人源化 CD73 抗体筛选及活性研究

赵丽丽[1,2]，孙士民[1,2]，朱中松[1,2]，张贵民[3]，刘　忠[3*]

（1. 鲁南新时代生物技术有限公司，山东临沂 273400；2. 哺乳动物细胞高效表达国家工程实验室，山东临沂 273400；
3. 鲁南制药集团股份有限公司，山东临沂 276000）

摘要：CD73 抗体可以遏制肿瘤发展和转移，但其靶点和疗效研究较少，且目前没有上市的抗体药物。该研究通过对鼠源 CD73 抗体进行人源化改造，并进一步通过小鼠实体瘤模型研究其药效。结果显示，人源化的 CD73 抗体 20huM51 有较高的亲和力和中和活性。该抗体能逆转 AMP 介导的抑制 $CD4^+$ T/$CD8^+$ T 释放 IFN-γ 的作用，从而促进 IFN-γ 的分泌。在 20 mg/kg 的给药剂量下，该抗体在小鼠体内具有显著的抗肿瘤作用，肿瘤体积抑制率和肿瘤质量抑制率分别为 26.3％和 21.6％。本研究为 CD73 抗体药物的临床前研发提供了数据支持。

关键词：CD73 单克隆抗体；抗肿瘤活性；杂交瘤；人源化抗体；药效

中图分类号：Q816；R979.1$^+$9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)05-0665-09

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.05.010

Screening and Activity Study of Humanized CD73 Antibody

ZHAO Lili[1,2], SUN Shimin[1,2], ZHU Zhongsong[1,2], ZHANG Guimin[3], LIU Zhong[3*]

(*1. Lunan New Time Bio-tech Co., Ltd., Linyi 273400; 2. State Engineering Lab. of High Expression of Mammalian Cells, Linyi 273400;
3. Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276000*)

ABSTRACT: Anti-CD73 antibody can inhibit tumor development and metastasis, but there are few studies on its targets and efficacy, and there is no antibody drug on the market at present. In this study, a murine CD73 antibody was humanized, and its efficacy in a mouse solid tumor model was further studied. The results showed that the humanized anti-CD73 20huM51 antibody had a high affinity and neutralizing activity. The anti-CD73 antibody reversed the AMP-mediated inhibition on the release of IFN-γ by $CD4^+$ T/$CD8^+$ T cells and promoted the secretion of IFN-γ. At a dose of 20 mg/kg, the antibody had a significant antitumor activity in mice. The tumor volume and weight inhibition rates were 26.3％ and 21.6％ , respectively. This study provided data support for the preclinical development of anti-CD73 drugs.

Key Words: CD73 monoclonal antibody; antitumor activity; hybridoma; humanized antibody; pharmacodynamics

胞外 -5'- 核苷酸酶（ecto-5'-nucleotidase，CD73）是通过糖基磷脂酰肌醇（glycosylphosphatidylinositol，GPI）锚定在细胞膜上的一种多功能糖蛋白[1]，可催化 CD39 降解 ATP 产生的 AMP 形成腺苷，是形成胞外腺苷的主要限速酶。而腺苷是一种免疫抑制分子，其与相应受体结合后可激活一系列免疫信号通路[2]，作用于多种免疫效应细胞和抑制细胞[3]。CD73 可在肿瘤细胞上表达，其表达和活性与肿瘤的侵袭和转移密切相关[4—5]。因此，CD73 也被认为是肿瘤免疫的负调控因子。研究[6—8]表明，肺癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌、肾癌和胶质母细胞瘤等恶性肿瘤的预后较差都与 CD73 表达升高相关。

CD73 抑制剂可通过与 CD73 的特异性结合而阻

收稿日期：2023-09-18

基金项目：山东省重点研发计划项目（泰山产业领军人才工程）（tscy20200329、tscx202306088）

作者简介：赵丽丽（1978—），女，博士，高级研究员，从事蛋白药物研究与开发。

通信作者：刘　忠（1975—），男，博士，高级研究员，从事蛋白药物研究与开发。

E-mail：clevertree@163.com

断其酶活性，从而降低腺苷的产生，削弱腺苷对免疫抑制细胞的刺激，从而调节肿瘤微环境，增强免疫反应，发挥抗肿瘤作用。GOSWAMI 等[9]研究表明，敲除 CD73 可提高用 anti-CTLA-4 和 anti-PD-1 治疗多形性胶质母细胞瘤模型小鼠的存活率，确定了 CD73 可作为一种特异性免疫治疗靶点，用于改善多形性胶质母细胞瘤免疫检查点治疗的抗肿瘤免疫应答。在乳腺癌、黑色素瘤和纤维肉瘤的临床前模型中，CD73 和腺苷 A_{2A} 受体的共抑制作用已被证明可提高抗肿瘤免疫反应，限制肿瘤的发生、生长和转移[10]。

关于 CD73 在人恶性肿瘤中作为治疗靶点的研究较少，一些临床试验试图评估 CD73 靶向治疗恶性肿瘤的效果。目前临床试验进展最快的是阿斯利康的 oleclumab（MEDI9447，一种人 IgG1λ 抗 CD73 单克隆抗体）。阿斯利康公布了 MEDI9447 单独或联合度伐利尤单抗（durvalumab）用于晚期结直肠癌或胰腺癌的临床数据[11]，显示 MEDI9447 和度伐利尤单抗的联合治疗具有可控的安全性。目前尚无上市的 CD73 单克隆抗体，主要原因是 CD73 单克隆抗体作用机制是阻止变构，不同于其他的治疗性抗体（作用机制为阻断、杀伤、中和或变构）。并且，活性 CD73 以同源二聚体的形式存在，在人体中分布广泛，包括细胞膜和血液。因此，CD73 靶向药物的设计要求很高，尤其是对 CD73 单克隆抗体的结合及中和活性的要求很高。为获得具有较高结合力、亲和力和中和活性的 CD73 抗体，本研究利用杂交瘤技术筛选得到鼠源 CD73 抗体，将其人源化处理，采用 ELISA、流式细胞荧光分选技术（fluorescence-activated cell sorting，FACS）及孔雀绿磷酸盐检测试剂盒筛选所得抗体，并通过小鼠实体瘤模型考察人源化抗体抑制肿瘤生长的作用，以为后续抗体的临床前研究提供参考。

