选地, 所述的抗体具有抑制细胞表面及重组CD73蛋白酶催化功能, 所述抗体能快速被细胞内吞进入溶酶体。

本发明的抗体可以是双链或单链抗体, 并且可以是选自动物源抗体、嵌合抗体、人-动物嵌合抗体、优选为人源化抗体, 更优选为全人源化抗体。

本发明所述抗体衍生物可以是单链抗体、和/或抗体片段, 如: Fab、Fab'、(Fab')₂或该领域内其他已知的抗体衍生物等, 以及IgA、IgD、IgE、IgG以及IgM抗体或其他亚型的抗体中的任意一种或几种。

其中, 所述动物优选为哺乳动物, 如鼠。

本发明抗体可以是靶向人CD73的嵌合抗体、人源化抗体、CDR嫁接和/或修饰的抗体。

在本发明的一种优选实施例中, 上述SEQ ID NO. 1~3、SEQ ID NO.5~7、SEQ ID NO.9~11、NO.13~15、NO.17~19、NO.21~23、NO.25~27、NO.29~31、NO.33~35中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有CD73结合亲和力的序列, 位于可变区(VH)的CDR区。

本发明上述内容中, 所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量, 优选为不超过初始氨基酸序列总氨基酸数量的40%, 更优选为不超过35%, 更优选为1-33%, 更优选为5-30%, 更优选为10-25%, 更优选为15-20%。

本发明上述内容中, 更优选地, 所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量, 可以是1-7个, 更优选为1-5个, 更优选为1-3个, 更优选为1-2个。

在另一优选例中, 所述的原始抗体为人-羊驼嵌合抗体 3-D7、5-E11、4-D04、4-B02、1-E7、2-B10、2-G9、3-A3、3-F1。

在另一优选例中, 所述嵌合抗体的重链可变区(VH)的氨基酸序列编号由表 1 列出。

在另一优选例中, 所述抗体的互补决定区(CDR)的氨基酸序列编号由表 2 列出。

本发明的抗体可以联合应用, 用于构建CAR构建物、包含CAR构建物的重组的免疫细胞、抗体药物偶联物等用途, 还可以用于(a)制备检测试剂、检测板或试剂盒; 和/或(b)制备预防和/或治疗CD73相关疾病的药物。

表-1: 本发明序列表中各序列的代表含义

序列编号	序列名称	序列编号	序列名称
SEQ ID NO.1	3-D7 CDR1	SEQ ID NO.27	2-B10 CDR3
SEQ ID NO.2	3-D7 CDR2	SEQ ID NO.28	2-B10 VH
SEQ ID NO.3	3-D7 CDR3	SEQ ID NO.29	2-G9 CDR1
SEQ ID NO.4	3-D7 VH	SEQ ID NO.30	2-G9 CDR2

SEQ ID NO.5	5-E11 CDR1	SEQ ID NO.25	2-G9 CDR1
SEQ ID NO.6	5-E11 CDR2	SEQ ID NO.26	2-G9 CDR2
SEQ ID NO.7	5-E11 CDR3	SEQ ID NO.27	2-G9 CDR3
SEQ ID NO.8	5-E11 VH	SEQ ID NO.28	2-G9 VH
SEQ ID NO.9	4-D04 CDR1	SEQ ID NO.29	3-A3 CDR1
SEQ ID NO.10	4-D04 CDR2	SEQ ID NO.30	3-A3 CDR2
SEQ ID NO.11	4-D04 CDR3	SEQ ID NO.31	3-A3 CDR3
SEQ ID NO.12	4-D04 VH	SEQ ID NO.32	3-A3 VH
SEQ ID NO.13	4-B02 CDR1	SEQ ID NO.33	3-F1 CDR1
SEQ ID NO.14	4-B02 CDR2	SEQ ID NO.34	3-F1 CDR2
SEQ ID NO.15	4-B02 CDR3	SEQ ID NO.35	3-F1 CDR3
SEQ ID NO.16	4-B02 VH	SEQ ID NO.36	3-F1 VH
SEQ ID NO.17	1-E7 CDR1	SEQ ID NO.37	3-D7-FC1
SEQ ID NO.18	1-E7 CDR2	SEQ ID NO.38	3-D7-FC2
SEQ ID NO.19	1-E7 CDR3	SEQ ID NO.39	3-D7-FC3
SEQ ID NO.20	1-E7 VH	SEQ ID NO.40	5-E11-FC1
SEQ ID NO.21	2-B10 CDR1	SEQ ID NO.41	5-E11-FC2
SEQ ID NO.22	2-B10 CDR2	SEQ ID NO.42	5-E11-FC3
SEQ ID NO.22	2-B10 CDR3	SEQ ID NO.43	3-D7-HLE
SEQ ID NO.24	2-B10 VH	SEQ ID NO.44	3-D7-ABD
		SEQ ID NO.45	5-E11-ABD

表-2：本发明纳米抗体的CDR氨基酸序列

纳米抗体	CDR1	CDR2	CDR3
3-D7	GFLLDYYV	ISGSDRST	AADPSPVTVQAMCLPRFPVPY
5-E11	GFTLDYYN	SSNSGGST	AAYRGWHPSLDARVYDY
4-D04	GFTLDYYN	ISSSEGST	AADRYYYCSLHVSQYDY
4-B02	GFPLDYYS	IGSSDGST	AALKYYYCSGHEAIYDY
1-E7	GFTLDYYN	ISNSDGST	AAYRGWHPSLDARVYDY
2-B10	GFTLDDNA	MRTSDGDT	AAALGTYYSGFYLAGDGMDY
2-G9	GFLLDYYT	ISSSDSSP	ALRANVYDY
3-A3	GFPLDYTY	ISSSDSSP	SLRANVYDY
3-F1	GFTLDYYT	IRSSDSSP	SLTANVYDY

重组蛋白（或融合蛋白）

- 5 在本发明中，还包括含有本发明的 CD73 纳米抗体的重组蛋白（或融合蛋白）。一种优选的融合蛋白为多特异性抗体，所述多特异性抗体还包括靶向选自下组的靶点的第二抗原结合区：EGFR、TGFβ、BCMA、B7H6、GUCY2C、DLL3、CD38、CD123、CD19、CD20、CD22、B7-H3、GPC3、HER2、PMSA、CD28、4-1BB、OX40、CD40、CD27、CD3、CTLA4、PD1、PDL1、BCMA、GLP-1、Trop2、TIGIT、LAG-3、FGL1、TLR7，
- 10 或其组合。

较佳地，所述多特异性抗体包括一个或多个第二抗原结合区，或进一步地包含第三抗原结合区。

- 此外，本发明的重组蛋白（或融合蛋白）除了含有本发明的CD73纳米抗体外，还包括任选的协助表达和/或纯化的标签序列（例如6His标签、GGGS序列、FLAG标签）；
- 15 或包括任选的具有治疗功能的多肽分子或片段；或任选的协助理化或者药学的蛋白功能域（例如能够延长纳米抗体体内半衰期的分子，如HLE、ABD）。

本发明不仅包括完整的抗体,还包括具有免疫活性的抗体的片段或抗体与其他序列形成的融合蛋白。因此,本发明还包括所述抗体的片段、衍生物和类似物。

如本文所用,术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明抗体相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i) 有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽,而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的,或(ii) 在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽,或(iii) 成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物,例如聚乙二醇)融合所形成的多肽,或(iv) 附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列,或与 6His 标签形成的融合蛋白)。根据本文的教导,这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

本发明抗体指具有 CD73 蛋白结合活性的、包括上述 CDR 区的多肽。该术语还包括具有与本发明抗体相同功能的、包含上述 CDR 区的多肽的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于): 一个或多个(通常为 1-50 个,较佳地 1-30 个,更佳地 1-20 个,最佳地 1-10 个)氨基酸的缺失、插入和/或取代,以及在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个(通常为 20 个以内,较佳地为 10 个以内,更佳地为 5 个以内)氨基酸。例如,在本领域中,用性能相近或相似的氨基酸进行取代时,通常不会改变蛋白质的功能。又比如,在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括本发明抗体的活性片段和活性衍生物。

该多肽的变异形式包括: 同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧度条件下能与本发明抗体的编码 DNA 杂交的 DNA 所编码的蛋白、以及利用抗本发明抗体的抗血清获得的多肽或蛋白。

本发明还提供了其他多肽,如包含纳米抗体或其片段的融合蛋白。除了几乎全长的多肽外,本发明还包括了本发明纳米抗体的片段。通常,该片段具有本发明抗体的至少约 50 个连续氨基酸,较佳地至少约 50 个连续氨基酸,更佳地至少约 80 个连续氨基酸,最佳地至少约 100 个连续氨基酸。

在本发明中,“本发明抗体的保守性变异体”指与本发明抗体的氨基酸序列相比,有至多 10 个,较佳地至多 8 个,更佳地至多 5 个,最佳地至多 3 个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表 A 进行氨基酸替换而产生。

表 A

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu

Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

本发明还提供了编码上述抗体或其片段或其融合蛋白的多核苷酸分子。本发明的多核苷酸可以是 DNA 形式或 RNA 形式。DNA 形式包括 cDNA、基因组 DNA 或人工合成的 DNA。DNA 可以是单链的或是双链的。DNA 可以是编码链或非编码链。

5 编码本发明的成熟多肽的多核苷酸包括：只编码成熟多肽的编码序列；成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列；成熟多肽的编码序列(和任选的附加编码序列)以及非编码序列。

术语“编码多肽的多核苷酸”可以是包括编码此多肽的多核苷酸，也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

10 本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少 50%，更佳地至少 70%，更佳地至少 80%相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中，“严格条件”是指：(1)在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱，如 0.2×SSC, 0.1%SDS, 60°C；或(2)杂交时加有变性剂，如 50%(v/v)甲酰胺，0.1%小牛血清/0.1% Ficoll, 42°C 等；或(3)仅在两条序列之间的相同性至少在 90%以上，
15 更好是 95%以上时才发生杂交。并且，可杂交的多核苷酸编码的多肽与成熟多肽有相同的生物学功能和活性。

本发明的抗体的核苷酸全长序列或其片段通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。一种可行的方法是用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。此外，还可将重链的编码序列和表达标签(如 6His)融合在一起，形成融合蛋白。
20

抗体的制备

本发明抗体或其片段的DNA分子的序列可以用常规技术，比如利用PCR扩增或基因组文库筛选等方法获得。此外，还可将轻链和重链的编码序列融合在一起，形成单链抗体。

25 一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

此外，还可用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。

30 目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码所述的本发明的抗体(或其片段，或其衍生物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。此外，还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

本发明还涉及包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。

35 宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。优选的动物细胞包括(但并不限于)：CHO-S、HEK-293细胞。

通常，在适合本发明抗体表达的条件下，培养转化所得的宿主细胞。然后用常规的免疫球蛋白纯化步骤，如蛋白A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析、离子交换层析、疏水层析、分子筛层析或亲和层析等本领域技术人员熟知的常规分离纯化手段纯化

得到本发明的抗体。

所得单克隆抗体可用常规手段来鉴定。比如，单克隆抗体的结合特异性可用免疫沉淀或体外结合试验(如放射性免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA))来测定。单克隆抗体的结合亲和力例如可用Munson等, Anal. Biochem., 107:220(1980)的Scatchard分析来测定。

本发明的抗体可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要, 可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于: 常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超声处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

纳米抗体-药物偶联物 (Nanobody-drug conjugate, NDC)

本发明还提供了基于本发明抗体的免疫偶联物, 优选地为纳米抗体偶联药物(nanobody-drug conjugate, NDC)。

典型地, 所述抗体偶联药物包括所述抗体、以及效应分子, 所述抗体与所述效应分子偶联, 并优选为化学偶联。其中, 所述效应分子优选为具有治疗活性的药物。此外, 所述效应分子可以是毒蛋白、化疗药物、小分子药物或放射性核素中的一种或多种。

本发明抗体与所述效应分子之间可以通过偶联剂进行偶联。所述偶联剂的例子可以是非选择性偶联剂、利用羧基的偶联剂、肽链、利用二硫键的偶联剂中的任意一种或几种。所述非选择性偶联剂是指使效应分子和抗体形成共价键连接的化合物, 如戊二醛等。所述利用羧基的偶联剂可以是顺乌头酸酐类偶联剂(如顺乌头酸酐)、酰基脲类偶联剂(偶联位点为酰基脲)中的任意一种或几种。

抗体上某些残基(如 Cys 或 Lys 等)用于与多种功能基团相连, 其中包括成像试剂(例如发色基团和荧光基团), 诊断试剂(例如 MRI 对比剂和放射性同位素), 稳定剂(例如乙二醇聚合物)和治疗剂。抗体可以被偶联到功能剂以形成抗体-功能剂的偶联物。功能剂(例如药物, 检测试剂, 稳定剂)被偶联(共价连接)至抗体上。功能剂可以直接地、或者是通过接头间接地连接于抗体。

纳米抗体可以偶联药物从而形成抗体药物偶联物(NDCs)。典型地, NDC 包含位于药物和抗体之间的接头。接头可以是可降解的或者是不可降解的接头。可降解的接头典型地在细胞内环境下容易降解, 例如在目标位点处接头发生降解, 从而使药物从抗体上释放出来。合适的可降解的接头包括, 例如酶降解的接头, 其中包括可以被细胞内蛋白酶(例如溶酶体蛋白酶或者内体蛋白酶)降解的含有肽基的接头, 或者糖接头例如, 可以被葡萄糖苷酸酶降解的含葡萄糖苷酸的接头。肽基接头可以包括, 例如二肽, 例如缬氨酸-瓜氨酸, 苯丙氨酸-赖氨酸或者缬氨酸-丙氨酸。其它合适的可降解的接头包括, 例如, pH 敏感接头(例如 pH 小于 5.5 时水解的接头, 例如脲接头)和在还原条件下会降解的接头(例如二硫键接头)。不可降解的接头典型地在抗体被蛋白酶水解的条件下释放药物。

连接到抗体之前, 接头具有能够和某些氨基酸残基反应的活性反应基团, 连接通过活性反应基团实现。巯基特异性的活性反应基团是优选的, 并包括: 例如马来酰亚胺类化合物, 卤代酰胺(例如碘、溴或氯代的); 卤代酯(例如碘、溴或氯代的); 卤代甲基酮(例如碘、溴或氯代), 苄基卤代物(例如碘、溴或氯代的); 乙烯基砜, 吡啶基二硫化物; 汞衍生物例如 3,6-二-(汞甲基)二氧六环, 而对离子是醋酸根、氯离子或者硝酸根; 和聚亚甲基二甲基硫醚硫代碘酸盐。接头可以包括, 例如, 通过硫代丁二酰亚胺连接到抗体上的马来酰亚胺。

药物可以是任何细胞毒性, 抑制细胞生长或者免疫抑制的药物。在实施方式中, 接头连接抗体和药物, 而药物具有可以和接头成键的功能性基团。例如, 药物可以具有可以和

连接物成键的氨基，羧基，巯基，羟基，或者酮基。在药物直接连接到接头的情况下，药物在连接到抗体之前，具有反应的活性基团。

有用的药物类别包括，例如，抗微管蛋白药物、DNA 小沟结合试剂、DNA 复制抑制剂、烷化试剂、抗生素、叶酸拮抗物、抗代谢药物、化疗增敏剂、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱等。特别有用的细胞毒性药物类的例子包括，例如，DNA 小沟结合试剂、DNA 烷基化试剂、和微管蛋白抑制剂、典型的细胞毒性药物包括、例如奥瑞他汀(auristatins)、喜树碱(camptothecins)、多卡霉素/倍癌霉素(duocarmycins)、依托泊甙(etoposides)、美登木素(maytansines)和美登素类化合物(maytansinoids)(例如 DM1 和 DM4)、紫杉烷(taxanes)、苯二氮卓类(benzodiazepines)或者含有苯二氮卓的药物(benzodiazepine containing drugs)(例如吡咯并[1,4]苯二氮卓类(PBDs)，吲哚啉苯并二氮卓类(indolinobenzodiazepines)和噁唑烷并苯并二氮卓类(oxazolidinobenzodiazepines))和长春花生物碱(vinca alkaloids)。

在本发明中，药物-接头可以用于在一个简单步骤中形成 NDC。在其它实施方式中，双功能连接物化合物可以用于在两步或多步方法中形成 NDC。例如，半胱氨酸残基在第一步骤中与接头的反应活性部分反应，并且在随后的步骤中，接头上的功能性基团与药物反应，从而形成 NDC。

通常，选择接头上功能性基团，以利于特异性地与药物部分上的合适的反应活性基团进行反应。作为非限制性的例子，基于叠氮化合物的部分可以用于特异性地与药物部分上的反应性炔基基团反应。药物通过叠氮和炔基之间的 1,3-偶极环加成，从而共价结合于接头。其它的有用的功能性基团包括，例如酮类和醛类(适合与肟肟类和烷氧基胺反应)，膦(适合与叠氮反应)；异氰酸酯和异硫氰酸酯(适合与胺类和醇类反应)；和活化的酯类，例如 N-羟基琥珀酰亚胺酯(适合与胺类和醇类反应)。这些和其它的连接策略，例如在《生物偶联技术》，第二版(Elsevier)中所描述的，是本领域技术人员所熟知的。本领域技术人员能够理解，对于药物部分和接头的选择性反应，当选择了一个互补对的反应活性功能基团时，该互补对的每一个成员既可以用于接头，也可以用于药物。

