

(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 6 月 22 日 (22.06.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/109962 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/28 (2006.01) *C12N 5/20* (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) *A61K 47/68* (2017.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/139741

(22) 国际申请日: 2022 年 12 月 16 日 (16.12.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202111552957.3 2021 年 12 月 17 日 (17.12.2021) CN

(71) 申请人: 三生国健药业(上海)股份有限公司(SUNSHINE GUOJIAN PHARMACEUTICAL (SHANGHAI) CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区李冰路 399 号, Shanghai 201203 (CN)。

(72) 发明人: 张学赛(ZHANG, Xuesai); 中国上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区李冰路 399 号, Shanghai 201203 (CN)。黄浩旻(HUANG, Haomin); 中国上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区李冰路 399 号, Shanghai 201203 (CN)。朱祯平(ZHU, Zhenping); 中国上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区李冰路 399 号, Shanghai 201203 (CN)。邓少荣(DENG, Shaorong); 中国上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区李冰路 399 号, Shanghai 201203 (CN)。陈建鹤(CHEN, Jianhe); 中国上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区李冰路 399 号, Shanghai 201203 (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, 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, CV, 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, 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)。

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: ANTIBODY BINDING TO HUMAN CD73, PREPARATION METHOD THEREFOR, AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 结合人 CD73 的抗体、其制备方法和用途

(57) Abstract: The present invention provides an antibody binding to human CD73, a preparation method therefor, and a use thereof. The monoclonal antibody of the present invention can bind to a CD73 antigen with high specificity, has high affinity, has remarkable anti-tumor activity and the like, and has excellent clinical application prospects.

(57) 摘要: 本发明提供了一种结合人 CD73 的抗体、其制备方法和用途。本发明的单克隆抗体能够高特异性地结合 CD73 抗原, 其具有很高的亲和力并且具有显著抗肿瘤等活性, 具有良好的临床应用前景。



WO 2023/109962 A1

结合人CD73的抗体、其制备方法和用途

技术领域

本发明属于肿瘤治疗领域。具体地，涉及结合人CD73的抗体、其制备方法和用途。

背景技术

目前随着肿瘤免疫治疗领域针对PD-1/PD-L1以及CTLA-4等研究的进展，免疫治疗已成为攻克癌症的主要方向之一。然而，现有的肿瘤免疫治疗方法有效率低，仍难以满足临床的需求，研究发现，肿瘤免疫疗法响应不佳的主要原因之一就是在肿瘤微环境中存在抑制免疫细胞的物质，其会导致肿瘤细胞逃脱免疫细胞的杀伤。

腺苷是肿瘤微环境中产生肿瘤免疫抑制的重要物质之一，其通过与腺苷受体（A2AR）的结合，激活蛋白激酶A（PKA）和Csk激酶，抑制LCK、MAPK、PKC等一系列与免疫激活相关的信号通路，发挥免疫抑制作用。高浓度的腺苷一方面损害T细胞和自然杀伤(NK)细胞的激活和功能，导致强大的免疫抑制；另一方面增强调节性T细胞(Treg)的功能和巨噬细胞M2的分化。而在腺苷的产生过程中，有两个重要的关键环节：1）当机体出现组织紊乱的情况（如炎症、恶性肿瘤等）时，胞内的ATP会大量释放到细胞外，这些ATP会被胞外的核苷酸水解酶CD39水解转化为ADP与AMP；2）AMP再在CD73的协同作用下去磷酸生成免疫抑制腺苷。

CD73是由NT5E基因编码的胞外-5'-核苷酸酶，分子量为70kD，是机体腺苷生成的主要限速酶之一。CD73的表达受到低氧诱导因子-1（HIF-1）、TGF- β 、EGFR、AKT、 β -catenin等分子的调控，其中尤以行使转录因子功能的HIF-1最为关键。低氧(Hypoxia)是肿瘤微环境的一个重要特征，在肿瘤微环境中诱导HIF-1上调，进而导致CD73在肿瘤中广泛表达。因此，研究发现CD73在多种肿瘤表面存在过表达，并且与肿瘤的不良预后密切相关，包括乳腺癌、肺癌、卵巢癌、结直肠癌、肾癌、胃癌、头颈癌等。

临床前研究显示，抑制CD73能刺激T细胞的活性，并增强腺苷调控的T细胞和其它免疫细胞水平的抗肿瘤免疫监测。解除肿瘤微环境（TME）对免疫效应细胞的抑制作用是克服免疫疗法耐药、提高疗效一个很重要的方面。

然而，本领域的众多抗CD73抗体仍然存在许多不足。因此，本领域需要开发适于治疗患者的抗CD73的抗体。

发明内容

本发明的目的在于提供一种结合人CD73的抗体、其制备方法和用途。

在本发明的第一方面，提供了一种抗人CD73抗体或其抗原结合片段，所述抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区，其中，

所述重链可变区包括三个重链互补决定区CDR：

SEQ ID NO.10所示的HCDR1，

SEQ ID NO.11所示的HCDR2，

SEQ ID NO.12所示的HCDR3；或

SEQ ID NO.16所示的HCDR1，

SEQ ID NO.17所示的HCDR2，

SEQ ID NO.18所示的HCDR3；和

所述轻链可变区包括三个轻链互补决定区CDR：

SEQ ID NO.13所示的LCDR1，

SEQ ID NO.14所示的LCDR2，

SEQ ID NO.15所示的LCDR3；或

SEQ ID NO.19所示的LCDR1,
SEQ ID NO.20所示的LCDR2,
SEQ ID NO.21所示的LCDR3。

5 所述抗体或其抗原结合片段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。

在另一优选例中,上述任一CDR的氨基酸序列中包含经过添加、缺失、修饰和/或取代1、2或3个氨基酸的衍生CDR序列,并且使得含有所述衍生CDR序列的VH和VL所构成的衍生抗体能够保留与CD73结合的亲和力。

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1-5个(如1-3个,较佳地1-2个,更佳地1个)。

在另一优选例中,所述抗体包括重链和轻链,所述抗体的重链包括所述的三个重链互补决定区CDR以及用于连接重链互补决定区CDR的重链框架区;和所述的抗体的轻链包括所述的三个轻链互补决定区CDR以及用于连接轻链互补决定区CDR的轻链框架区。

15 在另一优选例中,所述的重链可变区具有SEQ ID NO. 1、4、6、9、24或28所示的氨基酸序列;较佳地具有SEQ ID NO.1、4、6或9所示的氨基酸序列。

在另一优选例中,所述重链还包括重链恒定区。

在另一优选例中,所述重链恒定区为人源或鼠源的。

在另一优选例中,所述重链恒定区为人源抗体重链IgG1或IgG4恒定区。

在另一优选例中,所述重链恒定区的序列如SEQ ID NO. 31所示。

20 在另一优选例中,所述轻链可变区具有SEQ ID NO. 2、3、5、7、8、26或30所示的氨基酸序列;较佳地,具有SEQ ID NO.2、3、5、7或8所示的氨基酸序列。

在另一优选例中,所述轻链还包括轻链恒定区。

在另一优选例中,所述轻链恒定区为人源或鼠源的。

在另一优选例中,所述轻链恒定区为人源抗体轻链kappa或lambda恒定区。

25 在另一优选例中,所述轻链恒定区的序列如SEQ ID NO. 32所示。

在另一优选例中,所述的抗体还包括重链恒定区和/或轻链恒定区。

在另一优选例中,所述的重链恒定区为人源的,和/或所述的轻链恒定区为人源的。

在另一优选例中,所述重链恒定区为人源抗体重链IgG4 (S228P) 恒定区,且所述轻链恒定区为人源抗体轻链kappa恒定区。

30 在另一优选例中,所述抗体的重链可变区还包括人源的框架区,和/或所述抗体的轻链可变区还包括人源的框架区。

在另一优选例中,所述抗体的重链可变区还包括鼠源的框架区,和/或所述抗体的轻链可变区还包括鼠源的框架区。

35 在另一优选例中,所述抗体选自下组:动物源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体、或其组合。

在另一优选例中,所述的抗体是部分或全人源化、或全人的单克隆抗体。

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,所述抗体为抗体全长蛋白、或抗原结合片段。

在另一优选例中,所述抗原结合片段包括Fab片段、F(ab')₂片段、Fv片段。

40 在另一优选例中,所述抗体为双特异性抗体、或多特异性抗体。

在另一优选例中,所述的抗体为药物偶联物形式。

在另一优选例中,所述的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区;其中,所述的重链可变区包括以下三个互补决定区CDR:

SEQ ID NO.10所示的HCDR1,

45 SEQ ID NO.11所示的HCDR2,

SEQ ID NO.12所示的HCDR3；和
所述的轻链可变区包括以下三个互补决定区CDR：

SEQ ID NO.13所示的LCDR1，

SEQ ID NO.14所示的LCDR2，

5 SEQ ID NO.15所示的LCDR3；或

所述的重链可变区包括以下三个互补决定区CDR：

SEQ ID NO.16所示的HCDR1，

SEQ ID NO.17所示的HCDR2，

SEQ ID NO.18所示的HCDR3；和

10 所述的轻链可变区包括以下三个互补决定区CDR：

SEQ ID NO.19所示的LCDR1，

SEQ ID NO.20所示的LCDR2，

SEQ ID NO.21所示的LCDR3。

15 在另一优选例中，所述抗体的重链可变区含有1、4、6、9、24或28中任一所示的氨基酸序列；和/或所述的轻链可变区含有2、3、5、7、8、26或30中任一所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述抗体的重链可变区含有SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列，且所述抗体的轻链可变区含有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列；或重链可变区含有SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列，且轻链可变区含有SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列；或重链可变区含有SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列，且轻链可变区含有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列；或重链可变区含有SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列，且轻链可变区含有SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列；或重链可变区含有SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列，且轻链可变区含有SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列；或重链可变区含有SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列；且轻链可变区含有SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列；或重链可变区含有SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列，且轻链可变区含有SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列；或重链可变区含有SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列，且轻链可变区含有SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列。

25 在另一优选例中，所述重链可变区的氨基酸序列与SEQ ID NO. 1、4、6、9、24或28所示的氨基酸序列至少有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同源性或序列相同性。

30 在另一优选例中，所述轻链可变区的氨基酸序列与如序列表中SEQ ID NO. 2、3、5、7、8、26或30所示的氨基酸序列至少有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同源性或序列相同性。

在另一优选例中，所述抗体为人源化抗体，所述抗体的重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）包含选自表3所述的氨基酸序列。

35 在另一优选例中，所述抗体与人CD73蛋白的结合表位包含对应于CD73胞外区（SEQ ID NO. 22）的选自下组的位点：

第132位酪氨酸（Y132）、第133位亮氨酸（L133）、第139位脯氨酸（P139）、第137位缬氨酸（V137）、第181位亮氨酸（L181）、第184位亮氨酸（L184）、第144位缬氨酸（V144）、第180位赖氨酸（K180）。

在本发明的第二方面，提供了一种重组蛋白，所述的重组蛋白包括：

40 (i) 如本发明第一方面所述的抗体或其抗原结合片段；以及

(ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

在另一优选例中，所述的标签序列包括6×His标签。

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，所述的重组蛋白为单体、二聚体、或多聚体。

45 在另一优选例中，所述重组蛋白包括：

(i) 选自下组的抗体, 所述抗体的重链可变区含有1、4、6、9、24或28中任一所示的氨基酸序列; 和/或所述的轻链可变区含有2、3、5、7、8、26或30中任一所示的氨基酸序列; 以及(ii)任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

在另一优选例中, 所述重组蛋白还包括结合其他靶点的抗体或其抗原结合片段, 例如结合CTLA-4、PD-1、PD-L1的抗体或其抗原结合片段。

在本发明的第三方面, 提供了一种多核苷酸, 所述多核苷酸编码选自下组的多肽:

(1) 如本发明第一方面的抗体或其抗原结合片段; 以及

(2) 如本发明的第二方面所述的重组蛋白。

在另一优选例中, 编码所述重链可变区的多核苷酸如SEQ ID NO. 23、27、33、36、38、41所示; 和/或, 编码所述轻链可变区的多核苷酸如SEQ ID NO. 25、29、34、35、37、39、40所示。

在本发明的第四方面, 提供了一种载体, 所述载体含有本发明第三方面所述的多核苷酸。

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。

在本发明的第五方面, 提供了一种遗传工程化的宿主细胞, 所述宿主细胞含有本发明第四方面所述的载体或基因组中整合有本发明第三方面所述的多核苷酸。

在本发明的第六方面, 提供了一种抗体偶联物, 该抗体偶联物含有:

(a) 抗体部分, 如本发明第一方面所述的抗体或其抗原结合片段; 和

(b) 与所述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、放射性核素、酶、或其组合。

在另一优选例中, 所述的抗体部分与所述的偶联部分通过化学键或接头进行偶联。

在本发明的第七方面, 提供了一种CAR构建物, 所述CAR构建物的单克隆抗体抗原结合区的scFv段为特异性结合于CD73的结合区, 并且, 所述scFv的重链可变区包括:

