

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 12 月 29 日 (29.12.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/267702 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/46 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/090931

(22) 国际申请日: 2022 年 5 月 5 日 (05.05.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110704255.6 2021年6月24日 (24.06.2021) CN

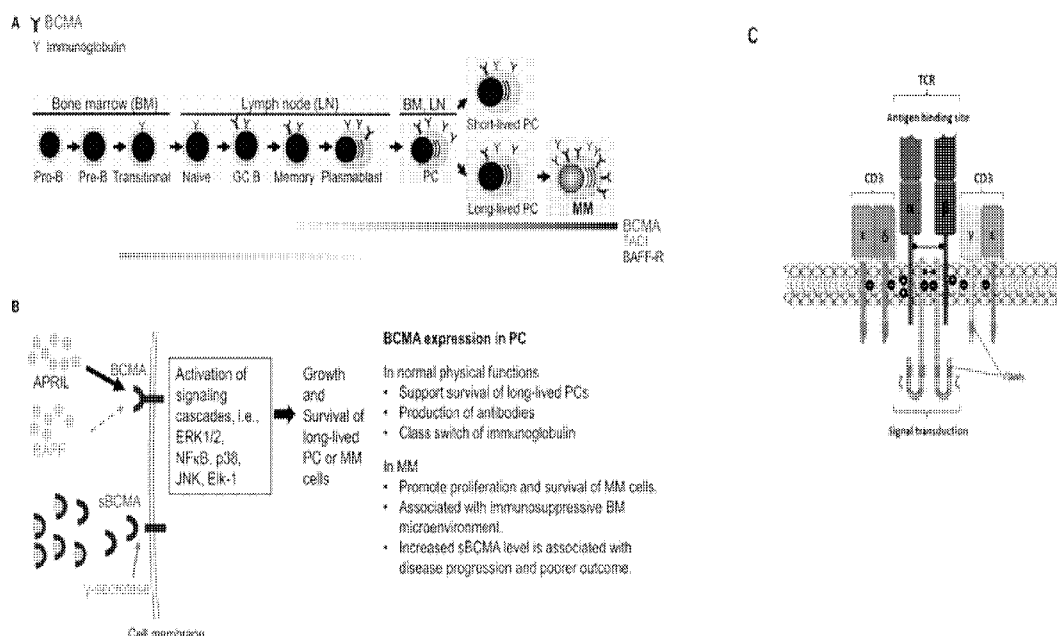
(71) 申请人: 益科思特(北京)医药科技发展有限公司 (EXCYTE BIOPHARMA LTD) [CN/CN]; 中国北京市海淀区开拓路5号3层 B306, Beijing 100085 (CN)。

(72) 发明人: 袁清安(YUAN, Qingan); 中国北京市海淀区开拓路5号3层B306, Beijing 100085 (CN)。 白丽莉(BAI, Lili); 中国北京市海淀区开拓路5号3层B306, Beijing 100085 (CN)。 孟庆武(MENG, Qingwu); 中国北京市海淀区开拓路5号3层B306, Beijing 100085 (CN)。 赵立坤(ZHAO, Likun); 中国北京市海淀区开拓路5号3层B306, Beijing 100085 (CN)。 李艺嘉(LI, Yijia); 中国北京市海淀区开拓路5号3层B306, Beijing 100085 (CN)。 李延虎(LI, Yanhu); 中国北京市海淀区开拓路5号3层B306, Beijing 100085 (CN)。

(74) 代理人: 北京路浩知识产权代理有限公司 (CN-KNOWHOW INTELLECTUAL PROPERTY); 中国北京市海淀区中关村大街11号9层965, Beijing 100086 (CN)。

(54) **Title:** BISPECIFIC ANTIBODY BINDING TO BCMA AND CD3, AND PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 结合BCMA和CD3的双特异性抗体及其制备方法与应用



(57) **Abstract:** Provided are a bispecific antibody binding to BCMA and CD3, and a preparation method therefor and the use thereof. Provided is a bispecific antibody, which can bind to BCMA and CD3 at the same time, has a specific targeting effect and can efficiently stimulate a directed immune response. The bispecific antibody retains the biological functions of an anti-CD3 antibody and an anti-BCMA antibody well, enables a bispecific antibody molecule to achieve an excellent biological function of simultaneously binding to BCMA and CD3 in a targeted manner, can form a bridge between tumor cells and immune effector cells, effectively activates the immune effector cells and the directed immune response, significantly enhances the effects of immune cells in killing tumor cells, has a

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

high targeted cell killing efficiency, reduces the ADCC effect to the largest extent, has high safety, and has good application prospects in tumor immunotherapy.

(57) 摘要: 提供结合BCMA和CD3的双特异性抗体及其制备方法与应用。提供一种能够同时结合BCMA和CD3、具有特异的靶向作用、能够高效激发导向性免疫反应的双特异性抗体。该双特异性抗体很好地保留了抗CD3抗体和抗BCMA抗体的生物学功能, 实现了一个双特异性抗体分子同时具有优异的BCMA和CD3靶向结合的生物学功能, 能够在肿瘤细胞和免疫效应细胞之间搭建桥梁, 有效激活免疫效应细胞和导向性免疫反应, 显著增强了免疫细胞杀伤肿瘤细胞的功效, 具有较高的靶细胞杀伤效率, 同时最大程度地降低了ADCC效应, 具有较高的安全性, 在肿瘤的免疫治疗中具有较好的应用前景。

结合 BCMA 和 CD3 的双特异性抗体及其制备方法与应用

交叉引用

本申请要求2021年6月24日提交的专利名称为“结合BCMA和CD3的双特异性抗体及其制备方法与应用”的第202110704255.6号中国专利申请的优先权，其全部公开内容通过引用整体并入本文。

技术领域

本发明涉及基因工程抗体技术领域，具体涉及结合BCMA和CD3的双特异性抗体及其制备方法与应用。

背景技术

单克隆抗体在临床上可用于肿瘤治疗、免疫性疾病治疗以及抗感染治疗。其中，肿瘤治疗是目前单克隆抗体应用最为广泛的领域，单克隆抗体治疗肿瘤是一种针对病变细胞特异靶点刺激免疫系统杀伤靶细胞的免疫疗法。在单克隆抗体的基础上，为了进一步提高药效和减少毒副作用，以单克隆抗体为基础的新的抗体药物，包括抗体药物偶联物（Antibody drug conjugate, ADC）、双特异性抗体（bispecific antibody, bsAb）以及CAR-T（chimeric antigen receptor T cells）等新型蛋白和细胞药物的发展极为迅速。其中，基于双特异性性构建的细胞桥（cell-bridging）双抗，由于其连接免疫T细胞和癌靶细胞的能力，显著提高了杀伤活性和特异性，具有突破性的临床价值，受到了格外的关注。对于多发性骨髓瘤而言，靶向BCMA的具有上述性质的细胞桥双抗是改善抗体治疗效果的发展方向之一，现已成为抗体工程研究领域的热点。

T细胞表面的CD3分子由4个亚基组成： δ 、 ϵ 、 γ 、 ζ ，其分子质量分别为18.9k Da, 23.1kDa, 20.5kDa和18.7kDa，其长度分别为171、207、182、164个氨基酸残基。它们共同组成6条肽链，常与T细胞受体(T cell receptor, TCR)紧密结合形成含有8条肽链的TCR-CD3复合体，其结构示意图见图1的A。该复合体具有T细胞活化、信号转导以及稳定TCR结构的功能。CD3胞质段含有免疫受体酪氨酸活化基序(immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM)，TCR识别并结合由MHC(major histo-compatibility complex)分子提呈的抗原肽，导致CD3的ITAM的保守序列中的酪氨酸残基被T细胞内的酪氨酸蛋白激酶p56lck磷酸化，然后募集其它含有SH2 (Src homology 2)结构域的酪氨酸蛋白激酶(如ZAP-70)。ITAM的磷酸化以及与ZAP-70的结合是T细胞活化信号传导过程早期阶段的重要生化反应之一。因此，CD3分子的功能是转导TCR识别抗原所产生的活化信号。

BCMA（即B-细胞成熟抗原，TNFRSF17，CD269）是一种优先在分化的浆细胞中表达的属于肿瘤坏死（TNF）受体超家族成员的非糖基化I型跨膜蛋白，其参与B细胞成熟、生长和存活。BCMA最初报道为人成熟B淋巴细胞的高尔基体内的整合膜蛋白，即作为细胞内蛋白，其表明BCMA看起来在B-细胞发育和稳态中具有重要作用。

BCMA的表达限于B-细胞谱系且主要存在于浆细胞和浆母细胞上（图1的B），并在一定程度上存在于记忆B-细胞上，但是实际上不存在于外周B-细胞上。BCMA也在多发性骨髓瘤(MM)细胞上表达。BCMA与其家族成员跨膜激活剂及亲环蛋白配体作用因子(TACI)和TNF家族受体

(BAFF-R)的B细胞活化因子一起调节体液免疫、B-细胞发育和稳态的不同方面。BCMA是TNF超家族的两种配体的受体(图1的C): APRIL(增殖诱导配体, CD256, TNFSF13), BCMA的高亲和力配体, 以及B细胞活化因子BAFF(THANK, BlyS, B淋巴细胞刺激因子, TALL-1和zTNF4), BCMA的低亲和力配体。APRIL和BAFF显示出结构相似性以及重叠但不同的受体结合特异性。负调控因子TACI也结合至BAFF和APRIL两者。APRIL和BAFF与BCMA和/或TACI的配位结合激活转录因子NF- κ B并增加促存活Bcl-2家族成员(例如, Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-w、Mcl-1、A1)的表达并下调促凋亡因子(例如, Bid、Bad、Bik、Bim等)的表达, 从而抑制细胞凋亡并促进存活。该组合作用促进B细胞分化、增殖、存活和抗体产生。BCMA的表达出现在B-细胞分化作用的较后期并有利于浆母细胞和浆细胞在骨髓中的长期存活。

BCMA是一个极其重要的B细胞生物标志物, 广泛存在于MM细胞表面, 是MM和其他血液系统恶性肿瘤的热门免疫治疗靶点。在连续3届ASCO年会上, BCMA都是行业瞩目的焦点。美国癌症研究所(CRI)的最新分析显示, BCMA已成为继CD19之后第二大最受欢迎的抗癌细胞疗法靶点。MM是一种异质性疾病并且多数是由t(11; 14)、t(4; 14)、t(8; 14)、del(13)、del(17)(除其他外)的染色体易位引起的。MM受累患者可能经历因骨髓浸润、骨质破坏、肾衰竭、免疫缺陷以及癌症诊断的心理负担而经历多种与疾病相关的症状。

对于MM, 化疗和干细胞移植的治疗方法虽然能够提高生存率, 但是常常伴有有害的副作用, 因此MM仍然难以治疗。尽管在化疗、蛋白酶体抑制剂、免疫调节剂沙利度胺衍生物和CD38靶向抗体方面取得了很大进展, 但几乎所有患者最终仍会复发。因此, 该领域对新药的需求仍然迫切。迄今为止, 对于多发性骨髓瘤患者而言两种最常用的治疗选择是类固醇、沙利度胺、来那度胺、硼替佐米或多种细胞毒素试剂的组合, 以及对于较年轻的患者采用高剂量化疗理念配合自体干细胞移植。多数的移植为自体型, 即使用患者自身的细胞。这种移植, 尽管不具有治愈性, 但其显示延长选定患者的生命。其可在新诊断的患者中作为初始疗法或在复发时进行。有时为了适当的控制疾病, 可能会建议选定患者采用一种以上的移植。用于治疗该疾病的化疗试剂是环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和去甲泼尼松, 与免疫调节剂如沙利度胺来那度胺硼替佐米和皮质类固醇(如地塞米松)的组合疗法已经成为用于治疗新确诊患者和化疗或移植均失败的疾病晚期患者中骨髓瘤的重要选择。

目前对于MM所用疗法是通常非治愈性的。因为高龄、其它严重疾病的存在或其它身体上的限制, 干细胞移植可能不适用于多数患者的选择。化疗仅能部分控制多发性骨髓瘤, 且极少达到完全缓解。因此, 迫切需要新的创新疗法。

拮抗性BCMA-特异性抗体可阻止与在正常和恶性B-细胞中强效促存活信号转导通路有关的NF- κ B活化。

在对抗血源性肿瘤或自身免疫性障碍方面的其它方法专注于BAFF和APRIL(即TNF配体超家族的配体)与其由BAFF和/或APRIL活化的受体TACI、BAFF-R和BCMA之间的相互作用。例如, 通过将人免疫球蛋白的Fc-结构域与Zymogenetics公司的TACI融合产生了阿塞西普(TACI-Ig), 来中和这两种配体并阻止受体的活化。阿塞西普目前正处于用于治疗系统性红斑狼疮(SLE, 第III期)多发性硬化症(MS, 第II期)及类风湿性关节炎(RA, 第II期)的临床试验中, 以及处于用于治疗B细胞恶性肿瘤慢性淋巴细胞白血病(CLL)、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)及MM的第I期临床试验中。在临床前研究中, 阿塞西普在体外和体内降低了初始MM细胞和MM细胞系

的生长和存活，这表明了TACI配体对于MM细胞的相关性。由于多数MM细胞及其衍生的细胞系都表达BCMA和TACI，两者的受体可能有利于配体介导的生长与存活。这些数据表明，对BCMA和TACI的拮抗作用可能有益于浆细胞障碍的治疗。另外，已经描述了与TACI交叉反应的BCMA-特异性抗体(WO02/066516)。

5 人类基因组科学公司和葛兰素史克已经开发出一种称为贝利木单抗的靶向BAFF的抗体。贝利木单抗阻断可溶性BAFF与其受体BAFF-R、BCMA及TACI在B细胞上的结合。贝利木单抗不直接结合B细胞，但是通过结合BAFF，贝利木单抗抑制包括自体反应性B细胞的B细胞的存活，并减少B细胞分化为产生免疫球蛋白的浆细胞。

然而，尽管存在BCMA、BAFF-R和TACI(即属于TNF受体超家族的B细胞受体)及其配体
10 BAFF和APRIL服从在对抗癌症和/或自身免疫性障碍中的治疗方案这一事实，仍然需要可用于治疗这种医学病症的其它可用选择。

