

抗 CD73 的抗体及其用途

技术领域

本发明涉及免疫学领域。具体地，涉及抗 CD73 抗体及其用途。

背景技术

胞外-5'-核苷酸酶 (Ecto-5'-nucleotidase)，即 CD73 蛋白，是 NT5E 基因编码的一种蛋白分子量为 70KD 的多功能糖蛋白，其通过糖基磷脂酰肌醇 (glycosyl phosphatidy linositol, GPI) 锚定于细胞膜上(Zimmermann H. Biochem J. 1992; 285:345–365)。

CD73 广泛分布在人体组织细胞表面，目前研究已经发现 CD73 高表达于多种实体肿瘤，如肿瘤微环境的癌细胞、树突细胞、调节型 T 细胞 (Treg)、自然杀伤细胞 (NK 细胞)、髓系起源的抑制细胞 (MDSC)、肿瘤相关巨噬细胞 (TAM) 等。肿瘤微环境的一个重要特征是低氧，低氧诱导低氧诱导因子-1(HIF-1) 等分子的上调，进而导致 CD73 在肿瘤微环境广泛表达(Synnestvedt K, et al. J Clin Invest. 2002; 110:993–1002.)。对临床肿瘤样本的分析显示，CD73 高表达是一种潜在的生物标志物，与多种类型肿瘤的不良预后密切相关，包括乳腺癌、肺癌、卵巢癌、肾癌、胃癌、头颈癌等。

CD73 既有水解酶活性，又有非水解酶作用。CD73 的酶与非酶功能同时存在于肿瘤的相关过程中，并且互相促进，维持肿瘤的演进。越来越多的研究发现，CD73 是体外肿瘤细胞增殖、转移和侵袭，体内肿瘤血管生成和肿瘤免疫逃逸机制的关键调控分子，其中很重要的一个免疫抑制机制是由 CD73-腺苷 (Adenosine) 代谢信号通路介导的，CD73 上游的 CD39 可以催化 ATP 产生腺苷单磷酸 (AMP)，所产生的 AMP 被 CD73 转化为腺苷，而腺苷会结合下游的腺苷受体(A2AR)，A2AR 通过激活蛋白激酶 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，抑制 T 细胞的免疫杀伤作用，从而发挥免疫抑制作用，使肿瘤实现免疫逃逸(Antonioli L, et al. Nat Rev Cancer. 2013; 13:842–857.)。临床前动物模型研究显示，免疫细胞和非免疫细胞表达的 CD73 均可以促

进肿瘤的免疫逃逸,发展和转移,其中 Treg 细胞相关的 CD73-腺苷信号对 CTL (细胞毒性 T 细胞) 和 NK 细胞功能的抑制最为明显。

对于实体瘤治疗而言,要克服耐药提高疗效,很重要的一个方面就是解除肿瘤微环境 (Tumor micro environment, TME) 对免疫效应细胞的抑制作用。TME 是非常复杂的系统,由多种细胞、胞间质、酶、细胞因子、代谢产物等构成,有显著的低氧、低 pH 以及高压的特点,与正常组织差异巨大。放化疗杀伤肿瘤细胞所造成的低氧或 ATP 富集会促进 CD39-CD73 腺苷信号的级联反应,有利于各种促癌类细胞的增殖和功能,而不利于抑癌类细胞 (Regateiro, F. S., Cobbold, S. P. & Waldmann, H. Clin. Exp. Immunol. 2013; 171:1-7)。

在动物模型中使用靶向 CD73 的抗体或基因敲除 CD73 可以有效阻断肿瘤生长和转移。近来,利用 CD73 单克隆抗体、小干扰 RNA 技术、特异性抑制剂 APCP 等在动物实验的抗肿瘤治疗中取得了显著疗效,为抗肿瘤治疗提供了新的途径。体内试验的证据显示,对于肿瘤患者,靶向阻断 CD73 将成为有效的治疗手段。

CD73 过表达与肿瘤亚型、预后及患者的药物反应之间的联系已经表明 CD73 可作为未来个体肿瘤治疗、检测的一个重要标志物。因此,对 CD73 靶点的研究是不可或缺的。

发明内容

本发明人经过深入的研究和创造性的劳动,利用哺乳动物细胞表达系统表达出重组的人 CD73 作为抗原免疫小鼠,经小鼠脾脏细胞与骨髓瘤细胞融合获得杂交瘤细胞。发明人通过对大量样本的筛选,得到了杂交瘤细胞株 LT014 (保藏编号为 CCTCC NO: C2018137)。

本发明人惊奇地发现,杂交瘤细胞株 LT014 能够分泌产生与人 CD73 特异性结合的特异性单克隆抗体 (命名为 19F3),并且该单克隆抗体能够十分有效地以非底物竞争的方式抑制 CD73 的酶活反应,降低腺苷的产生,促进 T 细胞活性,发挥抑制肿瘤生长的效果。进一步地,本发明人创造性地制得了抗人 CD73 的人源化抗体 (命名为 19F3H1L1, 19F3H2L2, 19F3H2L3); 在前述人源化抗体的基础上,通过在重链恒定区引入氨基酸

突变，得到了消除了 ADCC 活性的新的人源化抗体（命名为 19F3H1L1(hG1DM)，19F3H2L2(hG1DM)，19F3H2L3(hG1DM)）。

本发明人还惊奇地发现，本发明的抗体例如 19F3H1L1，19F3H2L2，19F3H2L3 具有诱导细胞膜表达的 CD73 内吞的活性，可以降低 CD73 的活性，并且进一步突变的例如 19F3H2L3(hG1DM)不与引起抗体介导的细胞毒作用的 FcγRIIIa 结合，显著提升了安全性。本发明的抗体具有用于治疗肿瘤潜力。

本发明的一个方面涉及抗 CD73(例如人 CD73)抗体或其抗原结合片段，所述抗 CD73 抗体包含 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 10 所示重链可变区包含的 HCDR1，HCDR2 和 HCDR2；和 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 14 所示轻链可变区包含的 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3，

优选地，根据 IMGT 编号系统，所述抗 CD73 抗体包含：

HCDR1，其包含 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列，与所述序列具有至少 80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%、87%、88%、89%、90%，优选至少 91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或 99% 序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个（优选 1 个、2 个或 3 个）保守氨基酸突变（优选置换，插入或缺失）的氨基酸序列，或由其组成，

HCDR2，其包含 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列，与所述序列具有至少 80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%、87%、88%、89%、90%，优选至少 91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或 99% 序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个（优选 1 个、2 个或 3 个）保守氨基酸突变（优选置换，插入或缺失）的氨基酸序列，或由其组成，

HCDR3，其包含 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列，与所述序列具有至少 80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%、87%、88%、89%、90%，优选至少 91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或 99% 序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个（优选 1 个、2 个或 3 个）保守氨基酸突变（优选置换，插入或缺失）的氨基酸序列，或由

其组成，

LCDR1，其包含 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列，与所述序列具有至少 80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%、87%、88%、89%、90%，优选至少 91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或 99% 序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个（优选 1 个、2 个或 3 个）保守氨基酸突变（优选置换，插入或缺失）的氨基酸序列，或由其组成，