较佳地，本发明中的纳米抗体药物偶联物 NDC 中的与所述纳米抗体部分偶联的偶联部分包括蛋白降解剂或寡核苷酸药物。

较佳地，所述寡核苷酸药物为靶向小分子的核酸药物，包括反义核酸(ASO)、小干扰 RNA(siRNA)、微小 RNA(miRNA)、小激活 RNA(saRNA)、信使 RNA(mRNA)、适配体(aptamer)、核酶(ribozyme)、抗体核酸偶联药物(ARC)等。

如本文所用，所述蛋白降解剂为肿瘤相关蛋白的降解剂，所述肿瘤相关蛋白选自下组：

(1) 激酶类，如 RIPK2、BCR-ABL、EGFR、HER2、c-Met、TBK1、CDK2/4/6/9、ALK、Akt、CK2、ERK1/2、FLT3、PI3K、BTK、Fak 等；

(2) BET 蛋白，如 BRD2/4/6/9；

(3) 核受体，如 AR、ER 等；

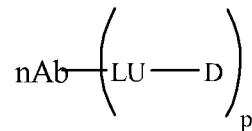
(4) 其他蛋白，如 MetAp-2、Bcl-xL、Sirt2、HDAC6、Pirin、SMAD3、ARNT、PCAF/GCN5、Tau、FRS2、RAS(KRAS、HRAS 和 NRAS) 等。

较佳地，所述蛋白降解剂包括 PROTAC(蛋白降解靶向嵌合体)，更佳地，所述 PROTAC 靶向 EGFR、KRAS(例如 KRAS-G12C、KRAS-G12D)。

本发明还提供了制备 NDC 的方法，可进一步地包括：将抗体与药物-接头化合物，在足以形成抗体偶联物(NDC)的条件下进行结合。

在某些实施方式中，本发明方法包括：在足以形成抗体-接头偶联物的条件下，将抗体与双功能接头化合物进行结合。在这些实施方式中，本发明方法还进一步地包括：在足以将药物部分通过接头共价连接到抗体的条件下，将抗体接头偶联物与药物部分进行结合。

在一些实施方式中，纳米抗体药物偶联物 NDC 如下分子式所示：



其中：

nAb 是纳米抗体，

5 LU 是接头/连接子；

D 是药物；

而且下标 p 是选自 1 到 8 的值。

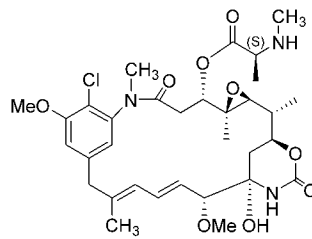
药物(Drug)

10 如本文所用，“药物”泛指任何具有期望的生物活性，并具有反应性官能团以便制备本发明所述偶联物的化合物。期望的生物活性包括，诊断，治愈，缓解，治疗，预防人或其它动物的疾病。因此，只要具有必需的反应性官能团，术语“药物”涉及的化合物包括正式国家药典，以及例如美国正式同种疗法药典，正式全国处方集，或者其任何增补本等确认的药物。典型的药物列于医师案头用药参考(PDR)和美国食品药品监督管理局(FDA)的
15 橙皮书。应理解，随着新型药物不断被发现和发展，这些药物也应纳入本发明所述偶联药物的中的“药物”。

可用于构成本发明NDC的药物包括但并不限于：细胞毒剂（例如细胞毒类小分子药物）。

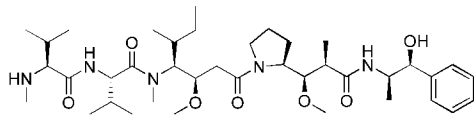
术语“细胞毒剂”是指抑制或阻止细胞表达活性、细胞功能和/或造成细胞破坏的物质。
20 该术语包括放射性同位素、化学治疗剂以及毒素，如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素，包括其片段和/或变体。细胞毒剂的例子包括但不限于：耳他汀类(例如，耳他汀E、耳他汀F、MMAE和MMAF)、金霉素、类美坦西醇、蓖麻毒素、蓖麻毒素A- 链、考布他汀、多卡米星、多拉司他汀、阿霉素、柔红霉素、紫杉醇、顺铂、cc1065、溴化乙锭、丝裂霉素、依托泊甙、替诺泊甙(tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙素、
25 二羟基炭疽菌素二酮、放线菌素、白喉毒素、假单胞菌外毒素(PE)A、PE40、相思豆毒素、相思豆毒素A 链、蒴莲根毒素A 链、 α - 八叠球菌、白树毒素、迈托毒素(mitogellin)、局限曲菌素(retstrictocin)、酚霉素、依诺霉素、麻疯树毒蛋白(curicin)、巴豆毒素、卡奇霉素、肥皂草(*Saponaia officinalis*)抑制剂以及糖皮质激素和其它化学治疗剂，以及放射性同位素，如At211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212或213、P32和包括Lu177
30 在内的Lu 的放射性同位素。抗体也可与能够将前药转化成其活性形式的抗癌前药活化酶偶联。

一种优选的本发明药物是美登素或类美登素。美登素化合物通过抑制微管蛋白的微管形成来抑制细胞增殖。类美登素是美登素的衍生物。美登素和类美登素都具有高效的细胞毒性，但是它们在癌症治疗的临床应用上具有很大的局限性，这主要是源于
35 此类分子对肿瘤的低选择性。但是，这种高细胞毒性促使它们成为抗体药物偶联物的首选药物部分。以下列出了去乙酰基美登素的结构。

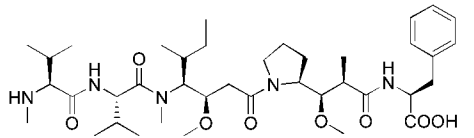


去乙酰基美登素

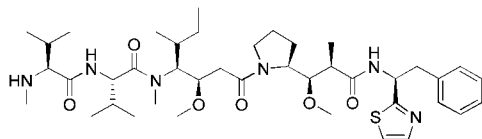
另一种优选的本发明药物是耳抑素肽类药物。耳抑素肽类药物是海兔毒素10(Dolastatin10)的类似物,而后者是从海洋软体动物海兔体内分离出来的具有生物活性的多肽。海兔毒素10通过结合微管蛋白(与长春新碱同样的结合区域)而抑制微管蛋白聚合。海兔毒素10,耳抑素肽PE,耳抑素肽E都是线性多肽,含有四个氨基酸(其中三个氨基酸是海兔毒素类化合物所独有的)和C-端酰胺基团。两个代表性的耳抑素肽类化合物,单甲基耳抑素肽E(MMAE)和单甲基耳抑素肽F(MMAF),都是抗体药物偶联物的首选药物。



Monomethyl Auristatin E(MMAE)

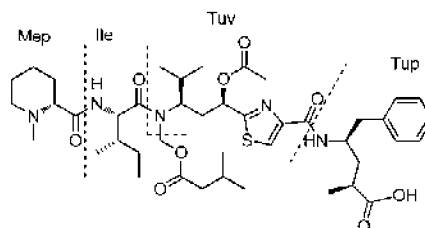


Monomethyl Auristatin F(MMAF)

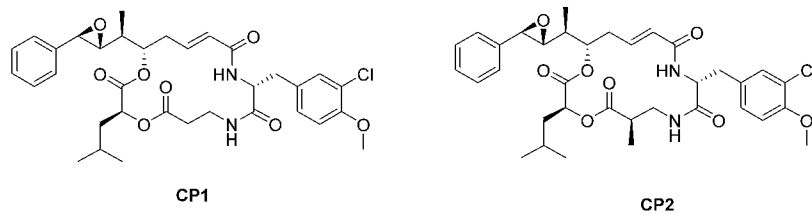


Monomethyl Dolastatin 10(MMAD)

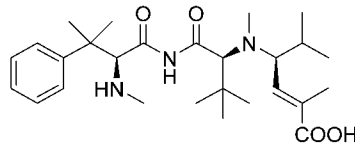
另一种优选的本发明药物是微管溶素(Tubulysin)。微管溶素首先由研究小组从粘细菌培养物中分离,是非常有效的细胞生长抑制剂,其通过抑制微管蛋白聚合并从而诱导细胞凋亡而起作用。微管溶素中的微管溶素D是最有效的,具有超过大多数其他微管蛋白调节剂(包括埃博霉素、长春碱和紫杉醇)10至100倍的活性。紫杉醇和长春碱目前用于多种癌症的治疗,而埃博霉素衍生物正在临床试验中进行活性评价。微管溶素D的合成衍生物将提供与抑制和关键结合相互作用有关的必要信息,并且作为抗癌剂可以具有优越的性质,所述抗癌剂作为分离的实体或作为靶向抗体或配体上的化学弹头。微管溶素D是复杂的四肽,其可以分为四个区域, Mep (D-N-甲基哌啶甲酸)、Ile(异亮氨酸)、Tuv(管式缬氨酸, tubuvaline)和Tup(管式苯丙氨酸, tubuphenylalanine),如下式所示:



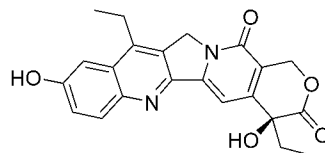
另一种优选的本发明药物是可抑制微管聚合的微生物来源的cryptophycin衍生物。Cryptophycin是从蓝藻的培养物中分离得到的一种能抑制微管生成的新型抗肿瘤活性物质,对多种肿瘤有活性。Cryptophycin是一个脂溶性化合物,含有2个肽键及2个酯键,有5个光学活性中心及1个环氧基团。双肽双酯键都在一个大环结构中。Cryptophycin衍生物CP1和CP2结构如下式所示:



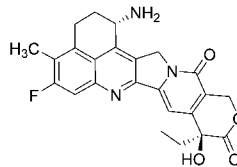
另一种优选的本发明药物是新型抗微管剂Taltobulin(HTI-286、SPA-110)。Taltobulin抑制纯化微管的多聚化，干扰细胞内微管组织、诱导有丝分裂阻断以及诱导细胞凋亡。Taltobulin是细胞增殖强效抑制剂，对18种人肿瘤细胞系的平均IC₅₀为2.5nM。和目前应用的抗微管剂相比，Taltobulin并不是p-糖蛋白的合适的底物，其中Taltobulin结构如下图所示。



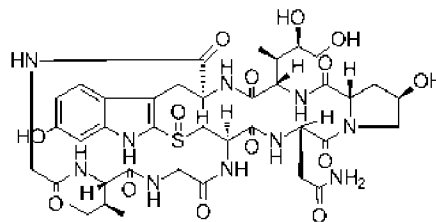
一方面，药物是喜树碱类药物衍生物SN-38。SN-38是伊立替康盐酸盐(CPT-11)的生物活性代谢物，为一类拓扑异构酶抑制剂。SN-38引起DNA拓扑异构酶I的抑制最强，剂量依赖性和时间依赖性地抑制DNA的合成，并造成频繁DNA单链断裂。其中SN-38结构如下图所示。



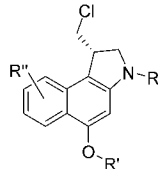
一方面，药物是喜树碱类药物衍生物Exatecan。是拓扑异构酶I抑制剂喜树碱的合成类似物，活性较SN-38更强，可引起DNA拓扑异构酶I的抑制最强，剂量依赖性和时间依赖性地抑制DNA的合成，并造成频繁DNA单链断裂。其中Exatecan结构如下式所示。



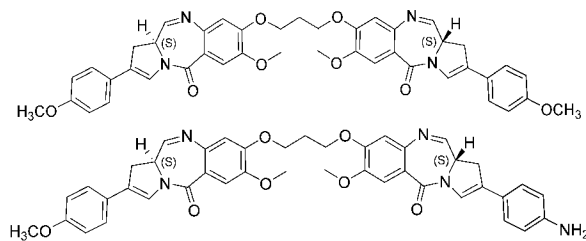
另一种优选的本发明药物是鹅膏蕈碱类药物(alpha-Amanitin)，结构如下图所示。alpha-Amanitin是一种来自毒蘑菇鬼笔鹅蕈(Amanita phalloides)的真菌毒素，二环八肽，能抑制真核RNA聚合酶II与RNA聚合酶III转录。



另一种优选的本发明药物是苯并二吡咯类抗生素(duocarmycins, CC-1065等)和它们的环丙基吡咯吲哚-4-酮(cyclopropapyrroloind-4-one, CPI)衍生物。这类化合物是有效的DNA小沟结合-烷基化试剂。环丙苯并吡咯吲哚-4-酮(cyclopropabenzindol-4-one, CBI)类似物的化学结构更稳定，生物活性更高，而且与它们含有天然CPI烷基化亚基的父系化合物相比更容易合成。一个代表性的CBI衍生物是酚羟基保护衍生物CBI，具有弱化的前药毒性和增强的水溶性(其中CBI-*seco*类结构通式如下图所示)：

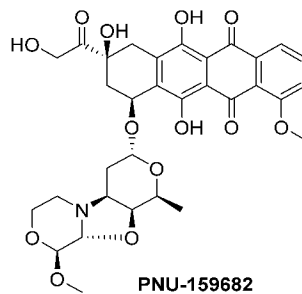


另一种优选的本发明药物是吡咯并苯二氮卓类 (pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines, PBDs) 或者 PBD 二聚体类 (PBD dimers)。PBD 是一类由链霉菌产生的天然产物，其独特特性在于能够在 DNA 小沟，确切是在嘌呤-鸟嘌呤-嘌呤序列处，形成非扭曲的共价加合物。应用 PBD 作为部分小分子策略靶向锁定 DNA 序列以及作为新型的抗癌和抗菌药物引起了越来越多的兴趣。应用一个柔性碳链连接两个 PBD 单元的 C8/C8' 的羟基基团，所得的二聚体具有增强的生物活性。PBD 二聚体被认为是可以产生序列选择性的 DNA 损伤，例如倒序的 5'-Pu-GATC-Py-3' 链间交联，从而导致其生物活性。这些化合物已被证明是高效的细胞毒性药物，可作为抗体药物偶联物的备选药物。



PBD 二聚体

另一种优选的本发明药物是 PNU-159682 衍生物，PNU-159682 是 Nemorubicin 在人肝微粒体中的主要活性代谢产物，与 MMDX 和阿霉素相比，活性提高 3000 倍。



PNU-159682

另一方面，药物并不仅仅局限于上述提到的类别，还包括所有可用于抗体药物偶联物的药物。并且尤其是那些能够通过头部的酰胺键来配位，如通过具有碱性胺基（一级胺或二级胺）来配位的细胞毒素，例如上文中所示的细胞毒素 D1-D12 的结构。

连接子

按照在细胞内药物释放的机制，“连接子”或“抗体药物偶联物的连接子”可被分为两类：不可断裂连接子和可断裂连接子。

对于含有不可断裂连接子的抗体药物偶联物，其药物释放机制为：偶联物与抗原结合并被细胞内吞后，抗体在溶酶体中被酶解，释放出由小分子药物，连接子，和抗体氨基酸残基共同组成的活性分子。由此带来的药物分子结构改变并不减弱其细胞毒性，但由于活性分子是带电荷的（氨基酸残基），从而导致其不能渗入邻近细胞。因此，此类活性药物不能杀死邻近不表达靶向抗原（抗原阴性细胞）的肿瘤细胞（旁观者效应，bystander effect）。

可断裂连接子，顾名思义，可以在目标细胞内断裂并释放出活性药物（小分子药物本身）。可断裂连接子可分为两个主要的类别：化学不稳定连接子和酶不稳定连接

子。化学不稳定连接子可以由于血浆和细胞质性质的不同而选择性的断裂。这样的性质包括pH值，谷胱甘肽浓度等。对pH值敏感的连接子，通常又称为酸断裂连接子。这样的连接子在血液的中性环境下相对稳定(pH7.3-7.5)，但是在弱酸性的内涵体(pH5.0-6.5)和溶酶体(pH4.5-5.0)内将会被水解。第一代的抗体药物偶联物大多应用这类连接子，例如脲，碳酸酯，缩醛，缩酮类。由于酸断裂连接子有限的血浆稳定性，基于此类连接子的抗体药物偶联物通常具有较短的半衰期(2-3天)。这种较短的半衰期在一定程度上限制了pH敏感连接子在新一代抗体药物偶联物中的应用。

对于谷胱甘肽敏感的连接子，又称二硫键连接子。药物释放是基于细胞内谷胱甘肽的高浓度(毫摩尔范围)与血液中相对较低的谷胱甘肽浓度(微摩尔范围)差异引起的。对于肿瘤细胞而言尤其如此，其低含氧量导致还原酶的活性增强，因而导致更高的谷胱甘肽浓度。二硫键具有热力学稳定性，因此在血浆中具有较好的稳定性。