其中, 所述scFv的重链可变区包括以下三个互补决定区CDR:

SEQ ID NO.10所示的HCDR1,

SEQ ID NO.11所示的HCDR2,

SEQ ID NO.12所示的HCDR3; 和

所述scFv的轻链可变区包括以下三个互补决定区CDR:

SEQ ID NO.13所示的LCDR1,

SEQ ID NO.14所示的LCDR2,

SEQ ID NO.15所示的LCDR3; 或

所述scFv的重链可变区包括以下三个互补决定区CDR:

SEQ ID NO.16所示的HCDR1,

SEQ ID NO.17所示的HCDR2,

SEQ ID NO.18所示的HCDR3; 和

所述scFv的轻链可变区包括以下三个互补决定区CDR:

SEQ ID NO.19所示的LCDR1,

SEQ ID NO.20所示的LCDR2,

SEQ ID NO.21所示的LCDR3。

在本发明的第八方面, 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七方面所述的CAR构建物。

在另一优选例中, 所述的免疫细胞包括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)。

在本发明的第九方面, 提供了一种药物组合物, 所述药物组合物含有:

(i) 活性成分，所述活性成分选自下组：如本发明第一方面所述的抗体或其抗原结合片段、如本发明第二方面所述的重组蛋白、如本发明第六方面所述的抗体偶联物、如本发明第八方面所述的重组的免疫细胞、或其组合；以及

(ii) 药学上可接受的载体。

5 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。

在另一优选例中，所述的药物组合物还包括(iii)其他活性成分，较佳地包括结合其他靶点的抗体或其抗原结合片段，更佳地包括结合CTLA-4、PD-1、PD-L1的抗体或其抗原结合片段。

10 在本发明的第十方面，提供了一种体外检测样品中CD73蛋白的方法，所述方法包括步骤：

(1) 在体外，将所述样品与如本发明第一方面所述的抗体或如本发明第六方面所述的抗体偶联物接触；

(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蛋白。

15 在本发明的第十一方面，提供了一种药物组合，包括：

(i) 第一活性成分，所述第一活性成分包括如本发明第一方面所述的抗体、如本发明第六方面所述的抗体偶联物、如本发明第八方面所述的重组的免疫细胞、或如本发明的第九方面所述的药物组合物、或其组合；

(ii) 第二活性成分，所述第二活性成分包括第二抗体、或化疗剂。

20 在另一优选例中，所述第二抗体选自下组：CTLA4抗体、PD-1抗体、PD-L1抗体。

在另一优选例中，所述的第二抗体为PD-1抗体。

在另一优选例中，所述化疗剂选自下组：多西他赛、卡铂、或其组合。

25 在本发明的第十二方面，提供了一种如本发明第一方面所述的抗体或其抗原结合片段、如本发明第二方面所述的重组蛋白、如本发明第六方面所述的抗体偶联物、如本发明第八方面所述的重组的免疫细胞、如本发明第十二方面所述的药物组合的用途，用于(a)制备试剂或试剂盒；和/或(b)制备预防和/或治疗CD73相关疾病的药物。

30 在本发明的第十三方面，提供了一种预防和/或治疗CD73相关疾病的方法，所述方法包括：给需要的对象施用如本发明第一方面所述的抗体、如本发明第六方面所述的抗体偶联物、如本发明第八方面所述的重组的免疫细胞、或如本发明的第九方面所述的药物组合物、或其组合。

在另一优选例中，所述CD73相关疾病选自下组：

35 血液癌、淋巴瘤、恶性胶质瘤、黑色素瘤、皮肤癌、胃癌、胃肠道间质瘤、肝癌、胆管癌、胆囊癌、腹膜癌、结直肠癌、小肠癌、肛门癌、多发性骨髓瘤、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、阴道癌、膀胱癌、肾癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、前列腺癌、睾丸癌、阴茎癌、甲状腺癌、头颈部癌、食道癌、骨癌、肉瘤。

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。

40 附图说明

图1显示鼠源抗体对人CD73-His蛋白的结合能力。

图2显示鼠源抗体抑制CD73酶活性的能力。

图3显示嵌合抗体对人CD73-His蛋白的结合活性。

图4显示56B10各人源化抗体对人CD73-His蛋白的结合活性。

45 图5显示48A11各人源化抗体对人CD73-His蛋白的结合活性。

图6显示人源化抗体对人CD73蛋白酶活性的抑制作用。

图7显示人源化抗体对肿瘤细胞(MDA-MB-231细胞)表面CD73蛋白的结合活性。

图8显示人源化抗体对肿瘤细胞(H292细胞)表面CD73蛋白的结合活性。

图9显示人源化抗体对肿瘤细胞(A375细胞)表面CD73蛋白的结合活性。

图10显示人源化抗体对肿瘤细胞(MDA-MB-231细胞)表面CD73蛋白酶活性的抑制作用。

图11显示人源化抗体对肿瘤细胞(H292细胞)表面CD73蛋白酶活性的抑制作用。

图12显示人源化抗体对肿瘤细胞(A375细胞)表面CD73蛋白酶活性的抑制作用。

图13显示人源化抗体逆转肿瘤细胞降解AMP对CD4⁺ T细胞应答的抑制-1。

图14显示人源化抗体逆转肿瘤细胞降解AMP对CD8⁺ T细胞应答的抑制-2。

图15显示人源化抗体的体内药效活性。

图16显示人源化抗体48A11-HuV33对CD73的结合表位测定。

图17显示人源化抗体56B10-HuV31对CD73的结合表位测定。

图18显示人源化抗体48A11-HuV33对CD73-ND各突变体蛋白的亲和力-1。

图19显示人源化抗体48A11-HuV33对CD73-ND各突变体蛋白的亲和力-2。

图20显示人源化抗体48A11-HuV33对CD73-ND各突变体蛋白的亲和力-3。

图21显示人源化抗体48A11-HuV33对CD73-ND各突变体蛋白的亲和力-4。

图22显示影响48A11-HuV33结合的关键氨基酸位点在CD73结晶3D结构图中位置。

具体实施方式

本发明人经过广泛而深入地研究,通过大量筛选,首次获得一种抗CD73抗体及其人源化抗体。本发明的抗CD73抗体具有优异的生物活性,能够通过抑制CD73的酶活性来阻断腺苷的产生直接破坏腺苷介导的免疫抑制。特别地,本发明的靶向CD73的人源化抗体与靶向PD1抗体联用,具有协同作用,可显著增强各自单药的疗效。在此基础上完成了本发明。

术语

本发明中,术语“抗体(Antibody,缩写Ab)”和“免疫球蛋白G(Immunoglobulin G,缩写IgG)”是有相同结构特征的异四聚糖蛋白,其由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(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(isotype)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),其后是恒定区,重链恒定区由三个结构域CH1、CH2、以及CH3构成。每条轻链的一端有可变区(VL),另一端有恒定区,轻链恒定区包括一个结构域CL;轻链的恒定区与重链恒定区的CH1结构域配对,轻链的可变区与重链的可变区配对。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,例如参与抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用(ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)等。重链恒定区包括IgG1、IgG2、IgG3、IgG4亚型;轻链恒定区包括κ(Kappa)或λ(Lambda)。抗体的重链和轻链通过重链的CH1结构域和轻链的CL结构域之间的二硫键共价连接在一起,抗体的两条重链通过铰链区之间形成的多肽间二硫键共价连接在一起。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。在本发明中,抗体可以是单特异性、双特异性、三特异性、或者更多的多重特异性。

本发明“单克隆抗体”指从一类基本均一的群体获得的抗体,即该群体中包含的单个抗体是相同的,除少数可能存在的天然发生的突变外。单克隆抗体高特异性地针对单个抗原位点。而且,与常规多克隆抗体制剂(通常是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。除了它们的特异性外,单克隆抗体的好处还在于它

们是通过杂交瘤培养来合成的，不会被其它免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示了抗体的特性，是从基本均一的抗体群中获得的，这不应被解释成需要用任何特殊方法来生产抗体。

本发明“抗原结合片段”是指能够结合特定抗原的抗体活性片段，优选地与人 CD73 特异性结合的抗体的片段。本发明的抗原结合片段的例子包括 Fab 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段等。Fab 片段是用木瓜蛋白酶消化抗体产生的片段。F(ab')₂ 片段是用胃蛋白酶消化抗体产生的片段。Fv 片段是由抗体的重链可变区和轻链可变区紧密非共价关联的二聚物组成。

本发明中，术语“Fab”和“Fc”是指木瓜蛋白酶可将抗体裂解为两个完全相同的 Fab 段和一个 Fc 段。Fab 段由抗体的重链的 VH 和 CH1 以及轻链的 VL 和 CL 结构域组成。Fc 段即可结晶片段 (fragment crystallizable, Fc)，由抗体的 CH2 和 CH3 结构域组成。Fc 段无抗原结合活性，是抗体与效应分子或细胞相互作用的部位。

本发明中，术语“scFv”为单链抗体 (single chain antibody fragment, scFv)，由抗体重链可变区和轻链可变区通常通过 15~25 个氨基酸的连接短肽 (linker) 连接而成。

本发明“鼠源抗体”是指来源于大鼠或小鼠的抗体，优选小鼠。本发明的鼠源抗体为使用人 CD73 为抗原免疫小鼠并进行杂交瘤细胞筛选获得。

本发明“嵌合抗体”是指包含来源于一个物种的重和轻链可变区序列以及来源于另一个物种的恒定区序列的抗体，例如具有与人恒定区连接的鼠重和轻链可变区的抗体。

本发明中，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整个抗体可变区中。它集中于重链可变区和轻链可变区中称为互补决定区 (complementarity-determining region, CDR) 或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为框架区 (frame region, 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))。

本发明“人源化抗体”是指其 CDR 来源于非人物种 (优选小鼠) 抗体，抗体分子中残余的部分 (包括框架区和恒定区) 来源于人抗体。此外，框架区残基可被改变以维持结合亲和性。

如本文所用，术语“框架区”(FR)指插入 CDR 间的氨基酸序列，即指在单一物种中不同的免疫球蛋白间相对保守的免疫球蛋白的轻链和重链可变区的那些部分。免疫球蛋白的轻链和重链各具有四个 FR，分别称为 FR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L 和 FR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-H。相应地，轻链可变结构域可因此称作 (FR1-L)-(CDR1-L)-(FR2-L)-(CDR2-L)-(FR3-L)-(CDR3-L)-(FR4-L) 且重链可变结构域可因此表示为 (FR1-H)-(CDR1-H)-(FR2-H)-(CDR2-H)-(FR3-H)-(CDR3-H)-(FR4-H)。优选地，本发明的 FR 是人抗体 FR 或其衍生物，所述人抗体 FR 的衍生物与天然存在的人抗体 FR 基本相同，即序列同一性达到 85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99%。获知 CDR 的氨基酸序列，本领域的技术人员可轻易确定框架区 FR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L 和/或 FR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-H。

如本文所用，术语“人框架区”是与天然存在的人抗体的框架区基本相同的 (约 85% 或更多，具体地 90%、95%、97%、99% 或 100%) 框架区。

本发明中，术语“抗”、“结合”、“特异性结合”是指两分子间的非随机的结合反应，如抗体和其所针对的抗原之间的反应。通常，抗体以小于大约 10^{-7} M，例如小于大约 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M 或更小的平衡解离常数 (KD) 结合该抗原。本发明中，术语“KD”是指特定抗体-抗原相互作用的平衡解离常数，其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。

平衡解离常数越小，抗体-抗原结合越紧密，抗体与抗原之间的亲和力越高。例如，使用表面等离子体共振术（Surface Plasmon Resonance，缩写 SPR）在 BIACORE 仪中测定抗体与抗原的结合亲和力或使用 ELISA 测定抗体与抗原结合的相对亲和力。

本发明中，术语“表位”是指与抗体特异性结合的多肽决定簇。本发明的表位是抗原中被抗体结合的区域。

在本发明中，本发明抗体还包括其保守性变异体，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

编码核酸和表达载体

本发明还提供了编码上述抗体或其片段或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。

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。

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。

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。

其中所述载体为本领域常规的表达载体,是指包含适当的调控序列,例如启动子序列、终止子序列、多腺苷酰化序列、增强子序列、标记基因和/或序列以及其他适当的序列的表达载体。所述表达载体可以是病毒或质粒,如适当的噬菌体或者噬菌粒,更多技术细节请参见例如 Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989。许多用于核酸操作的已知技术和方案请参见 *Current Protocols in Molecular Biology*, 第二版, Ausubel 等编著。本发明所述表达载体较佳地为 pDR1, pcDNA3.1(+), pcDNA3.1/ZEO(+), pDHFR, pcDNA4, pDHFF, pGM-CSF 或 pCHO 1.0。