发明内容

本发明的第一目的在于提供一种结合BCMA和CD3的双特异性抗体及其活性片段。

本发明的第二目的在于提供编码上述抗体或其活性片段的核酸。

15 本发明的第三目的在于提供上述抗体或其活性片段的用途。

具体地，本发明提供以下技术方案：

首先，本发明提供结合BCMA和CD3的双特异性抗体，该双特异性抗体包括：

第一结构域，结合B细胞成熟抗原BCMA，

以及，第二结构域，结合T细胞表面抗原CD3，

20 其中，第一结构域和第二结构域之间通过连接肽连接，

第一结构域包括重链可变区和轻链可变区，重链可变区的CDR1、CDR2、CDR3分别具有SEQ ID NO.4-6所示的氨基酸序列，或者，其分别具有以SEQ ID NO.4-6所示的氨基酸序列为参考序列、含有如下突变中的一种或多种突变的组合的氨基酸序列：

(1) SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列的第1位S突变为P或K；

25 (2) SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列的第2位Y突变为H、D、G、M或S；

(3) SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列的第3位A突变为N；

(4) SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列的第5位S突变为H、N、A或M；

(5) SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列的第1位G突变为V或T；

(6) SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列的第3位I突变为H；

30 (7) SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列的第4位I突变为D或A；

(8) SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列的第5位F突变为H；

(9) SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列的第7位T突变为K；

(10) SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列的第4位F突变为L；

第一结构域的轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3分别具有SEQ ID NO.1-3所示的氨基酸序
35 列，或者，其分别具有以SEQ ID NO.1-3所示的氨基酸序列为参考序列，含有如下突变中的一种或多种的组合得到的氨基酸序列：

(1) SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的第5位S突变为N、R或T；

- (2) SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列的第7位L突变为Q、V或A;
- (3) SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列的第8位I突变为S、A、R或P;
- (4) SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列的第10位Y突变为M、L、W或T;
- (5) SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列的第11位V突变为L或Q。

5 本发明从全合成单链人抗体库中筛选出抗BCMA的基因工程单链抗体,并获得其抗体的可变区基因序列,通过点突变试剂盒构建突变文库,获得亲和力高的克隆,将这些克隆的DNA混合,以重组方式组装单链抗体组合文库,筛选后获得与人BCMA结合的亲和力高的BCMA抗体。

10 本发明提供的抗体可变区氨基酸序列模式为FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4。在本申请中,FR和CDR的区域划分基于Kabat命名系统。在此,FR1~4代表4个框架区域,CDR1~3代表3个高变区。FR1~4可以是恒定区序列分离而来(比如人免疫球蛋白轻重链类、亚类或亚家族最常用的氨基酸),也可以是从单独的人抗体框架区分离而来或从不同的框架区基因组合而来。

15 经进一步筛选,本发明提供以下双特异性抗体,其第一结构域与BCMA表现出更高的亲和力:

结合BCMA和CD3的双特异性抗体,其包括:

第一结构域,结合B细胞成熟抗原BCMA,

以及,第二结构域,结合T细胞表面抗原CD3,

其中,第一结构域和第二结构域之间通过连接肽连接,

20 第一结构域包括重链可变区和轻链可变区,重链可变区的CDR1具有SEQ ID NO.4、7、8、9任一所示的氨基酸序列,CDR2具有SEQ ID NO.5、10任一所示的氨基酸序列,CDR3具有SEQ ID NO.6、11任一所示的氨基酸序列;

轻链可变区的CDR1具有SEQ ID NO.1、12任一所示的氨基酸序列,CDR2具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列,CDR3具有SEQ ID NO.3、13、14、15、16任一所示的氨基酸序列。

25 进一步地,在上述结合BCMA的抗体中,以下抗体与BCMA表现出更高的亲和力:

重链可变区的CDR区序列为如下任一种:

(1) CDR1具有SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列,CDR2具有SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列,CDR3具有SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列;

30 (2) CDR1具有SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列,CDR2具有SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列,CDR3具有SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列;

(3) CDR1具有SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列,CDR2具有SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列,CDR3具有SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列;

(4) CDR1具有SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列,CDR2具有SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列,CDR3具有SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列;

35 轻链可变区的CDR区序列为如下任一种:

(1) CDR1具有SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列,CDR2具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列,CDR3具有SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列;

(2) CDR1具有SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列,CDR2具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸

序列，CDR3具有SEQ ID NO.13所示的氨基酸序列；

(3) CDR1具有SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.14所示的氨基酸序列；

(4) CDR1具有SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.15所示的氨基酸序列；

(5) CDR1具有SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.16所示的氨基酸序列；

更进一步地，在上述结合BCMA的抗体中，以下抗体与BCMA表现出更高的亲和力：

重链可变区的CDR和轻链可变区的CDR为如下任一种：

(1) 重链可变区的CDR1具有SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列；轻链可变区的CDR1具有SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列；

(2) 重链可变区的CDR1具有SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列；轻链可变区的CDR1具有SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.13所示的氨基酸序列；

(3) 重链可变区的CDR1具有SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列；轻链可变区的CDR1具有SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列；

(4) 重链可变区的CDR1具有SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列；轻链可变区的CDR1具有SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.16所示的氨基酸序列。

基于上述CDR的序列，具有如下可变区序列的抗体（第一结构域）表现出较高的BCMA的亲和力：

重链可变区具有SEQ ID NO.17、19-21任一所示的氨基酸序列，轻链可变区具有SEQ ID NO.18、22-27任一所示的氨基酸序列；

在上述重链可变区、轻链可变区的基础上，与其序列相比具有满足以下二者中至少一个：
a) 结合相同抗原表位；b) 序列同一性大于70%、80%、85%、90%、97%、98%或99%的氨基酸序列也在本发明的保护范围内。

进一步而言，具有如下可变区序列的抗体（第一结构域）表现出更为优异的BCMA的亲和力：

重链可变区具有SEQ ID NO.17所示的氨基酸序列，轻链可变区具有SEQ ID NO.18所示的氨基酸序列；

或者，重链可变区具有SEQ ID NO.20所示的氨基酸序列，轻链可变区具有SEQ ID NO.22所示的氨基酸序列；

或者，重链可变区具有SEQ ID NO.19所示的氨基酸序列，轻链可变区具有SEQ ID NO.27所示的氨基酸序列；

或者，重链可变区具有SEQ ID NO.21所示的氨基酸序列，轻链可变区具有SEQ ID NO.25所示的氨基酸序列；

5 或者，重链可变区具有SEQ ID NO.20所示的氨基酸序列，轻链可变区具有SEQ ID NO.26所示的氨基酸序列。

本发明的双特异性抗体中，第一结构域为能够结合BCMA的抗体，包含2个完整的重链-轻链对，其中，每对轻链和重链之间通过二硫键连接。

10 第一结构域的重链的Fc片段可为人或人源化抗体（IgG1、IgG2、IgA、IgE、IgM、IgG4或IgD）的Fc片段。

作为本发明的一种实施方式，第一结构域的重链的Fc片段为人或人源化IgG4抗体的Fc片段。

作为本发明的优选实施方式，第一结构域的重链具有SEQ ID NO.32所示的氨基酸序列，轻链具有SEQ ID NO.33所示的氨基酸序列，

15 或者，重链具有SEQ ID NO.49所示的氨基酸序列，轻链具有SEQ ID NO.42所示的氨基酸序列，

或者，重链具有SEQ ID NO.50所示的氨基酸序列，轻链具有SEQ ID NO.44所示的氨基酸序列，

20 或者，重链具有SEQ ID NO.51所示的氨基酸序列，轻链具有SEQ ID NO.46所示的氨基酸序列，

或者，重链具有SEQ ID NO.52所示的氨基酸序列，轻链具有SEQ ID NO.48所示的氨基酸序列。

这些结合BCMA的抗体具有较高的BCMA的亲合力，且能够保证与结合CD3的抗体在形成双特异性抗体时，两者的功能均得到充分发挥。

25 在上述重链、轻链序列的基础上，与该序列相比具有满足以下二者中至少一个：a)结合相同抗原表位；b)序列同一性大于70%、80%、85%、90%、97%、98%或99%的氨基酸序列也在本发明的保护范围内。

30 本发明提供的上述人源抗人BCMA抗体以0.2 nM-10 nM的亲合力结合于人BCMA。该抗体抑制BCMA配体结合人BCMA。该抗体结合于表达BCMA的细胞，所述的细胞可以是人多发性骨髓瘤细胞或淋巴瘤细胞。

对于结合CD3抗原的第二结构域，其重链可变区具有SEQ ID NO.28所示的氨基酸序列，轻链可变区具有SEQ ID NO.29所示的氨基酸序列。

优选第二结构域的轻链可变区和重链可变区通过连接肽连接为单链抗体，该单链抗体具有SEQ ID NO.31所示的氨基酸序列。

35 本发明的双特异性抗体优选设计为以下结构：第一结构域包含2个完整的轻链-重链对，第二结构域包含2个单链抗体，通过如下任意一种方式连接而成的对称结构：

（1）第二结构域的2个单链抗体的C端分别通过连接肽与第一结构域的2条重链的N端连接；

(2) 第二结构域的2个单链抗体的N端分别通过连接肽与第一结构域的2条重链的C端连接。

本发明发现, 针对上述第一结构域和第二结构域的序列, 具有上述对称结构的双特异性抗体与其它结构的双特异性抗体相比, 能够更好地保留第一结构域和第二结构域的原抗体的特异性抗原结合能力, 同时具有优异的结合BCMA和CD3的生物学功能, 在生产工艺和药用性能等方面具有明显优势。本发明开发了具有上述抗体分子结构的结合BCMA和CD3的双特异性抗体, 该双特异性抗体具有特异性的靶向作用, 并能够高效激发具有导向性的免疫反应, 杀伤肿瘤细胞。

用于第一结构域和第二结构域连接的连接肽的氨基酸序列优选为 (GGGGX)_n, 其中, X 为Gly或Ser, n为1-4的自然数。

作为本发明的一种优选实施方式, 连接肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.30所示。

作为具有上述结构的双特异性抗体的示例, 本发明提供针对人的CD3和BCMA的双特异性抗体, 在具有上述单链抗体重链可变区、轻链可变区以及单克隆抗体的重链和轻链的结构和序列中, 本发明构建了2个能同时结合CD3和BMCA的双特异性抗体, 其结构和序列如下:

(1) 第一结构域的重链与第二结构域连接形成具有SEQ ID NO.34所示的氨基酸序列的融合蛋白, 第一结构域的轻链具有SEQ ID NO.33所示的氨基酸序列;

(2) 第一结构域的重链与第二结构域连接形成具有SEQ ID NO.35所示的氨基酸序列的融合蛋白, 第一结构域的轻链具有SEQ ID NO.33所示的氨基酸序列;

(3) 第一结构域的重链与第二结构域经连接肽连接后具有SEQ ID NO.41所示的氨基酸序列, 轻链具有SEQ ID NO.42所示的氨基酸序列;

(4) 第一结构域的重链与第二结构域经连接肽连接后具有SEQ ID NO.43所示的氨基酸序列, 轻链具有如SEQ ID NO.44所示的氨基酸序列;

(5) 第一结构域的重链与第二结构域经连接肽连接后具有SEQ ID NO.45所示的氨基酸序列, 轻链具有SEQ ID NO.46所示的氨基酸序列;

(6) 第一结构域的重链与第二结构域经连接肽连接后具有SEQ ID NO.47所示的氨基酸序列, 轻链具有SEQ ID NO.48所示的氨基酸序列。

以上所公开和要求保护的SEQ ID NO.1-52所示序列包括“保守序列修饰”, 即不明显影响和改变所述抗体或含有所述氨基酸序列抗体的结合特征的核苷酸和氨基酸序列修饰。所述保守序列修饰包括核苷酸或氨基酸替换、添加或缺失。可以通过本领域的标准技术, 如定点诱变和PCR介导的诱变等将修饰导入SEQ ID NO.1-52中, 保守氨基酸替换包括氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基或其他氨基酸残基代替。本领域中, 已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(如赖氨酸、精氨酸、组氨酸), 具有酸性侧链的氨基酸(如天冬氨酸、谷氨酸), 具有不带电的极性侧链的氨基酸(如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸), 具有非极性侧链的氨基酸(如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸), 具有β分支侧链的氨基酸(如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香侧链的氨基酸(如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此, 优选来自于同一侧链家族的另一种氨基酸残基代替人抗BCMA抗体中的非必须氨基酸残基。

因此，以上公开的具有所述氨基酸序列的抗体和/或含有以上公开的氨基酸序列的抗体包括基本上由经保守序列修饰的相似序列编码的，或含有经保守序列修饰的相似序列的抗体，均应视为本发明的范畴。

本发明还提供编码所述结合BCMA和CD3的双特异性抗体的核酸。

5 考虑到密码子的简并性，编码本发明所述抗体的基因可在其编码区，在不改变氨基酸序列的条件下，对编码上述抗体的基因序列进行修改，获得编码相同抗体的基因。本领域技术人员可以根据表达抗体宿主的密码子偏爱性，人工合成改造基因，以提高抗体的表达效率。

本发明还提供含有编码所述结合BCMA和CD3的双特异性抗体的核酸的生物材料，所述生物材料包括重组DNA、表达盒、载体、宿主细胞、工程菌或细胞系。

10 其中，所述载体包括但不限于克隆载体、表达载体，可为质粒载体、病毒载体、转座子等载体。

所述宿主细胞或细胞系可以为来源于微生物或动物的细胞或细胞系。

15 本发明还提供结合BCMA和CD3的双特异性抗体的制备方法，该方法包括：构建含有所述第一结构域和所述第二结构域的编码基因的表达载体；将所述表达载体导入宿主细胞，获得表达所述双特异性抗体的宿主细胞；培养宿主细胞，经分离纯化获得所述双特异性抗体。

在制备所述双特异性抗体时，本领域技术人员可根据需要选择本领域常规的宿主细胞、表达载体、将表达载体导入宿主细胞的方法以及抗体的分离纯化方法。

基于本发明提供的结合BCMA和CD3的双特异性抗体的功能，本发明提供结合BCMA和CD3的双特异性抗体或其编码核酸或含有该核酸的生物材料的如下任一种应用：

20 (1) 在制备用于诊断、预防或治疗 BCMA 表达的 B 细胞相关疾病的药物中的应用；
优选所述 BCMA 表达的 B 细胞相关疾病包括 B 细胞相关肿瘤（包括但不限于多发性骨髓瘤或淋巴瘤）、B 细胞引起的自身免疫病；

