

(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
2020年5月7日 (07.05.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/088164 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/108057

(22) 国际申请日: 2019年9月26日 (26.09.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201811294887.4 2018年11月1日 (01.11.2018) CN

(71) 申请人: 山东新时代药业有限公司
(SHANDONG NEWTIME PHARMACEUTICAL CO., LTD) [CN/CN]; 中国山东省临沂市费县北外环路1号, Shandong 273400 (CN)。

(72) 发明人: 李强(LI, Qiang); 中国上海市浦东新区紫萍路908弄3号, Shanghai 201318 (CN)。 贾世香(JIA, Shixiang); 中国上海市浦东新区紫萍路908弄3号, Shanghai 201318 (CN)。 赵丽丽(ZHAO, Lili); 中国山东省临沂市费县北外环路1号, Shandong 273400 (CN)。 张贵民(ZHANG, Guimin); 中国山东省临沂市费县北外环路1号, Shandong 273400 (CN)。 马心鲁(MA, Xinlu); 中国上海市浦东新区紫萍路908弄3号, Shanghai 201318 (CN)。 严源(YAN, Yuan); 中国上海市浦东新区紫萍路908弄3号, Shanghai 201318 (CN)。 李振宇(LI, Zhenyu); 中国山东省临沂市费县北外环路1号, Shandong 273400 (CN)。 胡兴霞(HU, Xingxia); 中国山东省临沂市费县北外环路1号, Shandong 273400 (CN)。 张玉华(ZHANG, Yuhua); 中国上海市浦东新区紫萍路908弄3号, Shanghai 201318

(CN)。 李斌(LI, Bin); 中国山东省临沂市费县北外环路1号, Shandong 273400 (CN)。

(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, IR, IS, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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))。

(54) Title: BISPECIFIC ANTIBODY AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 双特异性抗体及其用途

(57) Abstract: A bispecific antibody, which specifically binds the surface antigen CD3 of immune cells and the BCMA antigen on the surface of tumor cells and which may bind to human CD3 with high affinity, induce T cell proliferation, and mediate tumor cell killing effects. The bispecific antibody may be used to mediate the T cell-specific killing of target cells in in vitro tests. The method for constructing a bispecific antibody is simple, and avoids the possibility of mismatching between two sets of light chains and heavy chains of a heterologous bispecific antibody, thus the difficulty of antibody purification is reduced, the affinity of the obtained antibody is high, the side effects of induced cytokines are few, and safety is high.

(57) 摘要: 一种双特异性抗体, 特异性结合免疫细胞的表面抗原CD3和肿瘤细胞表面的BCMA抗原, 其能够以高亲和力与人CD3结合并诱导T细胞增殖, 介导肿瘤细胞杀伤作用。所述双特异性抗体在体外测试可用于介导T细胞特异杀伤靶细胞。该双特异性抗体构建方法简单, 避免了异源双特异性抗体两组轻链与重链错配的可能性, 从而降低了抗体纯化的难度, 得到的抗体亲和力高, 引起的细胞因子副作用小, 安全性高。



WO 2020/088164 A1

双特异性抗体及其用途

技术领域

本发明涉及免疫学领域，更具体地，涉及一种介导 T 细胞杀伤的抗 CD3 双特异性抗体，以及这类抗体的用途，特别是其在治疗癌症中的用途。

背景技术

多发性骨髓瘤是第二常见的血液系统恶性肿瘤，其骨髓中单克隆浆细胞的不受控制的增殖，导致单克隆免疫球蛋白和免疫抑制的过量产生，以及骨溶解和终末器官损伤。目前有两个单克隆抗体已批注临床使用，在过去十年，多发性骨髓瘤治疗方案已经显著提高了患者的存活率。尽管如此，现有的治疗方案仍未满足目前的治疗需求，特别是对于当前疗法具有抗性的复发/难治性患者。

B 细胞成熟抗原 (BCMA) 是一种高度浆细胞特异性抗原，在调节 B 细胞成熟和分化为浆细胞方面通过参与增殖诱导配体 (APRIL) 发挥重要作用。BCMA 表达限于 B 细胞谱系并且主要存在于浆细胞和浆母细胞上，并且在一定程度上存在于记忆 B 细胞上，但在外周和幼稚 B 细胞上实质上不存在，也未见在其他正常组织细胞中表达。BCMA 也在多发性骨髓瘤细胞上表达并参与白血病和淋巴瘤。连同其家族成员 TACI (跨膜活化剂和亲环素受体配体相互作用物) 和 BAFF-R (B 细胞活化因子受体)，BCMA 调节体液免疫、B 细胞发育和体内稳态的不同方面。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。小鼠中 BCMA 基因的靶向缺失导致骨髓中长寿浆细胞的数量显著减少，指示 BCMA 对其存活具有重要性。BCMA 过表达或通过多发性骨髓瘤细胞中的 BCMA 刺激 APRIL 可以直接上调关键免疫检查点分子，这可能有助于免疫抑制骨髓微环境。

在细胞免疫过程中，T 淋巴细胞扮演着重要的角色。T 细胞所介导的细胞免疫主要是通过 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR) 特异识别细胞表面由主要组织相容性复合物 (MHC) 所递呈的抗原肽，进而激活 T 细胞胞内信号，对该靶细胞进行特异杀伤。这对及时清除体内病变的细胞及预防肿瘤的发生起着至关重要的作用。由于多数癌细胞表面的 MHC 的表达下调甚至缺失，使得肿瘤细胞能够逃逸免疫杀伤，从而发生肿瘤。

T 细胞结合双特异性抗体 (T cell-engaging bispecific antibodies, TCBs) 代表了一种非常有效的将激活的细胞毒性 T 细胞重定向到肿瘤的方式。CD3 作为 T 细胞受体的一部分，表达于成熟 T 细胞，能够转导 TCR 识别抗原所产生的活化信号。TCBs 能够同时结合表面肿瘤抗原和 T 细胞受体的 CD3 ϵ 亚基，在 T 细胞和肿瘤细胞之间提供一个物理连接，从而有效的激活静止的 T 细胞杀伤肿瘤细胞，达到治疗肿瘤的效果 (Smits N C, Sentman C L, *Journal of Clinical Oncology*, 2016: JCO649970.)。因为 T 细胞双特异性旁路 TCR 抗原识别和 T 细胞活化的共刺激要求，它们消除了对肿瘤特异性免疫的需要，并克服了肿瘤微环境中 T 细胞面临的

许多障碍。

近年来，为了解决将两个不同的半抗体进行正确装配问题，科学家们设计开发了多种结构的双特异性抗体。总体归结起来有两大类，一类双特异性抗体不含 Fc 区，包括 BiTE、DART、TrandAbs、bi-Nanobody 等。这类结构双抗优点是分子量小，可以在原核细胞中表达，不需要考虑正确装配的问题；缺点是由于没有抗体 Fc 段，分子量较低，导致其半衰期较短，且这种形式的双抗极易聚合、稳定性差且表达量低，因而临床应用受到一定限制。另一类双特异性抗体保留 Fc 结构域，例如 Triomabs、kih IgG、Cross-mab、orthoFab IgG、DVD IgG、IgG scFv、scFv₂-Fc 等构型。此类双抗形成 IgG 样结构，分子结构较大，并且由 FcRn 介导的细胞内吞和再循环过程，使其具有更长的半衰期；同时保留了 Fc 介导的部分或全部效应子功能，如抗体依赖细胞介导细胞毒性（ADCC）、补体依赖细胞毒性（CDC）和抗体依赖细胞吞噬（ADCP）。然而这类双抗也不能完全杜绝错配产物的生成，而任何错配分子的残留级分都很难从产物中分离，并且这种方法需要针对两个抗体序列进行大量的突变等基因工程改造，无法达到简单、通用的目的。

因此，本发明旨在开发一种在产品半衰期、稳定性、安全性和可生产性方面具有改善性能的 BCMA 双特异性分子。

发明内容

本发明目的是提供一种靶向免疫效应细胞抗原 CD3 和肿瘤抗原 BCMA 的四价同源二聚体型双特异性抗体分子，这种双特异性抗体在体内能够显著抑制或杀伤肿瘤细胞，但对低表达 BCMA 的正常细胞的非特异性杀伤作用显著降低，同时增加由效应细胞过度活化所致的毒副作用的可控性，且其理化性质和体内稳定性都显著提高。

具体的，本发明的第一个方面，公开了一种双特异性抗体，所述双特异性抗体分子由两条相同的多肽链以共价键结合形成四价同源二聚体，每条多肽链从 N 端至 C 端依次包含特异性结合肿瘤抗原 BCMA 的第一单链 Fv、特异性结合效应细胞抗原 CD3 的第二单链 Fv 和 Fc 片段；其中，第一和第二单链 Fv 通过连接肽相连，而第二单链 Fv 与 Fc 片段直接相连或通过连接肽相连，且所述 Fc 片段不具有 CDC、ADCC 和 ADCP 等效应子功能。

其中，所述第一单链 Fv 包含 VH 结构域和 VL 结构域，并通过连接肽 L1 连接，且所述连接肽 L1 的氨基酸序列为 (GGGGX)_n，X 包含选自 Ser 或 Ala，n 为 1-5 的自然数；X 优选 Ser，n 优选 3。

本发明的一优选实施例中，所述连接肽 L1 的氨基酸序列为 (GGGGS)₃，在其他优选实施例方案中，所述连接肽 L1 的氨基酸序列还包括 (GGGGS)₁ 或 (GGGGS)₂ 或 (GGGGS)₄ 或 (GGGGS)₅ 或 (GGGGA)₁ 或 (GGGGA)₂ 或 (GGGGA)₃ 或 (GGGGA)₄ 或 (GGGGA)₅。

优选的，所述的第一单链 Fv 包含：

(1) VH 结构域, 其包含的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 分别如 SEQ ID NO: 1、2 和 3 所示, 或与上述序列至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高度相似的或具有一个或更多个氨基酸取代 (例如保守性取代) 的序列; 和

(2) VL 结构域, 其包含的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别如 SEQ ID NO: 4、5 和 6 所示, 或与上述序列至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高度相似的或具有一个或更多个氨基酸取代 (例如保守性取代) 的序列。

更优选的, 所述第一单链 Fv, 其包含:

(1) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH 结构域, 或与上述序列至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高度相似的或具有一个或更多个氨基酸取代 (例如保守性取代) 的序列; 和

(2) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示的 VL 结构域, 或与上述序列至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高度相似的或具有一个或更多个氨基酸取代 (例如保守性取代) 的序列。其中, 连接本发明所述第一单链 Fv 和第二单链 Fv 的连接肽 L2 由柔性肽和刚性肽组成。

进一步地, 所述柔性肽包含 2 个或更多个氨基酸, 并优选自下列几种氨基酸: Gly(G)、Ser(S)、Ala(A) 和 Thr(T)。更优地, 所述柔性肽包含 G 和 S 残基。最优地, 所述柔性肽的氨基酸组成结构通式为 $G_xS_y(GGGGS)_z$, 其中 x, y 和 z 是大于或等于 0 的整数, 且 $x+y+z \geq 1$ 。例如, 在一优选实施例中, 所述柔性肽的氨基酸序列为 $G_2(GGGGS)_3$ 。

进一步地, 所述刚性肽来自天然人绒毛膜促性腺激素 β 亚基羧基末端第 118 至 145 位氨基酸组成的全长序列 (如 SEQ ID NO: 9 所示) 或其截短的片段 (以下统称为 CTP)。优选地, CTP1 刚性肽包含 SEQ ID NO: 9 N 端的 10 个氨基酸, 即 SSSSKAPPPS; 或 CTP2 刚性肽包含 SEQ ID NO: 9 C 端的 14 个氨基酸, 即 SRLPGPSDTPILPQ; CTP3 刚性肽包含 SEQ ID NO: 9 N 端的 16 个氨基酸, 即 SSSSKAPPPSLPSPSR; CTP4 刚性肽包含 28 个氨基酸并开始于人绒毛膜促性腺激素 β 亚基的第 118 位, 终止于第 145 位, 即 SSSSKAPPPSLPSPSRRLPGPSDTPILPQ。

在本发明的一优选实施例中, 所述刚性肽为 SSSSKAPPPS, 即 CTP1 刚性肽。在其他优选实施方案中, 刚性肽序列还包括 CTP2 (SRLPGPSDTPILPQ)、CTP3 (SSSKAPPPSLPSPSR)、CTP4 (SSSKAPPPSLPSPSRRLPGPSDTPILPQ)。

在本发明的一优选实施例中, 所述连接肽 L2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示, 其柔性肽的氨基酸组成为 $G_2(GGGGS)_3$, 和其刚性肽的氨基酸组成为 SSSSKAPPPS, 即 CTP1 刚性肽。

其中, 双特异性抗体的第二单链 Fv 特异性结合 CD3, 在体外 FACS 结合分析测定中以大于 50nM, 或大于 100 nM, 或大于 300 nM, 或大于 500 nM 的 EC_{50} 值结合于效应细胞; 更优选地, 所述双特异性抗体的第二单链 Fv 不仅能与人 CD3 结合, 还可与食蟹猴或恒河猴的 CD3 特异性结合。在本发明的一优选实施例

中，所述双特异性抗体以 132.3 nM 的 EC₅₀ 值与效应细胞特异性结合。

优选地，所述第二单链 Fv 包含：

(1) VH 结构域，其包含的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 分别如 SEQ ID NO: 11、12 和 13 所示，或与上述序列至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高度相似的或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代）的序列；和

(2) VL 结构域，其包含的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别如 SEQ ID NO: 14、15 和 16 所示，或与上述序列至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高度相似的或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代）的序列。

更优选地，所述第二单链 Fv 包含氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示或与上述序列至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高度相似的或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代）的 VH 结构域；和

氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示或与上述序列至少 80%、85%、90%、92%、95%、97%、98%、99% 或更高度相似的或具有一个或更多个氨基酸取代（例如保守性取代）的 VL 结构域。

优选地，所述第二单链 Fv 的 VH 结构域和 VL 结构域通过连接肽 L3 连接，所述 VH、L3 和 VL 以 VH-L3-VL 或 VL-L3-VH 的顺序排列，且所述连接肽 L3 的氨基酸序列为 (GGGGX)_n，X 选自 Ser 或 Ala，n 为 1-5 的自然数；X 优选 Ser，n 优选 3。

本发明的一优选实施例中，所述连接肽 L3 的氨基酸序列为 (GGGGS)₃，在其他优选实施例方案中，所述连接肽 L3 的氨基酸序列还包括 (GGGGS)₁ 或 (GGGGS)₂ 或 (GGGGS)₄ 或 (GGGGS)₅ 或 (GGGGA)₁ 或 (GGGGA)₂ 或 (GGGGA)₃ 或 (GGGGA)₄ 或 (GGGGA)₅。

其中，本发明所述 Fc 片段直接或通过连接肽 L4 与第二单链 Fv 相连，且所述连接肽 L4 包含 1-20 个氨基酸，并优选自下列几种氨基酸：Gly(G)、Ser(S)、Ala(A)和 Thr(T)；较优地地，所述连接肽 L4 选自 Gly(G) 和 Ser(S)；更优选地，所述连接肽 L4 组成为 (GGGGS)_n，n=1, 2, 3 或 4。本发明的一优选实施例中，所述 Fc 片段与第二单链 Fv 直接相连。在其他优选实施例中，所述 Fc 片段通过连接肽 L4 与第二单链 Fv 相连，连接肽 L4 氨基酸序列包括 (GGGGS)₁ 或 (GGGGS)₂ 或 (GGGGS)₃ 或 (GGGGS)₄。

本发明所述 Fc 片段包含来源于人免疫球蛋白重链恒定区的铰链区、CH2 和 CH3 结构域，例如，在某些实施方案中，本发明所述 Fc 片段来源于例如选自人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD 和 IgE 的重链恒定区；特别地选自例如人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 的重链恒定区，更特别地选自人 IgG1 或 IgG4 的重链恒定区；并且，所述 Fc 片段与其所源自的天然序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加（例如，至多 20 个、至多 15 个、至多 10 个、或至多 5 个置换、缺失或添加）。

所述 Fc 片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示，它与其所源自的天然序列相比具有根据 EU 编号系

统确定的以下 6 个氨基酸的置换或取代：L234A/L235A/N297A/P331S/T250Q/M428L；且缺失或删除了根据 EU 编号系统确定的 K447。EU 编号系统来自网址：http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.htm。

在一些优选实施方案中，所述 Fc 片段被改变，例如被突变，以修饰本发明所述双特异性抗体分子的性质（例如改变下列中的一个或多个特性：Fc 受体结合、抗体糖基化、效应细胞功能或补体功能）。

例如，本发明提供的双特异性抗体包含具有改变的效应子功能（例如降低或消除）的氨基酸置换、缺失或添加的 Fc 变体。抗体的 Fc 区介导几种重要的效应子功能，例如 ADCC、ADCP、CDC 等。通过替换抗体的 Fc 区中的氨基酸残基，以改变抗体对效应子配体（如 Fc γ R 或补体 C1q）的亲合力，从而改变效应子功能的方法是本领域已知的（参见，例如 EP 388,151A1；US 564,8260；US 562,4821；Natsume A 等, *Cancer Res.*, 68: 3863-3872, 2008；Idusogie EE 等, *J. Immunol.*, 166: 2571-2575, 2001；Lazar GA 等, *PNAS*, 103: 4005-4010, 2006；Shields RL 等, *JBC*, 276: 6591-6604, 2001；Stavenhagen JB 等, *Cancer Res.*, 67: 8882-8890, 2007；Stavenhagen JB 等, *Advan. Enzyme. Regul.*, 48: 152-164, 2008；Alegre ML 等, *J. Immunol.*, 148: 3461-3468, 1992；和 Kaneko E 等, *Biodrugs*, 25: 1-11, 2011）。在本发明一些优选实施例中，对抗体恒定区上的氨基酸 L235（EU 编号）进行修饰以改变 Fc 受体相互作用，例如 L235E 或 L235A。在另一些优选实施例中，对抗体恒定区上的氨基酸 234 和 235 同时进行修饰，例如 L234A 和 L235A（L234A/L235A）（EU 编号）。

例如，本发明提供的双特异性抗体可包含具有延长的循环半衰期的氨基酸置换、缺失或添加的 Fc 变体。研究发现 M252Y/S254T/T256E、M428L/N434S 或者 T250Q/M428L 都能够延长抗体在灵长类动物中的半衰期。更多的与新生儿受体（FcRn）结合亲和力增强的 Fc 变体所包含突变位点可以参见中国发明专利 CN 201280066663.2、US 2005/0014934A1、WO 97/43316、US 5,869,046、US 5,747,03、WO 96/32478。在本发明一些优选实施例中，对抗体恒定区上的氨基酸 M428（EU 编号）进行修饰以增强 FcRn 受体的结合亲和力，例如 M428L。在另一些优选实施例中，对抗体恒定区上的氨基酸 250 和 428（EU 编号）同时进行修饰，例如 T250Q 和 M428L（T250Q/M428L）。