本发明中,术语“宿主细胞”为本领域常规的各种宿主细胞,只要能使载体稳定地自行复制,且所携带的多核苷酸分子可被有效表达即可。其中所述宿主细胞包括原核表达细胞和真核表达细胞,所述宿主细胞较佳地包括: COS、CHO、NS0、sf9、sf21、DH5 α 、BL21(DE3)、TG1、BL21(DE3)、293F 或 293E 细胞。

抗体的制备

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。

药物组合物和应用

本发明还提供了一种组合物。优选地,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,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(但不限于):静脉注射、静脉滴注、皮下注射、局部注射、肌肉注射、瘤内注射、腹腔内注射(如腹膜内)、颅内注射、或腔内注射。本发明中,术语“药物组合物”是指本发明的抗 CD73 抗体可以和药学上可以接受的载体一起组成药物制剂组合物从而更稳定地发挥疗效,这些制剂可以保证本发明公开的抗 CD73 抗体的氨基酸核心序列的构象完整性,同时还保护蛋白质的多官能团防止其降解(包括但不限于凝聚、脱氨或氧化)。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%)的本发明上述的抗 CD73 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 10 微克/千克体重-约 50 毫克/千克体重。此外,本发明的抗 CD73 抗体还可与其他治疗剂一起使用,例如其它免疫分子调节剂联合使用(如 CTLA-4 抗体、

PD-1 抗体)。

使用药物组合物时，是将安全有效量的抗 CD73 抗体或其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 10 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。

抗体-药物偶联物(ADC)

本发明还提供了基于本发明抗体的抗体偶联药物(antibody-drug conjugate, ADC)。

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。

抗体可以偶联药物从而形成抗体药物偶联物(ADCs)。典型地，ADC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磺酸盐。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。

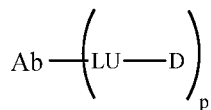
有用的药物类别包括，例如，抗微管蛋白药物、DNA小沟结合试剂、DNA复制抑制剂、烷化试剂、抗生素、叶酸拮抗物、抗代谢药物、化疗增敏剂、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱等。在本发明中，药物-接头可以用于在一个简单步骤中形成ADC。在其它实施方式中，双功能连接物化合物可以用于在两步或多步方法中形成ADC。例如，半胱氨酸残基在第一步骤中与接头的反应活性部分反应，并且在随后的步骤中，接头上的功能性基团与药物反应，从而形成ADC。

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(适合与酰肼类和烷氧基胺反应),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-羧基琥珀酰亚胺酯(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。

本发明还提供了制备ADC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(ADC)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,抗体药物偶联物ADC如下分子式所示:



其中:

Ab是抗体,

LU是接头;

D是药物;

而且下标p是选自1到8的值。

本发明的主要优点包括:

(1) 本发明提供了一种新型CD73抗体,对人CD73具有很高的亲和力,有效抑制肿瘤细胞表面的CD73蛋白酶活性。

(2) 本发明的CD73抗体能有效逆转CD73蛋白降解AMP或肿瘤细胞表面CD73蛋白介导的CD4⁺和CD8⁺ T细胞免疫应答的抑制。

(3) 本发明的CD73抗体具有良好的体内药效活性,同时将CD73与其它免疫分子调节剂(如CTLA-4抗体、PD-1抗体)联用可显著增强各自单药的疗效,可作为一种极具前景的肿瘤治疗策略。

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。

实验材料:

小鼠骨髓瘤细胞SP2/0:购自ATCC,货号CRL-1581。

Balb/c小鼠:购自上海灵畅生物科技有限公司。

H1975细胞:购自ATCC,货号CRL-1596。

MDA-MB-231细胞:购自ATCC,货号HTB-26。

H292细胞:购自中国科学院细胞库,货号SCSP-582。

A375细胞：购自中国科学院细胞库，货号SCSP-533。

SKOV3细胞：购自中国科学院细胞库，货号TCHu185。

HRP-羊抗鼠二抗：购自Millipore，货号AP181P。

HRP-山羊抗人IgG Fab二抗：购自Sigma，货号A0293-1ML

5 HRP-山羊抗人IgG Fc二抗：购自Sigma，货号A0170-1ML

驴抗鼠PE荧光二抗：购自Jackson，货号715-116-150。

羊抗人PE荧光二抗：购自Jackson，货号109-115-098

FITC标记山羊抗人IgG-Fc二抗：购自Abcam，货号97224。

TMB：购自KPL公司，货号52-00-03。

10 牛血清白蛋白（BSA）：购自生工，货号A600332-0100

RPMI 1640 Medium：购自Gibco公司，货号61870127

青霉素-链霉素(Penicillin-streptomycin)：购自Gibco公司，货号15140122

胎牛血清（FBS）：购自Gibco公司，货号10091-148

polyethylene glycol solution购自sigma公司，货号P7181

15 Hybridoma-SFM 购自life technologies，货号12045-076

HAT：购自Gibco，货号21060017。

pcDNA 3.4：购自ThermoFisher，货号A14697。

HEK-293F：购自Thermo Fisher，货号A14527。

Streptavidin（SA，链亲和素）：购自Sigma，货号S0677。

20 Streptavidin HRP：购自BD Pharmingen，货号554066。

EZ-Link NHS-Biotin Reagent：购自Thermo Fisher，货号20217。

Cell Titer-Glo：购自Promega，货号G7570。

AMP：购自Sigma，货号A1752。

ATP：购自Sigma，货号A7655。

25 HBS-EP pH7.4缓冲液：购自GE Healthcare，货号BR-1006-69。

Protein A/G的芯片：购自GE Healthcare，货号BR-1005-30。

CD8 MicroBeads, human：购自Miltenyi Biotec，货号130-097-057。

Naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit II, human：购自Miltenyi Biotec，货号130-094-13。

LS Columns plus tubes：购自Miltenyi Biotec，130-122-7291。

30 Ametycin：购自Tokyo Chemical Industry，货号M2320。

CD3 Monoclonal Antibody (OKT3), Functional Grade：购自eBioscience，货号16-0037-85。

CD28 Monoclonal Antibody (CD28.2), Functional Grade：购自eBioscience，货号16-0289-85。

35 Recombinant Human IL-2 Protein：购自R&D Systems，货号202-IL-50。

EHNA：购自Sigma，货号E114。

Purified NA/LE Mouse Anti-Human IFN- γ ：购自BD Pharmingen，货号554547。

Recombinant Human IFN- γ ：购自BD Pharmingen，货号554617。

Biotin Mouse Anti-Human IFN- γ ：购自BD Pharmingen，货号554550。

40

实施例1 抗原免疫动物以及杂交瘤的制备和筛选

1. 抗原表达

通过常规的基因合成和分子克隆的方法将CD73的胞外区基因（序列来自UniProt，登记号为P21589）构建到pcDNA 3.4表达载体中，并在其N端加上信号肽序列，C末端加上6×His标签，转染HEK-293F细胞，表达5d后，收集细胞培养上清并纯化获得CD73-His蛋白。同样，将上述6×His标签换成人IgG1的Fc序列后转染HEK-293F

45

细胞，表达纯化后获得CD73-Fc蛋白。

CD73胞外区氨基酸序列（SEQ ID NO. 22）：

WELTILHTNDVHSRLEQTSSEDSSKCVNASRCMGGVARLFTKVQQIRRAEPNVLLLDAGD
 QYQGTIWFTVYKGAEV AHFMNALRYDAMALGNHEFDNGVEGLIEPLLKEAKFILSANIKAKG
 5 PLASQISGLYLPYKVLPVGDEVVGIVGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEITALQPEVDKLKTLNVN
 KIIALGHSGFEMDKLIAQKVRGVDDVVVGHSNTFLYTGNPPSKEVPAGKYPPFIVTSDDGRKVPV
 VQAYAFGKYLGYLKIEFDERGNVISSHGNPILLNSSIPEDPSIKADINKWKRIKLDNYSTQELGKTI
 VYLDGSSQSCRFCNMGNLICDAMINNNLRHTDEMFWNHVSMCILNGGGIRSPIDERNNGTIT
 10 WENLA AVLFPFGGTFDLVQLKGSTLKKAFEHSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDL SRKPGDRVV
 KLDVLCTKCRVPSYDPLKMDEVYKVILPNFLANGGDGFQMIKDELLRHDSGDQDINVVSTYISK
 MKVIYPAVEGRIK

2、抗原免疫小鼠

用CD73-His蛋白常规免疫Balb/c小鼠。第1天，可溶性人CD73-His蛋白与弗氏完全佐剂乳化后，对Balb/c小鼠进行皮下多点注射(CD73-His蛋白，100μg/鼠/0.5mL)，第
 15 14天，将可溶性CD73-His蛋白与弗氏不完全佐剂乳化后，对Balb/c小鼠进行皮下注射
 (CD73-His蛋白，50μg/鼠/0.5mL)，在第28天，可溶性CD73-His蛋白与弗氏不完全佐剂
 乳化后，对Balb/c小鼠进行皮下注射(CD73-His蛋白，50μg/鼠/0.5mL)，三周后用可溶
 性CD73-His蛋白，50μg/小鼠/0.2mL，腹腔内注射激发免疫，3-4天后，取小鼠脾脏进
 行融合实验。

3、杂交瘤的制备和筛选

在小鼠末次免疫后3-4天，使用常规的杂交瘤技术方案，将小鼠脾细胞与小鼠骨
 髓瘤细胞SP2/0进行PEG融合。融合后的细胞在完全培养基中悬浮均匀，完全培养基
 为将RPMI1640-GLUMAX加入1% Penicillin-streptomycin，20% FBS，1*HAT组成的培
 养基。融合后的细胞按 3×10^4 个细胞/200μl/孔，共铺62块96孔细胞培养板，于培养箱
 25 中培养。在7-12天后，收获上清液，通过ELISA方法筛选人CD73结合活性阳性的杂交
 瘤孔。

其中，ELISA方法筛选人CD73结合活性阳性的杂交瘤孔的方法如下：将CD73-Fc
 以PBS缓冲液稀释至1μg/ml，100μl /孔加入ELISA板中，4℃包被过夜。次日甩掉上清，
 PBST洗板1次，加入PBS配制的5%脱脂奶粉，37℃封闭2h，PBST洗板3次待用。将收
 30 取的杂交瘤上清液依次加入封闭后的ELISA板中，100μl/孔，37℃放置1h。PBST洗板
 3次，加入HRP标记的羊抗鼠IgG二抗，37℃放置30min；PBST洗板3次后，在吸水纸
 上尽量拍干残留液滴，每孔加入100μl的TMB，室温避光显色5min；每孔加入50μl 2M
 H₂SO₄终止液终止底物反应，于多功能酶标仪450nm处读取OD值，分析待测抗体与靶
 抗原CD73结合能力。通过筛选共计拿到30株杂交瘤细胞株。将含血清完全培养基中
 35 扩增筛选获得的30株杂交瘤细胞株，离心换液至无血清Hybridoma-SFM培养基，使细
 胞密度为 $1 \sim 2 \times 10^7$ /ml，在8% CO₂、37℃条件下培养1周，离心获取培养上清，通过Protein
 G亲和层析进行纯化，得到抗人CD73的各鼠源单克隆抗体蛋白并进行分别命名。

实施例3 鼠源抗体对人CD73-His蛋白的结合能力

间接酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定鼠源抗体对人CD73-His蛋白的结合能力。
 40 具体方法如下：

以包被液（50mM的碳酸盐包被缓冲液，pH 9.6）稀释SA蛋白至1.5μg/mL包板
 ELISA板，4℃，过夜；弃掉上清，PBST洗板3次，再用PBS配制5%的脱脂奶粉封闭，
 37℃孵育2h；PBST洗板1次后，CD73-biotin蛋白（按照EZ-Link NHS-Biotin Reagent
 说明书将CD73-His蛋白biotin化获得）稀释至0.5μg/mL，100 μL/孔，室温孵育1h；PBST
 45 洗板3次，将制备的抗人CD73各鼠源单克隆抗体以PBST配制的1%BSA缓冲液进行梯
 度稀释，按照100μl/孔加入上述ELISA板中，37℃孵育1h；PBST洗板3次，加入HRP
 标记的羊抗鼠IgG二抗，37℃孵育30min；PBST洗板3次后，在吸水纸上尽量拍干残留

液滴，每孔加入100μl的TMB显色液，室温避光显色5min，每孔加入50μl 2M H₂SO₄终止液终止底物反应，于多功能酶标仪450nm处读取OD值，分析待测抗体与靶抗原人CD73-His的结合能力。

代表性实验结果如图1和表1所示，可知鼠源抗体48A11、56B10与对CD73蛋白的结合活性相对较强。

表1：各鼠源单克隆抗体对CD73-Fc结合的EC₅₀

样品	59D6	41A11	48A11	32G2	56B10	4H1
EC ₅₀ (ng/mL)	6114	148673	19.68	35.64	26.87	1235

