

抗CD73的抗体及其用途

技术领域

本发明涉及免疫学领域。具体地，涉及抗CD73抗体及其用途。

背景技术

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

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

CD73既有水解酶活性，又有非水解酶作用。CD73的酶与非酶功能同时存在于肿瘤的相关过程中，并且互相促进，维持肿瘤的演进。越来越多的研究发现，CD73是体外肿瘤细胞增殖、转移和侵袭，体内肿瘤血管生成和肿瘤免疫逃逸机制的关键调控分子，其中很重要的一个免疫抑制机制是由CD73-腺苷（Adenosine）代谢信号通路介导的，CD73上游的CD39可以催化ATP产生腺苷单磷酸（AMP），所产生的AMP被CD73转化为腺苷，而腺苷会结合下游的腺苷受体(A2AR)，A2AR通过激活蛋白激酶A(PKA)和Csk激酶，抑制LCK、MAPK、PKC等一系列与免疫激活相关的信号通路，抑制T细胞的免疫杀伤作用，从而发挥免疫抑制作用(Antonioli L, et al. Nat Rev Cancer. 2013; 13:842–857.)。

跨膜受体PD-1（程序性细胞死亡-1）是CD28基因家族成员之一，在

活化的 T 细胞，B 细胞以及骨髓系细胞都有表达。PD-1 的配体 PDL1 (Programmed cell death 1 ligand 1, 亦简称为 PDL-1) 和 PDL2 (Programmed cell death 1 ligand 2, 亦简称为 PDL-2) 均属于 B7 超家族，其中 PDL1 在多种细胞都有表达，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/PDL1 信号通路在调节免疫耐受、微生物感染及肿瘤免疫逃逸中发挥重要作用。PD-1 的表达主要在 T 细胞等免疫细胞，而 PD-1 的配体 PDL1 主要在许多人类肿瘤组织呈高表达。阻断 PD-1/PDL1 信号通路可使被抑制的 T 细胞激活，进而攻击癌细胞。阻断 PD-1/PDL1 信号可以促进肿瘤抗原特异性 T 细胞的增殖，发挥杀伤肿瘤细胞的作用，进而抑制局部肿瘤生长 (Julie R et al., 2012, N Engl J Med. 366:2455-2465)。另外，高表达 PDL1 的肿瘤伴随着很难被检测到的癌症 (Hamanishi et al., 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:3360-5)。一种实施有效的方法是通过体内注射抗 PD-1 抗体对 PD-1 的表达进行调控。由于 PD-1 抗体的广谱抗肿瘤前景和惊人的药效，业界普遍认为针对 PD-1 通路的抗体将带来治疗多种肿瘤的突破性进展：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., 2015, Semin Oncol. 42(3):466-473)，白血病以及贫血病 (Held SA, Heine A, et al., 2013, Curr Cancer Drug Targets. 13(7):768-74)。

细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原-4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4, 亦简称为 CTLA4) 与 CD28 分子在基因结构、染色体定位、序列的同源性及其基因表达具有十分相近的关系，都是共刺激分子 B7 的受体，主要表达于被激活 T 细胞表面。CTLA4 与 B7 结合后能抑制小鼠和人 T 细胞的激活，在 T 细胞活化中起负调节作用。

CTLA4 抗体 (或抗 CTLA4 单克隆抗体) 或 CTLA4 配体可以阻止 CTLA4 与其天然配体结合，从而封闭 CTLA4 对 T 细胞负性调节信号的传导，增强 T 细胞对各种抗原的反应性，在这方面体内与体外研究结果基本一致。目前已有 CTLA4 单克隆抗体处于临床试验阶段或被批准用于治疗前列腺癌，膀胱癌，结肠直肠癌，胃肠道癌，肝癌，恶性黑色素瘤等 (Grosso JF., Jure-Kunkel MN., 2013, Cancer Immun. 13:5.)。

CTLA4 及 CTLA4 抗体作为 T 细胞功能状况的重要影响因素,通过干预机体免疫微环境发挥作用。体外和体内试验中,CTLA4 抗体可特异地解除 CTLA4 对机体免疫抑制,激活 T 细胞,诱导 IL-2 产生,在抗肿瘤及寄生虫等疾病的基因治疗中有广泛应用前景。CTLA4 抗体可对疾病产生特异性治疗作用,并发挥较高疗效,补充传统用药的不足,由此开辟基因治疗的新途径。

ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) 即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) 即补体依赖的细胞毒性,是指当抗体与细胞膜表面相应抗原特异性结合后,形成复合物而激活补体系统,进而在靶细胞表面形成 MAC,导致靶细胞溶解。补体能导致多种细菌和其他病原生物细胞的溶解,是机体抵抗病原生物感染的重要防御机制。

Fc 受体是表达在特定免疫细胞表面,用于识别抗体 Fc 区域介导免疫应答的免疫球蛋白家族蛋白。抗体 Fab 区域识别抗原后,其抗体 Fc 区域与免疫细胞 (如杀伤细胞) 上的 Fc 受体结合,启动免疫细胞的应答功能,如吞噬作用及 ADCC。根据 Fc 受体识别抗体类型及表达细胞的不同,发现 FcγRIIIa 与 ADCC 效应密切相关。FcγRIIIa 是介导 ADCC 的最主要分子 (Hogarth PM, Pietersz GA. 2012, NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY, 11(4):311-331)。

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 FcγRs 的亲和力各不相同。IgG1 是人体内最多的亚型,也是单抗药物中用的最多的亚型, IgG1 能够结合各种 FcγRs, 能够引发 ADCC 以及 CDC 效应。抗体存在 ADCC 和/或 CDC 可能会导致不必要的靶向组织损伤,具有影响药物药理学负面效应。

发明内容

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

本发明人惊奇地发现，杂交瘤细胞株 LT014 能够分泌产生与人 CD73 特异性结合的特异性单克隆抗体（命名为 19F3），并且该单克隆抗体能够十分有效地以非底物竞争的方式抑制 CD73 的酶活反应，降低腺苷的产生，促进 T 细胞活性，发挥抑制肿瘤生长的效果。

进一步地，本发明人创造性地制得了抗人 CD73 的人源化抗体（命名为 19F3H1L1(hG1DM)、19F3H2L2(hG1DM)、19F3H2L3 及 19F3H2L3(hG1DM)），此外，抗 CD73 抗体引入了氨基酸突变以消除 ADCC 和 CDC 效应，避免了由抗体介导的不必要的毒性作用。

本发明人还惊奇地发现，本发明的抗体与抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体联用具有有效抑制肿瘤细胞增殖的药理学效果，优于抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体单药或者抗 CD73 抗体单药。

本发明的另一个方面还涉及一种抗体，其中，所述抗 CD73 抗体包含：

SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 10 所示的重链可变区的 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3；和 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 14 所示的轻链可变区的 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3；

优选地，根据 IMGT 编号系统，所述抗 CD73 抗体包含

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

HCDR2，其包含 SEQ ID NO: 16 所示的氨基酸序列，与所述序列具有至少 80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%、87%、88%、89%、

90%，优选至少 91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或 99% 序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个（优选 1 个、2 个或 3 个）保守氨基酸突变（优选置换，插入或缺失）的氨基酸序列，或由其组成，

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

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

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

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

在本发明的一些实施方案中，

所述抗体的重链可变区包含下述序列，或由下述序列组成：

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

所述抗体的轻链可变区包含下述序列, 或由下述序列组成:

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

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

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

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

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

在本发明的一些实施方案中, 所述抗体的重链恒定区为 Ig gamma-1 链 C 区, ACCESSION: P01857; 轻链恒定区为 Ig kappa 链 C 区, ACCESSION: P01834。

在本发明的一些实施方案中, 所述抗体的重链恒定区为在 Ig gamma-1 链 C 区, ACCESSION: P01857 的基础上在第 234 号位点引进了

亮氨酸到丙氨酸的点突变(L234A),第235号位点引进了亮氨酸到丙氨酸的点突变(L235A);轻链恒定区为Ig kappa链C区,ACCESSION: P01834,氨基酸序列如SEQ ID NO: 22所示。

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

优选地,CDR也可以由IMGT编号系统定义,请参见Ehrenmann, Francois, Quentin Kaas, and Marie-Paule Lefranc. IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF. Nucleic acids research 2009; 38(suppl_1): D301-D307。

