

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 1 月 6 日 (06.01.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/002019 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/102998

(22) 国际申请日: 2021 年 6 月 29 日 (29.06.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010617663.3 2020 年 6 月 30 日 (30.06.2020) CN

(71) 申请人: 江苏恒瑞医药股份有限公司 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。上海恒瑞医药有限公司 (SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。

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

本国际公布:

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

(72) 发明人: 孙乐 (SUN, Le); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。叶鑫 (YE, Xin); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。陈雨潇 (CHEN, Yuxiao); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。金薪盛 (JIN, Xinsheng); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。陶维康 (TAO, Weikang); 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司 (GE CHENG & CO., LTD); 中国北京市东城区东长安街 1 号东方广场东三办公楼 19 层程伟, Beijing 100738 (CN)。

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

(54) Title: ANTI-CD70 ANTIBODY AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 抗 CD70 抗体及其应用

(57) Abstract: The present disclosure relates to an anti-CD70 antibody and an application thereof. Specifically, the present disclosure relates to an anti-CD70 antibody, which comprises a light chain variable region and a heavy chain variable region of the antibody, and a use thereof as a drug.

(57) 摘要: 本披露涉及抗 CD70 抗体及其应用。具体地, 本披露涉及一种抗 CD70 抗体, 其包含所述抗体轻链可变区和重链可变区, 及其作为药物的用途。

WO 2022/002019 A1

抗 CD70 抗体及其应用

技术领域

本披露属于生物医药领域，具体涉及结合 CD70 的抗体及其应用。

5

背景技术

这里的陈述仅提供与本披露有关的背景信息，而不必然地构成现有技术。

CD70 是一种细胞表面抗原，属于肿瘤坏死因子 (Tumor necrosis factor, TNF) 家族成员，是含 193 个氨基酸，分子量约为 50kD 的 II 型膜蛋白。在体内以同源三聚体形式与其受体 CD27 相互作用，再由 CD27 的胞内域结合肿瘤坏死因子受体相关因子 (TNF receptor-associated factor, TRAF)，如 TRAF2 和 TRAF5 来激活 NF κ B 和 JNK 通路，最终导致促生存和增殖信号。CD70 诱导的 CD27 信号传导引起表达 CD27 的调节性 T 细胞的产生和激活增加。CD70 还通过诱导调节性 T 细胞，逃避免疫监视，从而促进肿瘤的生长。生理条件下，CD70 在活化的 T 细胞、B 细胞和树突状细胞上瞬时表达，而在非淋巴的正常组织上几乎不表达。但是，CD70 在多种血液瘤和实体瘤中高表达，比如 B 细胞淋巴瘤，肾癌和乳腺癌等，并与预后呈负相关性。CD27 在血液瘤中与 CD70 共表达，两者结合会导致 CD27 的胞外域被切下，形成可溶性 CD27 (sCD27)，可作为诊断的生物标识物。

10

15

目前 WO2012123586A1、WO2006044643A3、WO2007038637A3、WO2017138471A1 等多篇文献已公开了多种抗 CD70 抗体。目前仍无有效抗 CD70 抗体药物应用于临床，仍需研发新的有效的抗 CD70 抗体药物。

20

发明内容

本披露提供一种新的抗 CD70 抗体。本披露所述的抗 CD70 抗体包括抗 CD70 全长抗体及其抗原结合片段。

25

在一些实施方案中，本披露提供抗 CD70 抗体，其包含重链可变区和轻链可变区，其中：

i) 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1 和 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 42 所示的 HCDR2；所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 14 所示的 LCDR1 和 LCDR3，以及如 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 43 所示的 LCDR2；

30

ii) 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 17 所示的 HCDR1 和 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 16 或 SEQ ID NO: 54 所示的 HCDR2；所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 20 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或

35

iii) 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 21 和 SEQ ID NO: 23 所示的

HCDR1 和 HCDR3, 以及如 SEQ ID NO: 22 或 SEQ ID NO: 71 所示的 HCDR2; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1 和 LCDR3, 以及如 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 43 所示的 LCDR2。

5 中, 在一些实施方案中, 本披露的抗 CD70 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中,

所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 14 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 或

10 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 42 和 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 43 和 SEQ ID NO: 14 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 或

所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 17 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 20 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 或

15 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 54 和 SEQ ID NO: 17 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 20 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 或

20 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 23 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 或者

所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 71 和 SEQ ID NO: 23 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 43 和 SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

25 在一些实施方案中, 前述的抗 CD70 抗体是鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体; 在一些实施方案中, 前述的抗 CD70 抗体是全长抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中, 所述抗原结合片段选自: Fab、F(ab')₂、F(ab)₂、Fd、Fv、dsFv、scFv, 及其双抗体。

30 在一些实施方案中, 前述的抗 CD70 抗体为人源化抗体, 所述人源化抗体包含人抗体的框架区或人抗体的框架区变体, 所述框架区变体相对于人抗体的轻链框架区和/或重链框架区分别具有至多 11 个氨基酸的回复突变。

35 在一些实施方案中, 所述抗体的重链框架区上包含选自 4M、37I、38K、48I、67A、69L、71A、73R、78A、80L 和 94T 中的一个或多个氨基酸回复突变, 和/或所述抗体的轻链框架区上包含选自 5S 和 70N 中的一个或多个氨基酸回复突变; 在一些实施方案中, 所述抗体的轻链框架区上包含选自 38R、43S、69R、70Q 和 71Y 中的一个或多个氨基酸回复突变, 和/或所述抗体的重链框架区上包含选自 2I、24T、46K、72E 和 82a N 中的一个或多个氨基酸回复突变; 在一些实施方

案中，所述抗体的重链框架区上包含选自 27D、30P、37L、38K、48I、66K、67A、69L 和 82a N 中的一个或多个氨基酸回复突变，和/或所述抗体的轻链框架区上包含 49S 氨基酸回复突变；其中，所述突变位点根据 Kabat 编号规则编号，例如，“4M”表示重链可变区第 4 位（对应于 Kabat 编号规则编号）残基为“M”。

5 在一些实施方案中，所述抗 CD70 抗体包含人抗体的重链框架区变体，其相对于人抗体的重链框架区包含选自 4M、37I、38K、48I、67A、69L、71A、73R、78A、80L 和 94T 中的一个或多个氨基酸回复突变，和/或所述抗 CD70 抗体包含人抗体的轻链框架区变体，其相对于人抗体的轻链框架区包含选自 5S 和 70N 中的一个或多个氨基酸回复突变；在一些实施方案中，所述抗 CD70 抗体包含人抗体的轻链框架区变体，其相对于人抗体的轻链框架区包含选自 38R、43S、69R、70Q 和 71Y 中的一个或多个氨基酸回复突变，和/或所述抗 CD70 抗体包含人抗体的重链框架区变体，其相对于人抗体的重链框架区包含选自 2I、24T、46K、72E 和 82a N 中的一个或多个氨基酸回复突变；在一些实施方案中，所述抗 CD70 抗体包含人抗体的重链框架区变体，其相对于人抗体的重链框架区包含选自 27D、30P、37L、38K、48I、66K、67A、69L 和 82a N 中的一个或多个氨基酸回复突变，和/或所述抗 CD70 抗体包含人抗体的轻链框架区变体，其相对于人抗体的轻链框架区包含 49S 氨基酸回复突变；其中，所述突变位点根据 Kabat 编号规则编号，例如，“4M”表示重链可变区第 4 位（对应于 Kabat 编号规则编号）残基为“M”。

20 在一些实施方案中，所述人源化抗体包含选自以下 a)、b) 或 c) 所述的轻链可变区和重链可变区：

所述人源化抗体包含：

a) 重链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1 和 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 42 所示的 HCDR2；和轻链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 14 所示的 LCDR1 和 LCDR3，以及如 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 43 所示的 LCDR2；而且所述重链可变区包含人抗体的重链框架区变体，其相对于人抗体的重链框架区包含选自 4M、37I、38K、48I、67A、69L、71A、73R、78A、80L 和 94T 中的一个或多个氨基酸回复突变，和/或所述轻链可变区包含人抗体的轻链框架区变体，其相对于人抗体的轻链框架区包含选自 5S 和 70N 中的一个或多个氨基酸回复突变；或

30 b) 重链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 17 所示的 HCDR1 和 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 16 或 SEQ ID NO: 54 所示的 HCDR2；和轻链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 20 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；而且所述轻链可变区包含人抗体的轻链框架区变体，其相对于人抗体的轻链框架区包含选自 38R、43S、69R、70Q 和 71Y 中的一个或多个氨基酸回复突变，和/或所述重链可变区包含人抗体的重链框架区变体，其相对于人抗体的重链框架区包含选自 2I、24T、46K、72E 和 82a N 中的一个或多个氨基

酸回复突变；或

c)重链可变区,其包含分别如 SEQ ID NO:21 和 SEQ ID NO: 23 所示的 HCDR1 和 HCDR3, 以及如 SEQ ID NO: 22 或 SEQ ID NO: 71 所示的 HCDR2; 和轻链可变区, 其包含分别如 SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1 和 LCDR3, 以及如 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 43 所示的 LCDR2; 而且所述重链可变区包含人抗体的重链框架区变体, 其相对于人抗体的重链框架区包含选自 27D、30P、37L、38K、48I、66K、67A、69L 和 82a N 中的一个或多个氨基酸回复突变, 和/或所述轻链可变区包含人抗体的轻链框架区变体, 其相对于人抗体的轻链框架区包含 49S 氨基酸回复突变。其中, 所述突变位点对应于 Kabat 编号规则编号。

10 在一些实施方案中, 前述的抗 CD70 抗体的重链可变区为在 SEQ ID NO: 26 或 SEQ ID NO: 34 的基础上具有选自 4M、37I、38K、48I、67A、69L、71A、73R、78A、80L 和 94T 中的一个或多个氨基酸回复突变的重链可变区, 和所述轻链可变区为在 SEQ ID NO: 32 或 SEQ ID NO: 40 的基础上具有选自 5S 和 70N 中的一个或多个氨基酸回复突变的轻链可变区; 在一些实施方案中, 前述的抗 CD70 抗体的重链可变区为在 SEQ ID NO: 44 或 SEQ ID NO: 51 的基础上具有选自 2I、24T、46K、72E 和 82a N 中的一个或多个氨基酸回复突变的重链可变区, 和所述轻链可变区为在 SEQ ID NO: 47 的基础上具有选自 38R、43S、69R、70Q 和 71Y 中的一个或多个氨基酸回复突变的轻链可变区; 在一些实施方案中, 前述的抗 CD70 抗体的重链可变区为在 SEQ ID NO: 55 或 SEQ ID NO: 63 的基础上具有选自 27D、20 30P、37L、38K、48I、66K、67A、69L 和 82a N 中的一个或多个氨基酸回复突变的重链可变区, 和所述轻链可变区为在 SEQ ID NO: 61 或 SEQ ID NO: 69 的基础上具有 49S 氨基酸回复突变的轻链可变区。其中, 所述突变位点对应于 Kabat 编号规则编号。

本领域技术人员应当理解, 前述氨基酸回复突变位点, 当采用 Kabat 以外的其他编号规则时, 在功能和/或结构上具有等同地位的氨基酸残基可能被赋予不同的编号, 但仍对应于本披露中所限定的位点。

在一些实施方案中, 前述的抗 CD70 抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

d) 所述重链可变区的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 3、26、27、28、29、30、31、34、35、36、37、38 或 39 分别具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、30 96%、97%、98%、99%或 100%的序列同一性, 和/或所述轻链可变区的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 4、32、33、40 或 41 分别具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的序列同一性;

e) 所述重链可变区的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 5、44、45、46、51、52 或 53 分别具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 35 100%的序列同一性, 和/或所述轻链可变区的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 6、47、48、49 或 50 分别具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99%或 100%的序列同一性；或

- f) 所述重链可变区的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 7、55、56、57、58、59、60、63、64、65、66、67 或 68 分别具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的序列同一性，和/或所述轻链可变区的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 8、61、62、69 或 70 分别具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的序列同一性。

在一些实施方案中，前述抗 CD70 抗体包含如下表 1、表 2 和表 3 所示的重链可变区和轻链可变区组合：

10 表 1. huB1 人源化抗体轻/重链可变区组合表

	huB1VL1-1 (SEQ ID NO: 40)	huB1VL1-2 (SEQ ID NO: 41)	huB1VL1 (SEQ ID NO: 32)	huB1VL2 (SEQ ID NO: 33)
huB1VH1 (SEQ ID NO: 26)	huB1V001	huB1V015	huB1V025	huB1V037
huB1VH2 (SEQ ID NO: 27)	huB1V002	huB1V016	huB1V026	huB1V038
huB1VH3 (SEQ ID NO: 28)	huB1V003	huB1V017	huB1V027	huB1V039
huB1VH4 (SEQ ID NO: 29)	huB1V004	huB1V018	huB1V028	huB1V040
huB1VH5 (SEQ ID NO: 30)	huB1V005	huB1V019	huB1V029	huB1V041
huB1VH6 (SEQ ID NO: 31)	huB1V006	huB1V007	huB1V030	huB1V042
huB1VH1-1 (SEQ ID NO: 34)	huB1V009	huB1V008	huB1V031	huB1V043
huB1VH2-1 (SEQ ID NO: 35)	huB1V010	huB1V020	huB1V032	huB1V044
huB1VH3-1 (SEQ ID NO: 36)	huB1V011	huB1V021	huB1V033	huB1V045
huB1VH4-1 (SEQ ID NO: 37)	huB1V012	huB1V022	huB1V034	huB1V046
huB1VH5-1 (SEQ ID NO: 38)	huB1V013	huB1V023	huB1V035	huB1V047
huB1VH6-1 (SEQ ID NO: 39)	huB1V014	huB1V024	huB1V036	huB1V048

备注：表中例如“huB1V001”表示抗体的重链可变区为与其同行的 SEQ ID NO: 26，轻链可变区为与其同列的 SEQ ID NO: 40，其它以此类推。

表 2.huB7 人源化抗体重轻链可变区组合表

	huB7VL1 (SEQ ID NO: 47)	huB7VL2 (SEQ ID NO: 48)	huB7VL3 (SEQ ID NO: 49)	huB7VL4 (SEQ ID NO: 50)
huB7VH1 (SEQ ID NO: 44)	huB7V001	huB7V007	huB7V013	huB7V019
huB7VH1-1 (SEQ ID NO: 51)	huB7V002	huB7V008	huB7V014	huB7V020
huB7VH2 (SEQ ID NO: 45)	huB7V003	huB7V009	huB7V015	huB7V021
huB7VH2-1 (SEQ ID NO: 52)	huB7V004	huB7V010	huB7V016	huB7V022
huB7VH3 (SEQ ID NO: 46)	huB7V005	huB7V011	huB7V017	huB7V023
huB7VH3-1 (SEQ ID NO: 53)	huB7V006	huB7V012	huB7V018	huB7V024

备注：表中例如“huB7V001”表示抗体的重链可变区为与其同行的 SEQ ID NO: 44，轻链可变区为与其同列的 SEQ ID NO: 47，其它以此类推。

表 3 .huF4 人源化抗体重轻链可变区组合表

	huF4VL1-1 (SEQ ID NO:69)	huF4VL2-1 (SEQ ID NO:70)	huF4VL1 (SEQ ID NO:61)	huF4VL2 (SEQ ID NO:62)
huF4VH1 (SEQ ID NO: 55)	huF4V001	huF4V014	huF4V025	huF4V037
huF4VH2 (SEQ ID NO: 56)	huF4V002	huF4V015	huF4V026	huF4V038
huF4VH3 (SEQ ID NO: 57)	huF4V003	huF4V016	huF4V027	huF4V039
huF4VH4 (SEQ ID NO: 58)	huF4V004	huF4V017	huF4V028	huF4V040
huF4VH5 (SEQ ID NO: 59)	huF4V005	huF4V018	huF4V029	huF4V041
huF4VH6 SEQ ID NO: 60	huF4V006	huF4V019	huF4V030	huF4V042
huF4VH1-1 (SEQ ID NO:63)	huF4V007	huF4V020	huF4V031	huF4V043
huF4VH2-1 (SEQ ID NO:64)	huF4V008	huF4V021	huF4V032	huF4V044
huF4VH3-1 (SEQ ID NO:65)	huF4V009	huF4V011	huF4V033	huF4V045
huF4VH4-1 (SEQ	huF4V010	huF4V022	huF4V034	huF4V046

ID NO:66)				
huF4VH5-1 (SEQ ID NO:67)	huF4V012	huF4V023	huF4V035	huF4V047
huF4VH6-1 (SEQ ID NO:68)	huF4V013	huF4V024	huF4V036	huF4V048

备注：表中例如“huF4V001”表示抗体的重链可变区为与其同行的 SEQ ID NO: 55，轻链可变区为与其同列的 SEQ ID NO: 69，其它以此类推。

在一些实施方案中，前述的抗 CD70 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：
g)所述重链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；和所述轻链可变区，

5 其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示；或

h)所述重链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26、27、28、29、30、31、34、35、36、37、38 或 39 所示；和所述轻链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 32、33、40 或 41 所示；或

i)所述重链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO:5 所示；和所述轻链可变区，
10 其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示；或

j)所述重链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 44、45、46、51、52 或 53 所示；和所述轻链可变区序列，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 47、48、49 或 50 所示；或

k)所述重链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示；和所述轻链可变区，
15 其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示；或

l)所述重链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 55、56、57、58、59、60、63、64、65、66、67 或 68 所示；和所述轻链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 61、62、69 或 70 所示。

在一些实施方案中，前述的抗 CD70 抗体包含如下所示的重链可变区和轻链可变区：
20 变区：

n)所述重链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 35 所示；和所述轻链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 40 所示；或

o)所述重链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 51 所示；和所述轻链可变区序列，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 47 所示；或

p)所述重链可变区，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 65 所示；和所述轻链可变区序列，其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 70 所示。
25