LCDR2，其包含 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列，与所述序列具有至少 80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%、87%、88%、89%、90%，优选至少 91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或 99% 序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个（优选 1 个、2 个或 3 个）保守氨基酸突变（优选置换，插入或缺失）的氨基酸序列，或由其组成，和

LCDR3，其包含 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列，与所述序列具有至少 80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%、87%、88%、89%、90%，优选至少 91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或 99% 序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个（优选 1 个、2 个或 3 个）保守氨基酸突变（优选置换，插入或缺失）的氨基酸序列，或由其组成。

在本发明的一些实施方案中，所述抗体的重链可变区包含下述序列，或由下述序列组成：

SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 10 所示的序列，与 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 10 所示的序列具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%序列同一性的序列，或与 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 10 所示的序列相比具有一个或多个（优选 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个）保守氨基酸突变（优选置换，插入或缺失）的氨基酸序列；并且

所述抗体的轻链可变区包含下述序列，或由下述序列组成：

SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 14

所示的序列，与 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 14 所示序列具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 序列同一性的序列，或与 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 14 所示序列所示的氨基酸序列相比具有一个或多个（优选 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个）保守氨基酸突变（优选置换，插入或缺失）的氨基酸序列。

在本发明的一些实施方案中，所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示，并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示；

所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示，并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示；

所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示，并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示；或

所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示，并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示。

在本发明的一些实施方案中，所述抗体的重链恒定区序列如 SEQ ID NO: 21 所示，即在 Ig gamma-1 链 C 区，ACCESSION: P01857 的基础上，在第 234 号位点引进了亮氨酸到丙氨酸的点突变（L234A），第 235 号位点引进了亮氨酸到丙氨酸的点突变（L235A）；轻链恒定区序列如 SEQ ID NO: 22 所示，即为 Ig kappa 链 C 区，ACCESSION: P01834；或重链恒定区采用 Ig gamma-1 chain C region，ACCESSION: P01857，轻链恒定区为 Ig kappa chain C region，ACCESSION: P01834）。

轻链和重链的可变区决定抗原的结合；每条链的可变区均含有三个高变区，称互补决定区（CDR）（重链（H）的 CDR 包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3，轻链（L）的 CDR 包含 LCDR1、LCDR2、LCDR3；其由 Kabat 等人命名，见 Bethesda M.d., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 1991; 1-3:91-3242。

优选地，CDR 也可以由 IMGT 编号系统定义，请参见 Ehrenmann, Francois, Quentin Kaas, and Marie-Paule Lefranc. IMGT/3Dstructure-DB

and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF. Nucleic acids research 2009; 38(suppl_1): D301-D307。

通过本领域技术人员所熟知的技术手段，例如通过 VBASE2 数据库根据 IMGT 定义分析单克隆抗体序列的 CDR 区的氨基酸序列。

本发明涉及的抗体 19F3、19F3H1L1、19F3H2L2、19F3H2L3 具有相同的 CDR：

其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

HCDR1: GYSFTGYT (SEQ ID NO: 15) ,

HCDR2: INPYNAGT (SEQ ID NO: 16) ,

HCDR3: ARSEYRYGGDYFDY (SEQ ID NO: 17) ;

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

LCDR1: QSLNSSNQKNY (SEQ ID NO: 18) ,

LCDR2: FAS (SEQ ID NO: 19) ,

LCDR3: QQHYDTPYT (SEQ ID NO: 20) 。

在本发明的一些实施方案中，所述抗体为单克隆抗体。

在本发明的一些实施方案中，所述抗体为人源化抗体、嵌合抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体）。

在本发明的一些实施方式中，所述抗原结合片段选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、Fab/c、互补决定区片段、单链抗体（例如，scFv）、人源化抗体、嵌合抗体或双特异性抗体。

本发明的另一个方面涉及分离的多肽，其选自以下各项组成的组：

(1) 分离的多肽，其包含 SEQ ID NO:15, SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO:17 所示的序列，其中所述多肽作为抗 CD73 抗体的一部分，特异性结合 CD73，所述抗体还包含 SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO:19; SEQ ID NO: 20 所示的序列；

(2) 分离的多肽，其包含 SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 和 SEQ ID NO:20 所示的序列，其中所述多肽作为抗 CD73 抗体的一部分，特异性结合 CD73，所述抗体还包含 SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO:16, 和 SEQ ID NO: 17 所示的序列；

(3) 分离的多肽，其包含 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 10 所示的序列或与所述序列具有至少 80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%、87%、88%、89%、90%，优选至少 91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或 99%序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个（优选 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个）保守氨基酸突变（优选置换，插入或缺失）的氨基酸序列，其中所述多肽作为抗 CD73 抗体的一部分，特异性结合 CD73，所述抗体还分别对应包含 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 12 所示的序列或与所述序列具有至少 80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%、87%、88%、89%、90%，优选至少 91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或 99%序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个（优选 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个）保守氨基酸突变（优选置换，插入或缺失）的氨基酸序列；

(4) 分离的多肽，其包含 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8 或 SEQ ID NO: 12 所示的序列或与所述序列具有至少 80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%、87%、88%、89%、90%，优选至少 91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或 99%序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个（优选 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个）保守氨基酸突变（优选置换，插入或缺失）的氨基酸序列，其中所述多肽作为抗 CD73 抗体的一部分，特异性结合 CD73，所述抗体还分别对应包含 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 10 所示的序列或与所述序列具有至少 80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%、87%、88%、89%、90%，优选至少 91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或 99%序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个（优选 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个）保守氨基酸突变（优选置换，插入或缺失）的氨基酸序列；

(5) 分离的多肽，其包含 SEQ ID NO:10 所示的序列或与所述序列具有至少 80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%、87%、88%、89%、90%，优选至少 91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或 99%序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个（优选 1、2、3、4、

5、6、7、8、9 或 10 个) 保守氨基酸突变(优选置换, 插入或缺失) 的氨基酸序列, 其中所述多肽作为抗 CD73 抗体的一部分, 特异性结合 CD73, 所述抗体还分别对应包含 SEQ ID NO:14 所示的序列或与所述序列具有至少 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%、87%、88%、89%、90%, 优选至少 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%或 99%序列同一性的序列, 或与所述序列相比具有一个或多个(优选 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个) 保守氨基酸突变(优选置换, 插入或缺失) 的氨基酸序列;

(6) 分离的多肽, 其包含 SEQ ID NO:14 所示的序列或与所述序列具有至少 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%、87%、88%、89%、90%, 优选至少 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%或 99%序列同一性的序列, 或与所述序列相比具有一个或多个(优选 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个) 保守氨基酸突变(优选置换, 插入或缺失) 的氨基酸序列, 其中所述多肽作为抗 CD73 抗体的一部分, 特异性结合 CD73, 所述抗体还分别对应包含 SEQ ID NO: 10 所示的序列或与所述序列具有至少 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%、87%、88%、89%、90%, 优选至少 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%或 99%序列同一性的序列, 或与所述序列相比具有一个或多个(优选 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个) 保守氨基酸突变(优选置换, 插入或缺失) 的氨基酸序列。

