(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119403832 A
(43)申请公布日 2025.02.07

(21)申请号 202380045319.3
(22)申请日 2023.06.07
(66)本国优先权数据
202210639331.4 2022.06.08 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.12.06
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2023/098753 2023.06.07
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/236971 ZH 2023.12.14
(71)申请人 上海华奥泰生物药业股份有限公司
地址 201203 上海市浦东新区中国(上海)自由贸易试验区蔡伦路538号2幢1楼
申请人 华博生物医药技术(上海)有限公司
(72)发明人 徐锦根 贾慧峰 占一帆 潘现飞 于海佳 王少杰 夏思敏 朱向阳
(74)专利代理机构 上海巅石知识产权代理事务所(普通合伙) 31309
专利代理师 张琤 蒋舫玮
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(54)发明名称

CD73抗体鸡尾酒疗法

(57)摘要

一种药物组合,其包含特异性结合CD73的第一抗原结合蛋白,以及特异性结合CD73的第二抗原结合蛋白,所述第一抗原结合蛋白和所述第二抗原结合蛋白具有不同的CD73抗原结合表位,还提供了包含所述药物组合的药物组合物及其用途。

CN 119403832 A

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2023 年 12 月 14 日 (14.12.2023)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2023/236971 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/098753

(22) 国际申请日: 2023 年 6 月 7 日 (07.06.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202210639331.4 2022年6月8日 (08.06.2022) CN

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

(72) 发明人: 徐锦根 **(XU, Jingen)**; 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区蔡伦路538号2幢1楼, Shanghai 201203 (CN)。贾慧峰 **(JIA, Huifeng)**; 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区蔡伦路538号2幢1楼, Shanghai 201203 (CN)。占一帆 **(ZHAN, Yifan)**; 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区蔡伦路538号2幢1楼, Shanghai 201203 (CN)。潘现飞 **(PAN, Xianfei)**; 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区蔡伦路538号2幢1楼, Shanghai 201203 (CN)。于海佳 **(YU, Haijia)**; 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区蔡伦路538号2幢1楼, Shanghai 201203 (CN)。王少杰 **(WANG, Shaojie)**; 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区蔡伦路538号2幢1楼, Shanghai 201203 (CN)。夏思敏 **(XIA, Simin)**; 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区蔡伦路538号2幢1楼, Shanghai 201203 (CN)。朱向阳 **(ZHU, Xiangyang)**; 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区蔡伦路538号2幢1楼, Shanghai 201203 (CN)。

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

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, 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, 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)。

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))。

WO 2023/236971 A1

(54) **Title:** CD73 ANTIBODY COCKTAIL THERAPY

(54) 发明名称: CD73抗体鸡尾酒疗法

(57) **Abstract:** A pharmaceutical combination, comprising a first antigen-binding protein that specifically binds to CD73, and a second antigen-binding protein that specifically binds to CD73. The first antigen-binding protein and the second antigen-binding protein have different CD73 antigen binding epitopes. Also provided are a pharmaceutical composition comprising the pharmaceutical combination and a use thereof.

(57) 摘要: 一种药物组合，其包含特异性结合CD73的第一抗原结合蛋白，以及特异性结合CD73的第二抗原结合蛋白，所述第一抗原结合蛋白和所述第二抗原结合蛋白具有不同的CD73抗原结合表位，还提供了包含所述药物组合的药物组合物及其用途。

CD73 抗体鸡尾酒疗法

技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体的涉及一种 CD73 抗体鸡尾酒疗法。

背景技术

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

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

因此，亟需开发多元的靶向 CD73 的疗法，为预防和/或治疗 CD73 表达异常引起的疾病提供更多新思路。

发明内容

本申请提供了一种药物组合，其包含特异性结合 CD73 的第一抗原结合蛋白，以及特异性结合 CD73 的第二抗原结合蛋白，所述第一抗原结合蛋白和所述第二抗原结合蛋白具有不同的 CD73 抗原结合表位。本申请所述的药物组合具有下述性质中的一种或多种：（1）能够特异性结合 CD73 蛋白；（2）与 CD73 蛋白有较高的亲和力；（3）能够抑制肿瘤细胞的生长和/或增殖。

在某些实施方式中，所述第一抗原结合蛋白和所述第二抗原结合蛋白以非竞争方式与 CD73 蛋白结合。

在某些实施方式中，所述第一抗原结合蛋白与所述第二抗原结合蛋白以混合物形式存在。

在某些实施方式中，所述第一抗原结合蛋白包含抗体重链可变区 VH 中的至少一个 CDR，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第一抗原结合蛋白包含 HCDR3，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第一抗原结合蛋白包含 HCDR2，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第一抗原结合蛋白包含HCDR1，所述HCDR1包含SEQ ID NO: 3所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第一抗原结合蛋白包含VH，且所述VH包含SEQ ID NO: 8所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第一抗原结合蛋白包含抗体重链恒定区。

在某些实施方式中，所述抗体重链恒定区源自IgG重链恒定区。

在某些实施方式中，所述抗体重链恒定区源自人IgG重链恒定区。

在某些实施方式中，所述抗体重链恒定区包含SEQ ID NO: 9所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第一抗原结合蛋白包含抗体重链，所述抗体重链包含 SEQ ID NO: 10所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第一抗原结合蛋白包含抗体轻链可变区VL中的至少一个CDR，所述VL包含SEQ ID NO: 18所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第一抗原结合蛋白包含LCDR3，所述LCDR3包含SEQ ID NO: 11所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第一抗原结合蛋白包含LCDR2，所述LCDR2包含SEQ ID NO: 12（WAS）所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第一抗原结合蛋白包含LCDR1，所述LCDR1包含SEQ ID NO: 13所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第一抗原结合蛋白包含VL，所述VL包含SEQ ID NO: 18所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第一抗原结合蛋白包含抗体轻链恒定区。

在某些实施方式中，所述抗体轻链恒定区源自人Igκ恒定区。

在某些实施方式中，所述抗体轻链恒定区包含SEQ ID NO: 19所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第一抗原结合蛋白包含抗体轻链，所述抗体轻链包含 SEQ ID NO: 20所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第二抗原结合蛋白包含抗体重链可变区VH中的至少一个CDR，所述VH包含SEQ ID NO: 27所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第二抗原结合蛋白包含HCDR3，所述HCDR3包含SEQ ID NO: 21所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第二抗原结合蛋白包含HCDR2，所述HCDR2包含SEQ ID NO:

22 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第二抗原结合蛋白包含 HCDR1，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第二抗原结合蛋白包含 VH，且所述 VH 包含 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第二抗原结合蛋白包含抗体重链恒定区。

在某些实施方式中，所述抗体重链恒定区源自 IgG 重链恒定区。

在某些实施方式中，所述抗体重链恒定区源自人 IgG 重链恒定区。

在某些实施方式中，所述第二抗原结合蛋白的抗体重链恒定区包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第二抗原结合蛋白包含抗体重链，所述抗体重链包含 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第二抗原结合蛋白包含抗体轻链可变区 VL 中的至少一个 CDR，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第二抗原结合蛋白包含 LCDR3，所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第二抗原结合蛋白包含 LCDR2，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 30（LAS）所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第二抗原结合蛋白包含 LCDR1，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第二抗原结合蛋白包含 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第二抗原结合蛋白包含抗体轻链恒定区。

在某些实施方式中，所述抗体轻链恒定区源自人 Igκ 恒定区。

在某些实施方式中，所述抗体轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第二抗原结合蛋白包含抗体轻链，所述抗体轻链包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述药物组合中所述第一抗原结合蛋白与所述第二抗原结合蛋白的质量比为约 1:5~5:1。

在某些实施方式中，所述药物组合中所述第一抗原结合蛋白与所述第二抗原结合蛋白的

质量比为约 1:5。

在某些实施方式中，所述药物组合中所述第一抗原结合蛋白与所述第二抗原结合蛋白的质量比为约 1:2.5。

在某些实施方式中，所述药物组合中所述第一抗原结合蛋白与所述第二抗原结合蛋白的质量比为约 1:1。

在某些实施方式中，所述药物组合中所述第一抗原结合蛋白与所述第二抗原结合蛋白的质量比为约 2.5:1。

在某些实施方式中，所述药物组合中所述第一抗原结合蛋白与所述第二抗原结合蛋白的质量比为约 5:1。

另一方面，本申请还提供了药物组合物，其包含所述药物组合，以及任选地一种或多种药学上可接受的载剂。

在某些实施方式中，所述药物组合的浓度为约 3-300mg/mL。

在某些实施方式中，所述药物组合的浓度为约 3-150mg/mL。

在某些实施方式中，所述药物组合的浓度为约 5-100mg/mL。

在某些实施方式中，所述药物组合的浓度为约 10-100mg/mL。

在某些实施方式中，所述药物组合的浓度为约 10-50mg/mL。

在某些实施方式中，所述药物组合的浓度为 30 ±5mg/mL。

在某些实施方式中，所述药物组合的浓度为 30 ±3mg/mL。

在某些实施方式中，所述药学上可接受的载剂包含缓冲液。

在某些实施方式中，所述缓冲液包含酸性缓冲液。

在某些实施方式中，所述缓冲液包含中性缓冲液。

在某些实施方式中，所述缓冲液选自下组：醋酸盐-醋酸缓冲液、组氨酸-组氨酸盐酸缓冲液、枸橼酸盐-枸橼酸缓冲液、磷酸盐缓冲液、组氨酸-醋酸缓冲液、三羟甲基氨基甲烷（Tris）-盐酸盐缓冲液、磷酸-枸橼酸盐，或其组合。

在某些实施方式中，所述缓冲液选自下组：醋酸盐-醋酸、枸橼酸盐-枸橼酸、组氨酸-组氨酸盐酸、磷酸盐、Tris-盐酸盐、组氨酸-醋酸、磷酸-枸橼酸盐，或其组合。

在某些实施方式中，所述缓冲液选自下组：醋酸钠-醋酸、枸橼酸钠-枸橼酸、组氨酸-组氨酸盐酸、磷酸二氢钠-磷酸氢二钠、Tris-盐酸盐、组氨酸-醋酸以及磷酸-枸橼酸钠。

在某些实施方式中，所述缓冲液的浓度为约 5-100mM。

在某些实施方式中，所述缓冲液的浓度为约 5-60mM。

在某些实施方式中，所述缓冲液的浓度为约 5-50mM。

在某些实施方式中，所述缓冲液的浓度为约 10-40mM。

在某些实施方式中，所述缓冲液的浓度为 20±5mM。

在某些实施方式中，所述缓冲液的浓度为 20±2mM。

在某些实施方式中，所述药物组合物的 pH 值为约 5-7。

在某些实施方式中，所述药物组合物的 pH 值为约 6±0.5。

在某些实施方式中，所述药物组合物的 pH 值为约 6±0.3。

在某些实施方式中，所述药物组合物的 pH 值为约 6±0.1。

在某些实施方式中，所述药物组合物的 pH 值为约 6.5±0.3。

在某些实施方式中，所述药物组合物的 pH 值为约 7±0.3。

在某些实施方式中，所述药学上可接受的载剂包含稳定剂。

在某些实施方式中，所述稳定剂选自下组：氯化钠、氨基酸、糖醇，或其组合。

在某些实施方式中，所述氨基酸选自下组：脯氨酸 (Proline)、精氨酸（Arginine）、甘氨酸（Glycine）、组氨酸（Histidine）、赖氨酸（lysine）、甲硫氨酸（蛋氨酸 Methionine），或其组合。

在某些实施方式中，所述糖醇选自下组：蔗糖（Sucrose）、甘露醇（Mannitol）、海藻糖（Trehalose）、山梨醇（Sorbitol），或其组合。

在某些实施方式中，所述稳定剂选自下组：蔗糖、海藻糖、山梨醇、甘露醇、脯氨酸/蔗糖、蛋氨酸/海藻糖、甘氨酸/甘露醇、氯化钠/蔗糖、精氨酸/蔗糖、以及赖氨酸/海藻糖。

在某些实施方式中，所述稳定剂的含量为约 0.15 wt.%- 20 wt.%。

在某些实施方式中，所述稳定剂的含量为约 0.15 wt.%- 10 wt.%。

在某些实施方式中，所述稳定剂的含量为约 0.15 wt.%- 8 wt.%。

在某些实施方式中，所述稳定剂的含量为约 4 ±1 wt.%或 8 ±1 wt.%。

在某些实施方式中，所述稳定剂的含量为约 4 ±0.5 wt.%或 8 ±0.5 wt.%。

在某些实施方式中，所述稳定剂的含量为约 4 wt.%、5 wt.%、7 wt.%或 8 wt.%。

在某些实施方式中，所述稳定剂的含量为约 8 wt.%。

在某些实施方式中，所述药学上可接受的载剂包含表面活性剂。

在某些实施方式中，所述表面活性剂选自下组：聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯、聚氧乙烯氢化蓖麻油、甘油脂肪酸酯、聚山梨醇酯、泊洛沙姆，或其组合。

在某些实施方式中，所述聚山梨醇酯选自下组：聚山梨醇酯 20（PS-20，吐温-20）、聚

山梨醇酯 40（PS-40）、聚山梨醇酯 60（PS-60）、聚山梨醇酯 80（PS-80）。

在某些实施方式中，所述表面活性剂选自下组：PS-20（吐温-20）和 PS-80（吐温-80）。

在某些实施方式中，所述表面活性剂的浓度为约 0.001%-0.5%。

在某些实施方式中，所述表面活性剂的浓度为约 0.005%-0.1%。

在某些实施方式中，所述表面活性剂的浓度为约 0.005%、0.01%、0.03%、0.05%或 0.1%。

在某些实施方式中，所述表面活性剂的浓度为约 0.01%。

在某些实施方式中，所述表面活性剂的浓度为约 0.03%。

在某些实施方式中，所述药学上可接受的载剂选自下组：（1）20mM 组氨酸-醋酸，8 wt.%蔗糖，0.03 wt.%吐温-80；（2）20mM 醋酸钠-醋酸，8 wt.%海藻糖，0.03 wt.%吐温-80；（3）20mM 组氨酸-醋酸，1.5 wt.%脯氨酸，5 wt.%蔗糖，0.03 wt.%吐温-80；（4）20mM 醋酸钠-醋酸，0.15 wt.%蛋氨酸，8 wt.%海藻糖，0.03 wt.%吐温-80；（5）20mM 组氨酸-醋酸，8 wt.%蔗糖，0.01 wt.%吐温-80；（6）20mM 醋酸钠-醋酸，8 wt.%海藻糖，0.01 wt.%吐温-80；（7）20mM 组氨酸-醋酸，1.5 wt.%脯氨酸，5 wt.%蔗糖，0.01 wt.%吐温-80；（8）20mM 醋酸钠-醋酸，0.15 wt.%蛋氨酸，8 wt.%海藻糖，0.01 wt.%吐温-80。

另一方面，本申请提供了所述药物组合和/或所述药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于预防和/或治疗疾病和/或病症。

在某些实施方式中，所述疾病和/或病症包括 CD73 介导的疾病和/或病症。

在某些实施方式中，所述疾病和/或病症包括肿瘤。

在某些实施方式中，所述肿瘤包括实体瘤和/或血液瘤。

在某些实施方式中，所述疾病和/或病症选自下组：胰腺癌、乳腺癌和特发性肺纤维化（IPF）。

在某些实施方式中，所述乳腺癌包括三阴性乳腺癌。

另一方面，本申请还提供了所述药物组合和/或所述药物组合物在制备检测试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测 CD73 蛋白的存在和/或含量。

