



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118510810 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 16

(21) 申请号 202380016649.X

(22) 申请日 2023.01.09

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2022/071080 2022.01.10 CN

202210352672.3 2022.04.01 CN

202310005123.3 2023.01.03 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.07.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2023/071314 2023.01.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/131328 ZH 2023.07.13

(71) 申请人 南京维立志博生物科技有限公司

地址 210031 江苏省南京市江北新区华康

路122号加速器四期05栋

(72) 发明人 孙建明 黄潇 秦玉蓉 张鹏

房行行 尚红岩 凌虹

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 史文静 黄革生

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

(54) 发明名称

一种抗体及其用途

(57) 摘要

本发明提供了一种抗体或其抗原结合蛋白。该抗体或其抗原结合蛋白可以特异性结合人CD3或人GPCR5D蛋白或MUC16或特异性结合人CD3和第二抗原。本发明进一步提供了编码所述抗体的核酸分子、用于表达所述抗体的表达载体、宿主细胞及其制备方法。本发明还提供了使用本发明的抗体的诊断和治疗方法。

(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 7 月 13 日 (13.07.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/131328 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/071314

(22) 国际申请日: 2023 年 1 月 9 日 (09.01.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
PCT/CN2022/071080
2022 年 1 月 10 日 (10.01.2022) CN
202210352672.3 2022 年 4 月 1 日 (01.04.2022) CN
202310005123.3 2023 年 1 月 3 日 (03.01.2023) CN

(71) 申请人: 南京维立志博生物科技有限公司 (NANJING LEADS BIOLABS CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省南京市江北新区华康路 122 号加速器四期 05 栋, Jiangsu 210031 (CN)。

(72) 发明人: 孙建明(SUN, Jianming); 中国江苏省南京市建邺区嘉陵江东街 18 号 3 幢 7 层 711 室, Jiangsu 210019 (CN)。 黄潇(HUANG, Xiao); 中国江苏省南京市建邺区嘉陵江东街 18 号 3 幢 7 层 711 室, Jiangsu 210019 (CN)。 秦玉蓉(QIN, Yurong); 中国江苏省南京市建邺区嘉陵江东街 18 号 3 幢 7 层 711 室, Jiangsu 210019 (CN)。 张鹏(ZHANG, Peng); 中国江苏省南京市建邺区嘉陵江东街 18 号 3 幢 7 层 711 室, Jiangsu 210019 (CN)。 房行行(FANG, Xingxing); 中国江苏省南京市建邺区嘉陵江东街 18 号 3 幢 7 层 711 室, Jiangsu 210019 (CN)。 尚红岩(SHANG, Hongyan); 中国江苏省南京市建邺区嘉陵江东街 18 号 3 幢 7 层 711 室, Jiangsu 210019 (CN)。 凌虹(LING, Hong); 中国江苏省南京市建邺区嘉陵江东街 18 号 3 幢 7 层 711 室, Jiangsu 210019 (CN)。

(74) 代理人: 北京市中咨律师事务所(ZHONGZI LAW OFFICE); 中国北京市西城区平安里西大街 26 号新时代大厦 7 层, Beijing 100034 (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, 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, CV, 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, ME, 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))。
- 在修改权利要求的期限届满之前进行, 在收到该修改后将重新公布(细则 48.2(h))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: ANTIBODY AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种抗体及其用途

(57) Abstract: Provided in the present invention is an antibody or an antigen binding protein thereof. The antibody or the antigen binding protein thereof can specifically bind to human CD3 or human GPRC5D protein or MUC16, or specifically bind to human CD3 and a second antigen. Further provided in the present invention are a nucleic acid molecule encoding the antibody, an expression vector for expressing the antibody, a host cell and a preparation method therefor. Also provided in the present invention is a diagnosis and treatment method using the antibody of the invention.

(57) 摘要: 本发明提供了一种抗体或其抗原结合蛋白。该抗体或其抗原结合蛋白可以特异性结合人 CD3 或人 GPRC5D 蛋白或 MUC16 或特异性结合人 CD3 和第二抗原。本发明进一步提供了编码所述抗体的核酸分子、用于表达所述抗体的表达载体、宿主细胞及其制备方法。本发明还提供了使用本发明的抗体的诊断和治疗方法。



WO 2023/131328 A1

一种抗体及其用途

技术领域

本发明提供了一种抗体或其抗原结合蛋白，以及基于其构建的非对称性双特异性抗体。本发明进一步提供了编码所述抗体的核酸分子、用于表达所述抗体的表达载体、宿主细胞及其制备方法。本发明还提供了使用本发明的抗体的诊断和治疗方法。

背景技术

CD3 是与 T 细胞受体复合物 (TCR) 结合的在 T 细胞上表达的同型二聚体或异二聚体抗原，并且是 T 细胞活化所需要的。功能性 CD3 由以下四种不同链中的两种的二聚体形成： ϵ 、 ζ 、 δ 和 γ 。CD3 二聚体排列包含 γ/ϵ 、 δ/ϵ 和 ζ/ζ 。已显示针对 CD3 的抗体在 T 细胞上聚集 CD3，从而以类似于通过肽负载的 MHC 分子参与 TCR 的方式引起 T 细胞活化。因此，已提出抗 CD3 抗体用于涉及 T 细胞活化的治疗目的。此外，已提出能够结合 CD3 和靶向肿瘤表面抗原的双特异性抗体能够将肿瘤细胞和 T 细胞衔接，从而直接活化 T 细胞，释放颗粒酶、穿孔素及细胞因子杀伤肿瘤，从而达到抑制肿瘤的治疗目的。

G 蛋白偶联受体家族 C 组 5 成员 D (GPRC5D) 作为一个孤儿受体，被发现在多发性骨髓瘤病人的浆细胞中高表达，且与病人的生存率相关 (Atamaniuk, J., et al. (2012). "Overexpression of G protein-coupled receptor 5D in the bone marrow is associated with poor prognosis in patients with multiple myeloma." *Eur J Clin Invest* 42(9): 953-960.)。通过进一步的研究显示在正常人的血细胞中 GPRC5D 表达于浆细胞表面，其他的血细胞表面 GPRC5D 表达都是阴性，从多发性骨髓瘤患者体内分离出的 CD38+CD138+ 的浆细胞表面 GPRC5D 高表达 (Kodama, T., et al. (2019). "Anti-GPRC5D/CD3 Bispecific T-Cell-Redirecting Antibody for the Treatment of Multiple Myeloma." *Mol Cancer Ther* 18(9): 1555-1564.)，对患者多发性骨髓瘤细胞的分析发现 GPRC5D 与 BCMA 的表达不具有相关性 (Smith, E. L., et al. (2019). "GPRC5D is a target for the immunotherapy of multiple myeloma with rationally designed CAR T cells." *Sci Transl Med* 11(485).) (Pillarsetti, K., et al. (2020). "A T-cell-redirecting bispecific G-protein-coupled receptor class 5 member D x CD3 antibody to treat multiple myeloma." *Blood* 135(15): 1232-1243.)，因此 GPRC5D 可以作为多发性骨髓瘤的一个肿瘤特异性靶点。此外，GPRC5D 还可以作为其他肿瘤的肿瘤特异性靶点。

MUC16 蛋白，自从发现以来一直被用做卵巢癌的特异性标记物，而且也被认为与卵巢癌的不良预后相关。MUC16 是一种分子量巨大的一型跨膜糖蛋白，由胞外域、跨膜段和胞内部分组成；胞外域分为两部分，前半段发生高度的糖基化，胞外域的后半段由约 60 个串联的重复结构域组成，其中每个重复结构域有 156 个氨基酸。MUC16 蛋白 N 端含有 56 个 SEA 结构域，MUC16 蛋白在胞外域近膜端第一个或第二个 SEA 域发生截断并释放出游离的 CA125 (Das, S. and S. K. Batra (2015). "Understanding the Unique Attributes of MUC16 (CA125): Potential Implications in Targeted Therapy." *Cancer Res* 75(22): 4669-4674, CA125 enters the circulation by being shed from the full-length MUC16 at the cell surface, Das, S., et al. (2015). "Membrane proximal ectodomain cleavage of MUC16 occurs in the acidifying Golgi/post-Golgi compartments" *Sci Rep* 5: 9759)。除了卵巢癌，CA125 指标在其他肿瘤中也发现上升，如乳腺癌、胰腺癌、结直肠癌和非小细胞肺癌等。有研究显示 MUC16 促进肿瘤的侵入、转移和抑制免疫反应等，基于此 MUC16 可能是一个潜在的治疗癌症的靶点。虽然很早就有以 MUC16 为靶点的疗法进

入临床研究，但是临床的结果都未能达到预期(Aithal, A., et al. (2018), "MUC16 as a novel target for cancer therapy", Expert Opin Ther Targets 22(8): 675-686), 主要原因是已经开发的大部分抗体都能结合循环中游离的 CA125, 从而减少了抗体与膜 MUC16 的结合量, 降低了抗体的肿瘤穿透能力。

近年来免疫检查点抑制剂 (ICI) 开启了肿瘤免疫疗法的新纪元, 通过阻断免疫检查点分子 (例如 PD-1 或者 CTLA4) 与配体的结合来解除免疫抑制, 从而恢复 T 细胞的功能。截至目前免疫检查点抑制剂类的药物已经在一些适应症获得批准上市, 如黑色素瘤、非小细胞肺癌、淋巴瘤等 (Pico de Coana, Y., et al. (2015). "Checkpoint blockade for cancer therapy: revitalizing a suppressed immune system." Trends Mol Med 21(8): 482-491) (Bu, X., et al. (2017). "Immune Checkpoint Blockade in Breast Cancer Therapy." Adv Exp Med Biol 1026: 383-402) (Hargadon, K. M., et al. (2018). "Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors." Int Immunopharmacol 62: 29-39)。尽管如此, 只有很少部分的卵巢癌患者能够从免疫检查点抑制剂药物的治疗中获益 (Borella, F., et al. (2020). "Immune Checkpoint Inhibitors in Epithelial Ovarian Cancer: An Overview on Efficacy and Future Perspectives." Diagnostics (Basel) 10(3)) (Lorusso, D., et al. (2020). "Emerging role of immune checkpoint inhibitors in the treatment of ovarian cancer." Expert Opin Emerg Drugs 25(4): 445-453)。免疫系统主要通过 T 细胞来清除体内的肿瘤细胞, 而肿瘤细胞通过多种方法来逃逸免疫系统的杀伤。T 细胞链接器是一类双特异性抗体, 它可以同时结合到 T 细胞的 CD3 和肿瘤细胞的肿瘤相关性抗原 (TAA) 上 (Labrijn, A. F., et al. (2019). "Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline." Nat Rev Drug Discov 18(8): 585-608.) (Ellerman, D. (2019). "Bispecific T-cell engagers: Towards understanding variables influencing the in vitro potency and tumor selectivity and their modulation to enhance their efficacy and safety" Methods 154: 102-117)。这种双特异性抗体通过同时结合到 T 细胞和肿瘤细胞, 驱动细胞间形成免疫突触, 激活 T 细胞对肿瘤细胞进行杀伤。博纳吐单抗 (blinatumomab) 作为第一个上市的 T 细胞链接器已经证实了这个理论的可行性, 更多的 T 细胞链接器已经处于早期开发中而且被广泛用于治疗血液瘤和实体瘤 (Goebeler, M. E. and R. C. Bargou (2020). "T cell-engaging therapies - BiTEs and beyond." Nat Rev Clin Oncol 17(7): 418-434.)。

因此, 本领域存在对开发特异性结合 CD3 的抗体、特异性结合 CD3 和另一抗原抗体以及基于其构建的双特异性抗体的需要, 用于治疗癌症。

发明内容

本发明提供了靶向人 CD3 的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段, 其具有如下优点:

- 1) 高特异性结合人 CD3 以及表达人 CD3 的靶细胞;
- 2) 适合作为基因工程构件;
- 3) 低免疫原性。

本发明还提供了靶向人 MUC16 的抗 MUC16 抗体、其具有以下一种或者多种优点:

- (1) 高亲和力结合 MUC16 (例如人或猴 MUC16)、表达人 MUC16 的靶细胞;
- (2) 不结合循环中游离的 CA125;
- (3) 适合作为基因工程构件;

- (4) 低免疫原性;
- (5) 表达纯度高;
- (6) 人源化之后仍然具有高亲和力。

本发明提供了一种新型的抗 GPRC5D 抗体, 以及应用其构建的与 CD3 抗体的双特异性抗体。在一些实施方案中, 本发明的抗 GPRC5D 抗体与人 GPRC5D 的结合亲和力很高, 能够识别人和猴 (例如食蟹猴) GPRC5D。

在一些实施方案中, 抗 GPRC5D 抗体可以以高亲和力特异性结合 GPRC5D (例如人 GPRC5D 和/或猴 (例如食蟹猴) GPRC5D), 结合活性显著优于对照抗体 GC5B596。

本发明还提供基于 CD3 的双特异性抗体, 例如特异性结合 CD3 和 MUC16 的双特异性抗体。

本发明的抗 CD3×MUC16 双特异性抗体具有以下一种或多种特性:

- (1) 高特异性结合人 CD3、表达人 CD3 的靶细胞和同时高亲和力结合人 MUC16、表达人 MUC16 的靶细胞;
- (2) 不结合循环中游离的 CA125, 同时将更多的 T 细胞靶向表达 MUC16 的癌细胞;
- (3) 激活 T 细胞, 并引发对表达 MUC16 的癌细胞的细胞毒活性, 从而有效杀伤癌细胞;
- (4) 低免疫原性;
- (5) 优异的抑瘤效果。

本发明的抗 CD3/GPRC5D 双特异性抗体具有以下一种或多种特性, 因此在 GPRC5D 相关的适应症中存在光明的治疗前景:

- (1) 在细胞 (例如 T 细胞, 例如 Jurkat 细胞) 中, 与细胞上表达的 CD3 结合;
- (2) 与人和/或猴 (例如食蟹猴) GPRC5D 结合, 例如与细胞上表达的 GPRC5D 结合, 例如以高亲和力与 GPRC5D 结合;
- (3) 在存在表达 GPRC5D 的细胞时才能够激活 CD3 信号通路, 例如在表达 GPRC5D 细胞存在的前提下才能够激活 CD3 信号通路;
- (4) 在无表达 GPRC5D 细胞的情况下, 只有在高浓度能够激活 CD3 信号通路;
- (5) 对 CD3 的信号通路具有较少的非特异性激活; 例如, 在不表达 GPRC5D 的细胞 (例如 HEK293T 细胞) 中, 只在高浓度下激活信号通路, 且具有浓度依赖性;
- (6) 更加特异性的诱导 T 细胞杀伤表达 GPRC5D 的细胞, 无非特异性激活或无可见的非特异性激活; 例如, 仅杀伤表达 GPRC5D 的靶细胞而不杀伤不表达 GPRC5D 的细胞;
- (7) 具有较好的细胞因子诱导特异性; 例如仅在表达 GPRC5D 的细胞 (例如 HEK293T-GPRC5D 细胞) 中诱导细胞释放细胞因子, 例如干扰素, 如 IFN γ ; 肿瘤坏死因子如 TNF α 和/或白细胞介素如 IL-6;
- (8) 例如体外结合测定, 例如 Fortebio 中, 能够特异性结合人和猴 (例如食蟹猴) CD3 蛋白, 即具有种属交叉活性;
- (9) 保留了最佳的 CD3 亲和力, 例如在体外结合测定中, 例如 Fortebio 中, 亲和力 K_D

在 1-1000nM 之间, 例如与猴 (例如食蟹猴) 的结合亲和力 K_D 在 1-100nM 之间, 例如在 10-100nM 之间, 例如在 50-100nM 之间, 例如与人的结合亲和力 K_D 在 1-1000nM 之间, 例如在 1-100nM 之间, 例如在 10-100nM 之间, 例如在 50-100nM 之间, 例如在 100-1000nM 之间, 例如在 200-1000nM 之间;

(10) 具有更好的肿瘤抑制作用, 例如肿瘤抑制率在 35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 以上, 甚至能够使得肿瘤完全消退;

(11) 能够结合细胞上表达的人和猴 (例如食蟹猴) GPRC5D, 和/或能够结合细胞上表达的人和猴 (例如食蟹猴) CD3, 对于 GPRC5D 和/或 CD3 具有种属交叉活性。

附图说明

图 1. 人源化抗 CD3 抗体 Roche-CD3/017-Roche-CD3、DA023AH23L2(图 1A)和 017-2(图 1B)激活 Jurkat/NFAT-luc 报告基因系统的结果。

图 2. 鼠源抗 GPRC5D 抗体与表达人 GPRC5D 蛋白 (上) 和食蟹猴 GPRC5D 蛋白 (下) 的细胞结合。

图 3. 人源化抗 GPRC5D 抗体与表达人 GPRC5D 蛋白的工程化细胞结合。

图 4. 双特异性分子结构示意图。

图 5. 抗 CD3/抗 GPRC5D 双特异性抗体与稳定表达人 CD3 蛋白的 Jurkat 细胞结合。

图 6. A 和 B: 抗 CD3/抗 GPRC5D 双特异性抗体与稳定表达人 GPRC5D 蛋白的 HEK293T 细胞结合; C: 抗 CD3/抗 GPRC5D 双特异性抗体 Bi-29H6-6 与稳定表达食蟹猴 GPRC5D 蛋白的 HEK293T 细胞结合; D-F: 抗 CD3/GPRC5D 双特异性抗体 Bi-29H6-6 不结合表达 GPRC5A、GPRC5B 或 GPRC5C 蛋白的细胞。

图 7. 抗 CD3/GPRC5D 双特异性抗体能在表达人 GPRC5D 的细胞存在时激活 CD3 信号通路。

图 8. 抗 CD3/GPRC5D 双特异性抗体在不表达人 GPRC5D 的细胞存在时不能激活 CD3 信号通路。

图 9. 抗 CD3/GPRC5D 双特异性抗体诱导 PBMC 特异性的杀伤表达 GPRC5D 的肿瘤细胞。

图 10. 抗 CD3/GPRC5D 双特异性抗体介导的 PBMC 对非相关靶细胞 Raji 的杀伤。

图 11. 抗 CD3/GPRC5D 双特异性抗体在 NCI-H929 体系中 T 细胞释放分泌因子 $IFN\gamma$ (A)、IL-6 (B) 和 $TNF\alpha$ (C) 的检测。

图 12. 抗 CD3/GPRC5D 双特异性抗体在不表达 GPRC5D 的 Raji 体系中 T 细胞释放分泌因子 $IFN\gamma$ (A)、IL-6 (B) 和 $TNF\alpha$ (C) 的检测。

图 13. A: 抗 CD3/抗 GPRC5D 双特异性抗体在人 CD3E 转基因小鼠 MC38-huGPRC5D 模型中的抗肿瘤作用; B: 抗 CD3/抗 GPRC5D 双特异性抗体在 NCG 小鼠移植人 PBMC 接种 NCI-H929 肿瘤模型中的抗肿瘤作用。

图 14. 鼠源抗 MUC16 抗体 776.1 及其突变体的 SDS-PAGE 电泳结果 (左图是非还原型

SDS-PAGE 电泳结果，右图是还原型 SDS-PAGE 电泳结果）。

图 15. 鼠源抗人 MUC16 抗体 776.1 及其突变体与表达人 Muc16 蛋白的 293T 细胞结合的流式细胞术检测结果。

图 16. 鼠源抗人 MUC16 抗体 776.1 及其突变体与表达恒河猴 MUC16 蛋白的 293T 细胞结合的流式细胞术检测结果。

图 17. 人源化抗 MUC-16 抗体 Hu-L4H7 与表达人 MUC16 蛋白的 293T 细胞结合的 ELISA 结果。

图 18. 人源化抗 MUC-16 抗体 Hu-L4H7 不结合人 CA125 的 ELISA 结果。

图 19. 肿瘤组织中 MUC16 及 CD8 的免疫组化检测结果。

图 20. 双特异性抗体分子的结构示意图

图 21. 抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体结合 OVCAR3 细胞。

图 22. 抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体结合 293T/ 恒河猴 MUC16 细胞。

图 23. 抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体结合 Jurkat 细胞。

图 24. 抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体在 OVCAR3 肿瘤细胞存在时激活 Jurkat/NFAT-luc 细胞。

图 25. 抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体在 293T 细胞存在时不激活 Jurkat/NFAT-luc 细胞。

图 26. A:抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体特异性介导 T 细胞杀伤肿瘤细胞；B: 抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体特异性介导 T 细胞杀伤 OVCAR3 肿瘤细胞的活性，孵育 72 小时

图 27. 抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体激活 T 细胞后诱导释放细胞因子的结果，其中比较了分别与 OVCAR3 或者 293T 细胞共培养细胞因子 $IFN\gamma$ 、 $TNF\alpha$ 以及 IL-6 因子的释放情况。

图 28A. 给药后各组肿瘤体积增长结果。

图 28B. 给药后各组肿瘤相对体积增长结果。

图 29. TDCC 实验中 T 细胞激活、衰竭和凋亡检测。

图 30. 抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体特异性介导 T 细胞重复杀伤肿瘤细胞。

图 31. TDCC 重复杀伤实验中 T 细胞激活、衰竭和凋亡检测。

发明详述:

应理解本发明不限于本文中描述的特定方法学、方案和试剂，因为这些可以变化。还应理解本文中使用的术语仅为了描述具体实施方案，而并不意图限制本发明的范围，其仅会由所附权利要求书限制。

I. 定义

为了解释本说明书，将使用以下定义，并且只要适当，以单数形式使用的术语也可以包括复数，并且反之亦然。除非另外定义，本文中使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域中普通技术人员通常的理解具有相同的含义。

术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小 10%的下限和比指定数字数值大 10%的上限的范围内的数字数值。

如本文所用，术语“和/或”意指可选项中的任一项或可选项的两项或多项或全部。

如本文中所用，术语“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整数或步骤，但是不排除任意其他要素、整数或步骤。在本文中，当使用术语“包含”或“包括”时，除非另有指明，否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组成的情形。例如，当提及“包含”某个具体序列的抗体可变区时，也旨在涵盖由该具体序列组成的抗体可变区。

在本文中当提及“第一”“第二”时，仅为了区分两个结构域或两条链，而不以任何方式表明两个结构域的位置。

本文所使用的术语“CD3”指表达在 T 细胞上作为多分子 T 细胞受体(TCR)的部分的抗原，即 T 细胞衔接抗原 T 细胞表面糖蛋白 CD3，其是由下列四条受体链中的二条链所形成的同源二聚体或异源二聚体所组成：CD3- ϵ 、CD3- δ 、CD3- ζ 和 CD3- γ 。人类 CD3- ϵ (hCD3 ϵ)包含 UniProtKB/Swiss-Prot: P07766 中所述的氨基酸序列。人类 CD3- δ (hCD3 δ)包含 UniProtKB/Swiss-Prot: P04234 中所述的氨基酸序列。在一些实施方案中，本发明所述的 CD3 是指来自人或猴（例如食蟹猴）的 CD3。

本文所使用的术语“结合 CD3 的抗体”或“抗 CD3 抗体”包含特异性识别单一 CD3 亚单元（例如 ϵ 、 δ 、 γ 或 ζ ）或与其结合的抗体和其抗原结合片段，以及特异性识别两个 CD3 亚单元的二聚复合物（例如， γ/ϵ 、 δ/ϵ 和 ζ/ζ CD3 二聚体）以及与其连结的抗体和其抗原结合片段。本发明的抗体和抗原结合片段可与可溶性 CD3、结合 CD3 和/或细胞表面表达的 CD3 结合。可溶性 CD3 包含天然的 CD3 蛋白以及重组的 CD3 蛋白变体，例如，缺乏跨膜区或另外不与细胞膜结合的单体和二聚体 CD3 结构。在一个实施方案中，本发明的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段（例如 ScFv）或双特异性抗体中的结合 CD3 中的抗原结合区可以对 CD3 或表达 CD3 的细胞（例如 T 细胞）具有较低的结合活性。可以通过流式细胞术检测或生物膜层光学干涉技术检测，例如实施例 6.5 或实施例 10.2 中所述测定试验，检测抗体对 CD3 的结合亲和力。优选地，在本发明的双特异性抗体分子中，结合 CD3 的抗原结合区对人和/或猴（食蟹猴）CD3 的结合亲和力在 1-1000nM 之间。在一些实施方案中，本发明的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段或双特异性抗体中的结合 CD3 中的抗原结合区以较低的结合亲和力结合人类和/或猴（例如食蟹猴）CD3 从而能够激活人类和/或猴（例如食蟹猴）的 T 细胞。

效应细胞包含效应 T 细胞(T 淋巴细胞)，例如 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、Th1、Th2 和调节 T 细胞(Tregs)。效应细胞还可以包含自然杀伤细胞、巨噬细胞、粒细胞、浆细胞或 B 细胞(淋巴细胞)。

术语“GPCR5D”指肿瘤相关抗原 G 蛋白偶联受体家族 C 组 5 成员 D（例如，登录号 NP_061124.1 下的人 GPCR5D 蛋白或 XP_005570249.2 下的食蟹猴 GPCR5D 蛋白）。在一个实施方案中，本发明的人 GPCR5D 蛋白包含 SEQ ID NO:57 所示的氨基酸序列，或具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成。在一个实施方案中，本发明的食蟹猴 GPCR5D 蛋白包含 SEQ ID NO:58 所示的氨基酸序列，或具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成。在一个实施方案中，本发明的抗 GPCR5D 抗体或其抗原结合片段（例如 Fab）或双特异性抗体中的结合 GPCR5D 的抗原结合区对表达人 GPCR5D 的细胞具有高亲和力结合活性，例如具有比对照抗体（例如 GC5B596）更高的结合亲和力。在一个实施方案中，通过流式细胞术测定，例如实施 6.2 所述的测定实验。在一

个实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段（例如 Fab）或双特异性抗体中的结合 GPRC5D 中的抗原结合区对人和猴（例如食蟹猴）GPRC5D 具有交叉反应性，即能结合人和猴（例如食蟹猴）GPRC5D。

术语“全抗体”、“全长抗体”、“完全抗体”和“完整抗体”在本文中可互换地用来指天然存在的包含由二硫键相互连接的至少两条重链(H)和两条轻链(L)的糖蛋白。每条重链由重链可变区(本文中缩写为 VH)和重链恒定区组成。重链恒定区由 3 个结构域 CH1、CH2 和 CH3 组成。每条轻链由轻链可变区(本文中缩写为 VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。VH 区和 VL 区可以进一步再划分为超变区（为互补决定区(CDR)，其间插有较保守的区域（为构架区(FR)）。每个 VH 和 VL 由三个 CDR 和 4 个 FR 组成，从氨基端到羧基端以如下顺序排列：FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合，但是显示出多种效应子功能。在一些实施方案中，本发明的抗体重链恒定区 HC 为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的重链恒定区，优选的 IgG1 的重链恒定区。在一些实施方案中，重链恒定区包含 LALA 突变。在一些实施方案中，重链恒定区包含 D265A 和 P329A 突变。在一些实施方案中，重链恒定区包含 LALA 突变和 D265A 和 P329A 突变。在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体分子的重链恒定区包含“结入扣突变”。在一些优选的实施方案中，本发明的抗体重链恒定区 HC

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:45 或 48 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 45 或 48 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 45 或 48 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明的抗体轻链恒定区 LC 为 Lambda 或 Kappa 轻链恒定区。在一些实施方案中，本发明的抗体轻链恒定区 LC

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:47 或 50 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 47 或 50 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 47 或 50 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

术语“抗体片段”包括完整抗体的一部分。在优选的实施方案中，抗体片段为抗原结合片段。

术语“抗原结合片段”是比完整或完全抗体的氨基酸残基数要少的完整或完全抗体的一部分或一段，其能结合抗原或与完整抗体(即与抗原结合片段所来源的完整抗体)竞争结合抗原。可以通过重组 DNA 技术、或通过酶或化学切割完整的抗体制备抗原结合片段。抗原结合片段包括但不限于 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、单链 Fv、双体抗体(diabody)、单结构域抗体(sdAb)。所述 Fab 片段是一种由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段，例如，通过木瓜蛋白酶消化完全抗体能够获得 Fab 片段。此外，通过胃蛋白酶在铰链区的二硫键下面消化完全抗体产生 F(ab')₂，其为 Fab' 的二聚体，是二价的抗体片段。F(ab')₂ 可以在中性条件下通过破坏

较链区中的二硫键而被还原，由此将 F(ab')₂ 二聚体转化为 Fab' 单体。Fab' 单体基本上是具有较链区的 Fab 片段(其它抗体片段的更详细的描述请参见：基础免疫学(Fundamental Immunology), W. E. Paul 编辑, Raven Press, N.Y. (1993))。所述 Fv 片段由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成。另外，虽然 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由独立的基因编码，但是使用重组方法，可以将它们通过能够使这两个结构域作为单条蛋白链产生的合成性连接肽连接，在所述单条蛋白链中 VL 区和 VH 区配对以形成单链 Fv(scFv)。可以通过化学方法、重组 DNA 方法或蛋白酶消化法获得所述抗体片段。

“Fab 片段”或“Fab”在本文中可互换使用，用于指，由两条多肽链组成的、包含免疫球蛋白重链可变结构域 VH、重链恒定结构域 CH1、轻链可变结构域 VL 和轻链恒定结构域 CL 的免疫球蛋白片段，其中，一条多肽链从 N 端到 C 端包含 VH 和选自 CH1 和 CL 的一个恒定区，另一条多肽链从 N 端到 C 端包含 VL 和选自 CL 和 CH1 的另一恒定区，其中所述 VH 结构域和 VL 结构域配对形成抗原结合位点。在本文中，包含重链恒定区 CH1 的 Fab 链也称作“Fab 重链”；相应地，包含轻链恒定区 CL 的 Fab 链也称作“Fab 轻链”。

术语“靶标”是指结合分子所针对的被结合物。靶标可以是抗原，也可以是配体或受体。

术语“抗原”是指引发免疫应答的分子。这种免疫应答可能涉及抗体产生或特异性免疫细胞的活化，或两者兼有。技术人员将理解，任何大分子，包括基本上所有的蛋白质或肽，都可以用作抗原。此外，抗原可以衍生自重组或基因组 DNA。如本文所用，术语“表位”指抗原中与抗体分子特异性相互作用的部分。

如本文所用的术语“靶标结合区”是指多特异性结合分子，例如双特异性结合分子的结合特定靶标或抗原的部分。靶标结合区可以是例如抗体或免疫球蛋白本身或抗体片段。这种靶标结合区可以具有或不具有独立于双特异性抗体分子的剩余部分的三级结构，并且可以作为单独实体结合或不结合其靶标。靶标结合区还可以是受体或配体，或受体的能够结合配体的结构域。在多特异性抗体或双特异性抗体时，也将“靶标结合区”称为“抗原结合区”。在一个实施方案中，用于本发明双特异性抗体分子的抗原结合区包含抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)组成的 VH/VL 对，所述 VH/VL 对可以包含在单一多肽链（例如在 scFv）中或包含在分离的两条多肽链（例如分别在 Fab 重链和 Fab 轻链）中。

如本文所用，术语“单特异性”抗体指具有一个或多个结合位点的抗体，所述位点中的每一个位点与相同抗原的相同表位结合。如本文所用，术语“多特异性”抗体指具有至少两个抗原结合位点的抗体，其中至少一个抗原位点，相对于其余的抗原结合位点，结合不同的抗原表位，例如，相同抗原上的不同表位或不同抗原上的不同表位。例如，本发明提供了针对 GPRC5D 的抗体、针对 CD3 的抗体和针对 GPRC5D 和 CD3 的双特异性抗体。本发明还提供了针对 CD3 和 MUC16 的双特异性抗体。

术语“免疫球蛋白分子”指具有天然存在抗体的结构的蛋白质。例如，IgG 类免疫球蛋白是由二硫键键合的两条轻链和两条重链组成的约 150,000 道尔顿的异四聚体糖蛋白。从 N 端至 C 端，每条免疫球蛋白重链具有一个重链可变区(VH)，也称作重链可变结构域，随后是三个重链恒定结构域(CH1、CH2 和 CH3)。类似地，从 N 端至 C 端，每条免疫球蛋白轻链具有一个轻链可变区(VL)，也称作轻链可变结构域，随后是一个轻链恒定结构域(CL)。免疫球蛋白的重链可以归属 5 个类别之一，称作 α (IgA)、 δ (IgD)、 ϵ (IgE)、 γ (IgG) 或 μ (IgM)，其中某些类别可以进一步划分成亚类，例如 $\gamma 1$ (IgG1)、 $\gamma 2$ (IgG2)、 $\gamma 3$ (IgG3)、 $\gamma 4$ (IgG4)、 $\alpha 1$ (IgA1) 和 $\alpha 2$ (IgA2)。免疫球蛋白的轻链可以基于其恒定结构域的氨基酸序列而划分成两种类型之一，

称作 κ 和 λ 。IgG 免疫球蛋白基本上由借助免疫球蛋白铰链区连接的两个 Fab 分子和两个二聚化的 Fc 区(Fc 二聚体)组成。

术语“可变区”或“可变结构域”是指参与抗体与抗原结合的抗体重或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变区通常具有相似的结构,其中每个结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个互补决定区。

“互补决定区”或“CDR 区”或“CDR”是抗体可变结构域中在序列上高变并且形成在结构上确定的环(“超变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触点”)的区域。CDR 主要负责与抗原表位结合。重链和轻链的 CDR 通常被称作 CDR1、CDR2 和 CDR3,从 N-端开始顺序编号。位于抗体重链可变结构域内的 CDR 被称作 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,而位于抗体轻链可变结构域内的 CDR 被称作 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一个给定的轻链可变区或重链可变区氨基酸序列中,各 CDR 的精确氨基酸序列边界可以使用许多公知的抗体 CDR 指派方案的任一种或其组合确定,所述指派方案包括例如:基于抗体的三维结构和 CDR 环的拓扑学的 Chothia (Chothia 等人, (1989) Nature 342: 877-883, Al-Lazikani 等人, “Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins”, Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997)), 基于抗体序列可变性的 Kabat (Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 4 版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM (University of Bath), Contact (University College London), 国际 ImMunoGeneTics database (IMGT) (在万维网上 imgt.cines.fr/上), 以及基于利用大量晶体结构的近邻传播聚类 (affinity propagation clustering)的 North CDR 定义。

以下为采用 kabat、AbM、Chothia、Contact 和 IMGT 方案定义的 CDR 的区域范围。

CDR	Kabat 方案	AbM 方案	Chothia 方案	Contact 方案	IMGT 方案
LCDR1 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36	L27-L32
LCDR2 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55	L50-L52
LCDR3 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96	L89-L96
HCDR1(Kabat 编号系统)	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B	H26-H35B
HCDR1 (Chothia 编号系统)	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35	H26-H35
HCDR2 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58	H51-H57
HCDR3 (Kabat 和 Chothia 编号系统)	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101	H93-H102

除非另有说明，否则在本发明中，术语“CDR”或“CDR 序列”涵盖以上述任一种方式确定的 CDR 序列。CDR 也可以基于与参考 CDR 序列(例如本发明示例性 CDR 之任一)具有相同的 Kabat 编号位置而确定。除非另有说明，否则在本发明中，当提及抗体可变区中的残基位置(包括重链可变区残基和轻链可变区残基)时，是指根据 Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)中的 Kabat 编号系统的编号位置。

在一本实施方案中，本发明抗体中的 HCDR 和 LCDR 按照 Kabat 方案确定。

应该注意，基于不同的指派方案获得的同一抗体的可变区的 CDR 的边界可能有所差异。即不同指派方案下定义的同一种抗体可变区的 CDR 序列有所不同。因此，在涉及用本发明定义的具体 CDR 序列限定抗体时，所述抗体的范围还涵盖了这样的抗体，其可变区序列包含所述的具体 CDR 序列，但是由于应用了不同的方案(例如不同的指派方案规则或组合)而导致其所声称的 CDR 边界与本发明所定义的具体 CDR 边界不同。

术语“Fc 结构域”或“Fc 区”或“Fc 片段”在本文中用来定义免疫球蛋白重链的含有至少一部分恒定区的 C 端区域。该术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。天然的免疫球蛋白“Fc 结构域”包含两个或三个恒定结构域，即 CH2 结构域、CH3 结构域和可选的 CH4 结构域。例如，在天然抗体中，免疫球蛋白 Fc 结构域包含源自 IgG、IgA 和 IgD 类抗体的两条重链的第二和第三恒定结构域(CH2 结构域和 CH3 结构域)；或者包含源自 IgM 和 IgE 类抗体的两条重链的第二、第三和第四恒定结构域(CH2 结构域、CH3 结构域和 CH4 结构域)。除非本文中另外说明，否则 Fc 区或重链恒定区中的氨基酸残基编号根据如 Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969)(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5257969/>)中所述的 EU 编号体系(也称作 EU 索引)进行编号，还参见 http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html。在本文中，术语“Fc 结构域”或“Fc 区”或“Fc 片段”不包括免疫球蛋白的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 以及重链恒定区 CH1 和轻链恒定区 CL，但在一些情况下可以包括在重链恒定区 N 端的铰链区，例如 EPKSS 或 EPKSC。在一些实施方案中，适用于本发明的重链恒定区 Fc 来自抗体重链恒定区，例如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的恒定区，优选来自 IgG1 的恒定区。在一些实施方案中，Fc 区包含降低与 Fcγ受体结合的突变，例如 LALA 突变、D265A 突变和/或 P329A 突变，优选地包含 LALA 突变和 D265A 和 P329A 突变。在一些实施方案中，Fc 包含 SEQ ID NO:46 或 SEQ ID NO:49 所示的氨基酸序列，或包含与其具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。在本发明的一些实施方案中，Fc 片段二聚化构成 Fc 二聚体。在一些实施方案中，Fc 片段异二聚化为 Fc 异二聚体。在 Fc 片段异二聚化为异二聚体的情况下，Fc 片段可以包含用于异二聚化的突变，例如结入扣突变。

免疫球蛋白的“效应子功能”的例子包括：C1q 结合和补体依赖的细胞毒性(CDC)、Fc 受体结合作用、抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖的细胞吞噬作用(ADCP)、细胞因子分泌、免疫复合物介导的抗原呈递细胞摄取抗原、下调细胞表面受体(例如 B 细胞受体)和 B 细胞活化。

术语“嵌合抗体”是这样的抗体分子，其中(a)将恒定区或其部分改变、替换或交换，从而抗原结合位点与不同的或改变的类别、效应子功能和/或物种的恒定区或赋予嵌合抗体新性能的完全不同的分子(例如，酶、毒素、激素、生长因子、药物)等连接；或(b)将可变区或其部分用具有不同或改变的抗原特异性的可变区改变、替换或交换。例如，小鼠抗体可以通过将其恒定区更换为来自人免疫球蛋白的恒定区进行修饰。由于更换为人类恒定区，该嵌合抗体

可以保留其在识别抗原方面的特异性，同时如与原始小鼠抗体相比，具有在人类中降低的免疫原性。

“人源化抗体”是一种保留非人类抗体(例如小鼠单克隆抗体)的抗原特异性反应性，同时作为治疗药对人施用免疫原性较低的抗体。这可以例如通过保留非人类抗原结合位点并将抗体的剩余部分替换成它们的人类相应部分(即，将恒定区以及可变区中不参与结合的部分替换为人类抗体的相应部分)来实现。

如本文所用，术语“抗”、“结合”或“特异性结合”意指结合作用对靶标或抗原是选择性的并且可以与不想要的或非特异的相互作用区别。结合位点与特定靶标或抗原结合的能力可以通过流式细胞术或酶联免疫吸附测定法(ELISA)或本领域已知的常规结合测定法如通过放射性免疫测定(RIA)或生物膜薄层干涉测定法或 MSD 测定法或表面等离子体共振法 (SPR) 测定。

“亲和力”或“结合亲和力”指反映结合对子的成员之间相互作用的固有结合亲和力。分子 X 对其配偶物 Y 的亲和力可以通常由解离常数(K_D)表示，解离常数是解离速率常数和缔合速率常数(分别是 K_{dis} 和 K_{on})的比例。亲和力可以由本领域已知的常见方法测量。用于测量亲和力的一个具体方法是本文中的 ForteBio 动力学结合测定法。

氨基酸序列的“同一性百分数(%)”是指将候选序列与本说明书中所示的具体氨基酸序列进行比对并且如有必要的话为达到最大序列同一性百分数而引入空位后，并且不考虑任何保守置换作为序列同一性的一部分时，候选序列中与本说明书中所示的具体氨基酸序列的氨基酸残基相同的氨基酸残基百分数。在一些实施方案中，本发明考虑本发明抗体分子的变体，所述变体相对于在本文中具体公开的抗体分子及其序列而言具有相当程度的同一性，例如同一性为至少 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 或 99% 或更高。所述变体可以包含保守性改变，或为保守性修饰变体。

对于多肽序列，“保守性改变”包括对多肽序列的置换、缺失或添加，但不实质性改变多肽序列的期望功能活性。例如，保守性置换常常导致某个氨基酸置换为化学上相似的氨基酸。提供功能上相似氨基酸的保守性置换表是本领域熟知的。以下列出了 8 组含有互为保守置换的氨基酸：1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G)；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)；5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V)；6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)；7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T)；和 8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)。在一些实施方案中，术语“保守序列改变”用于指不显著影响或改变含有氨基酸序列的本发明抗体分子或结合蛋白分子的目的抗原结合特征的氨基酸修饰。例如保守修改变体相对于亲本抗体或结合蛋白保持对目的抗原至少 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% 或更高，例如 100-110% 或更高的结合亲和力。

“knob-in-hole”突变或“结入扣”突变或“杵臼”在本文中用于指，利用“结入扣”技术，在第一 Fc 多肽和第二 Fc 多肽中分别引入突变，以在第一 Fc 多肽的界面上与在第二 Fc 多肽的界面上形成凸起(“结(knob)”)和互补的空穴(“扣(hole)”)。本领域已知，“结入扣”技术可在抗体分子的不同链之间改造界面，以促进抗体分子各链的正确缔合。通常，该技术涉及在一条链的界面引入“凸起/结”，在欲与之配对的另一条链的界面引入相应的“空穴/扣”，使得凸起可置于空穴中。一个优选的界面包含一条链的重链恒定结构域的 CH3 结构域和欲与之配对的另一条链的重链恒定结构域的 CH3 结构域。可通过将来自一条链的重链恒定结构域的 CH3 结构域的界面的小氨基酸侧链替换为较大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)来构建凸起。通过将大氨基酸侧链替换为较小的侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)，在欲配对的另一条链的重链恒定结构

域的 CH3 结构域的界面构建与凸起相同或相似大小的补偿性空穴。另一可选的界面是上文所述 Fab 片段的包含轻链的 CL 结构域和重链的 CH1 结构域,通过构建凸起-空穴相互作用促进 Fab 片段的两条链之间发生正确的异二聚化。

“单链可变片段”或“scFv”在本文中用于指,包含由接头连接的重链可变结构域 VH 和轻链可变结构域 VL 的单链抗体片段,其中 VH 和 VL 配对形成抗原结合位点。

在本文中,抗体恒定区或抗体恒定结构域,包括 CH1, CL 和 Fc 结构域以及构成 Fc 结构域的 CH2, CH3 和可选的 CH4 结构域,可以根据抗体分子的预期功能进行选择。例如,恒定区可以是 IgA, IgD, IgE, IgG 或 IgM 区,尤其是人 IgG 的免疫球蛋白恒定结构域,例如,人 IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 的恒定结构域,优选人 IgG1 的恒定结构域。作为一个例子,抗体的 Fab 片段可以包含来自 IgG1 的 CH 和 CL 恒定区。作为再一例子,抗体的 Fc 区可以包含来自 IgG1 的 CH2 和 CH3 结构域。免疫球蛋白恒定区可以具有天然序列或变体序列。

如本文所用的术语“接头”是指使得能够直接连接双特异性结合分子的不同部分的任何分子。在不同分子部分之间建立共价连接的接头的实例包括肽接头和非蛋白质聚合物,包括但不限于聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚氧化烯或聚乙二醇、聚丙二醇的共聚物。在一些实施方案中,接头是肽接头(又称为“连接肽”),其是指是指由氨基酸组成的短氨基酸序列,例如单独或组合使用的甘氨酸(G)和/或丝氨酸(S)和/或苏氨酸残基(T),或来自免疫球蛋白的铰链区,用于将结合分子的第一部分的氨基酸序列连接至结合分子的第二部分。例如,肽接头可以将结合分子的第一靶标结合区连接至第二靶标结合区。例如,肽接头也可以将抗体的一部分连接至抗体的另一部分,诸如将轻链可变区连接至重链可变区。优选地,所述肽接头具有这样的长度,其足以连接两个实体,其方式使得它们维持它们相对于彼此的构象,使得不妨碍期望的活性。在一个实施方案中,连接肽具有 5-50 个氨基酸长度,例如,10,15,20,25,30 个氨基酸长度。在一个实施方案中,连接肽包含氨基酸序列(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n、(GGGS)_n、(GGGS)_n 和(GGGGS)_nG,其中 n 是等于或大于 1 的整数,例如,n 是 2、3、4、5、6、7、8、9、10 的整数。有用的接头还包括甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和其他柔性接头。在一些实施方案中,所述肽接头是(GGGGS)_n,其中 n=1、2、3 或 4,例如 SEQ ID NO:12 所示的序列。

在再一实施方案中,连接肽为来自免疫球蛋白的铰链区或铰链区部分,包括天然的铰链区或其部分,或者突变的铰链区或其部分。在一个实施方案中,连接肽例如是免疫球蛋白(例如 IgG,例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4)的铰链区或其部分(例如 EPKSC)或是突变的铰链区或其部分,例如 EPKSS。或者,可以使用计算机程序模拟蛋白和肽的三维结构,或通过噬菌体展示方法,来合理地设计合适的柔性连接肽。

术语“半数有效浓度 (EC₅₀)”是指在特定的暴露时间后诱导在基线和最大值之间的 50% 的应答的药物、抗体或毒剂的浓度。

术语“宿主细胞”指已经向其中引入外源多核苷酸的细胞,包括这类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”,这包括原代转化的细胞和从其衍生的子代。宿主细胞是可以用来产生本发明抗体分子的任何类型的细胞系统,包括真核细胞,例如,哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞;和原核细胞,例如,大肠杆菌细胞。宿主细胞包括培养的细胞,也包括转基因动物、转基因植物或培养的植物组织或动物组织内部的细胞。

术语“载体”当在本文中使用是指能够增殖与其相连的另一个核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及结合到已经引入其的宿主细胞的基因组中的载体。术语“表达载体”是指包含重组多核苷酸的载体,其包含有效连接要表达的核苷酸序列的表达控

制序列。表达载体包含足够的用于表达的顺式作用元件；用于表达的其它元件可以由宿主细胞提供或在体外表达系统中。表达载体包括本领域已知的所有那些，包括被掺入重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如，裸的或包含在脂质体中)和病毒(例如，慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒)。

术语“个体”或“受试者”可互换地使用，是指哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯化动物(例如，奶牛、绵羊、猫、犬和马)、灵长类(例如，人和非人灵长类如猴)、兔和啮齿类(例如，小鼠和大鼠)。特别地，个体是人。

术语“治疗”指减缓、中断、阻滞、缓解、停止、降低、或逆转疾病的症状、并发症、或生化指征的发作、缓解症状或阻止或抑制疾病、病状或病症的进一步发展。

术语“预防”包括对疾病或病症或特定疾病或病症的症状的发生或发展的抑制。在一些实施方式中，具有癌症家族病史的受试者是预防性方案的候选。通常，在癌症的背景中，术语“预防”是指在癌症的病征或症状发生前，特别是在具有癌症风险的受试者中发生前的药物施用。

本文所述的术语“治疗剂”涵盖在预防或治疗肿瘤，例如癌症中有效的任何物质，包括化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂(例如免疫抑制剂)。

术语“细胞毒性剂”用在本发明中指抑制或防止细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。

“化疗剂”包括在治疗癌症或免疫系统疾病中有用的化学化合物。

术语“小分子药物”是指低分子量的能够调节生物过程的有机化合物。“小分子”被定义为分子量小于 10kD、通常小于 2kD 和优选小于 1kD 的分子。小分子包括但不限于无机分子、有机分子、含无机组分的有机分子、含放射性原子的分子、合成分子、肽模拟物和抗体模拟物。作为治疗剂，小分子可以比大分子更能透过细胞、对降解更不易感和更易于引发免疫应答。

本文使用的术语“免疫调节剂”指抑制或调节免疫应答的天然或合成活性剂或者药物。免疫应答可以是体液应答或细胞应答。免疫调节剂包含免疫抑制剂。在一些实施方案中，本发明的免疫调节剂包括免疫检查点抑制剂或免疫检查点激动剂。

术语“有效量”指本发明的抗体或片段或组合物或组合的这样的量或剂量，其以单一或多次剂量施用患者后，在需要治疗或预防的患者中产生预期效果。

“治疗有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需治疗结果的量。治疗有效量也是这样的一个量，其中抗体或抗体片段或组合物或组合的任何有毒或有害作用不及治疗有益作用。相对于未治疗的对象，“治疗有效量”优选地抑制可度量参数或改善可度量参数至少约 40%、甚至更优选地至少约 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90% 甚至 100%。

“预防有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需预防结果的量。通常，由于预防性剂量在对象中在疾病较早阶段之前或在疾病较早阶段使用，故预防有效量将小于治疗有效量。

术语“肿瘤”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”、“癌性”和“肿瘤”在本文中提到时并不互相排斥。术语“肿瘤”涵盖实体瘤和液体肿瘤。

术语“抗肿瘤作用”或“抑瘤作用”或“肿瘤抑制作用”指可以通过多种手段展示的生物学效果，包括但不限于例如，肿瘤体积减少、肿瘤细胞数目减少、肿瘤细胞增殖减少或肿瘤细胞存活减少。

术语“药用辅料”指与活性物质一起施用的稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全和不完全的))、赋形剂、载体或稳定剂等。

术语“药物组合物”指这样的组合物，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，并且不包含对施用所述组合物的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

术语“药物组合或组合产品”是指非固定组合产品或固定组合产品，包括但不限于药盒、药物组合物。术语“非固定组合”意指活性成分(例如，(i)本发明的免疫缀合物、以及(ii)其他治疗剂)以分开的实体被同时、无特定时间限制或以相同或不同的时间间隔、依次地施用于患者，其中这类施用在患者体内提供预防或治疗有效水平的两种或更多种活性剂。术语“固定组合”意指两种或更多种活性剂以单个实体的形式被同时施用于患者。优选对两种或更多种活性剂的剂量和/或时间间隔进行选择，从而使各部分的联合使用能够在治疗疾病或病症时产生大于单独使用任何一种成分所能达到的效果。各成分可以各自呈单独的制剂形式，其制剂形式可以相同也可以不同。

术语“组合疗法”是指施用两种或更多种治疗剂或治疗方式(例如放射疗法或手术)以治疗本文所述疾病。这种施用包括以基本上同时的方式共同施用这些治疗剂，例如以具有固定比例的活性成分的单一胶囊。或者，这种施用包括对于各个活性成分在多种或在分开的容器(例如片剂、胶囊、粉末和液体)中的共同施用。粉末和/或液体可以在施用前重构或稀释至所需剂量。此外，这种施用还包括以大致相同的时间或在不同的时间以顺序的方式使用每种类型的治疗剂。在任一情况下，治疗方案将提供药物组合在治疗本文所述的病症或病状中的有益作用。

“受试者/患者/个体样品”指从患者或受试者得到的细胞或流体的集合。组织或细胞样品的来源可以是实体组织，像来自新鲜的、冷冻的和/或保存的器官或组织样品或活检样品或穿刺样品；血液或任何血液组分；体液，诸如泪液、玻璃体液、脑脊液、羊膜液(羊水)、腹膜液(腹水)、或间隙液；来自受试者的妊娠或发育任何时间的细胞。在一些实施方案中，组织样品是肿瘤组织。组织样品可能包含在自然界中天然不与组织混杂的化合物，诸如防腐剂、抗凝剂、缓冲剂、固定剂、营养物、抗生素、等等。

II. 人源化 CD3 抗体

本发明一方面提供一种人源化的 CD3 抗体，其具有更佳的与 CD3 的结合亲和力，从而更适用于构建双特异性抗体分子中的抗原结合区。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段以所需的亲和力结合 CD3(例如人 CD3 或猴 CD3 例如食蟹猴 CD3)。在一些实施方案中，本发明的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段能够既结合人 CD3，又结合猴 CD3 例如食蟹猴 CD3。在一些实施方案中，通过生物膜薄层干涉测定技术或表面等离子共振法测定抗体的亲和力。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD3 抗体，以下平衡解离常数(K_D)与人 CD3 或猴 CD3 例如食蟹猴 CD3 结合，所述 K_D 在大约 1nM-1000nM 之间。在一些实施方中，本发明的抗 CD3 抗体，以大约 10nM-100nM，或 20nM-100nM 或 50nM-100nM 之间的 K_D 与猴 CD3 例如食蟹

猴 CD3 结合。在一些实施方案中，本发明的抗 CD3 抗体大约 100-1000nM 之间（例如大约 200、300、400 或 500-1000nM 之间）的 K_D 与人 CD3 结合。

在一些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段与效应细胞表面的 CD3 结合。在一些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段能够激活效应细胞。在一些实施方案中，效应细胞为 T 细胞。在一些实施方案中，利用流式细胞术检测所述结合。在一些实施方案中，利用报告基因检测系统（例如 Jurkat/NFAT-luc 报告基因系统）检测 CD3 抗体的激活作用。

在一些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段能够激活效应细胞诱导对肿瘤细胞的杀伤。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR）和 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR）。

在一些方面中，本发明的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区（VH）。在一些方面中，本发明的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区（VL）。在一些方面中，本发明的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）。在一些实施方案中，所述重链可变区包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（CDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。在一些实施方案中，所述轻链可变区包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区（CDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段还包含抗体重链恒定区 HC。在一些实施方案中，本发明抗 CD3 抗体或其抗原结合片段还包含抗体轻链恒定区 LC。在一些实施方案中，本发明抗 CD3 抗体或其抗原结合片段还包含重链恒定区 HC 和轻链恒定区 LC。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD3 抗体重链可变区 VH

(i) 包含与 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD3 抗体轻链可变区 VL

(i) 包含与 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中，本发明抗 CD3 抗体的 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 选自

(i) 如 SEQ ID NO:3 中任一项所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，或

(ii) 相对于(i)中任一项的序列，在所述三个 HCDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的序列。

在一些实施方案中，本发明抗 CD3 抗体的 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 选自

(i) 如 SEQ ID NO:4 中任一项所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，或

(ii) 相对于(i)中任一项的序列，在所述三个 LCDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的序列。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD3 抗体中，

HCDR1 包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:9 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；和/或 LCDR3 包含 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段包含 VH 和 VL，其中

所述 VH 含有 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段包含如 SEQ ID NO:3 中所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和如 SEQ ID NO:4 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段包含：如 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO:6 示的 HCDR2、如 SEQ ID NO:7 示的 HCDR3；如 SEQ ID NO:8 示的 LCDR1、如 SEQ ID NO:9 示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:10 的 LCDR3。

在本发明的一个实施方案中，本文所述的氨基酸改变包括氨基酸的置换、插入或缺失。在优选的实施方案中，本发明所述的氨基酸改变发生在 CDR 外的区域（例如在 FR 中）。更优选地，本发明所述的氨基酸改变发生在重链可变区外和/或轻链可变区外的区域。优选的，本文所述的氨基酸改变为氨基酸置换，优选地保守置换。

在一些实施方案中，本发明的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段具有以下一个或多个特性：

(i) 显示与本发明抗体对 CD3 相同或相似的结合亲和力和/或特异性；

- (ii)抑制(例如, 竞争性抑制) 本发明抗体与 CD3 的结合;
- (iii)与本发明抗体结合相同或重叠的表位;
- (iv)与本发明抗体竞争结合 CD3;
- (v)具有本发明抗体的一个或多个生物学特性。

在一些实施方案中,本发明的抗 CD3 抗体是 IgG1 形式的抗体或 IgG2 形式的抗体或 IgG3 形式的抗体或 IgG4 形式的抗体, 例如, 为 IgG1 形式的抗体。在一些实施方案中, 本发明的抗 CD3 抗体的轻链恒定区为 kappa 或 lamda 轻链恒定区, 例如 lamda 轻链恒定区。

在一些实施方案中, 抗 CD3 抗体是单克隆抗体。

在一些实施方案中, 抗 CD3 抗体是人源化的。

在一个实施方案中, 本发明的抗 CD3 抗体还涵盖其抗体片段(例如抗原结合片段), 优选地选自以下的抗体片段: Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体(例如 scFv)、(Fab')₂、单结构域抗体例如 VHH、dAb(domain antibody)或线性抗体。

在一个实施方案中, 本发明的抗 CD3 抗体片段是 scFv, 包含本文所述的 VH 和 VL, 以及连接肽, 其中例如连接肽为(GGGGS)_n, 其中 n=1、2、3、4 或 5, 例如 n=3 或 4, 例如 SEQ ID NO:12 所示的接头。在一些实施方案中, scFv 包含 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列, 或包含与其具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由所述氨基酸序列组成。

在一个实施方案中, 本发明的抗 CD3 抗体是单链抗体, 其包含抗 CD3 抗体片段 scFv 和重链恒定区 Fc(任选地所述 Fc 区包含铰链区), 或由 scFv 和重链恒定区 Fc(任选地所述 Fc 区包含铰链区)组成。

在一些实施方案中, 本发明的抗 CD3 单链抗体包含 SEQ ID NO:13 所示的氨基酸序列, 或包含与其具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列, 或由所述氨基酸序列组成。

在一个方面, 本发明提供了靶向人 CD3 的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段, 其具有如下优点:

- 1) 高特异性结合人 CD3 以及表达人 CD3 的靶细胞;
- 2) 适合作为基因工程构件;
- 3) 低免疫原性。

在一个实施方案中, 所述抗 CD3 抗体或其抗原结合片段是人源化的。

在一个具体的实施方案中, 所述抗 CD3 抗体或其抗原结合片段包含:

- 1) 序列如 SEQ ID NO:3 所述的重链可变区(VH_{CD3})或与 SEQ ID NO:3 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的重链可变区; 和

2) 序列如 SEQ ID NO:4 所述的轻链可变区(VL_{CD3}) 或与 SEQ ID NO:4 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的轻链可变区。

在另一个具体的实施方案中，所述抗 CD3 抗体或其抗原结合片段包含：

1) 序列如 SEQ ID NO:1 所示的重链 (H)或与 SEQ ID NO:1 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的重链；和

2) 序列如 SEQ ID NO:2 所述的轻链 (L) 或与 SEQ ID NO:2 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的轻链。

在一个实施方案中，所述抗 CD3 抗体的抗原结合片段是 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂；线性抗体；单链抗体(例如 scFv)。在一个具体实施方案中，所述抗 CD3 抗体的抗原结合片段是 scFv，其包含如 SEQ ID NO:11 所示的序列或与 SEQ ID NO:11 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的序列。在另一个实施方案中，所述抗 CD3 抗体包含 scFv 和 Fc 区，其包含如 SEQ ID NO:13 所示的序列或与 SEQ ID NO:13 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的序列。

III. 抗 GPRC5D 抗体

本发明一方面提供一种 GPRC5D 抗体，其具有与 GPRC5D 的更高的结合亲和力，例如本发明的 GPRC5D 抗体更适用于构建双特异性抗体分子中的抗原结合区。

在一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段以更高的亲和力结合 GPRC5D（例如人 GPRC5D 或猴 GPRC5D 例如食蟹猴 GPRC5D），例如相比对照抗体如 GC5B596。在一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段能够既结合人 GPRC5D，又结合猴 GPRC5D 例如食蟹猴 GPRC5D。

在一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段与细胞表达的 GPRC5D 结合。在一些实施方案中，通过流式细胞术测定抗 GPRC5D 抗体与细胞表达的 GPRC5D 的亲和力。

在一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

在一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR）和 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR）。

在一些方面中，本发明的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区（VH）。在一些方面中，本发明的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区（VH）。在一些方面中，本发明的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区（VH）和轻链可变区（VL）。在一些实施方案中，所述重链可变区包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（CDR），

HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。在一些实施方案中，所述轻链可变区包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区（CDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段还包含抗体重链恒定区 HC。在一些实施方案中，本发明抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段还包含抗体轻链恒定区 LC。在一些实施方案中，本发明抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段还包含重链恒定区 HC 和轻链恒定区 LC。

在一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 抗体的重链可变区

(i) 包含与 SEQ ID NO: 62、72、82、16、23、25、27、29、38 或 40 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 62、72、82、16、23、25、27、29、38 或 40 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 62、72、82、16、23、25、27、29、38 或 40 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 抗体的轻链可变区

(i) 包含与 SEQ ID NO: 63、73、83、17、19 或 21 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 63、73、83、17、19 或 21 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 63、73、83、17、19 或 21 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 抗体 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 选自

(i) 如 SEQ ID NO: 62、72、82、16、23、25、27、29、38 或 40 中任一项所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，或

(ii) 相对于 (i) 中任一项的序列，在所述三个 HCDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变（优选氨基酸置换，优选保守置换）的序列，

例如所述 CDR 通过 Kabat 方案确定。

在一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 抗体 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 选自

(i) 如 SEQ ID NO: 63、73、83、17、19 或 21 中任一项所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 或

(ii) 相对于(i)中任一项的序列, 在所述三个 LCDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)的序列,

例如所述 CDR 通过 Kabat 方案确定。

在一些实施方案中, HCDR1 包含 SEQ ID NO:64、74 或 84 的氨基酸序列, 或由所述氨基酸序列组成, 或者 HCDR1 包含与 SEQ ID NO: 64、74 或 84 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)的氨基酸序列。

在一些实施方案中, HCDR2 包含 SEQ ID NO:65、75、85、39 或 41 的氨基酸序列, 或由所述氨基酸序列组成, 或者 HCDR2 包含与 SEQ ID NO: 65、75、85、39 或 41 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)的氨基酸序列。

在一些实施方案中, HCDR3 包含 SEQ ID NO:66、76 或 86 的氨基酸序列, 或由所述氨基酸序列组成, 或者 HCDR3 包含与 SEQ ID NO: 66、76 或 86 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)的氨基酸序列。

在一些实施方案中, LCDR1 包含 SEQ ID NO:67、77 或 87 的氨基酸序列, 或由所述氨基酸序列组成, 或者 LCDR1 包含与 SEQ ID NO: 67、77 或 87 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)的氨基酸序列。