(2) 在制备用于诊断、预防或治疗以 BCMA 为靶标的疾病的药物中的应用，优选所述的药物为抗肿瘤药或治疗自身免疫性疾病的药物；

25 (3) 在制备用于杀伤BCMA表达的细胞的药物中的应用；

(4) 在制备BCMA和/或CD3的检测试剂中的应用；

(5) 在制备适用于CAR-T疗法的相关试剂中的应用。

以上所述的BCMA表达的B细胞相关疾病优选为高表达/过度表达BCMA的恶性肿瘤和自身免疫性疾病。

30 本发明提供的双特异性抗体本身可用于治疗 and 诊断。抗体可以被标记、交联或偶联及与其他蛋白或多肽分子融合表达形成复合物（如细胞毒性物质、放射性毒素和/或化学分子等）用于诊断和治疗。

本发明还提供包含所述结合BCMA和CD3的双特异性抗体的多特异性抗体、融合蛋白、免疫毒素、药物或检测试剂。

35 以上所述的免疫毒素包含以各种形式连接于细胞毒性剂的所述双特异性抗体。

所述的各种连接形式为抗体被标记、体外交联或分子偶联。所述细胞毒性剂包括化学分子、放射性同位素、多肽、毒素及其他对细胞具有杀伤或诱导细胞死亡特性的物质。

以上所述的融合蛋白，包含本发明提供的上述双特异性抗体和具有某种功能的其他蛋白或

多肽分子的复合物。

具体地，所述的融合蛋白可为将抗体基因与免疫毒素或细胞因子基因连接构建重组表达载体，通过哺乳动物细胞或其他表达系统获得重组融合蛋白分子。

5 以上所述的所述药物、检测试剂还可包含药学领域和检测试剂领域允许的其它有效成分或辅料（例如：抗体的组分和药理学上可接受的递送分子或溶液。其中，治疗用组分为无菌，可低温冻干）。

10 本发明的双特异性抗体可以抑制BCMA所诱导的一种或多种生物学活性。通过阻碍BCMA与其配体结合发挥作用，也可以通过杀伤BCMA高表达的细胞发挥作用，或者通过与BCMA结合后复合物被内化从而消耗细胞表面的BCMA而发挥作用。BCMA拮抗剂所具有的所有干扰功能均应平等地视为本发明的目的。

本发明的有益效果在于：

15 本发明通过基因工程和噬菌体表面展示文库技术，从天然全人序列的单链抗体库中筛选出抗人B细胞表面抗原BCMA的特异性抗体。通过亲和力成熟改造获得结合能力显著提高的多株克隆，它们与人BCMA的亲和力在0.26 nM-0.31 nM之间。流式细胞仪测定的表观亲和力相对于亲本抗体提高了61-97倍，证实了本发明的抗人BCMA抗体及优化的突变体都具有良好的结合BCMA的能力。

20 在此基础上，本发明提供一种能够同时结合BCMA和CD3、具有特异的靶向作用、能够高效激发导向性免疫反应的双特异性抗体。该双特异性抗体更好地保留了抗CD3抗体和抗BCMA抗体的生物学功能，实现了一个双特异性抗体分子同时具有优异的结合BCMA和CD3的生物学功能，能够在肿瘤细胞和免疫效应细胞之间搭建桥梁，有效激活免疫效应细胞和导向性免疫反应，显著增强了免疫细胞杀伤肿瘤细胞的功效，同时最大程度地降低了ADCC效应，具有较高的安全性。

25 本发明提供的双特异性抗体具有良好的治疗应用前景，主要表现为与人BCMA和CD3具有特异性结合活性。该抗体经ELISA检测及流式细胞仪检测，与H929、RPMI8226细胞表面的BCMA以及T细胞均能够特异性结合，表明靶标特异性良好。经体外细胞杀伤效率检测，该双特异性抗体具有较高的靶细胞杀伤效率。

此外，本发明提供的双特异性抗体具有结构完全对称的特点，在进行宿主表达时，不会产生其它结构的蛋白异构体，从而大大降低了提取和纯化工艺的难度，具有制备简单、产量高的优势，在肿瘤的免疫治疗中具有广阔的应用前景。

30 本发明为研发针对BCMA靶标的抗肿瘤抗体药物、CAR-T试剂开发、其它疾病如B细胞相关的炎症和自身免疫性疾病的预防和治疗提供了双特异性抗体候选分子。本发明的双特异性抗体能够同时结合免疫细胞和肿瘤细胞，导向T免疫反应，特异性有效杀伤肿瘤细胞，可研发为多发性骨髓瘤的抗体药物。

附图说明

35 图1为本发明背景技术中BCMA的表达及TCR结构示意图，其中，A为BCMA抗原在B细胞发育期的表达；B为BCMA抗原的配体作用信号通道，来源：fimmu-09-01821-g001.jpg (1050 × 762) (frontiersin.org)；C为T细胞受体（TCR）复合体结构及其中CD3的组成，来源：

<https://www.researchgate.net/publication/299549376>。

图2为本发明实施例2中流式细胞仪（FACS）分析BCMA先导克隆B10的结合，其中，上方两个图片：阴性对照（NC）；中间两个图片：阳性对照（PC）；下方两个图片：候选克隆B10（B10）。

图3为本发明实施例3中流式细胞仪分析B10及其亲和力成熟的突变体的结合，其中，A、B、C、D、E依次为B10、B10.3、B10.4、B10.5、B10.9对H929细胞的结合，F、G、H、I、J依次为B10、B10.3、B10.4、B10.5、B10.9对RPMI8226细胞的结合。

图4为本发明实施例3中ELISA及流式细胞仪分析分别比较J6，B10及其突变体的结合，其中，A为ELISA，B为FACS。

图5为本发明实施例4中基于FIST平台构建的抗BCMA×CD3双特异性抗体结构示意图，其中，A为以N端融合（nFIST）构建的双抗：抗-CD3单链抗体融合于抗-BCMA抗体VH的N端，B为以C端融合（cFIST）构建的双抗：抗-CD3单链抗体融合于抗-BCMA抗体Fc的C端。

图6为本发明实施例5中双特异抗体K3B10.3和B10.3K3的SDS-PAGE电泳图，其中，A和C为还原SDS-PAGE电泳；B和D为非还原SDS-PAGE电泳；A和B为K3B10.3双特异抗体SDS-PAGE电泳结果；C和D为B10.3K3双特异抗体SDS-PAGE电泳结果；泳道M代表蛋白分子量标准，泳道1为目的蛋白。

图7为本发明实施例5中纯化的双特异抗体K3B10.3和B10.3K3的HPLC-SEC纯度分析峰形图，其中A为双特异抗体K3B10.3；B为双特异抗体B10.3K3。

图8为本发明实施例6中流式细胞仪分析K3B10.3和B10.3K3对人Jurkat T细胞、RPMI细胞的结合，其中，A为二抗对照；B为K3B10.3；C为B10.3K3对CD3的结合；D为二抗对照；E为K3B10.3；F为B10.3K3对BCMA的结合。

图9为本发明实施例7中cFIST双抗对BCMA抗原的结合它们介导T细胞对BCMA表达细胞RPMI8226的杀伤，其中，A为B10亲和力提高突变体双抗对BCMA抗原的ELISA结合，其中，抗体包被为200ng/well，biotin-BCMA以250ng/ml起始倍半稀释，B为B10亲和力提高突变体双抗对BCMA表达细胞的介导杀伤，其中，B10K3分别进行了高、低浓度的实验，低浓度（B10K3）无法获得标准的S曲线，高浓度（B10(high)K3）能够获得标准的S曲线，并根据该曲线计算EC50值。

图10为本发明实施例7中BCMA双抗介导T细胞对不同表达水平的BCMA细胞杀伤图，其中，A为H929细胞，B为RPMI8226细胞。

具体实施方式

以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。

实施例1 从天然人抗体噬菌体表面呈现文库中筛选抗人BCMA抗体

抗体库技术是一种将某种动物（包括人）的所有抗体可变区基因克隆到质粒或噬菌体中，后者感染大肠杆菌后，抗体片段表达于噬菌体颗粒表面，或者大肠杆菌周质、包浆中。然后用靶标抗原从抗体库中筛选出携带特异抗体基因的克隆，从而获得相应的特异性抗体的技术。从抗体库中已经筛选多种基础研究和临床研发中需要的抗体，如肿瘤相关的膜蛋白抗原、与自身免疫病相关的自身抗原、抵抗病毒性疾病的病毒抗原的抗体。这些显示出抗体库技术在

基础研究和抗体药物研发中的巨大应用潜力。特别的，从人的抗体库中得到全人源的单克隆抗体，克服了难以用鼠杂交瘤技术获得人源单抗的障碍；由于人抗体序列的高度保守性，这些抗体对人体自身免疫系统的免疫原性远低于来源于动物的抗体，因此更安全。

非免疫的人天然抗体库以健康人为抗体基因来源，这些人称之为供体。由于使用全天然人抗体序列，获得的抗体对人体免疫系统具有极低的免疫原性。采用分子生物学和 DNA 操作技术，以 RNA 抽提试剂盒（例如 QIAGEN 的 RNeasy Mini Kit，目录号 74104），把全部 RNA 从供体的外周血单核细胞（PBMC）中提取出来以后，从每一份 RNA 样品中取等量后合并，以反转录试剂盒（例如 ThermoFisher Scientific 的 cDNA 合成试剂盒（SuperScript™ IV Reverse Transcriptase）进行轻重链基因 cDNA 的合成。以这些抗体 cDNA 为模板，在第一轮扩增中，在以各个亚组特异性的上游引物和恒定区引物配合下进行 PCR 扩增，获得各个亚组的全部成员基因。在第二轮 PCR 中，带有搭桥的重链可变区（VH）3'-端引物组和带有搭桥的轻链可变区（VL）5'-端引物组分别与各自的另一端引物（包含有特异性的限制性内切酶位点）配合，使得获得的 VH 和 VL 能够搭头链接，形成单链抗体（scFv）基因。利用这些单链抗体的基因在 5'-端和 3'-端的特异性酶切位点，将这些 scFv 基因克隆至溶源性的噬菌粒（phagemid，如 M13 phagemid）载体中，构建抗体文库。该文库的大小达到了 50 亿个集落形成单位（cfu）。

生物淘选指的是用特异性靶标从抗体中筛选获得特异性克隆的过程。为了获得人 BCMA 抗原特异性的人抗体，用液相筛选法进行淘选。液相淘选法的一般步骤是：首先把商品化的 BCMA 抗原（BCMA-Fc 融合蛋白，Acrobiosystems，目录号 BC7-H5254）经生物素修饰，让每个分子交联上 3-5 个生物素分子，去除游离的生物素。合适量的生物素标记的 BCMA 抗原结合到链亲和素偶联的磁珠上（例如 Dynabeads™ M-280 Streptavidin, ThermoFisher Scientific，目录号 11205D）。解冻一份人抗体库，其中包含 100 亿个表达有不同抗体的噬菌体颗粒。磁珠和抗体库都以 4% 的脱脂奶粉溶液（4% MPBS）封闭，以消除非特异性作用位点。由于磁珠上可能还有未被亲和素结合的链亲和素，同时由于 BCMA 抗原分子是由人 Fc 构成的融合蛋白，因此需要在解冻的抗体库中同时添加足量（50-100 倍过量于所用的靶标蛋白的量）的链亲和素和人抗体 Fc，以去除结合它们的抗体克隆。封闭好的抗体库溶液与磁珠一起（总体积 < 1 ml）加到 1.5ml 的 Eppendorf 管中，在室温旋转混合孵育 2 小时，以便让 BCMA 特异性的噬菌体抗体结合。孵育完成后把 Eppendorf 管置于磁力架上静置 1 分钟，分离磁珠和溶液。用移液枪尽量完全去除溶液部分，换上新的枪头（tip），加入 1 ml 洗涤液 PBST（磷酸缓冲液（PBS）溶液中加入终浓度为 0.05% 的 Tween 20）至 Eppendorf 管中，远离磁力架，以移液枪轻轻悬浮磁珠，重新置于磁力架上分离磁珠和溶液。去除溶液，如此重复三次。然后把洗涤液改成 PBS，洗涤磁珠 3 次。经过洗涤，非特异性和低亲和力的噬菌体抗体被大部分去除，特异性的噬菌体抗体就留在磁珠上。向磁珠中加入洗脱液（10 mM Glycine，pH2.0），重悬磁珠，室温静置 10 分钟，以磁力架分离磁珠和溶液，吸取溶液至一个干净的 Eppendorf 管中，加入 1/10 1M Tris 溶液（pH8.0）以中和溶液，这就是洗脱液，其中包含了成千上万的不同结合 BCMA 抗原的噬菌体抗体，如此就完成了第一轮淘选。

为了进一步收获亲和力比较高的特异性抗体克隆，需要进行更多轮淘选。为此，以第一轮淘选洗脱的噬菌体抗体溶液感染对数期的、能被 M13 噬菌体侵染的大肠杆菌（如 TG1 菌株），得到感染液，取少量进行一系列 10 倍梯度稀释（通常稀释至原液的百万分之一，并取最后三个梯度进行涂布）以测定第一轮产出洗脱液（output）的滴度（titer），该 titer 又称为第一轮最大多样性，通常第一轮淘选后的产出滴度在 $10E6$ 个 cfu 以下。把其余感染液全部涂布于含有相应抗生素的细菌培养板上过夜培养，以获取菌落；刮下菌落层并以培养基重悬，取足量包含第一轮 output 多样性的重悬液至含足量液体培养基（2YT-CG，2YT 培养基中加入 Carbenicillin 和葡萄糖，终浓度分别是 $100\mu\text{g/ml}$ 和 2%）的摇瓶中，使重悬液稀释至 0.1 OD_{600} 以下并开始培养，直到对数期，即 OD_{600} 达到 0.5 左右。为使第一轮淘选获取的这些抗体再次呈现于噬菌体颗粒表面，取 10 ml 菌液，加入辅助噬菌体 M13K07，使感染复数为 20:1，静置于 37°C 保持 30 分钟（这个阶段称之为噬菌体拯救）。离心，以 50 ml 表达培养基（2YT-AK，2YT 培养基中加入 Carbenicillin 和 Kanamycin，终浓度分别是 $100 \mu\text{g/ml}$ 和 $30 \mu\text{g/ml}$ ）重悬菌体，置于 30°C ，200 转/分培养过夜。次日离心收获培养上清，加入 1/5 体积的 PEG8000/NaCl（PEG-8000 20%，NaCl 2.5 M），充分混匀，置于冰上孵育 1 小时。高速离心（ $11500\times g$ ）30 分钟以收获噬菌体抗体颗粒。以 1 ml PBS 溶液重悬沉淀，再次置于高速离心以去除细菌碎片。上清液即为第一轮淘选后的扩增液，其中包含的每个抗体克隆都被扩增了上万倍以上。这个扩增液即可用于第二轮的淘选实验。第二轮淘选的操作除了在 PBST/PBS 时，增加至各做 6 次（6/6）之外，其余和第一轮操作方法完全相同。在第三轮中，可以进一步增加洗涤次数至 10/10。多轮淘选通常会有效地富集特异性的克隆，多样明显减少但它们的亲和力比较高，便于后续的单克隆筛选。

