



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112574313 B

(45) 授权公告日 2021.05.11

(21) 申请号 202110206975.X

(22) 申请日 2021.02.25

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 112574313 A

(43) 申请公布日 2021.03.30

(73) 专利权人 吴江近岸蛋白质科技有限公司  
地址 215200 江苏省苏州市吴江经济开发区科技创业园综合楼

(72) 发明人 李德彬 宋作伟 路娜 于福涛  
王小燕 薛玉婷 林超 许波琳  
曲平

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266  
代理人 徐迅 马莉华

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

审查员 汪豪杰

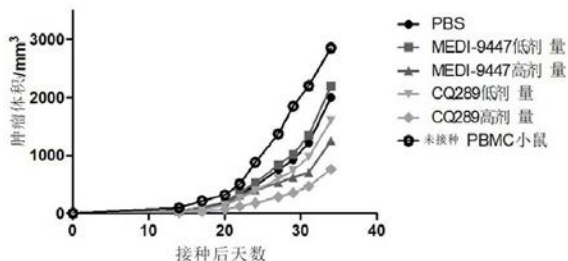
权利要求书2页 说明书18页  
序列表7页 附图10页

(54) 发明名称

抗CD73抗体及其用途

(57) 摘要

本发明提供了抗CD73抗体及其用途。具体地,本发明提供了一种高亲和力高生物活性的CD73抗体,所述抗体能够和CD73高亲和力结合,并能显著抑制CD73蛋白酶活,诱导CD73的肿瘤细胞内化,从而治疗和/或预防癌症相关疾病。



1. 一种抗CD73的抗体,其特征在于,所述抗体包括轻链和重链,并且,所述的轻链的轻链可变区包括以下三个轻链CDR:  
SEQ ID NO:8所示的VL-CDR1,  
SEQ ID NO:9所示的VL-CDR2,和  
SEQ ID NO:10所示的VL-CDR3;  
其中,所述的重链的重链可变区包括以下三个重链CDR:  
SEQ ID NO:3所示的VH-CDR1,  
SEQ ID NO:4所示的VH-CDR2,和  
SEQ ID NO:5所示的VH-CDR3。
2. 如权利要求1所述的抗体,其特征在于,所述的抗体的轻链包括所述的三个轻链CDR以及用于连接轻链CDR的轻链框架区;和所述的抗体的重链包括所述的三个重链CDR以及用于连接重链CDR的重链框架区。
3. 一种重组蛋白,其特征在于,所述的重组蛋白具有:
  - (i) 轻链和重链,或者所述轻链和所述重链形成的抗CD73的抗体,  
其中,所述轻链的轻链可变区包括SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9和SEQ ID NO: 10所示的3个轻链CDR,而所述重链的重链可变区包括SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4和SEQ ID NO: 5所示的3个重链CDR;  
以及(ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。
4. 一种抗体制剂,其特征在于,所述的抗体制剂包括:
  - (a) 如权利要求1所述的抗体;以及
  - (b) 载体,所述的载体包括:缓冲剂、无菌水。
5. 一种试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒含有权利要求4所述的抗体制剂,以及盛装所述抗体制剂的容器。
6. 一种CAR构建物,其特征在于,所述的CAR构建物的抗原结合区域的scFv区段为特异性结合于CD73的结合区,并且所述scFv区段具有轻链可变区和重链可变区,其中,轻链可变区包括SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9和SEQ ID NO: 10所示的3个轻链CDR,而重链可变区包括SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4和SEQ ID NO: 5所示的3个重链CDR。
7. 一种重组的免疫细胞,其特征在于,所述的免疫细胞表达外源的如权利要求6所述的CAR构建物。
8. 一种抗体药物偶联物,其特征在于,所述的抗体药物偶联物含有:
  - (a) 抗体部分,所述抗体部分选自下组:如权利要求1所述的抗体、或权利要求3所述的重组蛋白、或其组合;和
  - (b) 与所述抗体部分偶联的偶联部分,所述偶联部分选自下组:可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、或其组合。
9. 一种活性成分的用途,其特征在于,所述活性成分选自下组:如权利要求1所述的抗体、如权利要求3所述的重组蛋白、如权利要求6所述的CAR构建物、如权利要求7所述的免疫细胞、如权利要求8所述的抗体药物偶联物、或其组合,所述活性成分用于:
  - (a) 制备检测试剂或试剂盒;
  - (b) 制备预防和/或治疗CD73相关疾病的药物或制剂;和/或

(c) 制备预防和/或治疗抗人CD73 抗体相关的癌症或肿瘤的药物或制剂。

10. 一种药物组合物,其特征在於,所述的药物组合物含有:

(i) 活性成分,所述活性成分选自下组:如权利要求1所述的抗体、如权利要求3所述的重组蛋白、如权利要求6所述的CAR构建物、如权利要求7所述的免疫细胞、如权利要求8所述的抗体药物偶联物、或其组合;以及

(ii) 药学上可接受的载体。

11. 一种多核苷酸,其特征在於,所述的多核苷酸编码选自下组的多肽:

- (1) 如权利要求1所述的抗体;或
- (2) 如权利要求3所述的重组蛋白;
- (3) 如权利要求6所述的CAR构建物。

12. 一种载体,其特征在於,所述的载体含有如权利要求11所述的多核苷酸。

13. 一种遗传工程化的宿主细胞,其特征在於,所述的宿主细胞含有如权利要求12所述的载体或基因组中整合有如权利要求11所述的多核苷酸。

14. 一种体外非诊断的检测样品中CD73蛋白的方法,其特征在於,所述方法包括步骤:

- (1) 在体外,将所述样品与如权利要求1所述的抗体接触;
- (2) 检测是否形成抗原-抗体复合物,其中形成复合物就表示样品中存在CD73蛋白。

## 抗CD73抗体及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,具体地,本发明涉及一种抗CD73抗体及其用途。

### 背景技术

[0002] CD73,分化簇73,也叫5'-核苷酸酶,通过GPI(糖基磷脂酰肌醇)锚定在细胞膜上,结构为二聚体。CD73在肿瘤微环境中发挥重要作用,可以将AMP转化成腺苷,腺苷通过与特异的G蛋白偶联受体结合,导致免疫细胞在肿瘤部位浸润异常,调控多种癌症的增殖和迁移,主要抑制T细胞相关的免疫系统的功能,是肿瘤预后不良的标志。

[0003] 在过去的大量研究中表明,抑制CD73可以阻止肿瘤的发生和转移。不管是CD73的小分子酶抑制剂还是大分子抗体,都表现出了抗肿瘤效果。CD73表达在多种肿瘤细胞表面,包括肺癌、黑色素瘤、结肠癌、胰腺癌等肿瘤细胞。除此之外,多种免疫细胞也受到CD73影响,CD73表达在Treg表面,参与Treg对免疫活化的抑制性调节;分泌的腺苷可以与DC细胞上腺苷受体结合,从而抑制DC的功能;CD73在M2型巨噬细胞上高表达,增强了肿瘤的转移。

[0004] CD73靶点在肿瘤治疗中的潜力巨大,CD73的抗体还可以增强PD1抗体和CTLA4抗体的作用。但是目前还没有CD73的特异性靶向抗体上市。此外,由于鼠单抗在临床治疗时会引起人抗鼠抗体反应(human anti-mouse antibody,HAMA),因此在临床治疗上受到限制。抗体人源化技术可以很大程度的降低鼠单抗的免疫原性。

[0005] 因此,鉴于CD73在各类相关疾病中作用和功能,本领域需要开发一种适于治疗患者的抗CD73人源化抗体。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种高亲和力高生物活性的抗CD73人源化抗体。

[0007] 在本发明的第一方面,提供了一种抗CD73的抗体,所述抗体包括轻链和重链,

[0008] 并且,所述的轻链的轻链可变区包括以下三个轻链CDR:

[0009] SEQ ID NO:8所示的VL-CDR1,

[0010] SEQ ID NO:9所示的VL-CDR2,和

[0011] SEQ ID NO:10所示的VL-CDR3;

[0012] 其中,所述的重链的重链可变区包括以下三个重链CDR:

[0013] SEQ ID NO:3所示的VH-CDR1,

[0014] SEQ ID NO:4所示的VH-CDR2,和

[0015] SEQ ID NO:5所示的VH-CDR3。

[0016] 在另一优选例中,上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个(如1-3个,较佳地1-2个,更佳地1个)氨基酸并能够保留CD73结合亲和力的衍生序列。

[0017] 在另一优选例中,所述的抗体的轻链包括所述的三个轻链CDR以及用于连接轻链CDR的轻链框架区;和所述的抗体的重链包括所述的三个重链CDR以及用于连接重链CDR的

重链框架区。

[0018] 在另一优选例中,所述轻链可变区还包括人源的FR区或鼠源的FR区。

[0019] 在另一优选例中,所述轻链可变区选自下组:序列如SEQ ID NO: 6或SEQ ID NO: 16所示的轻链可变区。

[0020] 在另一优选例中,所述抗体的轻链还包括轻链恒定区。

[0021] 在另一优选例中,所述的轻链恒定区为人源、鼠源或兔源的,较佳地为人源的。

[0022] 在另一优选例中,所述重链可变区还包括人源的FR区或鼠源的FR区。

[0023] 在另一优选例中,所述重链可变区选自下组:序列如SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 15所示的重链可变区。

[0024] 在另一优选例中,所述的抗体的重链还包括重链恒定区。

[0025] 在另一优选例中,所述的重链恒定区为人源、鼠源或兔源的,较佳地为人源的。

[0026] 在另一优选例中,所述抗体为人源化抗体。

[0027] 在另一优选例中,所述抗体对人CD73蛋白结合的亲和力常数KD(M)为 $(0.5-10) \times 10^{-9}$ ,较佳地为 $(1-9) \times 10^{-9}$ ,更佳地为 $(5-6) \times 10^{-9}$ 。

[0028] 在另一优选例中,所述抗体选自:动物源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、或其组合。

[0029] 在另一优选例中,所述的抗体为双链抗体、或单链抗体。

[0030] 在另一优选例中,所述的抗体为单克隆抗体。

[0031] 在另一优选例中,所述的抗体包括单特异性、双特异性、或三特异性抗体。

[0032] 在本发明的第二方面,提供了一种重组蛋白,所述的重组蛋白具有:

[0033] (i) 轻链和/或重链,或者所述轻链和所述重链形成的抗CD73的抗体,

[0034] 其中,所述轻链的轻链可变区包括SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9和SEQ ID NO: 10所示的3个轻链CDR,而所述重链的重链可变区包括SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4和SEQ ID NO: 5所示的3个重链CDR;

[0035] 以及(ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

[0036] 在另一优选例中,所述的标签序列包括6His标签。

[0037] 在另一优选例中,所述的重组蛋白(或多肽)包括融合蛋白。

[0038] 在另一优选例中,所述的重组蛋白为单体、二聚体、或多聚体。

[0039] 在另一优选例中,所述的重组蛋白还包括与所述元件(i)融合在一起的额外的融合元件(或融合多肽片段)。

[0040] 在本发明的第三方面,提供了一种抗体制剂,所述的抗体制剂包括:

[0041] (a) 如本发明第一方面所述的抗体;以及

[0042] (b) 载体,所述的载体包括:缓冲剂、无菌水,任选的表面活性剂。

[0043] 在本发明的第四方面,提供了一种试剂盒,所述的试剂盒含有本发明第三方面所述的抗体制剂,以及盛装所述抗体制剂的容器。

[0044] 在本发明的第五方面,提供了一种CAR构建物,所述的CAR构建物的抗原结合区域的scFv区段为特异性结合于CD73的结合区,并且所述scFv区段具有轻链可变区和重链可变区,其中,轻链可变区包括SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10所示的3个轻链CDR,而重链可变区包括SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5所示的3个重链CDR。

[0045] 在本发明的第六方面,提供了一种重组的免疫细胞,所述的免疫细胞表达外源的

本发明的第五方面所述的CAR构建物。

[0046] 在另一优选例中,所述的免疫细胞选自下组:NK细胞、T细胞。

[0047] 在另一优选例中,所述的免疫细胞来自人或非人哺乳动物(如鼠)。

[0048] 在本发明的第七方面,提供了一种抗体药物偶联物,所述的抗体药物偶联物含有:

[0049] (a) 抗体部分,所述抗体部分选自下组:如本发明第一方面所述的抗体、或本发明第二方面所述的重组蛋白、或其组合;和

[0050] (b) 与所述抗体部分偶联的偶联部分,所述偶联部分选自下组:可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、或其组合。

[0051] 在本发明的第八方面,提供了一种活性成分的用途,所述活性成分选自下组:如本发明第一方面所述的抗体、或本发明第二方面所述的重组蛋白、如本发明第五方面所述的CAR构建物、如本发明第六方面所述的免疫细胞、如本发明第七方面所述的抗体药物偶联物、或其组合,所述活性成分用于:

[0052] (a) 制备检测试剂或试剂盒;

[0053] (b) 制备预防和/或治疗CD73相关疾病的药物或制剂;和/或

[0054] (c) 制备预防和/或治疗癌症或肿瘤的药物或制剂。

[0055] 在另一优选例中,所述癌症或肿瘤选自下组:肺癌、黑色素瘤、结肠癌、胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、食道癌、胃肠癌、肝癌、淋巴瘤、骨髓瘤、白血病。

[0056] 在本发明的第九方面,提供了一种药物组合物,所述的药物组合物含有:

[0057] (i) 活性成分,所述活性成分选自下组:如本发明第一方面所述的抗体、或本发明第二方面所述的重组蛋白、如本发明第五方面所述的CAR构建物、如本发明第六方面所述的免疫细胞、如本发明第七方面所述的抗体药物偶联物、或其组合;以及

[0058] (ii) 药学上可接受的载体。

[0059] 在另一优选例中,所述的药物组合物为液态制剂。

[0060] 在另一优选例中,所述的药物组合物为注射剂。

[0061] 在另一优选例中,所述的药物组合物用于治疗肿瘤。

[0062] 在另一优选例中,所述肿瘤为高表达CD73的肿瘤。

[0063] 在本发明的第十方面,提供了一种多核苷酸,所述的多核苷酸编码选自下组的多肽:

[0064] (1) 如本发明第一方面所述的抗体;或

[0065] (2) 如本发明第二方面所述的重组蛋白;

[0066] (3) 如本发明第五方面所述的CAR构建物。

[0067] 在本发明的第十一方面,提供了一种载体,所述的载体含有如本发明的第十方面所述的多核苷酸。

[0068] 在另一优选例中,所述的载体包括:细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒、或其他载体。

[0069] 在本发明的第十二方面,提供了一种遗传工程化的宿主细胞,所述的宿主细胞含有如本发明的第十一方面所述的载体或基因组中整合有如本发明的第十方面所述的多核苷酸。

[0070] 在本发明的第十三方面,提供了一种体外非诊断的检测样品中CD73蛋白的方法,

所述方法包括步骤：

[0071] (1) 在体外,将所述样品与如本发明第一方面所述的抗体接触；

[0072] (2) 检测是否形成抗原-抗体复合物,其中形成复合物就表示样品中存在CD73蛋白。

[0073] 在本发明的第十四方面,提供了一种体外的检测(包括诊断性或非诊断性)样品中CD73蛋白的方法,所述方法包括步骤：

[0074] (1) 在体外,将所述样品与如本发明第一方面所述的抗体接触；

[0075] (2) 检测是否形成抗原-抗体复合物,其中形成复合物就表示样品中存在CD73蛋白。

[0076] 在本发明的第十五方面,提供了一种治疗CD73相关疾病的方法,所述方法包括：

[0077] 给需要的对象施用如本发明第一方面的抗体、所述的抗体的药物偶联物、或表达所述抗体的CAR-T细胞、或其组合。

[0078] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

## 附图说明

[0079] 图1显示了CQ134与重组hCD73蛋白的亲合力大小。

[0080] 图2显示了通过ELISA的方法检测CQ134与重组猴CD73的结合情况。

[0081] 图3显示了CQ134与人CD73阳性细胞(SK-0V-3细胞)的结合情况。

[0082] 图4显示了CQ134与猴CD73阳性细胞(CHOK1-cynoCD73细胞)的结合情况。

[0083] 图5显示了CD73抗体(CQ134和MEDI-9447)对rhCD73蛋白活性的影响。

[0084] 图6显示了CQ134对人SK-0V-3细胞上CD73活性的影响。

[0085] 图7显示了CQ134对CHOK1-cynoCD73细胞上CD73活性的影响。

[0086] 图8显示了通过ELISA的方法检测人源化抗体CQ289与重组人CD73的结合情况。

[0087] 图9显示了通过ELISA的方法检测人源化抗体CQ289与重组猴CD73的结合情况。

[0088] 图10显示了人源化抗体CQ289与SK-0V-3细胞的结合情况。

[0089] 图11显示了人源化抗体CQ289对rhCD73蛋白活性的影响。

[0090] 图12显示了人源化抗体CQ289对人SK-0V-3细胞上CD73活性的影响。

[0091] 图13显示了CD73抗体(人源化抗体CQ289和MEDI-9447)介导的细胞内化结果。

[0092] 图14显示了人源化抗体CQ289抑制人黑色素瘤细胞A375在小鼠体内的增殖。

## 具体实施方式

[0093] 本发明人经过广泛而深入地研究,经过大量筛选,意外地获得一种具有优异亲和力的抗CD73人源化抗体。实验表明,本发明的CD73抗体能够与CD73高亲和力结合。通过对人源化抗体的结合实验和亲和力的检测,所述抗体与人和猴的CD73蛋白、CD73阳性细胞特异性结合,并具有抑制CD73蛋白酶活的效果。本发明的抗体还可以诱导CD73的肿瘤细胞内化。在小鼠实验中,本发明的抗体表现出比AstraZeneca(AZ)/Medimmune的MEDI-9447更优的抗肿瘤活性。在此基础上完成了本发明。

[0094] 术语

[0095] 如本文所用,术语“给予”和“处理”是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物应用于动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体。“给予”和“处理”可以指治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触、以及试剂与流体的接触、流体与细胞的接触。“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理。“处理”当应用于人、动物或研究受试者时,是指治疗处理、预防或预防性措施,研究和诊断;包括CD73抗体与人或动物、受试者、细胞、组织、生理区室或生理流体的接触。

[0096] 如本文所用,术语“治疗”指给予患者内用或外用治疗剂,包含本发明的任何一种CD73抗体及其组合物,所述患者具有一种或多种疾病症状,而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常,以有效缓解一种或多种疾病症状的治疗剂的量(治疗有效量)给予患者。

[0097] 如本文所用,术语“任选”或“任选地”意味着随后所描述的事件或情况可以发生但不是必须发生。例如,“任选包含1-3个抗体重链可变区”是指特定序列的抗体重链可变区可以有但不是必须有,可以是1个、2个或3个。

[0098] 抗体

[0099] 如本文所用,术语“抗体”指免疫球蛋白,是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同,故其抗原性也不同。据此,可将免疫球蛋白分为五类,或称为免疫球蛋白的不同种型,即IgM、IgD、IgG、IgA和IgE,对应于不同类免疫球蛋白的重链恒定区分别称为a、d、e、g、和m。IgG代表免疫球蛋白中最重要的一类,由于化学结构和生物功能差异,它又可以分为4个子类:IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 $\kappa$ 或 $\lambda$ 链。不同类免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是本领域人员所熟知的。

[0100] 抗体重链和轻链靠近N端的约110个氨基酸的序列变化很大,为可变区(V区);靠近C端的其余氨基酸序列相对稳定,为恒定区(C区)。可变区包括3个高变区(HVR)和4个序列相对保守的FR区(FR)。4个FR的氨基酸序列相对比较保守,不直接参与结合反应。3个高变区决定抗体的特异性,又称为互补性决定区(CDR)。每条轻链可变区(LCVR)和重链可变区(HCVR)由3个CDR区和4个FR区组成,从氨基端到羧基端依次排列的顺序为FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。轻链的3个CDR区,即轻链高变区(LCDR),指LCDR1、LCDR2和LCDR3;重链的3个CDR区,即重链高变区(HCDR),指HCDR1、HCDR2和HCDR3。发明所述的抗体或抗原结合片段的LCVR和HCVR区的CDR氨基酸残基在数量和位置符合已知的Kabat编号规则(LCDR1-3, HCDR2-3),或者符合kabat和chothia的编号规则(HCDR1)。天然重链和轻链可变区中的四个FR区大致上呈b-折叠构型,由形成连接环的三个CDR相连,在某些情况下可形成部分b折叠结构。每条链中的CDR通过FR区紧密地靠在一起并与另一链的CDR一起形成了抗体的抗原结合部位。可以通过比较同类型的抗体的氨基酸序列来确定是哪些氨基酸构成了FR或CDR区域。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但是它们表现出不同的效应功能,例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。

[0101] 如本文所用,术语“抗原结合片段”,指具有抗原结合活性的Fab片段,Fab'片段,F(ab')<sub>2</sub>片段,或单一Fv片段。Fv抗体含有抗体重链可变区、轻链可变区,但没有恒定区,并具



有全部抗原结合位点的最小抗体片段。一般的，Fv抗体还包含VH和VL结构域之间的多肽接头，且能够形成抗原结合所需的结构。

[0102] 如本文所用，术语“抗原决定簇”指抗原上不连续的，由本发明抗体或抗原结合片段识别的三维空间位点。

[0103] 本发明不仅包括完整的抗体，还包括具有免疫活性的抗体的片段或抗体与其他序列形成的融合蛋白。因此，本发明还包括所述抗体的片段、衍生物和类似物。

[0104] 在本发明中，抗体包括用本领域技术人员熟知技术所制备的鼠的、嵌合的、人源化的或者全人的抗体。重组抗体，例如嵌合的和人源化的单克隆抗体，包括人的和非人的部分，可以采用本领域熟知的DNA重组技术制备。

[0105] 如本文所用，术语“单克隆抗体”指得自单个细胞来源的克隆分泌的抗体。单克隆抗体是高度特异性的，针对单个抗原表位。所述的细胞可能是真核的、原核的或噬菌体的克隆细胞株。

[0106] 如本文所用，术语“嵌合抗体”是由鼠源性抗体的V区基因与人抗体的C区基因拼接为嵌合基因，然后插入载体，转染宿主细胞表达的抗体分子。既保留了亲本鼠抗体的高特异性和亲和力，又使其人源Fc段能有效介导生物学效应功能。

[0107] 如本文所用，术语“人源化抗体”，是本发明鼠抗的一种可变区改造形式，具有源自（或基本上源自）非人类抗体（优选小鼠单克隆抗体）的CDR区，和基本源自人源抗体序列的FR区和恒定区；即将鼠抗的CDR区序列嫁接到不同类型的人种系抗体构架序列上。因为CDR序列负责大部分的抗体-抗原相互作用，所以可以通过构建表达载体来表达模拟特定天然存在的抗体性质的重组抗体。

[0108] 在本发明中，抗体可以是单特异性、双特异性、三特异性、或者更多的多重特异性。

[0109] 在本发明中，本发明的抗体还包括其保守性变异体，指与本发明抗体的氨基酸序列相比，有至多10个，较佳地至多8个，更佳地至多5个，最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表A进行氨基酸替换而产生。

[0110] 表 A.

