(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
2023 年 3 月 16 日 (16.03.2023)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2023/036326 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/118334

(22) 国际申请日: 2022 年 9 月 13 日 (13.09.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202111069892.7 2021年9月13日 (13.09.2021) CN

(71) 申请人: 江苏先声药业有限公司 (**JIANGSU SIMCERE PHARMACEUTICAL CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国江苏省南京市玄武区玄武大道699-18号, Jiangsu 210042 (CN)。

(72) 发明人: 王琼 (**WANG, Qiong**); 中国上海市浦东新区芙蓉花路118弄, Shanghai 201318 (CN)。 付雅媛 (**FU, Yayuan**); 中国上海市浦东新区芙蓉花路118弄, Shanghai 201318 (CN)。 卫培培 (**WEI, Peipei**); 中国上海市浦东新区芙蓉花路118弄, Shanghai 201318 (CN)。 曹卓晓 (**CAO, Zhuoxiao**); 中国上海市浦东新区芙蓉花路118弄, Shanghai 201318 (CN)。 唐任宏 (**TANG, Renhong**); 中国上海市浦东新区芙蓉花路118弄, Shanghai 201318 (CN)。 任晋生 (**REN, Jinsheng**); 中国江苏省南京市玄武区玄武大道699-18号, Jiangsu 210042 (CN)。

(74) 代理人: 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 (**INSIGHT INTELLECTUAL PROPERTY LIMITED**); 中国北京市朝阳区建外大街光华东里8号中海广场中楼7层, Beijing 100020 (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, CV, 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))。

(54) **Title:** ANTI-HUMAN CD3 ANTIBODY AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 抗人CD3抗体及其应用

(57) **Abstract:** Provided are an anti-human CD3 antibody and the use thereof. Specifically, provided are an antibody specifically binding to human CD3 or an antigen binding fragment thereof, a multi-specific antigen binding molecule, an isolated nucleic acid molecule, a vector, a cell and an immune effector cell thereof, a method for preparing the antibody or the antigen binding fragment thereof, the multi-specific antigen binding molecule and the immune effector cell, a pharmaceutical composition, the pharmaceutical use and a method for treating diseases.

(57) 摘要: 提供了抗人CD3抗体及其用途，具体涉及特异性结合人CD3的抗体或其抗原结合片段、多特异性抗原结合分子、分离的核酸分子、载体、细胞、免疫效应细胞，所述抗体或其抗原结合片段、所述多特异性抗原结合分子和所述免疫效应细胞的制备方法，药物组合物，制药用途和疾病的治疗方法。

WO 2023/036326 A1

抗人CD3抗体及其应用

相关申请的交叉引用

本申请要求于2021年9月13日向中国国家知识产权局提交的、发明名称为“抗人CD3抗体及其应用”、申请号为CN202111069892.7的发明专利申请的优先权，其全部内容通过援引整体并入本文中。

技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体而言，涉及抗人CD3抗体及其应用。

背景技术

T细胞(抗原)受体(T cell receptor，TCR)是T细胞表面的特异性受体，存在两种亚单位TCRαβ和TCRγδ，主要功能是识别并结合MHC分子提呈的抗原，TCR的胞浆区非常短，单独TCR无法传导信号，需要借助CD3分子。CD3分子是T细胞膜上的重要分化抗原，主要由ε、δ、γ和ζ四种链组成。在CD3-TCR复合体中，CD3γ、δ和ε以两种非共价键形式的γε和δε异源二聚体存在，ζ链绝大多数以同源二聚体即ζ-ζ形式存在。CD3ε、CD3δ、CD3γ和CD3ζ的细胞质结构域中都包含了保守的基于免疫受体酪氨酸的激活基序(immune receptor tyrosine-based activation motif，ITAM)。其中CD3ζ具有三个ITAM，而其他CD3链各包含一个ITAM，不同的抗原刺激能够诱导TCR的10个ITAM发生不同的磷酸化，最终触发不同的下游信号通路。CD3ε的细胞质结构域在近膜区域有一个富含碱性氨基酸的序列(basic residue-rich sequence，BRS)，然后是一个非冗余的富含脯氨酸残基的序列(proline residue-rich sequence，PRS)以及一个ITAM。因此，CD3ε亚基中的BRS可以通过离子相互作用有效地招募Lck以启动TCR磷酸化。已证明针对CD3ε的某些抗体可诱导TCR信号传导，而其他抗体则不能。基于CD3在TCR信号转导和和免疫应答方面的重要作用，开发针对CD3的抗体具有重要意义。

另外，多特异性抗体通过与肿瘤细胞上的靶抗原和T细胞上的CD3结合，形成不依赖于TCR的人为免疫突触并避开HLA的限制。但是CD3抗体存在发生细胞因子风暴的风险。Faroudi等人观察到靶细胞裂解的激活阈值比细胞因子释放的激活阈值敏感1000倍以上，这种差异主要是由于靶细胞表面抗原浓度和pMHC:TCR复合物数量不同导致的。低亲和力有助于通过不断的快速结合和解离使一些肽-MHC复合物连续触发许多TCR，这种连续触发对于维持一定时间内的信号传递至关重要，其允许T细胞最终达到激活阈值。而高亲和力的抗CD3抗体可能较难解离，不能连续触发TCR，而不能有效地刺激T细胞，这表明合适亲和力范围的抗体可能会更有效地通过TCR信号传递刺激T细胞。

因此，开发新型抗CD3抗体仍然存在很大的需求。

发明内容

本申请提供了特异性结合人CD3的抗体或其抗原结合片段、多特异性抗原结合分子、分离的核酸分子、载体、细胞、免疫效应细胞，所述抗体或其抗原结合片段、所述多特异性抗原结合分子和所述免疫效应细胞的制备方法，药物组合物，制药用途和疾病的治疗方法。

在第一方面，本申请提供了特异性结合人 CD3 的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和/或轻链可变区，所述重链可变区包含 HCDR1-3，所述轻链可变区包含 LCDR1-3，所述 HCDR1-3 和/或所述 LCDR1-3 选自表 10 或表 18。

在第一方面的一些实施方案中，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO:31-33、44-46、57-59、70-72、83-85、96-98 和 109-111 中任一项所示的序列，或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个氨基酸突变或差异的序列；和

所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO:34-36、137、47-49、60-62、73-75、86-88、99-101 和 112-114 中任一项所示的序列，或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个氨基酸突变或差异的序列；和

所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO:37-38、138-139、50-51、142-143、63-64、76-77、89-90、102-103 和 115-116 中任一项所示的序列，或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个氨基酸突变或差异的序列；和/或

所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO:39-40、140-141、52-53、65-66、78-79、91-92、104-105 和 117-118 中任一项所示的序列，或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个氨基酸突变或差异的序列；和

所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO:41-42、54-55、67-68、80-81、93-94、106-107 和 119-120 中任一项所示的序列，或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个氨基酸突变或差异的序列；和

所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO:43、56、69、82、95、108 和 121 中任一项所示的序列，或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个氨基酸突变或差异的序列。

在第一方面的一些实施方案中，所述 HCDR1-3 和/或所述 LCDR1-3 根据 Kabat、Chothia 或 IMGT 方式确定。

在第一方面的一些实施方案中，所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 17、19、21、23、25、27、29、124、126、128、130、132、134 和 136 中任一项所示的序列，或与其相比具有至少 70%同一性或至多 15 个氨基酸突变或差异的序列。

在第一方面的一些实施方案中，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 18、20、22、24、26、28、30、123、125、127、129、131、133 和 135 中任一项所示的序列，或与其相比具有至少 70%同一性或至多 15 个氨基酸突变或差异的序列。

在第一方面的一些实施方案中，，所述至少 70%的同一性为至少 75%、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%的同一性。

在第一方面的一些实施方案中，所述至多 3 个突变或差异为至多 3、2、1 或 0 个突变或差异。

在第一方面的一些实施方案中，所述至多 15 个突变或差异为至多 15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 或 0 个突变或差异。

在第一方面的一些实施方案中，所述突变为插入、缺失或替换。在一些实施方案中，所

述替换为保守氨基酸替换。

在第一方面的一些实施方案中，所述突变为回复突变或热点突变。

在第一方面的一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 28 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 30 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 124 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 123 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 126 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 125 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 128 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 127 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 130 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 129 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 132 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 131 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 134 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 133 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 136 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 135 所示。

在第一方面的一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段还包含重链恒定区和/或轻链恒定区。

在第一方面的一些实施方案中，所述重链恒定区选自 IgG，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。

在第一方面的一些实施方案中，所述重链恒定区选自可选自人 IgG，例如人 IgG1、人 IgG2、人 IgG3 或人 IgG4。

在第一方面的一些具体实施方案中，所述重链恒定区可选自 SEQ ID NO:13。

在第一方面的一些实施方案中，所述轻链恒定区选自 κ 链或 λ 链。

在第一方面的一些具体实施方案中，所述轻链恒定区可选自 SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:122。

在第一方面的一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段选自：单克隆抗体、多克隆抗体、天然抗体、工程化抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、单价抗体、多价抗体、完整抗体、完整抗体的片段、裸抗体、缀合抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体、Fab、Fab'、Fab'-SH、$F(ab')_2$、Fd、Fv、scFv、双抗体(diabody)和单域抗体。

在第一方面的一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段与治疗剂或示踪剂缀合。

在第一方面的一些实施方案中，所述治疗剂可选自：放射性同位素、化疗药和免疫调节剂。

在第一方面的一些实施方案中，所述示踪剂可选自：放射学造影剂、顺磁离子、金属、荧光标记、化学发光标记、超声造影剂和光敏剂。

在第一方面的一些实施方案中，所述抗体或其抗原结合片段还结合猴 CD3。

在第一方面的一些实施方案中，所述 CD3 选自 CD3ε 亚基和包含 CD3ε 亚基的二聚体，例如，CD3ε/δ 二聚体。

在第二方面，本申请提供了多特异抗原结合分子，其中所述多特异性抗原结合分子至少包括第一抗原结合模块和第二抗原结合模块，所述第一抗原结合模块包含第一方面所述的抗体或其抗原结合片段，和/或所述第二抗原结合模块结合与所述第一抗原结合模块不同的其他靶点或结合相同靶点的不同表位。

在第二方面的一些实施方案中，所述其他靶点选自肿瘤特异性抗原(TSA)和肿瘤相关抗原(TAA)。

在第二方面的一些实施方案中，所述多特异性抗原结合分子为双特异性 T 细胞接合器(BiTE)。

在第三方面，本申请提供了分离的核酸分子，其中所述核酸分子编码第一方面所述的抗体或其抗原结合片段、或第二方面所述的多特异性抗原结合分子。

在第三方面的一些实施方案中，所述核酸分子还编码嵌合抗原受体。

在第三方面的一些实施方案中，编码第一方面所述抗体或其抗原结合片段、或第二方面所述多特异性抗原结合分子的核酸与编码所述嵌合抗原受体的核酸通过编码自裂解肽的核酸序列或 IRES 核酸序列连接。

在第四方面，本申请提供了载体，其包含第三方面所述的核酸分子。

在第五方面，本申请提供了细胞，其包含第四方面所述的载体。

在第六方面，本申请提供了免疫效应细胞，其表达嵌合抗原受体，和/或表达第一方面所述的抗体或其抗原结合片段或第二方面所述的多特异性抗原结合分子。

在第六方面的一些实施方案中，所述免疫效应细胞选自：T 细胞、自然杀伤细胞(NK 细胞，natural killer cell)、自然杀伤 T 细胞(NKT 细胞，natural killer T cell)、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞和肥大细胞。

在第六方面的一些实施方案中，所述 T 细胞选自：细胞毒性 T 细胞、调节性 T 细胞和辅助性 T 细胞。

在第六方面的一些实施方案中，所述免疫效应细胞为自体免疫效应细胞或同种异体免疫效应细胞。

在第七方面，本申请提供了制备第一方面所述的抗体或其抗原结合片段或第二方面所述的多特异性抗原结合分子的方法，其中所述方法包括：(1)培养第五方面所述的细胞；和/或(2)分离所述细胞表达的抗体或其抗原结合片段，或多特异性抗原结合分子。

在第八方面，本申请提供了制备第六方面所述的免疫效应细胞的方法，其中所述方法包括：(1)将 a.编码所述嵌合抗原受体的核酸分子和 b.编码第一方面所述的抗体或其抗原结合片段或第二方面所述的多特异性抗原结合分子的核酸分子导入初始的免疫效应细胞；和/或(2)使导入上述核酸分子的免疫效应细胞表达所述嵌合抗原受体和第一方面所述的抗体或其抗原结合片段或第二方面所述的多特异性抗原结合分子。

在第九方面，本申请提供了药物组合物，其中所述药物组合物包含第一方面所述的抗体或其抗原结合片段、第二方所述的多特异性抗原结合分子、第三方面所述的核酸分子、第四方面所述的载体、第五方面所述的细胞、第六方面所述的免疫效应细胞或根据第七或第八方面所述的方法制备得到的产品。

在第九方面的一些实施方案中，所述组合物还包含药学上可接受的运载体(carrier)、稀释剂或助剂。

在第十方面，本申请提供了第一方面所述的抗体或其抗原结合片段、第二方面所述的多特异性抗原结合片段、第三方面所述的核酸分子、第四方面所述的载体、第五方面所述的细胞、第六方面所述的免疫效应细胞、根据第七或第八方面所述的方法制备得到的产品、或第九方面所述的药物组合物，在制备治疗肿瘤或癌症的药物中的用途。

在第十方面的一些实施方案中，所述肿瘤或癌症选自血液瘤或实体瘤。

在第十方面的一些实施方案中，所述血液瘤可选自：急性骨髓样白血病(AML)、慢性骨髓样白血病(CML)、急变期 CML、脊髓发育不良综合征(MDS)、急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL)、急性 T 淋巴细胞白血病(TALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、Richter 综合征、毛细胞白血病(HCL)、母细胞浆细胞样树突细胞肿瘤(BPDCN)、包括套细胞淋巴瘤(MCL)和小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)的非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金淋巴瘤、系统性肥大细胞增生症和伯基特淋巴瘤。

在第十方面的一些实施方案中，所述实体瘤可选自：卵巢癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、食管癌、胃食管癌、结直肠癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、胶质瘤、乳腺癌和肝癌。

在第十一方面，本申请提供了治疗肿瘤或癌症的方法，其中所述方法包括向受试者施用有效量的药物，所述药物包括第一方面所述的抗体或其抗原结合片段、第二方面所述的多特异性抗原结合分子、第三方面所述的核酸分子、第四方面所述的载体、第五方面所述的细胞、

第六方面所述的免疫效应细胞、根据第七或第八方面所述的方法制备得到的产品或第九方面所述的药物组合物。

在第十一方面的一些实施方案中，所述肿瘤或癌症选自血液瘤或实体瘤。

在第十一方面的一些实施方案中，所述血液瘤可选自：急性骨髓样白血病(AML)、慢性骨髓样白血病(CML)、急变期 CML、脊髓发育不良综合征(MDS)、急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL)、急性 T 淋巴细胞白血病(TALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、Richter 综合征、毛细胞白血病(HCL)、母细胞浆细胞样树突细胞肿瘤(BPDCN)、包括套细胞淋巴瘤(MCL)和小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)的非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金淋巴瘤、系统性肥大细胞增生症和伯基特淋巴瘤。

在第十一方面的一些实施方案中，所述实体瘤可选自：卵巢癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、食管癌、胃食管癌、结直肠癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、胶质瘤、乳腺癌和肝癌。

在第十二方面，本申请提供了第一方面所述的抗体或其抗原结合片段、第二方面所述的多特异性抗原结合分子、第三方面所述的核酸分子、第四方面所述的载体、第五方面所述的细胞、第六方面所述的免疫效应细胞、根据第七或第八方面所述的方法制备得到的产品或第九方面所述的药物组合物，其用于治疗肿瘤或癌症。

在第十二方面的一些实施方案中，所述肿瘤或癌症选自血液瘤或实体瘤。

在第十二方面的一些实施方案中，所述血液瘤可选自：急性骨髓样白血病(AML)、慢性骨髓样白血病(CML)、急变期 CML、脊髓发育不良综合征(MDS)、急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL)、急性 T 淋巴细胞白血病(TALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、Richter 综合征、毛细胞白血病(HCL)、母细胞浆细胞样树突细胞肿瘤(BPDCN)、包括套细胞淋巴瘤(MCL)和小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)的非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金淋巴瘤、系统性肥大细胞增生症和伯基特淋巴瘤。

在第十二方面的一些实施方案中，所述实体瘤可选自：卵巢癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、食管癌、胃食管癌、结直肠癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、胶质瘤、乳腺癌或肝癌。

本申请第一方面至第十二方面中任一方面所述的实施方案至少具有以下一种或多种有益效果：

(1) 本申请所述方法筛选获得与现有抗体不同的、新的 CD3 抗体，其特异性结合 CD3ε 亚基或其复合物，或特异性结合表达所述 CD3ε 亚基或其复合物的细胞，尤其是 T 细胞；

(2) 本公开所述抗体对 CD3 具有适当的亲和力，能够有效地通过 TCR 信号传递从而刺激 T 细胞，优选获得高效激活 T 细胞的抗体。

术语定义和说明

除非本申请另外定义，与本申请相关的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员所理解的含义。

此外，除非本文另有说明，本文单数形式的术语应包括复数形式，复数形式的术语应包括单数形式。更具体地，如在本说明书和所附权利要求中所使用的，除非另外明确指出，否

则单数形式“一种”和“这种”包括复数指示物。

本文术语“包括”、“包含”和“具有”之间可互换使用，旨在表示方案的包含性，意味着所述方案可存在除所列出的元素之外的其他元素。同时应当理解，在本文中使用“包括”、“包含”和“具有”描述，也提供“由……组成”方案。示例性地，“一种组合物，包括 A 和 B”，应当理解为以下技术方案：由 A 和 B 组成的组合物，以及除 A 和 B 外，还含有其他组分的组合物，均落入前述“一种组合物”的范围内。

术语“和/或”在本文使用时，包括“和”、“或”和“由所属术语链接的要素的全部或任何其他组合”的含义。

本文术语“特异性结合”是指抗原结合分子(例如抗体)通常以高亲和力特异性结合抗原和实质上相同的抗原，但不以高亲和力结合不相关抗原。亲和力通常以平衡解离常数(equilibrium dissociation constant，KD)来反映，其中较低 KD 表示较高亲和力。以抗体为例，高亲和力通常指具有约 10^{-6}M 或更低、约 10^{-7}M 或更低、约 10^{-8}M 或更低、约 1×10^{-9}M 或更低、约 1×10^{-10}M 或更低、约 1×10^{-11}M 或更低、或约 1×10^{-12}M 或更低的 KD。KD 计算方式如下：KD = Kd/Ka，其中 Kd 表示解离速率，Ka 表示结合速率。可采用本领域周知的方法测量平衡解离常数 KD，如表面等离子共振(例如 Biacore)或平衡透析法测定，示例性地，可参见本文实施例 8 所示 KD 值获得方法。

本文术语“抗原结合分子”按最广义使用，是指特异性结合抗原的分子。示例性地，抗原结合分子包括但不限于抗体或抗体模拟物。“抗体模拟物”是指能够与抗原特异性结合，但与抗体结构无关的有机化合物或结合域，示例性地，抗体模拟物包括但不限于 affibody、affitin、affilin、经设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)、核酸适体或 Kunitz 型结构域肽。

本文术语“抗体”按最广义使用，是指包含来自免疫球蛋白重链可变区的足够序列和/或来自免疫球蛋白轻链可变区的足够序列，从而能够特异性结合至抗原的多肽或多肽组合。本文“抗体”涵盖各种形式和各种结构，只要它们展现出期望的抗原结合活性。本文“抗体”包括具有移植的互补决定区(CDR)或 CDR 衍生物的替代蛋白质支架或人工支架。此类支架包括抗体衍生的支架(其包含引入以例如稳定化抗体三维结构的突变)以及包含例如生物相容性聚合物的全合成支架。参见，例如 Korndorfer 等人，2003,Proteins:Structure,Function,and Bioinformatics,53(1):121-129(2003)；Roque 等人，Biotechnol.Prog.20:639-654(2004)。此类支架还可以包括非抗体衍生的支架，例如本领域已知可用于移植 CDR 的支架蛋白，包括但不限于肌腱蛋白、纤连蛋白、肽适体等。

本文“抗体”包括一种典型的“四链抗体”，其属于由两条重链(HC)和两条轻链(LC)组成的免疫球蛋白；重链是指这样的多肽链，其在 N 端到 C 端的方向上由重链可变区(VH)、重链恒定区 CH1 结构域、铰链区(HR)、重链恒定区 CH2 结构域、重链恒定区 CH3 结构域组成；并且，当所述全长抗体为 IgE 同种型时，任选地还包括重链恒定区 CH4 结构域；轻链是在 N 端到 C 端方向上由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成的多肽链；重链与重链之间、重链与轻链之间通过二硫键连接，形成“Y”字型结构。由于免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，故其抗原性也不同。据此，可将本文“免疫球蛋白”分为五类，或称为免疫球蛋白的同种型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相应的重链分别为 μ 链、δ 链、γ 链、α 链和 ε 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别，又

可分为不同的亚类，如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4，IgA 可分为 IgA1 和 IgA2。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中第每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。

本文“抗体”还包括不包含轻链的抗体，例如，由单峰驼(Camelus dromedarius)、双峰驼(Camelus bactrianus)、大羊驼(Lama glama)、原驼(Lama guanicoe)和羊驼(Vicugna pacos)等产生的重链抗体(heavy-chain antibodies, HCAbs)以及在鲨等软骨鱼纲中发现的免疫球蛋白新抗原受体(Ig new antigen receptor, IgNAR)。

本文“抗体”可以来源于任何动物，包括但不限于人和非人动物，所述非人动物可选自灵长类动物、哺乳动物、啮齿动物和脊椎动物，例如骆驼科动物、大羊驼、原鸵、羊驼、羊、兔、小鼠、大鼠或软骨鱼纲(例如鲨)。

本文“抗体”包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、单价抗体、多价抗体、完整抗体、完整抗体的片段、裸抗体、缀合抗体、嵌合抗体、人源化抗体或全人抗体。