例如，本发明提供的双特异性抗体也可包含具有可以降低或消除 Fc 糖基化的氨基酸置换、缺失或添加的 Fc 变体。例如，Fc 变体包含正常存在于氨基酸位点 297（EU 编号）处的 N-连接聚糖降低的糖基化。N297 位糖基化对 IgG 的活性有很大影响，如果该位点糖基化被移除，则会影响 IgG 分子 CH2 上半部分的构象，从而丧失对 Fc γ Rs 的结合能力，影响抗体相关的生物活性。在本发明的一些优选实施例中，对人 IgG 恒定区上的氨基酸 N297（EU 编号）进行修饰以避免抗体的糖基化，例如 N297A。

例如，本发明提供的双特异性抗体也可包含具有消除电荷异质性的氨基酸置换、缺失或添加的 Fc 变体。在工程细胞表达过程中发生的多种翻译后修饰都会引起单克隆抗体的电荷异质性，而 IgG 抗体 C 末端赖氨酸的不均一性是其中的一个主要原因，重链 C 端的赖氨酸 K 可能在抗体生产过程中出现一定比例的缺失，

从而造成电荷异质性，从而影响抗体的稳定性、有效性、免疫原性或药代动力学。在本发明的一些优选实施例中，将 IgG 抗体 C 末端的 K447（EU 编号）去除或缺失，以消除抗体的电荷异质性，提高表达产物的均一性。

与包含野生型人 IgG Fc 区的双特异性抗体相比，本发明提供的双特异性抗体所包含的 Fc 片段对人 FcγRs（FcγRI、FcγRIIa 或 FcγRIIIa）和 C1q 的至少一种显示出降低的亲和力，具有减少的效应细胞功能或补体功能。例如，在本发明的一优选实施例中，双特异性抗体包含的 Fc 片段来自人 IgG1，且具有 L234A 和 L235A 取代（L234A/L235A），显示出对 FcγRI 降低的结合能力；此外，本发明提供的双特异性抗体包含的所述 Fc 片段还可以包含具有使其它一种或几种特性（例如，与 FcRn 受体结合能力、抗体糖基化或抗体电荷异质性等）改变的氨基酸取代。例如，在本发明的一优选实施例中，所述 Fc 片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示，它与其所源自的天然序列相比具有 L234A/L235A/T250Q/N297A/P331S/M428L 的氨基酸置换或取代，且 K447 被缺失或删除。

本发明所述双特异性抗体分子由两条相同的多肽链通过 Fc 片段铰链区的链间二硫键结合形成四价同源二聚体，每条多肽链自 N 端至 C 端依次由抗-BCMA scFv、连接肽、抗-CD3 scFv 和 Fc 片段组成。

本发明一优选实施例中，所述双特异性抗体结合人 BCMA 和 CD3，其氨基酸序列如下：

(1) SEQ ID NO: 20 所示的序列；

(2) 与 SEQ ID NO: 20 所示的序列相比具有一个或几个置换、缺失或添加（例如 1 个，2 个，3 个，4 个或 5 个置换、缺失或添加）的序列；或

(3) 与 SEQ ID NO: 20 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列。

在某些优选的实施方案中，(2) 中所述的置换是保守置换。

本发明的第二方面，提供了编码上述双特异性抗体的 DNA 分子。

本发明的优选实施例中，编码上述双特异性抗体的 DNA 分子如 SEQ ID NO: 21 所示的核苷酸序列。

本发明的第三方面，提供了包含上述 DNA 分子的载体。

本发明的第四方面，提供了包含上述载体的宿主细胞；所述宿主细胞包含原核细胞、酵母或哺乳动物细胞，优选地，所述宿主细胞为哺乳动物细胞，如 CHO 细胞、NS0 细胞或其它哺乳动物细胞，进一步优选为 CHO 细胞。

本发明的第五方面，提供了一种药物组合物，所述组合物包含上述双特异性抗体以及可药用赋形剂和/或载体和/或稀释剂。

本发明的第六方面，还提供了制备本发明所述双特异性抗体的方法，其包括：

- (a) 获得双特异性抗体的融合基因，构建双特异性抗体的表达载体；
- (b) 通过基因工程方法将上述表达载体转染到宿主细胞中；
- (c) 在允许产生所述双特异性抗体的条件下培养上述宿主细胞；
- (d) 分离、纯化产生的所述抗体。

其中，步骤(a)中所述表达载体选自质粒、细菌和病毒中的一种或多种，优选地，所述表达载体为质粒，更优选地，所述表达载体为 PCDNA3.1；

其中，步骤(b)通过基因工程方法将所构建的载体转染入宿主细胞中，所述宿主细胞包含原核细胞、酵母或哺乳动物细胞，优选地，所述宿主细胞为哺乳动物细胞，如 CHO 细胞、NS0 细胞或其它哺乳动物细胞，进一步优选为 CHO 细胞。

其中，步骤(d)通过常规的免疫球蛋白纯化方法，包含蛋白质 A 亲和层析和离子交换、疏水层析或分子筛方法分离、纯化所述双特异性抗体。

本发明的第七方面，提供了所述双特异性抗体在用于治疗或改善选自浆细胞障碍、其他与 BCMA 表达有关的 B 细胞障碍和自生免疫性疾病的药物中的用途，其中所述浆细胞障碍包括但不限于多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、浆细胞白血病、巨球蛋白血症、淀粉样变性、华氏巨球蛋白血症、孤立性骨浆细胞瘤、髓外浆细胞瘤、骨硬化性骨髓瘤、重链病、意义不明的单克隆丙种球蛋白病及郁积型多发性骨髓瘤。

本发明公开的技术方案，取得了有益的技术效果：

1、本发明提供的双特异性抗体不易结合弱表达或低表达 BCMA 的正常细胞，减少了非特异性杀伤，但对过表达或高表达 BCMA 的细胞的结合特异性没有显著下降，表现出良好的体内杀伤效果。由此亦知，当靶抗原仅表达于肿瘤细胞上或本发明所述双特异性抗体仅与过表达靶抗原的肿瘤细胞特异性结合时，使得免疫效应细胞限制性仅在靶细胞组织内被激活，这使得所述双特异性抗体对正常细胞的非特异性杀伤以及细胞因子的伴随释放能够被降至最低，减小其在临床治疗中的毒副作用。

2、本发明提供的双特异性抗体选择的抗-CD3 scFv 以微弱的结合亲和力（EC₅₀ 值大于 50 nM，或大于 100 nM，或大于 300 nM，或大于 500 nM）与效应细胞特异性结合，此外因被包埋在抗-BCMA scFv 和 Fc 之间，且位于其 N 端的连接肽 L3 包含的 CTP 刚性肽和位于其 C 端的 Fc 片段，都部分“遮盖”或“屏蔽”了抗-CD3 scFv 的抗原结合域，这种位阻效应使其以更微弱的结合亲和力（例如以大于 1 μM）与 CD3 结合，这使其对 T 细胞的活化刺激能力减弱，因而限制了细胞因子的过度释放，因而具有更高的安全性。

3、本发明提供的双特异性抗体创造性地采用了二价抗-CD3 scFv，这使得所述双特异性抗体在构型设计上规避了现有技术普遍所采用的异源二聚体型（所包含的抗-CD3 scFv 为单价）的非对称结构，因而也不存在重链间错配的问题，简化了下游纯化步骤；并且出人意料地，在体外细胞结合试验中未观察到抗-CD3 scFv 与 T 细胞的非特异性结合，且细胞激活程度（IL-2 等细胞因子的释放）控制在安全、有效的范围内，即本

发明采用的二价抗-CD3 scFv 结构并未引起非抗原依赖地诱导 T 细胞的过度活化,而对其他包含二价抗-CD3 结构域的双特异性抗体而言, T 细胞被不可控地过度激活是普遍存在的,因而抗-CD3 双特异性抗体在设计时一般避免引入二价抗-CD3 结构。

4、本发明提供的双特异性抗体所包含的经修饰的 Fc 片段不具有 Fc γ R 结合能力,避免了由 Fc γ R 所介导的 T 细胞全身性激活,因而允许免疫效应细胞限制性地仅在靶细胞组织内被激活。

5、本发明提供的双特异性抗体为同源二聚体型,不存在重链及轻链错配的问题,下游生产工艺稳定,纯化步骤简单高效,表达产物均一,且其理化和体内稳定性都显著提高。

发明详述

缩写和定义

BCMA	B 细胞成熟抗原
BiAb	双特异性抗体 (bispecific antibody)
CDR	用 Kabat 编号系统界定的免疫球蛋白可变区中的互补决定区
EC ₅₀	产生 50% 功效或结合的浓度
ELISA	酶联免疫吸附测定
FR	抗体构架区: 将 CDR 区排除在外的免疫球蛋白可变区
HRP	辣根过氧化物酶
IL-2	白细胞介素 2
IFN	干扰素
IC ₅₀	产生 50%抑制的浓度
IgG	免疫球蛋白 G
Kabat	由 Elvin A Kabat 倡导的免疫球蛋白比对及编号系统
mAb	单克隆抗体
PCR	聚合酶链式反应
V 区	在不同抗体之间序列可变的 IgG 链区段。其延伸到轻链的 109 位 Kabat 残基和重链的第 113 位残基
VH	免疫球蛋白重链可变区
VK	免疫球蛋白 κ 轻链可变区
K _D	平衡解离常数
k _a	结合速率常数

k_d 解离速率常数

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。本发明使用的抗体或其片段可单独或联合使用本领域已知的常规技术，例如氨基酸缺失、插入、取代、增加、和/或重组以及/或其他修饰方法作进一步修饰。根据一种抗体的氨基酸序列在其 DNA 序列中引入这种修饰的方法对本领域技术人员来说是众所周知的；见例如，Sambrook，分子克隆：实验手册，Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y.。所指的修饰优选在核酸水平上进行。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

“BCMA”是 B 细胞成熟抗原，属于肿瘤坏死因子受体超家族成员，优先在成熟 B 淋巴细胞中表达，并且表达在浆母细胞（即，浆细胞前体）和浆细胞的表面。在脾脏、淋巴结、胸腺、肾上腺和肝脏中均能检测到 BCMA 的 RNA，多个 B 细胞系成熟后其 BCMA mRNA 的水平也增加。BCMA 与白血病、淋巴瘤（如霍奇金淋巴瘤）、多发性骨髓瘤、自身免疫性疾病（如系统性红斑狼疮）等多种疾病有关，因此可作为涉及相关 B 细胞疾病的潜在靶标。针对 BCMA 靶点的适应症还包括其他现有技术中发现的以及未来发现的相关疾病或病症。该术语还包括 BCMA 的任何变体、同工型、和物种同源物，其由细胞-包括肿瘤细胞-天然地表达，或由以 BCMA 基因或 cDNA 转染的细胞表达。

CD3 分子是 T 细胞膜上的重要分化抗原，是成熟 T 细胞的特征性标志，由 6 条肽链组成，以非共价键与 T 细胞抗原受体（TCR）组成 TCR-CD3 复合体，不仅参与 TCR-CD3 复合体的胞浆内组装，而且通过各多肽链胞浆区的免疫受体酪氨酸活化基序（Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif, ITAM）传递抗原刺激信号。CD3 分子的主要功能为：稳定 TCR 结构，传递 T 细胞活化信号，当 TCR 特异性识别并结合抗原后，CD3 参与将信号转导到 T 细胞胞浆内，作为诱导 T 细胞活化的第一信号，在 T 细胞抗原识别和免疫应答产生过程中具有极其重要的作用。

“CD3”指的是作为 T 细胞受体复合物的一部分，由三个不同的链 CD3 ϵ 、CD3 δ 和 CD3 γ 组成。CD3 在 T 细胞上通过例如抗 CD3 抗体对其的固定作用而产生的集中（clustering），导致 T 细胞的活化，与 T 细胞受体介导的活化类似，但是不依赖于 TCR 克隆的特异性。绝大多数抗 CD3 抗体识别 CD3 ϵ 链。本发明的特异性识别 T 细胞表面受体 CD3 的第二功能域不受具体的限制，只要其能够特异性地识别 CD3，例如但不限于在下列专利中提到的 CD3 抗体：US7,994,289，US6,750,325；US6,706,265；US5,968,509；US8,076,459；US7,728,114；US20100183615。优选地，本发明中使用的抗人 CD3 抗体与食蟹猴和/或恒河猴具有交叉反应性，例如但不限于下列专利中提到的抗人 CD3 抗体：WO 2016130726，US 20050176028，WO 2007042261 或 WO 2008119565。该术语还包括任何 CD3 变体、同工型、衍生物和物种同源物，其由细胞天然地表达，或在以编码前述的链的基因或 cDNA 转染的细胞上表达。

术语“抗体”具体包括单克隆抗体、多克隆抗体和抗体样多肽，例如嵌合抗体和人源化抗体。“抗原结合

片段”包括通过任何已知技术提供的片段，例如酶裂解，肽合成和重组技术。一些抗原结合片段由保留亲本抗体分子的抗原结合特异性的完整抗体部分组成。例如，抗原结合片段可以包含已知结合特定抗原的抗体的至少一个可变区（重链或轻链可变区）或一个或多个 CDR。合适的抗原结合片段的实例包括但不限于双特异性抗体体和单链分子以及 Fab, F(ab')₂, Fc, Fabc 和 Fv 分子，单链（Sc）抗体，单独的抗体轻链，单独的抗体重链，抗体链或 CDR 和其他蛋白质之间的嵌合融合物，蛋白质支架，重链单体或二聚体，轻链单体或二聚体，由一个重链和一个轻链组成的二聚体，由 VL, VH, CL 和 CH1 结构域，或如 WO2007059782 中所述的单价抗体，包含通过铰链区上的二硫键连接的两个 Fab 片段的二价片段，基本上由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；基本上由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段，dAb 片段（Ward 等人, *Nature*, 1989, 341: 544-54），其基本上由 VH 结构域组成，也称为结构域抗体（Holt 等人, *Trends Biotechnol.* 2003, 21（11）：484-90）；或纳米体（Revetts 等人; *Expert Opin Biol Ther.* 2005 Jan; 5（1）：111-24）；分离的互补决定区（CDR）等。所有抗体同种型可用于产生抗原结合片段。另外，抗原结合片段可以包括非抗体蛋白质框架，其可以成功地将多肽片段并入赋予给定的感兴趣抗原（例如蛋白质支架）的亲力的取向。可以通过完整抗体的酶切或化学切割来重组产生或产生抗原结合片段。术语“抗体或其抗原结合片段”可以用于表示给定的抗原结合片段掺入短语中提到的抗体的一个或多个氨基酸片段。

术语“超变区”或“CDR 区”或“互补决定区”是指负责抗原结合的抗体氨基酸残基，是非连续的氨基酸序列。CDR 区序列可以由 IMGT、Kabat、Chothia 和 AbM 方法来定义或本领域熟知的任何 CDR 区序列确定方法而鉴定的可变区内的氨基酸残基。例如，超变区包含以下氨基酸残基：来自序列比对所界定的“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基，例如，轻链可变结构域的 24-34 (L1)、50-56 (L2) 和 89-97 (L3) 位残基和重链可变结构域的 31-35 (H1)、50-65 (H2) 和 95-102 (H3) 位残基，参见 Kabat 等, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (免疫目的物的蛋白质序列), 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 和/或来自根据结构来界定的“超变环”（HVL）的残基，例如，轻链可变结构域的 26-32 (L1)、50-52 (L2) 和 91-96 (L3) 位残基和重链可变结构域的 26-32 (H1)、53-55 (H2) 和 96-101 (H3) 位残基，参见 Chothia 和 Leskl, *J.Mol.Biol.*, 196: 901-917, 1987。“构架”残基或“FR”残基为除本文定义的超变区残基之外的可变结构域残基。在某些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段含有的 CDR 优选地通过 Kabat、Chothia 或 IMGT 编号系统确定。本领域技术人员可以明确地将每种系统赋予任何可变结构域序列，而不依赖于超出序列本身之外的任何实验数据。例如，给定抗体的 Kabat 残基编号方式可通过将抗体序列与每种“标准”编号序列对比同源区来确定。基于本文提供的序列的编号，确定序列表中任何可变区序列的编号方案完全在本领域技术人员的常规技术范围内。

术语“单链 Fv 抗体”（或“scFv 抗体”）是指包含抗体的 VH 和 VL 结构域的抗体片段，是通过接头（linker）连接的重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）的重组蛋白，接头使得这两个结构域相交联以形成抗原结合

位点，接头序列一般由柔性肽组成，例如但不限于 $G_2(GGGGS)_3$ 。scFv 的大小一般是一个完整抗体的 1/6。单链抗体优选是由一个核苷酸链编码的一条氨基酸链序列。对于 scFv 综述，可参见 Pluckthun (1994) *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies* (单克隆抗体药理学), 第 113 卷, Rosenberg 和 Moore 主编, Springer-Verlag, New York, 第 269-315 页。还参见国际专利申请公开号 WO 88/01649 和美国专利第 4,946,778 号和第 5,260,203 号。

术语“Fab 片段”由一条轻链和一条重链的 CH1 及可变区组成。Fab 分子的重链不能与另一个重链分子形成二硫键。“Fab 抗体”的大小是完整抗体的 1/3，其只包含一个抗原结合位点。

术语“Fab' 片段”含有一条轻链和一条重链的 VH 结构域和 CH1 结构域以及 CH1 和 CH2 结构域之间的恒定区部分。

术语“F(ab')₂ 片段”含有两条轻链和两条重链的 VH 结构域和 CH1 结构域以及 CH1 和 CH2 结构域之间的恒定区部分，由此在两条重链间形成链间二硫键。因此，F(ab')₂ 片段由通过两条重链间的二硫键保持在一起的两个 Fab' 片段组成。