实施例4 鼠源抗体抑制CD73酶活性的能力

CD73是一种酶，可以催化一磷酸腺苷（AMP）去磷酸化为腺苷。在此用检测ATP的方法测定鼠源抗体对H1975细胞表面CD73蛋白酶活性的抑制作用。具体方法如下：

收集处于对数生长期的H1975细胞，离心去除细胞培养液，用PBS缓冲液洗涤细胞1遍；计数并用含10%FBS的RPMI-1640培养基稀释至3*10⁴/well，铺细胞至96孔细胞培养板中，100 μL/孔，于细胞培养箱37℃培养过夜；次日，弃细胞培养上清，将待测抗体用RPMI-1640培养基稀释至10μg/ml，5倍梯度稀释，随后按照50μL/孔，加入上述细胞培养板中，于37℃孵育30min；再加入800μM 的AMP，50μL/孔，37℃孵育3h，取25μL培养上清与25μL 80μM 的ATP于96孔白色不透光检测板中混匀后，加入50μL 的Cell Titer-Glo检测试剂，室温孵育5min，于多功能酶标仪中读取荧光强度并分析。

代表性实验结果如图2和表2所示，相对于其他鼠源单克隆抗体，48A11、56B10对H1975细胞表面CD73蛋白酶活性的抑制作用最强。

表2：各鼠源单克隆抗体对H1975细胞表面CD73蛋白酶活的抑制作用

样品	59D6	41A11	48A11	32G2	56B10	4H1
IC ₅₀ (ng/mL)	164.7	1.041	17.01	130.1	20.74	2507

实施例5 候选抗体可变区基因获取及嵌合抗体的制备

本实施例通过分子生物学的相关方法获取鼠源抗体48A11、56B10的重链可变区和轻链可变区，并进一步构建嵌合抗体。

通过Trizol分别提取48A11、56B10杂交瘤细胞的RNA并进行mRNA反转录获取cDNA，随后以cDNA为模板，分别用鼠源抗体的重链和轻链简并引物（《Antibody Engineering》Volume 1, Edited by Roland Kontermann and Stefan Dübel，组合引物的序列来自第323页）进行PCR，对所获得的PCR产物进行测序并通过kabat数据库分析，确定所获得的序列为鼠源抗体的可变区序列。

相关序列信息如下：

48A11 重链可变区基因序列，全长均为351bp，各自编码117个氨基酸残基，核苷酸序列为（SEQ ID NO. 23）：

CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGT
CCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGG
ACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTAATCCTAGCATCGGTCGTAATACTACAATGAGAAGT
TCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTTCATGCAACTCAGCAG
TCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAAGGGTCTATGGTACTATGGACTACTG
GGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

48A11 重链可变区氨基酸序列为（SEQ ID NO. 24）：

QVQLQPPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPQGLEWIGEINPSIGRTNYNEK
FKSKATLTVDKSSSTAFMQLSSLTSEDSAVYYCARRVYGTMDYWGQGTSTVTVSS

48A11 轻链可变区基因序列，全长均为318bp，各自编码106个氨基酸残基，核苷酸序列为（SEQ ID NO. 25）：

GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCACTATC
ACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTAATAGCTATTTAAGCTGGTTCAGCAGAAACCAGGGAAATC

TCCTAAGACCCTGATCTATCGTGCAAACATATGGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGCA
GTGGATCTGGGCAAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAGTATGAAGATATGGGAATTTATT
ATTGTCTACAGTATGATGAGTTATACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

48A11 轻链可变区氨基酸序列为 (SEQ ID NO. 26):

5 DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANIWVDGVPSRFSGS
GSGQDYSLTISSEYEDMGIYYCLQYDELYTFGGGTKLEIK

56B10 重链可变区基因序列, 全长均为 357bp, 各自编码 119 个氨基酸残基, 核苷酸序列为 (SEQ ID NO. 27):

10 CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAGGATAT
CCTGCAAGACTTCTGGCTACACCTTCACAAGATACTATATATATTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGAC
AGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTATCCTGGAAATTTAATACTAAGTACAATGAGAAGTTCA
AGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCT
GACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGATGTATATGATTACGCGGGATTGCTTA
CTGGGGCCAGGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

15 56B10 重链可变区氨基酸序列为 (SEQ ID NO. 28):

QVQLQQSGPELVKPGASVRISCKTSGYTFTRYIYWVKQRPGQGLEWIGWIYPGNFNTKYNEK
FKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARDVYDYAGFAYWGQGLTVTVA

56B10 轻链可变区基因序列, 全长均为 321bp, 各自编码 107 个氨基酸残基, 核苷酸序列为 (SEQ ID NO. 29):

20 GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAGATTCTTGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCAT
CACCTGCAAGGCCAGTCAGGGTGTGGCTACTGCTGTTGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAA
TCTCTAACTCCTGATTTACTGGGCATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGG
CAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATTAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGATT
ATTTCTGTCAAGCAATATAGCAGCTATCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

25 56B10 轻链可变区氨基酸序列为 (SEQ ID NO. 30):

DIVMTQSHRFLSTSVGDRVSITCKASQGVATAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTG
SGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPWTFGGGTKLEIK

对所得的各杂交瘤重链可变区序列与人的IgG4 (S228P) 恒定区 (氨基酸序列SEQ ID NO. 31) 拼接, 轻链可变区序列与人的kappa链恒定区 (氨基酸序列SEQ ID NO. 32) 拼接, 分别构建各嵌合抗体的重链和轻链至pcDNA3.4表达载体, 转染HEK-293F细胞表达并纯化获得各嵌合抗体, 分别命名为48A11-ch、56B10-ch。

实施例6 嵌合抗体对人CD73-His蛋白的结合活性

参照实施例3测定嵌合抗体48A11-ch、56B10-ch对人CD73-his蛋白的结合亲和力。实验结果如图3所示, 48A11-ch、56B10-ch对人CD73-his蛋白结合的EC₅₀分别为

35 0.067nM和0.09nM。

参照实施例3测定嵌合抗体48A11-ch、56B10-ch对人CD73-his蛋白的结合亲和力。实验结果如图3所示, 48A11-ch、56B10-ch对人CD73-his蛋白结合的EC₅₀分别为0.067nM和0.09nM。

实施例7 人源化抗体的构建和制备

40 对各候选鼠源抗体轻链可变区和重链可变区的氨基酸序列进行分析, 依据Kabat规则确定鼠源抗体的48A11和56B10的抗原互补决定区 (CDR) 和4个框架区 (FR)。其中, 48A11重链互补决定区的氨基酸序列为

HCDR1: SYWMH SEQ ID NO.10

HCDR2: EINPSIGRTNYNEKFKS SEQ ID NO.11

45 HCDR3: RYVGTMDY SEQ ID NO.12

轻链互补决定区的氨基酸序列为

LCDR1: KASQDINSYLS SEQ ID NO.13

LCDR2: RANIWVD SEQ ID NO.14

LCDR3: LQYDELYT SEQ ID NO.15

50 56B10重链互补决定区的氨基酸序列为

HCDR1: RYIY SEQ ID NO.16

HCDR2: WIYPGNFNTKYNEKFKG SEQ ID NO.17

HCDR3: DVYDYAGFAY SEQ ID NO.18

轻链互补决定区的氨基酸序列为

LCDR1: KASQGVATAVA

SEQ ID NO.19

LCDR2: WASTRHT

SEQ ID NO.20

LCDR3: QQYSSYPWT

SEQ ID NO.21

- 5 在Germline数据库中选取与上述各鼠源抗体非FR区匹配最好的人源化模板。然后将鼠源抗体的CDR区移植到所选择的人源化模板上,替换人源模板的CDR区,重链可变区再与人IgG4恒定区重组,轻链可变区与人的kappa链恒定区重组,同时以该抗体的三维结构为基础,对包埋残基、与CDR区有直接相互作用的残基,以及对各抗体的VL和VH的构象有重要影响的残基进行回复突变,最终获得多个人源化抗体,各人源化抗体对应的重链、轻链可变区及序列如表3所示。分别构建各人源化抗体的重链和轻链至pcDNA3.4表达载体,转染HEK-293F细胞表达并纯化获得各人源化抗体。

获得的相关序列信息如下:

表 3: 各人源化抗体可变区序列表

抗体		氨基酸序列	核苷酸序列
56B10-HuV21	VH	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 33
	VL	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 34
56B10-HuV23	VH	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 33
	VL	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 35
56B10-HuV31	VH	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 36
	VL	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 34
56B10-HuV32	VH	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 36
	VL	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 37
56B10-HuV33	VH	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 36
	VL	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 35
48A11-HuV22	VH	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 38
	VL	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 39
48A11-HuV23	VH	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 38
	VL	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 40
48A11-HuV33	VH	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 41
	VL	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 40

相关氨基酸序列如下所示:

- 15 **SEQ ID NO: 1**
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTRYIYWVRQAPGQGLEWIGWIYPGNFNTKYNE
KFKGRATLTADTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDVYDYAGFAYWGQGLTLTVSS
- SEQ ID NO: 2**
 DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCKASQGVATAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFSGS
 20 GSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSYPWTFGQGTKVEIK
- SEQ ID NO: 3**
 DIQMTQSPSFLSASVGDRVITITCKASQGVATAVAWYQQKPGKSPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGS
 GSGTEFTLTISLQPEDFATYFCQQYSSYPWTFGQGTKVEIK
- SEQ ID NO: 4**
 25 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYIYWVRQRPQGLEWIGWIYPGNFNTKYNE
KFKGRATLTADTSASTAYMELSSLTSEDTAVYYCARDVYDYAGFAYWGQGLTLTVSS
- SEQ ID NO: 5**
 DIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCKASQGVATAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGS
 GSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQYSSYPWTFGQGTKVEIK
- SEQ ID NO: 6**
 30 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGEINPSIGRTNYNE
KFKSRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRVYGTMDYWGQGLTLTVSS
- SEQ ID NO: 7**
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLSWFQKPGKSPKTLIYRANIWVDGVPSRFSGS

GSGQDYTFITSSLPEDIATYYCLQYDELYTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 8

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKLLIYRANIWVDGVPSRFSGS

GSGQDYTFITSSLPEDIATYYCLQYDELYTFGQGTKVEIK

5 SEQ ID NO: 9

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIGEINPSIGRTNYNE

KFKSRVTLTRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRVYGTMDYWGQGLTVTVSS

实施例8 人源化抗体对人CD73-His蛋白的结合活性

参照实施例3测定各人源化抗体对人CD73-his蛋白的结合亲和力。

10 实验结果如图4和表4所示, 56B10各人源化抗体对CD73蛋白的结合亲和力与嵌合抗体56B10-ch相当。

如图5和表5所示, 48A11各人源化抗体对CD73蛋白的结合亲和力与嵌合抗体48A11-ch相当。

表4: 56B10各人源化抗体对CD73蛋白结合的EC₅₀

样品	EC ₅₀ (nM)
56B10-ch	0.070
56B10-HuV32	0.105
56B10-HuV31	0.079
56B10-HuV33	0.112
56B10-HuV23	0.107
56B10-HuV21	0.110

15

表5: 48A11各人源化抗体对CD73蛋白结合的EC₅₀

样品	EC ₅₀ (nM)
48A11-ch	0.058
48A11-HuV32	0.087
48A11-HuV33	0.069
48A11-HuV23	0.081
48A11-HuV22	0.093

实施例9 人源化抗体对人CD73蛋白酶活性的抑制作用

将CD73-His蛋白以Tris-MgCl₂ (25 mM Tris, 5 mM MgCl₂, pH=7.5)溶液稀释至0.5 μg/mL, 按照每孔25 μL加入到白色96孔细胞培养板中; 以Tris-MgCl₂溶液将各抗体进行梯度稀释, 按照每孔25 μL加入上述96孔板中并于37℃孵1 h;

20 每孔加入25 μL 预先混匀的AMP/ATP溶液 (AMP和ATP的 终浓度分别为300 μM和100 μM), 于37℃孵育1h; 每孔加入75 μL的Cell Titer-Glo检测液, 振荡混匀2分钟后, 于室温下反应5-8分钟; 随后将96孔板置于多功能酶标仪中测量荧光强度, 计算各抗体对CD73酶活性的抑制作用。

25 实验结果如图6和表6所示, 48A11-HuV22对CD73蛋白酶分解AMP活性的抑制作用最弱, 56B10-HuV33和48A11-HuV33的抑制作用相当, 56B10-HuV31的抑制作用最强。

表6: 各人源化抗体对CD73蛋白酶活性的抑制作用

样品	IC ₅₀ (nM)
56B10-HuV31	3.660
56B10-HuV33	4.129
48A11-HuV22	9.023
48A11-HuV33	4.274