本文术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体，即，除了可能的变异体(例如含有天然存在的突变或在制剂的生产过程中产生，此类变体通常以少量存在)之外，包含所述群体的各个抗体是相同的和/或结合相同的表位。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反，单克隆抗体制剂中的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。本文修饰语“单克隆”不应解释为需要通过任何特定方法产生所述抗体或其抗原结合分子。举例来说，单克隆抗体可通过多种技术制得，包括(但不限于)杂交瘤技术、重组 DNA 方法、噬菌体库展示技术和利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转殖基因动物的方法和其它本领域已知的方法。

本文术语“天然抗体”是指通过多细胞生物体的免疫系统制造和配对的抗体。本文术语“工程化抗体”的抗体是指通过基因工程、抗体工程等技术获得的非天然抗体，示例性地，“工程化抗体”包括人源化抗体、小分子抗体(例如 scFv 等)、双特异性抗体等等。

本文术语“单特异性”是指表示具有一个或多个结合位点，其中每个结合位点结合相同抗原的相同表位。

本文术语“多特异性抗体”是指具有至少两个抗原结合位点，所述至少两个抗原结合位点中的每一个抗原结合位点与相同抗原的不同表位或与不同抗原的不同表位结合。因此，诸如“双特异性”、“三特异性”、“四特异性”等术语是指抗体/抗原结合分子可以结合的不同表位的数目。

本文术语“价”表示抗体/抗原结合分子中规定数目的结合位点的存在。因此,术语“单价”、“二价”、“四价”和“六价”分别表示抗体/抗原结合分子中一个结合位点、两个结合位点、四个结合位点和六个结合位点的存在。

本文“全长抗体”、“完好抗体”和“完整抗体”在本文中可互换使用，是指具有基本上与天然抗体结构相似的结构。

本文“抗原结合片段”和“抗体片段”在本文中可互换使用，其不具备完整抗体的全部结构，仅包含完整抗体的局部或局部的变体，所述局部或局部的变体具备结合抗原的能力。本文“抗原结合片段”或“抗体片段”包括但不限于 Fab、Fab’、Fab’-SH、$F(ab')_2$、Fd、Fv、

scFv、双抗体(diabody)和单域抗体。

完整抗体的木瓜蛋白酶消化生成两个同一的抗原结合片段，称作“Fab”片段，每个含有重链可变域和轻链可变域，还有轻链的恒定域和重链的第一恒定域(CH1)。如此，本文术语“Fab片段”指包含轻链的VL域和恒定域(CL)的轻链片段，和重链的VH域和第一恒定域(CH1)的抗体片段。Fab’片段因在重链CH1域的羧基末端增加少数残基而与Fab片段不同，包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab’-SH 是其中恒定域的半胱氨酸残基携带游离硫醇基团的Fab’片段。胃蛋白酶处理产生具有两个抗原结合位点(两个Fab片段)和Fc区的一部分的$F(ab')_2$片段。

本文术语“Fd”是指由VH和CH1结构域组成的抗体。本文术语“Fv”是指由单臂VL和VH结构域组成的抗体片段。Fv片段通常被认为是，能形成完整的抗原结合位点的最小抗体片段。一般认为，六个CDR赋予抗体的抗原结合特异性。然而，即便是一个可变区(例如Fd片段，其仅仅含有三个对抗原特异的CDR)也能够识别并结合抗原，尽管其亲和力可能低于完整的结合位点。

本文术语“scFv”(single-chain variable fragment)是指包含VL和VH结构域的单个多肽链，其中所述VL和VH通过接头(linker)相连(参见，例如，Bird等人，Science 242:423-426(1988)；Huston等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883(1988)；和Pluckthun，The Pharmacology of Monoclonal Antibodies，第113卷，Roseburg和Moore编，Springer-Verlag，纽约，第269-315页(1994))。此类scFv分子可具有一般结构：NH2-VL-接头-VH-COOH或NH2-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的GGGGS氨基酸序列或其变体组成。例如，可使用具有氨基酸序列$(GGGGS)_4$的接头，但也可使用其变体(Holliger等人(1993)，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448)。可用于本申请的其他接头由Alfthan等人(1995)，Protein Eng.8:725-731，Choi等人(2001)，Eur.J.Immunol.31:94-106，Hu等人(1996)，Cancer Res.56:3055-3061，Kipriyanov等人(1999)，J.Mol.Biol.293:41-56和Roovers等人(2001)，Cancer Immunol.描述。在一些情况下，scFv的VH与VL之间还可以存在二硫键，形成二硫键连接的Fv(dsFv)。

本文术语“双抗体(diabody)”，其VH和VL结构域在单个多肽链上表达，但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对，从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位(参见，例如，Holliger P.等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)，和Poljak R.J.等人，Structure 2:1121-1123(1994))。

本文术语“单域抗体”(single domain antibody，sdAb)、“VHH”和“纳米抗体(nanobody)”具有相同的含义并可互换使用，指克隆抗体重链的可变区，构建仅由一个重链可变区组成的单域抗体，它是具有完整功能的最小的抗原结合片段。通常先获得天然缺失轻链和重链恒定区1(CH1)的抗体后，再克隆抗体重链的可变区，构建仅由一个重链可变区组成的单域抗体。单域抗体可以衍生自骆驼科重链抗体或软骨纲鱼类IgNAR。

本文术语“裸抗体”是指不与治疗剂或示踪剂缀合的抗体；术语“缀合抗体”是指与治疗剂或示踪剂缀合的抗体。

本文术语“嵌合抗体(chimeric antibody)”是指，这样的抗体，其轻链或/和重链的一部分

源自一个抗体(其可以源自某一特定物种或属于某一特定抗体类或亚类)，且轻链或/和重链的另一部分源自另一个抗体(其可以源自相同或不同的物种或属于相同或不同的抗体类或亚类)，但无论如何，其仍保留对目标抗原的结合活性(U.S.P 4,816,567，Cabilly 等人；Morrison 等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984))。例如，术语“嵌合抗体”可包括这样的抗体(例如人鼠嵌合抗体)，其中抗体的重链和轻链可变区来自第一抗体(例如鼠源抗体)，而抗体的重链和轻链恒定区来自第二抗体(例如人抗体)。

本文术语“人源化抗体”是指，经基因工程改造的非人源抗体，其氨基酸序列经修饰以提高与人源抗体的序列的同源性。通常而言，人源化抗体的全部或部分 CDR 区来自于非人源抗体(供体抗体)，全部或部分的非 CDR 区(例如，可变区 FR 和/或恒定区)来自于人源免疫球蛋白(受体抗体)。人源化抗体通常保留或部分保留了供体抗体的预期性质，包括但不限于，抗原特异性、亲和性、反应性、提高免疫细胞活性的能力、增强免疫应答的能力等。

本文术语“全人抗体”是指具有其中 FR 和 CDR 二者都源自人种系免疫球蛋白序列的可变区的抗体。此外，如果抗体包含恒定区，则恒定区也源自人种系免疫球蛋白序列。本文全人抗体可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如，通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。然而，本文“全人抗体”不包括其中来源于另一个哺乳动物物种(例如小鼠)的种系的 CDR 序列已被移植到人框架序列上的抗体。

本文术语“可变区”是指抗体重链或轻链中牵涉使抗体结合抗原的区域，“重链可变区”与“VH”、“HCVR”可互换使用，“轻链可变区”与“VL”、“LCVR”可互换使用。天然抗体的重链和轻链的可变域(分别是 VH 和 VL)一般具有相似的结构,每个域包含四个保守的框架区(FR)和三个高变区(HVR)。参见例如 Kindt 等人，Kuby Immunology,6th ed.，W.H.Freeman and Co.,p.91(2007)。单个 VH 或 VL 域可足以赋予抗原结合特异性。本文术语“互补决定区”与“CDR”可互换使用，通常指重链可变区(VH)或轻链可变区(VL)的高变区(HVR)，该部位因在空间结构上可与抗原表位形成精密的互补，故又称为互补决定区，其中，重链可变区 CDR 可缩写为 HCDR，轻链可变区 CDR 可缩写为 LCDR。本术语“构架区”或“FR 区”可互换，是指抗体重链可变区或轻链可变区中除 CDR 以外的那些氨基酸残基。通常典型的抗体可变区由 4 个 FR 区和 3 个 CDR 区按以下顺序组成：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

对于 CDR 的进一步描述，参考 Kabat 等人, J. Biol. Chem.,252:6609-6616 (1977)；Kabat 等人, 美国卫生与公共服务部，“Sequences of proteins of immunological interest ”(1991); Chothia 等人,J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Al-Lazikani B.等人, J.Mol. Biol., 273: 927-948 (1997); MacCallum 等人, J. Mol.Biol. 262:732-745 (1996); Abhinandan 和 Martin, Mol. Immunol., 45: 3832-3839 (2008); Lefranc M.P.等人, Dev. Comp.Immunol., 27: 55-77 (2003); 以及 Honegger 和 Plückthun, J. Mol. Biol., 309:657-670 (2001)。“CDR”可由 Kabat 编号系统加以定义，工具网站包括 abYsis 网站(www.abysis.org/abysis/sequence_input/key_annotation/key_annotation.cgi)

本文术语“Kabat 编号系统”通常是指由 Elvin A.Kabat 提出的免疫球蛋白比对及编号系统(参见，例如 Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.,1991)。

本文术语“重链恒定区”是指抗体重链的羧基端部分，其不直接参与抗体与抗原的结合，但是表现出效应子功能，诸如与 Fc 受体的相互作用，其相对于抗体的可变结构域具有更保守

的氨基酸序列。“重链恒定区”至少包含：CH1 结构域，铰链区，CH2 结构域，CH3 结构域，或其变体或片段。“重链恒定区”包括“全长重链恒定区”和“重链恒定区片段”，前者具有基本上与天然抗体恒定区基本相似的结构，而后者仅包括“全长重链恒定区的一部分”。示例性地，典型的“全长抗体重链恒定区”由 CH1 结构域-铰链区-CH2 结构域-CH3 结构域组成；当抗体为 IgE 时，其还包括 CH4 结构域；当抗体为重链抗体时，则其不包括 CH1 结构域。示例性地，典型的“重链恒定区片段”可选自 CH1、Fc 或 CH3 结构域。

本文术语“轻链恒定区”是指抗体轻链的羧基端部分，其不直接参与抗体与抗原的结合，所述轻链恒定区可选自恒定 κ 结构域或恒定 λ 结构域。

本文术语“Fc”是指完整抗体经木瓜蛋白酶水解而成的抗体羧基端部分，典型地，其包含抗体的 CH3 和 CH2 结构域。Fc 区包括例如天然序列 Fc 区、重组 Fc 区和变体 Fc 区。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的边界可以略微变化，但是人IgG重链的Fc区通常被定义为从Cys226 位置的氨基酸残基或从 Pro230 延伸至其羧基末端。Fc 区的 C 末端赖氨酸(根据 Kabat 编号系统的残基 447)可以例如在抗体的产生或纯化过程中，或通过对编码抗体重链的核酸重组工程化而除去，因此，Fc 区可包括或不包括 Lys447。

本文术语“保守氨基酸”通常是指属于同一类或具有类似特征(例如电荷、侧链大小、疏水性、亲水性、主链构象和刚性)的氨基酸。示例性地，下述每组内的氨基酸属于彼此的保守氨基酸残基，组内氨基酸残基的替换属于保守氨基酸的替换：

示例性地，以下六组是被认为是互为保守性置换的氨基酸的实例：

1) 丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)；
2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)；
3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)；
4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K)、组氨酸(H)；
5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V)；和
6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)。

本文术语“同一性”可通过以下方式计算获得：为确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的“同一性”百分数，将所述序列出于最佳比较目的比对(例如，可以为最佳比对而在第一和第二氨基酸序列或核酸序列之一或二者中引入空位或可以为比较目的而抛弃非同源序列)。随后比较在对应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置由第二序列中对应位置处的相同氨基酸残基或核苷酸占据时，则所述分子在这个位置处是相同的。

考虑到为最佳比对这两个序列而需要引入的空位的数目和每个空位的长度，两个序列之间的同一性百分数随所述序列共有的相同位置变化而变化。

可以利用数学算法实现两个序列间的序列比较和同一性百分数的计算。例如，使用已经集成至GCG软件包的GAP程序中的Needlema和Wunsch((1970)J.Mol.Biol.48:444-453)算法(在 www.gcg.com 可获得)，使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵和空位权重 16、14、12、10、8、6 或 4 和长度权重 1、2、3、4、5 或 6，确定两个氨基酸序列之间的同一性百分数。又例如，使用 GCG 软件包中的 GAP 程序(在 www.gcg.com 可获得)，使用 NWSgapdna.CMP 矩阵和空位权重 40、50、60、70 或 80 和长度权重 1、2、3、4、5 或 6，确定两个核苷酸序列之间的

同一性百分数。特别优选的参数集合(和除非另外说明否则应当使用的一个参数集合)是采用空位罚分 12、空位延伸罚分 4 和移码空位罚分 5 的 Blossum62 评分矩阵。

还可以使用 PAM120 加权余数表、空位长度罚分 12，空位罚分 4，利用已经并入 ALIGN 程序(2.0 版)的 E.Meyers 和 W.Miller 算法,((1989)CABIOS,4:11-17)确定两个氨基酸序列或核苷酸序列之间的同一性百分数。

可选地，可以进一步使用本申请所述的核酸序列和蛋白质序列作为“查询序列”以针对公共数据库执行检索，以例如鉴定其他家族成员序列或相关序列。例如，可以使用 Altschul 等人，(1990)J.Mol.Biol.215:403-10 的 NBLAST 及 XBLAST 程序(版本 2.0)执行此类检索。BLAST 核苷酸检索可以用 NBLAST 程序，评分=100、字长度=12 执行，以获得与本申请核酸(SEQ ID NO:1)分子同源的核苷酸序列。BLAST 蛋白质检索可以用 XBLAST 程序、评分=50、字长度=3 执行，以获得与本申请蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了出于比较目的获得带空位的比对结果，可以如 Altschul 等人，(1997)Nucleic Acids Res.25:3389-3402 中所述那样使用空位 BLAST。当使用 BLAST 和空位 BLAST 程序时，可以使用相应程序(例如，XBLAST 和 NBLAST)的默认参数。参见 www.ncbi.nlm.nih.gov。

本文术语“嵌合抗原受体(CAR)”是指经改造以在免疫效应细胞上表达并且特异性结合抗原的人工细胞表面受体，其包含至少(1)细胞外抗原结合结构域，例如抗体的可变重链或轻链，(2)锚定 CAR 进入免疫效应细胞的跨膜结构域，和(3)胞内信号传导结构域。CAR 能够利用细胞外抗原结合结构域以非 MHC 限制性的方式将 T 细胞和其它免疫效应细胞重定向至所选择的靶标，例如癌细胞。

本文术语“核酸”包括包含核苷酸的聚合物的任何化合物和/或物质。每个核苷酸由碱基，特别是嘌呤或嘧啶碱基(即胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U))、糖(即脱氧核糖或核糖)和磷酸基团组成。通常，核酸分子由碱基的序列描述，由此所述碱基代表核酸分子的一级结构(线性结构)。碱基的序列通常表示为 5’至 3’。在本文中，术语核酸分子涵盖脱氧核糖核酸(DNA)，包括例如互补 DNA(cDNA)和基因组 DNA、核糖核酸(RNA)，特别是信使 RNA(mRNA)、DNA 或 RNA 的合成形式，以及包含两种或更多种这些分子的混合的聚合物。核酸分子可以是线性的或环状的。此外，术语核酸分子包括有义链和反义链二者，以及单链和双链形式。而且，本文所述的核酸分子可含有天然存在的或非天然存在的核苷酸。非天然存在的核苷酸的例子包括具有衍生的糖或磷酸骨架键合或化学修饰的残基的修饰的核苷酸碱基。核酸分子还涵盖 DNA 和 RNA 分子，其适合作为载体用于在体外和/或体内，例如在宿主或患者中，直接表达本申请的抗体。此类 DNA(例如 cDNA)或 RNA(例如 mRNA)载体可以是未修饰的或修饰的。例如，可以对 mRNA 进行化学修饰以增强 RNA 载体的稳定性和/或被编码分子的表达，从而可以将 mRNA 注入到受试者内以在体内产生抗体(参见例如 Stadler 等人，Nature Medicine 2017，published online 2017 年 6 月 12 日，doi：10.1038/nm.4356 或 EP 2 101 823 B1)。本文“分离的”核酸指已经与其天然环境的组分分开的核酸分子。分离的核酸包括在下述细胞中含有的核酸分子，所述细胞通常含有该核酸分子，但该核酸分子存在于染色体外或存在于不同于其天然染色体位置的染色体位置处。

本文术语“载体”是指能够扩增与其连接的另一个核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制型核酸结构的载体以及整合入已引入该载体的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体

能够指导与它们可操作连接的核酸的表达，这样的载体在本文中称为“表达载体”。

本文术语“宿主细胞”是指细胞中引入外源核酸的细胞，包括这种细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“经转化的细胞”，其包括原代的经转化的细胞和来源于其的后代，而不考虑传代的次数。后代在核酸内容物上可能与亲本细胞不完全相同，而是可以包含突变。本文中包括具有与在初始转化的细胞中筛选或选择的相同功能或生物学活性的突变体后代。

本文术语“药物组合物”是指这样的制剂，其以允许包含在其中的活性成分的生物学活性有效的形式存在，并且不含有对施用所述药物组合物的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

本文术语“治疗”是指外科手术或药物处理(surgical or therapeutic treatment)，其目的是预防、减缓(减少)治疗对象中不希望的生理变化或病变，如癌症的进展。有益的或所希望的临床结果包括但不限于症状的减轻、疾病程度减弱、疾病状态稳定(即，未恶化)、疾病进展的延迟或减慢、疾病状态的改善或缓和、以及缓解(无论是部分缓解或完全缓解)，无论是可检测的或不可检测的。需要治疗的对象包括已患有病症或疾病的对象以及易于患上病症或疾病的对象或打算预防病症或疾病的对象。当提到减缓、减轻、减弱、缓和、缓解等术语时，其含义也包括消除、消失、不发生等情况。

本文术语“受试者”是指接受对如本申请所述的特定疾病或病症的治疗的生物体。对象和患者的实例包括接受疾病或病症治疗的哺乳动物，如人、灵长类动物(例如，猴)或非灵长类哺乳动物。

本文术语“有效量”指单独给予或与另一治疗剂组合给予细胞、组织或对象时能有效防止或缓解疾病病症或该疾病进展的治疗剂用量。“有效量”还指足以缓解症状，例如治疗、治愈、防止或缓解相关医学病症，或治疗、治愈、防止或缓解这些病症的速度增加的化合物用量。当将活性成分单独给予个体时，治疗有效剂量单指该成分。当应用某一组合时，治疗有效剂量指产生治疗作用的活性成分的组合用量，而无论是组合、连续或同时给予。

本文术语“癌症”指向或描述哺乳动物中典型地以不受调节的细胞生长为特征的生理状况。此定义中包括良性和恶性癌症。本文术语“肿瘤”或“瘤”是指所有赘生性(neoplastic)细胞生长和增殖，无论是恶性的还是良性的，及所有癌前(pre-cancerous)和癌性细胞和组织。术语“癌症”和“肿瘤”在本文中提到时并不互相排斥。

本文术语“EC50”是指半最大有效浓度，其包括在指定暴露时间之后诱导基线与最大值之间的半途响应的抗体浓度。EC50 本质上代表其中观察到其最大作用的 50%的抗体浓度，可通过本领域已知方法测量。

附图说明

图 1 为 Jurkat 细胞与 SP34、OKT3 抗体的 FACS 检测结果。

图 2 为 SP34 抗体检测人 T 细胞表面 CD3 的表达。

图 3 为 SP34 抗体检测猴 T 细胞表面 CD3 的表达。

图 4A-图 4D 为 FACS 检测人鼠嵌合抗体与人 T 细胞的结合。

图 5A-图 5C 为 FACS 检测人鼠嵌合抗体与 Jurkat 细胞的结合。

图 6A-图 6D 为 FACS 检测人鼠嵌合抗体与猴 T 细胞的结合。

图 7A-图 7D 为荧光素酶报告基因检测人鼠嵌合抗体激活 Jurkat 细胞信号通路。

图 8A-图 8G 为 ELISA 检测人源化抗体与人 CD3ε/δ 蛋白结合反应。

图 9A-图 9G 为 ELISA 检测人源化抗体与人 CD3ε 蛋白结合反应。

图 10A-图 10G 为 FACS 检测人源化抗体与人 T 细胞结合反应。

图 11A-图 11G 为 ELISA 检测人源化抗体与猴 CD3ε/δ 结合反应。

图 12A-图 12G 为 ELISA 检测人源化抗体与猴 CD3ε 结合反应。

图 13A-图 13G 为 FACS 检测人源化抗体与猴 T 细胞的结合反应。

图 14A-图 14E 为 FACS 检测人源化抗体激活 T 细胞的反应。

具体实施方式

下面结合具体实施例来进一步描述本申请，本申请的优点和特点将会随着描述而更为清楚。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

本申请实施例仅是范例性的，并不对本申请的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是，在不偏离本申请的精神和范围下可以对本申请技术方案的细节和形式进行修改或替换，但这些修改和替换均落入本申请的保护范围内。

实施例 1 对照抗体的制备

阳性对照抗体(VH、VL 序列详见表 1)：SP34、OKT3、I2C、40G5c、F2B 和 7221G20 均识别人 CD3 的抗体，其中 SP34、I2C 和 40G5c 克隆识别人 CD3ε 蛋白、CD3ε/δ 异源二聚体和 CD3γ/δ 异源二聚体；OKT3、F2B 和 7221G20 克隆仅识别人 CD3ε/δ 异源二聚体。

阳性对照抗体的制备方法如下：将阳性对照抗体的轻链可变区序列分别克隆到包含信号肽和人源抗体 IgG1 的轻链恒定区的表达载体 pcDNA3.4-B1HLK，重链可变区序列分别克隆到包含信号肽和人源抗体 IgG1 的重链恒定区的表达载体 pcDNA3.4-B1HH1，获得 SP34-hIgG1、OKT3-hIgG1、I2C-hIgG1、40G5c-hIgG1、7221G20-hIgG1 和 F2B-hIgG1，以下分别简称 SP34、OKT3、I2C、40G5c、7221G20 和 F2B。按已建立的标准分子生物学方法制备质粒，具体方法参见 Sambrook, J., Fritsch, E. F.和 Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition(Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press)。另外，按照相同方法将抗体轻链可变区和重链可变区分别克隆到包含信号肽和鼠 IgG1 轻链恒定区的表达载体 pcDNA3.4-B1MLK，和包含信号肽和鼠 IgG1 重链恒定区的表达载体 pcDNA3.4-B1MH1。具体序列信息参见表 1。