为了获取特异性的单克隆抗体，需要进行单克隆噬菌体酶联实验（Monophage ELISA）。为此，把在第二轮和/或第三轮的梯度稀释中会得到分离良好的单菌落单独地接种这些菌落至含 2YT-AG 的 96-孔培养板中（每板接种 93 个菌落，留下三个孔作为阴性对照），过夜培养，这就是母板（master plate）。将母板中每孔的菌液接种至新的培养板中生长至对数期，进行上述的噬菌体拯救，使每个克隆的抗体表达于噬菌体表面。在普通的 96-孔酶联板上包被 BCMA 抗原（ $1\mu\text{g/ml}$ ），同时以同样浓度的人 Fc 包被另一块酶联板。每个单独表达的单克隆噬菌体抗体菌液分别加入到 BCMA 板和 Fc 板对应孔，后接合适的二抗及辣根过氧化物酶（HRP）偶联的三抗，底物显色，读取吸光值（ 450nm ）。BCMA 阳性克隆的判断方法是：在 Fc 板上为阴性（不超过其所在板阴性孔吸收值 1.5 倍），在 BCMA 板上为阳性（高于所在板阴性孔吸收值 3 倍以上），并且其孔吸收值高于 Fc 板上对应孔之吸收值上的克隆。经过分析，10 个孔对应的克隆显示仅对 BCMA 抗原阳性，而对 Fc 为阴性，这些克隆统称为 hit。

从母板对应孔上将这些 hit 菌液分别接种至 3ml 2YT-CG，置于 37°C ，200 转/分培养过夜。次日抽提噬菌粒 DNA，以特异性引物测定包含每个 hit 的单链抗体区的序列。取编码区 DNA 序列翻译成氨基酸序列，对它们进行多重序列比较（CLUSTALW，网站链接 <https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>）以判断克隆特异性。经过分析，这十个 hit 在序列上属于两个不同的克隆，其中一个命名为 B10，由此获得

了抗人 BCMA 抗原的全人抗体可变区序列。B10 的重链可变区的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.4-6 所示，轻链可变区的 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.1-3 所示，重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO.17 所示，轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO.18 所示。由 B10 的轻链和重链可变区构成的单链抗体氨基酸序列如 SEQ ID NO.36 所示。

实施例2 抗体功能验证

为了验证获得的 BCMA 抗体克隆是否结合纯化的 BCMA 抗原以及细胞膜表面表达的 BCMA，B10 单链抗体的基因被克隆至真核表达载体 pFH（益科思特公司制备），得到质粒 pFH-B10。在该载体中，scFv 基因和人 IgG4 的 Fc 基因融合，表达出 scFv-Fc 形式的蛋白，它可以用 Potein-A 进行亲和纯化，也可以用（HRP 或荧光素）标记抗人 Fc 抗体进行检测。

获得了 B10 的 scFv-Fc 蛋白后，以 Octet RED 检测了这株抗体对 BCMA 的结合情况，证实了 B10 对 BCMA 的特异性结合。

以流式细胞仪检测了 B10 对表达 BCMA 的细胞系 H929（NCI-H929, ATCC® CRL-9068™），表明了 B10 特异性结合细胞膜表面的 BCMA 抗原（见图 2）。在此 FACS 分析中，四分区左上角百分数（阳性百分数）代表了每个单链抗体对细胞表面抗原的结合强弱。克隆 B10 的阳性百分数为 48.96%，由此验证了该抗人 BCMA 抗原的抗体的结合能力。

实施例3 抗体亲和力成熟

体外亲和力成熟是一种快速的定向分子进化操作：在 DNA 水平上引入突变，在蛋白结合的水平上进行筛选。对于 B10 抗体而言，为了避免引入可能增强免疫原性的突变或者明显改变抗体的结构，突变位点局限于 CDR 区的序列，而且每个位置都分别进行饱和突变，每一种突变分别表达，分别检测。

亲和力成熟的操作过程是：首先把由 B10 的轻重链可变区基因分别克隆至 pUFL 载体上（pUFL 是一种可以在大肠杆菌中表达抗体 Fab 的质粒，由益科思特公司制备），得到 B10 的 Fab 形式。设计全套 CDR 区单点随机突变引物，以点突变试剂盒（QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent 目录号 210515）分别对每个 CDR 位置进行 PCR 突变，分别转化 BL21(DE3) 感受态细菌，分别制备单克隆菌落平板，这些突变体统称为单点突变文库。同时把亲本 B10 的 Fab 载体也进行转化。挑取 >30 个菌落制备 DNA 对突变区进行序列分析以评估突变效率。当突变效率合适时（大于 80%）按每个 CDR 位置的突变挑取 92 个菌落至含有相应培养基（2YT 中含 100 μg/ml Carbenicillin+0.1% 葡萄糖）的 96-孔培养板中，另外挑取 3 个亲本菌落，留下三个孔为空白对照。平板置于 37°C 中，300 转/分培养 6 小时，加入 IPTG 至终浓度 1 mM，转入 30°C 中，300 转/分培养过夜，Fab 片段表达并分泌至培养基中。

通过预实验，优化酶联反应条件，使得 B10 亲本抗体 Fab 对抗原 BCMA-Fc 的结合 A450 吸光度略高于本底信号的 3 倍左右。提前一天在酶联板上按 0.25 μg/ml 包被 BCMA-Fc 抗原，次日按孔加入分泌表达的突变 Fab，以 HRP 偶联的抗人 Fab 作为二抗，底物显色，读取 A450，获得信号高于亲本孔最高值 1.5 倍的孔对应的克隆，这些克隆称之为 hit。收集轻重链可变区所有的 hit，重新进行诱导表达以及酶联实验以验证它们确实具有高于亲本抗体的亲和力。对重复阳性的克隆的质粒进行突变区序列分析，获取 CDR 氨基酸的突变信息，这个过程称之为初级筛选（primary screening）。由此获取了 CDR 区所有有益于亲和力提高的突变信息：重链可变区 CDR 中对亲和

力有提供的突变位点见表1， 轻链可变区CDR中对亲和力有提供的突变位点见表2。

表 1 B10 重链可变区 CDR 中对亲和力提高有益的突变

CDR 区位置	亲本氨基酸	有益的突变氨基酸
H31	S	P, K
H32	Y	H, D, G, M, S
H33	A	N
H35	S	H, N, A, M
H50	G	V, T
H52	I	H
H53	I	D, A
H54	F	H
H56	T	K
H98	F	L

表 2 B10 轻链可变区 CDR 中对亲和力提高有益的突变

CDR 区位置	亲本氨基酸	有益的突变氨基酸
L28	S	N, R, T
L97	L	Q, V, A
L98	I	S, A, R, P
L100	Y	M, L, W, T
L101	V	L, Q

从初级文库中通过酶联实验筛选获得了整个CDR区有益于亲和力提高的所有单个突变信息后，重新设计新的多点突变引物，使其包含主要的有益突变，再次以点突变试剂盒构建突变文库，这个文库称为组合文库。为了尽可能筛选轻重链可变区中所有的突变组合，分别构建及筛选包含各自多个突变的轻重链可变区的组合文库。获得了轻链可变区组合文库中亲和力最高的前5个克隆，它们的轻链可变区氨基酸序列包含5种突变序列，如SEQ ID NO.22-26所示，其轻链可变区的CDR1具有SEQ ID NO.1、12任一所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.3、13、14、15、16任一所示的氨基酸序列。

在重链可变区组合文库中进行酶联筛选，获得了重链可变区组合文库中亲和力最高的前3个克隆的氨基酸序列，它们的重链可变区的氨基酸序列包含了3种突变序列，分别如序列SEQ ID NO.19-21所示，其重链可变区的CDR1具有SEQ ID NO.7、8、9任一所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO. 10所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO. 11所示的氨基酸序列。

分别将上述轻重链可变区亲和力最高的前5个克隆的DNA混合，以酶切、链接的重组方式组装成最终的单链抗体组合文库。对这个文库进行筛选，挑取信号最高的前10位，分析其DNA序列，得到四株不同的单链抗体克隆，对应的氨基酸序列如SEQ ID NO.37-40所示。

为了检验获得的突变体的亲和力是否得到了提高，分别表达并纯化B10亲本抗体以及最后获得的4个突变体B10.3、B10.4、B10.5、B10.9（氨基酸序列分别如SEQ ID NO.37-40所示）与Fc的融合蛋白（即scFv-Fc）。纯化产物在两株不同表达水平的BCMA阳性细胞系H929和RPMI8226上进行流式细胞仪检测。它们与H929细胞结合百分率分别是：亲本B10为75.31%，

突变体B10.3提高到97.96%，突变体B10.4提高到97.89%，突变体B10.5提高到97.17%，突变体B10.9提高到91.61%；与RPMI8226细胞结合百分率分别是：亲本B10为5.54%，突变体B10.3提高到54.89%，突变体B10.4提高到57.51%，突变体B10.5提高到58.18%，突变体B10.9提高到42.89%。结果表明所有四个突变体对BCMA的结合相比于B10均有显著的提高（见图3）。

为了了解获得B10及其衍生抗体的亲和力，将B10亲本抗体以及最后获得的4个突变体与已知亲和力的BCMA抗体J6（即克隆J6M0，根据专利[WO2012163805A1]记录，其亲和力约为0.2nM）分别通过ELISA进行比较实验。不同浓度的抗体包被酶联板后，按步骤加入生物素化的BCMA抗原，链亲和素偶联的辣根过氧化物酶（HRP）和显色底物。获得其信号-抗体梯度曲线见图4的A，相对亲和力改变倍数见表3。

表3 ELISA 检测 B10 及其亲和力成熟突变体对 BCMA 的结合

Ab	J6	B10	B10.3	B10.4	B10.5	B10.9
EC50	26.54	n/a	34.3	41.12	35.78	37.94
Fold of J6	1.00	n/a	1.29	1.55	1.35	1.43
nM	0.20	n/a	0.26	0.31	0.27	0.29

结果表明，就内在亲和力而言，由于亲本B10对人BCMA的结合显著弱于J6，S行曲线未能获得，故其亲和力数值无法产生。其它，B10.3亲和力约为0.26 nM, B10.4亲和力约为0.31nM, B10.5亲和力约为0.27nM, B10.9亲和力约为0.29 nM。

为了了解获得这些抗体对细胞表面的BCMA的表现亲和力，将B10亲本抗体以及最后获得的4个突变体与J6分别通过与表达BCMA的细胞系RPMI8226结合的流式细胞术进行比较实验（见图4的B，表4）。结果表明，在细胞水平上，亲本B10的EC50比J6（EC50为2.741 μg/ml）提高约1.5倍，为1.575 μg/ml。B10.3、B10.4、B10.5以及B10.9的EC50分别是0.02822 μg/ml、0.03429 μg/ml、0.04063 μg/ml及0.04514 μg/ml。相对于J6，这些亲和力提高的突变体的EC50提高倍数分别为97.13、79.94、67.46及60.72。

表4 FACS检测B10及其亲和力成熟突变体对RPMI8226细胞系的结合

抗体	B10.3	B10.4	B10.5	B10.9	J6	B10
EC50（μg/ml）	0.02822	0.03429	0.04063	0.04514	2.741	1.575
相对于 J6 提高倍数	97.13	79.94	67.46	60.72	1	0.57

实施例4 BCMA×CD3双特异性抗体设计

本实施例以肿瘤细胞表面抗原BCMA和免疫细胞表面抗原CD3作为靶点，设计双特异性抗体。

结合蛋白质结构设计软件和大量的人工实验筛选，本发明在多种结合BCMA和CD3的双特异性抗体结构中筛选确定了包括单链抗体单元和单克隆抗体单元的具有对称结构的双特异性抗体结构。本发明将这种技术平台称之为FIST（fusion of IgG and scFv technology）。例如，抗-BCMA单克隆抗体单元可以作为IgG抗体，包括2个完整的轻链-重链对（即含有完整的Fab和Fc结构域，重链和轻链之间通过二硫键连接），抗-CD3可以作为单链抗体单元，包括2个单链抗体（ScFv）。单链抗体和单克隆抗体之间采用连接肽（SEQ ID NO.30）连接，对于单链抗体和单克隆抗体的连接方式，设计下述连接方式，由此获得对称结构的双特异性抗体（图5）：

将单链抗体的C端与单克隆抗体的重链可变区(VH)N端通过连接,得到nFIST(图5的A)。单链抗体也可与IgG-Fc的C端通过连接肽融合,得到cFIST(图5的B)。

本实施例中,抗-CD3单链抗体UCHT1的可变区序列来自文献(Beverley, P. C. & Callard, R. E. Distinctive functional characteristics of human "T" lymphocytes defined by E rosetting or a monoclonal anti-T cell antibody (1981) Eur. J. Immunol. 11, 329-334)并经人源化改造(Shalaby et.al., Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene.(1992) J Exp Med. Jan 1;175(1):217-25)。由此构建的单链抗体命名为K3(SEQ ID NO.31),包含了分别安插在重链可变区和轻链可变区里面的两个半胱氨酸(Cys),在折叠之后形成一对链间二硫键,其重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO.28所示,轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO.29所示。

实施例5 BCMA×CD3双特异性抗体的制备

根据实施例4中设计nFIST及cFIST形式的双特异性抗体编码基因并克隆至表达载体pG4HK,得到的2个双特异性抗体K3B10.3和B10.3K3。它们的重链氨基酸序列分别如SEQ ID NO.34和35所示(单克隆抗体的重链与单链抗体经连接肽连接形成的融合肽);轻链氨基酸序列如SEQ ID NO.33所示。将K3B10.3和B10.3K3对应的表达质粒分别稳定转染CHO-K1,表达制备双抗蛋白。