实施例10 人源化单克隆抗体对CD73的结合动力学测定

利用共价偶联有Protein A/G的芯片捕获各待测抗体，相关运行参数如下： 抗体浓度为2 $\mu\text{g/mL}$ ，接触时间75 s，流速10 $\mu\text{L/min}$ ，再生接触时间为30 s。利用HBS-EP pH7.4缓冲液稀释CD73-his抗原，最高浓度为100 nM，按照2倍梯度稀释至0.78 nM，
5 设置复孔及0浓度点，采用6M 盐酸胍溶液作为再生缓冲液，在Biacore 8K上按照如下参数进样，结合时间180s，解离时间900s，流速30 $\mu\text{L/min}$ ，再生接触时间为30s。运行完成后，利用Biacore 8K Evaluation Software按照“1: 1 binding kinetics model”对数据进行分析，得出各抗体对CD73的结合动力学参数。

结果如表7，人源化抗体56B10-HuV31和48A11-HuV33对CD73结合常数（ k_a ）、
10 解离常数（ k_d ）以及平衡解离常数（ K_D ）均处于同一水平。

表7：各人源化抗体对CD73的结合动力学参数

样品	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
48A11-HuV33	1.68E+05	3.81E-04	2.26E-09
56B10-HuV31	1.99E+05	3.76E-04	1.89E-09

实施例11 人源化抗体对肿瘤细胞表面CD73蛋白的结合活性

分别收集处于对数生长期的MDA-MB-231（三阴性乳腺癌）、H292（人肺癌细胞）和A375（人恶性黑色素瘤细胞）细胞，用RPMI-1640基础培养基洗涤细胞一次，
15 并分别于含1%BSA的RPMI-1640基础培养基（抗体稀释液）中调整细胞浓度至 2.0×10^6 个/mL。用抗体稀释液按照3倍梯度稀释待测抗体，并取100 μL 各浓度的待测抗体与100 μL 的细胞于96孔细胞培养板中混合均匀，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h（待测抗体的最高工作浓度为500 nM，靶细胞为 1×10^5 个/孔）。PBS洗涤细胞两次以去除未结合的待测抗体，再将细胞与200 μL 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、FITC标记山羊抗人IgG-Fc二抗混匀，于4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min。PBS洗
20 涤细胞两次以去除未结合的二抗，最后将细胞重悬于200 μL PBS中，通过流式细胞仪测定待测抗体对该细胞的结合亲和力。

如图7所示，56B10-HuV31和48A11-HuV33均可与MDA-MB-231细胞结合，且48A11-HuV33的亲和力更强， EC_{50} 分别为1.387nM和1.927nM。

如图8所示，56B10-HuV31和48A11-HuV33均可与H292细胞结合，且
25 48A11-HuV33的亲和力更强， EC_{50} 分别为2.549nM和2.305nM。

如图9所示，56B10-HuV31和48A11-HuV33均可与A375细胞结合，且48A11-HuV33的亲和力更强， EC_{50} 分别为1.269nM和0.789nM。

实施例12 人源化抗体对肿瘤细胞表面CD73蛋白酶活性的抑制作用

分别收集处于对数生长期的MDA-MB-231、H292和A375细胞，用RPMI-1640基础培养基洗涤细胞一次，并于含10%FBS的RPMI-1640基础培养基调整细胞浓度分别为 1×10^5 个/mL， 1×10^5 和 1×10^6 个/mL，按照每孔100 μL 细胞悬液铺制96孔细胞培养板，于37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱过夜培养。第二天，弃细胞上清，并用Tris- MgCl_2 溶液洗涤细胞一次。用Tris- MgCl_2 溶液按照3倍梯度连续稀释待测抗体，并取50 μL 各浓度的待测抗体加入到各细胞培养孔中，于37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中孵育0.5 h（待测抗体的最高工作浓度为
30 100 $\mu\text{g/mL}$ ）。向细胞培养板中加入AMP，终浓度为300 μM ，每孔加入50 μL ，于37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中继续孵育3 h。取50 μL 上述细胞孵育上清至96孔白色细胞培养板中，加入等体积的ATP，对于MDA-MB-231细胞ATP终浓度为 100 μM （ATP:AMP=1:3）、对于H292和A375细胞ATP终浓度为 60 μM （ATP:AMP=1:5）。随后将白色细胞培养板于37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中孵育15 min。加入等体积Cell Titer-Glo试剂反应10min，于多功
40 能酶标仪上读取荧光值，分析各样品对肿瘤细胞表面CD73蛋白酶活性的抑制作用。

如图10所示，56B10-HuV31和48A11-HuV33均能有效抑制MDA-MB-231细胞表面CD73蛋白酶降解AMP的活性， IC_{50} 分别为0.610nM和0.566nM。

如图11所示，56B10-HuV31和48A11-HuV33均能有效抑制H292细胞表面CD73蛋

白酶降解AMP的活性，IC₅₀分别为0.818nM和0.859nM。

如图12所示，56B10-HuV31和48A11-HuV33均能有效抑制A375细胞表面CD73蛋白酶降解AMP的活性，IC₅₀分别为1.339nM和1.482nM。

实施例13人源化抗体逆转肿瘤细胞降解AMP对CD4⁺和CD8⁺ T细胞应答的抑制

1.T细胞分选

将新鲜购置的PBMC细胞（购自上海赛笠生物科技有限公司）至于冰上，计数，分别按照CD8⁺T和CD4⁺T细胞磁珠分选说明书要求，将CD8⁺T和CD4⁺T细胞分选出，备用。

2.肿瘤细胞处理

取处于对数生长期的H292细胞，去除细胞培养上清，加入新鲜配制的含有50 μg/mL Ametycin的RPMI-1640完全培养基，将细胞置于37℃细胞培养箱中继续培养3 h。

3.肿瘤细胞与T细胞共培养

将上述分选的CD8⁺T和CD4⁺T细胞，按照5*10⁴/100μl/孔分别铺制预先包被有1μg/mL和3μg/mL的CD3抗体的96孔细胞培养板。随后分别加入3μg/mL的CD28抗体和RPMI-1640完全培养基配制的IL-2（工作浓度为100 IU/mL）以激活T细胞。向各实验孔加入终浓度为0.5μM的EHNA和终浓度为300μM的AMP。进一步向各细胞培养孔加入各不同浓度的待测抗体以及上述经Ametycin作用后的H292细胞，细胞密度为2.5*10⁴/50μl /孔。将该96孔细胞培养板置于细胞培养箱中作用4d，收集细胞培养上清进行IFN-γ检测。

4.IFN-γ检测

用ELISA包被液将mouse anti-human IFN-γ抗体稀释至1 μg/mL，包被ELISA板，100 μL/孔，置于湿盒中，4 °C，包被16 h。用PBST洗涤ELISA板3次，去除未结合抗原，并将ELISA板于吸水纸上拍干，除去多余的液体，然后用PBS配制的2%BSA，200 μL/孔，于室温封闭2 h。用PBST洗涤一次，洗除多余的封闭液，并将ELISA板拍干，除去多余的液体，加入不同浓度抗体作用下的上述细胞上清，100 μL/孔，室温孵育1h。PBST洗涤ELISA板3次，将biotin-mouse anti-human IFN-γ抗体稀释至1 μg/mL，加入ELISA板，100 μL/孔，室温孵育1h。PBST洗涤ELISA板3次，将HRP-SA稀释按照1:5000稀释，加入ELISA板，100 μL/孔，室温孵育30 min。PBST洗涤ELISA板5次，并将ELISA板于吸水纸上拍干，除去多余的液体，加入TMB显色液，100 μL/孔，显色至合适深浅，加入2M H₂SO₄，50 μL/孔，以终止显色，并于多功能酶标仪中在450nm波长处测定其吸光度，分析数据。

结果分别如图13和图14所示，人源化抗体48A11-HuV33可以显著逆转肿瘤细胞H292降解AMP产生的腺苷对CD4⁺和CD8⁺ T细胞应答的抑制作用，其活性明显优于56B10-HuV31。

实施例14人源化抗体对不同种属CD73蛋白的交叉反应性

实验方法参照实施例10，其中抗原分别用食蟹猴CD73蛋白（购自Sino biological，货号90192-C08H）和小鼠CD73蛋白（购自Sino biological，货号50231-M08H）。

实验结果如表8所示，48A11-HuV33和56B10-HuV31均可有效的与食蟹猴CD73蛋白结合，但不与小鼠CD73蛋白结合，说明食蟹猴可以作为后续药代毒理研究的相关种属。

表8：人源化抗体对食蟹猴和小鼠CD73蛋白的交叉反应性

样品	抗原	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
48A11-HuV33	CD73-小鼠	\	\	\
56B10-HuV31	CD73-小鼠	\	\	\
48A11-HuV33	CD73-食蟹猴	7.28E+04	8.83E-04	1.21E-08

56B10-HuV31	CD73-食蟹猴	9.99E+04	7.12E-04	7.13E-09
-------------	----------	----------	----------	----------

\: 不结合, 未检测出结合信号。

实施例15 人源化抗体的体内药效活性

本实施例利用人外周血单核细胞hPBMC (购自上海赛笠生物科技有限公司) 在NSG小鼠体内重建人源免疫系统, 并在此小鼠上建立人肺癌NCI-H292皮下移植瘤模型以评估候选抗体的体内药效活性。

具体实施步骤如下: 收集体外培养的人胞肺癌NCI-H292细胞, 将细胞悬液浓度调整为 $5 \times 10^7/\text{ml}$, 与基质胶以1: 1等比例混合。用PBS重悬新鲜复苏的PBMC细胞, 将PBMC悬液浓度调整为 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 。将混合好的肿瘤细胞悬液和PBMC悬液1: 1混合。在无菌条件下, 接种200 μl 细胞混合悬液于NSG小鼠右侧上背部皮下。当天将接种混合细胞的小鼠按体重随机分组, 每组8只。包括空白对照组; 抗PD1单克隆抗体609A组 (参见专利申请PCT/CN2018/073575), 1mg/kg剂量; 抗CD73单克隆抗体组, 包括56B10-HuV31、48A11-HuV33, 剂量均为10mg/kg, 以及抗CD73单抗分别与609A联用组。每周腹腔给药2次, 共给药8次。每周测定肿瘤体积2次。

各组肿瘤随时间的生长曲线如图15所示, 可见在实验终点, 相对于对照组, 609A单药对H292的小鼠皮下移植瘤抑制率为34.4%, 56B10-HuV31为25.3%, 48A11-HuV33为24.4%, 当56B10-HuV31与609A联用后抑制率为61.2%, 48A11-HuV33与609A联用后抑制率为52.9%, 这表明靶向CD73的人源化抗体56B10-HuV31和48A11-HuV33与靶向PD1抗体609A联用可显著增强各自单药的疗效。

实施例16人源化抗体对CD73的结合表位测定

根据CD73序列的结构域特征及文献资料研究结果 (DOI: 10.1016/j.str.2012.10.001), 将CD73胞外区分为两部分进行表达, 分别为第1位的氨基酸W至第291位的氨基酸D的N端区域和第311位的氨基酸Q至第523位的氨基酸S的C端区域, 参照实施例1的方进行表达纯化, 并分别命名为CD73-ND-his和CD73-CD-his。

参照实施例3的实验方法, 测定48A11-HuV33和56B10-HuV31对CD73蛋白的结合区域。结果分别如图16和17所示, 48A11-HuV33和56B10-HuV31均只与CD73-ND-his结合, 而不与CD73-CD-his结合, 说明人源化抗体48A11-HuV33和56B10-HuV31均结合在CD73蛋白的N端结构域。

进一步根据48A11-HuV33和56B10-HuV31对CD73蛋白的结合特征, 选取CD73蛋白N端结构域的第133位氨基酸Y至第144位氨基酸V以及第180位氨基酸K至第187位氨基酸N两个序列片段通过PCR (聚合酶链式反应) 进行丙氨酸扫描式定点突变, 随后参照实施例1进行表达和纯化, 获得各CD73-ND突变体。

参照实施例3的实验方法, 测定48A11-HuV33对CD73-ND各突变体蛋白的亲和力, 其中SA蛋白稀释至 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 包板ELISA板, 生物素化的CD73蛋白 (CD73-biotin) 使用浓度为 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$, 实验结果如图18至图21所示, 各突变体蛋白对48A11-HuV33结合的亲和力下降倍数 (Ratio(EC_{50})) 以及高平台值下降倍数 (Ratio(Top)) 分别如表9至表12所示, 可见Y132、L133、P139 三个氨基酸位点为影响48A11-HuV33对CD73结合的重要位点, 它们分别突变后, 结合的 EC_{50} 下降10倍以上, 高平台值Top下降2倍以上; 其次为V137、L181、L184, 它们分别突变后, 结合的 EC_{50} 下降3-10倍或高平台值Top下降1.5-2倍, 再者为V144、K180, 它们分别突变后, 结合的 EC_{50} 下降2-3倍。

上述各位点在CD73结晶3D结构图 (来源于PDB: 6VC9) 中的位置如图22所示, 这也进一步说明48A11-HuV33与CD73的结合表位为包括上述关键氨基酸位点在内的不连续的空间表位。