将表达载体按照 PEI(购自 Polysciences，货号：24765-1)说明书瞬时转染 HEK293E 细胞(购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库)并使用 FreeStyle TM 293(Thermofisher scientific，货号：12338018)在 37°C下连续培养 5 天，离心去除细胞成分，获得含抗体的培养上清液。将培养上清液上样到蛋白 A 层析柱(蛋白 A 填料 AT Protein A Diamond 和层析柱 BXK16/26 均购

自博格隆，货号：AA0273 和 B-1620)，使用 PBS 磷酸盐缓冲液(pH7.4)清洗后再用 20mM PB，1M NaCl(pH 7.2)进行清洗，最后使用 pH3.4 的柠檬酸缓冲液进行洗脱，收集从蛋白 A 层析柱上洗脱的抗体，用 1/10 体积的 pH8.0 的 1M Tris 中和，用 PBS 在 4°C条件透析过夜，透析后的蛋白经 0.22 微米滤膜无菌过滤后分装于-80°C保存。

阴性对照抗体 hIgG1 为针对鸡卵溶菌酶的抗体抗 hel-hIgG1(购自百英，货号：B117901)，以下简称 hIgG1。

阴性对照抗体 mIgG1 为针对鸡卵溶菌酶的抗体抗 hel-mIgG1(购自百英，货号：B118301)，简称 mIgG1。

表 1 抗人 CD3 的阳性抗体的重链和轻链序列信息

序列名称	SEQ ID NO:	氨基酸序列
OKT3-VH	1	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS
OKT3-VL	2	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEIN
I2C-VH	3	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS
I2C-VL	4	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
40G5c-VH	5	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQGLEWIGWIYPGDGNTKYNEKFKGRATLTADTSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCARDSYSNYYFDYWGQGTLVTVSS
40G5c-VL	6	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCTQSFILRTFGQGTKVEIK
7221G20-VH	7	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYSMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKYGSGYGKFYYYGMDVWGQGTTVTVSS
7221G20-VL	8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK
F2B-VH	9	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGTLVTVSS
F2B-VL	10	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPWTFGQGTKVEIK
SP34-VH	11	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTED

		TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
SP34-VL	12	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
人重链恒定区	13	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
人轻链恒定区	14	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
鼠重链恒定区	15	AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK
鼠轻链恒定区	16	RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

实施例 2 表达 CD3 细胞的鉴定

2.1 内源性表达 CD3 细胞株的鉴定

将悬浮细胞 Jurkat 细胞(购自中国科学院细胞库)在 T-175 细胞培养瓶中扩大培养至对数生长期，离心弃去培养基上清，细胞沉淀用 PBS 洗涤 2 次。对上一步的细胞进行细胞计数后将细胞沉淀用[PBS+2%(w/v)FBS]封闭液重悬至 4×10^6 个细胞/毫升，按 50μl/孔加入到 96 孔 FACS 反应板中，离心去除上清，加入起始浓度 100nM，1:5 梯度稀释的检测抗体及 IgG 阴性对照，每孔 100μl，将细胞混匀，冰上孵育 1 小时。用 PBS 缓冲液离心洗涤 3 次，加入 50μl/孔 Alexa647 标记的二抗(购自 Jackson，货号：109-605-088)，冰上孵育 1 小时。用 PBS 缓冲液离心洗涤 5 次，用 FACS(FACS CantoII，购自 BD 公司)检测和分析结果。通过软件(CellQuest)进行数据分析，得到细胞的平均荧光强度(MFI)。再通过软件(GraphPad Prism8)分析，进行数据拟合，计算 EC50 值。其中检测抗体为 SP34、OKT3 抗体，对照为 hIgG1。分析结果如表 2 以及图 1 所示。结果表明：Jurkat 细胞可与 SP34 及 OKT3 结合，与 hIgG1 不结合，Jurkat 细胞可作为 CD3 抗体筛选的阳性细胞。

表 2 内源性细胞系 Jurkat 的 FACS 检测结果

序号	抗体名称	Jurkat 细胞平均荧光强度	
		最大荧光-Alexa647	EC50 (nM)
1	SP34	7327	0.45
2	OKT3	8931	0.15
3	hIgG1	108	阴性

2.2 不表达 CD3 细胞株的鉴定

将 MOLT4 细胞(购自中科院细胞库，TCHU224)在 T-175 细胞培养瓶中扩大培养至对数生长期，离心弃去培养基上清，细胞沉淀用 PBS 洗涤 2 次。按照实施例 2.1 的方法进行 FACS 检测与数据分析。其中检测抗体为 SP34 和 OKT3 抗体，对照为 hIgG1。分析结果如表 3 所示。结果表明：MOLT4 细胞不与 SP34 及 OKT3 结合，MOLT4 细胞可作为 CD3 抗体筛选的阴性细胞。

表 3 内源性细胞系 MOLT4 的 FACS 检测结果

序号	抗体名称	MOLT4 细胞平均荧光强度	
		最大荧光值 Alexa 647	EC50 (nM)
1	SP34	211	阴性
2	OKT3	285	阴性
3	hIgG1	273	阴性

2.3 人 T 细胞的扩增

将人 PBMC 细胞(购自澳赛尔斯生物技术(上海)有限公司)按照 T 细胞激活/扩增试剂盒(T Cell Activation/Expansion Kit (人类，购自美天旎，货号：130-091-441))的说明书描述完成 T 细胞的扩增实验。当细胞培养至 14 天时，离心弃去培养基上清，细胞沉淀用 PBS 洗涤 2 次。用 SP34 抗体作为一抗，Alexa647 标记的二抗(购自 Jackson Immuno，货号：109-605-098)，按照实施例 2.1 的方法进行 FACS 检测与数据分析。分析结果如表 4 以及图 2 所示。结果表明人 PBMC 经扩增后得到了 CD3 阳性的 T 细胞。

表 4 人 T 细胞的 FACS 检测结果

抗体名称	T 细胞平均荧光强度	
	最大荧光值 Alexa 647	EC50 (nM)
SP34	6145	2.54
hIgG1	480	阴性

2.4 食蟹猴 T 细胞的扩增

将食蟹猴 PBMC(以下简称猴 PBMC，购自上海美迪西生物医药股份有限公司)按照 T 细胞激活/扩增试剂盒(T Cell Activation/Expansion Kit (非人灵长目动物，购自美天旎，货号：130-092-919))的说明书描述完成食蟹猴(以下简称猴)T 细胞的扩增实验。当细胞培养至 14 天时，离心弃去培养基上清，细胞沉淀用 PBS 洗涤 2 次。用 SP34 抗体作为一抗，Alexa647 标记的二抗(购自 Jackson Immuno，货号：109-605-098)，按照实施例 2.1 的方法进行 FACS 检测与数据分析。分析结果如表 5 以及图 3 所示。结果表明：猴 PBMC 经扩增后得到了 CD3 阳

性的 T 细胞。

表 5 猴 T 细胞的 FACS 检测结果

抗体名称	T 细胞平均荧光强度	
	最大荧光值 Alexa 647	EC50 (nM)
SP34	21174	0.49
hIgG1	299	阴性

实施例 3 抗人 CD3 杂交瘤单克隆抗体的制备

3.1 小鼠免疫和杂交瘤融合

使用含人 CD3ε-ECD 的蛋白(购自 Sino biological，10977-H02H)作为免疫原，免疫 6~8 周龄雌性 BALB/c AnNCrl 小鼠，SJL/JorllcoCrl 小鼠，MRL/lpr 小鼠或 C57 小鼠(均购自上海斯莱克公司)。初次免疫时，免疫原用 TiterMax(购自 Sigma，货号 T2684)乳化后皮下与腹腔分别注射 0.1 毫升，即每只小鼠注射 50 微克免疫原蛋白。加强免疫时，免疫原用 Imject Alum 佐剂(购自 Thermofisher scientific 货号：77161)皮下与腹腔分别注射 0.1 毫升，即每只小鼠注射 25 微克免疫原。

脾细胞融合前 3 天在皮下和腹膜内注射 50μg/只的生理盐水配制的抗原溶液进行最后一次加强免疫。分离脾脏后加入 ACK 裂解缓冲液(购自 Gibco，货号：A1049201)，裂解脾细胞中掺杂的红细胞，获得脾细胞悬液。用 DMEM(购自 Gibco，货号 10569-010)基础培养基 1000 转每分钟离心清洗细胞 3 次，然后按照活细胞数目 2:1 比率与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0(购自 ATCC，CRL-1581)混合，采用 BTX ECM2001+高效电融合方法(参见 METHODS IN ENZYMOLOGY, VOL. 220)进行细胞融合。融合后的细胞稀释到含 10%胎牛血清(ExCell Bio，货号 FSD500)、1×HAT(购自 Sigma，货号：H0262)的 DMEM 培养基(购自 Gibco，货号：10569-010)中，所述百分比为体积百分比。然后按 2×10^4/200 微升每孔加入到 96 孔细胞培养板中，放入 5% CO_2、37°C培养箱中进行培养，杂交瘤分泌抗体后的培养基上清作为杂交瘤上清液进行阳性克隆筛选。

3.2 小鼠杂交瘤筛选

通过 ELISA 检测杂交瘤上清与人 CD3ε/δ-His(购自北京义翘神州科技有限公司，货号：CT038-H2508H)和猴 CD3ε/δ-His(购自 Acrobiosystems，CDD-C52W4)的结合，对杂交瘤上清液进行筛选(参照下文的实施例 10.1)。通过流式细胞术检测 ELISA 阳性克隆杂交瘤上清与 Jurkat 细胞、猴 T 细胞的结合以及通过报告基因系统(方法参照实施例 2.1、实施例 2.4 和下文的实施例 7.1)检测杂交瘤上清对 Jurkat-Lucia NFAT(购自 InvivoGen，货号 jktl-nfat)细胞的激活情况。根据杂交瘤上清检测结果，挑选优秀克隆(详见表 6-8)，扩大培养，液氮冻存即得本申请杂交瘤细胞。

表 6 ELISA 测试杂交瘤上清与人和猴 CD3ε/δ 的结合

ELISA(OD_{450})		
克隆号	人 CD3ε/δ	猴 CD3ε/δ
1-22.6	2.17	3.08
SP34-mIgG1	2.65	2.88

mIgG1	0.05	0.07
克隆号	人 CD3ε/δ	猴 CD3ε/δ
5-7.13	2.08	2.09
5-40.21	2.15	1.82
SP34-mIgG1	1.82	1.87
mIgG1	0.05	0.04
克隆号	人 CD3ε/δ	猴 CD3ε/δ
6-35.22	2.01	1.74
6-44.5	2.06	1.94
SP34-mIgG1	1.79	1.63
mIgG1	0.04	0.05
克隆号	人 CD3ε/δ	猴 CD3ε/δ
7-35.6	1.56	1.46
SP34-mIgG1	1.40	1.57
mIgG1	0.04	0.04
克隆号	人 CD3ε/δ	猴 CD3ε/δ
8-18.1	2.04	2.14
SP34-mIgG1	1.79	1.84
mIgG1	0.04	0.04

表 7 通过流式细胞术检测与 Jurkat 细胞和猴 T 细胞的结合

克隆号	Jurkat 平均荧光强度	猴 T 细胞平均荧光强度	MOLT4 平均荧光强度
1-22.6	767	20819	132
SP34-mIgG1	1293	22144	52
mIgG1	92	158	122
克隆号	Jurkat 平均荧光强度	猴 T 细胞平均荧光强度	MOLT4 平均荧光强度
5-7.13	8276	16321	61
5-40.21	6906	15166	105
SP34-mIgG1	5275	7562	156
mIgG1	152	51	143
克隆号	Jurkat 平均荧光强度	猴 T 细胞平均荧光强度	MOLT4 平均荧光强度
6-35.22	7048	32618	124
6-44.5	7240	36249	98
SP34-mIgG1	6388	23752	124
mIgG1	242	82	107
克隆号	Jurkat 平均荧光强度	猴 T 细胞平均荧光强度	MOLT4 平均荧光强度
7-35.6	284	1646	44
SP34-mIgG1	6034	13383	180
mIgG1	70	28	80
克隆号	Jurkat 平均荧光强度	猴 T 细胞平均荧光强度	MOLT4 平均荧光强度
8-18.1	895	3102	69
SP34-mIgG1	3141	10636	75
mIgG1	145	71	56

表 8 报告基因检测 CD3 抗体激活下游通路信号

报告测定(RLU)		
克隆号	杂交瘤上清被稀释 4 倍	杂交瘤上清被稀释 20 倍
1-22.6	15970	8890

SP34-mIgG1	5420	22840
mIgG1	2220	2560
克隆号	杂交瘤上清被稀释 4 倍	杂交瘤上清被稀释 20 倍
5-7.13	24510	27830
5-40.21	18880	15550
SP34-mIgG1	15100	25250
mIgG1	2370	1940
克隆号	杂交瘤上清被稀释 4 倍	杂交瘤上清被稀释 20 倍
6-35.22	29050	34110
6-44.5	26170	21410
SP34-mIgG1	38630	23640
mIgG1	3930	5190
克隆号	杂交瘤上清被稀释 4 倍	杂交瘤上清被稀释 20 倍
7-35.6	27450	14800
SP34-mIgG1	21530	38540
mIgG1	1760	1790
克隆号	杂交瘤上清被稀释 4 倍	杂交瘤上清被稀释 20 倍
8-18.1	26950	17770
SP34-mIgG1	25370	23930
mIgG1	1100	1200

实施例 4 杂交瘤阳性克隆轻链重链可变区氨基酸序列测定及人鼠嵌合抗体的生产

4.1 杂交瘤阳性克隆轻链重链可变区氨基酸序列测定

收集处于对数生长期的阳性杂交瘤细胞，用 Trizol(Invitrogen,Cat No.15596-018)充分裂解后于-80℃保存待测。样品委托苏州金唯智生物生物科技有限公司测定杂交瘤阳性克隆轻链重链可变区氨基酸序列，抗体重链可变区与轻链可变区如表 9 所示，对应 CDR 如表 10 所示。

表 9 杂交瘤筛选抗体的轻链可变区与重链可变区序列

SEQ ID NO:	克隆名称	序列
17	1-22.6-VH	QIPLVQSGPELKKPGETVKISCKTSGYTFTSYGMSWVKQAPGKGLKWMGWINTYSGVPTYADDFKGRFVFSLDTSASTAFLQINNLKNEDTATYFCARLKNNPFCWGQGSTLTVFS
18	1-22.6-VL	DVLMTQSPLSLPVRLGDQASISCRSSQLILHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHFPWTFGGGTKLEIK
19	5-7.13-VH	QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWVHWVKQRPGQGLEWIGNINPSDGVTNYNEKFKSRATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRDAYGQYYFDDWGQGTTLTVSS
20	5-7.13-VL	DIVMSQSPSSLVVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASVRDSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQAEDLAVYYCIQSYYLRTFGGGTILEIK
21	5-40.21-VH	QVQLQQPGSELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGNTYPGSGSTNYDEKFKSKATLTVDSSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRDRYGVYYFDYWGQGTTLTVSS
22	5-40.21-VL	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCTQSYNLRTFGGGTKLEIK
23	6-35.22-VH	EVKLVESGGGLVQPGASLSLSCAASGFTFTDYYMSWVRQPPGKALEWLAM

		SRNKAKGHTIEYSSSVKGRFTISRDNSQSILYLQMNALRAEDSATYYCARDTYESYDGYFDVWGAGTTVIVSS
24	6-35.22-VL	DIVMSQSPSSLAVSAGETVTMSCKSSQSLFNSRSRKNYLAWYQQKPGQTPKLLIYWASIRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYYLYTFGSGTKLEIK
25	6-44.5-VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGHTFTSHIMHWVKQKPGQGLEWIGYINPNNDRTEYSEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAGEAYYSNSLYAMDYWGQGTSVTVSS
26	6-44.5-VL	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLFNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPELLIYWASTRESGVPVRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYYLRTFGGGTKLEVK
27	7-35.6-VH	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKINNYATYYGDSVKDRFTISRDDSQSMFYLQMNNLKTEDTAMYYCVIHENYGSISWFAYWGQGTLVTVSA
28	7-35.6-VL	QAVVTQESTLTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVL
29	8-18.1-VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYIFTMNTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPYSGYTKYNQIFKDKATLTADKSSSTAYMRLSSLTSEDSAVYYCLRGGEGVWGQGTTLTVSS
30	8-18.1-VL	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSELGSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPRTFGGGTKLEIK

表 10 抗体 CDR 序列

抗体名称	定义方式	CDR1	CDR2	CDR3
1-22.6-VH	Kabat	SYGMS (SEQ ID NO:31)	WINTYSGVPTYADDFKG (SEQ ID NO:34)	LKNNPFC (SEQ ID NO:37)
	Chothia	GYTFTSY (SEQ ID NO:32)	NTYSGV (SEQ ID NO:35)	LKNNPFC (SEQ ID NO:37)
	IMGT	GYTFTSYG (SEQ ID NO:33)	INTYSGVP (SEQ ID NO:36)	ARLKNNPFC (SEQ ID NO:38)
1-22.6-VL	Kabat	RSSQLILHSNGNTYLE (SEQ ID NO:39)	KVSNRFS (SEQ ID NO:41)	FQGSHFPWT (SEQ ID NO:43)
	Chothia	RSSQLILHSNGNTYLE (SEQ ID NO:39)	KVSNRFS (SEQ ID NO:41)	FQGSHFPWT (SEQ ID NO:43)
	IMGT	QLILHSNGNTY (SEQ ID NO:40)	KVS (SEQ ID NO:42)	FQGSHFPWT (SEQ ID NO:43)
5-7.13-VH	Kabat	SYWVH (SEQ ID NO:44)	NINPSDGVTNYNEKFKS (SEQ ID NO:47)	DAYGQYYFDD (SEQ ID NO:50)
	Chothia	GYTFTSY (SEQ ID NO:45)	NPSDGV (SEQ ID NO:48)	DAYGQYYFDD (SEQ ID NO:50)
	IMGT	GYTFTSYW (SEQ ID NO:46)	INPSDGVT (SEQ ID NO:49)	TRDAYGQYYFDD (SEQ ID NO:51)
5-7.13-VL	Kabat	KSSQSLLNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:52)	WASVRDS (SEQ ID NO:54)	IQSYYLRT (SEQ ID NO:56)
	Chothia	KSSQSLLNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:52)	WASVRDS (SEQ ID NO:54)	IQSYYLRT (SEQ ID NO:56)
	IMGT	QSLLNSRTRKNY (SEQ ID NO:53)	WAS (SEQ ID NO:55)	IQSYYLRT (SEQ ID NO:56)
5-40.21-VH	Kabat	SYWMH (SEQ ID NO:57)	NTYPGSGSTNYDEKFKS (SEQ ID NO:60)	DRYGVYYFDY (SEQ ID NO:63)
	Chothia	GYTFTSY (SEQ ID NO:58)	YPGSGS (SEQ ID NO:61)	DRYGVYYFDY (SEQ ID NO:63)
	IMGT	GYTFTSYW (SEQ ID NO:59)	TYPGSGST (SEQ ID NO:62)	TRDRYGVYYFDY (SEQ ID NO:64)

5-40.21-VL	IMGT	KSSQSLLNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:65)	WASTRES (SEQ ID NO:67)	TQSYNLRT (SEQ ID NO:69)
	Chothia	KSSQSLLNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:65)	WASTRES (SEQ ID NO:67)	TQSYNLRT (SEQ ID NO:69)
	IMGT	QSLLNSRTRKNY (SEQ ID NO:66)	WAS (SEQ ID NO:68)	TQSYNLRT (SEQ ID NO:69)
6-35.22-VH	Kabat	DYYMS (SEQ ID NO:70)	MSRNKAKGHTIEYSSSVKG (SEQ ID NO:73)	DTYESYDGYFDV (SEQ ID NO:76)
	Chothia	GFTFTDY (SEQ ID NO:71)	RNKAKGHT (SEQ ID NO:74)	DTYESYDGYFDV (SEQ ID NO:76)
	IMGT	GFTFTDYY (SEQ ID NO:72)	SRNKAKGHTI (SEQ ID NO:75)	ARDTYESYDGYFDV (SEQ ID NO:77)
6-35.22-VL	Kabat	KSSQSLFNSRSRKNYLA (SEQ ID NO:78)	WASIRES (SEQ ID NO:80)	KQSYYLYT (SEQ ID NO:82)
	Chothia	KSSQSLFNSRSRKNYLA (SEQ ID NO:78)	WASIRES (SEQ ID NO:80)	KQSYYLYT (SEQ ID NO:82)
	IMGT	QSLFNSRSRKNY (SEQ ID NO:79)	WAS (SEQ ID NO:81)	KQSYYLYT (SEQ ID NO:82)
6-44.5-VH	Kabat	SHIMH (SEQ ID NO:83)	YINPNNDRTEYSEKFKG (SEQ ID NO:86)	EAYYSNSLYAMDY (SEQ ID NO:89)
	Chothia	GHTFTSH (SEQ ID NO:84)	NPNNDR (SEQ ID NO:87)	EAYYSNSLYAMDY (SEQ ID NO:89)
	IMGT	GHTFTSHI (SEQ ID NO:85)	INPNNDRT (SEQ ID NO:88)	AGEAYYSNSLYAMDY (SEQ ID NO:90)
6-44.5-VL	Kabat	KSSQSLFNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:91)	WASTRES (SEQ ID NO:93)	KQSYYLRT (SEQ ID NO:95)
	Chothia	KSSQSLFNSRTRKNYLA (SEQ ID NO:91)	WASTRES (SEQ ID NO:93)	KQSYYLRT (SEQ ID NO:95)
	IMGT	QSLFNSRTRKNY (SEQ ID NO:92)	WAS (SEQ ID NO:94)	KQSYYLRT (SEQ ID NO:95)
7-35.6-VH	Kabat	TYAMN (SEQ ID NO:96)	RIRSKINNYATYYGDSVKD (SEQ ID NO:99)	HENYGSISWFAY (SEQ ID NO:102)
	Chothia	GFTFNTY (SEQ ID NO:97)	RSKINNYA (SEQ ID NO:100)	HENYGSISWFAY (SEQ ID NO:102)
	IMGT	GFTFNTYA (SEQ ID NO:98)	IRSKINNYAT (SEQ ID NO:101)	VIHENYGSISWFAY (SEQ ID NO:103)
7-35.6-VL	Kabat	RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:104)	GTNNRAP (SEQ ID NO:106)	ALWYSNHWV (SEQ ID NO:108)
	Chothia	RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:104)	GTNNRAP (SEQ ID NO:106)	ALWYSNHWV (SEQ ID NO:108)
	IMGT	TGAVTTSNY (SEQ ID NO:105)	GTN (SEQ ID NO:107)	ALWYSNHWV (SEQ ID NO:108)
8-18.1-VH	Kabat	MNTMH (SEQ ID NO:109)	YINPYSGYTKYNQIFKD (SEQ ID NO:112)	GGEGV (SEQ ID NO:115)
	Chothia	GYIFTMN (SEQ ID NO:110)	NPYSGY (SEQ ID NO:113)	GGEGV (SEQ ID NO:115)
	IMGT	GYIFTMNT (SEQ ID NO:111)	INPYSGYT (SEQ ID NO:114)	LRGGEGV (SEQ ID NO:116)
8-18.1-VL	Kabat	KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:117)	LVSELGS (SEQ ID NO:119)	WQGTHFPRT (SEQ ID NO:121)
	Chothia	KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO:117)	LVSELGS (SEQ ID NO:119)	WQGTHFPRT (SEQ ID NO:121)
	IMGT	QSLLDSDGKTY (SEQ ID NO:118)	LVS (SEQ ID NO:120)	WQGTHFPRT (SEQ ID NO:121)