本发明的另一方面涉及一种分离的核酸分子, 其编码本发明任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 或所述分离的多肽。

本发明的再一方面涉及一种载体, 其包含本发明的分离的核酸分子。

本发明的再一方面涉及一种宿主细胞, 其包含本发明的分离的核酸分子, 或者本发明的载体。

本发明的再一方面涉及一种偶联物, 其包括抗体以及偶联部分, 其中, 所述抗体为本发明任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 所述偶联部分为纯化标签(如 His 标签), 可检测的标记; 优选地, 所述偶联部分为放射性同位素、荧光物质、化学发光物质、有色物质、聚乙二醇或酶。

本发明的再一个方面，涉及融合蛋白或多特异性抗体（优选双特异性抗体），其包含本发明任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

本发明的再一方面涉及一种试剂盒，其包括本发明任一项所述的抗体或其抗原结合片段、本发明的偶联物、融合蛋白或多特异性抗体；优选地，所述试剂盒还包括第二抗体，其特异性识别所述抗体；任选地，所述第二抗体还包括可检测的标记，例如放射性同位素、荧光物质、化学发光物质、有色物质或酶。

本发明的再一方面涉及本发明任一项所述的抗体或其抗原结合片段、本发明的偶联物、融合蛋白或多特异性抗体在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测 CD73 在样品中的存在或其水平。

本发明的再一方面涉及一种药物组合物，其包含本发明任一项所述的抗体或其抗原结合片段、本发明的偶联物、融合蛋白或多特异性抗体；可选地，所述药物组合物还包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。优选地，所述药物组合物为适于通过皮下注射、皮内注射、静脉内注射、肌肉注射或病灶内注射施用的形式。

本发明的再一方面涉及本发明任一项所述的抗体或其抗原结合片段、本发明的偶联物、融合蛋白或多特异性抗体在制备治疗和/或预防肿瘤（例如实体瘤，优选非小细胞肺癌、前列腺癌（包括转移性去势抵抗前列腺癌 (mCRPC)）、三阴性乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌（包括结直肠癌微卫星稳定 (MSS)）、胃癌、黑色素瘤、头颈癌、肾细胞癌或胰管腺癌）的药物中的用途，或者在制备用于诊断肿瘤的药物中的用途。

本发明的再一方面涉及杂交瘤细胞株 LT014，其保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC)，保藏编号为 CCTCC NO:C2018137。

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

如本文中所使用的，术语 EC₅₀ 是指半最大效应浓度（concentration

for 50% of maximal effect)，是指能引起 50%最大效应的浓度。

如本文中所使用的，术语“抗体”是指通常由两对多肽链（每对具有一条“轻”（L）链和一条“重”（H）链）组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ 和 λ 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ε ，并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(V_H)和重链恒定区(C_H)组成。重链恒定区由 3 个结构域(C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3})组成。各轻链由轻链可变区(V_L)和轻链恒定区(C_L)组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和经典补体系统的第一组分($C1q$)的结合。 V_H 和 V_L 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR))，其间散布有较保守的称为构架区 (FR) 的区域。各 V_H 和 V_L 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(V_H 和 V_L)分别形成抗原结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda M.d.(1987 and 1991))，或 Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 1987; 196:901-917; Chothia 等人 Nature 1989; 342:878-883 或者 IMGT 编号系统定义，见 Ehrenmann, Francois, Quentin Kaas, and Marie-Paule Lefranc. "IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF." Nucleic acids research 2009; 38(suppl_1): D301-D307.的定义。术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如，其包括，特别地，重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体，例如，IgG (例如，IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 亚型)，IgA1, IgA2, IgD, IgE 或 IgM 抗体。

如本文中所使用的，术语“单抗”和“单克隆抗体”是指，来自一群高度同源的抗体分子中的一个抗体或抗体的一个片段，也即除可能自发出现的自然突变外，一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位

具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的，其通常包含至少 2 种或更多种的不同抗体，这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。单克隆抗体通常可采用 Kohler 等首次报道的杂交瘤技术获得（Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. nature, 1975; 256(5517): 495），但也可采用重组 DNA 技术获得(如参见 U.S.Patent 4,816,567)。

如本文中所使用的，术语“人源化抗体”是指，人源免疫球蛋白（受体抗体）的全部或部分 CDR 区被一非人源抗体（供体抗体）的 CDR 区替换后得到的抗体或抗体片段，其中的供体抗体可以是具有预期特异性、亲和性或反应性的非人源（例如，小鼠、大鼠或兔）抗体。此外，受体抗体的构架区（FR）的一些氨基酸残基也可被相应的非人源抗体的氨基酸残基替换，或被其他抗体的氨基酸残基替换，以进一步完善或优化抗体的性能。关于人源化抗体的更多详细内容，可参见例如，Jones et al., Nature 1986; 321:522-525; Reichmann et al., Nature 1988; 332:323-329; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 1992; 2:593-596; 和 Clark M. Antibody humanization: a case of the ‘Emperor’s new clothes’?[J]. Immunol. Today, 2000; 21(8): 397-402。

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

如本文中所使用的，术语“载体（vector）”是指，可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时，载体称为表达载体。载体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人

工染色体，例如酵母人工染色体（YAC）、细菌人工染色体（BAC）或 P1 来源的人工染色体（PAC）；噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于，逆转录酶病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（如 SV40）。一种载体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于，启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。

如本文中所使用的，术语“宿主细胞”是指，可用于导入载体的细胞，其包括但不限于，如大肠杆菌或枯草杆菌等的原核细胞，如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞，如 S2 果蝇细胞或 Sf9 等的昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO 细胞，COS 细胞，NSO 细胞，HeLa 细胞，GS 细胞，BHK 细胞，HEK 293 细胞或人细胞等的动物细胞。

如本文中使用的，术语“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。在某些实施方式中，特异性结合某抗原的抗体（或对某抗原具有特异性的抗体）是指，抗体以小于大约 10^{-5} M，例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的亲和力（ K_D ）结合该抗原。

如本文中所使用的，术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数，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。通常，抗体以小于大约 10^{-5} M，例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的解离平衡常数（ K_D ）结合抗原（例如，PD-1 蛋白）。可以使用本领域技术人员知悉的方法测定 K_D ，例如使用 ForteBio 分子相互作用仪测定。

如本文中所使用的，术语“单克隆抗体”和“单抗”具有相同的含义且可互换使用；术语“多克隆抗体”和“多抗”具有相同的含义且可互换使用；术语“多肽”和“蛋白质”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中，氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如，丙氨酸可用 A 或 Ala 表示。

如本文中所使用的，术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂，其是本领域公知的（参见例如 Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995），并且包括但不限于：pH 调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂。例如，pH 调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液；表面活性剂包括但不限于阳离子，阴离子或者非离子型表面活性剂，例如 Tween-80；离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。