酶不稳定连接子，如肽连接子，能够更好地控制药物释放。肽连接子能够被溶酶体内蛋白酶，如组织蛋白酶(CathepsinB)或纤溶酶(在一些肿瘤组织中此类酶含量增加)，有效地切断。这种肽连接被认为在血浆循环中非常稳定，这是因为细胞外不合宜的pH值及血清蛋白酶抑制剂导致蛋白酶通常在不具备活性。鉴于较高的血浆稳定性和良好的细胞内断裂选择性和有效性，酶不稳定连接子被广泛用做抗体药物偶联物的可断裂连接子。典型的酶不稳定连接子包括 Val-Cit(VC)， Val-Ala(VA), Gly-Gly-Phe-Gly (GGFG)等。

自释放连接子一般嵌合在可断裂连接子与活性药物之间，或者本身就是可断裂连接子的一部分。自释放连接子的作用机制是：当可断裂连接子在合宜的条件下断裂后，自释放连接子能够自发地进行结构重排，进而释放与之连接的活性药物。常见的自杀式连接子包括对氨基苄醇类(PAB)和 β -葡萄糖醛酸苷类(β -Glucuronide)等。

应用

本发明还提供了本发明抗体的用途，例如用于制备诊断制剂、或制备用于预防和/或治疗CD73相关的疾病的药物。所述CD73相关的疾病包括肿瘤发生、生长和/或转移、肿瘤耐药相关疾病、炎症、代谢相关疾病等。

本发明抗体、NDC或CAR-T等的用途，包括(但不限于)：

(i)诊断、预防和/或治疗肿瘤发生、生长和/或转移，尤其是CD73高表达的肿瘤。所述肿瘤包括(但不限于)：乳腺癌(如三阴性乳腺癌)、肺癌(如非小细胞肺癌)、胰腺癌、恶性脑胶质瘤、胃癌、肝癌、食道癌、肾癌、结直肠癌、膀胱癌、前列腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、宫颈癌、白血病、骨髓瘤、血管肉瘤等；尤其是三阴性乳腺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、恶性脑胶质瘤，更优选为三阴性乳腺癌和/或非小细胞肺癌。

(ii)诊断、预防和/或治疗自身免疫疾病。所述自身免疫疾病包括(但不限于)：系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、溃疡性结肠炎、I型糖尿病、银屑病、多发性硬化症。

(iii)诊断、预防和/或治疗炎症。所述炎症包括(但不限于)：风湿性关节炎、骨关节炎、强直性脊柱炎、痛风、莱特尔综合征、牛皮癣性关节炎、感染性关节炎、结核性关节炎、病毒性关节炎、真菌性关节炎、肾小球性肾炎、全身性红斑狼疮、克罗恩病、溃疡性结肠炎、急性肺损伤、慢性阻塞性肺疾病、特发性肺纤维化。

(iv)诊断、预防和/或治代谢相关疾病。所述代谢相关疾病包括(但不限于)：糖尿病、食源性肥胖和脂肪炎症。

药物组合物

本发明还提供了一种组合物。在优选例中，所述的组合物是药物组合物，它含有上述

的抗体或其活性片段或其融合蛋白或其 NDC 或相应的 CAR-T 细胞, 以及药学上可接受的载体。通常, 可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中, 其中 pH 通常约为 5-8, 较佳地 pH 约为 6-8, 尽管 pH 值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药, 其中包括(但并不限于): 瘤内、腹膜内、静脉内、或局部给药。

本发明所述抗体也可以是由核苷酸序列在细胞内表达用于的细胞治疗, 比如, 所述抗体用于嵌合抗原受体T细胞免疫疗法(CAR-T)等。

本发明的药物组合物可直接用于结合 CD73 蛋白分子, 因而可用于预防和治疗肿瘤等疾病。此外, 还可同时使用其他治疗剂。

本发明的药物组合物含有安全有效量(如 0.001-99wt%, 较佳地 0.01-90wt%, 更佳地 0.1-80wt%)的本发明上述的单克隆抗体(或其偶联物)以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于): 盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式, 例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量, 例如每天约 1 微克/千克体重-约 5 毫克/千克体重。此外, 本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

使用药物组合物时, 是将安全有效量的免疫偶联物施用于哺乳动物, 其中该安全有效量通常至少约 10 微克/千克体重, 而且在大多数情况下不超过约 50 毫克/千克体重, 较佳地该剂量是约 10 微克/千克体重-约 20 毫克/千克体重。当然, 具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素, 这些都是熟练医师技能范围内的。

对于NDC而言, 由于本发明提供的纳米抗体-药物偶联物可以靶向瞄准特殊的细胞群体, 与细胞表面特异蛋白(抗原)结合, 从而通过结合物内吞或药物渗入使得药物以活性形式释放到细胞内, 因此, 本发明的纳米抗体-药物偶联物可以用于治疗目标疾病, 上面提到的抗体-药物偶联物可以以治疗有效量, 通过合适的途径给予受试者(例如人)。需要治疗的受试者可以是有风险, 或怀疑患有与特定抗原的活性或表达量有关病症的患者。这样的患者可以通过常规体检来鉴定。

当用本发明的纳米抗体-药物偶联物治疗时, 可以通过本领域常规的方法进行递送。例如, 它可以通过使用脂质体, 水凝胶, 环糊精, 生物可降解的纳米胶囊, 或生物粘附性微球被引入到细胞中。或者, 所述核酸或载体可在本地通过直接注射或通过使用输注泵递送。

本发明的主要优点包括:

(a)本发明纳米抗体具有优异的生物活性和特异性, 并具有很高的亲和力(ELISA测定其 EC_{50} 为0.014~0.070 μ g/mL), 具有CD73酶功能的抑制活性(酶活性测定其 IC_{50} 为4.66~38.18 ng/mL)。此外, 对肿瘤细胞的CD73具有良好的结合亲和力(FACS测定其 EC_{50} 为0.037~0.227 μ g/mL), 并抑制肿瘤细胞CD73酶的功能(IC_{50} 值为0.083~0.48 μ g/mL), 可用做靶向CD73的治疗抗体。

(b)本发明的纳米抗体和NDC具有显著的抗肿瘤活性, 而对于正常的细胞无明显毒副作用。

(c)本发明的纳米抗体对人T淋巴细胞具有显著的增殖保护作用, 能有效逆转腺苷单磷酸(AMP)对T淋巴细胞的增殖抑制, 并促进 $INF\gamma$ 的表达和分泌, 其 EC_{50} 为0.0008~0.0247 μ g/mL。

(d)本发明所述的纳米抗体-药物偶联物(NDC)具有优异的CD73-依赖的抗肿瘤活性, 即对CD73-正常或低表达的细胞无明显毒副作用, 而对CD73-中高表达的肿瘤细

胞具有极高的杀伤活性，细胞增殖抑制试验测定其 IC_{50} 为 $0.0025\sim 0.0658\mu\text{g/mL}$ 。

(e)本发明所述的NDC对正常人T淋巴细胞的增值没有明显的毒副作用，细胞增殖抑制试验测定其 IC_{50} 为 $>15\mu\text{g/mL}$ 。

(f)本发明的NDC对人T淋巴细胞具有显著的增殖保护作用，能有效逆转腺苷单磷酸(AMP)对T淋巴细胞的增殖抑制并促进 $INF\gamma$ 的表达和分泌，其 EC_{50} 为 $0.0046\sim 0.0379\mu\text{g/mL}$ 。

下面结合具体实施例，进一步陈述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明详细条件的实验方法，通常按照常规条件如Sambrook等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。

实施例1 靶向人CD73纳米抗体的发现和制备

首先制备人CD73蛋白的胞外区(CD73-ECD)作为抗原。参照NCBI:NP_002517.1氨基酸的第27位到第547位，采用基因克隆技术和哺乳动物载体表达体系获得碳末端多组氨酸标记(C-terminus polyhistidine-tagged)的抗原：

WELTILHTNDVHSRLQTSSESSKCVNASRCMGGVARLFTKVQQIRRAEPNVLLL
DAGDQYQGFTIWFVYKGAEVAHFMNALRYDAMALGNHEFDNGVEGLIEPLLKEAKF
PILSANIKAKGPLASQISGLYLPYKVLPGDEVVGIVGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEIT
ALQPEVDKLLKTLNVNKKIALGHSGFEMDKLIAQKVRGVDVVVGHSNTFLYTGNPPSK
EVPAGKYPFIVTSDGRKVPVQAYAFGKYLGYLKIEFDERGNVISSHGPNILLNSSIPE
DPSIKADINKWRIKLDNYSTQELGKTIVYLDGSSQSCRFRECNMGNLICDAMINNNLRH
TDEMFWNHVSMCILNGGGIRSPIDERNNGTITWENLAAVLPGGTFDLVQLKGSTLKK
AFEHSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVDLSRKPGDRVVKLDVLCTKCRVPSYDPLKMD
EVYKVILPNFLANGDGFQMIKDELLRHDSGDQDINVVSTYISKMKVIYPAVEGRIKAH
HHHHHHHHH

利用上述制备的CD73胞外区蛋白对羊驼(Alpaca)进行免疫，免疫间隔时间21天，最后一次免疫10天后采集部分外周血(PBMC)；经PBMC分离及VHH抗体片段克隆，构建噬菌体展示库和酵母展示库。通过反复淘选，单克隆ELISA，FACS筛选等步骤，从噬菌体展示库获得4款高活性且具独立序列的纳米抗体(3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02)，从酵母展示库获得5款活性抗体且具独立序列(1-E7、2-B10、2-G9、3-A3、3-F1)。

实施例2 CD73纳米抗体对人CD73抗原亲和力SPR的测定

表面等离子体共振(SPR)测定：使用Protein A传感器固化抗体，固化高度为1.5nM左右。缓冲液为PBST(PBS+0.02% tween20)，CD73-ECD蛋白样品稀释至500, 250, 125, 62.5, 31.3, 0nM。亲和力检测：平衡60s，结合180s，解离180s，检测温度 25°C ，使用ForteBio OCTET R2 系统进行动力学表征分析。

检测结果如图1所示，3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02对CD73-ECD有很强的亲和性，结合常数(KD)分别为1.997nM, 0.826nM, 0.919nM, 0.795nM。

实施例3 CD73纳米抗体对人CD73抗原亲和力ELISA的测定

用包被液将CD73蛋白胞外区(CD73-ECD)稀释成 $1\mu\text{g/mL}$ ，包被ELISA板， $100\mu\text{L}$ /孔， 4°C ，过夜。洗去多余抗原，用1%BSA于室温封闭2h，然后加入5倍梯度稀释的

各单克隆抗体, 100 μ L/孔, 室温孵育1h; 洗去未结合的抗体, 加入合适浓度辣根过氧化物酶标记的葡萄球菌A蛋白, 100 μ L/孔, 室温孵育0.5h。洗去未结合的二抗, 加入TMB显色液反应大约15min, 加入1M HCL, 50 μ L/孔, 终止显色反应, 然后在450nm处测定吸光度, 并分析数据。

5 检测结果如图2所示, 3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02对CD73-ECD有很强的亲和性, EC₅₀分别0.070 μ g/mL, 0.052 μ g/mL, 0.035 μ g/mL, 0.014 μ g/mL。

针对酵母来源的5款抗体, 经HEK293F细胞瞬转表达后继续培养2天后取上清, 采用100 μ L、10 μ L、1 μ L进行ELISA测定。

10 检测结果如图11所示, 纳米抗体1-E7、2-B10、2-G9、3-A3、3-F1均有较强的CD73-ECD结合亲和力。

综上结果说明, 本实施例CD73纳米抗体与人CD73抗原具有良好的结合活性。

实施例4 CD73纳米抗体对重组人CD73酶催化功能的抑制活性的测定

15 用抗原稀释液将人重组CD73酶(CD73胞外区)稀释成0.1 μ g/mL, 均匀铺到96孔低吸附培养板中, 25 μ L/孔。将50 μ L按照3倍梯度从300ng/mL稀释到0.137ng/mL的CD73抗体加入培养板中, 混匀(终浓度为1350ng/mL~0.069ng/mL), 37 $^{\circ}$ C孵育1h后, 加入25 μ L含有1.2mM AMP和0.4mM ATP的混合液, 37 $^{\circ}$ C孵育1h。取出上述反应液 50 μ L加入另一96孔白板中, 向每孔加入50 μ L CellTiter-Glo试剂, 混匀避光反应3-5min, 采用酶标仪检测荧光信号强度。

20 检测结果如图3所示, 3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02均具有显著抑制重组CD73蛋白酶水解AMP的活性, 其IC₅₀分别为38.18ng/mL、9.47ng/mL、5.63 ng/mL, 4.66 ng/mL。

综上结果说明, 本实施例CD73单克隆抗体对重组人CD73酶催化功能具有显著的抑制活性。

25 实施例5 CD73纳米抗体对肿瘤细胞表面CD73的结合亲和力的测定

采用CD73-中高表达的三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231、非小细胞肺癌细胞NCI-H1299、PC9、SW1573、NCI-H1975和NCI-H1373作为靶细胞, 将100 μ L按照5倍梯度从10 μ g/mL稀释到0.016 μ g/mL的受试抗体作为一抗, 分别与悬浮于100 μ L RPMI-1640无血清培养基中的1 $\times 10^5$ 个肿瘤细胞混匀, 使其终浓度为5 μ g/mL稀释到30 0.008 μ g/mL, 然后于4 $^{\circ}$ C孵育1h, PBS洗涤细胞两次以去除未结合的一抗, 再将靶细胞与200 μ L, 2 μ g/mL, PE标记的二抗4 $^{\circ}$ C孵育30min, PBS洗涤细胞两次以去除未结合的二抗, 最后将细胞重悬在200 μ L PBS中, 通过流式细胞仪测定受试抗体对相应细胞表面CD73的结合亲和力(Binding affinity)。

35 检测结果如图4A所示, 3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02对MDA-MB-231具有优异的结合亲和力, EC₅₀分别为0.120 μ g/mL、0.037 μ g/mL、0.059 μ g/mL、0.037 μ g/mL;

检测结果如图4B所示, 3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02对NCI-H1299具有优异的结合亲和力, EC₅₀分别为0.222 μ g/mL、0.068 μ g/mL、0.080 μ g/mL、0.078 μ g/mL;

检测结果如图5A所示, 3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02对PC9具有优异的结合亲和力, EC₅₀分别为0.133 μ g/mL、0.041 μ g/mL、0.057 μ g/mL、0.044 μ g/mL;

40 检测结果如图5B所示, 3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02对NCI-H1975具有优异的结合亲和力, EC₅₀分别为0.106 μ g/mL、0.057 μ g/mL、0.068 μ g/mL、0.055 μ g/mL;

检测结果如图6A所示, 3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02对SW1573具有优异的结合亲和力, EC₅₀分别为0.116 μ g/mL、0.062 μ g/mL、0.067 μ g/mL、0.061 μ g/mL;

检测结果如图6B所示, 3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02对NCI-H1373具有优异的结合

合亲和力, EC_{50} 分别为0.227 μ g/mL、0.135 μ g/mL、0.163 μ g/mL、0.112 μ g/mL;

检测结果如图7所示, 3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02对HC44具有优异的结合亲和力, EC_{50} 分别为0.234 μ g/mL、0.096 μ g/mL、0.114 μ g/mL、0.105 μ g/mL;

针对酵母来源的6款抗体, 经HEK293F细胞瞬转表达后继续培养2天后取上清, 采用100 μ L、10 μ L、1 μ L与MDA-MB-231细胞孵育后进行流式细胞仪测定其结合活性。

检测结果如图12所示, 纳米抗体1-E7、2-B10、2-G9、3-A3、3-F1均有较强的CD73-ECD结合亲和力。

综上结果说明, 本实施例CD73纳米抗体能够以人源肿瘤细胞的CD73为作用靶点并具有良好的结合活性。

实施例6 CD73纳米抗体对肿瘤细胞表面CD73酶催化功能的影响

采用CD73-高表达的三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231作为靶细胞。铺合适数量的肿瘤细胞(经预实验确认)于96孔板中, 37°C培养16小时之后, 用无血清RPMI-1640培养基洗涤细胞3次, 将50 μ L按照3倍梯度从10 μ g/mL稀释到0.0045 μ g/mL的受试抗体加入96孔板中, 37°C孵育30min后, 加入25 μ L 0.9mM的AMP, 置37°C, 5%CO₂培养3h。取出上述培养上清25 μ L加入另一个96孔白板中, 加入25 μ L 0.1mM ATP, 混匀。向每孔加入50 μ L CellTiter-Glo试剂, 混匀避光反应3~5min, 采用酶标仪检测荧光信号强度。

检测结果如图8所示, 3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02均能显著抑制MDA-MB-231细胞表面CD73催化水解AMP的功能, IC_{50} 分别为0.483 μ g/mL, 0.088 μ g/mL, 0.093 μ g/mL, 0.083 μ g/mL。