4.2 人鼠嵌合抗体的生产

委托泰州市百英生物科技有限公司将表 9 所列的重链可变区序列分别克隆到包含信号肽和人源抗体 IgG1 的重链恒定区的表达载体 pcDNA3.4-B1HH1(重链恒定区氨基酸序列如 SEQ ID NO:13 所示)，轻链可变区序列分别克隆到包含信号肽和对应人源抗体 IgG1 κ 轻链恒定区的表达载体pcDNA3.4-B1HLK(轻链恒定区氨基酸序列如SEQ ID NO:14 所示)或包含信号肽和人源抗体 IgG1 的 λ 轻链恒定区的表达载体 pcDNA3.4- BIHL5(轻链恒定区氨基酸序列如 SEQ ID NO:122 所示)，获得人鼠嵌合抗体的表达载体并参照实施例 1 所示方法表达和纯化嵌合抗体。

GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS(SEQ ID NO:122)。

实施例 5 CD3 人鼠嵌合抗体的鉴定

5.1 流式细胞实验(FACS)检测嵌合抗体与不同 CD3 表达细胞的结合

嵌合抗体与细胞表面 CD3 的结合情况，通过检测抗体与 Jurkat 细胞及人 T 细胞结合来分析。将悬浮细胞 Jurkat 细胞在 T-75 细胞培养瓶中扩大培养至对数生长期，离心弃去培养基上清，细胞沉淀用 PBS 洗涤 2 次，备用。经扩增后的人 T 细胞，用 PBS 洗涤 2 次，备用。对上一步的细胞进行细胞计数后将细胞沉淀用[PBS+2%(w/w)BSA]封闭液重悬至 4×10^6 个细胞/毫升，按 50μl/孔加入到 96 孔 FACS 反应板中，按 50μl/孔加入待测嵌合抗体，4℃孵育 1h。用 PBS 缓冲液离心洗涤 3 次，加入 50μl/孔 Alexa Flour 647 标记的二抗(购自 Jackson Immuno ，货号：109-605-098)，冰上孵育 1 小时。用 PBS 缓冲液离心洗涤 5 次，用 FACS(FACS CantoTM，购自 BD 公司)检测和分析结果。通过软件(CellQuest)进行数据分析，得到细胞的平均荧光密度(MFI)。再通过软件(GraphPad Prism8)分析，进行数据拟合，计算 EC50 值。使用同样的方法同时检测嵌合抗体与内源 CD3 阴性的细胞 MOLT4 细胞的结合。分析结果如表 11-1~11-4 以及图 4A-4D 和图 5A-5C 所示，嵌合抗体可结合 Jurkat 细胞和人 T 细胞，不结合 MOLT4 细胞，具有很好的特异性。另外，与 Jurkat 细胞系相比，嵌合抗体与人 T 细胞的结合更能反映抗体与免疫细胞上 CD3 的结合情况，因此，未再检测 8-18.1 嵌合抗体与 Jurkat 细胞的结合。

表 11-1. FACS 检测嵌合抗体与 Jurkat、人 T 细胞和 MOLT4 的结合反应

抗体名称	人 T 细胞		Jurkat		MOLT4
	EC50(nM)	MFI_Max	EC50(nM)	MFI_Max	MFI_Max
1-22.6	18.15	15126	4.28	2083	124
SP34	0.43	43060	0.13	7022	570
F2B	7.56	8775	8.77	841	93
40G5c	0.46	40947	0.16	6345	156
hIgG1	NB	148	NB	151	126

注：NB 代表未结合。

表 11-2. FACS 检测嵌合抗体与 Jurkat、人 T 细胞和 MOLT4 的结合反应

抗体名称	人 T 细胞	Jurkat	MOLT4

	EC50(nM)	MFI_Max	EC50(nM)	MFI_Max	MFI
5-7.13	0.10	15922	0.06	32219	328
5-40.21	0.99	11416	0.44	26740	146
6-35.22	3.62	8902	8.30	26743	123
6-44.5	0.62	13290	0.15	31689	225
40G5c	0.70	12335	0.10	29471	168
F2B	10.44	1985	20.35	4861	66
hIgG1	19.92	823	NB	490	68

注：NB 代表未结合。

表 11-3. FACS 检测嵌合抗体与 Jurkat、人 T 细胞和 MOLT4 的结合反应

抗体名称	人 T 细胞		Jurkat		MOLT4
	MFI_Max	EC50(nM)	MFI_Max	EC50(nM)	MFI_Max
7-35.6	3804	4.62	2802	3.37	61
40G5c	15415	0.66	11330	0.47	59
F2B	2365	15.78	2079	6.18	58
hIgG1	195	NB	182	NB	66

注：NB 代表未结合。

表 11-4. FACS 检测嵌合抗体与人 T 细胞和 MOLT4 的结合反应

抗体名称	FACS		
	人 T 细胞		MOLT4
	EC50(nM)	MFI_Max	MFI_Max
8-18.1	1.58	8982	139
40G5c	0.99	26501	161
F2B	5.71	5076	81
hIgG1	NB	124	82

注：NB 代表未结合。

实施例 6 嵌合抗体的种属交叉结合活性检测

6.1 FACS 检测嵌合抗体与猴 CD3 表达细胞的结合

将实施例 2.4 冻存的猴 T 细胞按照实施例 5.1 的方法进行 FACS 检测与数据分析。分析结果如表 12-1~12-3 以及图 6A-6D 所示，所有嵌合抗体与猴 T 细胞均有结合活性。

表 12-1 FACS 检测嵌合抗体与猴 T 细胞的结合反应

抗体名称	猴 T 细胞	
	EC50(nM)	MFI_Max
1-22.6	5.51	43563
SP34	0.27	64682
hIgG1	NB	87

F2B	NB	67
40G5c	0.28	65994

注：NB 代表未结合。

表 12-2 FACS 检测嵌合抗体与猴 T 细胞的结合反应

抗体名称	猴 T 细胞	
	EC50(nM)	MFI_Max
5-7.13	0.09	26500
5-40.21	1.09	24382
6-35.22	4.18	18150
6-44.5	0.42	27135
40G5c	0.63	24086
F2B	NB	296
hIgG1	NB	1566

注：NB 代表未结合。

表 12-3 FACS 检测嵌合抗体与猴 T 细胞的结合反应

抗体名称	猴 T 细胞	
	MFI_Max	EC50(nM)
7-35.6	11512	2.74
40G5c	24937	0.53
F2B	62	25.53
hIgG1	195	NB

注：NB 代表未结合。

表 12-4 FACS 检测嵌合抗体与猴 T 细胞的结合反应

抗体名称	猴 T 细胞		
抗体浓度	100nM	20nM	4nM
8-18.1	24771	22143	16094
40G5c	41398	41063	40999
F2B	61	60	63
hIgG1	170	80	64

实施例 7 CD3 嵌合抗体的功能鉴定

7.1 荧光素酶报告基因(报告测定)检测嵌合抗体的功能

为检测嵌合抗体激活 CD3 细胞内的信号通路，将待检测的抗体用 PBS 稀释，起始浓度为 133nM，按 1:2 梯度稀释后，以 100μl/孔加到 96 孔板。盖好盖子，37°C孵育 3 小时后，用 PBS 洗板 3 次。收集处于对数生长期的 Jurkat-Lucia NFAT(购自 InvivoGen，货号 jktl-nfat)，用含 2% FBS 的培养基(RPMI 1640，采购于 Gibco，货号 12633012)调节细胞浓度至 2e6/mL，

按 200μL/孔将细胞加入洗好的 96 孔板中。37°C孵育 24 小时后 400g 离心 5 分钟，取上清 20μL 至黑色不透明 96 孔检测板中，加入 50μL 检测试剂(采购于 QUANTI-Luc，品牌：Invivogen，货号：rep-qlc2)，通过 PerkiElmer Ensight 酶标仪读取响应值，再通过软件(GraphPad Prism8)分析，进行数据拟合，计算 EC50 值。结果如表 13-1~13-4 及图 7A-7D 所示，在报告测定中，所有抗体均能激活 Jurkat-Lucia NFAT 细胞的下游信号通路。

表 13-1 荧光素酶报告基因检测人鼠嵌合抗体激活 Jurkat-Lucia NFAT **细胞信号通路**

抗体名称	EC50(nM)	最大响应值(RLU)
1-22.6	11.63	31670
F2B	23.7	14540
40G5c	1.74	33440
hIgG1	阴性	1830

表 13-2 荧光素酶报告基因检测人鼠嵌合抗体激活 Jurkat-Lucia NFAT **细胞信号通路**

抗体名称	EC50(nM)	最大响应值(RLU)
5-7.13	0.70	55440
5-40.21	4.79	46150
6-35.22	0.82	27020
6-44.5	1.84	33600
40G5c	5.97	46910
F2B	拟合差	12040
hIgG1	阴性	2330

表 13-3 荧光素酶报告基因检测人鼠嵌合抗体激活 Jurkat-Lucia NFAT **细胞信号通路**

抗体名称	EC50(nM)	最大响应值(RLU)
7-35.6	11.81	8570
40G5c	5.04	14320
F2B	7.41	6560
hIgG1	阴性	4250

表 13-4 荧光素酶报告基因检测人鼠嵌合抗体激活 Jurkat-Lucia NFAT **细胞信号通路**

抗体名称	EC50(nM)	最大响应值(RLU)
8-18.1	11.85	10390
40G5c	22.49	25450
F2B	拟合差	8220
hIgG1	阴性	3780

实施例 8 CD3 抗体亲和力测定

8.1 嵌合抗体与人 CD3ε-His 蛋白亲和力测定

使用 Protein A 芯片(GE Helthcare；29-127-558)捕获抗人 CD3 嵌合抗体。样品和运行缓冲

液是 HBS-EP+(10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05%表面活性剂 P20) (GE Healthcare；BR-1006-69)。流经池设置为 25℃。样品块设置为 16℃。两者都用运行缓冲液预处理。在每一个循环中，首先用 Protein A 芯片捕获待测抗体，然后注入单一浓度的 CD3ε抗原蛋白(购自北京义翘神州科技有限公司，货号：10977-H08H)，记录抗体和抗原蛋白的结合和解离过程，最后用甘氨酸溶液(pH1.5，GE Helthcare; BR-1003-54)完成芯片再生。通过注射溶液中不同浓度的重组人 CD3ε-ECD His 持续 240 秒来测量结合，其中流速为 30μL/分钟，从 200nM 起始 (测试的实际浓度见详细结果)，以 1：1 稀释，总共 5 个浓度。监测解离相长达 600 秒，并通过从样品溶液切换到运行缓冲液触发。通过用 10mM 甘氨酸溶液(pH1.5)以 30μL/分钟的流速洗涤 30 秒，再生表面。通过减去从山羊抗人 Fc 表面获得的响应来校正本体折射率(Bulk refractive index)差异。也减去空白注射(＝双重参照)。为了计算表观 KD 和其他动力学参数，使用 Langmuir 1：1 模型。嵌合抗体抗体与人 CD3ε-His 蛋白的结合速率(Ka)、解离速率(Kd)及结合亲和力(KD)如表 14 所示。嵌合抗体与人 CD3 的亲和力在 0.1nM 到 10nM 之间。

表 14 SPR(biacore)检测嵌合抗体与人 CD3ε 的亲和力

抗体名称	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
1-22.6	1.27E+05	6.99E-04	5.51E-09
5-40.21	6.86E+05	3.79E-04	5.53E-10
5-7.13	7.85E+05	2.70E-04	3.45E-10
6-44.5	5.81E+05	2.59E-04	4.45E-10
7-35.6	2.72E+05	2.61E-04	9.59E-10
8-18.1	4.45E+05	2.41E-04	5.42E-10
40G5c	1.58E+06	3.21E-04	2.03E-10

实施例 9 抗体的人源化设计

鼠源抗体 6-44.5、6-35.22、7-35.6、8-18.1、5-7.13、5-40.21 和 1-22.6 的人源化设计：通过比对 IMGT(http://imgt.cines.fr)人类抗体重链轻链可变区种系基因数据库，挑选合适的序列作为鼠源抗体的人源化轻链模板和人源化重链模板。首先，将鼠源抗体的 CDR 分别移植到其人源模板的 FR 中，形成次序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的可变区序列。根据抗体的三维结构模拟，将人源化抗体的 FR 区序列中关键氨基酸进行回复突变为鼠源抗体对应的氨基酸，以保证原有的亲和力。另外，根据具体需要，将人源化抗体的 CDR 区序列中的部分氨基酸突变为人源模板对应的同源氨基酸以提高人源化程度，或者突变为其他氨基酸以优化分子的理化性质（例如对容易发生脱酰胺修饰、糖基化修饰以及异构化的位点就行 hot spot 突变），得到人源化抗体。本实施例抗体的 CDR 区由 Kabat 编号系统确定并注释(http://www.abysis.org/abysis/sequence_input/key_annotation/key_annotation.cgi)。其中鼠源抗体对应的人源化模板参见表 15，最终人源化抗体对应的 VL 和 VH 参见表 16，具体序列参见表 17，部分人源化抗体序列的 CDR（发生 hot spot 突变）参见表 18，其余 CDR 序列在人源化前后未发生变化，此处未再次列出。参照实施例 4.2 生产人源化抗体。

表 15 鼠源抗体对应的人源化模板

鼠源抗体克隆号	人源化轻链模板	人源化重链模板
6-44.5	IGKV2-40*01 + IGKJ4*01	IGHV1-69*02 + IGHJ6*01
6-35.22	IGKV4-1*01 + IGKJ2*01	IGHV3-30*01 + IGHJ6*01
7-35.6	IGLV7-43*01 + IGLJ2*01	IGHV3-73*01 + IGHJ1*01
8-18.1	IGKV2-30*01 + IGKJ4*01	IGHV1-3*01 + IGHJ6*01
5-7.13	IGKV4-1*01，IGKV2-40*01 和 IGKJ4*01	IGHV1-3*01 和 IGHJ6*01
5-40.21	IGKV4-1*01，IGKV2-40*01 和 IGKJ4*01	IGHV1-3*01 和 IGHJ6*01
1-22.6	IGKV2-40*01，IGKV4-1*01 和 IGKJ4*01	IGHV7-4-1*02 和 IGHJ6*01

表 16 人源化抗体对应的 VL 和 VH

人源化抗体	VL	VH
6-44.5-H1-L2	6-44.5-L2(SEQ ID NO:123)	6-44.5-H1(SEQ ID NO:124)
6-35.22-H1-L1	6-35.22-L1(SEQ ID NO:125)	6-35.22-H1(SEQ ID NO:126)
7-35.6-H2-L3	7-35.6-L3(SEQ ID NO:127)	7-35.6-H2(SEQ ID NO:128)
8-18.1-H1-L2	8-18.1-L2(SEQ ID NO:129)	8-18.1-H1(SEQ ID NO:130)
5-7.13-H1a-L2	5-7.13-L2(SEQ ID NO:131)	5-7.13-H1a(SEQ ID NO:132)
5-40.21-H3-L1	5-40.21-L1(SEQ ID NO:133)	5-40.21-H3(SEQ ID NO:134)
1-22.6-1-H2a-L2a	1-22.6-1-L2a(SEQ ID NO:135)	1-22.6-1-H2a(SEQ ID NO:136)

表 17 人源化抗体 VL 和 VH 序列

编号	序列
6-44.5-L2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYYLRTFGGGTKVEIK(SEQ ID NO:123)
6-44.5-H1	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGHTFSSHIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPNNDRTE YSEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGEAYYSNSLYAMDYWGQGTTVTV SS(SEQ ID NO:124)
6-35.22-L1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLFNSRSRKNYLAWYQQKPGQTPKLLIYWASIRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYYLYTFGQGTKLEIK(SEQ ID NO:125)
6-35.22-H1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTDYYMSWVRQAPGKGLEWVAMSRNKAKGHT IEYSSSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDTYESYDGYFDVWGQGTTVT VSS(SEQ ID NO:126)
7-35.6-L3	ETVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAFTGLIGGTNNRAPWTP ARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVL(SEQ ID NO:127)
7-35.6-H2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKINNYAT YYGDSVKDRFTISRDDSKNTFYLQMNSLKTEDTAVYYCVIHENYGSISWFAYWGQGTLVTV SS(SEQ ID NO:128)
8-18.1-L2	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLQQRPGQSPRRLIYLVSELGSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPRTFGGGTKVEIK(SEQ ID NO:129)
8-18.1-H1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTMNTMHWVRQAPGQRLEWMGYINPYSGYT KYNQIFKDRVTITADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCLRGGEGVWGQGTTVTVSS(SEQ ID NO:130)
5-7.13-L2	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYLQKPGQSPQLLIYWASVRDS

	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCIQSYYLRTFGGGTKVEIK(SEQ ID NO:131)
5-7.13-H1a	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWVHWVRQAPGQRLEWMGNINPSDGVTNYNEKFKSRVTITVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRDAYGQYYFDNWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:132)
5-40.21-L1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCTQSYNLRTFGGGTKVEIK(SEQ ID NO:133)
5-40.21-H3	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQGLEWMGNTYPGSGSTNYDEKFKSRVTITVDSSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRDRYGVYYFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:134)
1-22.6-1-L2a	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQLILHSSGNTYLEWYQQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCFQGSHFPWTFGGGTKVEIK(SEQ ID NO:135)
1-22.6-1-H2a	EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKTSGYTFTSYGMSWVRQAPGQGLEWMGWINTYSGVPTYAQDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARLKNNPFVWGQGTTVTVSS(SEQ ID NO:136)

表 18 部分人源化抗体的 CDR 序列

抗体名称	定义方式	CDR1	CDR2	CDR3
1-22.6-1-H2a(hotspot 修复)	Kabat	SYGMS (SEQ ID NO:31)	WINTYSGVPTYAQDFKG (SEQ ID NO:137)	LKNNPFV (SEQ ID NO:138)
	Chothia	GYTFTSY (SEQ ID NO:32)	NTYSGV (SEQ ID NO:35)	LKNNPFV (SEQ ID NO:138)
	IMGT	GYTFTSYG (SEQ ID NO:33)	INTYSGVP (SEQ ID NO:36)	ARLKNNPFV (SEQ ID NO:139)
1-22.6-1-L2a(hot spot 修复)	Kabat	RSSQLILHSSGNTYLE (SEQ ID NO:140)	KVSNRFS (SEQ ID NO:41)	FQGSHFPWT (SEQ ID NO:43)
	Chothia	RSSQLILHSSGNTYLE (SEQ ID NO:140)	KVSNRFS (SEQ ID NO:41)	FQGSHFPWT (SEQ ID NO:43)
FQGSHFPWT FQGSHFPWT	IMGT	QLILHSSGNTY (SEQ ID NO:141)	KVS (SEQ ID NO:42)	FQGSHFPWT (SEQ ID NO:43)
5-7.13-H1a(hot spot 修复)	Kabat	SYWVH (SEQ ID NO:44)	NINPSDGVTNYNEKFKS (SEQ ID NO:47)	DAYGQYYFDN (SEQ ID NO:142)
	Chothia	GYTFTSY (SEQ ID NO:45)	NPSDGV (SEQ ID NO:48)	DAYGQYYFDN (SEQ ID NO:142)
	IMGT	GYTFTSYW (SEQ ID NO:46)	INPSDGVT (SEQ ID NO:49)	TRDAYGQYYFDN (SEQ ID NO:143)

注：带字符边框为 hot spot 修复突变位点。

实施例 10 人源化抗体与人 CD3ε 的结合能力鉴定

10.1 酶联免疫吸附实验(ELISA)检测抗体与 CD3 蛋白的结合

为检测人源化抗体与 CD3 蛋白的结合活性，将 CD3 蛋白用 PBS 稀释到终浓度 1μg/mL，

然后以 50μL/孔加到 96 孔 ELISA 板，用塑料膜封好 4℃孵育过夜，第二天用 PBS 洗板 2 次，加入封闭液[PBS+2%(v/v)BSA]室温封闭 2 小时。倒掉封闭液，加入起始浓度 100nM，1:10 梯度稀释的抗体或阴性对照抗体 50μL/孔。37℃孵育 2 小时后，用 PBS 洗板 3 次。加入 HRP(辣根过氧化物酶)标记的二抗(购自 Jackson，货号：309-035-088)，37℃孵育半小时后，用 PBS 洗板 5 次。加入 TMB 底物 50μl/孔，室温孵育 10 分钟后，加入终止液(1.0N HCl)50μL/孔。用 ELISA 读板机(Multimode Plate Reader，EnSight，购自 Perkin Elmer)读取 OD450nm 数值。实验结果如图 8A-8G、图 9A-9G 和表 19 所示。其中 IgG 对照为 hIgG1，40G5c、7221G20 和 F2B 为阳性对照。表中的数据为 OD450nm 值。结果说明，所有人源化抗体与 CD3ε 蛋白或 CD3ε/δ 蛋白在 ELISA 实验中均有结合活性。