1　仪器与试药

Neo2 型酶标仪（美国 BioTek 公司）；PowerPac Basic 型核酸电泳仪和 T100 型 PCR 仪（美国 Bio-Rad 公司）；3111 型细胞培养箱（美国 Thermo Fisher 公司）；Biacore T200 型生物分子相互作用分析仪（美国 GE 公司）；FACS Canto Ⅱ型流式细胞仪（美国 BD 公司）；Amersham Imager 600 型凝胶成像系统（美国 GE 公司）；CKX41SF 型倒置荧光显微镜（日本 Olympus 公司）。

X-VIVO™ 15 培养基（瑞士 Lonza 公司）；PBMC 分选试剂（加拿大 STEMCELL Technologies 公司）；细胞活力检测试剂（Cell Counting-Lite 2.0，南京诺唯赞生物科技股份有限公司）；IgG4 同型对照抗体（批号 MA15JU2525）、CD73-His 蛋白（批号 LC10OC2810）和人源 CD28 抗体（批号 MA15NO1510）、人源 IFN-γ ELISA 试剂盒均购于北京义翘神州科技股份有限公司；ATP（批号 SLCH8422）、AMP（批号 BCCG4167）均购于美国 Sigma-Aldrich 公司；RPMI-1640 培养基、胎牛血清（FBS）、Expi 293F 表达培养基、Opti-MEM 减血清培养基、McCoy's 5A 培养基和青链霉素双抗均购于美国 Gibco 公司；辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记的羊抗人二抗（HRP-goat anti-human IgG，美国 Jackson 公司）；3,3',5,5'- 四甲基联苯胺显色液（TMB，苏州博奥龙科技有限公司）；人源 CD3 抗体（批号 2452334）、APC 标记的山羊抗人 IgG（批号 12012280）均购自美国 Invitrogen 公司；Series S Sensor Chip Protein A 试剂盒、HBS-EP^+ 缓冲液（美国 Cytiva 公司）；牛血清白蛋白（BSA，国药集团化学试剂有限公司）；HRP 标记的鼠抗 His 抗体（美国 SouthernBiotech 公司）；脱脂奶粉［京天成生物技术（北京）有限公司］；PBS（pH 7.4，北京索莱宝生物技术有限公司）；TA 克隆试剂盒、PrimeScript RT-PCR 试剂盒和 RNA 提取试剂盒均购于日本 Takara 生物技术有限公司；孔雀绿磷酸盐检测试剂盒（美国 R&D 公司）；红细胞裂解液人、外周血单核细胞（PBMC）分离试剂盒、人 CD4 阳性 T 细胞分选试剂盒、人 CD8 阳性 T 细胞分选试剂盒均购于德国 Miltenyi 生物技术有限公司；ExpiFectamine™ 293 转染试剂盒（美国 Thermo Fisher 公司）；其他化学试剂均为分析纯。

试验所用到的阳性对照抗体 MEDI9447 具有人 IgG1/κ 恒定区，按照专利 WO 2016075099A1 中的氨基酸序列制备。

雌性 BALB/c-hPD1/hPDL1/hCD73 人源化小鼠（40 只，体质量 19.0 ～ 22.7 g，7 ～ 8 周龄）购于江苏集萃药康生物科技股份有限公司，试验动物生产许可证号 SCXK（苏）2018-0008，试验动物质量合格证号 No.202223931。

人胚肾细胞（293F 细胞，美国 Thermo Fisher 公司）；人卵巢癌细胞（SK-OV-3 细胞，南京科佰生物科技有限公司）；

小鼠骨髓瘤细胞（Sp2/0 细胞，美国模式培养物保藏中心）；TOP10 感受态细胞［生工生物工程（上海）股份有限公司］；小鼠结肠癌细胞（CT26-hCD73 细胞）、人纤维肉瘤细胞（HT1080 细胞）和人胚肾细胞（HEK 293T 细胞）购于康源博创生物科技（北京）有限公司；中国仓鼠卵巢细胞人 / 猴 CD73 细胞（CHOK1-huCD73 细胞和 CHOK1-cynoCD73 细胞）由本课题组保存。

2 方法与结果

2.1 鼠源抗体可变区序列扩增

将通过杂交瘤技术[12]筛选得到的鼠源 CD73 抗体 20B12-2A8 的杂交瘤细胞于 37 ℃、5% CO_2 条件下培养 36 h，提取 RNA，通过逆转录聚合物链反应（reverse transcription polymerase chain reaction，RT-PCR）法扩增得 cDNA，然后采用 PCR 法扩增抗体的重链和轻链的可变区。

PCR 反应体系：分别取细胞的 cDNA 2 μL，轻重链 F/R 引物（表 1）各 1.5 μL，2×PCR mix 25 μL，加水定容至 50 μL，即得反应液。

将反应液放入 PCR 仪中，设置反应程序为 35 个循环（95 ℃，5 min；95 ℃，30 s；58 ℃，30 s；72 ℃，30 s）；完毕后于 72 ℃保持 5 min，再降温至 12 ℃保存。