实施例7 CD73纳米抗体对T淋巴细胞增殖和表达IFN- γ 的保护作用

PBMC的复苏、扩增与分选: 首先采用含有500ng/mL CD3/CD28抗体和100IU/mL IL-2的培养基将PBMC复苏培养3-4天, 然后采用分选试剂盒(Stemcell, Cat#1795)分选PBMC后获得CD3阳性的T淋巴细胞。

T淋巴细胞增殖试验: 将上述分选得到的T淋巴细胞进行荧光标记, 将预先配好的CFSE(carboxyfluorescein succinimidyl ester)加入细胞悬液(终浓度2.5 μ M), 使其在37°C标记5min后以PBS洗涤3次。然后, 将CFSE-标记的T细胞铺至96孔板中(2 $\times$ 10⁴个细胞/孔), 每孔加入50 μ L按照梯度稀释的纳米抗体(终浓度15 μ g/mL~0.00019 μ g/mL, n=4), 并加入50 μ L腺苷单磷酸(AMP, 终浓度为0.25mM), 混匀, 培养4-5天后收集培养上清, 采用流式细胞分选仪(FACS)读取并统计固定体积的细胞数, 使用Flowjo软件绘制细胞增殖曲线并计算 EC_{50} 值。摄取50 μ L/孔T细胞培养上清用于检测IFN- γ 蛋白浓度, 采用ELISA试剂盒, 并参照试剂盒所提供的技术操作步骤。

结果如图9显示, CD73纳米抗体3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02对人T淋巴细胞具有显著的增殖保护作用, 能有效逆转AMP对T淋巴细胞的增殖抑制, 其 EC_{50} 分别为0.0247 $\pm$ 0.0052 μ g/mL, 0.0008 $\pm$ 0.0002 μ g/mL, 0.0025 $\pm$ 0.0007 μ g/mL, 0.0012 $\pm$ 0.0004 μ g/mL。

结果如图10显示, CD73纳米抗体3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02能有效逆转AMP对T细胞表达/分泌INF- γ 的抑制作用。

综上结果说明, 本实施例CD73纳米抗体不仅能够抑制肿瘤细胞表面CD73酶活性, 还能够对T细胞表面CD73的酶活功能抑制, 逆转AMP对T细胞增殖和功能的影响, 保护T细胞。

实施例8 CD73抗体与肿瘤细胞结合导致内吞至细胞内溶酶体

将50%密度MDA-MB-231细胞铺于26孔板中，于37°C培养16 h后加入5μg/mL的CD73纳米抗体，分别于37°C孵育4h或4°C孵育1h，PBS洗涤三次以去除未与细胞结合的抗体，采用4%的多聚甲醛于室温固定30min。PBS洗涤三次，采用0.4% Triton X-100透化10min。PBS洗涤三次后，37°C条件下孵育Lamp-2(兔抗人)抗体1h，以标记细胞溶酶体的位置。采用PBS洗去未结合的抗体，37°C孵育R-PE标记的羊抗人和Alexa Fluor 488标记的驴抗兔二抗30 min。洗去未结合的二抗，用DAPI染色10min以标记细胞核位置，之后用荧光显微镜(200×)观察抗体内吞情况。

结果如图13所示，3-D7, 5-E11, 4-D04, 4-B02均能快速并大幅度的被MDA-MB-231细胞内吞至溶酶体。该结果表明，本发明的抗体适合用于制备NDC，提示CD73-NDC将具有良好的NDC药物特性，可用于广谱且高特异性靶向CD73阳性肿瘤治疗药物的前景。

实施例9 3-D7-vc-MMAE、5-E11-vc-MMAE、4-D01-vc-MMAE的制备

(一) 3-D7-vc-MMAE偶联物的制备

将3-D07蛋白原液用50mM 磷酸二氢钾-氢氧化钠(KH₂PO₄-NaOH)/150mM 氯化钠(NaCl)/1mM 二乙基三胺五乙酸(DTPA)，pH 7.4反应缓冲液稀释至5mg/mL，加入3-4倍过量摩尔比的三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)，反应液于25°C搅动2.5小时。

将上述反应液冷至0-10°C，未经纯化加入适量的二乙基乙酰胺(DMA)，再加入6倍过量摩尔比的mc-vc-MMAE(10mg/ml预先溶在DMA中)，保证反应体系中DMA的体积占比不超过10%，于10-25°C搅动2小时进行偶联。

采用脱盐柱将偶联反应混合物用pH 6.0的组氨酸-醋酸/蔗糖凝胶过滤纯化，根据UV280 紫外吸收值收集出峰样品。然后经由0.22微米孔径的过滤装置除菌，-80°C保存。

通过质谱分析抗体偶联物3-D7-vc-MMAE的质量数与理论分子量差值(图21)，计算获得精确载药量约为4。

(二) 5-E11-vc-MMAE偶联物的制备

将5-E11蛋白原液用50mM 磷酸二氢钾-氢氧化钠(KH₂PO₄-NaOH)/150mM 氯化钠(NaCl)/1mM 二乙基三胺五乙酸(DTPA)，pH 7.4反应缓冲液稀释至5mg/mL，加入3-4倍过量摩尔比的三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)，反应液于25°C搅动2.5小时。

将上述反应液冷至0-10°C，未经纯化加入适量的二乙基乙酰胺(DMA)，再加入6倍过量摩尔比的mc-vc-MMAE(10mg/ml预先溶在DMA中)，保证反应体系中DMA的体积占比不超过10%，于10-25°C搅动2小时进行偶联。

采用脱盐柱将偶联反应混合物用pH 6.0的组氨酸-醋酸/蔗糖凝胶过滤纯化，根据UV280 紫外吸收值收集出峰样品。然后经由0.22微米孔径的过滤装置除菌，-80°C保存。

通过质谱分析抗体偶联物5-E11-vc-MMAE的质量数与理论分子量差值(图22)，计算获得精确载药量为4(图22)。

(三) 4-D04-vc-MMAE偶联物的制备

将4-D04蛋白原液用50mM 磷酸二氢钾-氢氧化钠(KH₂PO₄-NaOH)/150mM 氯化钠(NaCl)/1mM 二乙基三胺五乙酸(DTPA)，pH 7.4反应缓冲液稀释至5mg/mL，加入3-4倍过量摩尔比的三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)，反应液于25°C搅动2.5小时。

将上述反应液冷至0-10°C，未经纯化加入适量的二乙基乙酰胺(DMA)，再加入6

倍过量摩尔比的mc-vc-MMAE(10mg/ml预先溶在DMA中), 保证反应体系中DMA的体
积占比不超过10%, 于10-25°C搅动2小时进行偶联。

采用脱盐柱将偶联反应混合物用pH 6.0的组氨酸-醋酸/蔗糖凝胶过滤纯化, 根据
UV280 紫外吸收值收集出峰样品。然后经由0.2 2微米孔径的过滤装置除菌, -80°C保
存。

通过质谱分析抗体偶联物4-D04-vc-MMAE的质量数与理论分子量差值(图22), 计
算获得精确载药量约为4 (图23)。

实施例10 CD73-NDC针对CD73高表达的肿瘤细胞的体外抗肿瘤活性

实例所使用细胞系购自于美国典型培养物保藏中心(ATCC)、中国科学院细胞库、
南京科佰生物有限公司, 并按照相应的说明进行培养, 包括: MDA-MB-453、
MDA-MB-231、PC9、NCI-H1975、NCI-H441、SW1573。将上述处于对数生长期的
细胞, 分别以每孔200-2000个细胞的密度(依不同细胞的生长速率而定)接种至96孔细
胞培养板中, 150μL/孔, 37°C, 5% CO₂培养约5h后, 分别加入不同浓度的CD73-NDCs
(15μg/mL~0.00019μg/mL), 每个药物浓度设置2-4个复孔, 及相应的溶媒对照和空
白对照孔, 作用 5-9天后(根据细胞生长速度, 保证细胞分裂足够次数), 倾去培养液,
加入MTS反应液(购自Promega, cat# G3581), 100μL/孔, 于37°C反应至预期颜色深浅,
测定每组的细胞活力(OD490nm), 并按照以下公式计算细胞存活率: 存活率=(OD给
药-OD空白)/(OD对照-OD空白)×100%。通过GraphPad Prism 8软件分析上述数据, 并分
别计算上述CD73抗体-药物偶联物在不同细胞株上的IC₅₀值。

两种优选的CD73-NDC: 3-D7-MMAE、5-E11-MMAE以及作为对照的CD73-ADC
Hu001-MMAE的体外抗肿瘤活性结果分别如图14至图16所示。

如图14A所示, CD73-NDCs对CD73低表达的细胞MDA-MB-453的增殖抑制作用
不明显, 而对CD73中高表达的MDA-MB-231 (图14B)、PC9 (图15A)、NCI-H1975
(图15B)、NCI-H441 (图16A)、SW1573 (图16B) 均显示很强的细胞增殖抑制作
用。

总体而言, CD73-NDC的细胞毒性(IC₅₀值)表明CD73-NDC的细胞毒活性与受试
细胞的CD73表达水平直接相关, 因此判断为CD73靶标特异性细胞毒性。表-3汇总了
部分细胞增殖抑制测试的IC₅₀值。

表-3: CD73纳米抗体-药物偶联物的体外抗肿瘤活性

NDC名称	细胞增殖抑制率IC ₅₀ ±SD (μg/mL)					
	MDA-MB-453	MDA-MB-231	PC9	NCI-H1975	NCI-H441	SW1573
3-D7-MMAE	>15	0.0025±0.0001	0.0035±0.0005	0.0048±0.0001	0.0037±0.0001	0.0045±0.0002
5-E11-MMAE	>15	0.0124±0.0004	0.0042±0.0003	0.0366±0.0185	0.0089±0.0004	0.0658±0.0098
Hu001-MMAE	>15	0.0063±0.0015	0.0045±0.0005	0.0075±0.0007	0.0048±0.0001	0.0048±0.0001

实施例11 CD73-NDC对T淋巴细胞增殖和表达IFN-γ的保护作用

人外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)冻存管均由江苏西
迪尔生物技术有限公司提供。首先采用含有500ng/mL CD3/CD28抗体和100IU/mL
IL-2的培养基将PBMC复苏培养3-4天, 然后采用分选试剂盒(供应商: Stemcell,

Cat#1795)分选出CD3阳性的 T淋巴细胞,再对其进行荧光标记。将预先配好的荧光染料CFSE(carboxyfluorescein succinimidyl ester)加入细胞悬液(终浓度2.5 μ M),使其在37 $^{\circ}$ C孵育5min后以PBS洗涤3次后用于试验。

5 先是观察不同浓度CD73-NDC对T细胞增殖曲线的影响,将CFSE-标记的T细胞铺至96孔板中(2×10^4 个细胞/孔),每孔加入按照梯度稀释的CD73-NDC(终浓度15 μ g/mL $\sim$ 0.000192 μ g/mL, n=2)或加入对照溶媒,培养5天后采用FACS读取活细胞数,作剂量曲线图计算IC₅₀值。如图17A所示,3-D7-MMAE和5-E11-MMAE在受试浓度区间未显示明显的毒副作用(IC₅₀>15 μ g/mL)。

10 在另一组试验中,将CFSE-标记的T细胞铺至96孔板中(2×10^4 个细胞/孔),每孔加入50 μ L按照梯度稀释的NDC(终浓度3 μ g/mL $\sim$ 0.00019 μ g/mL, n=2),并加入50 μ L AMP(终浓度为0.25mM),混匀,培养4-5天后收集培养上清,采用流式细胞分选仪(FACS)读取并统计固定体积的细胞数,使用Flowjo软件绘制细胞增殖曲线并计算EC₅₀值。结果如图17B显示,3-D7-MMAE和5-E11-MMAE对人T淋巴细胞具有显著的增殖保护作用,能有效逆转AMP对T淋巴细胞的增殖抑制,其EC₅₀分别为0.0379 $\pm$ 0.0066 μ g/mL,
15 0.0046 $\pm$ 0.0012 μ g/mL。

摄取50 μ L/孔T细胞培养上清用于检测IFN- γ 蛋白浓度,采用ELISA试剂盒(Sinobiological, Cat#KIT11725A),并参照试剂盒所提供的技术操作步骤。结果如图18显示,3-D7-MMAE和5-E11-MMAE能有效逆转AMP对T细胞表达/分泌INF-g的抑制作用

20 本实施例的结果说明CD73-NDC对T淋巴细胞不仅无毒性作用,并且能有效逆转AMP/Ado对T淋巴细胞的增殖的抑制作用。

综上,CD73-NDC相关实施例的研究明确表明:

25 1、CD73-NDC 3-D7-MMAE和5-E11-MMAE均具有良好的CD73特异的肿瘤细胞杀伤活性,即针对CD73-中高表达的肿瘤细胞增殖具有极强的抑制作用,而对CD73-低表达的细胞增殖无明显毒性;

2、CD73-NDC 3-D7-MMAE和5-E11-MMAE针对正常人的T淋巴细胞的细胞增殖无明显毒性;

30 3、CD73-NDC 3-D7-MMAE和5-E11-MMAE对T淋巴细胞不仅无毒性作用,并且能有效逆转AMP/Ado对T淋巴细胞的增殖的抑制作用;

实施例12 CD73纳米抗体及融合蛋白的批量表达生产和纯化

35 将3-D7, 5-E11纳米抗体可变区序列克隆至hIgG1表达载体(3-D7-FC1, 3-D7-FC2, 3-D7-FC3, 5-E11-FC1, 5-E11-FC2, 5-E11-FC3),或重组/融合蛋白表达载体(3-D7-HLE, 3-D7-ABD, 5-E11-ABD),经瞬转HEK293后置无血清培养基悬浮培养6天。收集培养上清开展纯化,蛋白定量和SDS-PAGE检测。

如图19,图20所示,来源于3-D7, 5-E11的嵌合纳米抗体和重组融合蛋白均能高效率地表达,生产和纯化。

本发明纳米抗体序列

SEQ NO.1: 3-D7 CDR1 GFLLDYYV

SEQ NO.2: 3-D7 CDR2 ISGSDRST

SEQ NO.3: 3-D7 CDR3 AADPSPVTVQAMCLPRFPVPY

5 SEQ NO.4: 3-D7 VH

QRQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFLLDYYVIGWFRQAPGKEREGVSCISGS
DRSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYFCAAADPSPVTVQAMC
LPRFPVPYWGQGTQVTVST

10 SEQ NO.5: 5-E11 CDR1 GFTLDYYN

SEQ NO.6: 5-E11 CDR2 SSNSGGST

SEQ NO.7: 5-E11 CDR3 AAYRGWHPSLDARVYDY

SEQ NO.8: 5-E11 VH

15 ALQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEVSGFTLDYYNIGWFRQAPGKEREGVSCS
SNSGGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTGVYYCAAAYRGWHPSL
DARVYDYWGQGTQVTVSS

SEQ NO.9: 4-D04 CDR1 GFTLDYYN

SEQ NO.10: 4-D04 CDR2 ISSSEGST

20 SEQ NO.11: 4-D04 CDR3 AADRYYYCSLHVSQYDY

SEQ NO.12: 4-D04 VH

QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYNIGWFRQAPGKEREGVSCI
SSSEGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAAADRYYYCSL
HVSQYDYWGQGTQVTVSS

25

SEQ NO.13: 4-B02 CDR1 GFPLDYYS

SEQ NO.14: 4-B02 CDR2 IGSSDGST

SEQ NO.15: 4-B02 CDR3 AALKYYYCSGHEAIYDY

SEQ NO.16: 4-B02 VH

30 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPLDYYSIGWFRQAPGKEREGVSCI
GSSDGSTYYADSVKGRFTISRDNAENTVWLQMNLSLKPEDTAVYYCAAALKYYYCSG
HEAIYDYWGQGTQVTVSG

35 SEQ NO.17: 1-E7 CDR1 GFTLDYYN

SEQ NO.18: 1-E7 CDR2 ISNSDGST

SEQ NO.19: 1-E7 CDR3 AAYRGWHPSLDARVYDY

SEQ NO.20: 1-E7 VH

40 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYNIGWFRQAPGKEREGVSCI
SNSDGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLMNSLKPEDTAVYYCAAAYRGWHPSL
DARVYDYWGQGTQVTVSS

SEQ NO.21: 2-B10 CDR1 GFTLDDNA

SEQ NO.22: 2-B10 CDR2 MRTSDGDT

SEQ NO.23: 2-B10 CDR3 AAALGTYYS GFYYLAGDGMDY

45 SEQ NO.24: 2-B10 VH

QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDDNAIGWFRQAPGKEREGVAC
MRTSDGDTYYADSVKGRFTISRDNAKNTMYLQMNLSLKPEDTAVYYCAAALGTYYS
GFYYLAGDGMDYWGKGTQVTVSS