术语“Fc”区指抗体重链恒定区片段，其包含至少铰链区、CH2 和 CH3 结构域。

术语“Fv 区”包含来自重链和轻链二者的可变区，但缺少恒定区，是包含完整抗原识别和结合位点的最小片段。

术语“Fd 片段”由一条重链的 CH1 及可变区组成，是 Fab 片段除去轻链后剩下的重链部分。

术语“二硫键稳定性蛋白 (dsFv)”在 VH 和 VL 区分别引入一个半胱氨酸突变点，从而在 VH 和 VL 之间形成二硫键而实现结构稳定性。

术语“连接肽”是指连接两个多肽的肽，其中所述连接肽可以是两个免疫球蛋白可变区或一个可变区。连接肽的长度可以是 0-30 个氨基酸或 0-40 个氨基酸。在一些实施方案中，连接肽可以是 0-25、0-20 或 0-18 个氨基酸长度。在一些实施方案中，连接肽可以是不多于 14、13、12、11、10、9、8、7、6 或 5 个氨基酸长的肽。在其它实施方案中，连接肽可以是 0-25、5-15、10-20、15-20、20-30 或 30-40 个氨基酸长。在其它实施方案中，连接肽可以是约 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个氨基酸长。连接肽是本领域技术人员已知的。连接肽的制备可以采用本领域任何方法。例如，连接肽可以是合成来源的。

术语“重链恒定区”包括来自免疫球蛋白重链的氨基酸序列。包含重链恒定区的多肽至少包含以下一种：CH1 结构域，铰链（例如，上部铰链区、中间铰链区，和/或下部铰链区）结构域，CH2 结构域，CH3 结构域，或其变体或片段。例如，本申请中使用的抗原结合多肽可包含具有 CH1 结构域的多肽链；具有 CH1 结构域、至少一部分的铰链结构域和 CH2 结构域的多肽；具有 CH1 结构域和 CH3 结构域的多肽链；具有 CH1 结构域、至少一部分铰链结构域和 CH3 结构域的多肽链，或者具有 CH1 结构域，至少一部分铰链结构，

CH2 结构域, 和 CH3 结构域的多肽链。在另一个实施例中, 本申请的多肽包括具有 CH3 结构域的多肽链。另外, 在本申请中使用的抗体可能缺少至少一部分 CH2 结构域(例如, 所有的或一部分的 CH2 结构域)。如上文所述, 但本技术领域的普通技术人员应理解, 重链恒定区可能会被修改, 使得它们在氨基酸序列上与天然存在的免疫球蛋白分子不同。

术语“轻链恒定区”包括来自抗体轻链的氨基酸序列。优选地, 所述轻链恒定区包括恒定 kappa 结构域和恒定 lambda 结构域中的至少一个。

术语“VH 结构域”包括免疫球蛋白重链的氨基末端可变结构域, 而术语“CH1 结构域”包括免疫球蛋白重链的第一(多数为氨基末端)恒定区。CH1 结构域邻近 VH 结构域并且是免疫球蛋白重链分子的铰链区的氨基末端。

术语“铰链区”包括重链分子的将 CH1 结构域连接至 CH2 结构域的那一部分。该铰链区包含约 25 个残基并且是柔性的, 从而使两个 N-末端抗原结合区独立地移动。铰链区可分为三个不同的结构域: 上部、中部、和下部铰链结构域 (Roux KH 等, *J.Immunol.*, 161: 4083, 1998)。

术语“二硫键”包括两个硫原子之间形成的共价键。氨基酸半胱氨酸含有巯基, 该巯基可以与第二个巯基形成二硫键或桥连。在大多数天然存在的 IgG 分子中, CH1 和 CK 区由二硫键连接并且两个重链由两个二硫键连接, 在对应于使用 Kabat 编号系统的 239 和 242 处(位置 226 或 229, EU 编号系统)连接。

“结合”定义抗原上的特定表位与其对应抗体之间的亲和性相互作用, 一般也理解为“特异性识别”。“特异性识别”的意思是本发明的双特异性抗体不与或基本上不与目标抗原以外的任意多肽交叉反应。和特异性的程度可以通过免疫学技术来判断, 包括但不限于免疫印迹, 免疫亲和层析, 流式细胞分析等。在本发明中, 特异性识别优选通过流式细胞技术来确定, 而具体情况下特异性识别的标准可由本领域一般技术人员根据其掌握的本领域常识来判断。

术语“双特异性抗体”指本发明的双特异性抗体, 例如抗 Her2 抗体或其抗原结合片段可以进行衍生化或连接至另一功能性分子上, 例如另一种肽或蛋白质(例如 TAA、细胞因子和细胞表面受体)以生成与至少两种不同结合位点或靶分子结合的双特异性分子。为创建本发明的双特异性分子, 可以将本发明的抗体在功能上连接(例如通过化学偶联、基因融合、非共价结合或其它方式)至一种或多种其它结合分子, 诸如另一种抗体、抗体片段、肽或结合模仿物, 从而产生双特异性分子。例如, “双特异性抗体”是指包含两个可变结构域或 scFv 单位使得所得抗体识别两种不同抗原。本领域已知双特异性抗体的许多不同的形式和用途 (Chames P 等, *Curr. Opin. Drug Disc. Dev.*, 12:276, 2009; Spiess C 等, *Mol. Immunol.*, 67: 95-106, 2015)。

术语“hCG- β 羧基末端肽 (CTP)”是一段来自人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 的 β -亚基羧基末端的短肽。四种与生殖相关的多肽类激素促卵泡激素 (FSH)、黄体生成素 (LH)、促甲状腺素 (TSH) 和绒毛膜促性腺激素 (hCG) 含有相同的 α -亚基和各自特异的 β -亚基。与其它三种激素相比, hCG 体内半衰期明显延

长，这主要来源于其 β -亚基上特有的羧基末端肽（CTP）。CTP 含有 37 个氨基酸残基，它具有 4 个 O-糖基化位点，糖侧链终端是唾液酸残基。带负电、高度唾液酸化的 CTP 能够抵抗肾脏对其的清除作用，从而延长蛋白在体内的半衰期（Fares FA 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4304-4308, 1992）。

术语“糖基化”意思是低聚糖（含有连接在一起的两个或更多个单糖、例如连接在一起的 2 个到约 12 个单糖的碳水化合物）附着形成糖蛋白。低聚糖侧链通常通过 N-或 O-连接连接到糖蛋白的骨架上。本文公开的抗体的低聚糖通常是连接到 Fc 区的 CH2 结构域，作为 N-连接的低聚糖。“N-连接的糖基化”是指碳水化合物类部分连接到糖蛋白链的天冬酰胺残基上。例如，技术人员可以识别鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3 以及人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA 和 IgD 的 CH2 结构域中的每一个在残基 297 处有用于 N-连接的糖基化的单一位点。

同源抗体，在又一方面，本发明抗体包含的重链和轻链可变区所包含的氨基酸序列与本文所述的优选抗体的氨基酸序列同源，且其中所述抗体保留了本发明所述，例如 Her2 \times CD3 双特异性抗体的期望的功能特性。

具有保守修饰的抗体，术语“保守修饰”意图指氨基酸修饰不会显著影响或改变含有该氨基酸序列的抗体的结合特征。此类保守修饰包括氨基酸的取代、添加和缺失。修饰可以通过本领域已知的标准技术，例如定点诱变和 PCR 介导的优点引入到本发明的抗体中。保守氨基酸取代指氨基酸残基用具有类似侧链的氨基酸残基替换。本领域中对具有类似侧链的氨基酸残基家族已有详细说明。这些家族包括具有碱性侧链（例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸）、酸性侧链（例如天冬氨酸、谷氨酸）、不带电荷的极性侧链（例如甘氨酸、天冬酰胺、谷酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸）、非极性侧链（例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸）、 β -分支侧链（例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）和芳香侧链（例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）的氨基酸。因此，可以用来自同一侧链家族的其它氨基酸残基替换本发明抗体 CDR 区中的一个或多个氨基酸残基。

与新生儿受体（FcRn）结合亲和力改变的 Fc 变体，这里使用的“FcRn”指结合 IgG 抗体 Fc 区的至少部分由 FcRn 基因编码的蛋白。FcRn 可以来源于包括但不限于人、小白鼠、大鼠、兔子和猴的任何生物体。功能性 FcRn 蛋白包含经常被称为重链和轻链的两条多肽，轻链是 β -2-微球蛋白，重链由 FcRn 基因编码。

本发明涉及对 FcRn 的结合被调节的抗体（调节包括增加以及降低结合）。例如：在有些情况下，增加的结合会导致细胞再循环抗体，并由此延长，例如治疗抗体的半衰期。有时，降低 FcRn 结合是合乎需要的，例如用作包含放射标记的诊断抗体或治疗抗体。另外，对 FcRn 的结合显示出增加，同时对其他 Fc 受体，例如 Fc γ Rs 的结合被改变的抗体可以用于本发明。

本申请涉及包含调节对 FcRn 的结合力的氨基酸修饰的抗体。具有特殊意义的是在较低的 pH 时，对 FcRn 的结合亲和力显示出增加，而在更高的 pH 时，结合基本上不显示出改变的最低限度地包含 Fc 区的抗体或

其功能性变体。

与新生儿受体 (FcRn) 结合亲和力增强的 Fc 变体, IgG 的血浆半衰期取决于它与 FcRn 的结合, 一般在 pH 6.0 时结合, 在 pH 7.4 (血浆 pH) 时解离。通过对两者结合位点的研究, 改造 IgG 上与 FcRn 结合的位点, 使之在 pH 6.0 时结合能力增加。已经证明对于结合 FcRn 重要的人 Fc γ 结构域的一些残基的突变可增加血清半衰期。已报道 T250、M252、S254、T256、V308、E380、M428 和 N434 (EU 编号) 中的突变可增加或降低 FcRn 结合亲和力 (Roopenian DC 等, *Nat. Rev. Immunol.*, 7: 715-725, 2007)。韩国专利号 KR 10-1027427 公开了具有增加的 FcRn 结合亲和力的曲妥珠单抗 (赫赛汀, Genentech) 变体, 并且这些变体包含选自 257C、257M、257L、257N、257Y、279Q、279Y、308F 和 308Y 的一个或多个氨基酸修饰。韩国专利公开号 KR 2010-0099179 提供了贝伐单抗 (阿瓦斯汀, Genentech) 变体并且这些变体通过包含在 N434S、M252Y/M428L、M252Y/N434S 和 M428L/N434S 的氨基酸修饰显示增加的体内半衰期。此外, Hinton 等也发现 T250Q 和 M428L2 个突变体分别使与 FcRn 的结合增加 3 和 7 倍。同时突变 2 个位点, 则结合增加 28 倍。在恒河猴体内, M428L 或 T250QM/428L 突变体显示血浆半衰期增加 2 倍 (Hinton PR 等, *J. Immunol.*, 176: 346-356, 2006)。更多的与新生儿受体 (FcRn) 结合亲和力增强的 Fc 变体所包含突变位点可以参见中国发明专利 CN 201280066663.2。此外, 有研究对五种人源化抗体的 Fc 段进行 T250Q/M428L 突变不仅改善了 Fc 与 FcRn 的相互作用, 且在随后的体内药代动力学试验中, 发现以皮下注射给药, Fc 突变抗体与野生型抗体相比药代动力学参数有所改善, 如体内暴露量增加、清除率降低、皮下生物利用度提高 (Datta-Mannan A 等, *MAbs. Taylor & Francis*, 4: 267-273, 2012)。

其他可引起本发明抗体与 FcRn 亲和力增强的突变点包括但不限于以下氨基酸修饰: 226, 227, 230, 233, 239, 241, 243, 246, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 433, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446, 其中 Fc 区中氨基酸的编号是 Kabat 中的 EU 索引的编号。

与 FcRn 结合亲和力增强的 Fc 变体还包括其他一切公知的氨基酸修饰位点以及尚未被发现的氨基酸修饰位点。

在可选择的实施方式中, 可以优化 IgG 变体使其具有增加或降低的 FcRn 亲和力, 以及增加或降低的人 Fc γ R, 包括但不限于 Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIc、Fc γ RIIIa 和包括他们的等位基因变异的 Fc γ RIIIb 亲和力。

优先地, IgG 变体的 Fc 配体特异性将决定它的治疗应用。给定 IgG 变体用于治疗目的将取决于靶抗原的表位或形式, 以及待治疗的疾病或适应症。对大多数靶和适应症来说, 增强的 FcRn 结合可是更优选的,

因为增强的 FcRn 结合可以导致血清半衰期延长。较长的血清半衰期允许治疗时以较低的频率和剂量给药。为了使需要重复给药的适应症作出反应而施用该治疗剂时，这种特性可是特别优选的。对一些靶和适应症来说，当需要变体 Fc 具有增加的清除或降低的血清半衰期时，例如当 Fc 多肽用作显象剂或放射治疗剂时，降低的 FcRn 亲和力可是特别优选的。

延长半衰期的 Fc 改变，本文所述“延长半衰期的 Fc 改变”是指与包含相同 Fc 多肽、但其不包含改变的相似 Fc 蛋白质的半衰期相比，Fc 多肽链中延长包含改变的 Fc 多肽链的蛋白质的体内半衰期的改变。所述改变可包含在作为双特异性抗体一部分的 Fc 多肽链中。改变 T250Q、M252Y、S254T 和 T256E（第 250 位的苏氨酸变为谷氨酰胺；第 252 位的甲硫氨酸变为酪氨酸；第 254 位的丝氨酸变为苏氨酸；和第 256 位的苏氨酸变为谷氨酸；根据 EU 编号进行编号）为延长半衰期的 Fc 改变并能联合、单独或任意组合使用。这些改变及其它一些改变详细描述于美国专利 7,083,784 中。美国专利 7,083,784 中描述这种改变的部分以引用的方式并入本文。

同样地，M428L 和 N434S 为延长半衰期的 Fc 改变并能联合、单独或任意组合使用。这些改变及其它一些改变详细描述于美国专利申请公开文本 2010/0234575 和美国专利 7,670,600 中。美国专利申请公开文本 2010/0234575 和美国专利 7,670,600 中描述这种改变的部分以引用的方式并入本文。

此外，按照本文含义，在以下位点之一处的任何置换都可被认为是延长半衰期的 Fc 改变：250、251、252、259、307、308、332、378、380、428、430、434、436。这些改变中的每一个或者这些改变的组合可用于延长本文所述双特异性抗体的半衰期。其它可用于延长半衰期的改变详细描述于 2012 年 12 月 17 日提交的国际申请 PCT/US2012/070146 (公开号: WO 2013/096221) 中。这一申请中描述上述改变的部分以引用的形式并入本文。

延长半衰期的 Fc 改变还包括包含公知技术及未来可能发现的位点及其修饰。

Fc 可以来自包括但不限于人类、小鼠、大鼠、兔和猴的任意生物。

编码双特异性抗体的核酸，使用本文描述的治疗剂和抗体或抗体片段，本领域技术人员可容易地构建含有功能等价核酸（例如序列不同、但编码相同的效应部分或抗体序列的核酸）的多个克隆。因此，本发明提供了双特异性抗体、编码抗体、抗体片段和缀合物及其融合蛋白的核酸、核酸变体、衍生物和物种同源物。

本领域已知许多编码包含 VH、VL、铰链、CH1、CH2、CH3 和 CH4 区的免疫球蛋白区的核酸序列。参见，如，Kabat 等., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Public Health Service N.I.H., Bethesda, MD, 1991。根据本文提供的教导，本领域技术人员可将所述核酸序列和/或本领域已知的其它核酸序列结合，以构建编码本发明双特异性抗体的核酸序列。编码本发明双特异性抗体的示例性核苷酸包括 SEQ ID NO: 21。

此外，基于本文和其它地方提供的氨基酸序列及本领域常识，本领域技术人员可以确定编码本发明双

特异性抗体的核酸序列。除较传统的生产编码特定氨基酸序列的克隆 DNA 片段的方法外，现今如 DNA 2.0 (Menlo Park, CA, USA) 和 Blue Heron (Bothell, WA, USA) 等公司通常采用化学合成来生产任意期望顺序排序的基因大小的 DNA，从而简化生产所述 DNA 的过程。

制备双特异性抗体的方法，可采用本领域任何已知的方法制备本发明双特异性抗体。早期构建双特异性抗体的方法有化学交联法或杂合杂交瘤或四价体瘤法（例如，Staerz UD 等, *Nature*, 314: 628-31, 1985; Milstein C 等, *Nature*, 305: 537-540, 1983; Karpovsky B 等, *J. Exp. Med.*, 160: 1686-1701, 1984）。化学偶联法是将 2 个不同的单克隆抗体用化学偶联的方式连接在一起，制备出双特异性单克隆抗体。例如两种不同单克隆抗体的化学结合，或例如两个抗体片段如两个 Fab 片段的化学结合。杂合—杂交瘤法是通过细胞杂交法或者三元杂交瘤的方式产生双特异性单克隆抗体，这些细胞杂交瘤或者三元杂交瘤是通过建成的杂交瘤融合，或者建立的杂交瘤和从小鼠得到的淋巴细胞融合而得到的。虽然这些技术用于制造 BiAb，但各种产生问题使得此类复合物难以使用，诸如产生含有抗原结合位点的不同组合的混合群体、蛋白质表现方面的困难、需要纯化目标 BiAb、低产率、生产费用高等。

最近的方法利用经过基因工程改造的构建体，其能够产生单一 BiAb 的均质产物而无需彻底纯化以去除不需要的副产物。此类构建体包括串联 scFv、二抗体、串联二抗体、双可变结构域抗体和使用诸如 Ch1/Ck 结构域或 DNLTM 的基元的异源二聚 (Chames & Baty, *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.*, 12: 276-83, 2009; Chames & Baty, *mAbs*, 1: 539-47)。相关纯化技术是公知的。

还可以使用单淋巴细胞抗体方法通过克隆和表达由选择用于产生特异性抗体的单个淋巴细胞产生的免疫球蛋白可变区 cDNA 来产生抗体，例如由 Babcook J 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 7843-7848, 1996; WO 92/02551; WO 2004/051268 和 WO 2004/106377 所述的方法。

用于产生例如用于免疫宿主或用于淘选诸如用于噬菌体展示（或酵母细胞或细菌细胞表面表达）的抗体的抗原多肽可以通过本领域熟知的方法从包含表达系统的遗传工程改造的宿主细胞制备，或者它们可以从天然生物来源回收。例如，可将编码双特异性抗体的一条或两条多肽链的核酸通过多种已知的方法（如转化、转染、电穿孔、用核酸包被的微粒轰击等）引入培养的宿主细胞。在一些实施方案中，编码双特异性抗体的核酸在被引入宿主细胞前可先插入至适于在宿主细胞中表达的载体中。典型的所述载体可包含使插入的核酸能够在 RNA 和蛋白质水平上表达的序列元件。