反应产物采用琼脂糖凝胶电泳分离、回收得 PCR 产物。

PCR 产物加腺嘌呤（A）：取 PCR 产物，于 65 ℃孵育 10 min，与 pMD-20T 进行 TA 克隆，16 ℃过夜。

将连接过夜的连接体系分别转化至 TOP10 感受态细胞 100 μL 中，于 37 ℃培养过夜。分别挑取 6 个单克隆菌进行测序，经生工生物工程（上海）股份有限公司测序，得编码 20B12-2A8 重链可变区和轻链可变区的基因序列。

2.2 CD73 抗体的人源化设计与制备

采用互补决定区（complementarity determining regions，CDR）移植法进行鼠源抗体的人源化改造。用 PDB BLAST 软件调取与 20B12-2A8 序列最接近的抗体晶体结构模型，进行三维结构模拟，以确定 20B12-2A8 的可变结构域中可能对维持 CDR 环状结构起重要作用的关键框架氨基酸残基，从而设计人源化抗体的回复突变。利用所选择的结构模板，采用人种系重链和轻链框架序列代替小鼠框架以构建人源化 20B12-2A8 的结构模型。为增加抗体的稳定性和结合活性，对抗体进行翻译后修饰。另外，为防止可能干扰抗原结合的糖基化反应，消除抗原结合结构域内的潜在糖基化位点。

在人源化改造的可变区序列上分别补充重链恒定区序列和氨基酸序列、信号肽序列和 Kozak 序列，委托南京金斯瑞生物科技有限公司进行 DNA 序列的优化、合成，并克隆至 pCDNA3.1 载体，共得到 10 个人源化抗体表达质粒。

取对数生长期的 293F 细胞，以每 1 mL 含有 3×10^6 个细胞的密度接种，用 Expi 293F 表达培养基进行培养。取 Opti-MEM 培养基 6 mL，加入轻链质粒和重链质粒各 40 μg；另取 Opti-MEM 培养基 6 mL，加入 ExpiFectamine™ 293 转染试剂 320 μL。将转染试剂加入质粒混合液中充分混匀，静置 15 min，加至 293F 细胞中，于 37 ℃、8% CO_2、100 r/min 条件下培养 20 h，加入 Enhancer Ⅰ 600 μL，Enhancer Ⅱ 6 mL。培养 5 d 后收样并进行纯化，采用 Protein A 亲和色谱法纯化抗体。

Protein A 亲和色谱法：用 PBS（pH 7.4）平衡 Protein A 亲和色谱柱后，将离心并经 0.4 μm 滤膜过滤的细胞培养上清液过柱，然后用 PBS（pH 7.4）洗

表 1 引物序列

Tab.1 Primer Sequences

名称	序列
轻链 -F	5’-GACATTGTGCTSACMCARWCTMCA-3’
轻链 -R	5’-GGATACAGTTGGTGCAGCATC-3’
重链 -F	5’-CCTAGGAGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG-3’
重链 -R	5’-CATATGTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAG-3’

至 OD 值接近于零，以 50 mmol/L 的甘氨酸 - 盐酸缓冲溶液（pH 3.5）洗脱，收集峰值区的洗脱液，调至 pH 6.0，得到纯化的人源化抗体，于 －20 ℃保存备用。

2.3 人源化 CD73 抗体与人 CD73 的亲和力

使用生物分子相互作用分析仪，通过表面等离子体共振（surface plasmon resonance，SPR）技术，测定人源化 CD73 抗体与 CD73-His 蛋白相互作用的亲和动力学特性。

分别用 HBS-EP$^+$ 缓冲液将 10 个人源化 CD73 抗体和参比抗体 MEDI9447 稀释为 6 μg/mL，作为配体。用 HBS-EP$^+$ 缓冲液将 CD73-His 蛋白（单体）分别稀释为 15、7.5、3.75、1.875、0.936、0.468、0.234、0.117 μg/mL；另取空白 HBS-EP$^+$ 缓冲液，作为分析物；取适量甘氨酸 1.5（10 mmol/L 甘氨酸 - HCL，pH 1.5）作为再生液。按照 Series S Sensor Chip Protein A 试剂盒说明书，采用捕获法，将配体捕获于 Protein A 芯片上，取分析物进样，进行亲和力分析和计算，从而获得结合常数（K_{on}）和解离常数（K_{off}），再计算得抗体的亲和力常数（K_D）。结果如表 2 所示，抗体 20huM51 显示出较优的亲和力。（抗体 20huM51 人源化后的氨基酸序列保存于编辑部。）

2.4 FACS 法检测人源化抗体的结合力

采用 FACS 法进一步验证人源化抗体 20huM51 与 CHOK1-huCD73 和 CHOK1-cynoCD73 的结合活性。分别将 1×10^5 个 CHOK1-huCD73 和 CHOK1-cynoCD73 细胞加至 96 孔板中；CD73 抗体（20huM51 和 MEDI9447）用 PBS 梯度稀释至 40.00、13.33、4.44、1.48、0.49、0.16、0.05、0.02 μg/mL，再分别加入上述 96 孔板中。上述 96 孔板于 4 ℃孵育 1 h 后，用 PBST（PBS+0.01％ Tween-20）洗涤 3 遍；再加入用 PBS 以体积比 1 ∶ 500 稀释的 APC- 山羊抗人 IgG，4 ℃孵育 1 h；然后用 PBS 清洗 3 遍，采用 FACS 检测仪监测细胞荧光。结果如表 3、图 1 所示，20huM51 与 CHOK1-huCD73/cynoCD73 的结合强度均优于对照抗体 MEDI9447。

表 3　抗体与 CHOK1-huCD73 或 CHOK1-cynoCD73 的 EC_{50} 值

Tab.3　EC_{50} Values of Antibodies for Binding to CHOK1-huCD73 or CHOK1-cynoCD73

抗体	EC_{50}/(nmol·L^{-1})	
	CHOK1-huCD73	CHOK1-cynoCD73
20huM51	6.67	20.57
MEDI9447	11.00	49.82