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

本发明涉及的抗体19F3、19F3H1L1(hG1DM)、19F3H2L2(hG1DM)、19F3H2L3(hG1DM)具有相同的CDR:

其重链可变区的3个CDR区的氨基酸序列如下:

HCDR1: GYSFTGYT (SEQ ID NO: 15),

HCDR2: INPYNAGT (SEQ ID NO: 16),

HCDR3: ARSEYRYGGDYFDY (SEQ ID NO: 17);

其轻链可变区的3个CDR区的氨基酸序列如下:

LCDR1: QSLNSSNQKNY (SEQ ID NO: 18),

LCDR2: FAS (SEQ ID NO: 19),

LCDR3: QQHYDTPYT (SEQ ID NO: 20)。

在本发明的一些实施方案中,所述抗体为单克隆抗体。

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

在本发明的一些实施方式中,所述抗原结合片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、Fab/c、互补决定区片段、单链抗体(例如,scFv)、

人源化抗体、嵌合抗体或双特异性抗体。

本发明的另一个方面涉及分离的多肽，其选自以下各项组成的组：

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

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

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

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

81%，82%，83%，84%，85%，86%、87%、88%、89%、90%，优选至少91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个（优选1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个）保守氨基酸突变（优选置换，插入或缺失）的氨基酸序列。

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

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

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

本发明的再一方面涉及一种载体，其包含本发明的分离的核酸分子。

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

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

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

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

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

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

本发明的再一方面涉及本发明任一项所述的抗体或其抗原结合片段、本发明的偶联物、融合蛋白或多特异性抗体在制备治疗和/或预防肿瘤（例如实体瘤，优选非小细胞肺癌、前列腺癌（包括转移性去势抵抗前列腺癌 (mCRPC)）、三阴性乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌（包括结微卫星稳定（MSS）和错配修复功能缺陷/微卫星不稳定（dMMR/MSI-high）型）、胃癌（包括结微卫星稳定（MSS）和错配修复功能缺陷/微卫星不稳定（dMMR/MSI-high）型）、黑色素瘤、头颈癌、

肾细胞癌或胰管腺癌的药物中的用途,或者在制备用于诊断肿瘤的药物中的用途。

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

本发明的再一方面涉及试剂盒, 其包含(1)本发明所述的抗体或其抗原结合片段、本发明所述的偶联物或本发明所述的融合蛋白或多特异性抗体, 和(2) 抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体, 和任选地, 使用说明书。

本发明的再一方面涉及治疗和/或预防肿瘤的方法, 包括对患者施用治疗有效量的药物 A 和治疗有效量的药物 B, 其中药物 A 包含本发明所述的抗体或其抗原结合片段、本发明所述的偶联物或本发明所述的融合蛋白或多特异性抗体, 药物 B 包含抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体, 优选地, 药物 A 和药物 B 同时或顺序施用, 其中所述顺序施用为先施用药物 A 或先施用药物 B。

在本发明的一些实施方案中, 所述抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:35 所示, 轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:36 所示。

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(V_H)和重链恒定区(C_H)组成。重链恒定区由 3 个结构域(C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3})组成。各轻

链由轻链可变区(V_L)和轻链恒定区(C_L)组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子, 包括免疫系统的各种细胞(例如, 效应细胞)和经典补体系统的第一组分($C1q$)的结合。 V_H 和 V_L 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR)), 其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各 V_H 和 V_L 由按下列顺序: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(V_H 和 V_L)分别形成抗原结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda M.d.(1987 and 1991)), 或 Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 1987; 196:901-917; Chothia 等人 Nature 1989; 342:878-883 或者 IMGT 编号系统定义, 见 Ehrenmann, Francois, Quentin Kaas, and Marie-Paule Lefranc. "IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF." Nucleic acids research 2009; 38(suppl_1): D301-D307.的定义。术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如, 其包括, 特别地, 重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体, 例如, IgG (例如, IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 亚型), IgA1, IgA2, IgD, IgE 或 IgM 抗体。

如本文中所使用的, 术语“单抗”和“单克隆抗体”是指, 来自一群高度同源的抗体分子中的一个抗体或抗体的一个片段, 也即除可能自发出现的自然突变外, 一群完全相同的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的, 其通常包含至少 2 种或更多种的不同抗体, 这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。单克隆抗体通常可采用 Kohler 等首次报道的杂交瘤技术获得 (Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. nature, 1975; 256(5517): 495), 但也可采用重组 DNA 技术获得(如参见 U.S.Patent 4,816,567)。

