

抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体及其用途

技术领域

本发明属于肿瘤治疗和分子免疫学领域，涉及一种抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体、其药物组合物及其用途。

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. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. 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。CD73的表达受到TGF- β 、EGFR、AKT、 β -catenin等分子的调控，特别是行使转录因子功能的HIF-1最为关键。肿瘤微环境的一个重要特征是低氧，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. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. 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具有水解酶活性，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. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. 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和高压的特点,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,而不利抑制癌类细胞。(Regateiro, F. S., Cobbold, S. P. & Waldmann, H. CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. 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。

跨膜受体 PD-1(程序性细胞死亡-1)是 CD28 家族成员之一,在活化的 T 细胞, B 细胞以及骨髓系细胞都有表达。PD-1 的受体 PDL1 和 PDL2 均属于 B7 超家族,其中 PDL1 多种细胞都有表达,包括 T 细胞, B 细胞以及内皮细胞和上皮细胞, PDL2 则仅表达于抗原呈递细胞如树突状细胞

和巨噬细胞。

PD-1 在负调节 T 细胞的活化过程中起着非常重要的作用，PD-1 介导的对 T 细胞负调节作用是肿瘤免疫逃避的重要机制之一，肿瘤表面表达的 PDL-1 可与免疫细胞表面的 PD-1 结合，进而通过 PD-1/PDL-1 信号通路抑制免疫细胞对肿瘤组织的杀伤，高表达 PD-L1 的肿瘤伴随着很难被检测到的癌症(Hamanishi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2007;104:3360-5)。拮抗 PD-1，从而抑制 PD-1/PDL-1 信号通路的一种有效方法是体内注射抗 PD-1 抗体。

PD-1 抗体具有广谱抗肿瘤前景和惊人的药效，针对 PD-1 通路的抗体将带来治疗多种肿瘤治疗的突破性的进展：用于治疗非小细胞性肺癌，肾细胞癌，卵巢癌，黑色素瘤 (Homet M. B., Parisi G., et al., Anti-PD-1 Therapy in Melanoma. Semin Oncol. 2015 Jun;42(3):466-473)，血液肿瘤以及贫血 (Held SA, Heine A, et al., Advances in immunotherapy of chronic myeloid leukemia CML. Curr Cancer Drug Targets. 2013 Sep;13(7):768-74)。

双功能抗体亦称为双特异性抗体 (Bispecific Antibody)，是同时靶向结合两种不同抗原的特异性抗体药物，其可通过免疫分选纯化生产，也可通过基因工程获得。基因工程在结合位点优化，合成形式的考量以及产量等方面都具有相应的灵活性，所以具有一定的优势。目前，双特异性抗体存在形式已被证明有超过 45 种 (Müller D, Kontermann RE. Bispecific antibodies for cancer immunotherapy: Current perspectives. BioDrugs 2010; 24:89-98)。IgG-ScFv 形式即 Morrison 模式 (Coloma MJ, Morrison SL. Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies. Nat Biotechnol. Nature Biotechnology, 1997; 15:159-163) 由于类似于天然存在的 IgG 的形式，在抗体工程、表达和纯化上具有优势，已被证明是双功能抗体的一种理想存在形式 (Miller BR, Demarest SJ, et al., Stability engineering of scFvs for the development of bispecific and multivalent antibodies. Protein Eng Des Sel 2010; 23:549-57; Fitzgerald J, Lugovskoy A. Rational engineering of antibody therapeutics targeting multiple oncogene pathways. MAbs 2011; 3:299-309)。

ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) 是抗体依赖的

细胞介导的细胞毒性作用，是指抗体的 Fab 段结合病毒感染的细胞或肿瘤细胞的抗原表位，其 Fc 段与杀伤细胞（NK 细胞、巨噬细胞等）表面的 Fc 受体（Fc Receptor, FcR）结合，介导杀伤细胞直接杀伤靶细胞。

CDC（complement dependent cytotoxicity）指补体依赖的细胞毒性。CDC 作用是由抗体与细胞膜表面相应抗原结合后，进一步与补体 C1q 的首先结合引起的，接着 C2-C9 就被激活形成攻膜复合物对靶细胞发挥裂解效应。

IgG 家族包含四个成员，IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4，它们重链恒定区的可结晶片段（fragment crystallizable, Fc）区域存在氨基酸的差异，导致它们与 Fc γ Rs 的亲和力各不相同。野生型 IgG1 能够结合各种 Fc γ Rs，能够引发 ADCC 以及 CDC 效应。Zhang 等人（Zhang T 等人. *Cancer Immunol Immunother.* 2018;67(7):1079 - 1090.）及 Dahan 等人（Dahan R 等人. *Cancer Cell.* 2015; 28(3):285-95.）的研究表明，靶向 PD-1 等免疫检查点的抗体的 Fc 段与 Fc 受体结合会对抗抗体介导的抗癌活性产生负面影响，这可能是由于 Fc 依赖性效应子功能诱导的免疫细胞受损，包括抗体依赖性细胞介导的细胞毒性是导致免疫细胞损伤的重要机制。

白细胞介素 8（interleutin-8，IL-8）是一种趋化性细胞因子（Chemotactic cytokines），主要是由单核细胞等分泌。IL-8 在正常细胞和肿瘤细胞的增殖中有重要作用，尤其是对肿瘤的发生和发展具有重要的促进作用。研究表明 IL-8 可以促进肿瘤的发生；肿瘤细胞本身也可分泌 IL-8，促进肿瘤的生长和转移（Lo MC et al. *Cancer letters*, 2013, 335(1):81-92.）。因此，IL-8 已成为肿瘤微环境之中不可缺少的一种重要的炎症因子。

IL-8 作为一种促炎因子与肿瘤的发生发展密切相关。在甲基肿酸（methylarsonate）诱导非肾癌细胞的恶变过程中，IL-8 基因的表达增加，IL-8 基因沉默则可显著抑制小鼠体内移植瘤的生长，此外 IL-8 水平的降低可抑制与肿瘤的生长、转移相关的基质金属蛋白酶-9（Matrix metalloproteinase-9）、细胞周期蛋白 D1（Cyclin D1）、促凋亡蛋白 Bcl-2、血管内皮生长因子（VEGF）的表达（Escudero-Lourdes C et al. *Toxicology and applied pharmacology*, 2012, 258(1):10-18.）。Inoue 等

人的研究发现IL-8可诱导非肿瘤性膀胱细胞系(233JP)的恶变及侵袭性的增加,而在IL-8敲除鼠中233JP细胞发生恶性转化的几率明显减少(Inoue K et al. *Cancer Res*, 2000, 60(8):2290-2299.)。此外,在前列腺癌中,IL-8可以促进患者去势抵抗性前列腺癌(CRPC)的发生(Chen K et al. *Cancer research*, 2015, 75(10):1992-2004.),并且与肿瘤治疗的抗药性有关(Araki S et al. *Cancer Res*, 2007, 67(14):6854-6862.); IL-8或其受体的基因沉默可诱导肿瘤细胞细胞周期阻滞,抑制肿瘤的增殖(Singh RK, Lokeshwar BL. *Molecul Cancer*, 2009, 8:57.)。上述研究表明IL-8的水平与肿瘤的发生发展密切相关。进一步的研究(Mian BM et al. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(8):3167-3175.)表明IL-8可以作为肿瘤治疗新的靶点。在膀胱癌的肿瘤模型中,使用抗IL-8抗体可以明显的抑制抑制瘤的生长。

IL-6主要由巨噬细胞迅速产生,响应与病原体相关的分子模式(PAMP)或损伤相关分子模式(DAMP),并通过除去感染因子,诱导急性期和免疫应答来治愈受损组织,起保护作用。IL-6虽然在感染和组织损伤的抵抗和修复中发挥重要作用,但是高水平的IL-6可以激活凝血途径和血管内皮细胞,进而抑制心肌功能,甚至可以引起“细胞因子风暴”,产生严重的急性全身炎症反应。细胞因子风暴是病毒感染、肿瘤免疫疗法等中一种致死性的并发症和不良反应。

免疫相关不良反应是免疫检查点抑制剂(immune checkpoint inhibitor, ICI)抗肿瘤治疗中一种常见而又危险的不良反应(Spain L et al. *Cancer Treat Rev*. 2016;44:51-60.)。近年来,免疫检查点抑制剂在肿瘤免疫治疗方面取得了巨大成功,但也因为脱靶(off-target)效应导致了全新的毒性谱。其中尤其是主要器官(包括心脏、肺和脑)的严重免疫相关不良事件(irAE)可能危及生命(Bergqvist V, et al. *Cancer Immunol Immunother*. 2017;66(5):581-592.; Gomatou G et al. *Respiration*. 2020;1:1-11.; Joshi MN et al. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2016;85(3):331-9.; Prieux-Klotz C et al. *Target Oncol*. 2017;12(3):301-308.; Tajiri K et al. *Jpn J Clin Oncol*. 2018;48(1):7-12.)。已有数据表明ICI可能通过4种机制诱导脱靶效应,包括直接结合正

常细胞表面表达的免疫检查点分子，激活补体超敏反应；正常组织与肿瘤细胞存在同源抗原/表位；产生自身抗体；增加前炎症细胞因子的水平，如IL-6等（Martins F et al., The Lancet Oncology, 20(1), e54 - e64.）。

目前抗IL-6疗法，如托珠单抗，一种重组人源化抗IL-6R单克隆抗体，已被用于治疗急性期严重irAE、严重或难治性关节炎、大血管血管炎、葡萄膜炎、心肌炎、肺炎、重症肌无力等（Martins F et al., The Lancet Oncology, 20(1), e54 - e64.）。

巨噬细胞上的FcγRIa与野生型IgG1或者IgG4抗体的结合可由诱导其分泌IL-8和IL-6（Kinder M et al., mAbs. 2015），而进行抗体Fc段的突变，消除其与FcγRIa的结合可以有效地抑制IL-8的分泌，进而增加抗体的安全性和有效性。

发明内容

本发明人利用哺乳动物细胞表达系统分别表达出重组的 CD73 和 PD-1 分别作为抗原免疫小鼠，经小鼠脾脏细胞与骨髓瘤细胞融合获得杂交瘤细胞。发明人通过进行对大量样本的筛选，分别得到了如下的杂交瘤细胞株：

杂交瘤细胞株 LT014（又称 CD73-19F3），其于 2018 年 6 月 19 日保藏于中国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号为 CCTCC NO:C2018137；以及

杂交瘤细胞株 LT003（又称 PD-1-14C12），其于 2015 年 6 月 16 日保藏于中国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号为 CCTCC NO:C2015105。

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 细胞活性及肿瘤抑制效果。

杂交瘤细胞株 LT003 能够分泌产生与 PD-1 特异性结合的特异性单克

隆抗体（命名为 14C12），并且该单克隆抗体能够十分有效地阻断 PD-1 与 PDL1 的结合。

进一步地，本发明人创造性地制得了抗 CD73 的人源化抗体（分别命名为 19F3H2L2、19F3H2L3、19F3H2L3(hG1M)、19F3H2L3(hG1TM)）和抗 PD-1 的人源化抗体（命名为 14C12H1L1 和 14C12H1L1(hG1TM)）。

进一步地，本发明人创造性地将两类人源化抗体进行蛋白重组融合成新的抗体，获得了能够结合 CD73 和 PD-1，抑制 CD73 活性、阻断 PD-1 与 PDL1 的结合的人源化双功能抗体（分别命名为 P1D7V01、P1D7V03、NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4（在本文及在申请号为 202110270671.X 的中国发明专利中又写为 NTPDV1(hG1TM)、NTPDV2(hG1TM)、NTPDV3(hG1TM)、NTPDV4(hG1TM)），具有用于制备预防和治疗实体瘤和血液肿瘤的潜力。

由此提供了下述发明：

本发明的一个方面涉及一种抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体，其包括：
第一蛋白功能区，所述第一蛋白功能区靶向 PD-1，和
第二蛋白功能区，所述第二蛋白功能区靶向 CD73。

在本发明的一个实施方案中，所述双特异性抗体中

第一蛋白功能区包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区所包含的 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，优选 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs:45-47 所示的序列或与 SEQ ID NOs:45-47 所示的序列具有至少 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%同一性的序列，或与 SEQ ID NOs:45-47 所示的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，和包含

氨基酸序列如 SEQ ID NO:49 所示的轻链可变区所包含的 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3，优选 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs:50-52 所示的序列或与 SEQ ID NOs:50-52 所示的序列具有至少 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 SEQ ID NOs:50-52 所示的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；

第二蛋白功能区包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示的重链可变区所包含的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3, 优选 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3 的氨基酸序列如 SEQ ID NOs:3-5 所示的序列或与 SEQ ID NOs:3-5 所示的序列具有至少 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 SEQ ID NOs:3-5 所示的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，和包含

氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示的轻链可变区所包含的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3, 优选 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs:8-10 所示的序列或与 SEQ ID NOs:8-10 所示的序列具有至少 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 SEQ ID NOs:8-10 所示的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。

在本发明的一个实施方案中，在所述抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体中：

所述第一蛋白功能区包含

氨基酸序列如 SEQ ID NO: 44 或 SEQ ID NO:62 所示的序列或与 SEQ ID NOs:44 或 62 所示的序列具有至少 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 SEQ ID NOs:44 或 62 所示的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；和包含

分别对应选自氨基酸序列如 SEQ ID NO: 49 或 SEQ ID NO: 64 所示的序列或与 SEQ ID NOs:49 或 64 所示的序列具有至少 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 SEQ ID NOs:49 或 64 所示的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；

和/或，

所述第二蛋白功能区包含氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 20 所示的序列或与 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 20 所示的序列具有至少 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 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 20 所示的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；和包含

分别对应选自 SEQ ID NO: 7，或 SEQ ID NO:22 或与 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 22 所示的序列具有至少 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 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 22 所示的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

所述第二蛋白功能区包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:20 所示的序列或与 SEQ ID NO:20 所示的序列具有至少 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 SEQ ID NO: 20 所示的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，和包含

氨基酸序列如 SEQ ID NO:24 所示的序列或与 SEQ ID NO:24 示的序列具有至少 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 SEQ ID NO:24 所示的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。

本发明的一个方面涉及一种抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体,其包括:

第一蛋白功能区,所述第一蛋白功能区靶向 CD73, 和

第二蛋白功能区,所述第二蛋白功能区靶向 PD-1。

在本发明的一个实施方案中,在所述双特异性抗体中,

第一蛋白功能区包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示的重链可变区所包含的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3, 优选 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs:3-5 所示的序列或与 SEQ ID NOs:3-5 所示的序列具有至少 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%同一性的序列, 或与 SEQ ID NOs:3-5 所示的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, 和包含

氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示的轻链可变区所包含的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3, 优选 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs:8-10 所示的序列或与 SEQ ID NOs:8-10 所示的序列具有至少 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 SEQ ID NOs:8-10 所示的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;

第二蛋白功能区包含氨基酸序列如 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区所包含的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3, 优选 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs:45-47 所示的序列或与 SEQ ID NOs:45-47 所示的序列具有至少 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 SEQ ID NOs:45-47 所示的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, 和包含

氨基酸序列如 SEQ ID NO:49 所示的轻链可变区所包含的 LCDR1,

LCDR2 和 LCDR3, 优选 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs:50-52 所示的序列或与 SEQ ID NOs:50-52 所示的序列具有至少 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 SEQ ID NOs:50-52 所示的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。

在本发明的一个实施方案中, 在所述抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体中:

所述第一蛋白功能区包含

氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 20 所示的序列或与 SEQ ID NOs:2 或 20 所示的序列具有至少 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 SEQ ID NOs:2 或 20 所示的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; 和包含

分别对应选自氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO:24 所示的序列或与 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO:24 所示的序列具有至少 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 SEQ ID NOs:7, 22 或 24 所示的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;

和/或,

所述第二蛋白功能区包含氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 44 或 SEQ ID NO:62 所示的序列或与 SEQ ID NO: 44 或 SEQ ID NO:62 所示的序列具有至少 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 SEQ ID NO: 44 或 SEQ ID NO:62 所示的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;和包含

分别对应选自 SEQ ID NOs:49 或 64 或与 SEQ ID NOs:49 或 64 所示的序列具有至少 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 SEQ ID NOs:49 或 64 所示的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。

在本发明的一个实施方案中, 在所述抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体中, 所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区直接连接或者通过连接片段连接; 优选地, 所述连接片段为(GGGGS)_n, n 为正整数, 例如 1、2、3、4、5 或 6。

在本发明的一个实施方案中, 在所述抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体中的所述第一蛋白功能区和第二蛋白功能区独立地为免疫球蛋白或抗原结合片段, 例如半抗体、Fab、F(ab')₂ 或单链抗体, 优选地, 所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白, 所述第二蛋白功能区为抗原结合片段; 或者, 所述第一蛋白功能区为抗原结合片段, 所述第二蛋白功能区为免疫球蛋白。

在本发明的一个实施方案中, 所述抗原结合片段的重链可变区 N 端直接(或通过连接片段)连接于所述免疫球蛋白的 CH1 的 C 端和所述抗原结合片段的轻链可变区 N 端直接(或通过连接片段)连接于所述免疫球蛋白的轻链可变区 CL 的 C 端; 或者所述抗原结合片段的重链可变区 N 端直接(或通过连接片段)连接于所述免疫球蛋白的轻链可变区 CL 的 C 端和所述抗原结合片段的轻链可变区 N 端直接(或通过连接片段)连接于所述免疫球蛋白的重链可变区 CH1 的 C 端。

在本发明的一个实施方案中, 所述抗原结合片段的重链可变区 C 端直接(或通过连接片段)连接于所述免疫球蛋白的重链 N 端和所述抗原结合片段的轻链可变区 C 端直接(或通过连接片段)连接于所述免疫球蛋白的轻链 N 端; 或者所述抗原结合片段的重链可变区 C 端直接(或通过连接片段)连接于所述免疫球蛋白的轻链 N 端和所述抗原结合片段的轻链可变区的 C 端直接(或通过连接片段)连接于所述免疫球蛋白的重链 N 端。

在本发明的一个实施方案中, 所述抗原结合片段是单链抗体, 优选地,

所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白，所述第二蛋白功能区为单链抗体；或者，所述第一蛋白功能区为单链抗体，所述第二蛋白功能区为免疫球蛋白。

在本发明的一个实施方案中，所述的双特异性抗体，其中，所述第一蛋白功能区 and 第二蛋白功能区独立地为 1 个、2 个或者 2 个以上。

在本发明的一个实施方案中，在所述抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体中，所述单链抗体为通过连接片段（Linker）连接抗体重链可变区（V_H）和抗体轻链可变区（V_L）的分子；优选地，可具有一般结构：NH₂-V_L-连接片段-V_H-COOH 或 NH₂-V_H-连接片段-V_L-COOH。

在本发明的一个实施方案中，在所述抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体中，所述单链抗体通过连接片段连接在免疫球蛋白的重链的 C 末端（C_H）（或者重链的 N 端、重链可变区的 CH1 的 C 端）时，可以首先连接所述单链抗体的抗体重链可变区（V_H），或者，首先连接所述单链抗体的抗体轻链可变区（V_L）；优选地，单链抗体可具有一般结构：C_H-连接片段-V_H-连接片段-V_L-COOH，或者，C_H-连接片段-V_L-连接片段-V_H-COOH，