如本文中所使用的，术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如，预防疾病（例如肿瘤）有效量是指，足以预防，阻止，或延迟疾病（例如肿瘤）的发生的量；治疗疾病有效量是指，足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。

发明的有益效果：

本发明的单克隆抗体能够很好地特异性与 CD73 结合，并且能够十分有效地、以非底物竞争的方式抑制 CD73 的酶活反应，降低腺苷的产生，促进 T 细胞活性及肿瘤抑制效果。

生物材料保藏说明：

杂交瘤细胞株 LT014（又称 CD73-19F3），其于 2018 年 6 月 21 日保藏于中国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号为 CCTCC NO: C2018137，保藏地址为中国.武汉.武汉大学，邮编：430072。

附图说明

图 1. 19F3H2L3 与 HNT5E(1-552)-his 亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM、100 nM、50 nM、25 nM、12.5 nM、6.25 nM、3.125 nM。

图 2. 19F3H2L2 与 HNT5E(1-552)-his 亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM、100 nM、50 nM、25 nM、12.5 nM、6.25 nM、3.125 nM。

图 3. MEDI9447 与 HNT5E(1-552)-his 亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM、100 nM、50 nM、25 nM、12.5 nM、6.25 nM、3.125 nM。

图 4. FACS 检测 19F3H2L3 与 MDA-MB-231 细胞表面 CD73 的结合活性。

图 5. MDA-MB-231 细胞中加入抗 CD73 抗体的酶活性的检测结果。

图 6. U87-MG 细胞中加入抗 CD73 抗体的酶活性的检测结果。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者，按照本领域内的文献所描述的技术或条件（例如参考 J.萨姆布鲁克等著，黄培堂等译的《分子克隆实验指南》，第三版，科学出版社）或按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，为可以通过市场购买获得的常规产品。例如 MDA-MB-231 细胞和 U87-MG 细胞可以购自 ATCC。

在本发明的下述实施例中，使用的 BALB/c 小鼠购自广东省医学实验动物中心。

在本发明的下述实施例中，所用的阳性对照抗体 MEDI9447 (Oleclumab)，生产自中山康方生物医药有限公司，其序列与 MedImmune Limited 公开专利，公开号：US 20160129108A1 中所述的抗体 SEQ ID NOs:21-24 相同。

在本发明的下述实施例中，所用的 AD2 购自 Biolegend（货号：Cat.344002）。

实施例 1：抗 CD73 抗体 19F3 的制备

1、杂交瘤细胞株 LT014 的制备

制备抗 CD73 抗体所用的抗原为人 NT5E-His（NT5E 为 GenbankID:NP_002517.1，位置：1-552）。取免疫后的小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合，制成杂交瘤细胞。以人 NT5E（NT5E 为

GenbankID:NP_002517.1, 位置: 1-552)-Biotin 作为抗原, 对杂交瘤细胞进行间接 ELISA 法筛选, 获得能够分泌与 CD73 特异性结合的抗体的杂交瘤细胞。对筛选得到的杂交瘤细胞, 经过有限稀释法得到稳定的杂交瘤细胞株。将以上杂交瘤细胞株命名为杂交瘤细胞株 LT014, 其分泌的单克隆抗体命名为 19F3。

杂交瘤细胞株 LT014 (又称 CD73-19F3), 其于 2018 年 6 月 21 日保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 保藏编号为 CCTCC NO: C2018137, 保藏地址为中国.武汉.武汉大学, 邮编: 430072。

2、抗 CD73 抗体 19F3 的制备

用 CD 培养基 (Chemical Defined Medium) 对上面制得的 LT014 细胞株分别进行培养 (CD 培养基, 内含 1%青链霉素, 于 5% CO₂, 37°C 细胞培养箱中进行培养)。7 天后收集细胞培养上清, 通过高速离心、微孔滤膜抽真空过滤, 并使用 HiTrap protein A HP 柱进行纯化, 制得抗体 19F3。

实施例 2: 抗 CD73 的抗体 19F3 的序列分析

按照培养细胞细菌总 RNA 提取试剂盒 (Tiangen, 货号 DP430) 的方法, 从实施例 1 中培养的 LT014 细胞株中提取 mRNA。

按照 Invitrogen SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒说明书合成 cDNA, 并进行 PCR 扩增。

PCR 扩增产物直接进行 TA 克隆, 具体操作参考 pEASY-T1 Cloning Kit (Transgen CT101) 试剂盒说明书进行。

将 LT014 细胞株进行抗 CD73 的抗体 19F3 的 TA 克隆的产物直接进行测序, 测序结果如下:

重链可变区的核酸序列如 SEQ ID NO:1 所示, 长度为 363bp。

其编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示, 长度为 121aa;

其中重链 CDR1 的序列如 SEQ ID NO:15 所示, 重链 CDR2 的序列如 SEQ ID NO:16 所示, 重链 CDR3 的序列如 SEQ ID NO:17 所示。

轻链可变区的核酸序列如 SEQ ID NO:3 所示, 长度为 339 bp。

其编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示, 长度为 113aa;

其中轻链 CDR1 的序列如 SEQ ID NO:18 所示, 轻链 CDR2 的序列如 SEQ ID NO:19 所示, 轻链 CDR3 的序列如 SEQ ID NO:20 所示。

实施例 3: 抗人 CD73 的人源化抗体的轻链和重链设计和制备

1. 抗人 CD73 的人源化抗体 19F3H1L1、19F3H2L2 和 19F3H2L3 的轻链和重链设计

根据人 CD73 蛋白的三维晶体结构 (Hage T, Reinemer P, Sebald W. Crystals of a 1:1 complex between human interleukin-4 and the extracellular domain of its receptor alpha chain. Eur J Biochem. 1998; 258(2):831-6.) 以及实施例 2 获得的抗体 19F3 的序列, 通过计算机模拟抗体模型, 根据模型设计突变, 得到抗体 19F3H1L1、19F3H2L2、19F3H2L3 的可变区序列 (抗体恒定区序列, 来自 NCBI 的数据库, 重链恒定区均采用 Ig gamma-1 chain C region, ACCESSION: P01857; 轻链恒定区为 Ig kappa chain C region, ACCESSION: P01834)。

设计的可变区序列如下:

(1) 人源化单克隆抗体 19F3H1L1 的重链可变区和轻链可变区序列
重链可变区的核酸序列如 SEQ ID NO:5 所示, 长度为 363 bp。

其编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示, 长度为 121aa, 其中重链 CDR1 的序列如 SEQ ID NO:15 所示, 重链 CDR2 的序列如 SEQ ID NO:16 所示, 重链 CDR3 的序列如 SEQ ID NO:17 所示。

轻链可变区的核酸序列如 SEQ ID NO:7 所示, 长度为 339 bp。

其编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示, 长度为 113aa, 其中轻链 CDR1 的序列如 SEQ ID NO:18 所示, 轻链 CDR2 的序列如 SEQ ID NO:19 所示, 轻链 CDR3 的序列如 SEQ ID NO:20 所示。