在一些实施方案中, LCDR2 包含 SEQ ID NO:68 或 78 的氨基酸序列, 或由所述氨基酸序列组成, 或者 LCDR2 包含与 SEQ ID NO: 68、78 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)的氨基酸序列。

在一些实施方案中, LCDR3 包含 SEQ ID NO:69、79 或 88 的氨基酸序列, 或由所述氨基酸序列组成, 或者 LCDR3 包含与 SEQ ID NO:69、79 或 88 的氨基酸序列相比具有一个、两个或三个改变(优选氨基酸置换, 优选保守置换)的氨基酸序列。

在本发明的一些具体实施方案中, 本发明的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段包含 VH 和 VL, 其中

(i) 所述 VH 含有 SEQ ID NO:62 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:63 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 所述 VH 含有 SEQ ID NO:72 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:73 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(iii) 所述 VH 含有 SEQ ID NO:82 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的 VH, 和所述 VL 含有 SEQ ID NO:83 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(iv) 所述 VH 含有 SEQ ID NO: 16、23、25、27、29、38 或 40 所示的氨基酸序列或与其

具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO: 17、19 或 21 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段包含：

(i) 如 SEQ ID NO:64 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO:65、39 或 41 所示的 HCDR2、如 SEQ ID NO:66 所示的 HCDR3；如 SEQ ID NO:67 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO:68 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:69 所示的 LCDR3；

(ii) 如 SEQ ID NO:74 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO:75 所示的 HCDR2、如 SEQ ID NO:76 所示的 HCDR3；如 SEQ ID NO:77 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO:78 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:79 所示的 LCDR3；或

(iii) 如 SEQ ID NO:84 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO:85 所示的 HCDR2、如 SEQ ID NO:86 所示的 HCDR3；如 SEQ ID NO:87 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO:78 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:88 所示的 LCDR3。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段包含 VH 和 VL，其中 VH 和 VL 分别包含如下所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成：

- (i). SEQ ID NO:62 和 SEQ ID NO:63；
- (ii). SEQ ID NO:72 和 SEQ ID NO:73；
- (iii). SEQ ID NO:82 和 SEQ ID NO:83；
- (iv). SEQ ID NO:16、23、25、27、29、38 或 40 和 SEQ ID NO:21；
- (v). SEQ ID NO:16 或 25 和 SEQ ID NO:17；
- (vi). SEQ ID NO:16 或 27 和 SEQ ID NO:19。

在本发明的一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段包含重链。在本发明的一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段包含轻链。在本发明的一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链。

在一些具体的实施方案中，抗 GPRC5D 抗体的重链包含 SEQ ID NO:60、70、80、14、22、24、26 或 28 的氨基酸序列，或包含与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

在一些具体的实施方案中，抗 GPRC5D 抗体的轻链包含 SEQ ID NO:61、71、81、15、18 或 20 的氨基酸序列，或包含与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

在一些具体的实施方案中，抗 GPRC5D 抗体包含重链和轻链，其中所述重链包含如下 SEQ ID NO: 14、22、24、26 或 28 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成，且所述轻链包含 SEQ ID NO: 15、18 或 20 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

在一些具体的实施方案中，抗 GPRC5D 抗体包含重链和轻链，其中所述重链和轻链分别包含如下 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成：

- (i). SEQ ID NO:60 和 SEQ ID NO:61;
- (ii). SEQ ID NO:70 和 SEQ ID NO:71;
- (iii). SEQ IDNO:80 和 SE QI DNO:81;
- (iv). SEQ ID NO: 14 或 24 和 SEQ ID NO:15;
- (v). SEQ ID NO: 14 或 26 和 SEQ ID NO:18;
- (vi). SEQ ID NO: 14、22、24、26 或 28 和 SEQ ID NO:20。

在本发明的一个实施方案中，本文所述的抗 GPRC5D 抗体的氨基酸改变包括氨基酸的置换、插入或缺失。在优选的实施方案中，本发明所述的氨基酸改变发生在 CDR 外的区域（例如在 FR 中）。更优选地，本发明所述的氨基酸改变发生在重链可变区外和/或轻链可变区外的区域。优选的，本文所述的氨基酸改变为氨基酸置换，优选地保守置换。

在本发明的一个实施方案中，本发明所述的抗 GPRC5D 抗体的氨基酸改变为消除翻译后修饰的改变，例如存在于抗 GPRC5D 抗体的 CDR 中，例如抗 GPRC5D 抗体的 HCDR2，其包含 N55S 和/或 G56E 置换。

在一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段具有以下一个或多个特性：

- (i)显示与本发明抗体对 GPRC5D 相同或相似的结合亲和力和/或特异性；
- (ii)抑制(例如，竞争性抑制)本发明抗体与 GPRC5D 的结合；
- (iii)与本发明抗体结合相同或重叠的表位；
- (iv)与本发明抗体竞争结合 GPRC5D；
- (v)具有本发明抗体的一个或多个生物学特性。

在一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 抗体是 IgG1 形式的抗体或 IgG2 形式的抗体或 IgG3 形式的抗体或 IgG4 形式的抗体，例如，为 IgG1 形式的抗体。在一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 抗体的轻链恒定区为 lambda 或 kappa 轻链恒定区，例如 Kappa 轻链恒定区。

在一些实施方案中，抗 GPRC5D 抗体是单克隆抗体。

在一些实施方案中，抗 GPRC5D 抗体是人源化的。

在一些实施方案中，抗 GPRC5D 抗体是嵌合抗体。

在一个实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 抗体还涵盖其抗体片段（例如抗原结合片段），优选地选自以下的抗体片段：Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体(例如 scFv)、(Fab')₂、单结构域抗体例如 VHH、dAb(domain antibody)或线性抗体。

IV. MUC16 抗体

本发明提供了靶向人 MUC16 的抗 MUC16 抗体、其具有以下一种或者多种优点：

- (1) 高亲和力结合 MUC16 (例如人或猴 MUC16)、表达人 MUC16 的靶细胞;
- (2) 不结合循环中游离的 CA125;
- (3) 适合作为基因工程构件;
- (4) 低免疫原性;
- (5) 表达纯度高;
- (6) 人源化之后仍然具有高亲和力。

在一个实施方案中,所述抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段是人源化的。

在一些实施方案中,本发明的抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包含 3 个来自重链可变区的互补决定区 (HCDR), HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

在一些实施方案中,本发明的抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区 (LCDR), LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中,本发明的抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包含 3 个来自重链可变区的互补决定区 (HCDR) 和 3 个来自轻链可变区的互补决定区 (LCDR)。

在一些方面中,本发明的抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 (VH)。在一些方面中,本发明的抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区 (VL)。在一些方面中,本发明的抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 (VH) 和轻链可变区 (VL)。在一些实施方案中,所述重链可变区包含 3 个来自重链可变区的互补决定区 (CDR), HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。在一些实施方案中,所述轻链可变区包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区 (CDR), LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中,本发明的抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段还包含抗体重链恒定区 HC。在一些实施方案中,本发明抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段还包含抗体轻链恒定区 LC。在一些实施方案中,本发明抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段还包含重链恒定区 HC 和轻链恒定区 LC。

在一些实施方案中,本发明的抗 MUC16 抗体重链可变区 VH

(i) 包含与 SEQ ID NO:92 或 113 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO:92 或 113 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO:92 或 113 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个,更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换,更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成,优选地,所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中,本发明的抗 MUC16 抗体轻链可变区 VL

(i) 包含与 SEQ ID NO:96、100、102 或 114 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO:96、100、102 或 114 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO:96、100、102 或 114 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列由所述氨基酸序列组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中，本发明抗 MUC16 抗体的 3 个来自重链可变区的互补决定区(HCDR)，HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 选自

(i) 如 SEQ ID NO:92 或 113 中任一项所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，或

(ii) 相对于(i)中任一项的序列，在所述三个 HCDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的序列。

在一些实施方案中，本发明抗 MUC16 抗体的 3 个来自轻链可变区的互补决定区(LCDR)，LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 选自

(i) 如 SEQ ID NO:96、100、102 或 114 中任一项所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，或

(ii) 相对于(i)中任一项的序列，在所述三个 LCDR 区上共包含至少一个且不超过 5、4、3、2 或 1 个氨基酸改变(优选氨基酸置换，优选保守置换)的序列。

在一些实施方案中，本发明的抗 MUC16 抗体中，

HCDR1 包含 SEQ ID NO:93 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:94 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:95 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR1 包含 SEQ ID NO:97、101 或 103 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:98 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；和/或 LCDR3 包含 SEQ ID NO:99 的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明的抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包含 VH 和 VL，其中

所述 VH 含有 SEQ ID NO:92 或 113 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，和所述 VL 含有 SEQ ID NO:96、100、102 或 114 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明的抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包含如 SEQ ID NO:92 或 113 中所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，和如 SEQ ID NO:96、100、102 或 114 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在本发明的一些具体实施方案中，本发明的抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包含：如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO:94 示的 HCDR2、如 SEQ ID NO:95 示的 HCDR3；

如 SEQ ID NO:97、101 或 103 示的 LCDR1、如 SEQ ID NO:98 示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:99 的 LCDR3。

在本发明的一个实施方案中，本文所述的氨基酸改变包括氨基酸的置换、插入或缺失。在优选的实施方案中，本发明所述的氨基酸改变发生在 CDR 外的区域（例如在 FR 中）。更优选地，本发明所述的氨基酸改变发生在重链可变区外和/或轻链可变区外的区域。优选的，本文所述的氨基酸改变为氨基酸置换，优选地保守置换。

在一些实施方案中，本发明的抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段具有以下一个或多个特性：

- (i) 显示与本发明抗体对 MUC16 相同或相似的结合亲和力和/或特异性；
- (ii) 抑制（例如，竞争性抑制）本发明抗体与 MUC16 的结合；
- (iii) 与本发明抗体结合相同或重叠的表位；
- (iv) 与本发明抗体竞争结合 MUC16；
- (v) 具有本发明抗体的一个或多个生物学特性。

在一些实施方案中，本发明的抗 MUC16 抗体是 IgG1 形式的抗体或 IgG2 形式的抗体或 IgG3 形式的抗体或 IgG4 形式的抗体，例如，为 IgG1 形式的抗体。在一些实施方案中，本发明的抗 MUC16 抗体的轻链恒定区为 kappa 或 lamda 轻链恒定区，例如 lamda 轻链恒定区。

在一些实施方案中，抗 MUC16 抗体是单克隆抗体。

在一些实施方案中，抗 MUC16 抗体是人源化的。

在一个实施方案中，本发明的抗 MUC16 抗体还涵盖其抗体片段（例如抗原结合片段），优选地选自以下的抗体片段：Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体（例如 scFv）、(Fab')₂、单结构域抗体例如 VHH、dAb(domain antibody) 或线性抗体。

在一个具体的实施方案中，所述抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包含 VH 和 VL，其中：

1) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO:94 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:95 所示的 HCDR3，所述 VL 包含如 SEQ ID NO:97 所示的 LCDR1，如 SEQ ID NO:98 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:99 所示的 LCDR3；或

2) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO:94 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:95 所示的 HCDR3，所述 VL 包含如 SEQ ID NO:101 所示的 LCDR1，如 SEQ ID NO:98 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:99 所示的 LCDR3；或

3) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO:94 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:95 所示的 HCDR3，所述 VL 包含如 SEQ ID NO:103 所示的 LCDR1，如 SEQ ID NO:98 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:99 所示的 LCDR3；或

在一个具体的实施方案中，所述抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包含：

- 1) 序列如 SEQ ID NO:92 所述的 VH 或与 SEQ ID NO:92 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多序列同一性且具有相同 CDR 的 VH；和序列如 SEQ ID NO:96 所述的 VL 或与 SEQ ID NO:96 具有至少 90%、91%、

92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的 VL; 或

2) 序列如 SEQ ID NO:92 所述的 VH 或与 SEQ ID NO:92 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的 VH; 和序列如 SEQ ID NO:100 所述的 VL 或与 SEQ ID NO:100 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的 VL; 或

3) 序列如 SEQ ID NO:92 所述的 VH 或与 SEQ ID NO:92 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的 VH; 和序列如 SEQ ID NO:102 所述的 VL 或与 SEQ ID NO:102 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的 VL; 或

4) 序列如 SEQ ID NO:113 所述的 VH 或与 SEQ ID NO:113 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的 VH; 和序列如 SEQ ID NO:114 所述的 VL 或与 SEQ ID NO:114 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的 VL。

在另一个具体的实施方案中, 所述抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包含:

1) 序列如 SEQ ID NO:106 所示的重链 (H)或与 SEQ ID NO:106 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的重链, 和序列如 SEQ ID NO:107 所述的轻链 (L) 或与 SEQ ID NO:107 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的轻链; 或

2) 序列如 SEQ ID NO:106 所示的重链 (H)或与 SEQ ID NO:106 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的重链, 和序列如 SEQ ID NO:108 所述的轻链 (L) 或与 SEQ ID NO:108 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的轻链; 或

3) 序列如 SEQ ID NO: 106 所示的重链 (H)或与 SEQ ID NO: 106 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的重链, 和序列如 SEQ ID NO:109 所述的轻链 (L) 或与 SEQ ID NO:109 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的轻链; 或

4) 序列如 SEQ ID NO:115 所示的重链 (H)或与 SEQ ID NO:115 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的重链, 和序列如 SEQ ID NO:116 所述的轻链 (L) 或与 SEQ ID NO:116 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的轻链。

在一些实施方案中, 所述抗体包含氨基酸改变。在本发明的一个实施方案中, 本文所述的氨基酸改变包括氨基酸的置换、插入或缺失。在优选的实施方案中, 本发明所述的氨基酸

改变发生在 CDR 外的区域（例如在 FR 中）。更优选地，本发明所述的氨基酸改变发生在重链可变区外和/或轻链可变区外的区域。优选的，本文所述的氨基酸改变为氨基酸置换，优选地保守置换。

在某些实施方案中，本发明的抗体可以是经半胱氨酸工程改造的抗体，例如“硫代 mAb”，其中抗体的一或多个残基经半胱氨酸残基置换。

V. 双特异性抗体

在一些实施方案中，本发明的抗 CD3 抗体是双特异性抗体或多特异性抗体，其例如包含 CD3 的第一结合特异性和针对一种或多种的分子（例如肿瘤相关抗原，例如 GPRC5D 或 MUC16）的其他结合特异性。

在一些实施方案中，本发明的抗 GPRC5D 抗体是双特异性抗体或多特异性抗体，其例如包含针对 GPRC5D 的第一结合特异性和针对一种或多种的分子（例如 CD3）的其他结合特异性。

在一些实施方案中，本发明的抗 MUC16 抗体是双特异性抗体或多特异性抗体，其例如包含针对 MUC16 的第一结合特异性和针对一种或多种的分子（例如 CD3）的其他结合特异性。

因此，本发明的一个方面涉及一种双特异性抗体，其包含

第一抗原结合区和第二抗原结合区，其中第一抗原结合区特异性结合肿瘤相关抗原，和/或第二抗原结合区特异性结合 CD3。

本文所述的“肿瘤相关抗原”是指与肿瘤相关的抗原，例如在肿瘤中高表达的蛋白，例如 GPRC5D 或 MUC16。

因此，本发明的一个方面涉及一种双特异性抗体，其包含

第一抗原结合区和第二抗原结合区，其中第一抗原结合区特异性结合 GPRC5D 或 MUC16，和/或第二抗原结合区特异性结合 CD3。

在一些实施方案中，第一抗原结合区来自本文所述的抗 GPRC5D 抗体，例如是抗 GPRC5D 抗体的 Fab 片段。在一些实施方案中，第一抗原结合区来自本文所述的抗 MUC16 抗体，例如是抗 MUC16 抗体的 Fab 片段。

在一些实施方案中，第二抗原结合区来自抗 CD3 抗体，例如 SP34 抗体或其人源化抗体，例如本文所述的抗 CD3 人源化抗体，例如是抗 CD3 抗体的 scFv 片段。

适用于本发明的双特异性抗体的第一抗原结合区可以包含本发明的抗 GPRC5D 或 MUC16 全长抗体或其抗原结合片段，或由其组成，只要其能够特异性结合 GPRC5D 或 MUC16 即可，包括但不限于，例如特异性结合 GPRC5D 的全长抗体、单链 Fv、Fab、Fab'、(Fab)₂、单域抗体、VHH 或重链抗体等。

适用于本发明的双特异性抗体的第二抗原结合区可以包含抗 CD3 全长抗体或其抗原结合片段，或由其组成，只要其能够特异性结合 CD3 即可，包括但不限于，例如特异性结合 CD3 的全长抗体、单链 Fv、Fab、Fab'、(Fab)₂、单域抗体、VHH 或重链抗体等。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体是 IgG 样双特异性抗体。本文所述的“IgG 样双特异性抗体”是指包含 Fc 二聚体的双特异性抗体。因此，在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体包含 Fc 二聚体。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体是 IgG 样双特异性抗体，其包含 Fab 片段作为一个抗原结合区和 scFv 片段作为另一个抗原结合区。在一些实施方案中，所述 IgG 样双特异性抗体包含特异性结合 GPRC5D 或 MUC16 的 Fab 片段作为第一抗原结合区，且包含特异性结合 CD3 的 scFv 作为第二抗原结合区。

➤ 本发明的双特异性抗体结构

在一些实施方案中，本发明提供了一种双特异性抗体，其包含一个或两个特异性结合第一抗原的 Fab 片段、一个特异性结合第二抗原的 scFv 和 Fc 异二聚体，其中

- (1) 特异性结合第一抗原的 Fab 片段在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合特异性结合第二抗原的 scFv 片段的 N 末端(例如 VH 或 VL 的 N 末端)，且所述 scFv 片段的 C 末端(例如 VL 或 VH 的 C 末端)融合至 Fc 异二聚体的 Fc 区之一(例如包含结的 Fc 区或包含扣的 Fc 区)的 CH2 或铰链区，例如如图 4A 所示的结构；
- (2) 特异性结合第一抗原的第一 Fab 片段在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的 Fc 区之一(例如包含扣的 Fc 区或包含结的 Fc 区)的 CH2 或铰链区；特异性结合第一抗原的第二 Fab 片段在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合特异性结合第二抗原的 scFv 片段的 N 末端(例如 VH 或 VL 的 N 末端)，且所述 scFv 片段的 C 末端(例如 VL 或 VH 的 C 末端)融合至 Fc 异二聚体的另一 Fc 区(例如包含结的 Fc 区或包含扣的 Fc 区)的 CH2 或铰链区；例如如图 4B 或图 20A 所示的结构；
- (3) 特异性结合第一抗原的 Fab 片段在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的 Fc 区之一(例如包含扣的 Fc 区或包含结的 Fc 区)的 CH2 或铰链区；特异性结合第二抗原的 scFv 片段的 C 末端(例如 VL 或 VH 的 C 末端)融合至 Fc 异二聚体的另一 Fc 区(例如包含结的 Fc 区或包含扣的 Fc 区)的 CH2 或铰链区；例如如图 4C 或图 20B 所示的结构；或
- (4) 特异性结合第一抗原的第一 Fab 片段在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至特异性结合第一抗原的第二 Fab 片段的 VH 的 N 末端，且所述第二 Fab 片段在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的 Fc 区之一(例如包含结的 Fc 区或包含扣的 Fc 区)的 CH2 或铰链区；特异性结合第二抗原的 scFv 片段的 C 末端(例如 VL 或 VH 的 C 末端)融合至 Fc 异二聚体的另一 Fc 区(例如包含扣的 Fc 区或包含结的 Fc 区)的 CH2 或铰链区；例如如图 20C 所示的结构。

在一些实施方案中，融合包括直接融合或通过接头融合。

因此，在一些实施方案中，本发明涉及一种双特异性抗体，其为 IgG 样双特异性抗体，其包含一个特异性结合第一抗原的 Fab 片段、一个特异性结合第二抗原的 scFv 和 Fc 异二聚体，其中

所述 Fab 片段包含 VH-CH1 和 VL-CL，所述 scFv 包含 VH-接头-VL 或 VL-接头-VH，第一 Fc 区构成第一重链；

所述 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合所述 scFv 片段的 N 末端，且所述 scFv 片段的 C 末

端融合至第二 Fc 区的 CH2 或铰链区, 构成第二重链;

且

所述 Fab 片段的 VL-CL 构成轻链。

在另一些实施方案中, 本发明涉及一种双特异性抗体, 其为 IgG 样双特异性抗体, 其包含两个特异性结合第一抗原的 Fab 片段、一个特异性结合第二抗原的 scFv 和 Fc 异二聚体, 其中

所述 Fab 片段包含 VH-CH1 和 VL-CL, 所述 scFv 包含 VH-接头-VL 或 VL-接头-VH,

第一 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合至包含第一 Fc 区的 CH2 或铰链区构成第一重链;

第二 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合所述 scFv 片段的 VH 的 N 末端, 且所述 scFv 片段的 C 末端融合至第二 Fc 区的 CH2 或铰链区, 构成第二重链;

且

所述第一和第二 Fab 片段的 VL-CL 分别构成两条轻链;

其中所述第一 Fab 和第二 Fab 片段相同或不同。

在另一些实施方案中, 本发明涉及一种双特异性抗体, 其为 IgG 样双特异性抗体, 其包含一个特异性结合第一抗原的 Fab 片段、一个特异性结合第二抗原的 scFv 和 Fc 异二聚体, 其中

所述 Fab 片段包含 VH-CH1 和 VL-CL, 所述 scFv 包含 VH-接头-VL 或 VL-接头-VH,

所述 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合至第一 Fc 区的 CH2 或铰链区构成第一重链;

所述 scFv 片段的 C 末端融合至包含第二 Fc 区的 CH2 或铰链区, 构成第二重链;

且

所述 Fab 片段的 VL-CL 构成轻链。

在另一些实施方案中, 本发明涉及一种双特异性抗体, 其为 IgG 样双特异性抗体, 其包含两个特异性结合第一抗原的 Fab 片段、一个特异性结合第二抗原的 scFv 和 Fc 异二聚体, 其中

所述 Fab 片段包含 VH-CH1 和 VL-CL, 所述 scFv 包含 VH-接头-VL 或 VL-接头-VH,

第一 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合至第二 Fab 片段的 VH 的 N 末端, 且第二 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合至第一 Fc 区的 CH2 或铰链区构成第一重链;

所述 scFv 片段的 C 末端融合至第二 Fc 区的 CH2 或铰链区, 构成第二重链; 且

所述第一和第二 Fab 片段的 VL-CL 分别构成两条轻链;

其中所述第一 Fab 和第二 Fab 片段相同或不同。

在一些实施方案中, 第一抗原选自 GPRC5D 或 MUC16 (例如人 GPRC5D 或人 MUC16)。在一些实施方案中, 第二抗原为 CD3。

在一些实施方案中, 第一 Fc 区包含结突变, 且第二 Fc 区包含扣突变。在一些实施方案

中，第一 Fc 区包含扣突变，且第二 Fc 区包含结突变。

在一些实施方案中，所述 scFv 片段的 C 末端为 ScFv 片段的 VL 的 C 末端。在一些实施方案中，所述 scFv 片段的 N 末端为 ScFv 片段的 VH 的 N 末端。

➤ 适用于本发明的双特异性抗体的 Fab 片段

在一些实施方案中，作为双特异性抗体抗原结合区之一的 Fab 片段由包含抗体 VH、CH1、VL 和 CL 结构域的两条多肽链组成，其中所述 VH 与 VL 配对且所述 CH1 与 CL 配对以形成抗原结合区。在一些实施方案中，在 Fab 中，一条链从 N 端到 C 端包含 VH 和 CH1（即，VH-CH1），另一条链从 N 端到 C 端包含 VL 和 CL（即，VL-CL）。

在一些实施方案中，在所述双特异性抗体中，Fab 可以通过包含 VH 的链的 C 端融合在抗体的 Fc 结构域的 N 端或通过另一抗原结合区例如 scFv 片段融合在抗体的 Fc 结构域的 N 端，其中 Fc 结构域可以包含或不包含铰链区（例如 EPKSS 或 EPKSC）。优选地，所述 Fab 包含 VH-CH1 链和 VL-CL 链，并通过 VH-CH1 链的 CH1 的 C 末端与抗体 Fc 结构域融合，其中 Fc 结构域可以包含或不包含铰链区（例如 EPKSS 或 EPKSC）。在本文中，与 Fc 二聚体连接的 Fab 链也称作 Fab 重链，而未与 Fc 二聚体连接的 Fab 链也称作 Fab 轻链。在一些实施方案中，所述融合是直接融合，或通过接头融合。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中包含的 Fab 片段特异性结合 GPRC5D。在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中包含的 Fab 片段来自本发明的抗 GPRC5D 抗体，其包含本发明的抗 GPRC5D 抗体的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL。

在一些实施方案中，所述 Fab 重链包含 VH 和 CH1，其中 VH 为本发明的抗 GPRC5D 抗体的 VH。在一些实施方案中，所述 CH1 是来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 CH1，优选地来自 IgG1 的 CH1。在一些实施方案中，所述 CH1

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:44 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:44 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 44 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，所述 Fab 轻链包含 VL-CL，其中 VL 为本发明的抗 GPRC5D 抗体的 VL。在一些实施方案中，所述 CL 是来自抗体 kappa 或 lamda 轻链的轻链恒定区，优选地来自 Kappa 轻链的轻链恒定区。在一些实施方案中，所述 CL 为本发明的抗 GPRC5D 抗体的轻链恒定区。在一些实施方案中，所述 Fab 轻链为本发明的抗 GPRC5D 抗体的轻链。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中包含的 Fab 片段特异性结合 MUC16。在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中包含的 Fab 片段来自本发明的抗 MUC16 抗体，其包含本发明的抗 MUC16 抗体的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL。

在一些实施方案中，所述 Fab 重链包含 VH 和 CH1，其中 VH 为本发明的抗 MUC16 抗体的 VH。在一些实施方案中，所述 CH1 是来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 CH1，优选地来自 IgG1 的 CH1。在一些实施方案中，所述 CH1

(i) 包含与选自 SEQ ID NO:44 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、

95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 包含选自 SEQ ID NO:44 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者

(iii) 包含与选自 SEQ ID NO: 44 的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，所述 Fab 轻链包含 VL-CL，其中 VL 为本发明的抗 MUC16 抗体的 VL。在一些实施方案中，所述 CL 是来自抗体 kappa 或 lamda 轻链的轻链恒定区，优选地来自 Kappa 轻链的轻链恒定区。在一些实施方案中，所述 CL 为本发明的抗 MUC16 抗体的轻链恒定区。在一些实施方案中，所述 Fab 轻链为本发明的抗 MUC16 抗体的轻链。

➤ 适用于本发明的双特异性抗体的 scFv

在一些实施方案中，作为双特异性抗体结合区之一的 scFv 片段由包含抗体 VH 和 VL 结构域的一条多肽链组成，其中所述 VH 和 VL 连接（例如通过接头）以配对形成抗原结合位点。在一些实施方案中，所述 scFv 为反式构型，从 N 端到 C 端包含：VH、接头、和 VL（VH-接头-VL）。在另一些实施方案中，所述 scFv 为顺式构型，从 N 端到 C 端包含：VL、接头、和 VH（VL-接头-VH）。在一些实施方案中，接头为由氨基酸残基组成的肽接头。适宜的肽接头是本领域技术人员已知的。在一个实施方案中，接头为 5-50 个氨基酸长度，例如 5-30 个氨基酸长，例如 15 个氨基酸或 20 个氨基酸长度。在一个实施方案中，接头包含氨基酸序列 (G4S)_n，其中 n=1,2,3,4 或 5，优选地，n=3 或 4，更优选地，n=3。

在一些优选的实施方案中，包含在本发明抗体分子中的 scFv 抗原结合位点为二硫键稳定的 scFv。

在一些实施方案中，在所述双特异性抗体中，scFv 可以通过链 C 端融合在抗体的 Fc 结构域的 N 端。在一些实施方案中，在所述双特异性抗体中，scFv 在链的 N 端融合在另一抗原结合区（例如 Fab 重链）的 C 端，且在链的 C 端融合在抗体 Fc 结构域的 N 端。

在一些实施方案中，在所述双特异性抗体中，scFv 可以通过包含 VL 的链 C 端融合在抗体的 Fc 结构域的 N 端。在一些实施方案中，在所述双特异性抗体中，scFv 在 VH 链的 N 端融合在另一抗原结合区（例如 Fab 重链）的 C 端，且在 VL 链的 C 端融合在抗体 Fc 结构域的 N 端。

在一些实施方案中，在所述双特异性抗体中，scFv 可以通过包含 VH 的链 C 端融合在抗体的 Fc 结构域的 N 端。在一些实施方案中，在所述双特异性抗体中，scFv 在 VL 链的 N 端融合在另一抗原结合区（例如 Fab 重链）的 C 端，且在 VH 链的 C 端融合在抗体 Fc 结构域的 N 端。

在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中包含的 scFv 特异性结合 CD3。在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体中包含的 scFv 来自本发明的抗 CD3 抗体，其包含本发明的抗 CD3 抗体的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL。

➤ 适用于本发明双特异性抗体的 Fc 二聚体

在一个实施方案中，本发明双特异性抗体中的两个 Fc 区二聚化形成二聚 Fc。优选地，两个 Fc 区异二聚化形成异二聚 Fc。

在一些实施方案中，第一和第二 Fc 区相同。在另一些实施方案中，第一 Fc 区和第二 Fc 区不同，两者配对并异二聚化。

适用于本发明抗体分子的 Fc 区片段可以是任何抗体 Fc 区。Fc 区可以包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。天然序列 Fc 结构域涵盖天然存在的各种免疫球蛋白 Fc 序列，例如各种 Ig 亚型以及其同种异型的 Fc 区 (Gestur Vidarsson 等, IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, 20 October 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.)。例如，本发明抗体的 Fc 区可以包含两个或三个恒定结构域，即 CH2 结构域、CH3 结构域和可选的 CH4 结构域。在一些实施方案中，抗体 Fc 区还可以在 N 端带有 IgG 铰链区或部分 IgG 铰链区，例如，IgG1 铰链区或部分 IgG1 铰链区。在所述铰链区中可以含有突变。在一些实施方案中，铰链区可以是 EPKSS 或 EPKSC。

优选地，本发明抗体的 Fc 区从 N 端到 C 端包含:CH2-CH3，或从 N 端到 C 端包含: 铰链区-CH2-CH3。在一些实施方案中，适用于本发明抗体或双特异性抗体的 Fc 区为人的 IgG Fc，例如，人 IgG1 Fc，人 IgG2 Fc，人 IgG3 或人 IgG4 Fc。在一个实施方案中，Fc 区包含氨基酸序列 SEQ ID NO:49 或与其具有至少 90% 同一性，例如 95%，96%，97%，99% 或更高的同一性的氨基酸序列或由其组成。

可以将本发明的抗体或双特异性抗体中的 Fc 区进行突变以获得所需的特性。本领域已知对 Fc 区的突变。

在一个实施方案中，在 Fc 区的效应子功能（例如 Fc 区的补体激活功能）的特性上修饰 Fc 区。在一个实施方案中，所述效应子功能相对于野生同种型 Fc 区已经被降低或消除。在一个实施方案中，通过选自以下的方法来降低或消除效应子功能：使用天然具有降低或消除的效应子功能的 Fc 同种型、和 Fc 区修饰。

在一个优选的实施方案中，Fc 区具有减少的由 Fc 区介导的效应子功能，例如减少的或消除的 ADCC 或 ADCP 或 CDC 效应子功能，例如包含实现上述功能的突变。

如本领域技术人员理解的，根据本发明抗体分子的预期用途，本发明抗体分子也可以在 Fc 结构域中包含改变对一种或多种 Fc 受体的结合亲和力的修饰。在一个实施方案中，所述 Fc 受体是 Fcγ 受体，特别地是人 Fcγ 受体。在一些实施方案中，所述 Fc 区包含降低与 Fcγ 受体结合的突变。例如，在一些实施方案中，用于本发明的 Fc 区具有降低与 Fcγ 受体结合的 L234A/L235A 突变、D265A 突变或 P329A 突变中的一个或多个。在一些实施方案中，用于本发明的 Fc 区具有降低与 Fcγ 受体结合的 L234A/L235A 突变、D265A 突变和 P329A 突变。在再一优选的实施方案中，Fc 片段可以具有导致增加的血清半衰期的突变，例如改善 Fc 片段与 FcRn 结合的突变。在一些实施方案中，包含降低与 Fcγ 受体结合的突变的 Fc 区包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 46 或与其具有至少 90% 同一性，例如 95%，96%，97%，99% 或更高的同一性的氨基酸序列或由其组成。在一些实施方案中，所述 Fc 区包含与 SEQ ID NO:46 具有至少 90% 同一性，例如 95%，96%，97%，99% 或更高的同一性的氨基酸序列且包含 L234A/L235A 突变、D265A 突变和 P329A 突变。

如本领域技术人员理解的，为了促进本发明的双特异性抗体作为异二聚体的形成，本发明双特异性抗体所包含的 Fc 区可以包含利于异二聚化的突变。在一个实施方案中，在两个 Fc 区的 CH3 区中引入突变。

本领域已知促进 Fc 区异二聚化的方法。例如，第一 Fc 区的 CH3 区和第二 Fc 区的 CH3 区以互补方式进行工程化改造使得每个 CH3 区(或包含它的重链)不再能与其自身同二聚化但被迫与互补工程化改造的其它 CH3 区异二聚化(使得第一和第二 CH3 区异二聚化且两个第一 CH3 区或两个第二 CH3 区之间不形成同二聚体)。

优选地，基于结入扣(Knob-in-Hole)技术，在第一单体 Fc 区和第二单体 Fc 区中分别引入相应的结(knob)突变和扣(Hole)突变。此技术参见例如 Merchant, A. M., et al. (1998). "An efficient route to human bispecific IgG." Nat Biotechnol 16(7): 677-681。

在一个特定的实施方案中,在一个 Fc 区的 CH3 区中,第 366 位的苏氨酸残基用色氨酸残基替换(T366W) (结突变);而在另一个 Fc 区的 CH3 区中,第 407 位的酪氨酸残基用缬氨酸残基替换(Y407V) (扣突变),任选地 366 位的苏氨酸残基用丝氨酸残基替换(T366S)且第 368 位的亮氨酸残基用丙氨酸残基替换(L368A) (编号方式依照 EU 索引)。

在又一个实施方案中,在一个 Fc 区的 CH3 区中,结突变包括或由下述组成:第 366 位的苏氨酸残基用色氨酸残基替换(T366W)且第 354 位的丝氨酸残基用半胱氨酸残基替换(S354C)或第 356 位的谷氨酸残基用半胱氨酸残基替换(E356C) (特别是,第 354 位的丝氨酸残基用半胱氨酸残基替换);而在另一个 Fc 区的 CH3 区中,扣突变包括或由下述组成:第 407 位的酪氨酸残基用缬氨酸残基替换(Y407V),任选地 366 位的苏氨酸残基用丝氨酸残基替换(T366S)且第 368 位的亮氨酸残基用丙氨酸残基替换(L368A) (编号方式依照 EU 索引),任选地第 349 位的酪氨酸残基用半胱氨酸残基替换(Y349C) (编号方式依照 EU 索引)。

在一个具体的实施方案中,一个 Fc 区包含氨基酸替代 S354C 和 T366W (结突变),且另一个 Fc 区包含氨基酸替代 Y349C, T366S, L368A 和 Y407V (扣突变) (编号方式依照 EU 索引)。

因此,在一个具体的实施方案中,本发明的双特异性抗体包含的两个 Fc 区异二聚化,其中

- a) 一个 Fc-区多肽包含突变 T366W, 而另一个 Fc-区多肽包含突变 T366S、L368A 和 Y407V, 或
- b) 一个 Fc-区多肽包含突变 T366W 和 Y349C, 而另一个 Fc-区多肽包含突变 T366S、L368A、Y407V 和 S354C, 或
- c) 一个 Fc-区多肽包含突变 T366W 和 S354C, 而另一个 Fc-区多肽包含突变 T366S、L368A、Y407V 和 Y349C;

任选地,所述 Fc 区还包含降低与 Fcγ受体结合的突变,例如, L234A/L235A 突变、D265A 突变或 P329A 突变中的一个或多个;例如 L234A/L235A 突变、D265A 突变和 P329A 突变。

在一些实施方案中,Fc 区还包含其他利于异二聚体纯化的突变。例如,可以将 H435R 突变 (Eric J. Smith, Scientific Reports | 5:17943 | DOI: 10.1038/srep17943) 引入异二聚体的 Fc 区之一中 (例如,带 Hole 突变的 Fc 区),以利于使用蛋白 A 纯化异二聚体。在另一些实施方案中,对于包含铰链区的异二聚体单体,也可以在铰链区中引入突变,例如 C220S,以利于异二聚体的形成。

在一个具体的实施方案中,本发明的双特异性抗体的两个 Fc 区异二聚化,其中

第一 Fc 区包含结突变, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 43 或 89 或与其具有至少 90% 同一性, 例如 95%, 96%, 97%, 99% 或更高的同一性的氨基酸序列或由其组成; 在一些实施方案中, 所述 Fc 区包含与 SEQ ID NO: 43 或 89 具有至少 90% 同一性, 例如 95%, 96%, 97%, 99% 或更高的同一性的氨基酸序列且包含 L234A/L235A 突变、D265A 突变和 P329A 突变和结突变 (例如 S354C 和 T366W); 在一些实施方案中, 所述 Fc 区包含或不包含铰链区 EPKSS 或 EPKSC;

第二 Fc 区包含扣突变, 其包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 30、42 或 59 与其具有至少 90% 同一性, 例如 95%, 96%, 97%, 99% 或更高的同一性的氨基酸序列或由其组成。在一些实施方案中, 所述 Fc 区包含与 SEQ ID NO: 30、42 或 59 具有至少 90% 同一性, 例如 95%, 96%, 97%, 99% 或更高的同一性的氨基酸序列且包含 L234A/L235A 突变、D265A 突变和 P329A 突变和结突变; 在一些实施方案中, 所述 Fc 区包含或不包含铰链区 EPKSS 或 EPKSC。

➤ 示例性的双特异性抗体分子

(I) 特异性结合 GPRC5D 和 CD3 的双特异性抗体

在一些优选的实施方案中, 本发明提供了一种双特异性抗体, 其包含一个或两个抗 GPRC5D 抗体的 Fab 片段、一个抗 CD3 抗体的 scFv 和 Fc 异二聚体, 其中

- (1) 抗 GPRC5D 的 Fab 片段在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合抗 CD3 抗体 scFv 片段的 VH 的 N 末端, 且所述 scFv 片段的 VL 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的 Fc 区之一 (例如包含结的 Fc 区) 的 CH2 或铰链区, 例如如图 4A 所示的结构;
- (2) 第一 GPRC5D 的 Fab 片段在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的 Fc 区之一 (例如包含扣的 Fc 区) 的 CH2 或铰链区; 第二抗 GPRC5D 的 Fab 片段在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合抗 CD3 抗体 scFv 片段的 VH 的 N 末端, 且所述 scFv 片段的 VL 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的另一 Fc 区 (例如包含结的 Fc 区) 的 CH2 或铰链区; 例如如图 4B 所示的结构;
- (3) GPRC5D 的 Fab 片段在 Fab 重链的 CH1 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的 Fc 区之一 (例如包含扣的 Fc 区) 的 CH2 或铰链区; 抗 CD3 抗体的 scFv 片段的 VL 的 C 末端融合至 Fc 异二聚体的另一 Fc 区 (例如包含结的 Fc 区) 的 CH2 或铰链区; 例如如图 4C 所示的结构。

在一些实施方案中, 融合包括直接融合或通过接头融合。

因此, 在一些实施方案中, 本发明涉及一种双特异性抗体, 其为 IgG 样双特异性抗体, 其包含一个抗 GPRC5D 抗体的 Fab 片段、一个抗 CD3 抗体的 scFv 和 Fc 异二聚体, 其中

所述 Fab 片段包含 VH-CH1 和 VL-CL, 所述 scFv 包含 VH-接头-VL,

包含扣突变的 Fc 区构成第一重链;

所述 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合所述 scFv 片段的 VH 的 N 末端, 且所述 scFv 片段的 VL 的 C 末端融合至包含结突变的 Fc 区的 CH2 或铰链区, 构成第二重链;

且

所述 Fab 片段的 VL-CL 构成轻链。

在一些实施方案中, 第一重链包含 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列, 或与所述氨基酸

序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；

第二中重链包含 SEQ ID NO: 31、34 或 35 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；和/或

轻链包含 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成。

在另一些实施方案中，本发明涉及一种双特异性抗体，其为 IgG 样双特异性抗体，其包含两个抗 GPRC5D 抗体的 Fab 片段、一个抗 CD3 抗体的 scFv 和 Fc 异二聚体，其中

所述 Fab 片段包含 VH-CH1 和 VL-CL，所述 scFv 包含 VH-接头-VL，

第一 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合至包含扣突变的 Fc 区的 CH2 或铰链区构成第一重链；

第二 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合所述 scFv 片段的 VH 的 N 末端，且所述 scFv 片段的 VL 的 C 末端融合至包含结突变的 Fc 区的 CH2 或铰链区，构成第二重链；

且

所述第一和第二 Fab 片段的 VL-CL 分别构成两条轻链；

其中所述第一 Fab 和第二 Fab 片段相同或不同。

在一些实施方案中，第一重链包含 SEQ ID NO: 32、33 或 36 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；

第二中重链包含包含 SEQ ID NO:31、34 或 35 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；和/或

轻链包含 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成。

在一些实施方案中，第一重链包含 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；

第二中重链包含包含 SEQ ID NO:31 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；和/或

轻链包含 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成。

在一些实施方案中，第一重链包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；

第二中重链包含 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；和/或

轻链包含 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成。

在一些实施方案中，第一重链包含 SEQ ID NO: 36 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；

第二中重链包含包含 SEQ ID NO:35 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；和/或

轻链包含 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成。

在另一些实施方案中，本发明涉及一种双特异性抗体，其为 IgG 样双特异性抗体，其包含一个抗 GPRC5D 抗体的 Fab 片段、一个抗 CD3 抗体的 scFv 和 Fc 异二聚体，其中

所述 Fab 片段包含 VH-CH1 和 VL-CL，所述 scFv 包含 VH-接头-VL，

所述 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合至包含扣突变的 Fc 区的 CH2 或铰链区构成第一重链；

所述 scFv 片段的 VL 的 C 末端融合至包含结突变的 Fc 区的 CH2 或铰链区，构成第二重链；

且

所述 Fab 片段的 VL-CL 构成轻链。

在一些实施方案中，第一重链包含 SEQ ID NO: 32、33 或 36 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；

第二中重链包含包含 SEQ ID NO:37 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；和/或

轻链包含 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成。

(II) 特异性结合 CD3 和 MUC16 的双特异性抗体

本发明提供了一种同时靶向人 CD3 和人 MUC16 的双特异性抗体(抗 CD3× MUC16 双特异性抗体), 其具有以下优点:

(1) 高特异性结合人 CD3、表达人 CD3 的靶细胞和同时高亲和力结合人 MUC16、表达人 MUC16 的靶细胞;

(2) 不结合循环中游离的 CA125, 同时将更多的 T 细胞靶向表达 MUC16 的癌细胞;

(3) 激活 T 细胞, 并引发对表达 MUC16 的癌细胞的细胞毒活性, 从而有效杀伤癌细胞;

(4) 低免疫原性;

(5) 优异的抑瘤效果。

在一个实施方案中, 本发明提供了一种抗 CD3× MUC16 双特异性抗体, 其包含:

(i) 1 条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 VH-CH1-scFv-Fc 的重链 2, 和 2 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中 2 条轻链分别与重链 1 和 2 的 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的 2 个抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点; 或

(ii) 1 条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 scFv-Fc 的重链 2, 和 1 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中轻链与重链 1 的 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点; 或

(iii) 1 条结构为 VH-CH1-VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 scFv-Fc 的重链 2, 和 2 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中 2 条轻链分别与重链 1 中的 2 个 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的 2 个抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点。

在一个实施方案中, 本发明提供了一种抗 CD3× MUC16 双特异性抗体, 其包含:

(i) 1 条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 VH-CH1-scFv-Fc 的重链 2, 和 2 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中 2 条轻链分别与重链 1 和 2 的 VH-CH1 结构配对形成 2 个识别 MUC16 分子的抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:94 所示的 HCDR2 如 SEQ ID NO:95 所示的 HCDR3, 识别 MUC16 分子的 VL 包含如 SEQ ID NO:97 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:98 所示的 LCDR2 如 SEQ ID NO:99 所示的 LCDR3; 识别 CD3 分子的 scFv 包含识别 CD3 的 VH (为了与识别 MUC16 的 VH 相区别, 在本文称为 VH_{CD3}) 和识别 CD3 的 VL (为了与识别 MUC16 的 VL 相区别, 在本文称为 VL_{CD3}), 其中所述 VH_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:6 所示的 HCDR2 如 SEQ ID NO:7 所示的 HCDR3 并且 VL_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:8 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:9 所示的 LCDR2 如 SEQ ID NO:10 所示的 LCDR3; 或

1 条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 VH-CH1-scFv-Fc 的重链 2, 和 2 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中 2 条轻链分别与重链 1 和 2 的 VH-CH1 结构配对形成 2 个识别 MUC16 分子的抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的

VH 包含如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:94 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:95 所示的 HCDR3, 识别 MUC16 分子的 VL 包含如 SEQ ID NO:101 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:98 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:99 所示的 LCDR3; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3}, 其中所述 VH_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:6 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:7 所示的 HCDR3 并且 VL_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:8 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:9 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:10 所示的 LCDR3; 或

1 条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 VH-CH1-scFv-Fc 的重链 2, 和 2 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中 2 条轻链分别与重链 1 和 2 的 VH-CH1 结构配对形成 2 个识别 MUC16 分子的抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:94 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:95 所示的 HCDR3, 识别 MUC16 分子的 VL 包含如 SEQ ID NO:103 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:98 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:99 所示的 LCDR3; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3}, 其中所述 VH_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:6 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:7 所示的 HCDR3 并且 VL_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:8 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:9 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:10 所示的 LCDR3;

或者

(ii) 1 条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 scFv-Fc 的重链 2, 和 1 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中轻链与重链 1 的 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:94 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:95 所示的 HCDR3, 识别 MUC16 分子的 VL 包含如 SEQ ID NO:97 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:98 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:99 所示的 LCDR3; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3}, 其中所述 VH_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:6 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:7 所示的 HCDR3 并且 VL_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:8 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:9 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:10 所示的 LCDR3; 或

1 条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 scFv-Fc 的重链 2, 和 1 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中轻链与重链 1 的 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:94 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:95 所示的 HCDR3, 识别 MUC16 分子的 VL 包含如 SEQ ID NO:101 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:98 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:99 所示的 LCDR3; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3}, 其中所述 VH_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:6 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:7 所示的 HCDR3 并且 VL_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:8 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:9 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:10 所示的 LCDR3; 或

1 条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 scFv-Fc 的重链 2, 和 1 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中轻链与重链 1 的 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:94 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:95 所示的 HCDR3, 识别 MUC16 分子的 VL 包含如 SEQ ID NO:103 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:98 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:99 所示的 LCDR3; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3}, 其中所述 VH_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:6 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:7 所示的 HCDR3 并且 VL_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:8 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:9 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:10 所示的 LCDR3;

或者

(iii) 1 条结构为 VH-CH1-VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 scFv-Fc 的重链 2, 和 2 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中 2 条轻链分别与重链 1 中的 2 个 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的 2 个抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:94 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:95 所示的 HCDR3, 识别 MUC16 分子的 VL 包含如 SEQ ID NO:97 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:98 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:99 所示的 LCDR3; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3}, 其中所述 VH_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:6 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:7 所示的 HCDR3 并且 VL_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:8 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:9 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:10 所示的 LCDR3, 或

1 条结构为 VH-CH1-VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 scFv-Fc 的重链 2, 和 2 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中 2 条轻链分别与重链 1 中的 2 个 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的 2 个抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:94 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:95 所示的 HCDR3, 识别 MUC16 分子的 VL 包含如 SEQ ID NO:101 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:98 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:99 所示的 LCDR3; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3}, 其中所述 VH_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:6 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:7 所示的 HCDR3 并且 VL_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:8 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:9 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:10 所示的 LCDR3, 或

1 条结构为 VH-CH1-VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 scFv-Fc 的重链 2, 和 2 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中 2 条轻链分别与重链 1 中的 2 个 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的 2 个抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:94 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:95 所示的 HCDR3, 识别 MUC16 分子的 VL 包含如 SEQ ID NO:103 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:98 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:99 所示的 LCDR3; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3}

和 VL_{CD3}，其中所述 VH_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO:6 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:7 所示的 HCDR3 并且 VL_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:8 所示的 LCDR1，如 SEQ ID NO:9 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:10 所示的 LCDR3。

在一个具体的实施方案中，本发明提供了一种抗 CD3× MUC16 双特异性抗体，其包含：

(i) 1 条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1，1 条结构为 VH-CH1-scFv-Fc 的重链 2，和 2 条结构为 VL-CL 的轻链，其中 2 条轻链分别与重链 1 和 2 的 VH-CH1 结构配对形成 2 个识别 MUC16 分子的抗原识别位点，scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点，其中识别 MUC16 分子的 VH 包含选自 SEQ ID NO:92 或 113 的序列，识别 MUC16 分子的 VL 包含选自 SEQ ID NO:96、100、102 或 114 的序列；识别 CD3 分子的 scFv 包含识别 CD3 的 VH（为了与识别 MUC16 的 VH 相区别，在本文称为 VH_{CD3}）和识别 CD3 的 VL（为了与识别 MUC16 的 VL 相区别，在本文称为 VL_{CD3}），其中所述 VH_{CD3} 包含 SEQ ID NO:3 所示的序列并且 VL_{CD3} 包含 SEQ ID NO:4 所示的序列。

(ii) 1 条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1，1 条结构为 scFv-Fc 的重链 2，和 1 条结构为 VL-CL 的轻链，其中轻链与重链 1 的 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的抗原识别位点，scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点，其中识别 MUC16 分子的 VH 包含选自 SEQ ID NO:92 或 113 的序列，识别 MUC16 分子的 VL 包含选自 SEQ ID NO:96、100、102 或 114 的序列；识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3}，其中所述 VH_{CD3} 包含 SEQ ID NO:3 所示的序列并且 VL_{CD3} 包含 SEQ ID NO:4 所示的序列；或

(iii) 1 条结构为 VH-CH1-VH-CH1-Fc 的重链 1，1 条结构为 scFv-Fc 的重链 2，和 2 条结构为 VL-CL 的轻链，其中 2 条轻链分别与重链 1 中的 2 个 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的 2 个抗原识别位点，scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点，其中识别 MUC16 分子的 VH 包含选自 SEQ ID NO:92 或 113 的序列，识别 MUC16 分子的 VL 包含选自 SEQ ID NO:96、100、102 或 114 的序列；识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3}，其中所述 VH_{CD3} 包含 SEQ ID NO:3 所示的序列并且 VL_{CD3} 包含 SEQ ID NO:4 所示的序列。

在一个实施方案中，上述双特异性抗体中所包含的 2 个识别 MUC16 分子的抗原识别位点可以具有相同的 VH/VL 序列，或不同的 VH/VL 序列。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种抗 CD3× MUC16 双特异性抗体，其包含：

(i) 1 条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1，1 条结构为 VH-CH1-scFv-Fc 的重链 2，和 2 条结构为 VL-CL 的轻链，其中 2 条轻链分别与重链 1 和 2 的 VH-CH1 结构配对形成 2 个识别 MUC16 分子的抗原识别位点，scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点，其中识别 MUC16 分子的 VH 包含 SEQ ID NO: 113 的序列或者包含与 SEQ ID NO:113 具有至少 90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的序列, 识别 MUC16 分子的 VL 包含选自 SEQ ID NO: 114 的序列或者包含与 SEQ ID NO:114 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的序列; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3}, 其中所述 VH_{CD3} 包含 SEQ ID NO:3 所示的序列或者包含与 SEQ ID NO:3 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的序列, 并且 VL_{CD3} 包含 SEQ ID NO:4 所示的序列或者包含与 SEQ ID NO:4 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的序列; 或

(ii) 1 条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 scFv-Fc 的重链 2, 和 1 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中轻链与重链 1 的 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含选自 SEQ ID NO: 113 的序列或者包含与 SEQ ID NO:113 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的序列, 识别 MUC16 分子的 VL 包含选自 SEQ ID NO: 114 的序列或者包含与 SEQ ID NO:114 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的序列; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3}, 其中所述 VH_{CD3} 包含 SEQ ID NO:3 所示的序列或者包含与 SEQ ID NO:3 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的序列, 并且 VL_{CD3} 包含 SEQ ID NO:4 所示的序列或者包含与 SEQ ID NO:4 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的序列; 或

(iii) 1 条结构为 VH-CH1-VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 scFv-Fc 的重链 2, 和 2 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中 2 条轻链分别与重链 1 中的 2 个 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的 2 个抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含选自 SEQ ID NO: 113 的序列或者包含与 SEQ ID NO:113 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的序列, 识别 MUC16 分子的 VL 包含选自 SEQ ID NO: 114 的序列或者包含与 SEQ ID NO:114 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的序列; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3}, 其中所述 VH_{CD3} 包含 SEQ ID NO:3 所示的序列或者包含与 SEQ ID NO:3 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的序列, 并且 VL_{CD3} 包含 SEQ ID NO:4 所示的序列或者包含与 SEQ ID NO:4 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的序列。

在一个实施方案中, 如本发明上述所提供的一种抗 CD3× MUC16 双特异性抗体, 其中所述 Fc 区可以选自现有技术中已知的任何 IgG、IgA、IgM 类抗体的天然 Fc 区, 例如共有或者

胚系 IgG Fc 区。在一个具体实施方案中, IgG Fc 区可以来自同种型人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。在一个具体实施方案中, IgG Fc 区是人 IgG1 的 Fc 序列。在进一步的实施方案中, 所述 Fc 区包含突变, 例如增加双特异性抗体二聚体稳定性的突变(例如杵入白结构)、减少或者增加效应子功能的突变。

在以上任一个实施方案中, 本发明抗 CD3×MUC16 双特异性抗体的 scFv 通过接头与 Fc 或 CH1 连接, 所述接头可以是本领域已知或者将来获得的任何通用的柔性序列, 通常是短的柔性氨基酸序列, 例如, GGGSG; GGS GG; GS GG; SGGG; GGTGS; GTSPGG; GN GG; G4S-GGS GG-G4S-SGGG; GGG; DGGG; TGEKP; GGRR; EGKSSGSSES KVD; KESGSVSSEQLAQFRSLD; GGRRGGG; LRQRDGERP; LRQKDGGG SERP; GSTSGSGKPGSGEGSTKG 等。在一个具体实施方案中, 所述接头是(G4S)_n, 其中 n 是等于或大于 1 的整数, 例如, n 是 1、2、3、4、5、6、7、8、9 的整数。在一个具体实施方案中, 接头选自(G4S)₃。

在再一个实施方案中, 本发明提供了一种抗 CD3×MUC16 双特异性抗体, 其包含:

(i) 1 条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 VH-CH1-scFv-Fc 的重链 2, 和 2 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中 2 条轻链分别与重链 1 和 2 的 VH-CH1 结构配对形成 2 个识别 MUC16 分子的抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中重链 1 包含 SEQ ID NO:118 所示的序列, 重链 2 包含 SEQ ID NO:121 所示的序列, 并且轻链包含 SEQ ID NO:116 所示的序列。

(ii) 1 条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 scFv-Fc 的重链 2, 和 1 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中轻链与重链 1 的 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中重链 1 包含 SEQ ID NO:118 所示的序列, 重链 2 包含 SEQ ID NO:117 所示的序列, 并且轻链包含 SEQ ID NO:116 所示的序列; 或

(iii) 1 条结构为 VH-CH1-VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 scFv-Fc 的重链 2, 和 2 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中 2 条轻链分别与重链 1 中的 2 个 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的 2 个抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中重链 1 包含 SEQ ID NO:119 所示的序列, 重链 2 包含 SEQ ID NO:117 所示的序列, 并且轻链包含 SEQ ID NO:116 所示的序列。

VI. 编码抗体的核酸以及包含其的宿主细胞

在一方面, 本发明提供了编码以上任何抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或 MUC16 或双特异性抗体或其任一条链的核酸。

例如, 本发明的核酸包含编码选自 SEQ ID NO: 1、2、3、4、11、13、14-29、31-38、40、60-63、70-73、80-83、92、96、100、102、106-109、113-119 或 121 中任一项所示氨基酸序

列的核酸，或编码与选自 SEQ ID NO: 1、2、3、4、11、13、14-29、31-38、40、60-63、70-73、80-83、92、96、100、102、106-109、113-119 或 121 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性的氨基酸序列的核酸。

如本领域技术人员明了的，因为密码子简并性，每一个抗体或多肽氨基酸序列可以由多种核酸序列编码。编码本发明分子的核酸序列可以采用本领域熟知的方法，例如通过从头固相 DNA 合成，或通过 PCR 扩增而产生。

在一方面，本发明提供编码以上任何抗体或任何抗体链的核酸。当从适宜的表达载体表达时，由所述核酸编码的多肽能够显示人 CD3 和/或 GPRC5D 和/或 MUC16 抗原(和/或猴(例如恒河猴或食蟹猴))结合能力。

在再一方面，本发明提供编码以上任何双特异性抗体的核酸。当从适宜的表达载体表达时，由所述核酸编码的多肽能够显示人或猴(例如恒河猴或食蟹猴) CD3 和另一抗原(例如人或猴(例如恒河猴或食蟹猴) GPRC5D 或 MUC16 抗原)的结合能力。在一个实施方案中，编码双特异性抗体的各条链的核酸可以在相同的载体中或在不同的载体中。在再一实施方案中，编码双特异性抗体的各条链的核酸可以引入相同或不同的宿主细胞以表达。因此，在一些实施方案中，本发明的双特异性抗体的生产方法包括步骤：在适于表达所述分子各条链的条件下，培养包含编码所述各条链的核酸的宿主细胞，产生本发明双特异性抗体。

在一个实施方案中，提供包含所述核酸的载体。在一个实施方案中，载体是表达载体，例如真核表达载体。载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、λ噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。在一个实施方案中，载体是例如 pcDNA 载体，例如 pcDNA3.1。

在一个实施方案中，提供包含所述核酸或所述载体的宿主细胞，例如用于克隆或表达编码抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体的载体。在一个实施方案中，宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞例如 CHO 细胞(例如 CHO-S，如 ExpiCHO-S)或 293 细胞(例如 293F 或 HEK293 细胞)或适用于制备抗体或其片段的其它细胞。在一个实施方案中，宿主细胞是原核的，例如是细菌，例如大肠杆菌。

在一个实施方案中，宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞或适用于制备抗体或其片段的其它细胞。例如，真核微生物诸如丝状真菌或酵母是关于编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主。例如，糖基化途径已经进行“人源化”的真菌和酵母菌株导致产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。适于表达糖基化抗体的宿主细胞也衍生自多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。也可以将脊椎动物细胞用作宿主。例如，可以使用被改造以适合于悬浮生长的哺乳动物细胞系。有用的哺乳动物宿主细胞系的其它实例是用 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7)；人胚肾系(HEK293、293F 或 293T 细胞)等。其它有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞，包括 DHFR-CHO 细胞、CHO-S 细胞、ExpiCHO 等；以及骨髓瘤细胞系如 Y0，NS0 和 Sp2/0。本领域已知适合产生抗体的哺乳动物宿主细胞系。

VII、本发明的抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体的生产和纯化

在一个实施方案中,提供了制备本发明抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体的方法,其中所述方法包括,在适合抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体或其链表达的条件下,培养包含编码所述抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体(例如任意一条多肽链和/或多条多肽链)的核酸或包含所述核酸的表达载体的宿主细胞,如上文所提供的,和任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体。

可以将编码本发明抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体的多肽链的多核苷酸插入一个或多个载体中以便进一步在宿主细胞中克隆和/或表达。可以使用本领域技术人员熟知的方法来构建表达载体。一旦已经制备了用于表达的包含本发明的一种或多种核酸分子的表达载体,则可以将表达载体转染或引入适宜的宿主细胞中。多种技术可以用来实现这个目的,例如,原生质体融合、磷酸钙沉淀、电穿孔、逆转录病毒的转导、病毒转染、基因枪、基于脂质体的转染或其他常规技术。

如本文所述制备的抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体可以通过已知的现有技术如高效液相色谱、离子交换层析、凝胶电泳、亲和层析、尺寸排阻层析等纯化。用来纯化特定蛋白质的实际条件还取决于净电荷、疏水性、亲水性等因素,并且这些对本领域技术人员是显而易见的。

可以通过多种熟知分析方法中的任一种方法确定本发明的抗体分子的纯度,所述熟知分析方法包括尺寸排阻层析、凝胶电泳、高效液相色谱等。

VIII、对抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或双特异性抗体的测定法。

可以通过本领域中已知的多种测定法对本文中提供的抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体进行鉴定,筛选,或表征其物理/化学特性和/或生物学活性。

一方面,对本发明的抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体测试其靶标(例如抗原,例如游离的抗原或在细胞上表达的抗原)结合活性,例如通过已知的方法诸如生物膜薄层干涉技术、ELISA、流式细胞术等来进行。可使用本领域已知方法来测定对 CD3 和/或 GPRC5D 和/或抗 MUC16 抗体(或细胞上表达的 CD3 和/或 GPRC5D 和/或 MUC16)的结合,本文中公开了例示性方法。在一些实施方案中,使用放射性免疫测定(RIA)或生物膜薄层干涉测定法(BLI)或电化学发光(ECL)或表面等离子体共振法(SPR)或流式细胞术(FACS)测量。

本发明还提供了用于鉴定抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体的生物学活性的测定法。生物学活性选自本发明的抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体的性质。

例如,对于本发明的抗体分子对表达 CD3 和/或 GPRC5D 和/或 MUC16 的细胞的结合活性,可以通过本领域已知的方法,例如荧光报道分子和流式细胞术,或本文实施例公开的示例性方法测定,例如通过如实施例 5 或 6 或 7 或 8 或 10 所示的方法测定本发明的抗体分子与细胞上表达的 CD3 和/或 GPRC5D 和/或 MUC16 的结合。