优选地，

所述的免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 3—5 的 CDR，其轻链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 8—10 的 CDR；

所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 45—47 的 CDR，其轻链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 50—52 的 CDR，

优选地，所述单链抗体（例如 NH₂-V_L-连接片段-V_H-COOH 或 NH₂-V_H-连接片段-V_L-COOH）通过连接片段连接在免疫球蛋白的重链的 C 末端时，可以首先连接所述单链抗体的包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 45—47 的 CDR 的抗体重链可变区（V_H），或者，首先连接所述单链抗体的包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 50—52 的 CDR 的抗体轻链可变区（V_L），或者优选地，

所述的免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 45—47 的 CDR，其轻链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 50—52 的 CDR；和/或，

所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 3—5 的 CDR，其轻链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 8—10 的 CDR，

其中,所述单链抗体(例如 NH₂-V_L-连接片段-V_H-COOH 或 NH₂-V_H-连接片段-V_L-COOH)通过连接片段连接在免疫球蛋白的重链的 C 末端时,可以首先连接所述单链抗体的包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 3—5 的 CDR 的抗体重链可变区(V_H),或者,首先连接所述单链抗体的包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 8—10 的 CDR 的抗体轻链可变区(V_L),

优选地,

一个免疫球蛋白分子连接有两个单链抗体分子,更优选地,两个单链抗体分子相同。

在本发明的一个实施方案中,在所述抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体中,所述免疫球蛋白为 IgG、IgA、IgD、IgE 或 IgM;优选为 IgG,例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。

在本发明的一个实施方案中,在所述抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体中,所述单链抗体连接在免疫球蛋白的重链的 C 末端。由于免疫球蛋白由两条重链组成,因此,一个免疫球蛋白分子连接有两个单链抗体分子。优选地,两个单链抗体分子相同。

在本发明的一个实施方案中,在所述抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体中:

所述的免疫球蛋白,其重链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 3—5 的 CDR,其轻链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 8—10 的 CDR;和/或,

所述的单链抗体,其重链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 45—47 的 CDR,其轻链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 50—52 的 CDR,

优选地,所述单链抗体(例如 NH₂-V_L-连接片段-V_H-COOH 或 NH₂-V_H-连接片段-V_L-COOH)通过连接片段连接在免疫球蛋白的重链的 C 末端时,可以首先连接所述单链抗体的包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 45—47 的 CDR 的抗体重链可变区(V_H),或者,首先连接所述单链抗体的包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 50—52 的 CDR 的抗体轻链可变区(V_L)。

在本发明的另一个实施方案中,在所述抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体中:

所述的免疫球蛋白,其重链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 45

—47 的 CDR，其轻链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO:50—52 的 CDR；和/或，

所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 3—5 的 CDR，其轻链可变区包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 8—10 的 CDR，

其中，所述单链抗体（例如 NH₂-V_L-连接片段-V_H-COOH 或 NH₂-V_H-连接片段-V_L-COOH）通过连接片段连接在免疫球蛋白的重链的 C 末端时，可以首先连接所述单链抗体的包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 3—5 的 CDR 的抗体重链可变区（V_H），或者，首先连接所述单链抗体的包含氨基酸序列为 SEQ ID NO: 8—10 的 CDR 的抗体轻链可变区（V_L）。

在本发明的一个实施方案中，在所述抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体中：

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 20；所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列分别对应选自 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 22，或者所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20 所示的序列；所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:24 所示的序列；

和/或，

所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO:44 或 SEQ ID NO:62；所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列分别对应选自 SEQ ID NO: 49 或 SEQ ID NO: 64；

其中，所述单链抗体通过连接片段（Linker）连接在免疫球蛋白的重链的 C 末端时，可以首先连接所述单链抗体的抗体重链可变区（V_H），或者，首先连接所述单链抗体的抗体轻链可变区（V_L）。

在本发明的另一个实施方案中，在所述抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体中：

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO:44 或 SEQ ID NO:62；所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列对应选自 SEQ ID NO: 49 或 SEQ ID NO: 64，或所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 20，所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列对应选自 SEQ ID NO: 7 或 SEQ ID NO: 22，或所述单链抗体的

重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 20 所示的序列, 所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:24 所示的序列。

本发明的另一方面涉及分离的核酸分子, 其包含能够编码双特异性抗体重链可变区的核酸序列, 其中,

所述抗体的重链可变区包含:

氨基酸序列为 SEQ ID NO: 3—5 的 CDR、氨基酸序列为 SEQ ID NO:45—47 的 CDR 和氨基酸序列为 SEQ ID NO:50—52 的 CDR;

并且所述双特异性抗体重链可变区作为所述双特异性抗体的一部分, 特异性结合 CD73 和 PD-1 抗原, 所述双特异性抗体还包含轻链可变区, 所述轻链可变区包含:

氨基酸序列为 SEQ ID NO: 8—10 的 CDR;

优选地, 轻链可变区的 CDR 与重链可变区包含的 CDR 不相同。

在本发明的一个实施方案中, 在所述的双特异性抗体中,

所述的免疫球蛋白包括非-CDR 区, 且所述非-CDR 区来自不是鼠类的物种, 例如来自人抗体。

在本发明的一个实施方案中, 所述免疫球蛋白的恒定区是人源化的, 例如, 重链恒定区采用 Ig gamma-1 chain C region, ACCESSION: P01857; 轻链恒定区采用 Ig kappa chain C region, ACCESSION: P01834。

在本发明的一个实施方案中, 所述免疫球蛋白的恒定区是人源化的, 例如, 重链恒定区采用 Ig gamma-1 chain C region, ACCESSION: P01857; 轻链恒定区采用 Ig kappa chain C region, ACCESSION: P01834; 其中, 按照 EU 编号系统 (EU numbering system), 所述免疫球蛋白的重链恒定区在 234 位点、235 位点和 237 位点中的任意 2 个位点或 3 个位点发生突变, 并且突变后, 双特异性抗体与 Fc γ RIa、Fc γ RIIIa 和/或 C1q 的亲合力常数相比突变前降低; 优选地, 所述亲合力常数通过 Fortebio Octet 分子相互作用仪测得。

在本发明的一个或多个实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其中, 按照 EU 编号系统, 所述免疫球蛋白的重链恒定区在第 234 位点、235 位点和/或 237 位点具有如下突变:

L234A 和 L235A; 或者

L234A 和 G237A; 或者

L235A 和 G237A;

或者

L234A、L235A、G237A。

本发明中, 如果没有特别说明, 位点之前的字母表示突变前的氨基酸, 位点之后的字母表示突变后的氨基酸。

在本发明的一个或多个实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其中, 按照 EU 编号系统, 所述免疫球蛋白的重链恒定区还具有选自如下的一个或多个突变:

N297A、D265A、D270A、P238D、L328E、E233D、H268D、P271G、A330R、C226S、C229S、E233P、P331S、S267E、L328F、A330L、M252Y、S254T、T256E、N297Q、P238S、P238A、A327Q、A327G、P329A、K322A、T394D、G236R、G236A、L328R、A330S、P331S、H268A、E318A 和 K320A。

在具体的实施方案中, 所述的抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体结构如重链-轻链-连接片段 1-scFv 所示, 所述 scFv 选自 14C12H1V-连接片段 2-14C12L1V, 14C12H1V-连接片段 1-14C12L1V, 14C12H1V-连接片段 2-14C12L1V 和 14C12H1V-连接片段 1-14C12L1V, 具体选自以下各项组成的组:

(1) NTPDV1, 其重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:85 所示, 轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:28 所示, 连接片段 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:79 所示, 14C12H1V 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:66 所示, 连接片段 2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:81 所示, 14C12L1V 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:68 所示,

(2) NTPDV2, 其重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:85 所示, 轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:28 所示, 连接片段 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:79 所示, 14C12H1V 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:66 所示, 连接片段 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:79 所示, 14C12L1V 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:68 所示,

(3) NTPDV3, 其重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:85 所示, 轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:96 所示, 连接片段 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:79

所示, 14C12H1V 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:66 所示, 连接片段 2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:81 所示, 14C12L1V 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:68 所示, 和

(4) NTPDV4, 其重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:85 所示, 轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:96 所示, 连接片段 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:79 所示, 14C12H1V 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:66 所示, 连接片段 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:79 所示, 14C12L1V 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:68 所示。

在本发明的一个实施方案中, 所述的双特异性抗体以小于大约 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 K_D 结合 CD73 蛋白和/或 PD-1 蛋白。

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制备本发明的双特异性抗体的方法, 其包括在合适的条件下培养本发明的宿主细胞, 以及从细胞培养物中回收所述双特异性抗体的步骤。

本发明的再一方面涉及偶联物, 其包括双特异性抗体以及偶联部分, 其中, 所述双特异性抗体为本发明的双特异性抗体, 所述偶联部分为可检测的标记; 具体地, 所述偶联部分为放射性同位素、荧光物质、化学发光物质、有色物质或酶。

本发明的再一方面涉及试剂盒, 其包括本发明的双特异性抗体, 或者包括本发明的偶联物; 优选地所述试剂盒还包括第二抗体, 其特异性识别所述双特异性抗体; 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的双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 和/或 PD-1 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, 其包含本发明的双特异性抗体或者本发明的偶联物; 可选地, 其还包括药学上可接受的载体和/

或赋形剂。

本发明的再一方面涉及使用本发明的双特异性抗体或者本发明的偶联物在预防和/或治疗肿瘤或者贫血病中的用途，或者在诊断肿瘤或者贫血病的用途。

本发明的再一方面涉及本发明的双特异性抗体或者本发明的偶联物在制备预防和/或治疗肿瘤或者贫血病的药物中的用途，或者在制备诊断肿瘤或者贫血病的药物中的用途。

本发明的再一方面涉及本发明的双特异性抗体或者本发明的偶联物在制备如下药物中的用途：

检测样品中 CD73 水平的药物，
抑制 CD73 的酶活反应；
和/或
阻断 PD-1 与 PDL1 结合的药物，
调节（例如下调）PD-1 活性或水平的药物，
解除 PD-1 对机体免疫抑制的药物，
提高 T 淋巴细胞中 IL-2 表达的药物，或者
提高 T 淋巴细胞中 IFN- γ 表达的药物。

本发明的再一方面涉及一种在体内或体外方法，包括施加细胞或者给予有需求的受试者以有效量的本发明的双特异性抗体或者本发明的偶联物的步骤，

本发明的所涉及的抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体均能抑制细胞膜表面 CD73 酶活性，并且均能诱导 IFN γ 、IL-2 的分泌，激活免疫反应。

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 F, Kaas Q, Lefranc M P. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors,

MHC, IgSF and MhcSF[J]. 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,例如根据 IMGT 定义分析下面的(1)-(11)项中的单克隆抗体序列的 CDR 的氨基酸序列,结果如下:

(1) 19F3

重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示,轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示。

其重链可变区的 3 个 CDR 的氨基酸序列如下:

HCDR1: GYSFTGYT (SEQ ID NO:3),

HCDR2: INPYNAGT (SEQ ID NO: 4),

HCDR3: ARSEYRYGGDYFDY (SEQ ID NO: 5);

其轻链可变区的 3 个 CDR 的氨基酸序列如下:

LCDR1: QSLNSSNQKNY (SEQ ID NO: 8),

LCDR2: FAS (SEQ ID NO: 9),

LCDR3: QQHYDTPYT (SEQ ID NO: 10)。

(2) 19F3H2L2

重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示,轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:22 所示。

其重链可变区的 3 个 CDR 的氨基酸序列与 19F3 相同。

其轻链可变区的 3 个 CDR 的氨基酸序列与 19F3 相同。

(3) 19F3H2L3

重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示,轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:24 所示。

其重链可变区的 3 个 CDR 的氨基酸序列与 19F3 相同。

其轻链可变区的 3 个 CDR 的氨基酸序列与 19F3 相同。

(4) 14C12

重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 44 所示,轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:49 所示。

其重链可变区的 3 个 CDR 的氨基酸序列如下:

HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 45)

HCDR2: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 46)

HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 47)

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下:

LCDR1: QDINTY (SEQ ID NO: 50)

LCDR2: RAN (SEQ ID NO: 51)

LCDR3: LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 52)

(5) 14C12H1L1

重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 62 所示, 轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:64 所示。

其重链可变区的 3 个 CDR 的氨基酸序列与 14C12 相同。

其轻链可变区的 3 个 CDR 的氨基酸序列与 14C12 相同。

(6) NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4 其重链所包含的 9 个 CDR 的氨基酸序列依照 N 端向 C 端顺序分别为与 13F9 重链, 14C12 重链和 14C12 轻链区域的 CDR 氨基酸序列一致, 按照前述排列序列如下:

HCDR1: GYSFTGYT (SEQ ID NO:3)

HCDR2: INPYNAGT (SEQ ID NO:4)

HCDR3: ARSEYRYGGDYFDY (SEQ ID NO:5)

HCDR4: GFAFSSYD (SEQ ID NO:45)

HCDR5: ISGGGRYT (SEQ ID NO:46)

HCDR6: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO:47)

HCDR7: QDINTY (SEQ ID NO:50)

HCDR8: RAN (SEQ ID NO:51)

HCDR9: LQYDEFPLT (SEQ ID NO:52)

其轻链的 3 个 CDR 的氨基酸序列与 19F3 轻链三个 CDR 氨基酸序列一致, 序列如下:

LCDR1: QSLNSSNQKNY (SEQ ID NO:8)

LCDR2: FAS (SEQ ID NO:9)

LCDR3: QQHYDTPYT (SEQ ID NO:10)。

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。

本发明的再一方面涉及杂交瘤细胞株 LT003, 其保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 保藏编号为 CCTCC NO: C2015105。

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 EC_{50} 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 (VH) 和重链恒定区 (CH) 组成。重链恒定区由 3 个结构域 (CH1、CH2 和 CH3) 组成。各轻链由轻链可变区 (VL) 和轻链恒定区 (CL) 组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 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。VH 和 VL 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 VH 和 VL 由按下列顺序: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 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 (VH 和 VL) 分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 Bethesda M.d., Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, (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 F, Kaas Q, Lefranc M P. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF[J]. Nucleic acids research, 2009; 38(suppl_1): D301-D307 的定义。

特别地, 重链还可以包含 3 个以上 CDR, 例如 6、9、或 12 个。例如在本发明的双特异性抗体中, 重链可以是 IgG 抗体的重链的 C 端连接一个 ScFv, 这种情况下重链含有 9 个 CDR。

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, 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,

Immunol. Today 2000; 21: 397-402。在一些情况下，抗体的抗原结合片段是双抗体(Diabodies)，其中 V_H 和 V_L 结构域在单个多肽链上表达，但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对，从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位(参见，例如，Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90:6444-6448 和 Poljak R. J. et al., Structure 1994; 2:1121-1123)。

如本文中所使用的，术语“单链抗体(single chain fragment variable, ScFv)”是指，包含通过连接体连接的抗体重链可变区(V_H)和抗体轻链可变区(V_L)的分子。其中 V_L 和 V_H 结构域通过使其能够产生为单个多肽链的连接体配对形成单价分子(参见，例如，Bird et al, Science 1988; 242:423-426 和 Huston et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85:5879-5883)。此类 scFv 分子可具有一般结构： NH_2 - V_L -连接片段- V_H - $COOH$ 或 NH_2 - V_H -连接片段- V_L - $COOH$ 。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成。例如，可使用具有氨基酸序列 (GGGGS)₄ 的接头，但也可使用其变体(Holliger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993; 90: 6444-6448)。可用于本发明的其他接头由 Alfthan et al, Protein Eng. 1995; 8:725-731, Choi et al, Eur. J. Immunol. 2001; 31: 94-106, Hu et al, Cancer Res. 1996; 56:3055-3061, Kipriyanov et al, J. Mol. Biol. 1999; 293:41-56 和 Roovers et al, Cancer Immunology, Immunotherapy, 2001, 50(1): 51-59.描述。

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，GS 细胞，COS 细胞，NSO 细胞，HeLa 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。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。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如，对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其他治疗等等。

发明的有益效果

本发明的单克隆抗体（例如 13F9H2L3）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。

本发明涉及的双特异性抗体例如 NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4 能够很好地特异性与 PD-1 及 CD73 结合，并且能够十分有效地阻断 PD-1 与 PDL1 的结合，特异地解除 PD-1 对机体免疫抑制，以及抑制 CD73 的催化活性，解除腺苷对免疫细胞的抑制，激活 T 淋巴细胞，并且不引起细胞因子 IL-8 和 IL-6 的释放，有效地增加安全性和有效性。

本发明的双功能抗体具有应用于制备抗肿瘤的药物的潜力。

附图说明

图 1. ELISA 检测 P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R、14C12H1L1、Nivolumab 与 PD-1-mFc 的结合。

图 2. ELISA 检测 P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R、19F3H2L3、MEDI9447 与人 NT5E-Biotin 的结合。

图 3. P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R、14C12H1L1 和 Nivolumab 与人 PD-L1-mFc 竞争结合人 PD-1-mFc-Biotin 的活性检测结果。

图 4. P1D7V01 与 PD-1-mFc 亲和力常数测定。

图 5. 14C12H1L1 与 PD-1-mFc 亲和力常数测定

图 6. Nivolumab 与 PD-1-mFc 亲和力常数测定。

图 7. P1D7V01 与人 NT5E(1-552)-his 亲和力常数测定。

图 8. MEDI 9447 与人 NT5E(1-552)-his 亲和力常数测定。

图 9. FACS 检测 P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R 和 14C12H1L1 与 293T-PD1 细胞表面 PD-1 的结合活性。

图 10. FACS 检测 P1D7V01、P1D7V03、MEDI9447 和 19F3H2L3 与 MDA-MB-231 细胞表面 CD73 的结合活性

图 11. 抗CD73-抗PD-1 双特异性抗体对MDA-MB-231 膜表面 CD73 酶活性的抑制作用。

图 12. 抗CD73-抗PD-1 双特异性抗体对U87-MG 膜表面 CD73 酶活性的抑制作用。

图 13. 抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体促 Raji-PDL1 混合淋巴反应体系分泌 IFN- γ 的生物活性检测。

图 14. 抗CD73-抗PD-1 双特异性抗体促Raji-PDL1 混合淋巴反应体系分泌IL-2 的生物活性检测。

图 15. 抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体促 DC 混合淋巴反应体系分泌 IFN- γ 的生物活性检测。

图 16. 抗CD73-抗PD-1 双特异性抗体促DC 混合淋巴反应体系分泌IL-2 的生物活性检测。

图 17.14C12H1L1(hG1TM)与 PD-1-mFc 亲和力常数测定。

图 18. Nivolumab 与 PD-1-mFc 亲和力常数测定

图 19. NTPDV1 与 PD-1-mFc 亲和力常数测定。

图 20. NTPDV2 与 PD-1-mFc 亲和力常数测定。

图 21. NTPDV3 与 PD-1-mFc 亲和力常数测定。

图 22. NTPDV4 与 PD-1-mFc 亲和力常数测定。

图 23.19F3H2L3(hG1M)与人 NT5E(1-552)-his 亲和力常数测定。

图 24. NTPDV1 与人 NT5E(1-552)-his 亲和力常数测定。

图 25. NTPDV2 与人 NT5E(1-552)-his 亲和力常数测定。

图 26. NTPDV3 与人 NT5E(1-552)-his 亲和力常数测定。

图 27. NTPDV4 与人 NT5E(1-552)-his 亲和力常数测定。

图 28. 抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体抑制 U87-MG 细胞膜表面 CD73 酶活性的检测。