50 SEQ NO.25: 2-G9 CDR1 GFLLDYYT

SEQ NO.26: 2-G9 CDR2 ISSSDSSP

SEQ NO.27: 2-G9 CDR3 ALRANVYDY

SEQ NO.28: 2-G9 VH

5 QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFLLDYYTIGWFRQAPGKELEGVSCI
SSSDSSPYDADSVKGRFTMSRDNANNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCAAQRYYYCA
LRANVYDYWGQGTQVTVST

SEQ NO.29: 3-A3 CDR1 GFPLDYYT

SEQ NO.30: 3-A3 CDR2 ISSSDSSP

10 SEQ NO.31: 3-A3 CDR3 SLRANVYDY

SEQ NO.32: 3-A3 VH

15 QVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASGFPLDYYTIGWFRQAPGKELEGVSCI
SSSDSSPYDADSVKGRFTMSRDNANNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCAAQRYYYCSL
RANVYDYWGQGTQVTVSS

SEQ NO.33: 3-F1 CDR1 GFTLDYYT

SEQ NO.34: 3-F1 CDR2 IRSSDSSP

SEQ NO.35: 3-F1 CDR3 SLTANVYDY

SEQ NO.36: 3-F1 VH

20 QVQLVESGVSLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYTIGWFRQAPGKELEGISCI
SSDSSPYDADSVKDRFTMSRDNANNTVY LQMNSLKPEDTADYYCAAQRYYYCSLT
ANVYDYWGQGTQVTVSS

SEQ NO.37: 3-D7-FC1

25 QRQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFLLDYYVIGWFRQAPGKERE
GVSCI
SGSDRSTYYADSVKGRFTISRDN
AKNTVY LQMNSLKPEDTAVYFCAADPSPVTVQ
AMCLPRFPVPYWGQGTQVTVSTEPKSSDK
THTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKN
30 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ NO.38: 3-D7-FC2

35 QRQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFLLDYYVIGWFRQAPGKERE
GVSCI
SGSDRSTYYADSVKGRFTISRDN
AKNTVY LQMNSLKPEDTAVYFCAADPSPVTVQ
AMCLPRFPVPYWGQGTQVTVSTGGGGSGGGGSGGGGSPCPAPEFEGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
40 KSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKC

SEQ NO.39: 3-D7-FC3

45 QRQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFLLDYYVIGWFRQAPGKERE
GVSCI
SGSDRSTYYADSVKGRFTISRDN
AKNTVY LQMNSLKPEDTAVYFCAADPSPVTVQ
AMCLPRFPVPYWGQGTQVTVSTEPKSSDK
THTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
50 QQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKC

SEQ NO.40: 5E11-FC1

ALQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEVSGFTLDYYNIGWFRQAPGKEREVSCS
 SNSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCAAYRGWHPSL
 DARVYDYWGQGTEVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
 RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 5 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ NO.41: 5E11-FC2

10 ALQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEVSGFTLDYYNIGWFRQAPGKEREVSCS
 SNSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCAAYRGWHPSL
 DARVYDYWGQGTEVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKD
 TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
 15 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
 WQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ NO.42: 5E11-FC3

20 ALQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEVSGFTLDYYNIGWFRQAPGKEREVSCS
 SNSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCAAYRGWHPSL
 DARVYDYWGQGTEVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
 RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 25 VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ NO.43: 3-D7-HLE

30 QRQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFLLDYYVIGWFRQAPGKEREVSCI
 SGSDRSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYFCAADPSPVTVQ
 AMCLPRFPVPYWGQGTQVTVSTGGGGSGGGGCGGGGSEVQLVESGGGVVQPGGS
 LRLSCAASGLTFSSYAMGWFRQAPGKERERVVISRGGGYTYADSVKGRFTISR
 NSENTVYLQMNSLRPEDTALYYCAAARYWATGSEYEFDYWGQGLTVTVSSAHHH
 HHC

35 SEQ NO.44: 3-D7-ABD

QRQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFLLDYYVIGWFRQAPGKEREVSCI
 SGSDRSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYFCAADPSPVTVQ
 AMCLPRFPVPYWGQGTQVTVSTGGGGSGGGGCGGGGSQHDEAVDANSLAEAKVL
 ANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALPAHHHHHHC

40

SEQ NO.45: 5-E11-ABD

ALQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEVSGFTLDYYNIGWFRQAPGKEREVSCS
 SNSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTGVYYCAAYRGWHPSL
 DARVYDYWGQGTEVTVSSGGGGSGGGGCGGGGSQHDEAVDANSLAEAKVLNR
 45 ELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALPAHHHHHHC

在本发明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，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技
 术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求
 50 书所限定的范围。

权 利 要 求

1. 一种靶向CD73的纳米抗体，其特征在于，所述纳米抗体的VHH链的互补决定区
5 CDR为选自下组的一种或多种：
 (1) SEQ ID NO.1所示的CDR1，
 SEQ ID NO.2所示的CDR2，和
 SEQ ID NO.3所示的CDR3；
 或者，
10 (2) SEQ ID NO.5所示的CDR1，
 SEQ ID NO.6所示的CDR2，和
 SEQ ID NO.7所示的CDR3；
 或者，
15 (3) SEQ ID NO.9所示的CDR1，
 SEQ ID NO.10所示的CDR2，和
 SEQ ID NO.11所示的CDR3，
 或者，
20 (4) SEQ ID NO.13所示的CDR1，
 SEQ ID NO.14所示的CDR2，和
 SEQ ID NO.15所示的CDR3，
 或者，
25 (5) SEQ ID NO.17所示的CDR1，
 SEQ ID NO.18所示的CDR2，和
 SEQ ID NO.19所示的CDR3，
 或者，
30 (6) SEQ ID NO.21所示的CDR1，
 SEQ ID NO.22所示的CDR2，和
 SEQ ID NO.23所示的CDR3，
 或者，
35 (7) SEQ ID NO.25所示的CDR1，
 SEQ ID NO.26所示的CDR2，和
 SEQ ID NO.27所示的CDR3，
 或者，
40 (8) SEQ ID NO.29所示的CDR1，
 SEQ ID NO.30所示的CDR2，和
 SEQ ID NO.31所示的CDR3，
 或者，
 (9) SEQ ID NO.33所示的CDR1，
 SEQ ID NO.34所示的CDR2，和
 SEQ ID NO.35所示的CDR3。
2. 如权利要求1所述的纳米抗体，其特征在于，所述纳米抗体的VHH链还包括框架区(FR)。
3. 一种靶向CD73的抗体，其特征在于，所述抗体包括一个或多个如权利要求2所述的靶向CD73的纳米抗体的VHH链。

4. 一种多特异性抗体，其特征在于，所述的多特异性抗体包含：权利要求 1 所述的靶向 CD73 的纳米抗体或权利要求 3 所述的靶向 CD73 的抗体。

5. 一种重组蛋白，其特征在于，所述的重组蛋白具有：

(i) 如权利要求 1 所述的靶向 CD73 的纳米抗体、或如权利要求 3 所述的抗 CD73 抗体；

5 以及

(ii) 任选的具有治疗功能的多肽分子或片段；和/或

(iii) 任选的提升蛋白理化性质或成药性的功能域。

6. 一种 CAR 构建物，其特征在于，所述的 CAR 构建物的抗原结合区域为如权利要求 1 所述的纳米抗体的 VHH 链。

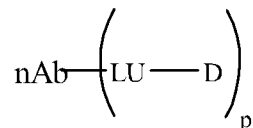
10 7. 一种重组的免疫细胞，其特征在于，所述的免疫细胞表达外源的如权利要求 6 所述的 CAR 构建物。

8. 一种免疫偶联物，其特征在于，所述的免疫偶联物含有：

(a) 抗体部分，所述抗体部分为权利要求 1 所述的靶向 CD73 的纳米抗体或权利要求 3 所述的靶向 CD73 的抗体；和

15 (b) 与所述纳米抗体部分偶联的偶联部分，所述偶联部分选自下组：可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、酶、蛋白降解剂、寡核苷酸或其组合。

9. 如权利要求 8 所述的免疫偶联物，其特征在于，所述免疫偶联物为如下分子式所示的抗体药物偶联物 ADC：



20 其中：

nAb 是靶向 CD73 的纳米抗体，

LU 是接头（又称连接子）；

D 是药物；

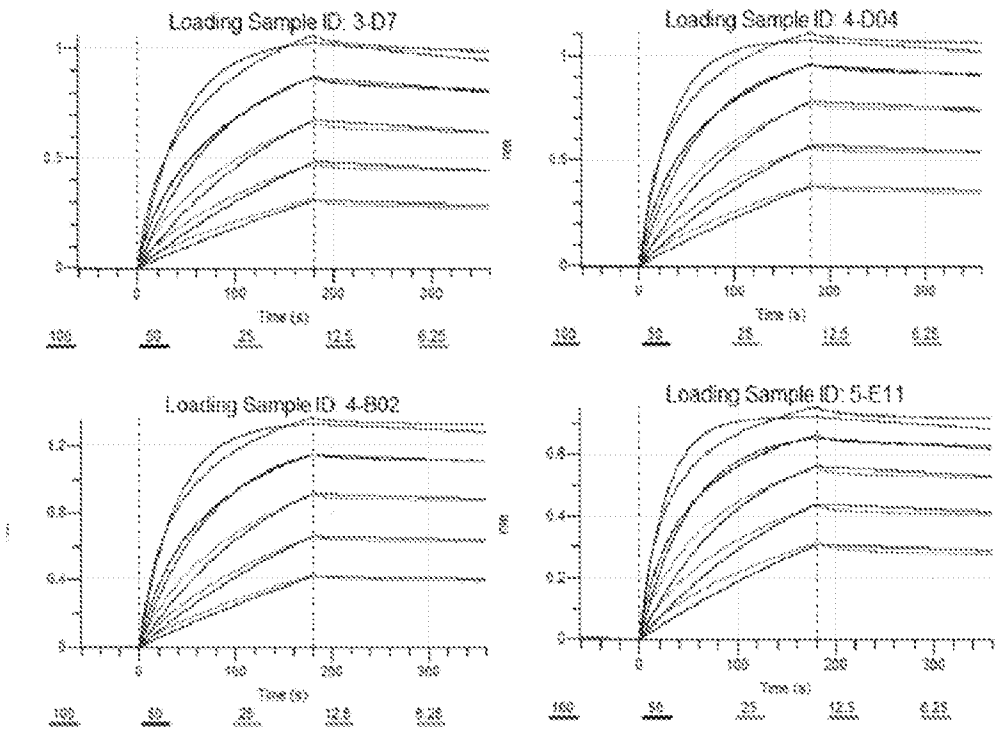
而且下标 p 是选自 1-8 的值。

25 10. 一种药物组合物，其特征在于，所述的药物组合物包含：

(i) 如权利要求 1 所述的靶向 CD73 的纳米抗体、如权利要求 3 所述的靶向 CD73 的抗体、如权利要求 4 的多特异性抗体、如权利要求 5 所述的重组蛋白、如权利要求 7 所述的重组的免疫细胞或如权利要求 8 所述的免疫偶联物；

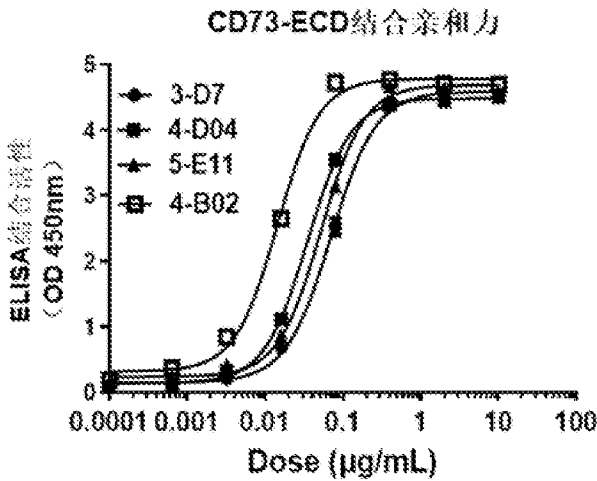
(ii) 药学上可接受的载体。

30



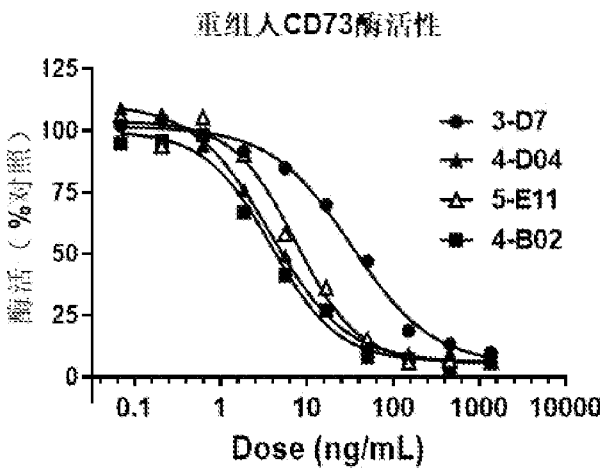
CLONE ID	KD(M)	Kon(M ⁻¹ S ⁻¹)	Koff(S ⁻¹)
3-D7	1.997x10 ⁻⁹	2.228x10 ⁵	4.449x10 ⁻⁴
4-D04	9.199x10 ⁻¹⁰	3.009x10 ⁵	2.768x10 ⁻⁴
4-B02	7.95x10 ⁻¹⁰	2.626x10 ⁵	2.088x10 ⁻⁴
5-E11	8.264x10 ⁻¹⁰	3.848x10 ⁵	3.180x10 ⁻⁴

图 1



抗体	EC50 ($\mu\text{g/mL}$)	EC50 (nM)
3-D7	0.070	0.875
4-D04	0.035	0.438
5-E11	0.052	0.650
4-B02	0.014	0.175

图 2



抗体	Top (%)	Bottom (%)	IC50 (ng/mL)
3-D7	101.60	5.01	38.18
4-D04	100.90	5.94	5.63
5-E11	103.80	5.60	9.47
4-B02	99.80	6.19	4.66