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

附图说明

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

图 1 显示的是本申请所述鸡尾酒抗体疗法的抑制 CD73 酶活的效果。

图 2 显示的是不同加样条件下 900698 与 900725 对人 CD73 蛋白结合亲和力曲线以及响应值。

图 3 显示的是抗 CD73 鸡尾酒抗体在胰腺癌动物模型中的抗肿瘤效果。

图 4 显示的是抗 CD73 鸡尾酒抗体在三阴性乳腺癌动物模型中的抗肿瘤效果。

图 5 显示的是特发性肺纤维化（IPF）小鼠模型给药方案示意图。

图 6 显示的是特发性肺纤维化（IPF）小鼠模型各组小鼠体重称量情况。

图 7 显示的是小鼠气道高反应性检测结果（Penh 变化率-Mch 浓度曲线下面积）。

图 8 显示的是肺泡灌洗液中炎性相关细胞总数及淋巴细胞数计数结果的分类柱状图。

图 9 显示的是特发性肺纤维化的病理评分结果。

图 10 显示的是实验中病理评分结果肺组织病理切片代表性图片。

具体实施方式

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

术语定义

在本申请中，术语“药物组合”通常是指至少包含两种活性成分/治疗剂的组合。在一些实施方式中，各个活性成分/治疗剂可以各自制备成独立的制剂（固体、液体、凝胶体等），在一些实施方式中，各个活性成分/治疗剂可以存在于不同的容器中，还可以在需要的时候同时或分别与合适的载体配制成期望的制剂；在一些实施方式中，各个活性成分/治疗剂可以是不同来源的；在一些实施方式中，各个活性成分/治疗剂可以以混合物的形式存在。

在本申请中，术语“CD73”也称“NT5E”、“分化簇 73”、“5’-核苷酸酶（5’-NT）”或“胞外 5’-核苷酸酶”。所述术语涵盖“全长”、未加工的 CD73 以及由细胞加工所产生的任何形式的 CD73。在本申请中，术语“CD73”包括全长野生型 CD73 及其突变体、片段、变体、同种型和同源物。在某些实施方式中，所述 CD73 可以包括人 CD73。例如针对人 CD73 的序列可以见 Uniprot 登录号 P21589 下。

在本申请中，术语“抗原结合蛋白”通常指从天然状态下经人工手段获得的具有抗原结合能力的蛋白。该“抗原结合蛋白”可以包含结合抗原的部分和任选地，允许抗原结合部分采用促进所述抗原结合部分结合抗原的构象的框架或构架部分。抗原结合蛋白可以包含例如抗体来源的蛋白框架区（FR）或具有移植的 CDR 或 CDR 衍生物的备选蛋白框架区或人工框架区。此类框架包括，但不限于包含被引入例如以稳定抗原结合蛋白的三维结构的突变的抗体来源的框架区以及包含例如生物相容性聚合物的完全合成的框架区。参见例如 Korndorfer 等, 2003,Proteins:Structure,Function,andBioinformatics,53(1):121-129(2003); Roque 等, Biotechnol. Prog. 20:639-654(2004)。抗原结合蛋白的实例包括但不限于：人抗体、人源化抗体；嵌合抗体；重组抗体；单链抗体；双功能抗体；三功能抗体；四功能抗体；Fab，Fab’，Fv 片段，$F(ab')_2$，$F(ab)_2$，scFv，di-scFv，dAb，IgD 抗体；IgE 抗体；IgM 抗体；IgG1 抗体；IgG2 抗体；IgG3 抗体；或 IgG4 抗体以及其片段。

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

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

在本申请中，术语“抗体”通常指免疫球蛋白或其片段或其衍生物，涵盖包括抗原结合位点的任何多肽，无论其是在体外还是体内产生的。该术语包括但不限于多克隆的、单克隆的、单特异性的、多特异性的、非特异性的、人源化的、单链的、嵌合的、合成的、重组的、杂化的、突变的和移植的抗体。除非另外被术语“完整的”修饰，如在“完整的抗体”中，为了本发明的目的，术语“抗体”也包括抗体片段，比如 Fab、$F(ab')_2$、Fv、scFv、Fd、dAb 和保持抗原结合功能(例如，特异性结合 CLDN18.2)的其它抗体片段。通常，这样的片段应

当包括抗原结合结构域。基本的 4 链抗体单元是由两个相同的轻(L)链和两个相同的重(H)链组成的异四聚体糖蛋白。IgM 抗体由 5 个基本的异四聚体单元与另外一个称为 J 链的多肽组成，且含有 10 个抗原结合位点，而 IgA 抗体包括 2-5 个可以与 J 链相结合聚合形成多价组合的基本 4 链单元。就 IgG 而言，4 链单元一般为约 150,000 道尔顿。每个 L 链通过一个共价二硫键与 H 链连接，而两个 H 链通过一个或多个取决于 H 链同种型的二硫键相互连接。每个 H 和 L 链还具有规则间隔的链内二硫化桥键。每个 H 链在 N 末端具有可变结构域(VH)，对于 α 和 γ 链各自继之以三个恒定结构域(CH)、对于 μ 和 ε 同种型继之以四个 CH 结构域。每个 L 链在 N 末端具有可变结构域(VL)，在其另一端具有恒定结构域。VL 与 VH 对应，且 CL 与重链的第一恒定结构域(CH1)相对应。特定的氨基酸残基被认为在轻链和重链可变结构域之间形成界面。VH 和 VL 配对一起形成单个抗原结合位点。对于不同类别抗体的结构和性质，参见例如 Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parsolw (eds), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994，第 71 页和第 6 章。来自任何脊椎动物物种的 L 链可以基于其恒定结构域的氨基酸序列被分为两种明显不同的类型中的一种，称为 κ 和 λ。根据重链(CH)恒定结构域的氨基酸序列，可以将免疫球蛋白分为不同的类别或同种型。目前存在五类免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，具有分别被命名为 α、δ、ε、γ 和 μ 的重链。基于 CH 序列和功能方面的相对小的差异，将 γ 和 α 类进一步分成亚类，例如，人表达下述亚类：IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgK1。

在本申请中，术语“CDR”也称“互补决定区”，通常指抗体可变结构域中的区域，其序列是高度可变的和/或形成结构定义环。例如，抗体可包括六个 CDR；在 VH 中三个(HCDR1、HCDR2、HCDR3)，和在 VL 中三个(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。在某些实施方案中，仅由重链组成的天然存在的骆驼抗体在缺乏轻链的情况下，其功能也能够正常且稳定。参见，例如 , Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993); Sheriff et al, Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996)。

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

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

在本申请中，术语“Fab”通常指抗体的抗原结合片段。如上所述，可以使用木瓜蛋白

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

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

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

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

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

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

在本申请中，术语“单克隆抗体”通常指单分子组成的抗体分子制备物。单克隆抗体通常针对单个抗原位点具有高度特异性。而且，与常规多克隆抗体制剂（通常具有针对不同决定簇的不同抗体）不同，各单克隆抗体是针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性之外，单克隆抗体的优点在于它们可以通过杂交瘤培养合成，不受其他免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示从基本上同质的抗体群体获得的抗体的特征，并且不被解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如，本申请使用的单克隆抗体可以在杂交瘤细胞中制备，或者可以通过重组 DNA 方法制备。

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

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

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

在本申请中，术语“直接相连”与术语“间接相连”相对，术语“直接相连”通常是指直接连接。例如，所述直接相连可以为物质间没有间隔子而直接相连的情况。所述间隔子可以是连接子。例如，所述连接子可以为肽连接子。术语“间接相连”通常是指物质间不直接相连的情况。例如，所述间接相连可以为通过间隔子而连接的情况。例如，在本申请所述的分离的抗原结合蛋白中，所述L-FR1的C末端与所述LCDR1的N末端可以直接或间接相连。

在本申请中，术语“药物组合物”通常指用于预防/治疗疾病或病症的组合物。所述药物组合物可以包含一种或多种活性成分，以及任选地药学上可接受的载剂。例如，所述药物组合物还可以包含一种或多种（药学上有效的）载剂、稳定剂、赋形剂、稀释剂、增溶剂、表面活性剂、乳化剂和/或防腐剂的合适的制剂。组合物的可接受成分在所用剂量和浓度下

优选地对接受者无毒。本发明的药物组合物包括但不限于液体、冷冻和冻干组合物。

在本申请中，术语“药学上可接受的载剂”通常包括药剂学可接受的载体、赋形剂和/或或稳定剂，它们在所采用的剂量和浓度对暴露于其的细胞或哺乳动物是无毒的。生理学可接受的载体可包括例如缓冲剂，抗氧化剂，低分子量（少于约 10 个残基）多肽，蛋白质，亲水性聚合物，氨基酸，单糖，二糖和其它碳水化合物，螯合剂，糖醇，成盐反荷离子，例如钠；和/或非离子表面活性剂。

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

在本申请中，术语“肿瘤”通常指由异常细胞生长形成的赘生物或实体病变。在本申请中，肿瘤可以是实体瘤或非实体瘤。

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

在本申请中，所述变体可以为，例如在所述蛋白质和/或所述多肽（例如，特异性结合 CD73 的抗体或其片段）的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或多个氨基酸的蛋白质或多肽。例如，所述功能性变体可包含已经通过至少 1 个，例如 1-30 个、1-20 个或 1-10 个，又例如 1 个、2 个、3 个、4 个或 5 个氨基酸取代、缺失和/或插入而具有氨基酸改变的蛋白质或多肽。所述功能性变体可基本上保持改变（例如取代、缺失或添加）之前的所述蛋白质或所述多肽的生物学特性。例如，所述功能性变体可保持改变之前的所述蛋白质或所述多肽的至少 60%，70%，80%，90%，或 100%的生物学活性（例如抗原结合能力）。例如，所述取代可以为保守取代。

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

在本申请中，所述同源性通常是指两个或多个序列之间的相似性、类似或关联。可以通过以下方式计算“序列同源性百分比”：将两条待比对的序列在比较窗中进行比较，确定两条序列中存在相同核酸碱基（例如，A、T、C、G、I）或相同氨基酸残基（例如，Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys 和 Met）的位置的数目以得到匹配位置的数目，将匹配位置的数目除以比较窗中的总位置数（即，窗大小），并且将结果乘以 100，以产生序列同源性百分比。为了确定序列同源性

百分数而进行的比对，可以按本领域已知的多种方式实现，例如，使用可公开获得的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign（DNASTAR）软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适宜参数，包括为实现正在比较的全长序列范围内或目标序列区域内最大比对所需要的任何算法。所述同源性也可以通过以下的方法测定：FASTA 和 BLAST。对FASTA算法的描述可以参见W．R．Pearson和D．J．Lipman的“用于生物学序列比较的改进的工具”，美国国家科学院院刊（Proc．Natl．Acad．Sci．），85：2444-2448，1988；和D．J．Lipman和W．R．Pearson的“快速灵敏的蛋白质相似性搜索”，Science，227：1435-1441，1989。对 BLAST 算法的描述可参见 S．Altschul、W．Gish、W．Miller、E．W．Myers和D．Lipman的“一种基本的局部对比（alignment）搜索工具”，分子生物学杂志，215：403-410，1990。

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

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

发明详述

一方面，本申请提供一种药物组合，其包含特异性结合 CD73 的第一抗原结合蛋白，以及特异性结合CD73的第二抗原结合蛋白。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白具有下述性质中的一种或多种：

（1） 能够特异性结合CD73或其功能活性片段；

（2） 能够抑制CD73的酶活性；

（3） 能够诱导细胞表面的CD73的内吞；

（4） 能够抑制肿瘤细胞的生长和/或增殖。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白和所述第二抗原结合蛋白可具有不同的 CD73 抗原结合表位。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白和所述第二抗原结合蛋白可以非竞争方式与 CD73 蛋白结合。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可与所述第二抗原结合蛋白以混合物形式存在。例如，所述第一抗原结合蛋白可与所述第二抗原结合蛋白存在于同一容器中，混合放置。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含抗体重链可变区VH中的至少一个CDR，所

述 VH 可包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含 HCDR3，所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含 HCDR2，所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含 HCDR1，所述 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含 H-FR1，所述 H-FR1 的 C 端与所述 HCDR1 的 N 端直接或间接相连，且所述 H-FR1 可包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含 H-FR2，所述 H-FR2 位于所述 HCDR1 和所述 HCDR2 之间，且所述 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含 H-FR3，所述 H-FR3 位于所述 HCDR2 和所述 HCDR3 之间，且所述 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含 H-FR4，所述 H-FR4 的 N 端与所述 H-FR3 的 C 端直接或间接相连，且所述 H-FR4 包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含 H-FR1，H-FR2，H-FR3 和 H-FR4。例如，所述 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列，所述 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 5 或 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列，所述 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列，且所述 H-FR4 可包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白包含 VH，且所述 VH 包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含抗体重链恒定区。

在本申请中，所述抗体重链恒定区源自 IgG 重链恒定区。例如，所述抗体重链恒定区源自人 IgG 重链恒定区。例如，所述抗体重链恒定区源自人 IgG1 重链恒定区或人 IgG4 重链恒定区。例如，所述抗体重链恒定区包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含抗体重链，所述抗体重链可包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含抗体轻链可变区 VL 中的至少一个 CDR，所述 VL 可包含 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含 LCDR3，所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含 LCDR2，所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 12（WAS）所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含 LCDR1，所述 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 13 所述的氨基酸序列，所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 12（WAS）所示的氨基酸序列，且所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含 L-FR1，所述 L-FR1 的 C 端与所述 LCDR1 的 N 端直接或间接相连，且所述 L-FR1 可包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含 L-FR2，所述 L-FR2 位于所述 LCDR1 和所述 LCDR2 之间，且所述 L-FR2 可包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含 L-FR3，所述 L-FR3 位于所述 LCDR2 和所述 LCDR3 之间，且所述 L-FR3 包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含 L-FR4，所述 L-FR4 的 N 端与所述 L-FR3 的 C 端直接或间接相连，且所述 L-FR4 包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含 L-FR1，L-FR2，L-FR3 和 L-FR4。例如，所述 L-FR1 可包含 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列，所述 L-FR2 可包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列，所述 L-FR3 可包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列，且所述 L-FR4 可包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白包含 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含抗体轻链恒定区。

在本申请中，所述抗体轻链恒定区可源自人 Igκ 恒定区。

在本申请中，所述抗体轻链恒定区可包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含抗体轻链，所述抗体轻链可包含 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含 VH 和 VL，所述 VH 可包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列，且所述 VL 可包含 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第一抗原结合蛋白可包含重链和轻链，所述重链可包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列，且所述轻链可包含 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含抗体重链可变区 VH 中的至少一个 CDR，所述 VH 可包含 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含 HCDR3，所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含 HCDR2，所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含 HCDR1，所述 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，所述 HCDR1 可包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列，所述 HCDR2 可包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列，且所述 HCDR3 可包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含 H-FR1，所述 H-FR1 的 C 端与所述 HCDR1 的 N 端直接或间接相连，且所述 H-FR1 可包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含 H-FR2，所述 H-FR2 位于所述 HCDR1 和所述 HCDR2 之间，且所述 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含 H-FR3，所述 H-FR3 位于所述 HCDR2 和所述 HCDR3 之间，且所述 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含 H-FR4，所述 H-FR4 的 N 端与所述 H-FR3 的 C 端直接或间接相连，且所述 H-FR4 包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含 H-FR1，H-FR2，H-FR3 和 H-FR4。例如，所述 H-FR1 包含 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列，所述 H-FR2 可包含 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列，所述 H-FR3 可包含 SEQ ID NO: 26 所示的氨基酸序列，且所述 H-FR4 可包含 SEQ ID NO: 7 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白包含 VH，且所述 VH 包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含抗体重链恒定区。