如本文中所使用的, 术语“人源化抗体”是指, 人源免疫球蛋白(受体抗体)的全部或部分 CDR 区被一非人源抗体(供体抗体)的 CDR

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

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

如本文中所使用的,术语“载体(vector)”是指,可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时,载体称为表达载体。载体可以通过转化,转导或者转染导入宿主细胞,使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的,包括但不限于:质粒;噬菌粒;柯斯质粒;人工染色体,例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或P1来源的人工染色体(PAC);噬菌体如 λ 噬菌体或M13噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于,逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒(如SV40)。一种载体可以含有多种控制表达的元件,包括但不限于,启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外,载体还可含有复制起始位点。

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

如本文中所使用的，术语“特异性结合”是指，两分子间的非随机的结合反应，如抗体和其所针对的抗原之间的反应。在某些实施方式中，特异性结合某抗原的抗体（或对某抗原具有特异性的抗体）是指，抗体以小于大约 10^{-5} M，例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的亲和力 (K_D) 结合该抗原。

如本文中所使用的，术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数，其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小，抗体-抗原结合越紧密，抗体与抗原之间的亲和力越高。通常，抗体以小于大约 10^{-5} M，例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的解离平衡常数 (K_D) 结合抗原（例如，PD-1 蛋白）。可以使用本领域技术人员知悉的方法测定 K_D ，例如使用 ForteBio 分子相互作用仪测定。

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

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

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

发明的有益效果：

本发明的单克隆抗体能够很好地特异性与 CD73 结合，并且能够十分有效地、以非底物竞争的方式抑制 CD73 的酶活反应，降低腺苷的产生，促进 T 细胞活性及肿瘤抑制效果。同时，本发明的抗体与抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体联用具有有效抑制肿瘤细胞增殖的药理学效果，优于抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体单药或者抗 CD73 抗体单药。

附图说明

- 图 1. 19F3H2L3(hG1DM)与 C1q 结合的动态亲和力数据拟合曲线。
- 图 2. MEDI9447 与 C1q 结合的动态亲和力数据拟合曲线。
- 图 3. IgG1 野生型抗体与 C1q 结合的动态亲和力数据拟合曲线。
- 图 4. 19F3H2L3(hG1DM)与 FcγRIIIa 结合的动态亲和力数据拟合曲线。
- 图 5. MEDI9447 与 FcγRIIIa 结合的动态亲和力数据拟合曲线。
- 图 6. IgG1 野生型抗体与 FcγRIIIa 结合的动态亲和力数据拟合曲线。
- 图 7. 分组后第 23 天时各组小鼠肿瘤重量。* $P < 0.01$ 。
- 图 8. 各组动物实验期间体重变化率，与 Day 0 天相比。
- 图 9. 抗 CD73 抗体有效抑制 CD73 酶学活性。

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。

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

在本发明的下述实施例中，所用的阳性对照抗体 MEDI9447 (Oleclumab)，生产自中山康方生物医药有限公司，其序列与 MedImmune Limited 在 WHO 网站公开登载的 International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances (INN) 中记载的抗体序列相同 (World Health Organization (2016). "International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances (INN). Proposed INN: List 116" (PDF). WHO Drug Information. 30 (4), P661-662.)。

在本发明的下述实施例中，所用的阳性对照抗体野生 IgG1 对照抗体的重链恒定区采用 Ig gamma-1 chain C region, ACCESSION: P01857; 轻链恒定区采用 Ig kappa chain C region, ACCESSION: P01834。

在本发明的下述实施例中，所用的 C1q 购自 fizegerald, 货号: A16050201;

在本发明的下述实施例中，所用的 FcγRIIIa-bio 购自 Sino Biological, 货号: LC09JA0407;

本发明的下述实施例中，所用的 CD73 (5' -核酸酶) 特异性抑制剂 APCP (alpha, beta-methylene adenosine-5' -diphosphate, 5' -α, β-亚甲基-二磷酸腺苷) 来源于 sigma, 货号: M3763-10MG。