表 19-1 人源化抗体与人 CD3ε/δ、CD3ε 蛋白结合 ELISA 水平的结合反应

抗体名称	人 CD3ε/δ		人 CD3ε	
	max_OD450	EC50(nM)	max_OD450	EC50(nM)
6-35.22-H1-L1	2.93	0.53	3.10	3.37E-02
7-35.6-H2-L3	3.15	0.32	3.12	3.95E-02
8-18.1-H1-L2	3.16	0.22	3.11	3.63E-02
5-7.13-H1a-L2	3.01	0.19	3.16	2.06E-02
40G5c	2.83	0.36	3.09	1.18E-01
F2B	0.16	阴性	0.10	阴性
7221G20	1.31	23.45	0.15	阴性
hIgG1	0.09	阴性	0.11	阴性

表 19-2 人源化抗体与人 CD3ε/δ、CD3ε 蛋白结合 ELISA 水平的结合反应

抗体名称	人 CD3ε/δ		人 CD3ε	
	max_OD450	EC50(nM)	max_OD450	EC50(nM)
5-40.21-H3-L1	3.15	0.28	1.53	0.13
1-22.6-H2a-L2a	3.29	0.45	1.49	0.10
40G5c	2.83	0.36	1.49	0.22
F2B	0.16	阴性	0.05	阴性
7221G20	1.31	23.45	0.05	阴性
hIgG1	0.09	阴性	0.09	阴性

表 19-3 人源化抗体与人 CD3ε/δ、CD3ε 蛋白结合 ELISA 水平的结合反应

抗体名称	人 CD3ε/δ		人 CD3ε	
	max_OD450	EC50(nM)	max_OD450	EC50(nM)
6-44.5-H1-L2	3.05	0.03	2.70	0.09
40G5c	2.83	0.36	2.59	0.22
F2B	0.16	阴性	016	阴性

7221G20	1.31	23.45	0.06	阴性
hIgG1	0.09	阴性	0.09	阴性

10.2 流式细胞实验(FACS)检测抗体与 CD3 表达细胞的结合

收集扩增后的人 PBMC 细胞，按照实施例 5.1 的方法进行 FACS 检测与数据分析。分析结果如图 10A-10G 以及表 20 所示，其中 IgG 对照为 hIgG1，40G5c、I2C、7221G20 和 F2B 为阳性对照。结果表明，人源化抗体与人 T 细胞表面的 CD3 有特异性结合。

表 20 人源化抗体与 CD3 表达阳性与阴性细胞 FACS 水平的结合反应

抗体名称	人 T 细胞		MOLT4
	max_MFI	EC50(nM)	max_MFI
6-35.22-H1-L1	11349	49.66	80
1-22.6-1-H2a-L2a	15865	11.04	77
7-35.6-H2-L3	10003	9.45	80
8-18.1-H1-L2	11482	7.05	124
5-40.21-H3-L1	18044	1.65	81
5-7.13-H1a-L2	35913	1.52	149
6-44.5-H1-L2	33953	0.43	96
40G5c	33491	2.09	110
I2C	38011	1.32	244
7221G20	20875	4.72	72
F2B	9273	7.03	70
hIgG1	2249	阴性	76

10.3 表面等离子共振(SPR)检测抗体与人 CD3ε 蛋白的亲和力

使用表面等离子共振(SPR)方法来测定人源化抗体与 CD3ε 蛋白的亲和力，实验方法如下：采用 Protein A 芯片(GE Helthcare；29-127-558)来捕获抗人 CD3 抗体，运行缓冲液是 HBS-EP+(10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05%表面活性剂 P20) (GE Healthcare；BR-1006-69)。流经池设置为 25℃。样品块设置为 16℃。两者都用运行缓冲液预处理。在每一个循环中，首先用 Protein A 芯片捕获待测抗体，然后注入单一浓度的 CD3ε 抗原蛋白，记录抗体和抗原蛋白的结合和解离过程，最后用 Glycine pH1.5 (GE Helthcare; BR-1003-54)完成芯片再生。通过注射溶液中不同浓度的重组人 CD3ε 持续 240 秒来测量结合，其中流速为 30μL/分钟，从 200nM 起始(测试的实际浓度见详细结果)，以 1：1 稀释，总共 5 个浓度。监测解离相长达 600 秒，并通过从样品溶液切换到运行缓冲液触发。通过用 10mM 甘氨酸溶液(pH 1 .5)以 30μL/分钟的流速洗涤 30 秒，再生表面。通过减去从山羊抗人 Fc 表面获得的响应来校正本体折射率(Bulk refractive index)差异，同时减去空白注射(＝双重参照)。为了计算表观 KD 值和其他动力学参数，使用 Langmuir 1：1 模型。人源化抗体与人 CD3ε 蛋白的结合速率(Ka)、解离速率(Kd)及结合亲和力(KD)如表 21~22 所示，所有检测的人源化抗体与人 CD3ε 的亲和

力在 1nM 左右，与人 CD3ε/δ 的亲和力在 10-200nM 之间。

表 21 SPR 检测人源化抗体与人 CD3ε 蛋白结合的亲和力

抗体名称	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
6-44.5-H1-L2	4.66E+05	3.11E-04	6.69E-10
7-35.6-H2-L3	2.86E+05	3.69E-04	1.29E-09
1-22.6-1-H2a-L2a	8.36E+04	3.05E-04	3.64E-09
5-7.13-H1a-L2	2.66E+05	2.14E-04	8.06E-10
5-40.21-H3-L1	2.60E+05	4.85E-04	1.87E-09
8-18.1-H1-L2	2.74E+05	2.49E-04	9.08E-10

表 22 SPR 检测人源化抗体与人 CD3ε/δ 蛋白结合的亲和力

抗体名称	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
1-22.6-1-H2a-L2a	1.19E+05	1.34E-02	1.13E-07
5-7.13-H1a-L2	3.58E+05	9.83E-03	2.74E-08
5-40.21-H3-L1	1.61E+05	1.84E-02	1.15E-07
6-44.5-H1-L2	4.91E+05	3.39E-02	6.90E-08
8-18.1-H1-L2	4.69E+05	3.17E-02	6.74E-08
7-35.6-H2-L3	2.31E+05	3.35E-02	1.45E-07
40G5c	1.53E+06	3.27E-02	2.13E-08
I2C	2.50E+05	1.35E-03	5.39E-09

实施例 11 人源化抗体交叉结合活性的鉴定

11.1 酶联免疫吸附实验(ELISA)检测抗体与猴 CD3 蛋白的结合

为了检测人源化抗体与猴 CD3 蛋白的结合活性，将 CD3 蛋白用 PBS 稀释到终浓度 1μg/mL，然后以 50μl/孔加到 96 孔 ELISA 板根据 10.1 的 ELISA 检测方法检测人源化抗体与猴 CD3 蛋白的结合反应，其中 IgG 对照为 hIgG1，40G5c、I2C、7221G20 和 F2B 为阳性对照。分析结果如图 11A-11G、图 12A-12G 以及表 23 所示，表中的数据为 OD450nm 值。结果说明，所有人源化抗体与猴 CD3 蛋白在 ELISA 实验中有结合活性。

表 23 人源化抗体与猴 CD3ε/δ、CD3ε 蛋白结合 ELISA 水平的结合反应

抗体名称	猴 CD3ε/δ		猴 CD3ε	
	max_OD450	EC50(nM)	max_OD450	EC50(nM)
6-35.22-H1-L1	2.94	7.82E-02	3.08	1.18E-02
1-22.6-1-H2a-L2a	3.23	1.24E-02	3.09	1.06E-04
7-35.6-H2-L3	3.13	5.52E-02	3.01	8.59E-03
8-18.1-H1-L2	3.16	1.93E-02	3.10	4.75E-03
5-40.21-H3-L1	3.16	4.56E-03	2.84	4.67E-04
5-7.13-H1a-L2	3.08	3.32E-03	2.99	2.63E-03

6-44.5-H1-L2	3.07	2.25E-04	2.84	9.47E-06
40G5c	2.52	7.54E-02	2.96	1.28E-01
I2C	2.42	3.60E-02	2.65	7.87E-02
F2B	0.05	阴性	0.06	阴性
7221G20	0.11	阴性	0.23	阴性
hIgG1	0.15	阴性	0.16	阴性

11.2 流式细胞实验(FACS)检测抗体与猴 T 细胞的结合

收集经扩增的猴 T 细胞，按照实施例 5.1 的方法进行 FACS 检测与数据分析。分析结果如图 13A-13G 以及表 24 所示，其中 IgG 对照为 hIgG1，40G5c、I2C、7221G20 和 F2B 为阳性对照。结果表明，所有人源化抗体与猴 T 细胞表面的 CD3 有特异性结合反应。

表 24 人源化抗体与猴 T 细胞的结合

抗体名称	猴 T 细胞	
	max_MFI	EC50(nM)
6-35.22-H1-L1	9957	35.42
1-22.6-1-H2a-L2a	12287	6.92
7-35.6-H2-L3	10162	7.84
8-18.1-H1-L2	11751	2.84
5-40.21-H3-L1	17764	0.73
5-7.13-H1a-L2	25448	0.92
6-44.5-H1-L2	24775	0.17
40G5c	24131	0.89
I2C	28242	1.10
7221G20	9140	4.71
F2B	72	阴性
hIgG1	74	阴性

实施例 12 人源化抗体的功能鉴定

为检测人源化抗体激活 CD3 细胞内的信号通路，将待检测的抗体用含 10% FBS 的 RPMI 1640 稀释，起始浓度 1*2μg/mL，1:5 梯度稀释，然后以 100μl/孔加到 96 孔圆底细胞培养板。复苏冻存的 PBMC(购自奥赛尔斯)，调节细胞浓度至 1e6/mL，将细胞加入加有抗体的细胞培养板，100μL 每孔。在 37°C的培养箱中孵育 24 小时后，用 PBS 缓冲液离心洗涤 1 次。加入配制好的 FACS 染色试剂 50μL 每孔(抗-CD25-PE，购自 Biolegend，货号 302602；抗-CD69-FITC 购自 BD，货号 555530)，4°C孵育 45 分钟，用 PBS 缓冲液离心洗涤 3 次，用 FACS(FACS Canto，购自 BD 公司)检测和分析结果。通过软件(CellQuest)进行数据分析，得到细胞的平均荧光密度(MFI)。再通过软件(GraphPad Prism8)分析。分析结果如图 14A-14E 所示，所有人源化抗体对人 PBMC 具有不同程度的激活作用。

权利要求：

1. 特异性结合人 CD3 的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和/或轻链可变区，所述重链可变区包含 HCDR1-3，所述轻链可变区包含 LCDR1-3，所述 HCDR1-3 和/或所述 LCDR1-3 选自表 10 或表 18；

优选地，所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO:31-33、44-46、57-59、70-72、83-85、96-98 和 109-111 中任一项所示的序列，或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个氨基酸突变的序列；和

所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO:34-36、137、47-49、60-62、73-75、86-88、99-101 和 112-114 中任一项所示的序列，或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个氨基酸突变的序列；和

所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO:37-38、138-139、50-51、142-143、63-64、76-77、89-90、102-103 和 115-116 中任一项所示的序列，或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个氨基酸突变的序列；和/或

所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO:39-40、140-141、52-53、65-66、78-79、91-92、104-105 和 117-118 中任一项所示的序列，或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个氨基酸突变的序列；和

所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO:41-42、54-55、67-68、80-81、93-94、106-107 和 119-120 中任一项所示的序列，或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个氨基酸突变的序列；和

所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO:43、56、69、82、95、108 和 121 中任一项所示的序列，或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个氨基酸突变的序列；

更优选地，所述 HCDR1-3 和/或所述 LCDR1-3 根据 Kabat、Chothia 或 IMGT 方式确定。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 17、19、21、23、25、27、29、124、126、128、130、132、134 和 136 中任一项所示的序列，或与其相比具有至少 70%同一性或至多 15 个氨基酸突变的序列；和/或

所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 18、20、22、24、26、28、30、123、125、127、129、131、133 和 135 中任一项所示的序列，或与其相比具有至少 70%同一性或至多 15 个氨基酸突变的序列。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述至少 70%的同一性为至少 75%、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%的同一性；和/或所述至多 3 个突变为至多 3、2、1 或 0 个突变；和/或所述至多 15 个突变为至多 15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 或 0 个突变；优选地，所述突变为插入、缺失或替换；更优选地，所述替换为保守氨基酸替换；最优选地，所述突变为回复突变或热点突变。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 18 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 19 所示，以及所

述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 20 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 21 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 22 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 23 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 25 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 27 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 28 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 29 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 30 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 124 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 123 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 126 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 125 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 128 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 127 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 130 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 129 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 132 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 131 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 134 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 133 所示；或者

所述抗体或其抗原结合片段的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 136 所示，以及所述抗体或其抗原结合片段的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 135 所示。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段还包含重链恒定区和/或轻链恒定区；

任选地，所述重链恒定区选自 IgG，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4；优选地，所述重链恒定区选自人 IgG，例如人 IgG1、人 IgG2、人 IgG3 或人 IgG4；更优选地，所述重链恒定区选自 SEQ ID NO:13；和/或

所述轻链恒定区选自 κ 链或 λ 链；

优选地，所述轻链恒定区选自 SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:122。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段选自：单克隆抗体、多克隆抗体、天然抗体、工程化抗体、单特异性抗体、多特异性抗

体(例如双特异性抗体)、单价抗体、多价抗体、完整抗体、完整抗体的片段、裸抗体、缀合抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体、Fab、Fab'、Fab'-SH、$F(ab')_2$、Fd、Fv、scFv、双抗体和单域抗体。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中述抗体或其抗原结合片段与治疗剂或示踪剂缀合；优选地，所述治疗剂选自：放射性同位素、化疗药和免疫调节剂；和/或所述示踪剂选自：放射学造影剂、顺磁离子、金属、荧光标记、化学发光标记、超声造影剂和光敏剂。

8. 根据权利要求 1-7 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体或其抗原结合片段还结合猴 CD3。

9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述 CD3 选自 CD3ε 亚基和包含 CD3ε 亚基的二聚体，例如，CD3ε/δ 二聚体。

10. 多特异性抗原结合分子，其中所述多特异性抗原结合分子至少包括第一抗原结合模块和第二抗原结合模块，所述第一抗原结合模块包含权利要求 1-9 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，和/或所述第二抗原结合模块结合与所述第一抗原结合模块不同的其他靶点或结合相同靶点的不同表位；优选地，所述其他靶点选自肿瘤特异性抗原(TSA)和肿瘤相关抗原(TAA)；任选地，所述多特异性抗原结合分子为双特异性 T 细胞接合器(BiTE)。

11. 分离的核酸分子，其中所述核酸分子编码权利要求 1-9 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、或权利要求 10 所述的多特异性抗原结合分子；任选地，所述核酸分子还编码嵌合抗原受体。

12. 载体，其包含权利要求 11 所述的核酸分子。

13. 细胞，其包含权利要求 12 所述的载体。

14. 免疫效应细胞，其表达嵌合抗原受体，和/或表达权利要求 1-9 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 10 所述的多特异性抗原结合分子；

优选地，所述免疫效应细胞选自：T 细胞、自然杀伤细胞(NK 细胞)、自然杀伤 T 细胞(NKT 细胞)、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞和肥大细胞；更优选地，所述 T 细胞选自：细胞毒性 T 细胞、调节性 T 细胞和辅助性 T 细胞；和/或

优选地，所述免疫效应细胞为自体免疫效应细胞或同种异体免疫效应细胞。

15. 制备权利要求 1-9 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，或权利要求 10 所述的多特异性抗原结合分子的方法，其中所述方法包括：(1)培养权利要求 13 所述的细胞；和/或(2)分离所述细胞表达的抗体或其抗原结合片段，或多特异性抗原结合分子。

16. 制备权利要求 14 所述的免疫效应细胞的方法，其中所述方法包括：(1)将 a.编码所述嵌合抗原受体的核酸分子和 b.编码权利要求 1-9 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 10 所述的多特异性抗原结合分子的核酸分子导入初始的免疫效应细胞；和/或(2)使导入上述核酸分子的免疫效应细胞表达嵌合抗原受体和权利要求 1-9 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或权利要求 10 所述的多特异性抗原结合分子。

17. 药物组合物，其中所述药物组合物包含权利要求 1-9 中任一项所述抗体或其抗原结合

片段、权利要求 10 所述的多特异性抗原结合分子、权利要求 11 所述的核酸分子、权利要求 12 所述的载体、权利要求 13 所述的细胞、权利要求 14 所述的免疫效应细胞或根据权利要求 15 或 16 所述方法制备得到的产品；优选地，所述组合物还包含药学上可接受的运载体、稀释剂或助剂。

18. 权利要求 1-9 中任一项所述抗体或其抗原结合片段、权利要求 10 所述的多特异性抗原结合片段、权利要求 11 所述的核酸分子、权利要求 12 所述的载体、权利要求 13 所述的细胞、权利要求 14 所述的免疫效应细胞、根据权利要求 15 或 16 所述方法制备得到的产品、或权利要求 17 所述的药物组合物，在制备治疗肿瘤或癌症的药物中的用途；

优选地，所述肿瘤或癌症选自血液瘤和实体瘤；更优选地，所述血液瘤选自：急性骨髓样白血病(AML)、慢性骨髓样白血病(CML)、急变期 CML、脊髓发育不良综合征(MDS)、急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL)、急性 T 淋巴细胞白血病(TALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、Richter 综合征、毛细胞白血病(HCL)、母细胞浆细胞样树突细胞肿瘤(BPDCN)、包括套细胞淋巴瘤(MCL)和小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)的非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金淋巴瘤、系统性肥大细胞增生症和伯基特淋巴瘤；和/或所述实体瘤选自：卵巢癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、食管癌、胃食管癌、结直肠癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、胶质瘤、乳腺癌和肝癌。

19. 治疗肿瘤或癌症的方法，其中所述方法包括向受试者施用有效量的药物，所述药物包括权权利要求 1-9 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 10 所述的多特异性抗原结合分子、权利要求 11 所述的核酸分子、权利要求 12 所述的载体、权利要求 13 所述的细胞、权利要求 14 所述的免疫效应细胞、根据权利要求 15 或 16 所述方法制备得到的产品或权利要求 17 所述的药物组合物；

优选地，所述肿瘤或癌症选自血液瘤和实体瘤；更优选地，所述血液瘤选自：急性骨髓样白血病(AML)、慢性骨髓样白血病(CML)、急变期 CML、脊髓发育不良综合征(MDS)、急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL)、急性 T 淋巴细胞白血病(TALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、Richter 综合征、毛细胞白血病(HCL)、母细胞浆细胞样树突细胞肿瘤(BPDCN)、包括套细胞淋巴瘤(MCL)和小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)的非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金淋巴瘤、系统性肥大细胞增生症和伯基特淋巴瘤；和/或所述实体瘤选自：卵巢癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、食管癌、胃食管癌、结直肠癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、胶质瘤、乳腺癌和肝癌。

20. 权利要求 1-9 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、权利要求 10 所述的多特异性抗原结合分子、权利要求 11 所述的核酸分子、权利要求 12 所述的载体、权利要求 13 所述的细胞、权利要求 14 所述的免疫效应细胞、根据权利要求 15 或 16 所述方法制备得到的产品或权利要求 17 所述的药物组合物，其用于治疗肿瘤或癌症；

优选地，所述肿瘤或癌症选自血液瘤和实体瘤；更优选地，所述血液瘤选自：急性骨髓样白血病(AML)、慢性骨髓样白血病(CML)、急变期 CML、脊髓发育不良综合征(MDS)、急性 B 淋巴细胞白血病(B-ALL)、急性 T 淋巴细胞白血病(TALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、Richter 综合征、毛细胞白血病(HCL)、母细胞浆细胞样树突细胞肿瘤(BPDCN)、包括套细胞淋巴瘤(MCL)和小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)的非霍奇金淋巴瘤(NHL)、霍奇金淋巴瘤、系统性肥大细胞增生症和伯基特淋巴瘤；和/或所述实体瘤选自：卵巢癌、胰腺癌、肺癌、胃癌、食管癌、胃食管癌、结直肠癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、胶质瘤、乳腺癌和肝癌。

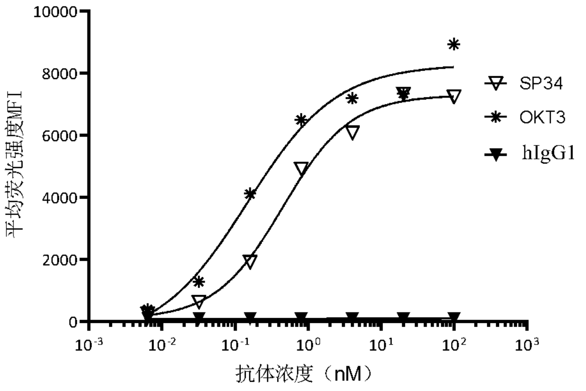
平均荧光强度MFI
抗体浓度（nM）
SP34
OKT3
hIgG1

图 1

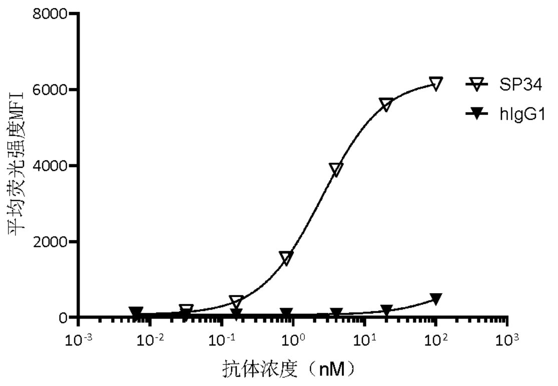
平均荧光强度MFI
抗体浓度（nM）
SP34
hIgG1

图 2

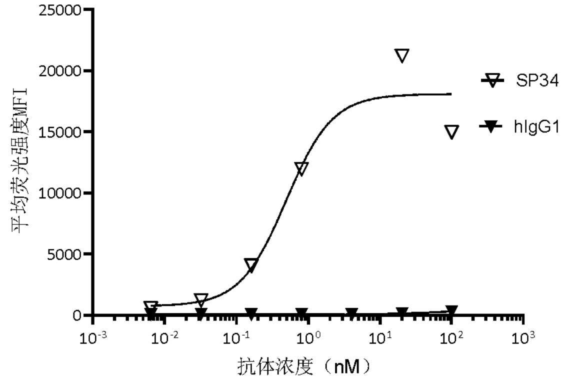
平均荧光强度MFI
抗体浓度（nM）
SP34
hIgG1

图 3

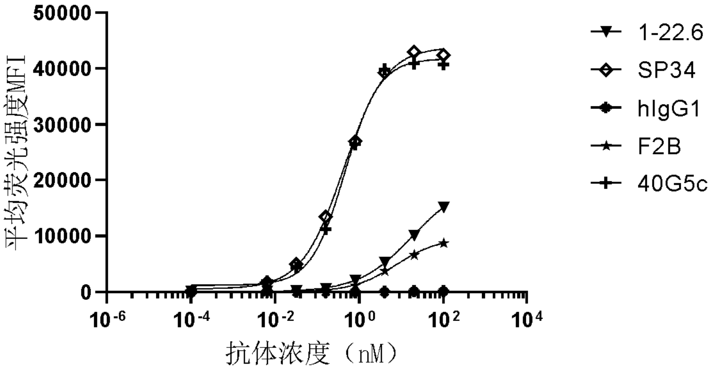
平均荧光强度MFI
抗体浓度（nM）
1-22.6
SP34
hIgG1
F2B
40G5c