在本申请中，所述抗体重链恒定区源自 IgG 重链恒定区。例如，所述抗体重链恒定区源自人 IgG 重链恒定区。例如，所述抗体重链恒定区源自人 IgG1 重链恒定区或人 IgG4 重链恒定区。例如，所述抗体重链恒定区包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含抗体重链，所述抗体重链可包含 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含抗体轻链可变区 VL 中的至少一个 CDR，所述 VL 可包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含 LCDR3，所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含 LCDR2，所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 30（LAS）所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含 LCDR1，所述 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3，所述 LCDR1 可包含 SEQ ID NO: 31 所述的氨基酸序列，所述 LCDR2 可包含 SEQ ID NO: 30（LAS）所示的氨基酸序列，且所述 LCDR3 可包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含 L-FR1，所述 L-FR1 的 C 端与所述 LCDR1 的 N 端直接或间接相连，且所述 L-FR1 可包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含 L-FR2，所述 L-FR2 位于所述 LCDR1 和所述 LCDR2 之间，且所述 L-FR2 可包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含 L-FR3，所述 L-FR3 位于所述 LCDR2 和所述 LCDR3 之间，且所述 L-FR3 包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含 L-FR4，所述 L-FR4 的 N 端与所述 L-FR3 的 C 端直接或间接相连，且所述 L-FR4 包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含 L-FR1，L-FR2，L-FR3 和 L-FR4。例如，所述 L-FR1 可包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列，所述 L-FR2 可包含 SEQ ID NO: 33 所示的氨基酸序列，所述 L-FR3 可包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列，且所述 L-FR4 可包含 SEQ ID NO: 17 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白包含 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含抗体轻链恒定区。

在本申请中，所述抗体轻链恒定区可源自人 Igκ 恒定区。

在本申请中，所述抗体轻链恒定区可包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含抗体轻链，所述抗体轻链可包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含 VH 和 VL，所述 VH 可包含 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列，且所述 VL 可包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述第二抗原结合蛋白可包含重链和轻链，所述重链可包含 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列，且所述轻链可包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。

在本申请中，所述药物组合中的所述第一抗原结合蛋白可以与所述第二抗原结合蛋白可以以一定的质量比混合。例如，可以以约 1:5~5:1 的质量比混合。例如，所述第一抗原结合蛋白与所述第二抗原结合蛋白的质量比为约 1:5。例如，所述第一抗原结合蛋白与所述第二抗原结合蛋白的质量比为约 1:2.5。例如，所述第一抗原结合蛋白与所述第二抗原结合蛋白的质量比为约 1:1。例如，所述第一抗原结合蛋白与所述第二抗原结合蛋白的质量比为约 2.5:1。例如，所述第一抗原结合蛋白与所述第二抗原结合蛋白的质量比为约 5:1。

在本申请中，所述药物组合可以被配制为通过静脉注射给药。

药物组合物

另一方面，本申请还提供了药物组合物，其包含所述药物组合，以及任选地一种或多种药学上可接受的载剂。

在本申请中，所述药物组合物可以为包含所述第一抗原结合蛋白和所述第二抗原结合蛋白的混合物，所述混合物还可包含非活性成分，以被配制为药学上可接受的制剂。

在本申请中，所述药物组合的浓度为约 3-300mg/mL，可选地为约 3-150mg/mL，可选地为约 5-100mg/mL，可选地为约 10-100mg/mL，可选地为约 10-50mg/mL，例如，为约 30 ±5mg/mL，例如，为约 30 ±3mg/mL。

在本申请中，所述药物组合物可包含缓冲液。例如，所述缓冲液可以为酸性缓冲液。例如，所述缓冲液可以为中性缓冲液。

例如，所述缓冲液可选自下组：醋酸盐-醋酸缓冲液、组氨酸-组氨酸盐酸缓冲液、枸橼酸盐-枸橼酸缓冲液、磷酸盐缓冲液、组氨酸-醋酸缓冲液、三羟甲基氨基甲烷（Tris）-盐酸盐缓冲液、磷酸-枸橼酸盐，或其组合。

例如，所述缓冲液可选自下组：醋酸盐-醋酸、枸橼酸盐-枸橼酸、组氨酸-组氨酸盐酸、

磷酸盐、Tris-盐酸盐、组氨酸-醋酸、磷酸-枸橼酸盐，或其组合。

例如，所述缓冲液可选自下组中的一种或多种：醋酸钠-醋酸、枸橼酸钠-枸橼酸、组氨酸-组氨酸盐酸、磷酸二氢钠-磷酸氢二钠、Tris-盐酸盐、组氨酸-醋酸以及磷酸-枸橼酸钠。例如，所述缓冲液可以为组氨酸-醋酸缓冲液。

在本申请中，所述缓冲液的浓度可以为约 5-100mM，可选地为约 5-60mM，可选地为约 5-50mM，可选地为约 10-40mM，可选地为约 20±5mM，可选地为约 20±2mM。

在本申请中，所述药物组合物的 pH 可以为约 5-7。例如，所述药物组合物的 pH 值为约 6±0.5。例如，所述药物组合物的 pH 值为约 6±0.3。例如，所述药物组合物的 pH 值为约 6±0.1。例如，所述药物组合物的 pH 值为约 6.5±0.3。例如，所述药物组合物的 pH 值为约 7±0.3。

在本申请中，所述药物组合物可包含稳定剂。在本申请中，所述稳定剂可选自下组：氯化钠、氨基酸、糖醇，或其组合。例如，所述氨基酸可选自下组：脯氨酸 (Proline)、精氨酸（Arginine）、甘氨酸（Glycine）、组氨酸（Histidine）、赖氨酸（lysine）、甲硫氨酸（蛋氨酸 Methionine），或其组合。例如，所述糖醇可选自下组：蔗糖（Sucrose）、甘露醇（Mannitol）、海藻糖（Trehalose）、山梨醇（Sorbitol），或其组合。

例如，所述稳定剂可选自下组中的一种或多种：蔗糖、海藻糖、山梨醇、甘露醇、脯氨酸/蔗糖、蛋氨酸/海藻糖、甘氨酸/甘露醇、氯化钠/蔗糖、精氨酸/蔗糖、以及赖氨酸/海藻糖。例如，所述药物组合物的稳定剂可以为蔗糖。

在本申请中，所述药物组合物中稳定剂的含量为约 0.15 wt.%- 20 wt.%，可选地稳定剂的含量为约 0.15 wt.%- 10 wt.%，可选地稳定剂的含量为约 0.15 wt.%- 8 wt.%，可选地稳定剂的含量为约 4 ±1 wt.%或 8 ±1 wt.%，可选地稳定剂的含量为约 4 ±0.5 wt.%、8 ±0.5 wt.%，可选地稳定剂的含量为约 4 wt.%、5 wt.%、7 wt.%或 8 wt.%。例如，所述稳定剂的含量为约 0.15 wt.%，约 0.2wt.%，约 0.3wt.%，约 0.4 wt.%，0.5 wt.%，约 0.6 wt.%，约 0.8 wt.%，约 1wt.%，约 1.5wt.%，约 2wt.%，约 2.5 wt.%，约 3 wt.%，约 3.5wt.%，约 4 wt.%，约 4.5 wt.%，约 5 wt.%，约 5.5 wt.%，约 6 wt.%，约 7 wt.%，约 8 wt.%，。

在本申请中，所述药物组合物可包含表面活性剂。

在本申请中，所述表面活性剂可选自下组：聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯、聚氧乙烯氢化蓖麻油、甘油脂肪酸酯、聚山梨醇酯、泊洛沙姆，或其组合。在本申请中，所述聚山梨醇酯可选自下组：聚山梨醇酯 20（PS-20，吐温-20）、聚山梨醇酯 40（PS-40）、聚山梨醇酯 60

（PS-60）、聚山梨醇酯 80（PS-80）。例如，所述表面活性剂可包括吐温-20（PS-20）和/或吐温-80（PS-80）。例如，所述表面活性剂的浓度为约 0.001%-0.5%，可选地为约 0.005%-0.1%，可选地为约 0.005%、0.01%、0.03%、0.05%或 0.1%，可选地为约 0.01%或 0.03%。例如，所述表面活性剂的浓度为约 0.005%，约 0.01%，0.03%，约 0.05%，约 0.1%。

在本申请中，所述药物组合物的缓冲体系可以包含 20mM 组氨酸-醋酸，8 wt.%蔗糖，0.03 wt.%吐温-80。

在本申请中，所述药物组合物的缓冲体系可以包含 20mM 醋酸钠-醋酸，8 wt.%海藻糖，0.03 wt.%吐温-80。

在本申请中，所述药物组合物的缓冲体系可以包含 20mM 组氨酸-醋酸，1.5 wt.%脯氨酸，5 wt.%蔗糖，0.03 wt.%吐温-80。

在本申请中，所述药物组合物的缓冲体系可以包含 20mM 醋酸钠-醋酸，0.15 wt.%蛋氨酸，8 wt.%海藻糖，0.03 wt.%吐温-80。

在本申请中，所述药物组合物的缓冲体系可以包含 20mM 组氨酸-醋酸，8 wt.%蔗糖，0.01 wt.%吐温-80。

在本申请中，所述药物组合物的缓冲体系可以包含 20mM 醋酸钠-醋酸，8 wt.%海藻糖，0.01 wt.%吐温-80。

在本申请中，所述药物组合物的缓冲体系可以包含 20mM 组氨酸-醋酸，1.5 wt.%脯氨酸，5 wt.%蔗糖，0.01 wt.%吐温-80。

在本申请中，所述药物组合物的缓冲体系可以包含 20mM 醋酸钠-醋酸，0.15 wt.%蛋氨酸，8 wt.%海藻糖，0.01 wt.%吐温-80。

用途

另一方面，本申请提供了所述药物组合和/或所述药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于预防和/或治疗疾病和/或病症。

另一方面，本申请还提供了预防和/或治疗疾病和/或病症的方法，所述方法可以包括向有需要的受试者施用本申请所述药物组合和/或所述药物组合物。

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

另一方面，本申请所述药物组合和/或所述药物组合物，其可以用于预防和/或治疗疾病和/或病症。

在本申请中，所述疾病和/或病症可以是 CD73 异常表达介导的疾病和/或病症。

在本申请中，所述疾病和/或病症可以包括肿瘤。

在本申请中，所述肿瘤可以包括实体瘤和/或血液瘤。

在本申请中，所述疾病和/或病症可以包括胰腺癌、乳腺癌和/或特发性肺纤维化（IPF）。例如，所述乳腺癌可包括三阴性乳腺癌。

另一方面，本申请还提供了检测样品中 CD73 的方法，所述方法包括施用所述药物组合和/或所述药物组合物。

在本申请中，所述检测样品中 CD73 的方法可以是体外方法。在本申请中，所述检测样品中 CD73 的方法可以为非治疗目的。在本申请中，所述检测样品中 CD73 的方法不是诊断方法。

另一方面，本申请还提供了检测样品中 CD73 的试剂或试剂盒，其包含所述药物组合和/或所述药物组合物。

另一方面，本申请还提供了所述药物组合和/或所述药物组合物在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测样品中 CD73 的存在和/或含量。

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

实施例

通用测定方法

SEC-UPLC：用 ACQUITY UPLC ® Protein BEH SEC 分析柱（4.6mm × 150mm），通过 Waters 超高效液相色谱仪器（Acquity H Class），参照《中华人民共和国药典》（2015 版，三部）0514 通则高效液相色谱法进行测定，以面积归一法计算纯度。

CEX-HPLC：用 ProPac™ WCX-10 分析柱（4mm × 250mm），通过 Water 高效液相色谱仪器（E2695），参照《中华人民共和国药典》（2015 版，三部）通则高效液相色谱法进行测定，以面积归一法计算纯度。

Tm 值测定（IF，全光谱荧光）：使用 Uncle（Unchained Labs），在 25℃至 95℃范围内，以 0.3℃/分钟加热，利用全光谱荧光模块计算出不同处方的溶解温度 Tm。

Tagg 值测定（SLS，静态光散射）：使用 Uncle 仪器在 25℃至 95℃下，以 0.3℃/分钟加热，利用静态光散射模块计算出不同处方的抗体分子的起始聚集温度 Tagg。

实施例 1 抗 CD73 鸡尾酒抗体中组分 900698 和 900725 的 CD73 酶活抑制实验

将 900698（重链序列如 SEQ ID NO: 10 所示，轻链序列如 SEQ ID NO: 20 所示）和

900725（重链序列如 SEQ ID NO: 28 所示，轻链序列如 SEQ ID NO: 36 所示）用 PBS 稀释至 30ug/ml，再按照 1:5，1:2.5，1:1，2.5:1，5:1 混合，再 5 倍稀释 8 个梯度。取对数生长期内表达人 CD73 的细胞(CHOK1-huCD73-3F4，华博生物)悬液，用培养基制备成 4X105/ml 细胞悬液，每孔 100ul（约 40000 个细胞）加入 96 孔 U 型板中,1500rpm×5min 离心，去上清。然后用系列稀释的抗体重悬细胞，每孔加入 100ul，混匀，37℃孵育 20min。孵育结束后，1500rpm 离心 5min，去上清，200ul/well PBS 洗涤 1 遍，然后用 100ul/well 180uM AMP 重悬，37℃孵育 60min。孵育结束后，1500rpm×5min 离心，取 50ul/well 上清，转移至 96 孔黑板中，再加入 50ul/well 配制好的 ATP，混匀，37℃反应 15min。最后将 CellTiter-Glo® Substrate 加入 CellTiter-Glo® buffer，混匀并平衡至室温，然后加入待测孔，100ul/well，室温反应 10min，全波长检测。酶活性的百分比按照如下所述进行评估：残余 CD73 的活性为：(CHOK1-huCD73-3F4 细胞+Ab+ATP+AMP)-(ATP+AMP)/(CHOK1-huCD73-3F4 细胞+ATP+AMP)-(ATP+AMP)*100。

900698、900725 以及不同比例的 900698 和 900725 的混合物对细胞膜表达的 CD73（CHOK1-huCD73-3F4，华博生物）酶活性抑制的效果见图 1。结果可以看出当抗体浓度在 0.1~1ug/ml 时，同等浓度条件下 900698 和 900725 的混合物对酶活抑制的能力比单独的 900698 和 900725 都要越强（如黑色虚线箭头所指，酶活抑制曲线的下平台值越低，则表明抗体对酶活的最大抑制能力越强），说明 900698 和 900725 混合后具有协同抑制效果，而且 900698 和 900725 的比例为 1:1 时的效果看起来最优。