例如,对于本发明的抗体分子对 T 细胞的激活活性,可以通过本领域已知的方法,例如 T 细胞激活试验系统,例如 NFAT-luc 报告基因系统如 Jurkat/NFAT-luc 报告基因系统测定,

例如通过实施 1 或 6 或 10 或 12 或 13 或 14 所示的方法,通过检测 T 细胞中的 CD3 信号通路或通过检测激活 T 细胞后细胞因子(例如干扰素,如 IFN γ ; 肿瘤坏死因子如 TNF α 和/或白细胞介素如 IL-6)的释放来测定。

例如,对于本发明抗体分子对肿瘤的抑制活性或结构安全性,可以通过本领域已知的方法,例如针对小鼠肿瘤模型进行肿瘤抑制实验,例如通过实施例 7 或 11 所示的方法来测定。

供任何上述体外测定法使用的细胞为原代细胞或细胞系,包括天然表达或过表达 CD3(例如人或猴(例如食蟹猴))或 GPRC5D(例如人或猴(例如食蟹猴) GPRC5D)或 MUC16(例如人或猴(例如食蟹猴) MUC16)的细胞,例如过表达 CD3 或 GPRC5D 或 MUC16 的细胞,例如 T 细胞或 293 细胞或 CHO 细胞或 Jurkat 细胞或骨髓瘤细胞,例如 HEK293 或 CHO-K1 或 Jurkat/NFAT-Luc 细胞或 NCI-H929。

可以理解的是,能够使用本发明的抗体和别的活性剂的组合来进行任何上述测定法。

IX、本发明抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体的免疫缀合物、药物组合物、药物组合产品和试剂盒

在一些实施方案,本发明提供了包含本文所述的任何抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体的免疫缀合物。优选地,所述免疫缀合物包含一种或多种其他治疗剂(例如细胞毒素或小分子化合物)或标记物。

在一些实施方案中,本发明提供包含本文所述的任何抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体的组合物或药物或制剂,优选地组合物为药物组合物。

在一个实施方案中,所述组合物还包含药用辅料。在一个实施方案中,组合物,例如,药物组合物,包含本发明的抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体,以及一种或多种其它治疗剂的组合。

本发明的所述组合物或药物或制剂还可以包含合适的药用辅料,如本领域中已知的药用载体、药用赋形剂,包括缓冲剂。

如本文所用,“药用载体”包括生理上相容的任何和全部溶剂、分散介质、等渗剂和吸收延迟剂等。

对于药用辅料的使用及其用途,亦参见“Handbook of Pharmaceutical Excipients”,第八版, R.C.Rowe,P.J.Seskey 和 S.C. Owen, Pharmaceutical Press, London, Chicago。

本发明的组合物或药物或制剂可以处于多种形式。这些形式例如包括液体、半固体和固体剂型,如液态溶液剂(例如,注射液或滴眼液)、散剂或混悬剂、脂质体剂和栓剂。优选的形式取决于预期的施用模式和治疗用途。

可以通过将具有所需纯度的本发明的抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体与一种或多种任选的药用辅料混合来制备包含本文所述的抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或双特异性抗体的药物或制剂,例如以冻干制剂或水溶液的形式。

本发明的组合物或药物或制剂还可以包含超过一种活性成分,所述活性成分是被治疗的特定适应证所需的,优选具有不会不利地彼此影响的互补活性的那些活性成分。例如,理想的是还提供其它治疗剂。

本发明还提供了药物组合或药物组合产品，其包含本发明的抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体，以及一种或多种其它治疗剂。

本发明还提供了包含所述药物组合的成套药盒，例如所述成套药盒在同一包装内包含：

- 含有包含本发明的抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体的药物组合物的第一容器；
- 含有包含其它治疗剂的药物组合物的第二容器。

在一些实施方案中，所述其他治疗剂例如化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂（例如免疫抑制剂）。

X、抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体的用途和应用其的方法。

本发明一方面提供了在受试者中预防或治疗疾病的方法，包括向受试者施用本发明的抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体，或包含其的免疫缀合物、组合物或药物或制剂。在一些实施方案中，本发明提供了在受试者中特异性激活 T 细胞（例如进而增强、刺激或增加受试者中的免疫反应）的方法，包括向受试者施用本发明的双特异性抗体，或包含其的免疫缀合物、组合物或药物或制剂。

在一些实施方案中，所述疾病例如肿瘤，例如癌症。癌症可以处于早期、中期或晚期或是转移性癌。在一些实施方案中，癌症可以是实体肿瘤或血液肿瘤。在一些实施方案中，所述癌症是卵巢癌、骨髓瘤、结肠癌、直肠癌或结直肠癌。

在一些实施方案中，所述的卵巢癌症是与卵巢细胞异常增殖相关的癌症，其包含一组异质性病变，最常见的是源自上皮细胞类型的那些病变。在一个实施方案中，卵巢癌症例如是卵巢癌，尤其是浆液性卵巢癌，例如卵巢浆液性囊腺癌、卵巢癌浆液性腺癌、卵巢癌粘液腺癌、子宫内膜样腺癌、卵巢癌透明细胞腺癌。

在一些实施方案中，所述疾病治疗将受益于激活 CD3 信号通路和/或激活 T 细胞。

在一些实施方案中，所述癌症是表征为具有升高的 GPRC5D 的蛋白质水平和/或核酸水平（例如表达升高）的癌症，例如，所述癌症的肿瘤细胞中具有升高的 GPRC5D 的蛋白质水平和/或核酸水平（例如表达升高），例如相比健康受试者的相同组织中的 GPRC5D 的蛋白质水平和/或核酸水平，或相比患者肿瘤组织相邻的健康组织中的 GPRC5D 的蛋白质水平和/或核酸水平。

在一些实施方案中，所述癌症是表征为具有升高的 MUC16 的蛋白质水平和/或核酸水平（例如表达升高）的癌症，例如，所述癌症的肿瘤细胞中具有升高的 MUC16 的蛋白质水平和/或核酸水平（例如表达升高），例如相比健康受试者的相同组织中的 MUC16 的蛋白质水平和/或核酸水平，或相比患者肿瘤组织相邻的健康组织中的 MUC16 的蛋白质水平和/或核酸水平。

患者或受试者可以是哺乳动物，例如，灵长类，优选地，高级灵长类，例如，人类（例如，患有本文所述癌症或具有患有本文所述癌症的风险的患者）。在某些实施方案中，受试者接受或已经接受过其它治疗，例如化疗治疗和/或放射疗法。

在一个实施方案中,本文公开的抗 MUC16 抗体不结合循环中的游离 CA125 分子,仅结合细胞表面表达的与细胞膜结合的 MUC16 分子。已知 MUC16 分子是卵巢癌症特异性表达的分子,因此治疗有效量的抗 MUC16 抗体或抗 CD3× MUC16 双特异性抗体可以特异性地结合表达 MUC16 分子的卵巢癌症细胞,有助于提高免疫系统对癌细胞的杀伤,从而达到治疗目的。

因此,本发明提供了抗 MUC16 抗体或抗 CD3× MUC16 双特异性抗体在制备用于治疗肿瘤(例如卵巢癌症)的药物中的用途。

在另一方面,本发明涉及预防或治疗受试者的肿瘤(例如卵巢癌症)的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文公开的抗 MUC16 抗体或抗 CD3× MUC16 双特异性抗体或包含其的药物组合物。

在一个实施方案中,本文公开的抗 GPRC5D 抗体或抗 GPRC5D × CD3 双特异性抗体可以用于治疗癌症例如骨髓瘤、结肠癌、直肠癌或结直肠癌。因此,本发明提供了抗 MUC16 抗体或抗 GPRC5D × CD3 双特异性抗体在制备用于治疗癌症例如骨髓瘤、结肠癌、直肠癌或结直肠癌的药物中的用途。

在另一方面,本发明涉及预防或治疗受试者的肿瘤(例如癌症例如骨髓瘤、结肠癌、直肠癌或结直肠癌)的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文公开的抗 GPRC5D 抗体或抗 CD3× GPRC5D 双特异性抗体或包含其的药物组合物。

本发明的抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体(以及包含其的免疫缀合物、组合物、药物组合物、制剂、组合产品等)可以通过任何合适的方法给药,包括肠胃外给药,肺内给药和鼻内给药,并且,如果局部治疗需要,病灶内给药。肠胃外注射或输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下注射或输注。在一定程度上根据用药是短期或长期性而定,可通过任何适合途径,例如通过注射,例如静脉内或皮下注射用药。本文中涵盖各种用药时程,包括,但不限于,单次给药或在多个时间点多次给药、推注给药及脉冲输注。

为了预防或治疗疾病,本发明的抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体(以及包含其的免疫缀合物、组合物、药物组合物、制剂、组合产品等)的合适剂量(当单独或与一种或多种其他的治疗剂组合使用时)将取决于待治疗疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重性和进程、以预防目的施用还是以治疗目的施用、以前的治疗、患者的临床病史和对所述抗体的应答,和主治医师的判断力。所述抗体以一次治疗或经过一系列治疗合适地施用于患者。在其他方面,本发明提供本发明的抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体或包含其的免疫缀合物或组合物或组合产品在生产或制备药物中的用途,所述药物用于本文所述的用途,例如用于预防或治疗本文提及的相关疾病或病症。

在一些实施方案中,抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体(以及包含其的免疫缀合物、组合物、药物组合物、制剂等)还能与一种或多种其它疗法例如治疗方式和/或其它治疗剂组合施用,用于本文所述的用途,例如用于预防和/或治疗本文提及的相关疾病或病症。

在一些实施方案中,所述治疗方式例如手术或放疗。

在一些实施方案中，所述其他治疗剂例如化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂（例如免疫抑制剂）。

XI、诊断和检测

在一个方面，本发明还涉及对抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或 MUC16 或双特异性抗体的用于诊断和检测（例如用于诊断或非诊断目的）的方法和包含其的用于诊断和检测的组合物。

在某些实施方案中，本文中提供的抗 GPRC5D 抗体可以用于检测 GPRC5D 在生物样品中的存在。在某些实施方案中，本文中提供的双特异性抗体可以用于检测 CD3 和/或 GPRC5D 在生物样品中的存在。

在某些实施方案中，本文中提供的抗 MUC16 抗体可以用于检测 MUC16 在生物样品中的存在。在某些实施方案中，本文中提供的双特异性抗体可以用于检测 CD3 和/或 MUC16 在生物样品中的存在。

在某些实施方案中，本文中提供的双特异性抗体可以用于检测第一抗原和/或第二抗原在生物样品中的存在。在某些实施方案中，本文中提供的双特异性抗体可以用于检测第一抗原和/或第二抗原在生物样品中的存在。

术语“检测”用于本文中时，包括定量或定性检测，示例性的检测方法可以涉及免疫组织化学、免疫细胞化学、流式细胞术（例如，FACS）、抗体分子复合的磁珠、ELISA 测定法、PCR-技术（例如，RT-PCR）。在某些实施方案中，生物样品是体液，例如血液、血清或血浆。

在某些实施方案中，所述方法包括将生物样品与如本文所述的抗 GPRC5D 抗体或双特异性抗体在允许其与 GPRC5D 结合的条件下接触，并检测在该抗 GPRC5D 抗体或双特异性抗体和 GPRC5D 之间是否形成复合物。复合物的形成表示存在 GPRC5D。该方法可以是体外或体内方法。

在某些实施方案中，所述方法包括将生物样品与如本文所述的抗 MUC16 抗体或双特异性抗体在允许其与 MUC16 结合的条件下接触，并检测在该抗 MUC16 抗体或双特异性抗体和 MUC16 之间是否形成复合物。复合物的形成表示存在 MUC16。该方法可以是体外或体内方法。

在某些实施方案中，提供标记的抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体。标记包括但不限于，被直接检测的标记或部分（如荧光标记、发色团标记、电子致密标记、化学发光标记和放射性标记），以及被间接检测的部分，如酶或配体，例如，通过酶促反应或分子相互作用。在一些实施方案中，所述标记例如生物素或 hFc 等标记物。

在本文中提供的一些实施方案中，样品是在用本发明的抗 CD3 抗体或抗 GPRC5D 抗体或抗 MUC16 抗体或双特异性抗体治疗之前获得的。在一些实施方案中，样品是在用其他疗法之前获得的。在一些实施方案中，样品是在用其他疗法治疗过程中，或者用其他疗法治疗后获得的。

在一些实施方案中，在治疗之前，例如，在起始治疗之前或在治疗间隔后的某次治疗之前检测 GPRC5D 或 MUC16。

在一些实施方案中，在治疗之前，例如，在起始治疗之前或在治疗间隔后的某次治疗之前检测第一抗原和/或第二抗原。

XII. 具体实施方案

在一些方面，本发明涉及以下具体的实施方案：

1、一种双特异性抗体，其包含

第一抗原结合区和第二抗原结合区，其中第一抗原结合区特异性结合肿瘤相关抗原，和/或第二抗原结合区特异性结合 CD3，

其中所述第二抗原结合区是抗 CD3 抗体的 scFv，所述 scFv 包含 VH 和 VL，任选地，所述 VH 和 VL 经由接头连接，所述接头例如包含氨基酸序列 (G4S)_n，其中 n=1,2,3,4 或 5，优选地，n=3 或 4，更优选地，n=3。

2、实施方案 1 的双特异性抗体，其中所述 scFv 包含的 VH 包含 3 个来自重链可变区的互补决定区 (HCDR)，HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且所述 scFv 包含的 VL 包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区 (LCDR)，LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中

(i) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 选自如 SEQ ID NO:3 中所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 选自如 SEQ ID NO:4 中所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

(ii) HCDR1 由 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列组成，HCDR2 由 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列组成，HCDR3 由 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列组成，LCDR1 由 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列组成，LCDR2 由 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列组成，且 LCDR3 由 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列组成。

3、实施方案 2 的双特异性抗体，其中

所述 VH 含有 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，

和/或所述 VL 含有 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

4、实施方案 1-3 中任一项的双特异性抗体，其中所述第一抗原结合区是特异性结合第一抗原的 Fab。

5、实施方案 4 的双特异性抗体，其中所述 Fab 包含 CH1，其中所述 CH1 是来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 CH1，优选地来自 IgG1 的 CH1。

6、实施方案 5 所述的双特异性抗体，其中所述 CH1 包含(i)包含与 SEQ ID NO:44 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(ii) 包含 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

7、实施方案 1-6 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述双特异性抗体是包含 Fc 二聚体的 IgG 样双特异性抗体，其中构成所述 Fc 二聚体的两个 Fc 区相同或不同。

8、实施方案 7 所述的双特异性抗体，其中所述 Fc 区之一或二者包含降低与 Fcγ 受体结合的突变，例如包含 L234A/L235A 突变、D265A 突变或 P329A 突变中的一个或多个，例如包含

L234A/L235A 突变、D265A 突变和 P329A 突变。

9、实施方案 8 所述的双特异性抗体，其中所述 Fc 区之一或二者包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 46 或 49 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%或更高的同一性的氨基酸序列或由其组成。

10、实施方案 7-9 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述两个 Fc 区不同，优选地，在第一单体 Fc 区和第二单体 Fc 区中分别引入相应的结 (knob) 突变和扣(Hole)突变。

11、实施方案 10 所述的双特异性抗体，其中

- a) 一个 Fc-区多肽包含结突变 T366W，而另一个 Fc-区多肽包含扣突变 T366S、L368A 和 Y407V，或
- b) 一个 Fc-区多肽包含结突变 T366W 和 Y349C，而另一个 Fc-区多肽包含扣突变 T366S、L368A、Y407V 和 S354C，或
- c) 一个 Fc-区多肽包含结突变 T366W 和 S354C，而另一个 Fc-区多肽包含扣突变 T366S、L368A、Y407V 和 Y349C；

任选地，所述 Fc 区还包含降低与 Fc γ 受体结合的突变，例如， L234A/L235A 突变、D265A 突变或 P329A 突变中的一个或多个；例如 L234A/L235A 突变、D265A 突变和 P329A 突变。

12、实施方案 7-11 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述 Fc 区之一或二者包含铰链区，例如 EPKSS 或 EPKSC。

13、实施方案 12 所述的双特异性抗体，其中

(i) 第一 Fc 区包含结突变，其

- a) 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 43 或 89 或由其组成；或
- b) 包含与 SEQ ID NO: 43 或 89 具有至少 90%同一性，例如 95%，96%，97%，99%或更高的同一性且包含 L234A/L235A 突变、D265A 突变和 P329A 突变和结突变(例如 S354C 和 T366W) 的氨基酸序列或由其组成； 和/或

(ii) 第二 Fc 区包含扣突变，其

- a) 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:30、42 或 59 或由其组成；或
- b) 包含与 SEQ ID NO: 30、42 或 59 具有至少 90%同一性，例如 95%，96%，97%，99%或更高的同一性且包含 L234A/L235A 突变、D265A 突变和 P329A 突变和扣突变(例如 Y349C ,T366S ,L368A 和 Y407V) 的氨基酸序列或由其组成。

14、实施方案 1-13 中任一项的双特异性抗体，其为 IgG 样双特异性抗体，其包含一个特异性结合第一抗原的 Fab 片段、一个特异性结合第二抗原的 scFv 和 Fc 异二聚体，其中

所述 Fab 片段包含 VH-CH1 和 VL-CL，所述 scFv 包含 VH-接头-VL 或 VL-接头-VH，包含扣突变的 Fc 区构成第一重链；

所述 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合所述 scFv 片段的 N 末端，且所述 scFv 片段的 C 末端融合至包含结突变的 Fc 区的 CH2 或铰链区，构成第二重链；

且

所述 Fab 片段的 VL-CL 构成轻链。

15、实施方案 1-13 中任一项的双特异性抗体，其为 IgG 样双特异性抗体，其包含两个特异性结合第一抗原的 Fab 片段、一个特异性结合第二抗原的 scFv 和 Fc 异二聚体，其中

所述 Fab 片段包含 VH-CH1 和 VL-CL，所述 scFv 包含 VH-接头-VL 或 VL-接头-VH，

第一 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合至包含扣突变的 Fc 区的 CH2 或铰链区构成第一重链；

第二 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合所述 scFv 片段的 N 末端，且所述 scFv 片段的 C 末端融合至包含结突变的 Fc 区的 CH2 或铰链区，构成第二重链；

且

所述第一和第二 Fab 片段的 VL-CL 分别构成两条轻链；

其中所述第一 Fab 和第二 Fab 片段相同或不同。

16、实施方案 1-13 中任一项的双特异性抗体，其为 IgG 样双特异性抗体，其包含一个特异性结合第一抗原的 Fab 片段、一个特异性结合第二抗原的 scFv 和 Fc 异二聚体，其中

所述 Fab 片段包含 VH-CH1 和 VL-CL，所述 scFv 包含 VH-接头-VL 或 VL-接头-VH，

所述 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合至包含扣突变的 Fc 区的 CH2 或铰链区构成第一重链；

所述 scFv 片段的 C 末端融合至包含结突变的 Fc 区的 CH2 或铰链区，构成第二重链；

且

所述 Fab 片段的 VL-CL 构成轻链。

17、实施方案 1-13 中任一项的双特异性抗体，其为 IgG 样双特异性抗体，其包含两个特异性结合第一抗原的 Fab 片段、一个特异性结合第二抗原的 scFv 和 Fc 异二聚体，其中

所述 Fab 片段包含 VH-CH1 和 VL-CL，所述 scFv 包含 VH-接头-VL 或 VL-接头-VH，

第一 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合至第二 Fab 片段的 VH 的 N 末端，且第二 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合至包含扣突变的 Fc 区的 CH2 或铰链区构成第一重链；

所述 scFv 片段的 C 末端融合至包含结突变的 Fc 区的 CH2 或铰链区，构成第二重链；且

所述第一和第二 Fab 片段的 VL-CL 分别构成两条轻链；

其中所述第一 Fab 和第二 Fab 片段相同或不同。

18、实施方案 1-18 中任一项的双特异性抗体，其中第一抗原为肿瘤相关抗原，例如选自 GPRC5D 或 MUC16（例如人 GPRC5D 或人 MUC16）。

19、实施方案 18 的双特异性抗体，其中第一抗原为人 GPRC5D，第一抗原结合区包含重链可变区 VH 的 3 个 CDR，HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，以及轻链可变区 VL 的 3 个 CDR，LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中

(i) 所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 选自如 SEQ ID NO: 62、38 或 40 中任一项所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3

为如 SEQ ID NO: 63 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3;

(ii) 所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 选自如 SEQ ID NO: 72 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3; 且所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 为如 SEQ ID NO: 73 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 或

(iii) 所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 选自如 SEQ ID NO: 82 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3; 且所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 为如 SEQ ID NO: 83 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

20、实施方案 19 的双特异性抗体, 其中第一抗原结合区包含

(i) 如 SEQ ID NO:64 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO:65、39 或 41 所示的 HCDR2、如 SEQ ID NO:66 所示的 HCDR3; 如 SEQ ID NO:67 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO:68 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:69 所示的 LCDR3;

(ii) 如 SEQ ID NO:74 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO:75 所示的 HCDR2、如 SEQ ID NO:76 所示的 HCDR3; 如 SEQ ID NO:77 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO:78 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:79 所示的 LCDR3;或

(iii) 如 SEQ ID NO:84 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO:85 所示的 HCDR2、如 SEQ ID NO:86 所示的 HCDR3; 如 SEQ ID NO:87 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO:78 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:88 所示的 LCDR3。

21、实施方案 19 或 20 的双特异性抗体, 其中第一抗原结合区包含重链可变区 VH, 其中所述重链可变区

(i) 包含与 SEQ ID NO: 62、72、82、16、23、25、27、29、38 或 40 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 62、72、82、16、23、25、27、29、38 或 40 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

22、实施方案 19-21 中任一项的双特异性抗体, 其中第一抗原结合区包含轻链可变区 VL, 其中所述轻链可变区

(i) 包含与 SEQ ID NO:63、73、83、17、19 或 21 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 63、73、83、17、19 或 21 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

23、实施方案 19-22 中任一项的双特异性抗体, 其中第一抗原结合区包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL, 其中

(i) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO:62 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 且所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:63 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO:72 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、

93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；且所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:73 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(iii)所述重链可变区包含 SEQ ID NO:82 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；且所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:83 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(iv)所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 16、23、25、27、29、38 或 40 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；且所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 17、19 或 21 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

24、实施方案 19-23 中任一项的双特异性抗体，其中第一抗原结合区包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，其中 VH 和 VL 分别包含如下所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成：

- (i). SEQ ID NO:62 和 SEQ ID NO:63；
- (ii). SEQ ID NO:72 和 SEQ ID NO:73；
- (iii). SEQ ID NO:82 和 SEQ ID NO:83；
- (iv). SEQ ID NO:16、23、25、27、29、38 或 40 和 SEQ ID NO:21；
- (v). SEQ ID NO:16 或 25 和 SEQ ID NO:17；
- (vi). SEQ ID NO:16 或 27 和 SEQ ID NO:19。

25、实施方案 18 的双特异性抗体，其中第一抗原为人 MUC16，第一抗原结合区包含重链可变区 VH 的 3 个 CDR，HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，以及轻链可变区 VL 的 3 个 CDR，LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中

所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 选自如 SEQ ID NO: 92 或 113 中所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 为如 SEQ ID NO: 96、100、102 或 114 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

26、实施方案 25 的双特异性抗体，其中第一抗原结合区包含

如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO:94 示的 HCDR2、如 SEQ ID NO:95 示的 HCDR3；如 SEQ ID NO:97、101 或 103 示的 LCDR1、如 SEQ ID NO:98 示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:99 的 LCDR3。

27、实施方案 25 或 26 的双特异性抗体，其中第一抗原结合区包含重链可变区 VH，其中所述重链可变区

包含与 SEQ ID NO: 92 或 113 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者包含 SEQ ID NO: 92 或 113 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

28、实施方案 25-27 中任一项的双特异性抗体，其中第一抗原结合区包含轻链可变区 VL，其中所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 96、100、102 或 114 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者包含 SEQ ID NO: 96、100、102 或 114 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

29、实施方案 25-28 中任一项的双特异性抗体，其中第一抗原结合区包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，其中

所述重链可变区包含 SEQ ID NO:92 或 113 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；且所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 96、100、102 或 114 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

30、实施方案 25-29 中任一项的双特异性抗体，其中第一抗原结合区包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，其中 VH 包含 SEQ ID NO:92 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，且所述 VL 包含 SEQ ID NO:96、100 或 102 所示的氨基酸序列或由其所组成；或

第一抗原结合区包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，其中 VH 包含 SEQ ID NO:113 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，且所述 VL 包含 SEQ ID NO:114 所示的氨基酸序列或由其所组成。

31、核酸分子，其编码实施方案 1-30 中任一项的双特异性抗体中的任一条链，或由所述核酸序列组成。

32、表达载体，其包含实施方案 31 的核酸分子，优选地，所述表达载体为 pCDNA，例如 pCDNA3.1。

33、宿主细胞，其包含实施方案 31 所述的核酸分子或实施方案 32 所述的表达载体，优选地，所述宿主细胞是原核的或真核的，例如 293 细胞或 CHO 细胞，例如 293F 细胞或 293T 细胞或 CHO-S 细胞。

34、制备实施方案 1-30 中任一项所述的双特异性抗体的方法，所述方法包括，在适合所述抗体的链表达的条件下，培养实施方案 31 所述的核酸分子或实施方案 32 所述的表达载体的宿主细胞，和任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述抗体。

35、免疫缀合物，其包含实施方案 1-30 中任一项所述的双特异性抗体。

36、药物组合物或药物或制剂，其包含实施方案 1-30 中任一项所述的双特异性抗体，或实施方案 35 的免疫缀合物以及任选地药用辅料。

37、药物组合产品，其包含实施方案 1-30 中任一项所述的双特异性抗体，或实施方案 35 的免疫缀合物，以及一种或多种其它治疗剂（例如化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂）。

38、在受试者中预防或治疗癌症的方法，包括向受试者施用有效量的实施方案 1-30 中任一项所述的双特异性抗体，或实施方案 35 的免疫缀合物，或实施方案 36 的药物组合物或制剂；或实施方案 37 的药物组合产品。

39、实施方案 38 的方法，其中所述癌症的肿瘤细胞中具有升高的第一抗原的蛋白质水平和/或核酸水平（例如表达升高）。

40、实施方案 38 的方法，其中所述第一抗原选自 GPRC5D 或 MUC16。

41、实施方案 38-40 中任一项的方法，其中所述癌症是实体肿瘤或血液肿瘤，例如卵巢癌（例如浆液性卵巢癌，例如卵巢浆液性囊腺癌、卵巢癌浆液性腺癌、卵巢癌粘液腺癌、子宫内膜样腺癌、卵巢癌透明细胞腺癌）、骨髓瘤、结肠癌、直肠癌或结直肠癌。

42、实施方案 38-41 中任一项的方法，其中所述方法还包括与其它疗法例如治疗方式（例如手术或放疗）和/或其它治疗剂（例如化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂）组合施用。

43、检测第一抗原在生物样品中的存在的方法，其包括

(i) 将生物样品与实施方案 1-30 中任一项所述的双特异性抗体在允许其与第一抗原结合的条件下接触，

(ii) 检测在该抗体或双特异性抗体和第一抗原之间是否形成复合物，

其中复合物的形成表示存在第一抗原。

在一些方面，本发明涉及以下具体的实施方案：

1. 一种特异性结合人 CD3 的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段，其包含：

1) 序列如 SEQ ID NO:3 所述的重链可变区(VH_{CD3})或与 SEQ ID NO:3 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的重链可变区；和

2) 序列如 SEQ ID NO:4 所述的轻链可变区(VL_{CD3}) 或与 SEQ ID NO:4 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的轻链可变区。

2. 实施方案 1 的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段包含：

1) 序列如 SEQ ID NO:1 所示的重链 (H)或与 SEQ ID NO:1 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的重链；和

2) 序列如 SEQ ID NO:2 所述的轻链 (L) 或与 SEQ ID NO:2 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多序列同一性且具有相同 CDR 的轻链。

3. 一种特异性结合人 MUC16 的抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段，其包含 VH 和 VL，其中：

1) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO:94 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:95 所示的 HCDR3，所述 VL 包含如 SEQ ID NO:97 所示的 LCDR1，如 SEQ ID NO:98 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:99 所示的 LCDR3；或

2) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO:94 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:95 所示的 HCDR3，所述 VL 包含如 SEQ ID NO:101 所示的 LCDR1，如 SEQ ID NO:98 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:99 所示的 LCDR3；或

3) 所述 VH 包含如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1，如 SEQ ID NO:94 所示的 HCDR2 和

如 SEQ ID NO:95 所示的 HCDR3, 所述 VL 包含如 SEQ ID NO:103 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:98 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:99 所示的 LCDR3; 或

4. 实施方案 3 所述的特异性结合人 MUC16 的抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段, 其包含:

1) 序列如 SEQ ID NO:92 所述的 VH 或与 SEQ ID NO:92 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多序列同一性且具有相同 CDR 的 VH; 和序列如 SEQ ID NO:96 所述的 VL 或与 SEQ ID NO:96 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多序列同一性且具有相同 CDR 的 VL; 或

2) 序列如 SEQ ID NO:92 所述的 VH 或与 SEQ ID NO:92 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多序列同一性且具有相同 CDR 的 VH; 和序列如 SEQ ID NO:100 所述的 VL 或与 SEQ ID NO:100 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多序列同一性且具有相同 CDR 的 VL; 或

3) 序列如 SEQ ID NO:92 所述的 VH 或与 SEQ ID NO:92 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多序列同一性且具有相同 CDR 的 VH; 和序列如 SEQ ID NO:102 所述的 VL 或与 SEQ ID NO:102 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多序列同一性且具有相同 CDR 的 VL; 或

4) 序列如 SEQ ID NO:113 所述的 VH 或与 SEQ ID NO:113 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多序列同一性且具有相同 CDR 的 VH; 和序列如 SEQ ID NO:114 所述的 VL 或与 SEQ ID NO:114 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多序列同一性且具有相同 CDR 的 VL。

5. 实施方案 3 或 4 所述的抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段包含:

1) 序列如 SEQ ID NO:106 所示的重链 (H) 或与 SEQ ID NO:106 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多序列同一性且具有相同 CDR 的重链, 和序列如 SEQ ID NO:107 所述的轻链 (L) 或与 SEQ ID NO:107 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多序列同一性且具有相同 CDR 的轻链; 或

2) 序列如 SEQ ID NO:106 所示的重链 (H) 或与 SEQ ID NO:106 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多序列同一性且具有相同 CDR 的重链, 和序列如 SEQ ID NO:108 所述的轻链 (L) 或与 SEQ ID NO:108 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多序列同一性且具有相同 CDR 的轻链; 或

3) 序列如 SEQ ID NO:106 所示的重链 (H) 或与 SEQ ID NO:106 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多序列同一性且具有相同 CDR 的重链, 和序列如 SEQ ID NO:109 所述的轻链 (L) 或与 SEQ ID NO:109 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多序列同一性且具有相同 CDR 的轻链; 或

4) 序列如 SEQ ID NO:115 所示的重链 (H) 或与 SEQ ID NO:115 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多序列同一性且具有相同 CDR 的重链, 和序列如 SEQ ID NO:116 所述的轻链 (L) 或与 SEQ ID NO:116 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多序列同一性且具有相同 CDR 的轻链。

6. 实施方案 1-2 中任一项所述的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段或实施方案 3-5 中任一项所述的抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗原结合片段是 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 线性抗体; scFv。

7. 实施方案 6 所述的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段, 其中所述 scFv 包含如 SEQ ID NO:11 所示的序列或与 SEQ ID NO:11 具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更多序列同一性且具有相同 CDR 的序列。

8. 一种抗 CD3×MUC16 双特异性抗体, 其包含:

(i) 1 条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 VH-CH1-scFv-Fc 的重链 2, 和 2 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中 2 条轻链分别与重链 1 和 2 的 VH-CH1 结构配对形成 2 个识别 MUC16 分子的抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:94 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:95 所示的 HCDR3, 识别 MUC16 分子的 VL 包含如 SEQ ID NO:96 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:97 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:98 所示的 LCDR3; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3}, 其中所述 VH_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:6 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:7 所示的 HCDR3, 并且 VL_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:8 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:9 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:10 所示的 LCDR3; 或

1 条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 VH-CH1-scFv-Fc 的重链 2, 和 2 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中 2 条轻链分别与重链 1 和 2 的 VH-CH1 结构配对形成 2 个识别 MUC16 分子的抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:94 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:95 所示的 HCDR3, 识别 MUC16 分子的 VL 包含如 SEQ ID NO:101 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:98 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:99 所示的 LCDR3; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3}, 其中所述 VH_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:6 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:7 所示的 HCDR3, 并且 VL_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:8 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:9 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:10 所示的 LCDR3; 或

1 条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 VH-CH1-scFv-Fc 的重链 2, 和 2 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中 2 条轻链分别与重链 1 和 2 的 VH-CH1 结构配对形成 2 个识别 MUC16 分子的抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:94 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:95 所示的 HCDR3, 识别 MUC16 分子的 VL 包含如 SEQ ID NO:103 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID

NO:98 所示的 LCDR 和 2 如 SEQ ID NO:99 所示的 LCDR3; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3} , 其中所述 VH_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:6 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:7 所示的 HCDR3, 并且 VL_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:8 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:9 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:10 所示的 LCDR3;

或者

(ii) 1 条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 scFv-Fc 的重链 2, 和 1 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中轻链与重链 1 的 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:94 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:95 所示的 HCDR3, 识别 MUC16 分子的 VL 包含如 SEQ ID NO:97 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:98 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:99 所示的 LCDR3; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3} , 其中所述 VH_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:6 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:7 所示的 HCDR3 并且 VL_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:8 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:9 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:10 所示的 LCDR3; 或

1 条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 scFv-Fc 的重链 2, 和 1 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中轻链与重链 1 的 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:94 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:95 所示的 HCDR3, 识别 MUC16 分子的 VL 包含如 SEQ ID NO:101 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:98 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:99 所示的 LCDR3; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3} , 其中所述 VH_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:6 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:7 所示的 HCDR3 并且 VL_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:8 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:9 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:10 所示的 LCDR3; 或

1 条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 scFv-Fc 的重链 2, 和 1 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中轻链与重链 1 的 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:94 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:95 所示的 HCDR3, 识别 MUC16 分子的 VL 包含如 SEQ ID NO:103 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:98 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:99 所示的 LCDR3; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3} , 其中所述 VH_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:6 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:7 所示的 HCDR3 并且 VL_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:8 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:9 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:10 所示的 LCDR3;

或者

(iii) 1 条结构为 VH-CH1-VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 scFv-Fc 的重链 2, 和 2 条结

构为 VL-CL 的轻链,其中 2 条轻链分别与重链 1 中的 2 个 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的 2 个抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:94 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:95 所示的 HCDR3, 识别 MUC16 分子的 VL 包含如 SEQ ID NO:97 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:98 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:99 所示的 LCDR3; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3}, 其中所述 VH_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:6 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:7 所示的 HCDR3 并且 VL_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:8 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:9 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:10 所示的 LCDR3, 或

1 条结构为 VH-CH1-VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 scFv-Fc 的重链 2, 和 2 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中 2 条轻链分别与重链 1 中的 2 个 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的 2 个抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:94 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:95 所示的 HCDR3, 识别 MUC16 分子的 VL 包含如 SEQ ID NO:101 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:98 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:99 所示的 LCDR3; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3}, 其中所述 VH_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:6 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:7 所示的 HCDR3 并且 VL_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:8 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:9 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:10 所示的 LCDR3, 或

1 条结构为 VH-CH1-VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 scFv-Fc 的重链 2, 和 2 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中 2 条轻链分别与重链 1 中的 2 个 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的 2 个抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:94 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:95 所示的 HCDR3, 识别 MUC16 分子的 VL 包含如 SEQ ID NO:103 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:98 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:99 所示的 LCDR3; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3}, 其中所述 VH_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:5 所示的 HCDR1, 如 SEQ ID NO:6 所示的 HCDR2 和如 SEQ ID NO:7 所示的 HCDR3 并且 VL_{CD3} 包含如 SEQ ID NO:8 所示的 LCDR1, 如 SEQ ID NO:9 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:10 所示的 LCDR3。

9. 实施方案 8 所述的一种抗 CD3×MUC16 双特异性抗体, 其包含:

(i) 1 条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 VH-CH1-scFv-Fc 的重链 2, 和 2 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中 2 条轻链分别与重链 1 和 2 的 VH-CH1 结构配对形成 2 个识别 MUC16 分子的抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含选自 SEQ ID NO:92 或 113 的序列, 识别 MUC16 分子的 VL 包含选自 SEQ ID NO:96、100、102 或 114 的序列; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3}, 其中所述 VH_{CD3} 包含 SEQ ID NO:3 所示的序列并且 VL_{CD3} 包含 SEQ ID NO:4 所示的序列。

(ii) 1条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1, 1条结构为 scFv-Fc 的重链 2, 和 1条结构为 VL-CL 的轻链, 其中轻链与重链 1 的 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含选自 SEQ ID NO:92 或 113 的序列, 识别 MUC16 分子的 VL 包含选自 SEQ ID NO:96、100、102 或 114 的序列; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3}, 其中所述 VH_{CD3} 包含 SEQ ID NO:3 所示的序列并且 VL_{CD3} 包含 SEQ ID NO:4 所示的序列; 或

(iii) 1条结构为 VH-CH1-VH-CH1-Fc 的重链 1, 1条结构为 scFv-Fc 的重链 2, 和 2条结构为 VL-CL 的轻链, 其中 2条轻链分别与重链 1 中的 2个 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的 2个抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含选自 SEQ ID NO:92 或 113 的序列, 识别 MUC16 分子的 VL 包含选自 SEQ ID NO:96、100、102 或 114 的序列; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3}, 其中所述 VH_{CD3} 包含 SEQ ID NO:3 所示的序列并且 VL_{CD3} 包含 SEQ ID NO:4 所示的序列。

10. 实施方案 8 或 9 所述的抗 CD3× MUC16 双特异性抗体, 其包含:

(i) 1条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1, 1条结构为 VH-CH1-scFv-Fc 的重链 2, 和 2条结构为 VL-CL 的轻链, 其中 2条轻链分别与重链 1 和 2 的 VH-CH1 结构配对形成 2个识别 MUC16 分子的抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含 SEQ ID NO: 113 的序列, 识别 MUC16 分子的 VL 包含选自 SEQ ID NO: 114 的序列; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3}, 其中所述 VH_{CD3} 包含 SEQ ID NO:3 所示的序列并且 VL_{CD3} 包含 SEQ ID NO:4 所示的序列。

(ii) 1条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1, 1条结构为 scFv-Fc 的重链 2, 和 1条结构为 VL-CL 的轻链, 其中轻链与重链 1 的 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含选自 SEQ ID NO: 113 的序列, 识别 MUC16 分子的 VL 包含选自 SEQ ID NO: 114 的序列; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3}, 其中所述 VH_{CD3} 包含 SEQ ID NO:3 所示的序列并且 VL_{CD3} 包含 SEQ ID NO:4 所示的序列; 或

(iii) 1条结构为 VH-CH1-VH-CH1-Fc 的重链 1, 1条结构为 scFv-Fc 的重链 2, 和 2条结构为 VL-CL 的轻链, 其中 2条轻链分别与重链 1 中的 2个 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的 2个抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中识别 MUC16 分子的 VH 包含选自 SEQ ID NO: 113 的序列, 识别 MUC16 分子的 VL 包含选自 SEQ ID NO: 114 的序列; 识别 CD3 分子的 scFv 包含 VH_{CD3} 和 VL_{CD3}, 其中所述 VH_{CD3} 包含 SEQ ID NO:3 所示的序列并且 VL_{CD3} 包含 SEQ ID NO:4 所示的序列。

11. 实施方案 8-10 中任一项所述的抗 CD3× MUC16 双特异性抗体, 其中所包含的 2个识别 MUC16 分子的抗原识别位点可以具有相同的 VH/VL 序列, 或不同的 VH/VL 序列。

12. 实施方案 8-11 中任一项所述的抗 CD3× MUC16 双特异性抗体, 其中所述 Fc 区选自

IgG 类抗体的 Fc 区, 例如来自同种型 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 区, 优选地所述 Fc 区包含突变, 例如增加双特异性抗体二聚体稳定性的突变 (例如杵入白结构)、减少或者增加效应子功能的突变。

13. 实施方案 8-12 中任一项所述的抗 CD3×MUC16 双特异性抗体, 其中所述 scFv 通过接头与 Fc 或 CH1 连接, 例如柔性肽接头。

14. 实施方案 8-13 中任一项所述的抗 CD3×MUC16 双特异性抗体, 其包含:

(i) 1 条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 VH-CH1-scFv-Fc 的重链 2, 和 2 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中 2 条轻链分别与重链 1 和 2 的 VH-CH1 结构配对形成 2 个识别 MUC16 分子的抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中重链 1 包含 SEQ ID NO:118 所示的序列, 重链 2 包含 SEQ ID NO:121 所示的序列, 并且轻链包含 SEQ ID NO:116 所示的序列。

(ii) 1 条结构为 VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 scFv-Fc 的重链 2, 和 1 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中轻链与重链 1 的 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中重链 1 包含 SEQ ID NO:118 所示的序列, 重链 2 包含 SEQ ID NO:117 所示的序列, 并且轻链包含 SEQ ID NO:116 所示的序列; 或

(iii) 1 条结构为 VH-CH1-VH-CH1-Fc 的重链 1, 1 条结构为 scFv-Fc 的重链 2, 和 2 条结构为 VL-CL 的轻链, 其中 2 条轻链分别与重链 1 中的 2 个 VH-CH1 结构配对形成识别 MUC16 分子的 2 个抗原识别位点, scFv 形成识别 CD3 分子的抗原识别位点, 其中重链 1 包含 SEQ ID NO:119 所示的序列, 重链 2 包含 SEQ ID NO:117 所示的序列, 并且轻链包含 SEQ ID NO:116 所示的序列。

15. 一种编码如实施方案 1-2 或 6-7 中任一项所述的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段, 编码如实施方案 3-6 中任一项所述的抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段, 或编码如实施方案 8-13 中任一项所述的抗 CD3×MUC16 双特异性抗体的核酸。

16. 包含实施方案 15 所述核酸的载体, 优选地所述载体是表达载体。

17. 包含实施方案 15 所述核酸或实施方案 16 所述载体的宿主细胞。

18. 一种用于产生如实施方案 1-2 或 6-7 中任一项所述的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段, 如实施方案 3-6 中任一项所述的抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段, 或如实施方案 8-13 中任一项所述的抗 CD3×MUC16 双特异性抗体的方法, 包括步骤:

(i) 在适于表达本发明抗 CD3 抗体、抗 MUC16 或抗 CD3×MUC16 双特异性抗体的条件下培养本发明的宿主细胞, 任选地,

(ii) 回收本发明的抗 CD3 抗体、抗 MUC16 或抗 CD3×MUC16 双特异性抗体。

19. 一种药物组合物, 其包含如实施方案 1-2 或 6-7 中任一项所述的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段, 如实施方案 3-6 中任一项所述的抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段, 或如实施方案 8-13 中任一项所述的抗 CD3×MUC16 双特异性抗体, 以及可药用载体。

20. 实施方案 19 所述的药物组合物, 其还包含其它治疗剂, 优选地, 所述其它治疗剂选自化疗剂、细胞毒性剂。

21. 如实施方案 1-2 或 6-7 中任一项所述的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段, 如实施方案 3-6 中任一项所述的抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段, 或如实施方案 8-13 中任一项所述的抗 CD3×MUC16 双特异性抗体或如实施方案 19-20 中任一项所述的药物组合物在制备用于治疗、预防和/或诊断卵巢癌症的药物中的用途。

22. 一种治疗、预防和/或诊断卵巢癌症的方法, 包括将治疗有效量或诊断有效量的如实施方案 1-2 或 6-7 中任一项所述的抗 CD3 抗体或其抗原结合片段, 如实施方案 3-6 中任一项所述的抗 MUC16 抗体或其抗原结合片段, 或如实施方案 8-13 中任一项所述的抗 CD3×MUC16 双特异性抗体、或如实施方案 19-20 中任一项所述的药物组合物施用给有需要的受试者。

23 实施方案 21 所述的用途或实施方案 22 所述的方法, 其中所述卵巢癌症是卵巢癌, 例如是浆液性卵巢癌, 例如卵巢浆液性囊腺癌、卵巢癌浆液性腺癌、卵巢癌粘液腺癌、子宫内膜样腺癌、卵巢癌透明细胞腺癌。

在一些方面, 本发明涉及以下具体的实施方案:

1、抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区 VH 的 3 个 CDR, HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 以及轻链可变区 VL 的 3 个 CDR, LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 其中

(i) 所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 选自如 SEQ ID NO: 62、38 或 40 中任一项所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3; 且所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 为如 SEQ ID NO: 63 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3;

(ii) 所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 选自如 SEQ ID NO: 72 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3; 且所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 为如 SEQ ID NO: 73 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 或

(iii) 所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 选自如 SEQ ID NO: 82 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3; 且所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 为如 SEQ ID NO: 83 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

2、抗 GPRC5D 抗体或其抗原结合片段, 其包含

(i) 如 SEQ ID NO:64 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO:65、39 或 41 所示的 HCDR2、如 SEQ ID NO:66 所示的 HCDR3; 如 SEQ ID NO:67 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO:68 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:69 所示的 LCDR3;

(ii) 如 SEQ ID NO:74 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO:75 所示的 HCDR2、如 SEQ ID NO:76 所示的 HCDR3; 如 SEQ ID NO:77 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO:78 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:79 所示的 LCDR3;或

(iii) 如 SEQ ID NO:84 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO:85 所示的 HCDR2、如 SEQ ID NO:86

所示的 HCDR3; 如 SEQ ID NO:87 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO:78 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:88 所示的 LCDR3。

3、实施方案 1 或 2 的抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区 VH, 其中所述重链可变区

(i)包含与 SEQ ID NO: 62、72、82、16、23、25、27、29、38 或 40 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 62、72、82、16、23、25、27、29、38 或 40 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

4、实施方案 1-3 中任一项的抗体或其抗原结合片段, 其包含轻链可变区 VL, 其中所述轻链可变区

(i)包含与 SEQ ID NO:63、73、83、17、19 或 21 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 63、73、83、17、19 或 21 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

5、实施方案 1 或 2 的抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL, 其中

(i)所述重链可变区包含 SEQ ID NO:62 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;且所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:63 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii)所述重链可变区包含 SEQ ID NO:72 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;且所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:73 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(iii)所述重链可变区包含 SEQ ID NO:82 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;且所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:83 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或

(iv)所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 16、23、25、27、29、38 或 40 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;且所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 17、19 或 21 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

6、实施方案 1 或 2 的抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL, 其中 VH 和 VL 分别包含如下所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成:

(i). SEQ ID NO:62 和 SEQ ID NO:63;

- (ii). SEQ ID NO:72 和 SEQ ID NO:73;
- (iii). SEQ ID NO:82 和 SEQ ID NO:83;
- (iv). SEQ ID NO:16、23、25、27、29、38 或 40 和 SEQ ID NO:21;
- (v). SEQ ID NO:16 或 25 和 SEQ ID NO:17;
- (vi). SEQ ID NO:16 或 27 和 SEQ ID NO:19。

7、实施方案 1-6 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其还包含重链恒定区 HC，例如，所述抗体重链恒定区 HC 为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的重链恒定区，优选的 IgG1 的重链恒定区。

8、实施方案 7 的抗体或其抗原结合片段，其包含

(i)包含与选自 SEQ ID NO: 45 或 48 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 45 或 48 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

9、实施方案 7 或 8 的抗体或其抗原结合片段，其中所述重链恒定区包含降低与 Fcγ受体结合的突变，例如 LALA 突变、D265A 突变和/或 P329A 突变，优选地包含 LALA 突变和 D265A 和 P329A 突变。

10、实施方案 1-9 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其包含轻链恒定区，例如所述轻链恒定区为 lambda 或 kappa 轻链恒定区。

11、实施方案 10 的抗体或其抗原结合片段，其中所述轻链恒定区

(i)包含与选自 SEQ ID NO:47 或 50 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 47 或 50 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

12、实施方案 1-11 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其包含重链，其中所述重链包含 SEQ ID NO:60、70、80、14、22、24、26 或 28 的氨基酸序列，或包含与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

13、实施方案 1-12 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其包含轻链，其中所述轻链包含 SEQ ID NO:61、71、81、15、18 或 20 的氨基酸序列，或包含与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

14、实施方案 12 或 13 所述的抗体或其抗原结合片段，其包含重链和轻链，其中

(i) 所述重链包含 SEQ ID NO:60 的氨基酸序列，或包含与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；且所述轻链包含 SEQ ID NO:61 的氨基酸序列，或包含与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

(ii) 所述重链包含 SEQ ID NO:70 的氨基酸序列,或包含与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;且所述轻链包含 SEQ ID NO:71 的氨基酸序列,或包含与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;

(iii) 所述重链包含 SEQ ID NO:80 的氨基酸序列,或包含与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;且所述轻链包含 SEQ ID NO:81 的氨基酸序列,或包含与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;

(iv) 所述重链包含 SEQ ID NO: 14、22、24、26 或 28 所示的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成,且所述轻链包含 SEQ ID NO: 15、18 或 20 所示的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;

(v) 所述重链包含 SEQ ID NO: 14 或 24 所示的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成,且所述轻链包含 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;

(vi) 包含如下 SEQ ID NO: 14 或 26 所示的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成,且所述轻链包含 SEQ ID NO: 18 所示的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成;

(vii) 包含如下 SEQ ID NO: 14、22、24、26 或 28 所示的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成,且所述轻链包含 SEQ ID NO: 20 所示的氨基酸序列,或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成。

15、实施方案 14 所述的抗体或其抗原结合片段,其包含重链和轻链,其中所述重链和轻链分别包含如下 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列,或由所述如下 SEQ ID NO 所示的氨基酸序列组成:

- (i). SEQ ID NO:60 和 SEQ ID NO:61;
- (ii). SEQ ID NO:70 和 SEQ ID NO:71;
- (iii). SEQ IDNO:80 和 SE QI DNO:81;
- (iv). SEQ ID NO: 14 或 24 和 SEQ ID NO:15;
- (v). SEQ ID NO: 14 或 26 和 SEQ ID NO:18;

(vi). SEQ ID NO: 14、22、24、26 或 28 和 SEQ ID NO:20。

16、实施方案 1-15 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体为人源化抗体或嵌合抗体。

17、实施方案 1-16 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体为单克隆抗体。

18、实施方案 1-17 中任一项所述的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗原结合片段为选自以下的抗体片段：Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体(例如 scFv)、(Fab')₂、单结构域抗体例如 VHH、dAb(domain antibody)或线性抗体。

19、实施方案 1-6 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是双特异性抗体或多特异性抗体，其包含针对 GPRC5D 的第一结合特异性和针对一种或多种的分子的其它结合特异性。

20、实施方案 19 的抗体或其抗原结合片段，其为双特异性抗体，其包含针对 GPRC5D 的第一结合特异性和针对 CD3 的第二结合特异性。

21、实施方案 20 的双特异性抗体，其包含第一抗原结合区和第二抗原结合区，

其中第一抗原结合区特异性结合 GPRC5D，且包含 VH 和 VL，其中

所述 VH 包含如实施方案 1 或 2 所定义的 HCDR1、HCDR2、HCDR3 且所述 VL 包含实施方案 1 或 2 所定义的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

所述 VH 和 VL 为如实施方案 3-6 中任一项所定义的 VH 和 VL；

第二抗原结合区特异性结合 CD3。

22、实施方案 21 所述的双特异性抗体，其中所述第二抗原结合区包含 VH 和 VL，所述 VH 包含 3 个来自重链可变区的互补决定区（HCDR），HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且所述 VL 包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区（LCDR），LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中

(i) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 选自如 SEQ ID NO:3 中任一项所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 选自如 SEQ ID NO:4 中任一项所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

(ii) HCDR1 由 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列组成，HCDR2 由 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列组成，HCDR3 由 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列组成，LCDR1 由 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列组成，LCDR2 由 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列组成，且 LCDR3 由 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列组成。

23、实施方案 22 所述的双特异性抗体，其中第二抗原结合区包含 VH 和 VL，其中

所述 VH 含有 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，

和/或所述 VL 含有 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

24、实施方案 21-23 中任一项的双特异性抗体，其中所述第一抗原结合区为实施方案 1-18 中任一项所定义的抗 GPRC5D 抗体的 Fab。

25、实施方案 24 所述的双特异性抗体,所述 Fab 包含 CH1,其中所述 CH1 是来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 CH1,优选地来自 IgG1 的 CH1。

26、实施方案 25 所述的双特异性抗体,其中所述 CH1 包含(i)包含与选自 SEQ ID NO:44 的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或

(ii) 包含选自 SEQ ID NO: 44 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

27、实施方案 21-26 中任一项所述的双特异性抗体,其中所述第二抗原结合区为 scFv。

28、实施方案 27 所述的双特异性抗体,其中所述 scFv 包含接头,所述接头例如包含氨基酸序列(G4S)_n,其中 n=1,2,3,4 或 5,优选地,n=3 或 4,更优选地,n=3。

29、实施方案 21-28 中任一项所述的双特异性抗体,其中所述双特异性抗体是包含 Fc 二聚体的 IgG 样双特异性抗体,其中构成所述 Fc 二聚体的两个 Fc 区相同或不同。

30、实施方案 29 所述的双特异性抗体,其中所述 Fc 区之一或二者包含降低与 Fcγ受体结合的突变,例如包含 L234A/L235A 突变、D265A 突变或 P329A 突变中的一个或多个,例如包含 L234A/L235A 突变、D265A 突变和 P329A 突变。

31、实施方案 30 所述的双特异性抗体,其中所述 Fc 区之一或二者包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 46 或 49 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%同一性,例如 95%,96%,97%,99%或更高的同一性的氨基酸序列或由其组成。

32、实施方案 29-31 中任一项所述的双特异性抗体,其中所述两个 Fc 区不同,优选地,在第一单体 Fc 区和第二单体 Fc 区中分别引入相应的结(knob)突变和扣(Hole)突变。

33、实施方案 32 所述的双特异性抗体,其中

a) 一个 Fc-区多肽包含结突变 T366W,而另一个 Fc-区多肽包含扣突变 T366S、L368A 和 Y407V,或

b) 一个 Fc-区多肽包含结突变 T366W 和 Y349C,而另一个 Fc-区多肽包含扣突变 T366S、L368A、Y407V 和 S354C,或

c) 一个 Fc-区多肽包含结突变 T366W 和 S354C,而另一个 Fc-区多肽包含扣突变 T366S、L368A、Y407V 和 Y349C;

任选地,所述 Fc 区还包含降低与 Fcγ受体结合的突变,例如, L234A/L235A 突变、D265A 突变或 P329A 突变中的一个或多个;例如 L234A/L235A 突变、D265A 突变和 P329A 突变。

34、实施方案 29-33 中任一项所述的双特异性抗体,其中所述 Fc 区之一或二者包含铰链区,例如 EPKSS 或 EPKSC。

35、实施方案 33 所述的双特异性抗体,其中

(i) 第一 Fc 区包含结突变,其

a) 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 43 或 89 或由其组成;或

b) 包含与 SEQ ID NO: 43 或 89 具有至少 90%同一性,例如 95%,96%,97%,99%或更高的

同一性且包含 L234A/L235A 突变、D265A 突变和 P329A 突变和结突变(例如 S354C 和 T366W) 的氨基酸序列或由其组成; 和/或

(ii) 第二 Fc 区包含扣突变, 其

a) 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:30、42 或 59 或由其组成; 或

b) 包含与 SEQ ID NO: 30、42 或 59 具有至少 90%同一性, 例如 95%, 96%, 97%, 99%或更高的同一性且包含 L234A/L235A 突变、D265A 突变和 P329A 突变和扣突变(例如 Y349C, T366S, L368A 和 Y407V) 的氨基酸序列或由其组成。

36、实施方案 21-35 中任一项的双特异性抗体, 其包含第一抗原结合区、第二抗原结合区和 Fc 二聚体, 其中第一抗原结合区为特异性结合 GPRC5D 的 Fab 片段, 第二抗原结合区为特异性结合 CD3 的 scFv。

37、实施方案 36 的双特异性抗体, 其包含一个第一抗原结合区 Fab, 一个第二抗原结合区 scFv 和 Fc 二聚体, 其中所述 Fab 包含 VH-CH1 和 VL-CL, 所述 scFv 包含 VH-接头-VL, Fc 二聚体中的一个 Fc 区包含扣突变, 且另一个包含结突变; 其中

包含扣突变的 Fc 区构成第一重链;

所述 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合至所述 scFv 片段的 VH 的 N 末端, 且所述 scFv 片段的 VL 的 C 末端融合至包含结突变的 Fc 区的 CH2 或铰链区, 构成第二重链;

且

所述 Fab 片段的 VL-CL 构成轻链。

38、实施方案 37 所述的双特异性抗体, 其中所述

第一重链包含 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列, 或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列, 或由所述序列组成;

第二中重链包含 SEQ ID NO:31、34 或 35 所示的氨基酸序列, 或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列, 或由所述序列组成; 和/或

轻链包含 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列, 或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列, 或由所述序列组成。

39、实施方案 36 的双特异性抗体, 其包含两个第一抗原结合区 Fab, 一个第二抗原结合区 scFv 和 Fc 二聚体, 其中所述 Fab 包含 VH-CH1 和 VL-CL, 所述 scFv 包含 VH-接头-VL, Fc 二聚体中的一个 Fc 区包含扣突变且另一个包含结突变;

第一 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合至包含扣突变的 Fc 区的 CH2 或铰链区构成第一重链;

第二 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合至所述 scFv 片段的 VH 的 N 末端, 且所述 scFv 片段的 VL 的 C 末端融合至包含结突变的 Fc 区的 CH2 或铰链区, 构成第二重链;

且

所述第一和第二 Fab 片段的 VL-CL 分别构成两条轻链；

其中所述第一 Fab 和第二 Fab 片段相同或不同。

40、实施方案 39 的双特异性抗体，其中

(i) 第一重链包含 SEQ ID NO:33 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；

第二中重链包含包含 SEQ ID NO:31 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；和/或

轻链包含 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；

(ii) 第一重链包含 SEQ ID NO: 32 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；

第二中重链包含包含 SEQ ID NO: 34 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；和/或

轻链包含 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；或

(iii) 第一重链包含 SEQ ID NO:36 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；

第二中重链包含包含 SEQ ID NO:35 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；和/或

轻链包含 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成。

41. 利要求 36 的双特异性抗体，其包含一个第一抗原结合区 Fab，一个第二抗原结合区 scFv 和 Fc 二聚体，其中所述 Fab 包含 VH-CH1 和 VL-CL，所述 scFv 包含 VH-接头-VL，Fc 二聚体中的一个 Fc 区包含扣突变且另一个包含结突变；

所述 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合至包含扣突变的 Fc 区的 CH2 或铰链区构成第一重链；

所述 scFv 片段的 VL 的 C 末端融合至包含结突变的 Fc 区的 CH2 或铰链区，构成第二重链；

且

所述 Fab 片段的 VL-CL 构成轻链。

42. 实施方案 41 的双特异性抗体，其中

第一重链包含 SEQ ID NO:32、33 或 36 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；

第二中重链包含包含 SEQ ID NO:37 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成；和/或

轻链包含 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列，或与所述氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的同一性的氨基酸序列，或由所述序列组成。

43. 核酸分子，其编码实施方案 1-20 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段的任一条链，或实施方案 21-42 中任一项的双特异性抗体中的任一条链，或由所述核酸序列组成。

44. 表达载体，其包含实施方案 43 的核酸分子，优选地，所述表达载体为 pCDNA，例如 pCDNA3.1。

45. 宿主细胞，其包含实施方案 43 所述的核酸分子或实施方案 44 所述的表达载体，优选地，所述宿主细胞是原核的或真核的，例如 293 细胞或 CHO 细胞，例如 293F 细胞或 293T 细胞或 CHO-S 细胞。

46. 制备实施方案 1-20 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或实施方案 21-42 中任一项所述的双特异性抗体的方法，所述方法包括，在适合所述抗体的链表达的条件下，培养实施方案 43 所述的核酸分子或实施方案 44 所述的表达载体的宿主细胞，和任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述抗体。

47. 免疫缀合物，其包含实施方案 1-20 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或实施方案 21-42 中任一项所述的双特异性抗体。

48. 药物组合物或药物或制剂，其包含实施方案 1-20 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或实施方案 21-42 中任一项所述的双特异性抗体，或实施方案 47 的免疫缀合物以及任选地药用辅料。

49. 药物组合产品，其包含实施方案 1-20 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或实施方案 21-42 中任一项所述的双特异性抗体，或实施方案 47 的免疫缀合物，以及一种或多种其它治疗剂（例如化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂）。

50. 在受试者中预防或治疗癌症的方法，包括向受试者施用有效量的实施方案 1-20 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或实施方案 21-42 中任一项所述的双特异性抗体，或实施方案 47 的免疫缀合物，或实施方案 48 的药物组合物或制剂；或实施方案 49 的药物组合产品。

51. 实施方案 50 的方法，其中所述癌症的肿瘤细胞中具有升高的 GPRC5D 的蛋白质水平和/或核酸水平（例如表达升高）。

52. 实施方案 50 或 51 的方法，其中所述癌症是实体肿瘤或血液肿瘤，例如骨髓瘤、结肠癌、直肠癌或结直肠癌。

- 53、实施方案 50-52 中任一项的方法，其中所述方法还包括与其它疗法例如治疗方式（例如手术或放疗）和/或其它治疗剂（例如化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂）组合施用。
- 54、检测 GPRC5D 在生物样品中的存在的方法，其包括
- (i) 将生物样品与实施方案 1-20 中任一项的所述的抗体或其抗原结合片段或实施方案 21-42 中任一项所述的双特异性抗体在允许其与 GPRC5D 结合的条件下接触，
- (ii) 检测在该抗体或双特异性抗体和 GPRC5D 之间是否形成复合物，
- 其中复合物的形成表示存在 GPRC5D。

实施例

实施例 1：人源化 CD3 抗体的制备和表征

1.1 CD3 抗体人源化准备

SP34 抗体是特异性结合 CD3epsilon 亚基（CD3ε）的鼠源抗体，其与人、猴具有种属交叉活性(Pessano, S., et al. (1985). "The T3/T cell receptor complex: antigenic distinction between the two 20-kd T3 (T3-delta and T3-epsilon) subunits." EMBO J 4(2): 337-344.)。本实施例以抗体 SP34 作为候选分子进行人源化的构建。