图 4A

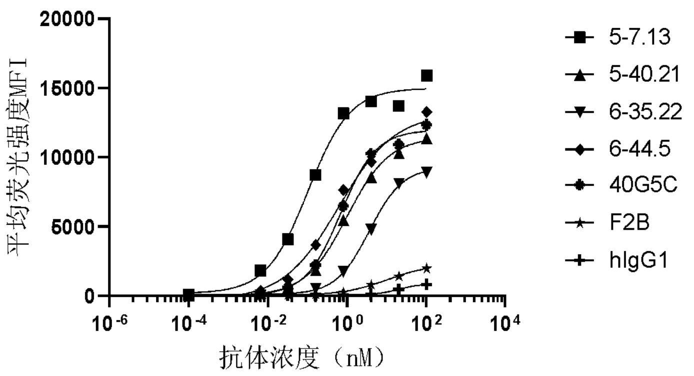

图 4B

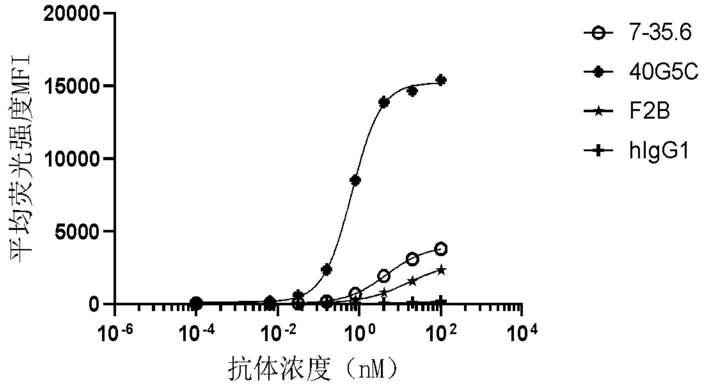

图 4C

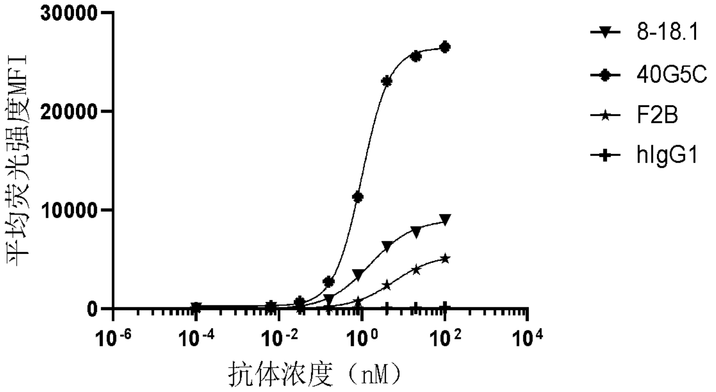

图 4D

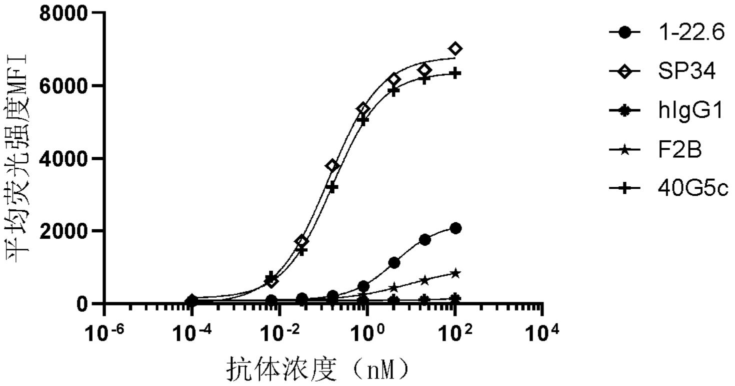

图 5A

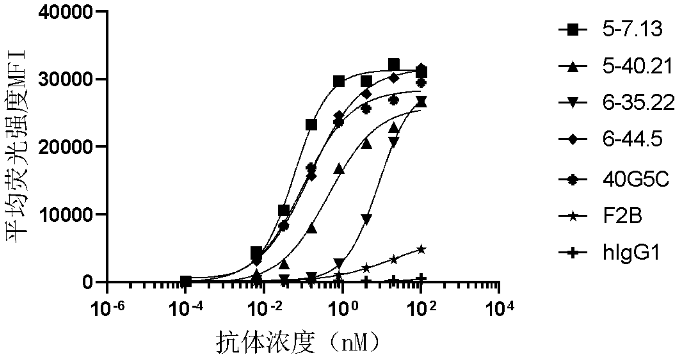

图 5B

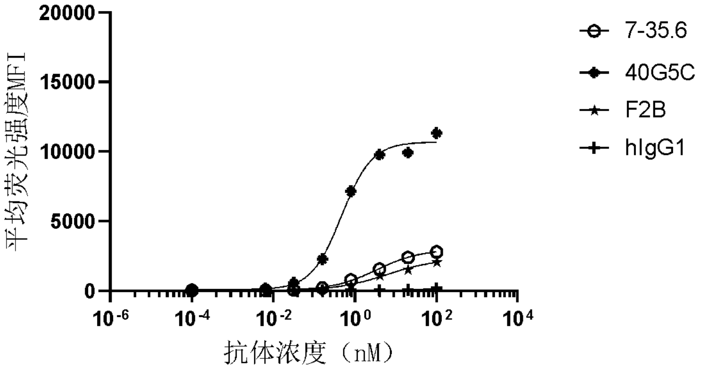

图 5C

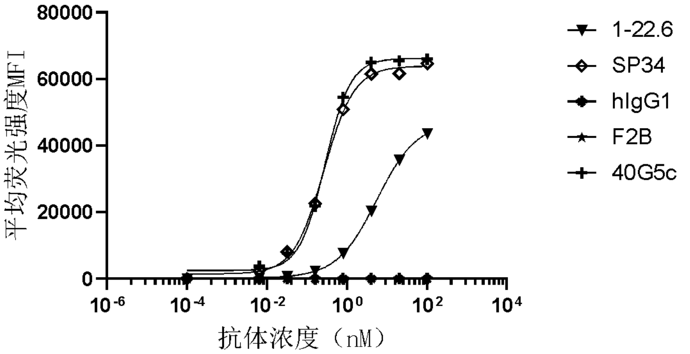

图 6A

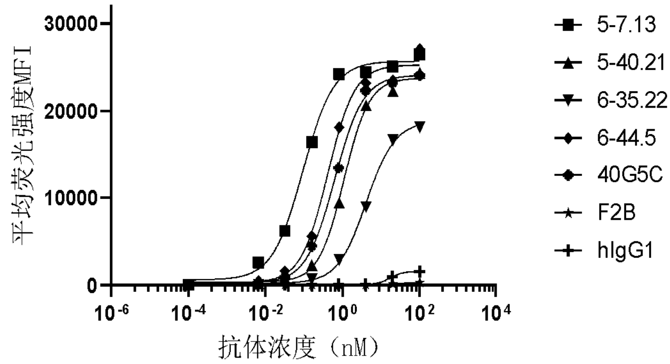

图 6B

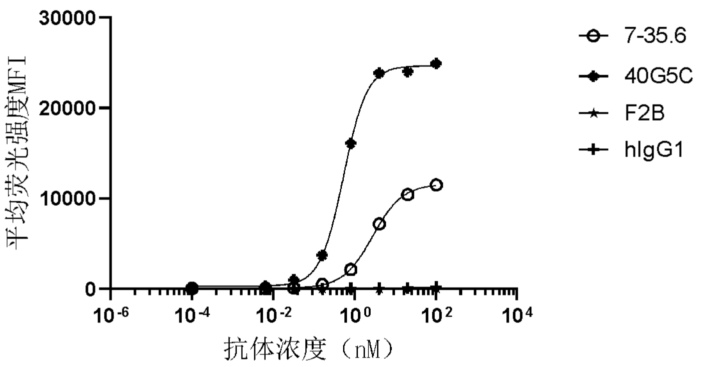

图 6C

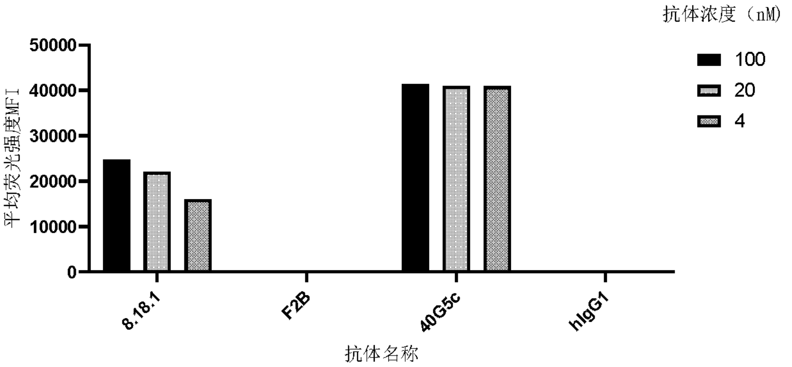

图 6D

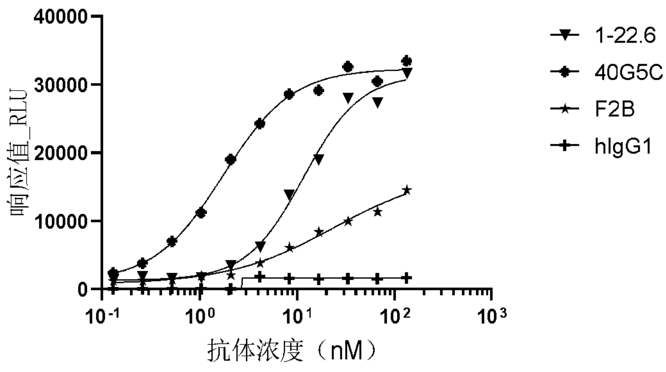

图 7A

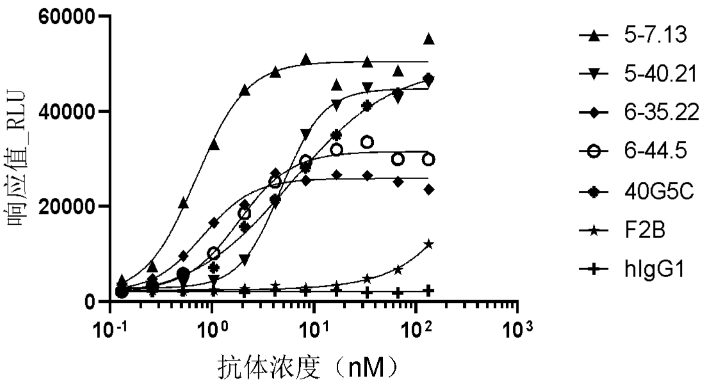

图 7B

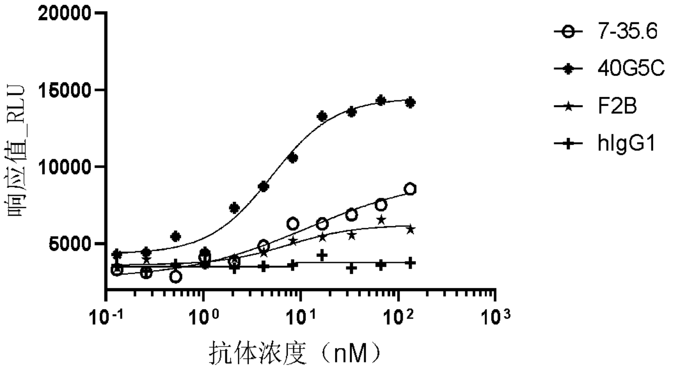

图 7C

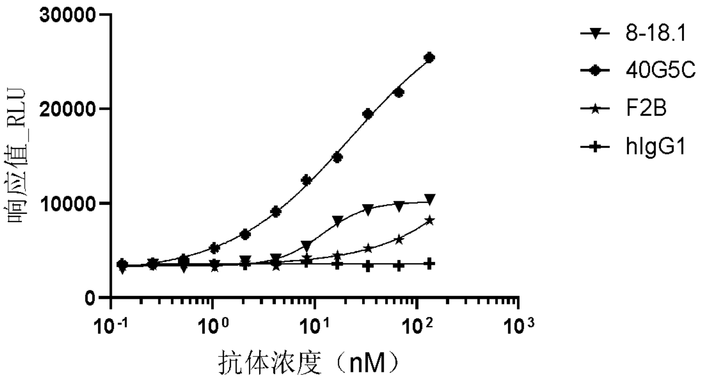

图 7D

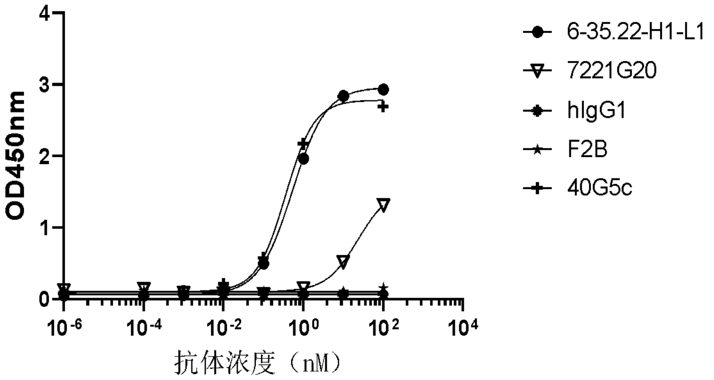

图 8A

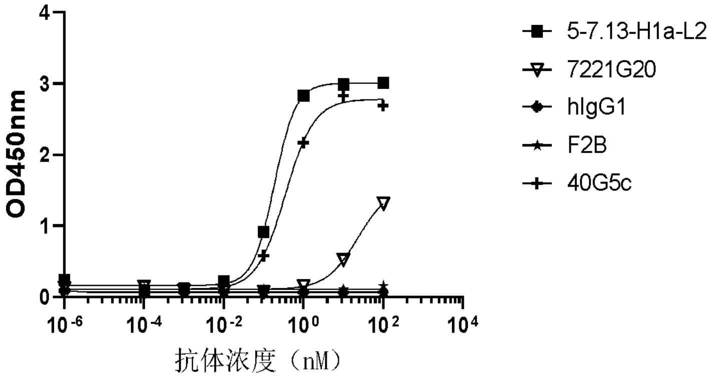

图 8B

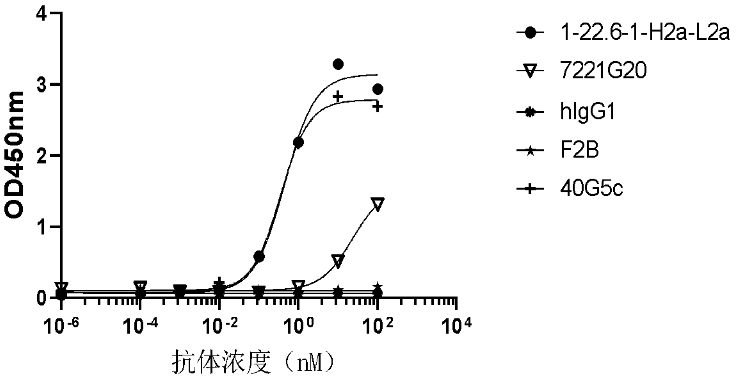

图 8C

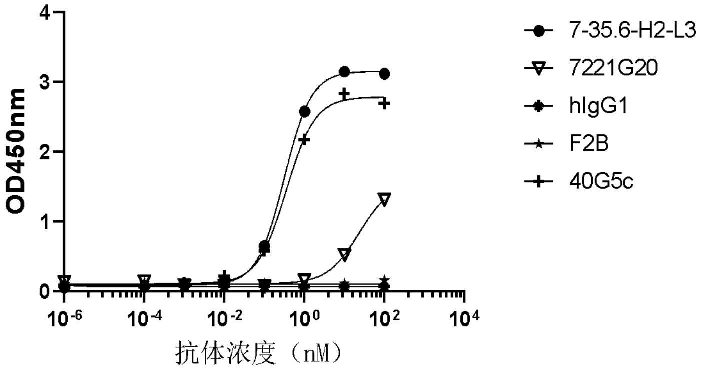

图 8D

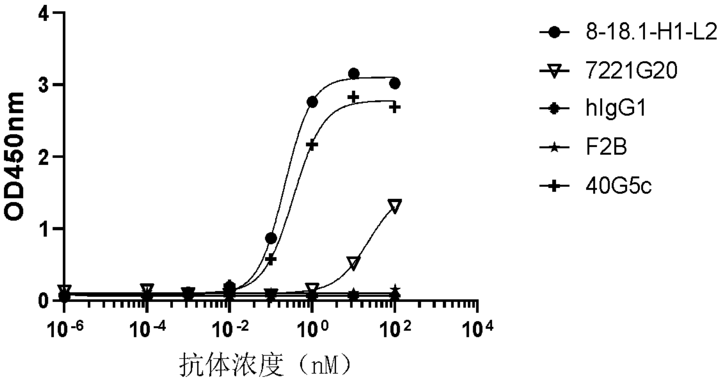

图 8E

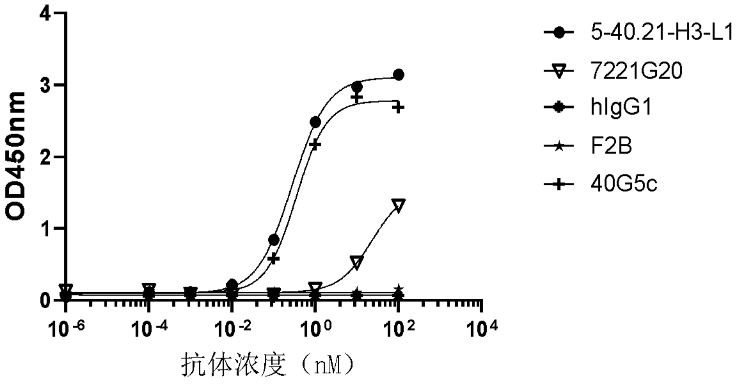

图 8F

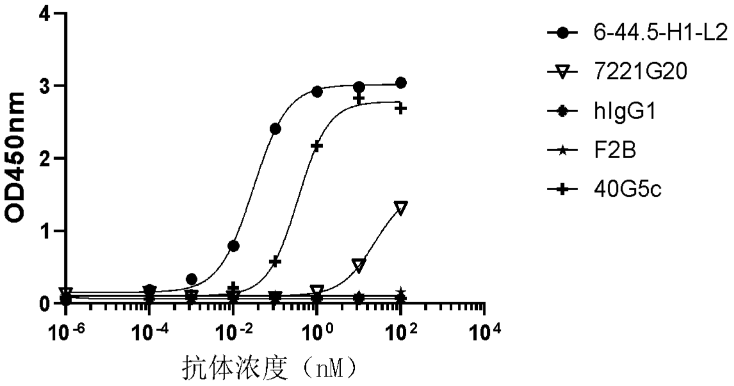

图 8G

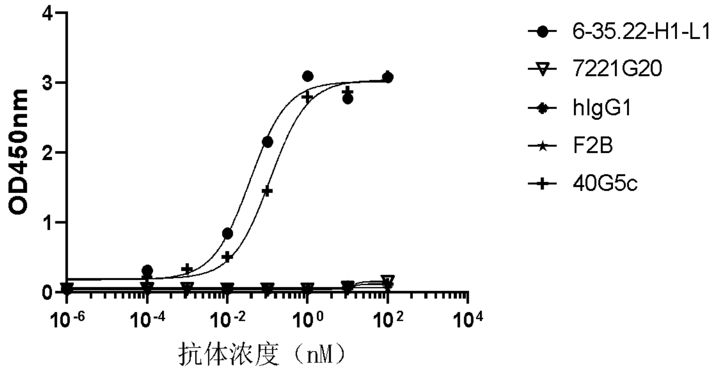

图 9A

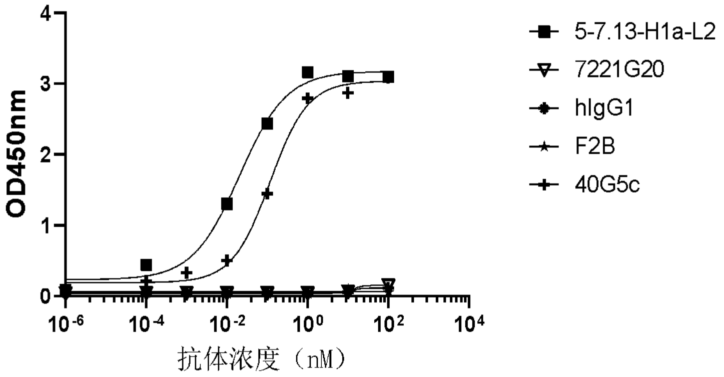

图 9B

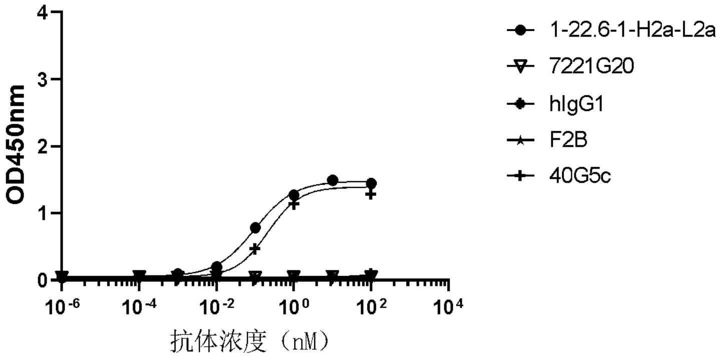

图 9C

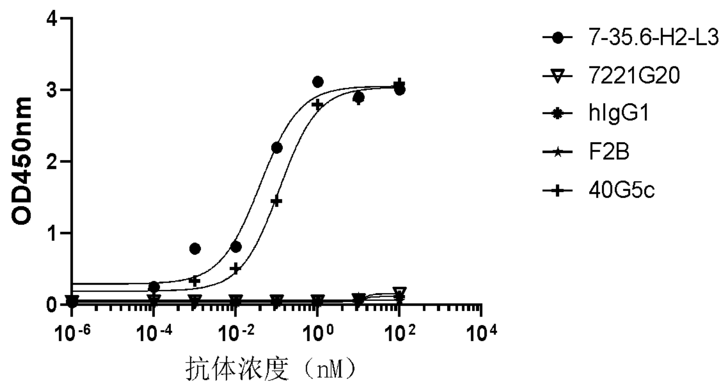

图 9D

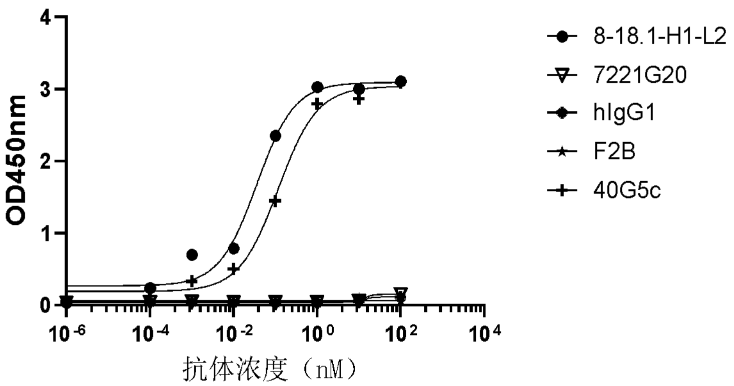

图 9E

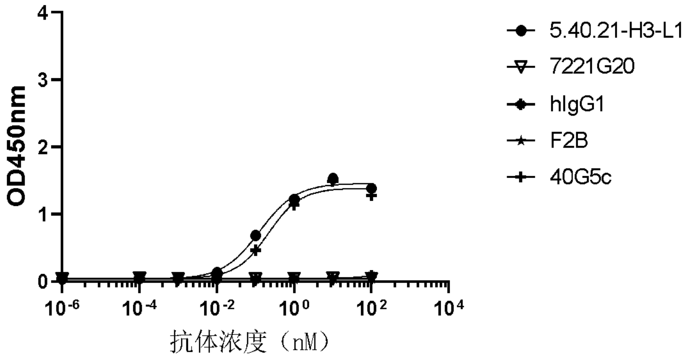

图 9F

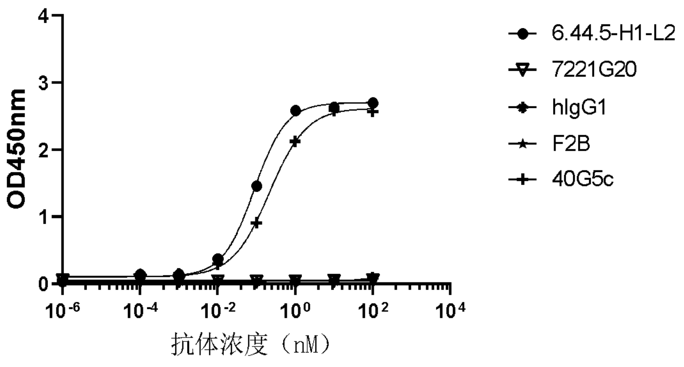

图 9G

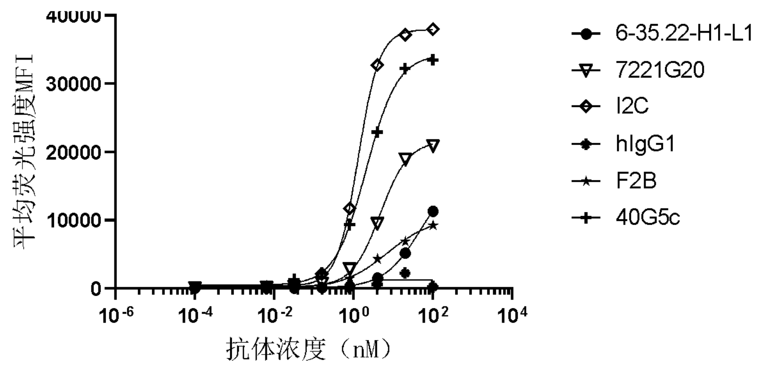

图 10A

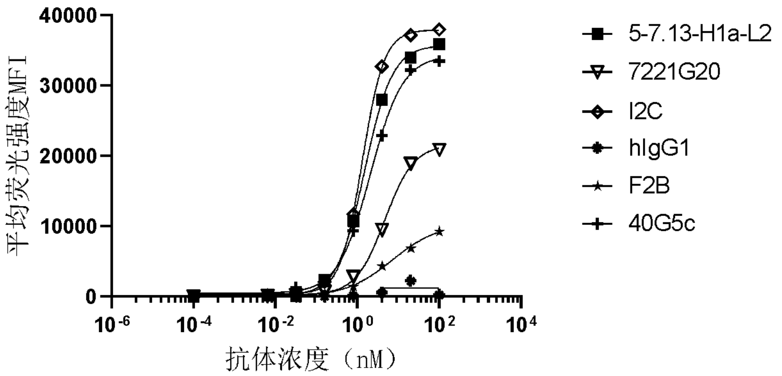

图 10B

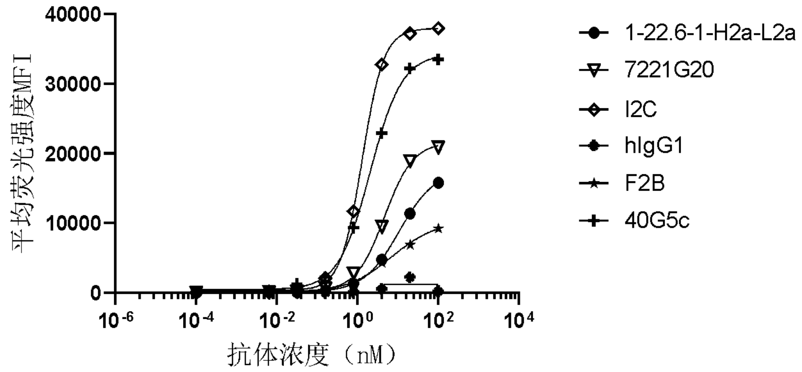

图 10C

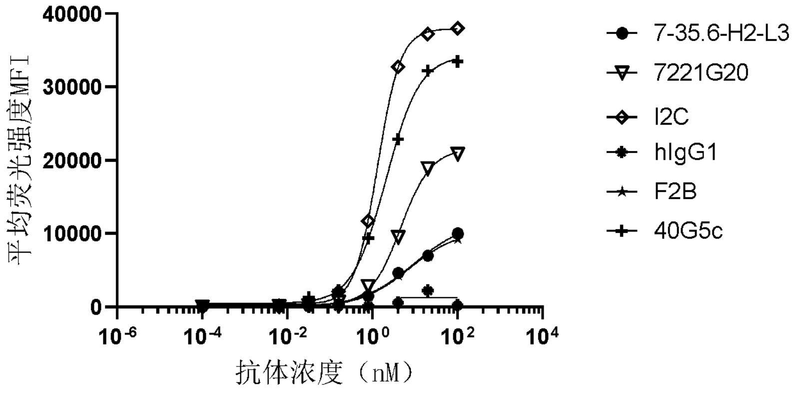

图 10D

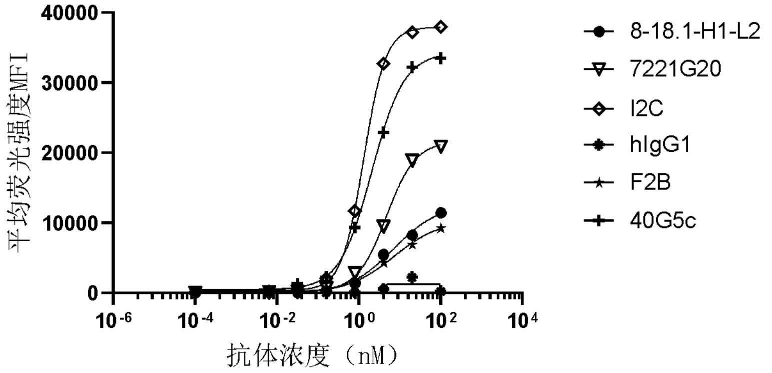

图 10E

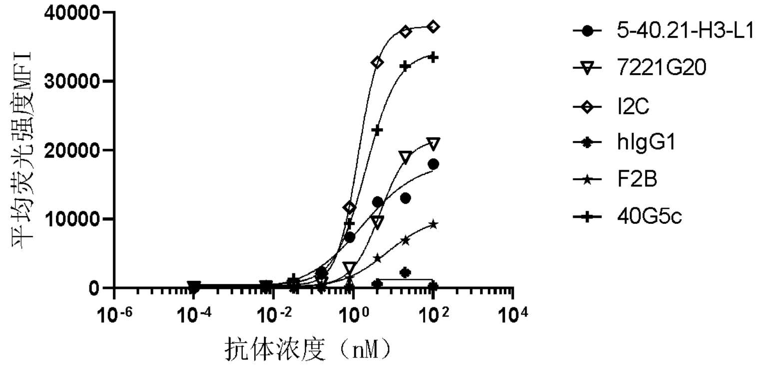

图 10F

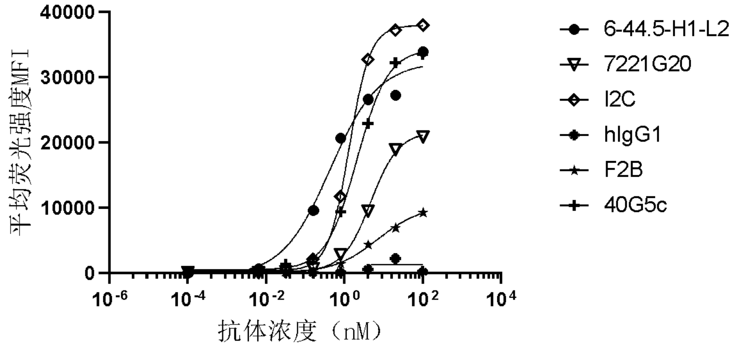

图 10G

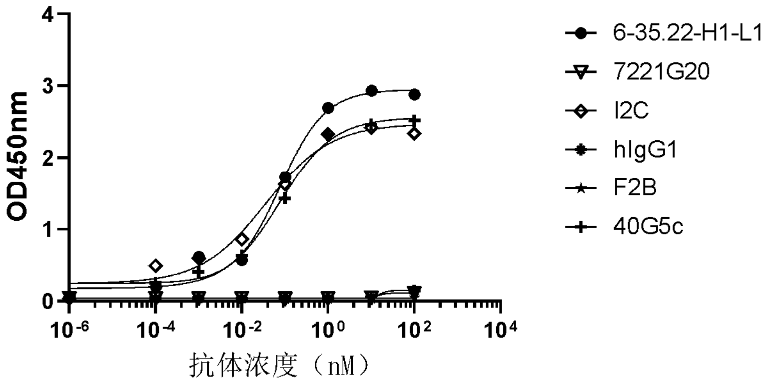

图 11A

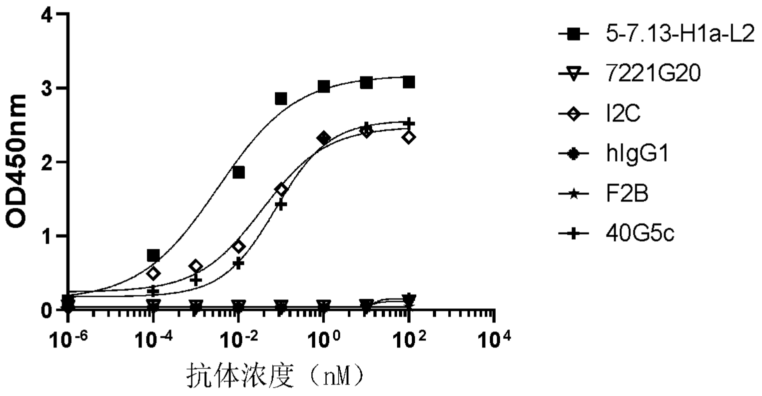

图 11B

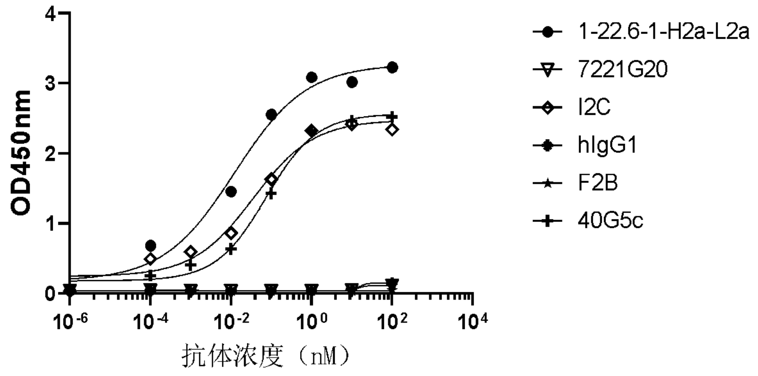

图 11C

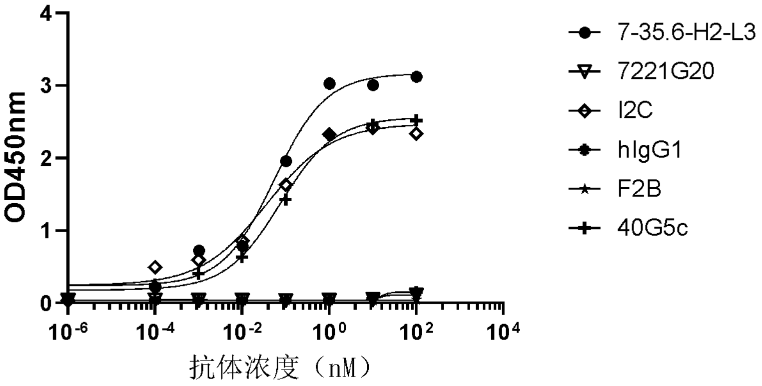

图 11D

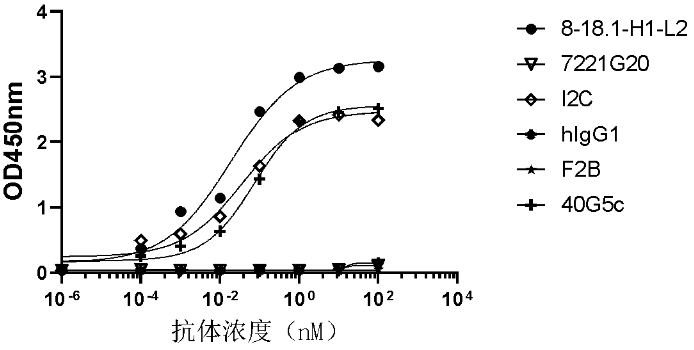

图 11E

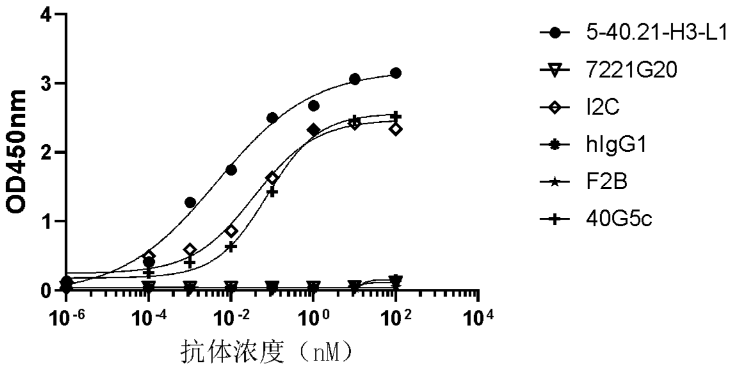

图 11F

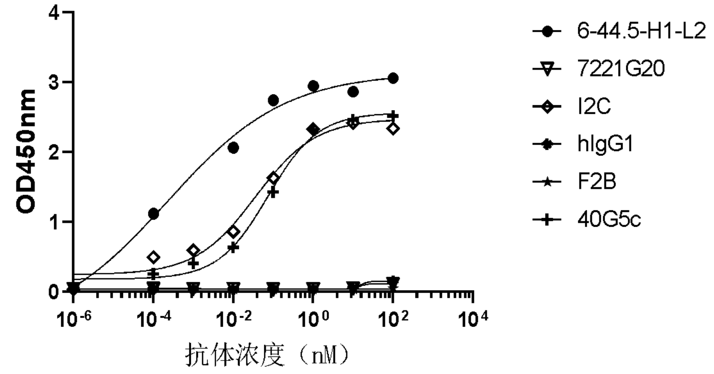

图 11G

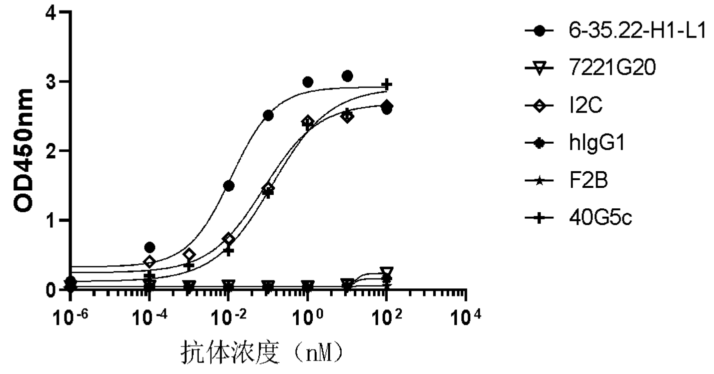

图 12A

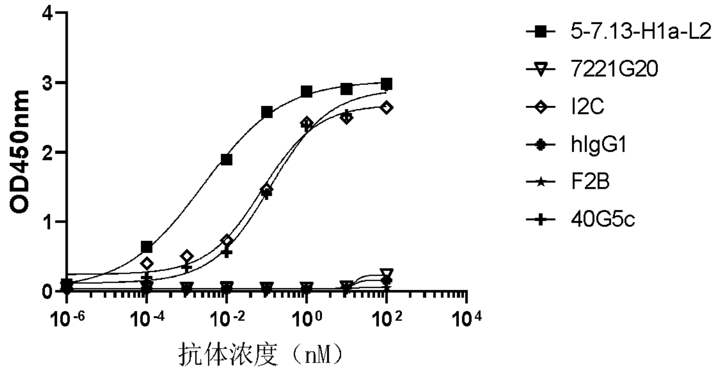

图 12B

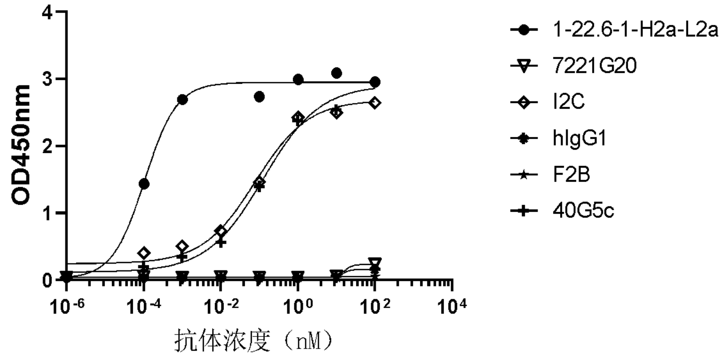

图 12C

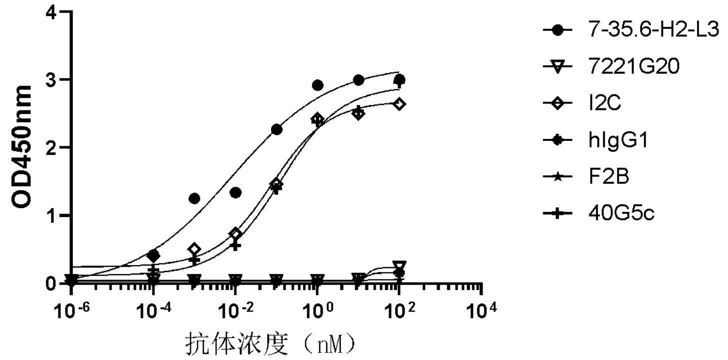

图 12D

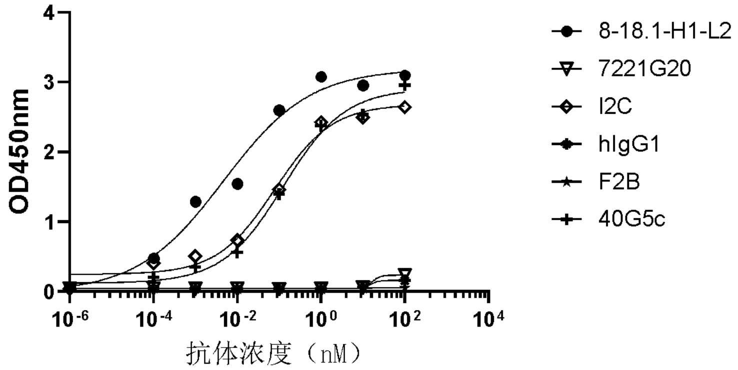

图 12E

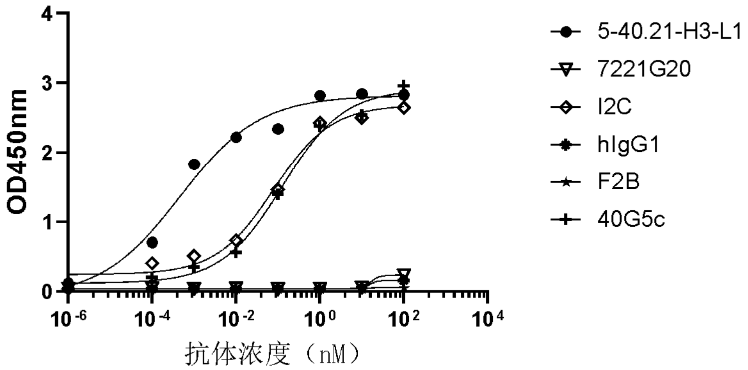

图 12F

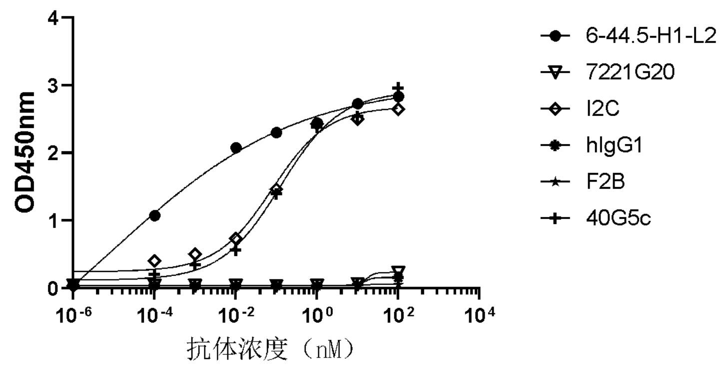

图 12G

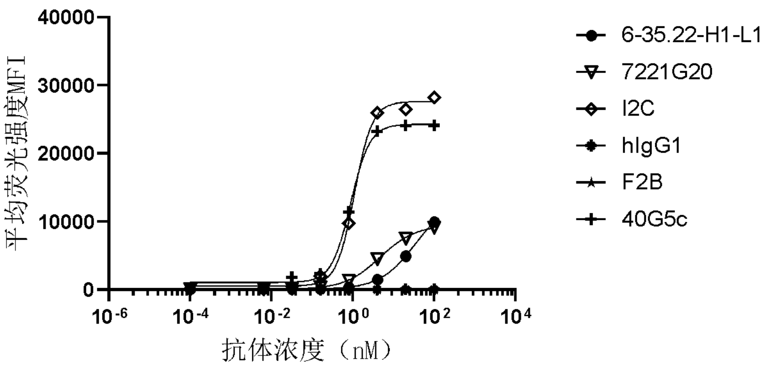

图 13A

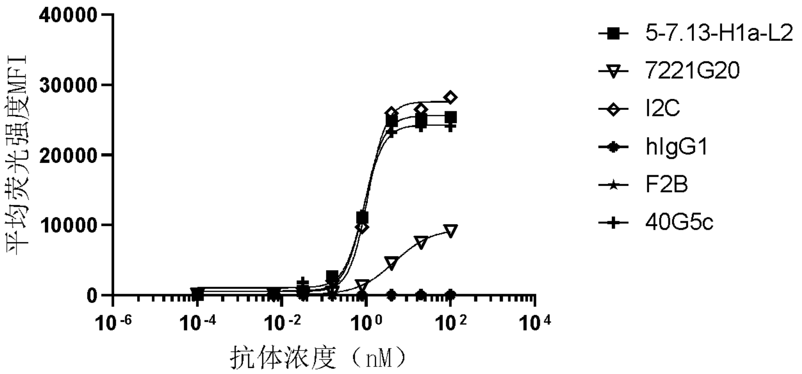

图 13B

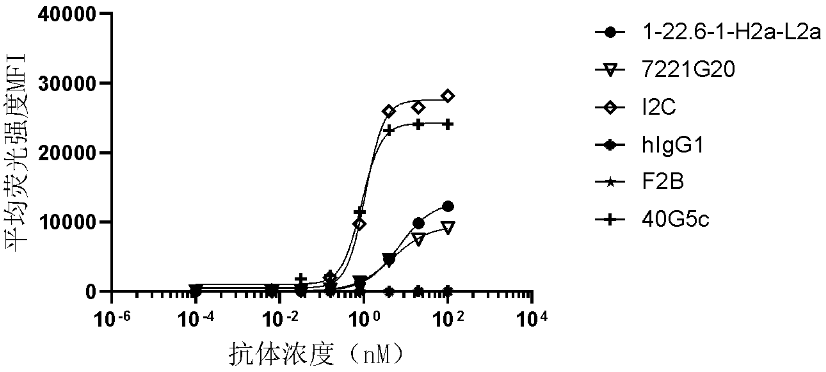

图 13C

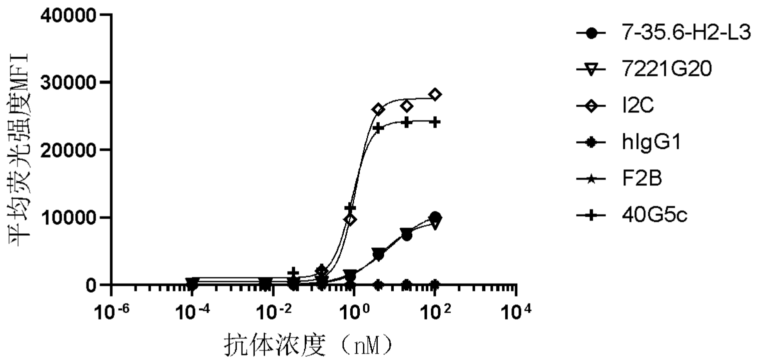

图 13D

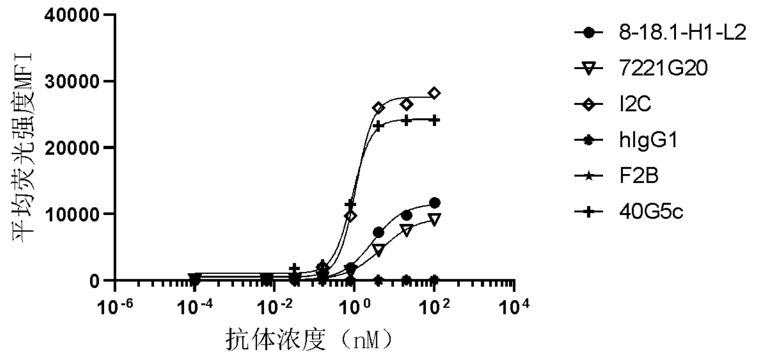

图 13E

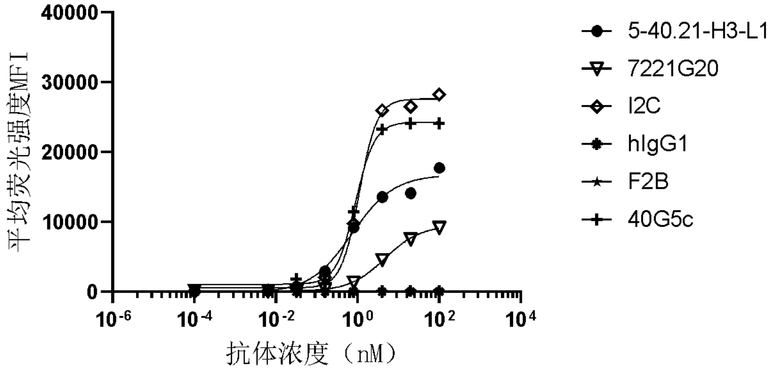

图 13F

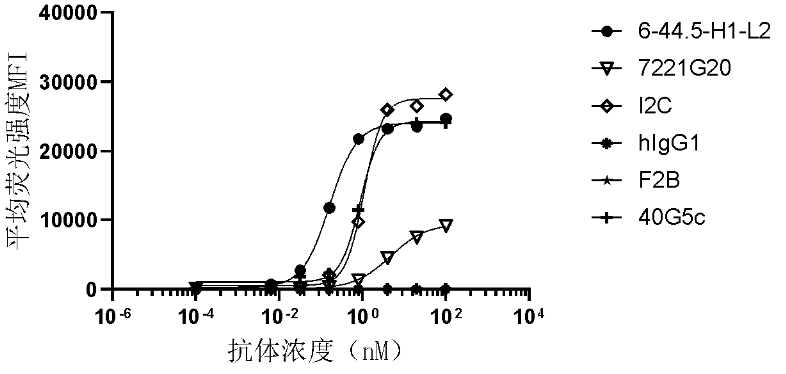

图 13G

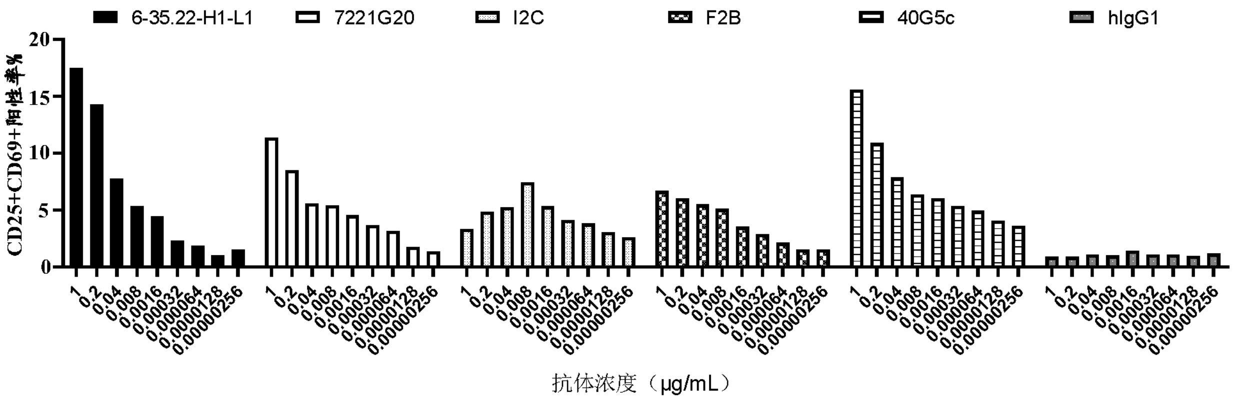

图 14A

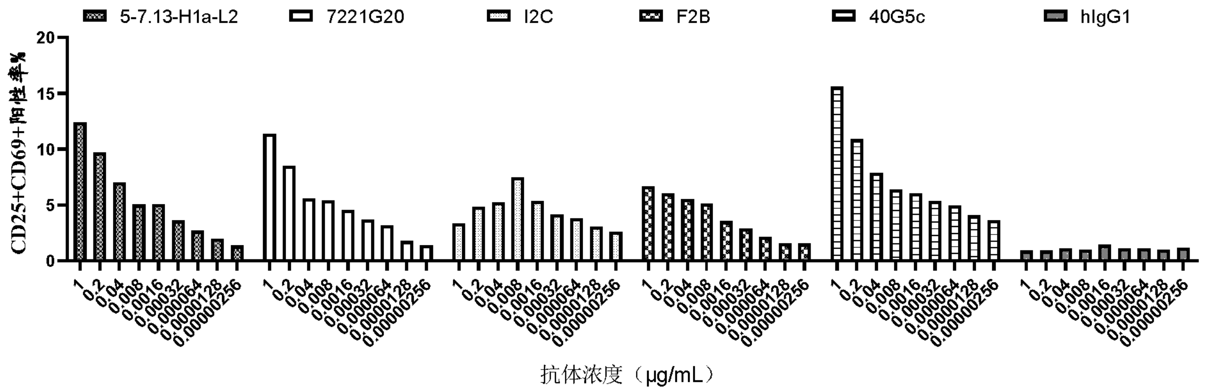

图 14B

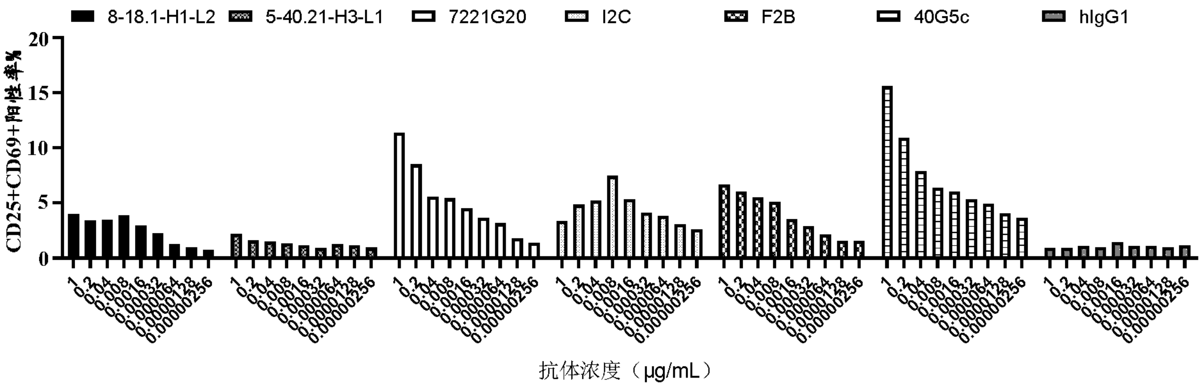

图 14C

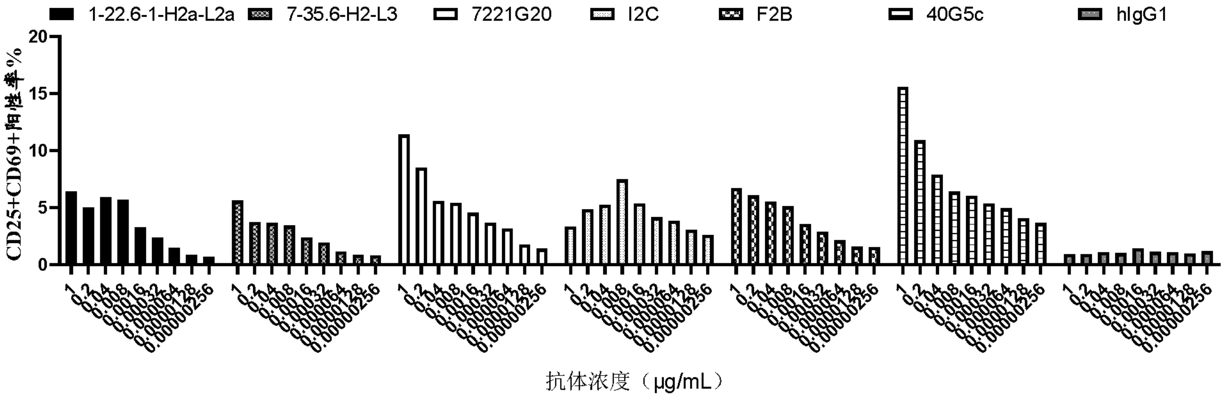
1-22.6-1-H2a-L2a
7-35.6-H2-L3
7221G20
I2C
F2B
40G5c
hIgG1
CD25+CD69+阳性率%