在本发明的下述实施例中，所用的同型对照抗体为人抗鸡蛋溶酶体抗体 (human anti-Hen Egg Lysozyme IgG, 即 anti-HEL 抗体, 或者 human IgG, 简称 hIgG, 或者同型对照) 的序列来自于 Acierno 等人发表的 Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies 中 Fab F10.6.6 序列的可变区序列 (Acierno 等人. J Mol Biol. 2007; 374(1): 130-146.);

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, 由中山康方生物医药有限公司制备)。取免疫后的小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合, 制成杂交瘤细胞。

以人 NT5E (NT5E 为 GenbankID:NP_002517.1, 位置: 1-552) -Biotin (NT5E-Biotin, 由中山康方生物医药有限公司制备) 作为抗原, 对杂交瘤细胞进行间接 ELISA 法筛选, 获得能够分泌与 CD73 特异性结合的抗体的杂交瘤细胞。对筛选得到的杂交瘤细胞, 经过有限稀释法得到稳定的杂交瘤细胞株。将以上杂交瘤细胞株命名为杂交瘤细胞株 LT014, 其分泌的单克隆抗体命名为 19F3。

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

2、抗 CD73 抗体 19F3 的制备

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

实施例 2: 抗 CD73 的抗体 19F3 的序列分析

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

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

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

将 TA 克隆的产物直接进行测序, 抗 CD73 的抗体 19F3 的序列分析测序结果如下:

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

其编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示, 长度为 121aa;

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

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

其编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示, 长度为 113aa;

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

实施例 3: 抗人 CD73 的人源化抗体的轻链和重链设计和制备

根据人 CD73 蛋白的三维晶体结构 (Hage T, Reinemer P, Sebald W. Crystals of a 1:1 complex between human interleukin-4 and the extracellular domain of its receptor alpha chain. Eur J Biochem. 1998; 258(2):831-6.) 以及实施例 2 获得的抗体 19F3 的序列, 通过计算机模拟抗体模型, 根据模型设计突变, 得到 19F3H1L1(hG1DM)、19F3H2L2(hG1DM)、19F3H2L3(hG1DM)的可变区序列;

上述人源化抗体的设计的可变区序列如下:

(1)人源化单克隆抗体 19F3H1L1(hG1DM)的重链可变区和轻链可变区序列

重链可变区的核酸序列如 SEQ ID NO:5 所示, 长度为 363 bp。

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

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

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

(2)人源化单克隆抗体 19F3H2L2(hG1DM)的重链可变区和轻链可变区序列

重链可变区的核酸序列如 SEQ ID NO:9 所示, 长度为 363 bp。

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

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

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

所示，轻链 CDR3 的序列如 SEQ ID NO:20 所示。

(3)人源化单克隆抗体 19F3H2L3(hG1DM)的重链可变区和轻链可变区序列

重链可变区的核酸序列如 SEQ ID NO:9 所示，长度为 363 bp。

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

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

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

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

19F3H1L1(hG1DM)、19F3H2L2(hG1DM)和 19F3H2L3(hG1DM)的抗体的轻链恒定区为 Ig kappa 链 C 区，ACCESSION: P01834。

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

将 19F3H1L1(hG1DM)重链 cDNA 和轻链的 cDNA、19F3H2L2(hG1DM)重链 cDNA 和轻链的 cDNA、以及 19F3H2L3(hG1DM)的重链 cDNA 和轻链的 cDNA，分别克隆到 pUC57simple (金斯瑞公司提供)载体中，分别获得 pUC57simple-19F3H1(hG1DM)、pUC57simple-19F3L1；pUC57simple-19F3H2(hG1DM)、pUC57simple-19F3L2 和 pUC57simple-19F3L3。参照《分子克隆实验指南 (第二版)》介绍的标准技术，EcoRI&HindIII 酶切合成的重、轻链全长基因，通过限制酶 (EcoRI&HindIII)的酶切亚克隆到表达载体 pcDNA3.1 中获得表达质粒 pcDNA3.1-19F3H1(hG1DM)，pcDNA3.1-19F3L1，pcDNA3.1-19F3H2(hG1DM)，pcDNA3.1-19F3L2，和 pcDNA3.1-19F3L3，