2.5 ELISA 法检测抗体与游离的 CD73 结合活性

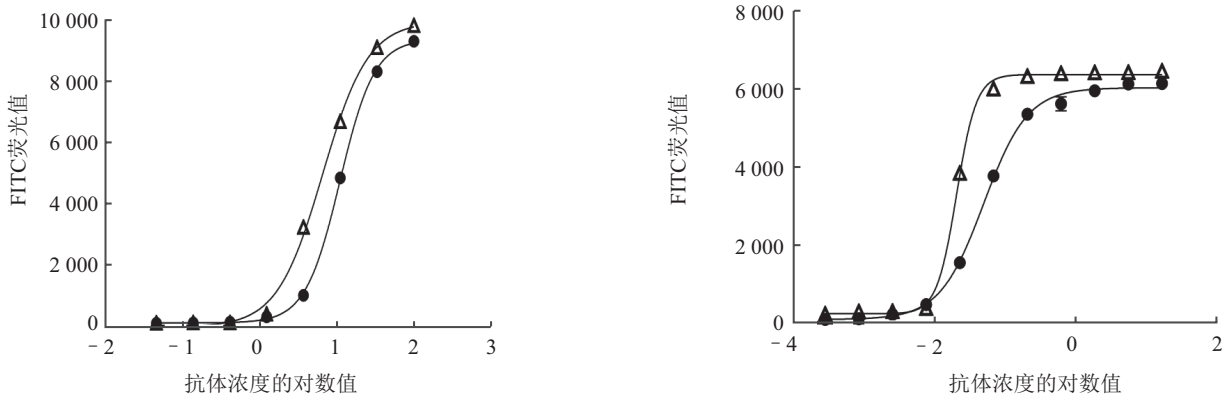
成熟 CD73 通过 C- 末端 GPI 上的 Ser-523 残基与复合寡聚糖和鞘脂肌醇基团连接，锚附在细胞膜上。而 CD73 的截短可溶形式可通过磷脂酰肌醇特异性磷脂酶裂解 GPI，从膜上脱落，并且可在血液和其他生物流体中自由循环[13]。

ELISA 法检测抗体与游离 CD73 的结合活性：取 2 μg/mL 的人 CD73-his 蛋白（即截短形式），

表 2　人源化 CD73 抗体与人 CD73 的结合亲和力

Tab.2　Binding Affinities of Humanized CD73 Antibodies to Human CD73

抗体样品	抗原	K_D/(mol·L^{-1})	K_a/(L·mol^{-1}·s^{-1})	K_d/(s^{-1})
20huM11	CD73 His	4.15×10^{-11}	7.35×10^5	3.05×10^{-5}
20huM21	CD73 His	3.49×10^{-11}	9.42×10^5	3.29×10^{-5}
20huM31	CD73 His	2.46×10^{-11}	1.19×10^6	2.92×10^{-5}
20huM41	CD73 His	2.43×10^{-11}	1.13×10^6	2.76×10^{-5}
20huM51	CD73 His	7.46×10^{-12}	1.43×10^6	1.17×10^{-5}
20huM12	CD73 His	3.66×10^{-11}	6.79×10^5	2.49×10^{-5}
20huM22	CD73 His	3.01×10^{-11}	1.01×10^6	3.05×10^{-5}
20huM32	CD73 His	2.52×10^{-11}	1.08×10^6	2.72×10^{-5}
20huM42	CD73 His	2.16×10^{-11}	1.13×10^6	2.45×10^{-5}
20huM52	CD73 His	1.34×10^{-11}	1.34×10^6	1.79×10^{-5}
20B2-2A8	CD73 His	9.46×10^{-11}	4.53×10^5	4.28×10^{-5}
MEDI9447	CD73 His	2.32×10^{-11}	7.49×10^5	1.74×10^{-5}

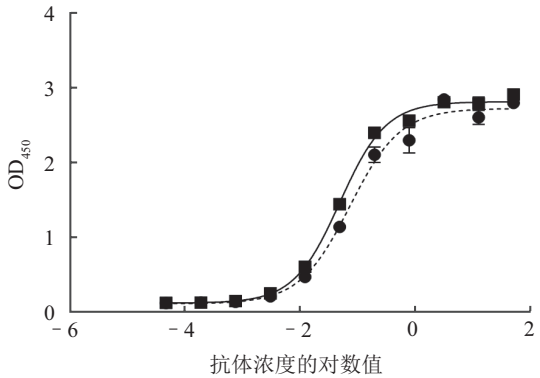


●—MEDI9447；△—20huM51。

图 1 抗体与 CHOK1-huCD73 细胞（A）和 CHOK1-cynoCD73 细胞（B）的结合曲线（*n*=3）

Fig.1 Binding Curves of the Antibodies for Binding to CHOK1-huCD73 Cells (A) and CHOK1-cynoCD73 Cells (B) (*n*=3)

加至 96 孔酶标板中，每孔 100 μL，于 4 ℃包被过夜。去掉包被液后每孔加入含 1% BSA 的 PBST 封闭液 200 μL，于 37 ℃封闭 2 h，再用 PBST 洗涤 3 次。分别加入用试验缓冲液（25 mmol/L Tris HCl+5 mmol/L 氯化镁）配制的质量浓度为 1 μg/mL 的 20huM51 和 MEDI9447 抗体，每孔 50 μL，于 37 ℃孵育 1 h，用 PBST 洗涤 3 遍。加入 HRP 标记的羊抗人 IgG 二抗（用 2%脱脂奶粉以 1 ∶ 5 000 的倍数稀释），于 37 ℃孵育 1 h，用 PBST 洗涤 3 遍。每孔加入 TMB 50 μL，避光显色 10 min，加入终止液（2.0 mol/L 硫酸）50 μL 终止显色。用酶标仪检测各样品在 450 nm 波长处的吸光度值（OD_{450}），结果如图 2 所示。可见，20huM51 抗体能和截短形式的人 CD73 蛋白结合，且结合活性优于对照抗体。