实施例 2 抗 CD73 鸡尾酒抗体的 SPR 竞争结合实验

为了探究 900698 和 900725 抗体在结合 CD73 时是否存在竞争作用，我们进行了SPR 竞争结合实验。首先，利用 BIAcore 8k 捕获人 CD73 抗原蛋白（厂家：ACRO Biosystems，货号：CD3-H52H7）作为配体,然后将抗体作为分析物。抗体的加入顺序按照 900698+900725（先加入 900698，然后再加入 900725）或 900725+900698（先加入 900725，然后再加入 900698）的方式依次进样，同时采用 900698+Buffer，900725+Buffer 的方式进行对照。

如下表 1 和图 2 所示，无论是先加入 900698 或 900725，都不影响另外一个抗体与 CD73 抗原的结合，说明抗 CD73 鸡尾酒抗体的两组分 900698 和 900725 在 CD73 抗原上具有不同的结合表位，能够同时结合到 CD73 抗原上。

表 1 不同加样条件下 900698 与 900725 对人 CD73 蛋白的结合亲和力检测

配体	分析物 1	分析物 2	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)

人源 CD73 二聚体蛋白	Buffer	900698	1.56E+05	1.14E-03	7.30E-09
	900725	900698	1.35E+05	1.70E-03	1.26E-08
	Buffer	900725	1.50E+06	4.52E-03	3.01E-09
	900698	900725	1.42E+06	5.91E-03	4.16E-09

实施例 3 抗 CD73 鸡尾酒抗体在胰腺癌动物模型中的抗肿瘤效果检测

本实验利用 NPG 小鼠建立 BxPC-3 胰腺癌动物模型并测试受试抗体的药效。用于本实验的人胰腺癌细胞 BxPC-3，以 RPMI-1640 培养基添加 10% FBS 培养于含 5% CO2 的 37℃培养箱。细胞连续培养十代之前，将约含 1×107 BxPC-3 细胞的 PBS 100μL 和等体积 Matrigel 混匀后，通过皮下注射接种于 36 只 NPG 小鼠背部右边靠近腋下，接种体积为 200 μL 左右。接种前用 2 - 5%异氟烷将小鼠麻醉。在接种当天，经尾静脉注射 $1.0X10^7$ PBMC（100 uL），当肿瘤生长到平均约 50 - 80 mm3 左右时，36 只荷瘤小鼠将根据肿瘤体积和体重被随机分成 6 组，每组 6 只。分组当天进行给药,具体给药方案见下表。其中，900201 为阴性对照抗体，不与 CD73 抗原结合。900201 的重链（HC）氨基酸序列如 SEQ ID NO: 37 所示，900201 的轻链（LC）氨基酸序列如 SEQ ID NO: 38 所示。Oleclumab 为阿斯利康开发的抗 CD73 单克隆抗体，目前处于临床 3 期。Uliledlimab 为天境生物开发的抗 CD73 单克隆抗体，目前处于临床 1 期.

结果如下表 2 和图 3 所示，和阴性对照组 900201 相比，阳性药 oleclumab，uliledlimab 以及测试药品 900698，900725，抗 CD73 鸡尾酒抗体均能够显著抑制 BxPC-3 胰腺癌的生长，且同等剂量的抗 CD73 鸡尾酒抗体的抑制肿瘤效果要优于阳性对照 oleclumab，uliledlimab 以及 900698 和 900725，证明 900698 和 900725 等比例混合而成的抗 CD73 抗体鸡尾酒抗体具有很好的协同抗胰腺癌肿瘤效果。

表 2 胰腺癌模型给药方案

组别	受试品	动物数（只）	给药剂量（mg/kg）	给药途径	给药频率 [a]	给药次数
G1	900201	6	5	i.p.	BIW	6
G2	oleclumab	6	5	i.p.	BIW	6
G3	uliledlimab	6	5	i.p.	BIW	6
G4	900698	6	5	i.p.	BIW	6

G5	900725	6	5	i.p.	BIW	6
G6	抗 CD73 鸡尾酒抗体	6	5	i.p.	BIW	8

实施例 4 抗 CD73 鸡尾酒抗体在三阴性乳腺癌动物模型中的抗肿瘤效果检测

本实验利用 NPG 小鼠建立 MDA-MB-231 三阴性乳腺癌动物模型并测试受试抗体的药效。用于本实验的人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 以 L-15 培养基添加 10% FBS 培养于含无 CO2 的 37℃培养箱。细胞连续培养十代之前，将约含 $5.0X10^6$ MDA-MB-231 细胞混悬于 100 μL PBS 中，和等体积 Matrigel 混匀后，通过皮下注射接种于 NPG 人源化小鼠背部右边靠近腋下，接种体积为 200 μL 左右。接种前用 2 - 5%异氟烷将小鼠麻醉。在接种当天，经尾静脉注射 $1.0X10^7$ PBMC（100 uL），当肿瘤生长到平均约 50 - 80 mm^3 左右时，30 只荷瘤小鼠将根据肿瘤体积和体重被随机分成 5 组，每组 6 只。分组当天进行给药,具体给药方案见下表。其中，900201 为阴性对照抗体，不与 CD73 抗原结合。Oleclumab 为阿斯利康开发的抗 CD73 单克隆抗体，目前处于临床 3 期。

结果如下表 3 和图 4 所示，和阴性对照组 900201 相比，阳性药 oleclumab 以及测试药品 900698，900725，抗 CD73 鸡尾酒抗体均能够显著抑制 MDA-MB-231 三阴性乳腺癌的生长，且同等剂量的抗 CD73 鸡尾酒抗体的抑制肿瘤效果要优于阳性对照 oleclumab 以及 900698 和 900725，证明 900698 和 900725 等比例混合而成的抗 CD73 抗体鸡尾酒抗体具有很好的协同抗三阴性乳腺癌肿瘤效果。

表 3 三阴性乳腺癌模型给药方案

组别	受试品	动物数（只）	给药剂量（mg/kg）	给药途径	给药频率 [a]	给药次数
G1	900201	6	5	i.p.	BIW	8
G2	oleclumab	6	5	i.p.	BIW	8
G3	900698	6	5	i.p.	BIW	8
G4	900725	6	5	i.p.	BIW	8
G5	抗 CD73 鸡尾酒抗体	6	5	i.p.	BIW	8

实施例 5 抗 CD73 鸡尾酒抗体在特发性肺纤维化（IPF）的动物模型中的治疗效果

特发性肺纤维化（IPF）是一种致命疾病，其特征是进行性和不可逆性肺纤维化，目前没有有效的治疗方法。大多数患者在症状发作后 3 - 8 年内死于进行性呼吸衰竭。尽管 IPF 发病机理知之甚少，但标志性病理特征包括：肺部炎症改变、成纤维细胞过度增殖以及细胞外基质（ECM）异常沉积。博来霉素（BLM）诱导的纤维化被广泛用于特发性肺纤维化的发病机理的研究。

博来霉素诱导的 CD73 人源化转基因小鼠特发性肺纤维化模型实验具体操作如下：将 CD73 人源化小鼠按照如下表格 4 进行分组，即除了随机挑选的 3 只动物直接列入 G1 正常组之外，其它所有组动物全部接受气管滴注博来霉素进行模型诱导。具体诱导方法为：在第 1 天，动物吸入 2 - 5%异氟烷进行麻醉，基于体重，动物将通过气管内的给药途径给予博来霉素（2 U/kg，具体给药体积将依据动物体重进行计算并被记录）。博来霉素滴注后 3 天，根据动物体重和动物状态，去除体重下降过大和体重变化轻微的动物，通过 BioBook 随机分配功能将 48 只动物分为余下 6 个组别，以达到近似的各组均重，减少组间偏差。所有动物将在第 4 天开始给药，直至实验结束，具体的给药方案参见图 5 和表 4 所示。整个实验周期，每周三次称量并记录动物的体重。小鼠体重结果如图 6 所示，在整个实验周期内，除正常组外，动物体重造模后逐渐体重减轻，随着试验进程及自我恢复体重逐渐持续性增长，各组间无明显差异。

表 4. 特发性肺纤维化（IPF）小鼠模型分组及给药方案

组别	测试物	动物	给药途径	浓度 mg/mL	给药浓度		给药方案
					mg/kg	mL/kg	
1	正常组（不接受博来霉素诱导）	3	i.p.	/	/	10	分组后当天开始，每周两次
2	模型组（给予 900201 阴性对照抗体）	8	i.p.	5	50	10	分组后当天开始，每周两次
3	阳性药尼达尼布组	8	p.o.	5	50	10	分组后当天开始，每天一次
4	900698 单药抗体组	8	i.p.	5	50	10	分组后当天开始，每周两次

5	抗 CD73 鸡尾酒抗体（900698+900725）-低剂量	8	i.p.	0.5+0.5	5+5	10	分组后当天开始，每周两次
6	抗 CD73 鸡尾酒抗体（900698+900725）-中等剂量	8	i.p.	1.5+1.5	15+15	10	分组后当天开始，每周两次
7	抗 CD73 鸡尾酒抗体（900698+900725）-高剂量	8	i.p.	2.5+2.5	25+25	10	分组后当天开始，每周两次

5.1 气道反应性测定：

在第 21 天，所有动物接受气道反应性的测定来对肺功能进行检测。使用 WBP 系统对实验小鼠进行气道高反应性测定。首先，小鼠雾化吸入 PBS 溶液，随后将连续雾化吸入浓度为 1.5625、3.125、6.25、12.5、25 和 50 mg/mL 的乙酰甲胆碱（Mch），测定相应浓度下的增强呼气间歇值（Penh），每个浓度下刺激 90 秒，绘制 Penh 相对基线的变化率-Mch 浓度曲线，并计算曲线下面积。

结果如图 7 显示，与正常动物相比，模型组动物 Penh 曲线下面积（AUC）明显升高。与模型动物组比较，受试物中高剂量组有改善趋势，且高剂量组有显著性差异（P=0.024 Kruskal-Wallis Test）。而阳性对照组尼达尼布则没有观察到改善，证明抗 CD73 鸡尾酒抗体在改善特发性肺纤维化肺功能方面要优于阳性对照尼达尼布。

5.2 肺泡灌洗液中炎性细胞数量的测定

肺功能检测完成后，使用舒泰（腹腔注射，25 - 50 mg/kg 舒泰，5-10 mg/kg 甲苯噻嗪）对动物麻醉后进行气管插管，用 0.4 mL 的 PBS（包含 1%FBS）对肺进行第一次灌洗。另各取 0.4 mL 的 PBS（包含 1%FBS）对肺进行第二次和第三次灌洗。混悬取 100 uL 计数肺泡灌洗液中的细胞总数。4℃下 300g 离心肺泡灌洗液 5 分钟，将离心后获得的细胞团重悬用以涂片制备，使用 Wright-Giemsa 染色液染色，从而区分出嗜酸细胞，中性白细胞，巨噬细胞和淋巴细胞。在光学显微镜下计数。实验数据表示成均值±标准误（mean ± S.E.M）。采用 SPSS 或 Graphpad Prism 分析数据。所采用的具体分析方法会在图例和表下注释里说明。$P < 0.05$ 认为具有统计学差异。

肺灌洗液细胞计数结果显示，模型组动物相对正常组肺泡灌洗液中炎症相关总细胞数、

淋巴细胞数百分比都有显著性攀升；给予阳性药以及不同浓度的抗 CD73 鸡尾酒抗体受试物后，炎症相关总细胞数和淋巴细胞数水平显著性降低，说明抗 CD73 鸡尾酒抗体可以显著改善特发性肺纤维化疾病的炎症程度。

5.3 病理纤维化程度评分：

灌洗后，通过脱颈椎安乐死动物。收集左肺，中性福尔马林固定并包埋在蜡块中，横切，分别在上、中和下段取切片，共计 3 张/肺叶，包埋在一个蜡块中，Masson 染色，用于病理纤维化程度评分。评分标准参考下表 5 所示。

评分结果如图 9 和图 10。与正常组动物相比，模型组动物经博来霉素诱导后，呈现显著性肺纤维化变化（P<0.001），说明博来霉素肺纤维化模型造模成功。阳性药尼达尼布组以及抗 CD73 鸡尾酒抗体给药组对病理评分均有改善。使用 Kruskal-Wallis test 方法检验，中等剂量的抗 CD73 鸡尾酒抗体给药组与模型组相比具有显著性差异。说明抗 CD73 鸡尾酒抗体可以有效改善特发性肺纤维化的病理评分。

表 5. 病理纤维化评分标准

评分	病理纤维化评分标准
1	正常
3	最小的纤维化增厚
5	中度纤维化增厚
7	纤维化伴随肺组织损伤（粗束）
8	纤维面积大，呈现“蜂窝状”

实施例 6 不同缓冲体系比较

用 WaterSep 中空纤维（Discover 12）将抗体置换至含 10mM 各筛选缓冲液（如下表 6 所示），并用各自缓冲液调整抗体浓度至约 5mg/mL，除菌过滤后备用。

新制备样品，通过 Tm 和 Tagg 评估各缓冲液的稳定性，结果如表 6 和表 7 所示。同时，将新制备样品置于各加压条件下，包括：高温试验（40℃±2℃，放置三周），反复冻融（5 个循环，≤-70℃/5℃±3℃）。分别通过外观、纯度等检测项目，评估其稳定性，结果如表 8 和表 9 所示。

表 6 900698 抗体不同缓冲液 Tm、Tagg 结果汇总

缓冲液		Tm	Tagg
种类	pH	（℃）	（℃）
醋酸钠-醋酸	6	71.9	80.4
枸橼酸钠-枸橼酸	6	70.3	75.7
组氨酸-组氨酸盐酸	6.5	70.6	76.4
磷酸二氢钠-磷酸氢二钠	6	72.2	80.1
Tris-盐酸盐	7	72.9	79.5
组氨酸-醋酸	6	69.9	77.0
磷酸-枸橼酸钠	6	71.3	77.4

表 7 900725 抗体不同缓冲液 Tm、Tagg 结果汇总

缓冲液		Tm	Tagg
种类	pH	（℃）	（℃）
醋酸钠-醋酸	6	71.8	80.4
枸橼酸钠-枸橼酸	6	70.6	77.1
组氨酸-组氨酸盐酸	6.5	71.3	77.0
磷酸二氢钠-磷酸氢二钠	6	67.9	76.2
Tris-盐酸盐	7	71.7	78.2
组氨酸-醋酸	6	70.8	76.7
磷酸-枸橼酸钠	6	70.7	77.5

表 8 900698 抗体各压力条件下，不同缓冲体系外观及纯度结果汇总

缓冲液		冻融		高温	
种类	pH	外观	SEC 纯度	外观	SEC 纯度
醋酸钠-醋酸	6	澄清	98.8%	澄清	96.6%
枸橼酸钠-枸橼酸	6	澄清	99.0%	澄清	96.2%
组氨酸-组氨酸盐酸	6.5	澄清	98.9%	澄清	97.0%
磷酸二氢钠-磷酸氢二钠	6	澄清	99.0%	澄清	96.0%
Tris-盐酸盐	7	澄清	98.8%	澄清	96.6%
组氨酸-醋酸	6	澄清	99.0%	澄清	97.0%
磷酸-枸橼酸钠	6	澄清	99.0%	澄清	96.2%