在一些实施方案中，前述的抗 CD70 抗体包含抗体重链恒定区和轻链恒定区；优选地，所述重链恒定区选自人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 恒定区及其常规变体，所述轻链恒定区选自人抗体 κ 和 λ 链恒定区及其常规变体；更优选地，所述抗体
30 包含如 SEQ ID NO: 72 所示的重链恒定区和如 SEQ ID NO: 73 所示的轻链恒定区。

在一些实施方案中，前述的抗 CD70 抗体包含：

q) 与 SEQ ID NO: 74 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列同一性的重链, 和/或与 SEQ ID NO: 75 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列同一性的轻链; 或

5 r) 与 SEQ ID NO:76 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列同一性的重链, 和/或与 SEQ ID NO: 77 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的轻链; 或

10 s) 与 SEQ ID NO:78 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%序列同一性的重链, 和/或与 SEQ ID NO: 79 具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性的轻链。

在一些实施方案中, 前述的抗 CD70 抗体包含:

t) 如 SEQ ID NO: 74 所示的重链和如 SEQ ID NO: 75 所示的轻链; 或
15 u) 如 SEQ ID NO: 76 所示的重链和如 SEQ ID NO: 77 所示的轻链; 或
v) 如 SEQ ID NO: 78 所示的重链和如 SEQ ID NO: 79 所示的轻链。

在一些实施方案中, 本披露还提供一种分离的抗 CD70 抗体, 其中所述抗体与前面任一项所述的抗 CD70 抗体竞争性结合人 CD70、人 CD70 抗原表位、猴 CD70 或猴 CD70 抗原表位。在一些实施方案中, 所述抗体与前面任一项所述的抗 CD70
20 抗体结合人 CD70 上相同表位。

在一些实施方案中, 前面任一项所述的抗 CD70 抗体, 其中所述抗 CD70 抗体为低岩藻糖基化抗体; 在一些实施方案中, 所述低岩藻糖基化的抗 CD70 抗体是至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%的抗体重链未被岩藻糖糖基化修饰的抗体。在一些实施方案中, 所述低岩藻
25 糖基化抗 CD70 抗体是至少 95%、96%、97%、98%、99%或 100%重链未被岩藻糖糖基化修饰的抗体。在一些实施方案中, 前述抗 CD70 抗体为 100%重链未被岩藻糖糖基化修饰的 IgG1 抗体 (也称非岩藻糖基化 IgG1 抗体)。

在一些实施方案中, 前面任一项所述的抗 CD70 抗体, 所述抗 CD70 抗体具有以下特征中的至少一种:

30 A. 所述抗 CD70 抗体以小于 $1 \times 10^{-8} \text{M}$, 优选小于 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 、或小于 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ 、或小于 $6 \times 10^{-11} \text{M}$ 、或小于 $5 \times 10^{-11} \text{M}$ 、或小于 $4 \times 10^{-11} \text{M}$ 、或小于 $3 \times 10^{-11} \text{M}$ 的 KD 值与人 CD70 结合, 所述 KD 值通过表面等离子共振技术所测定; 例如, 通过本披露的测试例 1 所述方法进行检测;

B. 所述抗 CD70 抗体既能与人 CD70 抗原结合, 也能与猴 CD70 抗原结合,
35 但不与小鼠 CD70 抗原结合;

C. 所述抗 CD70 抗体能抑制 CD70 诱导的 CD27 信号传导, 优选地, 所述抗

CD70 抗体抑制表达人 CD27 细胞（例如 HT1080/CD27 细胞）分泌 IL-8 的最大抑制百分比（Imax（%））大于或等于 72%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%；更优选大于或等于 90%、91%、93%或 98%，所述 IL-8 分泌通过 Elisa 方法检测，例如通过本披露测试例 5 所述方法检测；

D. 所述抗 CD70 抗体具有以下的一个或多个效应子功能：对表达人 CD70 细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)；优选地，所述抗 CD70 抗体通过 CDC 效应子功能使表达人 CD70 细胞（例如 Raji 细胞）裂解的最大裂解率大于或等于 70%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、95%、或 100%；更优选大于或等于 74%、78%、84%或 86%；在一些方案中，CDC 效应子功能通过本披露的测试例 7 所述方法进行检测；和

E、所述抗 CD70 抗体能被表达人 CD70 细胞内化，优选地，细胞内化裂解的最大裂解率大于或等于 70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%；更优选大于或等于 96%或 97%；在一些方案中，细胞内化通过本披露的测试例 10 所述方法进行检测。

在一些实施方案中，本披露还提供一种核酸分子，其编码前面任一项所述的抗 CD70 抗体。

在一些实施方案中，本披露还提供一种宿主细胞，其包含前述的核酸分子。所述宿主细胞可选自原核细胞和真核细胞，优选为真核细胞，更优选哺乳动物细胞，优选不包括人类的哺乳动物细胞，其中所述的哺乳动物细胞包括但不限于 CHO, 293, NSO 以及在哺乳动物细胞中进行基因编辑可改变抗体或其抗原结合片段的糖基化修饰，进而改变抗体或其抗原结合片段的 ADCC 功能的细胞，例如，敲除 *Fut8* 或 *GnT-III* 等基因进行糖基化修饰。

在一些实施方案中，本披露还提供一种制备前述抗 CD70 抗体的方法，所述方法包括培养前述的宿主细胞，然后纯化回收抗体的步骤。

在一些实施方案中，本披露还提供一种免疫偶联物，其包含前面任一项所述的抗 CD70 抗体和效应分子，所述效应分子偶联至所述抗 CD70 抗体；优选地，所述效应分子选自放射性同位素、抗肿瘤剂、免疫调节剂、生物反应修饰剂、凝集素、细胞毒性药物、发色团、荧光团、化学发光化合物、酶、金属离子，以及其任何组合。

在一些实施方案中，本披露还提供一种药物组合物，其含有治疗有效量的前面任一项所述的抗 CD70 抗体，或前述的核酸分子，或前述的免疫偶联物，以及一种或更多种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

在一些实施方案中，本披露还提供一种用于免疫检测或测定 CD70 的方法，所

述方法包括使前面任一项所述的抗 CD70 抗体接触受试者或来自受试者的样品的步骤。

在一些实施方案中，本披露还提供一种试剂盒，其包含前面任一项所述的抗 CD70 抗体或免疫偶联物。

- 5 在一些实施方案中，本披露还提供一种预防或治疗疾病或病症的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的前面任一项所述的抗 CD70 抗体，或前述的核酸分子，或前所述的药物组合物，或前述的免疫偶联物。

10 在一些实施方案中，本披露还提供前面任一项所述的抗 CD70 抗体，或前述的核酸分子，或前所述的药物组合物，或前述的免疫偶联物在制备用于预防或治疗疾病或病症的药物中的用途。

在一些实施方案中，本披露提供作为药物的前面任一项所述的抗 CD70 抗体，或前述的核酸分子，或前所述的药物组合物，或前述的免疫偶联物，所述药物用于预防或治疗疾病或病症。

- 15 在一些实施方案中，前面任一项所述的疾病或病症是 CD70 相关的疾病或病症。在一些实施方案中，所述疾病或病症为 CD70 高表达对受试者是有害的疾病或病症。在一些实施方案中，所述疾病或病症为肿瘤、自身免疫性疾病或感染性疾病。在一些实施方案中，其中所述肿瘤选自：头和颈鳞状细胞癌、头和颈癌、脑癌、神经胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、神经母细胞瘤、中枢神经系统癌、神经内分泌肿瘤、咽喉癌、鼻咽癌、食管癌、甲状腺癌、恶性胸膜间皮瘤、肺癌、乳腺癌、肝癌、肝胆癌、胰腺癌、胃癌、胃肠道癌、肠癌、结肠癌、结肠直肠癌、肾癌、透明细胞肾细胞癌、卵巢癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌、皮肤癌、黑色素瘤、白血病、淋巴瘤、骨癌、软骨肉瘤、骨髓瘤、多发性骨髓瘤、骨髓异常增生综合征、库肯勃氏瘤、骨髓增生性肿瘤、鳞状细胞癌、尤因氏肉瘤、全身性轻链淀粉样变性和梅克尔细胞癌；在另一些实施方案中，所述淋巴瘤选自：何杰金淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、弥漫性大 B-细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、原发性纵隔大 B-细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、小淋巴细胞性淋巴瘤、富含 T-细胞/组织细胞的大 B-细胞淋巴瘤和淋巴浆细胞性淋巴瘤，所述肺癌选自：非小细胞肺癌和小细胞肺癌，所述白血病选自：慢性髓细胞样白血病、急性髓细胞性白血病、淋巴细胞白血病、成淋巴细胞性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病和髓样细胞白血病。在一些实施方案中，所述自身免疫性疾病选自类风湿性关节炎、牛皮癣、关节银屑病、银屑病、皮炎、系统性硬皮病、系统性硬皮病及硬化症、炎症性肠病(IBD)、Crohn 病、溃疡性结肠炎、呼吸窘迫综合征、脑膜炎、脑炎、葡萄膜炎、肾小球肾炎、湿疹、哮喘、动脉硬化、白细胞粘附缺陷病、多发性硬化症、Raynaud 症候群、Sjogren 症候群、青少年糖尿病、Reiter 病、Behcet 病、免疫复合物性肾炎、IgA 肾病、IgM 多发性神经病、免疫介导的血小板减少症状（如急性特发性血小板减少性紫癜、慢性特发性血小板减少

性紫癜)、溶血性贫血、重症肌无力、狼疮性肾炎、系统性红斑狼疮、风湿关节炎(RA)、异位性皮炎、天疱疮、Graves 病、桥本甲状腺炎、Wegener 肉芽肿、Omenn 症候群、慢性肾功能衰竭、急性传染性单核细胞增多征、多发性硬化症、HIV 和疱疹病毒相关的疾病、严重急性呼吸综合征和脉络视网膜炎(choreoretinitis)、以及

5 病毒感染引起的免疫性疾病(如伊波病毒(EBV)感染 B 细胞引起或介导的疾病)。在一些实施方式中,疾病或病症为:急性髓细胞性白血病、骨髓增生异常综合症、鼻咽癌、非霍奇金淋巴瘤、肾细胞癌、转移性肾细胞癌、类风湿性关节炎和银屑病。

10 在一些实施方案中,前述治疗有效量为单位剂量的组合物中含有 0.1-3000mg 的前述的抗 CD70 抗体、或前述的核酸分子、或前述的免疫偶联物、或前所述的药物组合物。在一些实施方案中,所述治疗进一步包括向受试者施用治疗有效量的第二治疗剂。

附图说明

15 图 1A 和图 1B 显示抗 CD70 抗体结合 CD70 阳性 786-O 细胞的实验结果;其中,图 1A 为抗 CD70 抗体结合 CD70 阳性 786-O 细胞的实验结果图,图 1B 为非岩藻糖基化抗 CD70 抗体结合 CD70 阳性 786-O 细胞实验结果图。

图 2A 和图 2B 显示抗 CD70 抗体结合 CD70 阳性 Raji 细胞的实验结果,其中图 2A 为抗 CD70 抗体结合 CD70 阳性 Raji 细胞的实验结果图,图 2B 为非岩藻糖

20 基化抗 CD70 抗体结合 CD70 阳性 Raji 细胞的实验结果图。

图 3 显示 huB7002 结合人、猴和小鼠 CD70 蛋白的 ELISA 实验结果。

图 4 显示 huB1010 结合人、猴和小鼠 CD70 蛋白的 ELISA 实验结果。

图 5 显示 huF4011 结合人、猴和小鼠 CD70 蛋白的 ELISA 实验结果。

图 6 显示抗 CD70 抗体阻断 CD27 结合 CD70 阳性细胞的实验结果。

25 图 7 显示非岩藻糖基化抗 CD70 抗体阻断 CD27 结合 CD70 阳性细胞的实验结果。

图 8 显示抗 CD70 抗体对 HT1080/CD27 细胞 IL-8 分泌的抑制实验结果。

图 9 显示非岩藻糖基化抗 CD70 抗体对 HT1080/CD27 细胞 IL-8 分泌的抑制实验结果。

30 图 10 显示抗 CD70 抗体对 786-O 细胞体外 ADCC (NK92) 的实验结果。

图 11 显示抗 CD70 抗体对 786-O 细胞体外 ADCC (PBMC) 的实验结果。

图 12 显示抗 CD70 抗体对 Raji 细胞体外 CDC 的实验结果。

图 13 显示非岩藻糖基化抗 CD70 抗体对 Raji 细胞体外 CDC 的实验结果。

图 14A 和图 14B 显示抗 CD70 抗体对 786-O 和 Raji 细胞的体外 ADCP 的实验结果,其中,图 14A 为抗 CD70 抗体对 786-O 细胞的 ADCP 实验结果图,图 14B

35 为抗 CD70 抗体对 Raji 细胞的 ADCP 实验结果图。

图 15 显示抗 CD70 抗体对 Treg 细胞体外的抑制实验结果。

图 16 显示 786-O 细胞对抗 CD70 抗体的内化实验结果。

图 17 显示抗 CD70 抗体在小鼠 Raji 模型的体内药效实验结果。

图 18 显示非岩藻糖基化的抗 CD70 抗体在小鼠 Raji 模型的体内药效实验结果。

5

发明详述

术语（定义）

为了更容易理解本披露，以下具体定义了某些技术和科学术语。除非在本文中另有明确定义，本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本披露所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

10

本披露所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J.biol.chem, 243, p3558(1968) 中所述。

15

本披露的术语“抗体”以最广义使用，其涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体，多克隆抗体，多特异性抗体（例如双特异性抗体），全长抗体或其抗原结合片段（也称“抗原结合部分”），只要它们展现出期望的抗原结合活性。天然全长抗体是包含由二硫键互相连接的至少两条重链和两条轻链的免疫球蛋白（Ig）。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，故其抗原性也不同。据此，可将免疫球蛋白分为五类，或称为免疫球蛋白的同种型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链、和 ϵ 链。同一类 Ig 根据其较链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别，又可分为不同的亚类，如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。

20

抗体重链和轻链靠近 N 端的约 110 个氨基酸的序列变化很大，为可变区（缩写为 Fv 区）；靠近 C 端的其余氨基酸序列相对稳定，为恒定区。每条重链由重链可变区（缩写为 VH）和重链恒定区（缩写为 CH）组成。重链恒定区包含 CH1、CH2 和 CH3 三个结构域。每条轻链由轻链可变区（缩写为 VL）和轻链恒定区（缩写为 CL）组成。重链可变区和轻链可变区包括高变区（也称为互补性决定区，缩写为 CDR 或 HVR）和序列相对保守的骨架区（也称框架区，缩写为 FR）。每个 VL 和 VH 由从氨基末端排到羧基末端按以下顺序排列的 3 个 CDR 4 个 FR 组成：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。轻链的 3 个 CDR 区指 LCDR1、LCDR2、和 LCDR3；重链的 3 个 CDR 区指 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

25

30

本披露的抗体包括鼠源抗体、嵌合抗体和人源化抗体。

35

术语“鼠源抗体”在本披露中为根据本领域知识和技能制备的针对抗原（例如人 CD70）的鼠源性单克隆抗体。例如，用 CD70 抗原注射试验对象，然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交瘤。在本披露的一个优选的实施方案中，所述的鼠源抗 CD70 抗体或其抗原结合片段，可进一步包含鼠源 κ 、 λ 链或其变体

的轻链恒定区，或进一步包含鼠源 IgG1、IgG2、IgG3 或其变体的重链恒定区。

术语“嵌合抗体 (chimeric antibody)”，是将鼠源性抗体的可变区与人抗体的恒定区融合而成的抗体，可以减轻鼠源性抗体诱发的免疫应答反应。通常，建立嵌合抗体，要先建立分泌鼠源性特异性单抗的杂交瘤，然后从鼠杂交瘤细胞中克隆可变区基因，再根据需要克隆人抗体的恒定区基因，将鼠可变区基因与人恒定区基因连接成嵌合基因后插入表达载体中，最后在真核系统或原核系统中表达嵌合抗体分子。在本披露一个优选的实施方案中，所述嵌合抗体的抗体轻链进一步包含人源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区。所述的 CD70 嵌合抗体的抗体重链进一步包含人源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其变体的重链恒定区，优选包含人源 IgG1、IgG2 或 IgG4 重链恒定区，或者使用氨基酸突变(例如 L234A 和/或 L235A 突变，和/或 S228P 突变，265A 和/或 297A)的 IgG1、IgG2 或 IgG4 变体。

术语“人源化抗体 (humanized antibody)”，也称为 CDR 移植抗体 (CDR-grafted antibody)，是指将鼠的 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架，即不同类型的人种系抗体框架序列中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量鼠蛋白成分，从而诱导的异源性反应。此类构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库或公开的参考文献获得。如人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在“VBase”人种系序列数据库获得，以及在 Kabat, E.A.等人，1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版中找到。为避免抗体免疫原性下降的同时，引起活性下降，可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少反向突变或回复突变，以保持或增强活性。本披露的人源化抗体也包括进一步由酵母菌展示对 CDR 进行亲和力成熟突变后的人源化抗体。

在本披露一个的实施方案中，所述的抗体或其抗原结合片段，可进一步包含人源或鼠源 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区，或进一步包含人源或鼠源 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其变体的重链恒定区；可以包含人源 IgG1、IgG2 或 IgG4 重链恒定区，或者使用氨基酸突变(例如 L234A 和/或 L235A 突变、和/或 S228P 突变，265A 和/或 297A)的 IgG1、IgG2 或 IgG4 变体。