图 29. 混合淋巴细胞反应 MLR 检测抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体促 IFN- γ 和 IL-2 分泌的生物活性。

图 30.同型对照、19F3H2L3(hG1M)、不同剂量 NTPDV2 对小鼠肿瘤体积的影响。

图 31. 同型对照、19F3H2L3(hG1M)、不同剂量 NTPDV2 对小鼠体重的影响。

图 32. 在 CHO-K1-PD1 细胞和人巨噬细胞共培养体系中，Fc 段氨基酸突变有效消除由 PD-1/CD73 双特异性抗体介导的人巨噬细胞分泌 IL-8。

图 33. 在 CHO-K1-PD1 细胞和人巨噬细胞共培养体系中，Fc 段氨基酸突变有效消除由 PD-1/CD73 双特异性抗体介导的人巨噬细胞分泌 IL-6。

图 34. 在 U87-MG 细胞和人巨噬细胞共培养体系中，Fc 段氨基酸突变有效消除由 PD-1/CD73 双特异性抗体介导的人巨噬细胞分泌 IL-8。

图 35. 在 U87-MG 细胞和人巨噬细胞共培养体系中，Fc 段氨基酸突变有效消除由 PD-1/CD73 双特异性抗体介导的人巨噬细胞分泌 IL-6。

生物材料保持信息：

杂交瘤细胞株 LT003（又称 PD-1-14C12），其于 2015 年 6 月 16 日保

藏于中国典型培养物保藏中心（CCTCC），保藏编号为 CCTCC NO: C2015105，保藏地址为中国.武汉.武汉大学，邮编：430072。

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。

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（通用名：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，所用的同靶点已上市药物抗体 Nivolumab，商品名 Opdivo，购自百时美施贵宝公司。

在本发明的下述实施例中，所用的 293T-PD1 细胞系由中山康方生物医药有限公司构建。293T-PD1 细胞系由 HEK293T 细胞经病毒感染制得，病毒制备使用的是 3rd Generation Lentiviral Systems，参见，例如 A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L. J Virol. 1998. 72(11):8463-8471. 其中所使用的慢病毒表达载体为 pCDH-CMV-PD-1FL-Puro（其中 PD1，Genebank ID: NM_005018；载体 pCDH-CMV-Puro，购自优宝生物，产品编号：VT1480）。

在本发明的下述实施例中，所用的 Raji-PDL1 细胞系由中山康方生物医药有限公司构建。Raji-PDL1 细胞系由 Raji 细胞经病毒感染制得，病毒制备使用的是 3rd Generation Lentiviral Systems，参见，例如 A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L. J Virol. 1998. 72(11):8463-8471. 其中所使用的慢病毒表达载体为 plenti6.3-PDL1（其中 PDL1，Genebank ID: NP_054862.1；载体 plenti6.3，购自 Invitrogen，货号：K5315-20）。

在本发明的下述实施例中，所用的 CHO-K1-PD1 细胞系由中山康方生物医药有限公司构建。CHO-K1-PD1 细胞系由 CHO-K1 细胞经病毒感染制得，病毒制备使用的是 3rd Generation Lentiviral Systems，参见，例如 A Third Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, and Naldini L. J Virol. 1998. 72(11):8463-8471. 其中所使用的慢病毒表达载体为 pCDH-CMV-PD-1FL-Puro（其中 PD1，Genebank ID: NM_005018；载体 pCDH-CMV-Puro，购自优宝生物，产品编号：VT1480）。

实验例中采用携带有 S228P 突变的 IgG4 亚型抗 PD-1 抗体 Nivolumab（商品名 Opdivo）作为对照抗体，均购自百时美施贵宝公司。

在本发明的下述实验例中，所用同型对照抗体，即 hIgG1 均为靶向为人抗鸡蛋溶酶体（HEL）的抗体，抗体的可变区序列来自于 Acierno 等人发表的 Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies（Acierno 等人. J Mol Biol. 2007; 374(1): 130-46.），hIgG1 的恒定区片段采用 Ig gamma-1 chain C region，ACCESSION: P01857 作为重链恒定区，Ig kappa chain C region，ACCESSION: P01834 为轻链恒定区；hIgG1 为在中山康方生物医药有限公司的实验室制得。

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 ELISA 法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以及 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, 分别从实施例 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 TA 克隆的产物直接进行测序, 测序结果如下:

19F3 重链可变区的核酸序列 (363 bp) 如 SEQ ID NO: 1 所示, 其编码的氨基酸序列 (121 aa) 如 SEQ ID NO:2 所示。

根据 IMGT 编号系统, 其中重链 CDR1 的序列如 SEQ ID NO:3 所示, 重链 CDR2 的序列如 SEQ ID NO:4 所示, 重链 CDR3 的序列如 SEQ ID NO:5 所示。

19F3 轻链可变区的核酸序列 (339 bp) 如 SEQ ID NO: 6 所示, 其编码的氨基酸序列 (113 aa) 如 SEQ ID NO: 7 所示。

根据 IMGT 编号系统, 其中轻链 CDR1 的序列如 SEQ ID NO:8 所示, 轻链 CDR2 的序列如 SEQ ID NO:9 所示, 轻链 CDR3 的序列如 SEQ ID NO:10 所示。

19F3 重链 4 个骨架区 (Framework region) (FR-H1 至 FR-H4) 氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 11 至 SEQ ID NO: 14 所示; 19F3 轻链 4 个骨架区 (Framework region) (FR-H1 至 FR-H4) 氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 15 至 SEQ ID NO: 18 所示。

实施例 3: 抗人 CD73 的人源化抗体的设计、制备和检测

1. 人源化抗体 19F3H2L3 和 19F3H2L2 的轻链和重链序列的设计

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 获得的抗体鼠源抗体 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、19F3H2L3 和 19F3H2L2 的可变区序列, 其相应的重链可变区序列分别为 19F3H1、19F3H2 (氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:93、SEQ ID NO: 97 所示), 轻链可变区序列分别为和 19F3L1、19F3L2、19F3L3 (氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 95、SEQ ID NO: 98、SEQ ID NO: 99 所示), 抗体恒定区序列, 来自 NCBI 的数据库, 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。其中, 19F3H2L3 在申请号为 202110270671. X 的中国发明专利中又写为 19F3H2L3(hG1WT), 其中 19F3H1L1, 19F3H2L2, 19F3H2L3 的轻、重链可变区又可记为 19F3H1V (或者 19F3H1_V), 19F3H2V (或者 19F3H2_V), 19F3L1V (或者 19F3L1_V), 19F3L2V (或者 19F3L2_V), 19F3L3V (或者 19F3L3_V)。

(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(363 bp)如 SEQ ID NO: 92 所示, 其编码的氨基酸序列(121 aa)如 SEQ ID NO: 93 所示。

轻链可变区的核酸序列(339 bp)如 SEQ ID NO: 94 所示, 其编码的氨基酸序列(113 aa)如 SEQ ID NO: 95 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如下:

重链可变区 19F3H2 的核酸序列(363 bp)如 SEQ ID NO: 19 所示, 其编码的氨基酸序列(121 aa)如 SEQ ID NO: 20 所示。

轻链可变区 19F3L3 的核酸序列(339 bp)如 SEQ ID NO:21 所示, 其编码的氨基酸序列(113 aa)如 SEQ ID NO:22 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如下:

重链可变区 19F3H2 的核酸序列(363 bp)如 SEQ ID NO: 19 所示, 其编码的氨基酸序列(121 aa)如 SEQ ID NO: 20 所示。

轻链可变区 19F3L3 的核酸序列(339 bp)如 SEQ ID NO: 23 所示, 其编码的氨基酸序列(113 aa)如 SEQ ID NO:24 所示。

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

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

分别将 19F3H1L1、19F3H2L2 和 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, 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 19F3H2L3(hG1M)和 19F3H2L3(hG1TM)的轻链和重链序列的设计

本发明人在实施例 3 的 1 中所获得的 19F3H2L3 的基础上，通过在其重链的第 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），得到了 19F3H2L3(hG1M)，19F3H2L3(hG1M)重链核苷酸及氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:25 和 SEQ ID NO:26 所示；19F3H2L3(hG1M)轻链恒定区为 Ig kappa chain C region，ACCESSION: P01834，19F3H2L3(hG1M)轻链核苷酸及氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:28 所示。

本发明人在实施例 3 的 1 中所获得的 19F3H2L3 的基础上，通过在其重链的第 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），第 237 号位点引进了甘氨酸到丙氨酸的点突变（G237A），得到了 19F3H2L3(hG1TM)，其重链核苷酸及氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:29 和 SEQ ID NO:30 所示；其轻链与 19F3H2L3(hG1M)一致。

19F3H2 的 4 个骨架区（Framework region）（FR-H1 至 FR-H4）氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 31 至 SEQ ID NO: 34 所示；

19F3L2 轻链 4 个骨架区（Framework region）（FR-H1 至 FR-H4）氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 35 至 SEQ ID NO:38 所示；

19F3L3 轻链 4 个骨架区（Framework region）（FR-H1 至 FR-H4）氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 39 至 SEQ ID NO: 42 所示。

4. 人源化抗体 19F3H2L3(hG1M)的制备

分别将 19F3H2L3(hG1M)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-19F3H2(hG1M)、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 pcDNA3.1-19F3H2(hG1M) 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 pcDNA3.1-19F3H2(hG1M)/pcDNA3.1-19F3L3 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 19F3H2L3(hG1M)。

实施例 4: 抗 PD-1 的抗体 14C12 的制备

1. 杂交瘤细胞株 LT003 的制备

用 PD-1- mFc 融合蛋白 (PD-1 GenBank: NM_005018, mFc SEQ ID NO:89) 作为抗原, 取免疫 BALB/c 小鼠 (购自广东医学实验动物中心) 的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合成杂交瘤细胞, 参考目前已确立的方法 (例如, Stewart, S.J., “Monoclonal Antibody Production”, in Basic Methods in antibody Production and Characterization, Eds. G.C. Howard and D.R. Bethell, Boca Raton: CRC Press, 2000)。

用 PD-1-hFc (PD-1 Genbank ID: NM_005018, hFc 为人 IgG Fc 纯化标签, 具体为 Ig gamma-1 chain C region, GenbankID: P01857 位置 114-330) 作为抗原包被酶标板, 进行间接 ELISA 法筛选, 得到分泌与 PD-1 特异性结合的新的抗体的杂交瘤细胞。

通过竞争 ELISA 筛选出能够分泌与配体 PD-L1-hFc (PD-L1 Genbank ID:NP_054862.1) 竞争结合 PD-1 的单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 经过有限稀释法得到稳定的杂交瘤细胞株, 并经过有限稀释法得到 LT003 稳定细胞株 (PD-1-14C12), 其分泌的单克隆抗体命名为 14C12。

杂交瘤细胞株 LT003 (又称 PD-1-14C12), 其于 2015 年 6 月 16 日保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 保藏编号为 CCTCC NO: C2015105, 保藏地址为中国.武汉.武汉大学, 邮编: 430072。

2. 抗 PD-1 的抗体 14C12 的制备

用含 10% 的低 IgG 胎牛血清的 IMDM 培养基对上面制得的 LT003 细胞株进行培养 (IMDM 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进行纯化，制得抗体 14C12。

实施例 5：抗 PD-1 抗体 14C12 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 制得的杂交瘤细胞株 LT003 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 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（354 bp）如 SEQ ID NO:43 所示，其编码的氨基酸序列（118 aa）如 SEQ ID NO:44 所示。

根据 IMGT 编号系统，其中重链 CDR1 的序列如 SEQ ID NO:45 所示，重链 CDR2 的序列如 SEQ ID NO:46 所示，重链 CDR3 的序列如 SEQ ID NO:47 所示。

轻链可变区的核酸序列（321 bp）如 SEQ ID NO:48 所示，其编码的氨基酸序列（107 aa）如 SEQ ID NO:49 所示。

根据 IMGT 编号系统，其中轻链 CDR1 的序列如 SEQ ID NO:50 所示，轻链 CDR2 的序列如 SEQ ID NO:51 所示，轻链 CDR3 的序列如 SEQ ID NO:52 所示。

14C12 重链 4 个骨架区（Framework region）（FR-H1 至 FR-H4）氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 53 至 SEQ ID NO: 56 所示；14C12 轻链 4 个骨架区（Framework region）（FR-H1 至 FR-H4）氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 57 至 SEQ ID NO: 60 所示。

实施例 6：抗 PD-1 的人源化抗体 14C12H1L1 及的 14C12H1L1(hG1TM) 设计和制备

1. 抗 PD-1 的人源化抗体 14C12H1L1 的设计

人源化抗体 14C12H1L1 的轻链和重链序列的设计，根据 PD-1 蛋白的

三维晶体结构 (Shinohara T, et al., Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). Genomics 1995, 23 (3): 704–6) 以及实施例 5 获得的抗体 14C12 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 14C12H1L1 的可变区序列。

设计的可变区序列如下:

人源化单克隆抗体 14C12H1L1 的重链可变区 14C12H1 的核酸序列 (354 bp) 如 SEQ ID NO:61 所示, 其编码的氨基酸序列 (118 aa) 如 SEQ ID NO:62 所示。

人源化单克隆抗体 14C12H1L1 的轻链可变区 14C12L1 的核酸序列 (321 bp) 如 SEQ ID NO:63 所示, 其编码的氨基酸序列 (107 aa) 如 SEQ ID NO:64 所示。

抗体 14C12H1L1 的抗体恒定区序列, 来自 NCBI 的数据库, 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), 14C12H1L1 重链的核苷酸序列和氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:65 和 66 所示, 14C12H1L1 轻链的核苷酸序列和氨基酸序列分别如 SEQ ID NO:67 和 68 所示。其中, 14C12H1L1 在本文及申请号为 202110270671.X 的中国发明专利中又写为 14C12H1L1(hG1WT), 其中, 14C12H1L1 的重链可变区和轻链可变区在本文在申请号为 202110270671.X 的中国发明专利中又写为 14C12H1V (或者 14C12H1_V), 和 14C12L1_V (或者 14C12L1V)。

2. 人源化抗体 14C12H1L1(hG1TM)轻链和重链序列的设计

本发明人在实施例 6 的 1 中所获得的 14C12H1L1 的基础上, 通过在其重链的第 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), 第 237 号位点引进了甘氨酸到丙氨酸的点突变 (G237A) 得到了抗体 14C12H1L1(hG1TM)。14C12H1L1(hG1TM)的重链核苷酸及氨基酸序列分别入 SEQ ID NO:69 和 SEQ ID NO:70 所示; 其轻链可变区氨基酸序列与抗体 14C12H1L1 的轻链可变区一致。

14C12H1 的 4 个骨架区 (Framework region) (FR-H1 至 FR-H4) 氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 71 至 SEQ ID NO: 74 所示;

14C12L1 轻链 4 个骨架区 (Framework region) (FR-H1 至 FR-H4) 氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 75 至 SEQ ID NO:78 所示;

3. 人源化抗体 14C12H1L1, 14C12H1L1(hG1TM)的制备

分别将 14C12H1L1(hG1TM)和 14C12H1L1 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-14C12H1、pUC57simple-14C12L1 和 pUC57simple-14C12H1(hG1TM)。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 pcDNA3.1-14C12H1, pcDNA3.1-14C12L1 和 pcDNA3.1-14C12H1(hG1TM), 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 (pcDNA3.1-14C12H1(hG1TM)/pcDNA3.1-14C12L1, pcDNA3.1-14C12H1/pcDNA3.1-14C12L1) 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 7: 抗 PD-1/CD73 双功能抗体的序列设计、表达

1. 序列设计

本发明中的双功能抗体的结构模式属于 Morrison 模式 (IgG-scFv), 即在一个 IgG 抗体的两条重链的 C 端均连接另一个抗体的 scFv 片段, 其重链和轻链的主要组成设计如下面的表 1。表 1 表 1: P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R、P1D7V07、P1D7V08 的重链和轻链的组成设计

双特异性 抗体编号	重链			轻链
	IgG 部分	连接片段	scFv 部分	
P1D7V01	14C12H1	Linker1	19F3H2 _v -Linker1-19F3L3 _v	14C12L1
P1D7V02R	14C12H1	Linker1	19F3L3 _v -Linker1-19F3H2 _v	14C12L1
P1D7V03	14C12H1	Linker2	19F3H2 _v -Linker1-19F3L3 _v	14C12L1

P1D7V04R	14C12H1	Linker2	19F3L3 _V -Linker1-19F3H2 _V	14C12L1
P1D7V07	19F3H2	Linker1	14C12H1 _V -Linker1-14C12L1 _V	19F3L3
P1D7V08	19F3H2	Linker2	14C12H1 _V -Linker1-14C12L1 _V	19F3L3

上面的表 1 中:

(1) 右下角标注“V”的,是指相应重链的可变区或者相应轻链的可变区。没有标注“V”的,相应重链或者轻链为包含恒定区的全长。这些可变区或者全长的氨基酸序列及其编码核酸序列均参照上面的实施例中记载的相应序列。

(2) Linker1 的氨基酸序列为(GGGGS)₄ ((核苷酸序列 SEQ ID NO:80, 氨基酸序列 SEQ ID NO:79), Linker2 的氨基酸序列为 (GGGGS)₃ ((核苷酸序列 SEQ ID NO:82, 氨基酸序列 SEQ ID NO:81))。

2. 抗体的表达和纯化

分别将 P1D7V01 的重链 cDNA 序列和轻链的 cDNA 序列克隆到 pUC57simple (金斯瑞公司提供) 载体中, 分别获得 pUC57simple-VP101H 和 pUC57simple-VP101L 质粒。

分别将质粒 pUC57simple- VP101H 和 pUC57simple VP101L 进行酶切 (HindIII&EcoRI), 电泳回收得到的重链轻链分别亚克隆到 pcDNA3.1 载体中, 提取重组质粒共转染 293F 细胞。细胞培养 7 天后, 将培养液通过高速离心、上清浓缩后上样至 HiTrap MabSelect SuRe 柱, 用 Elution Buffer 一步洗脱蛋白并回收目标样品并换液至 PBS。

按照上述 P1D7V01 的表达和纯化方法获得纯化的抗体 P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R、P1D7V07、P1D7V08。

实施例 8: ELISA 方法测定抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体与抗原的结合活性

1. ELISA 方法分别测定 P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R 与抗原 PD-1-mFc 的结合活性。具体方法如下:

将 PD-1-mFc, 0.5 μg/ml 包被酶标板置于 4℃ 孵育过夜, 然后使用 PBST 洗板包被了抗原的酶标板 1 次, 再使用 1% BSA 的 PBS 溶液作为封闭液在