图 3

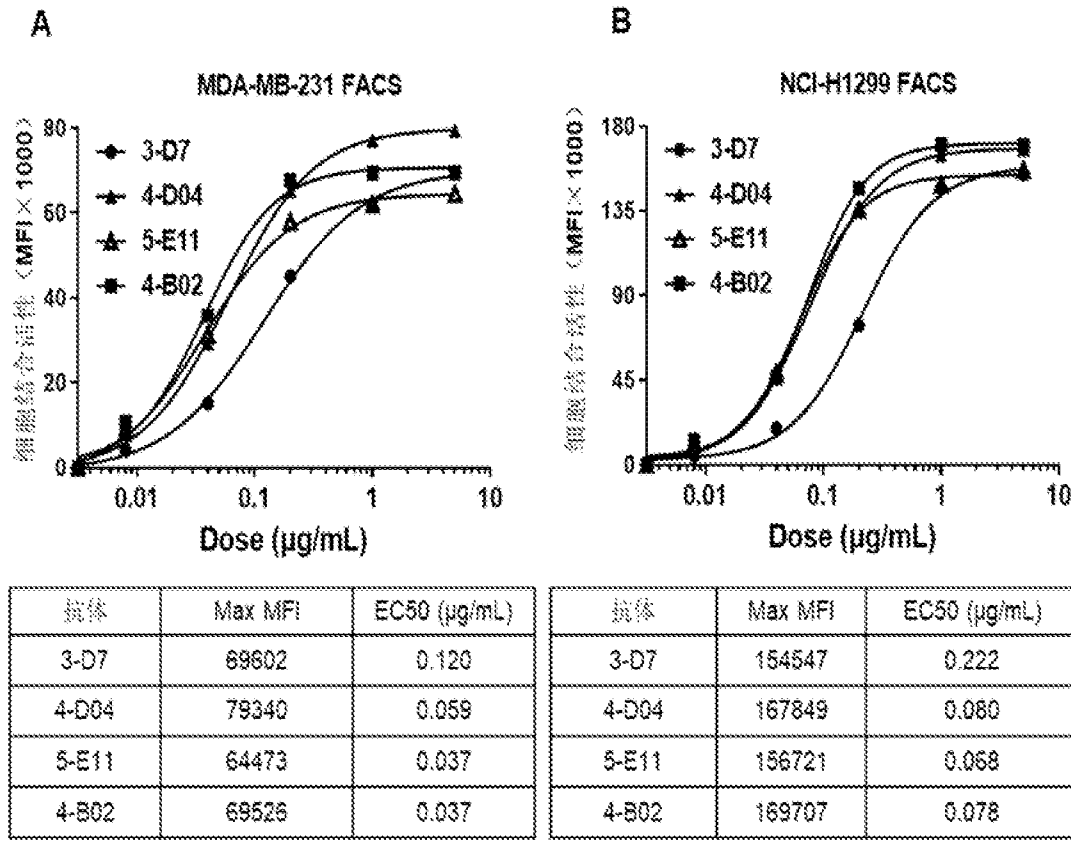


图 4

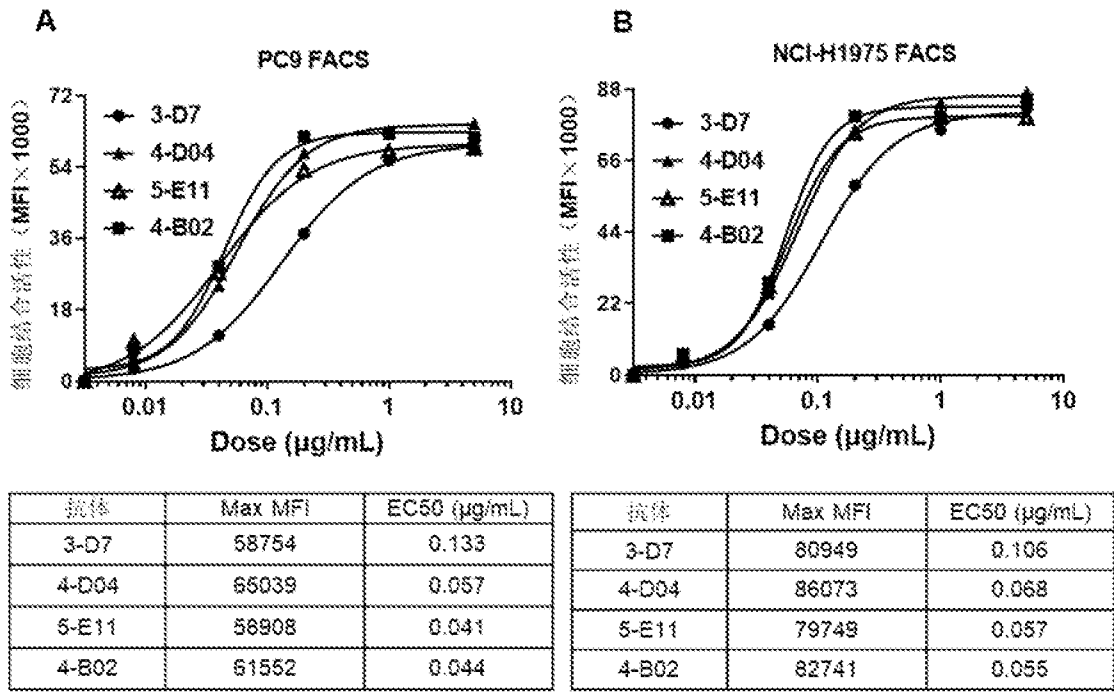


图 5

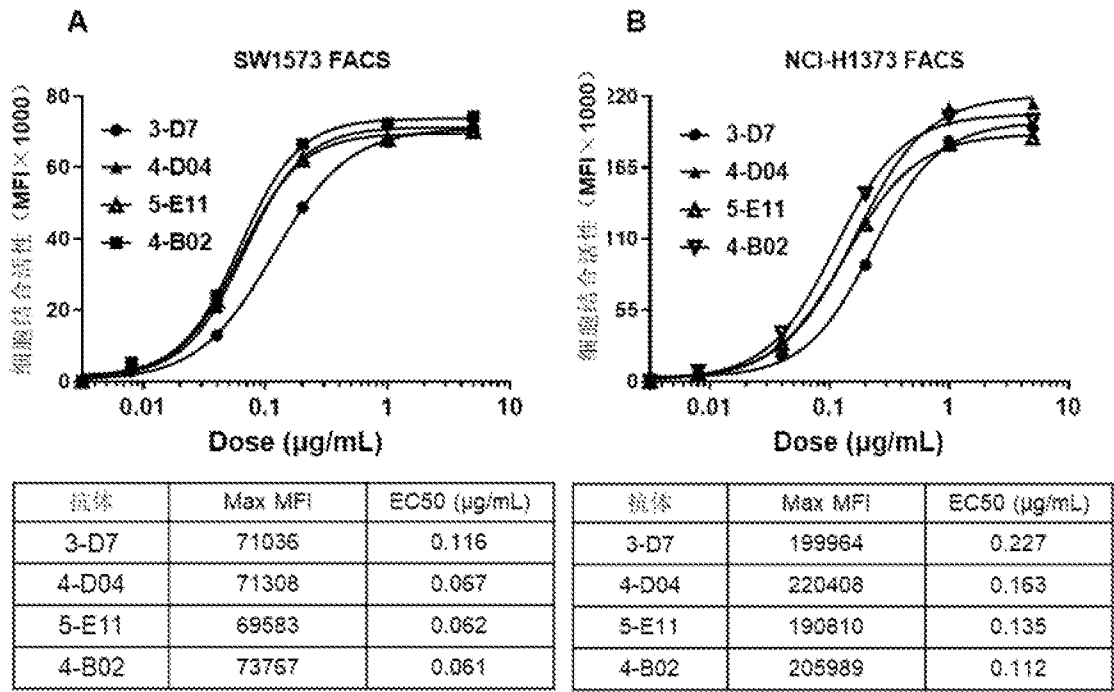


图 6

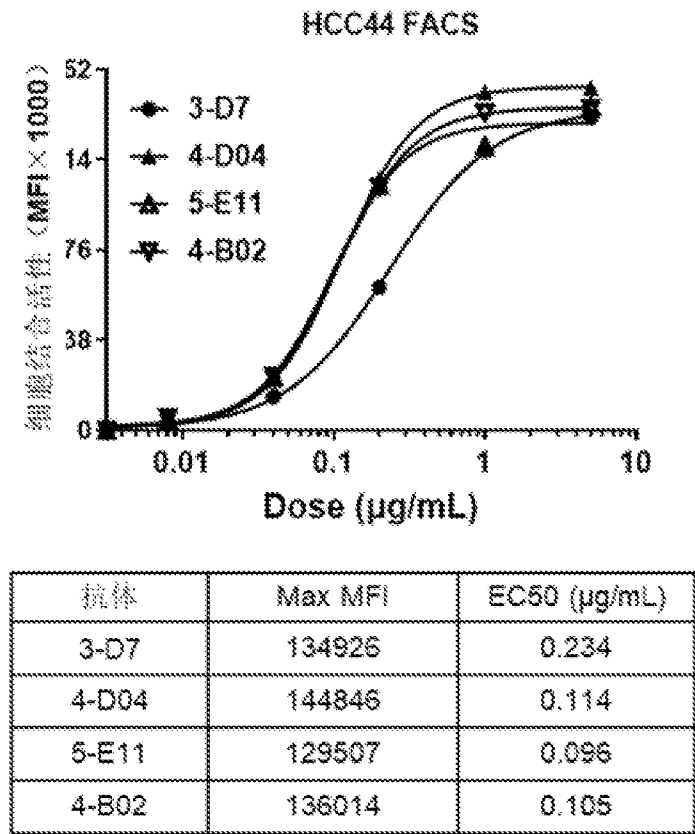


图 7

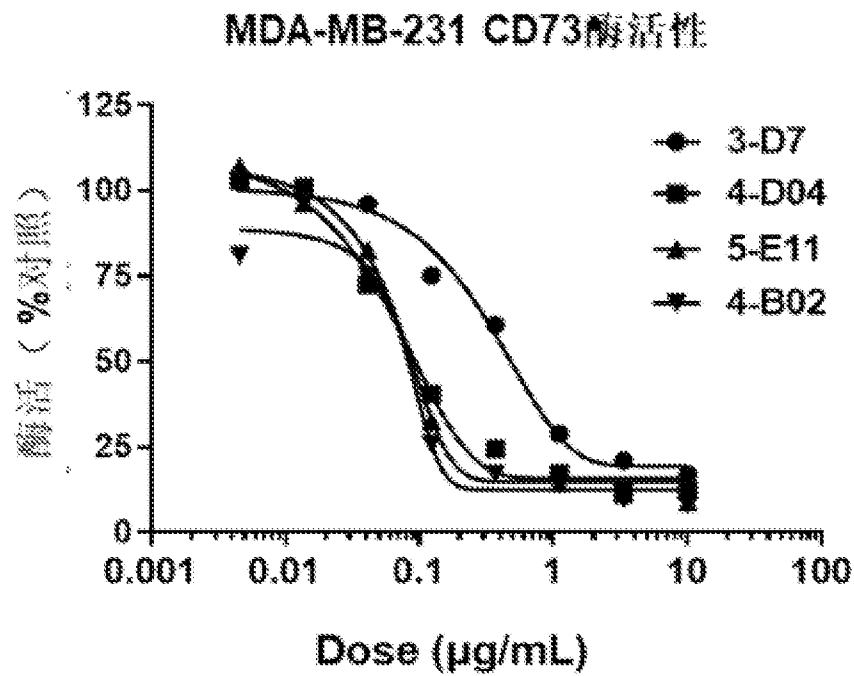
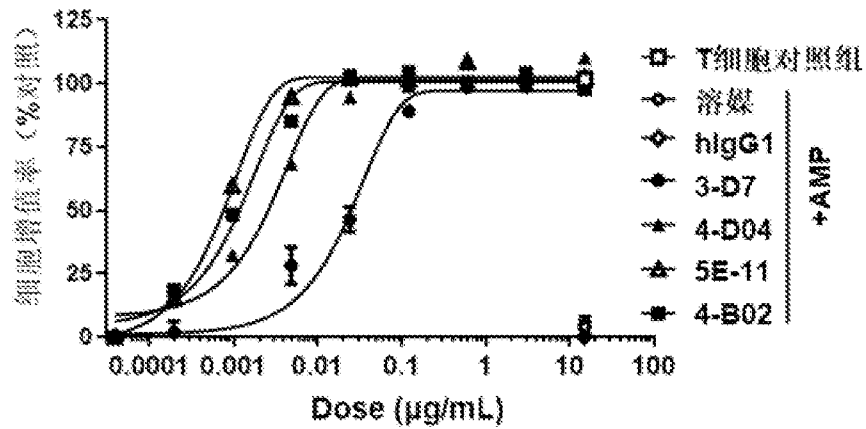


图 8

抗体对T细胞的保护作用



抗体	EC50±S.E (μg/mL)	Top (%)
3-D7	0.0247 ± 0.0052	97.2
4-D04	0.0025 ± 0.0007	102.2
5-E11	0.0008 ± 0.0002	102.5
4-B02	0.0012 ± 0.0004	100.8