表9: 各突变体蛋白对48A11-HuV33结合的亲和力

Sample	EC ₅₀ (nM)	Ratio(EC ₅₀)	Top	Ratio(Top)
CD73-ND	0.152	1.0	2.084	1.0
CD73-ND-Y132A	10.520	69.2	0.254	8.2
CD73-ND-L133A	25.750	169.4	0.922	2.3
CD73-ND-P134A	0.205	1.3	1.974	1.1
CD73-ND-Y135A	0.165	1.1	1.964	1.1
CD73-ND-K136A	0.145	1.0	2.125	1.0
CD73-ND-V137A	0.891	5.9	1.601	1.3
CD73-ND-L138A	0.182	1.2	1.908	1.1

表10: 各突变体蛋白对48A11-HuV33结合的亲和力

Sample	EC ₅₀ (nM)	Ratio(EC ₅₀)	Top	Ratio(Top)
CD73-ND	0.117	1.0	1.982	1.0
CD73-ND-E143A	0.167	1.4	1.769	1.1
CD73-ND-V144A	0.290	2.5	1.685	1.2
CD73-ND-K180A	0.321	2.7	1.741	1.1
CD73-ND-L181A	0.226	1.9	1.051	1.9
CD73-ND-K182A	0.121	1.0	2.027	1.0
CD73-ND-T183A	0.159	1.4	1.975	1.0
CD73-ND-N185A	0.188	1.6	1.902	1.0

表11: 各突变体蛋白对48A11-HuV33结合的亲和力

Sample	EC ₅₀ (nM)	Ratio(EC ₅₀)	Top	Ratio(Top)
CD73-ND	0.178	1.0	1.998	1.0
CD73-ND-P139A	4.339	24.4	0.871	2.3
CD73-ND-V140A	0.098	0.6	2.053	1.0
CD73-ND-D142A	0.344	1.9	1.842	1.1
CD73-ND-L184A	0.612	3.4	1.703	1.2

表12: 各突变体蛋白对48A11-HuV33结合的亲和力

Sample	EC ₅₀ (nM)	Ratio(EC ₅₀)	Top	Ratio(Top)
CD73-ND	0.091	0.8	1.943	1.0
CD73-ND-V186A	0.160	1.4	1.618	1.2
CD73-ND-N187A	0.105	0.9	1.767	1.1

5

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书所限定的范围。

权 利 要 求

1. 一种抗人CD73抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区，其中

5 所述重链可变区包括三个重链互补决定区CDR：

SEQ ID NO.10所示的HCDR1，

SEQ ID NO.11所示的HCDR2，

SEQ ID NO.12所示的HCDR3；或

SEQ ID NO.16所示的HCDR1，

10 SEQ ID NO.17所示的HCDR2，

SEQ ID NO.18所示的HCDR3；和

所述轻链可变区包括三个轻链互补决定区CDR：

SEQ ID NO.13所示的LCDR1，

SEQ ID NO.14所示的LCDR2，

15 SEQ ID NO.15所示的LCDR3；或

SEQ ID NO.19所示的LCDR1，

SEQ ID NO.20所示的LCDR2，

SEQ ID NO.21所示的LCDR3；

20 其中，所述抗体或其抗原结合片段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。

2. 权利要求1所述的抗人CD73抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述的重链可变区具有SEQ ID NO. 1、4、6、9、24或28所示的氨基酸序列。

25 3. 权利要求1所述的抗人CD73抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述的重链恒定区为人源或鼠源的，优选地，所述的重链恒定区为人源抗体IgG1或IgG4恒定区。

4. 权利要求1所述的抗人CD73抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述的轻链可变区具有SEQ ID NO. 2、3、5、7、8、26或30所示的氨基酸序列。

30 5. 权利要求1所述的抗人CD73抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述的轻链恒定区为人源或鼠源的，优选地，所述的轻链恒定区为人源抗体kappa链恒定区。

6. 如权利要求1所述的抗人CD73抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述的重链可变区含有1、4、6、9、24或28中任一所示的氨基酸序列；和/或所述的轻链可变区含有2、3、5、7、8、26或30中任一所示的氨基酸序列。

35 7. 一种抗人CD73抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体与人CD73蛋白的结合表位包含对应于SEQ ID NO. 22的选自下组的位点：

第132位酪氨酸（Y132）、第133位亮氨酸（L133）、第139位脯氨酸（P139）、第137位缬氨酸（V137）、第181位亮氨酸（L181）、第184位亮氨酸（L184）、第144位缬氨酸（V144）、第180位赖氨酸（K180）。

40 8. 如权利要求1所述的抗人CD73抗体或其抗原结合片段，其特征在于，所述抗体与人CD73蛋白的结合表位包含对应于SEQ ID NO. 22的选自下组的位点：

第132位酪氨酸（Y132）、第133位亮氨酸（L133）、第139位脯氨酸（P139）、

第137位缬氨酸（V137）、第181位亮氨酸（L181）、第184位亮氨酸（L184）、第144位缬氨酸（V144）、第180位赖氨酸（K180）。

9. 一种重组蛋白，其特征在于，所述的重组蛋白包括：

(i) 如权利要求1-8中任一项所述的抗体或其抗原结合片段；以及

(ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

10. 一种多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸编码选自下组的多肽：

(1) 如权利要求1-8中任一项所述的抗体或其抗原结合片段；以及

(2) 如权利要求9所述的重组蛋白。

11. 如权利要求10所述的多核苷酸，其特征在于，编码所述重链可变区的多核苷酸如SEQ ID NO. 33、36、38、41、23或27所示；和/或，编码所述轻链可变区的多核苷酸如SEQ ID NO. 34、35、37、39、40、25或29所示。

12. 一种载体，其特征在于，所述载体含有本发明权利要求10-11中任一项所述的多核苷酸。

13. 一种遗传工程化的宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞含有权利要求12所述的载体或基因组中整合有权利要求10-11中任一项所述的多核苷酸。

14. 一种抗体偶联物，其特征在于，该抗体偶联物含有：

(a) 抗体部分，如权利要求1-8中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或其组合；和

(b) 与所述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、放射性核素、酶、或其组合。

15. 一种CAR构建物，其特征在于，所述CAR构建物的单克隆抗体抗原结合区的scFv段为特异性结合于CD73的结合区，并且，所述scFv的重链可变区包括：

其中，所述scFv的重链可变区包括以下三个互补决定区CDR：

SEQ ID NO.10所示的HCDR1，

SEQ ID NO.11所示的HCDR2，

SEQ ID NO.12所示的HCDR3；和

所述scFv的轻链可变区包括以下三个互补决定区CDR：

SEQ ID NO.13所示的LCDR1，

SEQ ID NO.14所示的LCDR2，

SEQ ID NO.15所示的LCDR3；或

所述scFv的重链可变区包括以下三个互补决定区CDR：

SEQ ID NO.16所示的HCDR1，

SEQ ID NO.17所示的HCDR2，

SEQ ID NO.18所示的HCDR3；和

所述scFv的轻链可变区包括以下三个互补决定区CDR：

SEQ ID NO.19所示的LCDR1，

SEQ ID NO.20所示的LCDR2，

SEQ ID NO.21所示的LCDR3。

16. 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15所述的CAR构建物。

17. 一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有：

(i) 活性成分，所述活性成分选自下组：如权利要求1-8中任一项所述的抗体或

其抗原结合片段、如权利要求9所述的重组蛋白、如权利要求14所述的抗体偶联物、权利要求16所述的免疫细胞、或其组合；以及

(ii)药学上可接受的载体。

18. 一种体外检测样品中CD73蛋白的方法，其特征在于，所述方法包括步骤：

5 (1) 在体外，将所述样品与如权利要求1-8中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或如权利要求14所述的抗体偶联物接触；

(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蛋白。

10 19. 一种预防和/或治疗CD73相关疾病的方法，所述方法包括：给需要的对象施用如权利要求1-8中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、如权利要求14所述的抗体偶联物、如权利要求16所述重组的免疫细胞、或如权利要求17所述的药物组合物、或其组合。

15 20. 如权利要求19所述的方法，其特征在于，所述CD73相关疾病选自下组：血液癌、淋巴癌、恶性胶质瘤、黑色素瘤、皮肤癌、胃癌、胃肠道间质瘤、肝癌、胆管癌、胆囊癌、腹膜癌、结直肠癌、小肠癌、肛门癌、多发性骨髓瘤、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、阴道癌、膀胱癌、肾癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、前列腺癌、睾丸癌、阴茎癌、甲状腺癌、头颈部癌、食道癌、骨癌、肉瘤。