抗体浓度（μg/mL）

图 14D

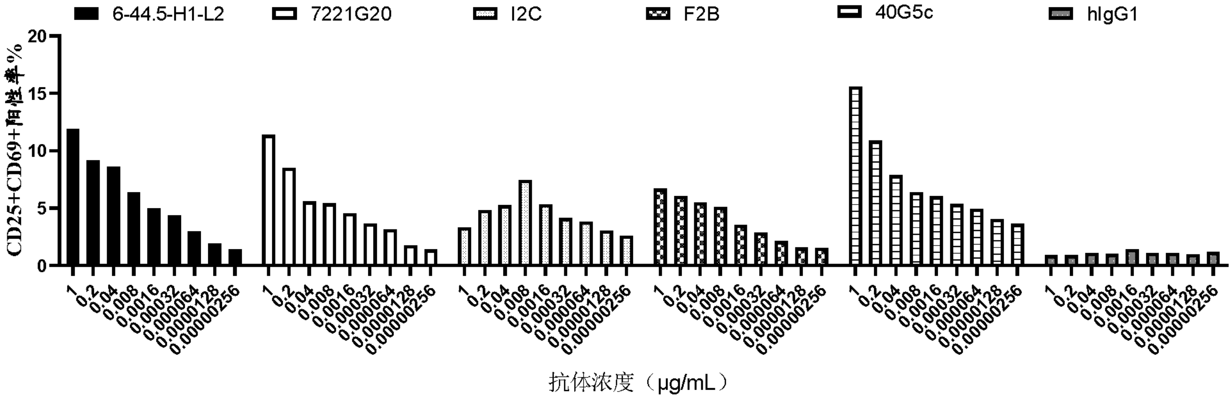
6-44.5-H1-L2
7221G20
I2C
F2B
40G5c
hIgG1
CD25+CD69+阳性率%
抗体浓度（μg/mL）

图 14 E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/118334

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(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; C12N; A61K; A61P

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; CNABS; ENTXT; CJFD; DWPI; VEN; STN; 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System; CNKI; PubMed; GenBank; EBI: 抗体, AB, 人CD3, CD3, antibody, 单抗, 单克隆, 江苏先声药业, 王琼, ANTIBODY, Mab, SEQ ID NOs: 31-136

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 110691789 A (NUMAB THERAPEUTICS AG) 14 January 2020 (2020-01-14) claims 1-15	1-20
A	CN 104098698 A (SECOND MILITARY MEDICAL UNIVERSITY OF PLA) 15 October 2014 (2014-10-15) entire document	1-20
A	CN 107889492 A (MILTENYI BIOTEC GMBH) 06 April 2018 (2018-04-06) entire document	1-20
A	CN 111247171 A (CYTOMX THERAPEUTICS INC.) 05 June 2020 (2020-06-05) entire document	1-20
A	WO 2019034580 A1 (MORPHOSYS AG) 21 February 2019 (2019-02-21) entire document	1-20
A	US 2018112000 A1 (MILTENYI BIOTEC GMBH) 26 April 2018 (2018-04-26) entire document	1-20

☐ 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	Date of mailing of the international search report
30 November 2022	**13 December 2022**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China**	
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/118334

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:

   [1] The actually submitted sequence table is an XML file in standard ST.26.

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **19**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

    [1] Claim 19 relates to a method for treating tumors or cancer, belonging to a treatment method, and therefore, no international search is conducted according to PCT Rule 39.1(iv). A search was conducted on the basis of a pharmaceutical use.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/118334

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110691789	A	14 January 2020	AU	2018280681	A1	05 December 2019
				US	2020115449	A1	16 April 2020
				KR	20200013233	A	06 February 2020
				MA	49250	A	14 April 2021
				CA	3064163	A1	13 December 2018
				JP	2020522260	A	30 July 2020
				EP	3634998	A1	15 April 2020
				IL	271128	A	30 January 2020
CN	104098698	A	15 October 2014	None			
CN	107889492	A	06 April 2018	WO	2016180721	A1	17 November 2016
				JP	2018516554	A	28 June 2018
				CA	2985251	A1	17 November 2016
				EP	3294766	A1	21 March 2018
				US	2018112000	A1	26 April 2018
				EP	3091032	A1	09 November 2016
CN	111247171	A	05 June 2020	JP	2020536549	A	17 December 2020
				TW	201927816	A	16 July 2019
				US	2019135943	A1	09 May 2019
				IL	273937	A	31 May 2020
				CA	3078911	A1	18 April 2019
				AU	2018347607	A1	26 March 2020
				SG	11202002384V	A	29 April 2020
				WO	2019075405	A1	18 April 2019
				KR	20200064096	A	05 June 2020
				EP	3694885	A1	19 August 2020