本披露中所述人抗体重链恒定区和人抗体轻链恒定区的“常规变体”是指现有技术已公开的来源于人的不改变抗体可变区结构和功能的重链恒定区或轻链恒定区的变体，示例性变体包括对重链恒定区进行定点改造和氨基酸替换的 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 重链恒定区变体，具体替换如现有技术已知的 YTE 突变，L234A 和/或 L235A 突变，S228P 突变，265A(例如 D265A)和/或 297A(例如 N297A)，和/或获得 knob-into-hole 结构的突变(使得抗体重链具有 knob-Fc 和 hole-Fc 组合)，这些突变已被证实使得抗体具有新的性能，但不改变抗体可变区的功能。

“人抗体”(HuMAb)、“人源抗体”、“全人抗体”、“完全人抗体”可以互换使用，可以是源于人的抗体或者是从一种转基因生物体中获得的抗体，该转基因生物体经“改造”以响应于抗原刺激而产生特异性人抗体并且可以通过本领域已知的任何

方法产生。在某些技术中，将人重链和轻链基因座的元素元件引入到源于胚胎干细胞系的生物体的细胞株中，这些细胞系中的内源性重链和轻链基因座被靶向破坏。转基因生物可以合成对人抗原特异的人抗体，并且该生物可以用于产生人抗体-分泌杂交瘤。人抗体还可以是一种抗体，其中重链和轻链是由源于一个或更多个人 DNA 来源的核苷酸序列编码的。完全人抗体还可以通过基因或染色体转染方法以及噬菌体展示技术来构建，或者由体外活化的 B 细胞构建，所有的这些都是本领域已知的。

术语“全长抗体”、“完整抗体”、“完全抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用，指基本上完整形式的抗体，与下文定义的抗原结合片段相区分。该术语特别指轻链和重链包含恒定区的抗体。

本披露的“抗体”包含“全长抗体”及其“抗原结合片段”。

在一些实施方案中，本披露的全长抗体包括由前述表 1、表 2 和表 3 中轻、重链可变区组合分别与轻、重链恒定区连接后所形成的全长抗体。本领域技术人员可以根据实际需要选择不同的抗体来源的轻链恒定区、重链恒定区，例如人抗体来源的轻链恒定区和重链恒定区。同时，表 1、表 2 和表 3 中不同轻链可变区和重链可变区组合可以形成单链抗体 (scFv)、Fab 或其他包含 scFv 或 Fab 的抗原结合片段形式。

术语“抗原结合片段”或“功能片段”或“抗原结合部分”是指保持特异性结合抗原(例如，CD70) 的能力的完整抗体的一个或更多个片段。已显示可利用全长抗体的片段来进行抗体的抗原结合功能。示例性的，涵盖在术语“抗原结合片段”的结合片段的实例包括：(i) Fab 片段，一种由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段；(ii) F(ab')₂ 片段，一种包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段，(iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；(iv) 由抗体的单臂的 VH 和 VL 结构域组成的 Fv 片段；(v) dsFv，由 VH 和 VL 经链间二硫键形成的稳定的抗原结合片段；(vi) 包含 scFv、dsFv、Fab 等片段的双抗体、双特异性抗体和多特异性抗体。此外，虽然 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由分开的基因编码，但可使用重组方法将这两个结构域通过能够使它们形成为单条蛋白质链的人工肽接头来接合，其中 VL 和 VH 配对形成单价分子，称为单链 Fv(scFv) (参见，例如，Bird 等人(1988)Science242 :423-426 ; 和Huston 等人(1988)Proc.Natl.Acad.Sci USA85:5879-5883))。此类单链抗体也包括在术语抗体的“抗原结合片段”中。使用本领域技术人员已知的常规技术获得此类抗体片段，并且以与对于完整抗体的方式相同的方式就功用性筛选片段。可通过重组 DNA 技术或通过酶促或化学断裂完整免疫球蛋白来产生抗原结合部分。抗体可以是不同同种型的抗体，例如，IgG(例如，IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 亚型)，IgA1, IgA2, IgD, IgE 或 IgM 抗体。

术语“氨基酸差异”或“氨基酸突变”是指相较于原蛋白质或多肽，变体蛋白质或

多肽存在氨基酸的改变或突变，包括在原蛋白质或多肽的序列上发生 1 个、2 个、3 个或更多个氨基酸的插入、缺失或替换。

术语“抗体框架”或“FR 区”，是指可变结构域 VL 或 VH 的一部分，其用作该可变结构域的抗原结合环(CDR)的支架。从本质上讲，其是不具有 CDR 的可变结构域。

术语“互补决定区”、“CDR”或“高变区”是指抗体的可变结构域内主要促成抗原结合的 6 个高变区之一。通常，每个重链可变区中存在三个 CDR (HCDR1、HCDR2、HCDR3)，每个轻链可变区中存在三个 CDR(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。可以使用各种公知方案中的任何一种来确定 CDR 的氨基酸序列边界，包括“Kabat”编号规则(参见 Kabat 等(1991)，“Sequences of Proteins of Immunological Interest”，第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)、“Chothia”编号规则(参见 Al-Lazikani 等人，(1997)JMB 273 : 927-948)和 ImMunoGenTics(IMGt)编号规则(Lefranc M.P., Immunologist, 7, 132-136(1999); Lefranc, M.P.等, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77(2003)等。例如，对于经典格式，遵循 Kabat 规则，所述重链可变域(VH)中的 CDR 氨基酸残基编号为 31-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和 95-102(HCDR3)；轻链可变域(VL)中的 CDR 氨基酸残基编号为 24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和 89-97(LCDR3)。遵循 Chothia 规则，VH 中的 CDR 氨基酸编号为 26-32(HCDR1)、52-56(HCDR2)和 95-102(HCDR3)；并且 VL 中的氨基酸残基编号为 26-32(LCDR1)、50-52(LCDR2)和 91-96(LCDR3)。通过组合 Kabat 和 Chothia 两者的 CDR 定义，CDR 由人 VH 中的氨基酸残基 26-35(HCDR1)、50-65(HCDR2)和 95-102(HCDR3)和人 VL 中的氨基酸残基 24-34(LCDR1)、50-56(LCDR2)和 89-97(LCDR3)构成。遵循 IMGt 规则，VH 中的 CDR 氨基酸残基编号大致为 26-35(CDR1)、51-57(CDR2)和 93-102(CDR3)，VL 中的 CDR 氨基酸残基编号大致为 27-32(CDR1)、50-52(CDR2)和 89-97(CDR3)。遵循 IMGt 规则，抗体的 CDR 区可以使用程序 IMGt/DomainGap Align 确定。遵循 AbM 规则，VH 中的 CDR 氨基酸编号为 26-32 (HCDR1)、50-58 (HCDR2)和 95-102 (HCDR3)；并且 VL 中的氨基酸残基编号为 24-34 (LCDR1)、50-56 (LCDR2)和 89-97 (LCDR3)。除非另有说明，本披露的抗体可变区和 CDR 序列均对应于“Kabat”编号规则。

术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上抗体特异性结合的部位(例如，CD70 分子上的特定部位)。表位通常以独特的空间构象包括至少 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 或 15 个连续或非连续的氨基酸。参见，例如，Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, 第 66 卷，G.E.Morris, Ed.(1996)。

术语“特异性结合”、“选择性结合”、“选择性地结合”和“特异性地结合”是指抗体对预先确定的抗原上的表位的结合。通常，抗体以大约小于 10^{-8} M，例如大约小于 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M 或更小的亲和力(KD) 结合。

术语“KD”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。通常，本披露的抗体以小于大约 10^{-8}M ，例如小于大约 10^{-9}M 或 10^{-10}M 的解离平衡常数(KD) 结合 CD70，所述 KD 值使用表面等离子体共振(SPR) 技术在 Biacore T200 仪器中测定。

当术语“竞争”用于竞争相同表位的抗原结合蛋白(例如中和抗原结合蛋白或中和抗体)的情况中时，意指在抗原结合蛋白之间竞争，其通过以下测定法来测定：在所述测定法中，待检测的抗原结合蛋白（例如抗体或其免疫学功能片段）防止或抑制（例如降低）参考抗原结合蛋白（例如配体或参考抗体）与共同抗原（例如 CD70 抗原或其片段）的特异性结合。众多类型的竞争性结合测定可用于确定一种抗原结合蛋白是否与另一种竞争，这些测定例如：固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定(参见例如 Stahli 等, 1983, *Methods in Enzymology* 9: 242-253); 固相直接生物素-亲和素 EIA(参见例如 Kirkland 等, 1986, *J. Immunol.* 137: 3614-3619)、固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定(参见例如 Harlow 和 Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*(抗体, 实验室手册), Cold Spring Harbor Press); 用 I-125 标记物的固相直接标记 RIA(参见例如 Morel 等, 1988, *Molec. Immunol.* 25: 7-15); 固相直接生物素-亲和素 EIA(参见例如 Cheung, 等, 1990, *Virology* 176: 546-552); 和直接标记的 RIA(Moldenhauer 等, 1990, *Scand. J. Immunol.* 32: 77-82)。通常所述测定法涉及使用结合荷有未标记的检测抗原结合蛋白及标记的参考抗原结合蛋白任一种的固态表面或细胞的纯化的抗原。通过测量在所测抗原结合蛋白存在下结合固态表面或细胞的标记的量来测量竞争性抑制。通常所测抗原结合蛋白过量存在。由竞争性测定(竞争抗原结合蛋白)鉴定的抗原结合蛋白包括：结合与参考抗原结合蛋白同一表位的抗原结合蛋白；和结合充分接近参考抗原结合蛋白的结合表位的邻近表位的抗原结合蛋白，所述两个表位在空间上互相妨碍发生结合。在本文实施例中提供关于用于测定竞争性结合的方法的其它详细资料。通常当竞争的抗原结合蛋白过量存在时，其将抑制(例如降低)至少 40-45%、45-50%、50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75% 或 75% 或更多参考抗原结合蛋白与共同抗原的特异性结合。在某些情况下，结合被抑制至少 80-85%、85-90%、90-95%、95-97% 或 97% 或更多。

本文中使用的术语“核酸分子”是指 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是单链或双链的，优选是双链 DNA 或单链 mRNA 或修饰的 mRNA。当将核酸与另一个核酸序列置于功能关系中时，核酸是“有效连接的”。例如，如果启动子或增强子影响编码序列的转录，那么启动子或增强子有效地连接至所述编码序列。

氨基酸序列“同一性”指在比对氨基酸序列（必要时引入间隙，以达成最大序列同一性百分比，且不将任何保守性取代视为序列同一性的一部分），第一序列中与第二序列中的氨基酸残基同一的氨基酸残基的百分比。为测定氨基酸序列同一性百分比的目的，比对可以通过本领域已知的多种方式来实现，例如使用诸如 BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2 或 Megalign(DNASTAR)等软件。本领域

技术人员可确定适用于测量比对的参数，包括在所比较的序列全长上达成最大比对所需的任何算法。

术语“岩藻糖基化”或“岩藻糖基化的”或“岩藻糖糖基化修饰”指附着于抗体的肽链的寡糖内存在岩藻糖残基。岩藻糖基化是糖蛋白翻译后修饰的一个普遍过程，与核心岩藻糖基化相关的代表性酶基因有 *GMD* (GDP-甘露糖 4,6-脱水酶) 基因和 *Fut8* (*fut8*, *FUT8*, α -1,6-岩藻糖基转移酶) 基因，通过抑制这两个基因的表达或者构建 *Fut8* 敲除型 CHO 宿主细胞可有效调节核心岩藻糖基化水平 (YAMANE-OHNUKI et al., “Establishment of FUT8knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity.”, BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, 2004, p614~622)。通常，岩藻糖基化抗体在 Fc 区的 N-寡糖中，在核心 N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)残基处 (例如人 IgG1 Fc 的 Asn297 位置(对应于 EU 编号规则)) 包含 α -1,6-岩藻糖。

“低岩藻糖基化”的抗体是指附着于 Fc 区的碳水化合物结构具有低的岩藻糖的糖基化修饰的抗体；“非岩藻糖基化”或“无岩藻糖基化”是指附着于 Fc 区的碳水化合物结构缺乏岩藻糖的糖基化修饰的抗体。抗体岩藻糖基化水平可通过本领域已知方法测定所有寡糖，进而确定岩藻糖基化寡糖的百分比。本领域已知的测定岩藻糖基化方法包括但不限于凝胶电泳、液相色谱法、和质谱分析法等。例如，通过亲水性相互作用色谱法 (或亲水性相互作用液相色谱法, HILIC) 测定抗体的岩藻糖基化的水平，例如用肽-N-聚糖酶 F 对样品进行处理变性以切割 N-连接的聚糖，然后分析 N-连接的聚糖的岩藻糖含量。本披露中，在一些实施方案中，本披露的低岩藻糖基化抗体是至少 80% 的重链未被岩藻糖的糖基化修饰的抗体，例如至少 80-95%、90-95%、95-100%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 抗体重链未被岩藻糖糖基化修饰。本披露中，除非另有说明，否则“非岩藻糖基化”是指 100% 重链未被岩藻糖糖基化修饰的抗体。

低岩藻糖基化或非岩藻糖基化抗体可通过本领域公知方法制备。例如通过添加、移动或缺失抗体上存在的一个或多个碳水化合物部分，例如使用岩藻糖苷酶切割抗体的岩藻糖残基 (参见 Tarentino 等 (1975) Biochem. 14:5516) 来制备。具有减少的岩藻糖基化的抗体还可通过改变糖基化的组成来改变糖基化水平，例如通过修饰在 N297 残基处与每个 Fc 片段附接的聚糖模块来制备 (Natsume 等 (2009) Drug Des. Devel. Ther. 3:7)。也可以在不改变抗体序列的情况下，例如，可以通过改变抗体糖基化模式的细胞表达低岩藻糖基化或非岩藻糖基化抗体，包括例如经遗传工程改变的糖基化工程的细胞来制备 (参见例如，Hse 等, (1997) J. Biol. Chem. 272:9062-9070; Yang 等, (2015) Nature Biotechnology 33, 842-844)。各种糖基化工程的细胞已经在本领域中公开，例如，缺乏岩藻糖转移酶基因 (*FUT8*, (α -(1,6)岩藻糖转移酶) 细胞系 Ms704、Ms705 和 Ms709 等 (参见 Yamane-Ohnuki

等 (2004) *Biotechnol. Bioeng.* 87:614; 美国专利 20040110704), 具有使岩藻糖衔接至 Asn(297)连接的糖类的能力降低 CHO 细胞系 Lec13(参见 WO 03/035835), 具有很小或没有添加岩藻糖至 N-乙酰葡萄糖胺(其结合抗体的 Fc 区)的活性的大鼠骨髓瘤细胞系 YB2/0(参见 EP 1176195); 用于生产具有经修饰的糖基化模式的抗体的植物细胞(参见美国专利 US20120276086)。另外, 携带编码使用 GDP-6-脱氧-D-来苏-4-己糖作为底物的酶(诸如 GDP-6-脱氧-D-来苏-4-己糖还原酶(RMD))的重组基因细胞也可生产低岩藻糖基化或非岩藻糖基化抗体(参见美国专利 US8642292)。本披露的一些具体实施方案中, 通过例如实施例 5 所述方法制备获得非岩藻糖基化抗体。

“抗体依赖性的细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”指的是细胞介导的反应, 其中表达 FcR 的非特异性细胞毒性细胞(例如天然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞、和巨噬细胞)识别靶细胞上结合的抗体, 并且随后引起靶细胞的裂解。调节 ADCC 的原代细胞、NK 细胞仅表达 FcγRIII, 而单核细胞表达 FcγRI、FcγRII 和 FCγRIII。为了评估目的分子的 ADCC 活性, 可进行体内外 ADCC 测定(诸如 Clynes 等人 (PNASUSA 95:652-656(1998))、美国专利号 US5500362、US5821337 等所述)。本披露中, 在一些实施例中, 所述 ADCC 通过本披露的测试例 6 方法进行检测。

“抗体依赖性细胞吞噬作用”或“ADCP”指通过吞噬细胞(例如, 巨噬细胞、嗜中性粒细胞和树突细胞)内化来消除经抗体包被的靶细胞或病毒体的机制。内化的抗体包被的靶细胞或病毒体被包含在称为吞噬体的囊泡中, 所述囊泡随后与一个或多个溶酶体融合, 以形成吞噬溶酶体。ADCP 可以通过使用巨噬细胞作为效应细胞的体外细胞毒性测定和电视显微术(videomicroscopy)来评价(如 van Bij 等于 *Journal of Hepatology* 第 53 卷, 第 4 期, 2010 年 10 月, 第 677-685)。本披露中, 在一些实施例中, 所述 ADCP 通过本披露的测试例 8 方法进行检测。

“补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指补体参与的细胞毒作用, 即通过抗体与细胞或病毒体上的相应抗原结合, 形成复合物而激活补体经典途径, 所形成的攻膜复合物对靶细胞发挥裂解效应。CDC 可以通过体外测定(如使用正常人血清作为补体源测定 CDC)或在 C1q 浓度系列中评价。CDC 活性的降低(例如由于在多肽或抗体中引入第二突变而导致的 CDC 活性的降低)可以通过在相同的测定法内比较多肽或抗体的 CDC 活性与其不具有第二突变的亲本多肽或抗体的 CDC 活性来测量。为了评估抗体诱导 CDC 的能力, 可通过如 Romeuf 等人所述的测定方法(Romeuf 等人, *Br J Haematol.* 2008Mar; 140(6):635-43)进行测定。本披露中, 在一些实施例中, 所述 CDC 通过本披露的测试例 7 方法进行检测。

术语“缀合物”、“药物偶联物”、“免疫偶联物”指配体通过稳定的连接单元与具有生物活性的药物相连而成的新型药物。例如, “抗体药物偶联物”(antibody drug conjugate, ADC), 其是将单克隆抗体或者抗体片段通过稳定的连接单元与具有生物活性的毒性药物相连。抗体可直接地或经接头地偶联至药物。每个抗体的平