(2) 人源化单克隆抗体 19F3H2L2 的重链可变区和轻链可变区序列
重链可变区的核酸序列如 SEQ ID NO:9 所示, 长度为 363 bp。

其编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示, 长度为 121aa, 其中重链 CDR1 的序列如 SEQ ID NO:15 所示, 重链 CDR2 的序列如 SEQ ID NO:16 所示, 重链 CDR3 的序列如 SEQ ID NO:17 所示。

轻链可变区的核酸序列如 SEQ ID NO:11 所示，长度为 339 bp。

其编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO:12 所示，长度为 113aa，其中轻链 CDR1 的序列如 SEQ ID NO:18 所示，轻链 CDR2 的序列如 SEQ ID NO:19 所示，轻链 CDR3 的序列如 SEQ ID NO:20 所示。

(3) 人源化单克隆抗体 19F3H2L3 的重链可变区和轻链可变区序列
重链可变区的核酸序列如 SEQ ID NO:9 所示，长度为 363 bp。

其编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO:10 所示，长度为 121aa，其中重链 CDR1 的序列如 SEQ ID NO:15 所示，重链 CDR2 的序列如 SEQ ID NO:16 所示，重链 CDR3 的序列如 SEQ ID NO:17 所示。

轻链可变区的核酸序列如 SEQ ID NO:13 所示，长度为 339 bp。

其编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO:14 所示，长度为 113aa，其中轻链 CDR1 的序列如 SEQ ID NO:18 所示，轻链 CDR2 的序列如 SEQ ID NO:19 所示，轻链 CDR3 的序列如 SEQ ID NO:20 所示。

2. 人源化抗体 19F3H1L1、19F3H2L2 和 19F3H2L3 的制备

重链恒定区均采用 Ig gamma-1 chain C region, ACCESSION: P01857;
轻链恒定区均采用 Ig kappa chain C region, ACCESSION: P01834。

将 19F3H1L1 重链 cDNA 和轻链的 cDNA、19F3H2L2 重链 cDNA 和轻链的 cDNA、以及 19F3H2L3 的重链 cDNA 和轻链的 cDNA，分别克隆到 pUC57simple（金斯瑞公司提供）载体中，分别获得 pUC57simple-19F3H1、pUC57simple-19F3L1；pUC57simple-19F3H2、pUC57simple-19F3L2 和 pUC57simple-19F3L3。参照《分子克隆实验指南（第二版）》介绍的标准技术，EcoRI&HindIII 酶切合成的重、轻链全长基因，通过限制酶(EcoRI&HindIII)的酶切亚克隆到表达载体 pcDNA3.1 中获得表达质粒 pcDNA3.1-19F3H1, pcDNA3.1-19F3L1, pcDNA3.1-19F3H2, pcDNA3.1-19F3L2, 和 pcDNA3.1-19F3L3，并进一步对重组表达质粒的重/轻链基因进行测序分析。随后将含有相应的轻、重链重组质粒设计基因组合（pcDNA3.1-19F3H1/pcDNA3.1-19F3L1，pcDNA3.1-19F3H2/pcDNA3.1-19F3L2，和 pcDNA3.1-19F3H2/pcDNA3.1-19F3L3）分别共转染 293F 细胞后收集培养液进行纯化。测序验证正确后，制备去内毒素级别的表达质粒并将质粒瞬时转染 HEK293 细胞进行抗体表达，培养 7 天后

收集细胞培养液，采用 Protein A 柱进行亲和纯化获得人源化抗体。

3. 人源化抗体 19F3H1L1(hG1DM)、19F3H2L2(hG1DM) 和 19F3H2L3(hG1DM)的制备

19F3H1L1(hG1DM)、19F3H2L2(hG1DM)和 19F3H2L3(hG1DM)的抗体的轻链恒定区为 Ig kappa 链 C 区，ACCESSION: P01834，见 SEQ ID NO:22。

重链恒定区在 Ig gamma-1 chain C region，ACCESSION: P01857 的基础上，在第 234 号位点引进了亮氨酸到丙氨酸的点突变 (L234A)，第 235 号位点引进了亮氨酸到丙氨酸的点突变 (L235A)，见 SEQ ID NO:21，获得了命名为 19F3H1L1(hG1DM)、19F3H2L2(hG1DM)和 19F3H2L3(hG1DM)的人源化抗体。

将 19F3H1L1(hG1DM) 重链 cDNA 和轻链的 cDNA、19F3H2L2(hG1DM)重链 cDNA 和轻链的 cDNA、以及 19F3H2L3(hG1DM)的重链 cDNA 和轻链的 cDNA，分别克隆到 pUC57simple (金斯瑞公司提供) 载体中，分别获得 pUC57simple-19F3H1(hG1DM)、pUC57simple-19F3L1；pUC57simple-19F3H2(hG1DM)、pUC57simple-19F3L2 和 pUC57simple-19F3L3。参照《分子克隆实验指南(第二版)》介绍的标准技术，EcoRI&HindIII 酶切合成的重、轻链全长基因，通过限制酶(EcoRI&HindIII)的酶切亚克隆到表达载体 pcDNA3.1 中获得表达质粒 pcDNA3.1-19F3H1(hG1DM)，pcDNA3.1-19F3L1，pcDNA3.1-19F3H2(hG1DM)，pcDNA3.1-19F3L2，和 pcDNA3.1-19F3L3，并进一步对重组表达质粒的重/轻链基因进行测序分析。随后将含有相应的轻、重链重组质粒设计基因组合 (pcDNA3.1-19F3H1(hG1DM)/pcDNA3.1-19F3L1，pcDNA3.1-19F3H2(hG1DM)/pcDNA3.1-19F3L2，和 pcDNA3.1-19F3H2(hG1DM)/pcDNA3.1-19F3L3) 分别共转染 293F 细胞后收集培养液进行纯化。测序验证正确后，制备去内毒素级别的表达质粒并将质粒瞬时转染 HEK293 细胞进行抗体表达，培养 7 天后收集细胞培养液，采用 Protein A 柱进行亲和纯化获得人源化抗体。

实施例 4: ELISA 方法测定抗 CD73 抗体与抗原人 NT5E-Biotin 的结合活性

实验步骤: 将链霉亲和素, 2 $\mu\text{g/ml}$ 包被酶标板后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 小时。孵育结束后使用 PBST 漂洗包被了抗原的酶标板 1 次, 后使用 1% BSA 的 PBST 溶液作为酶标板封闭液, 封闭 2 小时。酶标板结束封闭后用 PBST 洗板 3 次。再加入抗原人 NT5E-Biotin 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 分钟后用 PBST 洗板 3 次。在酶标板孔内加入 PBST 溶液梯度稀释的抗体, 抗体稀释梯度详见表 1。加入待测抗体的酶标板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 分钟, 孵育完成后用 PBST 洗板 3 次。洗板后加入 1:5000 比例稀释的 HRP 标记羊抗人 IgG(H+L)(Jackson, 货号: 109-035-088)或者 1:5000 比例稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG(H+L)(Jackson, 货号: 115-035-062)二抗工作液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 分钟。孵育完成后使用 PBST 洗板 4 次, 后加入 TMB (Neogen, 308177) 避光显色 5min, 加入终止液终止显色反应。立即把酶标板放入酶标仪中, 选择 450nm 光波长读取酶标板各孔的 OD 数值。用 SoftMax Pro 6.2.1 软件对数据进行分析处理。