37℃下对酶标板进行封闭 2 小时。酶标板封闭结束后用 PBST 洗板 3 次，加入 PBST 溶液梯度稀释的抗体（抗体稀释梯度详见表 2），加入待测抗体的酶标板置于 37℃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) 二抗工作液，然后置于 37℃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。

检测结果如表 2 和图 1 所示。由图可知，P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R 与抗原 PD-1-mFc 能够有效的结合，并且其结合效率呈剂量依赖关系，各剂量的吸光度强度见表 2，通过对结合的抗体进行吸光度定量分析，曲线模拟计算获得抗体 P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R、14C12H1L1 和 Nivolumab（作为对照）的结合效率 EC50 分别为 0.078nM、0.078nM、0.075nM 和 0.089 nM、0.033nM、0.051nM。

以上实验结果表明，在相同实验条件下，P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R 结合 PD-1-mFc 的活性与同靶点阳性药 14C12H1L1、Nivolumab 相当，提示 P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R 具有有效结合 PD-1-mFc 的活性。

表 2: ELISA 检测 P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R、14C12H1L1、Nivolumab 与 PD-1-mFc 的结合

抗体 稀释 浓度 (μg /ml)	抗原包被 PD-1-mFc 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$											
	P1D7V01		P1D7V02R		P1D7V03		P1D7V04R		14C12 H1L1		Nivolumab	
1	2.345	2.300	2.169	2.323	2.406	2.292	2.225	2.393	2.441	2.609	2.386	2.473
1:3	2.461	2.295	2.114	2.361	2.288	2.303	2.199	2.302	2.414	2.548	2.441	2.600
1:9	2.279	2.085	2.063	2.094	2.135	2.178	2.075	2.043	2.461	2.525	2.519	2.572
1:27	1.838	1.765	1.701	1.696	1.777	1.764	1.659	1.659	2.236	2.295	2.196	2.219
1:81	1.153	1.097	1.089	1.120	1.149	1.154	1.062	1.131	1.858	1.954	1.711	1.712

1:243	0.629	0.684	0.570	0.582	0.675	0.686	0.584	0.592	1.251	1.318	0.980	0.965
1:729	0.361	0.364	0.334	0.349	0.360	0.370	0.340	0.341	0.683	0.709	0.521	0.498
0	0.201	0.198	0.187	0.210	0.197	0.197	0.213	0.257	0.208	0.199	0.196	0.190
二抗	羊抗人 IgG(H+L), HRP(1:5000)											
EC50(nM)	0.078	0.078	0.075	0.089	0.033	0.051						

2. ELISA 方法分别测定 P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R 与抗原人 NT5E-Biotin 的结合活性

将链霉亲和素，2 $\mu\text{g/ml}$ 包被酶标板后置于 4℃ 孵育过夜。孵育结束后使用 PBST 对包被了链霉亲和素的酶标板洗板 1 次，1% BSA 的 PBS 溶液作为酶标板封闭液，对酶标板在 37℃ 进行封闭 2 小时。酶标板封闭结束后用 PBST 洗板 3 次。再加入抗原人 NT5E-Biotin 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 并置于 37℃ 条件下孵育 30 分钟，然后用 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 3），加入待测抗体的酶标板置于 37℃ 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）二抗工作液，置于 37℃ 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。

检测结果如表 3 和图 2 所示。由图可知，P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R 与抗原人 NT5E-Biotin 能够有效的结合，并且其结合效率呈剂量依赖关系（各剂量的吸光度强度见表 3）。通过对结合的抗体进行吸光度定量分析，曲线模拟计算获得抗体 P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R、19F3H2L3 和 MEDI9447（作为对照抗体）的结合效率 EC50 分别为 0.063nM、0.230nM、0.068nM 和 0.439 nM、0.045nM、0.042nM。

以上实验结果表明，在相同实验条件下，双特异抗体 P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R 结合人 NT5E-Biotin 的活性与同靶点

阳性药 19F3H2L3、MEDI9447 相当，提示 P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R 具有有效结合人 NT5E-Biotin 的活性。

表 3: ELISA 检测 P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R、19F3H2L3、MEDI9447 与人 NT5E-Biotin 的结合

抗体稀释浓度 (μg/ml)	抗原包被 SA: 2μg/ml											
	人 NT5E-Biotin (0.5μg/ml)											
	P1D7V01		P1D7V02R		P1D7V03		P1D7V04R		19F3 H2L3		MEDI9447	
0.333	2.465	2.254	2.125	2.024	2.245	2.311	1.992	1.864	2.345	2.413	2.460	2.570
1:3	2.310	2.207	1.718	1.680	2.202	2.194	1.385	1.397	2.366	2.376	2.434	2.528
1:9	1.899	1.856	1.090	1.086	1.834	1.782	0.886	0.898	2.164	2.120	2.219	2.345
1:27	1.276	1.239	0.556	0.554	1.199	1.132	0.464	0.465	1.681	1.631	1.729	1.810
1:81	0.704	0.654	0.289	0.279	0.610	0.601	0.235	0.230	1.048	0.978	1.091	1.166
1:243	0.363	0.333	0.183	0.178	0.308	0.302	0.155	0.156	0.548	0.504	0.547	0.587
1:729	0.199	0.197	0.138	0.141	0.183	0.184	0.130	0.122	0.283	0.278	0.288	0.305
0	0.135	0.119	0.115	0.117	0.116	0.119	0.115	0.111	0.120	0.126	0.121	0.121
二抗	羊抗人 IgG(H+L), HRP(1:5000)											
EC50(nM)	0.063		0.230		0.068		0.439		0.045		0.042	

实施例 9: 竞争 ELISA 方法分别测定抗体抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体与人 PD-L1-mFc 竞争结合人 PD-1-mFc-Biotin 的活性

将人 PD-L1-mFc (PD-L1 Genbank ID:NP_054862.1, mFc SEQ ID NO:143) 以 2 μg/mL 包被酶标板后, 4℃孵育过夜。孵育结束后用 1%BSA 的 PBS 溶液在 37℃条件下对酶标板进行封闭 2 小时, 封闭结束后洗板三次并拍干。在稀释板上以 10 μg/mL 作为起始浓度按照 1:3 的稀释比例将抗体进行梯度稀释至 7 个浓度, 并设空白对照, 然后加入等体积的 0.3 μg/mL 的人 PD-1-mFc-Biotin 溶液, 混匀后在室温孵育 20 分钟。然后将反应后混合液加入到包被好的酶标板, 在 37℃条件下孵育 30 分钟。孵育结束后用 PBST 洗板三次并拍干, 加入 SA-HRP (KPL, 14-30-00) 工作液, 在 37℃条件下孵育 30 分钟。孵育完成后洗板四次拍干, 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。

检测结果如图 3 所示。各剂量的 OD 值见表 4。通过对结合的抗体进行吸光强度定量分析，曲线模拟抗体的结合效率获得结合 EC50（表 4）。

结果表明，PID7V01、PID7V02R、PID7V03、PID7V04R、14C12H1L1 和 Nivolumab（作为对照）能有效地阻断抗原人 PD-1-mFc-Biotin 与其受体人 PD-L1-mFc 的结合，且阻断效率呈现剂量依赖关系，PID7V01、PID7V02R、PID7V03、PID7V04R、14C12H1L1 和 Nivolumab 阻断人 PD-1-mFc-Biotin 与其配体人 PD-L1-mFc 结合的 EC50 分别为 1.115nM、1.329nM、1.154nM、1.339nM、1.459nM、1.698nM。

表 4：PID7V01、PID7V02R、PID7V03、PID7V04R、14C12H1L1 和 Nivolumab 与人 PD-L1-mFc 竞争结合人 PD-1-mFc-Biotin 的活性检测结果

抗体稀释 (μg/mL)	抗原包被:人 PD-L1-mFc 2μg/ml											
	PID7V01		PID7V02R		PID7V03		PID7V04R		14C12 H1L1		Nivolumab	
5	0.049	0.047	0.047	0.048	0.048	0.048	0.048	0.051	0.046	0.047	0.057	0.057
1:3	0.050	0.050	0.051	0.051	0.052	0.050	0.052	0.054	0.048	0.050	0.075	0.076
1:9	0.070	0.065	0.097	0.104	0.067	0.068	0.105	0.107	0.053	0.055	0.107	0.100
1:27	1.056	1.109	1.253	1.216	1.109	1.121	1.187	1.158	0.817	0.849	1.014	0.875
1:81	1.460	1.505	1.414	1.372	1.453	1.491	1.424	1.337	1.263	1.299	1.235	1.152
1:243	1.474	1.551	1.503	1.505	1.449	1.447	1.442	1.382	1.316	1.383	1.387	1.207
1:729	1.499	1.604	1.501	1.493	1.569	1.452	1.436	1.424	1.336	1.403	1.347	1.284
0	1.399	1.283	1.467	1.456	1.288	1.252	1.343	1.342	1.302	1.391	1.265	1.156
人 PD-1-mFc-Biotin: 0.3μg/ml												
二抗	SA-HRP(1:4000)											
EC50(nM)	1.115		1.329		1.154		1.339		1.459		1.698	

实施例 10: 使用 ForteBio 分子相互作用仪测定抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体与抗原人 PD-1-mFc 结合的动力学参数

样品稀释缓冲液为 PBST，0.1%BSA，pH7.4。将抗体以 5 μg/mL 的浓度固定于 AHC 传感器上，固定高度约为 0.4 nm，传感器在缓冲液中平衡 60s，固定在传感器上的抗体与抗原 PD-1-mFc 结合，抗原浓度为 0.6-50 nM（三倍稀释），结合时间为 120s，蛋白在缓冲液中解离，时间 180s。检测温度为 37 度，检测频率为 0.3 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 P1D7V01、14C12H1L1 和 Nivolumab（作为对照抗体）与人 PD-1-mFc 的亲和力常数测定结果见表 5，检测结果如图 4、图 5 和图 6 所示。人源化抗体 P1D7V01、14C12H1L1 和 Nivolumab 与人 PD-1-mFc 的亲和力常数依次为 1.76E-10M，1.64E-10M，2.32E-10M。以上实验结果表明：P1D7V01 与 14C12H1L1、Nivolumab 的结合能力相当，提示人源化抗体 P1D7V01 与人 PD-1-mFc 有较强的结合能力。

表 5： P1D7V01、14C12H1L1、Nivolumab、与 PD-1-mFc 亲和力常数测定

待测抗体	KD (M)	kon(1/Ms)	SE (kon)	kdis(1/s)	S E(kdis)	Rmax (nm)
P1D7V01	1.76E-10	4.19E+05	1.52E+04	7.37E-05	3.12E-05	0.13-0.17
14C12H1L1	1.64E-10	4.55E+05	1.61E+04	7.47E-05	2.98E-05	0.24-0.28
Nivolumab	2.32E-10	5.85E+05	2.03E+04	1.36E-04	3.47E-05	0.02-0.14

K_D 为亲和力常数； $K_D=kdis/kon$

实施例 11：使用 Fortebio 分子相互作用仪测定抗CD73-抗PD-1 双特异性抗体与抗原人 NT5E (1-552)-his 结合的动力学参数。

样品稀释缓冲液为 PBST，pH7.4。将抗体以 5 μ g/mL 的浓度固定在 Protein A 传感器上，固定时间为 15 s，传感器在缓冲液中平衡 120s，固定在传感器上的抗体与抗原人 NT5E(1-552)-his 结合，抗原浓度为 3.125-200 nM（两倍稀释），结合时间为 120s，蛋白在缓冲液中解离，时间 600s。传感器采用 10mM Gly, 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 P1D7V01、MEDI 9447（作为对照抗体）与人 NT5E (1-552)-his 的亲和力常数测定结果见表 6，检测结果如图 7 和图 8 所示。人源化抗体 P1D7V01 和 MEDI 9447 与人 NT5E (1-552)-his 的亲和力常数依次为 2.29E-10M，1.04E-10M。

以上实验结果表明：P1D7V01 与 MEDI 9447 的结合能力相当，提示人源化抗体 P1D7V01 与人 NT5E(1-552)-his 有较强的结合能力。

表 6： P1D7V01、MEDI 9447 与人 NT5E(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)
P1D7V01	2.29E-10	1.81E+05	2.30E+03	4.13E-05	4.54E-06	0.47-0.57
MEDI 9447	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 12：FACS 检测抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体的结合活性

1. FACS 检测抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体与 293T-PD1 膜表面 PD-1 的结合活性

收集对数生长期 293T-PD1 细胞，按 3×10^5 个细胞/管将细胞转移到 1.5ml 离心管，加入 500 μ L PBSA，5600 rpm 离心 5min，去上清；加入 PBSA 稀释的抗体 100 μ L (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 500 μ L PBSA, 5600rpm 离心 5min，去上清；加入 500 倍稀释的 FITC 标记羊抗人 IgG 二抗 (Jackson, 货号：109-095-098) 重悬混匀，冰上避光孵育 0.5h；加入 500 μ L PBSA, 5600rpm 离心 5min，去上清；加入 200 μ L PBSA 重悬细胞沉淀，并转移至流式管，FACSCalibur 检测。

实验结果如表 7 和图 9 所示，P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R 均可特异性与 293T-PD1 膜表面 PD-1 结合，且呈剂量依赖关系，与 PD1 单靶点对照抗体 14C12H1L1 相比，均强于 14C12H1L1。

在相同实验条件下，P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R 与 293T-PD1 结合的 EC50 分别为 1.000nM、1.075nM、1.377nM、1.57nM，14C12H1L1 与 293T-PD1 结合的 EC50 为 2.111nM。

以上实验结果表明，在相同实验条件下 P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R 与 293T-PD1 结合活性均优于 PD1 单靶点对照抗体 14C12H1L1，提示 P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R 具有有

效结合 293T-PD1 膜表面 PD-1 的活性。

表 7: FACS 检测 P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R 和 14C12H1L1 与 293T-PD1 细胞表面 PD-1 的结合活性

浓度(nM)	0.05	0.14	0.41	1.23	3.70	11.11	33.33	100.00	EC50
14C12H1L1	35.69	57.70	129.42	437.62	974.97	1384.91	1174.75	1500.20	2.111
P1D7V01	26.65	58.65	150.57	307.19	530.77	577.76	479.34	531.15	1.000
P1D7V02R	23.44	42.98	108.44	217.56	404.33	426.06	405.29	301.40	1.075
P1D7V03	24.05	49.21	118.03	289.08	384.62	459.40	808.38	343.48	1.377
P1D7V04R	24.79	52.43	112.56	288.79	466.72	1284.73	400.33	360.79	1.57.0

2. FACS 检测抗CD73-抗PD-1 双特异性抗体与 MDA-MB-231 膜表面 CD73 的结合活性

常规胰酶消化对数期 MDA-MB-231 细胞，按 3×10^5 个细胞/管将细胞转移到 1.5ml 离心管，加入 500 μ L PBSA，5600 rpm 离心 5min，去上清；加入 PBSA 稀释的抗体 100 μ L（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 500 μ L PBSA，5600rpm 离心 5min，去上清；加入 500 倍稀释的 FITC 标记羊抗人 IgG 二抗（Jackson，货号：109-095-098）重悬混匀，冰上避光孵育 0.5h；加入 500 μ L PBSA，5600rpm 离心 5min，去上清；加入 200 μ L PBSA 重悬细胞沉淀，并转移至流式管，FACSCalibur 检测。

实验结果如表 8 和图 10 所示，与 MDA-MB-231 膜表面 CD73 的结合活性，P1D7V01 和 P1D7V03 优于 19F3H2L3，其中 P1D7V01 优于同靶点阳性药 MEDI9447。在相同实验条件下，P1D7V01、P1D7V03 与 MDA-MB-231 膜表面 CD73 结合的 EC50 分别为 1.384nM、2.009nM，MEDI9447 和 19F3H2L3 与 MDA-MB-231 膜表面 CD73 结合的 EC50 分别为 1.589nM、2.773nM。

以上实验结果表明，P1D7V01、P1D7V03、19F3H2L3 和同靶点阳性药 MEDI9447 均可呈剂量依赖性与 MDA-MB-231 膜表面 CD73 特异性结合，P1D7V01 和 P1D7V03 的结合活性优于 19F3H2L3，P1D7V01 优于同

靶点阳性药 MEDI9447。提示 P1D7V01、P1D7V03 具有有效结合 MDA-MB-231 膜表面 CD73 的活性。

表 8： FACS 检测 P1D7V01、P1D7V03、MEDI9447 和 19F3H2L3 与 MDA-MB-231 细胞表面 CD73 的结合活性。

浓度(nM)	0.05	0.14	0.41	1.23	3.70	11.11	33.33	100.00	EC50
MEDI9447	32.59	64.38	157.75	388.51	697.80	829.29	930.26	878.04	1.589
19F3H2L3	25.95	45.13	102.56	189.07	466.87	658.72	843.09	639.57	2.773
P1D7V01	23.37	38.02	76.84	271.72	571.56	560.81	525.91	705.50	1.384
P1D7V03	16.96	44.05	106.39	233.32	457.61	525.37	576.19	677.66	2.009

实施例 13：抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体抑制细胞膜表面 CD73 酶活性的检测

1. 检测抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体对 MDA-MB-231 细胞膜表面 CD73 酶活性的抑制

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， 2×10^4 个细胞/100 μ L/孔；用无血清 RPMI-1640 培养液按 2.5 倍进行梯度稀释抗体；将抗体加入 96 孔板，每孔 50 μ L，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时，1 小时后，每孔加入 50 μ L 1200 μ M RPMI-1640 稀释的 AMP（TCL，货号：A0157）；3 小时后取 25 μ L 细胞培养上清，转移至新 96 孔板，每孔加入 25 μ L 100 μ M 的 ATP（TCL，货号：A0158）；每孔加入 50 μ L CTG（CellTiterGlo，Promega，货号：G8641）显色液，进行显色，于多标记微孔板检测仪（PerkinElmer 2140-0020）读取相对荧光强度 RLU。

实验结果如图 11 所示，P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R 与阳性对照药 MEDI9447 的 AMP 含量相当，并且呈浓度依赖关系。

以上实验结果说明加入的 AMP，在无抗体情况下，可被 MDA-MB-231 细胞表面 CD73 的酶活性催化而转化为腺苷 A，而加入抗体后，由于 P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R 抗体与 CD73 结合而降低了其酶催化的活性，使 AMP 不会转化为腺苷 A。提示抗体以非底物竞争的方式有效抑制其酶活反应，降低腺苷的产生。

2. 检测抗CD73-抗PD-1双特异性抗体对U87-MG细胞膜表面CD73酶活性的抑制

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， 2×10^4 个细胞/100 μ L/孔；用无血清RPMI-1640培养液按2.5倍进行梯度稀释抗体，将抗体加入96孔板，每孔50 μ L，37 $^{\circ}$ C孵育1小时；1小时后，每孔加入50 μ L 1200uM RPMI-1640稀释的AMP；3小时后取25 μ L细胞培养上清，转移至新96孔板，每孔加入25 μ L 100 μ M的ATP；每孔加入50 μ L CTG（CellTiterGlo）显色液，进行显色后于多标记微孔板检测仪（PerkinElmer 2140-0020）读取相对荧光强度RLU。

实验结果如图12所示，P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R与阳性对照药MEDI9447的AMP含量相当，并且呈浓度依赖关系。