采用 CDR 移植技术（CDR grafting technology）对鼠抗 SP34 进行人源化。简言之：通过将上述 SP34 VH 及 SP34 VL 序列在 IMGT 数据库中检索比对，分别获得与 SP34 重链可变区和轻链可变区同源性较高的人胚系基因序列 IGHV3-73*01 和 IGLV7-46*01，将其作为人源化抗体可变区的框架；分别将鼠抗 SP34 的 CDR 移植到相应的人源化抗体重轻链可变区框架中，形成人源化的抗 CD3 抗体可变区。为了维持鼠源抗体 SP34 的亲合力，需要对获得的人源化抗体可变区进行回复突变。

由此分别获得了 SP34 抗体的人源化重链可变区序列（hu34H1）和轻链可变区序列（hu34L2），并进而获得了 SP34 抗体人源化抗体，具体序列参见表 1。

表 1：人源化抗 CD3 抗体的序列（CDR 序列均采用 Kabat 编码方式）

名称	SEQ ID NO
人源化 SP34 抗体 hu34 的重链 hu34H1	1
人源化 SP34 抗体 hu34 的轻链 hu34L2	2
人源化 SP34 抗体 hu34 的重链可变区 VH（hu34H1）	3
人源化 SP34 抗体 hu34 的轻链可变区 VL（hu34L2）	4
HCDR1	5
HCDR2	6
HCDR3	7
LCDR1	8

LCDR2	9
LCDR3	10

人源化的对照抗体 (Roche-CD3/017-Roche-CD3) 序列来自专利 US 2016/0075785 A1, 其重链氨基酸序列为 SEQ ID NO: 51, 轻链为 SEQ ID NO:52, 具体参见序列表。

将表 1 以及对照抗体 Roche-CD3 的可变区氨基酸序列送至通用生物系统(安徽)有限公司 (General Biology System (Anhui) Co., Ltd.) 进行密码子优化和基因合成。将编码 Roche-CD3 抗体的 VH 区和 VL 区的基因依次插入含有人 IgG1 重链恒定区(氨基酸序列 SEQ ID NO:45) 编码基因和 lambda 轻链恒定区(氨基酸序列 SEQ ID NO:47) 编码基因的表达式载体 pcDNA3.1(+) 中, 以获得表达抗 CD3 人源化抗体 017-2 全长重链 hu34H1 (SEQ ID NO:1) 的质粒和表达全长轻链 hu34L2 (SEQ ID NO:2) 的质粒。同时将合成的 VH 区 (hu34H1) 和 VL 区 (hu34L2) 通过(G4S)₃ 连接肽 SEQ ID NO:12 组成单链抗体 23L2 (23L2ScFv) (SEQ ID NO:11), 插入含有人 IgG1 重链恒定区 Fc 区(氨基酸序列 SEQ ID NO:46) 编码基因的表达式载体 pcDNA3.1(+) 中, 获得表达 DA023AH23L2 (scFv-Fc) (SEQ ID NO: 13) 的质粒。使用的重链恒定区均含有 L234A, L235A, D265A 和 P329A (根据 Eu 编码) 位点的突变, 以消除效应功能。

单链抗体 (23L2) 命名为 23L2ScFv, 氨基酸序列如下 SEQ ID NO:11 所示。合成的包含恒定区 Fc 结构域的抗 CD3 单链抗体命名为 DA023AH23L2 (VH-连接肽-VL-Fc), 其序列为 SEQ ID NO:13, 其中 VH-连接肽-VL 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:11, Fc 区的氨基酸序列为 SEQ ID NO:46。

依据制造商产品手册说明, 使用 ExpiCHO™ 表达系统 (ThermoFisher, Cat#A29133) 将上文获得的质粒共转染 ExpiCHO-S 细胞表达对照抗体 Roche-CD3、017-2 及 DA023AH23L2。转染后培养细胞 10-12 天, 当细胞存活率下降到 60% 至 70% 时, 收集上清液, 使用 MabSelect Sure 蛋白 A 亲和层析系统 (GE healthcare) 纯化表达在上清液中的抗体。浓缩纯化的抗体, 无菌过滤, 通过 SDS-PAGE 和分子排阻检测抗体蛋白的纯度, 结果表明抗体的纯度符合要求, 可以用于下一步实验。

1.2 检测人源化 CD3 抗体的激活作用

采用 Jurkat/NFAT-luc (荧光素酶) 报告基因系统检测 CD3 抗体的激活作用。按照厂商说明, 通过 Gene Pulser X Cell™ (BIO-RAD) 电转方式将 NFAT-luc2P (质粒: Promega, Cat# E8481) 中的报告基因元件转染到 Jurkat (中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, Cat# SCSP-513) 细胞中, 然后用潮霉素 B (Invitrogen, Cat#10687010) 筛选得到 NFAT-luc2P 多克隆细胞株, 多克隆细胞有限稀释后得到稳定且高表达 NFAT-luc2P 的单克隆细胞株。

Jurkat/NFAT-luc。

收集细胞，离心后去上清，用测试缓冲液 (99%1640 培养基 +1%FBS)重悬细胞，使得细胞密度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 。接种细胞于 384 孔板(Corning, Cat#3570)中，每孔 40 μl 。然后加入梯度系列稀释的人源化抗 CD3 抗体 DA023AH23L2、Roche-CD3 (终浓度为起始 20 nM, 3 倍稀释, 8 个梯度), 每孔 10 μl 。将 384 孔板放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中, 6 小时后, 每孔加入 30 μl One-Glo (Promega, Cat#E6130)试剂, 最后用多功能酶标仪(Tecan Infinite F200PRO)检测发光信号, 荧光素酶的表达情况直接反映了 CD3 抗体的激活作用。结果如图 1 所示, 表明 017-2 和 DA023AH23L2 有激活作用。

实施例 2: 免疫原

由于难以产生重组的 GPRC5D 抗原, 使用标准方法产生 GPRC5D[human 和 cyno]的转染细胞系, 以用作全细胞抗原用于抗体产生和表征研究(表 2)。

人 GPRC5D 蛋白 (NP_061124.1(NCBI 序列号), sp|Q9NZD1 (Uniprot 序列号), SEQ ID NO:57) 基因序列由通用生物系统 (安徽) 有限公司进行密码子优化和基因合成。使用 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Cat#11668019) 转染试剂将编码人 GPRC5D 蛋白基因序列分别转染到 CHO-K1 (ACTT, Cat#CCL-61) 和 HEK293T (中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, Cat# SCSP-502) 细胞中。食蟹猴 GPRC5D 蛋白 (XP_005570249.2(NCBI 序列号), SEQ ID NO:58) 基因序列由通用生物系统 (安徽) 有限公司进行密码子优化和基因合成。使用 Lipofectamine™ 2000 将编码食蟹猴 GPRC5D 蛋白基因序列转染到 HEK293T 细胞中。转染后的细胞经过 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素 (Gibco, Cat#A1113802) 筛选和单克隆铺板, 得到了高表达人 GPRC5D 的 CHO-K1 (CHO-K1-HuGPRC5D) 和 HEK293T 工程化单克隆细胞 (HEK293T-HuGPRC5D) 以及高表达食蟹猴的 GPRC5D 的 HEK293T 多克隆细胞 (HEK293T-CynoGPRC5D) (表 2)。编码人 GPRC5D 和食蟹猴 GPRC5D 蛋白的氨基酸序列见序列表。

表 2: GPRC5D 表达型细胞系

	蛋白质	细胞系	启动子	抗性
CHO-K1-HuGPRC5D 细胞系	HuGPRC5D	CHO-K1	CMV	嘌呤霉素
HEK293T-HuGPRC5D 细胞系	HuGPRC5D	HEK293T	CMV	嘌呤霉素
HEK293T-CynoGPRC5D	CynoGPRC5D	HEK293T	CMV	嘌呤霉素

实施例 3. 抗人 GPRC5D 抗体的产生

3.1 杂交瘤

3.1.1 动物免疫

采用 CHO-K1-HuGPRC5D 细胞系（表 2）免疫 5 只 BALB/c 小鼠（浙江维通利华实验动物技术有限公司）。对小鼠进行两周一次为期四次的交替注射（表 3）。分别在第一次免疫后 7 天和第二次加强免疫后 7 天对小鼠进行静脉采血，采用 HEK293T-HuGPRC5D 细胞系和 HEK293T-CynoGPRC5D 细胞系（表 2）对小鼠免疫血清进行流式细胞术（FACS）测定，选择两只小鼠用于动物融合。在最后一次加强免疫后四天，取小鼠脾脏，将从脾脏中分离的淋巴细胞用于融合以产生杂交瘤。

表 3. 小鼠免疫程序

步骤	给药方式	剂量
Primary Immunization	皮下注射	5*10 ⁶ CHO-K1-HuGPRC5D 细胞/只
1st Boost	腹腔注射	5*10 ⁶ CHO-K1-HuGPRC5D 细胞/只
2nd Boost	皮下注射	5*10 ⁶ CHO-K1-HuGPRC5D 细胞/只
Final Boost	腹腔注射	5*10 ⁶ CHO-K1-HuGPRC5D 细胞/只

3.1.2 杂交瘤筛选

来自 249 个杂交瘤的组织培养上清液通过 FACS 检测法 进行初级筛选测试,在此测定中,选取对 HEK293T-HuGPRC5D 细胞系或 HEK293T-CynoGPRC5D 细胞系有结合的 31 个克隆进行下一轮确认测试。利用筛选的抗原再测试阳性培养物以确认分泌。

3.1.3 亚克隆

将选择的杂交瘤细胞系(亲本克隆)亚克隆以确保单克隆性。通过使用单步克隆系统再次铺板亲本克隆来进行亚克隆。将 24 个亚克隆转移至 96 孔培养板。通过 FACS 法筛选亚克隆,筛选同时结合 HuGPRC5D 和 CynoGPRC5D 的抗体。

3.1.4 杂交瘤测序

通过聚合酶链式反应(PCR)扩增技术获得鼠源抗 GPRC5D 抗体轻链和重链可变区序列。用 RNAprep pure Cell Kit(TIANGEN, Cat#DP430)分离 24 个抗体的总 RNA,用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo, K1622)反转录成 cDNA。用 PCR 方法克隆了重链和轻

链可变区，所有 PCR 均采用高保真聚合酶进行。将 PCR 扩增到的抗体重链和轻链可变域序列片段送到苏州金唯智生物科技有限公司进行测序。测定编码生成的抗体的轻链可变域和重链可变域的氨基酸序列，抗体的 Kabat 轻链和重链可变区序列示于表 4 中。

表 4: 抗 GPRC5D 抗体的重链可变区和轻链可变区氨基酸序列

抗体名称	29H12C9	4B9E9	39A9F1
VH	SEQ ID NO:62	SEQ ID NO:72	SEQ ID NO:82
VL	SEQ ID NO:63	SEQ ID NO:73	SEQ ID NO:83
HCDR1	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:74	SEQ ID NO:84
HCDR2	SEQ ID NO:65	SEQ ID NO:75	SEQ ID NO:85
HCDR3	SEQ ID NO:66	SEQ ID NO:76	SEQ ID NO:86
LCDR1	SEQ ID NO:67	SEQ ID NO:77	SEQ ID NO:87
LCDR2	SEQ ID NO:68	SEQ ID NO:78	SEQ ID NO:78
LCDR3	SEQ ID NO:69	SEQ ID NO:79	SEQ ID NO:88

实施例 4: 通过杂交瘤技术获得的 GPRC5D 抗体的表征

4.1 抗 GPRC5D 嵌合抗体的合成与表达

表 4 中 3 个鼠源抗体的 DNA 序列由通用生物系统(安徽)有限公司进行密码子优化和基因合成。将编码抗体的 VH 区和 VL 区的基因依次插入含有编码人 IgG1 重链恒定区 (SEQ ID NO:48) 和 kappa 轻链恒定区(SEQ ID NO:50)的基因的表达式载体 pcDNA3.1(+)中以获得鼠源嵌合抗体。

人源化的对照抗体 GPRC5D (克隆号 GC5B596, 重链氨基酸序列为 SEQ ID NO:55, 轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO:56)和 CD3(克隆号 CD3B219, 重链氨基酸序列为 SEQ ID NO:53, 轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO:54) 序列来自专利 WO2018017786A2。

将编码抗 GPRC5D 抗体的重轻链的质粒共转染 ExpiCHO-S 细胞以表达如表 5 所述鼠源嵌合抗体及对照抗体 GC5B596 和 CD3B219, 并进行相应纯化。依据制造商产品手册说明, 使用 ExpiCHO™表达系统 (ThermoFisher, Cat#A29133) 将表 5 所述的编码抗 GPRC5D 抗体的重轻链的质粒共转染 ExpiCHO-S 细胞以表达抗 GPRC5D 嵌合抗体, 以及类似的表达对照抗体 GC5B596 和 CD3B219。转染后培养细胞 10-12 天, 当细胞存活率下降到 60%至 70%时, 收集上清液, 使用 MabSelect Sure 蛋白 A 亲和层析系统(GE healthcare)纯化表达在上清液中的抗体。浓缩纯化的抗体, 无菌过滤, 通过 SDS-PAGE 和分子排阻检测抗体蛋白的纯度, 结果

表明抗体的纯度>90%，可以用于下一步实验。

表 5: 嵌合抗体名称以及对应重轻链的组合

嵌合抗体名称	重链	轻链
29H12C9	29H12C9 VH-IgG1(SEQ ID NO:60)	29H12C9 VL-kappa(SEQ ID NO:61)
4B9E9	4B9E9 VH-IgG1(SEQ ID NO:70)	4B9E9 VL-kappa(SEQ ID NO:71)
39A9F1	39A9F1 VH-IgG1(SEQ ID NO:80)	39A9F1 VL-kappa(SEQ ID NO:81)

4.2 抗 GPRC5D 嵌合抗体与表达人 GPRC5D 蛋白或食蟹猴 GPRC5D 蛋白的细胞结合

通过细胞结合实验来判断本发明中的抗 GPRC5D 嵌合抗体能否与稳定表达在细胞表面的人 GPRC5D 蛋白或食蟹猴 GPRC5D 蛋白结合。

酶解消化表 2 所示的 HEK293T-HuGPRC5D 细胞系和 HEK293T-CynoGPRC5D 后得到两种细胞的单细胞悬液，室温 400×g 离心后弃培养基。得到的细胞沉淀用 PBS 洗一遍后用梯度稀释的表 5 所示的抗 GPRC5D 嵌合抗体和对照抗体 GC5B596（初始浓度为 133.3 nM，4 倍等比梯度稀释共 8 个浓度）重悬，4℃ 孵育 30 分钟。PBS 洗细胞一遍后加入 1:200 稀释的荧光二抗 R-PE-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcγ Fragment Specific (Jackson ImmunoResearch, Cat# 109-116-098)，4℃避光孵育 30 分钟。PBS 洗细胞两遍后重悬细胞，最后用 BD Accuri C5（BD Bioscience）流式细胞仪检测二通道荧光信号。

从图 2 所示的结果可知结果显示，鼠源嵌合抗 GPRC5D 抗体可以与表达人 GPRC5D 蛋白（图 2A）和食蟹猴 GPRC5D 蛋白（图 2B）的细胞结合，嵌合抗体 29H12C9 和嵌合抗体 39A9F1 克隆结合能力优于对照抗体(GC5B596)和细胞的结合。

实施例 5：鼠源抗 GPRC5D 抗体人源化及其表征

5.1 鼠源抗 GPRC5D 抗体人源化

对抗体 29H12C9 进行人源化，方法如实施例 1 所述。将 29H12C9 的序列分别在 IMGT 数据库中检索比对，分别获得与 29H12C9 重链可变区同源性较高的人胚系基因序列 IGHV1-46*01 作为重链可变区人源化框架，选择与轻链可变区同源性较高的人胚系基因序列 IGKV4-1*01 作为轻链可变区人源化框架，将 29H12C9 重轻链可变区的 CDR 移植到相应的人源化框架中，形成人源化的 29H12C9 抗体可变区。为了维持抗体 GPRC5D 的亲合力，需要对获得的人源化抗体可变区进行回复突变。

由此分别获得人源化重链可变区和人源化轻链可变区序列，表 6 列出鼠源抗体 29H12C9 人源化可变区氨基酸序列。

将可变区氨基酸序列送至通用生物系统(安徽)有限公司进行密码子优化和基因合成。将编码抗体的 VH 区和 VL 区的基因依次插入含有人 IgG1 重链恒定区(SEQ ID NO:48)编码基因

和 kappa 轻链恒定区(SEQ ID NO:50)的编码基因的表达载体 pcDNA3.1(+)中，以获得表达抗 GPRC5D 人源化抗体全长重链的质粒和编码全长轻链的质粒。表 6 列出了各个抗体的名称、可变区序列以及重链和轻链序列。

表 6: 人源化抗体名称以及对应的序列的 SEQ ID NO。

抗体名称	重链	轻链	重链可变区	轻链可变区	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
29H1	14	15	16	17	64	65	66	67	68	69
29H2	14	18	16	19						
29H3	14	20	16	21						
29H6	22	20	23	21						
29H10	24	15	25	17						
29H12	24	20	25	21						
29H20	26	18	27	19						
29H21	26	20	27	21						
29H24	28	20	29	21						

此外，还可以对抗体 CDR2 的 55 位和 56 位氨基酸进行突变，获得如下抗体：

抗体名称	重链可变区	轻链可变区	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
29H6NS (N55S 突变)	38	21	64	39	66	67	68	69
29H6GE (G56E 突变)	40	21	64	41	66	67	68	69

5.2 人源化抗 GPRC5D 抗体表达及纯化

如实施例 4.1 所述将编码重轻链的质粒组合（表 6）共转染 ExpiCHO-S 细胞以表达抗 GPRC5D 人源化抗体，并如实施例 1.1 所述进行相应纯化。浓缩纯化的抗体，无菌过滤，通过 SDS-PAGE 和分子排阻色谱（SEC）检测抗体纯度。

5.3 人源化抗 GPRC5D 抗体物理化学分析

对于获得的人源化抗 GPRC5D 抗体，通过分子排阻色谱确认了抗体的纯度。具体而言，

使用 100 mM 磷酸钠+100 mM Na₂SO₄ (pH 7.0)作为运行缓冲液,将 20 µg 抗体样品注入到 TSK G3000SWXL 柱上。运行 30 分钟。收集的流出液采用 Agilent 1220 HPLC 进行测量,并使用 OpenLAB 软件分析数据。结果表明抗体的纯度>90%,可以用于下一步实验。

5.4 人源化抗 GPRC5D 抗体与表达人 GPRC5D 蛋白的工程化细胞结合

通过细胞结合实验来判断本发明中的抗 GPRC5D 人源化抗体能否与稳定表达在细胞表面的人 GPRC5D 蛋白结合。

酶解消化表 2 所示的 HEK293T-HuGPRC5D 细胞系后得到 HEK293T-huGPRC5D 细胞的单细胞悬液,室温 400×g 离心后弃培养基。细胞沉淀用 PBS 洗一遍后用梯度稀释的抗 GPRC5D 人源化抗体和鼠源嵌合抗体 29H12C9 (初始浓度为 166.67 nM, 4 倍等比梯度稀释共 8 个浓度点)重悬,4°C 孵育 30 分钟。PBS 洗细胞一遍后加入 1:200 稀释的荧光二抗 R-PE-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcγ Fragment Specific (Jackson ImmunoResearch, Cat# 109-116-098), 4°C 避光孵育 30 分钟。PBS 洗细胞两遍后重悬细胞,最后用 Beckman Cytoflex 流式细胞仪检测二通道荧光信号。

从图 3 所示的结果可知结果显示,抗 GPRC5D 人源化抗体可以与表达人 GPRC5D 蛋白的细胞结合,抗体结合能力与鼠抗对照抗体(29H12C9)接近。

实施例 6: 抗 CD3/GPRC5D 双特异性抗体

6.1 构建双特异性抗体

本发明构建了如图 4 所示的三种不同非对称结构的双特异性抗体,其中各个双特异性抗体的抗 GPRC5D 的抗原结合区来源于上述实施例 5 产生的人源化 GPRC5D 抗体,抗 CD3 的抗原结合区来源于实施例 1 产生的人源化 CD3 抗体,双特异性抗体恒定区均包含结入扣结构(knob-in-hole, KIH) (Merchant, A. M., et al. (1998). "An efficient route to human bispecific IgG." Nat Biotechnol 16(7): 677-681.),并含有 L234A, L235A, D265A 和 P329A (根据 Eu 编码)位点的突变,以消除效应功能。这类双特异性抗体在本文中也称为“抗 CD3/GPRC5D 双特异性抗体”或“抗 CD3/抗 GPRC5D 双特异性抗体”,有时简称为“双特异性抗体分子”、“双抗”。

抗 CD3/GPRC5D 双特异性抗体的抗 GPRC5D 部分靶向表达 GPRC5D 的细胞,而抗 CD3 部分活化 T 细胞。双抗同时结合肿瘤细胞上的 GPRC5D 和 T 细胞的 CD3 有助于通过经活化的 T 细胞定向杀伤肿瘤细胞。

本发明使用标准构建方法获得了如图 4 所示结构的三种抗 CD3/GPRC5D 双特异性抗体,其氨基酸序列在下表 7 中列出。其中双特异性抗体的重链按照从 N 端到 C 端的顺序依次以来

源序列进行命名，例如 23L2-Rknob（又名 Hu34Scfv-Rknob）表示该序列从 N 端到 C 端依次包括来源于 23L2 的 ScFv 和含有结突变的恒定区；29H6-Rhole 表示该序列从 N 端到 C 端依次包括来源于 29H6 的序列和含有扣突变的恒定区。为了消除 29H6 重链分子的翻译后修饰（PTM）位点，对 29H6 重链 55 位天冬酰胺(N)或 56 位甘氨酸（G）进行突变，分别突变为丝氨酸（S）或谷氨酸（E），突变后在分子中简称 NS 或 GE(Kabat)。

下表 7 总结了各个双特异性抗体的构建以及相关序列：

表 7: 本发明双特异性抗体分子的构建以及序列

图 4A 双特异性抗体	Bi-29H6-1	Bi-29H6-3	Bi-29H6-4
重链 1: Fc-hole 铰链区-CH2-CH3hole	SEQ ID NO:30(Fc-Rhole) 其包含铰链区 EPKSS, 和 CH2-CH3hole (SEQ ID NO:42)		
重链 2: 抗 GPRC5D VH-CH1- 抗 CD3 scFv-Fcknob 抗 GPRC5D VH CH1 抗 CD3 scFv Fcknob 铰链区-CH2-CH3knob	SEQ ID NO:31 (29H6-23L2 Rknob) 29H6-VH:SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:34 (29H6NS-23L2 Rknob) 29H6NS VH :SEQ ID NO:38 SEQ ID NO:44 SEQ ID NO:11 SEQ ID NO:43 其包含铰链区 EPKSS 和 CH2-CH3(SEQ ID NO:89)	SEQ ID NO:35 (29H6GE-23L2 Rknob) 29H6GE VH : SEQ ID NO:40
轻链: 抗 GPRC5D VL-CL 抗 GPRC5D VL	29H6-LC:SEQ ID NO:20 (29HL3) 29H6-VL:SEQ ID NO:21		
图 4B 双特异性抗体	Bi-29H6-2	Bi-29H6-5	Bi-29H6-6
重链 1: 抗 GPRC5D VH-CH1-Fc-hole 抗 GPRC5D VH CH1 Fc-hole	SEQ ID NO:33 (29H6- Rhole) 29H6-VH:SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:32 (29H6NS -Rhole) 29H6NS VH :SEQ ID NO:38 SEQ ID NO:44 SEQ ID NO:59 其包含铰链区 EPKSC, 和 CH2-CH3hole (SEQ ID NO:42)	SEQ ID NO:36 (29H6GE-Rhole) 29H6GE VH : SEQ ID NO:40
重链 2: 抗 GPRC5D VH-CH1- 抗 CD3 scFv-Fcknob 抗 GPRC5D VH	SEQ ID NO:31 (29H6-23L2 Rknob) 29H6-VH:SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:34 (29H6NS-23L2 Rknob) 29H6NS VH :SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:35 (29H6GE-23L2 Rknob) 29H6GE VH : SEQ ID NO:40

CH1 抗 CD3 scFv Fcknob 铰链区-CH2-CH3knob	SEQ ID NO:44 SEQ ID NO:11 SEQ ID NO:43 其包含铰链区 EPKSS 和 CH2-CH3(SEQ ID NO:89)		
轻 链： 抗 GPRC5D VL-CL 抗 GPRC5D VL	29H6-LC:SEQ ID NO:20 (29HL3) 29H6-VL:SEQ ID NO:21		
图 4C 抗体	Bi-29H6/23L2	Bi-29H6GE/23L2	
重 链 1： 抗 GPRC5D VH-CH1-Fc-hole	SEQ ID NO:33 (29H6-Rhole)	SEQ ID NO:36 (29H6GE-Rhole)	
抗 GPRC5D VH	29H6-VH:SEQ ID NO:23	29H6GE VH：SEQ ID NO:40	
CH1	SEQ ID NO:44		
Fc-hole	SEQ ID NO:59		
	其包含铰链区 EPKSC，和 CH2-CH3hole（SEQ ID NO:42）		
重 链 2： 抗 CD3 scFv-Fcknob 抗 CD3 scFv Fcknob 铰链区-CH2-CH3knob	SEQ ID NO:37 (23L2Scfv-Rknob) SEQ ID NO:11 SEQ ID NO:43 其包含铰链区 EPKSS 和 CH2-CH3(SEQ ID NO:89)		
轻 链： 抗 GPRC5D VL-CL 抗 GPRC5D VL	29H6-LC:SEQ ID NO:20 (29HL3) 29H6-VL:SEQ ID NO:21		

如下构建各个双特异性抗体分子的各条链：

23L2-Rknob (又名 Hu34Scfv-Rknob)：将编码抗 CD3 单链抗体 23L2 的核苷酸序列克隆到带有 Fc (Knob) 的 pcDNA3.1 (+) 载体中，表达获得 23L2-Knob 分子。

29H6-23L2-Rknob：以人源化抗 GPRC5D 抗体重链编码序列为模板扩增编码重链可变区和重链恒定区 CH1 段的核苷酸序列，并采用重叠 PCR 技术将该序列与编码完整的 23L2-Rknob 的核苷酸序列直接拼接（两段序列之间没有连接肽），将拼接完成的核苷酸序列克隆到表达载体 pcDNA3.1 (+) 载体中，表达获得 29H6-23L2-Rknob 分子。

29H6NS-23L2-Rknob：以构建好的 29H6-23L2-Knob 为模板，采用重叠 PCR 技术将第 55 位的天冬酰胺 (N) 突变为丝氨酸 (S)，并克隆到表达载体 pcDNA3.1 (+) 载体中，表达获得 29H6NS-23L2-Rknob 分子。

29H6GE-23L2-Rknob：以构建好的 29H6-23L2-Rknob 为模板，采用重叠 PCR 技术将第 56 位的甘氨酸 (G) 突变为谷氨酸 (E)，并克隆到表达载体 pcDNA3.1 (+) 载体中，表达获得 29H6GE-23L2-Rknob 分子。

29H6-Rhole: 将编码人源化抗 GPRC5D 抗体重链可变区和重链恒定区 CH1 段的核苷酸序列克隆到带有 Fc (Hole) 的 pcDNA3.1 (+) 载体中, 表达获得 29H6-Rhole 分子。

29H6NS-Rhole: 以构建好的 29H6-Rhole 为模板, 采用重叠 PCR 技术将第 55 位的天冬酰胺(N)突变为丝氨酸(S), 并克隆到表达载体 pcDNA3.1 (+)载体中, 表达获得 29H6NS-Rhole 分子。

29H6GE-Rhole: 以构建好的 29H6-Hole 为模板, 采用重叠 PCR 技术将第 56 位的甘氨酸(G)突变为谷氨酸(E), 并克隆到表达载体 pcDNA3.1 (+)载体中, 表达获得 29H6GE-Rhole 分子。

29HL3: 将编码人源化抗 29H6 抗体轻链的核苷酸序列克隆到 pcDNA3.1 (+) 载体中, 表达获得 29HL3 分子。

根据表 7 所示的具体组成, 将上述各个表达载体相应组合, 在合适的条件下表达获得图 4 中的双特异性抗体。

双特异性抗体的构建、表达、纯化、初步分析步骤同实施例 1.1 或 4.1。

6.2 双特异性抗体与表达人 CD3 蛋白、人 GPRC5D 蛋白和食蟹猴 GPRC5D 的细胞的结合实验

(1) 通过细胞结合实验来判断本发明中的抗 CD3/抗 GPRC5D 双特异性抗体能否与内源性表达在 Jurkat 细胞(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, Cat# SCSP-513)上的 CD3 蛋白结合。

本实验采用流式细胞术进行测定。离心收集 Jurkat 细胞, PBS 重悬细胞后接种至 96 孔板 (Corning, Cat#3799), 每孔 1×10^5 个细胞, 96 孔板离心后弃上清, 将 100 μ L 梯度稀释的待测双特异性抗体 (最高浓度为 166.67 nM, 4 倍等比梯度稀释, 共 8 个浓度点) 加入到 Jurkat 细胞中, 4°C 孵育 30 分钟。室温 400 $\times$ g 离心后弃上清后, 用 PBS 将细胞洗两遍后离心弃上清。细胞沉淀用 1:200 稀释的荧光二抗 R-PE-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fc γ Fragment Specific (Jackson ImmunoResearch, Cat#109-116-098)重悬, 4°C避光孵育 30 分钟。细胞用 PBS 洗两遍后每孔加入 100 μ L 的 PBS 重悬细胞, 用 Beckman Cytotflex 流式细胞仪检测荧光信号。

从图 5 所示的结果可知, 测试的双特异性抗体在高浓度下可以与 Jurkat 细胞上表达的 CD3 蛋白结合。

(2) 通过细胞结合实验来判断本发明中的抗 CD3/抗 GPRC5D 双特异性抗体能否与稳定

表达人 GPRC5D 蛋白的 HEK293T 细胞结合。流式细胞术参见上文, 将 100 μ L 梯度稀释的待测双特异性抗体 (最高浓度为 166.67 nM, 4 倍等比梯度稀释, 共 8 个浓度点) 加入到表 2 所述的 293T-huGPRC5D 细胞中, 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。室温 400 $\times$ g 离心后弃上清后, 用 PBS 将细胞洗两遍后离心弃上清。细胞沉淀用 1:200 稀释的荧光二抗 R-PE-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fc γ Fragment Specific (Jackson ImmunoResearch, Cat#109-116-098) 重悬, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 分钟。细胞用 PBS 洗两遍后每孔加入 100 μ L 的 PBS 重悬细胞, 用 Beckman Cytoflex 流式细胞仪检测荧光信号。

图 6A 和 6B 所示的结果可知, 测试的双特异性抗体可以与表达人 GPRC5D 蛋白的 HEK293T 细胞结合。

(3) 通过细胞结合实验来判断本发明中的抗 GPRC5D/CD3 双功能抗体能否与稳定表达在细胞表面的食蟹猴 GPRC5D 蛋白结合。

酶解消化表 2 所示的 HEK293T-CynoGPRC5D 细胞系后得到单细胞悬液, 室温 400 $\times$ g 离心后弃培养基。细胞沉淀用 PBS 洗一遍后用梯度稀释的表 5 所示的双功能抗体 (初始浓度为 115.6 nM, 4 倍等比梯度稀释共 8 个浓度点) 重悬, 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。PBS 洗细胞一遍后加入 1:200 稀释的荧光二抗 R-PE-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fc γ Fragment Specific (Jackson ImmunoResearch, Cat# 109-116-098), 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 分钟。PBS 洗细胞两遍后重悬细胞, 最后用 Beckman Cytoflex 流式细胞仪检测二通道荧光信号。

结果如图 6C 显示, Bi-29H6-6 能特异地结合表达食蟹猴 GPRC5D 的细胞。

(4) 抗 CD3/抗 GPRC5D 双特异性抗体与表达人 GPRC5 同家族蛋白的细胞的结合实验

GPRC5D 属于 G 蛋白偶联受体中的 GPRC5 家族成员, 同家族还有 GPRC5A、GPRC5B、GPRC5C。在本实验中分别测试了抗 GPRC5D/CD3 双功能抗体对过表达人 GPRC5A、GPRC5B、GPRC5C 的 293T 细胞结合, 以确认抗 GPRC5D/CD3 双功能抗体对 GPRC5D 的结合特异性。

酶解消化 293T-huGPRC5A、293T-huGPRC5B 和 293T-huGPRC5C 细胞系 (将人 GPRC5A (UniProtKB/Swiss-Prot: Q8NFI5)、人 GPRC5B (UniProtKB/Swiss-Prot: Q9NZH0) 和人 GPRC5C (UniProtKB/Swiss-Prot: Q9NQ84) 分别转染 293T 细胞经过 0.3 μ g/mL 嘌呤霉素 (Gibco, Cat#A1113802) 加压筛选后获得) 后得到单细胞悬液, 室温 400 $\times$ g 离心后弃培养基。细胞沉淀用 PBS 洗一遍后用梯度稀释的双功能抗体 (初始浓度为 10 μ g/mL, 10 倍等比梯度稀释共

2 个浓度点)重悬, 4°C 孵育 30 分钟。PBS 洗细胞一遍后加入 1:200 稀释的荧光二抗 R-PE-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcγ Fragment Specific (Jackson ImmunoResearch, Cat# 109-116-098), 4°C 避光孵育 30 分钟。PBS 洗细胞两遍后重悬细胞, 最后用 Beckman Cytoflex 流式细胞仪检测二通道荧光信号。

结果如图 6D、6E 和 6F 所示, 分别以 anti-GPRC5A(R&D, MAB5239)、anti-GPRC5B(R&D, MAB10253)和 anti-GPRC5C(R&D, MAB6594)作为阳性对照 (R-Phycoerythrin AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (subclasses 1+2a+2b+3), Fcγ Fragment Specific (min X Hu, Bov, Rb Sr Prot) (Jackson ImmunoResearch, 115-115-164)作为二抗)以阴性对照 IgG control(Sino, MA16SE3081)作为参照, 抗 GPRC5D/CD3 双功能抗体 Bi-29H6-6 对 GPRC5A, GPRC5B 和 GPRC5C 表达细胞均不结合, 证明了其对 GPRC5D 的结合具有特异性。

6.3 抗 CD3/GPRC5D 双特异性抗体对 T 细胞的激活以及对肿瘤细胞的杀伤活性

本实施例检测抗 CD3/GPRC5D 双特异性抗体依赖结合 GPRC5D 抗原激活 Jurkat/NFAT-luc 报告基因系统 (荧光素酶, Promega, Cat#E8481) 的激活作用。检测系统中的靶细胞为内源性表达人 GPRC5D 的 NCI-H929 (南京科佰生物科技有限公司, CBP60243) 肿瘤细胞株或者 HEK293T 阴性细胞株。

抗 CD3/抗 GPRC5D 双特异性抗体同时与 NCI-H929 细胞表面的 GPRC5D 和 Jurkat 细胞表面的 CD3 结合, 通过结合 GPRC5D 抗原依赖性的抗体交联, 激活 Jurkat 细胞 CD3 下游信号。荧光素酶的表达情况直接反映了抗 CD3/抗 GPRC5D 双特异性抗体对 Jurkat/NFAT-luc 细胞的激活作用。

收集 Jurkat/NFAT-luc 细胞 (效应细胞, 如实施例 1.2 所述制备), 离心后去上清, 用测试缓冲液 (99% 1640 培养基+1% FBS) 重悬细胞, 使得效应细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。消化收集 NCI-H929 肿瘤细胞株以及 293T 阴性细胞株 (靶细胞), 离心后去上清, 用测试缓冲液重悬细胞, 使得靶细胞密度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 。然后分别将效应细胞和靶细胞悬液接种于 384 孔检测白板 (Corning, Cat#3570) 中, 每孔接种 $20 \mu\text{L}$ 效应细胞和 $20 \mu\text{L}$ 靶细胞, 加入梯度稀释 (最高检测浓度为 116 nM, 4 倍等比梯度稀释, 共 9 个浓度点) 的待测双特异性抗体, 每孔 $20 \mu\text{L}$ 。将 384 孔板放置在 37°C 培养箱中, 6 小时后, 每孔加入 $25 \mu\text{L}$ One-Glo (Promega, Cat#E6130) 试剂, 最后用多功能酶标仪 (Tecan, Cat#F200) 检测自发光信号。

结果在图 7 中示出, 结果表明抗 CD3/GPRC5D 双特异性抗体能在表达人 GPRC5D 的细胞 (NCI-H929 细胞) 存在时激活 CD3 信号通路, 且具有抗体的浓度依赖性。

图 8 表明当检测体系中没有 GPRC5D 存在时 (HEK293T 阴性细胞株), 抗 CD3/GPRC5D 双

特异性抗体只在高浓度下能激活 CD3 信号通路。因此，本发明的双特异性抗体对 CD3 信号通路的激活有浓度依赖，具有较少的非特异性激活，表明本发明的双特异性抗体能够特异性激活 CD3 信号通路。

为了检测抗 CD3/抗 GPRC5D 双特异性抗体介导 T 细胞杀伤肿瘤细胞的活性，我们建立了原代 T 细胞依赖的细胞毒性试验系统，以内源性表达人 GPRC5D 的 NCI-H929 为靶细胞，人外周血单个核细胞 PBMC（取自健康人血）为效应细胞。

复苏 PBMC 细胞，用 1640 完全培养基（添加 10% FBS）调整细胞密度至 $1\sim 2\times 10^6/\text{mL}$ ，加入终浓度为 100 IU/mL IL2（江苏金丝利药业有限公司）激活过夜。靶细胞 NCI-H929 以及 GPRC5D 阴性细胞 Raji（中科院典型培养物保藏委员会细胞库，Cat# TCHu 44）， $400\times g$ 离心 5 min 收集细胞弃上清。用含 1% FBS（Gibco, Cat#10099-141）和 100 IU/mL IL2 的 MEM- α （Gibco, Cat#41061-029）测试缓冲液调整靶细胞密度至 $2\times 10^5/\text{mL}$ ，按每孔 50 μL （即每孔 10,000 个细胞）铺到 96 孔板（Corning, Cat#3599）中。

准备等比梯度稀释的待测抗体稀释液（待测抗体最高检测浓度为 30 nM，5 倍等比梯度稀释，共 8 个浓度点），每孔加入 50 μL 。实验同时设置靶细胞最大杀伤（靶细胞中加 2% Triton100 裂解液）、最小杀伤（靶细胞中加测试缓冲液）及自然杀伤（靶细胞中加效应细胞）对照，每孔加入 50 μL 。最终效应细胞 E 和靶细胞 T 的比例为 10:1，然后放置于细胞培养箱继续孵育 24 h。孵育结束后，取出实验板， $400\times g$ 离心 3 min 使所有细胞沉到板底，小心吸取 50 μL 上清至新的 96 孔板，加入 50 μL LDH 检测液（Roche, Cat#11644793001）室温孵育，颜色变化时在 F50 酶标仪上读板，检测波长为 492nm，参比波长为 650nm，当最大杀伤孔的 OD492 值介于 0.4~1.0 之间时进行检测分析。

结果见图 9 和图 10，表明抗 CD3/抗 GPRC5D 双特异性抗体能够特异性诱导 T 细胞杀伤 NCI-H929 肿瘤细胞，而在低浓度下对 GPRC5D 阴性细胞 Raji 完全没有杀伤效应，仅在抗体高浓度下有轻微杀伤效应。因此，本发明的双特异性抗体能够特异性地诱导表达 GPRC5D 的 T 细胞杀伤，无可见的非特异性激活。

6.4 抗 CD3/抗 GPRC5D 双特异性抗体激活 T 细胞后诱导细胞因子释放

为了检测抗 CD3/抗 GPRC5D 双特异性抗体介导 T 细胞杀伤肿瘤细胞同时对因子分泌诱导的情况，我们建立了原代 T 细胞依赖的细胞毒性试验系统，以内源性表达人 GPRC5D 的 NCI-H929 为靶细胞，人外周血单个核细胞 PBMCs 为效应细胞。如 6.3 所示进行杀伤孵育。在杀伤终点，取上清检测体系里的 IL-6、TNF- α 和 IFN- γ 。

杀伤孵育结束后，取出实验板，400×g 离心 3 min 使所有细胞沉到板底，小心吸取 100μL 上清至新的 96 孔板，分别检测上清中的人 IFN γ （检测试剂盒：Cisbio, Cat#62HIFNGPEH）、人 TNF α （检测试剂盒：R&D, Cat#DY210）以及人 IL-6（检测试剂盒：R&D, Cat#DY206）因子水平。

结果见图 11，表明抗 CD3/抗 GPRC5D 双特异性抗体在 NCI-H929 体系中能够诱导 T 细胞释放人 IFN γ （图 11A）、人 TNF α （图 11B）以及人 IL-6 因子(图 11C)。图 12 表明，在不表达 GPRC5D 的 Raji 体系中抗 CD3/抗 GPRC5D 双特异性抗体在低浓度下不能诱导 IL-6 的释放，仅在抗体高浓度下能诱导 IFN γ 、TNF α 和 IL-6 的少量释放（图 12A-C），因此表明抗 CD3/抗 GPRC5D 双特异性抗体具有较好的诱导特异性。

综上，在 T 细胞介导的对阴性细胞杀伤及因子分泌实验中，Bi-29H6-6 诱导 PBMC 对非相关靶细胞 Raji 的杀伤活性较弱，诱导免疫细胞产生的细胞因子的水平较低，提示抗 CD3/抗 GPRC5D 双功能抗体引起细胞因子风暴的风险较低，安全性更好。

6.5 双特异性抗体与人/猴 CD3 蛋白的亲合力实验

在本实验中，根据厂商说明，利用 ForteBio Octet RED96 检测了双特异抗体与人 CD3D & CD3E 异源二聚蛋白(Sino Biological Cat#CT038-H2508H)、猴 CD3D & CD3E 异源二聚蛋白(Acro biosystems ,Cat#CDD-C52W4)的结合亲和力。

简要地，将 AHC 传感器(ForteBio, Cat#18-5060)放进 Running Buffer (1 X PBS Hyclone, Cat#SH30256.01，包含 0.02% Tween20，pH7.0)，在室温条件下进行预平衡 10min。在 96 孔板中，动力学实验方法按照以下步骤进行：

- a)用 Running Buffer 平衡基线 100 s，
- b) 加入用 Running Buffer 稀释的双特异抗体，终浓度 5 μ g/mL，固化 200 s，
- c) 用 Running buffer 平衡基线 300 s，
- d)向各孔中加入 100 nM 用 Running Buffer 稀释的人/猴 CD3 蛋白，结合 200 s，解离 600 s。

实验数据使用 Fortebio Data Analysis 软件 1:1 结合模型进行拟合并计算。表 8 总结了双特异性抗体 Bi-29H6-6 与人/猴 CD3 蛋白结合亲和力。

表 8: Bi-29H6-6 与人/猴 CD3 蛋白结合亲和力

抗体	分析物	KD(M)	Kon(M-1S-1)	Koff(S-1)	Full R^2
Bi-29H6-6	人 CD3D & CD3E 异源二聚蛋白	7.27E-07	2.17E+04	1.58E-02	0.9906

	猴 CD3D & CD3E 异源二聚蛋白	7.59E-08	8.32E+04	6.31E-03	0.99
--	-------------------------	----------	----------	----------	------

表 8 表明本申请构建的双特异性抗体可以特异地结合来自人/猴 CD3 蛋白，具有种属交叉活性。

通常针对 CD3 蛋白的亲和力优选低于针对其他靶标的亲和力，这样有助于通过产生瀑布效应以形成成簇的 T 细胞，从而指数式地引起下游信号通路的变化。可见，本申请获得的抗 CD3/抗 GPRC5D 双特异性抗体保留了适当的 CD3 亲和力。

实施例 7. 抗 CD3/抗 GPRC5D 双特异性抗体体内抑制肿瘤

实施例 7.1 本实施例通过在携带小鼠结肠癌细胞系 MC38 的 C57BL/6-hCD3e 转基因小鼠中评价了抗 CD3/抗 GPRC5D 双特异性抗体对小鼠皮下移植瘤的抑制作用。

首先，构建高表达人 GPRC5D 的小鼠结肠癌细胞系 MC38。采用慢病毒感染方法将编码人 GPRC5D 蛋白 (NP_061124.1(NCBI 序列号), sp|Q9NZD1(Uniprot 序列号), SEQ ID NO:57) 的核苷酸 (由通用生物合成) 感染到 MC38 细胞中。然后用添加了 4 µg/mL 嘌呤霉素 (Gibco, Cat#A1113802) 培养基筛选和铺单克隆，得到了高表达人 GPRC5D 的多克隆细胞，进而通过有限稀释法获得高表达人 GPRC5D 的单克隆 MC38 细胞株，命名为 MC38-huGPRC5D。

收集并计数 MC38-huGPRC5D 细胞，按 1:1 体积比添加基质胶 (Matrigel) 混匀后放在湿冰盒内低温保存使用。实验动物为 6-8 周龄的 C57BL/6-hCD3e 小鼠 (百奥赛图生物科技有限公司)。将含 2×10⁶ 细胞的 PBS 混悬液 100µL 和等体积 Matrigel 混匀后，接种于 35 只小鼠背部皮下，接种体积为 200µL。接种前用 3 - 4% 异氟烷将小鼠麻醉。其中 5 只小鼠接种肿瘤细胞当天同时给药 (G5)。当肿瘤生长到平均约 60 - 80mm³ 左右时，将 25 只小鼠根据肿瘤大小和体重随机分 3 组 (G1、G3 和 G4: 每组 5 只)，分组给药当天定义为第 0 天。分组情况和给药方案如表 9 所示：

表 9: 分组和给药方案

组别	受试药物	数量	剂量	方式	给药频率
G1	PBS	5	na	i.v.	BIW * 6 times
G3	Bi-29H6-6	5	5 mg/kg	i.v.	BIW * 6 times
G4	Bi-29H6-6	5	15 mg/kg	i.v.	BIW * 6 times
G5	Bi-29H6-6	5	5 mg/kg	i.v	BIW * 6 times

每天观察记录小鼠的外观及行为，自分组开始连续观察最多 4 周。分组后每周测量肿瘤体积两次。

肿瘤体积(V)的计算方法如下：

肿瘤体积（mm³）=1/2×（a×b²）（其中 a 表示长径，b 表示短径）

每只小鼠相对肿瘤体积(RTV)的计算方法是：RTV = Vt/V₀，其中 Vt 为每次的测量体积，V₀ 为治疗开始时的体积。分组后每周测量并记录老鼠体重两次。结果以平均值 ± S.E.M 的方式呈现。使用 Dunnett’s multi-comparison test 进行两组间比较，如果 p < 0.05 则认为有统计学显著性差异。

结果见图 13A，相对于阴性对照（G1 组），G3、G4 和 G5 组都具有良好的抑瘤作用，差异性极其显著。G4 和 G5 组小鼠的荷瘤有完全消退的个体。

表 25:

组别	剂量	数量	肿瘤体积（mm ³ ） a（第 15 天）	肿瘤抑制率（%） b	显著性 c
G1, PBS	/	5	2260 ± 619.32	/	/
G3, Bi-29H6-6	5mpk	5	350 ± 146.25	84.94%	< 0.05
G4, Bi-29H6-6	15mpk	5	227 ± 214.25	89.15%	< 0.05
G5, Bi-29H6-6 肿瘤接种当天给药	5mpk	5	0	100.00%	< 0.0001

a 肿瘤数据的呈现为平均值±标准偏差

b 肿瘤抑制率=（1-给药组的相对体积/PBS 组的相对体积）*100 %

c 对比 G1 组

实施例 7.2 抗 CD3/抗 GPRC5D 双特异性抗体在人源骨髓瘤 NCI-H929 细胞株 NCG 小鼠 Mixeno 模型中的抗肿瘤作用

本实施例通过在移植 PBMC 的 NCG 小鼠上接种人源骨髓瘤 NCI-H929 肿瘤模型上评价了抗 CD3/抗 GPRC5D 双特异性抗体对小鼠皮下移植瘤的抑制作用。

首先在合适周龄（7-9 周）的 NCG（江苏集萃药康生物技术有限公司）小鼠背部右边靠

近腋下接种人源骨髓瘤 NCI-H929 细胞株，细胞用 PBS 重悬（ 5×10^6 /mice/100 μ L）与 100 μ L 基质胶（Matrigel）1:1 等体积混合后接种。在肿瘤接种的当天，腹腔移植 PBMC（供体 Z0080） 1×10^7 /小鼠/100 μ L。当肿瘤生长到平均约 70 - 90 mm³ 左右时（约 7 天），将 18 只小鼠根据肿瘤大小和体重随机分 3 组（G1~G3：每组 6 只），分组给药当天定义为第 0 天。分组情况和给药方案如表 22 所示：

表 22: 分组和给药方案

组别	受试药物	数量	剂量	方式	给药频率
G1	PBS	6	na	i.v.	BIW * 6 times
G2	Talquetamab	6	3 mg/kg	i.v.	BIW * 6 times
G3	Bi-29H6-6	6	3 mg/kg	i.v.	BIW * 6 times

肿瘤细胞接种后，常规监测包括了肿瘤生长及治疗对动物正常行为的影响，具体内容有实验动物的活动性，摄食和饮水情况，体重增加或降低情况，眼睛、被毛及其它异常情况。试验过程中观察到的临床症状均记录在原始数据中。

开始给药后，每周测量两次小鼠的体重和肿瘤的大小。肿瘤体积计算公式：

肿瘤体积（mm³）= $1/2 \times (a \times b^2)$ （其中 a 表示长径，b 表示短径）。

实验中使用 StudyDirectorTM（版本号 3.1.399.19，供应商 StudylogSystem,Inc.）软件收集数据，包括肿瘤的长短径的测量和动物体重的称量，原始数据由天平和游标卡尺测量后直接导入软件，数据的任何变动都将被记录在此软件中。给药、肿瘤测量及体重称量等全部过程都在生物安全柜或超净工作台中进行。

图 13B 显示在实验第 5 次给药前，G2 组阳性对照抗体 Talquetamab(GC5B596+ CD3B219)（WO2018017786A2）和 G3 组待测抗体 Bi-29H6-6 都能使肿瘤完全消退，观察一周也未发现肿瘤有增长。对比 G1 组 PBS，G2 组和 G3 组具有极其显著的抑瘤效果。G2 组和 G3 组之间的抑瘤效果并没有显著性差异。

表 23:

组别	剂量	数量	肿瘤体积（mm ³ ）a（第 17 天）	肿瘤抑制率（%）b	显著性 c
G1, PBS	/	6	2378 $\pm$ 117.99	/	/
G2, Talquetamab	3mpk	6	0	100%	<0.0001

G3, Bi-29H6-6	3mpk	6	0	100%	<0.0001
---------------	------	---	---	------	---------

- a 肿瘤数据的呈现为平均值±标准偏差
- b 肿瘤抑制率=（1-给药组的相对体积/PBS 组的相对体积）*100 %
- c 对比 G1 组

实施例 8. 人源化 MUC16 抗体的制备和表征

8.1 制备鼠源抗 MUC16 抗体及序列优化

鼠源 MUC16 抗体 776.1 的序列公开于专利 US 7429382 B2，776.1 可以结合到人 MUC16 蛋白胞外域的 C 末端，并且具有人猴交叉反应。通过分析专利 US 7429382 B2 中 FIG.8C 及 FIG.8D 的序列，发现在 776.1 轻链中有一个未配对的半胱氨酸（C），重链的第三个框架区含有一个 N 糖基化位点。在序列优化阶段，将轻链第 33 位（kabat 编码）的半胱氨酸（C）选择性的突变成丝氨酸（S）或丙氨酸（A），获得相应的轻链 776.1LC(C33S) 和 776.1LC(C33A)。它们的 DNA 序列由通用生物系统(安徽)有限公司进行密码子优化和基因合成。表 24 给出上述获得的各个鼠源抗 MUC16 抗体的可变区序列。

表 24: MUC16 抗体的重链可变区和轻链可变区氨基酸序列

名称	氨基酸序列
776.1 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYNHWVKQSHGKILEWIGY IYPYNGVSDYNQNFKSKATLIVDNSSNTAYMELRSLTSEDSAVYYCARWD FGSGYYFDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO: 92) 包含如下 HCDR HCDR1: DYNIH (SEQ ID NO: 93) HCDR2: YIYPYNGVSDYNQNFKS (SEQ ID NO: 94) HCDR3: WDFGSGYYFDY (SEQ ID NO: 95)
776.1 VL	QIVLSQSPAILFASPGETVTMTCRASSSVIYMCWNQQKPGSSPKPWIYGTS TLASGVPTRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTK LEIK (SEQ ID NO: 96) 包含如下 LCDR LCDR1: RASSSVIYMC (SEQ ID NO: 97) LCDR2: GTSTLAS (SEQ ID NO: 98) LCDR3: QQWSSNPFT (SEQ ID NO: 99)
776.1 VL(C33A)	QIVLSQSPAILFASPGETVTMTCRASSSVIYMAWNQQKPGSSPKPWIYGTS TLASGVPTRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTK LEIK (SEQ ID NO: 100) 包含如下 LCDR

	LCDR1: RASSSVIYMA (SEQ ID NO: 101) LCDR2: GTSTLAS (SEQ ID NO: 98) LCDR3: QQWSSNPFT (SEQ ID NO: 99)
776.1 VL(C33S)	QIVLSQSPAILFASPGETVTMTCRASSSVIYMSWNQQKPGSSPKPWIYGTS TLASGVPTRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTK LEIK (SEQ ID NO:102) 包含如下 LCDR LCDR1: RASSSVIYMS (SEQ ID NO: 103) LCDR2: GTSTLAS (SEQ ID NO: 98) LCDR3: QQWSSNPFT (SEQ ID NO: 99)

kappa 轻链恒定区: SEQ ID NO:50

将编码上述 VH 区和 VL 区的基因依次插入含有编码人 IgG1 重链恒定区和 kappa 轻链恒定区的基因的表达载体 pcDNA3.1(+)中以获得相应的抗体重链和轻链。使用的重链恒定区均含有 L234A, L235A, D265A 和 P329A (根据 Eu 编码)位点的突变, 以消除效应功能。

将上文所述编码抗 MUC16 抗体的重轻链的质粒按照表 25 组合, 共转染 ExpiCHO-S 细胞以表达如表 25 所述抗体, 之后进行相应纯化 (具体方法参见实施例 1.1)。浓缩纯化的抗体, 无菌过滤, 通过 SDS-PAGE 和分子排阻检测抗体蛋白的纯度。

表 25 抗体名称以及对应重轻链的组合

抗体名称	重链名称	轻链名称
776.1	776.1 HC (SEQ ID NO:106)	776.1 LC (SEQ ID NO:107)
776.1(C33A)	776.1 HC (SEQ ID NO:106)	776.1 LC(C33A) (SEQ ID NO:108)
776.1(C33S)	776.1 HC (SEQ ID NO:106)	776.1 LC(C33S) (SEQ ID NO:109)

根据还原型 SDS-PAGE 和非还原型 SDS-PAGE 确认了重链的 N 糖基化, 在还原条件下所有抗体的重链在 50kDa 上下都有两个条带, 见图 14, 结果说明重链第三个框架区 N 糖基化位点具有发生糖基化的可能性。

将人、食蟹猴和恒河猴 MUC16 蛋白胞外区近膜端氨基酸序列送至通用生物系统(安徽)有限公司进行基因合成, 并使得各个蛋白在 C 末端融合了 6 x His 标签。下表给出各个 C 末端具有 His 标签的融合蛋白的氨基酸序列。

表 26 重组 MUC16 氨基酸序列

名称	氨基酸序列
人 MUC16-His	SEQ ID NO:110
恒河猴 MUC16-His	SEQ ID NO:111

食蟹猴 MUC16-His	SEQ ID NO:112
---------------	---------------

将包含编码表 26 所述人、食蟹猴或恒河猴 MUC16 蛋白胞外区近膜端蛋白的质粒分别转染 ExpiCHO-S 细胞以表达如表 26 所述抗原（具体方法参见实施例 1.1）并用 HisTrap™ excel（GE,Cat#29048586）根据厂商说明进行纯化。浓缩纯化的蛋白，无菌过滤，通过 SDS-PAGE 检测纯化的蛋白纯度。

8.2 抗 MUC-16 抗体对人和恒河猴 MUC16 蛋白的结合亲和力

利用 ForteBio Octet RED96 分别检测了抗 MUC-16 抗体对人 MUC16 蛋白胞外区近膜端（人 MUC16-His，表 26）和恒河猴 MUC16 蛋白胞外区近膜端（恒河猴 MUC16-His，表 26）结合亲和力。根据制造商的说明，将 AHC 传感器(ForteBio, Cat#18-5060)放进 Running Buffer (1 X PBS Hyclone, Cat#SH30256.01，含有 0.02% Tween20，pH7.0)，在室温下预平衡 10min。在 96 孔板中，动力学实验方法按照以下步骤进行：a)用 Running Buffer 平衡基线 100 s，b) 用 Running Buffer 稀释抗 MUC-16 抗体至 5 μg/mL，固化 200 s 停止，c) 用 Running buffer 平衡基线 300 s，d)人或恒河猴 MUC16 蛋白用 Running Buffer 稀释至 50 nM，结合 200 s，解离 600 s。实验数据使用 Fortebio Data Analysis 软件 1:1 结合模型进行拟合并计算。

结果如下表 27 所示。

表 27. MUC-16 抗体与人和恒河猴 MUC16 蛋白胞外区近膜端结合亲和力

抗体	抗原	Ka(M-1S-1)	Kd(S-1)	KD (M)
776.1	人 MUC16	4.68E+05	1.68E-04	3.59E-10
	恒河猴 MUC16	8.56E+05	1.56E-03	1.82E-09
776.1(C33A)	人 MUC16	2.55E+05	3.48E-04	1.36E-09
	恒河猴 MUC16	7.91E+05	9.45E-04	1.20E-09
776.1(C33S)	人 MUC16	2.66E+05	2.45E-04	9.21E-10
	恒河猴 MUC16	8.03E+05	8.26E-04	1.03E-09

8.3 抗人 MUC16 抗体与表达在 293T 细胞表面的人 MUC16 蛋白或恒河猴 MUC16 蛋白的结合

通过细胞结合实验来判断本发明中的抗人 MUC16 抗体能否与稳定表达在 293T 细胞表面的人或猴的 MUC16 蛋白结合。首先采用 Lipofectamine™ 2000(Invitrogen, Cat#11668019)转染试剂将编码人 MUC16 蛋白（ECT_TM huMuc16:SEQ ID NO:127，包含近膜端、跨膜区以及胞内区，由通用生物系统(安徽)有限公司进行密码子优化和基因合成，并克隆到稳转载体中）和恒河猴 MUC16 蛋白（ECT_TM RhMuc16:SEQ ID NO:128，包含近膜端、跨膜区以及胞内区，由通用生物系统(安徽)有限公司进行密码子优化和基因合成，并克隆到稳转载体中）分

别转染到 293T 细胞中，然后用 0.3μg/mL 嘌呤霉素(Gibco, Cat#A1113802)筛选，得到了高表达人 MUC16 的 293T 细胞(也称为 293T/hMUC16 细胞)或高表达恒河猴 MUC16 的 293T 细胞(也称为 293T/恒河猴 MUC16 细胞，或称为 293T/rhesus MUC16 细胞)。将梯度稀释的本申请获得的抗人 MUC16 抗体（初始浓度为 200 nM，4 倍稀释，共 8 个点）加入到细胞中，4℃ 孵育 30 分钟。PBS 洗细胞两遍后加入荧光二抗 R-PE-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcγ Fragment Specific (Jackson ImmunoResearch, Cat#109-116-098)，4℃ 孵育 30 分钟。PBS 洗细胞两遍后重悬细胞，最后用 BD Accuri C5 (BD Bioscience)流式细胞仪检测荧光信号。

从图 15-16 所示的结果可知，776.1(C33A)、 776.1(C33S) 结合 293T 细胞上表达的人 Muc16 蛋白和恒河猴 Muc16 蛋白，其与未修饰抗体（776.1）具有相当的结合能力。

8.4 MUC16 抗体人源化

对鼠抗体 776.1(C33S)进行人源化，方法如实施例 1 所述。简言之：将 776.1(C33S)的序列在 IMGT 数据库中检索比对，分别获得与 776.1(C33S)重链可变区同源性较高的人胚系基因序列 IGHV1-18*01 作为重链可变区人源化框架，选择与轻链可变区同源性较高的人胚系基因序列 IGKV1-39*01 作为轻链可变区人源化框架，将 776.1(C33S)重轻链可变区的 CDR 移植到相应的人源化框架中，形成人源化的抗 MUC16 抗体可变区。为了维持鼠源抗体 776.1(C33S)的亲和力，需要对获得的人源化抗体可变区进行回复突变。为了消除潜在的 N 糖基化位点，在第三个框架区引入 N73T（kabat 编码）。

由此分别获得相应人源化重链可变区和人源化轻链可变区序列，如表 28 所示。

表 28	
名称	氨基酸序列
重链可变区 (MCH7)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNIIHWVRQAPGQGLE WMGYIYPYNGVSDYNQNFKSRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTA VYYCARWDFGSGYYFDYWQGGLTVTVSS (SEQ ID NO: 113)
轻链可变区 (MCL4)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVIYMSWYQQKPGQAPRLLIYG TSTLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQ GTKLEIK (SEQ ID NO: 114)

将重链可变区氨基酸序列送至苏州金唯智生物科技有限公司和将轻链可变区氨基酸序列送至南京金斯瑞生物科技有限公司进行密码子优化和基因合成。将编码抗体的 VH 区和 VL 区的基因依次插入含有人 IgG1 重链恒定区编码基因和 kappa 轻链恒定区的编码基因的表达载体 pcDNA3.1(+)中，以获得表达抗 MUC16 人源化抗体全长重链的质粒和编码全长轻链的质粒。人源化后的 MUC16 抗体使用的重链恒定区均含有 L234A, L235A, D265A 和 P329A (根据 Eu 编码)位点的突变，以消除效应功能。