采用cFIST形式构建了更多的抗BCMA×CD3双特异性抗体。其中结合BCMA的IgG单元重链可变区来源于SEQ ID NO.17-21;结合BCMA的IgG单元的轻链可变区来源于SEQ ID NO.18、22、25-27。这些抗体的质粒转染293F细胞,以瞬时表达及protein-A一步纯化进行制备,获得B10K3(重链氨基酸序列如SEQ ID NO.41所示;轻链氨基酸序列如SEQ ID NO.42所示)、B10.3K3、B10.4K3(重链氨基酸序列如SEQ ID NO.43所示;轻链氨基酸序列如SEQ ID NO.44所示)、B10.5K3(重链氨基酸序列如SEQ ID NO.45所示;轻链氨基酸序列如SEQ ID NO.46所示)、B10.9K3(重链氨基酸序列如SEQ ID NO.47所示;轻链氨基酸序列如SEQ ID NO.48所示)双抗。SDS-PAGE纯度分析表明单体在90%以上。它们对BCMA抗原的结合检测见图9的A。

对于上述双特异性抗体,为获得高纯度的双特异性抗体,按照以下步骤进行。(1)料液预处理:发酵培养的上清液通过2000 rpm离心,10 min,然后用0.22μm滤膜过滤处理。(2)亲和层析:用Mabselect SuRe亲和层析柱(购自GE公司,货号18-5438-02)捕获经过预处理的发酵液中的抗体,用平衡缓冲液(10 mM PB, 0.1 M NaCl, pH7.0)充分平衡层析柱后,过亲和层析柱,用洗脱缓冲液(0.1 M柠檬酸, pH 3.0)洗脱。(3)阳离子交换层析:经亲和层析制备的样品,进一步通过分子筛交换层析纯化,缓冲液(50 mM PBS, 0.2 M Na₂SO₄, pH 6.7)。

K3B10.3和B10.3K3进行SDS-PAGE和HPLC-SEC检测,SDS-PAGE的结果如图6所示。其中,K3B10.3的还原SDS-PAGE电泳检测结果如图6的A所示,非还原SDS-PAGE电泳检测结果如图6的B所示;B10.3K3的还原SDS-PAGE电泳检测结果如图6的C所示,非还原SDS-PAGE电泳检测结果如图6的D所示。HPLC-SEC检测结果如图7所示。其中,K3B10.3的SEC检测结果如图7的A所示,B10.3K3的SEC检测结果如图7的B所示。检测结果表明,经表达和纯化成功制备得到了双特异性抗体K3B10.3和B10.3K3,经纯化后的双特异性抗体的单体纯度在95%以上。

实施例6 流式分析法检测双特异性抗体与T细胞的结合活性

收集健康人供体PBMC细胞并纯化T细胞,按 1×10^6 细胞/反应管重悬于PBS中,以1 ml 结

合缓冲液(含有0.5% w/v BSA+2 mM EDTA的PBS)漂洗细胞一次,离心(350 ×g, 4°C, 5 min),后用200 μl 结合缓冲液重悬细胞。分别加入双特异抗体K3B10.3和B10.3K3至5 μg/ml,冰上孵育45 min。如上漂洗细胞一次后用100 μl结合缓冲液重悬细胞。样品管加入5μl荧光标记二抗抗体(PE anti-human IgG Fc Antibody, Biolegend, 409304),同型对照管加入同型对照(PE Mouse IgG2a, κ Isotype Ctrl (FC) Antibody, Biolegend, 400213),冰上避光孵育15 min。如上漂洗细胞一次。用200 μl PBS重悬细胞后,上机(Beckman)检测。

流式细胞检测K3B10.3和B10.3K3对人T细胞的结合结果如图8所示,其中,对照的检测结果如图8的A, K3B10.3结合T细胞的检测结果如图8的B所示, B10.3K3结合T细胞的检测结果如图8的C所示。结果表明,双特异抗体K3B10.3和B10.3K3均能够特异性结合T细胞,即双特异抗体融合蛋白保留了单链抗体Anti-CD3的结合功能。

为检测抗BCMA单元对BCMA的结合,将此实验中的T细胞换成RPMI8226(ATCC® CCL-155)进行类似的FACS实验,对照的检测结果如图8的D所示, K3B10.3和B10.3K3的检测结果见图8的E、F。

实施例7 双特异性抗体介导的体外细胞杀伤效率检测

本实施例以分别以H929-luc和RPMI8226-Luc为靶细胞,以PBMC为免疫效应细胞,检测双特异性抗体B10K3、B10.3K3、B10.4K3、B10.5K3、B10.9K3以及K3B10.3介导的靶细胞的杀伤作用。具体实验步骤如下:

1)、靶细胞准备:培养H929-luc和RPMI8226-Luc(荧光素酶标记的H929和RPMI8226细胞,本实验室制备)细胞,靶细胞吹匀后计数,1000 rpm,离心5 min, PBS洗涤一次。靶细胞离心洗涤后用GT-T551培养基调整密度为 $0.2 \times 10^6/\text{ml}$,每孔加入50 μl,则每孔中细胞为10000个。

2)、PBMC准备:以PBMC为效应细胞。将冻存在液氮罐中的PBMC取出(参考细胞冻存与复苏)解冻,加入含有PBS或GT-T551培养基的15 ml离心管中,1000 rpm,离心5 min,用PBS或GT-T551培养基洗涤两次,计细胞数、活度与密度,并调整活细胞密度为 $2 \times 10^6/\text{ml}$,每孔加入50 μl,则每孔中细胞为100000个。

3)、抗体稀释:采用GT-T551培养基分别稀释双特异性B10K3、B10.3K3、B10.4K3、B10.5K3、B10.9K3以及K3B10.3和B10.3K3,将抗体起始浓度调整到10 nM。依次以1:5的比例稀释。将稀释好的抗体取100μl加入上述准备的细胞中,混匀,将96孔板放回培养箱,18小时后检测杀伤效果。

4)、检测:由于H929或RPMI8226靶细胞携带Luciferase基因,故采用LUMINEX方法检测靶细胞杀伤效率。

以Steady-GLO(Promega公司)为底物,将试剂盒中的缓冲液解冻融化后加入底物粉末中,混匀,分装为每支5 ml或10 ml,完成Steady-GLO底物重建。将共培养的细胞吹匀后取100 μl转移到不透明白板中,再加入100 μl重建的Steady-GLO底物,轻拍混匀,放置5 min后读板,检测仪器为Synergy HT。

5)、数据处理:靶细胞杀伤比例的计算公式如下:

靶细胞杀伤比例(百分数) = $100 \times (\text{只有靶细胞孔数值} - \text{检测孔数值}) / \text{只有靶细胞孔数值}$

将所有检测孔的靶细胞杀伤比例对应的抗体浓度转变为log10,以此作为横坐标,以杀伤比例作为纵坐标制作曲线图。cFIST形式的双抗B10K3、B10.3K3、B10.4K3、B10.5K3、B10.9K3

对敏感细胞株RPMI8226的杀伤浓度-梯度曲线如图9的B所示；各梯度杀伤百分数如表5所示。

5 K3B10.3和B10.3K3的结果如图10所示；它们对RPMI8226的杀伤百分数如表6所示。它们对H929的杀伤百分数如表7所示。结果表明，双特异抗体B10.3K3均能够有效地介导PBMC杀伤肿瘤细胞系H929或RPMI8226，B10.3K3单个分子都同时具有抗BCMA和抗CD3单克隆抗体的生物学功能。K3B10.3介导杀伤靶细胞RPMI8226的效力显著弱于B10.3K3，尤其在H929细胞上几乎没有表现出杀伤效果。B10.9K3、B10.5K3、B10.4K3、B10.3K3、B10K3介导的靶细胞杀伤的EC50依次为8.759pM、12.87pM、7.839pM、5.833pM、281.7pM。

表5 不同剂量的双特异性抗体介导的靶细胞杀伤RPMI8226的靶细胞杀伤比例

nM	B10.9K3		B10.5K3		B10.4K3		B10.3K3		B10K3	
0.1	60.77	77.35	58.20	67.98	69.81	67.41	81.10	86.51	31.27	42.02
0.025	66.27	64.55	51.07	49.06	64.78	49.36	78.84	76.85	25.86	22.70
6.3E-03	29.95	34.52	19.11	14.87	38.00	27.48	49.61	44.83	17.23	16.54
1.6E-03	8.96	27.99	6.96	0.38	5.35	9.98	7.65	32.26	11.37	30.92
3.9 E-04	9.02	4.55	-3.91	-21.11	-34.55	7.37	-7.61	13.98	-2.14	19.17
9.8E-05	16.80	17.22	2.67	4.17	-1.28	24.16	12.50	12.63	9.71	21.37
2.4E-05	17.22	24.38	8.43	8.44	-13.27	-7.27	11.57	-0.91	11.12	9.26

10 表6 不同剂量的双特异性抗体K3B10.3和B10.3K3介导的靶细胞杀伤RPMI8226的靶细胞杀伤比例

nM	B10.3K3		K3B10.3	
0.25	94.65	92.04	45.57	56.19
6.25E-2	92.31	89.86	32.15	24.14
1.6E-2	85.84	82.86	5.09	9.70
3.9E-3	68.89	64.42	-4.47	8.82
9.8E-4	21.16	32.04	2.84	8.87
2.4E-4	-7.47	0.18	-3.36	8.32
6.1E-05	7.71	3.14	-7.30	0.84

表7 不同剂量的双特异性抗体K3B10.3和B10.3K3介导的靶细胞杀伤H929的靶细胞杀伤比例

nM	B10.3K3			K3B10.3		
0.25	94.84	95.57	95.57	-4.98	2.87	-4.89
6.25E-2	91.26	93.06	93.06	-15.44	4.71	-4.70
1.6E-2	80.60	79.11	79.11	-11.72	1.69	-2.78
3.9E-3	36.72	42.99	42.99	-0.38	3.37	-15.90
9.8E-4	7.81	13.06	13.06	-3.36	7.51	-20.43
2.4E-4	13.01	24.53	24.53	-3.62	7.39	2.87
6.1E-05	4.25	9.32	9.32	2.85	13.07	-1.53

以上表5、表6、表7中，各双特异性抗体的两列数值为两个重复实验（duplicate）的结果。

虽然，上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述，但在本发明基础上，可以对之作一些修改或改进，这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此，在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进，均属于本发明要求保护的范围。

工业实用性

本发明涉及结合BCMA和CD3的双特异性抗体及其制备方法与应用。本发明提供一种能够同时结合BCMA和CD3、具有特异的靶向作用、能够高效激发导向性免疫反应的双特异性抗体。该双特异性抗体很好地保留了抗CD3抗体和抗BCMA抗体的生物学功能，实现了一个双特异性抗体分子同时具有优异的BCMA和CD3靶向结合的生物学功能，能够在肿瘤细胞和免疫效应细胞之间搭建桥梁，有效激活免疫效应细胞和导向性免疫反应，显著增强了免疫细胞杀伤肿瘤细胞的功效，具有较高的靶细胞杀伤效率，同时最大程度地降低了ADCC效应，具有较高的安全性，在肿瘤的免疫治疗中具有较好的应用前景。

权 利 要 求 书

1. 结合BCMA和CD3的双特异性抗体，其特征在于，其包括：

第一结构域，结合B细胞成熟抗原BCMA，

以及，第二结构域，结合T细胞表面抗原CD3，

5 所述第一结构域和所述第二结构域之间通过连接肽连接，

所述第一结构域包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区的CDR1、CDR2、CDR3分别具有SEQ ID NO.4-6所示的氨基酸序列，或者，其分别具有以SEQ ID NO.4-6所示的氨基酸序列为参考序列、含有如下突变中的一种或多种突变的组合的氨基酸序列：

(1) SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列的第1位S突变为P或K；

10 (2) SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列的第2位Y突变为H、D、G、M或S；

(3) SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列的第3位A突变为N；

(4) SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列的第5位S突变为H、N、A或M；

(5) SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列的第1位G突变为V或T；

(6) SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列的第3位I突变为H；

15 (7) SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列的第4位I突变为D或A；

(8) SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列的第5位F突变为H；

(9) SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列的第7位T突变为K；

(10) SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列的第4位F突变为L；

20 所述轻链可变区的CDR1、CDR2和CDR3分别具有SEQ ID NO.1-3所示的氨基酸序列，或者，其分别具有以SEQ ID NO.1-3所示的氨基酸序列为参考序列，含有如下突变中的一种或多种突变的组合的氨基酸序列：

(1) SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的第5位S突变为N、R或T；

(2) SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列的第7位L突变为Q、V或A；

(3) SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列的第8位I突变为S、A、R或P；

25 (4) SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列的第10位Y突变为M、L、W或T；

(5) SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列的第11位V突变为L或Q。

2. 结合BCMA和CD3的双特异性抗体，其特征在于，包括：

第一结构域，结合B细胞成熟抗原BCMA，

以及，第二结构域，结合T细胞表面抗原CD3，

30 所述第一结构域和所述第二结构域之间通过连接肽连接，

所述第一结构域包括重链可变区和轻链可变区，所述第一结构域的重链可变区的CDR1具有SEQ ID NO.4、7、8、9任一所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.5、10任一所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.6、11任一所示的氨基酸序列；

35 轻链可变区的CDR1具有SEQ ID NO.1、12任一所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.3、13、14、15、16任一所示的氨基酸序列；

优选地，所述第一结构域的重链可变区的CDR为如下任一种：

(1) CDR1具有SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.5所示的氨基酸序

列，CDR3具有SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列；

(2) CDR1具有SEQ ID NO.7所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列；

5 (3) CDR1具有SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列；

(4) CDR1具有SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列；

轻链可变区的CDR为如下任一种：

10 (1) CDR1具有SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列；

(2) CDR1具有SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.13所示的氨基酸序列；

(3) CDR1具有SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.14所示的氨基酸序列；

15 (4) CDR1具有SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.15所示的氨基酸序列；

(5) CDR1具有SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.16所示的氨基酸序列；

更优选地，所述第一结构域的重链可变区的CDR和轻链可变区的CDR为如下任一种：

20 (1) 重链可变区的CDR1具有SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.5所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列；轻链可变区的CDR1具有SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列；

25 (2) 重链可变区的CDR1具有SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列；轻链可变区的CDR1具有SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.13所示的氨基酸序列；

30 (3) 重链可变区的CDR1具有SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列；轻链可变区的CDR1具有SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列；

35 (4) 重链可变区的CDR1具有SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列；轻链可变区的CDR1具有SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列，CDR2具有SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列，CDR3具有SEQ ID NO.16所示的氨基酸序列。

3. 根据权利要求2所述的结合BCMA和CD3的双特异性抗体，其特征在于，所述第一结构域的重链可变区具有SEQ ID NO.17、19-21任一所示的氨基酸序列，轻链可变区具有SEQ ID NO.18、22-27任一所示的氨基酸序列；