检测抗 CD73 抗体与抗原人 NT5E-Biotin 结合的各剂量的 OD 值见表 1。以抗体浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标进行曲线拟合, 计算抗体的结合 EC_{50} , 结果如下表 1 所示。

实验结果显示, 抗体 19F3 H1L1、19F3 H2L2、19F3 H2L3 以及鼠源抗体 19F3 均能有效与人 NT5E-Biotin 结合, 结合效率呈剂量依赖关系。在基本相同的实验条件下, 19F3 H1L1 与人 NT5E-Biotin 结合的 EC_{50} 为 0.049nM, 19F3 H2L2 与人 NT5E-Biotin 结合的 EC_{50} 为 0.064nM, 19F3 H2L3 与人 NT5E-Biotin 结合的 EC_{50} 为 0.061nM, 同靶点阳性药 MEDI9447 与人 NT5E-Biotin 结合的 EC_{50} 为 0.048nM, 以及鼠源抗体 19F3 与人 NT5E-Biotin 结合的 EC_{50} 为 0.018nM,

以上实验结果表明, 在相同实验条件下 19F3 H1L1、19F3 H2L2、19F3 H2L3 以及鼠源抗体 19F3 分别与人 NT5E-Biotin 的结合活性与同靶点阳性药 MEDI9447 相当, 提示 19F3 H1L1、19F3 H2L2、19F3 H2L3 具有有效结合 CD73 的功能。

表1 19F3H1L1、19F3H2L2、19F3H2L3 和鼠源 19F3 与 HNT5E-Biotin 的结合活性检测结果

抗体 稀释 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	抗原包被: SA ($2\mu\text{g}/\text{ml}$)									
	人 NT5E-Biotin ($0.5\mu\text{g}/\text{ml}$)									
	19F3 H1L1		19F3 H2L2		19F3 H2L3		MEDI9447		19F3	
0.333	2.648	2.640	2.598	2.688	2.623	2.588	2.548	2.527	2.706	2.743
1:3	2.601	2.697	2.578	2.618	2.581	2.582	2.573	2.604	2.736	2.763
1:9	2.407	2.332	2.163	2.330	2.186	2.257	2.268	2.284	2.566	2.641
1:27	1.821	1.820	1.579	1.680	1.626	1.649	1.774	1.742	2.330	2.361
1:81	1.044	1.035	0.870	0.933	0.918	0.931	1.058	1.030	1.693	1.769
1:243	0.525	0.516	0.434	0.454	0.450	0.457	0.536	0.528	1.001	1.000
1:729	0.260	0.273	0.239	0.247	0.241	0.252	0.272	0.275	0.446	0.470
0	0.125	0.123	0.119	0.123	0.120	0.123	0.121	0.116	0.060	0.062
第二 抗体	HRP 标记羊抗人 IgG(H+L) (1:5000)								HRP 标记羊抗鼠 IgG(H+L) (1:5000)	
EC ₅₀ (nM)	0.049		0.064		0.061		0.048		0.018	

实施例 5: 使用 Fortebio 分子相互作用仪测定人源化抗体 19F3H2L3、19F3H2L2、MEDI9447 与抗原人 HNT5E (1-552)-his 结合的动力学参数。

样品稀释缓冲液为 PBST, pH7.4。5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗体固定于 Protein A 传感器上, 固定时间为 15 s。传感器在缓冲液中平衡 120 s。固定在传感器上的抗体与抗原人 NT5E(1-552)-his 结合, 浓度为 3.125-200 nM (两倍稀释), 时间 120 s。抗原抗体在缓冲液中解离, 时间 600 s。传感器采用 10mM 甘氨酸, pH1.5 溶液再生。检测温度为 37 度, 检测频率为 0.6 Hz, 样品板震动速率为 1000 rpm。数据以 1:1 模型拟合分析, 得到亲和力常数。

人源化抗体 19F3H2L3、19F3H2L2、MEDI9447 (作为对照抗体) 与人 CD73 的亲和力常数测定结果见表 2, 检测结果如图 1~3 所示。

实验结果如表 2 和图 1~3 所示, 人源化抗体 19F3H2L3、19F3H2L2、MEDI9447 与人 CD73 的亲和力常数依次为 1.04E-10M, 2.36E-10M, 2.59E-10M, 1.04E-10M。

以上实验结果表明: 19F3H2L3、19F3H2L2 与 HNT5E(1-552)-his 的结合能力相当, 提示人源化抗体 19F3H2L3、19F3H2L2 与人 CD73 均有

较强的结合能力。

表 2. 19F3H2L3、19F3H2L2 与 HNT5E(1-552)-his 亲和力常数测定

待测抗体	KD (M)	kon(1/Ms)	S E (kon)	kdis(1/s)	S E(kdis)	Rmax (nm)
19F3 H2L3	2.36E-10	4.82E+05	7.74E+03	1.14E-04	5.87E-06	0.34-0.41
19F3 H2L2	2.59E-10	4.80E+05	6.44E+03	1.24E-04	4.86E-06	0.35-0.39
MEDI9447	1.04E-10	2.34E+05	3.20E+03	2.44E-05	5.02E-06	0.59-0.82

K_D 为亲和力常数； $K_D=kdis/kon$

实施例 6. FACS 检测 19F3H2L3 抗体的结合能力

常规胰酶消化对数期 MDA-MB-231 细胞，离心，PBSA 重悬；将细胞分装至 1.5mL 离心管，每管 30 万细胞，5600rpm 离心 5min，去上清；加入 PBSA 稀释的 CD73 抗体 100uL，终浓度分别为 100，33.33，11.11，3.7，1.23，0.41，0.14，0.05nM，轻柔混匀后于冰上孵育 1h；加入 500uLPBSA，5600rpm 离心 5min，去上清；加入 500 倍稀释的 FITC 标记羊抗人 IgG 二抗（Jackson, Cat.109-095-098）重悬细胞沉淀，冰上避光孵育 0.5h；加入 500uLPBSA，5600rpm 离心 5min，去上清；加入 200uLPBSA 重悬细胞沉淀，并转移至流式管，流式细胞仪（BD FACSCalibur™）上机检测。

实验结果如表 3 和图 4 所示，19F3H2L3 与同靶点阳性药 MEDI9447 结合 MDA-MB-231 内源表达 CD73 的能力相当，结合呈剂量依赖关系。在相同的实验条件下，19F3H2L3 与 MDA-MB-231 内源表达 CD73 的结合 EC_{50} 为 3.423nM，MEDI9447 与 MDA-MB-231 内源表达 CD73 的结合 EC_{50} 为 1.433nM。

以上实验结果表明，在相同实验条件下 19F3H2L3 与 MDA-MB-231 内源表达 CD73 结合活性与同靶点阳性药 MEDI9447 的结合活性相当，提示 19F3H2L3 具有有效结合 CD73 的功能。