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
[0111] Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

[0112] 抗CD73抗体

[0113] 如本文所用,术语“CD73”一般是指天然的或重组的人CD73,以及人CD73的非人同源物。

[0114] 本发明提供一种针对CD73的高特异性和高亲和力的抗体,其包括重链和轻链,所述重链含有重链可变区(VH)氨基酸序列,所述轻链含有轻链可变区(VL)氨基酸序列。

[0115] 在本发明中,通过选择优质的人CD73抗原免疫小鼠,取小鼠免疫细胞构建噬菌体库,采用特殊的噬菌体展示技术,将单链抗体(scfv)展示到噬菌体表面,通过CD73抗原多轮筛选,获得抗体序列,通过重组构建方式构建到hIgG1框架的真核表达载体上,哺乳动物细胞表达获得抗CD73全长抗体(即获得人鼠嵌合抗体)。

[0116] 在本发明的一个优选实施例中,所获得的一个人鼠嵌合的抗CD73全长抗体为CQ134抗体蛋白。所获得的CQ134抗体可以和肿瘤表明的CD73分子结合,并且抑制人卵巢腺癌细胞上的CD73活性。具有治疗多种CD73过表达肿瘤的潜力。

[0117] 优选地,重链可变区(VH)的CDR选自下组:

[0118] SEQ ID NO:3所示的VH-CDR1,

[0119] SEQ ID NO:4所示的VH-CDR2,和

[0120] SEQ ID NO:5所示的VH-CDR3;和/或

[0121] 轻链可变区(VL)的CDR选自下组:

[0122] SEQ ID NO:8所示的VL-CDR1,

[0123] SEQ ID NO:9所示的VL-CDR2,和

[0124] SEQ ID NO:10所示的VL-CDR3。

[0125] 其中,上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个(如1-5、1-3个,较佳地1-2个,更佳地1个)氨基酸的具有CD73结合亲和力的衍

生序列。

[0126] 在另一优选例中,所述经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸序列所形成的序列优选为同源性为至少80%,较佳地至少85%,更佳地至少为90%,最佳地至少95%的氨基酸序列。

[0127] 本发明的抗体可以是双链或单链抗体,并且可以是选自动物源抗体、嵌合抗体、人源化抗体,更优选为人源化抗体、人-动物嵌合抗体,更优选为全人源化抗体。

[0128] 本发明所述抗体衍生物可以是单链抗体、和/或抗体片段,如:Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>或该领域内其他已知的抗体衍生物等,以及IgA、IgD、IgE、IgG以及IgM抗体或其他亚型的抗体中的任意一种或几种。

[0129] 其中,所述动物优选为哺乳动物,如鼠。

[0130] 本发明抗体可以是靶向人CD73的鼠源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、CDR嫁接和/或修饰的抗体。

[0131] 在本发明的一种优选实施例中,上述SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有CD73结合亲和力的序列,位于重链可变区(VH)的CDR区。

[0132] 在本发明的一种优选实施例中,上述SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有CD73结合亲和力的序列,位于轻链可变区(VL)的CDR区。

[0133] 在本发明的一种更优选实施例中,VH CDR1、CDR2、CDR3分别独立地选自SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有CD73结合亲和力的序列;VL CDR1、CDR2、CDR3分别独立地选自SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有CD73结合亲和力的序列。

[0134] 本发明上述内容中,所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量,优选为不超过初始氨基酸序列总氨基酸数量的40%,更优选为不超过35%,更优选为1-33%,更优选为5-30%,更优选为10-25%,更优选为15-20%。

[0135] 在本发明中,所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量通常是1、2、3、4或5个,较佳地为1-3个,更佳地为1-2个,最佳地为1个。

[0136] 在本发明的一种优选实施例中,提供了一种抗人CD73(CQ134)的抗体:

[0137] CQ134轻链可变区(SEQ ID NO: 6):

[0138] DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGT  
DYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFGGGTKLEIKR

[0139] CQ134重链可变区(SEQ ID NO: 1):

[0140] QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTGYWMQWVRQRPQGLEWIGAIYPGDGDTRYTQKFKGKAI  
LTADKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCATRGDWDYWFVDVWGAGTTVTVSS

[0141] hIgG1恒定区氨基酸序列(SEQ ID NO: 11):

[0142] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0143] kappa链恒定区氨基酸序列 (SEQ ID NO:13) :

[0144] TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS  
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC。

[0145] 本发明还提供了编码上述氨基酸的核苷酸序列:

[0146] CQ134 VH核苷酸序列 (SEQ ID NO:2) :

[0147] CAGGTT CAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGCAAGACCTGGGGCTCAGTGAAGTTGCCTGCAAG  
GCTTCTGGCTACACCTTTACTGGCTACTGGATGCAGTGGGTACGACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGG  
GGCTATTTATCCTGGAGATGGTGATACTAGGTACACTCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCATATTGACTGCAGATAAAT  
CCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCTGGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAACTCGGGGG  
GACTGGGACTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTTTCCTCG

[0148] CQ134 VL核苷酸序列 (SEQ ID NO:6) :

[0149] GACATTCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGC  
AGGGCAAGTCAGGACATTAGCAATTATTTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAAGTGTAAACTCCTGATCTA  
CTACACATCAAGATTACTCAGGAGTCCCATCAAGGTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTACCA  
TTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGCCACTACTTTTGCCAACAGGGTAATACGCTTCCGTGGACGTTCCGGTGA  
GGCACCAAGCTGGAAATCAAACGT

[0150] 所选hIgG1恒定区核苷酸序列为 (SEQ ID NO:12) :

[0151] GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG  
GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGG  
CGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA  
GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC  
AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTT  
CCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG  
AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG  
CAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA  
GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC  
CACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC  
TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGT  
GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT  
TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

[0152] 所选kappa链恒定区核苷酸序列为 (SEQ ID NO:14) :

[0153] ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTC  
TGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG  
GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA  
GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAA  
GAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG。

[0154] 人源化抗CD73抗体

[0155] 1986年Jones等人首次将鼠单抗重链CDR移植到人抗体重链骨架区,然后与鼠单抗轻链组装成完整抗体并保持了与原鼠单抗相似的亲和力,为抗体人源化技术的发展提供了思路。1989年Queen等人通过CDR移植的方法,成功构建抗CD25人源化抗体,该方法使用的是人抗体Eu骨架区进行人源化,在骨架区部分位点保留了鼠源抗体氨基酸以保持亲和力。1992年Presta等人报道了以人抗体亚群共有序列(consensus sequence)为模板进行CDR移植成功构建人源化的方法。1994年Pedersen等人报道了用表面重塑(resurfacing)的方法对抗体人源化。1994年Hsiao等人报道了以人抗体Germline序列骨架区进行CDR移植的人源化方法。1994年Jespersen等人用噬菌体库(shuffling library)的方法成功构建人源化方法。

[0156] 本发明还提供一种针对CD73的高特异性和高亲和力的人源化抗体(CQ289):

[0157] CQ289 VH氨基酸序列(SEQ ID NO: 15):

[0158] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYWMQWVRQAPGQGLEWIGAIYPGDGDTRYTQKFKGRVT  
LTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCATRGDWDYWFVDVWGRGTLVTVSS

[0159] CQ289 VL氨基酸序列(SEQ ID NO: 16):

[0160] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPKGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGT  
DYFTISSLQPEDIATYYCQQGNTLPWTFGGTKVEIK

[0161] 在另一优选例中,所述经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸序列所形成的序列优选为同源性为至少80%,较佳地至少85%,更佳地至少为90%,最佳地至少95%的氨基酸序列。

[0162] 本发明的抗体可以是双链或单链抗体,并且可以优选为全人源化抗体。

[0163] 本发明所述抗体衍生物可以是单链抗体、和/或抗体片段,如:Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、或该领域内其他已知的抗体衍生物等,以及IgA、IgD、IgE、IgG以及IgM抗体或其他亚型的抗体中的任意一种或几种。

[0164] 本发明抗体可以是靶向CD73的人源化抗体、CDR嫁接和/或修饰的抗体。

[0165] 本发明上述内容中,所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量,优选为不超过初始氨基酸序列总氨基酸数量的40%,更优选为不超过35%,更优选为1-33%,更优选为5-30%,更优选为10-25%,更优选为15-20%。

[0166] 抗体的制备

[0167] 任何适于产生单克隆抗体的方法都可用于产生本发明的CD73抗体。例如,可以用连接或天然存在的CD73蛋白或其片段免疫动物。可以使用合适的免疫接种方法,包括佐剂、免疫刺激剂、重复加强免疫接种,可以使用一种或多种途径。

[0168] 任何合适形式的CD73都可以作为免疫原(抗原),用于产生对CD73特异的非人抗体,筛选所述抗体的生物学活性。免疫原可以单独使用,或与本领域已知的一种或多种免疫原性增强剂组合使用。免疫原可以由天然来源纯化,或者在遗传修饰的细胞中产生。编码免疫原的DNA在来源上可以是基因组或非基因组的(例如cDNA)。可以使用合适的遗传载体表达编码免疫原的DNA,所述载体包括但不限于腺病毒载体、杆状病毒载体、质粒和非病毒载体。

[0169] 人源化抗体可以选自任何种类的免疫球蛋白,包括IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。同样,任一类轻链都可以在本文的化合物和方法中使用。具体地说, $\kappa$ 、 $\lambda$ 链或其变体在本发明的化

合物和方法中是可以用的。

[0170] 制备本发明CD73抗体的示例性方法描述于实施例1。

[0171] 本发明抗体或其片段的DNA分子的序列可以用常规技术,比如利用PCR扩增或基因组文库筛选等方法获得。此外,还可将轻链和重链的编码序列融合在一起,形成单链抗体。

[0172] 一旦获得了有关的序列,就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体,再转入细胞,然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

[0173] 此外,还可用人工合成的方法来合成有关序列,尤其是片段长度较短时。通常,通过先合成多个小片段,然后再进行连接可获得序列很长的片段。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。

[0174] 术语“核酸分子”是指DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链或双链的,但优选是双链DNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时,核酸是“有效连接的”。例如,如果启动子或增强子影响编码序列的转录,那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

[0175] 术语“载体”是指能够运输已与其连接的另一个核酸的核酸分子。在一个实施方案中,载体是“质粒”,其是指可将另外的DNA区段连接至其中的环状双链DNA环。

[0176] 本发明还涉及包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞,以使其能够表达蛋白质。

[0177] 术语“宿主细胞”是指已向其中引入了表达载体的细胞。宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞;或是低等真核细胞,如酵母细胞;或是高等真核细胞,如植物或动物细胞(如哺乳动物细胞)。

[0178] 本发明中所述的用重组DNA转化宿主细胞的步骤可用本领域熟知的技术进行。获得的转化子可用常规方法培养,转化子表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞,用常规培养基在合适的条件下培养。

[0179] 通常,在适合本发明抗体表达的条件下,培养转化所得的宿主细胞。然后用常规的免疫球蛋白纯化步骤,如蛋白A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析、离子交换层析、疏水层析、分子筛层析或亲和层析等本领域技术人员熟知的常规分离纯化手段纯化得到本发明的抗体。

[0180] 所得单克隆抗体可用常规手段来鉴定。比如,单克隆抗体的结合特异性可用免疫沉淀或体外结合试验(如放射性免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA))来测定。

[0181] 抗体-药物偶联物(ADC)

[0182] 本发明还提供了基于本发明抗体的抗体偶联药物(antibody-drug conjugate, ADC)。

[0183] 典型地,所述抗体偶联药物包括所述抗体、以及效应分子,所述抗体与所述效应分子偶联,并优选为化学偶联。其中,所述效应分子优选为具有治疗活性的药物。此外,所述效应分子可以是毒蛋白、化疗药物、小分子药物或放射性核素中的一种或多种。

[0184] 本发明抗体与所述效应分子之间可以通过偶联剂进行偶联。所述偶联剂的例子可以是非选择性偶联剂、利用羧基的偶联剂、肽链、利用二硫键的偶联剂中的任意一种或几种。所述非选择性偶联剂是指使效应分子和抗体形成共价键连接的化合物,如戊二醛等。所述利用羧基的偶联剂可以是顺乌头酸酐类偶联剂(如顺乌头酸酐)、酰基脲类偶联剂(偶联

位点为酰基胺)中的任意一种或几种。

[0185] 抗体上某些残基(如Cys或Lys等)用于与多种功能基团相连,其中包括成像试剂(例如发色基团和荧光基团),诊断试剂(例如MRI对比剂和放射性同位素),稳定剂(例如乙二醇聚合物)和治疗剂。抗体可以被偶联到功能剂以形成抗体-功能剂的偶联物。功能剂(例如药物,检测试剂,稳定剂)被偶联(共价连接)至抗体上。功能剂可以直接地、或者是通过接头间接地连接于抗体。