表 9 900725 抗体各压力条件下，不同缓冲体系外观及纯度结果汇总

缓冲液		冻融		高温	
种类	pH	外观	SEC 纯度	外观	SEC 纯度

醋酸钠-醋酸	6	澄清	98.5%	澄清	96.1%
枸橼酸钠-枸橼酸	6	澄清	98.5%	澄清	96.0%
组氨酸-组氨酸盐酸	6.5	澄清	98.4%	澄清	96.5%
磷酸二氢钠-磷酸氢二钠	6	澄清	98.6%	澄清	95.9%
Tris-盐酸盐	7	澄清	98.4%	澄清	96.2%
组氨酸-醋酸	6	澄清	98.5%	澄清	96.5%
磷酸-枸橼酸钠	6	澄清	98.5%	澄清	95.9%

从表 6 和表 7 中可以看出，各缓冲体系的 Tm 和 Tagg 差异不大。从表 8 和表 9 中可以看出，在冻融压力条件下，在纯度方面各组无明显差异；在高温压力条件下，各缓冲体系组在外观和纯度方面，均无明显差异。

后续将选用组氨酸-醋酸（pH6）作为缓冲液，进行其它辅料筛选。

实施例 7 不同稳定剂稳定性比较

用 WaterSep 中空纤维（Discover 12）将抗体置换至组氨酸-醋酸（pH6）缓冲体系中，分别加入各稳定剂的高浓母液，配制各稳定剂筛选组（如表 10 所示），调节抗体浓度至约 30mg/mL，除菌过滤后备用。

将新制备样品置于各加压条件下，包括：高温试验（40℃±2℃，放置三周），反复冻融（5 个循环，≤-70℃/5℃±3℃）。分别通过外观和纯度等检测项目，评估其稳定性，部分检测结果见下表 10 和表 11。

表 10 900698 抗体各压力条件下，不同稳定剂体系下外观及纯度结果汇总

样品		冻融		高温		
种类	含量	外观	SEC 纯度	外观	SEC 纯度	CEX 主峰
蔗糖	8 wt.%	澄清	98.4%	澄清	97.2%	55.9%
海藻糖	8 wt.%	澄清	98.4%	澄清	97.4%	55.1%
山梨醇	4 wt.%	澄清	98.4%	澄清	97.4%	55.5%
甘露醇	4 wt.%	澄清	97.1%	澄清	97.2%	56.5%
脯氨酸/蔗糖	1.5 wt.%/5 wt.%	澄清	98.4%	澄清	97.4%	55.9%
蛋氨酸/海藻糖	0.15 wt.%/8 wt.%	澄清	98.4%	澄清	97.3%	56.7%
甘氨酸/甘露醇	1 wt.%/4 wt.%	澄清	98.5%	澄清	97.3%	55.4%
氯化钠/蔗糖	0.6 wt.%/5 wt.%	澄清	98.4%	澄清	96.6%	56.7%
精氨酸/蔗糖	1.5 wt.%/5 wt.%	澄清	98.4%	澄清	97.2%	56.3%

赖氨酸/海藻糖	0.5 wt.%/7 wt.%	澄清	98.3%	澄清	96.7%	52.8%

表 11 900725 抗体各压力条件下，不同稳定剂体系下外观及纯度结果汇总

样品		冻融		高温		
种类	含量	外观	SEC 纯度	外观	SEC 纯度	CEX 主峰
蔗糖	8 wt.%	澄清	98.4%	澄清	97.2%	57.6%
海藻糖	8 wt.%	澄清	98.4%	澄清	97.0%	57.5%
山梨醇	4 wt.%	澄清	98.6%	澄清	97.0%	57.5%
甘露醇	4 wt.%	澄清	96.8%	澄清	97.0%	57.7%
脯氨酸/蔗糖	1.5 wt.%/5 wt.%	澄清	98.4%	澄清	97.1%	57.6%
蛋氨酸/海藻糖	0.15 wt.%/8 wt.%	澄清	98.4%	澄清	97.3%	58.1%
甘氨酸/甘露醇	1 wt.%/4 wt.%	澄清	98.4%	澄清	97.0%	56.4%
氯化钠/蔗糖	0.6 wt.%/5 wt.%	澄清	98.2%	澄清	96.6%	57.7%
精氨酸/蔗糖	1.5 wt.%/5 wt.%	澄清	98.3%	澄清	97.2%	58.1%
赖氨酸/海藻糖	0.5 wt.%/7 wt.%	澄清	98.3%	澄清	96.6%	56.9%

从表 10 和表 11 中可以看出，在冻融压力下，除了甘露醇组 SEC 纯度略低于其它组外，其它各组均无明显差异；高温压力下，氯化钠-蔗糖组和赖氨酸-海藻糖组 SEC 纯度略低于其它组外，其他各组间无明显差异。

后续将选用蔗糖作为稳定剂，开展表面活性剂筛选实验。

实施例 8 表面活性剂筛选

用 WaterSep 中空纤维（Discover 12）将抗 CD73 鸡尾酒抗体置换至组氨酸-醋酸（pH6）8 wt.%蔗糖缓冲体系中，分别加入各表面活性剂的高浓母液，配制各表面活性剂筛选组（如表 12 所示），调节抗体浓度至约 30mg/mL，除菌过滤后备用。

将新制备样品置于各震荡加压条件下，室温震荡 3 天（200rpm），通过外观与不溶性微粒数量评价表面活性剂吐温-20（PS-20）和吐温-80（PS-80）的保护效果，部分检测结果见下表 12。

表 12 震荡压力条件下，不同表面活性剂的微粒数目汇总

处方信息			震荡		
基础处方	表面活性剂		外观	≥10μm（个/mL）	≥25μm（个/mL）
	种类	浓度			

组氨酸-醋酸，含 8 wt.%蔗糖，抗体 30mg/ml	无	/	乳光+++	230	40
	PS-20	0.005%	澄清	60	10
		0.01%	澄清	20	0
		0.03%	乳光++	0	0
		0.05%	乳光++	380	0
		0.1%	乳光++	110	0
	PS-80	0.005%	澄清	50	0
		0.01%	澄清	0	0
		0.03%	乳光++	260	40
		0.05%	乳光++	280	10
		0.1%	乳光+	80	0

从表 12 中可以看出，在震荡压力下，与未添加表面活性剂组相比，PS-20 和 PS-80 的加入，均能显著抑制震荡引起的不溶性微粒数增加。外观“+”表示乳光现象等级，“+++”为严重，“++”为较严重，“+”为轻微 从外观来看，PS-20 和 PS-80 的加入，均能改善样品乳光现象严重程度，但 PS-20 和 PS-80 浓度超过 0.05%之后改善效果变差。

实施例 9 不同缓冲体系抗 CD73 鸡尾酒抗体制剂制备

从表 6-表 12 中，可以看出各组分实验结果除个别稍差以外，其他组间无明显差异。

综上，后续将选用几组缓冲体系进行加压、加速和长期稳定性考察，缓冲体系如下：

1) 20mM 组氨酸-醋酸，8 wt.%蔗糖，0.03 wt.%吐温-80，PH6±0.5

2) 20mM 醋酸钠-醋酸，8 wt.%海藻糖，0.03 wt.%吐温-80，PH6±0.5

3) 20mM 组氨酸-醋酸，1.5 wt.%脯氨酸，5 wt.%蔗糖，0.03 wt.%吐温-80，PH6±0.5

4) 20mM 醋酸钠-醋酸，0.15 wt.%蛋氨酸，8 wt.%海藻糖，0.03 wt.%吐温-80，PH6±0.5

先用 Merk 公司 30KD 超滤膜包（PLCTK）将抗 CD73 鸡尾酒抗体置换至各缓冲体系中，调节抗体浓度至约 30±3mg/mL，除菌过滤后无菌分装到 1.5mlEP 管中，每种体系制剂各时间点一支，每支 1ml。

实施例 10 抗 CD73 鸡尾酒抗体制剂的稳定性

实施例 10 考察实施例 9 制备的几组缓冲体系抗 CD73 鸡尾酒抗体药物制剂的稳定性，稳定性考察为加压、加速和长期稳定性考察，具体如下：

10.1 加压条件稳定性试验

加压条件包括：高温 3 周（40℃±2℃）、室温震荡 3 天（60rmp）、反复冻融（5 个循环，≤-70℃/5℃±3℃冻融）等。

按照实施例 9 制备的几组抗 CD73 鸡尾酒抗体药物制剂样品，置于各压力条件下储存（如表 13 所示），在设定时间点或处理次数后取样送检，通过外观、不溶性微粒数和纯度等评价其稳定性，部分检测结果见下表 13。

表 13 抗 CD73 鸡尾酒抗体药物制剂在各加压条件下的稳定性数据汇总

样品	加压条件	外观	不溶性微粒		纯度		
			≥10μm（个/mL）	≥25μm（个/mL）	SEC 纯度	CEX 主峰 38	CEX 主峰 39
缓冲体系 1	T0 对照	澄清	140	30	97.8%	25.3%	39.5%
	室温震荡 3 天	澄清	260	40	97.7%	26.1%	40.6%
	高温 3 周	澄清	110	65	96.4%	21.0%	30.5%
	冻融 5 次循环	澄清	/	/	97.8%	24.0%	37.4%
缓冲体系 2	T0 对照	澄清	90	10	97.3%	27.1%	37.1%
	室温震荡 3 天	澄清	60	0	97.6%	28.2%	37.3%
	高温 3 周	澄清	30	20	95.6%	20.7%	26.2%
	冻融 5 次循环	澄清	/	/	97.5%	26.9%	36.7%
缓冲体系 3	T0 对照	澄清	60	10	97.6%	25.5%	40.9%
	室温震荡 3 天	澄清	111	0	97.5%	25.6%	41.5%
	高温 3 周	澄清	25	5	96.0%	19.0%	28.4%
	冻融 5 次循环	澄清	/	/	97.7%	25.2%	40.5%
缓冲体系 4	T0 对照	澄清	50	20	97.3%	26.5%	33.9%
	室温震荡 3 天	澄清	30	0	97.1%	28.3%	35.5%
	高温 3 周	澄清	45	10	95.8%	21.3%	25.4%
	冻融 5 次循环	澄清	/	/	97.5%	26.4%	33.7%

备注：T0 对照为制剂制备完成时的对照。

从表 13 中可以看出，各压力条件对产品质量的影响项目和程度表现各异。震荡及高温压力主要引起不溶性微粒中大颗粒数量的增加，纯度上略有下降，但远高于质量标准。总之，这几组缓冲体系的药物组合物稳定性很高，能有效保护主药成分抗 CD73 鸡尾酒抗体，从而有效抵抗各加压条件的破坏作用。

10.2 加速稳定性试验

按照实施例 9 制备的几组缓冲体系抗 CD73 鸡尾酒抗体药物制剂样品，置于加速条件下

储存（25℃±2℃），在设定时间点取样送检，通过不溶性微粒和纯度等评价其稳定性，部分检测结果见下表 14。

表 14 抗 CD73 鸡尾酒抗体药物制剂在加速条件下的稳定性数据汇总

样品名称	条件	不溶性微粒		纯度		
		≥10μm（个/mL）	≥25μm（个/mL）	SEC 纯度	CEX 主峰（38）	CEX 主峰（39）
缓冲体系 1	T0 对照	140	30	97.8%	25.3%	39.5%
	3 周	20	10	97.6%	25.3%	39.0%
	二个月	160	10	97.3%	22.8%	33.9%
	三个月	0	0	96.8%	22.1%	32.2%
缓冲体系 2	T0 对照	90	10	97.3%	27.1%	37.1%
	3 周	25	15	97.2%	25.5%	34.4%
	二个月	60	0	96.7%	24.3%	31.5%
	三个月	0	0	95.8%	23.4%	29.8%
缓冲体系 3	T0 对照	60	10	97.6%	25.5%	40.9%
	3 周	111	0	97.4%	23.3%	37.2%
	二个月	25	5	97.1%	22.2%	33.7%
	三个月	0	0	96.2%	21.1%	31.3%
缓冲体系 4	T0 对照	50	20	97.3%	26.5%	33.9%
	3 周	40	15	97.2%	27.5%	34.6%
	二个月	220	0	96.9%	25.0%	30.8%
	三个月	0	0	95.9%	24.1%	29.2%

备注：T0 对照为制剂制备完成时的对照。

从表 14 中可以看出，加速条件会引起药物制剂质量发生一定程度的下降。几组缓冲体系中 20HA6Arg1.5Suc5ps0.03 表现稍差，与 T0 样品相比，加速 3 个月样品，SEC 分子筛纯度下降约 1.4%，CEX 主峰（38）含量下降约 4.4%，CEX 主峰（39）含量下降约 9.6%，但仍满足质量标准。总之，这几组缓冲体系的药物组合物的稳定性很高，在 25℃加速条件下，至少能稳定保存 3 个月以上。

10.3 长期稳定性试验

按照实施例 9 制备的几组缓冲体系抗 CD73 鸡尾酒抗体药物制剂样品，置于长期冷藏条件下储存（5℃±3℃），在设定时间点取样送检，通过不溶性微粒、纯度等评价其稳定性，部分检测结果见下表 15 所示。

表 15 抗 CD73 鸡尾酒抗体药物制剂在长期冷藏条件下的稳定性数据汇总

样品名称	条件	不溶性微粒		纯度		
		≥10μm（个/mL）	≥25μm（个/mL）	SEC 纯度	CEX 主峰（38）	CEX 主峰（39）
缓冲体系 1	T0 对照	140	30	97.8%	25.3%	39.5%
	三个月	0	0	97.3%	24.4%	37.3%
缓冲体系 2	T0 对照	90	10	97.3%	27.1%	37.1%
	三个月	10	0	96.9%	25.9%	34.5%
缓冲体系 3	T0 对照	60	10	97.6%	25.5%	40.9%
	三个月	10	0	97.2%	23.9%	37.8%
缓冲体系 4	T0 对照	50	20	97.3%	26.5%	33.9%
	三个月	40	10	97.0%	26.8%	33.6%

备注：T0 对照为制剂制备完成时的对照。

从表 15 中可以看出，长期冷藏条件下（5℃±3℃），这几组缓冲体系药物制剂稳定性很好，三个月样品在不溶性微粒无明显变化，纯度上略有下降，但远高于质量标准。总之，这几组缓冲体系药物组合物的稳定性很高，可以在长期冷藏条件下稳定保存。

综上可以看出，实施例 9 制备的几组缓冲体系抗 CD73 鸡尾酒抗体药物制具有很好的稳定性，抗 CD73 鸡尾酒抗体在各压力条件（高温、反复冻融和震荡）下保持较好的稳定性，在加速条件（25℃±2℃）下至少能稳定储存三个月以上，同时在长期冷藏条件下，表现出很高的稳定性，可以稳定储存。