均药物模块数，其范围可以是例如每个抗体约 0 到约 20 个药物模块，在一些实施方案中是每个抗体 1 个到约 10 个药物模块，在某些实施方案中是每个抗体 1 个到约 8 个药物模块。本披露的抗体-药物偶联物的混合物的组合物，其中每个抗体的平均药物载荷是约 2 个至约 5 个或约 3 个至约 4 个。

5 在一些实施方案中，提供了免疫偶联物。在一些实施方案中，本文所公开的免疫偶联物可以是附接至效应分子的抗体，其中抗体可以是包含重链和轻链的抗体。在一些实施方案中，抗体可以是抗体片段，诸如 Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二聚体、微型抗体、双功能抗体、双特异性抗体片段、多聚体，以及其任何组合。

10 在本文所描述的实施方案中，效应分子可以是放射性同位素、抗肿瘤剂、免疫调节剂、生物反应修饰剂、凝集素、细胞毒性药物、发色团、荧光团、化学发光化合物、酶、金属离子，以及其任何组合。

本披露所描述的抗体或抗体片段可以通过任何方式偶联至效应分子。举例来说，抗体或抗体片段可以通过化学或重组方式附接至毒素。制备融合物或偶联物的化学方式在本领域中是已知的并且可以用于制备免疫偶联物。用于偶联抗体或
15 抗体片段和毒素的方法必须能够连接抗体与毒素而不会干扰抗体或抗体片段结合至靶分子的能力。

术语“细胞毒性药物”是指抑制或防止细胞的功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。包括毒素、化疗药物等能用于肿瘤细胞杀伤的化合物。

20 术语“毒素”是指能够对细胞的生长或增殖产生有害效果的任何物质，可以是来自细菌、真菌、植物或动物的小分子毒素及其衍生物，包括喜树碱类衍生物如伊沙替康，美登木素生物碱及其衍生物(CN101573384)如 DM1、DM3、DM4，auristatin F (AF)及其衍生物，如 MMAF、MMAE、3024 (WO 2016/127790 A1，化合物 7)，白喉毒素、外毒素、蓖麻毒蛋白(ricin)A 链、相思豆毒蛋白(abrin)A 链、modeccin、
25 α-帚曲霉素(sarcin)、油桐 (Aleutites fordii) 毒蛋白、香石竹 (dianthin) 毒蛋白、美洲商陆 (Phytolaca americana) 毒蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜 (Momordica charantia) 抑制物、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(croton)、肥皂草(saponaire officinalis) 抑制物、白树毒蛋白(gelonin)、丝林霉素(mitogellin) 局限曲霉素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(enomycin) 和单端孢菌素
30 (trichothecenes)。

术语“化疗药物”是可用于治疗肿瘤的化学化合物。该定义还包括起调节、降低、阻断或抑制可促进癌生长的激素效果作用的抗激素剂，且常常是系统或全身治疗的形式。它们自身可以是激素。化疗药物实例包括烷化剂，如噻替哌(thiotepa);环磷酰胺(cyclophosphamide)(CYTOXAN™);烷基磺酸脂如白消安(busulfan)，英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶(aziridine)如苯并多巴(benaodopa)，卡波醌(carboquone)，美妥替哌(meturedopa) 和尿烷亚胺(uredopa);氮丙啶和
35

methyamelamine 包括六甲蜜胺(altretamine), 三亚胺嗪(triethylenemelamine), 三亚乙基磷酰胺, 三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺(trimethylolomelamine); 氮芥(nitrogen mustards)如苯丁酸氮芥, 萘氮芥, 胆磷酰胺(cholophosphamide), 雌氮芥(estramustine), 异环磷酰胺(ifosfamide), 氮芥(mechlorethamine), 盐酸氧氮芥; 左旋苯丙氨酸氮芥(melphalan), 新氮芥(novembichin), 胆甾醇苯乙酸氮芥, 松龙苯芥(prednimustine), 曲磷胺(trofosfamide), 尿嘧啶氮芥; 亚硝基脲(nitrosureas)如亚硝基脲氮芥(carmustine), 氯脲菌素(chlorozotocin), 福莫司汀(fotemustine), 洛莫司汀(lomustine), 尼莫司汀(nimustine), 雷莫司汀(ranimustine); 抗生素如阿克拉霉素, 放线菌素, authramycin, 重氮丝氨酸, 博来霉素, 放线菌素 C(cactinomycin), 加利车霉素(calicheamicin), carabycin, 洋红霉素(chromomycin), 嗜癌素(carzinophilin), 色霉素, 放线菌素 D, 柔红菌素(daunorubicin), 地托比星(detorubicin), 6-重氮-5-氧-L-正亮氨酸, 阿霉素(doxorubicin), 表阿霉素(epirubicin), 依索比星(esorubicin), 伊达比星(idarubicin), 发波霉素(marcellomycin), 丝裂霉素, 霉酚酸, 诺加霉素(nogalamycin), 橄榄霉素(olivomycin), 培洛霉素(peplomycin), potfiromycin, 嘌呤霉素, 三铁阿霉素(quelamycin), 罗多比星(rodorubicin), 链黑菌素; 链脲霉素(streptozocin), 杀结核菌素, 乌苯美司(ubenimex), 净司他丁(zinostatin), 佐柔比星(zorubicin); 抗代谢药如氨甲蝶呤, 5-氟尿嘧啶(5-FU); 叶酸类似物如二甲叶酸(denopterin), 氨甲蝶呤, 蝶罗呤, 三甲曲沙(trimetrexate); 嘌呤类似物氟达拉滨(fludarabine), 6-巯基蝶呤, 硫咪蝶呤, 硫鸟蝶呤; 嘧啶类似物如安西他滨(ancitabine), 阿扎胞苷(azacitidine), 6-氮尿苷, 卡莫氟(carmofur), 阿糖胞苷, 双脱氧尿苷, 去氟氧尿苷(doxitluridine), 依诺他滨(enocitabine), 氟尿苷, 5-FU; 雄激素类如二甲睾酮(calusterone), 丙酸甲雄烷酮(dromostanolong propionate), 环硫雄醇(epitiostanol), 美雄氨(mepitiothane), 睾内酯(testolactone); 抗肾上腺类如氨鲁米特(aminoglutethimide), 米托坦(mitotane), 曲洛司坦(trilostane); 叶酸补充剂如 frolinic acid; 醋葡内脂; 醛磷酰胺糖苷(aldophosphamideglycoside); 氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid); 安吡啶(amsacrine); bestabucil; 比生群(biasntrene); 依达曲沙(edatraxate); defofamine; 秋水仙胺; 地吡醌(diaziquone); elfomithine; 依利醋铵(elliptinium acetate); 依托格鲁(etoglucid); 硝酸镓; 羟基脲; 香菇多糖(lentinan); 氯尼达明(lonidamine); 米托胍脲(mitoguazone); 米托蒽醌(mitoxantrone); 莫哌达醇(mopidamol); 硝呋旦(nitracrine); 喷司他丁(pintostatin); phenamet; 吡柔比星(pirarubicin); 鬼臼树酸(podophyllinic acid); 2-乙酰肼; 丙卡巴肼(procarbazine); PSK®; 雷佐生(razoxane); 西索菲兰(sizofiran); 锗螺胺(spirogermanium); 细交链孢菌酮酸; 三亚胺脒; 2, 2', 2''-三氯二乙胺(trichlorotriethylamine); 乌拉坦(urethan); 长春碱酰胺; 达卡巴嗪(dacarbazine); 甘露醇氮芥; 二溴甘露醇(mitobronitol); 二溴卫矛醇; 哌溴烷坑(pipobroman); gacytosine; 阿拉伯糖苷("Ara-C"); 环磷酰胺; 三胺硫磷(thiotepa); 紫杉烷, 如紫杉醇(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) 和 docetaxel(TAXOTERE®,

Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 苯丁酸氮芥; 吉西他滨(gemcitabine); 6-巯代鸟嘌呤; 巯基嘌呤; 氮甲蝶呤; 铂类似物如顺铂和卡铂; 长春花碱; 铂; 依托泊甙(etoposide)(VP-16); 异环磷酰胺; 丝裂霉素 C; 米托蒽醌; 长春新碱; 长春瑞宾(vinorelbine); 新霉酰胺(navelbine); novantrone; 替尼泊甙(teniposide); 柔红霉素; 氨基蝶呤; xeloda; 伊拜磷酸盐(ibandronate); CPT-11; 拓扑异构酶抑制剂 RFS2000; 二氟甲基鸟氨酸(DMFO); 维甲酸 esperamicins; capecitabine; 以及上述任何物质的可药用盐, 酸或衍生物。此定义还包括能调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素制剂, 如抗雌激素制剂包括他莫昔芬(tamoxifen), 雷洛昔芬(raloxifene), 芳香酶抑制剂 4(5)-咪唑, 4-羟基他莫昔芬, 曲沃昔芬(trioxifene), keoxifene, LY117018, onapristone, 和托瑞米芬(Fareston); 和抗雄激素制剂如氟他氨(flutamide), 尼鲁米特(nilutamide), bicalutamide, 亮丙瑞林(leuprolide)和戈舍瑞林(goserelin); 和上述任何物质的可药用盐, 酸或衍生物。

在一个实施方案中, 抗体和毒素都是蛋白质并且可以使用本领域中熟知的技术偶联。存在本领域中所公开的数百种交联剂, 其可以偶联两种蛋白质。交联剂一般基于在抗体或毒素上可用或插入的反应官能团来选择。另外, 如果不存在反应基团, 那么可以使用光可活化交联剂。在某些情况下, 可能需要在抗体与毒素之间包括间隔子。本领域中已知的交联剂包括同型双功能剂: 戊二醛、二甲基己二亚酰胺化物和双(重氮基联苯胺), 以及异型双功能剂: 间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺和磺基-间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺。

可以用于使效应分子偶合至抗体片段的交联剂包括例如 TPCH(S-(2-巯代吡啶基)-L-半胱氨酸酰肼)和 TPMPH(S-(2-巯代吡啶基)巯基-丙酰肼)。TPCH 和 TPMPH 在先前已经通过温和高碘酸盐处理而氧化的糖蛋白的碳水化合物部分反应, 由此在交联剂的酰肼部分与高碘酸盐产生的醛之间形成腙键。异型双功能交联剂 GMBS(N-(γ -马来酰亚胺基丁酰氧基)-琥珀酰亚胺)和 SMCC(琥珀酰亚胺基 4-(N-马来酰亚胺基-甲基)环己烷)与伯胺反应, 由此将马来酰亚胺基引入组分上。这个马来酰亚胺基随后可以与另一种组分上的可以由交联剂引入的硫氢基反应, 由此在组分之间形成稳定的硫醚键。如果组分之间的位阻干扰任一种组分的活性, 那么可以使用交联剂, 将长的间隔臂引入组分之间, 诸如 3-(2-吡啶基二巯基)丙酸 n-琥珀酰亚胺酯(SPDP)。因此, 存在许多适合的交联剂, 其可以被使用并且各自取决于其对最佳免疫偶联物产量的影响来选择。

术语“表达载体”是指能够运输已与其连接的另一个核酸的核酸分子。在一个实施方案中, 载体是“质粒”, 其是指可将另外的 DNA 区段连接至其中的环状双链 DNA 环。在另一个实施方案中, 载体是病毒载体, 其中可将另外的 DNA 区段连接至病毒基因组中。本文中公开的载体能够在已引入它们的宿主细胞中自主复制(例如, 具有细菌的复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)或可在引入宿主细胞后整合入宿主细胞的基因组, 从而随宿主基因组一起复制(例如, 非附加

型哺乳动物载体)。

现有技术中熟知生产和纯化抗体和抗原结合片段的方法，如冷泉港的抗体实验技术指南，5-8 章和 15 章。例如，鼠可以用人 CD70 或其片段免疫，所得到的抗体能被复性、纯化，并且可以用常规的方法进行氨基酸测序。抗原结合片段同样可以用常规方法制备。公开所述的抗体或抗原结合片段用基因工程方法在非人源的 CDR 区加上一个或更多个人源 FR 区。人 FR 种系序列可以通过比对 IMGT 人类抗体可变区种系基因数据库和 MOE 软件，从 ImMunoGeneTics (IMGT) 的网站 <http://imgt.cines.fr> 得到，或者从免疫球蛋白杂志，2001 ISBN 012441351 上获得。

术语“宿主细胞”是指已向其中引入了表达载体的细胞。宿主细胞可包括细菌、微生物、植物或动物细胞。易于转化的细菌包括肠杆菌科 (enterobacteriaceae) 的成员，例如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 或沙门氏菌 (*Salmonella*) 的菌株；芽孢杆菌科 (*Bacillaceae*) 例如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)；肺炎球菌 (*Pneumococcus*)；链球菌 (*Streptococcus*) 和流感嗜血菌 (*Haemophilus influenzae*)。适当的微生物包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)。适当的动物宿主细胞系包括 CHO (中国仓鼠卵巢细胞系)、293 细胞和 NS0 细胞。为了获得非岩藻糖基化的抗体，可使用敲除 *Glul* 和 *Fut8* 基因的宿主细胞，包括但不限于敲除 *Glul* 和 *Fut8* 基因的 CHOK1 细胞。

本披露工程化的抗体或抗原结合片段可用常规方法制备和纯化。比如，编码重链和轻链的 cDNA 序列，可以克隆并重组至 GS 表达载体。重组的免疫球蛋白表达载体可以稳定地转染 CHO 细胞。作为一种更推荐的现有技术，哺乳动物类表达系统会导致抗体的糖基化，特别是在 Fc 区的高度保守 N 端位点。通过表达与人 CD70 特异性结合的抗体得到稳定的克隆。阳性的克隆在生物反应器的无血清培养基中扩大培养以生产抗体。分泌了抗体的培养液可以用常规技术纯化。比如，用含调整过的缓冲液的 A 或 G Sepharose FF 柱进行纯化。洗去非特异性结合的组分。再用 pH 梯度法洗脱结合的抗体，用 SDS-PAGE 检测抗体片段，收集。抗体可用常规方法进行过滤浓缩。可溶的混合物和多聚体，也可以用常规方法去除，比如分子筛、离子交换。得到的产物需立即冷冻，如 -70℃，或者冻干。

“施用”、“给予”和“处理”，当其应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“施用”、“给予”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触，以及试剂与流体的接触，其中所述流体与细胞接触。“施用”、“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“处理”，当其应用于人、兽医学或研究受试者时，是指治疗处理、预防或预防性措施，研究和诊断应用。

“治疗”意指给予患者内用或外用治疗剂，例如包含本披露的任一种结合化合物

的组合物，所述患者具有一种或多种疾病症状，而己知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常，在受治疗患者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂，以诱导这类症状退化或抑制这类症状发展到任何临床可测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量（也称作“治疗有效量”）可根据多种因素变化，例如患者的疾病状态、年龄和体重，以及药物在患者产生需要疗效的能力。

5 通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法，可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本披露的实施方案（例如治疗方法或制品）在缓解每个目标疾病症状方面可能无效，但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验（H 检验）、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验

10 确定，其在统计学显著数目的患者中应当减轻目标疾病症状。

“保守修饰”或“保守置换或取代”是指具有类似特征（例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等）的其它氨基酸置换蛋白中的氨基酸，使得可频繁进行改变而不改变蛋白的生物学活性。本领域技术人员知晓，一般而言，多肽

15 的非必需区域中的单个氨基酸置换基本上不改变生物学活性（参见例如 Watson 等（1987）Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub.Co., 第 224 页，（第 4 版））。另外，结构或功能类似的氨基酸的置换不大可能破坏生物学活性。示例性保守取代如下：

表 4. 示例性氨基酸保守取代

原始残基	保守取代
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His; Asp
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala; Val
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser

Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

“有效量”或“有效剂量”指获得任一种或多种有益的或所需的治疗结果所必需的药物、化合物或药物组合物的量。对于预防用途，有益的或所需的结果包括消除或降低风险、减轻严重性或延迟病症的发作，包括病症、其并发症和在病症的发展过程中呈现的中间病理表型的生物化学、组织学和/或行为症状。对于治疗应用，有益的或所需的结果包括临床结果，诸如减少各种本披露靶抗原相关病症的发病率或改善所述病症的一个或更多个症状，减少治疗病症所需的其它药剂的剂量，增强另一种药剂的疗效，和/或延缓患者的本披露靶抗原相关病症的进展。

“外源性”指根据情况在生物、细胞或人体外产生的物质。“内源性”指根据情况在细胞、生物或人体内产生的物质。

“同源性”是指两个多核苷酸序列之间或两个多肽之间的序列相似性。当两个比较序列中的位置均被相同碱基或氨基酸单体亚基占据时，例如如果两个 DNA 分子的每一个位置都被腺嘌呤占据时，那么所述分子在该位置是同源的。两个序列之间的同源性百分率是两个序列共有的匹配或同源位置数除以比较的位置数×100 的函数。例如，在序列最佳比对时，如果两个序列中的 10 个位置有 6 个匹配或同源，那么两个序列为 60%同源；如果两个序列中的 100 个位置有 95 个匹配或同源，那么两个序列为 95%同源。通常，当比对两个序列时进行比较以给出最大百分比同源性。例如，可以通过 BLAST 算法执行比较，其中选择算法的参数以在各个参考序列的整个长度上给出各个序列之间的最大匹配。以下参考文献涉及经常用于序列分析的 BLAST 算法：BLAST 算法 (BLAST ALGORITHMS)：Altschul, S.F. 等人，(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410；Gish, W.等人，(1993) Nature Genet. 3:266-272；Madden, T.L.等人，(1996) Meth. Enzymol. 266:131-141；Altschul, S.F.等人，(1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402；Zhang, J.等人，(1997) Genome Res. 7:649-656。其他如 NCBI BLAST 提供的常规 BLAST 算法也为本领域技术人员所熟知。