[0186] 抗体可以偶联药物从而形成抗体药物偶联物(ADCs)。典型地,ADC包含位于药物和抗体之间的接头。接头可以是可降解的或者是不可降解的接头。可降解的接头典型地在细胞内环境下容易降解,例如在目标位点处接头发生降解,从而使药物从抗体上释放出来。合适的可降解的接头包括,例如酶降解的接头,其中包括可以被细胞内蛋白酶(例如溶酶体蛋白酶或者内体蛋白酶)降解的含有肽基的接头,或者糖接头例如,可以被葡糖苷酸酶降解的含葡糖苷酸的接头。肽基接头可以包括,例如二肽,例如缬氨酸-瓜氨酸,苯丙氨酸-赖氨酸或者缬氨酸-丙氨酸。其它合适的可降解的接头包括,例如,pH敏感接头(例如pH小于5.5时水解的接头,例如脘接头)和在还原条件下会降解的接头(例如二硫键接头)。不可降解的接头典型地在抗体被蛋白酶水解的条件下释放药物。

[0187] 连接到抗体之前,接头具有能够和某些氨基酸残基反应的活性反应基团,连接通过活性反应基团实现。巯基特异性的活性反应基团是优选的,并包括:例如马来酰亚胺类化合物,卤代酰胺(例如碘、溴或氯代的);卤代酯(例如碘、溴或氯代的);卤代甲基酮(例如碘、溴或氯代),苄基卤代物(例如碘、溴或氯代的);乙烯基砜,吡啶基二硫化物;汞衍生物例如3,6-二-(汞甲基)二氧六环,而对离子是醋酸根、氯离子或者硝酸根;和聚亚甲基二甲基硫醚硫酸盐。接头可以包括,例如,通过硫代丁二酰亚胺连接到抗体上的马来酰亚胺。

[0188] 药物可以是任何细胞毒性,抑制细胞生长或者免疫抑制的药物。在实施方式中,接头连接抗体和药物,而药物具有可以和接头成键的功能性基团。例如,药物可以具有可以和连接物成键的氨基,羧基,巯基,羟基,或者酮基。在药物直接连接到接头的情况下,药物在连接到抗体之前,具有反应的活性基团。

[0189] 有用的药物类别包括,例如,抗微管蛋白药物、DNA小沟结合试剂、DNA复制抑制剂、烷化试剂、抗生素、叶酸拮抗物、抗代谢药物、化疗增敏剂、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱等。在本发明中,药物-接头可以用于在一个简单步骤中形成ADC。在其它实施方式中,双功能连接物化合物可以用于在两步或多步方法中形成ADC。例如,半胱氨酸残基在第一步骤中与接头的反应活性部分反应,并且在随后的步骤中,接头上的功能性基团与药物反应,从而形成ADC。

[0190] 通常,选择接头上功能性基团,以利于特异性地与药物部分上的合适的反应活性基团进行反应。作为非限制性的例子,基于叠氮化合物的部分可以用于特异性地与药物部分上的反应性炔基基团反应。药物通过叠氮和炔基之间的1,3-偶极环加成,从而共价结合于接头。其它的有用的功能性基团包括,例如酮类和醛类(适合与酰肼类和烷氧基胺反应),膦(适合与叠氮反应);异氰酸酯和异硫氰酸酯(适合与胺类和醇类反应);和活化的酯类,例如N-羟基琥珀酰亚胺酯(适合与胺类和醇类反应)。这些和其它的连接策略,例如在《生物偶联技术》,第二版(Elsevier)中所描述的,是本领域技术人员所熟知的。本领域技术人员能够理解,对于药物部分和接头的选择性反应,当选择了一个互补对的反应活性功能基团时,

该互补对的每一个成员既可以用于接头,也可以用于药物。

#### [0191] 抗体制剂

[0192] 抗体在不同的制剂缓冲液中具有不同的稳定性,表现为电荷异质性的变化、抗体分子的降解、聚合等,这些质量性质的变化与抗体本身的理化性质相关,因此,在抗体药物开发过程,需根据不同抗体的理化性质筛选适合其自身的制剂缓冲液。目前常用的抗体制剂缓冲体系有磷酸盐缓冲液、柠檬酸缓冲液、组氨酸缓冲液等,同时根据抗体性质会添加不同浓度的盐离子或山梨醇、海藻糖、蔗糖等赋形剂,以及适量的吐温20或吐温80等表面活性剂,以维持抗体的稳定性。

[0193] 本发明的抗体药物组合制剂可有效抑制本发明人源化抗体的聚集沉淀、水解、氧化及脱酰胺等副反应,同时能有效提高产品在加压(高温、强光照射及冻融等)、加速及长期冷藏条件下的稳定性。

#### [0194] 药物组合物

[0195] 本发明还提供了一种组合物。在优选例中,所述的组合物是药物组合物,它含有上述的抗体或其活性片段或其融合蛋白或其ADC或相应的CAR-T细胞,以及药学上可接受的载体。通常,可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中,其中pH通常约为5-8,较佳地pH约为6-8,尽管pH值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药,其中包括(但并不限于):瘤内、腹膜内、静脉内、或局部给药。

[0196] 本发明所述抗体也可以是由核苷酸序列在细胞内表达用于的细胞治疗,比如,所述抗体用于嵌合抗原受体T细胞免疫疗法(CAR-T)等。

[0197] 本发明的药物组合物可直接用于结合CD73蛋白分子,因而可用于预防和治疗CD73相关的疾病。此外,还可同时使用其他治疗剂。

[0198] 本发明的药物组合物含有安全有效量(如0.001-99wt%,较佳地0.01-90wt%,更佳地0.1-80wt%)的本发明上述的单克隆抗体(或其偶联物)以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量,例如每天约1微克/千克体重-约5毫克/千克体重。此外,本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

[0199] 使用药物组合物时,是将安全有效量的药物组合物施用于哺乳动物,其中该安全有效量通常至少约10微克/千克体重,而且在大多数情况下不超过约50毫克/千克体重,较佳地该剂量是约10微克/千克体重-约20毫克/千克体重。当然,具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素,这些都是熟练医师技能范围之内。

#### [0200] 检测用途和试剂盒

[0201] 本发明的抗体可用于检测应用,例如用于检测样本,从而提供诊断信息。

[0202] 本发明中,所采用的样本(样品)包括细胞、组织样本和活检标本。本发明使用的术语“活检”应包括本领域技术人员已知的所有种类的活检。因此本发明中使用的活检可以包括例如通过内窥镜方法或器官的穿刺或针刺活检制备的组织样本。

[0203] 本发明中使用的样本包括固定的或保存的细胞或组织样本。



[0204] 本发明还提供了一种指含有本发明的抗体(或其片段)的试剂盒,在本发明的一个优选例中,所述的试剂盒还包括容器、使用说明书、缓冲剂等。在优选例中,本发明的抗体可以固定于检测板。

[0205] 本发明的主要优点包括

[0206] (1) 本发明的抗体具有优异的生物活性和特异性;

[0207] (2) 本发明的人源化抗体相较于鼠源和嵌合抗体有更好的安全性;

[0208] (3) 本发明抗体通过竞争性筛选,具有更高的亲和力;

[0209] (4) 本发明抗体来源于噬菌体展示技术,比杂交瘤技术多样性更强。

[0210] (5) 本发明抗体对CD73的酶活性具有显著的抑制作用。

[0211] 下面结合具体实施例,进一步陈述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明详细条件的实验方法,通常按照常规条件如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。

[0212] 实施例1. 抗人CD73单克隆抗体的产生

[0213] 本实施例主要描述小鼠免疫及噬菌体展示获得鼠源抗人CD73单链抗体序列。使用重组人CD73蛋白(C446,Novoprotein)免疫Balb/C小鼠,首次免疫后,每隔14天做加强免疫,共免疫4次,取小鼠血清进行抗体效价评价。评价有效的小鼠取B细胞,提取RNA反转录,构建噬菌体展示库。将重组人CD73蛋白按照1-5 $\mu$ g/ml包板,加入展示的噬菌体,进行噬菌体库筛选,筛选后的未被洗掉的噬菌体收集后感染宿主菌,获得第一轮筛选文库,按照此法进行二轮和三轮筛选。筛选完成后,进行phage-ELISA鉴定,鉴定阳性的送测序获得Anti-CD73候选序列。将CQ134 VH和VL分别构建到含有hIgG1-kappa恒定区的真核表达载体上,转染freestyle 293F细胞,培养3-7天后收集上清,用protein A柱纯化,得到CQ134抗体蛋白。

[0214] CQ134 VH氨基酸序列(SEQ ID NO: 1)

[0215] QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTGYWMQWVRQRPQGLEWIGAIYPGDGTRYTQKFKGKAI  
LTADKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCATRGDWDYWFVDVWGAGTTVTVSS

[0216] CQ134 VL氨基酸序列(SEQ ID NO: 6)

[0217] DIQMTQTTSSLSASLGRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSSGSGGT  
DYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFGGGKLEIKR

[0218] hIgG1恒定区氨基酸序列(SEQ ID NO: 11)

[0219] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV  
VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV  
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK  
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW  
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0220] kappa链恒定区氨基酸序列(SEQ ID NO: 13)

[0221] TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLS  
SLTLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0222] 其中,下划线区为CDRs (IMGT定义,单列如下):

[0223] 表1 鼠源抗CD73抗体CDR序列

结构域	序列	SEQ ID NO.:
VH	CDR1	GYWMQ
	CDR2	AIYPGDGDTRYTQKFKG
	CDR3	RGDWDYWYFDV
VL	CDR1	RASQDISNYLN
	CDR2	YTSRLHS
	CDR3	QQGNTLPWT

[0225] 实施例2.CQ134抗体的亲和力检测

[0226] 本实施例主要描述CQ134与人和猴重组CD73蛋白的亲和检测,以及与人的CD73阳性细胞(SK-0V-3,人卵巢腺癌细胞)以及猴的CD73细胞株(CHOK1-cynoCD73)的亲和检测情况。

[0227] (1)与人CD73蛋白亲和

[0228] 采用Biacore测定CQ134与重组hCD73蛋白的亲和,将CQ134固化,CD73蛋白做两倍梯度(2.5nM-40nM)稀释,所得亲和力图、数据见图1、表2。

[0229] 表2. CQ134与人CD73蛋白亲和力

KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)
5.238E-9	7.009E+5	0.003671

[0231] 即,测得CQ134与rhCD73的亲和力为 $5.238 \times 10^{-9}$ M。

[0232] (2)与猴CD73蛋白亲和

[0233] 将重组猴CD73蛋白按照 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ 包板,加入梯度稀释的CQ134,用ELISA的方法检测CQ134与重组猴CD73结合情况,结果见图2。

[0234] 计算得CQ134的EC50为 $0.3211\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0235] (3)与人CD73阳性细胞结合

[0236] 取 $4 \times 10^5$ 个细胞SK-0V-3,加入三倍梯度( $0.009-20\mu\text{g}/\text{ml}$ )稀释的CQ134蛋白,孵育1h后,用PBS清洗3次,加入Anti-hFC-APC(购自Jackson immunology),流式上机检测。结果绘制S曲线见图3。

[0237] 计算得CQ134的EC50为 $1.883\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0238] (4)与猴CD73阳性细胞结合

[0239] 将猴CD73全长构建到含有NEO抗性的真核表达载体上,转染CHO-K1细胞,用G418筛选后获得CHOK1-cynoCD73细胞株,取 $4 \times 10^5$ 个CHOK1-cynoCD73细胞,加入Anti-hFC-APC(购自Jackson immunology),流式上机检测。结果绘制S曲线见图4。

[0240] 计算得CQ134的EC50为 $0.022\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0241] 实施例3 CQ134介导的CD73酶活性抑制检测

[0242] 本实施例主要展示CQ134抑制CD73蛋白和细胞酶活性:

[0243] (1)CD73蛋白酶活抑制

[0244] CD73蛋白稀释到工作浓度 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ,加入三倍梯度( $0.001-10\mu\text{g}/\text{ml}$ )稀释的CD73抗

体,37℃孵育15min,加入1mM ATP和AMP的混合液,37℃孵育30min,等体积加入Cell Titer-Glo检测试剂(购自promega),酶标仪读取自发光数值,以未加抗体为酶活性100%计算,获得rhCD73活性变化图5。