■—20huM51；●—MEDI9447。

图 2 抗体与游离 CD73 的结合曲线（*n*=3）

Fig.2 Binding Curves of the Antibodies with Free CD73 (*n*=3)

2.6 人源化抗体中和活性检测

取试验缓冲液配制质量浓度为 1 μg/mL 的 20huM51 和 MEDI9447 抗体，分别加至 96 孔板中，每孔 50 μL；加入用试验缓冲液配制的质量浓度为 0.195 μg/mL 的 CD73 蛋白 50 μL，混匀；于 37 ℃、5% CO_2 条件下静置孵育 30 min。用试验缓冲液配制浓度为 3 000 μmol/L 的 AMP，2 倍稀释 9 个浓度（包含 0 浓度点），每孔 50 μL 加至上述 96 孔板中，混匀，于 37 ℃、5% CO_2 条件下静置孵育 20 min。照孔雀绿磷酸盐检测试剂盒说明书进行操作，测量 OD_{620}，定量分析体系中磷酸的含量。抗体中和活性的 Top 值、Span 值和 EC_{50} 值结果如表 4 和图 3 所示，20huM51 中和 CD73 的 EC_{50} 值、Top 值和 Span 值均优于对照抗体 MEDI9447（P<0.05）。

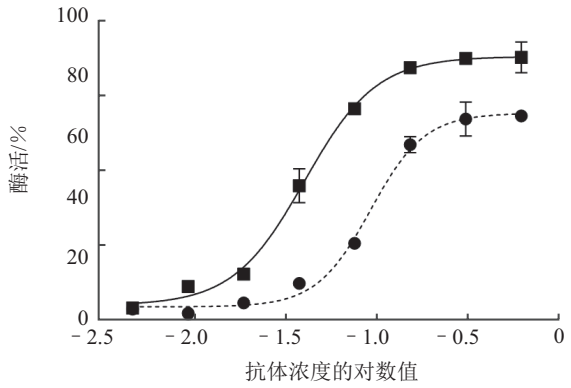
2.7 抗体对 CD73 酶活性的抑制作用

用 10 % FBS+McCoy's 5A 培养基重悬 SK-OV-3 细胞，并以每 1 mL 含 10^6 个细胞的密度，每孔 50 μL 接种至 96 孔板中。用 10 % FBS+McCoy's 5A 培养基配制待测样品（即 20huM51 和 IgG4 同型对照抗体），质量浓度梯度如表 5 所示，每孔 50 μL 加至上述 96 孔板中；混匀后于 37 ℃、

表 4　抗体中和活性试验结果

Tab.4　Results of Antibody Neutralization Activity Test

抗体	Top 值	Span 值	EC_{50}/(nmol·L^{-1})
20huM51	86.34	79.68	45.60
MEDI9447	67.43	63.16	96.56



■—20huM51；●—MEDI9447。

图 3　抗体中和活性曲线（*n*=3）

Fig.3　Curves of Antibody Neutralization Activity (*n*=3)

5％ CO_2 条件下孵育 30 min。每孔加入用溶剂①（10％ FBS+McCoy's 5A 培养基 +75 mmol/L Tris HCl+15 mmol/L 氯化镁）配制的浓度为 2 250 μmol/L 的 AMP 50 μL，混匀，于 37 ℃、5％ CO_2 条件下孵育 4 h，样品在反应体系中的初始终质量浓度为 16 667 ng/mL。离心 (900×*g*) 3 min，取上清液 50 μL，转移至新的 96 孔板中，每孔加入用溶剂②（10％ FBS+McCoy's 5A 培养基 +25 mmol/L Tris HCl+5 mmol/L 氯化镁）配制的浓度为 75 μmol/L 的 ATP 50 μL，作为 SK-OV-3+ 抗体 +ATP+AMP 组。另同法配制不含抗体的 SK-OV-3+ATP+AMP 组和无细胞和抗体的 ATP+AMP 组。每孔加入 Cell Counting-Lite 2.0 检测试剂 50 μL，检测 RLU 值，并计算 CD73 酶活。

$$CD73\ 酶活 = [RLU_{(SK\text{-}OV\text{-}3+Antibody+AMP+ATP)} - RLU_{(AMP+ATP)}] / [RLU_{(SK\text{-}OV\text{-}3+AMP+ATP)} - RLU_{(AMP+ATP)}] \times 100\%$$

以抗体质量浓度的对数值（*X*）为横坐标，以 CD73 酶活（*Y*，如表 5 所示）为纵坐标作图，以四参数方程拟合，分析抗体对 CD73 酶活性的抑制作用，结果如图 4 所示。可见，抗体能浓度梯度依赖性地抑制 CD73 酶的活性，IC_{50} 为 37.66 ng/mL。

2.8　20huM51 逆转 AMP 介导的免疫抑制作用的研究

用 PBS 配制 CD3 抗体（4 μg/mL）和 CD28 抗体（8 μg/mL）的混合液，每孔 50 μL 加入 96 孔板中。招募 1 名健康的自愿献血者，抽取外周血并提取 PBMC，利用人 $CD4^+$ T 和 $CD8^+$ T 阳性 T 细胞分选试剂盒富集 $CD4^+$ T 和 $CD8^+$ T 细胞，用 X-VIVO^{TM} 15 培养基重悬细胞，备用。用 PBS 清洗包被有 CD3 和 CD28 抗体的 96 孔板，洗涤 3 次后每孔加入细胞密度为每 1 mL 含 5×10^5 个的 $CD4^+$ T/$CD8^+$ T 细胞液 100 μL；然后，每孔加入用 X-VIVO^{TM} 15 培养基配制的 500 μmol/L AMP 液 50 μL 和待测样品 50 μL，于 37 ℃、5％ CO_2 培养箱中孵育 72 h；离心 (900×*g*) 3 min，每孔吸取上清液 100 μL，转移到包被 IFN-γ 抗体的酶标板中。以 CD3 抗体、CD28 抗体和 $CD4^+$ T 和 $CD8^+$ T 细胞混合液为阳性对照，AMP（125 μmol/L）为阴性对照，按照 IFN-γ ELISA 试剂盒说明书检测上清液中 IFN-γ 的含量。