本文使用的表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用，并且所有这类名称都包括后代。因此，单词“转化体”和“转化细胞”包括原代受试细胞和由其衍生的培养物，而不考虑转移数目。还应当理解的是，由于故意或非有意的突变，所有后代在 DNA 含量方面不可能精确相同。包括具有与最初转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。在意指不同名称的情况下，其由上下文清楚可见。

本文使用的“聚合酶链式反应”或“PCR”是指其中微量的特定部分的核酸、RNA 和/或 DNA 如在例如美国专利号 4, 683, 195 中所述扩增的程序或技术。一般来说，需要获得来自目标区域末端或之外的序列信息，使得可以设计寡核苷酸引物；

这些引物在序列方面与待扩增模板的对应链相同或相似。2 个引物的 5' 末端核苷酸可以与待扩增材料的末端一致。PCR 可用于扩增特定的 RNA 序列、来自总基因组 DNA 的特定 DNA 序列和由总细胞 RNA 转录的 cDNA、噬菌体或质粒序列等。一般参见 Mullis 等(1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; Erlich 编辑,

5 (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.)。本文使用的 PCR 被视为用于扩增核酸测试样品的核酸聚合酶反应法的一个实例,但不是唯一的实例,所述方法包括使用作为引物的已知核酸和核酸聚合酶,以扩增或产生核酸的特定部分。

“分离的”指纯化状态,并且在这种情况下意味着在指定的分子基本上不含其他生物分子,例如核酸、蛋白质、脂质、碳水化合物或其他材料,例如细胞碎片和生长培养基。通常,术语“分离的”并不意图指完全不存在这些材料或不存在水、缓冲液或盐,除非它们以显著干扰如本文所述的化合物的实验或治疗用途的量存在。

“任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必然发生,该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。

15 “药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物或其生理学上/可药用的盐或前体药物与其他化学组分的混合物,所述其他组分例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是促进对生物体的给药,利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

术语“药学上可接受的载体”指适合用于制剂中用于递送药物(例如本披露所述的抗 CD70 抗体或抗原结合片段)的任何无活性物质。载体可以是抗粘附剂、粘合剂、包衣、崩解剂、充填剂或稀释剂、防腐剂(如抗氧化剂、抗菌剂或抗真菌剂)、增甜剂、吸收延迟剂、润湿剂、乳化剂、缓冲剂等。合适的药学上可接受的载体的示例包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)右旋糖、植物油(例如橄榄油)、盐水、缓冲液、缓冲的盐水和等渗剂例如糖、多元醇、山梨糖醇和氯化钠。

此外,本披露包括用于治疗与目标抗原(例如 CD70)阳性细胞相关的疾病的药剂,所述药剂包含本披露的抗 CD70 抗体或其抗原结合片段作为活性成分。活性成分以治疗有效量施与受试者,可以治疗受试者 CD70 阳性细胞相关疾病。所述治疗有效量为单位剂量的组合物中含有 0.1-3000mg 的如前所述的特异性结合人 CD70 抗体。

本披露中与 CD70 相关的疾病或病症没有限制,只要它是与 CD70 相关的疾病或病症即可。例如,在一些实施方案中,本披露的分子对于以下一些表达 CD70 的疾病或病症是非常有用的:例如,类风湿性关节炎、自身免疫性脱髓鞘疾病(例如,多发性硬化、变应性脑脊髓炎)、内分泌性眼病、葡萄膜视网膜炎、系统性红斑狼疮、重症肌无力、Grave 病、肾小球性肾炎、自身免疫性肝(hepatological)病、炎症肠病(例如, Crohn 病、溃疡性结肠炎、乳糜泻病)、过敏反应、变应性反应、

Sjogren 综合征、I 型糖尿病、原发性胆汁性肝硬化、韦格纳肉芽肿病、纤维肌痛、多肌炎、皮炎、多内分泌不足、Schmidt 综合征、自身免疫性葡萄膜炎、Addison 病、肾上腺炎、甲状腺炎、Hashimoto 甲状腺炎、自身免疫性甲状腺疾病、恶性贫血、胃萎缩、慢性肝炎、狼疮样肝炎、动脉粥样硬化、亚急性皮肤性红斑狼疮、

5 甲状旁腺功能减退、Dressier 综合征、自身免疫性血小板减少症、特发性血小板减少性紫癜、溶血性贫血、寻常性天疱疮、天疱疮、疱疹样皮炎、斑秃、类天疱疮、硬皮病、进行性系统性硬化症、CREST 综合征(钙质沉着、Raynaud 现象、食管蠕动障碍、硬指症和毛细血管扩张)、男性和女性自身免疫性不育症、强直性脊柱炎、溃疡性结肠炎、混合性结缔组织病、结节性多动脉炎(polyarteritis nodosa)、系

10 统性坏死性血管炎、特应性皮炎、特应性鼻炎、Goodpasture 综合征、Chagas 病、结节病、风湿热、哮喘、复发性流产、抗磷脂综合征、农民肺、多形性红斑、心切开后综合征、Gushing 综合征、自身免疫性慢性活动性肝炎、养鸟人肺、中毒性表皮坏死性溶解症、Alport 综合征、肺炎、变应性肺炎、纤维化肺炎、间质性肺病、结节性红斑、坏疽性脓皮病、输血反应、Takayasu 动脉炎、风湿性多

15 肌痛、颞动脉炎、血吸虫病、巨细胞动脉炎(giant cell arthritis)、蛔虫病、曲霉病、Sampter 综合征、湿疹、淋巴瘤样肉芽肿病、白塞氏病、Caplan 综合征、川崎病、登革热、脑脊髓炎、心内膜炎、心内膜心肌纤维化、眼内炎、持久性隆起性红斑(erythema elevatum et diutinum)、银屑病、胎儿成红细胞增多症、嗜酸性筋膜炎、Shulman 综合征、Felty 综合征、丝虫病、睫状体炎、慢性睫状体炎、异色性睫状

20 体炎、Fuch 睫状体炎、IgA 肾病、Henoch-Schonlein 紫癜、移植物抗宿主病、移植排斥反应、心肌病、Eaton-Lambert 综合征、复发性多软骨炎、冷球蛋白血症、Evan 综合征和自身免疫性腺垂体功能减退，B 淋巴细胞的病症(例如，系统性红斑狼疮、Goodpasture 综合征、类风湿性关节炎和 I 型糖尿病)、Th1 淋巴细胞的病症(例如，类风湿性关节炎、多发性硬化症、银屑病、Sjorgren 综合征、Hashimoto 甲状腺炎、

25 Grave 病、原发性胆汁性肝硬化、韦格纳肉芽肿病、肺结核或移植物抗宿主病)、或者 Th2 淋巴细胞的病症(例如，特应性皮炎、系统性红斑狼疮、特应性哮喘、鼻结膜炎、变应性鼻炎、Omenn 综合征、系统性硬化症或慢性移植物抗宿主病)，Churg Strauss 综合征、显微多血管炎、以及 Takayasu 动脉炎。在另外一些方案中，本披露的分子对于以下一些表达 CD70 的疾病(例如癌症)是非常有用，包括肾癌(例如、肾细胞癌)、乳腺癌、脑肿瘤，慢性或急性白血病(包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病，急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病)、淋巴瘤(例如、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、原发性 CNS 淋巴瘤、T 细胞淋巴瘤)、鼻咽癌、黑素瘤(例如、转移性恶性黑素瘤)、前列腺癌、结肠癌、肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头部或颈部的癌、皮肤或眼内恶性黑素瘤、子宫癌、卵

30 巢癌、直肠癌、肛门区的癌症、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁

35

腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、儿童实体肿瘤、膀胱癌、肾脏或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、肿瘤血管发生、脊髓轴肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波济氏肉瘤、类上皮癌、鳞状细胞癌、间皮瘤。在另外一些方案中,本披露的分子对表征为存在表达 CD70 的肿瘤细胞,包括,例如肾细胞癌(RCC)如透明细胞(clear cell)RCC、胶质母细胞瘤、乳腺癌、脑肿瘤、鼻咽(nasopharyngeal)癌、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、Burkitt 淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、多发性骨髓瘤、皮肤 T 细胞淋巴瘤、结节性小裂细胞淋巴瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、外周 T 细胞淋巴瘤、Lennert 淋巴瘤、免疫母细胞淋巴瘤、T 细胞白血病/淋巴瘤(ATLL)、成人 T 细胞白血病(T-ALL)、中心母细胞/中心细胞性(cb/cc)滤泡性淋巴瘤癌(enteroblastic/centrocytic(cb/cc)follicular lymphomas cancers)、B 系弥漫性大细胞淋巴瘤,血管免疫母细胞性淋巴结病(AILD)样 T 细胞淋巴瘤、HIV 相关的基于体腔的淋巴瘤、胚胎癌、鼻咽的未分化癌(例如, Schmincke 瘤)、Castleman 病、Kaposi 肉瘤、多发性骨髓瘤、Waldenstrom 巨球蛋白血症、套细胞淋巴瘤和其他的 B 细胞淋巴瘤,具有良好作用。

此外,本披露涉及用于免疫检测或测定目标抗原(例如 CD70)的方法、用于免疫检测或测定目标抗原(例如 CD70)的试剂、用于免疫检测或测定表达目标抗原(例如 CD70)的细胞的方法和用于诊断与目标抗原(例如 CD70)阳性细胞相关的疾病的诊断剂,其包含本披露的特异性识别目标抗原(例如人 CD70)并与胞外区的氨基酸序列或其三维结构结合的抗体或抗体片段作为活性成分。

在本披露中,用于检测或测定目标抗原(例如 CD70)的量的方法可以是任何已知方法。例如,免疫检测或测定方法。

免疫检测或测定方法是使用标记的抗原或抗体检测或测定抗体量或抗原量的方法。免疫检测或测定方法的实例包括放射性物质标记的免疫抗体方法(RIA)、酶免疫测定法(EIA 或 ELISA)、荧光免疫测定法(FIA)、发光免疫测定法、蛋白质免疫印迹法、物理化学方法等。

与 CD70 阳性细胞(例如高表达 CD70 细胞)相关的疾病可以通过用本披露的抗体或抗体片段检测或测定表达 CD70 的细胞来诊断。

为了检测表达多肽的细胞,可以使用已知的免疫检测方法,并优选使用免疫沉淀法、荧光细胞染色法、免疫组织染色法等。此外,可以使用利用 FMAT8100HTS 系统(Applied Biosystem)的荧光抗体染色法等。

在本披露中,对用于检测或测定目标抗原(例如 CD70)的活体样品没有特别限制,只要它具有包含表达目标抗原(例如 CD70)的细胞的可能性即可,例如组织细胞、血液、血浆、血清、胰液、尿液、粪便、组织液或培养液。

根据所需的诊断方法,含有本披露的单克隆抗体或其抗体片段的诊断剂还可以含有用于执行抗原-抗体反应的试剂或用于检测反应的试剂。用于执行抗原-抗体

反应的试剂包括缓冲剂、盐等。用于检测的试剂包括通常用于免疫检测或测定方法的试剂，例如识别所述单克隆抗体、其抗体片段或其结合物的标记的第二抗体和与所述标记对应的底物等。

在以上说明书中提出了本披露一种或多种实施方式的细节。虽然可使用与本文所述类似或相同的任何方法和材料来实施或测试本披露，但是以下描述优选的方法和材料。通过说明书和权利要求书，本披露的其他特点、目的和优点将是显而易见的。在说明书和权利要求书中，除非上下文中有清楚的另外指明，单数形式包括复数指代物的情况。除非另有定义，本文使用的所有技术和科学术语都具有本披露所属领域普通技术人员所理解的一般含义。说明书中引用的所有专利和出版物都通过引用纳入。提出以下实施例是为了更全面地说明本披露的优选实施方式。这些实施例不应以任何方式理解为限制本披露的范围。

具体实施方式

以下结合实施例和测试例进一步描述本披露，但这些实施例和测试例并非限制着本披露的范围。本披露实施例或测试例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，如冷泉港的抗体技术实验手册，分子克隆手册；或按照原料或商品制造厂商所建议的条件；未注明具体来源的试剂材料，为市场购买获得。

实施例

20 实施例 1：CD70 抗原的制备

以UniProt CD70 抗原（人CD70蛋白，Uniprot号：P32970）作为CD70的模板，设计本披露使用的抗原及检测用蛋白的氨基酸序列，可选的在CD70蛋白基础上融合不同的标签如His标签或Fc等。分别克隆到pTT5载体上（Biovector，CAT#102762），在293细胞中瞬转表达，纯化，获得本披露抗原及检测用蛋白。

25

带His标签的CD70蛋白胞外域（简写：His-TNC-CD70）序列，作为检测试剂；

HHHHHHHACGCAAAPDIKDLLSRLEELEGLVSSLREQQRFAQAQQQLPLESLGWDV
AELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPELDKGQLRIHRDGIYMVHIQV
TLAICSSTTASRHHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFHQGCTIASQRLTPLARGDTL
CTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRP

30

SEQ ID NO: 1

注释：下划线部分为6×His标签，斜体部分为TNC标签，其余部分为CD70蛋白胞外域。

35 CD70 蛋白胞外域与 Human-IgG1-Fc 融合蛋白（简写：CD70-Fc）序列，作为免疫原；

QRFAQAQQQLPLESLGWDVAELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGPEL
 DKGQLRIHRDGIYMVHIQVTLAICSSTTASRHHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSFH
 QGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLLPSRNTDETFFGVQWVRPEPKSSDKTHT
 CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
 5 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK SEQ ID NO: 2

注释：下划线部分为Human-IgG1-Fc部分，无下划线部分为CD70蛋白胞外域。

10 实施例 2：CD70 相关重组蛋白的纯化

1. 带His标签的重组蛋白的纯化步骤：

将细胞表达上清样品高速离心去除杂质，并将缓冲液置换为PBS，加入咪唑至
 终浓度为5mM。用含有5mM咪唑的PBS溶液平衡镍柱，冲洗2-5倍柱体积。将置换
 后的细胞上清样品上Ni Sepharose excel柱（GE，17-3712-02）。用含有5mM咪唑的
 15 PBS溶液冲洗柱子，至A280读数降至基线。后用PBS+10mM咪唑冲洗层析柱，除
 去非特异结合的杂蛋白，并收集流出液。再用含有300mM咪唑的PBS溶液洗脱目
 的蛋白，并收集洗脱峰。收集的洗脱液浓缩后用凝胶层析Superdex200（GE，
 28-9893-35）进一步纯化，流动相为PBS。去除聚体峰，收集洗脱峰。所得到的蛋
 白经电泳，肽图，LC-MS鉴定为正确后分装备用。得到带His标签的His-TNC-CD70，
 20 用作本披露抗体的检测试剂。

2. CD70-Fc融合蛋白的纯化步骤：

将细胞表达上清样品高速离心去除杂质，上清进行MabSelect Sure（GE，
 17-5438-01）亲和层析。MabSelect Sure层析柱先用0.2M NaOH再生，利用纯水冲
 洗后用PBS平衡柱子，将上清结合后，利用PBS进行洗涤至A280读数降至基线。用
 25 0.1M醋酸缓冲液在pH3.5条件下洗脱目的蛋白，用1M Tris-HCl中和。洗脱样品适当
 浓缩后利用PBS平衡好的凝胶层析Superdex200（GE，28-9893-35）进一步纯化，
 合并收集目的蛋白所在接收管浓缩至适当浓度。此方法用来纯化CD70-Fc融合蛋白，
 该方法也可以用来纯化本披露中的抗体蛋白。

实施例 3：鼠抗 CD70 噬菌体库抗体的筛选

30 1. 小鼠免疫：

抗人CD70抗体通过免疫小鼠产生。实验用Balb/c白小鼠，雌性，6-8周龄（北
 京维通利华实验动物技术有限公司，动物生产许可证号：SCXK（京）2012-0001）。
 饲养环境：SPF级。小鼠购进后，实验室环境饲养1周，12/12小时光/暗周期调节，
 温度20-25℃；湿度40-60 %。将已适应环境的小鼠按以下方案免疫。

35 用蛋白抗原（CD70-Fc，SEQ ID NO: 2）与细胞抗原（表达人全长CD70的
 CHO-S细胞（Invitrogen, R80007））交叉免疫，其中蛋白抗原交替使用TiterMax®

Gold Adjuvant (Sigma Cat No. T2684) 与 Thermo Imject® Alum (Thermo Cat No. 77161) 佐剂。蛋白抗原与佐剂 (TiterMax® Gold Adjuvant) 比例为 1:1, 蛋白抗原与佐剂 (Thermo Imject® Alum) 比例为 3:1, 50 μ g/只/次 (蛋白抗原免疫), 1 $\times$ 10⁷ cells/只/次 (细胞抗原免疫)。蛋白抗原乳化后进行接种, 细胞抗原由磷酸缓冲溶液重悬后接种。接种时间为第 0、14、28、42、56 和第 70 天, 于第 21, 49, 82 天取血, 用 ELISA 方法确定小鼠血清中的抗体滴度。选择血清中抗体滴度高并且滴度趋于平台的小鼠, 取其脾脏用于建立免疫库。

2. 鼠源噬菌体单链抗体库构建:

取小鼠脾细胞, 用 Trizol (Invitrogen Cat No. 15596-018) 提取总 RNA。用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒 (Takara Cat No. 6210A) 进行反转录获得 cDNA。根据 IMGT 数据库设计并合成构建文库的引物 (金唯智公司)。通过三轮 PCR 反应, 获得单链抗体片段。PCR 反应均使用 LA Tag (Takara Cat No. RR02MB)。第一轮 PCR 以 cDNA 为模板, 分别扩增得到重链可变区和轻链可变区序列; 第二轮 PCR 以第一轮产物为模板, 在重链可变区 5' 端和轻链可变区 3' 端引入 SfiI 酶切位点序列, 在重链可变区 3' 端和轻链可变区 5' 端引入连接序列; 第三轮 PCR 以第二轮 PCR 产物的重链可变区和轻链可变区共同为模板, 进行搭桥 PCR, 获得重链可变区在前, 轻链可变区在后的单链抗体片段。