				BR	112020007309	A2	29 September 2020
WO	2019034580	A1	21 February 2019	EP	3668898	A1	24 June 2020
				US	2020377594	A1	03 December 2020
US	2018112000	A1	26 April 2018	WO	2016180721	A1	17 November 2016
				JP	2018516554	A	28 June 2018
				CN	107889492	A	06 April 2018
				CA	2985251	A1	17 November 2016
				EP	3294766	A1	21 March 2018
				EP	3091032	A1	09 November 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2022/118334

A. 主题的分类

C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(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; C12N; A61K; A61P

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;CNABS;ENTXT;CJFD;DWPI;VEN;STN;中国专利生物序列检索系统;CNKI; PubMed; GenBank;EBI:抗体，AB，人CD3，CD3，antibody，单抗，单克隆，江苏先声药业，王琼，ANTIBODY，Mab，SEQ ID NOs：31-136

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	CN 110691789 A (努玛治疗有限公司) 2020年1月14日 (2020 - 01 - 14) 权利要求1-15	1-20
A	CN 104098698 A (中国人民解放军第二军医大学) 2014年10月15日 (2014 - 10 - 15) 全文	1-20
A	CN 107889492 A (美天旎生物技术有限公司) 2018年4月6日 (2018 - 04 - 06) 全文	1-20
A	CN 111247171 A (西托姆克斯治疗公司) 2020年6月5日 (2020 - 06 - 05) 全文	1-20
A	WO 2019034580 A1 (MORPHOSYS AG) 2019年2月21日 (2019 - 02 - 21) 全文	1-20
A	US 2018112000 A1 (MILTENYI BIOTEC GMBH) 2018年4月26日 (2018 - 04 - 26) 全文	1-20

☐ 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11月30日	2022年12月13日
ISA/CN的名称和邮寄地址 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	受权官员 张艳青 电话号码 86-(10)-53962112

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：

 [1] 实际提交的序列表是ST.26标准的XML文件。

第II栏　　某些权利要求被认为是不能检索的意见（续第1页第2项）

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. ☑ 权利要求： 19
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求19涉及用于治疗肿瘤或癌症的方法，属于治疗方法，因此依据PCT实施细则39.1(iv)不进行国际检索。检索是基于其制药用途作出。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/118334

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	110691789	A	2020年1月14日	AU	2018280681	A1	2019年12月5日
				US	2020115449	A1	2020年4月16日
				KR	20200013233	A	2020年2月6日
				MA	49250	A	2021年4月14日
				CA	3064163	A1	2018年12月13日
				JP	2020522260	A	2020年7月30日
				EP	3634998	A1	2020年4月15日
				IL	271128	A	2020年1月30日
CN	104098698	A	2014年10月15日	无			
CN	107889492	A	2018年4月6日	WO	2016180721	A1	2016年11月17日
				JP	2018516554	A	2018年6月28日
				CA	2985251	A1	2016年11月17日
				EP	3294766	A1	2018年3月21日
				US	2018112000	A1	2018年4月26日
				EP	3091032	A1	2016年11月9日
CN	111247171	A	2020年6月5日	JP	2020536549	A	2020年12月17日
				TW	201927816	A	2019年7月16日
				US	2019135943	A1	2019年5月9日
				IL	273937	A	2020年5月31日
				CA	3078911	A1	2019年4月18日
				AU	2018347607	A1	2020年3月26日
				SG	11202002384V	A	2020年4月29日
				WO	2019075405	A1	2019年4月18日
				KR	20200064096	A	2020年6月5日
				EP	3694885	A1	2020年8月19日
				BR	112020007309	A2	2020年9月29日
WO	2019034580	A1	2019年2月21日	EP	3668898	A1	2020年6月24日
				US	2020377594	A1	2020年12月3日
US	2018112000	A1	2018年4月26日	WO	2016180721	A1	2016年11月17日
				JP	2018516554	A	2018年6月28日
				CN	107889492	A	2018年4月6日
				CA	2985251	A1	2016年11月17日
				EP	3294766	A1	2018年3月21日
				EP	3091032	A1	2016年11月9日