或者,所述重链可变区、轻链可变区与前述序列相比具有满足以下二者中至少一个: a) 结合相同抗原表位; b) 序列同一性大于70%、80%、85%、90%、97%、98%或99%的氨基酸序列;

5 优选地,所述第一结构域的重链可变区具有SEQ ID NO.17所示的氨基酸序列,轻链可变区具有SEQ ID NO.18所示的氨基酸序列;

或者,所述第一结构域的重链可变区具有SEQ ID NO.20所示的氨基酸序列,轻链可变区具有SEQ ID NO.22所示的氨基酸序列;

或者,所述第一结构域的重链可变区具有SEQ ID NO.19所示的氨基酸序列,轻链可变区具有SEQ ID NO.27所示的氨基酸序列;

10 或者,所述第一结构域的重链可变区具有SEQ ID NO.21所示的氨基酸序列,轻链可变区具有SEQ ID NO.25所示的氨基酸序列;

或者,所述第一结构域的重链可变区具有SEQ ID NO.20所示的氨基酸序列,轻链可变区具有SEQ ID NO.26所示的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1~3任一项所述的结合BCMA和CD3的双特异性抗体,其特征在于,所述
15 第一结构域为2个通过二硫键连接的完整的轻链-重链对;

优选地,所述重链的Fc片段为人或人源化抗体的Fc片段,所述人或人源化抗体为IgG1、IgG2、IgA、IgE、IgM、IgG4或IgD。

5. 根据权利要求1~4任一项所述的结合BCMA和CD3的双特异性抗体,其特征在于,所述
20 第一结构域的重链具有SEQ ID NO.32所示的氨基酸序列,轻链具有SEQ ID NO.33所示的氨基酸序列,

或者,重链具有SEQ ID NO.49所示的氨基酸序列,轻链具有SEQ ID NO.42所示的氨基酸序列,

或者,重链具有SEQ ID NO.50所示的氨基酸序列,轻链具有SEQ ID NO.44所示的氨基酸序列,

25 或者,重链具有SEQ ID NO.51所示的氨基酸序列,轻链具有SEQ ID NO.46所示的氨基酸序列,

或者,重链具有SEQ ID NO.52所示的氨基酸序列,轻链具有SEQ ID NO.48所示的氨基酸序列,

30 或者,所述重链、轻链与前述序列相比具有满足以下二者中至少一个: a) 结合相同抗原表位; b) 序列同一性大于70%、80%、85%、90%、97%、98%或99%的氨基酸序列。

6. 根据权利要求1~5任一项所述的结合BCMA和CD3的双特异性抗体,其特征在于,所述第二结构域的重链可变区具有SEQ ID NO.28所示的氨基酸序列,轻链可变区具有SEQ ID NO.29所示的氨基酸序列;

35 优选地,所述第二结构域的轻链可变区和重链可变区通过连接肽连接为单链抗体,所述单链抗体具有SEQ ID NO.31所示的氨基酸序列。

7. 根据权利要求1~6任一项所述的结合BCMA和CD3的双特异性抗体,其特征在于,所述第二结构域包含2个单链抗体,所述双特异性抗体为通过如下任意一种方式连接而成的对称结构:

(1)所述第二结构域的2个单链抗体的C端分别通过连接肽与所述第一结构域的2条重链的N端连接;

(2)所述第二结构域的2个单链抗体的N端分别通过连接肽与所述第一结构域的2条重链的C端连接;

5 优选地,所述连接肽的氨基酸序列为(GGGGX)_n,其中,X为Gly或Ser,n为1-4的自然数;

更优选地,所述连接肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.30所示。

8. 根据权利要求1~7任一项所述的结合BCMA和CD3的双特异性抗体,其特征在于,所述
10 第一结构域的重链与所述第二结构域经连接肽连接后具有SEQ ID NO.34或35所示的氨基酸序列,轻链具有SEQ ID NO.33所示的氨基酸序列,

或者,所述第一结构域的重链与所述第二结构域经连接肽连接后具有SEQ ID NO.41所示的氨基酸序列,轻链具有SEQ ID NO.42所示的氨基酸序列,

或者,所述第一结构域的重链与所述第二结构域经连接肽连接后具有SEQ ID NO.43所示的氨基酸序列,轻链具有如SEQ ID NO.44所示的氨基酸序列,

15 或者,所述第一结构域的重链与所述第二结构域经连接肽连接后具有SEQ ID NO.45所示的氨基酸序列,轻链具有SEQ ID NO.46所示的氨基酸序列,

或者,所述第一结构域的重链与所述第二结构域经连接肽连接后具有SEQ ID NO.47所示的氨基酸序列,轻链具有SEQ ID NO.48所示的氨基酸序列。

9. 编码权利要求1~8任一项所述的结合BCMA和CD3的双特异性抗体的核酸。

20 10. 含有权利要求9所述核酸的生物材料,所述生物材料包括重组DNA、表达盒、载体、宿主细胞、工程菌或细胞系。

11. 权利要求1~8任一项所述的结合BCMA和CD3的双特异性抗体的制备方法,其特征在于,包括:构建含有所述第一结构域和所述第二结构域的编码基因的表达载体;将所述表达载体导入宿主细胞,获得表达所述双特异性抗体的宿主细胞;培养宿主细胞,经分离纯化获得所
25 述双特异性抗体。

12. 权利要求1~8任一项所述的结合BCMA和CD3的双特异性抗体或权利要求9所述的核酸或权利要求10所述的生物材料的如下任一种应用:

(1)在制备用于诊断、预防或治疗BCMA表达的B细胞相关疾病的药物中的应用;优选所述BCMA表达的B细胞相关疾病包括B细胞相关肿瘤、B细胞引起的自身免疫病;

30 (2)在制备用于诊断、预防或治疗以BCMA为靶标的疾病的药物中的应用;

(3)在制备用于杀伤BCMA表达的细胞的药物中的应用;

(4)在制备BCMA和/或CD3的检测试剂中的应用;

(5)在制备适用于CAR-T疗法的相关试剂中的应用。

13. 包含权利要求1~8任一项所述的结合BCMA和CD3的双特异性抗体的多特异性抗体、融合
35 蛋白、免疫毒素、药物或检测试剂。

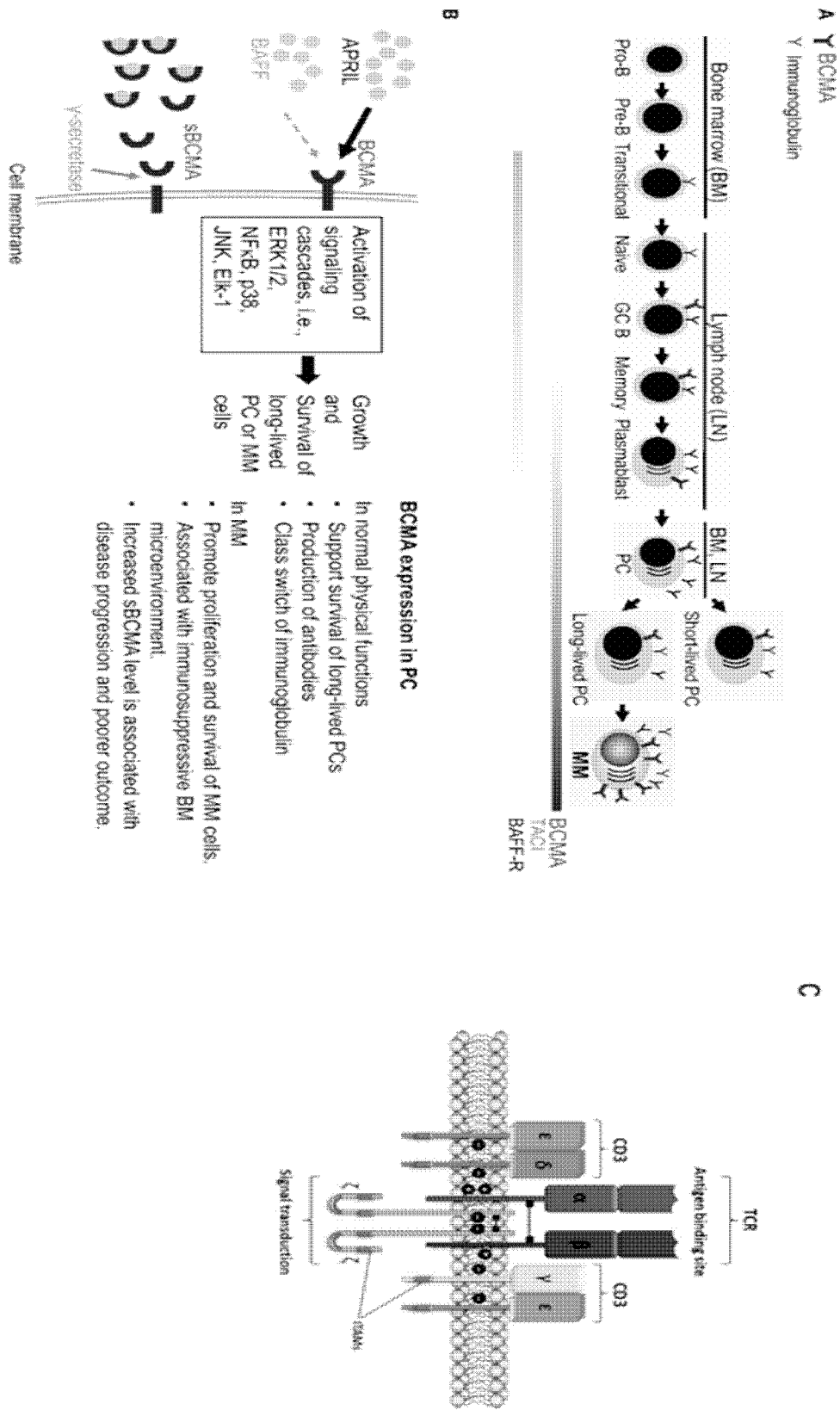
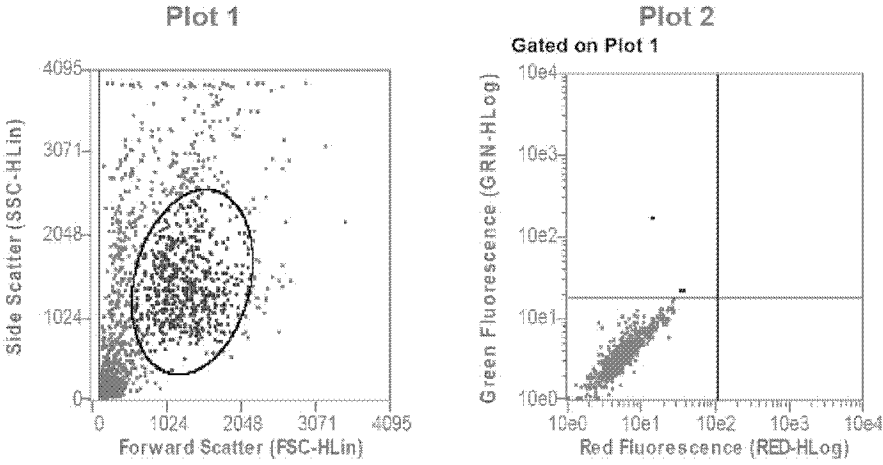
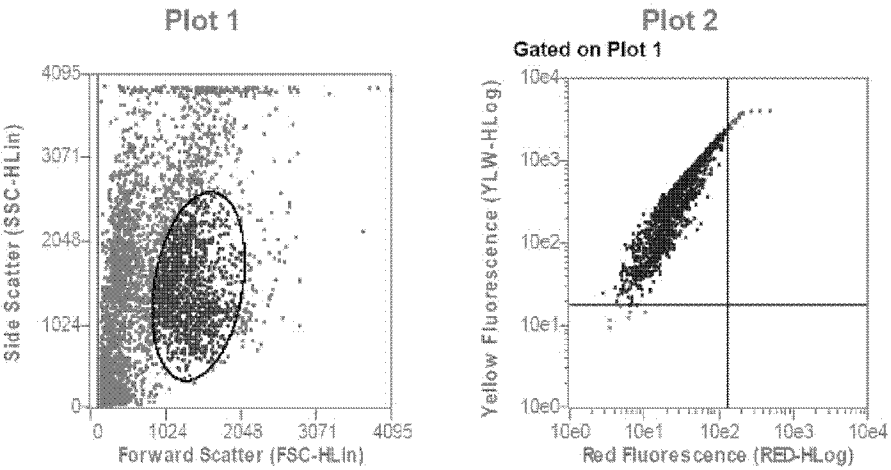