将单链抗体片段和经过改造的建库载体 pCantab5E (Amersham Biosciences/GE Cat No. 27-9400-01) 用 SfiI (NEB Cat No. #R0123L) 进行酶切, 电泳后用 E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Omega Cat No. D2500-02) 进行纯化回收。然后用 T4 DNA 连接酶 (NEB Cat No. #M0202L) 16℃ 连接 16-18 小时, 再用上述试剂盒进行纯化回收, 最后用去离子水洗脱。取 1 μ g 连接产物与 1 支电转化感受态 TG1 (Lucigen Cat No. 60502-2) 混合, 电转化仪 (Bio Rad Micropulser) 进行电转化。重复转化 20 次, 涂平板, 37℃ 倒置培养 16-18 小时。将所有菌落刮洗下来混和在一起, 加入终浓度为 15% 的甘油, -80 度保存备用。

3. 筛选噬菌体单链抗体库得到抗 CD70 的阳性单克隆序列:

噬菌体单链抗体库进行包装浓缩后, 首先进行两轮淘洗。将噬菌体库 (1 $\times$ 10¹²~1 $\times$ 10¹³/pfu) 悬浮于 1mL 2%MPBS (含有 2% 脱脂奶粉的 PBS) 中, 并加入 100 μ L Dynabeads® M-280 Streptavidin (Invitrogen Cat No. 11206D), 置于转台上反复翻转, 室温封闭 1 小时。将管子置于磁力架上 2 分钟, 去除 Dynabeads, 噬菌体库转移至新的管子中。向封闭后的噬菌体库中加入 2 μ g/mL 生物素标记的 His-TNC-CD70, 置于转台上反复翻转 1 小时。同时取 100 μ L Dynabeads 悬浮于 1mL 2%MPBS 中, 置于转台上反复翻转, 室温封闭 1 小时。将管子置于磁力架上 2 分钟, 吸去封闭液。将封闭后的 Dynabeads 加入到噬菌体库和 His-TNC-CD70 混合液中, 置于转台上反复翻转 15 分钟。将管子置于磁力架上 2 分钟, 吸去混合液。用 1mL PBST (含 0.1% Tween-20 的 PBS) 洗脱 Dynabeads, 再加入 0.5mL 1mg/mL 胰蛋白酶 (Sigma

Cat No. T1426-250MG), 置于转台上反复翻转孵育15分钟, 进行洗脱。洗脱下来的噬菌体直接感染对数期的大肠杆菌TG1, 测定滴度并进行扩增浓缩, 用于下一轮淘洗。第二轮淘洗噬菌体库 ($1 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ /pfu), 生物素标记的人His-TNC-CD70浓度降为1 μ g/mL, PBST洗涤次数增加至15次。将洗脱下来的噬菌体感染大肠杆菌TG1涂平板, 随机挑取单克隆, 用于噬菌体ELISA。

将克隆接种于96孔深孔板 (Nunc Cat No.260251) 37度培养16~18小时。取少量接种至另一个96孔深孔板, 至OD600达到0.5左右, 加入M13K07辅助噬菌体 (NEB Cat No.N0315S) 进行包装。4000g离心10分钟去除菌体, 吸取培养液进行人CD70结合ELISA检测。阳性克隆菌种及时冻存保种并送测序公司测序。测得阳性克隆B1、B7、F4的DNA序列对应的氨基酸序列如下:

> B1 重链可变区序列 (B1mVH):

QVQMQQSGAELVKPGASVMMSCASGYTFTTYNIHWIKQTPGQGLEWIGDIYPGN
GDASYNQKFRDRATLTADRSSSTAYLQLSSLTSEDSAIYYCATFSRFDGWFAFWGQG
TLVTVSA

15

SEQ ID NO: 3

> B1 轻链可变区序列 (B1 mVL):

DIVMSQSPASLAVSLGQRATISCRASRSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLASN
LESGVPARFSGSGSGTNFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPTYFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 4

> B7 重链可变区序列 (B7 mVH):

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKTSGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLKWMGWINTYT
GEPTYADDFKGRFAFSLETSAGTAYLQINNLENEDTATYFCARGDSFTTEILRNWYF
DVWGAGTT

SEQ ID NO: 5

> B7 轻链可变区序列 (B7 mVL):

DIQMTQTPASLSASVGETVTITCGASENIYGALNHWYQRKQKGKSPQLLIYGATNLADG
MSSRFSGSGSGRQYSLKISSLHPDDVATYYCQNVLSTPWTFGGGTKLEMK

SEQ ID NO: 6

> F4 重链可变区序列 (F4 mVH):

QVQLKQSGAELVKPGASVKMSCKASGDTFPRYNMHWLQTPGQGLEWIGAIIFPGN
GETSYNQNFKGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARNSSYYDYAWFTYWG
QGTLVTVSA

SEQ ID NO: 7

> F4 轻链可变区序列 (F4 mVL):

DIVMTQSPASLDVSLGQRATISCRASKSVSSSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLISLASN

LESGVPARFSGSGSGTDFTLTYPVEEEDAATYYCQHSREFPPTFGSGTKLEIK

SEQ ID NO: 8

注：上述序列中，顺序依次为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，下划线为依照 Kabat 编号系统确定的 CDR 序列，斜体为 FR 序列。

5

鼠源抗体 B1、B7、F4 的重链及轻链 CDR 区序列如下表 5 所示：

表 5. 抗体重链轻链 CDR 序列

抗体	重链		轻链	
B1	HCDR1	TYNIH SEQ ID NO: 9	LCDR1	RASRSVSTSGYSYMH SEQ ID NO: 12
	HCDR2	DIYPGNGDASYNQKFRD SEQ ID NO: 10	LCDR2	LASNLES SEQ ID NO: 13
	HCDR3	FSRFDGWFAF SEQ ID NO: 11	LCDR3	QHSRELPYT SEQ ID NO: 14
B7	HCDR1	NYGMN SEQ ID NO: 15	LCDR1	GASENIYGALN SEQ ID NO: 18
	HCDR2	WINTYTGEPTYADDFKG SEQ ID NO: 16	LCDR2	GATNLAD SEQ ID NO: 19
	HCDR3	GDSFTTEILRNWYFDV SEQ ID NO: 17	LCDR3	QNVLPSTPW SEQ ID NO: 20
F4	HCDR1	RYNMH SEQ ID NO: 21	LCDR1	RASKSVSSSGYSFMH SEQ ID NO: 24
	HCDR2	AIFPGNGETSYNQNFKG SEQ ID NO: 22	LCDR2	LASNLES SEQ ID NO: 13
	HCDR3	NSYYDYAWFTY SEQ ID NO: 23	LCDR3	QHSREFPPT SEQ ID NO: 25

备注：表中CDR为依照Kabat编号系统确定的CDR

4. 噬菌体展示单链抗体结合人CD70蛋白的ELISA 实验:

- 10 用pH7.4的PBS缓冲液将人His-TNC-CD70蛋白稀释至2μg/mL浓度，以100μL/孔的体积加入96孔酶标板（Corning，Cat No. CLS3590-100EA）中，于4℃冰箱中放置16-18小时。弃去液体后，加入用PBS稀释的5%脱脂奶粉（生工生物，产品编号A600669-0250）封闭液200μL/孔，37℃孵育箱孵育2小时进行封闭。封闭结束后，弃去封闭液，并用PBST缓冲液（pH7.4 PBS含0.1% tween-20）洗板3次后，加入100μL/
- 15 孔用2%MPBS（pH7.4 PBS含2%脱脂奶粉）1:1稀释的噬菌体培养液，放于37℃孵育箱孵育1小时。孵育结束后用PBST洗板6次，加入100μL/孔用2%MPBS稀释的抗M13 Antibody（HRP）二抗（SB，货号11973-MM05T-H），37℃孵育1小时。用PBST洗板6次后，加入50μl/孔TMB显色底物（KPL，Cat No. 52-00-03），室温孵育5-10min，加入50μl/孔1M H₂SO₄终止反应，用VERSAmax酶标仪（Molecular Devices）在波

长450nm处读取吸收值。实验结果如下表：

5

表6. 单链抗体与人CD70 抗原结合ELISA实验结果

抗体	酶标仪 OD450nm 处读值
B1	1.16
F4	1.09
B7	1.97

实施例 4：抗 CD70 鼠源抗体的人源化

通过比对 IMGT 人类抗体重轻链可变区种系基因数据库和 MOE 软件，分别挑选与 B1、B7 和 F4 同源性高的重轻链可变区种系基因作为模板，将这三个鼠源抗体的 CDR 分别移植到相应的人源模板中，形成次序为

10 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的可变区序列。示例性地，以下具体实施例中 CDR 氨基酸残基由 Kabat 编号系统确定并注释。

1. B1 鼠源抗体的人源化

鼠源抗体 B1 的人源化轻链模板为 IGKV4-1*01 和 IGKJ4*01，人源化重链模板为 IGHV1-46*01 和 IGHJ1*01，将鼠源抗体 B1 的 CDR 分别移植到其人源模板中，
15 进而对人源化抗体的 FR 部分氨基酸进行回复突变改造，其中轻链 FR 部分包括 5S 或 70N 中的一个或多个回复突变（其中的回复突变位点的位置根据 Kabat 编号规则确定），重链 FR 部分包括 4M, 37I, 38K, 48I, 67A, 69L, 71A, 73R, 78A, 80L, 94T 中的一个或多个回复突变（其中的回复突变位点的位置根据 Kabat 编号规则确定），抗体 B1 的人源化抗体的回复突变设计见下表 7：

20

表 7. B1 人源化抗体的回复突变设计

VL		VH	
huB1VL1	Graft	huB1VH1	Graft
huB1VL2	Graft + T5S, D70N	huB1VH2	Graft + L4M, R94T
		huB1VH3	Graft + L4M, R71A, T73R, R94T
		huB1VH4	Graft + L4M, M69L, R71A, T73R, V78A, R94T
		huB1VH5	Graft + L4M, M48I, V67A, M69L, R71A, T73R, V78A, M80L, R94T
		huB1VH6	Graft + L4M, V37I, R38K, M48I, V67A, M69L, R71A, T73R, V78A, M80L, R94T

注：Graft 代表鼠源抗体 CDR 植入人种系 FR 区；其中回复突变位点的位置根据

Kabat 编号规则确定，如“T5S”表示依照 Kabat 编号系统，将第 5 位 T 突变为 S。

B1 人源化抗体轻链可变区/重链可变区序列如下：

> huB1VH1 (huB1VH- graft)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYNIHWVRQAPGQGLEWMGDIYPGN
5 GDASYNQKFRDRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARFSRFDGWFAFWG
QGTLLTVSS

SEQ ID NO: 26

> huB1VH2

EVQMVSQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYNIHWVRQAPGQGLEWMGDIYPG
10 NGDASYNQKFRDRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCATFSRFDGWFAFWG
GQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 27

> huB1VH3

EVQMVSQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYNIHWVRQAPGQGLEWMGDIYPG
15 NGDASYNQKFRDRVTMTADRSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCATFSRFDGWFAFWG
GQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 28

> huB1VH4

EVQMVSQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYNIHWVRQAPGQGLEWMGDIYPG
20 NGDASYNQKFRDRVTLTADRSTSTAYMESSLRSEDTAVYYCATFSRFDGWFAFWG
GQGTLLTVSS

SEQ ID NO: 29

> huB1VH5

EVQMVSQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYNIHWVRQAPGQGLEWIGDIYPGN
25 GDASYNQKFRDRATLTADRSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCATFSRFDGWFAFWG
QGTLLTVSS

SEQ ID NO: 30

> huB1VH6

EVQMVSQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYNIHWIKQAPGQGLEWIGDIYPGN
30 GDASYNQKFRDRATLTADRSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCATFSRFDGWFAFWG
QGTLLTVSS

SEQ ID NO: 31

> huB1VL1 (huB1VL- graft)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASRSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLAS
35 NLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSRELPTYFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 32

> huB1VL2

DIVMSQSPDSLAVSLGERATINCRASRSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLAS
NLESGVPDRFSGSGSGTNFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSRELPTYFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 33

- 5 另外, 对轻链可变区和重链可变区的 CDR 部分的个别氨基酸进行改造, 其中, HCDR2 的氨基酸序列由 DIYPGNGDASYNQKFRD (如 SEQ ID NO: 10 所示) 改造为 DIYPGTGDASYNQKFRD (如 SEQ ID NO: 42 所示), LCDR2 的氨基酸序列由 LASNLES (如 SEQ ID NO: 13 所示) 改造为: LADNLES (如 SEQ ID NO: 43 所示), 改造后 B1 人源化抗体轻链可变区/重链可变区序列如下:

10 > huB1VH1-1

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTYNIHWVRQAPGQGLEWMGDIYPGT
GDASYNQKFRDRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARFSRFDGWFAYWG
QGTLVTVSS

SEQ ID NO: 34

15 > huB1VH2-1

EVQMVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTYNIHWVRQAPGQGLEWMGDIYPGT
GDASYNQKFRDRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCATFSRFDGWFAYWG
QGTLVTVSS

SEQ ID NO: 35

20 > huB1VH3-1

EVQMVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTYNIHWVRQAPGQGLEWMGDIYPGT
GDASYNQKFRDRVTMTADRSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCATFSRFDGWFAYWG
QGTLVTVSS

SEQ ID NO: 36

25 > huB1VH4-1

EVQMVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTYNIHWVRQAPGQGLEWMGDIYPGT
GDASYNQKFRDRVTLTADRSTSTAYMESSLRSEDVAVYYCATFSRFDGWFAYWG
QGTLVTVSS

SEQ ID NO: 37

30 > huB1VH5-1

EVQMVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTYNIHWVRQAPGQGLEWIGDIYPGT
GDASYNQKFRDRATLTADRSTSTAYLESSLRSEDVAVYYCATFSRFDGWFAYWG
QGTLVTVSS

SEQ ID NO: 38

35 > huB1VH6-1

EVQMVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTTYNIHWIKQAPGQGLEWIGDIYPGT

GDASYNQKFRDRATLTADRSTSTAYLELSSLRSEDTAVYYCATFSRFDGWFAYWG
QGTLVTVSS

SEQ ID NO: 39

> huB1VL1-1

5 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASRSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLAD
NLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSRELPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 40

> huB1VL2-1

10 DIVMSQSPDSLAVSLGERATINCRASRSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLAD
NLESGVPDRFSGSGSGTNFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSRELPYTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 41

其中，上述序列中，顺序依次为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜体为 FR 序列，下划线为依照 Kabat 编号系统确定的 CDR 序列。

15 2. 抗体库 huB7 人源化构架选择

鼠源抗体 B7 的人源化轻链模板为 IGKV27-1*01 和 IGKJ4*01，人源化重链模板为 IGHV7-4-1*02 和 IGHJ6*01，将鼠源抗体 B7 的 CDR 分别移植到其人源模板中，进而对人源化抗体的 FR 部分氨基酸进行回复突变改造，其中轻链 FR 部分包括 38R、43S、69R、70Q 或 71Y 中的一个或多个回复突变（其中的回复突变位点的位置根据 Kabat 编号规则确定），重链 FR 部分包括 2I、24T、46K、72E、82a N 中的一个或多个回复突变（其中的回复突变位点的位置根据 Kabat 编号规则确定）。抗体 B7 的人源化抗体可变区的回复突变设计见下表 8：

表 8. B7 人源化抗体的回复突变设计

VL		VH	
huB7VL1	Graft	huB7VH1	Graft
huB7VL2	Graft + T69R, F71Y	huB7VH2	Graft + V2I, A24T, D72E
huB7VL3	Graft + V43S, T69R, F71Y	huB7VH3	Graft + V2I, A24T, E46K, D72E, S82a N
huB7VL4	Graft + Q38R, V43S, T69R, D70Q, F71Y		

注：Grafted 代表鼠源抗体 CDR 植入人种系 FR 区；其中突变位点的位置根据 Kabat 编号规则确定，如“S82a N”表示依照 Kabat 编号系统，将第 82a（也称 82A）位 S 突变为 N。

B7 人源化抗体轻/重链可变区序列如下：

> huB7VH1 （huB7VH- graft）

*EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTY
TGEPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGDSFTTEILRNWY
FDVWGQGTTVTVSS*

SEQ ID NO: 44

5 > huB7VH2

*EIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKTSGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTY
TGEPTYADDFKGRFVFSLETSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGDSFTTEILRNWY
FDVWGQGTTVTVSS*

SEQ ID NO: 45

10 > huB7VH3

*EIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKTSGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLKWMGWINTY
TGEPTYADDFKGRFVFSLETSVSTAYLQINSLKAEDTAVYYCARGDSFTTEILRNWY
FDVWGQGTTVTVSS*

SEQ ID NO: 46

15 > huB7VL1 (huB7VL- graft)

*DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNHWYQQKPGKVPKLLIYGATNLAD
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQNVLSTPWTFGGGTKVEIK*

SEQ ID NO: 47

> huB7VL2

20 *DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNHWYQQKPGKVPKLLIYGATNLAD
GVPSRFSGSGSGRDTLTISLQPEDVATYYCQNVLSTPWTFGGGTKVEIK*

SEQ ID NO: 48

> huB7VL3

25 *DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNHWYQQKPGKSPKLLIYGATNLAD
GVPSRFSGSGSGRDTLTISLQPEDVATYYCQNVLSTPWTFGGGTKVEIK*

SEQ ID NO: 49

> huB7VL4

30 *DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNHWYQRKPGKSPKLLIYGATNLAD
GVPSRFSGSGSGRQYTLTISLQPEDVATYYCQNVLSTPWTFGGGTKVEIK*