[0245] 结果表明:CQ134在蛋白酶活上的抑制作用优于对照分子MEDI-9447。

[0246] (2) 人SK-0V-3细胞上CD73酶活抑制

[0247] 取 $5 \times 10^4$ 个SK-0V-3细胞,加入三倍梯度(0.009-6.67 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )稀释的抗体,37℃孵育15min,加入1mM AMP 37℃孵育2h,加入1mM ATP,立即加入Cell Titer-Glo检测试剂,酶标仪读取自发光数值,以未加抗体为酶活性100%计算,获得细胞上CD73活性变化图6。

[0248] 计算得CQ134的IC50为0.3022 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0249] (3) CHOK1-cynoCD73细胞上CD73酶活抑制

[0250] 取 $5 \times 10^4$ 个CHOK1-cynoCD73细胞,加入三倍梯度(0.003-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )稀释的抗体,37℃孵育15min,加入1mM AMP 37℃孵育2h,加入1mM ATP,立即加入Cell Titer-Glo检测试剂,酶标仪读取自发光数值,以未加抗体为酶活性100%计算,获得细胞上CD73活性变化图7。

[0251] 计算得CQ134的IC50为0.5547 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0252] 实施例4 CQ134人源化

[0253] 利用结构模拟与理性设计,分析与CQ134最接近的人源框架,获得一系列人源化抗体,经过评估,获得最优的人源化分子CQ289。将CQ289 VH和VL分别构建到含有hIgG1和kappa轻链恒定区的载体上,转染Freestyle 293F获得纯化的CQ289分子。

[0254] CQ289 VH氨基酸序列(SEQ ID NO: 15)

[0255] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYWMQWVRQAPGQGLEWIGAIYPGDGDRYTKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCATRGDWDYWFYFDVWGRGTLVTVSS

[0256] CQ289 VL氨基酸序列(SEQ ID NO: 16)

[0257] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPKGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYFTFISLQPEDATYYCQQGNTLPWTFGGTKVEIK

[0258] 其中,下划线区为CDRs (IMGT定义),CQ289为CQ134的人源化抗体蛋白,CQ289的CDR区与嵌合抗体CQ134的CDR区相同。

[0259] 实施例5 CQ289亲和力评价

[0260] 本实施例主要展示人源化后的CD73抗体于重组人和猴CD73蛋白亲和,

[0261] (1) 与CD73阳性细胞SK-0V-3细胞的亲和情况。具体的,

[0262] 将重组人CD73蛋白按照3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 包板,加入梯度稀释的人源化后的CQ289,用ELISA的方法检测抗体与重组人CD73结合情况,结果见图8

[0263] 计算得MEDI-9447的EC50为0.1667 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,CQ289为0.1062 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0264] (2) 与猴CD73蛋白亲和

[0265] 将重组猴CD73蛋白按照3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 包板,加入梯度稀释的人源化后的CQ289,用ELISA的方法检测抗体与重组猴CD73结合情况,结果见图9

[0266] 计算得MEDI-9447的EC50为0.4041 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,CQ289为0.3219 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0267] (3) 与人CD73阳性细胞结合

[0268] 取 $4 \times 10^5$ 个细胞SK-0V-3,加入梯度稀释的人源化抗体蛋白,孵育1h后,用PBS清洗3次,加入Anti-hFC-APC(购自Jackson immunology),流式上机检测。结果绘制S曲线见图

10。

[0269] CQ289与SK-OV-3细胞的结合优于MEDI-9447, MEDI-9447的EC50为0.1205 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , CQ289为0.02351 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0270] 比较CQ134、CQ289和MEDI-9447的结合活性(表3), 结果显示, 与阳性对照MEDI-9447相比, 人源化的CQ289抗体的EC50更低, 具有与人CD73阳性细胞更强的结合活性。

[0271] 表3. 抗体和猴CD73、人CD73阳性细胞(SK-OV-3)和猴CD73阳性细胞(CHOK1-cynoCD73)的结合活性检测

抗体名称	与猴CD73结合活性	与人CD73阳性细胞结合活性	与猴CD73阳性细胞结合活性
	EC50 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	EC50 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	EC50 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
CQ134	0.3211	1.883	0.022
CQ289	0.3219	0.02351	0.3219
MEDI-9447	0.4041	0.1205	0.4041

[0272] 实施例6 CQ289酶活性抑制评价

[0273] 本实施例主要展示人源化抗体CQ289抑制CD73蛋白和细胞酶活性。具体的,

[0274] (1) CD73蛋白酶活抑制

[0275] CD73蛋白稀释到工作浓度5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 加入梯度稀释的人源化抗体CQ289, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15min, 加入1mM ATP和AMP的混合液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30min, 等体积加入Cell Titer-Glo检测试剂(购自promega), 酶标仪读取自发光数值, 以未加抗体为酶活性为1计算, 获得rhCD73活性变化图11。

[0276] 计算得CQ289的IC50为5.282 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0277] (2) 人SK-OV-3细胞上CD73酶活抑制

[0278] 取 $5 \times 10^4$ 个SK-OV-3细胞, 加入梯度稀释的抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15min, 加入1mM AMP 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2h, 加入1mM ATP, 立即加入Cell Titer-Glo检测试剂, 酶标仪读取自发光数值, 以未加抗体为酶活性1计算, 获得细胞上CD73活性变化图12。

[0279] 计算得CQ289的IC50为0.1776 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0280] 与CQ134对人SK-OV-3细胞上CD73酶活抑制(IC50=0.3022  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )相比, 人源化的CQ289对人SK-OV-3细胞上CD73酶活具有更显著的抑制作用(IC50=0.1776 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。

[0281] 实施例7 CD73抗体介导的细胞内化

[0282] 取 $3 \times 10^5$ 个细胞, 加入0.2 $\mu\text{g}$  CD73抗体37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育, 按照时间0、2和3h孵育, 孵育完成后再加入等量的相应CD73抗体, 孵育1h后加入Anti-Hfc-APC流式抗体, 孵育洗脱后上流式细胞仪检测, 以0h时的相对荧光强度(MFI)为1, 计算细胞随时间变化的MFI, 结果见图13。

[0283] 结果表明:CQ289与MEDI9447介导的细胞内化结果相当。

[0284] 实施例8 CQ289抗体抑制人黑色素瘤细胞A375在小鼠体内的增殖

[0285] 用NSG小鼠构建人黑色素瘤细胞(A375)的小鼠模型NSG-A375, 做接种人PBMC实验鼠和未种人PBMC对照鼠, 隔天给药, 测量肿瘤体积。实验小鼠设置溶剂PBS的给药空白对照、MEDI-9447的低剂量(0.5mpk)给药、MEDI-9447高剂量(3mpk)给药、CQ289的高剂量(3mpk)和

低剂量(0.5mpk)组,实验结果见图14。其中mpk(Milligrams Per Kilograms)为毫克公斤。

[0287] 结果表明:在低剂量和高剂量时,CQ289对肿瘤生长的抑制优于MEDI-9447。

[0288] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。





[0078] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 [0079] 100 105  
 [0080] <210> 7  
 [0081] <211> 324  
 [0082] <212> DNA  
 [0083] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0084] <400> 7  
 [0085] gacattcaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60  
 [0086] atcagttgca gggcaagtca ggacattagc aattatntaa actggtatca gcagaaacca 120  
 [0087] gatggaactg ttaaactcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180  
 [0088] aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240  
 [0089] gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttccgtggac gttcgggtga 300  
 [0090] ggcaccaage tggaaatcaa acgt 324  
 [0091] <210> 8  
 [0092] <211> 11  
 [0093] <212> PRT  
 [0094] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0095] <400> 8  
 [0096] Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn  
 [0097] 1 5 10  
 [0098] <210> 9  
 [0099] <211> 7  
 [0100] <212> PRT  
 [0101] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0102] <400> 9  
 [0103] Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser  
 [0104] 1 5  
 [0105] <210> 10  
 [0106] <211> 9  
 [0107] <212> PRT  
 [0108] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0109] <400> 10  
 [0110] Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr  
 [0111] 1 5  
 [0112] <210> 11  
 [0113] <211> 330  
 [0114] <212> PRT  
 [0115] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0116] <400> 11



[0117]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
[0118]	1 5 10 15
[0119]	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
[0120]	20 25 30
[0121]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
[0122]	35 40 45
[0123]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
[0124]	50 55 60
[0125]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
[0126]	65 70 75 80
[0127]	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
[0128]	85 90 95
[0129]	Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
[0130]	100 105 110
[0131]	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
[0132]	115 120 125
[0133]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
[0134]	130 135 140
[0135]	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
[0136]	145 150 155 160
[0137]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
[0138]	165 170 175
[0139]	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
[0140]	180 185 190
[0141]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
[0142]	195 200 205
[0143]	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
[0144]	210 215 220
[0145]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
[0146]	225 230 235 240
[0147]	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
[0148]	245 250 255
[0149]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
[0150]	260 265 270
[0151]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
[0152]	275 280 285
[0153]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
[0154]	290 295 300
[0155]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

[0156]	305	310	315	320
[0157]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
[0158]		325	330	
[0159]	<210> 12			
[0160]	<211> 993			
[0161]	<212> DNA			
[0162]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0163]	<400> 12			
[0164]	gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	60		
[0165]	ggcacagcgg cctgggctg cctgggtaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg	120		
[0166]	tggaactcag ggcacctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca	180		
[0167]	ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc	240		
[0168]	tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	300		
[0169]	aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgccag cacctgaact cctgggggga	360		
[0170]	ccgtcagtct tctcttcccc cccaaaacc aaggacacc tcgatgctc ccggaccct	420		
[0171]	gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	480		
[0172]	tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	540		
[0173]	agcacgtacc gggtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag	600		
[0174]	gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	660		
[0175]	aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggatgag	720		
[0176]	ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtaaaag gcttctatcc cagcgacatc	780		
[0177]	gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg	840		
[0178]	ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	900		
[0179]	cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	960		
[0180]	cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga	993		
[0181]	<210> 13			
[0182]	<211> 106			
[0183]	<212> PRT			
[0184]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0185]	<400> 13			
[0186]	Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln			
[0187]	1	5	10	15
[0188]	Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr			
[0189]		20	25	30
[0190]	Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser			
[0191]		35	40	45
[0192]	Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr			
[0193]		50	55	60
[0194]	Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys			

[0195]	65	70	75	80
[0196]	His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro			
[0197]		85	90	95
[0198]	Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
[0199]		100	105	
[0200]	<210> 14			
[0201]	<211> 321			
[0202]	<212> DNA			
[0203]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0204]	<400> 14			
[0205]	acgggtggctg caccatctgt cttcatcttc cgcctatctg atgagcagtt gaaatctgga	60		
[0206]	actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg	120		
[0207]	aaggtggata acgcctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc	180		
[0208]	aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacagaaaa	240		
[0209]	cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgccctg cacaaagagc	300		
[0210]	ttcaacaggg gagagtgtta g	321		
[0211]	<210> 15			
[0212]	<211> 120			
[0213]	<212> PRT			
[0214]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0215]	<400> 15			
[0216]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
[0217]	1	5	10	15
[0218]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr			
[0219]		20	25	30
[0220]	Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
[0221]		35	40	45
[0222]	Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe			
[0223]		50	55	60
[0224]	Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
[0225]	65	70	75	80
[0226]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0227]		85	90	95
[0228]	Ala Thr Arg Gly Asp Trp Asp Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg			
[0229]		100	105	110
[0230]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0231]		115	120	
[0232]	<210> 16			
[0233]	<211> 107			

[0234] <212> PRT  
 [0235] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0236] <400> 16  
 [0237] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [0238] 1 5 10 15  
 [0239] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 [0240] 20 25 30  
 [0241] Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 [0242] 35 40 45  
 [0243] Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 [0244] 50 55 60  
 [0245] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 [0246] 65 70 75 80  
 [0247] Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp  
 [0248] 85 90 95  
 [0249] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 [0250] 100 105