以上实验结果说明加入的AMP，在无抗体情况下，可被U87-MG细胞表面CD73的酶活性催化而转化为腺苷A，而加入抗体后，由于P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R抗体与CD73结合而降低了其酶催化的功能，使AMP不会转化为腺苷A。提示抗体以非底物竞争的方式有效抑制其酶活反应，降低腺苷的产生。

实施例14：混合淋巴细胞反应MLR检测抗CD73-抗PD-1双特异性抗体促IFN- γ 和IL-2分泌的生物活性

1. 抗CD73-抗PD-1双特异性抗体促Raji-PDL1混合淋巴反应体系分泌IFN- γ 的生物活性检测

Raji-PDL1细胞正常传代培养；复苏PBMC，用10mL 1640完全培养基培养，0.5 μ g/mL的SEB（德诺泰克，货号：S010201）刺激两天；Raji-PDL1细胞用25 μ g/mL的MMC（Sigma，货号：M4287）处理，置于37 $^{\circ}$ C培养箱中1小时；收集SEB刺激2天后PBMC和经MMC处理1小时的Raji-PDL1细胞，PBS洗涤两次，完全培养基重悬计数，分别加入到U型96孔板，100000个细胞/孔；按实验设计加入抗体，于培养箱共培养3天；3天后，收集细胞培养上清，ELISA法进行IFN- γ 检测。

如图 13 所示, 人 PBMC 和 Raji-PDL1 细胞混合培养后对 PBMC 的 IFN- γ 的分泌具有显著促进作用, 在混合培养体系中同时加入抗体能显著诱导 PBMC 进一步分泌 IFN- γ , 促 IFN- γ 分泌活性水平方面, P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R 抗体与其母版 PD-1 单靶点抗体 14C12H1L1 活性相当。

2. 抗CD73-抗PD-1 双特异性抗体促Raji-PDL1 混合淋巴反应体系分泌IL-2 的生物活性检测

Raji-PDL1 细胞正常传代培养; 复苏 PBMC, 用 10mL 1640 完全培养基培养, SEB (0.5 μ g/mL) 刺激两天; Raji-PDL1 细胞用 25 μ g/mL 的 MMC 处理, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中 1 小时; 收集 SEB 刺激 2 天后的 PBMC 和经 MMC 处理 1 小时的 Raji-PDL1 细胞, PBS 洗两次, 完全培养基重悬计数, 分别加入到 U 型 96 孔板, 100000 个细胞/孔; 按实验设计加入抗体, 共培养 3 天; 收集细胞培养上清, ELISA 法进行 IL-2 检测。

如图 14 所示, 人 PBMC 和 Raji-PDL1 细胞混合培养后对 PBMC 的 IL-2 的分泌有一定的促进作用, 在混合培养体系中同时加入抗体能显著诱导 PBMC 进一步分泌 IL-2, 具有显著剂量依赖关系, 促 IL-2 分泌活性水平方面, 双功能抗体 P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R 在低浓度活性略低于其母版 PD-1 单靶点抗体 14C12H1L1, 而中高浓度与其相当, 与 PD1 靶点阳性对照药 Nivolumab 相比, P1D7V01、P1D7V02R、P1D7V03、P1D7V04R 在三个不同抗体浓度水平都具更佳的促 IL-2 分泌潜能。

3. 抗CD73-抗PD-1 双特异性抗体促DC 混合淋巴反应体系分泌IFN- γ 的生物活性检测

分离正常人外周血 PBMC, 完全培养基重悬, 接种于培养皿, 置于培养箱过夜培养后, 收集去除悬浮的 PBMC, 皿底贴壁细胞用 PBS 缓冲液洗涤后进行 DC 成熟诱导: 每皿加入含 GM-CSF 和 IL-4 的 RPMI1640 完全培养基 10mL, GM-CSF 和 IL-4 浓度均为 1000U/mL, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5%二氧化碳培养箱中培养三天; 半量换液, 补加 GM-CSF、IL-4 各 1000U/mL, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5%二氧化碳培养箱中继续培养三天; 三天后再次半量换液, 加

入 GM-CSF、IL-4 各 1000U/mL, TNF- α 100U/mL, 继续培养两天; 新鲜分离另外供者的 PBMC, 细胞计数后接种至 96 孔板, 100000 个细胞/孔; 收集诱导成熟的 DC 细胞, 用完全培养基洗涤一次, 细胞计数, 接种至含 PBMC 的 96 孔板, 10000 个细胞/孔; 按实验设计加入抗体, 混匀后置于 37°C, 5%二氧化碳培养箱中共培养 5 天; 5 天后, 收集细胞培养上清, ELISA 法进行 IFN- γ 定量检测。

结果如图 15 所示, 相比单独 DC 或 PBMC 培养, DC 与 PBMC 的混合培养可显著促进 IFN- γ 的分泌; 与同型对照相比, 在 DC 与 PBMC 二者混合培养的基础上加入抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体, 可见 IFN- γ 分泌水平进一步提高。

抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体促 DC 混合淋巴反应体系分泌 IL-2 的生物活性检测分离正常人外周血 PBMC, 完全培养基重悬, 接种于培养皿, 置于培养箱过夜培养后, 收集去除悬浮的 PBMC, 皿底贴壁细胞用 PBS 缓冲液洗涤后进行 DC 成熟诱导; 每皿加入含 GM-CSF 和 IL-4 的 RPMI1640 完全培养基 10mL, GM-CSF 和 IL-4 浓度均为 2000U/mL, 置于 37°C, 5%二氧化碳培养箱中培养三天; 半量换液, 加入 50ng/mL 的 IFN- γ 和 100ng/mL 的 LPS, 继续培养两天; 复苏另外供者的 PBMC, 细胞计数后接种至 96 孔板, 100000 个细胞/孔; 收集诱导成熟的 DC 细胞, 用完全培养基洗涤一次, 细胞计数, 接种至含 PBMC 的 96 孔板, 10000 个细胞/孔; 按实验设计加入抗体, 混匀后置于 37°C, 5%二氧化碳培养箱中共培养 5 天; 5 天后, 收集细胞培养上清, ELISA 法进行 IL-2 定量检测。结果如图 16 所示, 相比单独 DC 或 PBMC 培养, DC 与 PBMC 的混合培养可显著促进 IL-2 的分泌; 与同型对照相比, 在 DC 与 PBMC 二者混合培养的基础上加入抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体, 可见 IL-2 分泌水平进一步提高。

实施例 15: 抗 PD-1/CD73 双特异性抗体 NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4 的制备

双特异性抗体 NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4 的结构模式属于 Morrison 模式 (IgG-scFv), 即在一个 IgG 抗体的两条重链的 C 端均通过连接片段连接另一个抗体的 scFv 片段, 其重链和轻链的

设计组成如下面的表 9。

由于其免疫球蛋白部分的恒定区区域引入了氨基酸突变以消除其与 FcγR 的结合活性，因此 NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4 在本文及在申请号为 202110270671. X 的中国发明专利中又写为 NTPDV1(hG1TM)、NTPDV2(hG1TM)、NTPDV3(hG1TM)、NTPDV4(hG1TM)。

表 9：NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4 的序列设计

	重链			轻链
	免疫球蛋白部分	连接片段	scFv 部分	
NTPDV1	19F3H2 (hG1TM)	Linker1	14C12H1 _V -Linker 2-14C12L1 _V	19F3L3
NTPDV2			14C12H1 _V -Linker 1-14C12L1 _V	
NTPDV3			14C12H1 _V -Linker 2-14C12L1 _V	19F3L2
NTPDV4			14C12H1 _V -Linker1-14C12L1 _V	

上面的表 9 中：

右下角标注“V”的，是指相应重链的可变区或者相应轻链的可变区。没有标注“V”的，相应重链或者轻链为包含恒定区的全长。这些可变区或者全长的氨基酸序列及其编码核酸序列均参照上面的实施例中记载的相应序列。

Linker1 的氨基酸序列为(GGGGS)结构重复 4 次，即(GGGGS)₄ 或者 (G4S)₄（核苷酸序列 SEQ ID NO:80，氨基酸序列 SEQ ID NO:79）；

Linker2 的氨基酸序列为(GGGGS)结构重复 3 次，即(GGGGS)₃ 或者 (G4S)₃（核苷酸序列 SEQ ID NO:82，氨基酸序列 SEQ ID NO:81）。

NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4 中免疫球蛋白部分中的轻链 19F3L2 和 19F3L3 的 3 个 CDR 序列为和 19F3 中轻链 CDR 序列一致。

NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4 中免疫球蛋白部分中的 19F3H2(hG1TM) 的 3 个 CDR 序列为和 19F3 中重链 CDR 序列一致。

NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4 中的 scFv 部分的

14C12H1V-Linker2-14C12L1V 和 14C12H1V-Linker1-14C12L1V 的 CDR 序列和 14C12 中的重链 CDR 和轻链 CDR 一致。

NTPDV2 和 NTPDV4 重链的氨基酸序列一致，记为 NTPDH2/4 (SEQ ID NO:83)，NTPDV2、NTPDV4 的重链的核苷酸序列为 SEQ ID NO:84。

NTPDV1 和 NTPDV3 的重链的氨基酸序列一致，记为 NTPDH1/3(SEQ ID NO:85)，NTPDV1 和 NTPDV3 的重链的核苷酸序列为 SEQ ID NO:86。

NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4 中免疫球蛋白部分中的 19F3L3 和 19F3L2 的 3 个 CDR 序列和抗体 19F3 轻链三个 CDR 一致。

NTPDV1、NTPDV2 中的免疫球蛋白部分的轻链 19F3L3 的氨基酸序列和抗体 19F3H2L3(G1M)的轻链序列一致 (SEQ ID NO:28)，NTPDV1、NTPDV2 中的免疫球蛋白部分的轻链 19F3L3 的核苷酸序列为 SEQ ID NO:27。NTPDV3、NTPDV4 中的免疫球蛋白部分的轻链 19F3L2 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:96)，NTPDV3、NTPDV4 中的免疫球蛋白部分的轻链 19F3L2 的核苷酸序列为 SEQ ID NO:100。

(1) NTPDV1，其重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:85 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:28 所示，连接片段 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:79 所示，14C12H1V 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:66 所示，连接片段 2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:81 所示，14C12L1V 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:68 所示，

(2) NTPDV2，其重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:85 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:28 所示，连接片段 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:79 所示，14C12H1V 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:66 所示，连接片段 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:79 所示，14C12L1V 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:68 所示，

(3) NTPDV3，其重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:85 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:96 所示，连接片段 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:79 所示，14C12H1V 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:66 所示，连接片段 2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:81 所示，14C12L1V 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:68

所示，和

(4) NTPDV4，其重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:85 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:96 所示，连接片段 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:79 所示，14C12H1V 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:66 所示，连接片段 1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:79 所示，14C12L1V 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:68 所示。

抗体的表达和纯化

分别将 NTPDV1、NTPDV3 的重链 cDNA 和 NTPDV2、NTPDV4 的重链 cDNA 序列，以及其轻链的 cDNA 序列克隆到 pUC57simple（金斯瑞公司提供）载体中，分别获得 pUC57simple-NTPDH2/4，pUC57simple-NTPDH1/3 和 pUC57simple-19F3L3 质粒和 pUC57simple-19F3L2 质粒。

分别将质粒 pUC57simple-NTPDH2/4 和 pUC57simple-19F3L3 质粒、pUC57simple-NTPDH2/4 和 pUC57simple-19F3L2 质粒、pUC57simple-NTPDH1/3 和 pUC57simple-19F3L3 质粒、pUC57simple-NTPDH1/3 和 pUC57simple-19F3L2 质粒进行酶切（HindIII&EcoRI），电泳回收得到的重链轻链分别亚克隆到 pcDNA3.1 载体中，得到 pcDNA3.1-NTPDH2/4 和 pcDNA3.1-19F3L3 质粒、pcDNA3.1-NTPDH2/4 和 pcDNA3.1-19F3L2 质粒、pcDNA3.1-NTPDH1/3 和 pcDNA3.1-19F3L3 质粒、pcDNA3.1-NTPDH1/3 和 pcDNA3.1-19F3L2 质粒，提取重组质粒共转染 293F 细胞。细胞培养 7 天后，将培养液通过高速离心、上清浓缩后上样至 HiTrap MabSelect SuRe 柱，用 Elution Buffer 一步洗脱蛋白并回收目标样品并换液至 PBS。

按照前述制备例中提及的表达和纯化方法获得纯化的抗体 NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4。

实施例 16: ELISA 方法测定抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体与抗原的结合活性

1.ELISA 方法分别测定 NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4 与抗原 PD-1-mFc 的结合活性。

将 PD-1-mFc (0.5 µg/ml) 包被酶标板置于 4℃ 孵育过夜，然后使用 PBST 洗板包被了抗原的酶标板 1 次，再使用 1% BSA 的 PBS 溶液作为封闭液在 37℃ 下对酶标板进行封闭 2 小时。酶标板封闭结束后用 PBST 洗板 3 次，加入 PBST 溶液梯度稀释的抗体（抗体稀释梯度详见表 2），加入待测抗体的酶标板置于 37℃ 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 Fc (Jackson, 货号：109-035-098) 二抗工作液，然后置于 37℃ 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 8min，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。

检测结果如表 10 所示。可知，NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4 与抗原 PD-1-mFc 能够有效的结合，并且其结合效率呈剂量依赖关系，各剂量的吸光度强度见表 10，通过对结合的抗体进行吸光度定量分析，曲线模拟计算获得抗体 NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4、14C12H1L1(hG1TM)（作为对照）的结合效率 EC50 分别为 0.101nM、0.119nM 和 0.110nM、0.123nM、0.031nM。

以上实验结果表明，在相同实验条件下，NTPDV1 、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4 结合 PD-1-mFc 的活性与同靶点阳性药 14C12H1L1(hG1TM)相当，提示 NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4 具有有效结合 PD-1-mFc 的活性。

表 10: ELISA 检测 NTPDV1 、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4、14C12H1L1(hG1TM)与 PD-1-mFc 的结合

抗体稀释浓度 (nM)	抗原包被 PD-1-mFc 0.5 µg/ml									
	NTPDV1		NTPDV2		NTPDV3		NTPDV4		14C12H1L1 (hG1TM)	
5	2.222	2.231	2.249	2.249	2.204	2.171	2.244	2.289	2.399	2.524
1:3	2.206	2.195	2.160	2.223	2.211	2.167	2.222	2.209	2.361	2.441

1:9	2.039	2.027	1.922	2.013	2.010	1.971	1.920	1.944	2.273	2.401
1:27	1.514	1.530	1.425	1.446	1.489	1.414	1.417	1.464	2.071	2.091
1:81	0.880	0.844	0.804	0.802	0.829	0.807	0.794	0.804	1.644	1.691
1:243	0.400	0.396	0.363	0.369	0.386	0.381	0.373	0.379	1.006	1.059
1:729	0.183	0.184	0.176	0.174	0.175	0.174	0.170	0.178	0.503	0.531
0	0.053	0.056	0.055	0.056	0.056	0.056	0.054	0.059	0.057	0.059
二抗	HRP 标记羊抗人 IgG Fc(1:5000)									
EC50 (nM)	0.101		0.119		0.110		0.123		0.031	

2. ELISA 方法分别测定 NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4 与抗原人 NT5E-Biotin 的结合活性

将链霉亲和素 SA(2 $\mu\text{g/ml}$)包被酶标板后置于 4℃ 孵育过夜。孵育结束后使用 PBST 对包被了链霉亲和素的酶标板洗板 1 次，1% BSA 的 PBS 溶液作为酶标板封闭液，对酶标板在 37℃ 进行封闭 2 小时。酶标板封闭结束后用 PBST 洗板 3 次。再加入抗原人 NT5E-Biotin 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 并置于 37℃ 条件下孵育 30 分钟，然后用 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 11），加入待测抗体的酶标板置于 37℃ 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 Fc（Jackson, 货号：109-035-098）二抗工作液，置于 37℃ 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 7min，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。

检测结果如表 11 所示。可知，NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4、19F3H2L3(hG1M)与抗原人 NT5E-Biotin 能够有效的结合，并且其结合效率呈剂量依赖关系（各剂量的吸光度强度见表 11）。通过对结合的抗体进行吸光度定量分析，曲线模拟计算获得抗体 NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4、19F3H2L3(hG1M)（作为对照抗体）的结合效率 EC50 分别为 0.079nM、0.082nM 和 0.084nM、0.077nM、0.029nM。

以上实验结果表明，在相同实验条件下，双特异抗体 NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4 结合人 NT5E-Biotin 的活性与同靶点阳性

药 19F3H2L3(hG1M)相当，提示 NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4 具有有效结合人 NT5E-Biotin 的活性。

表 11：ELISA 检测 NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4、19F3H2L3(hG1M)与人 NT5E-Biotin 的结合

抗体稀 释浓度 (nM)	抗原包被 SA: 2μg/ml									
	人 NT5E-Biotin (0.5μg/ml)									
	NTPDV1		NTPDV2		NTPDV3		NTPDV4		19F3H2L3 (hG1M)	
5	2.286	2.300	2.322	2.333	2.364	2.286	2.298	2.291	2.371	2.383
1:3	2.412	2.347	2.450	2.409	2.381	2.412	2.427	2.421	2.420	2.506
1:9	2.227	2.177	2.226	2.238	2.230	2.081	2.186	2.222	2.322	2.345
1:27	1.795	1.729	1.744	1.746	1.768	1.698	1.734	1.759	2.125	2.162
1:81	1.071	1.070	1.103	1.058	1.068	1.025	1.095	1.125	1.649	1.752
1:243	0.528	0.527	0.540	0.551	0.552	0.534	0.552	0.611	1.067	1.143
1:729	0.273	0.274	0.271	0.275	0.279	0.267	0.275	0.309	0.542	0.601
0	0.092	0.092	0.090	0.087	0.092	0.090	0.092	0.095	0.112	0.206
二抗	HRP 标记羊抗人 IgG Fc(1:5000)									
EC50 (nM)	0.079		0.082		0.084		0.077		0.029	

实施例 17：竞争 ELISA 方法分别测定抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体与人 PD-L1-mFc 竞争结合人 PD-1-mFc-Biotin 的活性

将人 PD-L1-mFc (PD-L1 Genbank ID:NP_054862.1, mFc SEQ ID NO:89) 以 2 μg/mL 包被酶标板后，4℃孵育过夜。孵育结束后用 1%BSA 的 PBS 溶液在 37℃条件下对酶标板进行封闭 2 小时，封闭结束后洗板一次并拍干。在稀释板上以 10 μg/mL 作为起始浓度按照 1:3 的稀释比例将抗体进行梯度稀释至 7 个浓度，并设空白对照，然后加入等体积的 0.3 μg/mL 的人 PD-1-mFc-Biotin 溶液，混匀后在室温孵育 10 分钟。然后将反应后混合液加入到包被好的酶标板，在 37℃条件下孵育 30 分钟。孵育结束用 PBST 洗板三次并拍干，加入 SA-HRP (KPL, 14-30-00) 工作液，在 37℃条件下孵育 30 分钟。孵育完成后洗板四次拍干，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。