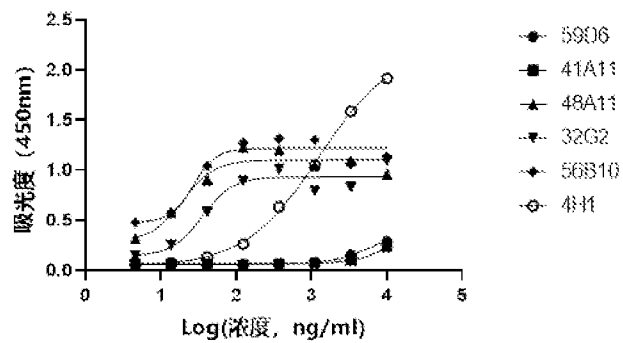


图 1

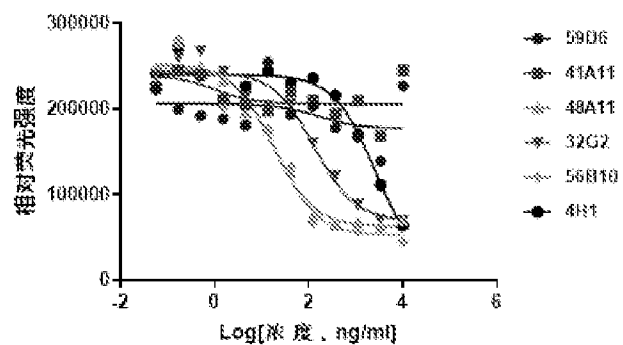


图 2

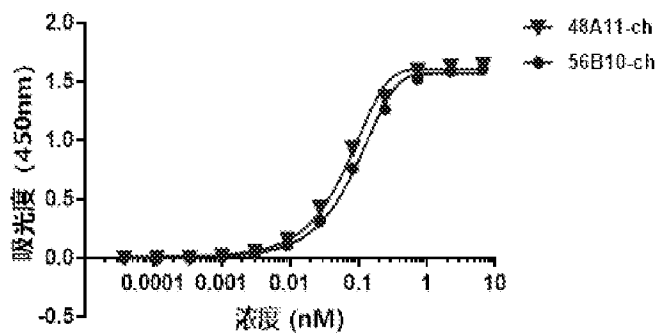


图 3

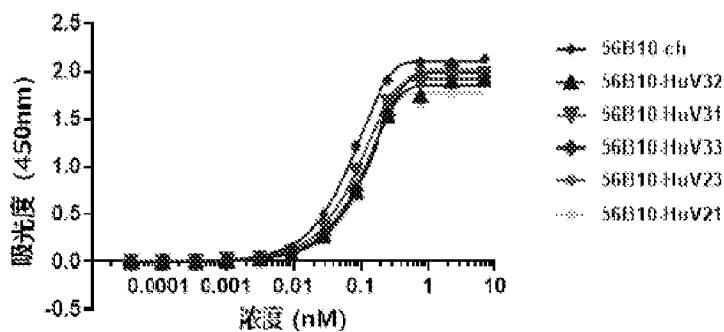


图 4

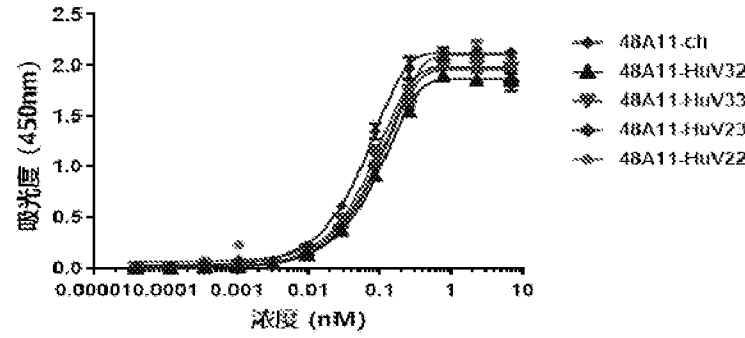


图 5

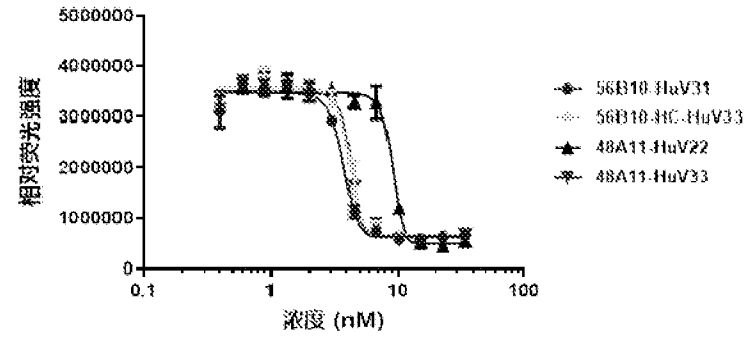


图 6

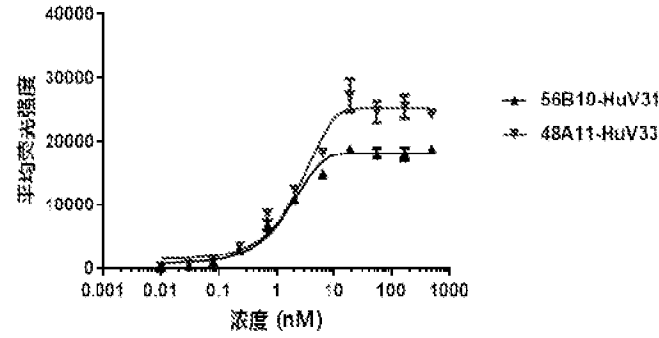


图 7

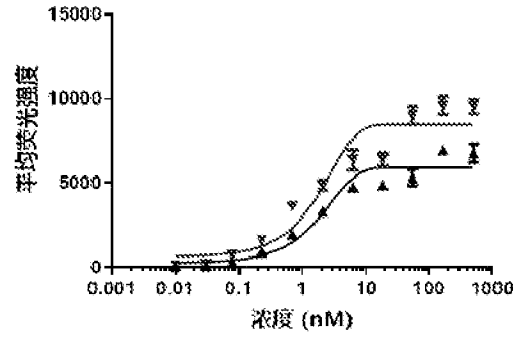


图 8

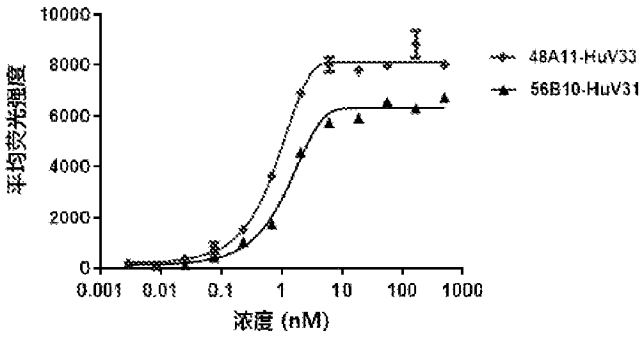


图 9

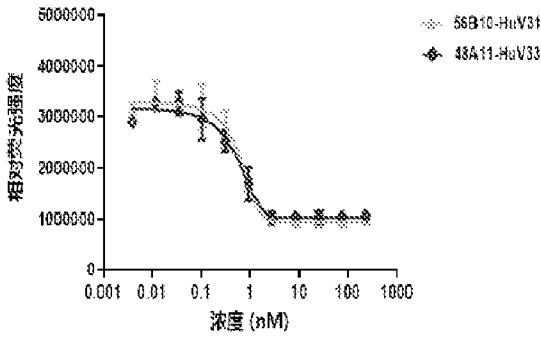


图 10

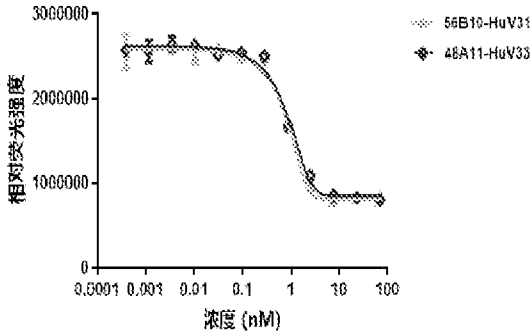


图 11

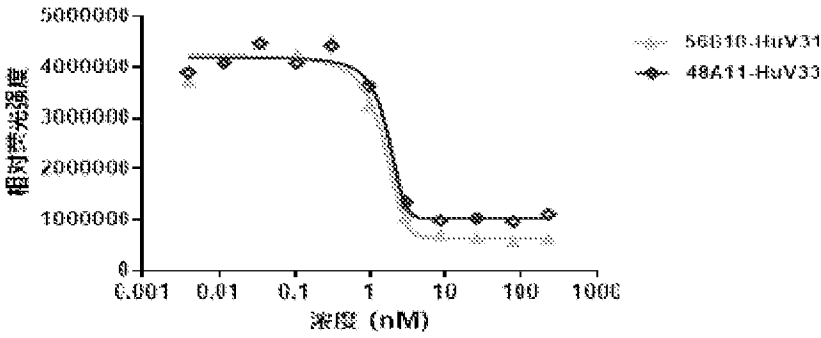


图 12

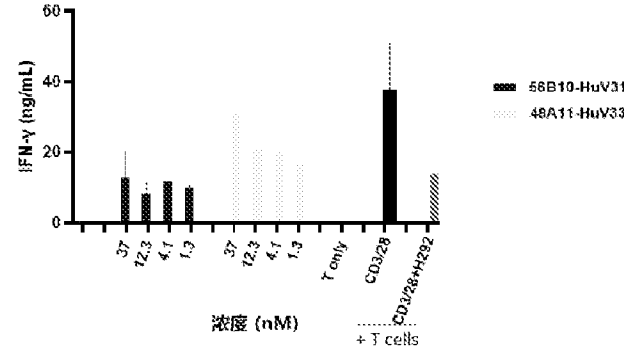


图 13

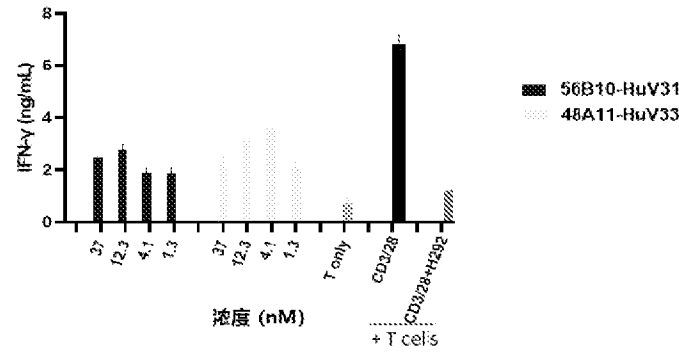


图 14

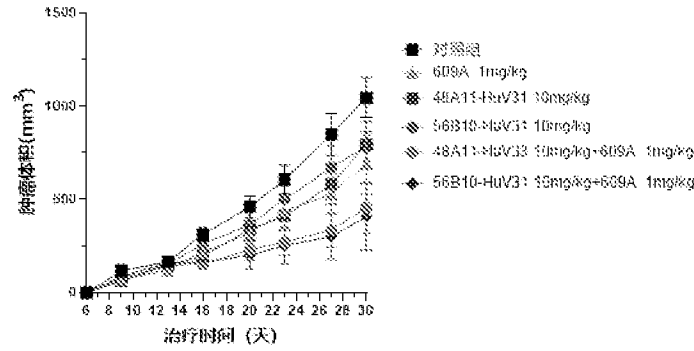


图 15

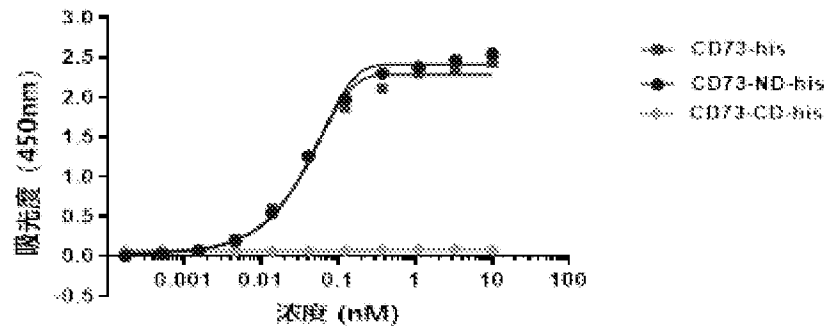


图 16

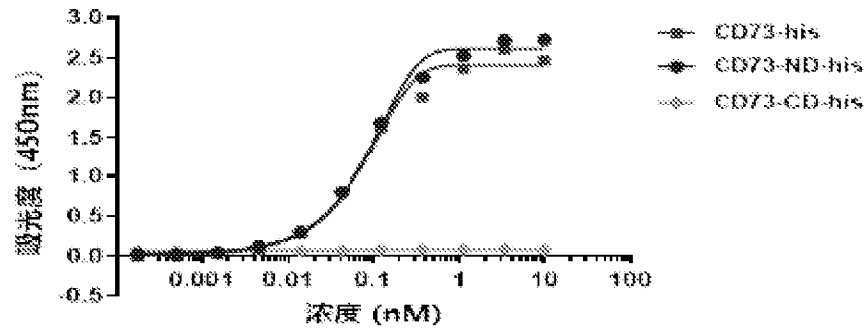


图 17

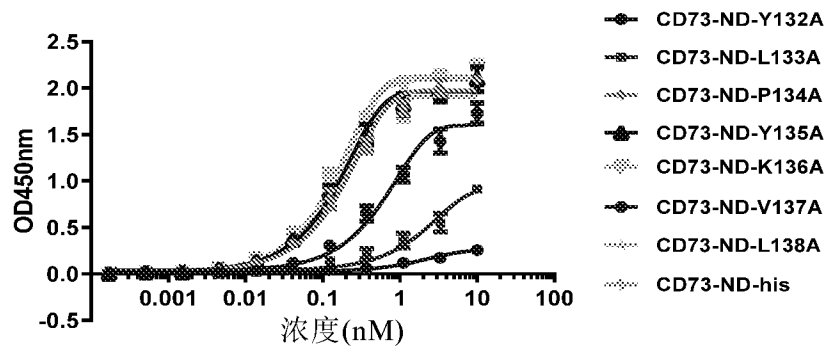


图 18

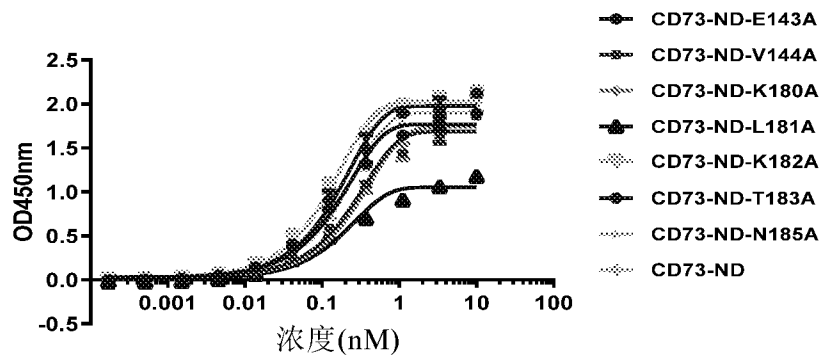


图 19

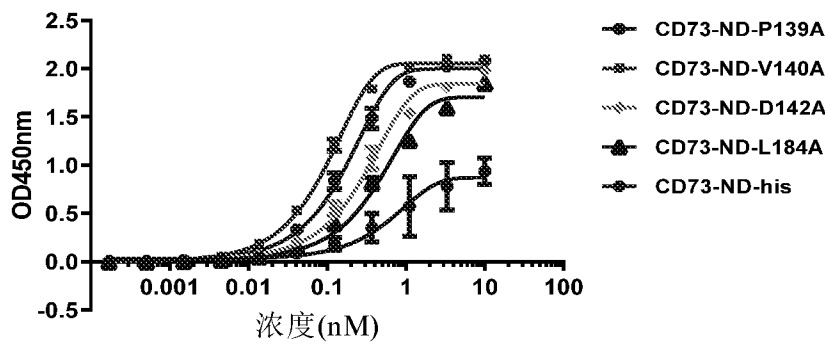


图 20

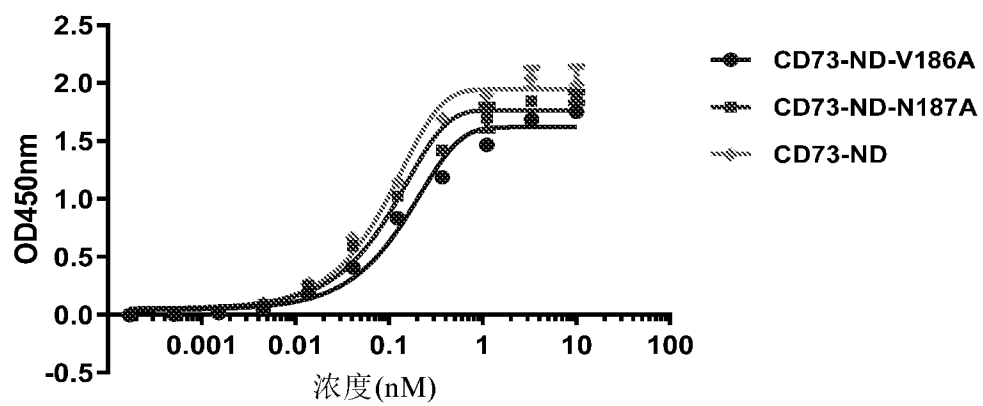


图 21

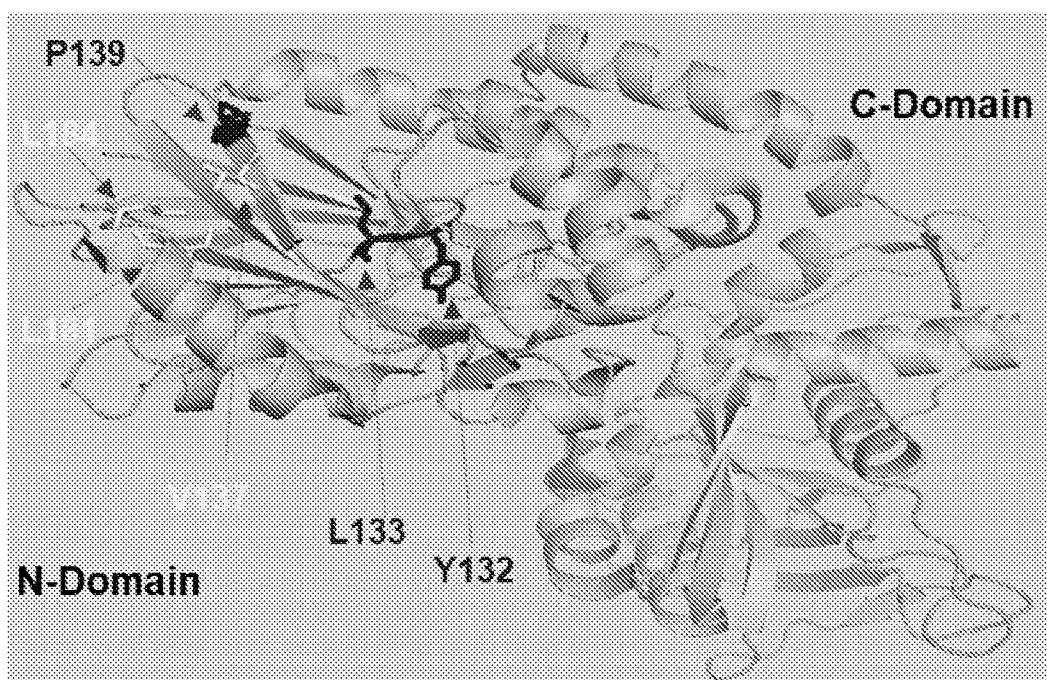


图 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/139741

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/28(2006.01)i;C07K14/705(2006.01)i;C12N15/13(2006.01)i;C07K19/00(2006.01)i;C12N5/20(2006.01)i;A61P35/00(2006.01)i;A61K39/395(2006.01)i;A61K47/68(2017.01)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 A61P A61K

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, CNKI, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, NCBI, 中国专利生物序列检索系统, China Patent Biological Sequence Search System, Genbank, EMBL和检索项: CD73, 胞外-5'-核苷酸酶, 5'-NT, NT5E, 抗体, 人源化, bind, antibody, humanized, SEQ ID Nos: 1-30

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 110240654 A (FUDAN UNIVERSITY) 17 September 2019 (2019-09-17) claims, description paragraphs 82-84, 158-195, embodiments and sequence table	7, 9, 10, 12-14, 17-20
A	CN 110240654 A (FUDAN UNIVERSITY) 17 September 2019 (2019-09-17) claims, description paragraphs 82-84, 158-195, embodiments and sequence table	1-6, 8, 11, 15, 16
X	CN 112513089 A (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.; SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 16 March 2021 (2021-03-16) claims, embodiments and sequence table	7, 9, 10, 12-14, 17-20
A	CN 112513089 A (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.; SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 16 March 2021 (2021-03-16) claims, embodiments and sequence table	1-6, 8, 11, 15, 16
X	CN 111867628 A (PHANES THERAPEUTICS INC.) 30 October 2020 (2020-10-30) claims, embodiments, description paragraph 165 and sequence table	7, 9, 10, 12-14, 17-20
A	CN 111867628 A (PHANES THERAPEUTICS INC.) 30 October 2020 (2020-10-30) claims, embodiments, description paragraph 165 and sequence table	1-6, 8, 11, 15, 16



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

30.1月2023 (30.01.2023)

Date of mailing of the international search report

06 March 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

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/139741**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 112111008 A (HISUN BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.) 22 December 2020 (2020-12-22) claims, embodiments, description paragraph 27 and sequence table	7, 9, 10, 12-14, 17-20
A	CN 112111008 A (HISUN BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD.) 22 December 2020 (2020-12-22) claims, embodiments, description paragraph 27 and sequence table	1-6, 8, 11, 15, 16
X	CN 111499747 A (COMMED BIOSCIENCES INC.) 07 August 2020 (2020-08-07) claims, embodiments and sequence table sequence 1	7, 9, 10, 12-14, 17-20
A	CN 111499747 A (COMMED BIOSCIENCES INC.) 07 August 2020 (2020-08-07) claims, embodiments and sequence table sequence 1	1-6, 8, 11, 15, 16
X	CN 110753703 A (HELMHOLTZ ZENTRUM MUENCHEN DEUTSCHES FORSCHUNGSZENTRUM GESUNDHEIT & UMWELT GMBH) 04 February 2020 (2020-02-04) claims, embodiments and sequence table sequence 17	7, 9, 10, 12-14, 17-20
A	CN 110753703 A (HELMHOLTZ ZENTRUM MUENCHEN DEUTSCHES FORSCHUNGSZENTRUM GESUNDHEIT & UMWELT GMBH) 04 February 2020 (2020-02-04) claims, embodiments and sequence table sequence 17	1-6, 8, 11, 15, 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/139741

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

International application No.

PCT/CN2022/139741

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **19-20**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
PCT Rule 39.1(iv) – methods for treatment of a human or animal body by surgery or therapy.
The international search will be directed to the following amended subject matter that might reasonably be expected: the use in the preparation of a drug for the prevention and/or treatment of CD73-related diseases.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/139741