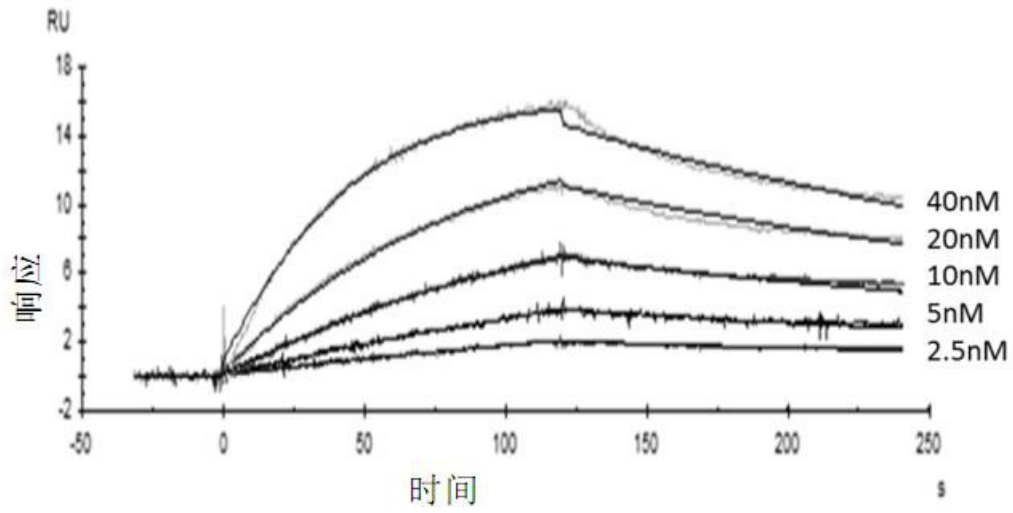


图1

### 重组猴 CD73 结合至 CQ134

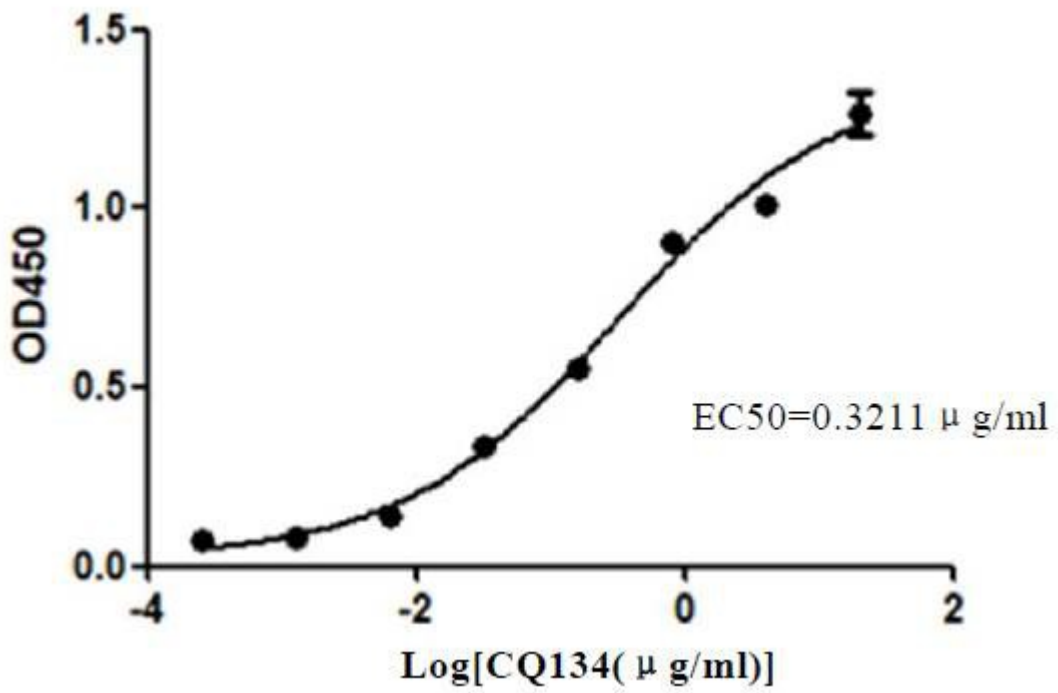


图2

### 重组猴 CD73 结合至 CQ134

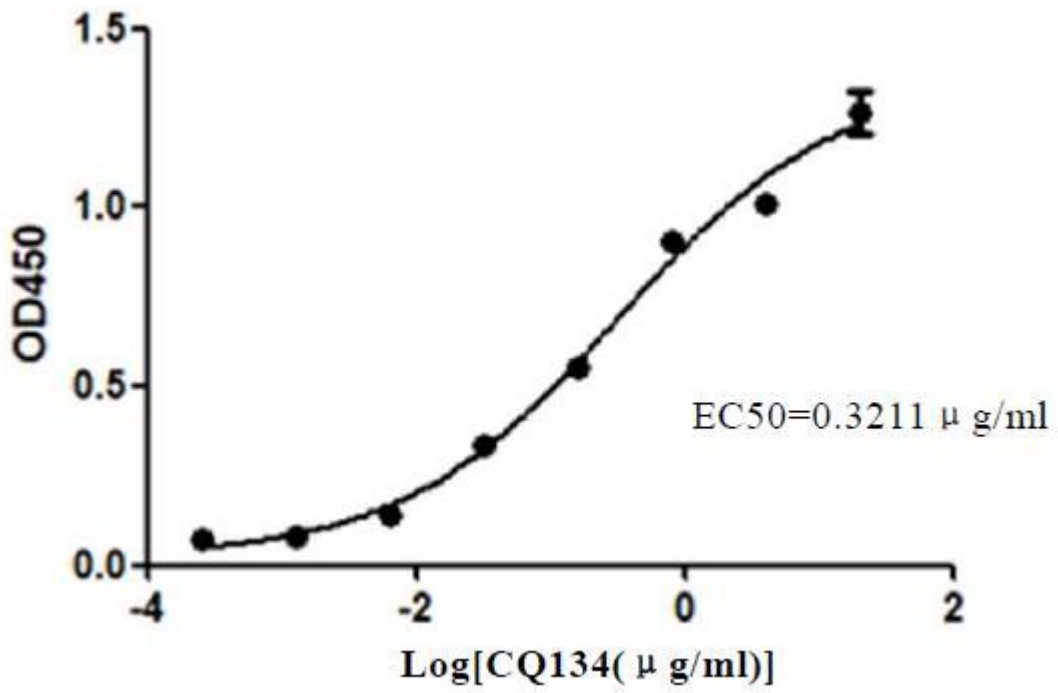


图3

### CQ134 结合至 CHOK1-cynoCD73 细胞

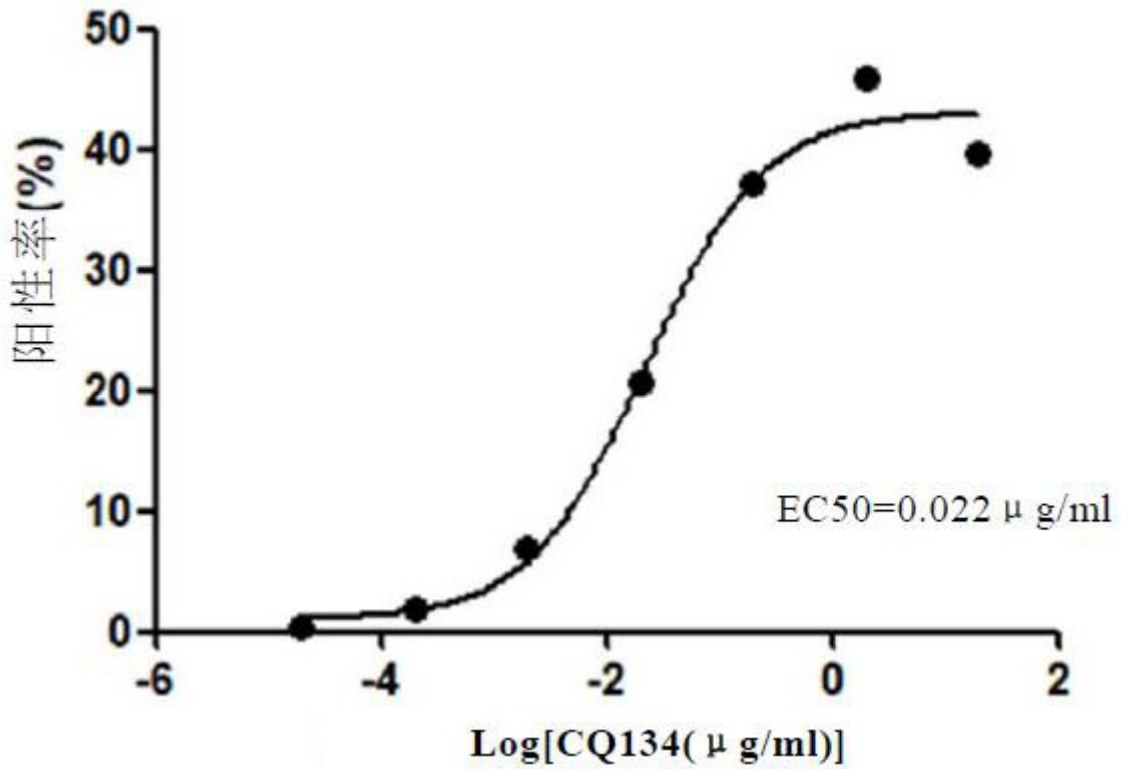


图4