所述载体是本领域公知的，并且许多是商购可获得的。含有所述核酸的宿主细胞可在能够使细胞表达该核酸的条件下培养，且得到的 BiAb 可从细胞群或培养基中收集。可选地，BiAb 可在体内生产，例如，在植物叶片中（参见，如 Scheller J 等, *Nature Biotechnol.*, 19: 573-577, 2001 和其中引用的参考文献），鸟蛋中（参见，如 Zhu L 等, *Nature Biotechnol.*, 23: 1159-1169, 2005 和其中引用的参考文献），或哺乳动物的奶中（参见，如 Laible G 等, *Reprod. Fertil. Dev.*, 25: 315, 2012）。

可以使用的多种宿主细胞包括，例如，原核细胞、真核细胞、细菌细胞（如大肠杆菌或嗜热脂肪芽胞杆菌（*Bacillus stearothermophilus*））、真菌细胞（如酿酒酵母或毕赤酵母）、昆虫细胞（如包括草地夜蛾细胞在内的鳞翅目昆虫细胞）或哺乳动物细胞（如中国仓鼠卵巢（CHO）细胞、NS0 细胞、小仓鼠肾（BHK）细胞、猴肾细胞、Hela 细胞、人肝细胞癌细胞或 293 细胞等等）。

双特异性抗体可通过双特异性抗原的免疫原性制剂免疫合适的受试者（例如，兔，山羊，小鼠，或其它哺乳动物，包括转基因的和经剔除的上述哺乳动物）制备。合适的免疫原性制剂可以是，例如化学合成的或重组表达的双特异性抗原。所述的制剂可进一步包含佐剂，例如弗氏完全佐剂或不完全佐剂或类似的免疫刺激化合物。而且，当用于制备抗体时，特别是通过体内免疫的方式，本发明的双特异性抗原可以单独使用，或优选地作为与载体蛋白的偶联物。这种加强抗体应答的方法是本领域所公知的。根据所需的抗体不同，可使用不同的动物宿主进行体内免疫。可使用自身表达有用的内源抗原的宿主，或使用已导致有用内源抗原缺陷的宿主。

双特异性抗体可通过结合的以上所述的方法制备。

本发明所述双特异性抗体分子可以作为关于每个靶点的单克隆抗体（MAb）。在一些实施方案中，抗体是嵌合的、人源化或全人的。

单克隆抗体可以通过本领域已知的任何方法制备，诸如杂交瘤技术（Kohler & Milstein, *Nature*, 256: 495-497, 1975），三源杂交瘤技术，人 B 细胞杂交瘤技术（Kozbor D 等，*Immunology Today*, 4: 72, 1983）和 EBV-杂交瘤技术（Cole SPC 等，*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, pp77-96, Alan R Liss, Inc., 1985）。

本发明的双特异性抗体或其部分可通过常规的免疫学分析方法，例如酶联免疫吸附试验（ELISA），放射免疫分析（RIA）或组织免疫组织化学用于检测任一或所有这些抗原（例如在生物样品，如血清或血浆中）。本发明提供检测生物样品中的抗原的方法，该方法包括：使所述生物样品与本发明的可特异识别所述抗原的双特异性抗体，或抗原结合片段相接触，并检测与抗原结合的抗体或其部分，或非结合抗体或其部分，由此检测所述生物样品中的所述抗原。所述抗体用可检测的物质进行直接或间接的标记，以便于检测结合或非结合抗体。合适的可检测物质包括多种酶，修复基团，荧光物质，发光物质和放射性物质。合适的酶的例子包括辣根过氧化物酶，碱性磷酸酶， β -半乳糖苷酶，乙酰胆碱酯酶；合适的修复基团复合物的例子包括链霉抗生物素蛋白/生物素和抗生物素蛋白/生物素；合适的荧光物质的例子包括 7-羟基香豆素，荧光素，荧光素异硫氰酸盐，硷性蕊香红 B，二氯三嗪基胺荧光素，丹磺酰氯或藻红蛋白；发光物质的例子包括 3-氨基邻苯二甲酰环胍；合适的放射性物质的例子包括 I^{125} 、 I^{131} 、 ^{35}S 或 3H 。

药物组合物，本发明的双特异性抗体或编码本申请抗体的核酸或多核苷酸可以应用于制备药物组合物或无菌组合物，例如，将双特异性抗体与药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合。药物组合物可包括一种或组合的（如两种或更多不同的）本发明的双特异性抗体。例如，本发明的药物组合物可包含与靶抗

原上的不同表位结合的具有互补活性的抗体或抗体片段（或免疫缀合物）的组合。治疗和诊断剂的制剂可通过以例如冻干粉末、浆液、水性溶液或悬浮液的形式与药学可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合来制备。

术语“药学上可接受的”指当分子本体、分子片段或组合物适当地给予动物或人时，它们不会产生不利的、过敏的或其他不良反应。可作为药学上可接受的载体或其组分的一些物质的具体示例包括糖类（如乳糖）、淀粉、纤维素及其衍生物、植物油、明胶、多元醇（如丙二醇）、海藻酸等。

双特异性抗体或编码本申请抗体的核酸或多核苷酸可连接至上述药学上可接受的载体或其组分的一些物质（作为免疫复合体）或与其分开施用。在后一种情况下，双特异性抗体或编码本申请抗体的核酸或多核苷酸可在上述药学上可接受的载体或其组分的一些物质之前、之后或与其共同施用，或可与其他已知疗法（如抗癌疗法、如辐射）共同施用。

本发明的组合物可以是多种形式。其包括例如，液体，半固体和固体的剂量形式，例如液体溶液（例如，可注射的和不可熔化的溶液）分散剂或悬浮剂片剂，丸剂，粉剂，脂质体和栓剂。优选的方式依赖于施用方式和治疗用途。典型的优选组合物是可注射的或不可熔化的溶液，例如那些类似于用其他抗体对人进行被动免疫的组合物。施用路径可以有多种形式，包括经口、直肠、经粘膜、经肠、肠胃外；肌肉内、皮下、皮内、髓内、鞘内、直接心室内、静脉内、腹膜内、鼻内、眼内、吸入、吹入、局部、皮肤、经皮或动脉内。优选的施用形式是非肠道的（例如静脉内，皮下，腹膜内，肌内）。在优选的实施方案中，所述的抗体通过静脉内注入或注射施用。在另一优选的实施方案中，所述的抗体通过肌内或皮下注射。

以上组合方法、治疗方法及施用方法是公知的，也包括未来可能发展的组合、治疗及施用方法。

本发明的药物组合物可以是两种药物的组合，可以是与已上市的类似功能相同产品或者增加治疗效果的产品的组合。

附图说明

图 1、AP163 纯化样品的 SEC-HPLC 检测结果。

图 2、AP163 纯化样品的 SDS-PAGE 电泳结果。

图 3、双特异性抗体与 BCMA 阳性细胞结合能力测定。

图 4、双特异性抗体与不同 T 细胞结合能力测定。

图 5、双特异性抗体同时结合靶细胞与效应细胞能力测定。

图 6、双特异性抗体介导 CD4⁺T 细胞/CD8⁺T 细胞的激活。

图 7、双特异性抗体活化报告基因细胞株 Jurkat T 细胞的能力测定。

图 8、双特异性抗体介导 T 细胞杀伤肿瘤细胞的能力测定。

图 9、不同效靶比下双特异性抗体介导 T 细胞杀伤 BCMA 阳性细胞的能力测定。

图 10、双特异性抗体在 NPG 小鼠皮下共接种人 CIK 细胞和人骨髓瘤细胞 RPMI-8226 移植瘤模型中的体内

抑瘤效果。注：箭头代表各次给药时间；***表示存在显著性差异。

图 11、双特异性抗体在 NPG 小鼠皮下共接种人 CIK 细胞和人 Burkitt's 淋巴瘤 Daudi 细胞移植瘤模型中的体内抑瘤效果。注：箭头代表各次给药时间；***表示存在显著性差异。

具体实施方式

通过下列实施例进一步说明本发明，所述实施例不应解释为进一步限制。在此将整篇申请中引用的所有附图和所有参考文献、专利和已公开专利申请的内容明确收入本文作为参考。

以下各实施例中，实验所用物料可购买，也可参照现有公开的技术制备；未标明来源和规格的均为市售可得；未详细描述的各种过程和方法是本领域中公知的常规方法。

实施例 1、双特异性抗体分子表达载体的构建

双特异性抗体 AP163 由抗-BCMA scFv、连接肽 L2、抗-CD3 scFv 和 Fc 片段依次串联组成，抗-BCMA scFv 和抗-CD3 scFv 内部的 VH 和 VL 之间分别由连接肽 L1 和 L3 连接。AP163 所包含的针对 BCMA 的 scFv 的 VH 和 VL 氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 8 所示。AP163 包含的抗 CD3-scFv 的 VH 和 VL 氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 18 所示，且 VH 和 VL 之间由(GGGGS)₃ 连接。AP163 所包含的 Fc 片段来自人 IgG1，且具有多个氨基酸的替换/取代，分别为 L234A、L235A、T250Q、N297A、P331S 和 M428L (EU 编号)，同时还删除/缺失了 Fc 片段 C 末端的 K447 (EU 编号)。其连接肽 (L2) 由柔性肽和刚性肽组成，且柔性肽均为 G₂(GGGGS)₃，刚性肽为 SSSSKAPPPS。而每个 scFv 内部的连接肽 L1 和 L3 的组成均为(GGGGS)₃。

按常规分子生物学方法合成上述双特异性抗体的编码基因，并将获得的融合基因的编码 cDNA 分别插入到经 PCDNA3.1 改造后的真核表达质粒 pCMAB2M 的相应酶切位点间。质粒 pCMAB2M 还含有选择性标记物，从而在细菌中可以具有卡那霉素抗性，而在哺乳动物细胞中可以具有 G418 抗性。另外，当宿主细胞是 DHFR 基因表达缺陷型时，pCMAB2M 表达载体含有小鼠的二氢叶酸还原酶 (DHFR) 基因，从而在存在氨甲蝶呤 (MTX) 时能共扩增目的基因和 DHFR 基因 (参见美国专利 US 4,399,216)。

实施例 2、双特异性抗体分子的表达

将上述构建的表达质粒转染哺乳动物宿主细胞系，以表达双特异性抗体。宿主细胞系是 DHFR 酶缺陷型 CHO-细胞 (参见美国专利 US 4,818,679)，本实施例中宿主细胞选取 CHO 衍生细胞株 DXB11。

一种优选的转染方法是电穿孔，也可以使用其它方法，包括磷酸钙共沉降、脂转染。在电穿孔中，用设置为 300V 电场和 1500 μFd 电容的 Gene Pulser 电穿孔仪 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)，在比色杯内的 5×10⁷ 个细胞中加入 50 μg 表达载体质粒 DNA。在转染两天后，将培养基改成含 0.6 mg/mL G418 的生长培养基。用极限稀释亚克隆转染子，并用 ELISA 方法测定各细胞系的分泌率。筛选出高水平表达双

特异性抗体的细胞株。

用受 MTX 药物抑制的 DHFR 基因进行共扩增，其操作步骤主要包括：在含有递增浓度 MTX 的生长培养基中，用 DHFR 基因共扩增转染的融合蛋白基因。极限稀释 DHFR 表达阳性的亚克隆，逐步加压并筛选出能在高达 6 μM MTX 培养基中生长的转染子，测定其分泌率，筛选出高表达外源蛋白的细胞系。将分泌率超过 5（较佳地约 15） $\mu\text{g}/10^6$ （即百万）个细胞/24 h 的细胞系使用无血清培养基的进行适应性悬浮培养。收集细胞上清并分离纯化双特异性抗体。

实施例 3、双特异性抗体的纯化

采用三步层析法对双特异性抗体 AP163 进行纯化。分别为亲和层析、羟基磷灰石层析和阴离子交换层析（本实施例采用的蛋白纯化仪为美国 GE 公司的 AKTA pure 25M。本实施例中采用的试剂均购自国药集团化学试剂有限公司，纯度均为分析级）。

第一步，亲和层析：采用 GE 公司的 MabSelect Sure 亲和层析介质（MabSelect Sure，购自 GE 公司）或其它市售的亲和介质（例如博格隆公司的 Diamond protein A 等）进行样品捕获、浓缩以及部分污染物的去除。首先使用平衡 buffer（20 mM PB，140 mM NaCl，pH 7.4），以 100-200 cm/h 的线性流速平衡层析柱 3-5 个柱体积（CV）；将经过澄清后的发酵液以 100-200 cm/h 的线性流速上样，载量不高于 20 mg/m；上样完毕后，使用平衡 buffer（20 mM PB，140 mM NaCl，pH 7.4）以 100-200 cm/h 的线性流速平衡层析柱 3-5 个柱体积（CV），冲洗未结合的组份；使用去污 buffer 1（50 mM NaAc-HAc，1 M NaCl，pH 5.0），以 100-200 cm/h 的线性流速冲洗层析柱 3-5 个柱体积，去除部分污染物；使用去污 buffer 2（50 mM NaAc-HAc，pH 5.0），以 100-200 cm/h 的线性流速平衡层析柱 3-5 个柱体积（CV）；之后使用洗脱 buffer（40 mM NaAc-HAc，pH 3.5），以不高于 100 cm/h 的线性流速洗脱目标产物，收集目标峰。

第二步，羟基磷灰石层析：使用 BIO-RAD 公司的 CHT Type II 或其它市售的羟基磷灰石介质（CHT Type II，购自 BIO-RAD 公司）进行中间纯化，用于降低聚合体含量。目标蛋白聚合以后，聚合体和单体之间在性质上的差异，包括电荷特性以及钙离子螯合等，我们使用电荷特性等差异对二者进行分离。首先，使用平衡 buffer（20 mM PB，pH 7.0），以 100-200 cm/h 的线性流速平衡层析柱 3-5 个柱体积（CV）；第一步亲和层析分离得到的目标蛋白调 pH 7.0，然后上样，载量控制在 <5 mg/ml；上样完毕后，使用平衡 buffer（20 mM PB，pH 7.0），以 100-200 cm/h 的线性流速冲洗层析柱 3-5 个柱体积（CV）；最后进行目标蛋白洗脱，使用洗脱 buffer（20 mM PB，1M NaCl，pH 7.0），以 0-50% 梯度洗脱，以不高于 100 cm/h 的线性流速洗脱 10 个柱体积（CV），对洗脱组分进行分段收集，分别送检 SEC-HPLC。将单体百分比大于 95% 的目标组分合并进行下一步层析。

第三步，阴离子交换层析：使用博格隆公司的 Q-HP 或其它市售的阴离子交换层析介质（Q-HP，购自博格隆公司）（例如 GE 的 Q HP、TOSOH 的 Toyopearl GigaCap Q-650、天地人和的 DEAE Beads 6FF，赛

分科技的 Generik MC-Q、Merck 的 Fractogel EMD TMAE、Pall 的 Q Ceramic HyperD F) 进行精细纯化, 进一步去除 HCP、DNA 等污染物。首先使用平衡 buffer (20 mM PB, 0.15M NaCl, pH 7.0), 以 100-200 cm/h 的线性流速冲洗层析柱 3-5 个柱体积 (CV); 经第二步羟基磷灰石层析分离得到的目标蛋白上样, 收集流穿, 上样完毕, 使用平衡 buffer (20 mM PB, 0.15M NaCl, pH 7.0), 以 100-200 cm/h 的线性流速冲洗层析柱 3-5 个柱体积 (CV); 对流穿组分进行收集, 分别送样进行蛋白含量、SEC-HPLC 和电泳检测。

样品的 SEC-HPLC 纯度结果及 SDS-PAGE 电泳结果分见图 1 和图 2, 其中 SEC-HPLC 结果显示, 三层析后双特异性抗体的主峰纯度达 95% 以上, SDS-PAGE 电泳带型符合预期, 非还原电泳 (180 KDa), 还原后可得清晰的 (90 KDa) 单链条带。

实施例 4、Anti-BCMA×CD3 双特异性抗体的体外生物学功能评价

(1) 双特异性抗体与 BCMA 阳性细胞和 T 细胞的结合活性

培养人骨髓瘤 NCI-H929 细胞、人 Jurkat-LUC 细胞、人 T 淋巴细胞白血病 HUT-78 细胞、人骨髓瘤 MM.1S 细胞、人早幼粒白血病 HL60 细胞、人 T 细胞和食蟹猴 T 细胞, 离心收集细胞用 1% DPBS (杜氏磷酸缓冲液) 重悬, 分别调整细胞密度为 2×10^6 个/ml, 置于 96 孔板中, 每孔 100 μ l。待测的双特异性抗体 AP163 进行梯度稀释, 每孔 100 μ l, 37°C、5% CO₂ 培养箱中孵育 1 h。离心, 每孔加入 200 μ l 1% DPBS 清洗 2 次后离心去上清, 每孔加入 100 μ l 荧光二抗 (Alexa Fluor® 647 山羊抗人 IgG (H+L) 抗体), 37°C、5%CO₂ 培养箱中孵育 1 h。离心去上清, 1% DPBS 洗板两遍, 每孔加入 100 μ l 1% DPBS 重悬, 流式细胞仪检测信号强度。再以平均荧光强度作为 Y 轴, 抗体浓度作为 X 轴, 通过软件 GraphPad Prism 6 进行分析, 计算 AP163 与 BCMA+细胞以及与 CD3+细胞的结合活性。

如图 3、图 4 所示, 在细胞水平上, AP163 可特异性的与 BCMA 阳性的细胞高度结合且具有量效关系; 同时, AP163 与人 T 细胞和食蟹猴 T 细胞均可特异性的高度结合, 且具有量效关系。

(2) 双特异性抗体与人猴种属 CD3 和 BCMA 蛋白的结合能力及交叉反应性测定

用 PBS 将包被抗原人和猴的 CD3、BCMA 分别稀释至 0.1 μ g/ml, 加入 96 孔板中, 100 μ l/孔, 2-8 °C 包被过夜。弃去板中液体, 加入含有脱脂奶粉的 PBST 室温封闭 2 h 后, PBST 洗板 2 次。待测双特异性抗体 4 倍稀释共 12 个梯度, 每浓度 2 个复孔, 100 μ l/孔加入 96 孔板中, 室温孵育 2 h。将未结合的双特异性抗体以 PBST 洗去, 将生物素化的人 BCMA 蛋白或人 CD3 蛋白稀释至 0.1 μ g/ml, 以 1:1000 混合 HRP 标记的链霉亲和素 (BD, 货号 554066) 加入 96 孔板中, 100 μ l/孔, 室温孵育 1 h。其后, 将 96 孔板以 PBST 清洗, 加入 TMB, 100 μ l/孔, 室温避光显色 2-3 min, 然后加入 1 M HCL 终止显色反应。用酶标仪检测 OD450 nm 的吸光值。以样品浓度对数值为横坐标, 吸光度值为纵坐标做四参数非线性回归, 可变斜率方程。计算双特异性抗体与抗原结合的 EC₅₀ 值。实验结果如表 1 所示, 双特异性抗体与人源 CD3 和 BCMA 蛋白、食蟹猴源 CD3 和 BCMA 蛋白结合的 EC₅₀ 值差距很小, 双特异性抗体与不同种属抗原的结合能力基本相同。