图 1

NC



PC



B10

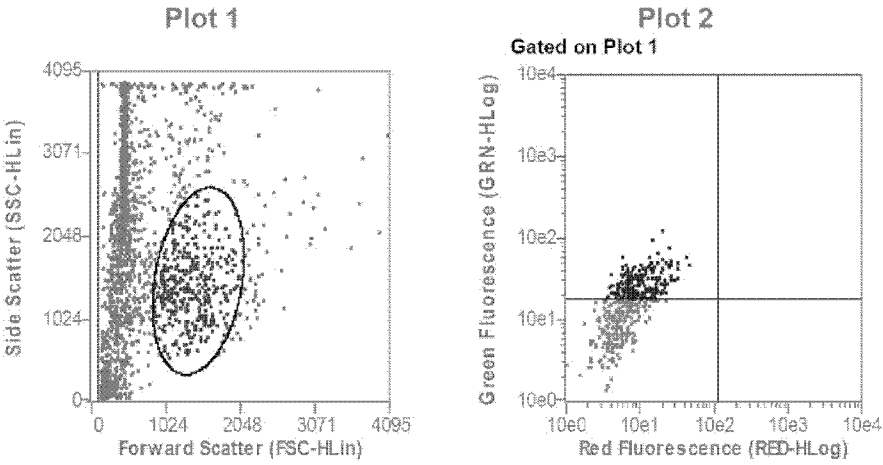


图 2

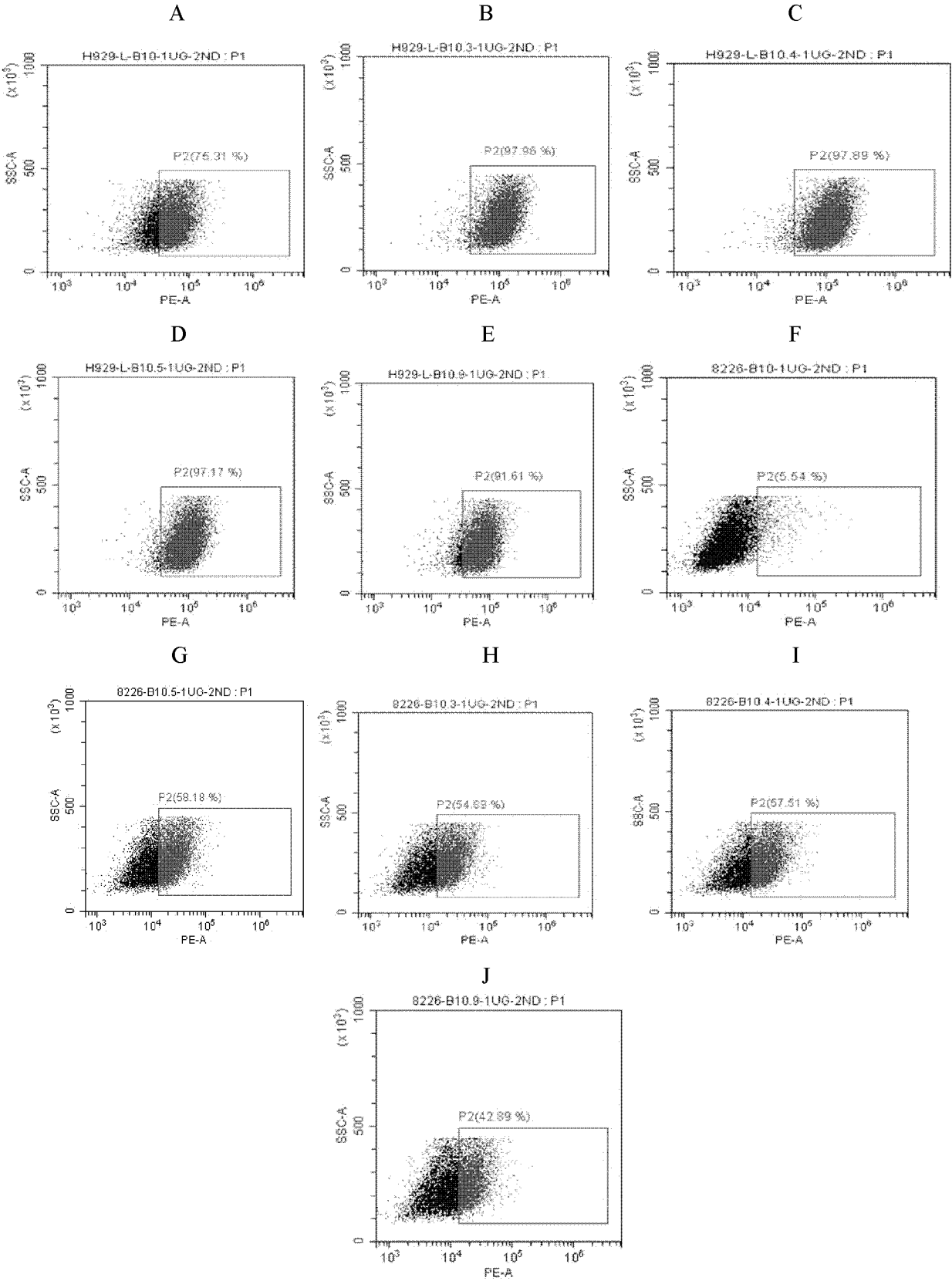


图 3

5

10

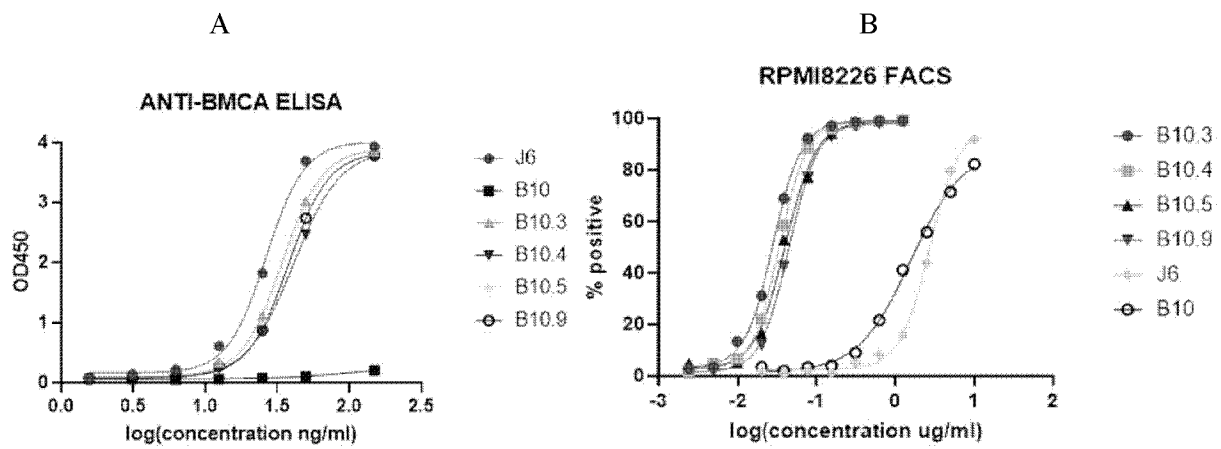


图 4

5

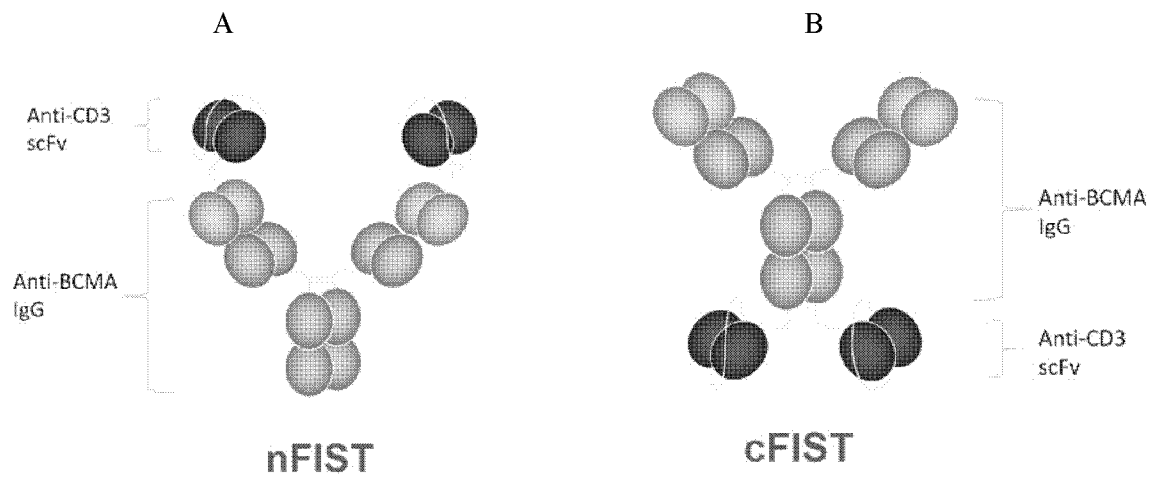


图 5

10

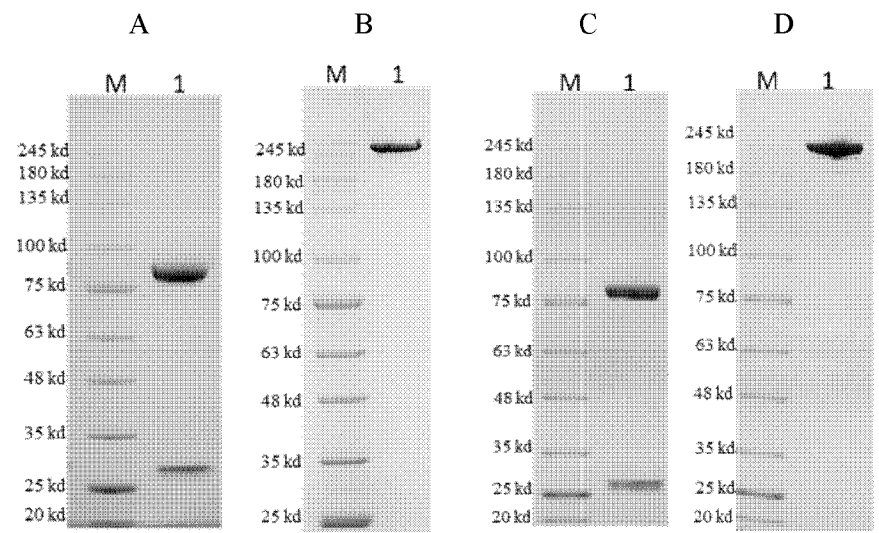


图 6

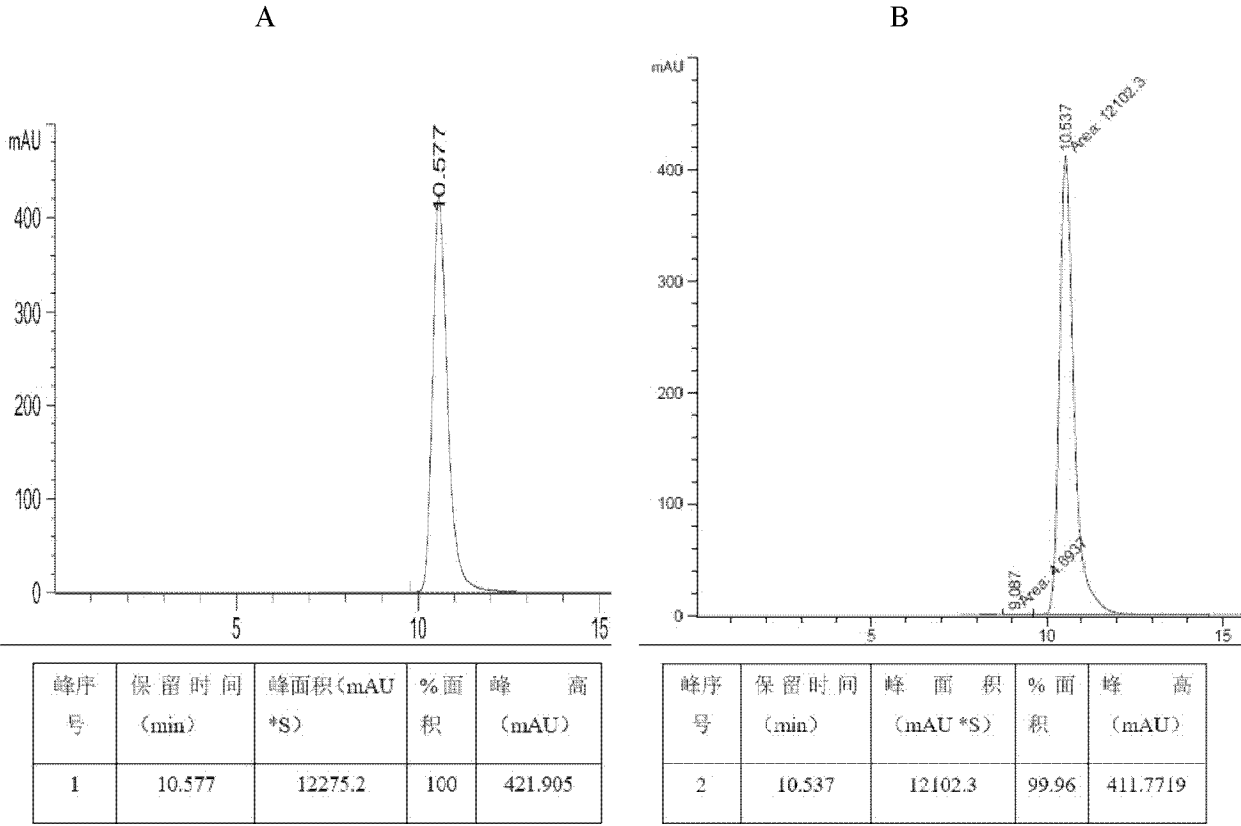


图 7

5

10

15

20

25

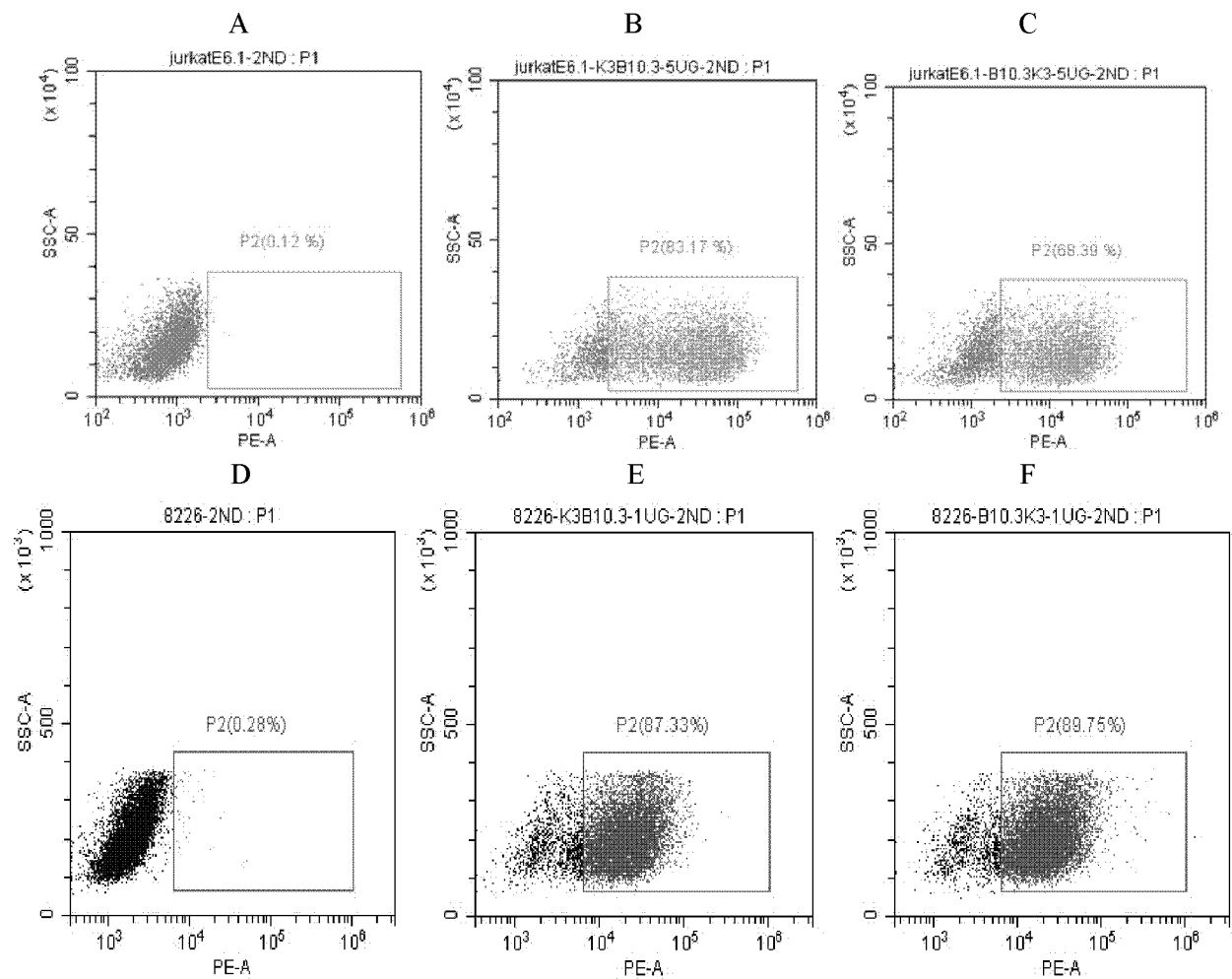
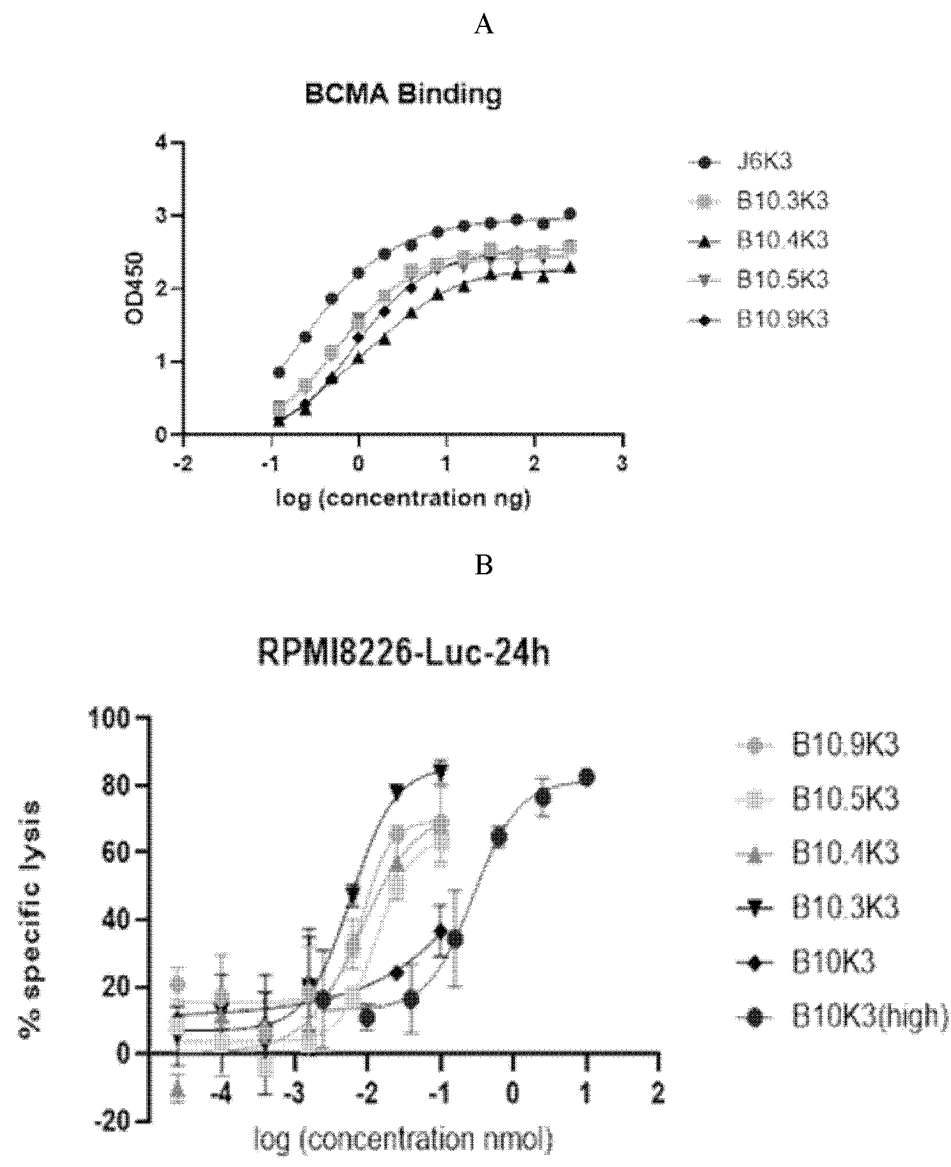


图 8



	B10.9K3	B10.5K3	B10.4K3	B10.3K3	B10K3	B10(high)K3
EC50, pM	8.759	12.87	7.839	5.833	N/A	281.7

图 9

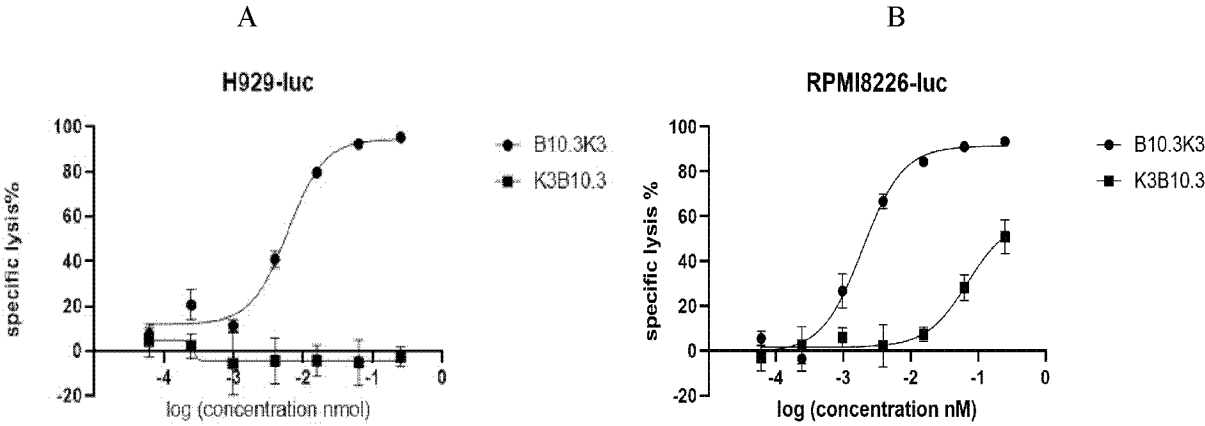


图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/090931

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/46(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; A61P; C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNTXT; ENTXT; DWPI; VEN; CJFD; BING; STN; NCBI; 百度学术, BAIDU SCHOLAR; 万方, WANFANG; 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System; WOTXT; USTXT; EPTXT; CD3, BCMA, CD269, TNFRSF17, bispecific, antibody, 双特异, SEQ ID Nos: 1-52

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2021063349 A1 (HARBOUR BIOMED (SUZHOU) CO., LTD.) 08 April 2021 (2021-04-08) entire document	1-13
A	WO 2020186974 A1 (EXCYTE (BEIJING) PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY DEVELOPMENT CO., LTD.) 24 September 2020 (2020-09-24) entire document	1-13
A	CN 109843325 A (TENEIO, INC.) 04 June 2019 (2019-06-04) entire document	1-13
A	CN 110431151 A (TENEIO, INC.) 08 November 2019 (2019-11-08) entire document	1-13
A	DILILLO, D. J. et al. "A Bcmxcd3 Bispecific T Cell-engaging Antibody Demonstrates Robust Antitumor Efficacy Similar to That of anti-BCMA CAR T Cells." <i>Blood Advances</i> , Vol. 5, No. 5, 02 March 2021 (2021-03-02), pp. 1291-1304	1-13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 July 2022

Date of mailing of the international search report

27 July 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/090931**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CARACCIO, C. et al. "Bispecific Antibodies for Multiple Myeloma: A Review of Targets, Drugs, Clinical Trials, and Future Directions." <i>Frontiers in Immunology</i> , Vol. 11, 24 April 2020 (2020-04-24), article number 501, pages 1-25	1-13
PA	CN 113061185 A (EXCYTE (BEIJING) PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY DEVELOPMENT CO., LTD.) 02 July 2021 (2021-07-02) entire document	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/090931

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/090931

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2021063349	A1	08 April 2021	TW	202126693	A	16 July 2021
WO	2020186974	A1	24 September 2020	CN	109776683	A	21 May 2019
				US	2022002408	A1	06 January 2022
				EP	3882276	A1	22 September 2021
				JP	2022513383	A	07 February 2022
CN	109843325	A	04 June 2019	JP	2019536430	A	19 December 2019
				EC	SP19026304	A	30 June 2019
				CL	2019000643	A1	09 August 2019
				KR	20220032640	A	15 March 2022
				CO	2019003706	A2	28 June 2019
				PH	12019500545	A1	29 July 2019
				EP	3512549	A1	24 July 2019
				BR	112019004873	A2	11 June 2019
				RU	2022103374	A	02 March 2022
				US	2020048348	A1	13 February 2020
				RU	2019111037	A	15 October 2020
				CR	20190198	A	11 October 2019
				CA	3036550	A1	22 March 2018
				JP	2022061993	A	19 April 2022
				IL	265321	D0	30 May 2019
				WO	2018052503	A1	22 March 2018
				AU	2017327723	A1	02 May 2019
				AU	2022201278	A1	17 March 2022
				KR	20190052048	A	15 May 2019
				ZA	202203250	B	25 May 2022
				DO	P2019000059	A	16 June 2019
				JP	2022061992	A	19 April 2022