将编码重轻链的质粒组合共转染 ExpiCHO-S 细胞以表达抗 MUC16 人源化抗体 (Hu-L4H7, 其重链序列如 SEQ ID NO:115 所示, 轻链序列如 SEQ ID NO:116 所示), 并进行相应纯化 (具体方法参见实施例 1.1)。浓缩纯化的抗体, 无菌过滤, 通过 SDS-PAGE 和分子排阻色谱 (SEC) 检测蛋白纯度。

8.5 人源化抗 MUC16 抗体物理化学分析以及亲和力检测

对于获得的人源化抗 MUC16 抗体 (Hu-L4H7), 通过分子排阻色谱确认了抗体的纯度。具体而言, 使用 100 mM 磷酸钠+100 mM Na₂SO₄ (pH 7.0)作为运行缓冲液, 将 20 μg 样品注入到 TSK G3000SWXL 柱上。运行 30 分钟。收集的流出液采用 Agilent 1220 HPLC 进行测量, 并使用 OpenLAB 软件分析数据。

表 29 结果显示, 人源化抗 MUC16 抗体 Hu-L4H7 在 SEC 上的主峰高于 99%, 而对照 776.1 (C33S) 的主峰为 56.9%, 这表明纯化的人源化抗体具有更高的纯度和完整性, 这也显示了人源化的抗体已经成功的去除了 N 糖基化。

表 29 人源化抗体纯度

mAb ID	Purity (%)
Hu-L4H7	99.1
776.1(C33S)	56.9

利用 ForteBio Octet RED96 分别检测了人源化抗 MUC-16 抗体对人和恒河猴 MUC16 蛋白结合亲和力。检测分析方法参见实施例 8.1, 检测结果参见表 30。

表 30. 人源化的抗 MUC-16 抗体与人和恒河猴 MUC16 蛋白结合亲和力

抗体	抗原	K _a (M ⁻¹ S ⁻¹)	K _d (S ⁻¹)	KD (M)
Hu-L4H7	人 MUC16-His	3.14E+05	9.11E-04	2.90E-09
	恒河猴 MUC16-His	2.54E+05	2.63E-04	1.04E-09

通过细胞结合实验来判断本发明的人源化抗 MUC16 抗体能否与稳定表达在 293T 细胞表面的人 MUC16 蛋白结合。具体检测分析步骤参见实施例 8.1。图 17 显示了人源化 MUC-16 抗体能够与表达在 293T 细胞表面的人 MUC16 蛋白结合。

为了进一步验证人源化的抗 MUC16 抗体能够特异性的结合到 MUC16 近膜端而不与游离 CA125 结合, 将 4000 U/mL 的人 CA125 (桂林英美特生物技术有限公司, Cat#KAY0023, 病人腹水提取的 CA125)以 50 μL/孔包被在 96 孔板上, 4℃孵育过夜。用封闭缓冲液 (含有 1%BSA 的 PBS 溶液) 将板在 37℃孵育, 封闭 1h。封闭后, 用 PBST 溶液 (含有 0.05%吐温 20 的 PBS 溶液) 将板洗涤 1 次。用稀释液梯度稀释生物素化的 Hu-L4H7、Sofituzumab (重链: SEQ ID NO:125;轻链: SEQ ID NO:126, 阳性对照)、IgG (阴性对照), 加入板中, 在 37℃孵育 1h。孵

育结束后用 PBST 溶液洗板。用稀释液稀释二抗（辣根过氧化物酶 HRP 标记链霉亲和素，Jackson Immuno Research, Cat# 016-030-084），加入板中在 37°C 孵育 1h，孵育结束后再次清洗，用 TMB 显色，之后用 1M H₂SO₄ 终止，之后于酶标仪中读取 OD_{450nm}-OD_{620nm} 的吸光值，结果见图 18。结果显示人源化抗体 Hu-L4H7 不结合人 CA125。

实施例 9：肿瘤组织中 MUC16 及 CD8 的免疫组化检测

卵巢癌组织切片（百意欣，Cat#FOV1006）通过二甲苯以及乙醇进行脱蜡，并复水 5 分钟。将组织切片浸没在抗原修复液（赛维尔，Cat#G1202-250ML）中煮沸 15 分钟。冷却组织切片，并加入 3% 双氧水室温孵育 10 分钟，然后在 PBS 溶液（索莱宝，Cat#P1010）中洗涤两次，在 5% BSA 封闭液（索莱宝，Cat#SW3015）中室温封闭 1 小时。然后将组织切片在封闭缓冲液中与 8.7ug/mL Hu-L4H7 或 1:300 倍稀释的 CD8 抗体（Abcam, Cat#ab209775）4°C 孵育过夜。用 PBS 溶液洗涤 3 次后，将组织切片与 1:3000 在封闭液中稀释的山羊抗人 IgG Fc 特异性（Jackson ImmunoResearch, Cat#109-035-098）抗体室温孵育 1 小时。然后用 PBS 溶液洗涤组织切片两次，在室温下利用 DAB（赛维尔，Cat#G1212-200T）进行检测，显色时间 10 分钟。然后用苏木素（赛维尔，Cat#G1004-100ML）对组织切片进行复染。再通过乙醇和二甲苯进行脱水处理，中性树胶（赛维尔，Cat#WG10004160）封片覆盖盖玻片，最后进行扫描。

结果如图 19 所示，其中图 19A、19B 为来自卵巢癌浆液性腺癌的组织切片样品（T1aNO0M0，Grade3），图 19C、19D 为来自卵巢癌粘液性腺癌的组织切片样品（T3aNO0M0，Grade3），图 19E、19F 为来自子宫内膜样腺癌的组织切片样品（T1aNO0M0，Grade3），图 19G、19H 为来自卵巢癌透明细胞腺癌的组织切片样品（T1aNO0M0，Grade2）。图 19A、19C、19E 及 19G 采用 CD8 抗体进行染色，图 19B、19D、19F 及 19H 采用本申请获得的 Hu-L4H7 抗体进行染色，阳性结果如箭头所示。图 19 的结果说明卵巢癌中存在一定数量的 CD8 T 细胞，以及本申请获得的 Hu-L4H7 抗体可与卵巢癌中表达 MUC16 的细胞结合。由此预测基于本申请获得的 Hu-L4H7 与 CD3 抗体的双特异性抗体在卵巢癌中可通过桥联作用提高肿瘤细胞杀伤效率，从而达到抑制肿瘤生长的效果。

实施例 10：抗 CD3/MUC16 双特异性抗体

10.1 构建双特异性抗体

本发明构建了如图 20 所示的三种不同非对称结构的双特异性抗体，其中各个双特异性抗体的抗 MUC16 部分来源于上述人源化 MUC16 抗体，抗 CD3 部分来源于上述人源化 CD3 抗体，双特异性抗体恒定区均包含杵臼结构（knob-in-hole, KIH）(Merchant, A. M., et al. (1998). "An efficient route to human bispecific IgG." Nat Biotechnol 16(7): 677-681.)。这类双特异性抗体在本文中也称为“抗 CD3/MUC16 双特异性抗体”或“抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体”，有时

简称为“双特异性抗体分子、双抗”。抗 CD3/MUC16 双特异性抗体的抗 MUC16 部分靶向表达 MUC16 的细胞，而抗 CD3 部分活化 T 细胞。双抗同时结合肿瘤细胞上的 MUC16 和 T 细胞的 CD3 有助于通过经活化的 T 细胞定向杀伤肿瘤细胞。

本申请使用标准构建方法获得了如图 20 所示结构的 3 种抗 CD3/MUC16 双特异性抗体，其氨基酸序列在下表 31 中列出。其中双特异性抗体的重链按照从 N 端到 C 端的顺序依次以来源序列进行命名，例如 23L2ScFv-Hole 表示该序列从 N 段到 C 端依次包括来源于 23L2 的 ScFv 和含有白结构的恒定区；2MCH7-KIH-Knob 表示该序列从 N 段到 C 端依次包括 2 个来源于 MCH7 的序列和含有杵结构的恒定区。

如下构建各个双特异性抗体分子：

23L2ScFv-Hole：将编码抗CD3单链抗体23L2的核苷酸序列克隆到带有Fc（Hole）的 pcDNA3.1（+）载体中，表达获得23L2ScFv-Hole分子。

MCH7-23L2ScFv-Hole：以人源化抗MUC16抗体重链编码序列为模板扩增编码重链可变区和重链恒定区CH1段的核苷酸序列，并采用重叠PCR技术将该序列与编码完整的 23L2ScFv-Hole的核苷酸序列直接拼接（两段序列之间没有连接肽），将拼接完成的核苷酸序列克隆到表达载体pcDNA3.1（+）载体中，表达获得MCH7-23L2ScFv-Hole分子。

MCH7-KIH-Knob：将编码人源化抗MUC16抗体重链可变区和重链恒定区CH1段的核苷酸序列克隆到带有Fc（Knob）的pcDNA3.1（+）载体中，表达获得 MCH7-KIH-Knob分子。

MCL4 LC：将编码人源化抗MUC16抗体轻链的核苷酸序列克隆到pcDNA3.1（+）载体中，表达获得 MCL4 LC分子。

2MCH7-KIH-Knob：采用重叠PCR技术，将2个编码人源化抗MUC16抗体重链可变区和重链恒定区CH1段的核苷酸序列直接串联拼接（2个编码片段之间没有连接肽），再将拼接好的序列克隆到带有Fc（Knob）的pcDNA3.1（+）载体中，表达获得 2MCH7-KIH-Knob分子。

根据表31所示的具体组成，将上述各个表达载体相应组合，在合适的条件下表达获得图8中的双特异性抗体。

对照抗体 REGN4018 来自于专利 US20190389966A1，由通用生物系统(安徽)有限公司进行密码子优化和基因合成并克隆到表达载体中。

双特异性抗体的构建、表达、纯化、初步分析步骤同实施例 1.1。

表 31 抗 CD3/MUC16 双特异性抗体的组成

克隆	SEQ ID NO	
MCH7-23L2 (图 8B)	117	重链 23L2ScFv-Hole
	118	重链 MCH7-KIH-Knob

	116	轻链 MCL4 LC
2MCH7-23L2 (图 8C)	119	重链 2MCH7-KIH-Knob
	117	重链 23L2ScFv-Hole
	116	轻链 MCL4 LC
MCH7-23L2-MCH7 (图 8A)	121	重链 MCH7-23L2ScFv-Hole
	118	重链 MCH7-KIH-Knob
	116	轻链 MCL4 LC
REGN4018	122	重链 REGN4018-8767pH
	123	重链 REGN4018-G20
	124	轻链 REGN4018-8767pL

10.2 双特异性抗体与人/食蟹猴 CD3 蛋白、MUC16 蛋白的亲合力实验

在本实验中, 根据厂商说明, 利用 ForteBio Octet RED96 检测了双特异抗体与人 CD3 蛋白(Cat#CT038-H2508H, Sinobiological)、食蟹猴 CD3 蛋白(Cat#CDD-C52W4, Acrobiosystems)、人 MUC16 蛋白(人 MUC16 全长、MUC16 胞外区近膜端(表 26))和食蟹猴 MUC16 蛋白(食蟹猴 MUC16 全长、MUC16 胞外区近膜端(表 26))的结合亲和力。

简要地, 将 AHC 传感器(ForteBio, Cat#18-5060)放进 Running Buffer (1 X PBS Hyclone, Cat#SH30256.01, 包含 0.02% Tween20, pH7.0), 在室温条件下进行预平衡 10min。在 96 孔板中, 动力学实验方法按照以下步骤进行: a)用 Running Buffer 平衡基线 100 s, b) 加入用 Running Buffer 稀释的抗人 CD3 和 MUC-16 双特异抗体, 终浓度 5 $\mu\text{g/mL}$, 固化 200 s, c) 用 Running buffer 平衡基线 300 s, d)向各孔中加入如下浓度的用 Running Buffer 稀释的人和食蟹猴的 CD3 和 MUC16 蛋白: 100 nM、50 nM、25 nM、12.5 nM、6.25 nM、3.13 nM, 结合 200 s, 解离 600 s。实验数据使用 Fortebio Data Analysis 软件 1:1 结合模型进行拟合并计算。

表 32 总结了双特异性抗体 MCH7-23L2-MCH7 与人和食蟹猴 CD3 蛋白结合亲和力。表 33 总结了双特异性抗体 MCH7-23L2-MCH7 与人和食蟹猴 MUC16 蛋白结合亲和力。

表 32MCH7-23L2-MCH7 与人和食蟹猴 CD3 蛋白结合亲和力

抗体	分析物	KD(M)	Kon(M ⁻¹ S ⁻¹)	Koff(S ⁻¹)	Full R ²
MCH7-23L2-MCH7	人 CD3D & CD3E 异源二聚蛋白	4.43E-08	2.11E+05	9.33E-03	0.9033

	食 蟹 猴 CD3D & CD3E 异源 二聚蛋白	3.04E-08	1.24E+05	3.78E-03	0.9795
--	------------------------------------	----------	----------	----------	--------

表 33 MCH7-23L2-MCH7 与人和食蟹猴 MUC16 蛋白结合亲和力

抗体	分析物	KD(M)	Kon(M ⁻¹ S ⁻¹)	Koff(S ⁻¹)	Full R ^{^2}
MCH7-23L2-MCH7	人 MUC16 蛋白	3.17E-09	1.66E+05	5.24E-04	0.9873
	食 蟹 猴 MUC16 蛋白	2.91E-09	1.88E+05	5.46E-04	0.9405

表 32-33 表明本申请构建的双特异性抗体可以特异地结合来自人或者食蟹猴的 CD3 蛋白和 MUC16 蛋白，具有种属交叉活性。本申请获得的双特异性抗体针对 CD3 蛋白的 KD 值比针对 MUC16 蛋白低一个数量级。

目前业内共识 CD3 抗体对 CD3 复合体ε链的亲合力强弱是 CD3 双抗是否构建成功的关键因素，最佳的 CD3 亲合力应维持在 1-100nM 的范围内，且对 T 细胞的激活处于合适的范围。通常针对 CD3 蛋白的亲合力优选低于针对其他靶标的亲合力。可见，本申请获得的抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体保留了最佳的 CD3 亲合力，符合上述要求。

10.3 双特异性抗体与表达人 CD3 蛋白、MUC16 蛋白的细胞的结合实验

(1) 通过细胞结合实验来判断本发明中的抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体能否与内源性表达在人类卵巢癌细胞(OVCAR3)(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, Cat#TCHu228)上的 MUC16 蛋白结合。

本实验采用流式细胞术进行测定。消化离心收集 OVCAR3 细胞，PBS 溶液重悬细胞后接种至 96 孔板 (Corning, Cat#3799)，每孔 1×10⁵ 个细胞，96 孔板离心后弃上清，将 100 μl 梯度稀释的待测双特异性抗体（最高浓度为 200 nM，随后从 100 nM 开始，5 倍稀释，总共 9 个浓度点）加入到 OVCAR3 细胞中，4℃ 孵育 30 分钟后离心（1000 rpm, 5 分钟）弃上清。每孔加入 100 μl PBS 溶液将细胞洗两遍后再加入 100 μl 1:200 稀释的荧光二抗 R-PE-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcy Fragment Specific (Jackson ImmunoResearch, Cat#109-116-098)，4℃ 孵育 30 分钟。用 PBS 溶液将细胞洗两遍后每孔加入 100 μl PBS 溶液重悬细胞，最后用 BD Accuri C5 (BD Bioscience)流式细胞仪根据厂商说明检测荧光信号。采用 REGN4018 作为阳性对照。

从图 21 所示的结果可知，测试的双特异性抗体可以与 OVCAR3 细胞上表达的 MUC16 分子结合。测试的双特异性抗体在高浓度条件下与 OVCAR3 细胞上表达的 MUC16 分子的结合强度优于对照 REGN4018。

(2) 通过细胞结合实验来判断本发明中的抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体能否与稳定表达在 293T 细胞（中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, Cat# SCSP-502）表面的食蟹猴 MUC16 蛋白结合。首先采用 Lipofectamine™ 2000(Invitrogen, Cat#11668019)转染试剂，根据厂商说明，将编码食蟹猴的 MUC16 蛋白（ECT_TM cyMuc16:SEQ ID NO:120），包含近膜端、跨膜区以及胞内区，由通用生物系统(安徽)有限公司进行密码子优化和基因合成，并克隆到稳转载体 pIRESpuro3 中）的真核表达载体转染到 293T 细胞中，转染后 48 小时用 0.3μg/mL 嘌呤霉素(Puromycin Dihydrochloride, Gibco, Cat#A1113802)筛选 3~5 天，得到了高表达食蟹猴 MUC16 蛋白的 293T 细胞。流式细胞术参见上文，将梯度稀释的待测双特异性抗体（初始浓度为 100 nM，5 倍稀释，9 个点）加入到细胞中，4℃ 孵育 30 分钟。用 PBS 将细胞洗两遍后加入荧光二抗 R-PE-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcγ Fragment Specific，4℃ 孵育 30 分钟。用 PBS 将细胞洗两遍后重悬细胞，最后用 BD Accuri C5 (BD Bioscience) 流式细胞仪检测荧光信号。

从图 22 所示的结果可知，测试的双特异性抗体可以与 293T 细胞上表达的食蟹猴 MUC16 蛋白质结合。

(3) 通过细胞结合实验来判断本发明中的抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体能否与内源性表达在 Jurkat 细胞(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, Cat# SCSP-513)上的 CD3 蛋白结合。采用上文描述的流式细胞术进行检测，区别如下：待测双特异性抗体的稀释梯度为：最高浓度为 200 nM，随后第二个浓度从 100 nM 开始，5 倍稀释，10 个点）加入到 Jurkat 细胞中，4℃ 孵育 30 分钟。用 PBS 将细胞洗两遍后加入荧光二抗 R-PE-conjugated AffiniPure Goat Anti-Human IgG, Fcγ Fragment Specific，4℃ 孵育 30 分钟。用 PBS 将细胞洗两遍后重悬细胞，最后用 BD Accuri C5 (BD Bioscience)流式细胞仪检测荧光信号。

从图 23 所示的结果可知，测试的双特异性抗体可以与细胞表达的人 CD3 分子结合。

10.4 抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体对 T 细胞的激活以及对肿瘤细胞的杀伤活性

本实施例检测抗CD3/抗MUC16双特异性抗体MUC16抗原依赖的对Jurkat / NFAT-luc报告基因系统（质粒：Promega, Cat# E8481）的激活作用。检测系统中的靶细胞为内源性表达人MUC16的OVCAR3肿瘤细胞株或者293T阴性细胞株（中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, Cat# SCSP-502）。

抗CD3/抗MUC16双特异性抗体同时与OVCAR3细胞表面的MUC16和Jurkat T细胞表面的CD3结合，通过MUC16抗原依赖性的CD3交联，激活T细胞，荧光素酶的表达情况直接反映了抗CD3/抗MUC16双特异性抗体对Jurkat/NFAT-luc细胞的激活作用。

根据厂商说明，收集 Jurkat/NFAT-luc 细胞，离心后去上清，用测试缓冲液（90%1640 培养基 +10%FBS)重悬细胞，使得效应细胞密度为 1E6/mL。消化收集 OVCAR3 肿瘤细胞株以

及 293T 阴性细胞株,离心后去上清,用测试缓冲液 (90% 1640 培养基 +10% FBS)重悬细胞,使得靶细胞密度为 $5E5/mL$ 。然后分别将效应细胞和靶细胞悬液接种于 384 孔板(Corning, Cat#3570)中,每孔接种 $20\mu l$ 效应细胞和 $20\mu l$ 靶细胞,加入梯度稀释(最高检测浓度为 30 nM ,依次往下 3 倍稀释,总共 9 个浓度点)的待测双特异性抗体,每孔 $10\mu l$ 。将 384 孔板放置在 $37^{\circ}C$ 培养箱中,6 小时后,每孔加入 $30\mu l$ One-Glo (Promega, Cat#E6130)试剂,最后用多功能酶标仪(Tecan, Cat#F200)检测发光信号。

结果在图 24-25 中示出,结果表明所有抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体均能在表达人 MUC16 的细胞 (OVCAR3 细胞) 存在时激活 CD3 信号通路。

图 25 表明当检测体系中没有 MUC16 存在时(293T 阴性细胞株),所有抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体均不能激活 CD3 信号通路。

为了检测抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体介导 T 细胞杀伤肿瘤细胞的活性,我们建立了原代 T 细胞依赖的细胞毒性试验系统,以内源性表达人 MUC16 的 OVCAR3 为靶细胞,人外周血单个核细胞 PBMCs 为效应细胞。

(1) 复苏 PBMC 细胞,用 1640+10%FBS 完全培养基调整细胞密度至 $1\sim 2E6/mL$,加入终浓度为 100 IU/mL IL2 激活过夜。第二天上午胰蛋白酶消化培养的靶细胞 OVCAR3 以及 MUC16 阴性细胞 293T, 1000 rpm 离心 5 min 收集细胞,弃上清,用含 1%FBS (Gibco, Cat#10099-141) 的 MEM- α (Gibco, Cat#41061-029) 测试缓冲液调整靶细胞密度至 $2\times 10^5/mL$,按每孔 $50\mu L$ (即每孔 10,000 个细胞)铺到 96 孔板(Corning, Cat#3599)中。准备 4 倍终检测浓度的待测抗体,待测抗体最高检测浓度为 10 nM ,进行 3 倍梯度系列稀释共获得 8 个浓度点,每孔加入 $50\mu L$ 。实验同时设置靶细胞最大杀伤(靶细胞中加 2%Triton100 裂解液)、最小杀伤(靶细胞中加测试缓冲液)及自然杀伤(靶细胞中加效应细胞)对照,每孔加入 $50\mu L$ 。最后加入 $100\mu L$ 的含 IL2 的 PBMC 效应细胞悬液,使得最终细胞密度至 $1\times 10^6/mL$ (效应细胞 E:靶细胞 T=10:1),然后在细胞培养箱继续孵育 24 h ,其中 PBMC 效应细胞悬液中含有 200 IU/mL 的 IL2 (江苏金丝利药业有限公司)。孵育结束后,取出实验板, 2000 rpm 离心 3 min 使所有细胞沉到板底,小心吸取 $50\mu L$ 上清至新的 96 孔板,加入 $50\mu L$ LDH 检测液(Roche, Cat#11644793001)室温孵育,颜色变化时在 F50 酶标仪上读板,检测波长为 OD_{492nm} ,背景波长为 OD_{650nm} ,当最大杀伤孔的 OD_{492nm} 值介于 $0.4\sim 1.0$ 之间时进行检测分析。结果见图 26A,表明抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体能够特异性诱导 T 细胞杀伤 OVCAR3 肿瘤细胞,而对 MUC16 阴性细胞 293T 完全没有 ADCC 效应。

(2) 复苏 PBMC 细胞,用 1640+10%FBS 完全培养基调整细胞密度至 $1\sim 2E6/mL$,加入终浓度为 100 IU/mL IL2 激活过夜。第二天上午收集 PBMC 细胞悬液,按 T 细胞分离试剂盒 (Stemcell, Cat#17951RF)操作分选出所有 T 细胞备用。胰蛋白酶消化培养的靶细胞 OVCAR3, 1000 rpm 离心 5 min 收集细胞,弃上清,用含 1%FBS (Gibco, Cat#10099-141) 的 MEM- α (Gibco,

Cat#41061-029) 测试缓冲液调整靶细胞密度至 $2 \times 10^5/\text{ml}$, 按每孔 $50 \mu\text{L}$ (即每孔 10,000 个细胞) 铺到 96 孔板(Corning, Cat#3599)中。准备 4 倍终检测浓度的待测抗体, 待测抗体最高检测浓度为 10 nM , 进行 5 倍梯度系列稀释共获得 8 个浓度点, 每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 。实验同时设置靶细胞最大杀伤(靶细胞中加 2% Triton100 裂解液)、最小杀伤(靶细胞中加测试缓冲液)及自然杀伤(靶细胞中加效应细胞)对照, 每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 。最后加入 $100 \mu\text{L}$ 的含 IL2 的 T 效应细胞悬液, 使得最终细胞密度至 $1 \times 10^5/\text{mL}$ (效应细胞 E:靶细胞 T=1:1), 然后在细胞培养箱继续孵育 72 h, 其中 T 效应细胞悬液中含有 200 IU/mL 的 IL2 (江苏金丝利药业有限公司)。孵育结束后, 取出实验板, 2000 rpm 离心 3 min 使所有细胞沉到板底, 小心吸取 $50 \mu\text{L}$ 上清至新的 96 孔板, 加入 $50 \mu\text{L}$ LDH 检测液 (Roche, Cat#11644793001) 室温孵育, 颜色变化时在 F50 酶标仪上读板, 检测波长为 $\text{OD}_{492\text{nm}}$, 背景波长为 $\text{OD}_{650\text{nm}}$, 当最大杀伤孔的 $\text{OD}_{492\text{nm}}$ 值介于 0.4~1.0 之间时进行检测分析。结果见图 26B, 表明抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体在低 E:T, 延长孵育时间条件下仍然能够特异性诱导 T 细胞杀伤 OVCAR3 肿瘤细胞。

10.5 抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体激活 T 细胞后诱导细胞因子释放

为了检测抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体介导 T 细胞杀伤肿瘤细胞同时的因子分泌情况, 我们建立了原代 T 细胞依赖的细胞毒性试验系统, 以内源性表达人 MUC16 的 OVCAR3 为靶细胞, 人外周血单核细胞 PBMCs 为效应细胞。

复苏 PBMC 细胞, 用 $1640+10\% \text{ FBS}$ 完全培养基调整细胞密度至 $1 \sim 2 \times 10^6/\text{mL}$, 加入终浓度为 100 IU/mL IL2 激活过夜。第二天上午胰蛋白酶消化培养的靶细胞 OVCAR3 以及 MUC16 阴性细胞 293T, 1000 rpm 离心 5 min 收集细胞, 弃上清, 用含 $1\% \text{ FBS}$ (Gibco, Cat#10099-141) 的 MEM- α (Gibco, Cat#41061-029) 测试缓冲液调整靶细胞密度至 $2 \times 10^5/\text{ml}$, 按每孔 $50 \mu\text{L}$ (即每孔 10,000 个细胞) 铺到 96 孔板(Corning, Cat#3599)中。准备 4 倍最终检测浓度的待测抗体, 待测抗体最高检测浓度为 10 nM , 进行 3 倍梯度系列稀释共获得 8 个浓度点。PBMC 效应细胞悬液中加入 200 IU/mL IL2 (江苏金丝利药业有限公司), 最后每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 含 IL2 的 PBMC 效应细胞悬液, 使得最终细胞密度至 $1 \times 10^6/\text{mL}$ (效应细胞 E: 靶细胞 T=10:1), 然后在细胞培养箱继续孵育 24 h。孵育结束后, 取出实验板, 2000 rpm 离心 3 min 使所有细胞沉到板底, 小心吸取 $100 \mu\text{L}$ 上清至新的 96 孔板, 分别检测上清中的人 IFN γ (Cisbio, Cat#62HIFNGPEH)、人 TNF α (R & D, Cat#DY210) 以及人 IL-6 (R & D, Cat#DY206) 因子水平。结果见图 27, 表明抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体以及阳性对照抗体 REGN4018 在 OVCAR3 或者 293T 体系中能够诱导 T 细胞释放不同水平的人 IFN γ 、人 TNF α 以及人 IL-6 因子, 其中人 IFN γ 因子在两个批次 PBMC (Lot2104200250 和 Lot2110210241) 和 293 共培养体系中释放水平低于检测下限, 未显示图谱。

实施例 11. 抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体体内抑制肿瘤

本实施例通过在携带小鼠结肠癌细胞系 MC38 的 C57BL/6-hCD3 转基因小鼠中评价了抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体对小鼠皮下移植瘤的抑制作用。

首先, 构建高表达人 MUC16 的小鼠结肠癌细胞系 MC38。采用慢病毒感染方法将编码人 MUC16 蛋白的核苷酸 (ECT_TM huMuc16 由通用生物合成) 感染到 MC38 细胞中, 然后用 4 $\mu\text{g/mL}$ Puromycin Dihydrochloride (Gibco, Cat#A1113802) 筛选, 得到了高表达人 MUC16 的多克隆细胞, 进而通过有限稀释法获得高表达人 MUC16 的单克隆 MC38 细胞株, 命名为 MC38-hMUC16。

收集并计数 MC38-hMUC16 细胞, 按 1:1 体积比添加基质胶 (Matrigel) 混匀后放在湿冰盒内低温保存使用。实验动物为 42 只 6-8 周龄的 C57BL/6-hCD3 小鼠 (Biocytogen, Cat#110008), 接种前用 3 - 4% 异氟烷将小鼠麻醉。然后以 200 μL 的接种体积, 按每只小鼠 1.5×10^6 个 MC38-hMUC16 细胞, 皮下注射 (i.v.) 接种于小鼠背部右边靠近腋下。其中 5 只小鼠接种肿瘤细胞当天同时给药 (G6 组)。选取荷肿瘤体积生长至约 60 - 80 mm^3 左右的小鼠共 25 只, 将 25 只小鼠根据肿瘤大小和体重随机分 5 组 (G1~G5: 每组 5 只), 分组给药当天定义为第 0 天。分组情况和给药方案如表 34 所示:

表 34. 分组和给药方案

组别	受试物	数量	药 物 剂 量 (mg/kg)	给药方案
1	Vehicle 对照	5	N/A	i.v., 一周 2 次, 持续 3 周
2	MCH7-23L2-MCH7	5	15	i.v., 一周 2 次, 持续 3 周
3	MCH7-23L2-MCH7	5	5	i.v., 一周 2 次, 持续 3 周
4	MCH7-23L2-MCH7	5	5	i.v., 每天 1 次, 持续 10 天
5	REGN4018	5	5	i.v., 一周 2 次, 持续 3 周
6	MCH7-23L2-MCH7	5	5	接种肿瘤细胞当天给药, i.v., 一周 2 次, 持续 3 周

每天观察记录小鼠的外观及行为, 自分组开始连续观察最多 4 周。分组后每周测量肿瘤体积两次。肿瘤体积(V)的计算方法如下: $V = (\text{长} \times \text{宽}^2)/2$ 。每只小鼠相对肿瘤体积(RTV)的计算方法是: $\text{RTV} = V_t/V_0$, 其中 V_t 为每次的测量体积, V_0 为治疗开始时的体积。结果以平均值 $\pm$ S.E.M 的方式呈现。使用 Dunnett's multi-comparison test 进行两组间比较, 如果 $p < 0.05$ 则认为有统计学显著性差异。

结果见图 28A 和图 28B, 相对于阴性对照 (G1 组), 各组都具有良好的抑瘤作用, 其中 G3 组(MCH7-23L2-MCH7 5mg/kg)在第 21 天时相比 G1 组有显著差异 ($P < 0.05$), 此外 G3

组的抑瘤作用好于 G5 组（相对肿瘤抑制率 TGI_{TV}: 41.52% vs 28.32%）。G2~G6 组在第 11 天时相比 G1 组有显著差异 ($P<0.05$)，G3~G6 组在第 14 天时相比 G1 组有显著差异 ($P<0.05$)。

实施例 12. 抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体在 TDCC 实验中对 T 细胞功能的影响

为了检测抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体在 TDCC 杀伤体系中对 T 细胞功能的影响，我们测试了杀伤实验中 T 细胞表达 CD25（Biolegend, Cat#302612）、CD69（Biolegend, Cat#310904）、PD1（Biolegend, Cat#329908）、TIM3（Biolegend, Cat#345006）以及 T 细胞凋亡（Biolegend, Cat#423114）指标。

复苏 PBMC 细胞，用 1640+10%FBS 完全培养基调整细胞密度至 $1\sim 2\times 10^6/\text{mL}$ ，加入终浓度为 100 IU/mL IL2 激活过夜。第二天上午收集 PBMC 细胞悬液，按 T 细胞分离试剂盒(Stemcell, Cat#17951RF)操作分选出所有 T 细胞备用。胰蛋白酶消化培养的靶细胞 OVCAR3，1000 rpm 离心 5 min 收集细胞，弃上清，用含 1%FBS（Gibco, Cat#10099-141）的 MEM- α （Gibco, Cat#41061-029）测试缓冲液调整靶细胞密度至 $2\times 10^5/\text{mL}$ ，按每孔 50 μL （即每孔 10,000 个细胞）铺到 96 孔板(Corning, Cat#3599)中。准备 4 倍终检测浓度的待测抗体，待测抗体最高检测浓度为 10 nM，进行 5 倍梯度系列稀释共获得 8 个浓度点，每孔加入 50 μL 。最后加入 100 μL 的含 IL2 的 T 效应细胞悬液，使得最终细胞密度至 $1\times 10^5/\text{mL}$ （效应细胞 E:靶细胞 T=1:1），然后在细胞培养箱继续孵育 72 h，其中 T 效应细胞悬液中含有 200 IU/mL 的 IL2（江苏金顺利药业有限公司）。孵育结束后，取出实验板，收集每孔细胞进行流式分析，测试 T 细胞激活(CD25 和 CD69 表达)、T 细胞功能衰竭(PD1 和 TIM3 表达)以及 T 细胞凋亡指标变化情况。结果见图 29，表明抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体在低 E:T，延长孵育时间条件下相比对照抗体 REGN4018，对 T 细胞激活更弱，但诱导 T 细胞功能衰竭和诱导 T 细胞凋亡活性也更弱。

实施例 13. 抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体对肿瘤细胞的重复杀伤活性

为了检测抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体介导 T 细胞重复杀伤肿瘤细胞的活性，我们建立了原代 T 细胞依赖的细胞毒性试验系统，以内源性表达人 MUC16 的 OVCAR3 为靶细胞，人外周血单核细胞 PBMCs 中分离的 T 细胞为效应细胞。

复苏 PBMC 细胞，用 1640+10%FBS 完全培养基调整细胞密度至 $1\sim 2\times 10^6/\text{mL}$ ，加入终浓度为 100 IU/mL IL2 激活过夜。第二天上午收集 PBMC 细胞悬液，按 T 细胞分离试剂盒(Stemcell, Cat#17951RF)操作分选出所有 T 细胞备用。胰蛋白酶消化培养的靶细胞 OVCAR3，1000 rpm 离心 5 min 收集细胞，弃上清，用含 1%FBS（Gibco, Cat#10099-141）的 MEM- α （Gibco,

Cat#41061-029) 测试缓冲液调整靶细胞密度至 $2 \times 10^5/\text{ml}$, 按每孔 $50 \mu\text{L}$ (即每孔 10,000 个细胞) 铺到 96 孔板(Corning, Cat#3599)中。准备 4 倍终检测浓度的待测抗体, 待测抗体最高检测浓度为 10 nM , 进行 5 倍梯度系列稀释共获得 8 个浓度点, 每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 。实验同时设置靶细胞最大杀伤(靶细胞中加 2% Triton100 裂解液)、最小杀伤(靶细胞中加测试缓冲液)及自然杀伤(靶细胞中加效应细胞)对照, 每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 。最后加入 $100 \mu\text{L}$ 的含 IL2 的 T 效应细胞悬液, 使得最终细胞密度至 $5 \times 10^5/\text{mL}$ (效应细胞 E:靶细胞 T=5:1), 然后在细胞培养箱继续孵育 24 h, 其中 T 效应细胞悬液中含有 200 IU/mL 的 IL2 (江苏金丝利药业有限公司)。孵育结束后, 取出 2 块相同的实验板, 2000 rpm 离心 3 min 使所有细胞沉到板底, 其中一块小心吸取 $50 \mu\text{L}$ 上清至新的 96 孔板, 加入 $50 \mu\text{L}$ LDH 检测液(Roche, Cat#11644793001)室温孵育, 颜色变化时在 F50 酶标仪上读板, 检测波长为 492 nm , 背景波长为 650 nm , 当最大杀伤孔的 492 nm 值介于 0.4~1.0 之间时进行检测分析。另一块板弃去板内 $100 \mu\text{L}$ 上清, 然后按前面的实验条件每孔再次加入 $50 \mu\text{L}$ OVCAR3 细胞悬液(每孔 10,000 个细胞)和 $50 \mu\text{L}$ 待测抗体, 孵育 48 h 后收集上清检测杀伤。

结果见图 30, 表明抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体可以诱导 T 细胞连续杀伤 OVCAR3 肿瘤细胞, 高 E:T 条件下, 第一轮杀伤强度比阳性对照抗体弱, 但第二轮杀伤强度比阳性对照 REGN4018 略强。

实施例 14. 抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体在 TDCC 重复杀伤实验中对 T 细胞功能的影响

为了检测抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体在 TDCC 重复杀伤体系中对 T 细胞功能的影响, 我们测试了杀伤实验中 T 细胞表达 CD25 (Biolegend, Cat#302612)、PD1 (Biolegend, Cat#367604 或 Cat#329908)、TIM3 (Biolegend, Cat#345006) 以及 T 细胞凋亡 (Biolegend, Cat#423114) 指标。

复苏 PBMC 细胞, 用 1640+10%FBS 完全培养基调整细胞密度至 $1 \sim 2 \times 10^6/\text{mL}$, 加入终浓度为 100 IU/mL IL2 激活过夜。第二天上午收集 PBMC 细胞悬液, 按 T 细胞分离试剂盒(Stemcell, Cat#17951RF)操作分选出所有 T 细胞备用。胰蛋白酶消化培养的靶细胞 OVCAR3, 1000 rpm 离心 5 min 收集细胞, 弃上清, 用含 1%FBS (Gibco, Cat#10099-141) 的 MEM- α (Gibco, Cat#41061-029) 测试缓冲液调整靶细胞密度至 $2 \times 10^5/\text{ml}$, 按每孔 $50 \mu\text{L}$ (即每孔 10,000 个细胞) 铺到 96 孔板(Corning, Cat#3599)中。准备 4 倍终检测浓度的待测抗体, 待测抗体最高检测浓度为 10 nM , 进行 5 倍梯度系列稀释共获得 8 个浓度点, 每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 。最后加入 100

μL 的含 IL2 的 T 效应细胞悬液,使得最终细胞密度至 $5 \times 10^5/\text{mL}$ (效应细胞 E:靶细胞 T=5:1),然后在细胞培养箱继续孵育 24 h,其中 T 效应细胞悬液中含有 200 IU/mL 的 IL2 (江苏金顺利药业有限公司)。孵育结束后,取出 2 块相同的实验板,收集其中一块板中的细胞进行流式分析,另一块板每孔弃去 100 μL 上清,然后按前面的实验条件每孔再次加入 50 μL OVCAR3 细胞悬液 (每孔 10,000 个细胞)和 50 μL 待测抗体,孵育 48 h 后收集每孔细胞进行流式分析。测试指标为 T 细胞激活(CD25 表达)、T 细胞功能衰竭(PD1 和 TIM3 表达)以及 T 细胞凋亡。结果见图 31,表明抗 CD3/抗 MUC16 双特异性抗体在两轮杀伤实验中相比对照抗体 REGN4018,对 T 细胞激活更弱,但诱导 T 细胞功能衰竭和诱导 T 细胞凋亡活性也更弱,这可能是导致其在第二轮杀伤中比对照抗体杀伤更强的原因。

本文所提及的全部出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用的方式完整地并入。上文以及整个本申请中所论述的任何或所有特征可以在本发明的各种实施方案中组合。此外,本文中所述的材料、方法和例子仅是说明性的并且不意在是限制性的。本发明的其他特征、目的和优点将从本说明书及附图并且从后附的权利要求书中显而易见。

序列表:

SEQ ID NO	说明	(CDR 均采用 Kabat 方案定义; 灰色部分为恒定区中序列)
1	SP34 抗体人源化抗体重链 hu34H1	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFEPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHITCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVAVAVSHEDPEVKFNWYVVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVITVTHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPHEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTITPPVLDSDGSSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
2	SP34 抗体人源化抗体轻链 hu34L2	QAVVTQEPSTLVSPGGTIVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLGGKA ALTLSGAQPEDEAEYFCALWYSNLTWVFGGGTKLTVLGOPKAAAPSVTLFPPSSSEELQANKATLVCLISDFYPGAV TVAWKADSSPVKAGVEFTIPSKQSNKKYAAASSYLSTLPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC
3	SP34 抗体人源化抗体重链可变区 hu34H1	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTITVTVSS
4	SP34 抗体人源化抗体轻链可变区 hu34L2	QAVVTQEPSTLVSPGGTIVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLGGKA ALTLSGAQPEDEAEYFCALWYSNLTWVFGGGTKLTVL
5	SP34 抗体人源化抗体 HCDR1	TYAMN
6	SP34 抗体人源化抗体 HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKDK

7	SP34 抗体人 源化抗体 HCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
8	SP34 抗体人 源化抗体 LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN
9	SP34 抗体人 源化抗体 LCDR2	GTNKRAP
10	SP34 抗体人 源化抗体 LCDR3	ALWYSNLWV
11	23L2 ScFv	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNGNSYVSWFAYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSQA VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLGGKAAL TLGSAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG
12	scFv 连接肽	GGGGSGGGSGGGGS
13	DA023AH23L 2 重链 (连接 肽见黑体+下 划线)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNGNSYVSWFAYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSQA VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLGGKAAL TLGSAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTHLMISRTPE VTCVVAVASHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL AAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

14	人源化抗体重链 29HH1-1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTHYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGATNFKFKTRVTLT VDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRVGGSLYMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVIVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHICPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRITPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFELYSKLTVDKSRWQQGNVFNESCVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
15	人源化抗体轻链 29HL1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGYG TDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSYPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFHFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSIYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFENRGEC
16	人源化抗体重链可变区 29HH1-1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTHYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGATNFKFKTRVTLT VDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRVGGSLYMDYWGQGTLVTVSS
17	人源化抗体轻链可变区 29HL1	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGYG TDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSYPRTFGGGTKVEIK
18	人源化抗体轻链 29HL2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGG TDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSYPRTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFHFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSIYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFENRGEC
19	人源化抗体轻链可变区 29HL2	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGG TDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSYPRTFGGGTKVEIK
20	人源化抗体轻链 29HL3	DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGY GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPRTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFHFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSIYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFENRGEC
21	人源化抗体轻链可变区 29HL3	DIVMTQSPDSLAVSLGERVTMNCSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGY GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPRTFGGGTKLEIK

22	人源化抗体重链 29HH1-2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTHYMYWVRQAPGGGLEWIGGINPSNGATNFNEKFKTKATLT VDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRVGGLSYTM DYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
23	人源化抗体重链可 变区 29HH1-2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTHYMYWVRQAPGGGLEWIGGINPSNGATNFNEKFKTKATLT VDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRVGGLSYTM DYWGQGLTVTVSS
24	人源化抗体重链 29HH1-4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTHYMYWVRQAPGGGLEWIGGINPSNGATNFNEKFKTRVTM TVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRVGGLSYTM DYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNH HYTQKSLSLSPGK
25	人源化抗体重链可 变区 29HH1-4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTHYMYWVRQAPGGGLEWIGGINPSNGATNFNEKFKTRVTM TVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRVGGLSYTM DYWGQGLTVTVSS
26	人源化抗体重链 29HH2-3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTHYMYWVRQAPGGGLEWIGGINPSNGATNFNEKFKTRVTLT VDKSISTAYMELSLRSDDTAVYYCTRVGGLSYTM DYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
27	人源化抗体重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTHYMYWVRQAPGGGLEWIGGINPSNGATNFNEKFKTRVTLT

	链可变区 29HH2-3	VDKSI STAYMEL SRLRSDDTAVYYCTRVGGLSY TMDYWGQGT LVTVSS
28	人源化抗体重 链 29HH2-4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTHYMYWVKQAPGQGLEWIGGINPSNGATNFNEKFKTKATLT VDKSI STAYMEL SRLRSDDTAVYYCTRVGGLSY TMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHITCPPCPAPELIGGPSVFELFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVKSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNH YTQKSLSLSPGK
29	人源化抗体重 链可变区 29HH2-4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTHYMYWVKQAPGQGLEWIGGINPSNGATNFNEKFKTKATLT VDKSI STAYMEL SRLRSDDTAVYYCTRVGGLSY TMDYWGQGT LVTVSS
30	双特异性抗体 HC1(Fc-Rhole)	EPKSSDKTHITCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVKSNKALAAPIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALH NHYTQKSLSLSPGK
31	双特异性抗体 HC2(29H6-23 L2 Rknob)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTHYMYWVRQAPGQGLEWIGGINPSNGATNFNEKFKTKATLT VDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRVGGLSY TMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVE PKSCVEQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATY YADSVK DRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNEGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSGGGGGGGGGGGG GSQAVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLGG KAALTL SGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGEPKSSDKTHITCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALAAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
32	双特异性抗体 重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTHYMYWVRQAPGQGLEWIGGINPSNGATNFNEKFKTKATLT VDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRVGGLSY TMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL

	HC1(29H6NS-Rhole) (N55S)	GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHITCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFELVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
33	双特异性抗体 HC1(29H6-Rhole)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTHYMYWVRQAPGQGLEWIGGINPSNGATNFEKFKTKATLT VDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRVGGSLYTM DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHITCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQ VSLSCAVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFELVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
34	双特异性抗体 HC2(29H6NS-23L2 Rknob) (N55S)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTHYMYWVRQAPGQGLEWIGGINPSNGATNFEKFKTKATLT VDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRVGGSLYTM DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCAEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTTSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYADSVK DRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNEFNSYVSWFAYWGQGTITVTVSSGGGGGGGGGG GSQAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGG KAALTLSGAQPEDEAEYFCALWYSNLTWVFGGGTKLTVLGEPKSSDKTHITCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGYFSPDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFELVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
35	双特异性抗体 HC2(29H6GE-23L2 Rknob)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTHYMYWVRQAPGQGLEWIGGINPSNEATNFEKFKTKATLT VDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRVGGSLYTM DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCAEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTTSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYADSVK DRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNEFNSYVSWFAYWGQGTITVTVSSGGGGGGGGGGGG GSQAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGG

		KAALTLSGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKPKD TLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVVDGVEVHNATKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (G56E)
36	双特异性抗体 重链 HC1(29H6GE- Rhole)(G56E)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTHYMYWVRQAPGQGLEWIGGINPSNEATNFNEKFKTKATLT VDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRVGGLSYTM DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVVDGVEVHNATK KPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
37	双特异性抗体 重链 HC2(23L2Scfv -Rknob)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTSYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTLYQMNSLKTEDTAVYYCTRHNFGNSYVSWFAYWVGQGTTVTVSSGGGGGGGGGGGSGQA VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLLGKAAL TLSGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVVDGVEVHNATKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
38	双特异性抗体 重链可变区 29H6NS VH (N55S)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTHYMYWVRQAPGQGLEWIGGINPSSGATNFNEKFKTKATLT VDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRVGGLSYTM DYWGQGTLVTVSS
39	双特异性抗体 重链可变区 HCDR2-NS	GINPSSGATNFNEKFKT
40	双特异性抗体 重链可变区 29H6GE VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTHYMYWVRQAPGQGLEWIGGINPSNEATNFNEKFKTKATLT VDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRVGGLSYTM DYWGQGTLVTVSS (G56E)

41	双特异性抗体 重链可变区 29H6GE VH-HCDR2	GINPSNEATNFNEKFKT
42	双特异性抗体 Fc-hole (CH2-CH3hole)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLT CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
43	双特异性抗体 Fc-knob (较链 区 -CH2-CH3kno b)	EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPCRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
44	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVAVTVPSSS LGITQYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSC
45	IgG1 恒定区 (LALA 突变 +D265A+P329 A) (划线部 分为恒定区 Fc 序列)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVAVTVPSSS LGTQYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
46	Fc(无较链区, CH2-CH3+LA LA 突变 +D265A+P329 A)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
47	lambda 轻链恒 定区	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPPSKQSNKYYAAASSYLSL TPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC

48	IgG1 恒定区 (无突变)(划线部分为恒定区Fc序列)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
49	Fc(无铰链区,无突变,CH2-CH3)	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
50	Kappa 轻链恒定区	RTVAAPSVFIFPPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
51	Roche-CD3 HC(重链可变区序列见下线)	EVQLLEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSTFYAMNWRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCVRHGFNGSNYSVSWFAYWGGGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
52	Roche-CD3 LC	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTSGSSTGAVTTSNYANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTHFPPSSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSSPVKAGVETITPPSKQSNKKYAAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC (轻链可变区见下线)
53	CD3B219 HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGFNGSNYSVSWFAYWGGGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSLKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

		HNHYTQKSLSLGK
54	CD3B219 LC	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSLNWVFGGKTLTVLGGPKAAPSVTLFPPSSSEELQANKATLYCLISDFYPGA VTVAWKADSSPVKAGVETITPSKQSNKYYASSYLSLTIPEQWKSHRSYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC
55	GC5B596 HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTGYTMNWVRQAPGQGLEWMGLINPYNSDTNYAQKLQGRVT MTTDTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARVALRVALDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTKITYTCNVDHKPSNITKVDKRV ESKYGPPCPAPPEAAGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKTP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMITKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPFVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHAEALHNHYT QKSLSLGK
56	GC5B596 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCKASQNVATHVGYQQKPGKAPKRLIYSASYRYSYGVSPSRFSGSGTEFTLT ISNLPQEDFATYYCQQYNRYPTYTFGGQTKLEIKRTVAAPSVFIEPPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSIYSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
57	HuGPRC5D	MYKDCIESTGDYFLCDAEGPWGHIIESLAIGIVVTILLALLAFLFLMRKIQDCSQWNVLPTQLLFLLSVLGLFG LAFAFIHLNQQTAPVRYFLFGVLFALCFSCLLAHASNLVKLVRCVSFSWTTILCIAIGCSLLQIIHATEYVTLIMT RGMFMFVNMTPCQLNVDVFLVLLVYVFLMALTFVSKATFCGPCENWKQHGRLIFITVLFSLIHWVWISMLLR GNPQFQRQPQWDDPVVCIALVTNAWVFLLLYIVPELCILYRSCREQCPLQGNACPVATAYQHSFQVENQELSRA RDSGAEEDVALTSYGTPIQPQTVDPTQECFIPQAKLSPPQDAGGV
58	CynoGPRC5D	MYKDCIESTGDYFLPCDSEGPWGHIESLAIGIVVTILLALLAFLFLMRKIQDCSQWNVLPTQLLFLLSVLGLFG LAFAFIHLNQQTAPVRYFLFGVLFALCFSCLLAHASNLVKLVRCVFSWTTILCIAIGCSLLQVIAIEYVTLIM TRGMMFVHMTPYQLNVDFVLLVYVFLMALTFVSKATFCGPCENWKQHGRLIFITVLFSLIHWVWISMLL RGNPQFQRQPQWDDPVVCIALVTNAWVFLLLYIVPELCILYRSCREQCPSQGHACPVATAYQRSFQVENQELS ARDSGAEEDVALTSFGTPIQPQTVDPTQECFIPRAKLSPQQDAGV
59	Fe-hole(铰链 区-CH2-CH3 hole)	EPKSCDKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK

60	嵌合抗体 29H12C9 重链	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTTHYMYWVKQRPGQGLEWIGGINPSNGATNFEKFKTKATLTV DKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRVGGLSYTMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNITKVDKKEP KSCDKTHCTCPPELPGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTK PREEQYNSTYRVVSVITVLIHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELITKNQV SLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTIPPVLDSDGSFFLYSKITVDKSRWQQGNVVFSCVVMHEALHNHY TQKLSLSLSPGK
61	嵌合抗体 29H12C9 轻链	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVSMSCKSSQLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGY GTDFTLTISSMKAEDLAVYYCQQYYSPRTFGGGTKLDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCILNNFYPR EAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
62	嵌合抗体 29H12C9 重链 可变区	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTTHYMYWVKQRPGQGLEWIGGINPSNGATNFEKFKTKATLTV DKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRVGGLSYTMDYWGQGTSTVTVSS
63	嵌合抗体 29H12C9 轻链 可变区	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVSMSCKSSQLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGY GTDFTLTISSMKAEDLAVYYCQQYYSPRTFGGGTKLDIK
64	嵌合抗体 29H12C9 重链 可变区 HCDR1	THYMY
65	嵌合抗体 29H12C9 重链 可变区 HCDR2	GINPSNGATNFEKFKT
66	嵌合抗体 29H12C9 重链 可变区 HCDR3	VGGLSYTMDY

67	嵌合抗体 29H12C9 轻链 可变区 LCDR1	KSSQSLLYSSNQKNYLA
68	嵌合抗体 29H12C9 轻链 可变区 LCDR2	WASTRES
69	嵌合抗体 29H12C9 轻链 可变区 LCDR3	QQYYSYPRT
70	嵌合抗体 4B9E9 重链	DVQLVESGGGLVQPRGSRKLSCAASGFTSSFGMHVVRQAPEKGLEWVAYISSDSNTIYYADTVQGRFTISRDNPKNTLFLQMTRLRSEDAMYYCARNPWYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFFPLAPSSKSTSGGFAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCTCPAPELIGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVAVSVLTIVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKSKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTIVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
71	嵌合抗体 4B9E9 轻链	DVLMTQTPLSLPVSLGDDQVSISCRSSQSIVHSNGNTYLEWFLQKPGQSPKLLIYKVSNNRFSGVDPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGYYCFQGSHIPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
72	嵌合抗体 4B9E9 重链可变区	DVQLVESGGGLVQPRGSRKLSCAASGFTSSFGMHVVRQAPEKGLEWVAYISSDSNTIYYADTVQGRFTISRDNPKNTLFLQMTRLRSEDAMYYCARNPWYFDVWGAGTTVTVSS
73	嵌合抗体 4B9E9 轻链可变区	DVLMTQTPLSLPVSLGDDQVSISCRSSQSIVHSNGNTYLEWFLQKPGQSPKLLIYKVSNNRFSGVDPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGYYCFQGSHIPPTFGGGTKLEIK

74	嵌合抗体 4B9E9 重链可 变区 HCDR1	SFGMH
75	嵌合抗体 4B9E9 重链可 变区 HCDR2	YISSDSNTIYYADTVQG
76	嵌合抗体 4B9E9 重链可 变区 HCDR3	NPWYFDV
77	嵌合抗体 4B9E9 轻链可 变区 LCDR1	RSSQSIHSHNGNTYLE
78	嵌合抗体 4B9E9 和 39A9F1 的轻 链可变区 LCDR2	KVSNRFS
79	嵌合抗体 4B9E9 轻链可 变区 LCDR3	FQGSHIPPT
80	嵌合抗体 39A9F1 重链	QVQLQQPGAELVKPGSSVKLSCKASGYTFTTYWMEWVKQRPQGQGLEWIGEINPNNGRSNRYNEKFQTKATLT VDKSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCARERAGLTYYWGQGLTVIVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPRE EQYNSTYRVAVSVSLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
81	嵌合抗体	DVVMQTPTLSPVSLGDQASISCRSSQSLVHSHNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPPDRFGSGSG

	39A9F1 轻链	TDFTLKISRVEAEDLGVYFCSSQSTHFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSIYSISSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
82	嵌合抗体 39A9F1 重链 可变区	QVQLQQPGAEELVKPGSSVKLSCKASGYTFTTYWMEWVKQRPQGQGLEWIGEINPNNGRSNYNEKFQTKATLT VDKSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCARERAGLTYWGGQTLVIVSA
83	嵌合抗体 39A9F1 轻链 可变区	DVVMQTPTLSPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNNRFSGVDPDRFGSGSG TDFTLKISRVEAEDLGVYFCSSQSTHFPYTFGGGTKLEIK
84	嵌合抗体 39A9F1 重链 可变区 HCDR1	TYWME
85	嵌合抗体 39A9F1 重链 可变区 HCDR2	EINPNNGRSNYNEKFQT
86	嵌合抗体 39A9F1 重链 可变区 HCDR3	ERAGLTY
87	嵌合抗体 39A9F1 轻链 可变区 LCDR1	RSSQSLVHSNGNTYLH
88	嵌合抗体 39A9F1 轻链 可变区 LCDR3	SQSTHFPYT

89	双特异性抗体 Fc-knob (CH2-CH3knob)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDKTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRAVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTIPPVLDSDGSEELYSKITVDKSRWQQGNVFSCSVMIHEALHNHYT QKSLSLSPGK
90	sp34 VH	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSQSIILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGFNGSNYSVWFAYWGQGTLLVTVSS
91	sp34 VL	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAA LTITGAQTEDEAIFYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
92	776.1 VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFDTYNIHWVKQSHGKILEWIGYIYPYNGVSDYNQNFKSKATLIVD NSSNTAYMELRSLTSEDSAVYYCARWDFGSGYYFDYWGQGTLLTVSS
93	776.1 VH HCDR1	DYNIH
94	776.1 VH HCDR2	YIYPYNGVSDYNQNFKS
95	776.1 VH HCDR3	WDFGSGYYFDY
96	776.1 VL	QIVLSQPAILFASPGETVMTCRASSSVIYMCWNQQKPGSSPKPWYGTSTLASGVPTRFSGSGSGTSYSLTISR VEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEIK
97	776.1 VL LCDR1	RASSSVIYMC
98	776.1 VL LCDR2	GTSTLAS
99	776.1 VL LCDR3	QQWSSNPFT
100	776.1 VL(C33A)	QIVLSQPAILFASPGETVMTCRASSSVIYMAWNQQKPGSSPKPWYGTSTLASGVPTRFSGSGSGTSYSLTISR VEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEI
101	776.1	RASSSVIYMA

	VL(C33A) LCDRI	
102	776.1 VL(C33S)	QIVLSQSPAILFASPGETVMTCRASSSVIYMSWNNQQKPGSSPKPWYGTSTLASGVPTRFSGSGSGTSYSLTISR VEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEIK
103	776.1 VL(C33S) LCDRI	RASSSVIYMS
104	sp34 HC	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFTNTYAMNWWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
105	sp34 LC	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAA LTTGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC
106	776.1 HC	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDYNHWWVKQSHGKILEWIGYIYPYNGVSDYNQNFKSKATLIVD NSSNTAYMELRSLTSEDSAVYYCARWDFGSGYYFDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
107	776.1 LC	QIVLSQSPAILFASPGETVMTCRASSSVIYMCWNNQQKPGSSPKPWYGTSTLASGVPTRFSGSGSGTSYSLTISR VEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFFPPSDEQLKSGTASVCLLNFNFPREAKVQWKV

108	776.1 LC(C33A)	DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC QIVLSQSPAILFASPGETVMTCRASSSVIYMAWNQKPGSSPKPWYGTSTLASGVPTFRFSGSGSGTSYSLTISR VEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
109	776.1 LC(C33S)	QIVLSQSPAILFASPGETVMTCRASSSVIYMSWNQKPGSSPKPWYGTSTLASGVPTFRFSGSGSGTSYSLTISR VEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFFPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
110	人 MUC16-His	GSRKFNTERVLQGLLRPLFKNTSVPLYSGCRLTLRLRPEKDGATGVDICTHRPDPPTGPGLDREQLYLELSQ LTHSITELGYPYTLDRDSLYVNGFTHRSSVPTTSTGVVSEEPFTLNFTINNLRYMADMGPQGLKFNITDNVMQH LLSPLFORSSVGARYTGCRVIALRSVKNGAETRVDDLCTYLQPLSGPLPIKQVVFHELSSQTHGITRLGYPYSLDK DSLYLNGYNEPGPDEPPTTPKPATTFPLPPLSEATTAMGYHLKTLTLNFTISNLQYSPDMGKGSATFNSTEGVLQH LLRPLFQKSSMGPFYLGCLISLRPEKDGATGVDTTCTYHPDPVGPGLDIQQLYWELSQLTHGVTQLGFYVL DRDSLFINGYAPQNLISIRGEYQINFHIVNWNLSNPDPTSSEYITLLRDIQDKVTTLYKGSQLHDTFRFCLVTNLT MDSVLVTVKALFSSNLDPSLVEQVFLDKTLNASFHWLGSYQLVDIHVTEMESVYQPTSSSSTQHFFYLNFTIT NLPYSQDKAQPGTTNYQRNKRNIEDALNQLFRNSSIKSYFSDCCQVSTFRSVPNRHHTGVDLSLNCNFSPLARRVD RVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLPHHHHHH
111	恒河猴 MUC16-His	GSRKFNTERVLQGLLRPLFKNTSVPLYSGCRLTLRLRPEKDGATGVDVICTHRPDPPTGPGLDREQLYLELSQ LTHSITELGYPYTLDNDSLFGVNGFTHRSSVPTTSTGMVSEEPFTLNFTINNLRYMADMGPQGLKFNITDNVMQH LLSPLFORSSVGARYTGCRVIALRSVKNGAKTQVDILCTYLQPLSGPALPIKQVVFHELSSQTHGITRLGYPYFLDK DSLYLNGYNEPGPDEPPTTPKPATTFPLPPLSEATTAMGYHLKTLTLNFTISNLQYSPDMGNGSAAFNSTERVVKH LLRALFQKSSMGPFYLGCLISLRPEKNGAATGVDTTCTYHTDPVGPGLDIQQLYWELSQLTHGVTQLGFYVL DRDSLFINGYAPQNLISIRGKYQIHFIHVNWNFSPNPDPTSSEYIALLRDIQDKVTTLYKGSQLHDTFRYCLVTNLT MDSMLVTVKALFSSDDLDPSSLVEQVFLDKTLNASSHWLGSYQLVDIHVTEMESVYQPTKPTSSSSTQHFFYLN FTITNLPYSQDISQPTTNYQRNKRNIEDALNQLFRNSSIKSYFSDCCQVSTFRSVPNSHHTGVDLSLNCNFSPLARR VDRVAIYEEFLRMTRNGSQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLPHHHHHH
112	食蟹猴 MUC16-His	GSRKFNTERVLQGLLRPLFKNTSVPLYSGCRLTLRLRPEKDGATGVDVICTHRPDPPTGPGLDREQLYLELSQ LTHSITELGYPYTLDNDSLFGVNGFTHRSSVPTTSTGMVSEEPFTLNFTINNLRYMADMGPQGLKFNITDNVMQH LLSPLFORSSVGARYTGCRVIALRSVKNGAKTQVDILCTYLQPLSGPALPIKQVVFHELSSQTHGITRLGYPYFLD