待测样品①的配制：对于 $CD4^+$ T 细胞，配制质量浓度为 62.5 ng/mL 的 20huM51 抗体溶液，4 倍稀释 6 个浓度点（包括 0 浓度点），样品在反应体系中的初始质量浓度为 15.625 ng/mL。

待测样品②的配制：对于 $CD8^+$ T 细胞，配制质量浓度为 320 ng/mL 的 20huM51 抗体溶液，5 倍稀释 6 个浓度点（包括 0 浓度点），样品在反应体系中的初始质量浓度为 80 ng/mL。

试验结果（图 5）显示，20huM51 抗体可与

表 5　20huM51 单克隆抗体对 CD73 酶活性的抑制百分比

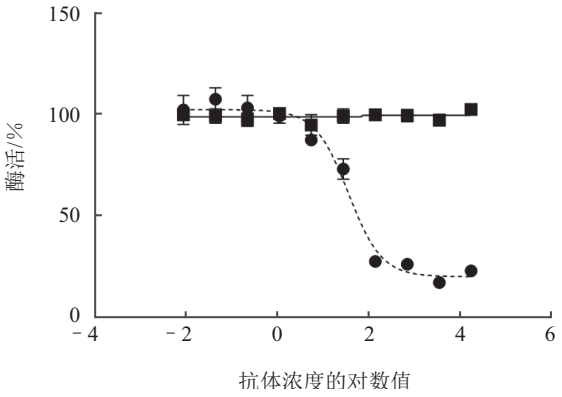
Tab.5　Percentage Inhibition of CD73 Enzyme Activity by 20huM51 Mab

抗体质量浓度 /(ng·mL^{-1})	CD73 酶活百分比 /%					
	20huM51			IgG4 同型对照抗体		
16 660.00	25	24	19	105	100	103
3 331.40	16	19	18	95	98	97
665.58	27	25	28	102	96	100
132.34	26	30	28	98	102	99
25.57	68	78	74	95	102	100
5.43	85	88	89	90	100	94
1.07	95	102	100	102	98	102
0.21	98	110	101	96	95	101
0.04	109	112	101	100	95	102
0.01	96	110	100	98	100	101

$CD4^+$ T/$CD8^+$ T 细胞表面的 CD73 结合，阻断 CD73 将细胞外 AMP 转化成腺苷的过程，从而逆转 AMP 介导的抑制 $CD4^+$ T/$CD8^+$ T 释放 IFN-γ 的作用，从而促进 IFN-γ 的分泌。

2.9 抗体对皮下移植瘤的抑制

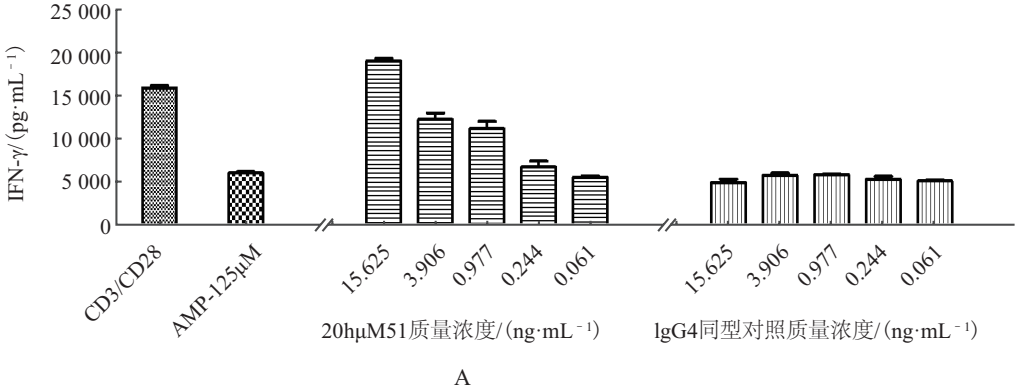
取 40 只雌性 BALB/c-hPD1/hPDL1/hCD73 小鼠，每只右后侧皮下接种细胞密度为每 1 mL 含 5×10^6 个的 CT26-hCD73 细胞 0.1 mL。当小鼠的平均肿瘤体积达到 28 mm^3 时，剔除肿瘤过大和过小的小鼠，根据肿瘤体积和体质量将剩余的 30 只小鼠随机分为 5 组，分别为溶媒（PBS）组（G1），20huM51 给药剂量 10、20、30 mg/kg 组（G2、G3、G4），以及阳性对照组（MEDI9447 抗体）（G5）(30 mg/kg)，每组 6 只，所有组别给药途径均