表 1、双特异性抗体与人猴种属 CD3 和 BCMA 蛋白的结合能力及交叉反应性测定结果

	AP163 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	0.001	0.01	0.015	0.1	0.15
EC ₅₀	人 CD3	0.1	0.12	0.75	1.3	1.6
	猴 CD3	0.1	0.12	0.75	1.3	1.6
	人 BCMA	0.1	0.12	0.25	0.6	1.25
	猴 BCMA	0.1	0.12	0.25	0.7	1.25

(3) 双特异性抗体同时结合靶细胞与效应细胞能力测定

正常培养的人骨髓瘤 NCI-H929 细胞作为靶细胞，用 PKH26 染色试剂染色标记，使用 1640 完全培养基重悬细胞，调整细胞密度为 1×10^5 个/ml，50 μl /孔加入 96 孔细胞培养板中。将双特异性抗体用培养基梯度稀释，50 μl /孔加入。加入 5 倍于靶细胞数的效应细胞（扩增培养的 T 细胞），50 μl /孔。37°C、5%CO₂ 培养箱中孵育 1 h，使待测样品与细胞充分混匀并发生桥连反应。用 DPBS 清洗 96 孔板，流式细胞术上机检测，捕捉 T 细胞，则带有 PKH26 信号的 T 细胞为发生桥连的细胞，统计数据计算桥连比例。从图 5 中可以看出，AP163 可特异性的使肿瘤细胞和靶细胞发生桥连反应，且具有量效关系。

(4) 双特异性抗体介导 CD4⁺T 细胞/CD8⁺T 细胞的激活

招募 3 名健康的自愿献血者，抽取外周血并提取 PBMC，利用 CD4⁺T 细胞分离试剂盒及 CD8⁺T 细胞分离试剂盒分选富集 PBMC 中的 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞，用含 10%FBS 的 1640 完全培养基重悬细胞，调整细胞密度为 1×10^6 个/ml，50 μl /孔加入 96 孔细胞培养板中。培养人骨髓瘤 NCI-H929 细胞，调整细胞密度为 1×10^5 个/ml，每孔加入 50 μl 。将双特异性抗体进行梯度稀释，50 μl /孔加入 96 孔板，37°C、5%CO₂ 培养箱中孵育 24 h。离心取上清液，采用 ELISA 法颗粒酶检测试剂盒检测上清中颗粒酶释放量。通过软件 GraphPad Prism 6 进行分析，计算双特异性抗体介导 CD4⁺T 细胞/CD8⁺T 细胞激活的 EC₅₀。

如图 6 和表 2 所示，AP163 可介导 3 名健康志愿者的 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞杀伤肿瘤细胞时释放颗粒酶，并呈现量效关系。

表 2、双特异性抗体介导 CD4⁺T 细胞/CD8⁺T 细胞激活释放颗粒酶的 EC₅₀

志愿者序号	CD4 ⁺ T 细胞 (pM)	CD8 ⁺ T 细胞 (pM)
1	0.6275	4.204
2	0.5341	1.202
3	0.4826	0.6863

(5) 双特异性抗体活化 T 细胞能力评价

含有 NFAT RE 报告基因的 Jurkat T 细胞（购自 BPS Bioscience），在双特异性抗体和 BCMA 阳性细胞同时存在的条件下可以过表达萤光素酶，通过检测萤光素酶的活性来定量 Jurkat T 细胞的活化程度。具体的，H929 细胞离心重悬，调整细胞密度为 2×10^5 个/ml，40 μ l/孔加入 96 孔细胞培养板中。NFAT-Jurkat 细胞调整细胞密度到 2×10^6 个/ml，每孔加入 40 μ l。双特异性抗体 AP163 用培养基稀释成 50 μ g/mL，10 倍稀释后，每孔加入 20 μ l，37°C、5%CO₂ 培养箱中孵育 48 h。洗板后，分别加入 100 μ l/孔 Steady-Glo[®] Luciferase，反应 5 min 后，用酶标仪检测冷发光值。以双特异性抗体的浓度做 X 轴，荧光素强度作为 Y 轴，通过软件 GraphPad Prism 6 进行分析，计算双特异性抗体活化 T 细胞的 EC₅₀。

如图 7 所示，AP163 可以特异性的活化 NFAT-Jurkat 细胞，EC₅₀ 值为 3.161 ng/ml，且其浓度和信号强度成正比。

（6）双特异性抗体介导 T 细胞杀伤肿瘤细胞的能力

培养人、食蟹猴的 T 细胞，调整细胞密度为 1×10^6 个/ml，50 μ l/孔分别加入 96 孔细胞培养板中。正常培养的人骨髓瘤 NCI-H929 细胞作为靶细胞，调整细胞密度 1×10^5 个/ml，50 μ l/孔加入。之后每孔加入 50 μ l 梯度稀释后双特异性抗体 AP163，37°C、5%CO₂ 培养箱中孵育 24 h。每孔加入 40 μ l Bright-Glo 试剂，室温避光静置 3min，应用多功能酶标仪检测 RLU 值，通过软件 GraphPad Prism 6 进行分析，计算双特异性抗体介导 T 细胞杀伤 H929 细胞的 EC₅₀ 值。

如图 8 所示，AP163 介导人 T 细胞杀伤肿瘤细胞的 EC₅₀ 值为 0.239 pM，介导食蟹猴 T 细胞杀伤肿瘤细胞的 EC₅₀ 值为 0.278 pM。AP163 可特异性的介导人和食蟹猴的 T 细胞杀伤肿瘤细胞，BCMA 高表达的 H929 细胞呈现出显著的杀伤作用，并呈现量效关系。

（7）双特异性抗体引起细胞因子释放的评价

评价双特异性抗体单独或依赖靶细胞活化 T 细胞引起细胞因子释放的能力。

培养原代 T 细胞，离心收集细胞用 1% PBSB 重悬，分别调整细胞密度为 1×10^6 个/ml 置于 96 孔板中，90 μ l/孔。识别 CD3 的母本单抗 AB314（具体参考 WO2007042261 专利文献）与双特异性抗体 AP163 分别用培养基稀释成 10000 ng/mL，10 倍梯度稀释后，10 μ l/孔加入 96 孔板，放入 37°C，5%CO₂ 培养箱中培养。分别在孵育 24h 和 48h 时取培养上清液，用 LEGENDplex[™] 人 Th1/Th2 试剂盒检测分析，流式细胞仪检测信号强度。以细胞因子浓度作为 Y 轴，抗体浓度作为 X 轴，通过软件 GraphPad Prism 6 进行分析，计算 AB314 与 AP163 活化 T 细胞致细胞因子释放的量。结果显示，在无靶细胞存在的条件下，AB314 活化原代 T 细胞 24h 后，引起细胞因子 IL-4、IL-5 和 TNF- α 的释放；而 AP163 活化原代 T 细胞，24h，48h 均无显著细胞因子的释放。

培养人 T 细胞，离心收集细胞用 10%FBS 的 1640 完全培养基重悬，调整细胞密度为 1×10^6 个/ml 置于 96 孔板中，50 μ l/孔。人骨髓瘤 NCI-H929 细胞密度调整为 1×10^5 个/ml，50 μ l/孔加入。AP163 梯度稀释后，

50 μ l/孔加入 96 孔板, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中分别培养 1、2、3、4、5、6、24 h。孵育结束后每孔取 50 μ l 上清液, 应用 8 细胞因子检测试剂盒检测上清中 8 中细胞因子的释放量。实验结果表明, AP163 能够活化 T 细胞释放 IL-5、IL-13、IL-2、IL-6、IL-10、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4, 并呈现时间依赖性, 具体见表 3。

表 3、双特异性抗体引起细胞因子释放量

时间	IL-5 (pg/ml)	IL-13 (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)
1 h	<1.95	<1.82	<2.19	<0.43	<2.07	<52.52	<1.82	<1.95
2 h	<1.95	<1.82	<2.19	<0.43	<2.07	<52.52	<1.82	<1.95
3 h	<1.95	8.73	<2.19	<0.43	<2.07	365.35	124.72	<1.95
4 h	<1.95	17.83	4.73	<0.43	<2.07	678.89	201.7	<1.95
5 h	<1.95	16.05	4.83	<0.43	<2.07	646.17	210.06	<1.95
6 h	<1.95	34.98	6.42	<0.43	<2.07	1203.93	263.52	<1.95
24 h	100.71	89.98	<2.19	<0.43	3.98	>1706.27	203.47	4.81

(8) 不同效靶比下双特异性抗体介导 T 细胞杀伤 BCMA 阳性人肿瘤细胞

培养人 T 细胞, 分别调整细胞密度为 2×10^7 个/ml、 1×10^7 个/ml、 1×10^6 个/ml、 1×10^5 个/ml、 1×10^4 个/ml、 1×10^3 个/ml, 每孔 50 μ l 分别加入 96 孔细胞培养板。人骨髓瘤 NCI-H929 细胞作为靶细胞, 调整细胞密度 1×10^5 个/ml, 50 μ l/孔加入。之后每孔加入 50 μ l 梯度稀释后的 AP163, 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中孵育 24 h。每孔加入 40 μ l Bright-Glo 试剂, 室温避光静置 3min, 应用多功能酶标仪检测 RLU 值, 通过软件 GraphPad Prism 6 进行分析, 计算双特异性抗体介导 T 细胞杀伤 H929 细胞的 EC₅₀ 值。

如图 9 所示, 效靶比 (E/T) 高于 1/1 时, AP163 介导 T 细胞杀伤肿瘤细胞的效率可达到 100% 杀伤; E/T 低于 1/1 时, EC₅₀ 值随着 E/T 的减小而逐渐增大。

(9) 评价地塞米松及吡哌美辛对 AP163 介导 PBMC 杀伤肿瘤细胞的影响作用

招募 12 名健康的自愿献血者, 抽取外周血并提取 PBMC, 用含 10%FBS 的 1640 完全培养基重悬细胞, 调整细胞密度为 3×10^6 个/ml, 每孔 50 μ l 加入 96 孔细胞培养板。配制地塞米松和吡哌美辛稀释液, 每孔 50 μ l 加入 96 孔板, 分别孵育 PBMC 1 h 和 14 h; 对照组加入等体积的缓冲液。人骨髓瘤 NCI-H929 细胞调整细胞密度 1×10^5 个/ml, 每孔 50 μ l。之后每孔加入 50 μ l 梯度稀释的 AP163, 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中分别孵育 4、8、12、24、48 h, 每孔加入 40 μ l Bright-Glo 试剂, 室温避光静置 3min, 应用多功能酶标仪检测 RLU 值。分析数据结果显示, 地塞米松或吡哌美辛孵育 PBMC 对 AP163 介导 PBMC 杀伤肿瘤细胞的影响较小。

实施例 5、Anti-BCMA \times CD3 双特异性抗体在小鼠移植瘤模型中的药效学研究

(1) NPG 小鼠皮下共接种人 CIK 细胞和人骨髓瘤细胞 NCI-H929 移植瘤模型

将人骨髓瘤 NCI-H929 细胞与 CIK 细胞（由人 PBMC 激活诱导扩增至第 10 天）以不同比例共同接种于雌性 NPG 小鼠右侧前肋部皮下。接种 1 小时后，根据小鼠体重进行随机分组，每组 4 只，共 4 组。分组当天开始给药，所有组给药途径均为腹腔注射，对照组给予相同体积的 PBS 溶液，AP163 给药剂量为 0.2 mg/kg。每周给药 2 次，连续给药 4 周。每 3 天测量肿瘤体积及体重 1 次，记录小鼠体重和肿瘤体积。实验结束时，动物安乐死，剥取肿瘤称重、拍照，计算相对肿瘤抑制率（TGI%）。

如表 4 所示，实验结束时，效靶比 1/1 对照组平均肿瘤体积为 $1501\pm351 \text{ mm}^3$ ，效靶比 1/2 对照组平均肿瘤体积为 $1555\pm244 \text{ mm}^3$ ；效靶比 1/1 AP163 试验组平均肿瘤体积为 $99\pm38 \text{ mm}^3$ ，TGI%为 93%，效靶比 1/2 AP163 试验组平均肿瘤体积为 $481\pm215 \text{ mm}^3$ ，TGI%为 70.2%。上述结果表明，AP163 有明显的抑瘤作用，同时，AP163 呈现较好的安全性，未对实验动物产生明显的毒性作用。

表 4、AP163 对 NCI-H929 NPG 小鼠模型的药效作用

CIK/NCI-H929	组别	剂量 (mg/kg)	给药方式	肿瘤体积 (mm^3)	肿瘤重量 (g)	抑瘤率 (%)
1/1	PBS	--	i.p.biw	1501 ± 351	2.34 ± 0.46	--
1/1	AP163	0.2	i.p.biw	99 ± 38	0.17 ± 0.06	93
1/2	PBS	--	i.p.biw	1555 ± 244	2.32 ± 0.28	--
1/2	AP163	0.2	i.p.biw	481 ± 215	0.69 ± 0.37	70.2

注：i.p:腹腔注射，biw:每周两次

(2) NPG 小鼠皮下共接种人 CIK 细胞和人 Burkkit's 淋巴瘤 Raji 细胞移植瘤模型

将人 Burkkit's 淋巴瘤 Raji 细胞与培养扩增后的 CIK（Raji 细胞与 CIK 细胞比例 1:1），并与 Matrigel 以体积比为 1:1 的比例混合，共同接种于雌性 NPG 小鼠右侧背部皮下。接种 1 小时后，根据小鼠的体重进行随机分组，每组 4 只，共 4 组。分组当天开始给药，对照组给予相同体积的 PBS 溶液，AP163 实验组的给药剂量分别为 1mg/kg、0.1 mg/kg 和 0.01mg/kg。所有组给药途径均为腹腔注射，每周给药两次，共给药 3 周。每 3 天测量肿瘤体积及体重 1 次，记录小鼠体重和肿瘤体积。实验结束时，动物安乐死，剥取肿瘤称重、拍照，计算相对肿瘤抑制率（TGI%）。

结果见表 5，实验结束时，对照组平均肿瘤体积为 $1750\pm653 \text{ mm}^3$ ；AP163 1mg/kg、0.1 mg/kg 和 0.01mg/kg 试验组的平均肿瘤体积都为 $0.00\pm0.00 \text{ mm}^3$ ，均与溶剂对照组的肿瘤体积有显著性差异（ $P<0.05$ ），三组的 TGI 都为 100%，表明供试双特异性抗体 AP163 有极其显著的抑瘤作用。

表 5、AP163 对 Raji NPG 小鼠模型的药效作用

组别	给药	剂量 (mg/kg)	给药方式	肿瘤体积 (mm ³)	肿瘤重量 (g)	抑瘤率 (%)
对照组	PBS	--	i.p.biw*6	1750±653	2.158±0.945	--
L	AP163	0.01	i.p.biw*6	0	0	100
M	AP163	0.1	i.p.biw*6	0	0	100
H	AP163	1	i.p.biw*6	0	0	100

注：i.p:腹腔注射，biw:每周两次

(3) NPG 小鼠皮下共接种人 CIK 细胞和人骨髓瘤细胞 RPMI-8226 移植瘤模型

将人骨髓瘤细胞 RPMI-8226 与 CIK 共同接种于雌性 NPG 小鼠右侧背部皮下，接种 1 小时后，根据小鼠的体重进行随机分组，当天开始给药。第一组 7 只,其余两组各 8 只，共 3 组。分组当天开始给药，对照组给予相同体积的 PBS 溶液，AP163 实验组的给药剂量分别为 1mg/kg 和 0.1mg/kg。所有组给药途径均为腹腔注射，每两天给药 1 次，连续给药 8 次，末次给药 18 天后结束实验。每周测量肿瘤体积及体重 2 次，记录小鼠体重和肿瘤体积。实验结束时，动物安乐死，剥取肿瘤称重、拍照，计算相对肿瘤抑制率 (TGI%)。

如图 10 所示，实验结束时（首次给药 32 天后），各组动物体重均出现增长，不同组别的动物体重比较无显著性差异 ($P>0.05$)。对照组平均肿瘤体积为 $1647.79\pm 247.90\text{mm}^3$ ；AP163 1mg/kg 试验组的平均肿瘤体积为 $0.00\pm 0.00\text{mm}^3$ ，TGI% 为 100%；AP163 0.1mg/kg 试验组的平均肿瘤体积为 $8.00\pm 5.24\text{mm}^3$ ，TGI% 为 99.51%。实验结果表明，抗体 AP163 有极显著抑瘤作用。在本实验条件下，AP163 在各给药浓度下均显著抑制肿瘤生长，同时 AP163 也呈现较好的安全性，未对实验动物产生明显的毒性作用。

(4) NPG 小鼠皮下共接种人 CIK 细胞和人 Burkkit's 淋巴瘤 Daudi 细胞移植瘤模型

将人 Burkkit's 淋巴瘤 Daudi 细胞与培养扩增后的 CIK (Daudi 细胞密度 5×10^6 个/ml, CIK 细胞密度 1×10^6 个/ml)，并与 Matrigel 以体积比 1:1 的比例混合，共同接种于雌性 NPG 小鼠右侧背部皮下。接种 1h 后，根据小鼠的体重进行随机分组，每组 6 只，共 4 组。分组当天开始给药，对照组给予相同体积的 PBS 溶液，AP163 实验组的给药剂量分别为 1mg/kg、0.2 mg/kg 和 0.04mg/kg。所有组给药途径均为腹腔注射，每两天给药 1 次，共给药 8 次，末次给药 10 天后结束实验。每周测量肿瘤体积及体重 2 次，记录小鼠体重和肿瘤体积。实验结束时，动物安乐死，剥取肿瘤称重、拍照，计算相对肿瘤抑制率 (TGI%)。

结果见图 11，实验结束时（首次给药 25 天后），各组动物体重均出现增长，与对照组比较无显著性差异 ($P>0.05$)。实验结束时，对照组平均肿瘤体积为 $970.83\pm 165.40\text{mm}^3$ ；AP163 1mg/kg、0.2mg/kg 和 0.04mg/kg