		KDSLNLNGYNEPGDEPPTTPKPATTFPLPPLSEATTAMGYHLKTLTLNFTISNLQYSPDMGNCSAAFNSTERVVK HLRLALFQKSSMGPFYLGCCQLISLRPEKNGAATGVDTTCTYHTDTPVGPGLDIQQLYWELSQLTHGVTQLGFYV LDRDSLFINGYAPQNL SIRGKYQHIFHIVNWNLGNPDPTSSSEYIALLRDIQDKVTTLTKGSRLLHDTFCYCLVTNL TMDTMLVTVKALFSSDLDP SLVEQVFLDKTLNASSHWLGSTYQLVDIHVTEMPEVSYYQPTKPTSSSTQHFYL NFTITNLPYSQDISQPSTTNYYQRNKRNIEDALNQLFRNSSIKSCFSDCQVSTFRSVPSNSHHTGVDSLCLCNFSPLAR RVDRVAIYEEFLRMTRNGSQLQNFITLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLPHHHHH
113	重链可变区 (MCH7)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNIHWRQAPGQGLEWMGYIYPYNGVSDYNQNFKSRVTM TTDTSTSTAYMELSLRSDDTAVYYCARWDFGSGYYFDYWGQGLTVTVSS
114	轻链可变区 (MCL4)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVIYMSWYQQKPGQAPRLLIYGTSTLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISL EPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLEIK
115	MCH7 HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNIHWRQAPGQGLEWMGYIYPYNGVSDYNQNFKSRVTM TTDTSTSTAYMELSLRSDDTAVYYCARWDFGSGYYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCTCPPEAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
116	MCL4 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVIYMSWYQQKPGQAPRLLIYGTSTLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISL EPEDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
117	重 23L2ScFv-Hol e	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFTSYAMNWRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRF TISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDAVYYCTRHNFGNSYVSWFAYWGGQTTVTVSSGGGGSGGGSGGGGGS QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGTNKRAPGVPARFSGSLGKGK AALTLGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGEPKSSDKTHTCPPEAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSGFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

118	重 链 MCH7-KIH-K nob	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNIHWRQAPGGQGLEWMGYIYPYNGVSDYNQNFKSRVTMTTDTSTSTAYMELSLRSDDTAVYYCARWDFGSGYYFDYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYVTLPPKQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
119	重链 2MCH7-KIH-Knob	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNIHWRQAPGGQGLEWMGYIYPYNGVSDYNQNFKSRVTMTTDTSTSTAYMELSLRSDDTAVYYCARWDFGSGYYFDYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNIHWRQAPGGQGLEWMGYIYPYNGVSDYNQNFKSRVTMTTDTSTSTAYMELSLRSDDTAVYYCARWDFGSGYYFDYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYVTLPPKQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
120	ECT_TM cyMuc16	MALPVTALLPLALLHAARPGSRKFNTERVLQGLLRPLFKNTSVGPLYSGCRLTLRLPEKDGATGVDVICTHRPDPTGPGLDREQLYLELSQLTHSITELGPYTLNDNSLFVNGFTHRSSVPTTSTGMVSEEPFTLNFNTINLRYMADMGQPGSLKFENITDNVMQHLLSPLFQSSVGARYTGCRVIALRSVKNGAKTQVDILCTYLQPLSGPGLPIKQVFHELSQLTHGIRLGPYFLDKDSLYLNGYNEPGPDEPPTTPKPATTFPLPSEATTAMGYHLKTLTLNFTISNLQYSPDMGNGSAAFNSTERVVLKHLRALFQKSSMGPFYLGCCQLISLRPEKNGAATGVDTTCTYHTDPVGPGLDIQQLYWELSQLTHGVTQLGFYVLDRLSLFINGYAPQNLIRGKYQIHFHIVNWNLGNPDPTSSSEYIALLRDIQDKVTTLYKGSRLHDTFCYCLVTNLTMDTMLVTVKALFSSDDLDPQLVEQVFLDKTLNASSHWLGSYQLVDIHVTEMEPSVYQPTKPTSSSSTQHFYLNFTITNLPYSQDISQPTTNYQRNKRNIEDALNQLFRNSSIKSCFSDCQVSTFRSVPNSHHTGVDSLNCNFSPLARRVDRVAIYEFLRMTRNGSQLQNFITLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNNSDLPFWAHILICLAVLLGLITCLICGFLATTRWRKKEEYSFRQCPGYRSHLDLEDLQ
121	重链 MCH7-23L2S	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNIHWRQAPGGQGLEWMGYIYPYNGVSDYNQNFKSRVTMTTDTSTSTAYMELSLRSDDTAVYYCARWDFGSGYYFDYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKK

	cFv-Hole	VEPKSCEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFESTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSV KDRFTISRDDSKNTLYLQMNLSLKTEDTAVYYCTRHNFGNSYVSWFAYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGG GGSAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLG GKAALTLGAQPEDEAEYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGEPKSSDKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPETVCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
122	重链 REGN4018-87 67pH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFESNYYSMSWVRQAPGKGLEWISYISGRGSTIFYADSVKGRITISRDN AKNSLFLQMNLSRAEDTAVYFCVKDRGGYSPYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETVCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLGK
123	重链 REGN4018-G 20	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYSMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIYADSVKGRFTISR DNAKNSLYLQMNLSRAEDTALYYCAKYGSGYGKYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKTYTCNVVDHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETVCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALH NRFTQKSLSLGLK
124	轻链 REGN4018-87 67pL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISITLYLNWYQQKPGKAPKLLIYTASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPITFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
125	sofituzumab HC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYISITNDYAWNVRQAPGKGLEWVGYISYSGYTTYNPSLKSRTISR DTSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARWTSGLDYWGQGTLLVTVSS
126	sofituzumab LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASDLIHNWLAWYQQKPGKAPKLLIYGATSLTGTVPFSRFSGSGSGTDFLT ISSLPEDFATYYCQQYWTTPFTFGQGTKEIK
127	ECT_TM	MALPVTALLPLALLHAARPGSRKFNTERVLQGLLRPLFKNTSVGPLYSGCRLTLRPEKDGATGVDAICT

	huMuc16	HRPDPTGPGLDREQLYLELSQLTHSITELGPYTLDRDSLNVNGFTHRSSVPTTSTGTVSEEPFTLNFNTNNLRYM ADMGPQGLKFNITDNVMQHLLSPLFQRSSLGARYTGCRVIALRSVKNGAETRVDLLCTYLQPLSGPGLPIKQ VFHELSSQTHGITRLGYPYSLDKDSLNLNGYNPGPDEPPTTPKPATTFPLPSEATTAMGYHLKTLTLNFTISNL QYSPDMGKGSATFNSTEGVLQHLLRPLFQKSSMGPFFYLGQCQLISLRPEKDGAAATGVDTTCTYHPDPVGPGLDI QQLYWELSQLTHGVTQLGFYVLDRLDSLFINGYAPQNL SIRGEYQINFHIVNWNLSNPNPPTSSEYITLLRDIQDK VTTLYKGSQQLHDTFRFCLVNTLMTDSVLTVKALFSSNLDPSLVEQVFLDKTLNASFWHLGSTYQLVDIHVTE MESSVYQPTSSSSTQHFFYLNFTITNLPYSQDKAQPQGTNNYQRNKRNIEDALNQLFRNSSIKSYFSDCCQVSTFRS VPNRHHTGVDSLNCNFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFNLTDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLPFW AVILIGLAGLLGVITCLICGVLVTTRRRKKEGEYNVQQQCPGYQSHLDLEDLQ
128	ECT_TM RhMuc16	MALPVTAALLPLALLHAARPGSRKFNTTTERVLQGLLRPLFKNTSVGPLYSGCRLTLRPEKDGATGVDVICT HRPDPTGPGLDREQLYLELSQLTHSITELGPYTLDNDSLFVNGFTHRSSVPTTSTGTMVSEEPFTLNFNTNNLRYM ADMGPQGLKFNITDNVMQHLLSPLFQRSSVGARYTGCRVIALRSVKNGAKTQVDILCTYLQPLSGPALPIKQ VFHELSSQTHGITRLGYPYFLDKDSLNLNGYNPGPDEPPTTPKPATTFPLPSEATTAMGYHLKTLTLNFTISNL QYSPDMGNGSAAFNSTERVLKHLRALFQKSSMGPFFYLGQCQLISLRPEKNGAATGVDTTCTYHTDPVGPGLDI QQLYWELSQLTHGVTQLGFYVLDRLDSLFINGYAPQNL SIRGKYQIHFIHIVNWNFSNPNPPTSSEYIALLRDIQDK VTTLYKGSQQLHDTFRYCLVTNLTMDSMLTVKALFSSDLDPSLVEQVFLDKTLNASFWHLGSTYQLVDIHVTE MEPSVYQPTKPTSSSSTQHFFYLNFTITNLPYSQDISQPTTNYQRNKRNIEDALNQLFRNSSIKSYFSDCCQVSTFR SVPNSHHTGVDSLNCNFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGSQLQNFNLTDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLPFW AHILICLAVLLGLITCLICGFLATTRWRKKEEYSFRQQCPGYRSHLDLEDLQ

权利要求

1、一种双特异性抗体，其包含

第一抗原结合区和第二抗原结合区，其中第一抗原结合区特异性结合肿瘤相关抗原，和/或第二抗原结合区特异性结合 CD3，

其中所述第二抗原结合区是抗 CD3 抗体的 scFv，所述 scFv 包含 VH 和 VL，任选地，所述 VH 和 VL 经由接头连接，所述接头例如包含氨基酸序列 (G4S)_n，其中 n=1,2,3,4 或 5，优选地，n=3 或 4，更优选地，n=3。

2、权利要求 1 的双特异性抗体，其中所述 scFv 包含的 VH 包含 3 个来自重链可变区的互补决定区 (HCDR)，HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且所述 scFv 包含的 VL 包含 3 个来自轻链可变区的互补决定区 (LCDR)，LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中

(i) HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 选自如 SEQ ID NO:3 中所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，且 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 选自如 SEQ ID NO:4 中所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

(ii) HCDR1 由 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列组成，HCDR2 由 SEQ ID NO:6 所示的氨基酸序列组成，HCDR3 由 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列组成，LCDR1 由 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列组成，LCDR2 由 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列组成，且 LCDR3 由 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列组成。

3、权利要求 2 的双特异性抗体，其中

所述 VH 含有 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，

和/或所述 VL 含有 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

4、权利要求 1-3 中任一项的双特异性抗体，其中所述第一抗原结合区是特异性结合第一抗原的 Fab。

5、权利要求 4 的双特异性抗体，其中所述 Fab 包含 CH1，其中所述 CH1 是来自 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 CH1，优选地来自 IgG1 的 CH1。

6、权利要求 5 所述的双特异性抗体，其中所述 CH1 包含 (i) 包含与 SEQ ID NO:44 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(ii) 包含 SEQ ID NO: 44 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

7、权利要求 1-6 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述双特异性抗体是包含 Fc 二聚体的 IgG 样双特异性抗体，其中构成所述 Fc 二聚体的两个 Fc 区相同或不同。

8、权利要求 7 所述的双特异性抗体，其中所述 Fc 区之一或二者包含降低与 Fcγ 受体结合的突变，例如包含 L234A/L235A 突变、D265A 突变或 P329A 突变中的一个或多个，例如包含 L234A/L235A 突变、D265A 突变和 P329A 突变。

9、权利要求 8 所述的双特异性抗体，其中所述 Fc 区之一或二者包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 46 或 49 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、

98%或 99%或更高的同一性的氨基酸序列或由其组成。

10、权利要求 7-9 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述两个 Fc 区不同，优选地，在第一单体 Fc 区和第二单体 Fc 区中分别引入相应的结 (knob) 突变和扣(Hole)突变。

11、权利要求 10 所述的双特异性抗体，其中

d) 一个 Fc-区多肽包含结突变 T366W，而另一个 Fc-区多肽包含扣突变 T366S、L368A 和 Y407V，或

e) 一个 Fc-区多肽包含结突变 T366W 和 Y349C，而另一个 Fc-区多肽包含扣突变 T366S、L368A、Y407V 和 S354C，或

f) 一个 Fc-区多肽包含结突变 T366W 和 S354C，而另一个 Fc-区多肽包含扣突变 T366S、L368A、Y407V 和 Y349C；

任选地，所述 Fc 区还包含降低与 Fc γ 受体结合的突变，例如， L234A/L235A 突变、D265A 突变或 P329A 突变中的一个或多个；例如 L234A/L235A 突变、D265A 突变和 P329A 突变。

12、权利要求 7-11 中任一项所述的双特异性抗体，其中所述 Fc 区之一或二者包含铰链区，例如 EPKSS 或 EPKSC。

13、权利要求 12 所述的双特异性抗体，其中

(i) 第一 Fc 区包含结突变，其

a) 包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 43 或 89 或由其组成；或

b) 包含与 SEQ ID NO: 43 或 89 具有至少 90%同一性，例如 95%，96%，97%，99%或更高的同一性且包含 L234A/L235A 突变、D265A 突变和 P329A 突变和结突变(例如 S354C 和 T366W) 的氨基酸序列或由其组成； 和/或

(ii) 第二 Fc 区包含扣突变，其

a) 包含氨基酸序列 SEQ ID NO:30、42 或 59 或由其组成；或

b) 包含与 SEQ ID NO: 30、42 或 59 具有至少 90%同一性，例如 95%，96%，97%，99%或更高的同一性且包含 L234A/L235A 突变、D265A 突变和 P329A 突变和扣突变(例如 Y349C, T366S, L368A 和 Y407V) 的氨基酸序列或由其组成。

14、权利要求 1-13 中任一项的双特异性抗体，其为 IgG 样双特异性抗体，其包含一个特异性结合第一抗原的 Fab 片段、一个特异性结合第二抗原的 scFv 和 Fc 异二聚体，其中

所述 Fab 片段包含 VH-CH1 和 VL-CL，所述 scFv 包含 VH-接头-VL 或 VL-接头-VH，

包含扣突变的 Fc 区构成第一重链；

所述 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合所述 scFv 片段的 N 末端，且所述 scFv 片段的 C 末端融合至包含结突变的 Fc 区的 CH2 或铰链区，构成第二重链；

且

所述 Fab 片段的 VL-CL 构成轻链。

15、权利要求 1-13 中任一项的双特异性抗体，其为 IgG 样双特异性抗体，其包含两个特

异性结合第一抗原的 Fab 片段、一个特异性结合第二抗原的 scFv 和 Fc 异二聚体，其中

所述 Fab 片段包含 VH-CH1 和 VL-CL，所述 scFv 包含 VH-接头-VL 或 VL-接头-VH，

第一 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合至包含扣突变的 Fc 区的 CH2 或铰链区构成第一重链；

第二 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合所述 scFv 片段的 N 末端，且所述 scFv 片段的 C 末端融合至包含结突变的 Fc 区的 CH2 或铰链区，构成第二重链；

且

所述第一和第二 Fab 片段的 VL-CL 分别构成两条轻链；

其中所述第一 Fab 和第二 Fab 片段相同或不同。

16、权利要求 1-13 中任一项的双特异性抗体，其为 IgG 样双特异性抗体，其包含一个特异性结合第一抗原的 Fab 片段、一个特异性结合第二抗原的 scFv 和 Fc 异二聚体，其中

所述 Fab 片段包含 VH-CH1 和 VL-CL，所述 scFv 包含 VH-接头-VL 或 VL-接头-VH，

所述 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合至包含扣突变的 Fc 区的 CH2 或铰链区构成第一重链；

所述 scFv 片段的 C 末端融合至包含结突变的 Fc 区的 CH2 或铰链区，构成第二重链；

且

所述 Fab 片段的 VL-CL 构成轻链。

17、权利要求 1-13 中任一项的双特异性抗体，其为 IgG 样双特异性抗体，其包含两个特异性结合第一抗原的 Fab 片段、一个特异性结合第二抗原的 scFv 和 Fc 异二聚体，其中

所述 Fab 片段包含 VH-CH1 和 VL-CL，所述 scFv 包含 VH-接头-VL 或 VL-接头-VH，

第一 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合至第二 Fab 片段的 VH 的 N 末端，且第二 Fab 片段的 CH1 的 C 末端融合至包含扣突变的 Fc 区的 CH2 或铰链区构成第一重链；

所述 scFv 片段的 C 末端融合至包含结突变的 Fc 区的 CH2 或铰链区，构成第二重链；且

所述第一和第二 Fab 片段的 VL-CL 分别构成两条轻链；

其中所述第一 Fab 和第二 Fab 片段相同或不同。

18、权利要求 1-18 中任一项的双特异性抗体，其中第一抗原为肿瘤相关抗原，例如选自 GPRC5D 或 MUC16（例如人 GPRC5D 或人 MUC16）。

19、权利要求 18 的双特异性抗体，其中第一抗原为人 GPRC5D，第一抗原结合区包含重链可变区 VH 的 3 个 CDR，HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，以及轻链可变区 VL 的 3 个 CDR，LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中

(i) 所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 选自如 SEQ ID NO: 62、38 或 40 中任一项所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 为如 SEQ ID NO: 63 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

(ii) 所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 选自如 SEQ ID NO: 72 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 为如 SEQ ID NO: 73 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

(iii) 所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 选自如 SEQ ID NO: 82 所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3; 且所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 为如 SEQ ID NO: 83 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

20、权利要求 19 的双特异性抗体, 其中第一抗原结合区包含

(i) 如 SEQ ID NO:64 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO:65、39 或 41 所示的 HCDR2、如 SEQ ID NO:66 所示的 HCDR3; 如 SEQ ID NO:67 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO:68 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:69 所示的 LCDR3;

(ii) 如 SEQ ID NO:74 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO:75 所示的 HCDR2、如 SEQ ID NO:76 所示的 HCDR3; 如 SEQ ID NO:77 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO:78 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:79 所示的 LCDR3;或

(iii) 如 SEQ ID NO:84 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO:85 所示的 HCDR2、如 SEQ ID NO:86 所示的 HCDR3; 如 SEQ ID NO:87 所示的 LCDR1、如 SEQ ID NO:78 所示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:88 所示的 LCDR3。

21、权利要求 19 或 20 的双特异性抗体, 其中第一抗原结合区包含重链可变区 VH, 其中所述重链可变区

(i)包含与 SEQ ID NO: 62、72、82、16、23、25、27、29、38 或 40 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 62、72、82、16、23、25、27、29、38 或 40 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

22、权利要求 19-21 中任一项的双特异性抗体, 其中第一抗原结合区包含轻链可变区 VL, 其中所述轻链可变区

(i)包含与 SEQ ID NO:63、73、83、17、19 或 21 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 63、73、83、17、19 或 21 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

23、权利要求 19-22 中任一项的双特异性抗体, 其中第一抗原结合区包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL, 其中

(i)所述重链可变区包含 SEQ ID NO:62 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 且所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:63 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(ii)所述重链可变区包含 SEQ ID NO:72 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 且所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:73 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

(iii)所述重链可变区包含 SEQ ID NO:82 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;

且所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:83 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(iv) 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 16、23、25、27、29、38 或 40 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；且所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 17、19 或 21 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

24、权利要求 19-23 中任一项的双特异性抗体，其中第一抗原结合区包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，其中 VH 和 VL 分别包含如下所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成：

- (vii). SEQ ID NO:62 和 SEQ ID NO:63;
- (viii). SEQ ID NO:72 和 SEQ ID NO:73;
- (ix). SEQ ID NO:82 和 SEQ ID NO:83;
- (x). SEQ ID NO:16、23、25、27、29、38 或 40 和 SEQ ID NO:21;
- (xi). SEQ ID NO:16 或 25 和 SEQ ID NO:17;
- (xii). SEQ ID NO:16 或 27 和 SEQ ID NO:19。

25、权利要求 18 的双特异性抗体，其中第一抗原为人 MUC16，第一抗原结合区包含重链可变区 VH 的 3 个 CDR，HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，以及轻链可变区 VL 的 3 个 CDR，LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中

所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 选自如 SEQ ID NO: 92 或 113 中所示的 VH 中所含的三个互补决定区域 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；且所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 为如 SEQ ID NO: 96、100、102 或 114 所示的 VL 中所含的三个互补决定区域 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

26、权利要求 25 的双特异性抗体，其中第一抗原结合区包含

如 SEQ ID NO:93 所示的 HCDR1、如 SEQ ID NO:94 示的 HCDR2、如 SEQ ID NO:95 示的 HCDR3；如 SEQ ID NO:97、101 或 103 示的 LCDR1、如 SEQ ID NO:98 示的 LCDR2 和如 SEQ ID NO:99 的 LCDR3。

27、权利要求 25 或 26 的双特异性抗体，其中第一抗原结合区包含重链可变区 VH，其中所述重链可变区

包含与 SEQ ID NO: 92 或 113 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者包含 SEQ ID NO: 92 或 113 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

28、权利要求 25-27 中任一项的双特异性抗体，其中第一抗原结合区包含轻链可变区 VL，其中所述轻链可变区包含与 SEQ ID NO: 96、100、102 或 114 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或者包含 SEQ ID NO: 96、100、102 或 114 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

29、权利要求 25-28 中任一项的双特异性抗体，其中第一抗原结合区包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，其中

所述重链可变区包含 SEQ ID NO:92 或 113 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；且所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 96、100、102 或 114 所示的氨基酸序列或与其具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

30、权利要求 25-29 中任一项的双特异性抗体，其中

第一抗原结合区包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，其中 VH 包含 SEQ ID NO:92 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，且所述 VL 包含 SEQ ID NO:96、100 或 102 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

第一抗原结合区包含重链可变区 VH 和轻链可变区 VL，其中 VH 包含 SEQ ID NO:113 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，且所述 VL 包含 SEQ ID NO:114 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

31、核酸分子，其编码权利要求 1-30 中任一项的双特异性抗体中的任一条链，或由所述核酸序列组成。

32、表达载体，其包含权利要求 31 的核酸分子，优选地，所述表达载体为 pCDNA，例如 pCDNA3.1。

33、宿主细胞，其包含权利要求 31 所述的核酸分子或权利要求 32 所述的表达载体，优选地，所述宿主细胞是原核的或真核的，例如 293 细胞或 CHO 细胞，例如 293F 细胞或 293T 细胞或 CHO-S 细胞。

34、制备权利要求 1-30 中任一项所述的双特异性抗体的方法，所述方法包括，在适合所述抗体的链表达的条件下，培养权利要求 31 所述的核酸分子或权利要求 32 所述的表达载体的宿主细胞，和任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述抗体。

35、免疫缀合物，其包含权利要求 1-30 中任一项所述的双特异性抗体。

36、药物组合物或药物或制剂，其包含权利要求 1-30 中任一项所述的双特异性抗体，或权利要求 35 的免疫缀合物以及任选地药用辅料。

37、药物组合产品，其包含权利要求 1-30 中任一项所述的双特异性抗体，或权利要求 35 的免疫缀合物，以及一种或多种其它治疗剂（例如化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂）。

38、在受试者中预防或治疗癌症的方法，包括向受试者施用有效量的权利要求 1-30 中任一项所述的双特异性抗体，或权利要求 35 的免疫缀合物，或权利要求 36 的药物组合物或制剂；或权利要求 37 的药物组合产品。

39、权利要求 38 的方法，其中所述癌症的肿瘤细胞中具有升高的第一抗原的蛋白质水平和/或核酸水平（例如表达升高）。

40、权利要求 38 的方法，其中所述第一抗原选自 GPRC5D 或 MUC16。

41、权利要求 38-40 中任一项的方法，其中所述癌症是实体肿瘤或血液肿瘤，例如卵巢癌（例如浆液性卵巢癌，例如卵巢浆液性囊腺癌、卵巢癌浆液性腺癌、卵巢癌粘液腺癌、子宫内膜样腺癌、卵巢癌透明细胞腺癌）、骨髓瘤、结肠癌、直肠癌或结直肠癌。

42、权利要求 38-41 中任一项的方法，其中所述方法还包括与其它疗法例如治疗方式（例如手术或放疗）和/或其它治疗剂（例如化疗剂、细胞因子、细胞毒性剂、其它抗体、小分子药物或免疫调节剂）组合施用。

43、检测第一抗原在生物样品中的存在的方法，其包括

- (i) 将生物样品与权利要求 1-30 中任一项所述的双特异性抗体在允许其与第一抗原结合的条件下接触，
- (ii) 检测在该抗体或双特异性抗体和第一抗原之间是否形成复合物，
其中复合物的形成表示存在第一抗原。