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	24 February 2021
				JP	2021516960	A	15 July 2021
				US	2021024646	A1	28 January 2021
				CA	3093327	A1	12 September 2019
CN	112513089	A	16 March 2021	US	2022220218	A1	14 July 2022
				AU	2019381219	A1	27 May 2021
				WO	2020098599	A1	22 May 2020
				CA	3118775	A1	22 May 2020
				JP	2022509930	A	25 January 2022
				EP	3882268	A1	22 September 2021
				EP	3882268	A4	22 September 2021
				TW	202017945	A	16 May 2020
				KR	20210093255	A	27 July 2021
CN	111867628	A	30 October 2020	SG	11202007199	XA	29 September 2020
				EP	3762030	A1	13 January 2021
				EP	3762030	A4	13 January 2021
				US	2020399389	A1	24 December 2020
				US	11299550	B2	24 December 2020
				CA	3090008	A1	12 September 2019
				WO	2019173291	A1	12 September 2019
				AU	2019231172	A1	03 September 2020
				IL	276950	A	29 October 2020
				JP	2021516057	A	01 July 2021
				KR	20200128542	A	13 November 2020
				BR	112020016049	A2	08 December 2020
CN	112111008	A	22 December 2020	None			
CN	111499747	A	07 August 2020	US	2022162331	A1	26 May 2022
				EP	3901175	A1	27 October 2021
				EP	3901175	A4	27 October 2021
				WO	2020143710	A1	16 July 2020
CN	110753703	A	04 February 2020	WO	2018215535	A1	29 November 2018
				US	2020148781	A1	14 May 2020
				US	11530273	B2	14 May 2020
				EP	3630830	A1	08 April 2020
				CA	3063344	A1	29 November 2018

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/139741

A. 主题的分类

C07K16/28(2006.01)i;C07K14/705(2006.01)i;C12N15/13(2006.01)i;C07K19/00(2006.01)i;C12N5/20(2006.01)i;
A61P35/00(2006.01)i;A61K39/395(2006.01)i;A61K47/68(2017.01)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 A61P A61K

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, CNKI, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, NCBI, 中国专利生物序列检索系统,
Genbank, EMBL和检索项: CD73, 胞外-5'-核苷酸酶, 5'-NT, NT5E, 抗体, 人源化, bind, antibody, humanized,
SEQ ID Nos: 1-30

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
X	CN 110240654 A (复旦大学) 2019年9月17日 (2019 - 09 - 17) 权利要求、说明书第82-84、158-195段、实施例和序列表	7、9、10、 12-14、17-20
A	CN 110240654 A (复旦大学) 2019年9月17日 (2019 - 09 - 17) 权利要求、说明书第82-84、158-195段、实施例和序列表	1-6、8、11、15、16
X	CN 112513089 A (江苏恒瑞医药股份有限公司 上海恒瑞医药有限公司) 2021年3月16日 (2021 - 03 - 16) 权利要求、实施例和序列表	7、9、10、 12-14、17-20
A	CN 112513089 A (江苏恒瑞医药股份有限公司 上海恒瑞医药有限公司) 2021年3月16日 (2021 - 03 - 16) 权利要求、实施例和序列表	1-6、8、11、15、16
X	CN 111867628 A (东莞凡恩世生物医药有限公司) 2020年10月30日 (2020 - 10 - 30) 权利要求、实施例, 说明书第165段和序列表	7、9、10、 12-14、17-20
A	CN 111867628 A (东莞凡恩世生物医药有限公司) 2020年10月30日 (2020 - 10 - 30) 权利要求、实施例, 说明书第165段和序列表	1-6、8、11、15、16

☒ 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

30.1月2023 (30.01.2023)

国际检索报告邮寄日期

2023年3月6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

传真号 (86-10)62019451

授权官员

王翔宇

电话号码 (+86) 010-62089318

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
X	CN 112111008 A (海正生物制药有限公司) 2020年12月22日 (2020 - 12 - 22) 权利要求、实施例，说明书第27段和序列表	7、9、10、 12-14、17-20
A	CN 112111008 A (海正生物制药有限公司) 2020年12月22日 (2020 - 12 - 22) 权利要求、实施例，说明书第27段和序列表	1-6、8、11、15、16
X	CN 111499747 A (康诺亚生物医药科技 (成都) 有限公司) 2020年8月7日 (2020 - 08 - 07) 权利要求、实施例和序列表序列1	7、9、10、 12-14、17-20
A	CN 111499747 A (康诺亚生物医药科技 (成都) 有限公司) 2020年8月7日 (2020 - 08 - 07) 权利要求、实施例和序列表序列1	1-6、8、11、15、16
X	CN 110753703 A (德国亥姆霍兹慕尼黑中心健康与环境研究中心 (有限公司)) 2020年2月4日 (2020 - 02 - 04) 权利要求、实施例和序列表序列17	7、9、10、 12-14、17-20
A	CN 110753703 A (德国亥姆霍兹慕尼黑中心健康与环境研究中心 (有限公司)) 2020年2月4日 (2020 - 02 - 04) 权利要求、实施例和序列表序列17	1-6、8、11、15、16

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:

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 19-20
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
PCT细则39.1 (iv) — 处置人体或者动物体的外科手术方法或治疗方法。
国际检索将针对以下合理预期修改的主题： 制备预防和/或治疗CD73相关疾病的药物中用途。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/139741

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	2021年2月24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
CN	112513089	A	2021年3月16日	US	2022220218	A1	2022年7月14日
				AU	2019381219	A1	2021年5月27日
				WO	2020098599	A1	2020年5月22日
				CA	3118775	A1	2020年5月22日
				JP	2022509930	A	2022年1月25日
				EP	3882268	A1	2021年9月22日
				EP	3882268	A4	2021年9月22日
				TW	202017945	A	2020年5月16日
				KR	20210093255	A	2021年7月27日
CN	111867628	A	2020年10月30日	SG	11202007199	XA	2020年9月29日
				EP	3762030	A1	2021年1月13日
				EP	3762030	A4	2021年1月13日
				US	2020399389	A1	2020年12月24日
				US	11299550	B2	2020年12月24日
				CA	3090008	A1	2019年9月12日
				WO	2019173291	A1	2019年9月12日
				AU	2019231172	A1	2020年9月3日
				IL	276950	A	2020年10月29日
				JP	2021516057	A	2021年7月1日
				KR	20200128542	A	2020年11月13日
				BR	112020016049	A2	2020年12月8日
CN	112111008	A	2020年12月22日	无			
CN	111499747	A	2020年8月7日	US	2022162331	A1	2022年5月26日
				EP	3901175	A1	2021年10月27日
				EP	3901175	A4	2021年10月27日
				WO	2020143710	A1	2020年7月16日
CN	110753703	A	2020年2月4日	WO	2018215535	A1	2018年11月29日
				US	2020148781	A1	2020年5月14日
				US	11530273	B2	2020年5月14日
				EP	3630830	A1	2020年4月8日
				CA	3063344	A1	2018年11月29日