权 利 要 求 书

1. 药物组合，其包含特异性结合 CD73 的第一抗原结合蛋白，以及特异性结合 CD73 的第二抗原结合蛋白，所述第一抗原结合蛋白和所述第二抗原结合蛋白具有不同的 CD73 抗原结合表位。
2. 根据权利要求 1 所述的药物组合，其中所述第一抗原结合蛋白和所述第二抗原结合蛋白以非竞争方式与 CD73 蛋白结合。
3. 根据权利要求 1-2 中任一项所述的药物组合，其中所述第一抗原结合蛋白与所述第二抗原结合蛋白以混合物形式存在。
4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的药物组合，其中所述第一抗原结合蛋白包含抗体重链可变区 VH 中的至少一个 CDR，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。
5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的药物组合，其中所述第一抗原结合蛋白包含 HCDR3，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列。
6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的药物组合，其中所述第一抗原结合蛋白包含 HCDR2，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。
7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的药物组合，其中所述第一抗原结合蛋白包含 HCDR1，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 3 所示的氨基酸序列。
8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的药物组合，其中所述第一抗原结合蛋白包含 VH，且所述 VH 包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。
9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的药物组合，其中所述第一抗原结合蛋白包含抗体重链恒定区。
10. 根据权利要求 9 所述的药物组合，其中所述抗体重链恒定区源自 IgG 重链恒定区。
11. 根据权利要求 9-10 中任一项所述的药物组合，其中所述抗体重链恒定区源自人 IgG 重链恒定区。
12. 根据权利要求 9-11 中任一项所述的药物组合，其中所述抗体重链恒定区包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。
13. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的药物组合，其中所述第一抗原结合蛋白包含抗体重链，所述抗体重链包含 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列。
14. 根据权利要求 1-13 中任一项所述的药物组合，其中所述第一抗原结合蛋白包含抗体轻链可变区 VL 中的至少一个 CDR，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。
15. 根据权利要求 1-14 中任一项所述的药物组合，其中所述第一抗原结合蛋白包含 LCDR3，所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列。
16. 根据权利要求 1-15 中任一项所述的药物组合，其中所述第一抗原结合蛋白包含

LCDR2，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 12（WAS）所示的氨基酸序列。

17. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的药物组合，其中所述第一抗原结合蛋白包含 LCDR1，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列。
18. 根据权利要求 1-17 中任一项所述的药物组合，其中所述第一抗原结合蛋白包含 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列。
19. 根据权利要求 1-18 中任一项所述的药物组合，其中所述第一抗原结合蛋白包含抗体轻链恒定区。
20. 根据权利要求 19 所述的药物组合，其中所述抗体轻链恒定区源自人 Igκ 恒定区。
21. 根据权利要求 19-20 中任一项所述的药物组合，其中所述抗体轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。
22. 根据权利要求 1-21 中任一项所述的药物组合，其中所述第一抗原结合蛋白包含抗体轻链，所述抗体轻链包含 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列。
23. 根据权利要求 1-22 中任一项所述的药物组合，其中所述第二抗原结合蛋白包含抗体重链可变区 VH 中的至少一个 CDR，所述 VH 包含 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列。
24. 根据权利要求 1-23 中任一项所述的药物组合，其中所述第二抗原结合蛋白包含 HCDR3，所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 21 所示的氨基酸序列。
25. 根据权利要求 1-24 中任一项所述的药物组合，其中所述第二抗原结合蛋白包含 HCDR2，所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列。
26. 根据权利要求 1-25 中任一项所述的药物组合，其中所述第二抗原结合蛋白包含 HCDR1，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列。
27. 根据权利要求 1-26 中任一项所述的药物组合，其中所述第二抗原结合蛋白包含 VH，且所述 VH 包含 SEQ ID NO: 27 所示的氨基酸序列。
28. 根据权利要求 1-27 中任一项所述的药物组合，其中所述第二抗原结合蛋白包含抗体重链恒定区。
29. 根据权利要求 28 所述的药物组合，其中所述抗体重链恒定区源自 IgG 重链恒定区。
30. 根据权利要求 28-29 中任一项所述的药物组合，其中所述抗体重链恒定区源自人 IgG 重链恒定区。
31. 根据权利要求 28-30 中任一项所述的药物组合，其中所述抗体重链恒定区包含 SEQ ID NO: 9 所示的氨基酸序列。
32. 根据权利要求 1-31 中任一项所述的药物组合，其中所述第二抗原结合蛋白包含抗体重链，所述抗体重链包含 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列。

33. 根据权利要求 1-32 中任一项所述的药物组合，其中所述第二抗原结合蛋白包含抗体轻链可变区 VL 中的至少一个 CDR，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列。
34. 根据权利要求 1-33 中任一项所述的药物组合，其中所述第二抗原结合蛋白包含 LCDR3，所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 29 所示的氨基酸序列。
35. 根据权利要求 1-34 中任一项所述的药物组合，其中所述第二抗原结合蛋白包含 LCDR2，所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 30（LAS）所示的氨基酸序列。
36. 根据权利要求 1-35 中任一项所述的药物组合，其中所述第二抗原结合蛋白包含 LCDR1，所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 31 所示的氨基酸序列。
37. 根据权利要求 1-36 中任一项所述的药物组合，其中所述第二抗原结合蛋白包含 VL，所述 VL 包含 SEQ ID NO: 35 所示的氨基酸序列。
38. 根据权利要求 1-37 中任一项所述的药物组合，其中所述第二抗原结合蛋白包含抗体轻链恒定区。
39. 根据权利要求 38 所述的药物组合，其中所述抗体轻链恒定区源自人 Igκ 恒定区。
40. 根据权利要求 38-39 中任一项所述的药物组合，其中所述抗体轻链恒定区包含 SEQ ID NO: 19 所示的氨基酸序列。
41. 根据权利要求 1-40 中任一项所述的药物组合，其中所述第二抗原结合蛋白包含抗体轻链，所述抗体轻链包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列。
42. 根据权利要求 1-41 中任一项所述的药物组合，其中所述第一抗原结合蛋白与所述第二抗原结合蛋白的质量比为约 1:5~5:1。
43. 根据权利要求 1-42 中任一项所述的药物组合，其中所述第一抗原结合蛋白与所述第二抗原结合蛋白的质量比为约 1:5。
44. 根据权利要求 1-42 中任一项所述的药物组合，其中所述第一抗原结合蛋白与所述第二抗原结合蛋白的质量比为约 1:2.5。
45. 根据权利要求 1-42 中任一项所述的药物组合，其中所述第一抗原结合蛋白与所述第二抗原结合蛋白的质量比为约 1:1。
46. 根据权利要求 1-42 中任一项所述的药物组合，其中所述第一抗原结合蛋白与所述第二抗原结合蛋白的质量比为约 2.5:1。
47. 根据权利要求 1-42 中任一项所述的药物组合，其中所述第一抗原结合蛋白与所述第二抗原结合蛋白的质量比为约 5:1。
48. 药物组合物，其包含权利要求 1-47 中任一项所述的药物组合，以及任选地一种或多种药学上可接受的载剂。

49. 根据权利要求 48 所述的药物组合物，其中所述药物组合的浓度为约 3-300mg/mL。
50. 根据权利要求 48-49 中任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合的浓度为约 3-150mg/mL。
51. 根据权利要求 48-50 中任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合的浓度为约 5-100mg/mL。
52. 根据权利要求 48-51 中任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合的浓度为约 10-100mg/mL。
53. 根据权利要求 48-52 中任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合的浓度为约 10-50mg/mL。
54. 根据权利要求 48-53 中任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合的浓度为 30 ±5mg/mL。
55. 根据权利要求 48-54 中任一项所述的药物组合物，其中所述药物组合的浓度为 30 ±3mg/mL。
56. 根据权利要求 48-55 中任一项所述的药物组合物，其中所述药学上可接受的载剂包含缓冲液。
57. 根据权利要求 56 所述的药物组合物，其中所述缓冲液包含酸性缓冲液。
58. 根据权利要求 56-57 中任一项所述的药物组合物，其中所述缓冲液包含中性缓冲液。
59. 根据权利要求 56-58 中任一项所述的药物组合物，其中所述缓冲液选自下组：醋酸盐-醋酸缓冲液、组氨酸-组氨酸盐酸缓冲液、枸橼酸盐-枸橼酸缓冲液、磷酸盐缓冲液、组氨酸-醋酸缓冲液、三羟甲基氨基甲烷（Tris）-盐酸盐缓冲液、磷酸-枸橼酸盐，或其组合。
60. 根据权利要求 56-59 中任一项所述的药物组合物，其中所述缓冲液选自下组：醋酸盐-醋酸、枸橼酸盐-枸橼酸、组氨酸-组氨酸盐酸、磷酸盐、Tris-盐酸盐、组氨酸-醋酸、磷酸-枸橼酸盐，或其组合。
61. 根据权利要求 56-60 中任一项所述的药物组合物，其中所述缓冲液选自下组：醋酸钠-醋酸、枸橼酸钠-枸橼酸、组氨酸-组氨酸盐酸、磷酸二氢钠-磷酸氢二钠、Tris-盐酸盐、组氨酸-醋酸以及磷酸-枸橼酸钠。
62. 根据权利要求 56-61 中任一项所述的药物组合物，其中所述缓冲液的浓度为约 5-100mM。
63. 根据权利要求 56-62 中任一项所述的药物组合物，其中所述缓冲液的浓度为约 5-60mM。

64. 根据权利要求 56-63 中任一项所述的药物组合物，其中所述缓冲液的浓度为约 5-50mM。
65. 根据权利要求 56-64 中任一项所述的药物组合物，其中所述缓冲液的浓度为约 10-40mM。
66. 根据权利要求 56-65 中任一项所述的药物组合物，其中所述缓冲液的浓度为 20±5mM。
67. 根据权利要求 56-66 中任一项所述的药物组合物，其中所述缓冲液的浓度为 20±2mM。
68. 根据权利要求 48-67 中任一项所述的药物组合物，其 pH 值为约 5-7。
69. 根据权利要求 48-68 中任一项所述的药物组合物，其 pH 值为约 6±0.5。
70. 根据权利要求 48-69 中任一项所述的药物组合物，其 pH 值为约 6±0.3。
71. 根据权利要求 48-70 中任一项所述的药物组合物，其 pH 值为约 6±0.1。
72. 根据权利要求 48-68 中任一项所述的药物组合物，其 pH 值为约 6.5±0.3。
73. 根据权利要求 48-68 中任一项所述的药物组合物，其 pH 值为约 7±0.3。
74. 根据权利要求 48-73 中任一项所述的药物组合物，其中所述药学上可接受的载剂包含稳定剂。
75. 根据权利要求 74 所述的药物组合物，其中所述稳定剂选自下组：氯化钠、氨基酸、糖醇，或其组合。
76. 根据权利要求 75 所述的药物组合物，其中所述氨基酸选自下组：脯氨酸 (Proline)、精氨酸（Arginine）、甘氨酸（Glycine）、组氨酸（Histidine）、赖氨酸（lysine）、甲硫氨酸（蛋氨酸 Methionine），或其组合。
77. 根据权利要求 75-76 中任一项所述的药物组合物，其中所述糖醇选自下组：蔗糖（Sucrose）、甘露醇（Mannitol）、海藻糖（Trehalose）、山梨醇（Sorbitol），或其组合。
78. 根据权利要求 74-77 中任一项所述的药物组合物，其中所述稳定剂选自下组：蔗糖、海藻糖、山梨醇、甘露醇、脯氨酸/蔗糖、蛋氨酸/海藻糖、甘氨酸/甘露醇、氯化钠/蔗糖、精氨酸/蔗糖、以及赖氨酸/海藻糖。
79. 根据权利要求 74-78 中任一项所述的药物组合物，其中所述稳定剂的含量为约 0.15 wt.%- 20 wt.%。
80. 根据权利要求 74-79 中任一项所述的药物组合物，其中所述稳定剂的含量为约 0.15 wt.%- 10 wt.%。
81. 根据权利要求 74-80 中任一项所述的药物组合物，其中所述稳定剂的含量为约 0.15 wt.%- 8 wt.%。
82. 根据权利要求 74-81 中任一项所述的药物组合物，其中所述稳定剂的含量为约 4 ±1

wt.%或 8 ±1 wt.%。

83. 根据权利要求 74-82 中任一项所述的药物组合物，其中所述稳定剂的含量为约 4 ±0.5 wt.%或 8 ±0.5 wt.%。

84. 根据权利要求 74-81 中任一项所述的药物组合物，其中所述稳定剂的含量为约 4 wt.%、5 wt.%、7 wt.%或 8 wt.%。

85. 根据权利要求 74-84 中任一项所述的药物组合物，其中所述稳定剂的含量为约 8 wt.%。

86. 根据权利要求 48-85 中任一项所述的药物组合物，其中所述药学上可接受的载剂包含表面活性剂。

87. 根据权利要求 86 所述的药物组合物，其中所述表面活性剂选自下组：聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯、聚氧乙烯氢化蓖麻油、甘油脂肪酸酯、聚山梨醇酯、泊洛沙姆，或其组合。

88. 根据权利要求 87 所述的药物组合物，其中所述聚山梨醇酯选自下组：聚山梨醇酯 20（PS-20，吐温-20）、聚山梨醇酯 40（PS-40）、聚山梨醇酯 60（PS-60）、聚山梨醇酯 80（PS-80）。

89. 根据权利要求 86-88 中任一项所述的药物组合物，其中所述表面活性剂选自下组：PS-20（吐温-20）和 PS-80（吐温-80）。

90. 根据权利要求 86-89 中任一项所述的药物组合物，其中所述表面活性剂的浓度为约 0.001%-0.5%。

91. 根据权利要求 86-90 中任一项所述的药物组合物，其中所述表面活性剂的浓度为约 0.005%-0.1%。

92. 根据权利要求 86-91 中任一项所述的药物组合物，其中所述表面活性剂的浓度为约 0.005%、0.01%、0.03%、0.05%或 0.1%。

93. 根据权利要求 86-92 中任一项所述的药物组合物，其中所述表面活性剂的浓度为约 0.01%。

94. 根据权利要求 86-92 中任一项所述的药物组合物，其中所述表面活性剂的浓度为约 0.03%。

95. 根据权利要求 48-94 中任一项所述的药物组合物，其中所述药学上可接受的载剂选自下组：

（1）20mM 组氨酸-醋酸，8 wt.%蔗糖，0.03 wt.%吐温-80；

（2）20mM 醋酸钠-醋酸，8 wt.%海藻糖，0.03 wt.%吐温-80；

（3）20mM 组氨酸-醋酸，1.5 wt.%脯氨酸，5 wt.%蔗糖，0.03 wt.%吐温-80；

（4）20mM 醋酸钠-醋酸，0.15 wt.%蛋氨酸，8 wt.%海藻糖，0.03 wt.%吐温-80；

（5）20mM 组氨酸-醋酸，8 wt.%蔗糖，0.01 wt.%吐温-80；

（6）20mM 醋酸钠-醋酸，8 wt.%海藻糖，0.01 wt.%吐温-80；

（7）20mM 组氨酸-醋酸，1.5 wt.%脯氨酸，5 wt.%蔗糖，0.01 wt.%吐温-80；

（8）20mM 醋酸钠-醋酸，0.15 wt.%蛋氨酸，8 wt.%海藻糖，0.01 wt.%吐温-80。

96. 权利要求 1-47 中任一项所述的药物组合和/或权利要求 48-95 中任一项所述的药物组合物在制备药物中的用途，所述药物用于预防和/或治疗疾病和/或病症。