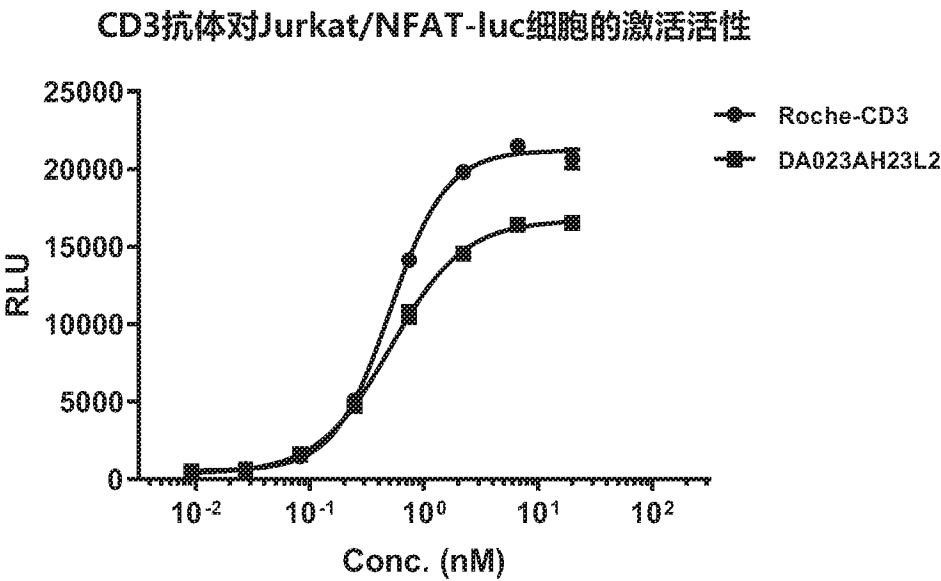


图 1A

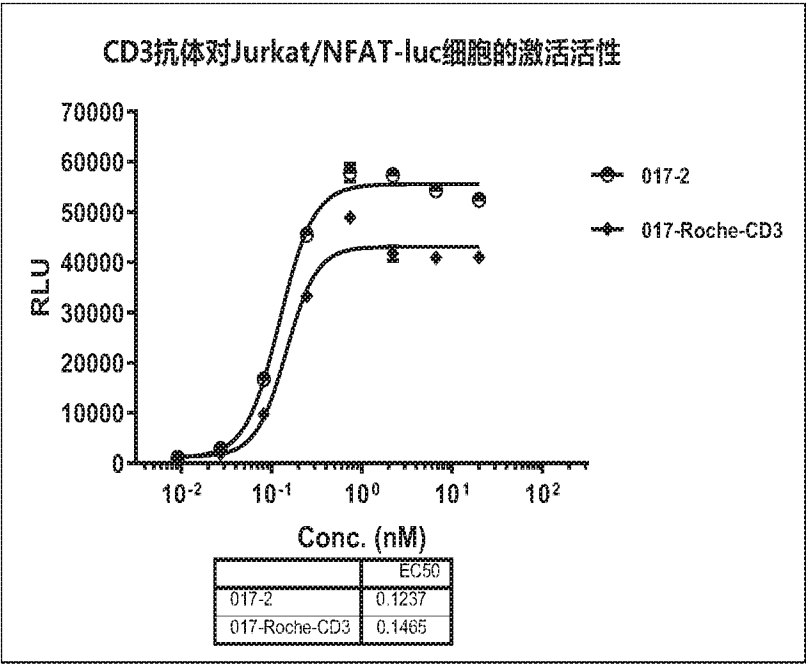


图 1B

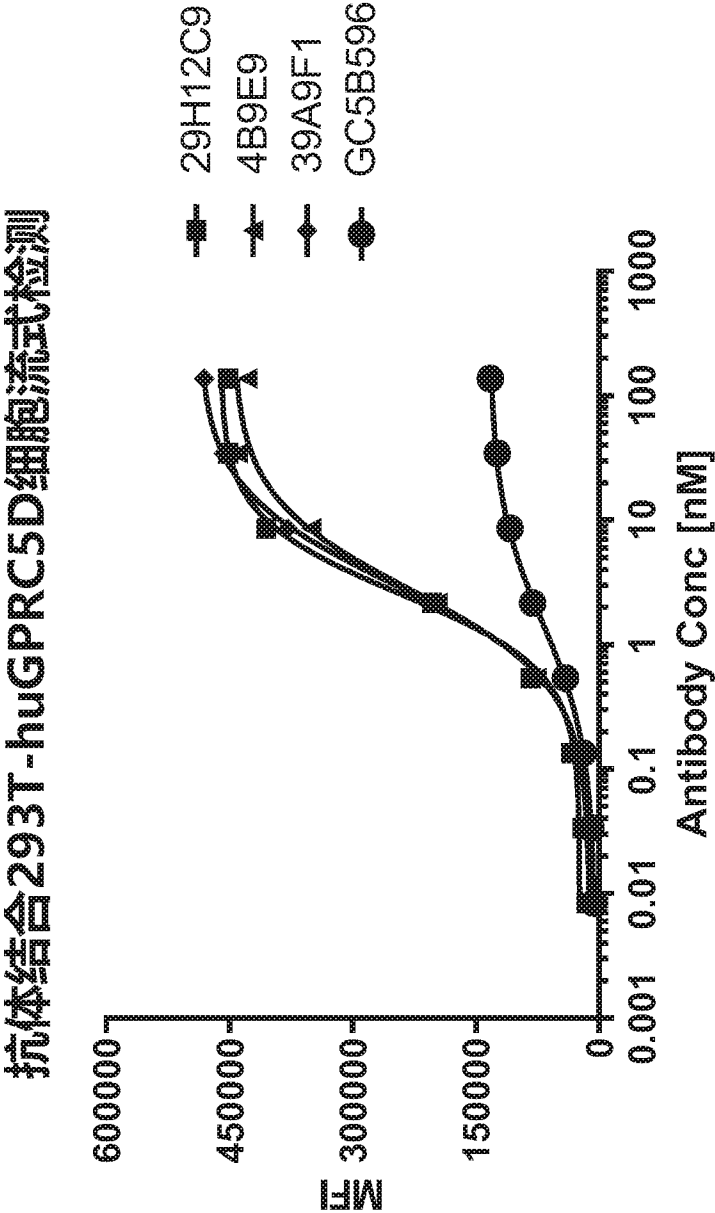


图 2A

抗体结合293T-cynoGPCR5D细胞流式检测

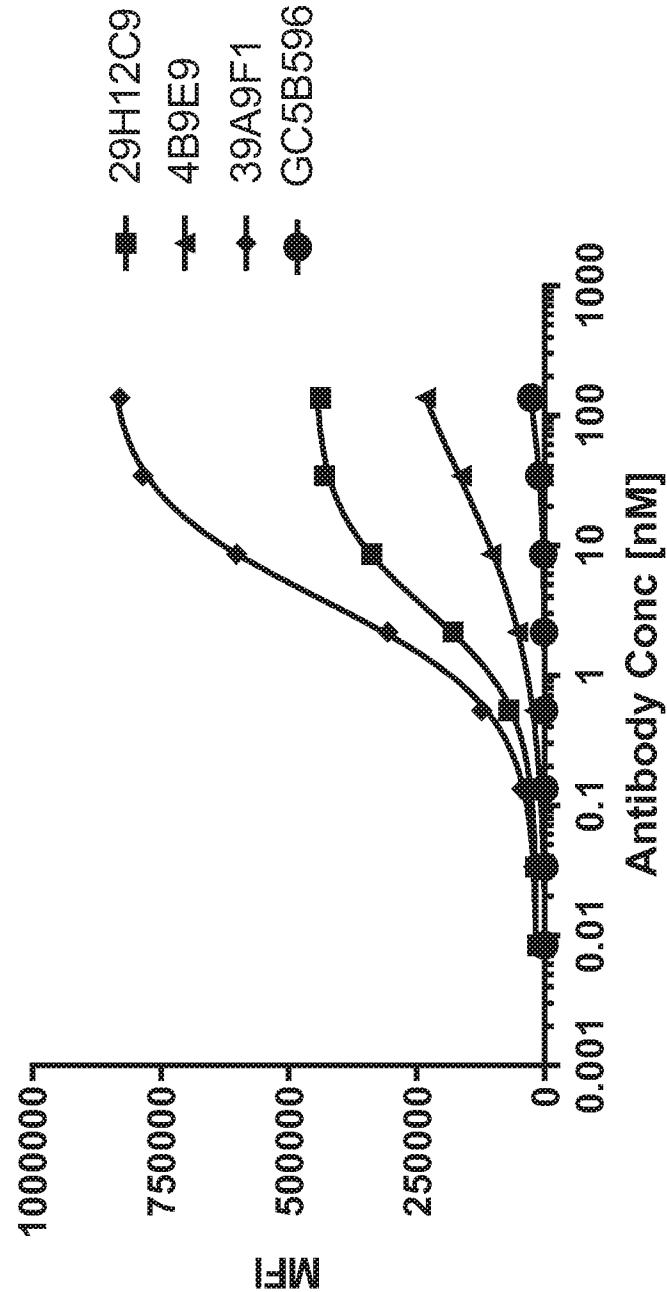


图 2B

抗体结合293T-huGPCR5D细胞流式检测

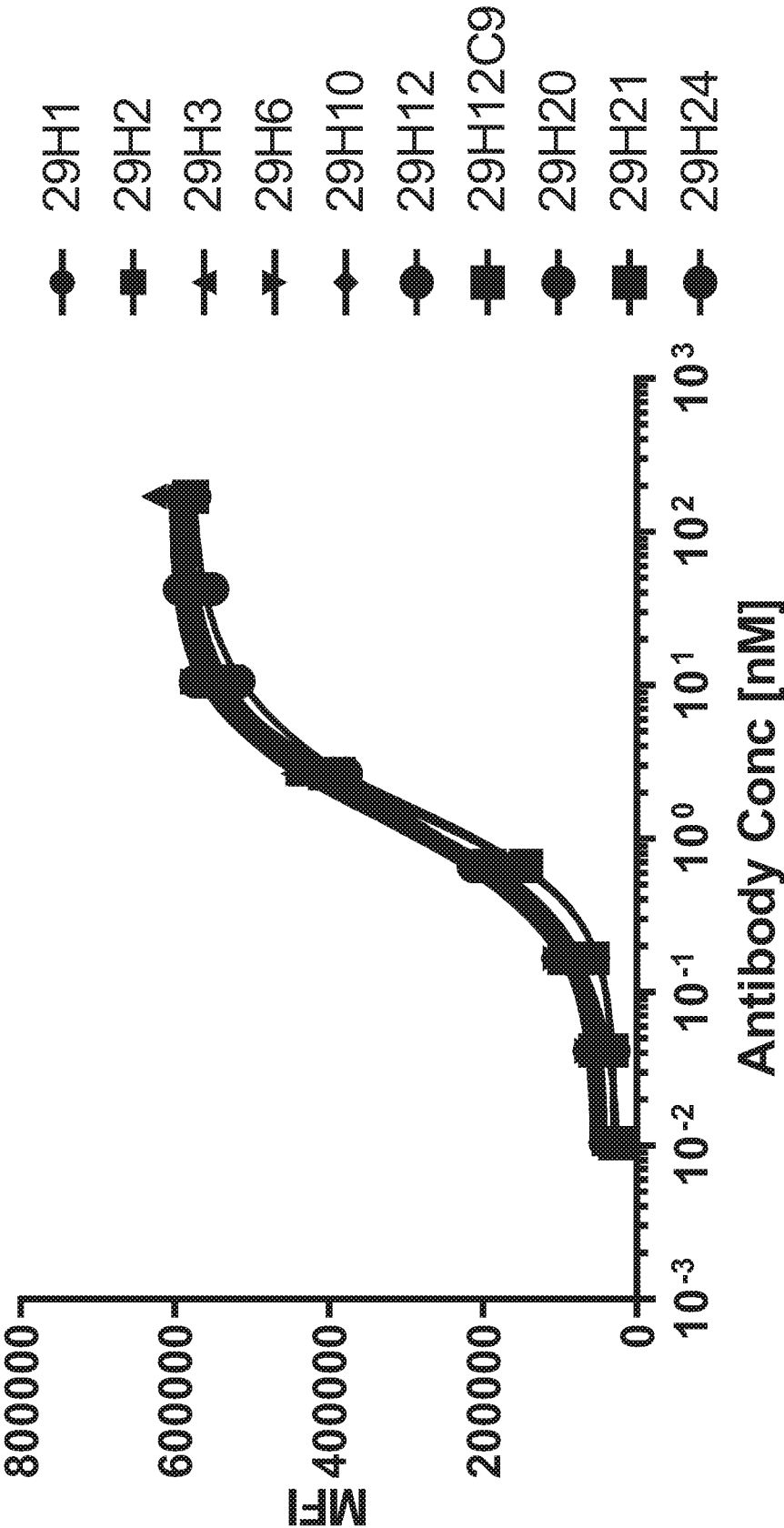


图 3

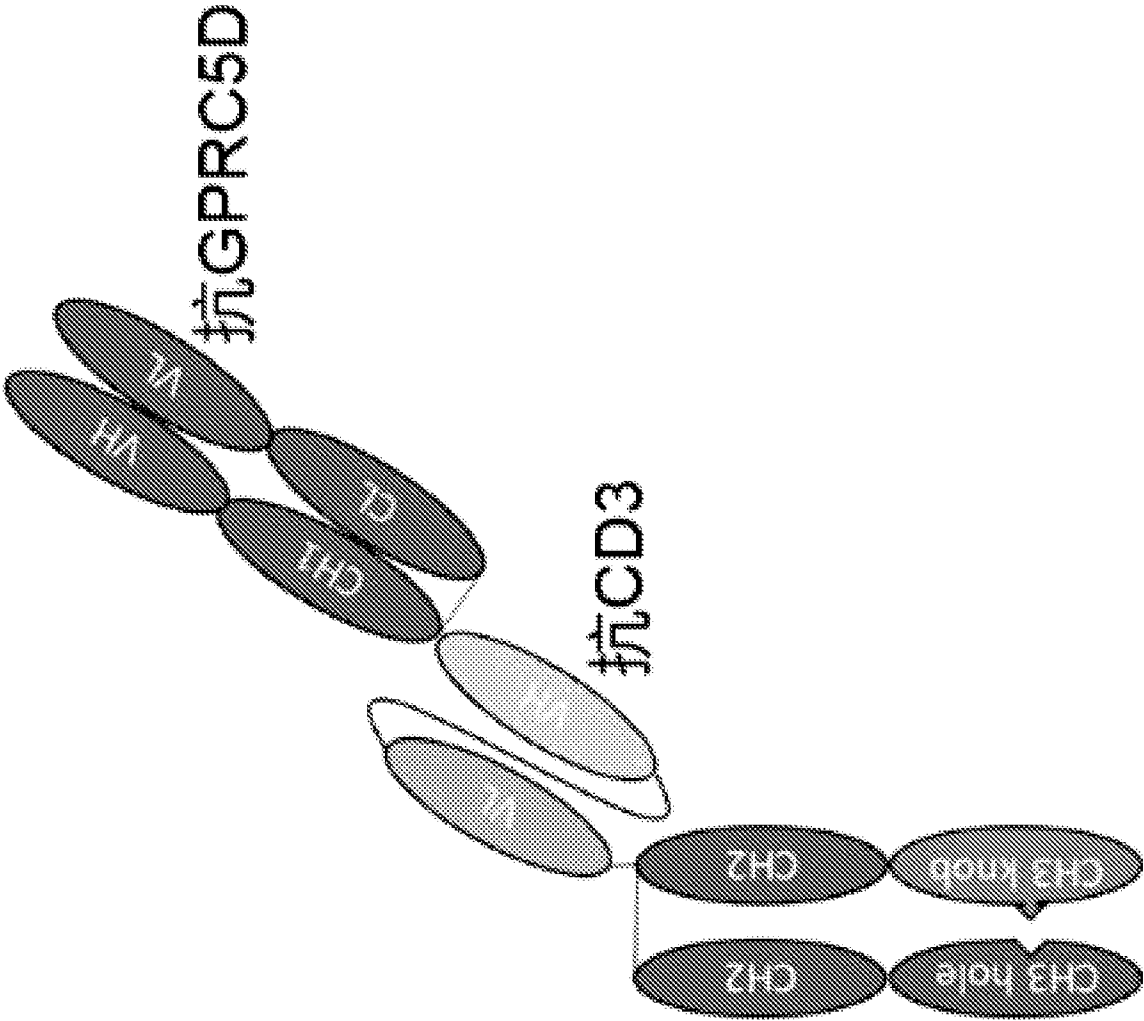


图 4A

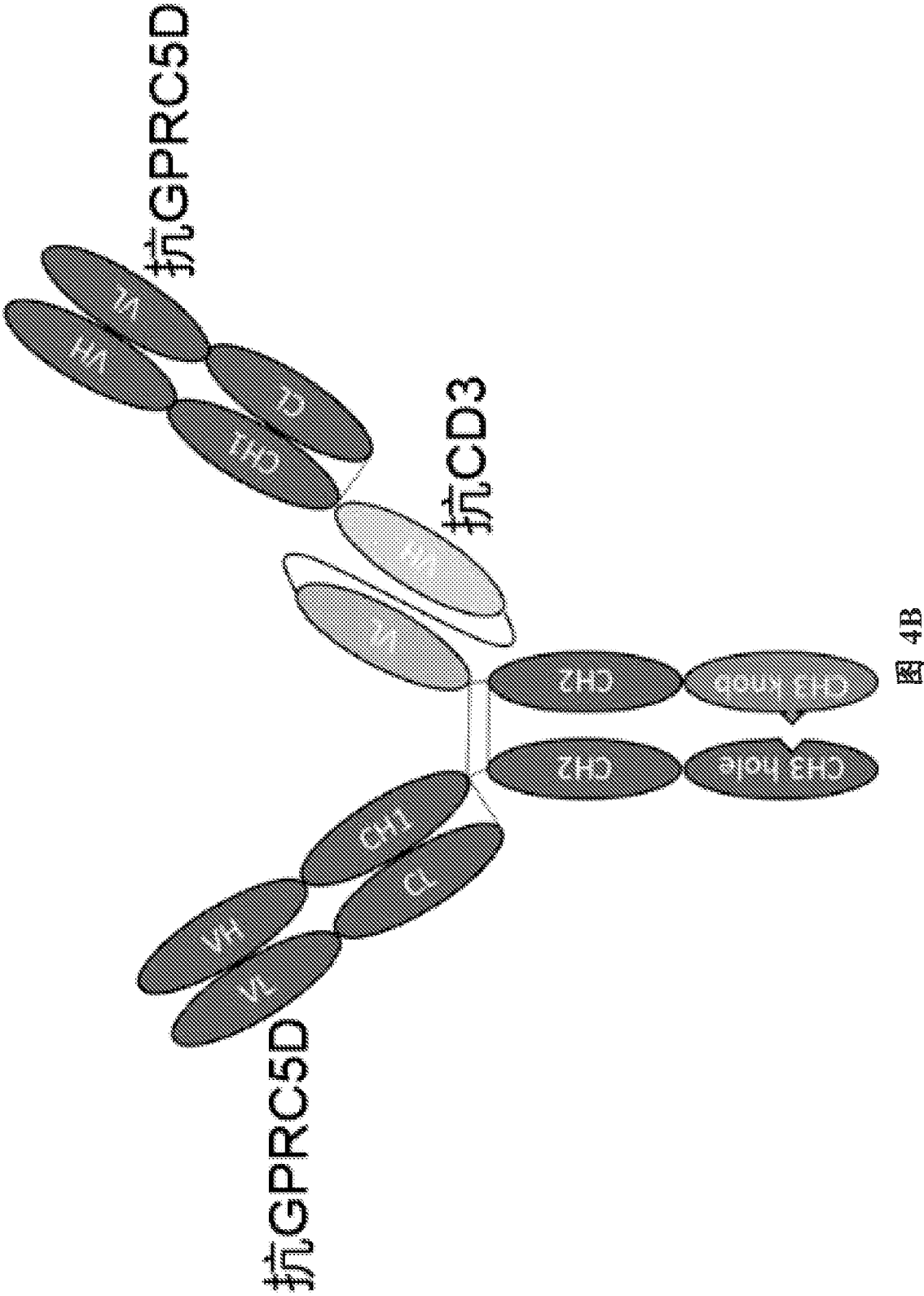


图 4B

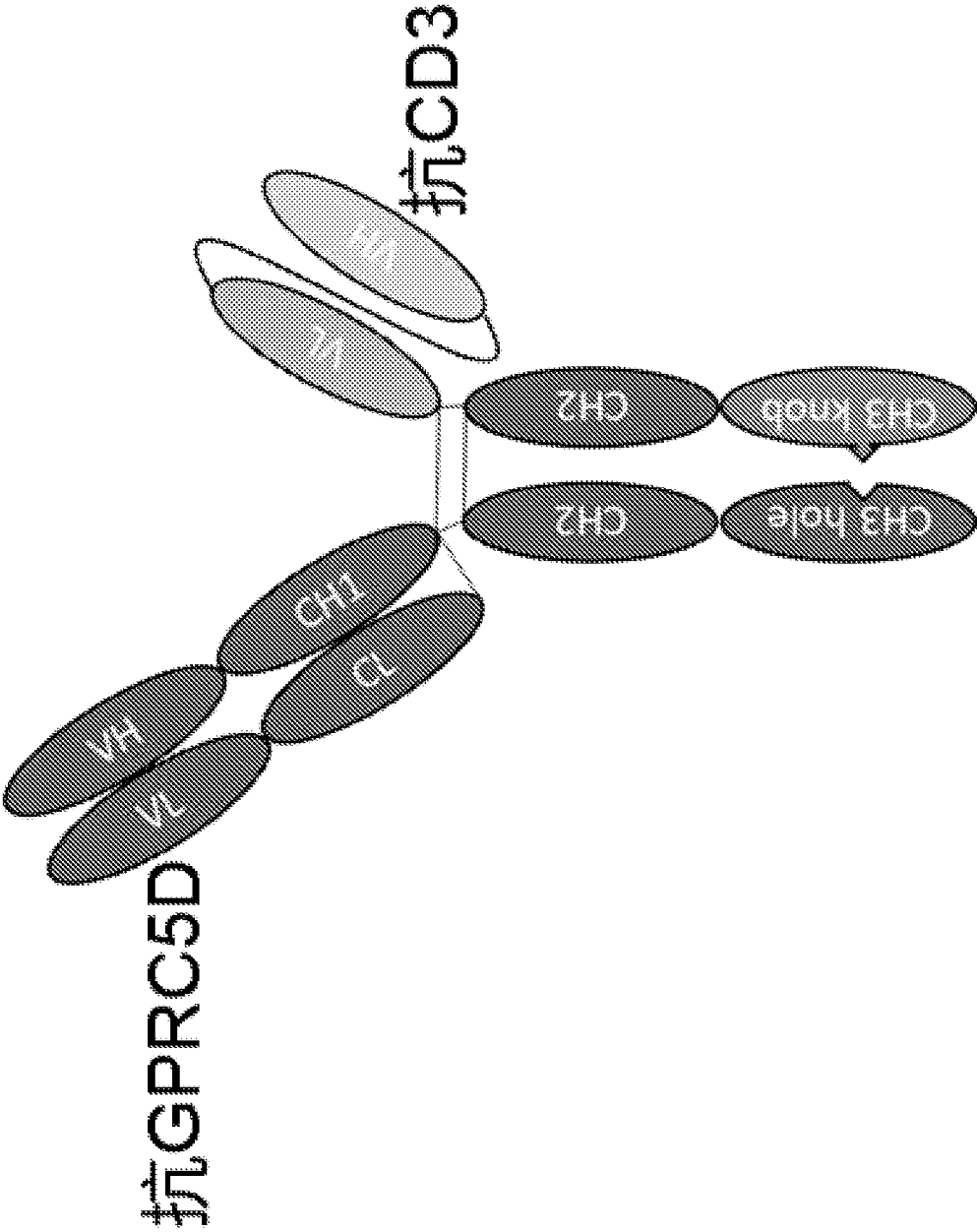


图 4C

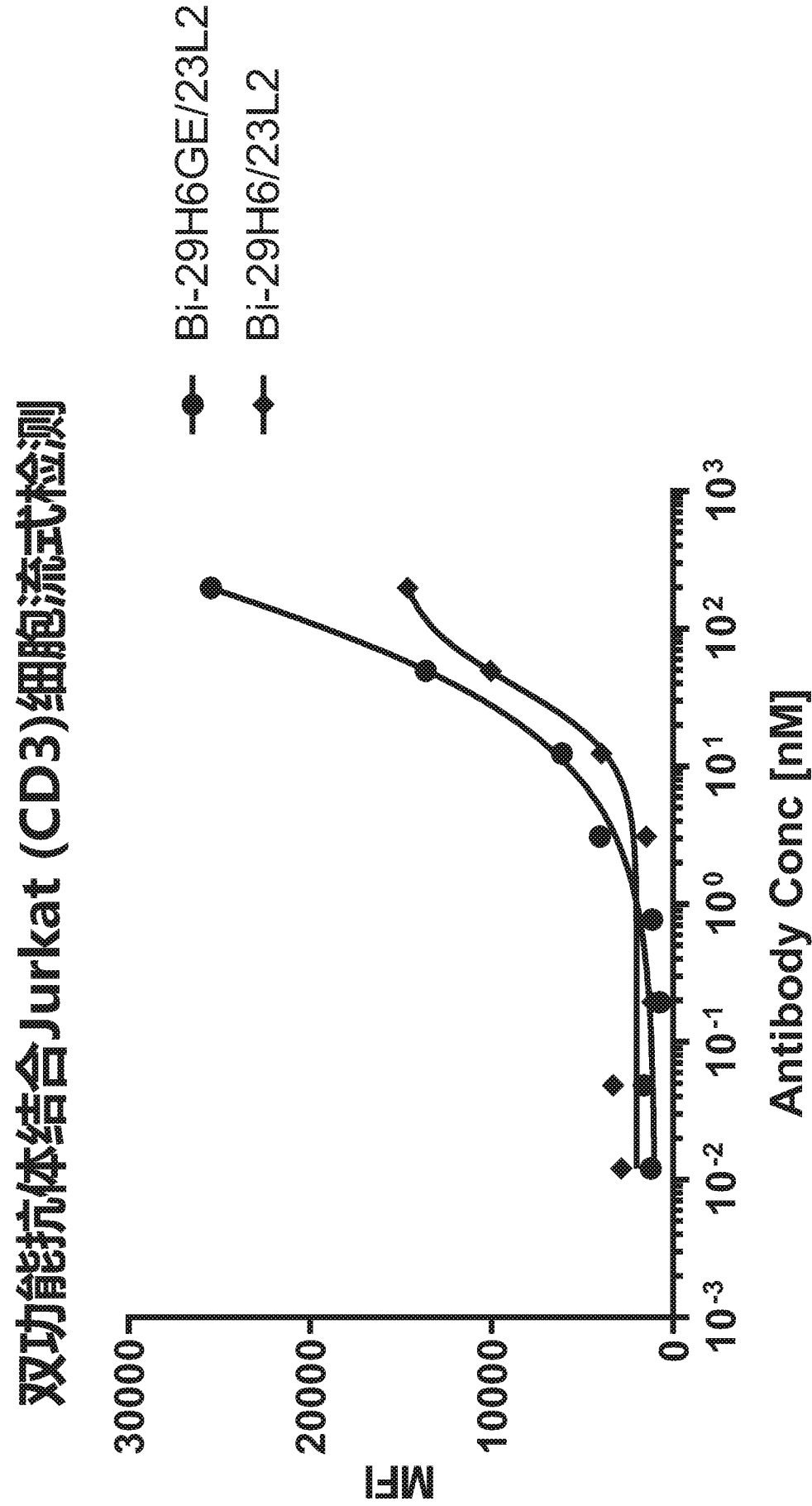


图 5

双功能抗体结合293T-huGPCR5D细胞流式检测

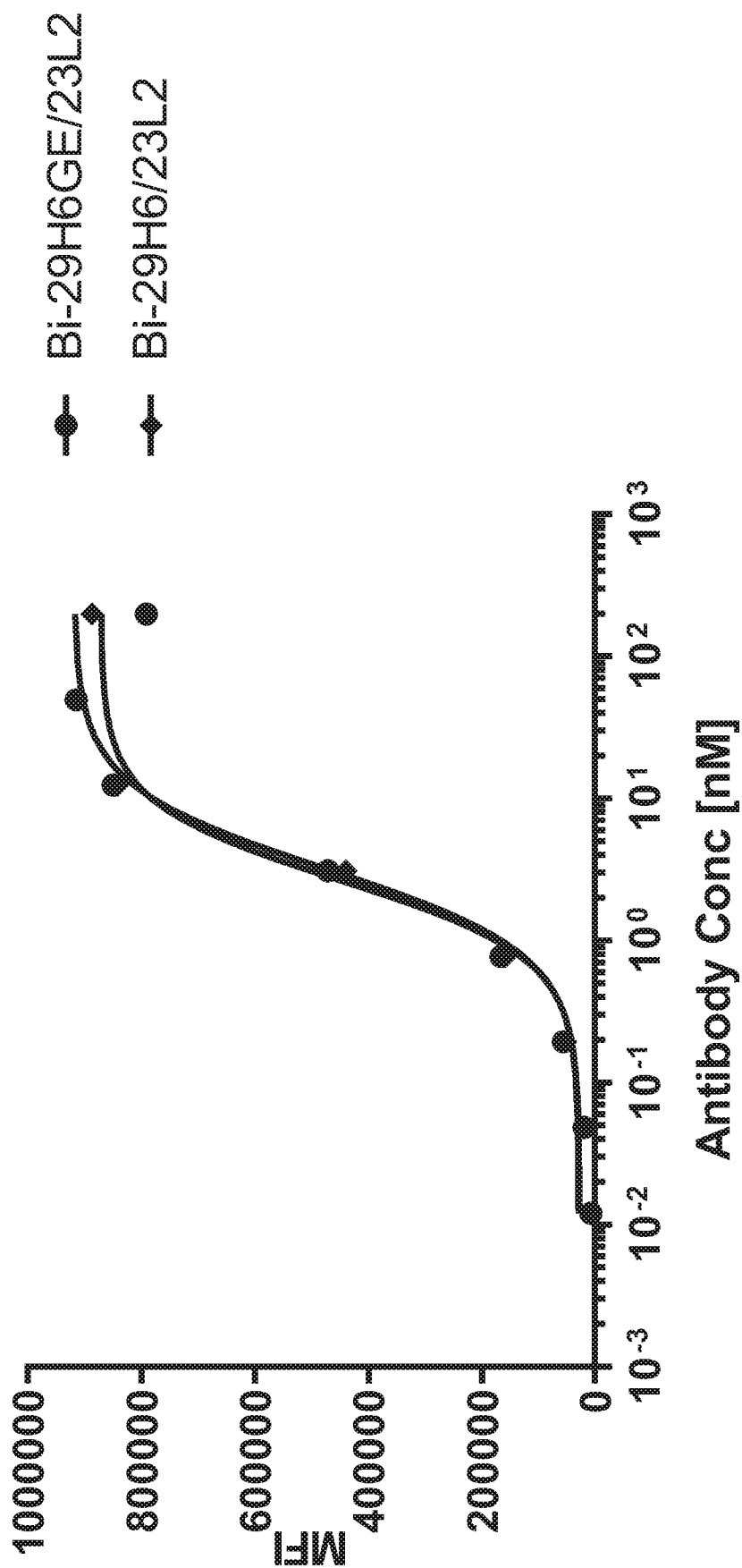


图 6A

双功能抗体结合293T-huGPCR5D细胞流式检测

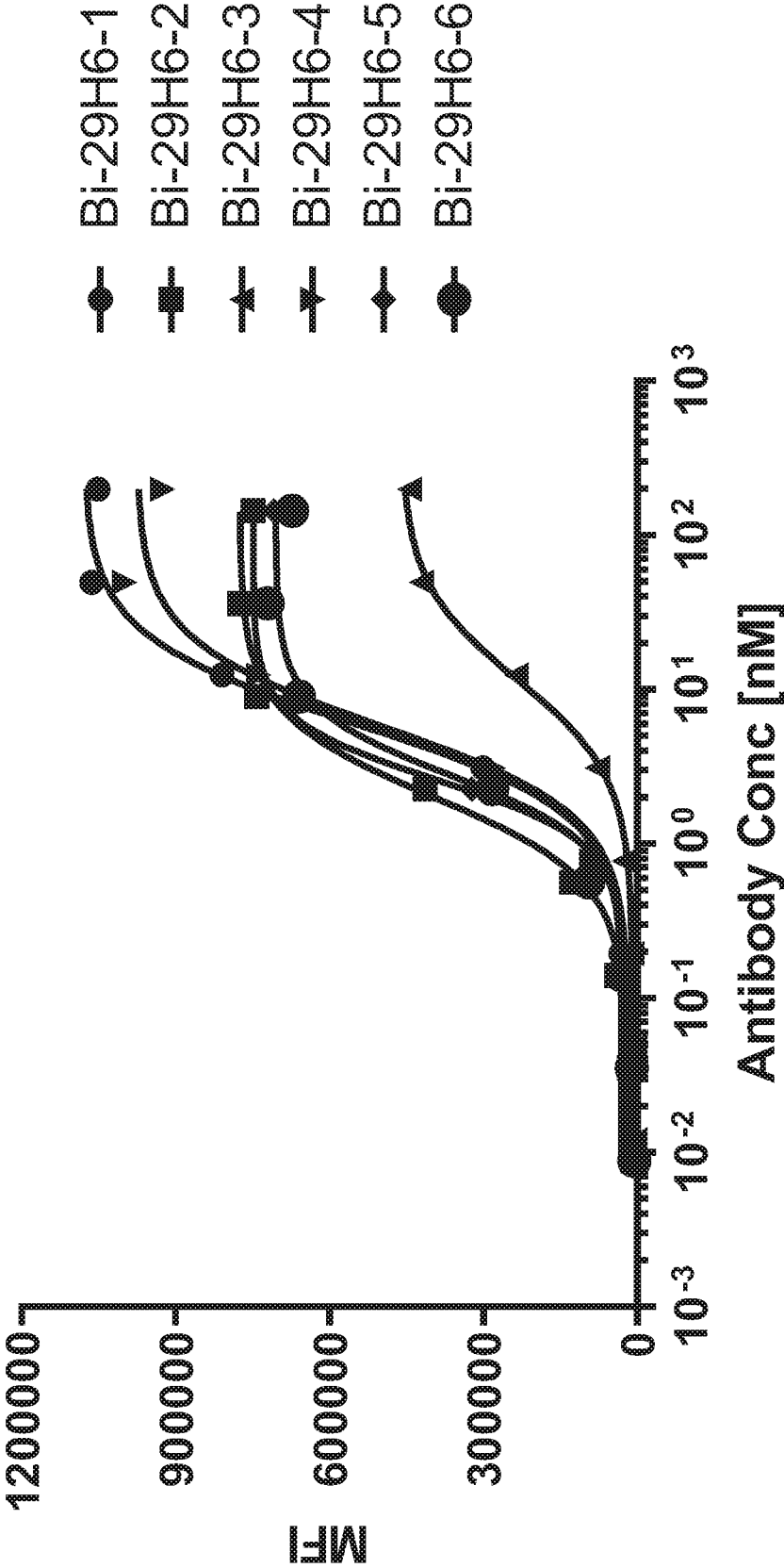


图 6B

抗体结合293T-cynoGPCR5D细胞流式检测

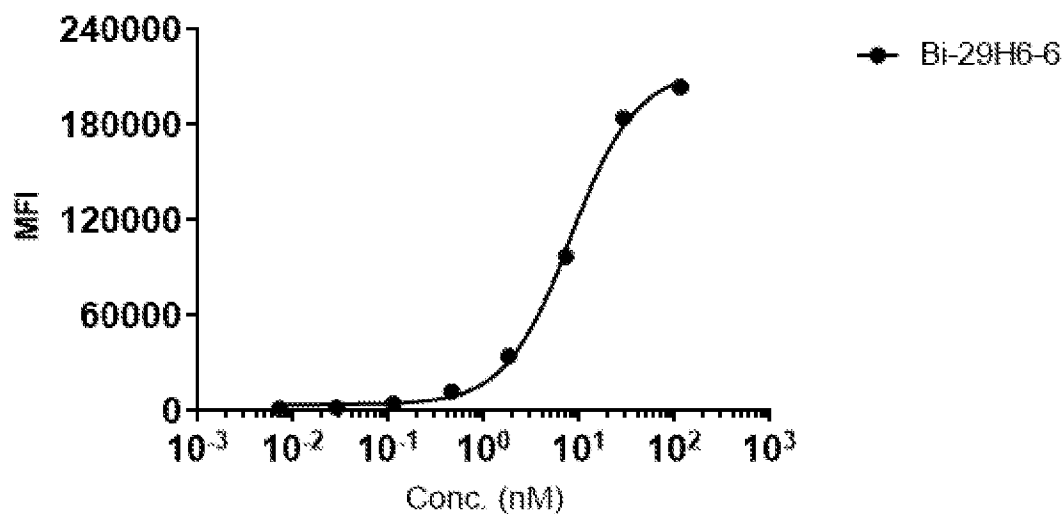


图 6C

抗体结合293T-huGPC5A细胞流式检测

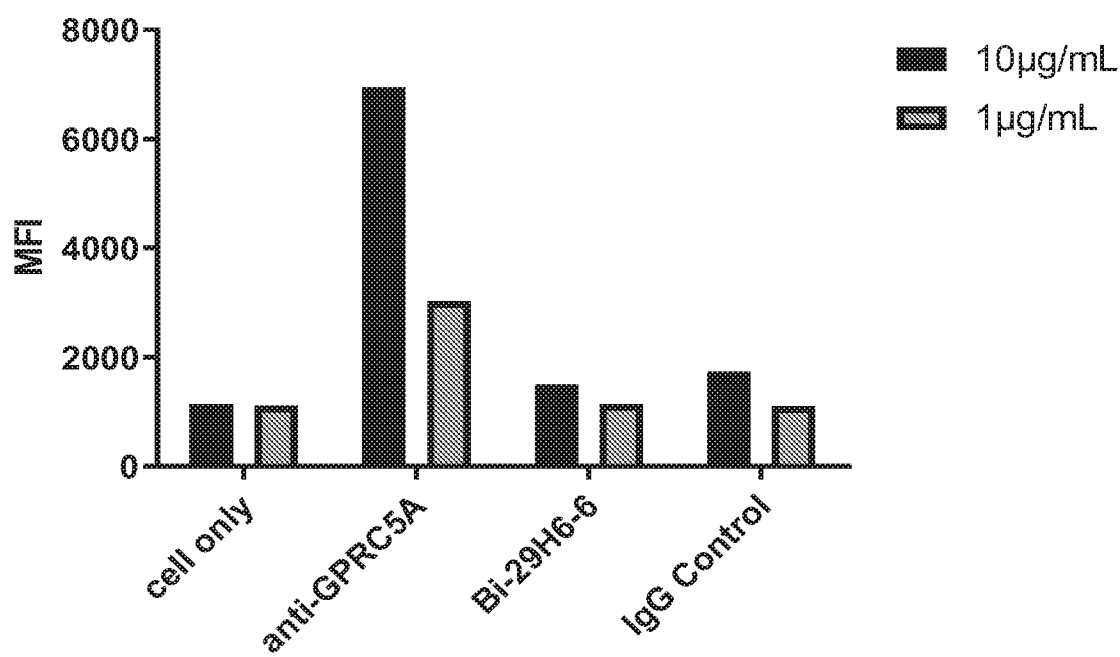


图 6D

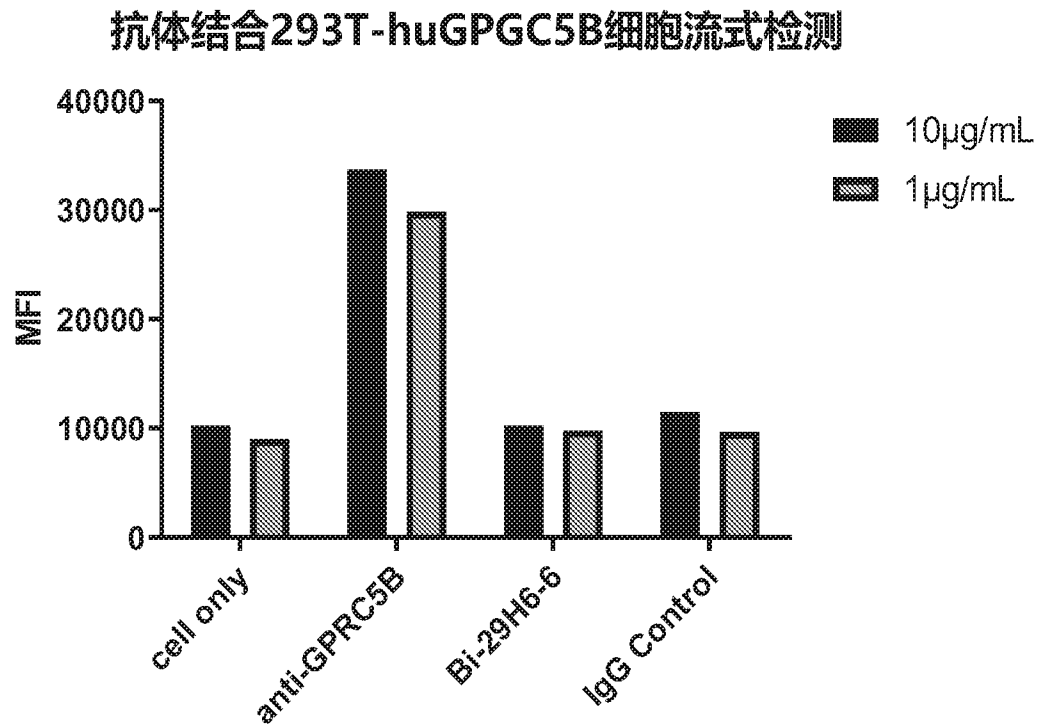


图 6E

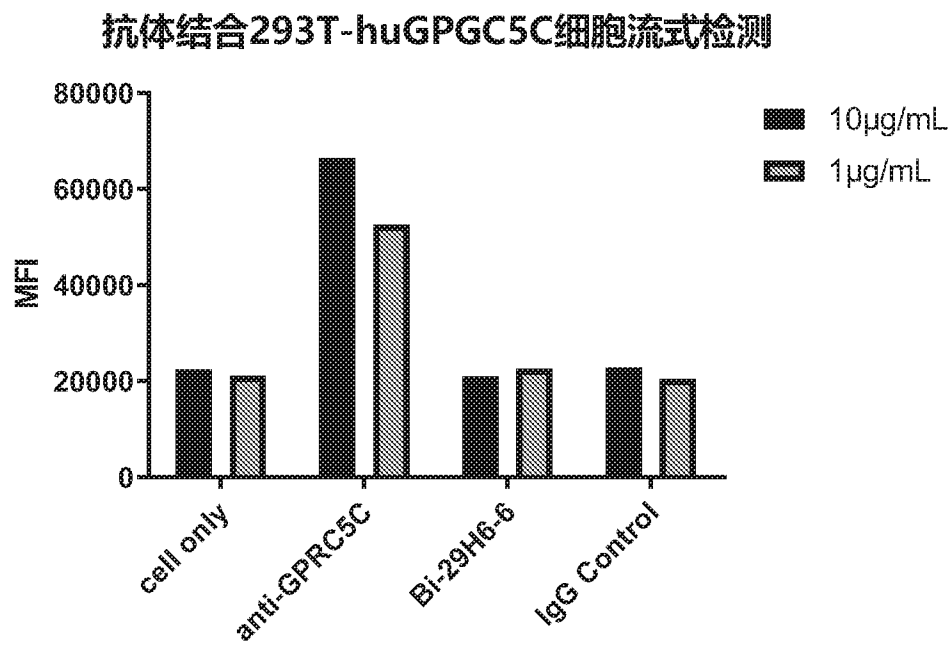


图 6F

双功能抗体激活CD3报告基因检测
有靶细胞NCI-H929存在

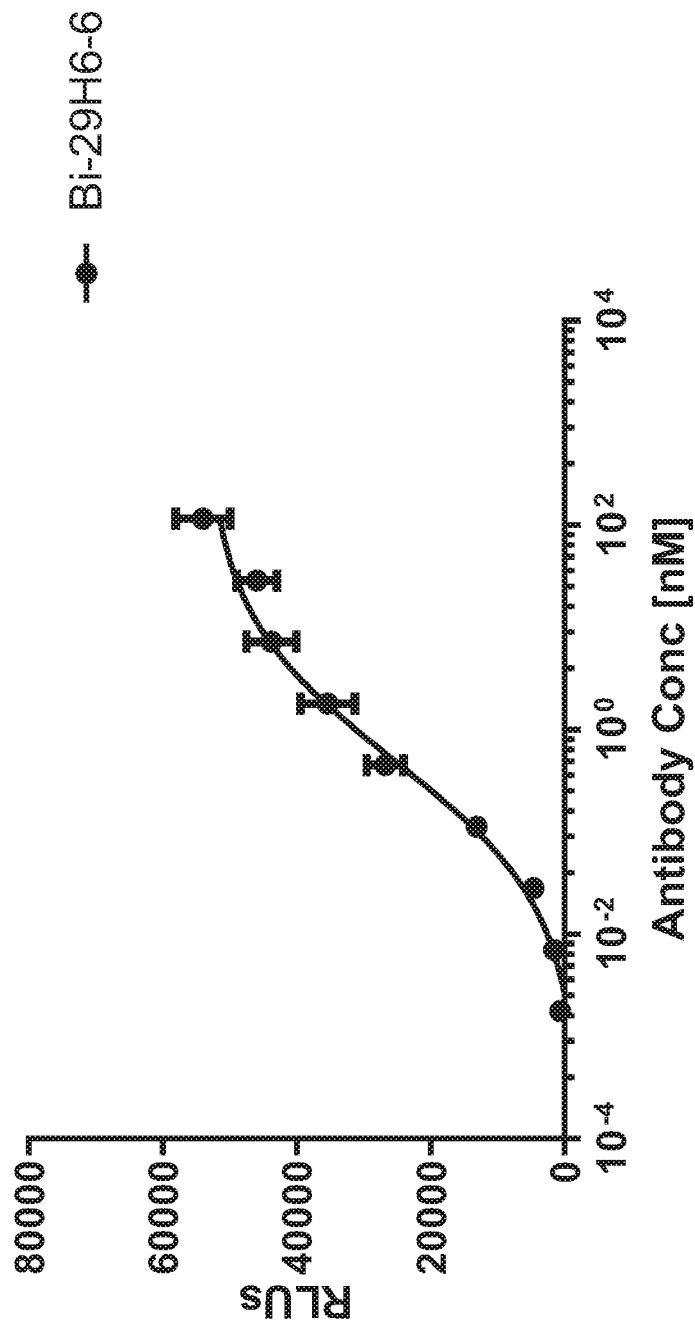


图 7

双功能抗体激活CD3报告基因检测
有非相关靶细胞293T存在

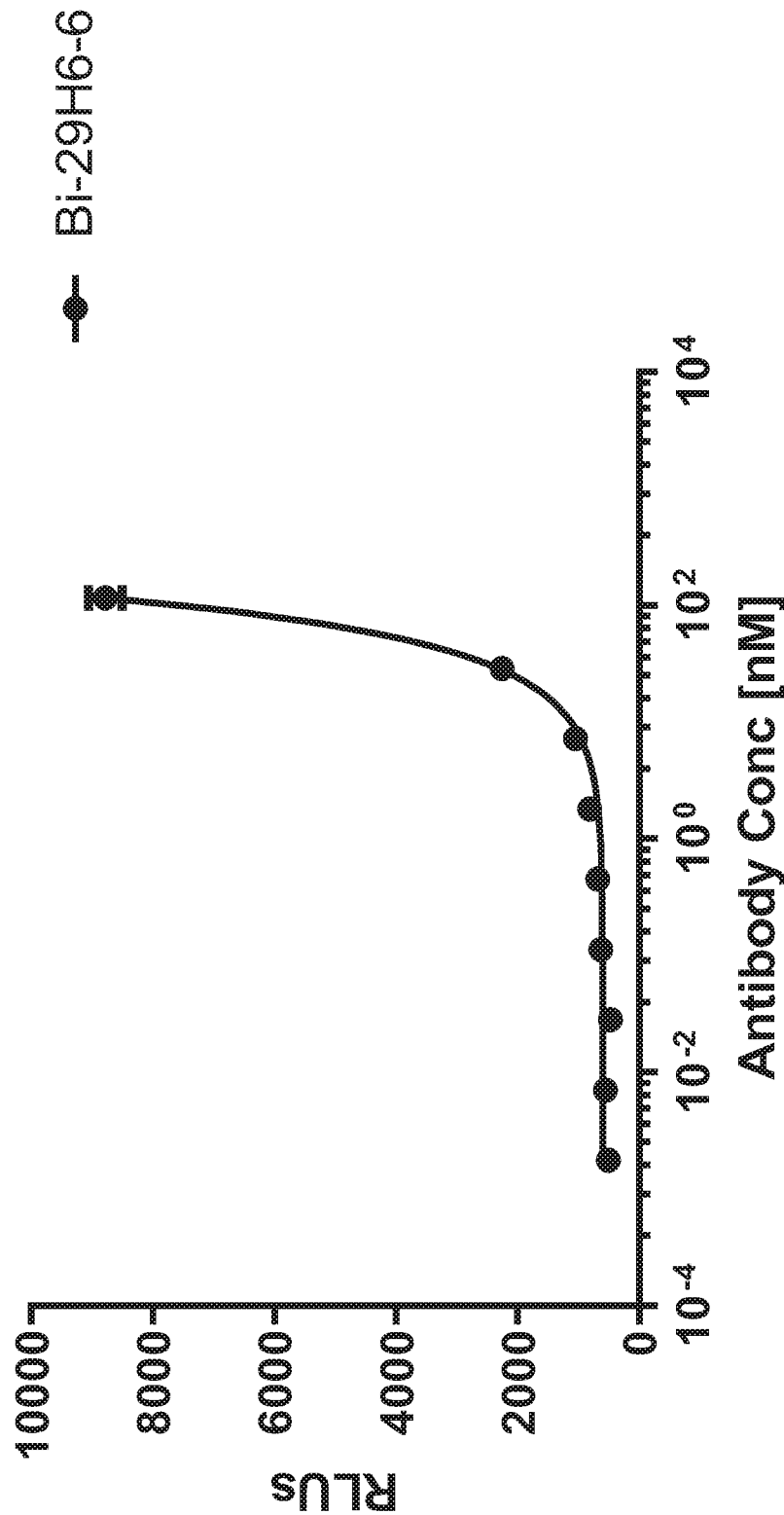


图 8

双功能抗体介导的PBMC特异性杀伤靶细胞NCI-H929, 24H

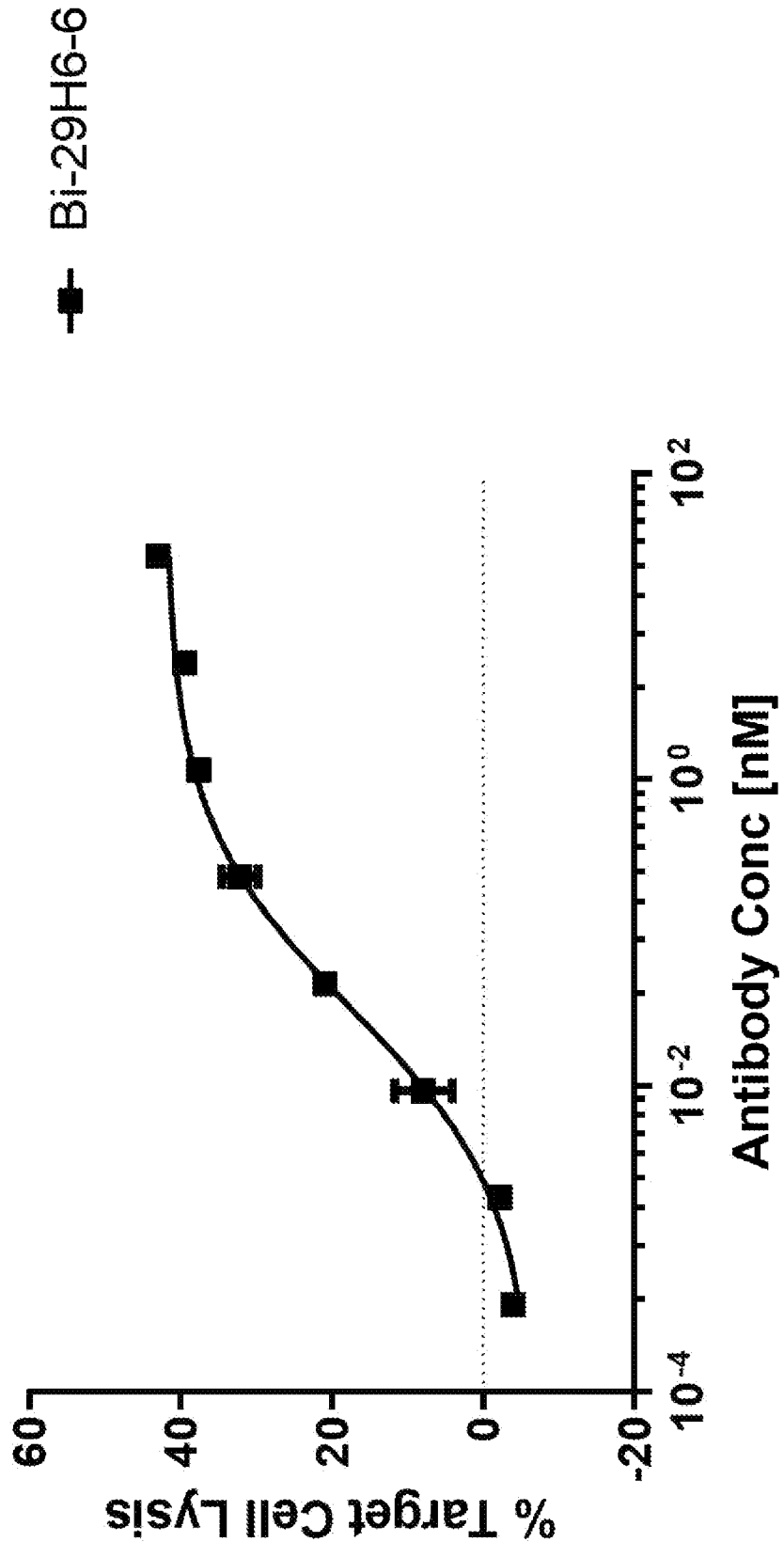


图 9

双功能抗体介导的PBMC对非相关靶细胞Raji的杀伤, 48H

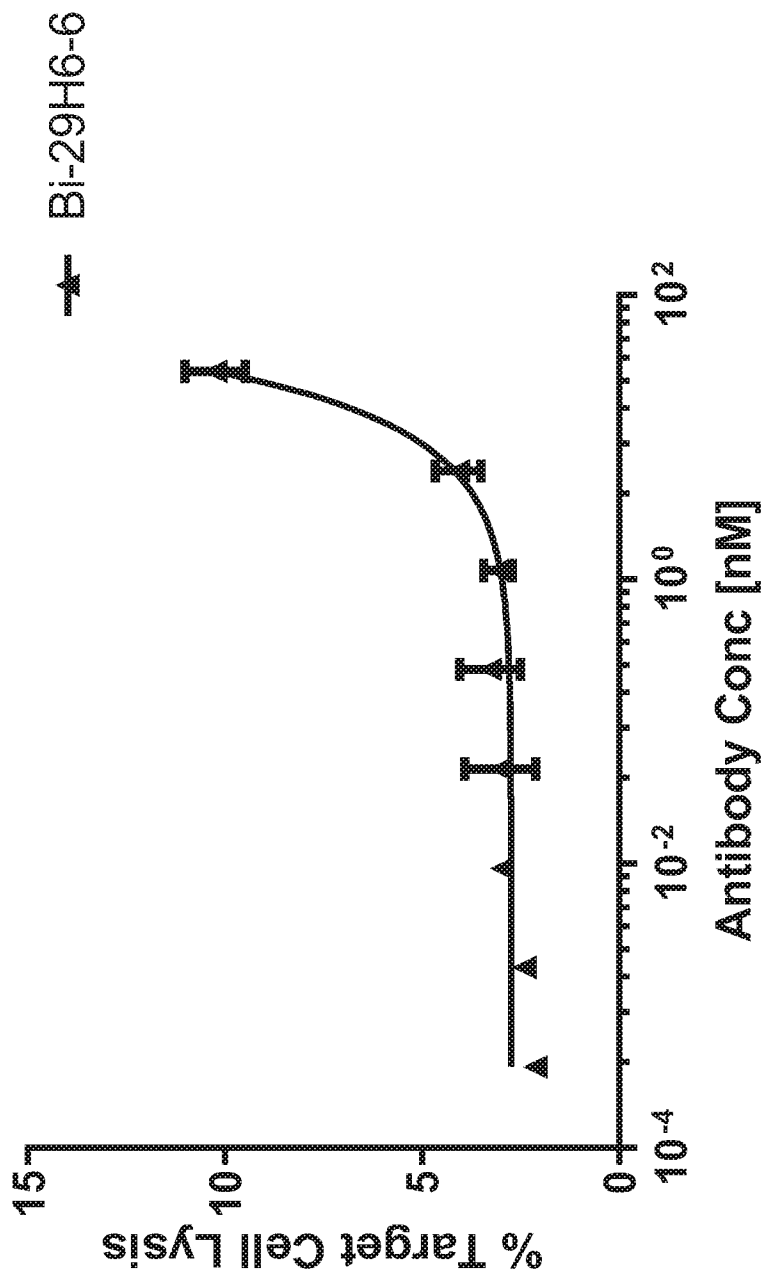


图 10

双功能抗体介导PBMC杀伤靶细胞NCI-H929上清IFN γ 释放检测

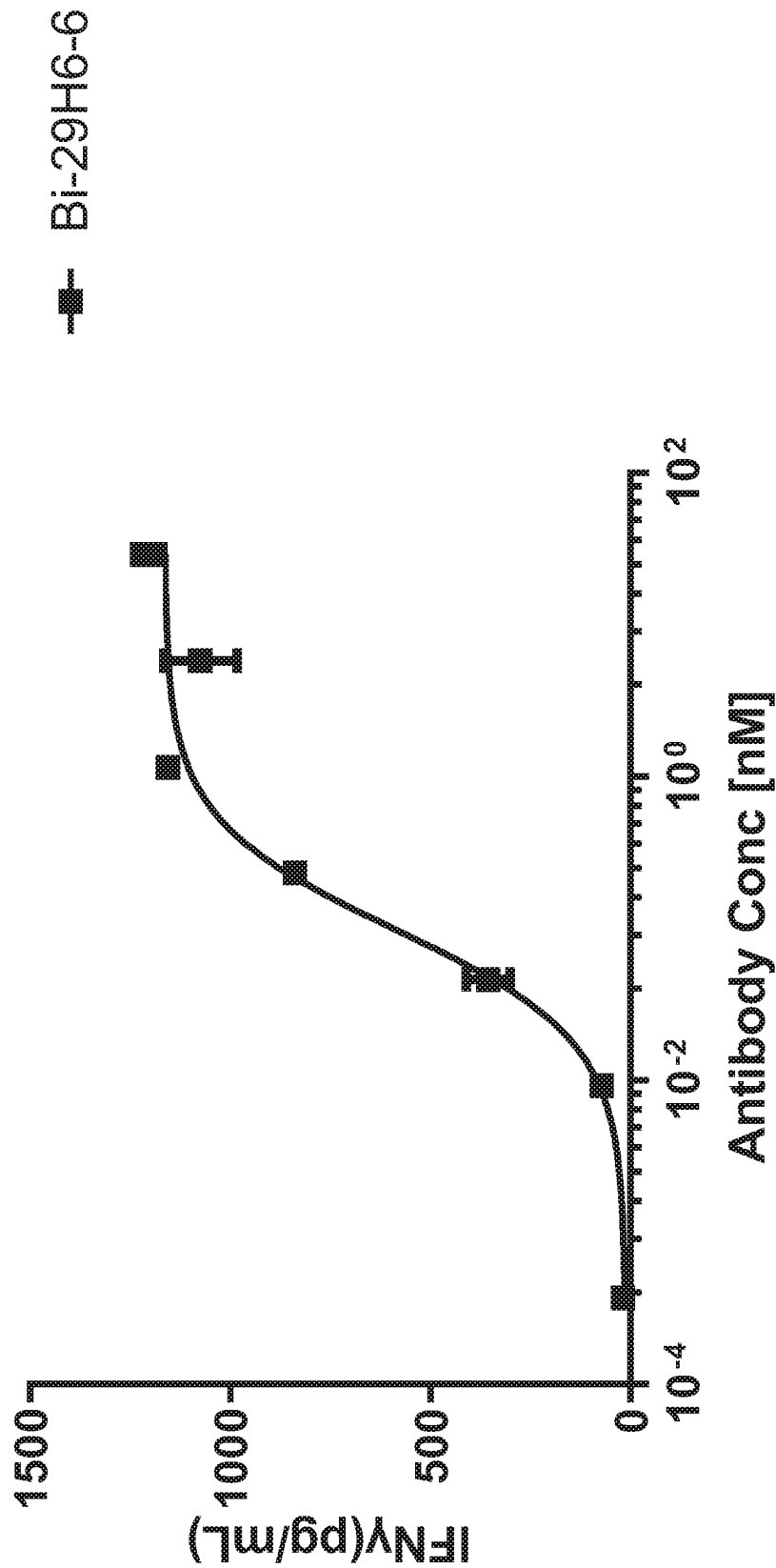


图 11A

双功能抗体介导PBMC杀伤靶细胞NCI-H929上清IL-6释放检测

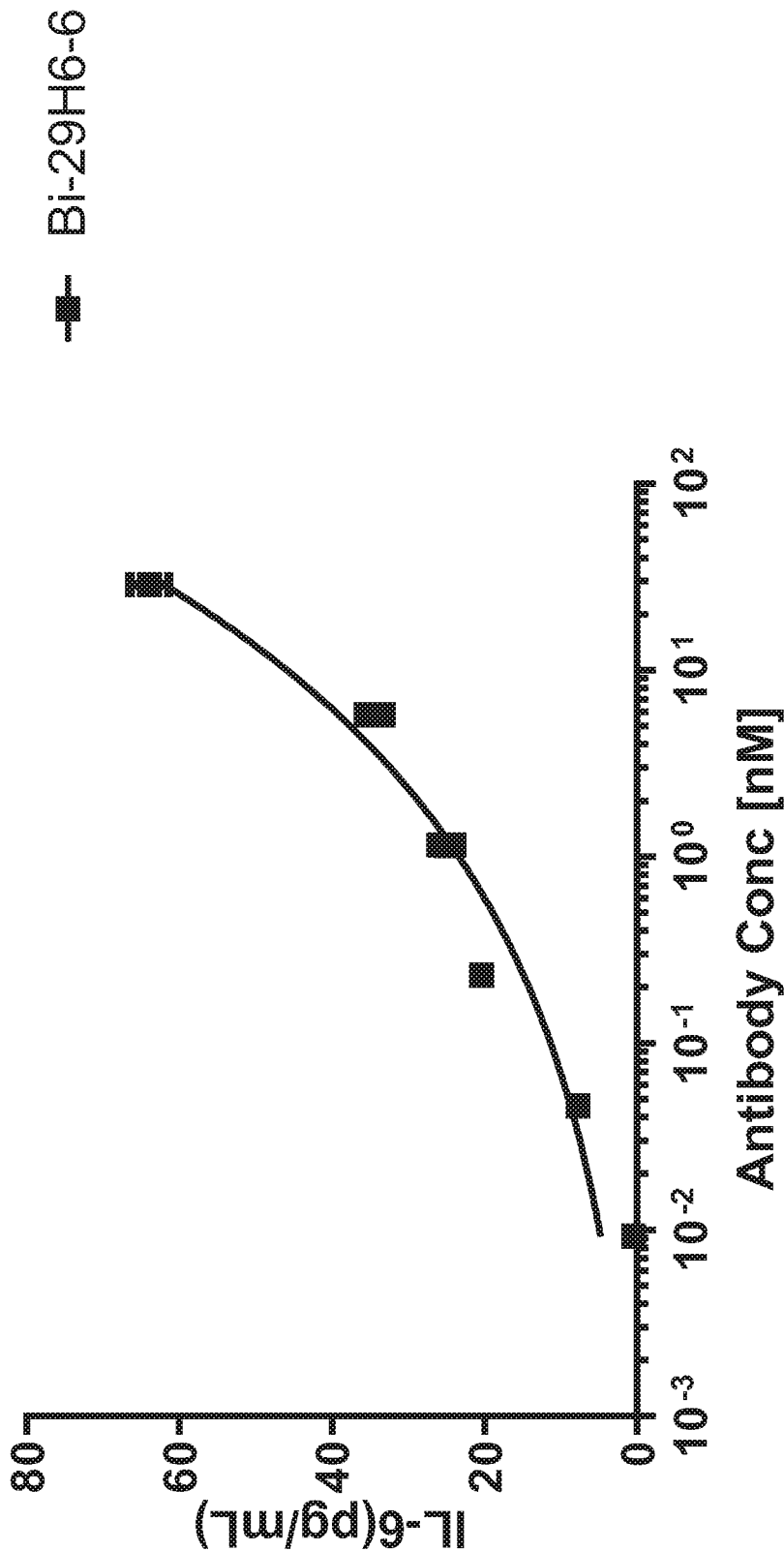


图 11B

双功能抗体介导PBMC杀伤靶细胞NCI-H929上清TNFα释放检测

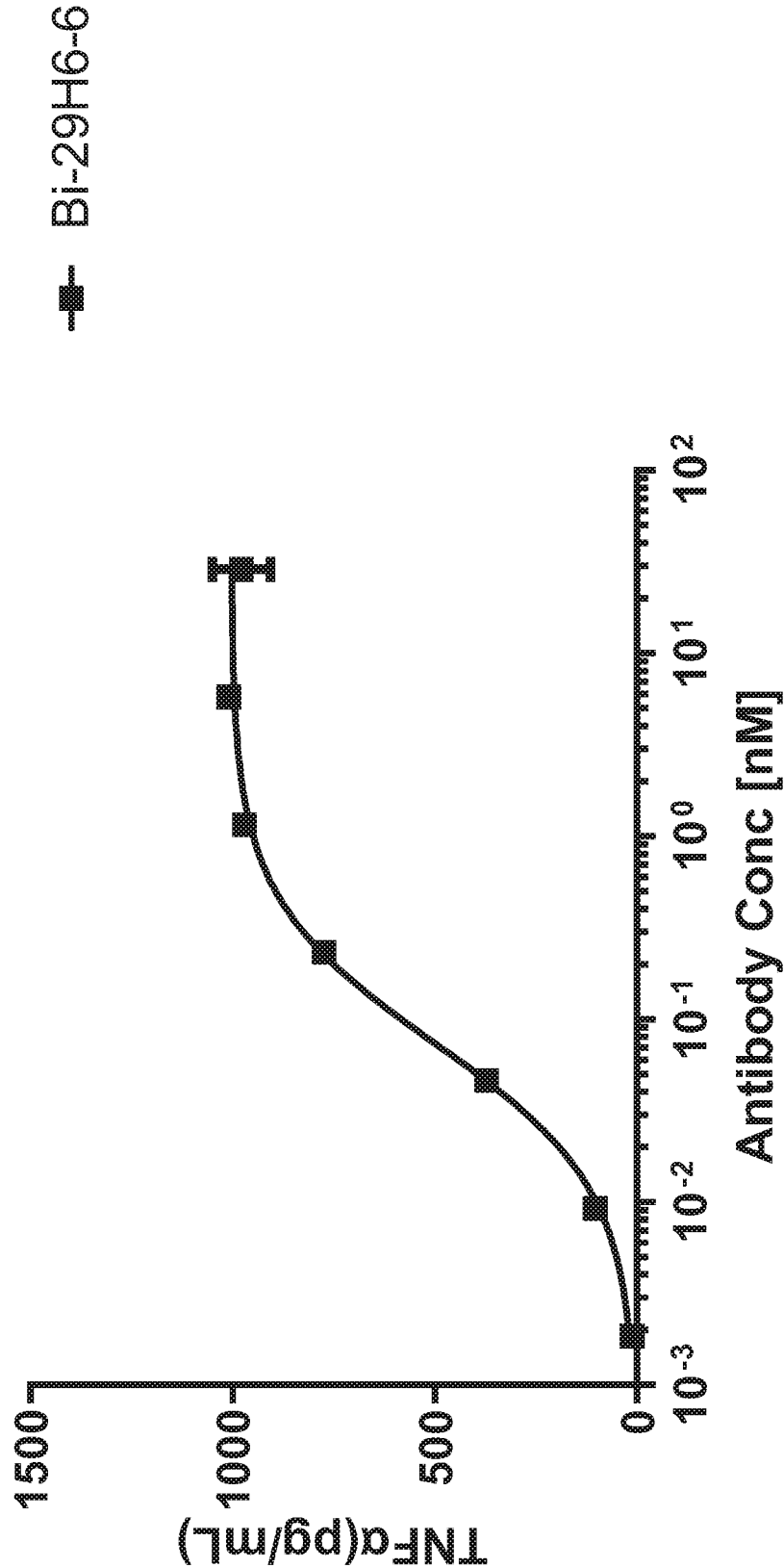


图 11C

双功能抗体介导的PBMC对非相关靶细胞Raji杀伤IFN γ 释放检测

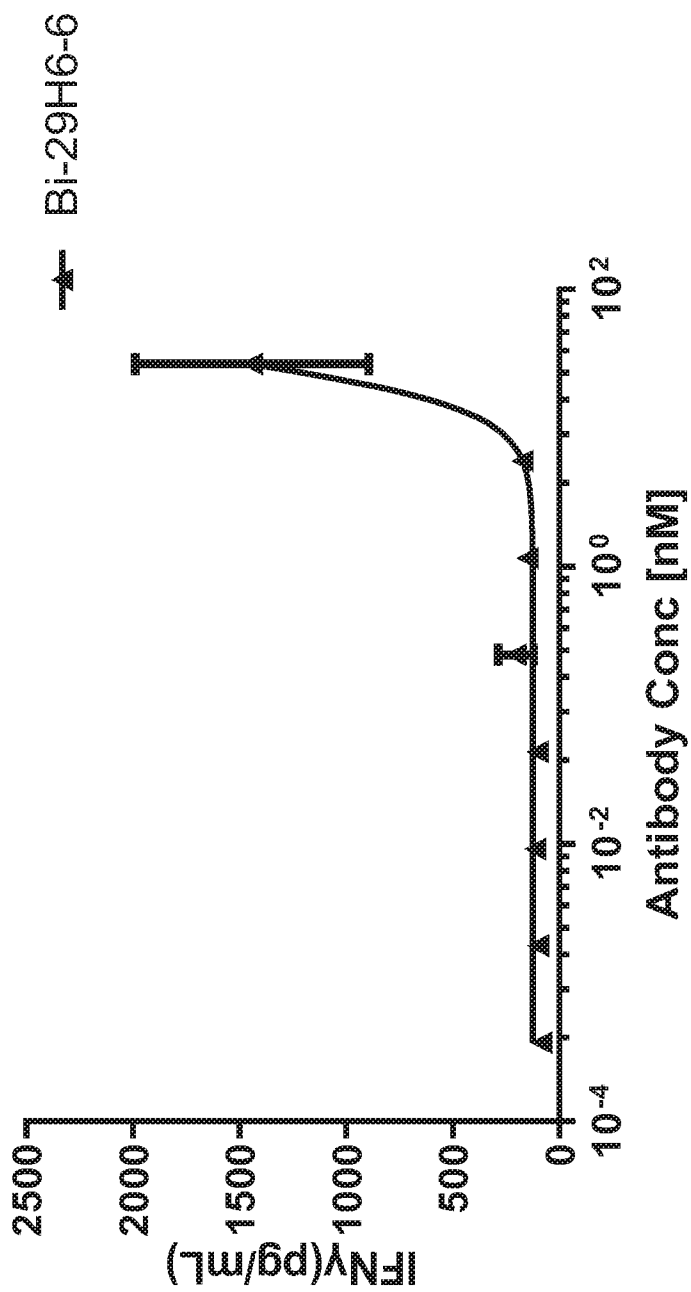


图 12A

双功能抗体介导的PBMC对非相关靶细胞Raji杀伤上清IL-6释放检测

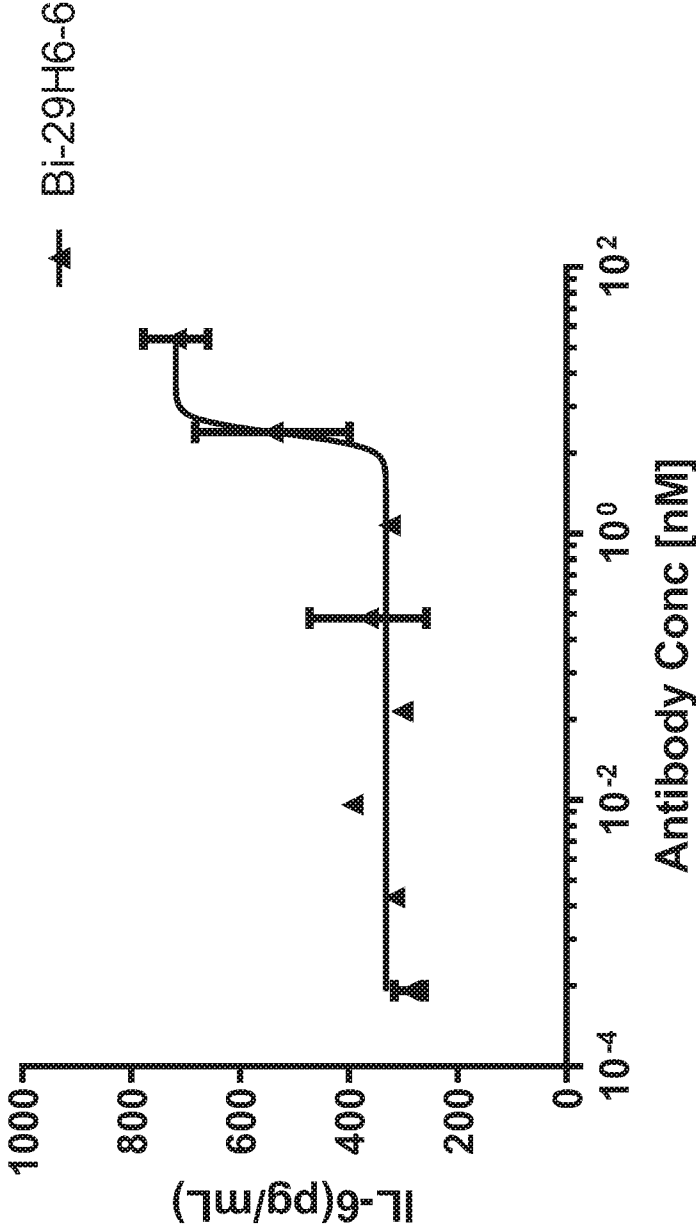


图 12B

双功能抗体介导的PBMC对非相关靶细胞Raji杀伤上清TNFα释放检测

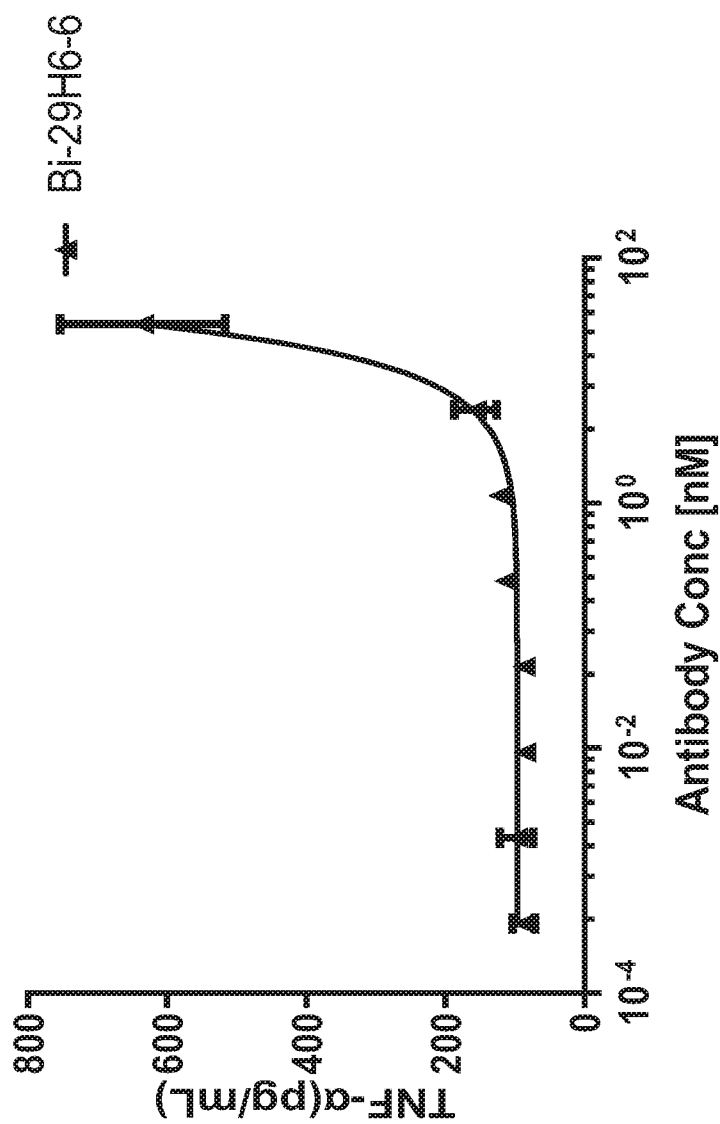


图 12C

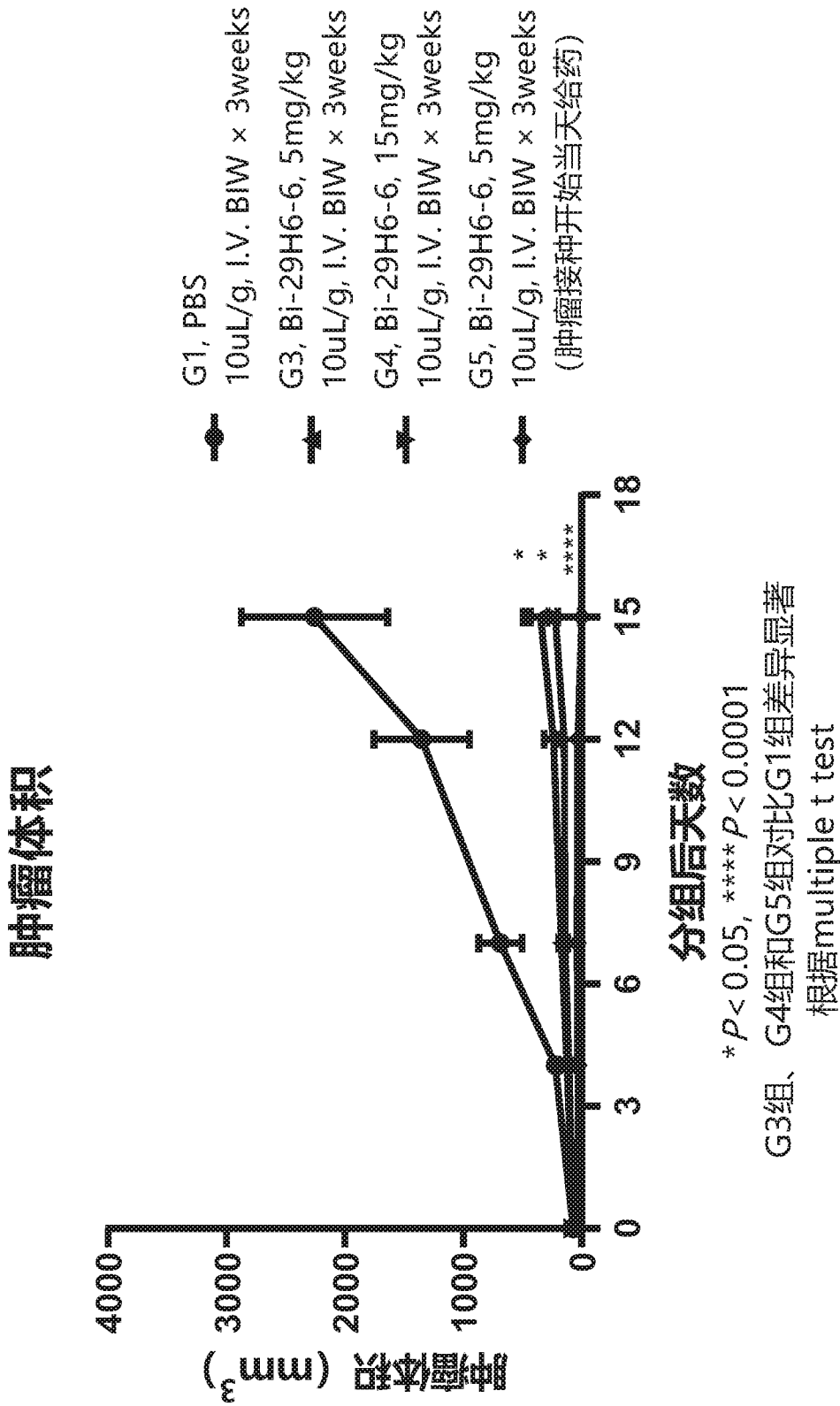


图 13A

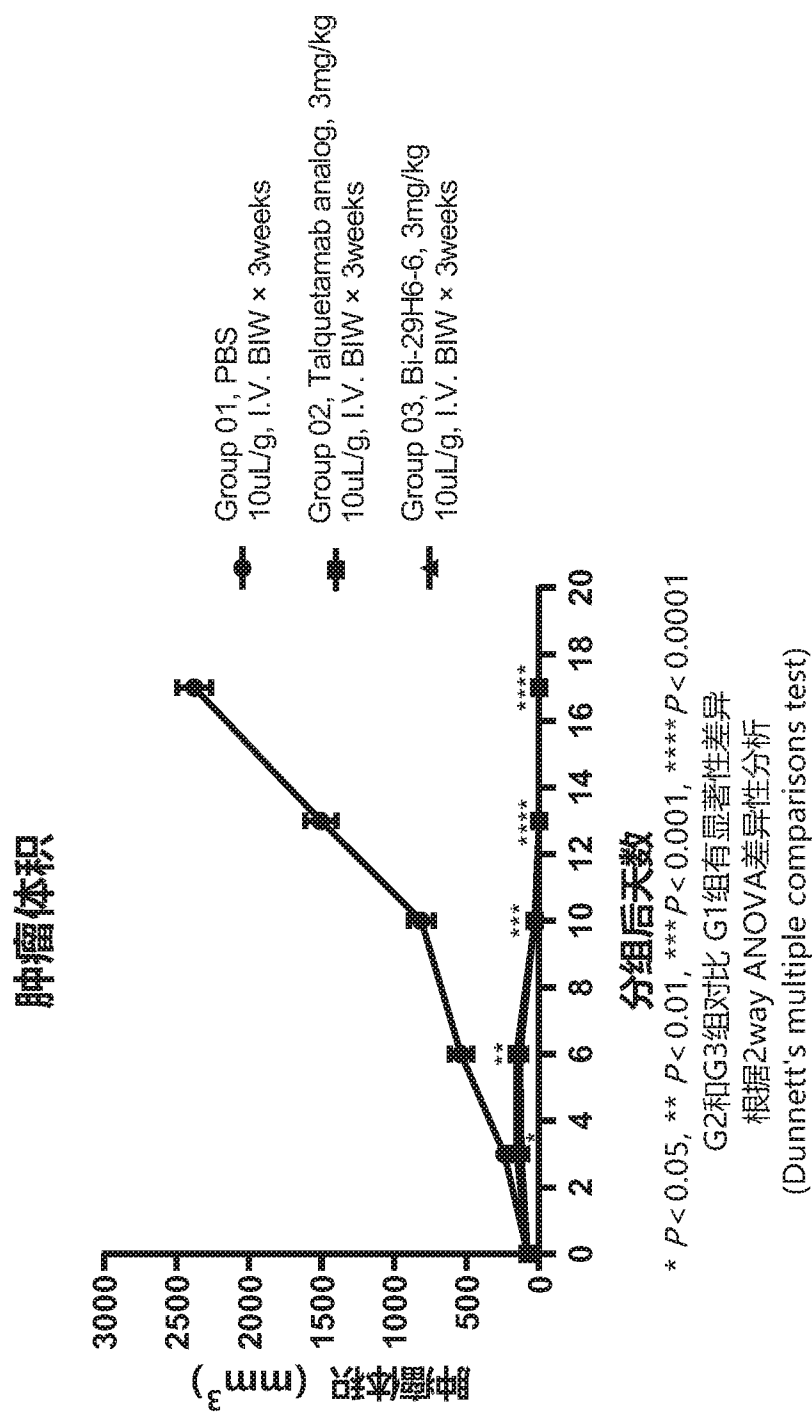


图 13B

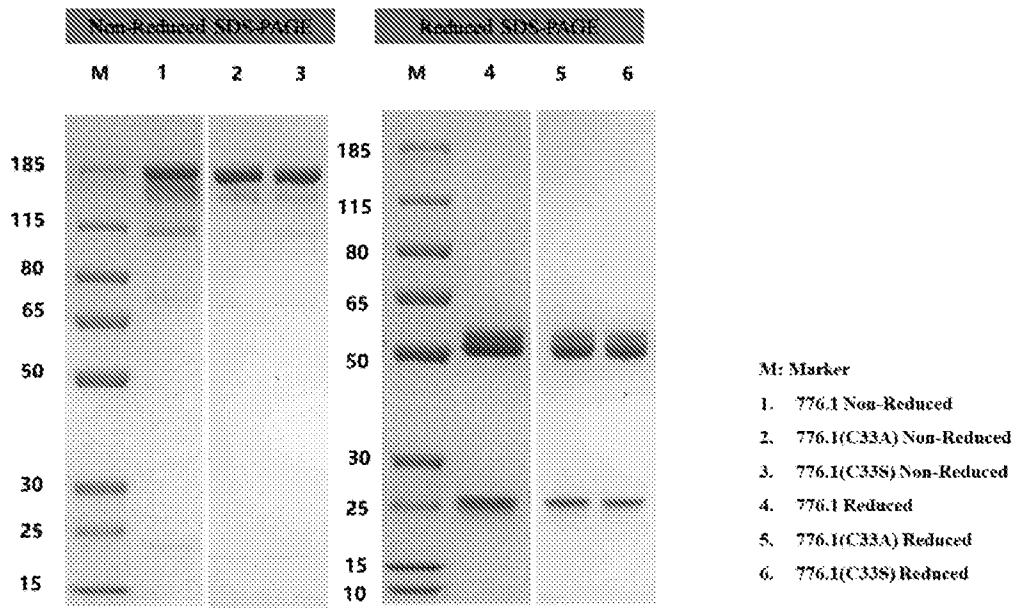


图 14

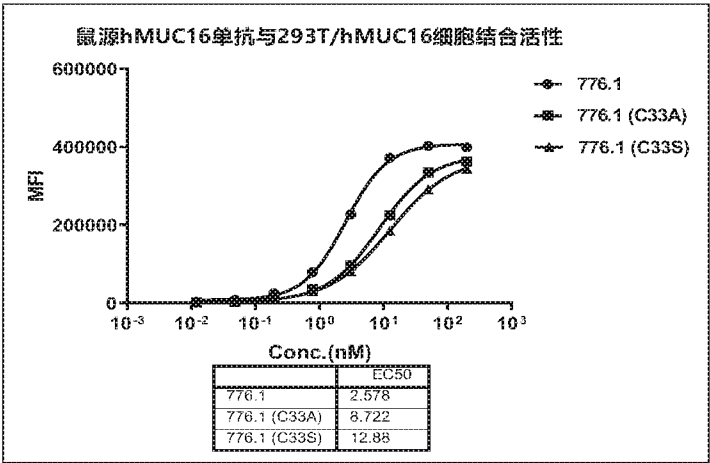


图 15

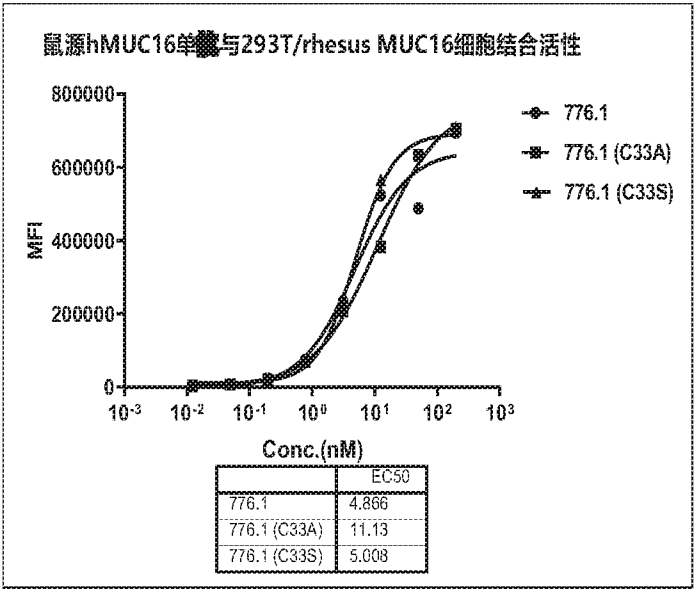


图 16

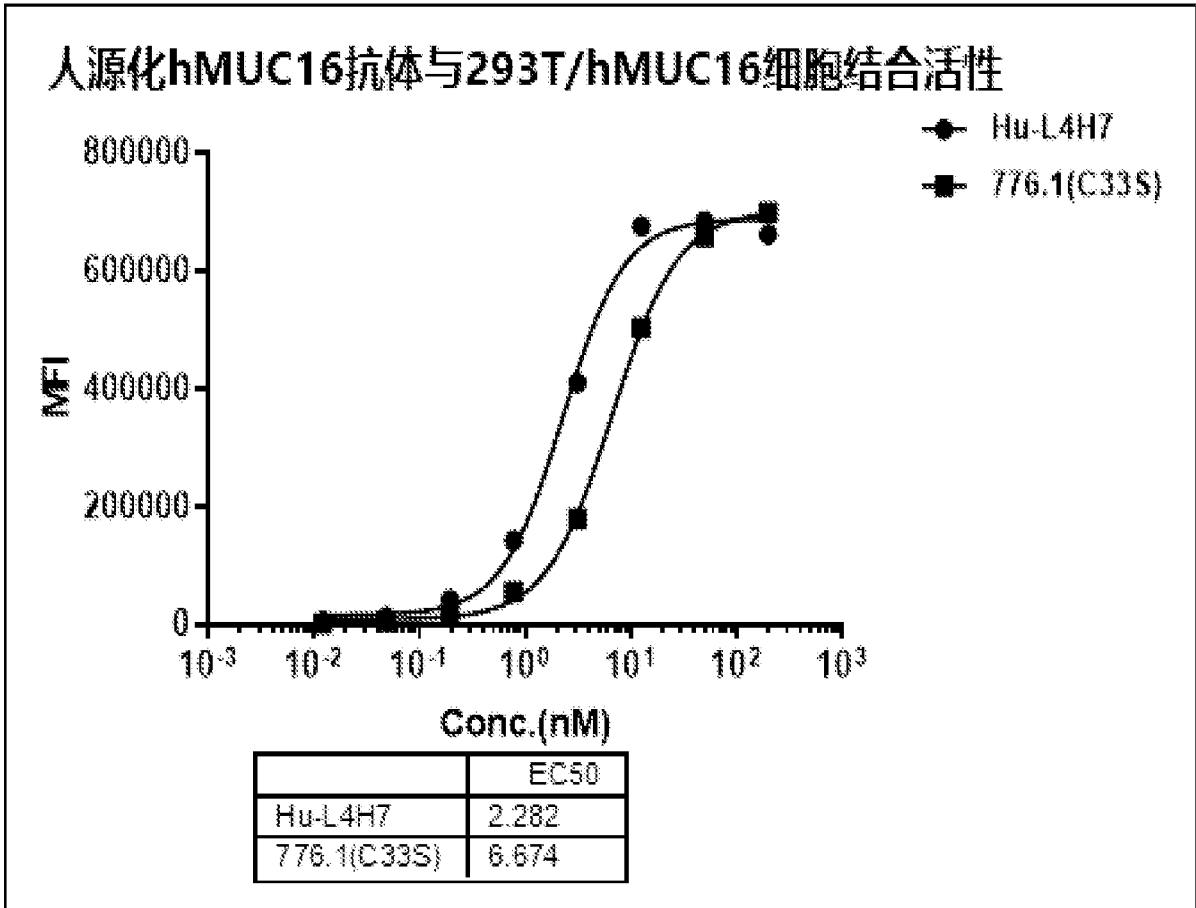


图 17

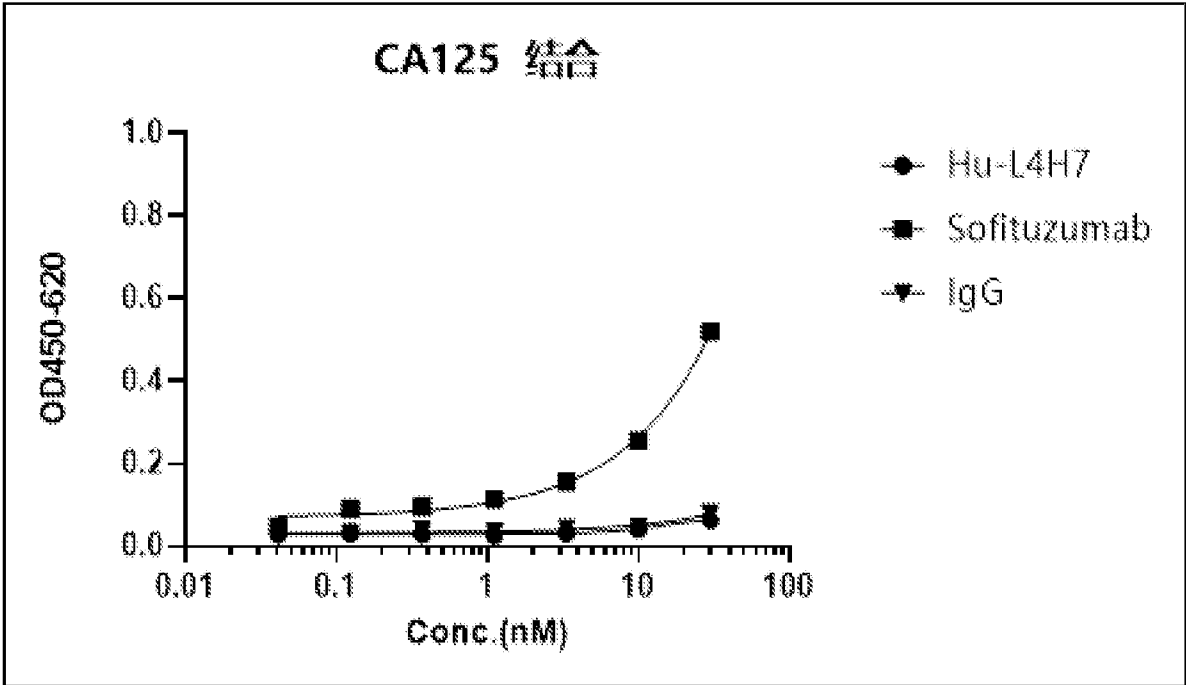


图 18

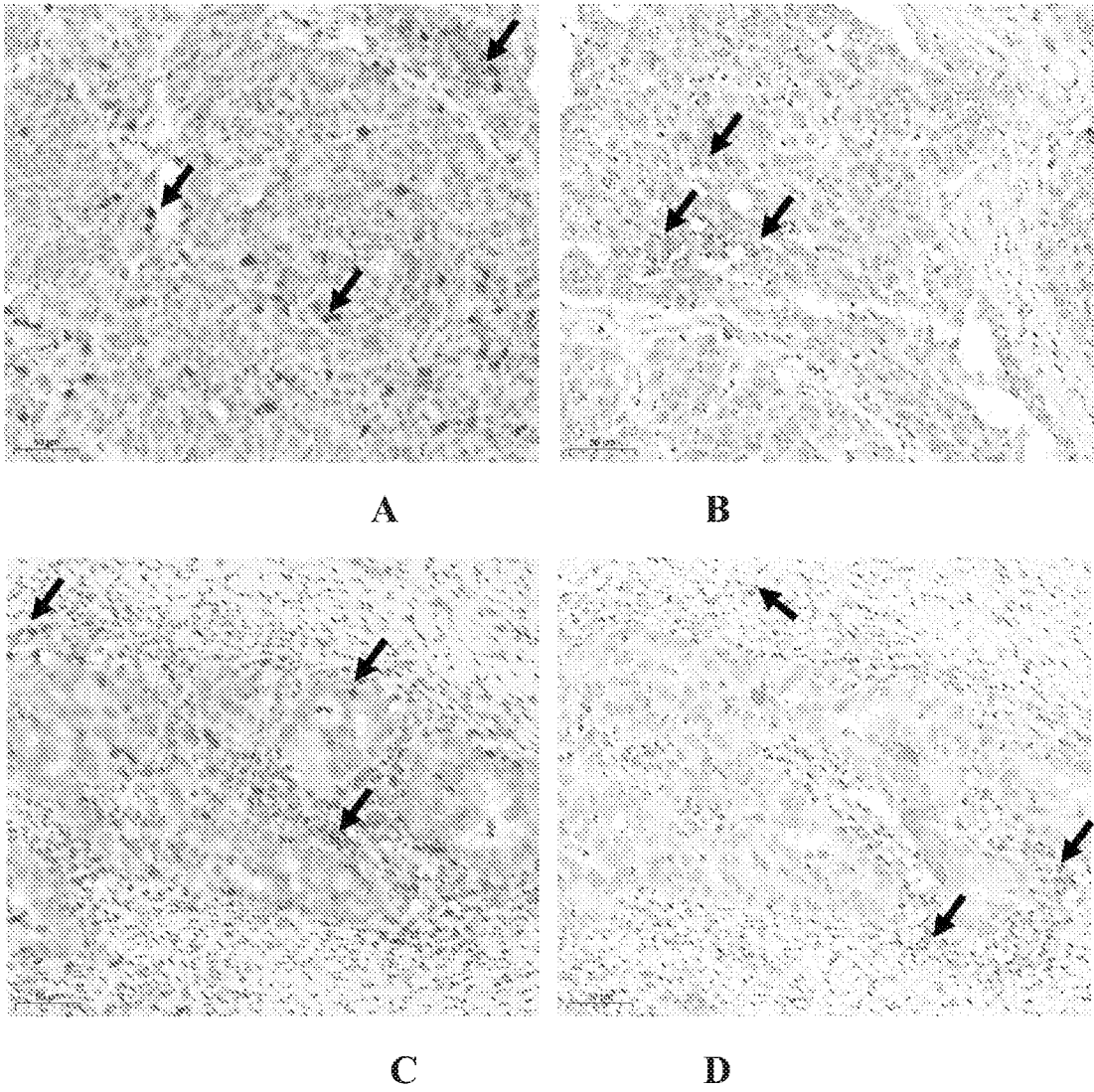
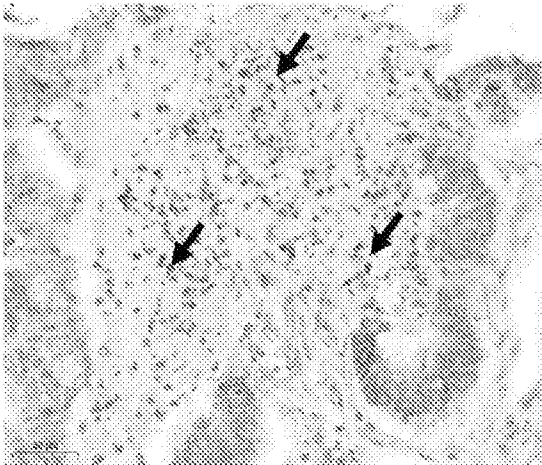
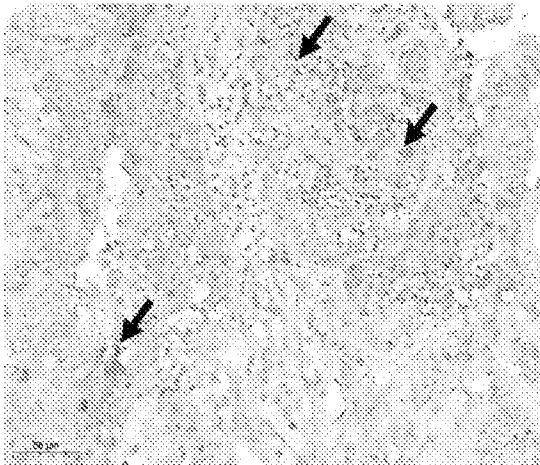