试验组的平均肿瘤体积分别为 $171.99 \pm 32.60 \text{ mm}^3$ 、 $190.82 \pm 53.60 \text{ mm}^3$ 和 $228.68 \pm 44.96 \text{ mm}^3$ ，对应的 TGI% 分别为 82.28%、80.34% 和 76.44%，且与对照组相比抑瘤作用均有显著性差异 ($P < 0.05$)，表明 AP163 在各给药浓度下均显著抑制肿瘤生长，且有较好的安全性，未对实验动物产生明显的毒性作用。

实施例 6、Anti-BCMA \times CD3 双特异性抗体安全性评价试验

评价 AP163 每周给药 2 次，重复静脉输注给予食蟹猴 2 周后的毒性反应情况，为后续的毒性试验确定合适的剂量范围及观察指标。6 只食蟹猴，3 只/性别，分成 3 组，1 只/性别/组，分别给予 0.1、0.5 和 2.5 mg/kg 的 AP163（第 1、2 或 3 组）。输注速度为 30 mL/kg/h，给药容量为 10 mL/kg。所有动物在 14 天（D14）给药期结束后 D15 实施安乐死。

试验期间，周期性的监测动物的临床症状、体重、食量、体温、心电图、血压、临床病理指标（血细胞计数、凝血功能指标和血液生化）、淋巴细胞亚群、细胞因子、药物血浆浓度测定和毒代分析。所有动物均进行大体解剖。大体解剖观察未见明显异常，未进行组织病理学检查。结果表明在本试验条件下，0.1、0.5 和 2.5 mg/kg 的 AP163 每周给药 2 次，重复静脉输注给予食蟹猴 2 周，各动物未见死亡或濒死，各给药组动物第 1 次药后均可见一过性的 Neut、CD3-CD20⁺、TNF- α 、IL-2 和 IL-6 升高和 Lymph、CD3⁺、CD3-CD16⁺/CD56⁺ 降低；最大耐受剂量（MTD） $\geq 2.5 \text{ mg/kg}$ 。

实施例 7、Anti-BCMA \times CD3 双特异性抗体药代动力学试验

试验共使用 6 只食蟹猴（3 只/性别），分成 3 组，1 只/性别/组，分别给予 0.1、0.5 和 2.5 mg/kg 的 AP163。从动物后肢皮下静脉非给药部位采集毒代血样（约 1 mL）至无抗凝剂的管中，第 1~3 组的采血时间点为：每组动物首末次给药前、给药结束药后即刻（ $\pm 1 \text{ min}$ ）、给药开始后 1 h、3 h、6 h、8 h、24 h、48 h、72 h。

离心管（不抗凝）使用前冰水浴保存；血样采集后转移至上述离心管中，然后于 2~8 $^{\circ}\text{C}$ ，3000 \times g 离心 10 min。分离血清样本后分装为 2 份，置于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存。血样采集至离心完成需在 2 小时内完成。

采用 ELISA 方法进行检测分析血清中 AP163 的浓度，采用 WinNonlin 8.0 软件的非房室模型法（NCA）对给药组的动力学参数进行计算，各组药代动力学参数结果见表 6。结果表明，0.1、0.5 和 2.5 mg/kg 剂量组 AP163 的体内半衰期分别为 7.08、8.95 和 11.42 小时。

表 6、AP163 在静脉注射食蟹猴后药代参数计算

剂量 (mg/kg)	参 数						
	t _{1/2} (h)	T _{max} (h)	C _{max} ($\mu\text{g/mL}$)	AUC _{last} (h $\cdot\mu\text{g/mL}$)	AUC _{INF} (h $\cdot\mu\text{g/mL}$)	V _z (mL/kg)	Cl (mL/h/kg)
0.1	7.08	0.66	2.12	20.95	21.14	48.74	4.76
0.5	8.95	1	12.49	120.19	120.64	60.92	4.55
2.5	11.42	0.66	48.08	430.37	431.62	94.45	5.84

虽然说明并描述了本发明的优选例，应理解本领域的技术人员可根据本文的教导做出各种改变，这些改变不违背本发明的范围。

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，本领域技术人员可对本发明做各种修改或改动，这些等价形式同样落后于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权利要求书

1. 一种双特异性抗体，所述双特异性抗体分子由两条相同的多肽链以共价键结合形成四价同源二聚体，每条多肽链包含特异性结合肿瘤抗原 BCMA 的第一单链 Fv、特异性结合效应细胞抗原 CD3 的第二单链 Fv 和 Fc 片段；其中，第一和第二单链 Fv 通过连接肽相连，而第二单链 Fv 与 Fc 片段直接相连或通过连接肽相连。
2. 如权利要求 1 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述 Fc 片段不具有 CDC、ADCC 和 ADCP 效应子功能。
3. 如权利要求 1 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述第一单链 Fv 所包含 VH 结构域和 VL 结构域通过连接肽连接，且所述连接肽的氨基酸序列为 $(GGGGX)_n$ ，X 包含 Ser 或 Ala，n 为 1-5 的自然数；X 优选 Ser，n 优选 3。
4. 如权利要求 1 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述第一单链 Fv 包含：
 - (1) VH 结构域，其包含的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 分别如 SEQ ID NO: 1、2 和 3 所示，或与上述序列至少 80% 相似度或具有一个或更多个氨基酸保守序列取代的序列；和
 - (2) VL 结构域，其包含的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别如 SEQ ID NO: 4、5 和 6 所示，或与上述序列至少 80% 相似度或具有一个或更多个氨基酸保守序列取代的序列。
5. 如权利要求 1 或 4 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述第一单链 Fv 包含：
 - (1) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示的 VH 结构域，或与上述序列至少 80% 相似度或具有一个或更多个氨基酸保守序列取代的序列；和
 - (2) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示的 VL 结构域，或与上述序列至少 80% 相似度或具有一个或更多个氨基酸保守序列取代的序列。
6. 如权利要求 1 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述第二单链 Fv 所包含 VH 结构域和 VL 结构域通过连接肽连接，且所述连接肽的氨基酸序列为 $(GGGGX)_n$ ，X 包含 Ser 或 Ala，n 为 1-5 的自然数；X 优选 Ser，n 优选 3。
7. 如权利要求 1 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述第二单链 Fv 包含：
 - (1) VH 结构域，其包含的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 分别如 SEQ ID NO: 11、12 和 13 所示，或与上述序列至少 80% 相似度或具有一个或更多个氨基酸保守序列取代的序列；和
 - (2) VL 结构域，其包含的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 分别如 SEQ ID NO: 14、15 和 16 所示，或与上述序列至少 80% 相似度或具有一个或更多个氨基酸保守序列取代的序列。
8. 如权利要求 1 或 7 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述第二单链 Fv 包含：
 - (1) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示的 VH 结构域，或与上述序列至少 80% 相似度

或具有一个或更多个氨基酸保守序列取代的序列；和

(2) 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示的 VL 结构域，或与上述序列至少 80% 相似度或具有一个或更多个氨基酸保守序列取代的序列。

9. 如权利要求 1 或 7 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述第二单链 Fv 可与人或食蟹猴或恒河猴的 CD3 特异性结合。

10. 如权利要求 1 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述连接第一单链 Fv 和第二单链 Fv 的连接肽由柔性肽和刚性肽组成；且所述柔性肽包含 2 个或更多个氨基酸，并优选自下列几种氨基酸：Gly(G)、Ser(S)、Ala(A) 和 Thr(T) 任意两个或两个以上的组合；更优地，所述柔性肽包含 G 和 S 残基；最优地，所述柔性肽的氨基酸组成结构通式为 $G_xS_y(GGGGS)_z$ ，其中 x, y 和 z 是大于或等于 0 的整数，且 $x+y+z \geq 1$ ；所述刚性肽来自天然人绒毛膜促性腺激素 β 亚基羧基末端第 118 至 145 位氨基酸组成的全长序列或其截短的片段；优选地，所述刚性肽包含氨基酸序列 SSSSKAPPPS。

11. 如权利要求 10 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述连接肽包含如 SEQ ID NO: 10 所示的氨基酸序列。

12. 如权利要求 1 所述的双特异性抗体，其特征在于，连接所述 Fc 片段与第二单链 Fv 的连接肽包含 1-20 个氨基酸，并优选自下列几种氨基酸：Gly(G)、Ser(S)、Ala(A) 和 Thr(T) 中的任意重复组合；较优选自 Gly(G) 和 Ser(S) 的任意重复组合；更优选地，所述连接肽组成为 $(GGGGS)_n$ ，n=1, 2, 3 或 4。

13. 如权利要求 1 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述 Fc 片段包含来源于人免疫球蛋白重链恒定区的铰链区、CH2 和 CH3 结构域；较优地，Fc 片段选自人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD 和 IgE 的重链恒定区；较优地，Fc 片段选自人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 的重链恒定区；更优地，Fc 片段选自人 IgG1 或 IgG4 的重链恒定区。

14. 如权利要求 13 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述 Fc 片段与其所源自的天然序列相比具有一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加。

15. 如权利要求 13 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述 Fc 片段包含具有降低或消除的效应子功能的氨基酸置换、缺失或添加。

16. 如权利要求 15 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述 Fc 片段包含根据 EU 编号系统确定的 L234A/L235A/P331S 的氨基酸置换。

17. 如权利要求 15 或 16 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述 Fc 片段还包含具有以下一种或多种性质的氨基酸的置换、缺失或添加：

- (1) 与新生儿受体 FcRn 的结合亲和力增强;
- (2) 降低或消除的糖基化;
- (3) 降低或消除的电荷异质性。

18. 如权利要求 17 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述 Fc 片段还包含以下一个或多个氨基酸的置换、缺失或添加:

- (1) 根据 EU 编号系统确定的 M428L、T250Q/M428L、M428L/N434S 或 M252Y/S254T/T256E 的氨基酸置换; 和/或
- (2) 根据 EU 编号系统确定的 N297A 的氨基酸置换; 和/或
- (3) 根据 EU 编号系统确定的 K447 的氨基酸缺失。

19. 如权利要求 17 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述 Fc 片段的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示, 它与其所源自的天然序列相比具有根据 EU 编号系统确定的以下 6 个氨基酸的置换或取代: L234A/L235A/N297A/P331S/ T250Q/M428L; 且缺失或删除了根据 EU 编号系统确定的 K447。

20. 如权利要求 1 所述的双特异性抗体, 其特征在于, 所述双特异性抗体结合人 BCMA 和 CD3, 其氨基酸序列如下:

- (1) SEQ ID NO: 20 所示的序列; 或
- (2) 与 SEQ ID NO: 20 所示的序列相比具有一个或几个置换、缺失或添加的序列; 或
- (3) 与 SEQ ID NO: 20 所示的序列具有至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或 100% 的序列同一性的序列。

21. 一种 DNA 分子, 其特征在于, 编码如权利要求 1-20 任一项所述双特异性抗体。

22. 如权利要求 21 所述的 DNA 分子, 其特征在于, 具有如 SEQ ID NO: 21 所示的核苷酸序列。

23. 一种表达载体, 其特征在于, 所述表达载体包含编码权利要求 21 所述氨基酸的 DNA 分子或权利要求 22 所述 DNA 分子。

24. 一种宿主细胞, 其特征在于, 转化权利要求 23 所述的表达载体, 优选地, 所述宿主细胞为原核细胞或酵母或哺乳动物细胞, 更优选地, 所述宿主细胞为哺乳动物细胞, 更进一步优选地, 所述哺乳动物细胞为 CHO 细胞或 NS0。

25. 一种药物组合物, 所述组合物包含如权利要求 1-20 任一项所述的双特异性抗体以及可药用赋形剂和/或载体和/或稀释剂。

26. 制备如权利要求 1-20 任一项所述双特异性抗体的方法，其包括：

- (a) 获得双特异性抗体的融合基因，构建双特异性抗体的表达载体；
- (b) 通过基因工程方法将上述表达载体转染到宿主细胞中；
- (c) 在允许产生所述双特异性抗体的条件下培养上述宿主细胞；
- (d) 分离、纯化产生的所述抗体；

27. 如权利要求 1-20 任一项所述双特异性抗体在用于治疗或改善选自浆细胞障碍、其他与 BCMA 表达有关的 B 细胞障碍和自身免疫性疾病的药物中的用途，其中所述浆细胞障碍包括但不限于多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、浆细胞白血病、巨球蛋白血症、淀粉样变性、华氏巨球蛋白血症、孤立性骨浆细胞瘤、髓外浆细胞瘤、骨硬化性骨髓瘤、重链病、意义不明确的单克隆丙种球蛋白病及郁积型多发性骨髓瘤。