97. 根据权利要求 96 所述的用途，其中所述疾病和/或病症包括 CD73 介导的疾病和/或病症。

98. 根据权利要求 96-97 中任一项所述的用途，其中所述疾病和/或病症包括肿瘤。

99. 根据权利要求 98 所述的用途，其中所述肿瘤包括实体瘤和/或血液瘤。

100. 根据权利要求 96-99 中任一项所述的用途，其中所述疾病和/或病症选自下组：胰腺癌、乳腺癌和特发性肺纤维化（IPF）。

101. 根据权利要求 100 所述的用途，其中所述乳腺癌包括三阴性乳腺癌。

102. 权利要求 1-47 中任一项所述的药物组合和/或权利要求 48-95 中任一项所述的药物组合物在制备检测试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测 CD73 蛋白的存在和/或含量。

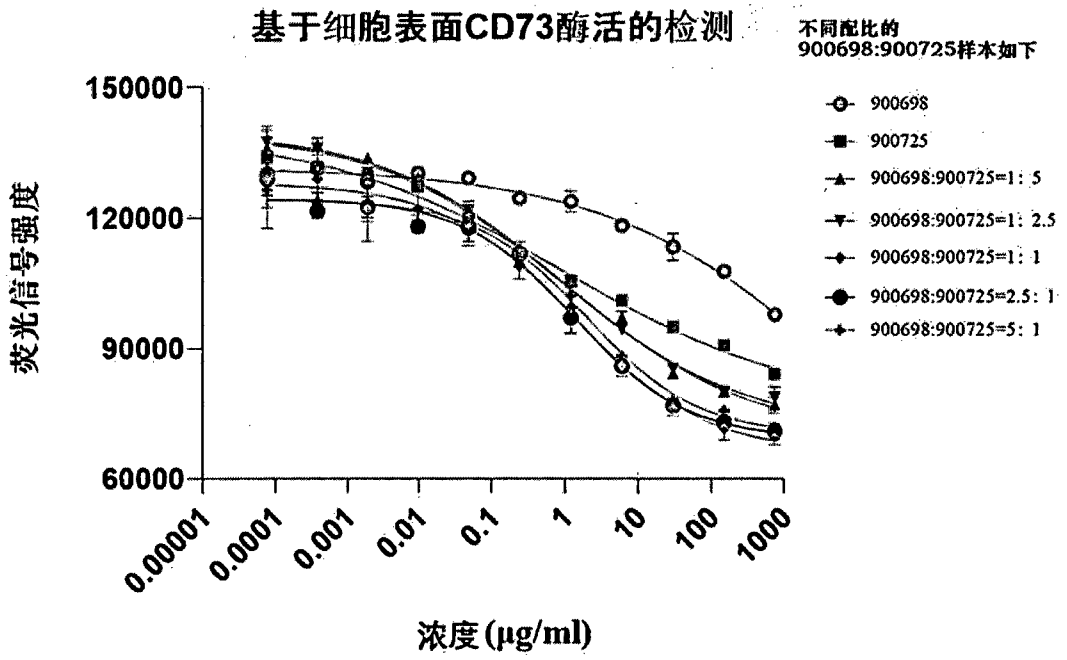

基于细胞表面CD73酶活的检测
不同配比的
900698:900725样本如下
900698
900725
900698:900725=1: 5
900698:900725=1: 2.5
900698:900725=1: 1
900698:900725=2.5: 1
900698:900725=5: 1
荧光信号强度
150000
120000
90000
60000
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度(μg/ml)

图 1

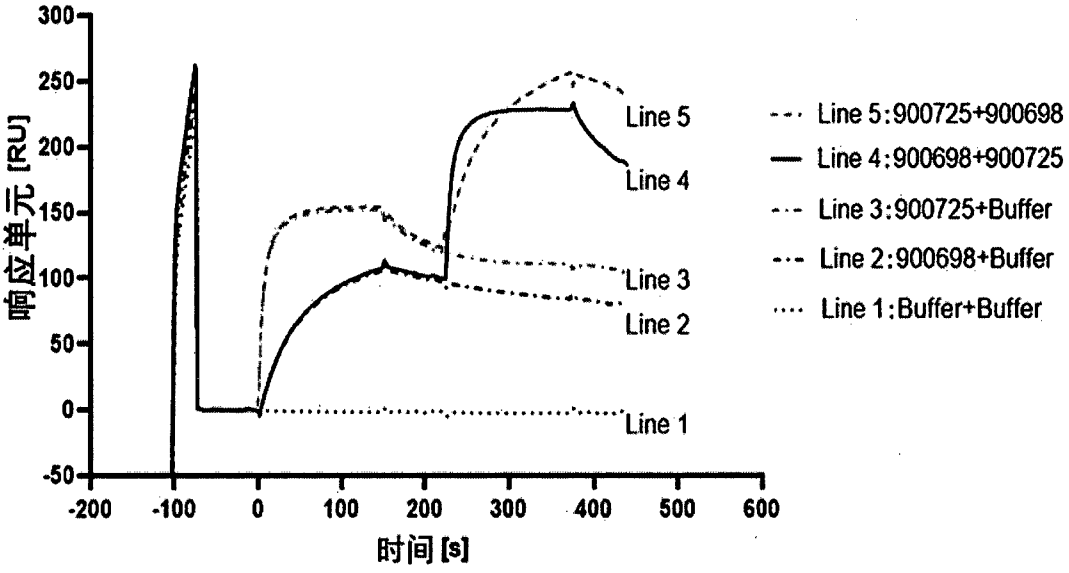

响应单元 [RU]
300
250
200
150
100
50
0
-50
-200
-100
0
100
200
300
400
500
600
时间 [s]
Line 5
Line 4
Line 3
Line 2
Line 1
Line 5:900725+900698
Line 4:900698+900725
Line 3:900725+Buffer
Line 2:900698+Buffer
Line 1:Buffer+Buffer

图 2

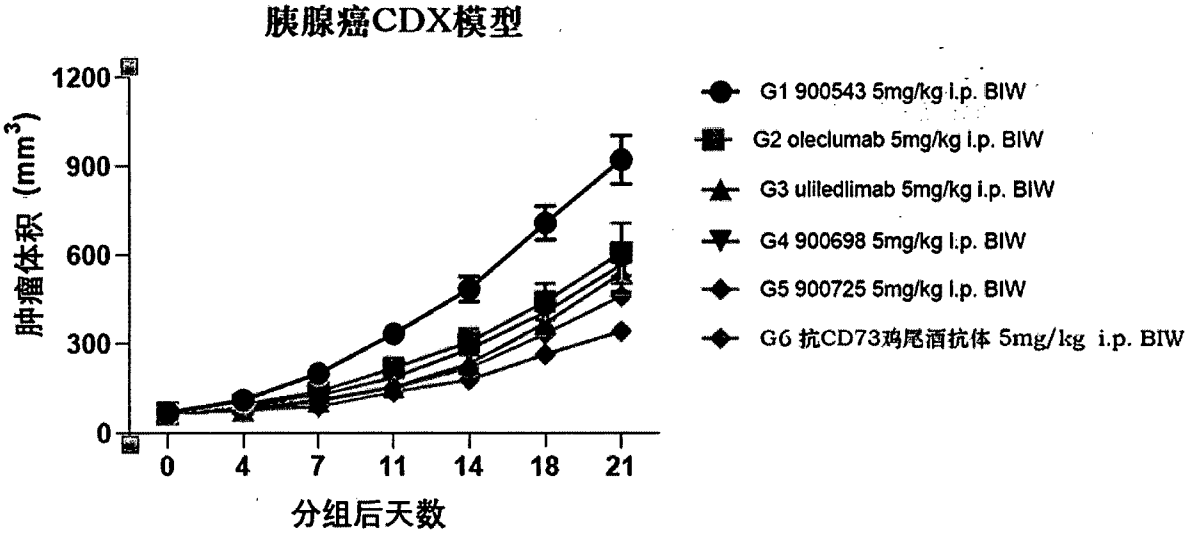

胰腺癌CDX模型
肿瘤体积 (mm3)
1200
900
600
300
0
0
4
7
11
14
18
21
分组后天数
G1 900543 5mg/kg i.p. BIW
G2 oleclumab 5mg/kg i.p. BIW
G3 ulilediimab 5mg/kg i.p. BIW
G4 900698 5mg/kg i.p. BIW
G5 900725 5mg/kg i.p. BIW
G6 抗CD73鸡尾酒抗体 5mg/kg i.p. BIW

图 3

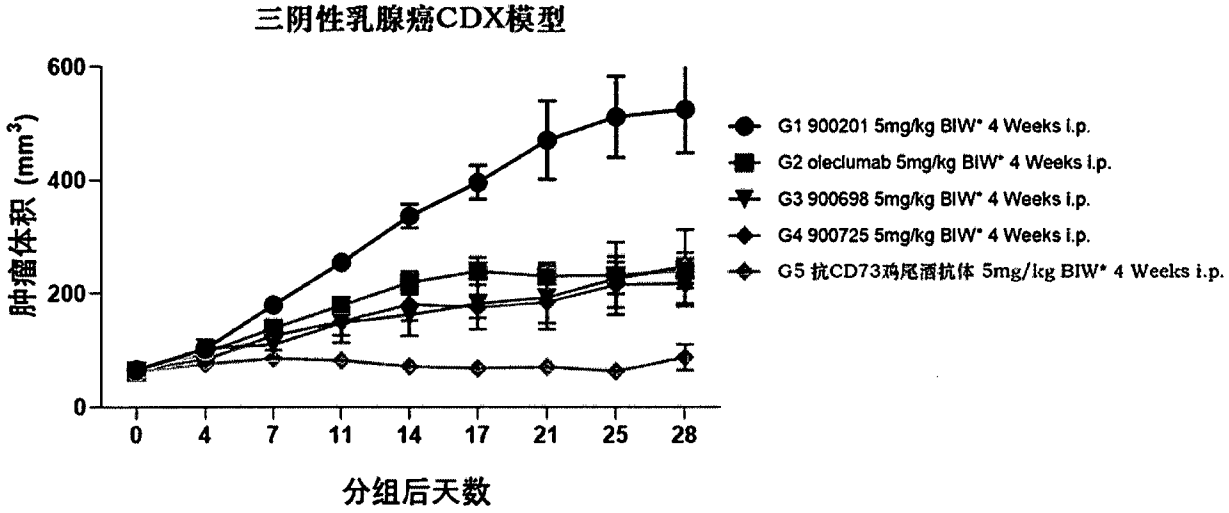

三阴性乳腺癌CDX模型
肿瘤体积 (mm3)
600
400
200
0
0
4
7
11
14
17
21
25
28
分组后天数
G1 900201 5mg/kg BIW* 4 Weeks i.p.
G2 oleclumab 5mg/kg BIW* 4 Weeks i.p.
G3 900698 5mg/kg BIW* 4 Weeks i.p.
G4 900725 5mg/kg BIW* 4 Weeks i.p.
G5 抗CD73鸡尾酒抗体 5mg/kg BIW* 4 Weeks i.p.

图 4

方案

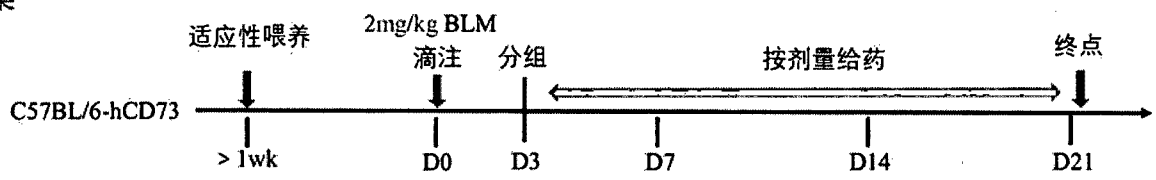
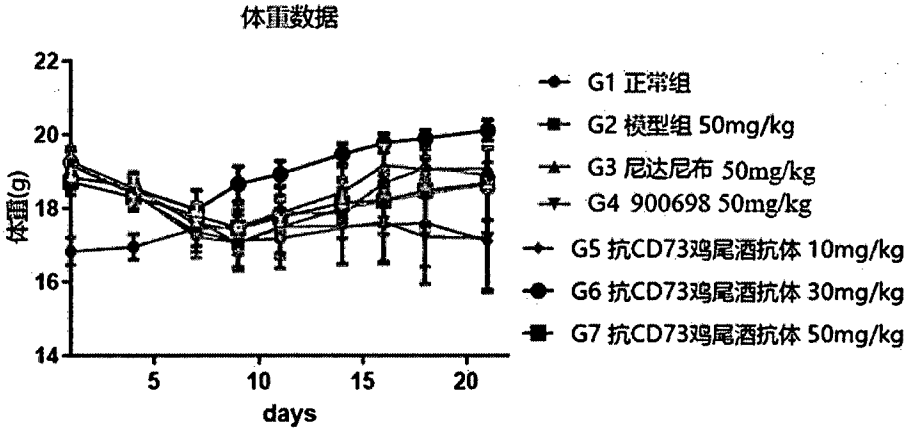

适应性喂养
2mg/kg BLM
滴注
分组
按剂量给药
终点
C57BL/6-hCD73
> 1wk
D0
D3
D7
D14
D21

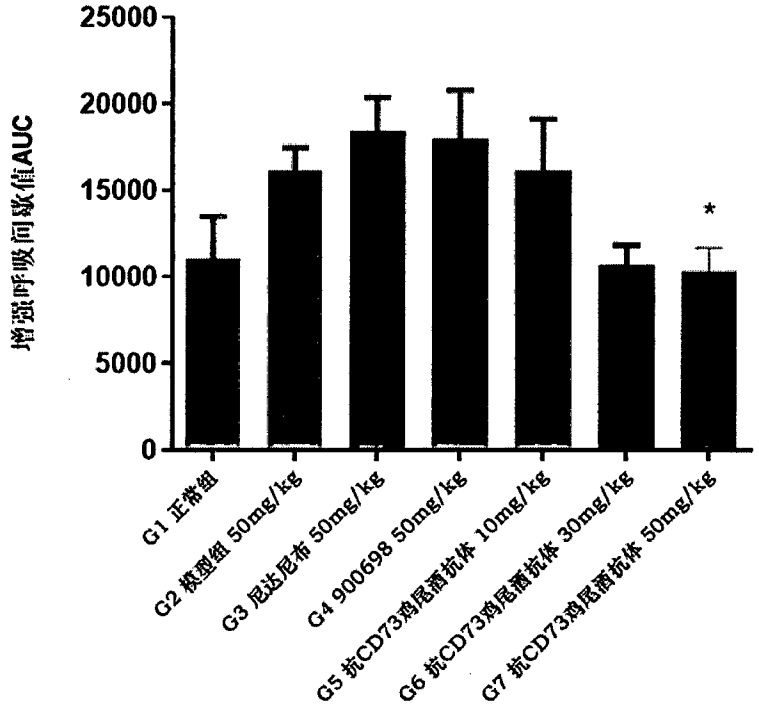
图 5



*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001: VS G2 (Repeat Measurment/Bonferroni's)

图 6

小鼠气道高反应性检测结果



*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001,vs G2(One-way ANOVA/Dunnett)