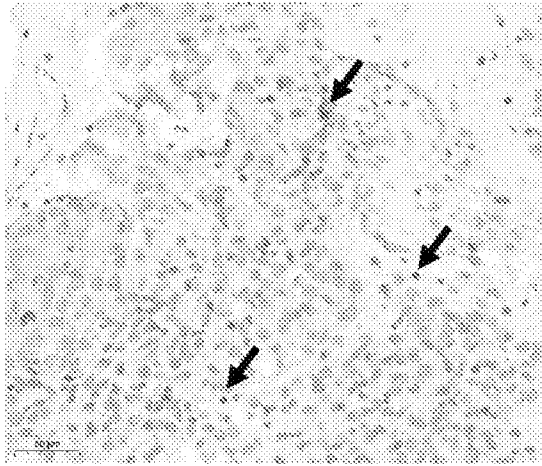
图 19



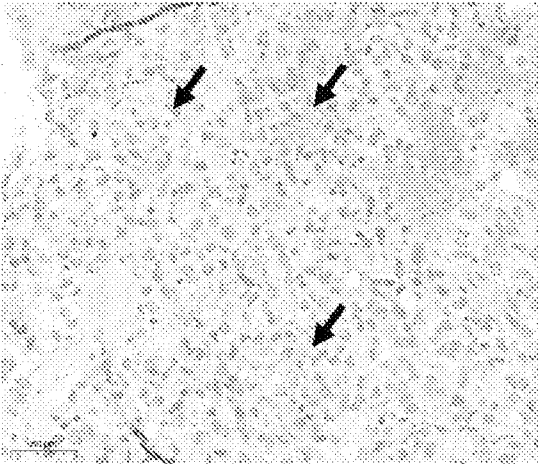
E



F



G



H

图 19 (续)

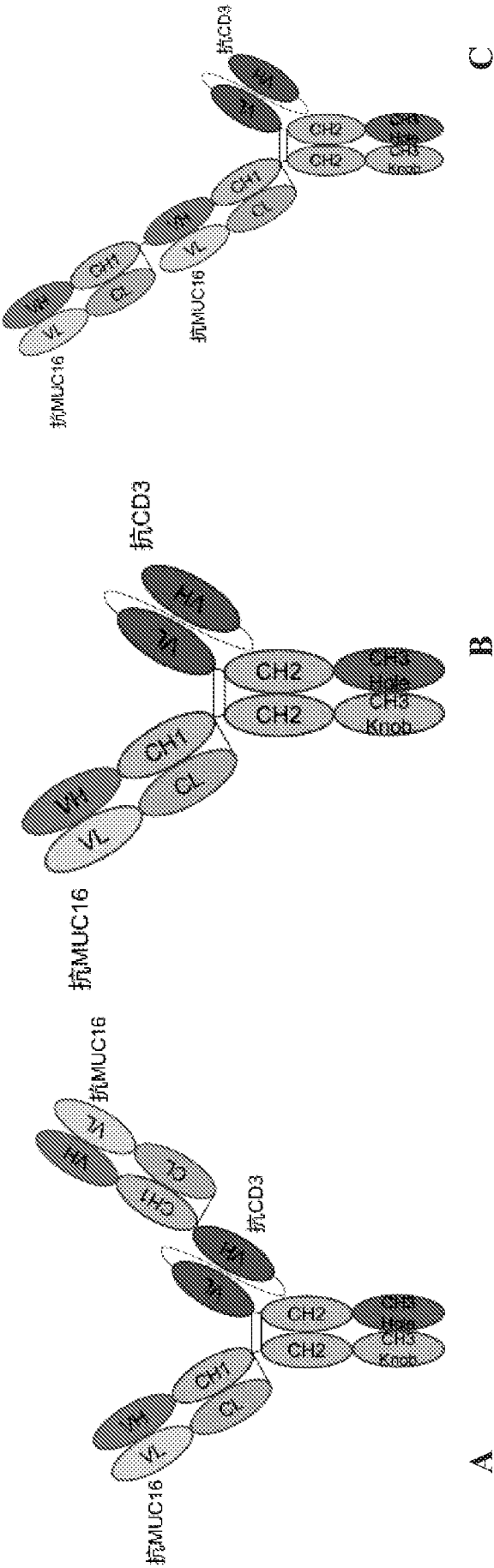


图 20

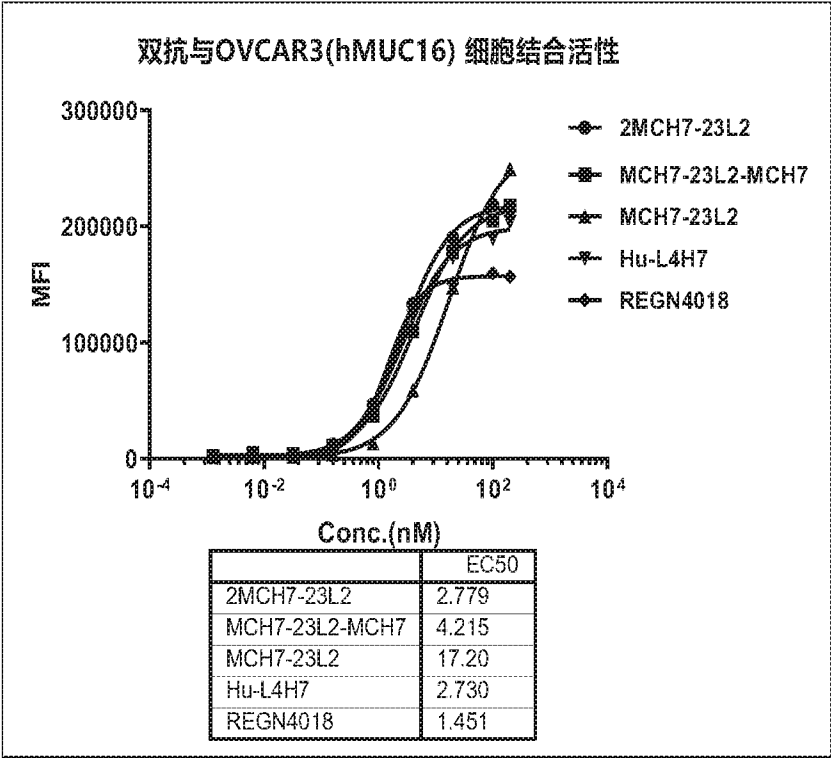


图 21

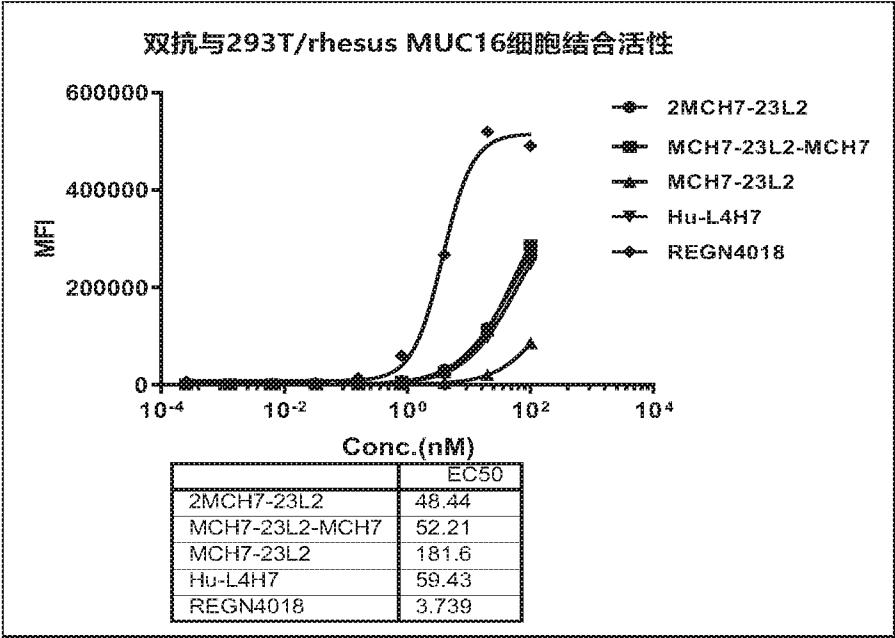


图 22

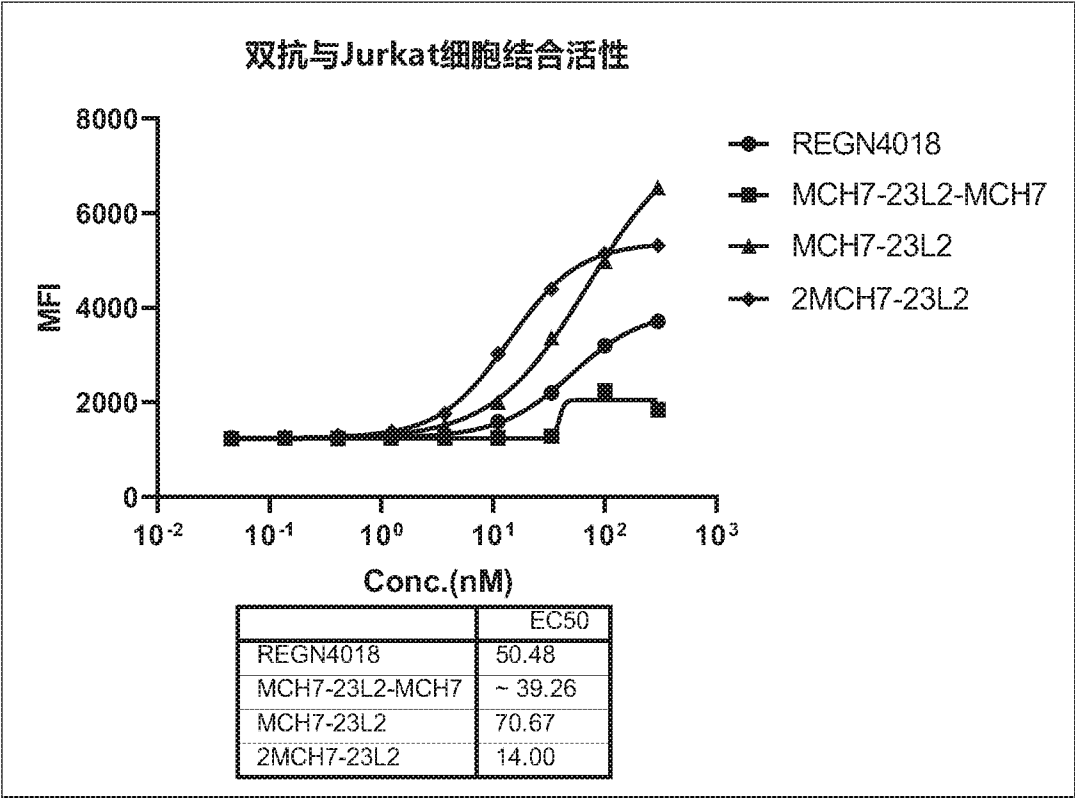


图 23

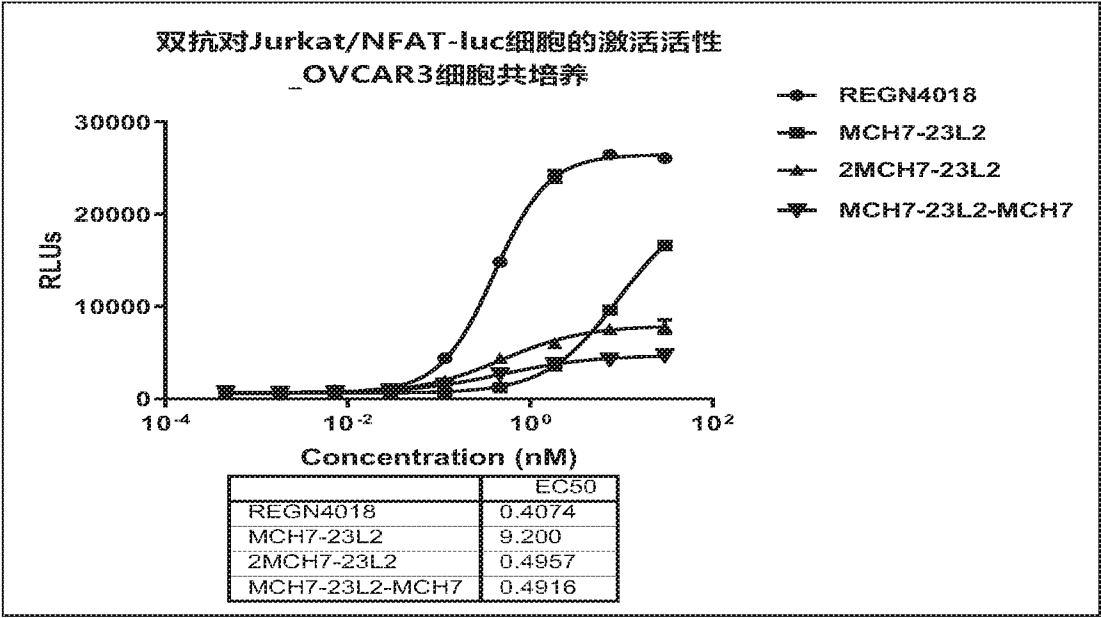


图 24

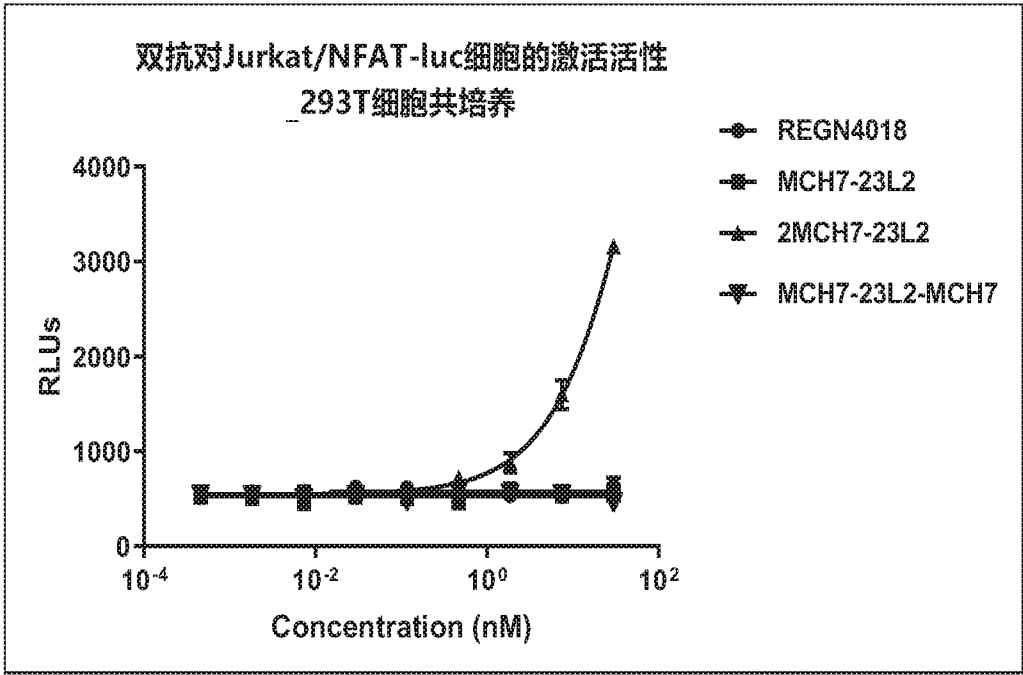


图 25

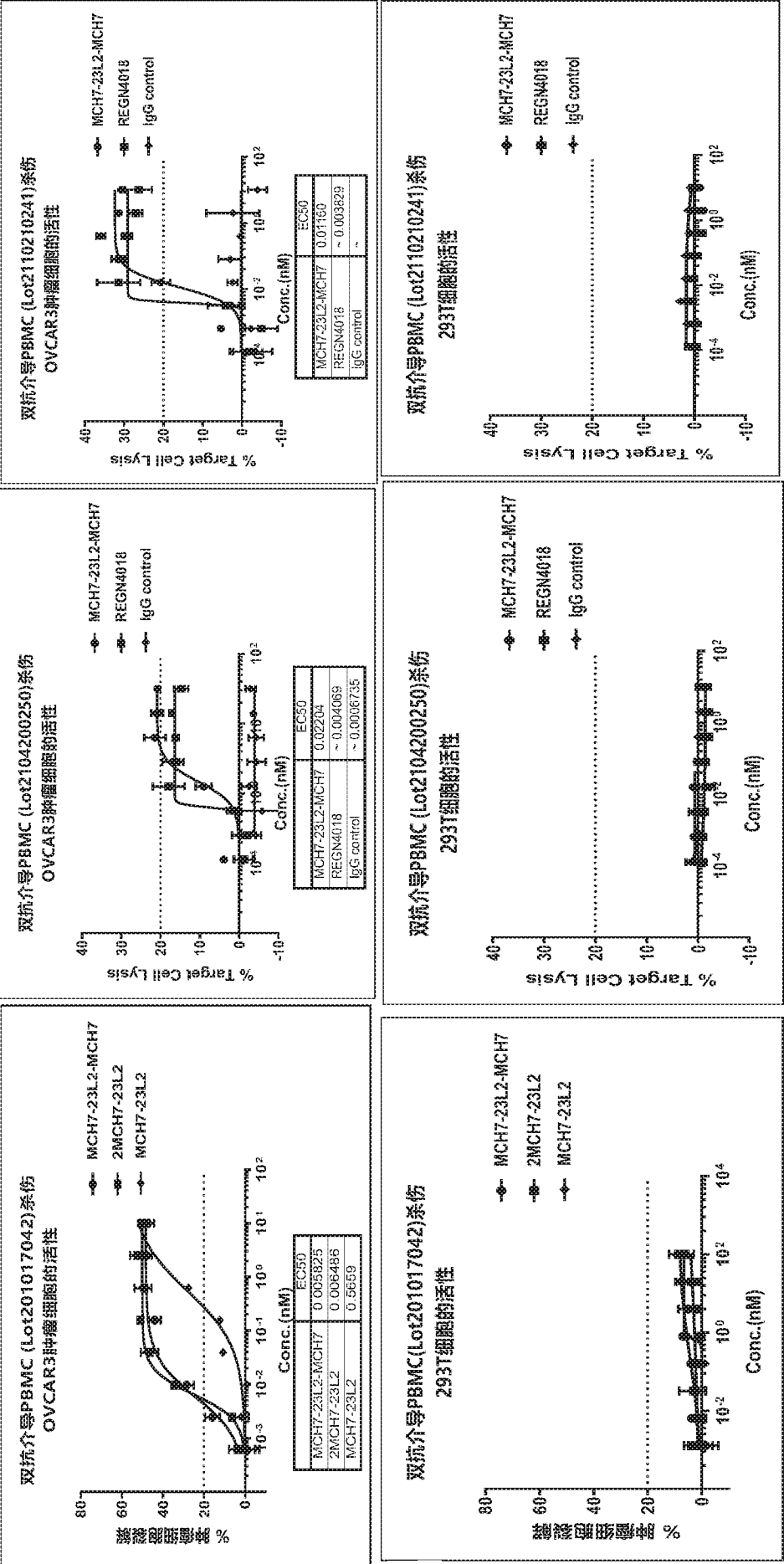


图 26A

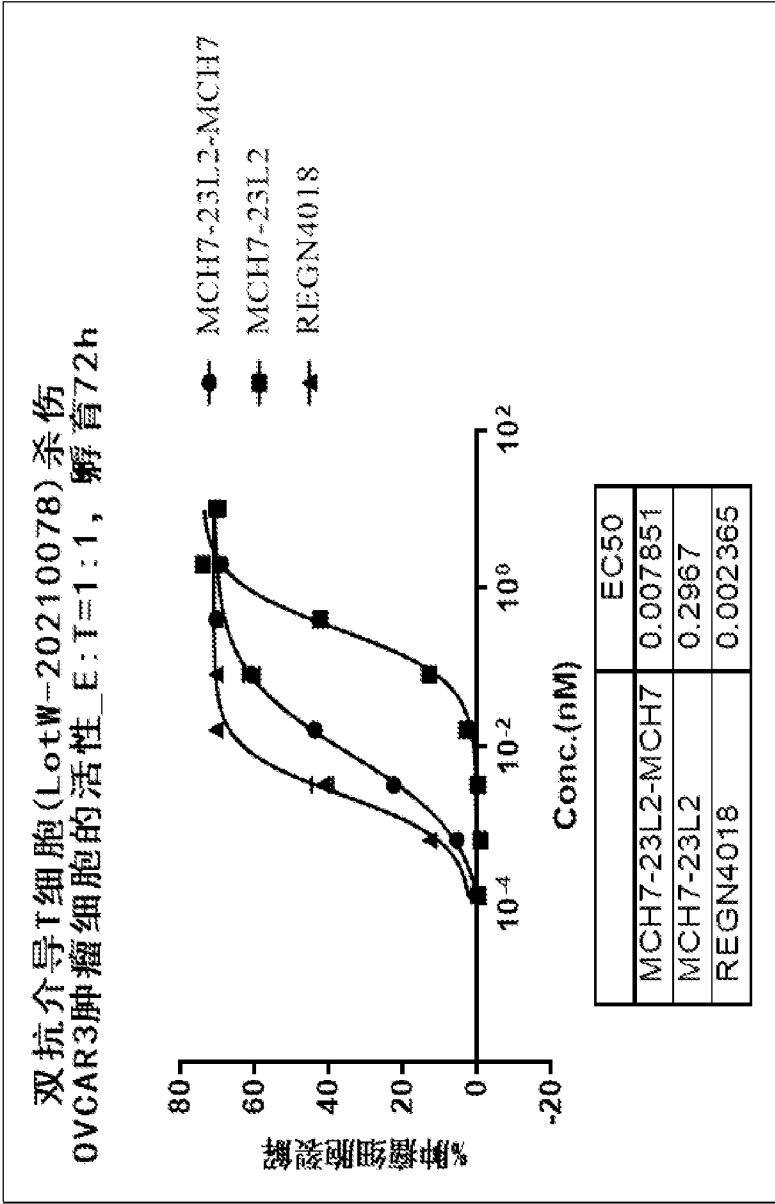


图 26B

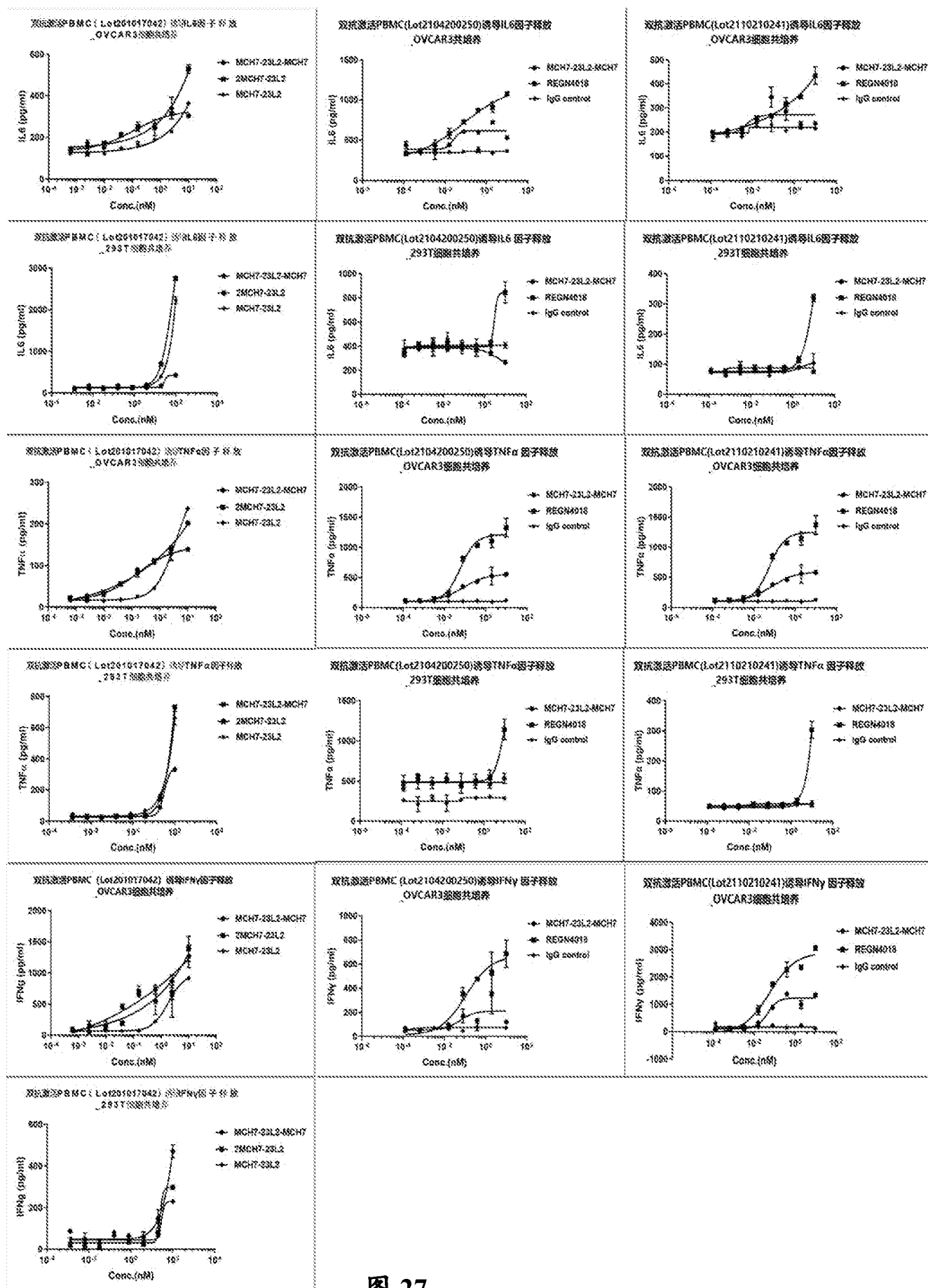


图 27

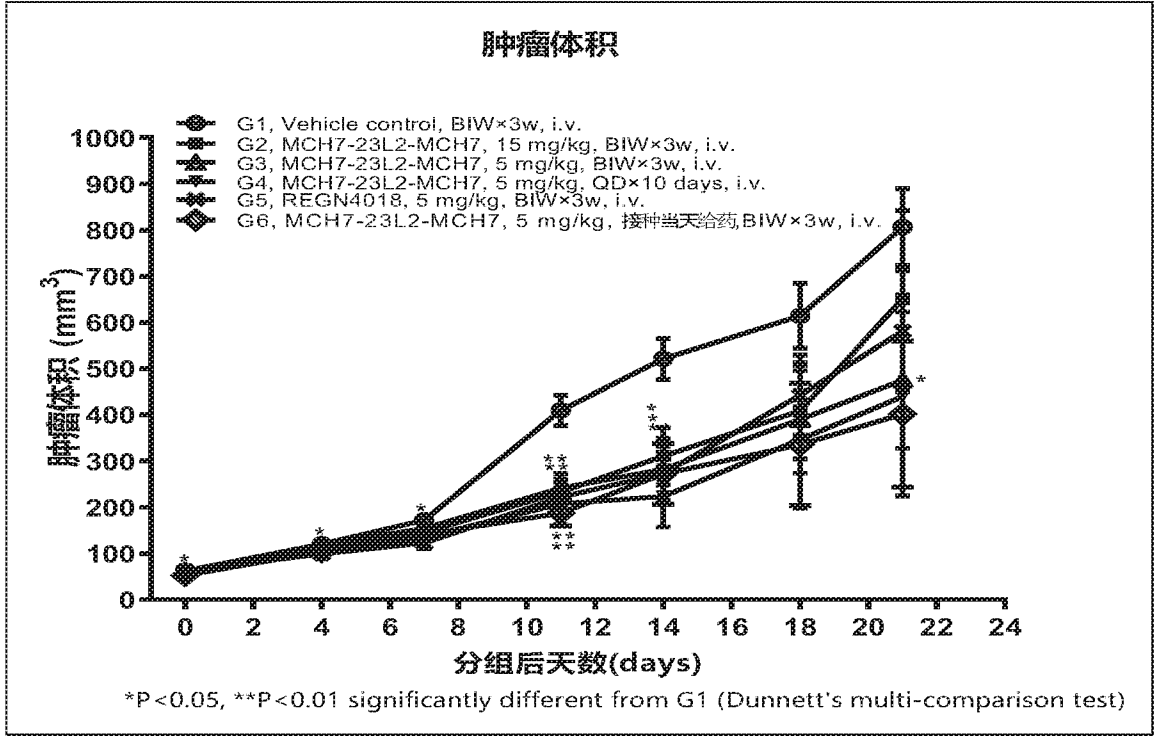


图 28A

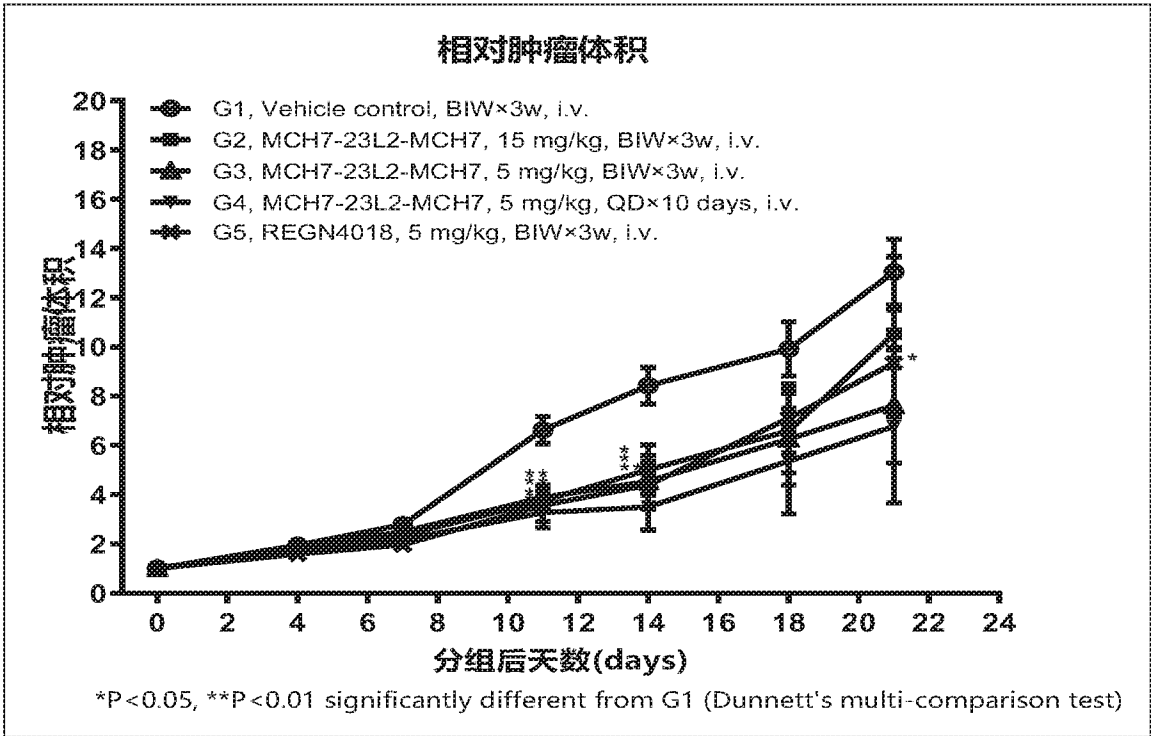


图 28B

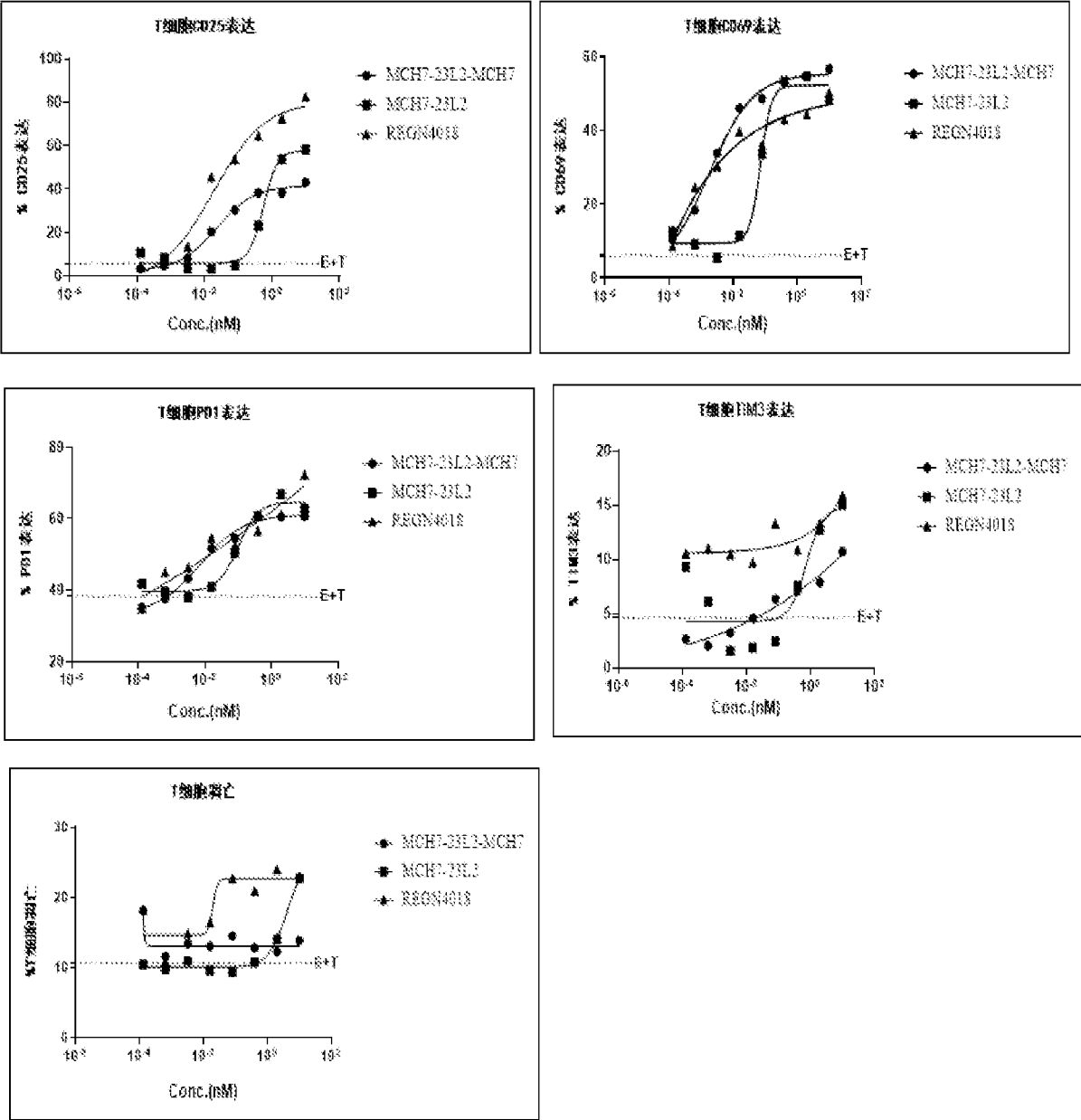


图 29

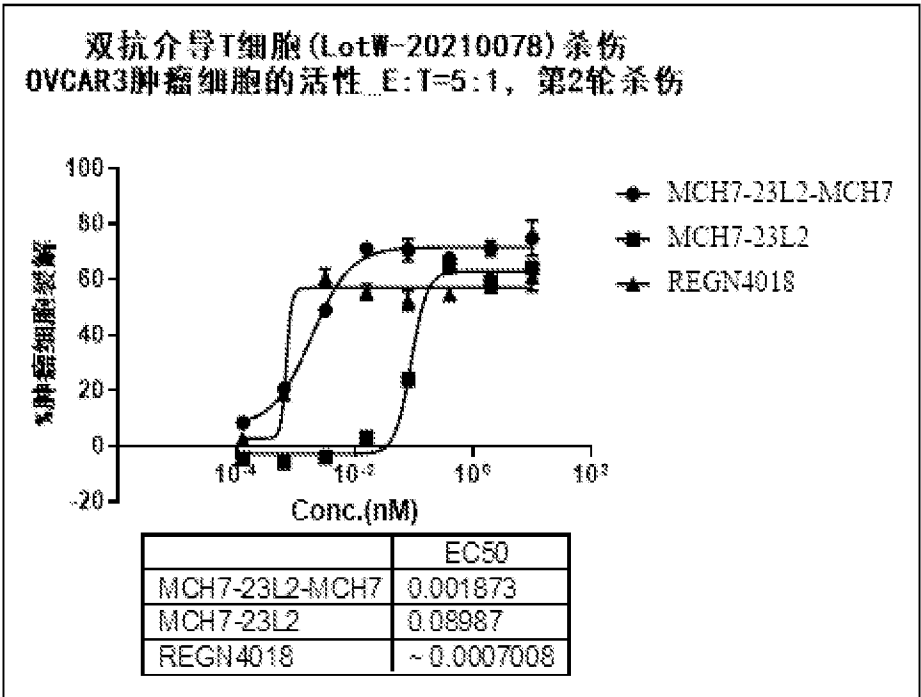
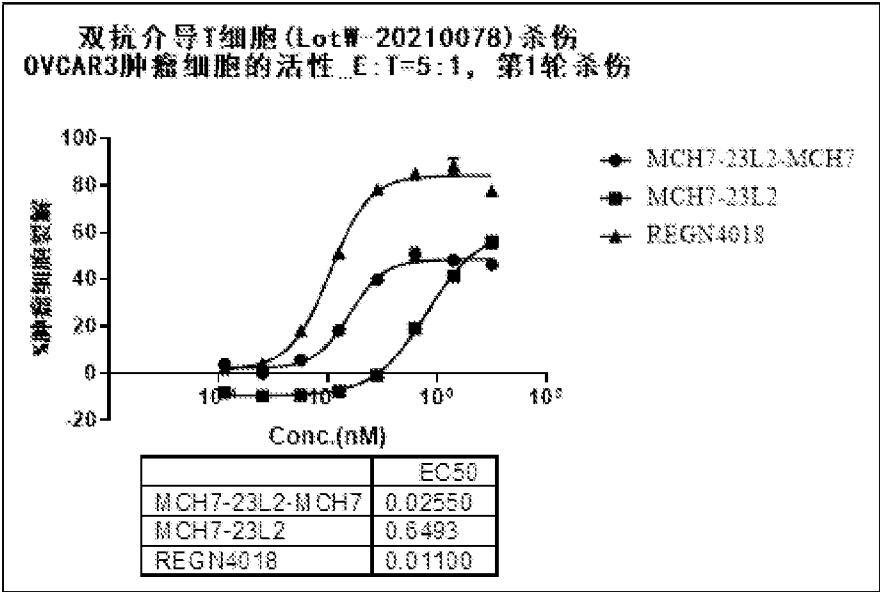


图 30

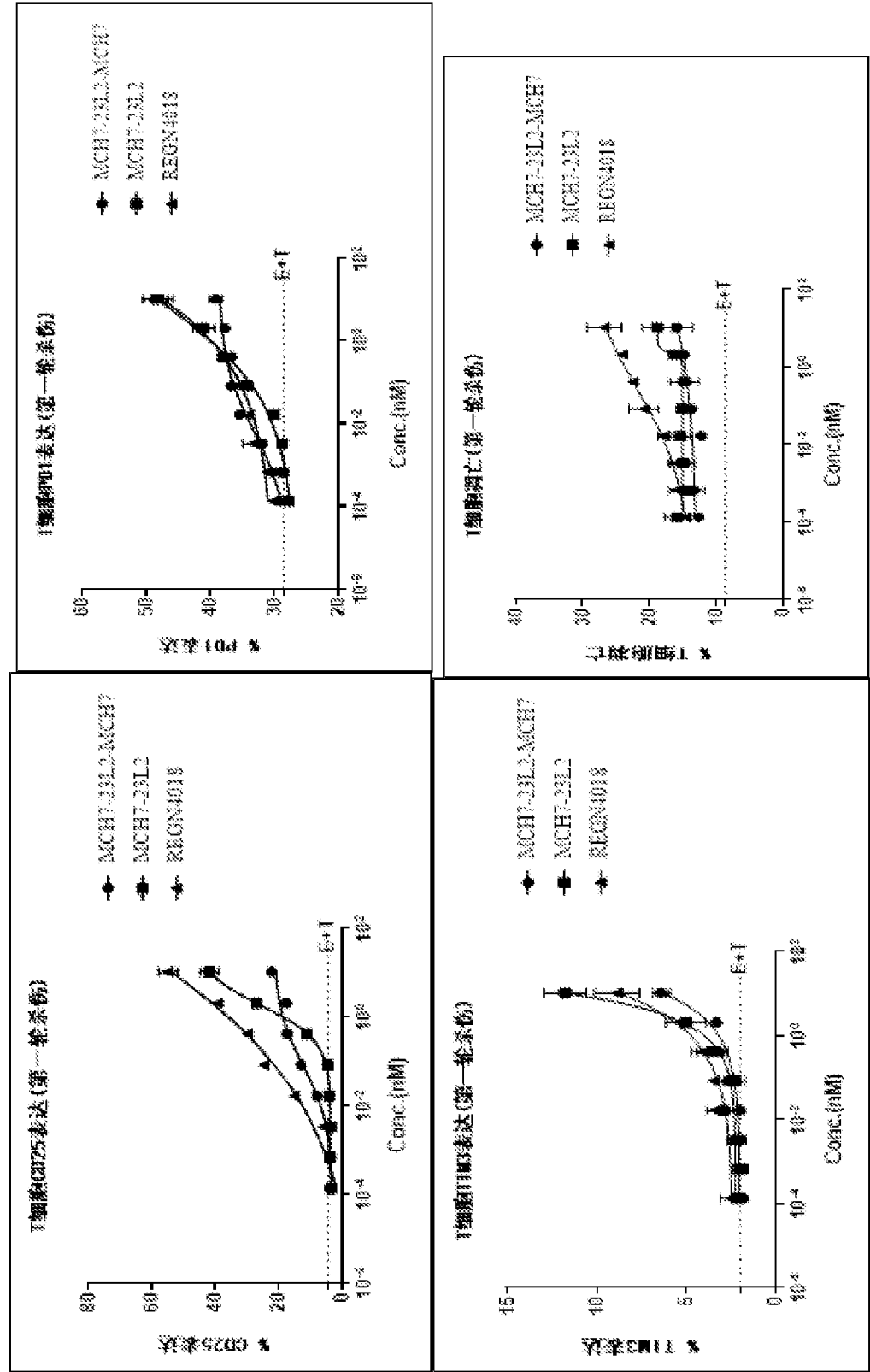


图 31

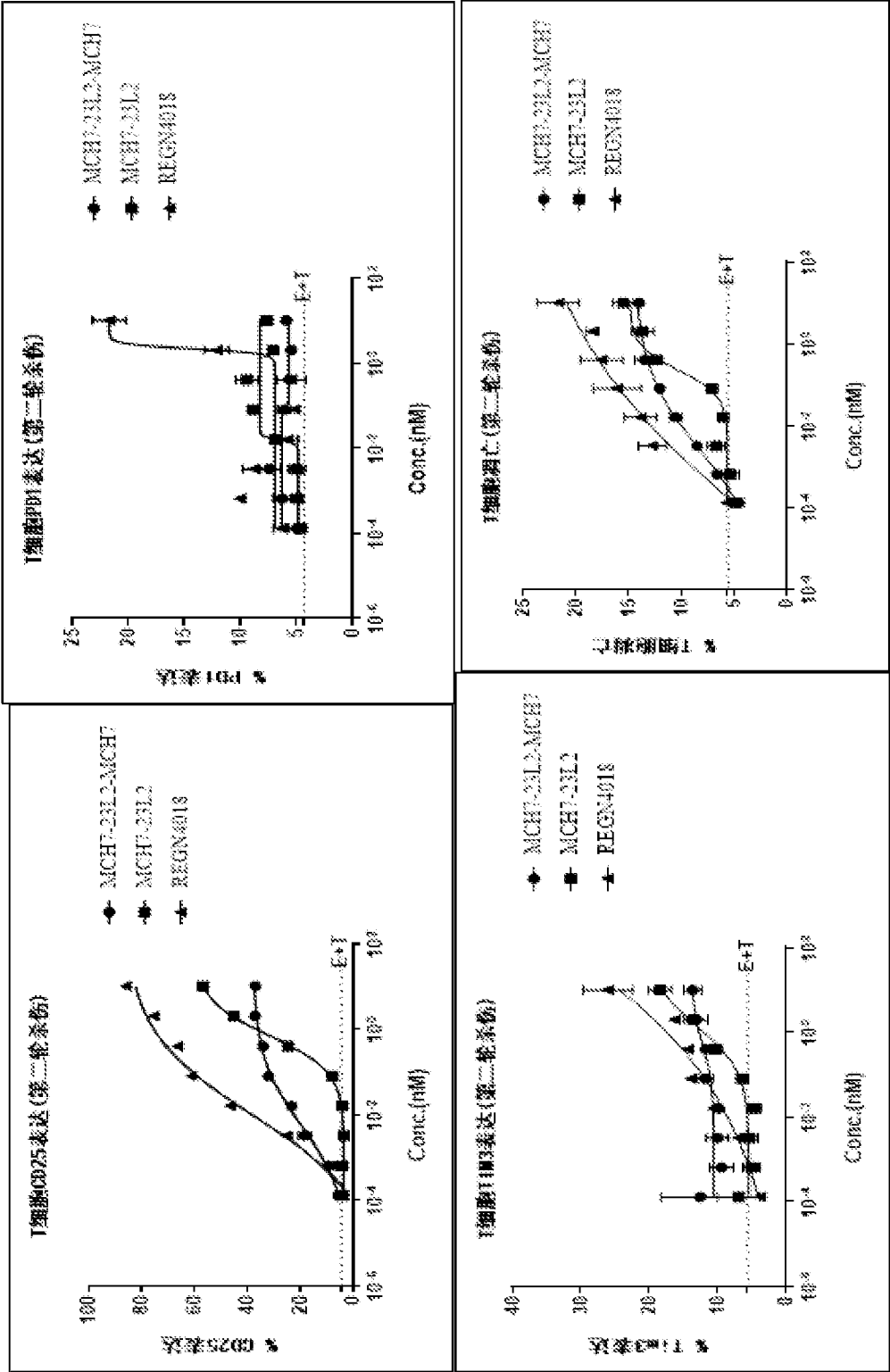


图 31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/071314

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28 (2006.01);A61K 39/00(2006.01);

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)

IPC:C07K,A61K

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, CNTXT, ENTXTC, WPABSC, DWPL, VEN, BLAST, CNKI, 万方, WANFANG, ISI-WEB OF SCIENCE, ELSEVIER: CD3, GPRC5D, MUC16, 双抗, 双特异性, 抗原结合片段, bispecific, antigen-binding, antibody, antibodies, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 35-36, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42-44, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 66-69, SEQ ID NO: 113-114, SEQ ID NO: 116-119, SEQ ID NO: 121的序列检索, search for SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 35-36, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42-44, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 66-69, SEQ ID NO: 113-114, SEQ ID NO: 116-119, SEQ ID NO: 121

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2018037651 A1 (JANSSEN PHARMACEUTICA NV) 08 February 2018 (2018-02-08) claims 27-42, 54-57, 58-60	19-43
A	CN 113429482 A (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER; EUREKA THERAPEUTICS (CAYMAN) LTD.) 24 September 2021 (2021-09-24) claim 1	19-43
A	US 2018112001 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 26 April 2018 (2018-04-26) claims 1-14, 45-49, description, paragraphs 306, 309	19-43
A	US 2019389966 A1 (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 26 December 2019 (2019-12-26) description, paragraph 10, claims 1-5, 13	19-43



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
 “D” document cited by the applicant in the international application
 “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

28 April 2023

Date of mailing of the international search report

07 May 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/071314

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.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/071314

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.: **38-42**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 38-42 set forth a method for preventing or treating cancer in a subject, which belongs to the disease treatment methods for humans or animals as defined in PCT Rule 39.1(iv). The search for this part is based on the reasonable expectation of the corresponding pharmaceutical use.
2. ☒ Claims Nos.: **1-18**
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:

Claims 1-17 set forth a bispecific antibody, but do not explicitly define a binding target of a first antigen binding region; claim 18 defines that a first antigen is selected from GPRC5D or MUC16, but does not define the specific structure of the first antigen binding region, which renders the scopes of protection of claims 1-18 unclear; therefore, said claims do not comply with PCT Article 6.
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/CN2023/071314

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2018037651	A1	08 February 2018	CR	20190025	A	14 March 2019
				AR	109499	A1	19 December 2018
				ZA	201901066	B	28 October 2020
				BR	112019001055	A2	01 October 2019
				NI	201900005	A	10 May 2019
				TW	201809005	A	16 March 2018
				TWI	781108	B	21 October 2022
				UY	37340	A	31 January 2018
				KR	20190028534	A	18 March 2019
				ECSP	19012075	A	28 February 2019
				PH	12019500152	A1	14 October 2019
				EP	3487882	A2	29 May 2019
				US	2023084967	A1	16 March 2023
				CL	2019000146	A1	26 April 2019
				SG	11201900468	YA	27 February 2019
				EA	201990346	A1	28 June 2019
				CA	3031472	A1	25 January 2018
				AU	2017299673	A1	07 February 2019
				IL	264334	A	28 February 2019
				IL	298277	A	01 January 2023
				MA	45712	A	29 May 2019
				JP	2019527061	A	26 September 2019
				WO	2018017786	A2	25 January 2018
				WO	2018017786	A3	01 March 2018
				US	10562968	B2	18 February 2020
				JP	2023011774	A	24 January 2023
				PE	20190392	A1	13 March 2019
				CO	2019001114	A2	19 February 2019
				MX	2019000825	A	04 September 2019
CN	113429482	A	24 September 2021	HK	1243955	A1	27 July 2018
				EP	3227324	A2	11 October 2017
				EP	3227324	A4	29 August 2018
				US	2020123249	A1	23 April 2020
				JP	2022044638	A	17 March 2022
				US	2018118822	A1	03 May 2018
				US	10590196	B2	17 March 2020
				BR	112017011932	A2	16 January 2018
				BR	112017011932	A8	08 November 2022
				IL	285101	A	31 August 2021
				RU	2017123545	A	14 January 2019
				RU	2017123545	A3	11 December 2019
				RU	2725819	C2	06 July 2020
				IL	252646	A0	31 July 2017
				IL	252646	B	31 August 2021
				SG	10201913937	QA	30 March 2020
				KR	20170108945	A	27 September 2017
				PH	12017501039	A1	05 March 2018
				MX	2017007247	A	25 January 2018
				JP	2020120684	A	13 August 2020
				JP	7027482	B2	01 March 2022

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/071314

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		JP 2018504890 A	22 February 2018
		JP 6753851 B2	09 September 2020
		JP 2020191900 A	03 December 2020
		CA 2969886 A1	09 June 2016
		AU 2015357535 A1	29 June 2017
		AU 2015357535 B2	14 May 2020
		SA 517381664 B1	27 December 2021
		SG 11201704552 TA	28 July 2017
		RU 2020120613 A	06 December 2021
		JP 2022103382 A	07 July 2022
		US 2020123250 A1	23 April 2020
		US 11566071 B2	31 January 2023
		AU 2020217320 A1	27 August 2020
		WO 2016090329 A2	09 June 2016
		WO 2016090329 A3	28 July 2016
US 2018112001 A1	26 April 2018	IL 265309 A	30 May 2019
		MX 2019003322 A	05 August 2019
		CL 2019000712 A1	31 May 2019
		HRP 20221202 T1	09 December 2022
		US 2018118848 A1	03 May 2018
		US 10941208 B2	09 March 2021
		HUE 059761 T2	28 December 2022
		PT 3515946 T	04 August 2022
		JP 2019536740 A	19 December 2019
		JP 7066691 B2	13 May 2022
		AU 2017331363 A1	11 April 2019
		IL 265369 A	30 May 2019
		PH 12019500604 A1	03 June 2019
		WO 2018067331 A1	12 April 2018
		WO 2018067331 A9	07 June 2018
		KR 20190073377 A	26 June 2019
		KR 102418667 B1	12 July 2022
		ES 2925563 T3	18 October 2022
		SI 3515946 T1	30 September 2022
		WO 2018058003 A1	29 March 2018
		RS 63660 B1	30 November 2022
		EP 3515946 A1	31 July 2019
		EP 3515946 B1	06 July 2022
		KR 20190067808 A	17 June 2019
		EP 3515487 A1	31 July 2019
		DK 3515946 T3	01 August 2022
		CO 2019003967 A2	10 May 2019
		JP 2019533807 A	21 November 2019
		JP 7066690 B2	13 May 2022
		MA 46277 A	31 July 2019
		BR 112019005697 A2	16 July 2019
		CL 2021002645 A1	29 April 2022
		PL 3515946 T3	07 November 2022
		CA 3037738 A1	12 April 2018
		CL 2019000726 A1	31 May 2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/071314

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
				BR	112019005670 A2	04 June 2019
				US	2020317810 A1	08 October 2020
				US	11485793 B2	01 November 2022
				PH	12019500550 A1	27 May 2019
				MX	2019003326 A	10 September 2019
				AU	2017339711 A1	11 April 2019
				CA	3037536 A1	29 March 2018
				LT	3515946 T	10 August 2022
				US	10738130 B2	11 August 2020
US	2019389966	A1	26 December 2019	MA	52962 A	28 April 2021
				TW	202005985 A	01 February 2020
				JP	2021528423 A	21 October 2021
				CL	2020003256 A1	30 April 2021
				EP	3810281 A1	28 April 2021
				SG	11202012137 UA	28 January 2021
				CA	3103887 A1	26 December 2019
				WO	2019246356 A1	26 December 2019
				PH	12020552115 A1	02 August 2021
				US	11254752 B2	22 February 2022
				AU	2019290170 A1	07 January 2021
				EA	202190088 A1	22 March 2021
				MX	2020013905 A	09 March 2021
				BR	112020025476 A2	16 March 2021
				IL	279251 A	31 January 2021
				KR	20210023981 A	04 March 2021

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2023/071314

A. 主题的分类

C07K 16/28 (2006.01)i;A61K 39/00(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)

IPC:C07K, A61K

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))

CNABS, CNTXT, ENTXTC, WPABSC, DWPI, VEN, BLAST, CNKI, 万方, ISI-WEB OF SCIENCE, ELSEVIER:CD3, GPRC5D, MUC16, 双抗, 双特异性, 抗原结合片段, bispecific, antigen-binding, antibody, antibodies, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:35-36, SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:42-44, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:66-69, SEQ ID NO:113-114, SEQ ID NO:116-119, SEQ ID NO:121的序列检索

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	US 2018037651 A1 (JANSSEN PHARMACEUTICA NV) 2018年2月8日 (2018 - 02 - 08) 权利要求27-42、54-57、58-60	19-43
A	CN 113429482 A (纪念斯隆-凯特琳癌症中心 尤里卡治疗(开曼群岛)公司) 2021年9月24日 (2021 - 09 - 24) 权利要求1	19-43
A	US 2018112001 A1 (REGENERON PHARMA) 2018年4月26日 (2018 - 04 - 26) 权利要求1-14、45-49, 说明书第306、309段	19-43
A	US 2019389966 A1 (REGENERON PHARMA) 2019年12月26日 (2019 - 12 - 26) 说明书第10段, 权利要求1-5、13	19-43

☐ 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

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“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

2023年4月28日

国际检索报告邮寄日期

2023年5月7日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

田园

电话号码 (+86) 010-62411047

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:

b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三. 1(a)),

☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:

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： 38-42
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
权利要求38-42要求保护在受试者中预防或治疗癌症的方法，属于PCT实施细则Rule 39.1(iv)规定的用于人类或动物的疾病治疗方法。对该部分的检索是基于相应制药用途的合理预期。
2. ☒ 权利要求： 1-18
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：
权利要求1-17要求保护一种双特异性抗体，但未对第一抗原结合区的结合靶点进行明确限定，权利要求18虽然限定第一抗原选自GPC5D或MUC16，但也没有对第一抗原结合区进行具体结构限定，从而导致权利要求1-18的保护范围不清楚，不符合PCT第6条的规定。
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/CN2023/071314

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)
US	2018037651	A1	2018年2月8日	CR	20190025	A	2019年3月14日
				AR	109499	A1	2018年12月19日
				ZA	201901066	B	2020年10月28日
				BR	112019001055	A2	2019年10月1日
				NI	201900005	A	2019年5月10日
				TW	201809005	A	2018年3月16日
				TWI	781108	B	2022年10月21日
				UY	37340	A	2018年1月31日
				KR	20190028534	A	2019年3月18日
				ECSP	19012075	A	2019年2月28日
				PH	12019500152	A1	2019年10月14日
				EP	3487882	A2	2019年5月29日
				US	2023084967	A1	2023年3月16日
				CL	2019000146	A1	2019年4月26日
				SG	11201900468	YA	2019年2月27日
				EA	201990346	A1	2019年6月28日
				CA	3031472	A1	2018年1月25日
				AU	2017299673	A1	2019年2月7日
				IL	264334	A	2019年2月28日
				IL	298277	A	2023年1月1日
				MA	45712	A	2019年5月29日
				JP	2019527061	A	2019年9月26日
				WO	2018017786	A2	2018年1月25日
				WO	2018017786	A3	2018年3月1日
				US	10562968	B2	2020年2月18日
				JP	2023011774	A	2023年1月24日
				PE	20190392	A1	2019年3月13日
				CO	2019001114	A2	2019年2月19日
				MX	2019000825	A	2019年9月4日
CN	113429482	A	2021年9月24日	HK	1243955	A1	2018年7月27日
				EP	3227324	A2	2017年10月11日
				EP	3227324	A4	2018年8月29日
				US	2020123249	A1	2020年4月23日
				JP	2022044638	A	2022年3月17日
				US	2018118822	A1	2018年5月3日
				US	10590196	B2	2020年3月17日
				BR	112017011932	A2	2018年1月16日
				BR	112017011932	A8	2022年11月8日
				IL	285101	A	2021年8月31日
				RU	2017123545	A	2019年1月14日
				RU	2017123545	A3	2019年12月11日
				RU	2725819	C2	2020年7月6日
				IL	252646	A0	2017年7月31日
				IL	252646	B	2021年8月31日
				SG	10201913937	QA	2020年3月30日
				KR	20170108945	A	2017年9月27日
				PH	12017501039	A1	2018年3月5日
				MX	2017007247	A	2018年1月25日
				JP	2020120684	A	2020年8月13日
				JP	7027482	B2	2022年3月1日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/071314

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)
				JP	2018504890	A	2018年2月22日
				JP	6753851	B2	2020年9月9日
				JP	2020191900	A	2020年12月3日
				CA	2969886	A1	2016年6月9日
				AU	2015357535	A1	2017年6月29日
				AU	2015357535	B2	2020年5月14日
				SA	517381664	B1	2021年12月27日
				SG	11201704552	TA	2017年7月28日
				RU	2020120613	A	2021年12月6日
				JP	2022103382	A	2022年7月7日
				US	2020123250	A1	2020年4月23日
				US	11566071	B2	2023年1月31日
				AU	2020217320	A1	2020年8月27日
				WO	2016090329	A2	2016年6月9日
				WO	2016090329	A3	2016年7月28日
US	2018112001	A1	2018年4月26日	IL	265309	A	2019年5月30日
				MX	2019003322	A	2019年8月5日
				CL	2019000712	A1	2019年5月31日
				HRP	20221202	T1	2022年12月9日
				US	2018118848	A1	2018年5月3日
				US	10941208	B2	2021年3月9日
				HUE	059761	T2	2022年12月28日
				PT	3515946	T	2022年8月4日
				JP	2019536740	A	2019年12月19日
				JP	7066691	B2	2022年5月13日
				AU	2017331363	A1	2019年4月11日
				IL	265369	A	2019年5月30日
				PH	12019500604	A1	2019年6月3日
				WO	2018067331	A1	2018年4月12日
				WO	2018067331	A9	2018年6月7日
				KR	20190073377	A	2019年6月26日
				KR	102418667	B1	2022年7月12日
				ES	2925563	T3	2022年10月18日
				SI	3515946	T1	2022年9月30日
				WO	2018058003	A1	2018年3月29日
				RS	63660	B1	2022年11月30日
				EP	3515946	A1	2019年7月31日
				EP	3515946	B1	2022年7月6日
				KR	20190067808	A	2019年6月17日
				EP	3515487	A1	2019年7月31日
				DK	3515946	T3	2022年8月1日
				CO	2019003967	A2	2019年5月10日
				JP	2019533807	A	2019年11月21日
				JP	7066690	B2	2022年5月13日
				MA	46277	A	2019年7月31日
				BR	112019005697	A2	2019年7月16日
				CL	2021002645	A1	2022年4月29日
				PL	3515946	T3	2022年11月7日
				CA	3037738	A1	2018年4月12日
				CL	2019000726	A1	2019年5月31日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/071314

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	112019005670	A2	2019年6月4日
				US	2020317810	A1	2020年10月8日
				US	11485793	B2	2022年11月1日
				PH	12019500550	A1	2019年5月27日
				MX	2019003326	A	2019年9月10日
				AU	2017339711	A1	2019年4月11日
				CA	3037536	A1	2018年3月29日
				LT	3515946	T	2022年8月10日
				US	10738130	B2	2020年8月11日
US	2019389966	A1	2019年12月26日	MA	52962	A	2021年4月28日
				TW	202005985	A	2020年2月1日
				JP	2021528423	A	2021年10月21日
				CL	2020003256	A1	2021年4月30日
				EP	3810281	A1	2021年4月28日
				SG	11202012137	UA	2021年1月28日
				CA	3103887	A1	2019年12月26日
				WO	2019246356	A1	2019年12月26日
				PH	12020552115	A1	2021年8月2日
				US	11254752	B2	2022年2月22日
				AU	2019290170	A1	2021年1月7日
				EA	202190088	A1	2021年3月22日
				MX	2020013905	A	2021年3月9日
				BR	112020025476	A2	2021年3月16日
				IL	279251	A	2021年1月31日
				KR	20210023981	A	2021年3月4日