28. 用于治疗权利要求 27 所述的疾病的组合产品，其中所述的双特异性抗体为 AP163。

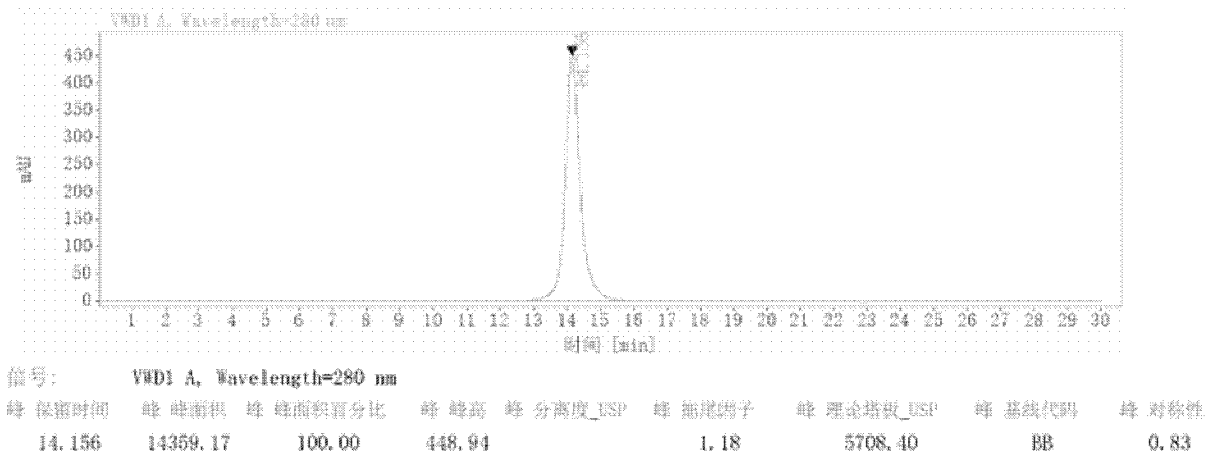


图 1

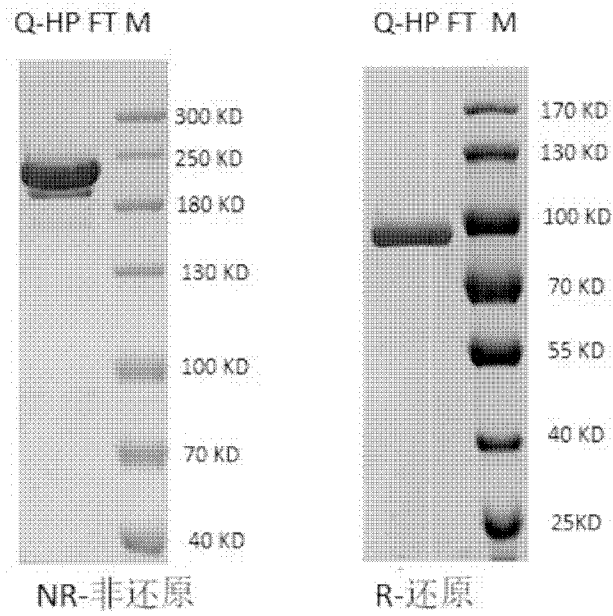


图 2

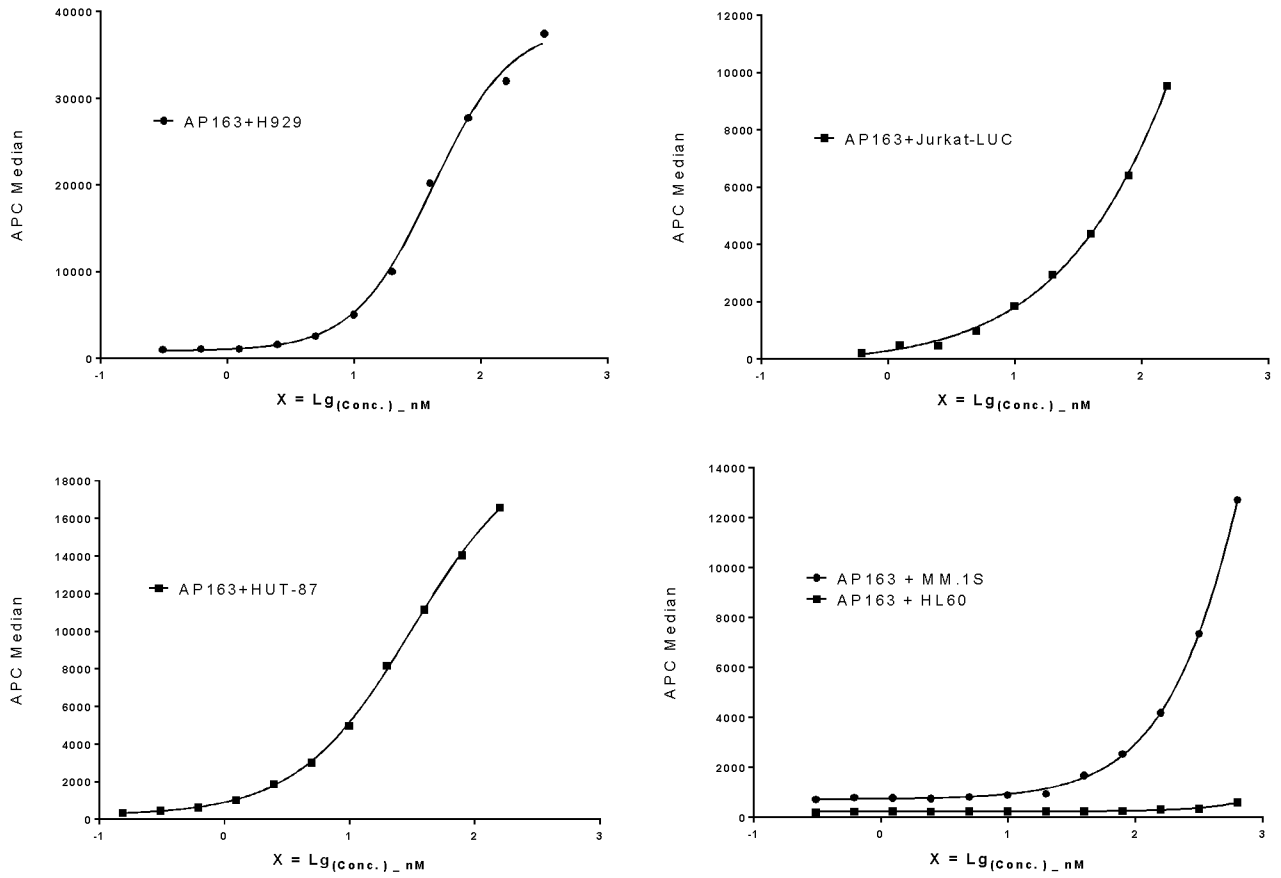


图 3

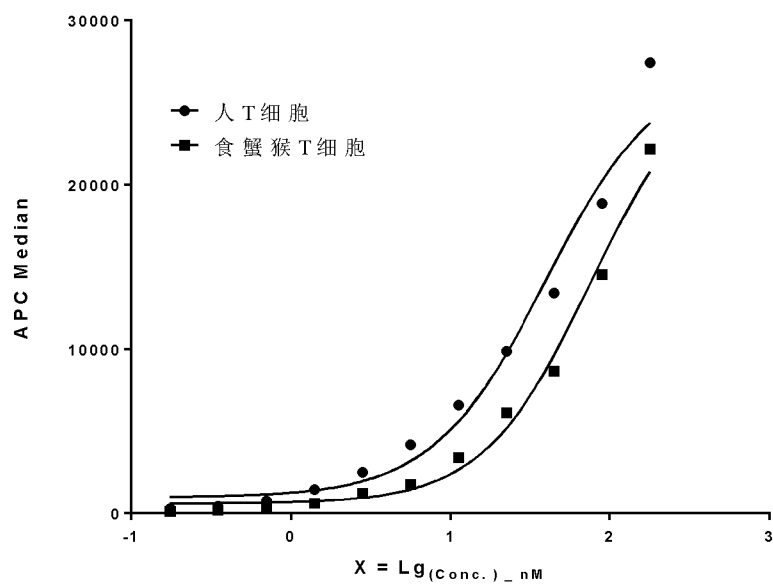


图 4

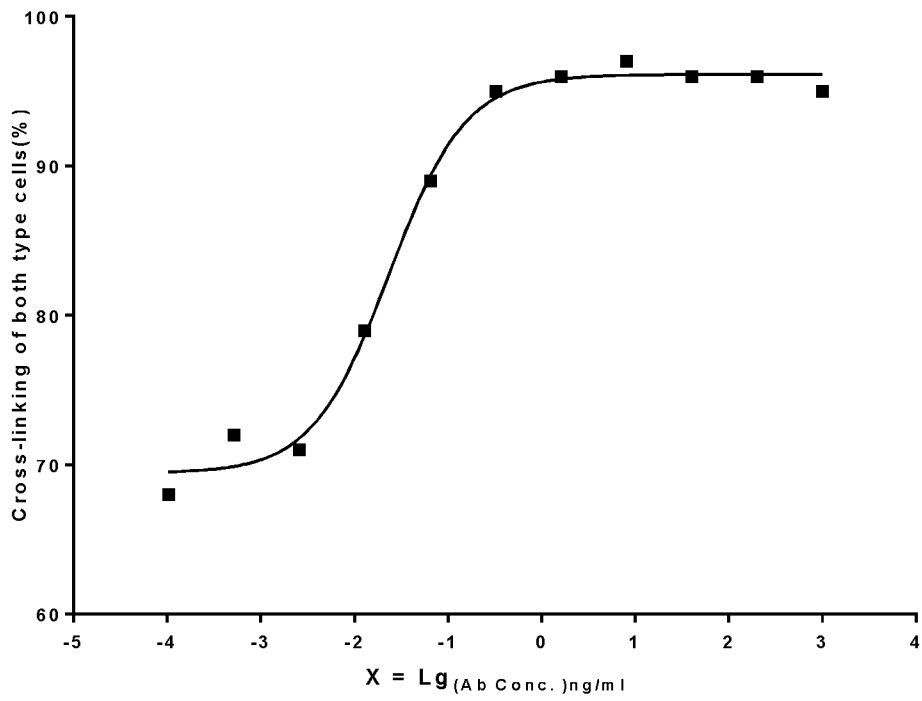


图 5

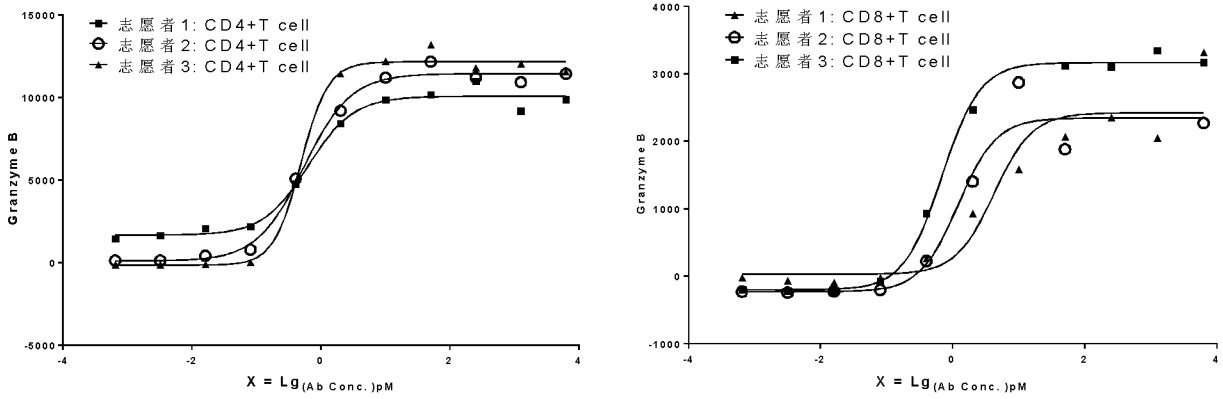


图 6

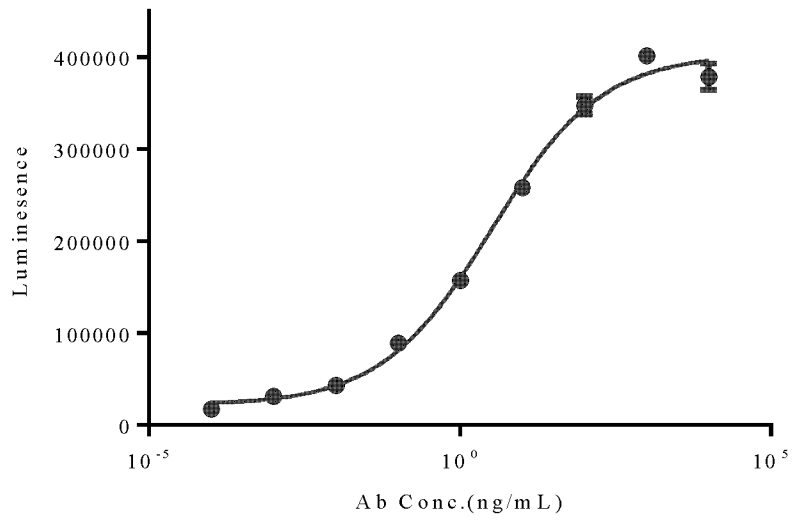


图 7

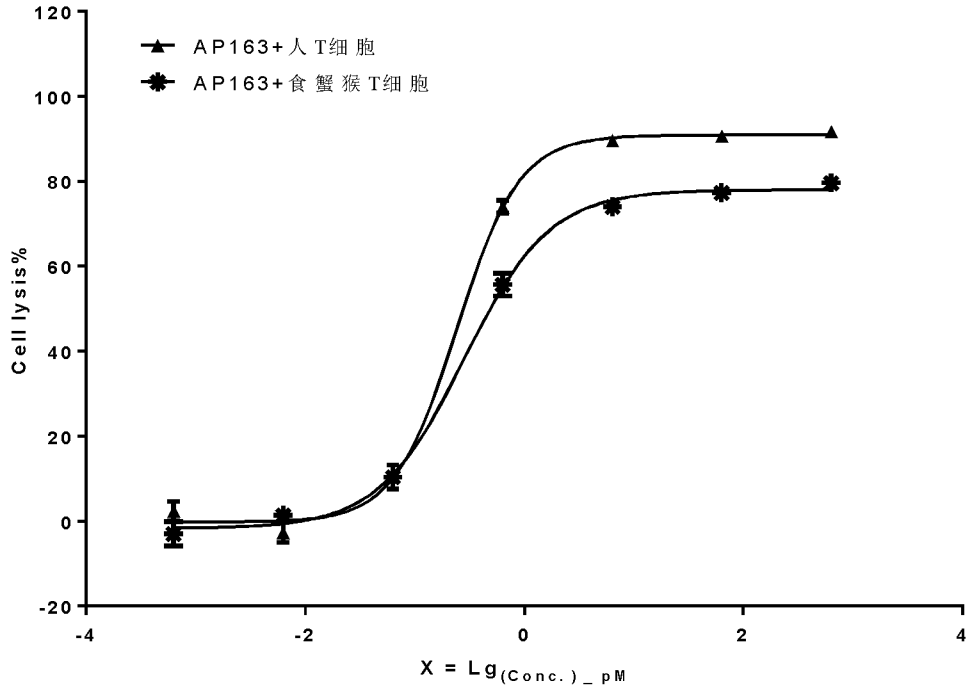


图 8

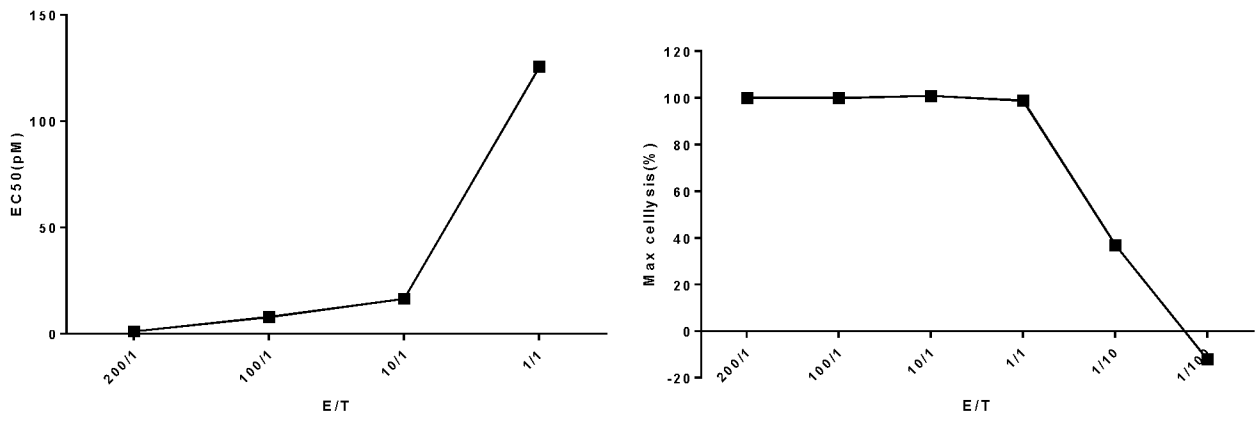


图 9

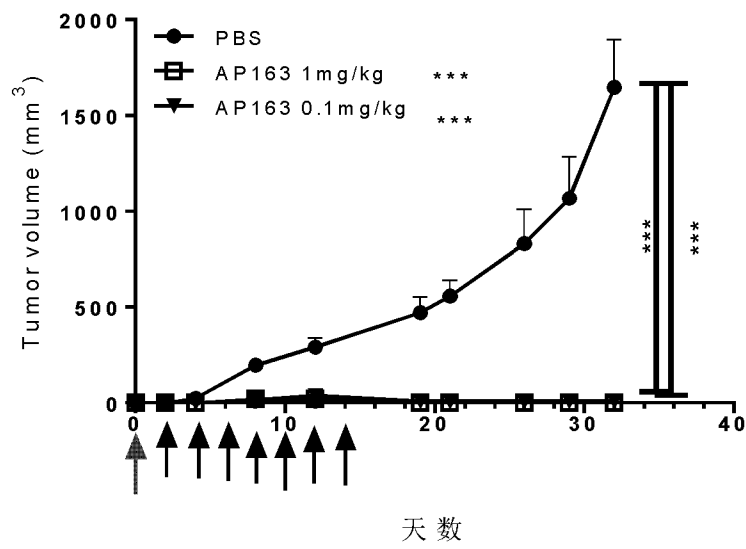


图 10

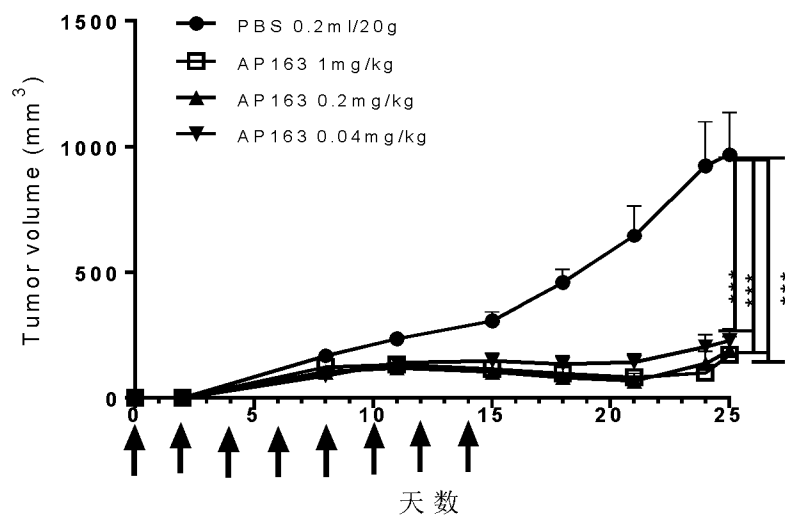


图 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/108057

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28 (2006.01) i; A61P 37/00 (2006.01) i; A61P 35/02 (2006.01) i; A61K 39/395 (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, A61K, 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)

CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, 万方, WANFANG, EBI, NCBI, 百度, BAIDU, ISI Web of Knowledge, PUBMED: 安源医药科技 (上海) 有限公司, 山东新时代药业有限公司, 李强, 贾世香, 赵丽丽, 张贵民, 马心鲁, 严源, 李振宇, 胡兴霞, 张玉华, 李斌, 双特异性抗体, bispecific antibody, BiAb, CD3, BCMA, AP163, B 细胞成熟抗原, Fc, dimer, dipolymer, linker, Fv, 单链

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 105658668 A (UCL BUSINESS PLC), 08 June 2016 (08.06.2016), claims 1-27, and description, paragraph [0010]	1-28
Y	CN 107759694 A (ANYUAN PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY (SHANGHAI) CO., LTD.), 06 March 2018 (06.03.2018), claims 1-4, and description, paragraphs [0037] and [0040]	1-28
Y	CN 108474793 A (GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY DEVELOPMENT LIMITED), 31 August 2018 (31.08.2018), sequences 1-6, 11 and 17	4-5, 20-28
Y	CN 102741423 A (ABBOTT LABORATORIES), 17 October 2012 (17.10.2012), sequences 98 and 99	7-8, 20-28
Y	CN 104114578 A (AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH et al.), 22 October 2014 (22.10.2014), claims 1-26	1-28
Y	CN 105980406 A (AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH et al.), 28 September 2016 (28.09.2016), claims 1-25	1-28

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 10 December 2019	Date of mailing of the international search report 27 December 2019
---	--

<p>Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451</p>	<p>Authorized officer LI, Juanjuan Telephone No. 86-(10)-53962095</p>
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/108057

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2017134134 A1 (AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH et al.), 10 August 2017 (10.08.2017), claims 1-20	1-28
Y	WO 2017223111 A1 (TENEObIO, INC.), 28 December 2017 (28.12.2017), claims 1-38	1-28
Y	WO 2012066058 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH et al.), 24 May 2012 (24.05.2012), claims 1-17	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/108057

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 105658668 A	08 June 2016	WO 2015052536 A1	16 April 2015
		GB 201317928 D0	27 November 2013
		EP 3055330 A1	17 August 2016
		JP 2016537966 A	08 December 2016
		JP 6557657 B2	07 August 2019
CN 107759694 A	06 March 2018	US 2016311915 A1	27 October 2016
		CN 110229238 A	13 September 2019
		CA 3059662 A1	22 February 2018
		CN 106317226 B	05 September 2017
		CN 107759696 A	06 March 2018
		CN 106317226 A	11 January 2017
		CA 3059994 A1	22 February 2018
		CN 107995914 A	04 May 2018
		CN 107759697 A	06 March 2018
		CN 108137708 A	08 June 2018
CN 108474793 A	31 August 2018	WO 2018032785 A1	22 February 2018
		CN 108137708 B	11 October 2019
		WO 2018032786 A1	22 February 2018
		BR 112018008799 A2	15 January 2019
		JP 2019501369 A	17 January 2019
		AU 2016347516 A1	10 May 2018
		KR 20180077193 A	06 July 2018
		CA 3002759 A1	04 May 2017
		WO 2017072716 A1	04 May 2017
		EP 3368903 A1	05 September 2018
CN 102741423 A	17 October 2012	US 2018306791 A1	25 October 2018
		IL 219205 D0	28 June 2012
		EC SP12011911 A	31 July 2012
		AU 2010310565 B2	23 May 2013
		KR 20130004563 A	11 January 2013
		RU 2012121189 A	27 November 2013
		CR 20120267 A	14 August 2012
		CA 2778176 A1	28 April 2011
		DO P2012000122 A	15 September 2013
		UY 32965 A	28 February 2011
		WO 2011050262 A3	30 June 2011
		PE 12492012 A1	06 October 2012
		PE 20121249 A1	06 October 2012
		EP 2491129 A4	29 May 2013
		DO P2012000117 A	31 July 2012
		MX 2012004775 A	01 June 2012
		WO 2011050262 A2	28 April 2011
		ZA 201203688 B	23 December 2014
		EP 2491129 A2	29 August 2012
		AU 2010310565 A1	31 May 2012
		JP 2013507969 A	07 March 2013
		BR 112012009043 A2	08 September 2015
		US 2010260668 A1	14 October 2010
AR 078728 A1	30 November 2011		
TW 201127956 A	16 August 2011		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/108057