并进一步对重组表达质粒的重/轻链基因进行测序分析。随后将含有相应的轻、重链重组质粒设计基因组合（pcDNA3.1-19F3H1(hG1DM)/pcDNA3.1-19F3L1，pcDNA3.1-19F3H2(hG1DM)/pcDNA3.1-19F3L2和pcDNA3.1-19F3H2(hG1DM)/pcDNA3.1-19F3L3 分别共转染 293F 细胞后收集培养液进行纯化。测序验证正确后，制备去内毒素级别的表达质粒并将质粒瞬时转染 HEK293 细胞进行抗体表达，培养 7 天后收集细胞培养液，采用 Protein A 柱进行亲和纯化获得人源化抗体。

实施例 4：抗 CD73 抗体与 C1q 和 FcγRIIIa 的动态亲和力测定。

(1) 抗 CD73 抗体与 C1q 的动态亲和力测定

样品稀释缓冲液为 PBS，0.02% Tween-20，0.1%BSA，pH7.4。50 μg/mL 的抗体固定在 FAB2G 传感器上，固定高度约为 2.0nm，传感器在缓冲液中平衡 60s，固定在传感器上的抗体与抗原 C1q 结合，抗原浓度为 0.63-10 nM（两倍梯度稀释），时间 60s，抗原抗体在缓冲液中解离，时间 60s。传感器使用 10mM 甘氨酸，pH1.7 再生，时间 5s，重复 4 次。样品板震动速率为 1000 rpm，检测温度为 30 度，检测频率为 0.6Hz。数据以 1:1 模型拟合分析，得到亲和力常数。数据采集软件为 Fortebio Data Acq μ isition 7.0，数据分析软件为 Fortebio Data Analysis 7.0。

结果如表 1 和图 1-3 所示，19F3H2L3(hG1DM)和 MEDI9447 与 C1q 均无结合活性。

Sample ID	KD (M)	kon (1/Ms)	标准误 (kon)	kdis(1/s)	标准误 (kdis)
19F3H2L3(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
MEDI9447	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
野生型 IgG1 抗体	1.37E-09	5.53E+06	4.27E+05	7.58E-03	4.84E-04

$KD = kdis / kon$

(2) 抗 CD73 抗体与 FcγRIIIa 的动态亲和力测定

样品稀释缓冲液为 PBS，0.02%Tween-20，0.1%BSA，pH7.4。0.5 μg/mL

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

结果如表 2 和图 4 至 6 所示，19F3H2L3(hG1DM)与 FcγRIIIa 无结合，而 MEDI9447 与 FcγRIIIa 具有结合活性。

Sample ID	KD (M)	kon (1/Ms)	标准误 (kon)	kdis(1/s)	标准误 (kdis)
19F3H2L3(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
MEDI9447	1.41E-07	2.43E+05	4.36E+04	3.42E-02	2.08E-03
野生型 IgG1 抗体	1.25E-07	1.76E+05	2.22E+04	2.20E-02	1.11E-03

$KD = kdis / kon$

实施例 5: 抗 CD73 抗体联合抗 CTLA-4/PD-1 双特异性抗体有效的阻断肿瘤细胞的生长

本实验考察了抗 CD73 抗体即 19F3H2L3(hG1DM)联合抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体 BiAb004 (hG1TM)（其重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:35 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:36 所示，轻链及重链 CDR 氨基酸序列如 SEQ ID NO:23 至 SEQ ID NO:34 所示）抑制肿瘤生长的药理学活性。

结果如图 7 所示，抗 CD73 抗体联合抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体较抗 CD73 抗体单药、抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体单药显示出更为优异的抑制肿瘤作用，并且对小鼠体重无显著影响（图 8）。

表 3. 实验设计

N（每组小鼠的数量）	给药组	给药剂量 (mg/kg)	开始给药时间	实际给药频次
8	同型对照抗体	30	接种后第 5 天，D0	BIW * 3.5，共 7 次， 腹腔注射
8	抗 CD73 抗体	30		