各剂量的 OD 值见表 12。通过对结合的抗体进行吸光强度定量分析，曲线模拟抗体的结合效率获得结合 EC50（表 12）。

结果表明，NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4、14C12H1L1(hG1TM)（作为对照）能有效地阻断抗原人 PD-1-mFc-Biotin 与其受体人 PD-L1-mFc 的结合，且阻断效率呈现剂量依赖关系，NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4、14C12H1L1(hG1TM)阻断人 PD-1-mFc-Biotin 与其配体人 PD-L1-mFc 结合的 EC50 分别为 2.249nM、2.253nM、2.332nM、2.398nM、2.216nM、2.231nM。

表 12：NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4、14C12H1L1(hG1TM) 与人 PD-L1-mFc 竞争结合人 PD-1-mFc-Biotin 的活性检测结果

抗体稀释 (nM)	抗原包被:人 PD-L1-mFc 2μg/ml									
	NTPDV1		NTPDV2		NTPDV3		NTPDV4		14C12H1L1(hG1TM)	
50	0.086	0.082	0.084	0.081	0.077	0.087	0.076	0.076	0.081	0.077
1:3	0.083	0.083	0.083	0.084	0.083	0.085	0.084	0.090	0.087	0.082
1:9	0.202	0.195	0.204	0.204	0.195	0.183	0.189	0.214	0.120	0.119
1:27	0.604	0.616	0.564	0.593	0.628	0.598	0.521	0.584	0.576	0.634
1:81	0.837	0.821	0.790	0.809	0.816	0.884	0.782	0.768	0.797	0.871
1:243	0.946	0.938	0.822	0.929	0.895	0.851	0.926	0.891	0.880	0.934
1:729	0.956	0.938	0.884	0.878	0.928	0.923	0.854	0.902	0.901	0.964
0	1.012	0.952	0.891	0.966	0.918	0.983	0.919	0.966	0.904	0.954
人 PD-1-mFc-Biotin: 0.3μg/ml										
二抗 SA-HRP(1:4000)										
EC50 (nM)	2.253		2.332		2.398		2.216		2.231	

实施例 18: 使用 Fortebio 分子相互作用仪测定抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体与抗原人 PD-1-mFc 结合的动力学参数

样品稀释缓冲液为 PBS，0.02%Tween-20，0.1%BSA，pH7.4。将 PD1-mFc 以 5 μg/mL 的浓度固定于 AMC 传感器上，固定高度约为 0.1 nm（时间 60s），传感器在缓冲液中平衡 60s，固定在传感器上的 PD1-mFc 与抗体结合，浓度为 0.62-50 nM（三倍稀释），时间 120s，蛋白在缓冲液中解离，时间 300s。检测温度为 30 度，检测频率为 0.3 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 NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4 和 Nivolumab（作为对照抗体）与人 PD-1-mFc 的亲和力常数测定结果见表 13，检测结果如图 19、图 20、图 21、图 22 和图 18 所示。人源化抗体 NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4 和 Nivolumab 与人 PD-1-mFc 的亲和力常数依次为 $1.40\text{E-}10\text{M}$ ， $7.39\text{E-}11\text{M}$ ， $1.25\text{E-}10\text{M}$ 、 $1.13\text{E-}11\text{M}$ 、 $2.26\text{E-}10\text{M}$ 。以上实验结果表明：NTPDV1、NTPDV3、Nivolumab 的结合能力相当，NTPDV2、NTPDV4 的结合能力优于 Nivolumab，提示人源化抗体 NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4 与人 PD-1-mFc 有较强的结合能力。

表 13: 14C12H1L1(hG1TM)、NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4、Nivolumab 与 PD-1-mFc 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)
14C12H1L1(hG1TM)	4.45E-11	1.18E+06	5.74E+04	5.23E-05	4.47E-05	0.38-0.57
Nivolumab	2.26E-10	1.52E+06	7.79E+04	3.43E-04	4.66E-05	0.25-0.37
NTPDV1	1.40E-10	6.09E+05	2.01E+04	8.55E-05	3.18E-05	0.38-0.52
NTPDV2	7.39E-11	6.83E+05	2.47E+04	5.05E-05	3.50E-05	0.40-0.55
NTPDV3	1.25E-10	6.68E+05	2.52E+04	8.35E-05	3.44E-05	0.38-0.50
NTPDV4	1.13E-11	5.35E+05	1.59E+04	6.03E-06	2.77E-05	0.35-0.47

KD 为亲和力常数； $KD=kdis/kon$

实施例 19: 使用 ForteBio 分子相互作用仪测定抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体与抗原人 NT5E (1-552)-his 结合的动力学参数。

样品稀释缓冲液为 PBS，0.02%Tween-20，0.1%BSA，pH7.4。将 HNT5E(1-552)-His 以 $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的浓度固定于 HIS1K 传感器上，固定高度约为 0.4 nm（时间 50s），传感器在缓冲液中平衡 60s，固定在传感器上的 HNT5E(1-552)-His 与抗体结合，浓度为 0.31-25 nM（三倍稀释），时间 100s，蛋白在缓冲液中解离，时间 180s。检测温度为 30 度，检测频率为 0.3 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(hG1M)（作为对照抗体）、NTPDV1、NTPDV2、

NTPDV3、NTPDV4 与人 NT5E (1-552)-his 的亲和力常数测定结果见表 14，检测结果如图 24-27 所示。人源化抗体 NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4 与人 NT5E (1-552)-his 的亲和力常数依次为 3.29E-11M，2.88E-11M、7.92E-11M、5.77E-11M。

以上实验结果表明：19F3H2L3(hG1M)、NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4 的结合能力相当，提示人源化抗体 NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4 与人 NT5E(1-552)-his 有较强的结合能力。

表 14： 19F3H2L3(hG1M)、NTPDV1、NTPDV2、NTPDV3、NTPDV4 与人 NT5E(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)
19F3H2L3 (hG1M)	4.05E-11	1.16E+06	6.50E+04	4.68E-05	8.96E-05	0.36-0.77
NTPDV1	3.29E-11	1.16E+06	3.27E+04	3.80E-05	4.63E-05	0.49-0.61
NTPDV2	2.88E-11	1.27E+06	3.84E+04	3.66E-05	4.88E-05	0.63-0.71
NTPDV3	7.92E-11	1.28E+06	4.08E+04	1.02E-04	5.29E-05	0.55-0.65
NTPDV4	5.77E-11	1.23E+06	3.82E+04	7.09E-05	4.95E-05	0.52-0.63

K_D 为亲和力常数； $K_D=kdis/kon$

实施例 20：抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体抑制 U87-MG 细胞膜表面 CD73 酶活性的检测

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， 2.5×10^4 个细胞/60 μ L/孔；用无血清 RPMI-1640 培养液按实验设计浓度进行梯度稀释抗体，将抗体加入 96 孔板，每孔 60 μ L，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时；1 小时后，每孔加入 60 μ L 600uM RPMI-1640 稀释的 AMP；3 小时后取 100 μ L 细胞培养上清，转移至新 96 孔板，每孔加入 40 μ L CTG (CellTiterGlo) 显色液，室温避光放置 5min；5min 后，每孔加入 10 μ L 300 μ M 的 ATP，进行显色后于多标记微孔板检测仪 (PerkinElmer 2140-0020) 读取相对荧光强度 RLU。

实验结果如表 15 和图 28 所示，NTPDV2 与阳性对照药 MEDI9447

的 AMP 含量相当。

以上实验结果说明加入的 AMP，在无抗体情况下，可被 U87-MG 细胞表面 CD73 的酶活性催化而转化为腺苷 A，而加入抗体后，由于 NTPDV2 抗体与 CD73 结合而降低了其酶催化的功能，使 AMP 不会转化为腺苷 A。提示抗体以非底物竞争的方式有效抑制其酶活反应，降低腺苷的产生。

表 15. 抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体抑制 U87-MG 细胞膜表面 CD73 酶活性的检测

抗体名称	MEDI9447	19F3H2L3(hG1M)	NTPDV2
IC50 (nM)	0.1189	0.3647	0.5551

实施例 21：混合淋巴细胞反应 MLR 检测抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体促 IFN- γ 和 IL-2 分泌的生物活性

1. 抗CD73-抗PD-1 双特异性抗体促Raji-PDL1 混合淋巴反应体系分泌IFN- γ 的生物活性检测

Raji-PDL1 细胞正常传代培养；复苏 PBMC，用 10mL 1640 完全培养基培养，0.5 μ g/mL 的 SEB(德诺泰克，货号：S010201)刺激两天；Raji-PDL1 细胞用 25 μ g/mL 的 MMC（丝裂霉素 C，Stressmarq，目录：SIH-246，批号：SM286474）处理，置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中 1 小时；收集 SEB 刺激 2 天后 PBMC 和经 MMC 处理 1 小时的 Raji-PDL1 细胞，PBS 洗涤两次，完全培养基重悬计数，分别加入到 U 型 96 孔板，1 $\times$ 10⁵ 个细胞/孔；按实验设计加入抗体，于培养箱共培养 3 天；3 天后，收集细胞培养上清，ELISA 法进行 IFN- γ 检测。

如图 29 所示，人 PBMC 和 Raji-PDL1 细胞混合培养后对 PBMC 的 IFN- γ 的分泌具有显著促进作用，在混合培养体系中同时加入抗体能显著诱导 PBMC 进一步分泌 IFN- γ ，促 IFN- γ 分泌活性水平方面，NTPDV2 抗体与其母版 PD-1 单靶点抗体 14C12H1L1 活性相当。

2. 抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体促 Raji-PDL1 混合淋巴反应体系分泌 IL-2 的生物活性检测

Raji-PDL1 细胞正常传代培养；复苏 PBMC，用 10mL 1640 完全培养基培养，SEB (0.5μg/mL) 刺激两天；Raji-PDL1 细胞用 25μg/mL 的 MMC 处理，置于 37℃ 培养箱中 1 小时；收集 SEB 刺激 2 天后的 PBMC 和经 MMC 处理 1 小时的 Raji-PDL1 细胞，PBS 洗两次，完全培养基重悬计数，分别加入到 U 型 96 孔板，1x10⁵ 个细胞/孔；按实验设计加入抗体，共培养 3 天；收集细胞培养上清，ELISA 法进行 IL-2 检测。

如图 29 所示，人 PBMC 和 Raji-PDL1 细胞混合培养后对 PBMC 的 IL-2 的分泌有一定的促进作用，在混合培养体系中同时加入抗体能显著诱导 PBMC 进一步分泌 IL-2，具有显著剂量依赖关系，促 IL-2 分泌活性水平方面，双功能抗体 NTPDV2 在低浓度活性与其母版 PD-1 单靶点抗体 14C12H1L1 相当，而中高浓度略低于母版 PD-1 单靶点抗体 14C12H1L1。

实施例 22：抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体体内抑制肿瘤生长实验

为检测抗 CD73-抗 PD-1 双特异性抗体的体内抑瘤活性，首先用 MC38-hPDL1/hCD73 细胞（来源于江苏集萃药康生物科技有限公司），皮下接种到 5-7 周龄的雌性 C57BL6-hPD1hPDL1hCD73 三转基因小鼠（来源于江苏集萃药康生物科技有限公司），造模与具体的给药方式见表 16。给药后测量各组肿瘤的长宽，计算肿瘤体积。

表 16：实验设计。

分组	n	肿瘤异种移植	给药情况
同型对照	8	MC38-hPDL1/hCD73, 1 百万个细胞/鼠,皮下	同型对照抗体 hIgG, 10 mg/kg, 每周给药两次, 给药三周
19F3H2L3 (hG1M)	8		19F3H2L3(hG1M), 10 mg/kg, 每周给药两次, 给药三周
NTPDV2	8		NTPDV2, 13.3 mg/kg 每周给药两次, 给药三周
NTPDV2	8		NTPDV2, 1.33 mg/kg 每周给药两次, 给药三周

实验结果如图 30、图 31 所示，结果表明：相比同型对照抗体 hIgG，

19F3H2L3(hG1M)，不同剂量 NTPDV2 均能有效抑制小鼠肿瘤的生长，且高剂量 NTPDV2 对肿瘤的抑制优于低剂量 NTPDV2。此外，NTPDV2 对荷瘤小鼠体重无影响。

实验例 23：Fc 段突变可有效消除由双特异性免疫检查点抑制剂 PD-1/CD73 双特异性抗体介导的 IL-8 和 IL-6 的分泌

HPMM 由 PBMC 诱导而来。本研究中所使用的 PBMC 均为在中山康方生物医药有限公司分离制备，且经提供者知情同意。

Ficoll-Paque PLUS 淋巴细胞分离液（GE，货号：17-1440-03）；RPMI 1640（Gibco，货号：22400-105）；CHO-K1-PD1 细胞（中山康方生物医药有限公司构建）；U87-MG 细胞（细胞来源于 ATCC，购自北京中原领先科技有限公司）；FBS（Fetal Bovine Serum，Excell bio，货号：FSP500）；人 IFN- γ 蛋白（sinobio，货号：11725-HNAS-100）；LPS（Lipopolysaccharides），脂多糖（sigma，货号：L4391）；96 孔细胞培养板（康宁）。

按照分离液 Ficoll-PaqueTM Plus 试剂说明书分离健康人 PBMC 并用含 2% FBS 的 1640 培养基重悬，在 37℃，5%CO₂ 细胞培养箱中放置。2h 后去除上清，贴壁细胞用 PBS 洗涤 2 次，加入 1640 完全培养基（含 10%FBS）以及 100ng/mL 人 M-CSF 诱导 7 天。第 3 天和第 5 天换液并补充 M-CSF 以诱导 HPMM。第 7 天 HPMM 诱导完成后收集，用完全培养基调整浓度为 10 万/mL 并分装至 96 孔板中，并加入重组人 IFN- γ （50ng/mL），放置培养箱孵育 24h。24h 后收集对数期的表达 PD-1 的 CHO-K1-PD1 细胞或者组成性表达 CD73 的 U87-MG 细胞，重悬后用完全培养基调整浓度为 30 万/mL。抗体用完全培养基稀释至工作浓度为 25nM、2.5nM、0.25nM。并同时设计同型对照抗体和空白对照。将 96 孔板中上清去掉，加入 CHO-K1-PD1 或者 U87-MG 细胞悬液和抗体（终体积 200 μ L）混匀，放置培养箱孵育 24h。500xg 离心 5min 后收集上清并用达科为试剂盒检测 IL-8、IL-6 分泌量。LPS 作为阳性对照药物，实验中由完全培养基调整浓度为 100 ng/mL。

本实施例中，CHO-K1-PD1 及 U87-MG 细胞作为靶细胞与 HPMM

共培养可诱导 HPMM 活化，活化的 HPMM 通过抗体 Fab 链接靶细胞后，抗体 Fc 段与 HPMM 上的 $\text{Fc}\gamma\text{R}$ 作用，引起 HPMM 分泌细胞因子。

3. 实验结果

如图 32-图 35 所示。

结果显示，相较于野生型 IgG1 亚型的 PD-1 抗体或者 CD73 抗体，携带有 Fc 段突变的抗 PD-1/CD73 双特异性抗体能够有效地消除免疫细胞的 IL-6 和/或 IL-8 的分泌。

以上对本发明的较佳实施方式进行了具体说明，但本发明创造并不限于所述实施例，熟悉本领域的技术人员在不违背本发明精神的前提下还可做出种种的等同变型或替换，这些等同的变型或替换均包含在本申请权利要求所限定的范围内。

序列表

19F3 的重链可变区核苷酸序列:

GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGACCAGAGCTGGTGAAGCCTGGCGCCTCCATGCGGAT
GTCTTGTAAGGCCTCTGGCTACAGCTTCACCGCTATACAATGAACTGGGTGAAGCAGTCT
CACGGCAAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCTTACAATGCCGGCACCAGCTATA
ACCAGAAGTTTAAGGGCAAGGCCACCCTGACAGTGGACAAGAGCTCCTCTACCGCCTACATG
GAGCTGCTGTCCCTGACATCTGAGGATAGCGCCGTGTACTATTGCGCCCCGGTCCGAGTACAG
ATATGGCGGCGACTACTTTGATTATTGGGGGCCAGGGCACCACACTGACAGTGAGCTCC

(SEQ ID NO:1, 下划线表示 CDR 序列)

19F3 的重链可变区氨基酸序列:

EVQLQQSGPELVKPGASMRMSCKASGYSFTGYTMNWWVKQSHGKNLEWIGLINPYNAGTS
YNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARSEYRYGGDYFDYWGQGTTLVSS

(SEQ ID NO:2, 下划线表示 CDR 序列)

19F3 的 HCDR1: GYSFTGYT

(SEQ ID NO:3)

19F3 的 HCDR2: INPYNAGT

(SEQ ID NO: 4)

19F3 的 HCDR3: ARSEYRYGGDYFDY

(SEQ ID NO:5)

19F3 轻链可变区的核苷酸序列:

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAAGCTCCCTGGCAATGAGCGTGGGACAGAAGGTGAC
AATGTCTTGTAAGTCTAGCCAGAGCCTGCTGAACTCCTCTAATCAGAAGAACTACTGGCC
TGGTATCAGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAGCTGCTGGTGTACTTTTGCCAGCACCAGGG
AGTCCGGAGTGCCTGACAGATTCATCGGCTCCGGCTCTGGCACAGACTTCACCCTGACAATC
AGCTCCGTGCAGGCAGAGGACCTGGCAGATTATTTCTGCCAGCAGCACTACGACACCCCTT
ATACATTTGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

(SEQ ID NO:6, 下划线表示 CDR 序列)

19F3 轻链可变的氨基酸序列:

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFASTR
ESGVPDRFIGSGSGTDFLTISVQAEDLADYFCQQHYDTPYTFGGGTKLEIK

(SEQ ID NO:7, 下划线表示 CDR 序列)

19F3 的 LCDR1 氨基酸序列: QSLNSSNQKNY

(SEQ ID NO:8)

19F3 的 LCDR2 氨基酸序列: FAS

(SEQ ID NO:9)

19F3 的 LCDR3 氨基酸序列: QQHYDTPYT

(SEQ ID NO:10)

19F3 重链的骨架区氨基酸序列:

FR-H1: EVQLQQSGPELVKPGASMRMSCKAS (SEQ ID NO:11)

FR-H2: MNWVKQSHGKNLEWIGL (SEQ ID NO:12)

FR-H3: SYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYC (SEQ ID NO:13)

FR-H4: WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:14)

19F3 轻链的骨架区氨基酸序列:

FR-L1: DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSS (SEQ ID NO:15)

FR-L2: LAWYQQKPGQSPKLLVY (SEQ ID NO:16)

FR-L3: TRESGVPDRFIGSGSGTDFLTITSSVQAEDLADYFC (SEQ ID NO:17)

FR-L4: FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:18)

19F3H2 的核苷酸序列: (SEQ ID NO:19, 下划线表示 CDR 序列)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTGTGAAGG
 TGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGCTATACAATGAACTGGGTGAGGCAGG
 CACCAGGACAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCTTACAATGCCGGCACCTCTT
 ATAACCAGAAGTTTCAGGGCAAGGTGACCCTGACAGTGGACAAGTCCACCTCTACAGCCTA
 CATGGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGCCGTGTACTATTGCGCCCCGGTCCGAG
TACAGATATGGCGGCGACTACTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCACACTGACCGTGTCT
 AGC