表 3. FACS 检测 19F3H2L3 与 MDA-MB-231 细胞表面 CD73 结合能力

吸光度(nM)	0.05	0.14	0.41	1.23	3.70	11.11	33.33	100.00	EC_{50}
MEDI9447	28.38	43.18	90.96	266.72	454.45	518.94	545.63	580.76	1.433
19F3H2L3	20.04	31.49	61.09	135.31	264.86	407.09	485.32	480.42	3.423

实施例 7：抗 CD73 抗体对抑制细胞内源表达 CD73 酶活性的检测

1、抗 CD73 抗体对 MDA-MB-231 细胞内源表达 CD73 酶活性的抑制活性检测

实验步骤如下：取状态良好的对数期 MDA-MB-231 细胞，用无血清的 RPMI-1640 培养液将细胞重悬、计数；将 MDA-MB-231 细胞接种至 96 孔板， 3×10^4 个细胞/100 μ l/孔；用无血清 RPMI-1640 培养液稀释抗体，起始浓度 200ug/ml，按 2.5 倍进行梯度稀释；将抗体加入 96 孔板，每孔 50ul，37℃ 孵育 1 小时。1 小时后，每孔加入 50ul RPMI-1640 稀释的 600uM AMP；3 小时后取 25ul 细胞培养液上清，转移至新 96 孔板，每孔加入 25ul 100uM 的 ATP；和 50ul CTG(CellTiter-Glo® One Solution Assay, promega, Cat: G8461) 显色液，进行显色，多标记微孔板检测仪 (PerkinElmer 2140-0020) 读取数据。

实验结果：结果如图 5 所示，19F3H2L3 和同靶点阳性对照药 MEDI9447 均可呈剂量依赖性抑制 MDA-MB-231 内源表达的 CD73 酶催化 AMP 为腺苷 A 的活性，从而剂量依赖性降低产生的平均荧光强度 RLU。

以上实验结果说明加入的 AMP 在无 CD73 抗体处理情况下，可被 MDA-MB-231 内源表达于细胞表面的 CD73 酶催化而转化为腺苷 A，从而解除对荧光素酶活性的抑制。而加入抗体后，由于 CD73 被抗体结合，而降低了其酶催化活性，使 AMP 不能转化为腺苷。提示抗 CD73 抗体以非底物竞争的方式有效抑制 CD73 的酶活反应，降低腺苷的产生。

2、在 U87-MG 细胞中加入抗 CD73 抗体的酶活性的检测

实验步骤如下：取状态良好的对数期 U87-MG 细胞，用无血清的 RPMI-1640 培养液将细胞重悬、计数；将 U87-MG 细胞接种至 96 孔板， 3×10^4 个细胞/100 μ l/孔；用无血清 RPMI-1640 培养液稀释抗体，起始浓度 200ug/ml，按 2.5 倍进行梯度稀释；将抗体加入 96 孔板，每孔 50ul，37℃ 孵育 1 小时；1 小时后，每孔加入 50ul RPMI-1640 稀释的 600uM AMP；3 小时后取 25ul 细胞培养液上清，转移至新 96 孔板，每孔加入 25ul 100uM 的 ATP 和 50ul CTG CellTiter-Glo® One Solution Assay, promega, Cat: G8461) 显色液，进行显色，于多标记微孔板检测仪 (PerkinElmer 2140-0020) 读取数据。

实验结果：结果如图 6 所示，19F3H2L3 和同靶点阳性对照药

MEDI9447 均可呈剂量依赖性抑制 MDA-MB-231 内源表达的 CD73 酶催化 AMP 为腺苷的活性，从而剂量依赖性降低产生的平均荧光强度 RLU。

以上实验结果说明加入的 AMP 在无 CD73 抗体处理情况下，可被 U87-MG 内源表达于细胞表面的 CD73 酶催化而转化为腺苷，从而解除对荧光素酶活性的抑制。而加入抗体后，由于 CD73 被抗体结合，而降低了其酶催化活性，使 AMP 不能转化为腺苷。提示抗 CD73 抗体以非底物竞争的方式有效抑制 CD73 的酶活反应，降低腺苷的产生。

实施例 8: 抗 CD73 抗体与介导抗体依赖的细胞毒效应的 FcγRIIIa 的动态亲和力测定

样品稀释缓冲液为 PBS, 0.02%Tween-20, 0.1%BSA, pH7.4。0.5 μg/mL 的 FcγRIIIa(来源于 Sino Biological, 又称为 CD16a)固定在 SA 传感器上，时间 120s，传感器在缓冲液中平衡 60s，固定在传感器上的 CD16a 与各抗体结合，抗体浓度为 31.3-500 nM（两倍梯度稀释），时间 60s，抗体抗原在缓冲液中解离，时间 60s。传感器使用 10mM NaOH 再生。检测温度为 30℃，频率为 0.6Hz。数据以 1:1 模型拟合分析，得到亲和力常数。

结果如表 4 所示，19F3H2L3(hG1DM)与 FcγRIIIa 无结合，而 MEDI9447 与 FcγRIIIa 具有结合活性，提示 19F3H2L3(hG1DM)引起表达有 CD73 的细胞的抗体依赖的细胞毒效应的风险较低，而 MEDI9447 存在引起抗体依赖的细胞毒效应的风险。

CD73 在血管内皮和正常组织有大量表达，与 FcγRIIIa 结合介导抗体依赖的细胞毒效应将会导致血管内皮细胞和正常组织的损伤，对抗体药物的安全性有显著影响。

表 4. 抗 CD73 抗体与介导抗体依赖的细胞毒效应的 FcγRIIIa 的动态亲和力测定

	KD (M)	kon (1/Ms)	标准误 (kon)	kdis(1/s)	标准误 (kdis)
19F3H2L3(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
MEDI9447	1.41E-07	2.43E+05	4.36E+04	3.42E-02	2.08E-03

野生型 IgG1 抗体	1.25E-07	1.76E+05	2.22E+04	2.20E-02	1.11E-03
-------------	----------	----------	----------	----------	----------

KD= kdis / kon

序列表

19F3 重链可变区的核酸序列，下划线表示 CDR 序列：(SEQ ID NO: 1)

GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGACCAGAGCTGGTGAAGCCTGGC
GCCTCCATGCGGATGTCTTGTAAGGCCTCTGGCTACAGCTTCACCGG
CTATAACAATGAACTGGGTGAAGCAGTCTCACGGCAAGAATCTGGAGT
GGATCGGCCTGATCAACCCTTACAATGCCGGCACCAGCTATAACCAG
AAGTTTAAGGGCAAGGCCACCCTGACAGTGGACAAGAGCTCCTCTA
CCGCTACATGGAGCTGCTGTCCCTGACATCTGAGGATAGCGCCGTG
TACTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGATATGGCGGGCGACTACTTTGAT
TATTGGGGCCAGGGCACCACTGACAGTGAGCTCC