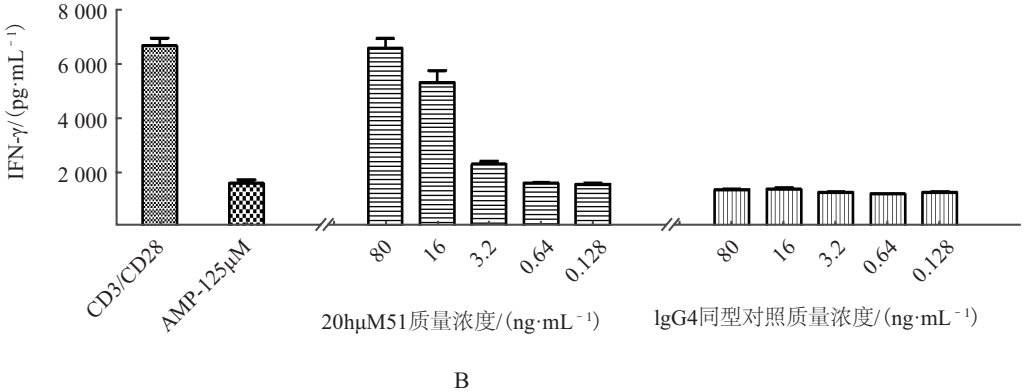
●—20huM51；■—IgG4 同型对照抗体。

图 4 20huM51 单克隆抗体对 CD73 酶活性的抑制曲线（*n*=3）

Fig.4 Inhibition Curves of CD73 Enzyme Activities by 20huM51 Monoclonal Antibody (*n*=3)



A



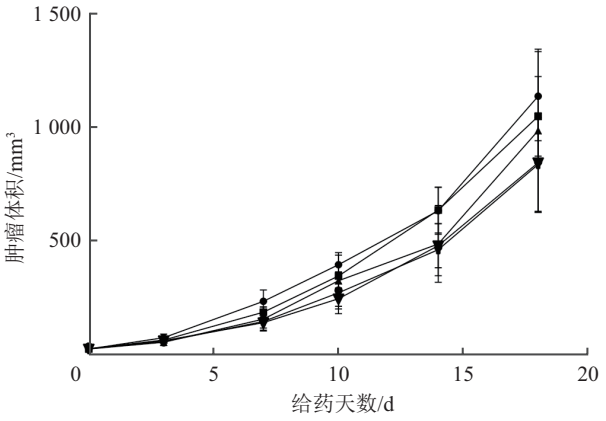
B

图 5 20huM51 单克隆抗体逆转 AMP 介导的抑制 $CD4^+$ T（A）和 $CD8^+$ T（B）释放 IFN-γ 的作用（*n*=3）

Fig.5 20huM51 Monoclonal Antibody Reverses AMP-mediated Inhibition of $CD4^+$ T (A) and $CD8^+$ T (B) Release of IFN-γ (*n*=3)

为腹腔注射。分组当天（定义为 D0）开始给药，每周给药 2 次，连续给药 3 周，每周 2 次测量肿瘤的最大直径（*D*）和最小直径（*d*）。试验结束时，小鼠做安乐死处理，取出肿瘤称定、拍照，计算肿瘤体积抑制率（TGI_{TV}）和瘤重抑制率（TGI_{TW}）。

结果（表 6、图 6）显示，溶媒组的平均肿瘤体积为（1 135.6±436.7）mm^3，各给药组（G2、G3、G4 和 G5）的 TGI_{TV}（n=6）分别为 8.0％、13.6％、26.3％、27.1％。溶媒组平均瘤重为（1.293±0.629）g，各给药组（G2、G3、G4 和 G5）的 TGI_{TW}（n=6）分别为 7.8％、9.2％、21.6％、22.5％。由表 6 可见，抗体 20huM51 的不同剂量对肿瘤体积和质量均具有显著的抑制作用（P<0.05），并且该抗肿瘤作用具有剂量依赖性，30 mg/kg 剂量时的抗肿瘤作用与阳性对照 MEDI9447 相当。在试验过程中，小鼠健康状态良好，无死亡。所有小鼠在给药期间的活动和进食状态良好，未发现明显不良反应，体质量均有一定程度增加（图 7）。



●—G1 组；■—G2 组；▲—G3 组；▼—G4 组；⬮—G5 组。

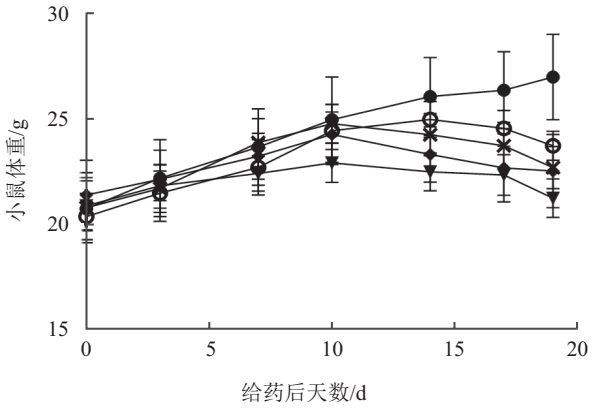
图 6　小鼠肿瘤体积的变化曲线（n=6）

Fig.6　Change Curves of Tumor Volume in Mice（n=6）

3　总结与讨论

肿瘤细胞通过多种机制，包括肿瘤微环境中免疫反应调节因子的复杂网络，诱导和增强免疫逃逸。CD73 可通过抑制腺苷生成而产生抗肿瘤免疫效应，不仅参与细胞生长、分化、转移和抗凋亡，还具有一定的促血管生成的作用[14]。因此，CD73 被认为是潜在的肿瘤治疗靶点和诊断标志物。目前，已有多个 CD73 抗体药物进入临床研究，但关于其肿瘤抑制机制的研究仍有待完善。

本研究设计筛选了人源化 CD73 抗体 20huM51，该抗体具有较高的结合力（EC_{50}=6.67 nmol/L）、亲和力（K_D=7.46×10^{-12} mol/L）和中和活性，可与 $CD4^+$ T/$CD8^+$ T 细胞表面的 CD73 结合，逆转 AMP 介导的免疫抑制，促进 IFN-γ 的分泌，并在 BALB/c 小鼠移植瘤模型中表现出良好的肿瘤抑制作用。本研究结果验证了 CD73 抗体可通过与 CD73 结合，