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104114578 A	22 October 2014	PE 15642014 A1	29 November 2014
		US 2014348837 A1	27 November 2014
		US 9598500 B2	21 March 2017
		PH 12014501091 A1	28 July 2014
		JP 2014534242 A	18 December 2014
		MA 35450 B1	01 September 2014
		NZ 622087 A	24 June 2016
		AP 201407529 A0	31 March 2014
		WO 2013072415 A1	23 May 2013
		IL 232636 D0	30 June 2014
		IL 232603 D0	30 June 2014
		JP 6231007 B2	15 November 2017
		CN 104114578 B	16 October 2018
		TN 2014000097 A1	01 July 2015
		MX 349396 B	26 July 2017
		EP 2780375 A1	24 September 2014
		JP 6378087 B2	22 August 2018
		AP 201407529 D0	31 March 2014
		LT 2780375 T	11 November 2019
		UY 34453 A	28 June 2013
		EP 2780374 A1	24 September 2014
		BR 112014010940 A2	16 May 2017
		CN 104169300 A	26 November 2014
		EA 201490932 A1	30 September 2014
		AU 2012327203 A1	30 May 2013
		US 2015023967 A1	22 January 2015
		JP 2015504306 A	12 February 2015
		EA 201490931 A1	29 August 2014
		MX 2014005851 A	19 January 2015
		KR 20140105757 A	02 September 2014
		JP 2018050627 A	05 April 2018
		CL 2014001254 A1	10 October 2014
		GE P20186928 B	26 November 2018
		BR 112014010630 A2	25 April 2017
		SG 11201401729P A	26 September 2014
		WO 2013072406 A1	23 May 2013
		TW 201326214 A	01 July 2013
		CA 2849196 A1	23 May 2013
		PE 20141564 A1	29 November 2014
		US 2013156770 A1	20 June 2013
		UA 116766 C2	10 May 2018
EP 2780375 B1	11 September 2019		
AR 088883 A1	16 July 2014		
US 9340621 B2	17 May 2016		
TN 2014000121 A1	01 July 2015		
SG 10201704483R A	28 July 2017		
US 9150664 B2	06 October 2015		
SG 11201400671 Y A	28 April 2014		
CN 109485729 A	19 March 2019		
CN 105980406 A	28 September 2016	TW I646107 B	01 January 2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/108057

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2017134134 A1	10 August 2017	BR 112015020277 A2	10 October 2017
		EA 201591692 A1	29 January 2016
		MX 2015012862 A	31 May 2016
		WO 2014140248 A1	18 September 2014
		UY 35456 A	30 May 2014
		PE 19202015 A1	20 December 2015
		JP 2019129830 A	08 August 2019
		UA 118757 C2	11 March 2019
		HK 1223629 A1	04 August 2017
		PE 20151920 A1	20 December 2015
		ZA 201505209 B	31 July 2019
		JP 2016511277 A	14 April 2016
		SG 11201506184W A	29 September 2015
		CL 2015002742 A1	03 March 2017
		AU 2019200493 A1	14 February 2019
		AU 2014230217 A1	06 August 2015
		EP 2970472 A1	20 January 2016
		AR 095374 A1	14 October 2015
		AU 2014230217 B2	07 February 2019
		PH 12015501672 A1	12 October 2015
		US 2016176973 A1	23 June 2016
		IL 241332 D0	30 November 2015
		TW 201506042 A	16 February 2015
		JP 6543197 B2	17 July 2019
		KR 20150130412 A	23 November 2015
		CA 2899830 A1	18 September 2014
		US 10301391 B2	28 May 2019
		CN 109219617 A	15 January 2019
		PE 15362018 A1	26 September 2018
		CO 2018007552 A2	31 July 2018
		UY 37106 A	31 August 2017
		JP 2017186301 A	12 October 2017
		AU 2017216230 A1	19 July 2018
PH 12018501536 A1	15 May 2019		
KR 20180103084 A	18 September 2018		
BR 112018015715 A2	05 February 2019		
EP 3411402 A1	12 December 2018		
EA 201891755 A1	28 February 2019		
CR 20180420 A	05 December 2018		
US 2017218077 A1	03 August 2017		
TW 201731874 A	16 September 2017		
CA 3010704 A1	10 August 2017		
CL 2018002057 A1	15 February 2019		
SG 11201805770U A	30 August 2018		
PE 20181536 A1	26 September 2018		
AR 107521 A1	09 May 2018		
MX 2018009108 A	11 March 2019		
WO 2017223111 A1	28 December 2017	CN 109641049 A	16 April 2019
		IL 263840 D0	31 January 2019
		JP 2019523017 A	22 August 2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/108057

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2012066058 A1	24 May 2012	BR 112018076767 A2	02 April 2019
		KR 20190053835 A	20 May 2019
		US 2019263904 A1	29 August 2019
		SG 11201811490X A	30 January 2019
		CA 3029209 A1	28 December 2017
		AU 2017281034 A1	24 January 2019
		EP 3471773 A1	24 April 2019
		US 2013273055 A1	17 October 2013
		EP 2640750 A1	25 September 2013
		JP 2014500879 A	16 January 2014
		JP 2017093437 A	01 June 2017
		JP 2019030338 A	28 February 2019

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/108057

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 16/28(2006.01)i; A61P 37/00(2006.01)i; A61P 35/02(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i</p> <p>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</p>																																			
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K, A61P, A61K, C12N</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>CNABS, SIPOABS, DWPI, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, 万方, EBI, NCBI, 百度, ISI Web of Knowledge, PUBMED:安源医药科技(上海)有限公司, 山东新时代药业有限公司, 李强, 贾世香, 赵丽丽, 张贵民, 马心鲁, 严源, 李振宇, 胡兴霞, 张玉华, 李斌, 双特异性抗体, bispecific antibody, BiAb, CD3, BCMA, AP163, B细胞成熟抗原, Fc, dimer, dipolymer, linker, Fv, 单链</p>																																			
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>CN 105658668 A (UCL商务股份有限公司) 2016年 6月 8日 (2016 - 06 - 08) 权利要求1-27, 说明书第【0010】段</td> <td>1-28</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 107759694 A (安源医药科技上海有限公司) 2018年 3月 6日 (2018 - 03 - 06) 权利要求1-4, 说明书第【0037】、【0040】段</td> <td>1-28</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 108474793 A (葛兰素史密斯克莱知识产权发展有限公司) 2018年 8月 31日 (2018 - 08 - 31) 序列1-6、11、17</td> <td>4-5, 20-28</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 102741423 A (雅培制药有限公司) 2012年 10月 17日 (2012 - 10 - 17) 序列98、99</td> <td>7-8, 20-28</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 104114578 A (安进研发慕尼黑股份有限公司 等) 2014年 10月 22日 (2014 - 10 - 22) 权利要求1-26</td> <td>1-28</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 105980406 A (安进研发慕尼黑股份有限公司 等) 2016年 9月 28日 (2016 - 09 - 28) 权利要求1-25</td> <td>1-28</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <table border="0"> <tr> <td>* 引用文件的具体类型:</td> <td>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了解发明之理论或原理的在后文件</td> </tr> <tr> <td>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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)</td> <td>“&” 同族专利的文件</td> </tr> <tr> <td>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td></td> </tr> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	CN 105658668 A (UCL商务股份有限公司) 2016年 6月 8日 (2016 - 06 - 08) 权利要求1-27, 说明书第【0010】段	1-28	Y	CN 107759694 A (安源医药科技上海有限公司) 2018年 3月 6日 (2018 - 03 - 06) 权利要求1-4, 说明书第【0037】、【0040】段	1-28	Y	CN 108474793 A (葛兰素史密斯克莱知识产权发展有限公司) 2018年 8月 31日 (2018 - 08 - 31) 序列1-6、11、17	4-5, 20-28	Y	CN 102741423 A (雅培制药有限公司) 2012年 10月 17日 (2012 - 10 - 17) 序列98、99	7-8, 20-28	Y	CN 104114578 A (安进研发慕尼黑股份有限公司 等) 2014年 10月 22日 (2014 - 10 - 22) 权利要求1-26	1-28	Y	CN 105980406 A (安进研发慕尼黑股份有限公司 等) 2016年 9月 28日 (2016 - 09 - 28) 权利要求1-25	1-28	* 引用文件的具体类型:	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了解发明之理论或原理的在后文件	“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“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	“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“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	“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)	“&” 同族专利的文件	“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	
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																																	
Y	CN 105658668 A (UCL商务股份有限公司) 2016年 6月 8日 (2016 - 06 - 08) 权利要求1-27, 说明书第【0010】段	1-28																																	
Y	CN 107759694 A (安源医药科技上海有限公司) 2018年 3月 6日 (2018 - 03 - 06) 权利要求1-4, 说明书第【0037】、【0040】段	1-28																																	
Y	CN 108474793 A (葛兰素史密斯克莱知识产权发展有限公司) 2018年 8月 31日 (2018 - 08 - 31) 序列1-6、11、17	4-5, 20-28																																	
Y	CN 102741423 A (雅培制药有限公司) 2012年 10月 17日 (2012 - 10 - 17) 序列98、99	7-8, 20-28																																	
Y	CN 104114578 A (安进研发慕尼黑股份有限公司 等) 2014年 10月 22日 (2014 - 10 - 22) 权利要求1-26	1-28																																	
Y	CN 105980406 A (安进研发慕尼黑股份有限公司 等) 2016年 9月 28日 (2016 - 09 - 28) 权利要求1-25	1-28																																	
* 引用文件的具体类型:	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了解发明之理论或原理的在后文件																																		
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“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																																		
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“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																																		
“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)	“&” 同族专利的文件																																		
“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																																			
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																																		
2019年 12月 10日	2019年 12月 27日																																		
ISA/CN的名称和邮寄地址	授权官员																																		
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	李娟娟																																		
传真号 (86-10)62019451	电话号码 86-(10)-53962095																																		

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
Y	WO 2017134134 A1 (AMGEN RESEARCH MUNICH GMBH等) 2017年 8月 10日 (2017 - 08 - 10) 权利要求1-20	1-28
Y	WO 2017223111 A1 (TENEObIO, INC.) 2017年 12月 28日 (2017 - 12 - 28) 权利要求1-38	1-28
Y	WO 2012066058 A1 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH 等) 2012年 5月 24日 (2012 - 05 - 24) 权利要求1-17	1-28

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/108057

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)
CN	105658668	A	2016年 6月 8日	WO	2015052536	A1	2015年 4月 16日
				GB	201317928	D0	2013年 11月 27日
				EP	3055330	A1	2016年 8月 17日
				JP	2016537966	A	2016年 12月 8日
				JP	6557657	B2	2019年 8月 7日
				US	2016311915	A1	2016年 10月 27日
				-----	-----	-----	-----
CN	107759694	A	2018年 3月 6日	CN	110229238	A	2019年 9月 13日
				CA	3059662	A1	2018年 2月 22日
				CN	106317226	B	2017年 9月 5日
				CN	107759696	A	2018年 3月 6日
				CN	106317226	A	2017年 1月 11日
				CA	3059994	A1	2018年 2月 22日
				CN	107995914	A	2018年 5月 4日
				CN	107759697	A	2018年 3月 6日
				CN	108137708	A	2018年 6月 8日
				WO	2018032785	A1	2018年 2月 22日
				CN	108137708	B	2019年 10月 11日
				WO	2018032786	A1	2018年 2月 22日
				-----	-----	-----	-----
CN	108474793	A	2018年 8月 31日	BR	112018008799	A2	2019年 1月 15日
				JP	2019501369	A	2019年 1月 17日
				AU	2016347516	A1	2018年 5月 10日
				KR	20180077193	A	2018年 7月 6日
				CA	3002759	A1	2017年 5月 4日
				WO	2017072716	A1	2017年 5月 4日
				EP	3368903	A1	2018年 9月 5日
				US	2018306791	A1	2018年 10月 25日
				-----	-----	-----	-----
CN	102741423	A	2012年 10月 17日	IL	219205	D0	2012年 6月 28日
				EC	SP12011911	A	2012年 7月 31日
				AU	2010310565	B2	2013年 5月 23日
				KR	20130004563	A	2013年 1月 11日
				RU	2012121189	A	2013年 11月 27日
				CR	20120267	A	2012年 8月 14日
				CA	2778176	A1	2011年 4月 28日
				DO	P2012000122	A	2013年 9月 15日
				UY	32965	A	2011年 2月 28日
				WO	2011050262	A3	2011年 6月 30日
				PE	12492012	A1	2012年 10月 6日
				PE	20121249	A1	2012年 10月 6日
				EP	2491129	A4	2013年 5月 29日
				DO	P2012000117	A	2012年 7月 31日
				MX	2012004775	A	2012年 6月 1日
				WO	2011050262	A2	2011年 4月 28日
				ZA	201203688	B	2014年 12月 23日
				EP	2491129	A2	2012年 8月 29日
				AU	2010310565	A1	2012年 5月 31日
				JP	2013507969	A	2013年 3月 7日
				BR	112012009043	A2	2015年 9月 8日
				US	2010260668	A1	2010年 10月 14日
				AR	078728	A1	2011年 11月 30日
TW	201127956	A	2011年 8月 16日				

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/108057

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)
CN	104114578	A	2014年 10月 22日	PE	15642014	A1	2014年 11月 29日
				US	2014348837	A1	2014年 11月 27日
				US	9598500	B2	2017年 3月 21日
				PH	12014501091	A1	2014年 7月 28日
				JP	2014534242	A	2014年 12月 18日
				MA	35450	B1	2014年 9月 1日
				NZ	622087	A	2016年 6月 24日
				AP	201407529	A0	2014年 3月 31日
				WO	2013072415	A1	2013年 5月 23日
				IL	232636	D0	2014年 6月 30日
				IL	232603	D0	2014年 6月 30日
				JP	6231007	B2	2017年 11月 15日
				CN	104114578	B	2018年 10月 16日
				TN	2014000097	A1	2015年 7月 1日
				MX	349396	B	2017年 7月 26日
				EP	2780375	A1	2014年 9月 24日
				JP	6378087	B2	2018年 8月 22日
				AP	201407529	D0	2014年 3月 31日
				LT	2780375	T	2019年 11月 11日
				UY	34453	A	2013年 6月 28日
				EP	2780374	A1	2014年 9月 24日
				BR	112014010940	A2	2017年 5月 16日
				CN	104169300	A	2014年 11月 26日
				EA	201490932	A1	2014年 9月 30日
				AU	2012327203	A1	2013年 5月 30日
				US	2015023967	A1	2015年 1月 22日
				JP	2015504306	A	2015年 2月 12日
				EA	201490931	A1	2014年 8月 29日
				MX	2014005851	A	2015年 1月 19日
				KR	20140105757	A	2014年 9月 2日
				JP	2018050627	A	2018年 4月 5日
				CL	2014001254	A1	2014年 10月 10日
				GE	P20186928	B	2018年 11月 26日
				BR	112014010630	A2	2017年 4月 25日
				SG	11201401729P	A	2014年 9月 26日
				WO	2013072406	A1	2013年 5月 23日
				TW	201326214	A	2013年 7月 1日
				CA	2849196	A1	2013年 5月 23日
				PE	20141564	A1	2014年 11月 29日
				US	2013156770	A1	2013年 6月 20日
				UA	116766	C2	2018年 5月 10日
				EP	2780375	B1	2019年 9月 11日
				AR	088883	A1	2014年 7月 16日
				US	9340621	B2	2016年 5月 17日
				TN	2014000121	A1	2015年 7月 1日
				SG	10201704483R	A	2017年 7月 28日
				US	9150664	B2	2015年 10月 6日
				SG	11201400671Y	A	2014年 4月 28日
				CN	109485729	A	2019年 3月 19日
CN	105980406	A	2016年 9月 28日	TW	I646107	B	2019年 1月 1日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/108057

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)
		BR 112015020277 A2	2017年 10月 10日
		EA 201591692 A1	2016年 1月 29日
		MX 2015012862 A	2016年 5月 31日
		WO 2014140248 A1	2014年 9月 18日
		UY 35456 A	2014年 5月 30日
		PE 19202015 A1	2015年 12月 20日
		JP 2019129830 A	2019年 8月 8日
		UA 118757 C2	2019年 3月 11日
		HK 1223629 A1	2017年 8月 4日
		PE 20151920 A1	2015年 12月 20日
		ZA 201505209 B	2019年 7月 31日
		JP 2016511277 A	2016年 4月 14日
		SG 11201506184W A	2015年 9月 29日
		CL 2015002742 A1	2017年 3月 3日
		AU 2019200493 A1	2019年 2月 14日
		AU 2014230217 A1	2015年 8月 6日
		EP 2970472 A1	2016年 1月 20日
		AR 095374 A1	2015年 10月 14日
		AU 2014230217 B2	2019年 2月 7日
		PH 12015501672 A1	2015年 10月 12日
		US 2016176973 A1	2016年 6月 23日
		IL 241332 D0	2015年 11月 30日
		TW 201506042 A	2015年 2月 16日
		JP 6543197 B2	2019年 7月 17日
		KR 20150130412 A	2015年 11月 23日
		CA 2899830 A1	2014年 9月 18日
WO 2017134134 A1	2017年 8月 10日	US 10301391 B2	2019年 5月 28日
		CN 109219617 A	2019年 1月 15日
		PE 15362018 A1	2018年 9月 26日
		CO 2018007552 A2	2018年 7月 31日
		UY 37106 A	2017年 8月 31日
		JP 2017186301 A	2017年 10月 12日
		AU 2017216230 A1	2018年 7月 19日
		PH 12018501536 A1	2019年 5月 15日
		KR 20180103084 A	2018年 9月 18日
		BR 112018015715 A2	2019年 2月 5日
		EP 3411402 A1	2018年 12月 12日
		EA 201891755 A1	2019年 2月 28日
		CR 20180420 A	2018年 12月 5日
		US 2017218077 A1	2017年 8月 3日
		TW 201731874 A	2017年 9月 16日
		CA 3010704 A1	2017年 8月 10日
		CL 2018002057 A1	2019年 2月 15日
		SG 11201805770U A	2018年 8月 30日
		PE 20181536 A1	2018年 9月 26日
		AR 107521 A1	2018年 5月 9日
		MX 2018009108 A	2019年 3月 11日
WO 2017223111 A1	2017年 12月 28日	CN 109641049 A	2019年 4月 16日
		IL 263840 D0	2019年 1月 31日
		JP 2019523017 A	2019年 8月 22日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/108057

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)
				BR	112018076767	A2	2019年 4月 2日
				KR	20190053835	A	2019年 5月 20日
				US	2019263904	A1	2019年 8月 29日
				SG	11201811490X	A	2019年 1月 30日
				CA	3029209	A1	2017年 12月 28日
				AU	2017281034	A1	2019年 1月 24日
				EP	3471773	A1	2019年 4月 24日
WO	2012066058	A1	2012年 5月 24日	US	2013273055	A1	2013年 10月 17日
				EP	2640750	A1	2013年 9月 25日
				JP	2014500879	A	2014年 1月 16日
				JP	2017093437	A	2017年 6月 1日
				JP	2019030338	A	2019年 2月 28日