8	抗 PD-1/CTLA-4 抗体	0.2		
8	抗 PD-1/CTLA-4 抗体	0.2		
	抗 CD73 抗体	30		

将小鼠结肠癌细胞 MC38-hPDL1/hCD73 (江苏集萃药康生物科技有限公司提供) 复苏, 复苏代次为 Pn+3 代。收集对数生长期的 MC38-hPDL1/hCD73 细胞, 去除培养液并用 PBS 洗两次后接种 C57BL/6-hPDL1/hPDL1/hCD73 小鼠(江苏集萃药康生物科技有限公司提供) (荷瘤前、荷瘤后 MC38-hPDL1/hCD73 细胞存活率分别为: 99.1% 及 96.4 %), 接种量: 2×10^6 /100 μ L/只, 接种位置: 小鼠右前肢。接种后第 5 天, 平均肿瘤体积达到 86.02 mm³ 时, 32 只小鼠根据肿瘤体积随机分成 4 组, 每组 8 只。分组当天定义为 Day 0 天, 并按照表 3 于 Day 0 天开始给药。

细胞接种后, 每周常规监测肿瘤对动物正常行为的影响。给药日期: Day 0、Day 3、Day 7、Day 10、Day 14、Day 17、Day 22 天。Day 0、Day 3、Day 6、Day 10、Day 13、Day 17、Day 20、Day 23 天观测肿瘤大小并称重小鼠体重。在 Day23 实验结束后, 挖取各组动物的肿瘤组织称重。小鼠体重变化率、肿瘤重量等实验结果以平均值 $\pm$ 标准误差 (Mean $\pm$ SEM) 表示。采用独立样本 T 检验比较不同治疗组与对照组相比有无显著性差异, $P < 0.05$ 被认为具有显著性差异。数据使用 Graphpad 或 Excel 进行做图。

实施例 6: 抗 CD73 抗体对抑制细胞内源表达 CD73 酶活性的检测

实验步骤如下: 取状态良好的对数期 MDA-MB-231 细胞(来源于 ATCC, HTB-26), 用无血清的 RPMI-1640 培养液将细胞重悬、计数; 将 MDA-MB-231 细胞接种至 96 孔板, 3×10^4 个细胞/100 μ L/孔; 用无血清 RPMI-1640 培养液稀释抗体, 起始浓度 200 μ g/ml, 按 2.5 倍进行梯度稀释; 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 RPMI-1640 稀释的 600 μ M AMP; 3 小时后取 25 μ L 细胞培养液上清, 转移至新 96 孔板, 每孔加入 25 μ L 100 μ M 的 ATP; 和 50 μ L CTG

(CellTiter-Glo® One Solution Assay, promega, Cat: G8461) 显色液, 进行显色, 多标记微孔板检测仪 (PerkinElmer, 货号: 2140-0020) 读取数

据。同型对照抗体及 CD73 特异性抑制剂 APCP 分别作为阴性对照及阳性对照。

实验结果：结果如图 9 所示，19F3、19F3H2L3(hG1DM)、19F3H2L3(hG1DM)和 19F3H2L3(hG1DM)均可呈剂量依赖性抑制 MDA-MB-231 内源表达的 CD73 酶催化 AMP 为腺苷 A 的活性，从而剂量依赖性降低产生的平均荧光强度 RLU。

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

权 利 要 求

1. 抗 CD73(例如人 CD73)抗体或其抗原结合片段, 其中, 根据 IMGT 编号系统, 所述抗 CD73 抗体包含:

SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 10 所示的重链可变区的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3; 和 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 14 所示的轻链可变区的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3;

优选地, 根据 IMGT 编号系统, 所述抗 CD73 抗体包含

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

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

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

LCDR1, 其包含 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列, 与所述序列具有至少 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、

90%，优选至少 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%，98%或 99% 序列同一性的序列，或与所述序列相比具有一个或多个（优选 1 个、2 个或 3 个）保守氨基酸突变（优选置换，插入或缺失）的氨基酸序列，或由其组成，

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

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

2. 权利要求 1 所述的抗 CD73 抗体或其抗原结合片段，所述抗体的重链可变区包含下述序列，或由下述序列组成：

SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 10，与 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 10 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: 6 或 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列相比具有一个或多个（优选 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个）保守氨基酸突变（优选置换，插入或缺失）的氨基酸序列；并且

所述抗体的轻链可变区包含下述序列，或由下述序列组成：

SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 14，与 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 14 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: 4、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列相比具有一个或多个（优选 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个）保守氨基酸突变（优选置换，插入或缺失）的氨基酸序列。