图 9

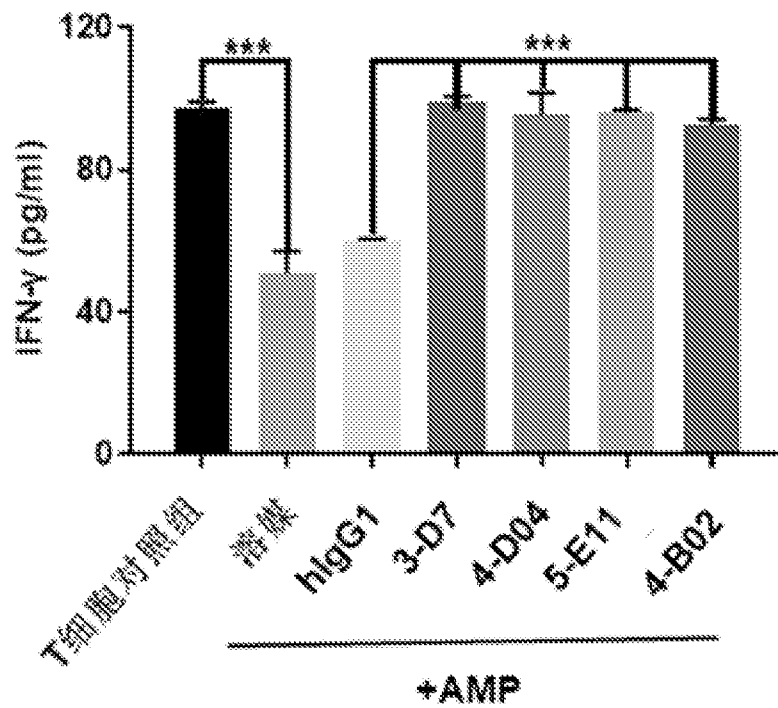


图 10

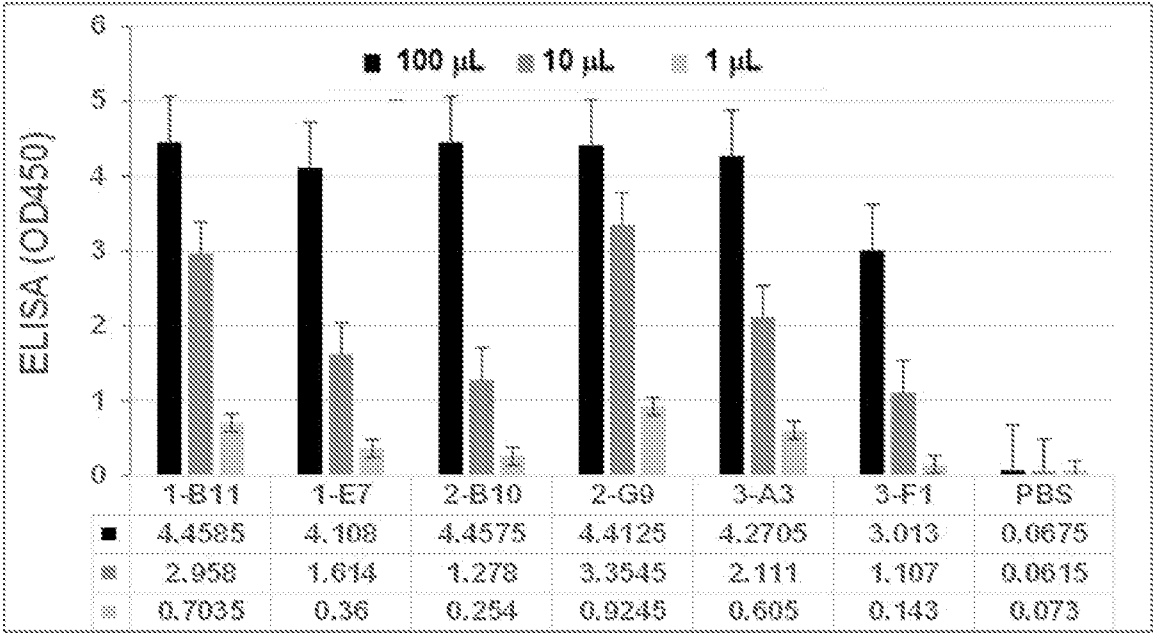


图 11

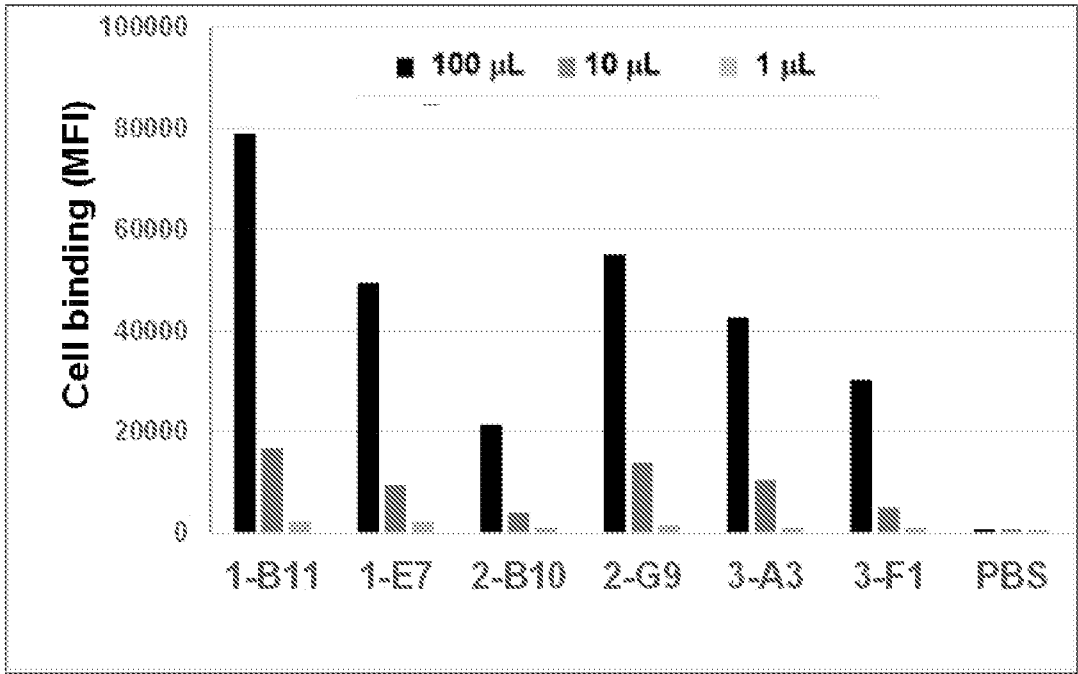


图 12

CD73 抗体针对肿瘤细胞的内吞作用

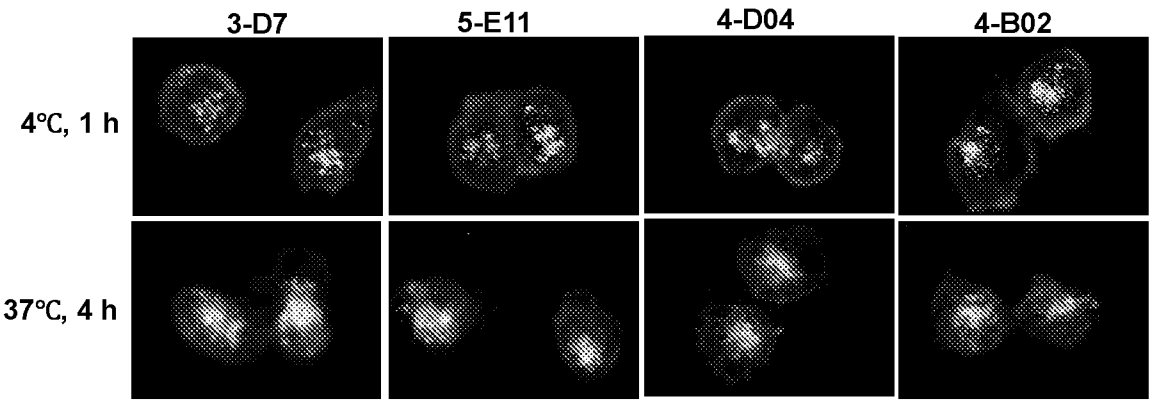


图 13

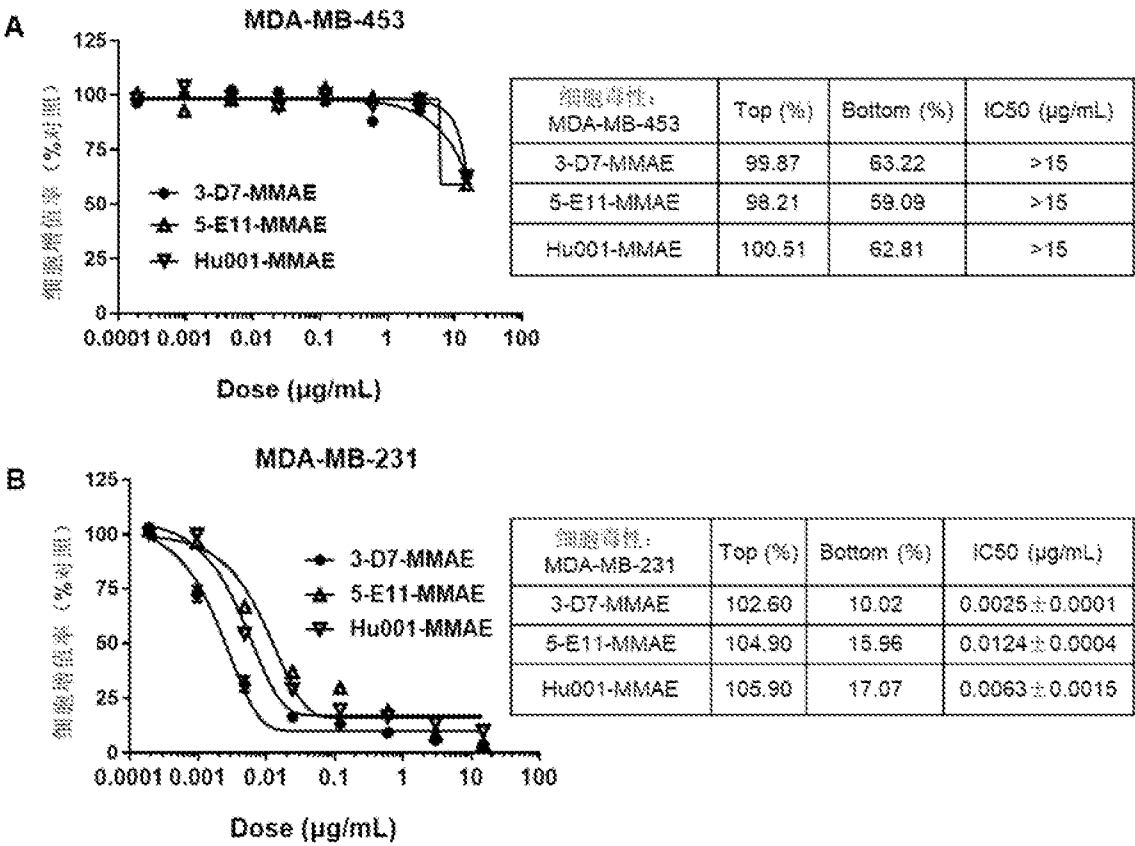


图 14

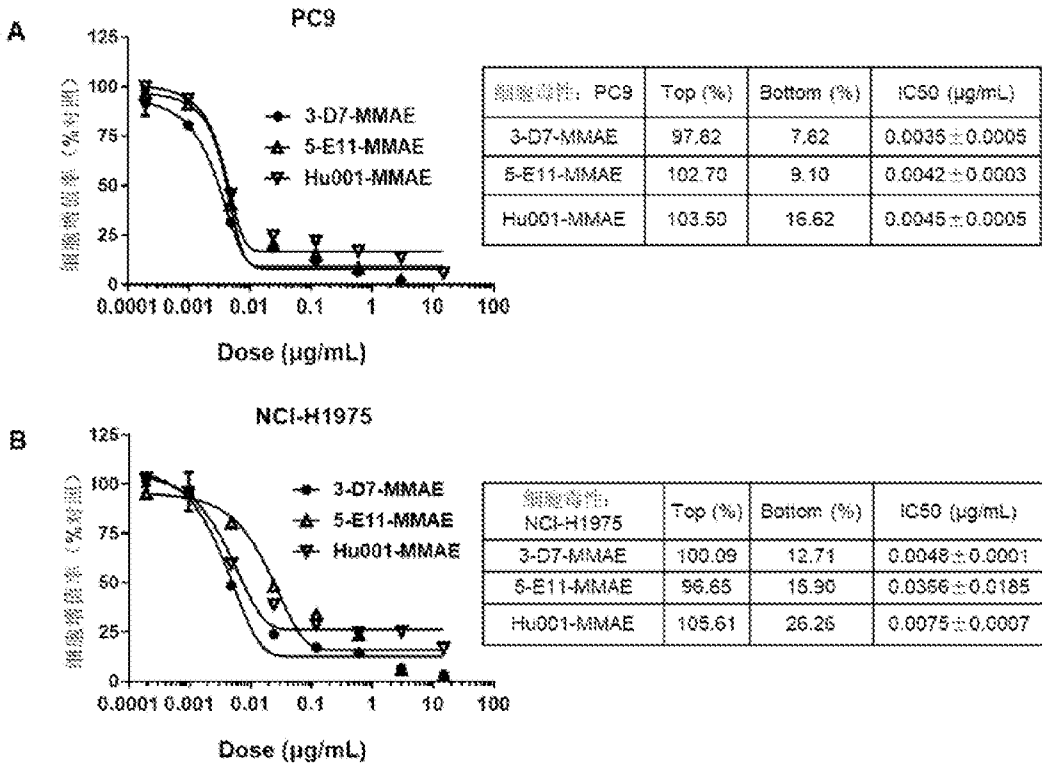


图 15

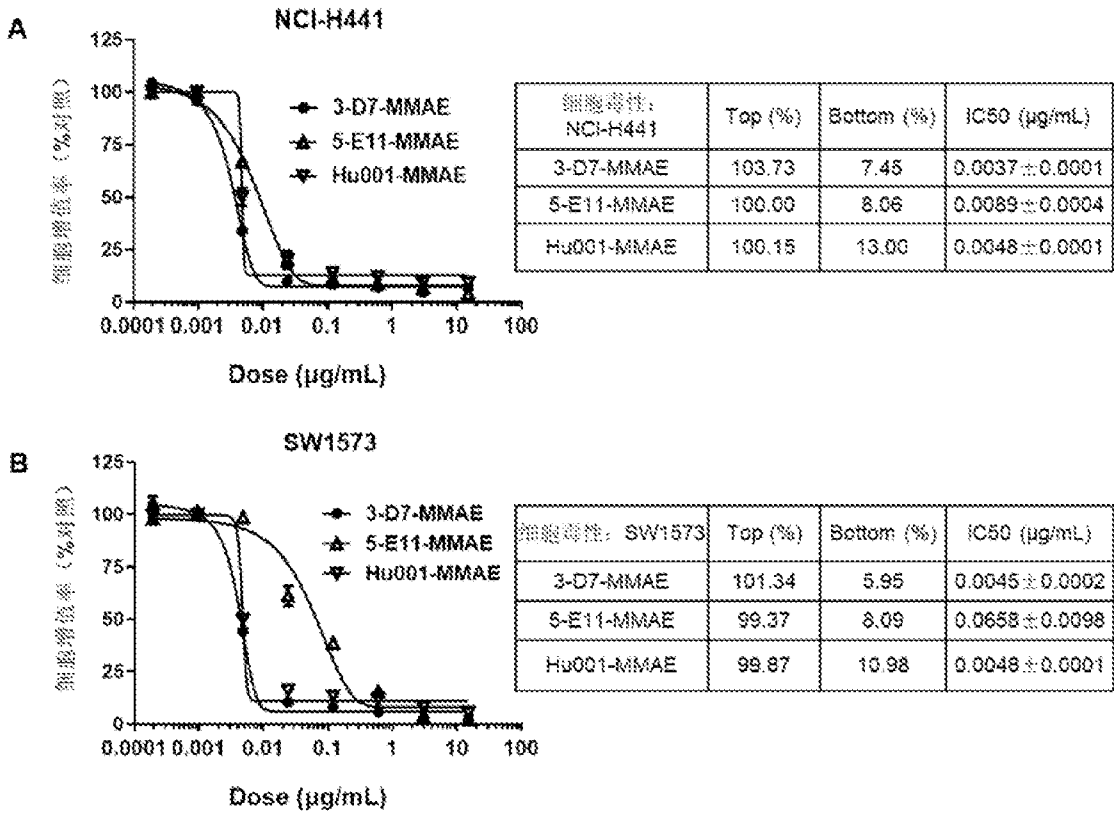


图 16

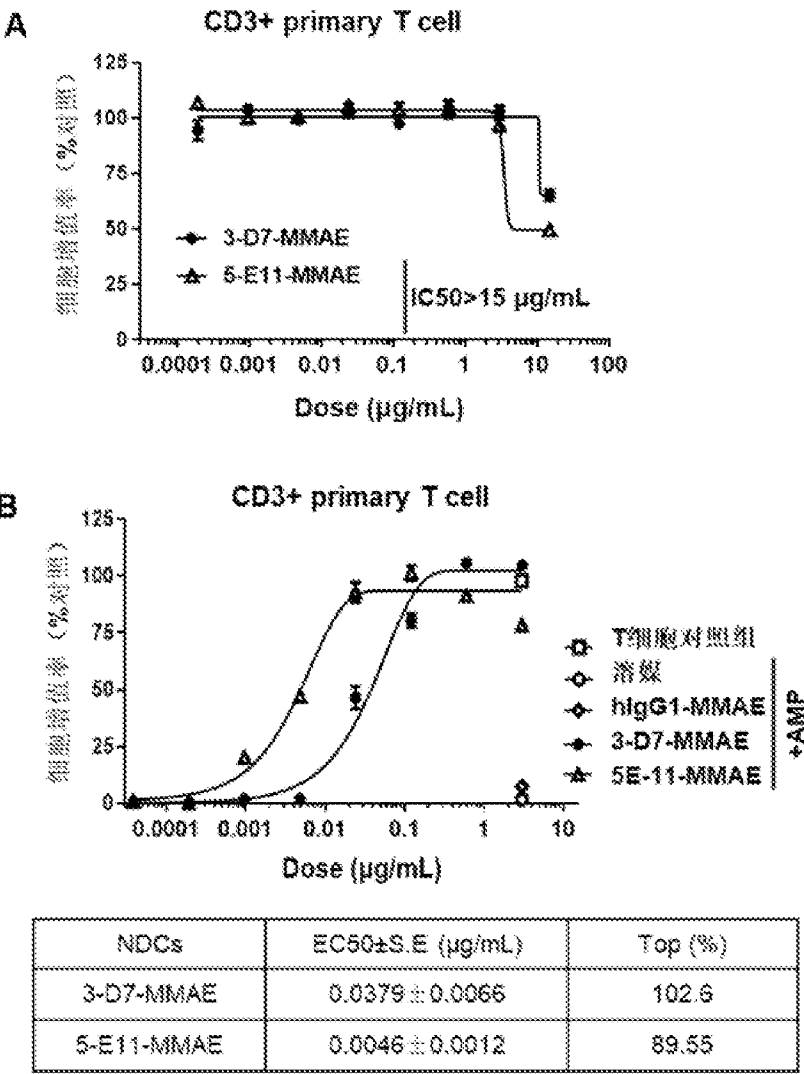


图 17

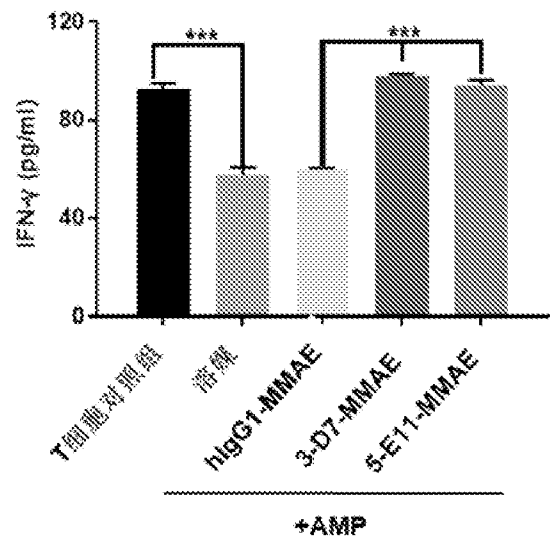


图 18

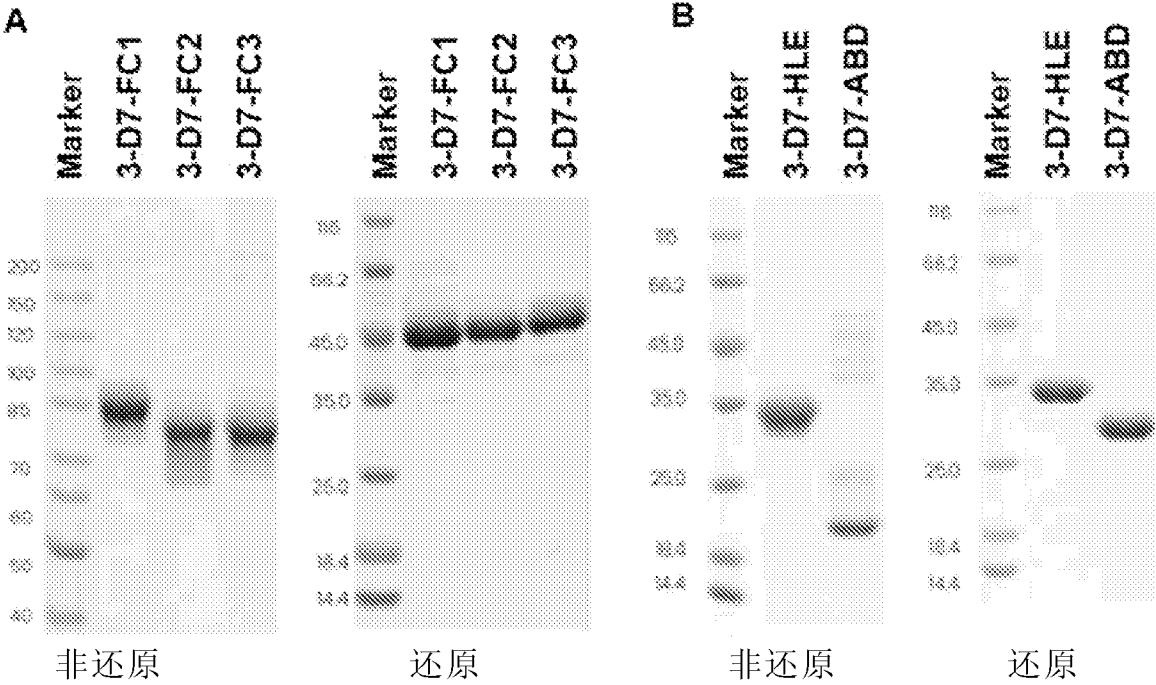


图 19

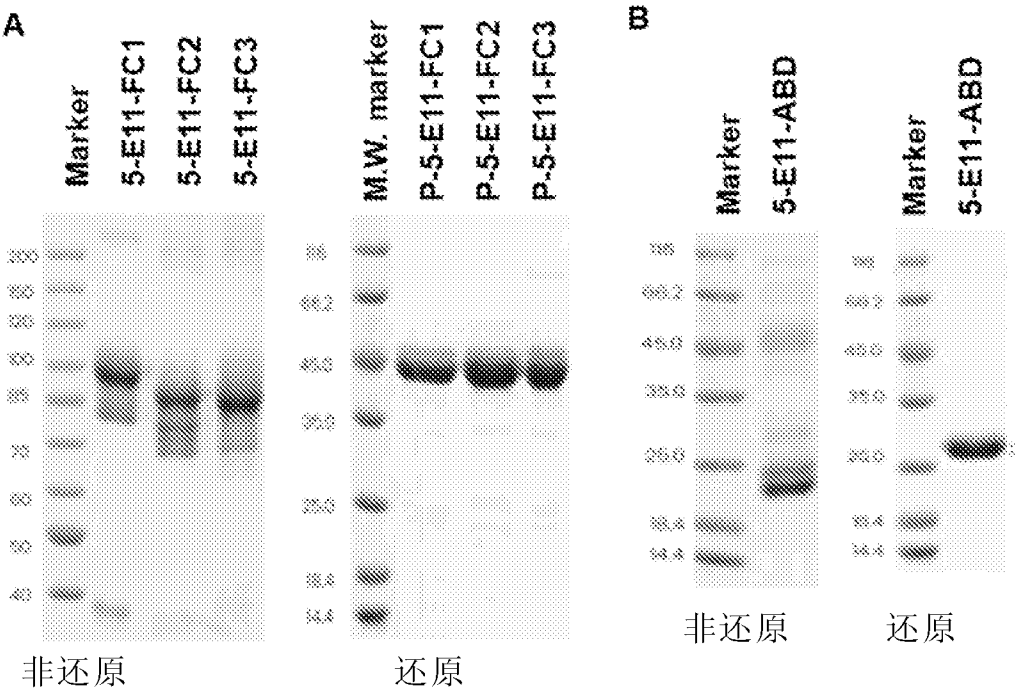


图 20

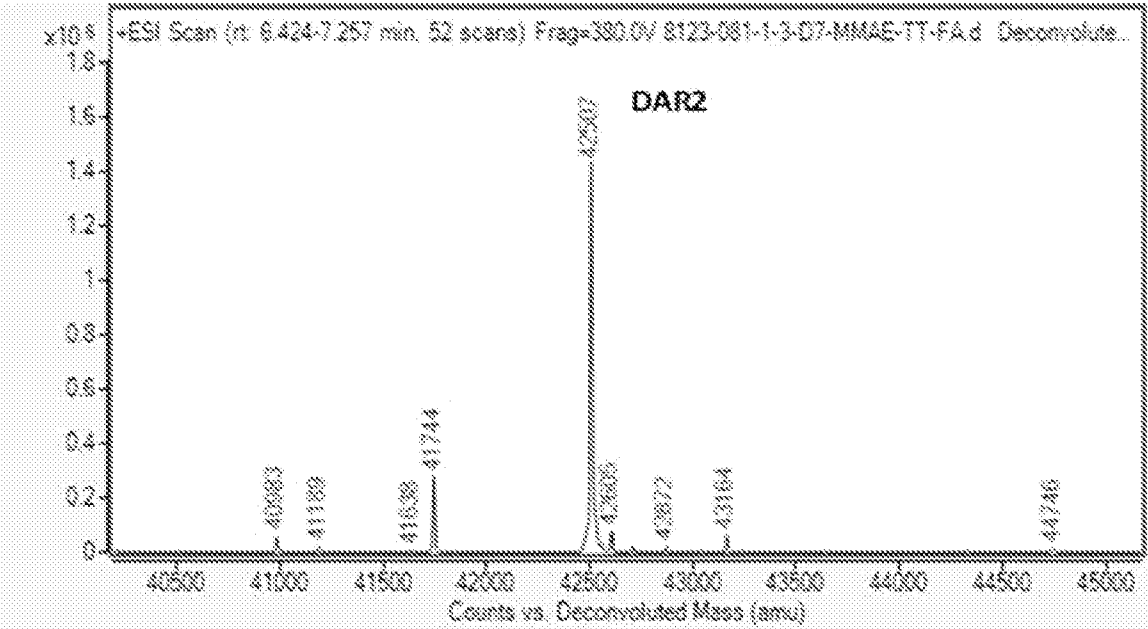


图 21

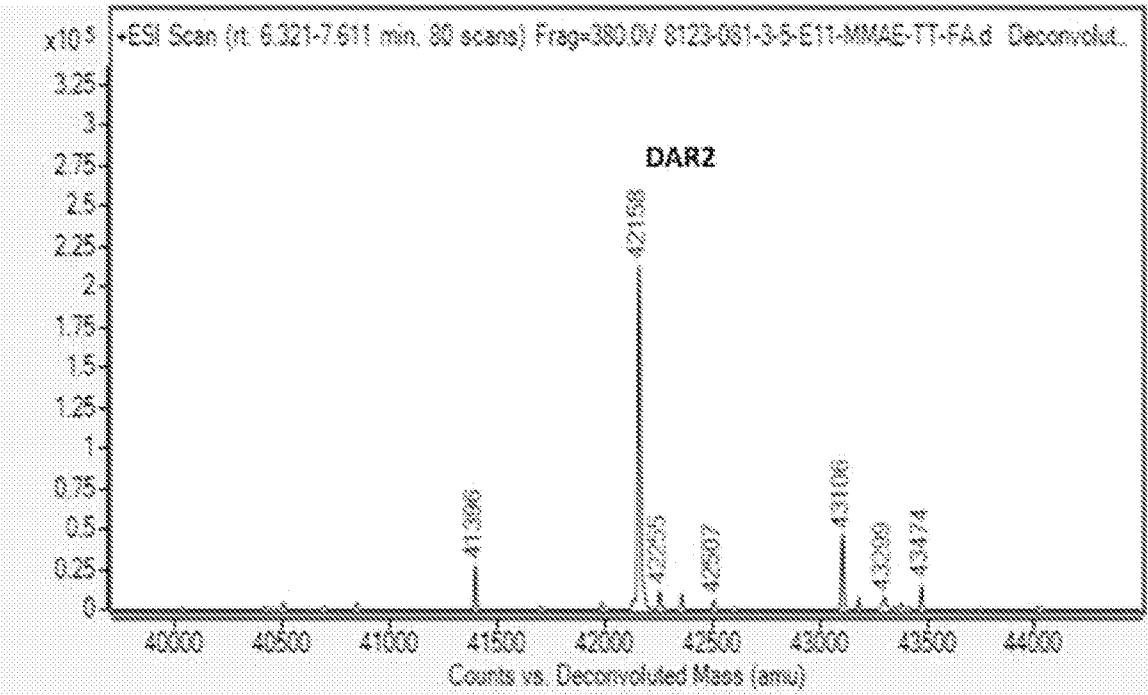


图 22

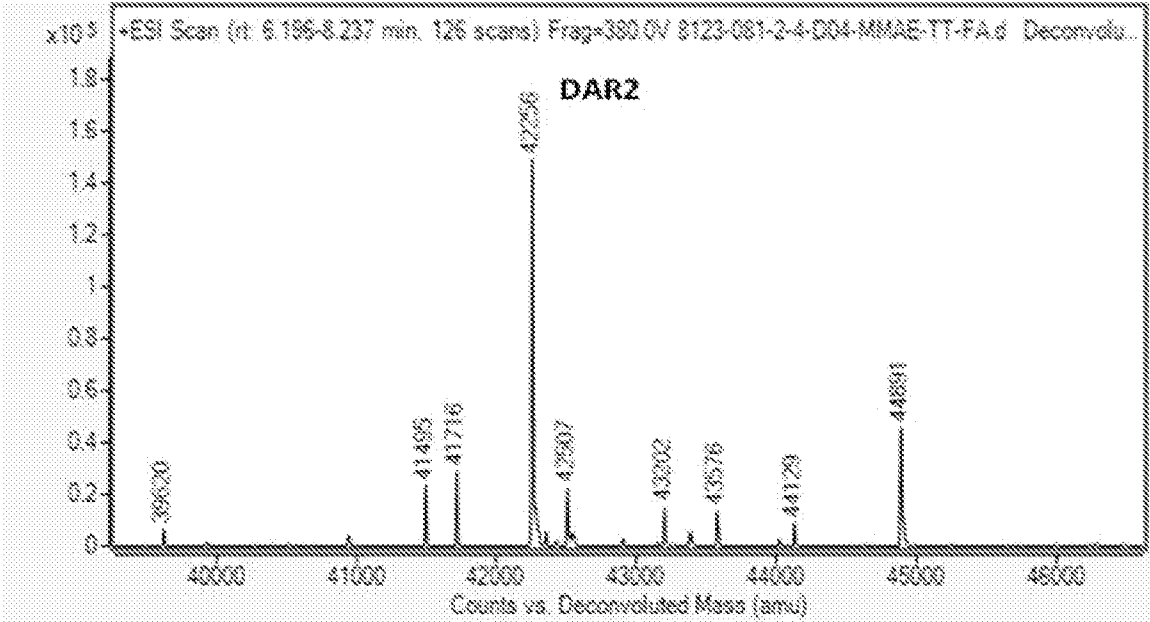


图 23

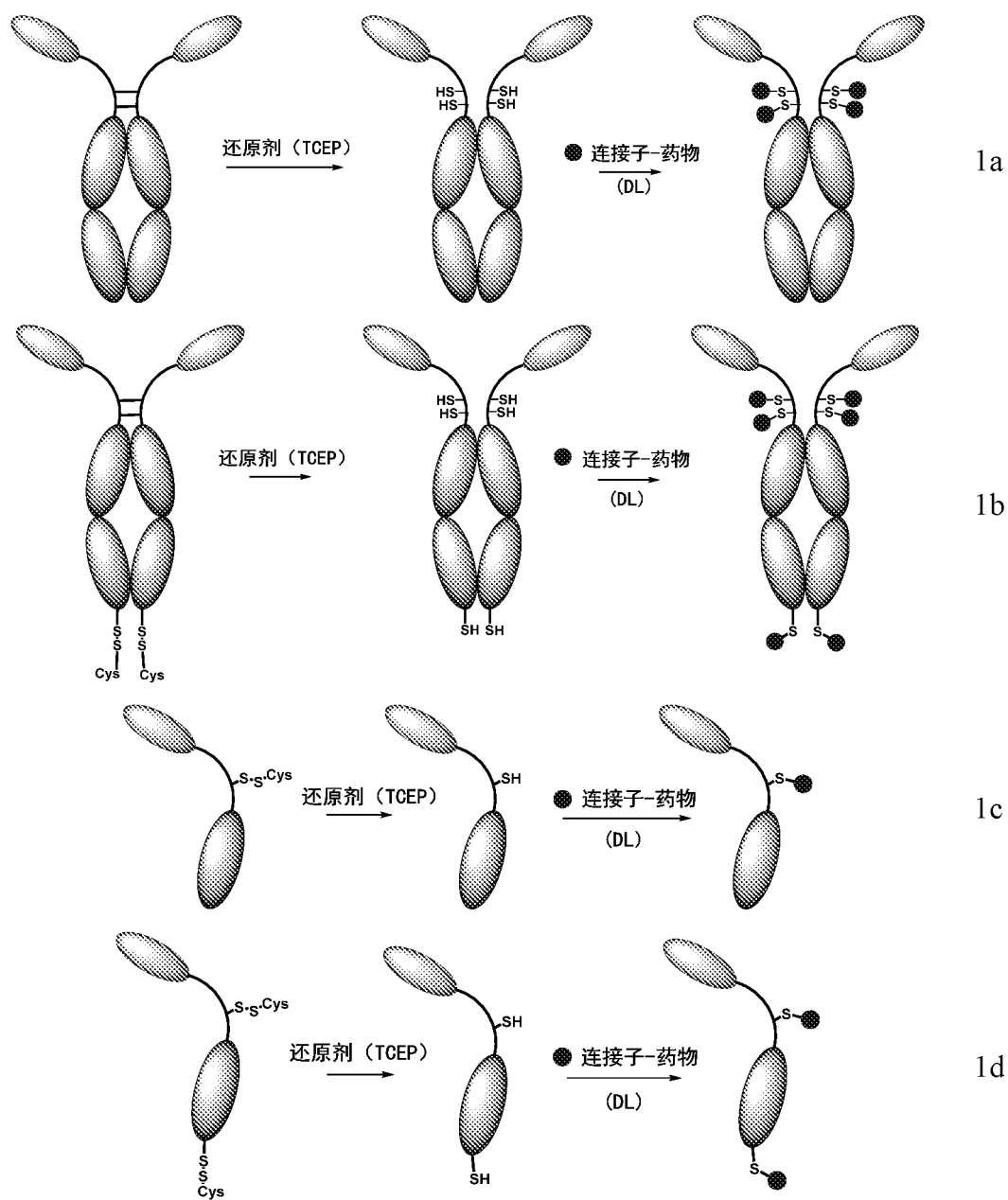


图 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/092108

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/28(2006.01)i; C07K16/46(2006.01)i; C07K19/00(2006.01)i; C12N5/10(2006.01)i; C12N15/85(2006.01)i;
A61K47/68(2017.01)i; A61P35/00(2006.01)i; A61P35/04(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)

IPC: C07K C12N A61K A61P

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; WPABS; WPABSC; DWPI; VEN; ENTXT; ENTXTC; CNKI; CJFD; ISI Web of Science; GenBank; STNext;
中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System: 分化簇73, CD73, 单域抗体, 纳米抗体, 重
链抗体, 骆驼抗体, 缀合物, 偶联物, 基于序列1-36的检索, search on the basis of sequence 1-36, single domain antibody, sdab,
VHH, nanobody, heavy chain antibody, hcab, conjugate, NDC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 110240654 A (FUDAN UNIVERSITY) 17 September 2019 (2019-09-17) description, paragraphs [0007]-[0025] and [0067]-[0186]	1-10
A	CN 111434688 A (SHANGHAI PHARMAEXPLORER CO., LTD.) 21 July 2020 (2020-07-21) claims 1-17	1-10



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
“D” document cited by the applicant in the international application
“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

14 August 2023

Date of mailing of the international search report

24 August 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

**China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/092108

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.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/092108

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110240654	A	17 September 2019	EP	3783025	A1	24 February 2021
				EP	3783025	A4	23 February 2022