●—G1 组；○—G2 组；×—G3 组；▼—G4 组；◆—G5 组。

图 7　不同剂量的人源化抗体 20huM51 给药后引起的小鼠体质量变化曲线（n=6）

Fig.7　Body Weight Change Curves of Mice Induced by Humanized Antibodies 20huM51 with Different Dosages（n=6）

表 6　肿瘤体积、瘤重和肿瘤抑制率（$\bar{x}\pm s$，n=6）

Tab.6　Tumor Volume, Tumor Weight, and Tumor Inhibition Rate（$\bar{x}\pm s$, n=6）

组别	给药前肿瘤积 /mm^3	给药后肿瘤体积 /mm^3	TGI_{TV}/%	肿瘤质量 /g	TGI_{TW}/%
G1	28.0±11.1	1 135.6±436.7	—	1.293±0.629	—
G2	29.1±8.9	1 047.5±391.0	8.0	1.193±0.507	7.8
G3	28.1±9.4	985.0±798.2	13.6	1.174±0.996	9.2
G4	28.0±9.2	844.1±488.9	26.3	1.013±0.726	21.6
G5	28.9±9.8	836.4±459.5	27.1	1.003±0.637	22.5

阻断、逆转 AMP 介导的免疫抑制作用，从而抑制肿瘤生长的作用机制，为 CD73 抗体药物的开发提供了试验参考。

然而，CD73 抗体单药抑制肿瘤的效果欠佳，与 PD-1、CTLA-4 等其他抑制分子或与手术、化疗、放疗等肿瘤疫苗联合使用而发挥协同抗肿瘤作用，可能是提高疗效的可行策略[15—17]，可在后续试验中进一步评估。此外，尽管 CD73 分子在各种恶性肿瘤类型中有所上调，但由于 CD73 在体内广泛表达，很难作为各种恶性肿瘤的精确预后诊断分子，也需进一步建立 CD73 表达水平与临床结果的相关性[18]。

参考文献：

[1] 岳文莉 , 田同德 , 田同良 , 等. CD73 在肿瘤免疫微环境中的研究进展 [J]. 肿瘤研究与临床 , 2019, **31**(1): 62-65.

[2] ANTONIOLI L, PACHER P, VIZI E S, *et al*. CD39 and CD73 in immunity and inflammation [J]. *Trends Mol Med*, 2013, **19**(6): 355-367.

[3] ALLARD D, CHROBAK P, ALLARD B, *et al*. Targeting the CD73-adenosine axis in immuno-oncology [J]. *Immunol Lett*, 2019, **205**: 31-39.

[4] ZHANG B. CD73: a novel target for cancer immunotherapy [J]. *Cancer Res*, 2010, **70**(16): 6407-6411.

[5] CHEN S Q, WAINWRIGHT D A, WU J D, *et al*. CD73: an emerging checkpoint for cancer immunotherapy [J]. *Immunotherapy*, 2019, **11**: 983-997.

[6] INOUE Y, YOSHIMURA K, KURABE N, *et al*. Prognostic impact of CD73 and A_{2A} adenosine receptor expression in non-small-cell lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, **8**(5): 8738-8751.

[7] WU X R, HE X S, CHEN Y F, *et al*. High expression of CD73 as a poor prognostic biomarker in human colorectal cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2012, **106**(2): 130-137.

[8] LOI S, POMMEY S, HAIBE-KAINS B,*et al*. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, **110**(27): 11091-11096.

[9] GOSWAMI S, WALLE T, CORNISH A E, *et al*. Immune profiling of human tumors identifies CD73 as a combinatorial target in glioblastoma [J]. *Nat Med*, 2020, **26**(1): 39-46.

[10] YOUNG A, NGIOW S F, BARKAUSKAS D S, *et al*. Co-inhibition of CD73 and $A_{2A}R$ adenosine signaling improves anti-tumor immune responses [J]. *Cancer cell*, 2016, **30**(3): 391-403.

[11] OVERMAN M J, LORUSSO P, STRICKLER J H, *et al*. Safety, efficacy and pharmacodynamics (PD) of MEDI9447 (oleclumab) alone or in combination with durvalumab in advanced colorectal cancer (CRC) or pancreatic cancer (panc) [J]. *J Clin Oncol*, 2018, **36**(15_suppl): 4123.

[12] 蔡玲民. 杂交瘤技术 (综述) [J]. 微生物学免疫学译刊 , 1983, (3): 24-39.

[13] ANTONIOLI L, YEGUTKIN G G, PACHER P, *et al*. Anti-CD73 in cancer immunotherapy: awakening new opportunities [J]. *Trends Cancer*, 2016, **2**(2): 95-109.

[14] GHALAMFARSA G, RASTEGARI A, ATYABI F, *et al*. Anti-angiogenic effects of CD73-specific siRNA-loaded nanoparticles in breast cancer-bearing mice [J]. *J Cell Physiol*, 2018, **233**(10): 7165-7177.

[15] BARNHART B C, SEGA E, YAMNIUK A, *et al*. Abstract 1476: a therapeutic antibody that inhibits CD73 activity by dual mechanisms [J]. *Cancer Res*, 2016, **76**(14_Suppl): 1476.

[16] HAY C, SULT E, HUANG Q H, *et al*. Abstract 285: MEDI9447: enhancing anti-tumor immunity by targeting CD73 in the tumor microenvironment [J]. *Cancer Res*, 2015, **75**(15_Suppl): 285.

[17] ANTONIOL L, NOVITSKIY S V, SACHSENMEIER K F, *et al*. Switching off CD73: a way to boost the activity of conventional and targeted antineoplastic therapies [J]. *Drμg Discov Today*, 2017, **22**(11): 1686-1696.

[18] GHALAMFARSA G, KAZEMI M H, RAOOFI MOHSENI S, *et al*. CD73 as a potential opportunity for cancer immunotherapy [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2019, **23**(2): 127-142.