19F3H2 的氨基酸序列: (SEQ ID NO:20, 下划线表示 CDR 序列)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQNLEWIGLINPYNAGTS
 YNQKFQKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCARSEYRYGGDYFDYWGQGTTLTVSS

19F3L2 的核苷酸序列: (SEQ ID NO:21, 下划线表示 CDR 序列)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCCGTGTCTGTGGGAGAGCGGGTGAC
 AATCTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAACTCCTCTAATCAGAAGAACTACCTGGC
 CTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTTTCGCCTCTACCAGG
 GAGAGCGGAGTGCCAGACAGATTCTCTGGCAGCGGCTCCGGCACAGACTTCACCCTGACAA
 TCAGTCCGTGCAGGCAGAGGACGTGGCAGATTACTATTGCCCAGCAGCACTACGATACCC
CCTATACATTTGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

19F3L2 的氨基酸序列: (SEQ ID NO:22, 下划线表示 CDR 序列)

DIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLIYFASTRES
 GVPDRFSGSGSGTDFLTITSSVQAEDVADYYCQQHYDTPYTFGGGTKLEIK

19F3L3 的核苷酸序列: (SEQ ID NO:23, 下划线表示 CDR 序列)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCCGTGTCTGTGGGAGAGCGGGTGAC
 AATCTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAACTCCTCTAATCAGAAGAACTACCTGGC
 CTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTTTCGCCTCTACCAGG
 GAGAGCGGAGTGCCAGACAGATTCTCTGGCAGCGGCTCCGGCACAGACTTCACCCTGACAA
 TCAGTCCCTGCAGGCAGAGGACGTGGCCGTGTACTATTGCCCAGCAGCACTACGATACCCC
CTATACATTTGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

19F3L3 的氨基酸序列：（SEQ ID NO:24，下划线表示 CDR 序列）

DIVMTQSPSSLAIVSVGERVTISCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLIYFASTRES
GVPDFRFGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYDTPYTFGGGTKLEIK

19F3H2L3(G1M) 的重链核苷酸（SEQ ID NO:25，下划线区域是非可变区序列）

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTGTGAAGGTGA
GCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTCACCGGCTATACAATGAACTGGGTGAGGCAGGCACCA
GGACAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCTTACAATGCCGGCACCTCTTATAACCAG
AAGTTTCAGGGCAAGGTGACCCTGACAGTGGACAAGTCCACCTCTACAGCCTACATGGAGCT
GAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGATATGG
CGGCGACTACTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCACACTGACCGTGTCTAGCGCCTCCACAA
AG ggG ccC agc gtg ttt cct ctc gcc ccc tcc tcc aaa a
gcaccagcggaggaaccgctgctctcggatgtctggtgaaggactacttccctgaacccgtcaccgtgag
ctggaatagcggcgtctgacaagcggagtccatacattccctgctgtgctgcaaagcagcggactctat
tccctgtccagcgtcgtcacagtgtccagcagcagcctgggcacccagacctaactctgtaacgtcaacc
acaagccctccaacaccaaggtggacaagaagtgagcccaaatcctgcgacaagacacacacctgtcc
ccctgtcctgctcccgaa**GCTGCT**ggaggccctagcgtcttccctcttctcctcccaaacccaaggacac
cctcatgatcagcagaacccctgaagtcacctgtgtcgtcgtggtggtcagccatgaggaccccgaggtg
aaattcaactggtatgtcgatggcgtcgaggtgcacaacgcaaaaccaagcccaggagggaacagtaca
actccacctacaggggtggtgtccgtgctgacagtcctccaccaggactggctgaacggcaaggagtacaa
gtgcaaggtgtccaacaaggctctccctgccccattgagaagaccatcagcaaggccaaaggccaaccc
aggagaccccgaggtctatacactgcctccctccaggagacgaactcaccaagaaccaggtgtccctgacct
gcctggtcaagggtctttatcccagcgacatcgccgtcgagtgggagtccaacggacagcccgagaataa
ctacaagaccacccctcctgtcctcgactccgacggctccttcttctgtacagcaagctgaccgtggac
aaaagcaggtggcagcagggaaacgtgttctcctgcagcgtgatgcaggaagccctccacaaccactaca
ccagaaaagcctgtccctgagccccggcaaatga

19F3H2L3(G1M) 的重链氨基酸（SEQ ID NO:26，下划线区域是非可变区序列）

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQNLEWIGLINPYNAGTSYNQKFQGVTL
TVDKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARSEYRYGGDYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPETVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

19F3H2L3(G1M) 的轻链核苷酸（SEQ ID NO:27，下划线区域是非可变区序列）

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCCGTGTCTGTGGGAGAGCGGGTGACAAT
CTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAACTCCTCTAATCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTA
TCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTTCGCCTCTACCAGGGAGAGCG
GAGTGCCAGACAGATTCTCTGGCAGCGGCTCCGGCACAGACTTACCCTGACAATCAGCTCC
CTGCAGGCAGAGGACGTGGCCGTGTACTATTGCCAGCAGCACTACGATACCCCTATACATTT
GGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCAGCCCCATCTGTCTTCATTTTCCCCCT
AGTGACGAGCAGCTGAAATCCGGAACAGCCTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCTCGCGAAG
CCAAGGTGCAGTGGAAGTCGATAACGCTCTGCAGAGGTGGCAATTCACAGGAGAGCGTGACTGAACAGGA

CTCCAAGGATTCTACCTATAGTCTGAGCTCCACTCTGACCCTGTCCAAAGCAGATTACGAAAAGCACAAA
GTGTATGCCTGTGAGGTACCCACCAGGGCTGAGTTCCTCAGTCACCAAATCCTTCAACAGAGGCGAAT
GT

19F3H2L3(G1M)的轻链氨基酸 (SEQ ID NO:28, 下划线区域是非可变区序列)

DIVMTQSPSSSLAVSVGERVTISCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLIYFASTRESGVPDRFSG
SGSGTDFTLTIISSLAEDVAVYYCQQHYDTPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC

19F3H2L3(hG1TM)的重链核苷酸 (SEQ ID NO:29, 下划线区域是非可变区序列)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTGTGAAGGTGA
GCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTACCGGCTATACAATGAACTGGGTGAGGCAGGCACCA
GGACAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCTTACAATGCCGGCACCTCTTATAACCAG
AAGTTTCAGGGCAAGGTGACCCTGACAGTGGACAAGTCCACCTCTACAGCCTACATGGAGCT
GAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGATATGG
CGGCGACTACTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCACACTGACCGTGTCTAGCGCCTCCACAA
AG ggG ccC agc gtg ttt cct ctc gcc ccc tcc tcc aaa a
gcaccagcggaggaaccgctgctctcgatgtctggtgaaggactacttccctgaaccgctcaccgtgag
ctggaatagcggcgctctgacaagcggagtccatacatccctgctgtgctgcaaagcagcggactctat
tccctgtccagcgtcgtcacagtgccagcagcagcctgggcacccagacctaactctgtaacgtcaacc
acaagccctccaacaccaaggtggacaagaaagtggagcccaaatcctgcgacaagacacacacctgtcc
cccctgtcctgctcccgaa**GCTGCT**gga**GCC**cctagcgtcttctcttcttctcccaaacccaaggacac
cctcatgatcagcagaacccctgaagtcacctgtgtcgtcgtggtgatgtcagccatgaggaccccgaggtg
aaattcaactggtatgtcgatggcgtcgaggtgcacaacgcaaaaccaagcccaggagggaacagtaca
actccacctacaggggtggtgtccgtgctgacagtcctccaccaggactggctgaacggcaaggagtacaa
gtgcaaggtgtccaacaaggctctccctgccccattgagaagaccatcagcaaggccaaaggccaaccc
aggagaccccggtctatacactgcctccctccaggagacgaactcaccaagaaccaggtgtccctgacct
gcctggtcaagggtcttttatcccagcgacatcgccgtcgagtgggagtccaacggacagcccgagaataa
ctacaagaccacccctcctgtcctcgactccgacggctccttcttctgtacagcaagctgaccgtggac
aaaagcaggtggcagcagggaaacgtgttctcctgcagcgtgatgcacgaagccctccacaaccactaca
ccagaaaaagcctgtccctgagccccggcaaatga

19F3H2L3(hG1TM)的重链氨基酸序列: (SEQ ID NO:30)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYSTFTYTMNWVRQAPGQNLEWIGLINPYNAGTSY
NQKFQGKVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSEYRYGGDYFDYWGQGTTLTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

19F3H2 的骨架区氨基酸序列:

FR-H1: QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS (SEQ ID NO:31)

FR-H2: MNWVRQAPGQNLEWIGL (SEQ ID NO:32)

FR-H3: SYNQKFQGKVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYC (SEQ ID NO:33)

FR-H4: WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:34)

19F3L2 的骨架区氨基酸序列:

FR-L1: DIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSS (SEQ ID NO:35)

FR-L2: LAWYQQKPGQAPKLLIY (SEQ ID NO:36)

FR-L3: TRESGVPDFRSGSGSGTDFTLTISVQAEDVADYYC (SEQ ID NO:37)

FR-L4: FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:38)

19F3L3 的骨架区氨基酸序列:

FR-L1: DIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSS (SEQ ID NO:39)

FR-L2: LAWYQQKPGQAPKLLIY (SEQ ID NO:40)

FR-L3: TRESGVPDFRSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC (SEQ ID NO:41)

FR-L4: FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:42)

14C12 重链可变区核苷酸序列: (SEQ ID NO:43)

GAGGTCAAAGTGGTGGAGAGCGCGCGGGCTGGTGAAGCCCGCGGGTCACTGAAAC
TGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGTCATGGGTGAGGCAGACCC
CTGAGAAGCGCCTGGAATGGGTGCTACTATCAGCGGAGGCGGGCGATACACCTACTATCCTG
ACTCTGTCAAAGGGAGATTACAATTAGTCGGGATAACGCCAGAAATACTCTGTATCTGCAGA
TGTCTAGTCTGCGGTCCGAGGATACAGCTCTGTACTATTGTGCAAACCGGTACGGCGAAGCAT
GGTTTGCTATTGGGGACAGGGCACCTGGTGACAGTCTCTGCC

14C12 重链可变区氨基酸序列: (SEQ ID NO:44)

EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVATISGGGRYTYYP
DSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDALYYCANRYGEAWFAYWGQGLTVTVSA

14C12 的 HCDR1 氨基酸序列: GFAFSSYD
(SEQ ID NO:45)

14C12 的 HCDR2 氨基酸序列: ISGGGRYT
(SEQ ID NO:46)

14C12 的 HCDR3 氨基酸序列: ANRYGEAWFAY
(SEQ ID NO:47)

14C12 轻链可变区核苷酸序列: (SEQ ID NO:48)

GACATTAAGATGACACAGTCCCCCTCCTCAATGTACGCTAGCCTGGGCGAGCGAGTGACC
TTCACATGCAAAGCATCCAGGACATCAACACATACCTGTCTTGTTTCAGCAGAAGCCAGG
CAAAAGCCCCAAGACCCTGATCTACCGGGCCAATAGACTGGTGGACGGGGTCCCCAGCAGAT
TCTCCGGATCTGGCAGTGGGCAGGATTACTCCCTGACCATCAGCTCCCTGGAGTATGAAGACA
TGGGCATCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTCCCTCTGACCTTTGGAGCAGGCACAAAAC
TGGAAGTGAAG

14C12 轻链可变区氨基酸序列: (SEQ ID NO:49)

DIKMTQSPSSMYASLGERVTFTCKASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRF
SGSGSGQDYSLTISLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK

14C12 的 LCDR1 氨基酸序列: QDINTY (SEQ ID NO:50)

14C12 的 LCDR2 氨基酸序列: RAN (SEQ ID NO:51)

14C12 的 LCDR3 氨基酸序列: LQYDEFPLT (SEQ ID NO:52)

14C12 重链骨架区氨基酸序列:

FR-H1: EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAAS (SEQ ID NO:53)

FR-H2: MSWVRQTPEKRLEWVAT (SEQ ID NO:54)

FR-H3: YYPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDALYYC (SEQ ID NO:55)

FR-H4: WGQGLVTVSA (SEQ ID NO:56)

14C12 轻链骨架区氨基酸序列:

HR-L1: DIKMTQSPSSMYASLGERVTFTCKAS (SEQ ID NO:57)

HR-L2: LSWFQKPGKSPKTLIY (SEQ ID NO:58)

HR-L3: RLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISLEYEDMGIIYYC (SEQ ID NO:59)

HR-L4: FGAGTKLELK (SEQ ID NO:60)

14C12H1 的核苷酸序列: (SEQ ID NO:61)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGGTCACTGCG
ACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTTCGCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGGGTGCGACA
GGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTCGCTACTATCTCAGGAGGCGGGAGATACACCT
ACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAAT
CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAA
CCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGACAGTCTCTA
GT

14C12H1 的氨基酸序列: (SEQ ID NO:62)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRY
TYPDSVKGRFTISRDNKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGLVTVS
S

14C12L1 的核苷酸序列: (SEQ ID NO:63)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGGGT
CACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTTCAGCAGA
AGCCAGGGAAAAGCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGACTGGTGTCTGGAGTC
CCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACACTCTGACCATCAGCTCCCT
GCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCCACTGACCTT
TGGCGCCGGGACAAAACCTGGAGCTGAAG

14C12L1 的氨基酸序列: (SEQ ID NO:64)

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQKPGKSPKTLIYRANRLVSGVP
SRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK

14C12H1L1 的重链核苷酸 (SEQ ID NO:65)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGGTCACTGCG
ACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTTCGCTTTAGCTCCTACGACATGTCCTGGGTGCGACA
GGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTCGCTACTATCTCAGGAGGCGGGAGATACACCT
ACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAAT
CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAA
CCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGACAGTCTCTA
GTGCCAGCACCAAAGGACCTAGCGTGTTCCTCTCGCCCCCTCCTCCAAAAGCACCAGC
GGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAACCCGTCACCGT
GAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGTCCATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAA
GCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAGCGTCGTACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACC
CAGACCTACATCTGTAACGTCAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGT

GGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACACACACCTGTCCCCCTGTCTGCTCCCGAACTCCT
CGGAGGCCCTAGCGTCTTCCTCTTTCTCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCAGCAG
AACCCCTGAAGTCACCTGTGTCTGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAAT
TCAACTGGTATGTCTGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGA
ACAGTACAACCTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCCTCCACCAGGACTGGC
TGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCATTGAG
AAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCC
CTCCAGGGACGAACTACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTT
ATCCCAGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAACTACAA
GACCACCCCTCCTGTCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGT
GGACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAAGCC
CTCCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAA

14C12H1L1 的重链氨基酸序列: (SEQ ID NO:66)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRY
TYYPDSVKGRFTISRDNSKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGLTVTS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSV
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

14C12H1L1 的轻链核苷酸序列: (SEQ ID NO:67)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCGACAGGGT
CACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAGCTGGTTTCAGCAGA
AGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGCTAATAGACTGGTGTCTGGAGTC
CCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGGACAGGACTACACTCTGACCATCAGCTCCCT
GCAGCCTGAGGACATGGCAACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCCACTGACCTT
TGGCGCCGGGACAAAACCTGGAGCTGAAGCGAACTGTGGCCGCTCCCTCCGTCTTCATTT
TTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAATCAGGCACAGCCAGCGTGGTCTGTCTGCTGAAC
AATTTCTACCCTAGAGAGGCAAAAGTGCAGTGGAAGGTCGATAACGCCCTGCAGTCCGG
CAACAGCCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAAAGATAGCACCTATTCCCTGTCTA
GTACACTGACTCTGTCCAAGGCTGATTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCATGCGAAGTG
ACACATCAGGGACTGTCAAGCCCCGTGACTAAGTCTTTTAACCGGGGCGAATGT

14C12H1L1 的轻链氨基酸序列: (SEQ ID NO:68)

DIQMTQSPSSMSASVGDRVFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVSGVP
SRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELKRVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

14C12H1L1(G1TM) 的重链核苷酸序列 (SEQ ID NO:69)

GAAGTGCAGCTGGTCTGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGGGTCACTGCG
ACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTGCGCTTTAGCTCCTACGACATGTCTGGGTGCGACA
GGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTCGCTACTATCTCAGGAGGCGGGAGATACACCT
ACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGGTTCACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAAT

CTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAA
 CCGCTACGGGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGACAGTCTCTA
 GTGCCAGCACCAAAGGGCCCAGCGTGTTTCTCTCGCCCCCTCCTCCAAAAGCACCAGC
 GGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGAACCCGTCACCGT
 GAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGTCCATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAA
 GCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAGCGTCGTCACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACC
 CAGACCTACATCTGTAACGTCAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGT
 GGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACACACACCTGTCCCCCTGTCTGCTCCCGAAGCTG
 CTGGAGCCCCTAGCGTCTTCTCTTTTCTCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCAGCA
 GAACCCCTGAAGTCACCTGTGTCGTCGTCGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAA
 TTCAACTGGTATGTCGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGA
 ACAGTACAACCTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCCTCCACCAGGACTGGC
 TGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCATTGAG
 AAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCC
 CTCCAGGGACGAACCTACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTT
 ATCCCAGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAACTACAA
 GACCACCCCTCTGTCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGT
 GGACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCCTGCAGCGTGATGCACGAAGCC
 CTCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAA

14C12H1L1(G1TM) 的重链氨基酸 (SEQ ID NO:70)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFATSSYDMSWVRQAPGKGLDWVATISGGGRY
 TYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAYWGQGLTVTVS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSG
 LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSV
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
 VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

14C12H1 的重链骨架区氨基酸序列:

FR-H1: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:71)
 FR-H2: MSWVRQAPGKGLDWVAT (SEQ ID NO:72)
 FR-H3: YYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYC (SEQ ID NO:73)
 FR-H4: WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:74)

14C12L1 的轻链骨架区氨基酸序列:

FR-L1: DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRAS (SEQ ID NO:75)
 FR-L2: LSWFQQKPGKSPKTLIY (SEQ ID NO:76)
 FR-L3: RLVSGVPSRFSGSGSQDYTLTISSLQPEDMATYYC (SEQ ID NO:77)
 FR-L4: FGAGTKLELK (SEQ ID NO:78)

Linker1 的氨基酸序列: GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:79)

Linker1 的核苷酸序列: (SEQ ID NO:80)

GGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCGGCTCCGGAGGAGGCGGCTCTGGCGGCGGCGGCAGC

Linker2 的氨基酸序列: GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:81)

Linker2 的核苷酸序列: (SEQ ID NO:82)

GGCGGCGGCGGCTCCGGAGGAGGCGGCTCTGGCGGCGGCGGCAGC

NTPDV2 和 NTPDV4 的重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:83): 其中的免疫球蛋白部分中的 19F3H2(hG1TM) 的 CDR 区域用下划线加粗标识, scFv 部分中的 14C12H1V-Linker1-14C12L1V 的 CDR 区域用下划线加粗标识, 重链区突变氨基酸用斜体加粗标识, linker 区域用加粗标识:

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKAS**GYSTGYT**MNWVRQAPGQNLWIGL**INPYNAGT**SYNQ
KFQGKVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSED~~TAVYYC~~**ARSEYRYGGDYFDY**WGQGTTLTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE**A4GAPSVFLFPPKPKD**TLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWYRQAP
GKGLDWVAIISGGGRYTYPPDSVKGRFTISRDNKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWFAY
WGQGTTLTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSMSASVGDRTFTCRASQDINTYLS
WFQQKPGKSPKTLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGT
KLELKR

NTPDV2 和 NTPDV4 的重链的核苷酸序列: (SEQ ID NO:84)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTGTGAAGG
TGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTACCGGCTATACAATGAAGTGGGTGAGGCAGGCA
CCAGGACAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCTTACAATGCCGGCACCTCTTATAAC
CAGAAGTTTCAGGGCAAGGTGACCCTGACAGTGGACAAGTCCACCTCTACAGCCTACATGGA
GCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGATA
TGGCGGCGACTACTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCACACTGACCGTGTCTAGCgcctccacaaag
gggcccacgctgttctctctgccccctcccaaaagaccagcggaggaaaccgctgctctcgatgtctggtgaaggactacttccctgaaccgctc
accgtgagctggaaatagcggcgtctgacaagcggagtcatactccctgctgtgctgcaaacgagcggactctattccctgtccagcgtcgtcacag
tgcccagcagcagcctgggcaccagacctacatctgtaacgtcaaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagaagtggagcccaaatcctg
cgacaagacacacacctgtccccctgtcctgctcccgaaGCTGCTggagCccctagcgtcttctcttctcccaaaccaaggacacctcat
gatcagcagaaccctgaagtcacctgtgctgctggtgatgcacatgaggaccccgaggtagaattcaactggtatgtcgatggcgctcgaggtgca
caaccccaaaaccaagcccaggaggaaacagtacaactccacctacagggtggtgctgctgacagtcctccaccaggactggctgaacggcaa
ggagtacaagtgaaggtgtccaacaaggctctccctgccccattgagaagaccatcagcaagccaaaggccaaccagggagccccaggctcat
aacctgcctccctccaggagcgaactaccaagaaccagggtgctcctgacctgctggtcaagggtttatccagcgacatcgccgtcgagtgagg
tccaacggagagcccagaaataactacaagaccaccctcctgtcctcgactccgacggctccttctctgtacagcaaacctgaccgtcgataaatctag
gtggcagcagggaacgtgttctctgttccgtgatgcatgaagcactgcacaaccattataccagaagctctgagcctgtccccggcaagGGCG
GCGGCGGCTCTGGAGGAGGAGGCAGCGGCGGAGGAGGCTCCGGAGGCGGCGGCTCTGAGG
TGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGTCTTGC
GCAGCAAGCGGATTTCGCCTTTAGCTCCTACGACATGAGCTGGGTGCGGCAGGCACCTGGCAA
GgglCTGGATTGGGTGGCAACCATCAGCGGAGGCGGCAGATACATACTATCCCGACTCCGTG
AAGGGCAGGTTACCATCTCCCGCGATAACTCTAAGAACAACTGTATCTGCAGATGAACAGC
CTGAGGGCCGAGGACACAGCCCTGTACTATTGCGCCAACCGCTACGGCGAGGCCTGGTTTGC
CTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGC
GGCTCCGGAGGAGGCGGCTCTGGCGGCGGCGGCAGCGATATCCAGATGACCCAGTCCCCCTC
CTCTATGTCTGCCAGCGTGGGCGACCGGGTGACCTTACATGTAGAGCCTCCAGGATATCAA
CACCTACCTGTCTTGGTTTCAGCAGAAGCCCGGCAAGAGCCCTAAGACACTGATCTATCGGG
CCAATAGACTGGTGAGCGGAGTGCCTTCCCGGTTCTCCGGCTCTGGCAGCGGACAGGACTAT

ACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGCCAGAGGATATGGCCACATACTATTGCCTGCAGTATGAC
GAGTCCCCCTGACCTTCGGGgctGGCACTAAGCTGGAGCTGAAAAGA

NTPDV1 和 NTPDV3 的重链的氨基酸序列 (SEQ ID NO:85): 其中的免疫球蛋白部分中的 19F3H2(hG1TM) 的 CDR 区域用 下划线加粗标识, scFv 部分中的 14C12H1V-Linker2-14C12L1V 的 CDR 区域用分别用 下划线加粗标识, 重链区突变氨基酸用 斜体加粗标识, linker 区域用加粗标识:

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQNLEWIGLINPYNAGTS
YNQKFQGKVTTLVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSEYRYGGDYFDYWGQGTTTLTVSSA
STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQ
APGKGLDWVATISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEAWF
AYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSMSASVGDRTFTCRASQDINTYLSWFO
QKPGKSPKTLIYRANRLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLE
LKR

NTPDV1 和 NTPDV3 的重链的核苷酸序列: (SEQ ID NO:86)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTGTGAAGG
TGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTACCGGCTATACAATGAAGTGGGTGAGGCAGGCA
CCAGGACAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCTTACAATGCCGGCACCTCTTATAAC
CAGAAAGTTTCAGGGCAAGGTGACCCTGACAGTGGACAAGTCCACCTCTACAGCCTACATGGA
GCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTACAGATA
TGCGGGCGACTACTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCACACTGACCGTGTCTAGCGCCTCCAC
AAaggggcccgctgtttcctctgccccctcctccaaagcaccagcggaggaaccgctgctctcgatgctgtggaaggactacttccctgaac
ccgtcaccgtgagctggaatagcggcgctctgacaagcggagtcatacattccctgctgtgctgcaaagcagcggactctatccctgtccagcgtcgt
cacagtccccagcagcagcctgggcacccagacctacatctgaacgtcaaccacaagccctccaacacaaaggtggacaagaagtggagcccaa
atcctgcgacaagacacacacctgtccccctgtcctgctcctcgaaGCTGCTggagCccctagegttctctcttctccaaacccaaggacac
cctcatgatcagcagaaccCCTGAAGTCACTGTGTCGTGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGT
GAAATTCAACTGGTATGTCTGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAG
GAACAGTACAACCTCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCCCTACCAGGACTGGCT
GAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCATTGAGAAG
ACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACTGCCTCCCTCCAG
GGACGAACCTACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCCAGCG
ACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAACTACAAGACCACCCCTCCT
GTCCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACAGCAAACCTGACCGTCGATAAATCTAGGTGG
CAGCAGGGCAACGTGTTCTTGTTCCTGTGATGCATGAAGCACTGCACAACCATATATACCCAG
AAGTCTCTGAGCCTGTCCCCCGCAAGGGCGGCGGGCTCTGGAGGAGGAGGCAGCGGCG
GAGGAGGCTCCGGAGGCGGCGGCTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGACTGGT
GCAGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTGTCTTGCGCAGCAAGCGGATTGCGCTTTAGCTCCTACG
ACATGAGCTGGGTGCGGCAGGCACCTGGCAAGGGTCTGGATTGGGTGGCAACCATCAGCGG
AGGCGGCAGATACATACTATCCCGACTCCGTGAAGGGCAGGTTACCATCTCCCGCGATAA

CTCTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACAGCCCTGTACTA
TTGCGCCAACCGCTACGGCGAGGCCTGGTTTGCCTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAG
TGTCTAGCGGCGGCGGGCGGCTCCGGAGGAGGCGGCTCTGGCGGCGGCGGCAGCGATATCCA
GATGACCCAGTCCCCCTCCTCTATGTCTGCCAGCGTGGGCGACCGGGTGACCTTCACATGTAG
AGCCTCCCAGGATATCAACACCTACCTGTCTTGGTTTCAGCAGAAGCCCCGGCAAGAGCCCTA
AGACACTGATCTATCGGGCCAATAGACTGGTGAGCGGAGTGCCTTCCCGGTTCTCCGGCTCTG
GCAGCGGACAGGACTATACCCTGACAATCAGCTCCCTGCAGCCAGAGGATATGGCCACATACT
ATTGCCTGCAGTATGACGAGTTCCCCCTGACCTTCGGGGCTGGCACTAAGCTGGAGCTGAAA
AGATGATAAGAATTC

NT5E (1-552)-his 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:87)

MCPRARAPATLLALGAVLWPAAGAWELTILHTNDVHSRLEQTSSESSKCVNASRCMGGV
ARLFTKVQQIRRAEPNVLLLDAGDQYQGTIWFTVYKGA EVAHFMNALRYDAMALGNHEFDNG
VEGLIEPLLKEAKFPILSANIKAKGPLASQISGLYLPYKVLPGDEVVGIVGYTSKETPFLSNPGTN
LVFEDEITALQPEVDKLTNLVKNIIALGHS GFEMDKLIAQKVRGV DVVVGHSNTFLYTGNPPS
KEVPAGKYPIVTSDDGRKVPVQAYAFGKYLGYLKIEFDERGNVIS SHGNPILLNSSIPEDPSIKA
DINKWRIKLDNYSTQELGKTIVYLDGSSQSCRFRECNMGNLICDAMINNNLRHTDEMFWNHVS
MCILNGGGIRSPIDERNNGTITWENLA AVL PFGGTFDLVQLKGSTLKKAFEHSVHRYGQSTGEFL
QVGGIHVYDLSRKPGRVVKLDVLCTKCRVPSYDPLKMDEVYKVILPNFLANGGDGFQMIKD
ELLRHDSGDQDINVVSTYISKMKVIYPAVEGRIKFSTGSHHHHHH

NT5E (1-552)-his 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:88)

ATGTGTCCTAGAGCCGCCAGAGCTCCAGCTACACTGCTGCTGGCTCTGGGAGCAGTCCT
CTGGCCAGCAGCAGGAGCTTGGGAACCTGACCATCCTGCACACCAACGACGTGCACAGCAGG
CTGGAACAGACCAGCGAGGACAGCAGCAAGTGC GTGAACGCCAGTCGCTGTATGGGAGGAG
TGGCAAGGCTGTTACCAAGGTGCAGCAGATCCGGAGAGCCGAACCTAACGTGCTGCTGCTG
GACGCCGAGATCAGTATCAGGGAACCATCTGGTTACCGTGTACAAGGGCGCCGAAGTGGC
CCACTTCATGAACGCTCTGCGCTACGACGCTATGGCCCTGGGCAATCACGAGTTCGATAACGG
CGTGAGGGGACTGATCGAGCCTCTGCTGAAGGAGGCCAAGTTCCCCATCCTGAGCGCCAACA
TCAAGGCCAAGGGACCTCTGGCTAGCCAGATTAGCGGCCTGTACCTGCCTTACAAGGTGCTG
CCCGTGGGAGACGAAGTGGTGGGAATCGTGGGCTACACCAGCAAGGAGACCCCTTTCTCTGA
GCAACCCAGGCACCAACCTGGTGTTCGAGGACGAGATACCGCTCTGCAGCCAGAGGTGGA
CAAGCTGAAGACCTGAACGTGAACAAGATCATCGCCCTGGGACACAGCGGCTTCGAGATG
GACAAGCTGATCGCCAGAAAGTGCGAGGAGTGGACGTGGTCTGTGGGCGGACACAGCAACA
CCTTCCTGTACACCGGCAACCCTCCTTCTAAGGAAGTGCCAGCCGGCAAGTACCCCTTCATCG
TGACCAGCGACGACGGAAGAAAGGTGCCAGTGGTGCAGGCTTACGCCTTCGGCAAGTACCT
GGGCTACCTGAAGATCGAGTTCGACGAGCGGGGCAACGTGATCTCTAGCCACGGCAACCCCA
TCCTGCTGAACAGCAGCATCCCAGAGGACCCAGCATCAAGGCCGACATCAACAAGTGGCG
GATCAAGCTGGACAACCTACAGCACCCAGGAGCTGGGAAAGACCATCGTGTACCTGGACGGC
AGCTCTCAGTCTTGCCGTTCCGCGAGTGCAACATGGGCAACCTGATTTGCGACGCCATGATC
AACAACAACCTGCGGCACACCGACGAGATGTTTGGAAACCACGTCAGCATGTGCATCCTGAA
CGGCGGAGGCATCAGAAGCCCTATTGACGAGCGGAACAACGGCACCATCACTTGGGAGAAC
CTGGCAGCAGTGCTGCCTTTTGGCGGAACATTCGACCTGGTGCAGCTGAAGGGCAGCACACT
GAAGAAGGCCCTTCGAGCACAGCGTGACAGATACGGCCAGAGCACAGGCGAGTTCCTGCAG
GTCGGAGGAATCCACGTGGTGTACGACCTGAGCAGGAAGCCAGGAGACAGAGTGGTGAAGC

TGGACGTGCTCTGCACCAAGTGTGCGGTGCCAAGCTACGACCCCTGAAGATGGACGAGGTG
TACAAGGTCATCCTGCCCAACTTCCTGGCTAACGGAGGAGACGGCTTCCAGATGATCAAGGA
CGAGCTGCTGAGGCACGACAGCGGAGACCAGGACATCAACGTCGTGTCCACCTACATCAGC
AAGATGAAGGTCATCTACCCCGCCGTGGAAGGCAGGATCAAGTTCAGCACCGGCTCTCACCA
CCACCATCACCAAC

mFc 的氨基酸序列: (SEQ ID NO:89)

PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNNV
EVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQ
VYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGGSYFMYSKL
RVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

19F3H1V-Linker-19F3L2V 的氨基酸序列: (SEQ ID NO:90)

QVQLQQSGAEVVKPGASMKMSCKASGYSFTGYTMNWVKQAHGQNLEWIGLINPYNAGTS
YNQKFQGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSEYRYGGDYFDYWGQGTTLTVSSG
GGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSSLAIVSGERVITISCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQAP
KLLIYFASTRESGVPRDFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDVADYYCQHYDTPYTFGGGKLEIK

19F3H1V-Linker2-19F3L2V 的核苷酸序列: (SEQ ID NO:91)

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTATGAAGA
TGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTACCGGCTATACAATGAACTGGGTGAAGCAGGC
CCACGGCCAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCTTACAATGCCGGCACCTCTTATA
ACCAGAAGTTTCAGGGCAAGGCCACCCTGACAGTGGACAAGTCCACCTCTACAGCCTACAT
GGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTAC
AGATATGGCGGCGACTACTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCACACTGACCGTGTCTAGC
GGCCTGTACGGCCTGTACGGCCTGTACGGCCTGTACAGCGAGAGGGGCTGTACGGCCTGT
CGGCCTGTACGGCCTGTACAGCGAGAGGGGCTGTACGGCCTGTACGGCCTGTACGGCCTGT
ACAGCGAGAGGGACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCCGTGTCTGTGGGAGA
GCGGGTGACAATCTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAACTCCTCTAATCAGAAGAACT
ACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTAAGCTGCTGATCTACTTCGCCTCT
ACCAGGGAGAGCGGAGTGCCAGACAGATTCTCTGGCAGCGGTCCGGCACAGACTTCACCC
TGACAATCAGCTCCGTGCAGGCAGAGGACGTGGCAGATTACTATTGCCAGCAGCACTACGA
TACCCCTATACATTTGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

19F3H1的核苷酸序列: (SEQ ID NO:92)

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCAGAGGTGGTGAAGCCAGGAGCCTCTATGAAGA
TGAGCTGTAAGGCCAGCGGCTACTCCTTACCGGCTATACAATGAACTGGGTGAAGCAGGC
CCACGGCCAGAATCTGGAGTGGATCGGCCTGATCAACCCTTACAATGCCGGCACCTCTTATA
ACCAGAAGTTTCAGGGCAAGGCCACCCTGACAGTGGACAAGTCCACCTCTACAGCCTACAT
GGAGCTGAGCTCCCTGCGGAGCGAGGATACAGCCGTGTACTATTGCGCCCGGTCCGAGTAC
AGATATGGCGGCGACTACTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCACACTGACCGTGTCTAGC

19F3H1 的氨基酸序列: (SEQ ID NO:93)

QVQLQQSGAEVVKPGASMKMSCKASGYSFTGYTMNWVKQAHGQNLEWIGLINPYNAGTSYN
QKFQGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSEYRYGGDYFDYWGQGTTLTVSS

19F3L1 的核苷酸序列: (SEQ ID NO:94)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCAATGTCTGTGGGAGAGAGGGTGA
CAATGTCCTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAACTCCTCTAATCAGAAGAACTACCTGGCC
TGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCCTAAGCTGCTGGTGTACTTTGCCTCTACCAGGGA
GAGCGGAGTGCCAGACAGATTCTCTGGCAGCGGCTCCGGCACAGACTTCACCCTGACAATC
AGCTCCGTGCAGGCAGAGGACCTGGCAGATTATTTCTGCCAGCAGCACTACGATACCCCCTA
TACATTTGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

19F3L1 的氨基酸序列: (SEQ ID NO:95)

DIVMTQSPSSLAMSVGERVTMSCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLVYFASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDLADYFCQQHYDTPYTFGGGTKLEIK

19F3L2 的轻链氨基酸 (全长) (SEQ ID NO:96, 下划线区域是非可变区序列)

DIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLIYFASTRES
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVADYYCQQHYDTPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

19F3H2 可变区的氨基酸序列, 下划线表示 CDR 序列: (SEQ ID NO: 97)

QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQNLEWIGLINPYNAGTS
YNQKFQGKVTLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSEYRYGGDYFDYWGQGTTTLTVSS

19F3L2 可变区的氨基酸序列, 下划线表示 CDR 序列: (SEQ ID NO: 98)

DIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLIYFASTRES
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISVQAEDVADYYCQQHYDTPYTFGGGTKLEIK

19F3L3 可变区的氨基酸序列, 下划线表示 CDR 序列: (SEQ ID NO: 99)

DIVMTQSPSSLAVSVGERVTISCKSSQSLNSSNQKNYLAWYQQKPGQAPKLLIYFASTRES
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYDTPYTFGGGTKLEIK

19F3L2 的轻链核苷酸 (全长) (SEQ ID NO:100)

GACATCGTGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGGCCGTGTCTGTGGGAGAGCGGGTGACAATCTCCTGTA
AGTCTAGCCAGTCTCTGCTGAACTCCTCTAATCAGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGG
CCAGGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACTTCGCCTCTACCAGGGAGAGCGGAGTGCCAGACAGATTCTCTGGC
AGCGGCTCCGGCACAGACTTCACCCTGACAATCAGCTCCGTGCAGGCAGAGGACGTGGCAGATTACTATT
GCCAGCAGCACTACGATACCCCCCTATACATTTGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTGGC
AGCCCCATCTGTCTTCATTTTTCCCCCTAGTGACGAGCAGCTGAAATCCGGAACAGCCTCTGTGGTCTGT
CTGCTGAACAATTTCTACCCTCGCGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCTCTGCAGAGTGGCA
ATTACAGGAGAGCGTGACTGAACAGGACTCCAAGGATTCTACCTATAGTCTGAGCTCCACTCTGACCCT
GTCCAAAGCAGATTACGAAAAGCACAAAGTGTATGCCTGTGAGGTCACCCACCAGGGGCTGAGTTCTCCA
GTCACCAAATCCTTCAACAGAGGCGAATGT