				JP	2021516960	A	15 July 2021
				US	2021024646	A1	28 January 2021
				CA	3093327	A1	12 September 2019
				WO	2019170131	A1	12 September 2019
				CN	110869393	A	06 March 2020
				CN	110869393	B	30 August 2022
				HK	40017733	A0	25 September 2020
				HK	40017733	A1	23 December 2022
CN	111434688	A	21 July 2020	EP	3909982	A1	17 November 2021
				EP	3909982	A4	01 February 2023
				US	2022098319	A1	31 March 2022
				WO	2020143836	A1	16 July 2020
				CN	113316591	A	27 August 2021

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2023/092108

A. 主题的分类

C07K16/28(2006.01)i; C07K16/46(2006.01)i; C07K19/00(2006.01)i; C12N5/10(2006.01)i; C12N15/85(2006.01)i; A61K47/68(2017.01)i; A61P35/00(2006.01)i; A61P35/04(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)

IPC: C07K C12N A61K A61P

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;WPABS;WPABSC;DWPI;VEN;ENTXT;ENTXTC;CNKI;CJFD;ISI Web of Science;GenBank;STNext;中国专利生物序列检索系统: 分化簇73, CD73, 单域抗体, 纳米抗体, 重链抗体, 骆驼抗体, 缀合物, 偶联物, 基于序列1-36的检索, single domain antibody, sdab, VHH, nanobody, heavy chain antibody, hcab, conjugate, NDC

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 110240654 A (复旦大学) 2019年9月17日 (2019 - 09 - 17)
说明书第[0007]-[0025]、[0067]-[0186]段

1-10

A

CN 111434688 A (上海开拓者生物医药有限公司) 2020年7月21日 (2020 - 07 - 21)
权利要求1-17

1-10

☐ 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

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“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

2023年8月14日

国际检索报告邮寄日期

2023年8月24日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

陈仕高

电话号码 (+86) 0512-88996545

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:

b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三. 1(a)),

☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。

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/CN2023/092108

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	110240654	A	2019年9月17日	EP	3783025	A1	2021年2月24日
				EP	3783025	A4	2022年2月23日
				JP	2021516960	A	2021年7月15日
				US	2021024646	A1	2021年1月28日
				CA	3093327	A1	2019年9月12日
				WO	2019170131	A1	2019年9月12日
				CN	110869393	A	2020年3月6日
				CN	110869393	B	2022年8月30日
				HK	40017733	A0	2020年9月25日
				HK	40017733	A1	2022年12月23日
CN	111434688	A	2020年7月21日	EP	3909982	A1	2021年11月17日
				EP	3909982	A4	2023年2月1日
				US	2022098319	A1	2022年3月31日
				WO	2020143836	A1	2020年7月16日
				CN	113316591	A	2021年8月27日