				PE	20190976	A1	09 July 2019
				US	2022025047	A1	27 January 2022
				IL	290517	D0	01 April 2022
				MX	2019002967	A	04 July 2019
CN	110431151	A	08 November 2019	IL	267485	D0	29 August 2019
				JP	2020505001	A	20 February 2020
				EP	3559035	A1	30 October 2019
				KR	20190117489	A	16 October 2019
				BR	112019012354	A2	26 November 2019
				CA	3047419	A1	28 June 2018
				US	2019352412	A1	21 November 2019
				AU	2017382251	A1	11 July 2019
				RU	2019122880	A	22 January 2021
				MX	2019007379	A	18 September 2019
				WO	2018119215	A1	28 June 2018
CN	113061185	A	02 July 2021	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/090931

A. 主题的分类 C07K 16/46(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K; A61P; C12N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNTXT;ENTXTC;DWPI;VEN;CJFD;BING;STN;NCBI;百度学术;万方;中国专利生物序列检索系统;WOTXT;USTXT;EPTXT:CD3, BCMA, CD269, TNFRSF17, bispecific, antibody, 双特异, SEQ ID Nos:1-52		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2021063349 A1 (和铂医药苏州有限公司) 2021年4月8日 (2021 - 04 - 08) 全文	1-13
A	WO 2020186974 A1 (益科思特北京医药科技发展有限公司) 2020年9月24日 (2020 - 09 - 24) 全文	1-13
A	CN 109843325 A (特尼奥生物股份有限公司) 2019年6月4日 (2019 - 06 - 04) 全文	1-13
A	CN 110431151 A (特尼奥生物股份有限公司) 2019年11月8日 (2019 - 11 - 08) 全文	1-13
A	DILILLO, D.J. 等. "A BCMAxCD3 bispecific T cell-engaging antibody demonstrates robust antitumor efficacy similar to that of anti-BCMA CAR T cells." Blood Advances., 第5卷, 第5期, 2021年3月2日 (2021 - 03 - 02), 第1291-1304页	1-13
A	CARACCIO, C. 等. "Bispecific Antibodies for Multiple Myeloma: A Review of Targets, Drugs, Clinical Trials, and Future Directions." Frontiers in Immunology., 第11卷, 2020年4月24日 (2020 - 04 - 24), 文章号501, 第1-25页	1-13
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2022年7月11日		2022年7月27日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		周茂新 电话号码 86-(10)-53961922

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
PA	CN 113061185 A (益科思特北京医药科技发展有限公司) 2021年7月2日 (2021 - 07 - 02) 全文	1-13

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列 (续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/090931

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2021063349	A1	2021年4月8日	TW	202126693	A	2021年7月16日
WO	2020186974	A1	2020年9月24日	CN	109776683	A	2019年5月21日
				US	2022002408	A1	2022年1月6日
				EP	3882276	A1	2021年9月22日
				JP	2022513383	A	2022年2月7日
CN	109843325	A	2019年6月4日	JP	2019536430	A	2019年12月19日
				EC	SP19026304	A	2019年6月30日
				CL	2019000643	A1	2019年8月9日
				KR	20220032640	A	2022年3月15日
				CO	2019003706	A2	2019年6月28日
				PH	12019500545	A1	2019年7月29日
				EP	3512549	A1	2019年7月24日
				BR	112019004873	A2	2019年6月11日
				RU	2022103374	A	2022年3月2日
				US	2020048348	A1	2020年2月13日
				RU	2019111037	A	2020年10月15日
				CR	20190198	A	2019年10月11日
				CA	3036550	A1	2018年3月22日
				JP	2022061993	A	2022年4月19日
				IL	265321	D0	2019年5月30日
				WO	2018052503	A1	2018年3月22日
				AU	2017327723	A1	2019年5月2日
				AU	2022201278	A1	2022年3月17日
				KR	20190052048	A	2019年5月15日
				ZA	202203250	B	2022年5月25日
				DO	P2019000059	A	2019年6月16日
				JP	2022061992	A	2022年4月19日
				PE	20190976	A1	2019年7月9日
				US	2022025047	A1	2022年1月27日
				IL	290517	D0	2022年4月1日
				MX	2019002967	A	2019年7月4日
CN	110431151	A	2019年11月8日	IL	267485	D0	2019年8月29日
				JP	2020505001	A	2020年2月20日
				EP	3559035	A1	2019年10月30日
				KR	20190117489	A	2019年10月16日
				BR	112019012354	A2	2019年11月26日
				CA	3047419	A1	2018年6月28日
				US	2019352412	A1	2019年11月21日
				AU	2017382251	A1	2019年7月11日
				RU	2019122880	A	2021年1月22日
				MX	2019007379	A	2019年9月18日
				WO	2018119215	A1	2018年6月28日
CN	113061185	A	2021年7月2日	无			