3. 权利要求 1 或 2 所述的抗 CD73 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示，并且所述抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示；

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

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

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

4. 权利要求 1 或 2 所述的抗 CD73 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体的重链恒定区为 Ig gamma-1 链 C 区，ACCESSION: P01857；轻链恒定区为 Ig kappa 链 C 区，ACCESSION: P01834。

5. 权利要求 1 或 2 所述的抗 CD73 抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体为单克隆抗体、人源化抗体、嵌合抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体）。

6. 权利要求 1 或 2 所述的抗 CD73 抗体或其抗原结合片段，所述抗原结合片段选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb、Fab/c、互补决定区片段、单链抗体（例如，scFv）、人源化抗体、嵌合抗体或双特异性抗体。

7. 分离的多肽，其选自以下各项组成的组：

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

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

CD73, 所述抗体还包含 SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 和 SEQ ID NO:17 所示的序列。

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

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

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

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

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

8. 核酸分子, 其编码权利要求 1-6 任一项所述的抗体或其抗原结合片段, 或权利要求 7 所述分离的多肽。

9. 载体, 其包含权利要求 8 所述的核酸分子。

10. 宿主细胞, 其包含权利要求 8 所述的核酸分子, 或权利要求 9 所述的载体。

11. 偶联物, 其包含权利要求 1-6 任一项所述的抗体或其抗原结合片段以及偶联部分, 其中, 所述偶联部分为纯化标签(如 His 标签), 可检测的标记; 优选地, 所述偶联部分为放射性同位素、荧光物质、化学发光物质、有色物质、聚乙二醇或酶。

12. 融合蛋白或多特异性抗体(优选双特异性抗体), 其包含权利

要求 1-6 任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

13. 试剂盒，其包括权利要求 1-6 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 11 所述的偶联物或权利要求 12 所述的融合蛋白或多特异性抗体；优选地，所述试剂盒还包括第二抗体，其特异性识别所述抗体；任选地，所述第二抗体还包括可检测的标记，例如放射性同位素、荧光物质、化学发光物质、有色物质或酶；优选地，所述试剂盒用于检测 CD73 在样品中的存在或其水平。

14. 药物组合物，其包含权利要求 1-6 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 11 所述的偶联物或权利要求 12 所述的融合蛋白或多特异性抗体；可选地，所述药物组合物还包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。优选地，所述药物组合物为适于通过皮下注射、皮内注射、静脉内注射、肌肉注射或病灶内注射施用的形式。

15. 权利要求 1-6 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 11 所述的偶联物或权利要求 12 所述的融合蛋白或多特异性抗体在制备治疗和/或预防肿瘤（例如实体瘤，优选非小细胞肺癌、前列腺癌（包括转移性去势抵抗前列腺癌（mCRPC））、三阴性乳腺癌、卵巢癌、结直肠癌（包括结微卫星稳定（MSS）和错配修复功能缺陷/微卫星不稳定（dMMR/MSI-high）型）、胃癌（包括结微卫星稳定（MSS）和错配修复功能缺陷/微卫星不稳定（dMMR/MSI-high）型）、黑色素瘤、头颈癌、肾细胞癌或胰管腺癌的药物中的用途，或者在制备用于诊断肿瘤的药物中的用途。

16. 杂交瘤细胞株，其选自：

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。

17. 试剂盒，其包含(1) 权利要求 1-6 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 11 所述的偶联物或权利要求 12 所述的融合蛋白或多特异性抗体，和(2) 抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体，和任选地，使用说明书，优选地，所述抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:35 所示，轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:36 所示。

18. 治疗和/或预防肿瘤的方法，包括对患者施用治疗有效量的药物

A 和治疗有效量的药物 B, 其中药物 A 包含权利要求 1-6 任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 11 所述的偶联物或权利要求 12 所述的融合蛋白或多特异性抗体, 药物 B 包含抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体, 优选地, 药物 A 和药物 B 同时或顺序施用, 其中所述顺序施用为先施用药物 A 或先施用药物 B, 优选地, 所述抗 PD-1/CTLA-4 双特异性抗体的重链氨基酸序列如 SEQ ID NO:35 所示, 轻链氨基酸序列如 SEQ ID NO:36 所示。