### CD73 抗体抑制 rhCD73 蛋白活性

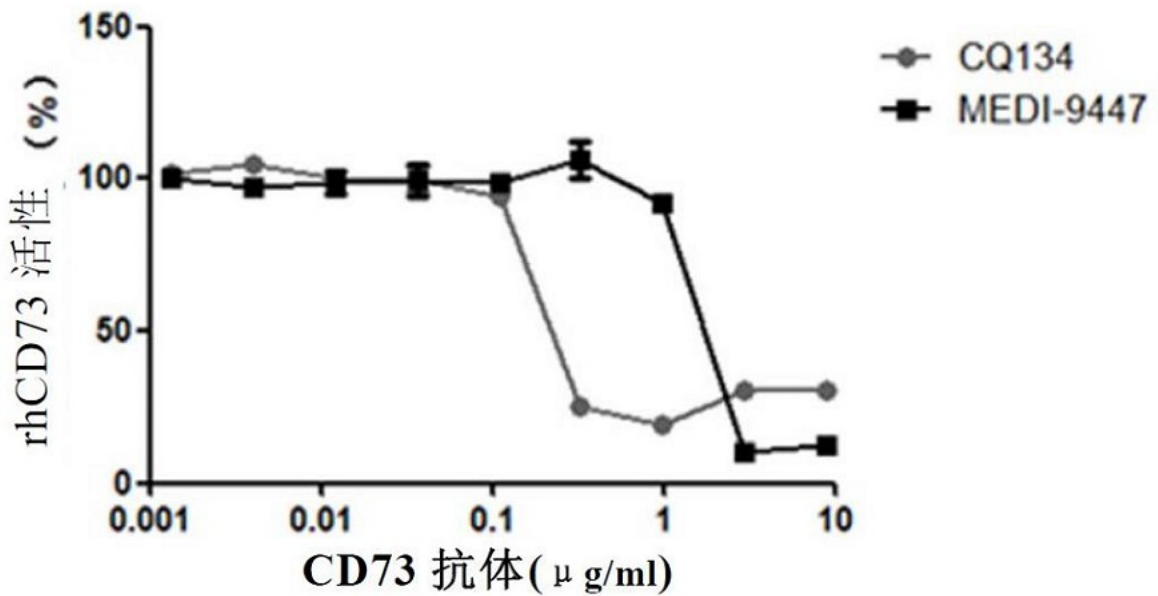


图5

### CQ134 抑制 SK-OV-3 细胞上 CD73 活性

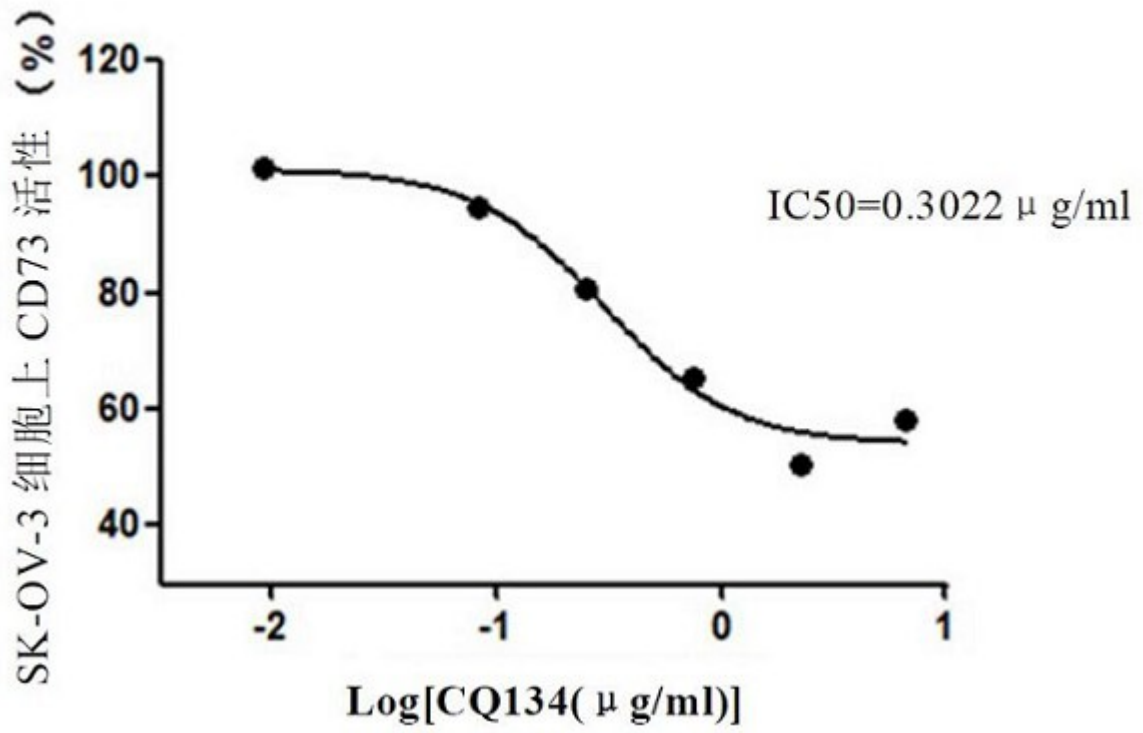


图6



### CQ134 抑制 CHOK1-cynoCD73 细胞上 CD73 活性

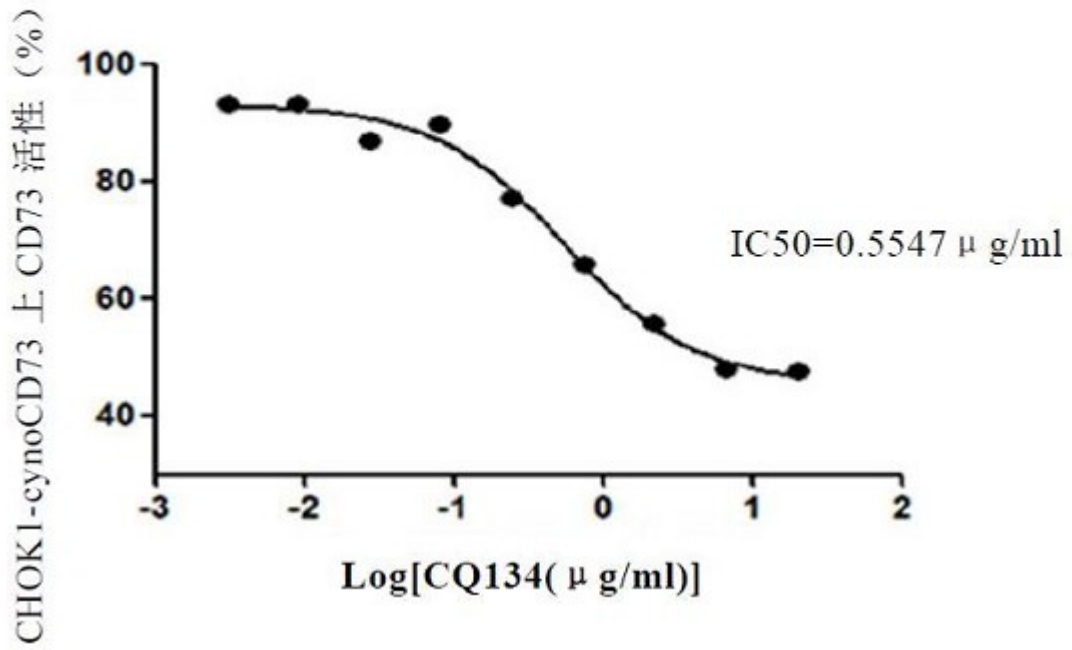


图7

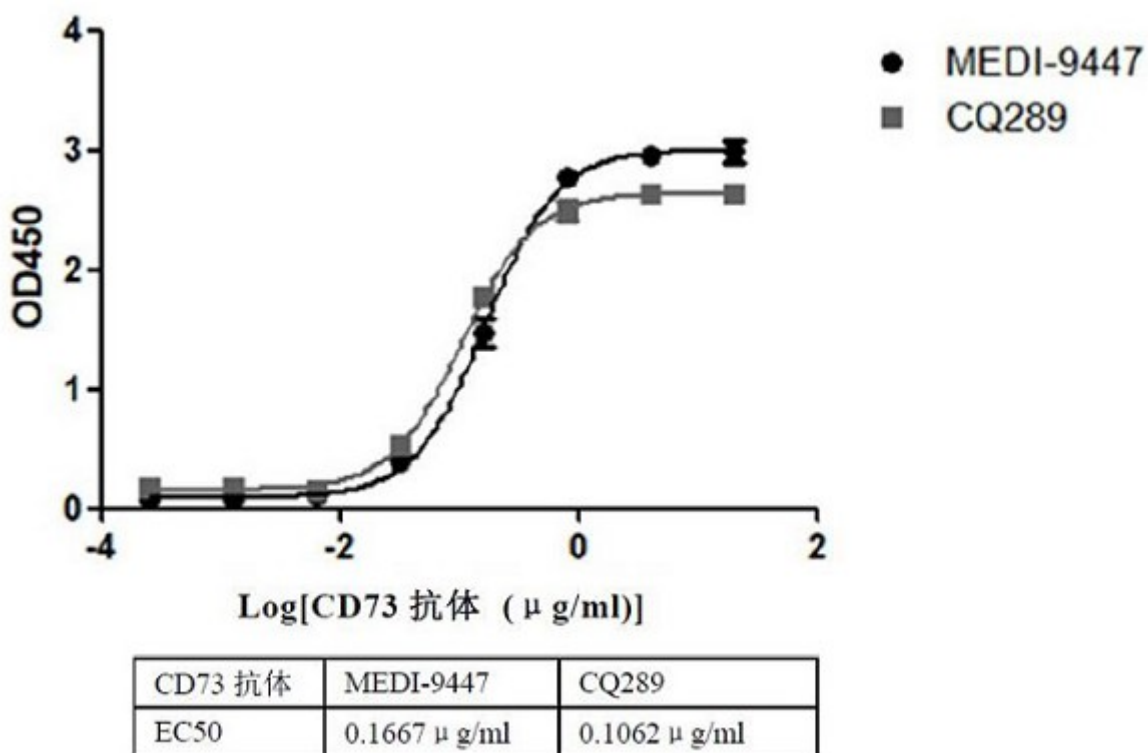


图8