图 7

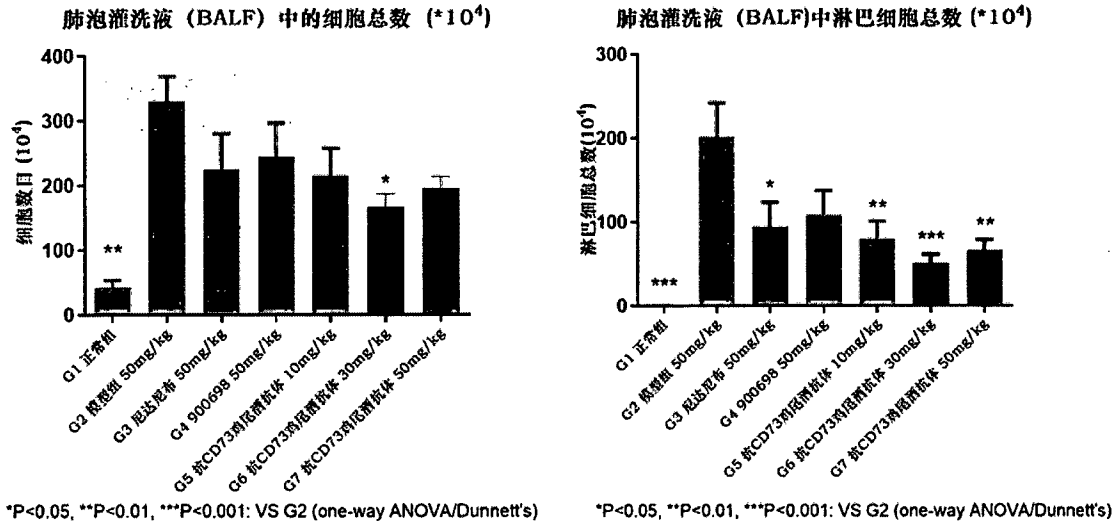

肺泡灌洗液（BALF）中的细胞总数（*10⁴）
细胞数目（10⁴）
400
300
200
100
0
**
*
G1 正常组
G2 模型组 50mg/kg
G3 厄达替布 50mg/kg
G4 900698 50mg/kg
G5 抗CD73鸡尾酒抗体 10mg/kg
G6 抗CD73鸡尾酒抗体 30mg/kg
G7 抗CD73鸡尾酒抗体 50mg/kg
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001: VS G2 (one-way ANOVA/Dunnett's)
肺泡灌洗液（BALF）中淋巴细胞总数（*10⁴）
淋巴细胞总数（10⁴）
300
200
100
0
***
*
**
***
**
G1 正常组
G2 模型组 50mg/kg
G3 厄达替布 50mg/kg
G4 900698 50mg/kg
G5 抗CD73鸡尾酒抗体 10mg/kg
G6 抗CD73鸡尾酒抗体 30mg/kg
G7 抗CD73鸡尾酒抗体 50mg/kg
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001: VS G2 (one-way ANOVA/Dunnett's)

图 8

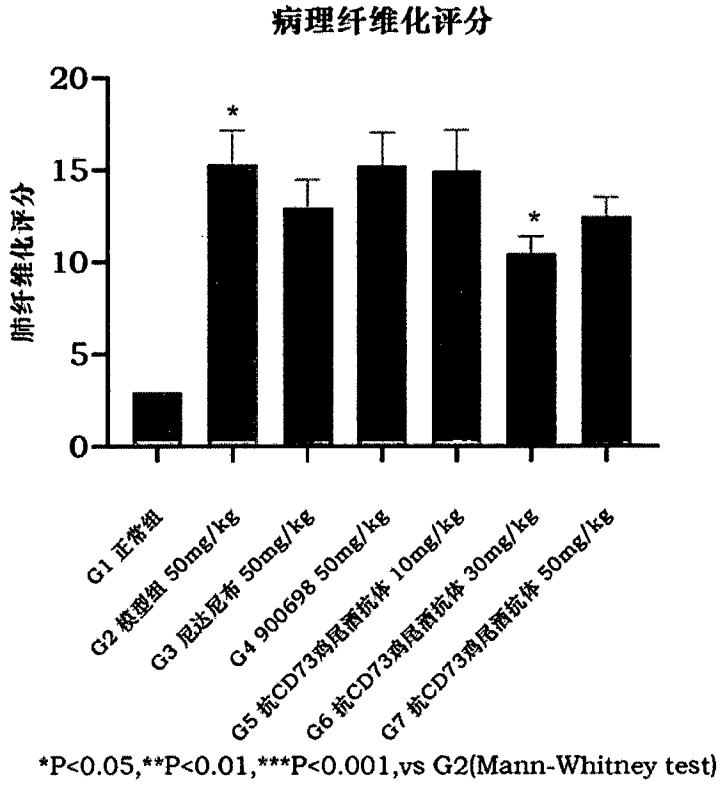

病理纤维化评分
肺纤维化评分
20
15
10
5
0
*
*
G1 正常组
G2 模型组 50mg/kg
G3 厄达替布 50mg/kg
G4 900698 50mg/kg
G5 抗CD73鸡尾酒抗体 10mg/kg
G6 抗CD73鸡尾酒抗体 30mg/kg
G7 抗CD73鸡尾酒抗体 50mg/kg
*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001,vs G2(Mann-Whitney test)

图 9

病理：Masson

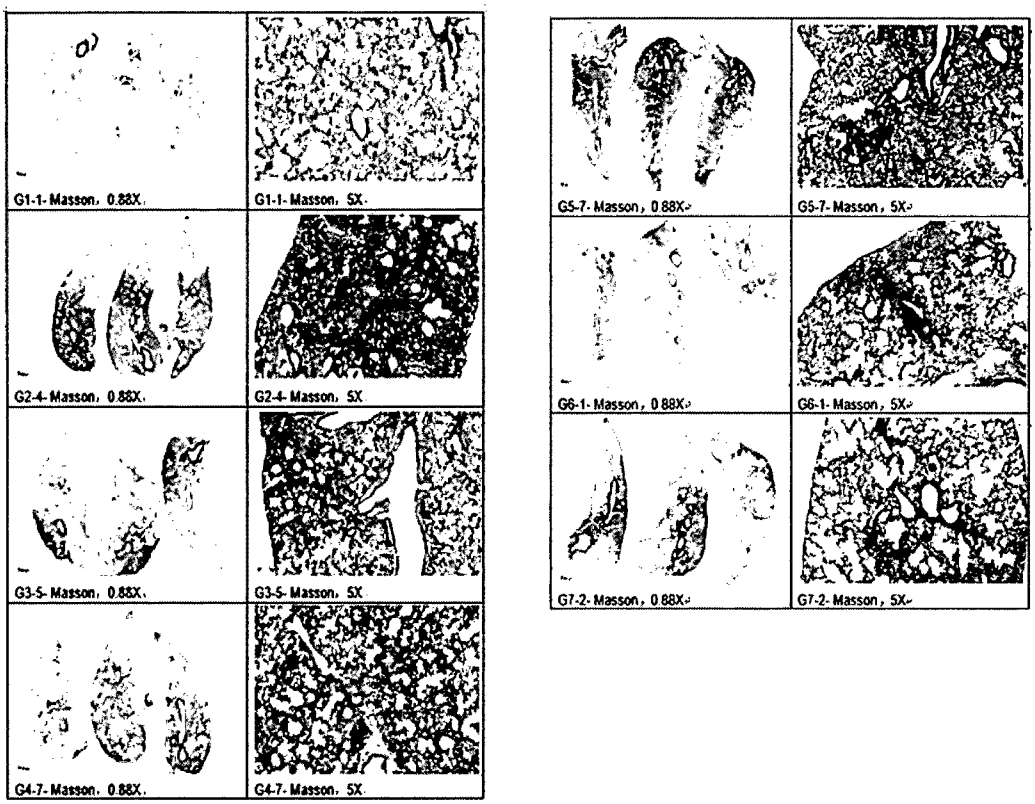


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/098753

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/28(2006.01)i; A61K39/395(2006.01)i; A61P35/00(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,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, DWPI, CNTXT, EPTXT, WOTXT, USTXT, CNKI, ISI web of science, baidu, Pubmed, STN on web, genbank, NCBI, 中文专利序列检索系统, Chinese Patent Sequence Search System: 上海华奥泰生物药业股份有限公司, 华博生物医药技术(上海)有限公司, 徐锦根, CD37, 鸡尾酒, 第一, 第二, 抗原结合蛋白, 不同表位, 双表位, dual epitope, 双互补, biparatopic, SEQ ID NOs: 1-3, 8-13, 18, 19-23, 27-31, 35 and 36

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	GAMMELGAARD, O. L. et al. "Targeting two distinct epitopes on human CD73 with a bispecific antibody improves anticancer acitity." *Journal for Immuno Therapy of Cancer,* Vol. 10, No. 9, 12 September 2022 (2022-09-12), article e004554, p. 1, abstract	1-3, 9-12, 19-21, 28-31, 38-40, 42-102
PY	GAMMELGAARD, O. L. et al. "Targeting two distinct epitopes on human CD73 with a bispecific antibody improves anticancer acitity." *Journal for Immuno Therapy of Cancer,* Vol. 10, No. 9, 12 September 2022 (2022-09-12), article e004554, p. 1, abstract	4-102
PY	WO 2022122004 A1 (SHANGHAI HUAOTA BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD. et al.) 16 June 2022 (2022-06-16) claims 1-39	4-102
PY	WO 2022152144 A1 (SHANGHAI HUAOTA BIOPHARMACEUTICAL CO., LTD. et al.) 21 July 2022 (2022-07-21) claims 1-55	23-102

☑ 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	Date of mailing of the international search report
11 September 2023	**19 September 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.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021097223 A2 (GENZYME CORPORATION) 20 May 2021 (2021-05-20) claims 25-43	1-3, 9-12, 19-21, 28-31, 38-40, 42-102
A	WO 2021097223 A2 (GENZYME CORPORATION) 20 May 2021 (2021-05-20) claims 25-43	4-102
X	WO 2017118613 A1 (SYDDANSK UNIVERSITET) 13 July 2017 (2017-07-13) abstract, and claims 1-14	1-3, 9-12, 19-21, 28-31, 38-40, 42-102
A	WO 2017118613 A1 (SYDDANSK UNIVERSITET) 13 July 2017 (2017-07-13) abstract, and claims 1-14	4-102
X	STEFANO, J. E. et al. "A highly potent CD73 biparatopic antibody blocks organization of the enzyme active site through dual mechanisms" *J. Biol. Chem.,* Vol. 295, No. 52, 26 October 2020 (2020-10-26), p. 18379, left-hand column, paragraph 1	1-3, 9-12, 19-21, 28-31, 38-40, 42-102
A	STEFANO, J. E. et al. "A highly potent CD73 biparatopic antibody blocks organization of the enzyme active site through dual mechanisms" *J. Biol. Chem.,* Vol. 295, No. 52, 26 October 2020 (2020-10-26), p. 18379, left-hand column, paragraph 1	4-102

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/098753

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 13*ter*.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/CN2023/098753

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2022122004	A1	16 June 2022	TW	202222840	A	16 June 2022
				AU	2021395129	A1	06 July 2023
WO	2022152144	A1	21 July 2022	WO	2022152144	A9	09 September 2022
				AU	2022207557	A1	06 July 2023
WO	2021097223	A2	20 May 2021	CA	3161717	A1	20 May 2021
				WO	2021097223	A3	17 June 2021
				CO	2022008204	A2	21 June 2022
				KR	20220100929	A	18 July 2022
				IL	292959	A	01 July 2022
				BR	112022009317	A2	09 August 2022
				AU	2020384305	A1	30 June 2022
				JP	2023503846	A	01 February 2023
				EP	4058150	A2	21 September 2022
				US	2022403041	A1	22 December 2022
WO	2017118613	A1	13 July 2017		None		

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/098753

A. 主题的分类

C07K16/28(2006.01)i；A61K39/395(2006.01)i；A61P35/00(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,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，DWPI，CNTXT，EPTXT，WOTXT，USTXT，CNKI，ISI web of science，baidu，Pubmed，STN on web，genbank，NCBI，中文专利序列检索系统，上海华奥泰生物药业股份有限公司，华博生物医药技术（上海）有限公司，徐锦根，CD37，鸡尾酒，第一，第二，抗原结合蛋白，不同表位，双表位，dual epitope，双互补，biparatopic，SEQ ID NOs:1-3,8-13,18,19-23,27-31,35,36

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
PX	GAMMELGAARD, O.L.等. "Targeting two distinct epitopes on human CD73 with a bispecific antibody improves anticancer acitity." Journal for Immuno Therapy of Cancer, 第10卷，第9期，2022年9月12日 (2022-09-12)， 第e004554篇第1页摘要	1-3,9-12,19-21,28-31,38-40,42-102
PY	GAMMELGAARD, O.L.等. "Targeting two distinct epitopes on human CD73 with a bispecific antibody improves anticancer acitity." Journal for Immuno Therapy of Cancer, 第10卷，第9期，2022年9月12日 (2022-09-12)， 第e004554篇第1页摘要	4-102
PY	WO 2022122004 A1 (上海华奥泰生物药业股份有限公司 等) 2022年6月16日 (2022-06-16) 权利要求1-39	4-102

☑ 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	国际检索报告邮寄日期
2023年9月11日	2023年9月19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	受权官员 陈皓 电话号码 (+86) 010-53962068

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
PY	WO 2022152144 A1 (上海华奥泰生物药业股份有限公司 等) 2022年7月21日 (2022-07-21) 权利要求1-55	23-102
X	WO 2021097223 A2 (GENZYME CORPORATION) 2021年5月20日 (2021-05-20) 权利要求25-43	1-3,9-12,19-21,28-31,38-40,42-102
A	WO 2021097223 A2 (GENZYME CORPORATION) 2021年5月20日 (2021-05-20) 权利要求25-43	4-102
X	WO 2017118613 A1 (SYDDANSK UNIVERSITET) 2017年7月13日 (2017-07-13) 说明书摘要，权利要求1-14	1-3,9-12,19-21,28-31,38-40,42-102
A	WO 2017118613 A1 (SYDDANSK UNIVERSITET) 2017年7月13日 (2017-07-13) 说明书摘要，权利要求1-14	4-102
X	STEFANO, J.E. 等. "A highly potent CD73 biparatopic antibody blocks organization of the enzyme active site through dual mechanisms" J. Biol. Chem., 第295卷，第52期，2020年10月26日 (2020-10-26)， 第18379页左栏第1段	1-3,9-12,19-21,28-31,38-40,42-102
A	STEFANO, J.E. 等. "A highly potent CD73 biparatopic antibody blocks organization of the enzyme active site through dual mechanisms" J. Biol. Chem., 第295卷，第52期，2020年10月26日 (2020-10-26)， 第18379页左栏第1段	4-102

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2023/098753

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/CN2023/098753

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)
WO	2022122004	A1	2022年6月16日	TW	202222840	A	2022年6月16日
				AU	2021395129	A1	2023年7月6日
WO	2022152144	A1	2022年7月21日	WO	2022152144	A9	2022年9月9日
				AU	2022207557	A1	2023年7月6日
WO	2021097223	A2	2021年5月20日	CA	3161717	A1	2021年5月20日
				WO	2021097223	A3	2021年6月17日
				CO	2022008204	A2	2022年6月21日
				KR	20220100929	A	2022年7月18日
				IL	292959	A	2022年7月1日
				BR	112022009317	A2	2022年8月9日
				AU	2020384305	A1	2022年6月30日
				JP	2023503846	A	2023年2月1日
				EP	4058150	A2	2022年9月21日
				US	2022403041	A1	2022年12月22日
WO	2017118613	A1	2017年7月13日		无		