19F3 重链可变区的氨基酸序列，下划线表示 CDR 序列：(SEQ ID NO: 2)

EVQLQQSGPELVKPGASMRMSCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLE
WIGLINPYNAGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYY
CARSEYRYGGDYFDYWGQGTTTLTVSS

19F3 轻链可变区的核酸序列，下划线表示 CDR 序列：(SEQ ID NO: 3)

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAAGCTCCCTGGCAATGAGCGTGGG
ACAGAAGGTGACAATGTCTTGTAAGTCTAGCCAGAGCCTGCTGAAC
TCCTCTAATCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCAGG
CCAGTCTCCCAAGCTGCTGGTGTACTTTGCCAGCACCAAGGGAGTCC
GGAGTGCCTGACAGATTCATCGGCTCCGGCTCTGGCACAGACTTCAC
CCTGACAATCAGCTCCGTGCAGGCAGAGGACCTGGCAGATTATTTCT
GCCAGCAGCACTACGACACCCCTTATACATTTGGCGGCGGCACCAA
GCTGGAGATCAAG

19F3 轻链可变区的氨基酸序列，下划线表示 CDR 序列：(SEQ ID NO: 4)

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPG
QSPKLLVYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFLTLSVQAEDLADYFCQQH

YDTPYTFGGGTKLEIK

19F3H1L1 重链可变区的核酸序列, 下划线表示 CDR 序列: (SEQ ID NO: 5)
CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGA
GCCTCTATGAAGATGAGCTGTAAGGCCAGCGCTACTCCTTCACCG
GCTATACAATGAACTGGGTGAAGCAGGCCACGGCCAGAATCTGGA
GTGGATCGGCCTGATCAACCCTTACAATGCCGGCACCTCTTATAACC
AGAAGTTTCAGGGCAAGGCCACCCTGACAGTGGACAAGTCCACCTC
TACAGCCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGCC
GTGTACTATTGCGCCCCGGTCCGAGTACAGATATGGCGGCGACTACT
TTGATTATTGGGGCCAGGGCACCACTGACCGTGTCTAGC

19F3H1L1 重链可变区的氨基酸序列, 下划线表示 CDR 序列: (SEQ ID NO: 6)
QVQLQQSGAEVVKPGASMKMSCKASGYSFTGYTMNWVKQAHGQNL
EWIGLINPYNAGTSYNQKFQGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAV
YYCARSEYRYGGDYFDYWGQGTTTLTVSS

19F3H1L1 轻链可变区的核酸序列, 下划线表示 CDR 序列: (SEQ ID NO: 7)
GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCAATGTCTGTGG
GAGAGAGGGTGACAATGTCCTGTAAGTCTAGCCCAGTCTCTGCTGAA
CTCCTCTAATCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCC
GGCCAGGCCCCCTAAGCTGCTGGTGTACTTTTGCCCTCTACCAGGGAGA
GCGGAGTGCCAGACAGATTCTCTGGCAGCGGCTCCGGCACAGACTT
CACCCTGACAATCAGCTCCGTGCAGGCAGAGGACCTGGCAGATTAT
TTCTGCCCAGCAGCACTACGATACCCCCTATACATTTGGCGGCGGCA
CCAAGCTGGAGATCAAG

19F3H1L1 轻链可变区的氨基酸序列, 下划线表示 CDR 序列: (SEQ ID NO: 8)

DIVMTQSPSSLAMSVGERVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLLAWYQQKPG
QAPKLLVYFASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQ
HYDTPYTFGGGTKLEIK

19F3H2L2 及 19F3H2L3 重链可变区的核酸序列，下划线表示 CDR 序列：
(SEQ ID NO: 9)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGA
GCCTCTGTGAAGGTGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCG
GCTATACAATGAACTGGGTGAGGCAGGCACCAGGACAGAATCTGGA
GTGGATCGGCCTGATCAACCCTTACAATGCCGGCACCTCTTATAACC
AGAAGTTTCAGGGCAAGGTGACCCTGACAGTGGACAAGTCCACCTC
TACAGCCTACATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGCC
GTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGATATGGCGGCGACTACTTT
GATTATTGGGGCCAGGGCACCACACTGACCGTGTCTAGC

19F3H2L2 及 19F3H2L3 重链可变区的氨基酸序列，下划线表示 CDR 序列：
(SEQ ID NO: 10)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQNLE
WIGLINPYNAGTSYNQKFQGKVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY
CARSEYRYGGDYFDYWGQTTTLTVSS

19F3H2L2 轻链可变区的核酸序列，下划线表示 CDR 序列：(SEQ ID NO:
11)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCCGTGTCTGTGG
GAGAGCGGGTGACAATCTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAA
CTCCTCTAATCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCC
GGCCAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTTCGCCTCTACCAGGGAGA
GCGGAGTGCCAGACAGATTCTCTGGCAGCGGCTCCGGCACAGACTT
CACCTGACAATCAGCTCCGTGCAGGCAGAGGACGTGGCAGATTAC

TATTGCCAGCAGCACTACGATACCCCCTATACATTTGGCGGCGGCA
CCAAGCTGGAGATCAAG

19F3H2L2 轻链可变区的氨基酸序列，下划线表示 CDR 序列：(SEQ ID NO: 12)

DIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQ
APKLLIYFASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVADYYCQQH
YDTPYTFGGGTKLEIK

19F3H2L3 轻链可变区的核酸序列：(SEQ ID NO: 13)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCCGTGTCTGTGGG
AGAGCGGGTGACAATCTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAAC
TCTCTAATCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGC
CAGGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACTTCGCCTCTACCAGGGAGAGCGG
AGTGCCAGACAGATTCTCTGGCAGCGGCTCCGGCACAGACTTCACC
CTGACAATCAGCTCCCTGCAGGCAGAGGACGTGGCCGTGTACTATTG
CCAGCAGCACTACGATACCCCCTATACATTTGGCGGCGGCACCAAGC
TGGAGATCAAG

19F3H2L3 轻链可变区的氨基酸序列，下划线表示 CDR 序列：(SEQ ID NO: 14)

DIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQA
PKLLIYFASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYD
TPYTFGGGTKLEIK

19F3 和 19F3H1L1、19F3H2L2 及 19F3H2L3 的 CDR 区

HCDR1: GYSFTGYT (SEQ ID NO: 15)

HCDR2: INPYNAGT (SEQ ID NO: 16)

HCDR3: ARSEYRYGGDYFDY (SEQ ID NO: 17)

LCDR1: QSLNSSNQKNY (SEQ ID NO: 18)

LCDR2: FAS (SEQ ID NO: 19)

LCDR3: QQHYDTPYT (SEQ ID NO: 20)

19F3H1L1(hG1DM)、19F3H2L2(hG1DM)和 19F3H2L3 (hG1DM)的重链恒定区序列 (330aa, 突变位点用下划线加粗标出):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 21)

19F3H1L1(hG1DM)、19F3H2L2(hG1DM)和 19F3H2L3 (hG1DM)的轻链恒定区序列 (107 aa):

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC (SEQ ID NO:22)