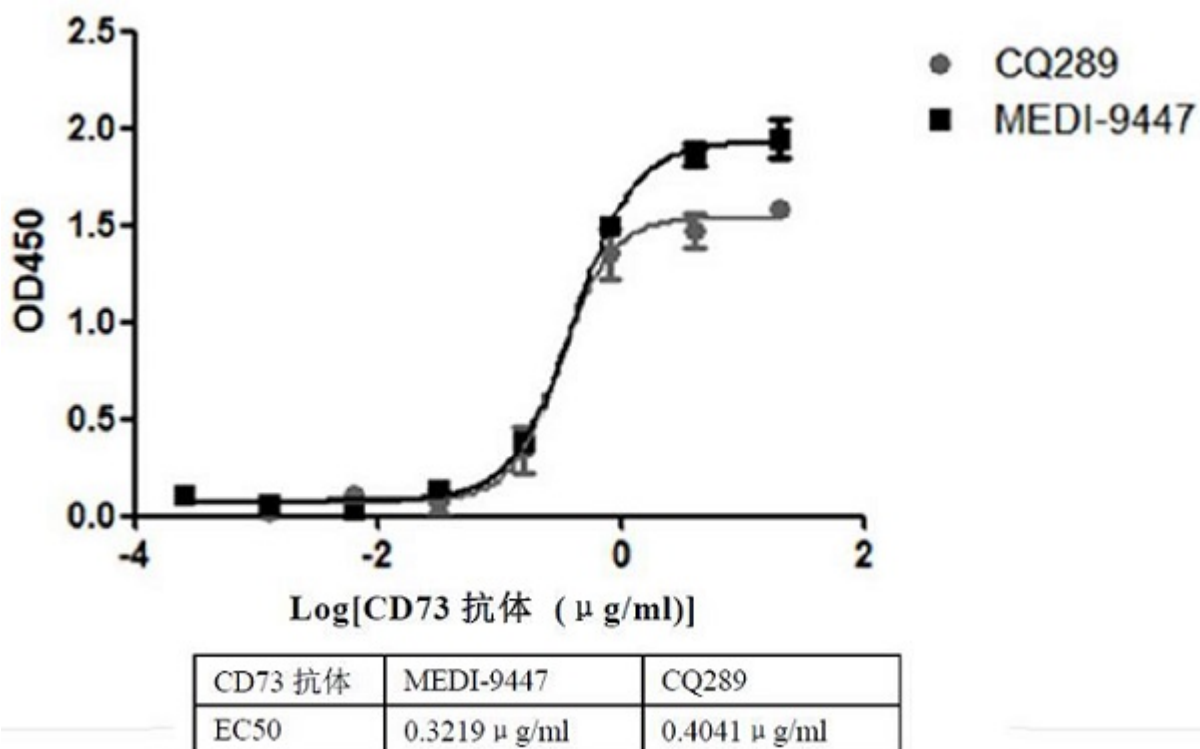


图9

CD73 抗体结合至 SK-OV-3

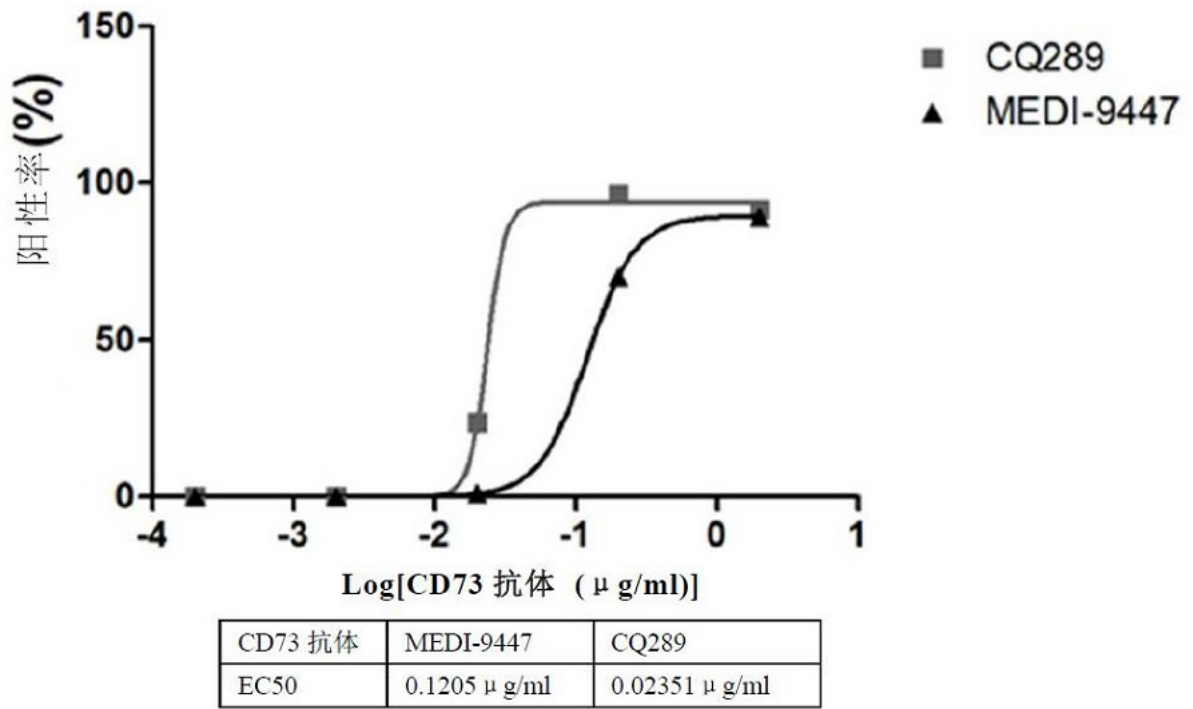


图10

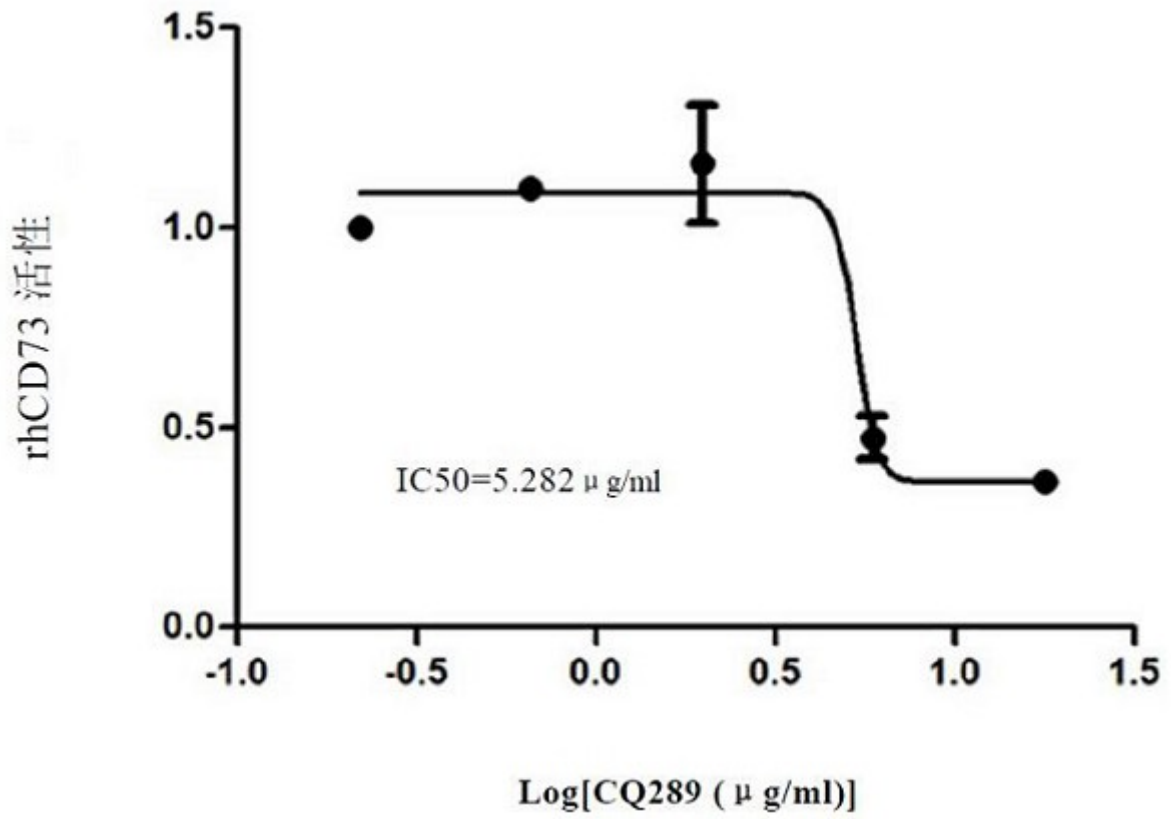


图11

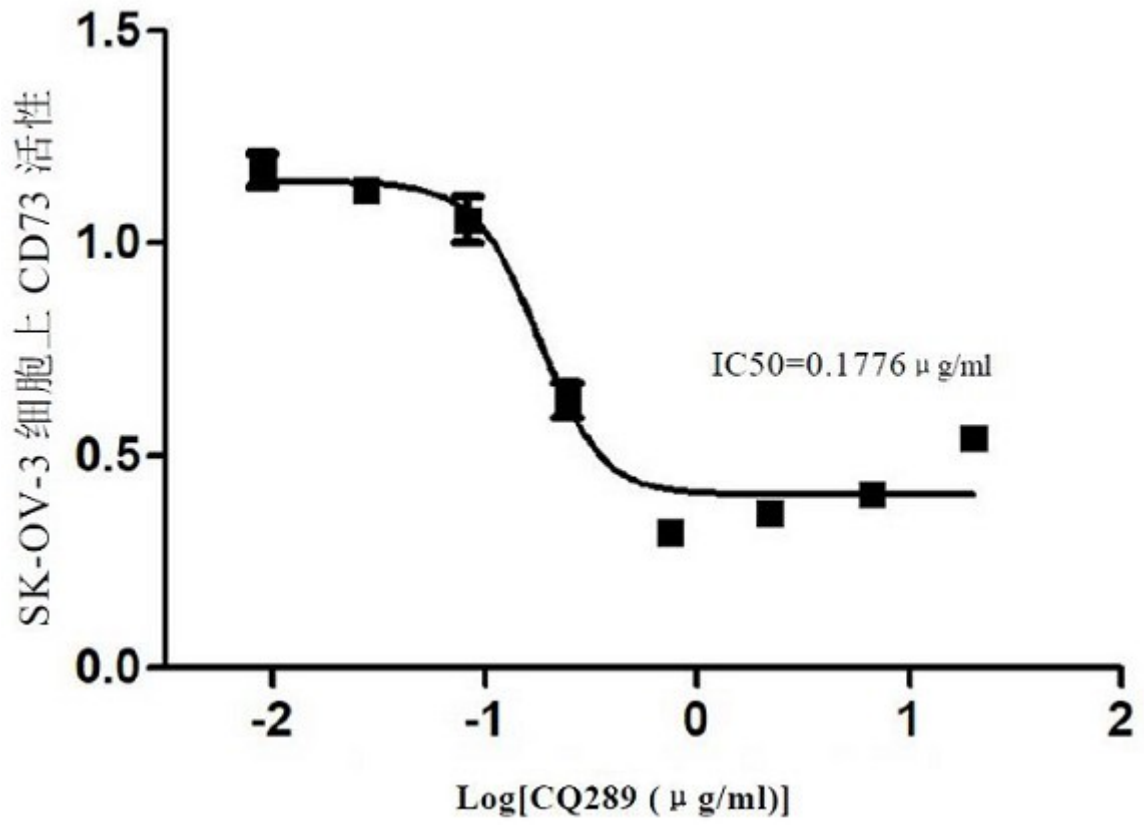


图12

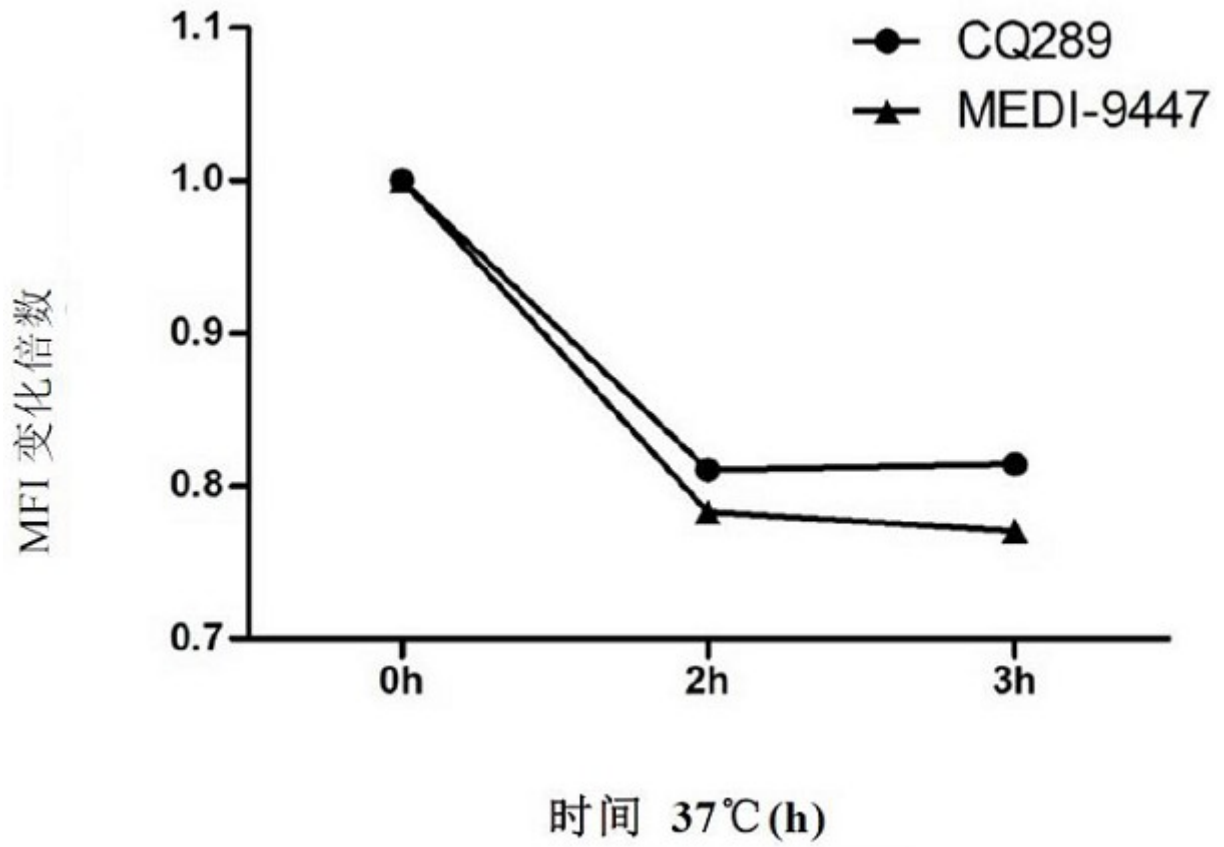


图13

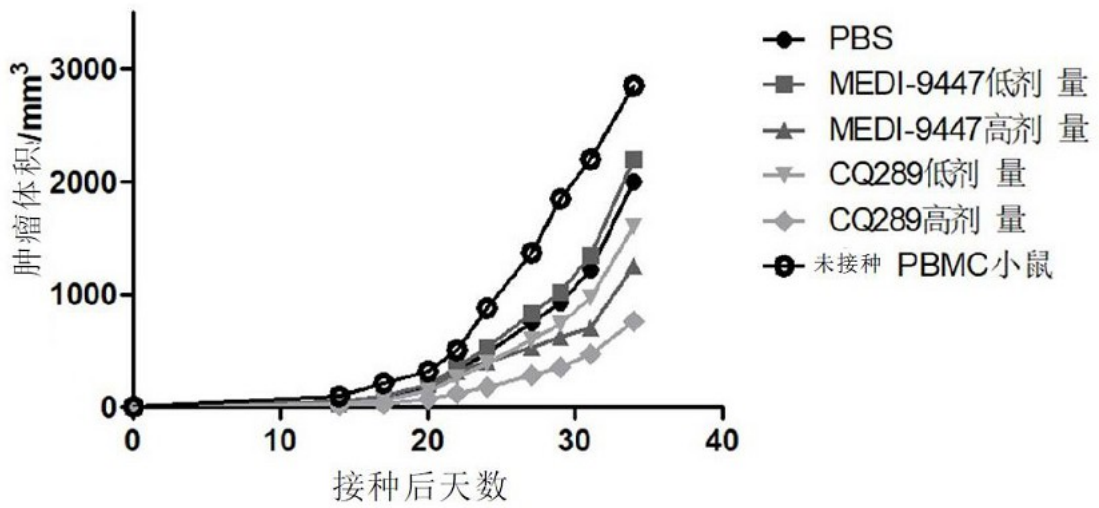


图14