SEQ ID NO: 50

另外，还对重链可变区的 CDR 部分的个别氨基酸进行改造，其中，HCDR2 的氨基酸序列由原 WINTYTGEPTYADDFKG（如 SEQ ID NO: 16 所示）改造为：WINTYTGEPTYADEFKG（如 SEQ ID NO: 54 所示），改造后 B7 人源化抗体重链可变区序列如下：

35 > huB7VH1-1

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTY

TGEPTYADEFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGDSFTTEILRNWY
FDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 51

> huB7VH2-1

5 EIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKTSGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTY
TGEPTYADEFKGRFVFSLETSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGDSFTTEILRNWY
FDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 52

> huB7VH3-1

10 EIQLVQSGSELKKPGASVKVSCKTSGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLKWMGWI
NTYTGEPTYADEFKGRFVFSLETSVSTAYLQINSLKAEDTAVYYCARGDSFTTEILR
NWYFDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 53

15 其中，上述序列中，顺序依次为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜体为 FR 序列，下划线为依照 Kabat 编号系统确定的 CDR 序列。

3. 抗体库 huF4 人源化构架选择

鼠源抗体 F4 的人源化轻链模板为 IGKV4-1*01 和 IGKJ2*01，人源化重链模板为 IGHV1-69*08 和 IGHJ1*01，将鼠源抗体 F4 的 CDR 分别移植到其人源模板中，进而对人源化抗体的 FR 部分氨基酸进行回复突变改造，其中轻链 FR 部分包括 49S 的回复突变（其中的回复突变位点的位置根据 Kabat 编号规则确定），重链 FR 部分包括 27D、30P、37L、38K、48I、66K、67A、69L、82a N 中的一个或多个回复突变（其中的回复突变位点的位置根据 Kabat 编号规则确定）。抗体 F4 的人源化抗体可变区的回复突变设计见下表 9：

25 表 9. F4 人源化抗体的回复突变设计

VL		VH	
huF4VL1	Graft	huF4VH1	Graft
huF4VL2	Graft + Y49S	huF4VH2	Graft + G27D, S30P
		huF4VH3	Graft + G27D, S30P, I69L
		huF4VH4	Graft + G27D, S30P, V37L, R38K, I69L
		huF4VH5	Graft + G27D, S30P, V37L, R38K, R66K, I69L, S82a N

		huF4VH6	Graft + G27D, S30P, V37L, R38K, M48I, R66K, V67A, I69L, S82a N
--	--	---------	--

注：Grafted 代表鼠源抗体 CDR 植入人种系 FR 区；其中的回复突变位点的位置根据 Kabat 编号规则确定。如“S82a N”表示依照 Kabat 编号系统，将第 82a(也称 82A)位 S 突变为 N

> huF4VH1 (huF4VH- graft)

5 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSRYNMHWVRQAPGQGLEWMGAIFPG
NGETSYNQNFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNSYDYAWFTYW
 GQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 55

> huF4VH2

10 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDTFPRYNMHWVRQAPGQGLEWMGAIFPG
NGETSYNQNFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNSYDYAWFTYW
 GQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 56

> huF4VH3

15 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDTFPRYNMHWVRQAPGQGLEWMGAIFPG
NGETSYNQNFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNSYDYAWFTY
 WGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:57

> huF4VH4

20 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDTFPRYNMHWLQAPGQGLEWMGAIFPG
NGETSYNQNFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNSYDYAWFTY
 WGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 58

> huF4VH5

25 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDTFPRYNMHWLQAPGQGLEWMGAIFPG
NGETSYNQNFKGKVTITADKSTSTAYMELNSLRSEDTAVYYCARNSYDYAWFTY
 WGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 59

> huF4VH6

30 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDTFPRYNMHWLQAPGQGLEWIGAIFPGN
GETSYNQNFKGKATITADKSTSTAYMELNSLRSEDTAVYYCARNSYDYAWFTYW
 GQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 60

> huF4VL1 (huF4VL-graft)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSSSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLAS
NLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSREFPPTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:61

> huF4VL2

5 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSSSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLISLAS
NLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSREFPPTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 62

另外，还对轻链可变区和重链可变区的 CDR 部分的个别氨基酸进行改造，其中，HCDR2 的氨基酸序列由原 AIFPGNGETSYNQNFKG (SEQ ID NO: 22) 改造为: AIFPGTGETSYNQNFKG (如 SEQ ID NO:71 所示)，LCDR2 的氨基酸序列由原 LASNLES (SEQ ID NO: 13) 改造为: LADNLES (如 SEQ ID NO:43 所示)

> huF4VH1-1

15 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSRYNMHWVRQAPGQGLEWMGAIFPG
TGETSYNQNFKGGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNSYDYAWFTYW
GQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 63

> huF4VH2-1

20 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDTFPRYNMHWVRQAPGQGLEWMGAIFPG
TGETSYNQNFKGGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNSYDYAWFTYW
GQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 64

> huF4VH3-1

25 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDTFPRYNMHWVRQAPGQGLEWMGAIFPG
TGETSYNQNFKGGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNSYDYAWFTY
WGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:65

> huF4VH4-1

30 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDTFPRYNMHWLQAPGQGLEWMGAIFPG
TGETSYNQNFKGGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNSYDYAWFTY
WGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 66

> huF4VH5-1

35 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDTFPRYNMHWLQAPGQGLEWMGAIFPG
TGETSYNQNFKGKVTLTADKSTSTAYMELNSLRSEDTAVYYCARNSYDYAWFTY

WGQGTLLVTVSS

SEQ ID NO: 67

> huF4VH6-1

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDTFPRYNMHWLQAPGQGLEWIGAIIFPGT
 5 GETSYNQNFKGKATLTADKSTSTAYMELNSLRSEDTAVYYCARNSSYYDYAWFTYW
 GQGTLLVTVSS

SEQ ID NO: 68

> huF4VL1-1

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSSSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLAD
 10 NLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSREFPPTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 69

> huF4VL2-1

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSSSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLISLAD
 15 NLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSREFPPTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 70

其中，上述序列中，顺序依次为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜体为 FR 序列，下划线为依照 Kabat 编号系统确定的 CDR 序列。

4. 构建和表达抗 CD70 人源化抗体 IgG1 形式

设计引物 PCR 搭建各人源化抗体 VH/VK 基因片段，再与表达载体 pTT5（带信号肽及恒定区基因（CH1-FC/CL）片段，实验室构建）进行同源重组，构建抗体全长表达载体 VH-CH1-FC-pTT5/VK-CL-pTT5。抗体的重链恒定区可选自人 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、或其变体的重链恒定区，轻链恒定区可选自人 κ 、 λ 链或其变体的轻链恒定区。示例性的，以下实施例，抗体重链恒定区选自如 SEQ ID NO: 72 所示的人 IgG1 重链恒定区，轻链恒定区选自如 SEQ ID NO: 73 所示的人轻链恒定区。

人 IgG1 重链恒定区序列：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
 VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
 PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 30 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSL
 SLSPGK

SEQ ID NO: 72

人轻链恒定区序列：

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 35 SVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:73

将前面筛选的鼠源抗体 B1、B7、F4 的重链可变区羧基端与如 SEQ ID NO: 72 所示的人重链恒定区氨基端连接, 同时将鼠源抗体轻链可变区羧基端与如 SEQ ID NO: 73 所示的人轻链恒定区氨基端连接, 可获得其对应的嵌合抗体, B1、B7、F4 的嵌合抗体分别表示为 CHB1、CHB7、CHF4。

将前面构建的 B1、B7、F4 的人源化抗体重链可变区羧基端与如 SEQ ID NO: 72 所示的人重链恒定区氨基端连接形成抗体全长重链, 将人源化抗体轻链可变区羧基端与如 SEQ ID NO: 73 所示的人轻链恒定区氨基端连接形成抗体全长轻链, 可得到如下表 10-12 所示的人源化抗体:

10

表 10. B1 的人源化抗体

可变区	huB1VL1-1	huB1VL2-1	huB1VL1	huB1VL2
huB1VH1	huB1001	huB1015	huB1025	huB1037
huB1VH2	huB1002	huB1016	huB1026	huB1038
huB1VH3	huB1003	huB1017	huB1027	huB1039
huB1VH4	huB1004	huB1018	huB1028	huB1040
huB1VH5	huB1005	huB1019	huB1029	huB1041
huB1VH6	huB1006	huB1007	huB1030	huB1042
huB1VH1-1	huB1009	huB1008	huB1031	huB1043
huB1VH2-1	huB1010	huB1020	huB1032	huB1044
huB1VH3-1	huB1011	huB1021	huB1033	huB1045
huB1VH4-1	huB1012	huB1022	huB1034	huB1046
huB1VH5-1	huB1013	huB1023	huB1035	huB1047
huB1VH6-1	huB1014	huB1024	huB1036	huB1048

备注: 表中, “huB1001”表示重链可变区为 huB1VH1 (SEQ ID NO: 26), 轻链可变区为 huB1VL1-1 (SEQ ID NO: 40), 且重链恒定区如 SEQ ID NO: 72 所示, 轻链恒定区如 SEQ ID NO: 73 所示的人源化抗体, 其它以此类推。

表 11. B7 的人源化抗体

可变区	huB7VL1	huB7VL2	huB7VL3	huB7VL4
huB7VH1	huB7001	huB7007	huB7013	huB7019
huB7VH1-1	huB7002	huB7008	huB7014	huB7020
huB7VH2	huB7003	huB7009	huB7015	huB7021
huB7VH2-1	huB7004	huB7010	huB7016	huB7022
huB7VH3	huB7005	huB7011	huB7017	huB7023
huB7VH3-1	huB7006	huB7012	huB7018	huB7024

15

备注: 表中, “huB7001”表示重链可变区为 huB7VH1 (SEQ ID NO: 44), 轻链可变区为 huB7VL1 (SEQ ID NO: 47), 且重链恒定区如 SEQ ID NO: 72 所示, 轻链恒定区如 SEQ ID NO: 73 所示的人源化抗体, 其它以此类推。

表 12. F4 的人源化抗体

可变区	huF4VL1-1	huF4VL2-1	huF4VL1	huF4VL2
huF4VH1	huF4001	huF4014	huF4025	huF4037
huF4VH2	huF4002	huF4015	huF4026	huF4038
huF4VH3	huF4003	huF4016	huF4027	huF4039
huF4VH4	huF4004	huF4017	huF4028	huF4040
huF4VH5	huF4005	huF4018	huF4029	huF4041
huF4VH6	huF4006	huF4019	huF4030	huF4042
huF4VH1-1	huF4007	huF4020	huF4031	huF4043
huF4VH2-1	huF4008	huF4021	huF4032	huF4044
huF4VH3-1	huF4009	huF4011	huF4033	huF4045
huF4VH4-1	huF4010	huF4022	huF4034	huF4046
huF4VH5-1	huF4012	huF4023	huF4035	huF4047
huF4VH6-1	huF4013	huF4024	huF4036	huF4048

备注：表中，“huF4001”表示重链可变区为 huF4VH1（SEQ ID NO：55），轻链可变区为 huF4VL1-1（SEQ ID NO：69），且重链恒定区如 SEQ ID NO：72 所示，轻链恒定区如 SEQ ID NO：73 所示的人源化抗体，其它以此类推。

示例性的人源化抗体轻链/重链全长序列如下：

5 huB1010 重链序列：

EVQMVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYNIHWVRQAPGQGLEWMGDI
YPGTGDASYNQKFRDRVMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCATFSRFDG
WFAYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
10 DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO:74

15 huB1010 轻链序列：

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASRSVSTSGYSYMHWHYQQKPGQPPKLLIYL
ADNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSRELPTYFGGGTKVE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
20 C SEQ ID NO:75

huB7002 重链序列：

EVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWMGWI
NTYTGEPTYADEFKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGDSFTTEIL
25 RNWFYFDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP

VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSN
 TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
 5 KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO:76

huB7002 轻链序列:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNWYQQKPGKVPKLLIYGATNL
ADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQNVLTSTPWTFTGGGTKVEIKRT
 10 VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
 TEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 SEQ ID NO:77

huF4011 重链序列:

15 EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDTFPRYNMHWVRQAPGQGLEWMGAIF
PGTGETSYNQNFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARNSYDYAW
FTYWGGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVD
 KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 20 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO:78

huF4011 轻链序列:

25 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSSSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLISLA
DNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQHSREFPPTFGQGTKLEIK
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
 SVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 SEQ ID NO:79

30 备注: 上述抗体全长序列中, 下划线部分为抗体可变区序列, 无下划线部分
 为抗体恒定区序列。

另外, 本披露实施例中的阳性对照抗体 41D12 (参见 WO2012123586) 的轻重
 链序列如下:

41D12 重链序列:

35 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYYMNWVRQAPGKGLEWVS
 DINNEGTTYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDAGY

SNHVPIFDSWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
 PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPK
 SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 5 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:80

41D12 轻链序列:

10 QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGLKSGSVTSDNFPTWYQQTPGQAPRLLIY
 NTNTRHSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDEAEYFCALFISNPSVEFGGGTQ
 LTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK
 AGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPT
 ECS

SEQ ID NO:81

15

本披露实施例中使用的其它蛋白序列:

猴CD70蛋白胞外域与Human-IgG1-Fc融合蛋白(简写:猴CD70-Fc)序列:

QRLSRAQQQLPLESLGWDIAELQLNHTGPQQDPRLYWQGGPALGRSFLHGP
 DKGQLRIRRDGIYMVHIQVTLAICSSSTSTSRHHPTTLAVGICSPASRSISLLRLSF
 20 HQGCTIASQRLTPLARGDTLCTNLTGTLTPSRNTDETFFGVQWVRPEPKSSDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

SEQ ID NO:82

注释:下划线部分为Human-IgG1-Fc部分,无下划线部分为猴CD70蛋白胞外域

鼠CD70蛋白胞外域与Human-IgG1-Fc融合蛋白(简写:鼠CD70-Fc)序列:

SKQQQRLLEHPEPHTAELQLNLTVPKDPTRLRWGAGPALGRSFTHGPELEEGHL
 30 RIHQDGLYRLHIQVTLANCSSPGSTLQHRATLAVGICSPAAGHISLLRGRFGQDC
 TVALQRLTYLVHGDVLTNLTPLPSRNADETFFGVQWICPEPKSSDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQENN
 35 YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

SEQ ID NO:83

注释：下划线部分为 Human-IgG1-Fc 部分，无下划线部分为鼠 CD70 蛋白胞外域人 CD27 与 Human-IgG1-Fc 融合蛋白（简写：CD27-Fc）序列：

ATPAPKSCPERHYWAQGKLCCQMCEPGTFLVKDCDQHRKAAQCDPCIPGVSFS
PDHHTRPHCESCRHCNSGLLRNCTITANAECACRNGWQCRDKECTECDPLPN
5 PSLTARSSQALSPHPQPTHLPYVSEMLEARAGHMOTLADFRQLPARTLSTHWPP
QRLCSDSFIRGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
10 VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:84

注释：下划线部分为 Human-IgG1-Fc 部分，无下划线部分为人 CD27 部分，斜体字部分为连接序列

实施例 5：非岩藻糖基化的人源化抗体制备

15 构建编码 CD70 抗体的重链和轻链氨基酸序列的双基因载体，采用电转仪（BioRad）将双基因载体通过电穿孔的方式稳定地转染敲除 *Glul* 和 *Fut8* 基因的 CHOK1（ECACC, Cat #85051005-1VL, Lot#12G006），将电转后的细胞冰浴 5min 后，转移至预热的含 1%SP4（CAT# BESP1076E, Lonza）+ 0.5% Anti-Clumping agent（CAT#01-0057DG, Gibco）的 CD CHO 培养基（CAT#10743-029, Gibco）中轻轻混匀，细胞摇床中培养（36.5℃、6.0%CO₂、120rpm、80%相对湿度）。

转染后 24h，将细胞进行计数，并进行 minipool（微细胞池）铺板，以每孔 2000 个细胞接种至 96 孔细胞培养板中，每孔加入 100μL 含 0.5%ACF supplement（CAT#3820, STEMCELL Technologies）+ 0.5% Anti-Clumping agent CD CHO 培养基，开始 minipool 的筛选；铺板第 14 天后观察细胞形成状况，细胞覆盖率大于 30%以后采用基于 Octet 的方法测定上清中蛋白表达量，将其中表达量较好的细胞群从 96 孔细胞板转移至 24 孔细胞板，培养至 1mL 含 25μM MSX（CAT# M5379-500MG, SIGMA）+ 0.5% Anti-Clumping agent 的 CD CHO 培养基中，加压筛选 14 天后，采用基于 Octet 的方法测定 minipool 细胞群上清中蛋白表达量，取表达量较好的细胞群转入 125mL 细胞培养瓶中，置于细胞培养摇床中培养（摇床培养条件为 36.5℃、6.0%CO₂、80%相对湿度、120rpm）；培养培养 2-3 天后细胞取样计数，采用稀释法进行细胞传代，直至细胞处于指数生长期，接着对其中细胞株进行 Fed-Batch 培养，培养 14 天左右后取上清样品采用 Protein A 纯化，纯化后的样品进行 SEC、CE-SDS 纯度检测以及糖型检测。最终获得非岩藻糖基化的人源化抗体。以下测试例中，非岩藻糖基化的人源化抗体以“（afuc）”后缀表示，例如：huB7002（afuc）、huB1010（afuc）、huF4011（afuc）和 41D12（afuc）分别表示 huB7002、huB1010、huF4011 和 41D12 的非岩藻糖基化抗体。

测试例 1: Biacore 检测抗 CD70 抗体亲和力实验

用 Biacore 仪器测试本披露嵌合抗体及人源化抗体对人 CD70 抗原的亲和力。方法如下:

- 5 按照人 Fc 捕获试剂盒 (CAT#BR-1008-39, GE) 说明书中所述的方法, 将人 Fc 捕获分子共价偶联于 CM5 生物传感芯片 (CAT#BR-1005-30, GE) 上, 从而亲和捕获待测抗体。然后于芯片表面流经人 His-TNC-CD70 抗原 (如 SEQ ID NO: 1 所示), 利用 Biacore T200 仪器实时检测反应信号, 从而获得结合和解离曲线。在实验中每个循环解离完成后, 用人 Fc 捕获试剂盒 (GE) 里配置的再生溶液将生物芯片洗净再生。数据拟合模型采用 1:1 Model。实验结果见表 13:
- 10

表 13. 抗 CD70 抗体对人 CD70 抗原的亲和力检测结果

抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
CHB1	2.26E+06	7.54E-05	3.34E-11
CHF4	2.23E+06	8.37E-05	3.75E-11
CHB7	5.66E+06	1.70E-04	3.00E-11
huF4025	2.15E+06	8.68E-05	4.03E-11
huF4026	2.44E+06	9.56E-05	3.92E-11
huF4027	2.73E+06	9.13E-05	3.35E-11
huF4028	2.56E+06	1.06E-04	4.12E-11
huF4009	2.51E+06	1.14E-04	4.55E-11
huF4011	3.12E+06	1.45E-04	4.65E-11
huB1025	3.33E+06	1.54E-04	4.62E-11
huB1026	1.91E+06	9.62E-05	5.03E-11
huB1037	3.93E+06	1.60E-04	4.07E-11
huB1038	1.80E+06	1.01E-04	5.61E-11
huB1010	3.67E+06	1.30E-04	3.55E-11
huB7002	6.09E+06	1.74E-04	2.86E-11
huB7004	5.58E+06	1.57E-04	2.82E-11
huB7006	6.41E+06	1.58E-04	2.46E-11
huB7008	4.87E+06	1.69E-04	3.47E-11
huB7010	4.36E+06	1.72E-04	3.96E-11
huB7012	5.99E+06	1.54E-04	2.57E-11
huB7014	4.92E+06	1.82E-04	3.71E-11
huB7016	4.43E+06	1.85E-04	4.18E-11
huB7018	4.12E+06	1.91E-04	4.64E-11
huB7020	5.76E+06	1.59E-04	2.76E-11
huB7022	4.41E+06	1.95E-04	4.42E-11
huB7024	4.41E+06	2.05E-04	4.64E-11

实验结果显示, 本披露的抗 CD70 抗体与人 CD70 抗原具有高亲和力。

测试例 2: 抗 CD70 抗体结合 CD70 阳性细胞实验

通过流式细胞仪检测抗 CD70 抗体结合 CD70 阳性细胞结合活性。方法如下:

将 1×10^6 cells/mL 786-O 细胞(ATCC, CRL-1932)或 Raji 细胞(ATCC, CCL-86)用 1%BSA PBS 缓冲液封闭后,加入不同浓度稀释的抗 CD70 抗体样品孵育 1 小时。
5 洗两次后,再加入 Alexa Fluor 488-羊抗人(H+L)抗体(Invitrogen, CAT#A11013)孵育 1h。洗两次后,使用流式细胞仪读取荧光信号值。实验结果见附图 1A、1B、2A 和 2B。

实验结果显示,本披露的抗 CD70 抗体均能与 CD70 阳性细胞有效结合,且 huB7002 及其非岩藻糖基化抗体 huB7002 (afuc) 和 huB1010 及其非岩藻糖基化抗体 huB1010 (afuc) 的结合能力均比阳性对照更强。
10

测试例 3: 抗 CD70 抗体结合人、猴和小鼠 CD70 蛋白的 ELISA 实验

抗 CD70 抗体的结合力通过抗体与固定在 ELISA 板上 CD70 抗原蛋白的结合的量来检测。包被 $1 \mu\text{g/mL}$ 的人 CD70-Fc (如 SEQ ID NO: 2 所示)、猴 CD70-Fc (如 SEQ ID NO: 82 所示)和小鼠 CD70-Fc (如 SEQ ID NO: 83 所示),孵育后
15 封闭。洗板后加入不同浓度稀释的抗 CD70 抗体,再洗板后加入辣根过氧化物酶-羊抗人 F(ab')₂ 抗体(Jackson, CAT#109-036-097),再洗板加入四甲基联苯胺溶液显色,最后加入终止液,在酶标仪上测量 OD450 值。实验结果见附图 3、4、5。

实验结果显示,本披露的抗 CD70 抗体均能与 CD70 抗原和猴 CD70 抗原结合,而不与小鼠 CD70 抗原结合。
20

测试例 4: 抗 CD70 抗体阻断 CD27 结合 CD70 阳性细胞的实验

抗 CD70 抗体的细胞阻断活性通过流式细胞仪来检测。将 1×10^6 cells/mL 表达人全长 CD70 的 CHO-S 细胞(Invitrogen, R80007)用 1%BSA PBS 缓冲液封闭后,加入不同浓度稀释的抗 CD70 抗体样品和生物素标记的 CD27-Fc(如 SEQ ID NO:84
25 所示)孵育 1h。洗两次后,再加入 Alexa Fluor 488-streptavidin (Invitrogen, CAT#S11223)孵育 1h。洗两次后,使用流式细胞仪读取荧光信号值。实验结果见附图 6、7。

实验结果显示,本披露的抗 CD70 抗体具有对 CD27 结合 CD70 阳性细胞的阻断能力。

测试例 5: 抗 CD70 抗体抑制 CD70/CD27 结合介导的 IL-8 报告系统实验

CD70 和 CD27 结合后,CD27 细胞会分泌 IL-8,本实验通过检测表达 CD27 细胞的 IL-8 分泌情况来检测抗 CD70 抗体对 CD70 诱导的 CD27 信号传导的水平的影响。

收集 U266 细胞(ATCC, TIB-196),用含 10%FBS(Gibco, CAT# 10099-141)的 RPMI1640(Gibco, CAT# 11875119)重悬,稀释细胞至 1×10^6 cells/mL。收集
35 HT1080/CD27 细胞(表达人全长 CD27 的 HT1080 细胞(ATCC, CCL-121)),

用含 10%FBS 的 RPMI1640 重悬，稀释细胞至 2×10^6 cells/mL。

将 U266 细胞与不同浓度的抗体（其中阴性对照为与 CD70 抗原无关的 IgG 蛋白）按 1:1 的比例，在 96 孔板（Corning, CAT#3599）中各加入 50 μ L，孵育 60 分钟（37℃，5% CO₂）后，加入 50 μ L HT1080/CD27 细胞。

- 5 孵育 18 小时（37℃，5% CO₂）后，收集上清，并进行 10 倍稀释，然后用 IL-8 Elisa 试剂盒（欣博盛，CAT# EHC007.96）进行 Elisa 检测，在酶标仪上测量 OD450 值。实验结果见附图 8、9 以及表 14，

表 14. CD70 抗体抑制 CD70/CD27 结合介导的 IL-8 分泌实验

抗体	IC50 (ng/mL)	Imax (%)
huB7002 (afuc)	19.8	91.7
huF4011 (afuc)	13.0	92.3
huB7002	21.0	98.7
huF4011	14.2	93.8
41D12	23.3	70.9
41D12 (afuc)	24.2	71.1

备注：Imax 为抗 CD70 抗体抑制 CD27 细胞分泌 IL-8 的最大抑制率

- 10 实验结果显示，本披露的抗 CD70 抗体对 HT1080/CD27 细胞的 IL-8 分泌的抑制能力优于对照抗体 41D12 和 41D12 (afuc)。说明本披露的抗 CD70 抗体能通过阻断 CD70/CD27 结合，有效抑制 CD70 诱导的 CD27 信号传导。

测试例 6：抗 CD70 抗体对 786-O 细胞体外 ADCC 的实验

收集 786-O-Luc 细胞（表达荧光素酶的 786-O 细胞（ATCC，CCL-86）），

- 15 用 Assay Buffer 在 MEM α （Gibco，CAT# 12561-056）基础培养基（含 2mM L-Glutamine）中添加 12.5%胎牛血清（Gibco，CAT# 10099-141），12.5%马血清（碧云天，CAT# C0262），0.2mM 肌醇（SIGMA，CAT# I7508），0.02mM 叶酸（SIGMA，CAT# F8758），0.1mM 2-巯基乙醇（MERCK，CAT# M6250-10ML）以及 200U/mL 重组人 IL-2（Peprotech，CAT# 200-02-100）重悬，稀释细胞至 2×10^5 cells/mL。

20 收集 NK92 细胞（南京科佰，CBP60980），用 Assay buffer 重悬，稀释细胞至 1×10^6 cells/mL。

将 786-O-Luc 与不同浓度的抗体按 1:1 的比例，在 96 孔板（Corning, CAT#3903）中各加入 25 μ L，孵育 30 分钟（37℃，5% CO₂）后，加入 25 μ L 效应细胞 NK92。

- 25 孵育 4 小时（37℃，5% CO₂）后，向每孔加入 50 μ L One-Glo reagent（Promega，CAT#E6120），常温孵育 10min，用酶标仪检测发光强度（Luminescence），实验结果见附图 10 及表 15。

表 15. CD70 抗体对 786-O 细胞体外 ADCC 的实验

抗体	huB7002 (afuc)	huB7002	huB1010 (afuc)	huB1010	huF4011 (afuc)
----	----------------	---------	----------------	---------	----------------

EC50 (ng/mL)	0.0071	0.3816	0.0028	0.7088	0.0047
最大裂解 (%)	96.02	95.81	97.00	97.28	98.49

收集 786-O-Luc 细胞, 用含 10% 超低 IgG 胎牛血清 (Gibco, CAT# 1921005PJ) 的 RPMI 1640 培养基 (Gibco, CAT# 11875119) 重悬, 稀释细胞至 1×10^5 cells/mL。

使用 Ficoll (GE, CAT# 17-5442-02) 从新鲜人血液中分离外周血单核细胞 (PBMC), 于 RPMI 1640 培养基中重悬, 稀释细胞至 2×10^6 cells/mL。

将 786-O-Luc 与不同浓度的抗体按 1:1 的比例, 在 96 孔板 (Corning, CAT#3903) 中各加入 50 μ L, 孵育 30 分钟 (37°C, 5% CO₂) 后, 加入 50 μ L 效应细胞 PBMC。孵育 4 小时 (37°C, 5% CO₂) 后, 向每孔加入 50 μ L One-Glo reagent (Promega, CAT#E6120), 常温孵育 10min, 用酶标仪检测发光强度。实验结果见附图 11 及

表 16。

表 16. CD70 抗体对 786-O 细胞体外 ADCC 的实验

	huB7002 (afuc)	huB7002	huB1010 (afuc)	huB1010	huF4011 (afuc)
EC50 (ng/mL)	0.11	8.32	0.07	7.21	0.08
最大裂解 (%)	89.79	78.10	92.03	82.03	90.29

实验结果显示, 本披露的抗 CD70 抗体对 786-O 细胞体外 ADCC 的作用较强, 非岩藻糖基化的人源化抗体显著提高 ADCC 的作用。

测试例 7: 抗 CD70 抗体对 Raji 细胞体外 CDC 的实验

收集 Raji 细胞 (ATCC, CCL-86) 后重悬, 将细胞以 1×10^6 cells/mL 重悬在含 10% 超低 IgG 胎牛血清 (Gibco, CAT# 1921005PJ) 的无酚红 RPMI 1640 培养基 (Gibco, CAT# 11835-030) 中。随后, 将细胞以 5×10^4 cells/孔 (50 μ L/孔) 铺于 96 孔板 (Corning, CAT#3903) 中。然后, 加入 50 μ L 不同浓度的抗体。孵育 30 分钟 (37°C, 5% CO₂) 后, 向每个孔中加入 50 μ L 人血清 (新鲜提取)。孵育 2 小时 (37°C, 5% CO₂) 后, 向每个孔中加入 16.6 μ L Alamar Blue reagent (Thermo, CAT#DAL1025), 孵育 20 小时 (37°C, 5% CO₂), 用 FlexStation 3 (Molecular Devices) 检测发射波长 585 nm (激发波长 570 nm)。实验结果见表 17 以及附图 12 和附图 13 所示。

表 17. 抗 CD70 抗体对 Raji 细胞体外 CDC 的实验结果

	huB7002 (afuc)	huB1010 (afuc)	huF4011 (afuc)	41D12 (afuc)	huB7002	huB1010	41D12
EC50 (μ g/mL)	0.013	0.028	0.014	0.028	0.024	0.042	0.052
最大裂解 (%)	84.9	86.0	78.1	67.8	74.3	74.7	65.5

实验结果显示, 本披露涉及的抗 CD70 抗体对 Raji 细胞体外 CDC 的作用比对

照抗体 41D12 更强。

测试例 8: 抗 CD70 抗体对 786-O 和 Raji 细胞体外 ADCP 的实验

PBMC 使用 Ficoll (GE, CAT# 17-5442-02) 分离自人血, 从中使用 CD14 磁珠 (Miltenyi Biotec, CAT#130-050-201) 分选 CD14⁺ 单核细胞。在含 10%FBS (Gibco, CAT#10091148) 和 50ng/mL M-CSF (Peprotech, CAT#300-25) 的 RPMI 1640 培养基 (Gibco, CAT#11875119) 中培养 7 天, 使单核细胞分化成为巨噬细胞。实验当天用细胞刮刮下巨噬细胞, 收集巨噬细胞。1%BSA PBS 缓冲液重悬后以 1:4 的 E:T 比例添加使用 0.1 μ M CFSE (羧基荧光素二乙酸丁二酰亚胺酯 (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester), BD, CAT#565082) 标记的 786-O 细胞 (ATCC, CRL-1932) 或 Raji 细胞 (ATCC, CCL-86), 并加入不同浓度稀释的抗 CD70 抗体样品, 对靶细胞进行 1.5h 的吞噬作用。吞噬结束后, 用 PBS 洗两次, 加入偶联 APC 的抗人 CD14 抗体 (Ebioscience, CAT#17-0149-42), 冰上孵育 30min 后, 用 PBS 洗 2 次。最后通过流式细胞术进行分析。通过在 CD14⁺ 阳性的活细胞门上评估 CFSE⁺ 阳性细胞的百分比的方式, 测量吞噬作用。实验结果见附图 14A 和图 14B。

实验结果显示, 本披露的抗 CD70 抗体对 786-O 细胞和 Raji 细胞具有良好的体外 ADCP 作用。

测试例 9: 抗 CD70 抗体对 Treg 细胞体外的抑制实验

收集 U266 细胞 (ATCC, TIB-196), 用含 10%FBS (Gibco, CAT# 10099-141) 的 RPMI1640 (Gibco, CAT# 11875119) 重悬, 稀释细胞至 2×10^6 cells/mL。

使用 Ficoll (GE, CAT# 17-5442-02) 从新鲜人血液中分离外周血单核细胞 (PBMC), 于 RPMI 1640 培养基中重悬, 稀释细胞至 2×10^6 cells/mL。

将 U266 细胞与 PBMC 按 1:1 的比例, 在 96 孔板 (U 底板, corning, CAT#3788) 中各加入 50 μ L, 随后加入 25 μ L 不同浓度的抗体与 25 μ L 终浓度为 3 μ g/mL 的抗 CD3 (ebioscience, CAT# 16-0037-85) 与抗 CD28 (ebioscience, CAT# 16-0289-85) 抗体, 孵育 48h (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂) 后, 收集细胞于 1.5mL ep 管 (Axygen, CAT#MCT-150-C-S), 用 500 μ L 流式缓冲液清洗一次, 加入 PerCP-CyTM5.5 Mouse 抗人 CD4 (BD PharmingenTM, CAT# 560650), CD25 单克隆抗体, PE (eBioscience, CAT# 12-0257-42), CD127 单克隆抗体, Alexa Fluor 647 (eBioscience, CAT# 51-1278-42) 流式抗体染色 (4 $^{\circ}$ C, 20min), 用 BD FACSVerserTM 流式细胞仪 (BD Biosciences, 651154) 分析 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} 的 Treg 细胞比例。实验结果见附图 15。

实验结果显示, 本披露的抗 CD70 抗体对 Treg 细胞具有良好的体外抑制能力。

测试例 10: 786-O 细胞对抗 CD70 抗体的内化实验

收集 786-O-Luc 细胞 (表达荧光素酶的 786-O 细胞 (ATCC, CRL-1932)),

用含 10%超低 IgG 胎牛血清(Gibco, CAT# 1921005PJ)的 RPMI 1640 培养基(Gibco, CAT# 11875119) 重悬, 稀释细胞至 2×10^4 细胞/mL。随后, 将细胞以 1000 细胞/孔(50 μ L/孔)铺于 96 孔板(Corning, CAT#3903)中。孵育 16 小时(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)。

用含 10%超低 IgG 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基配制成 4 倍浓度的 DT3C(白喉毒素的 Fragment A 和 G 群链球菌的 3C 片段融合而成, 其摩尔浓度为抗体摩尔浓度的 6 倍)。用相同的培养基配制 4 倍浓度的抗体, 将 DT3C 和抗体按照 1:1 的体积混匀, 室温下静置孵育 30min。然后进行浓度梯度稀释。将稀释好的抗体按照 1: 1 的比例加入细胞中, 50 μ L/孔。孵育 3 天 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)。向每孔加入 50 μ L CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, CAT#G7573), 常温孵育 10min, 用酶标仪检测发光强度。实验结果见附图 16 及表 18。

表 18. 786-O 细胞对抗 CD70 抗体的内化实验结果

抗体	huB7002 (afuc)	huB7002	41D12 (afuc)
EC50 (nM)	8.65	13.26	55.46
最大裂解 %	96.45	97.18	63.59

实验结果显示, 本披露的抗 CD70 抗体能被 786-O 细胞内化, 细胞内化裂解的最大裂解率超过 96%。

测试例 11: 抗 CD70 抗体在 小鼠 Raji 模型的体内药效实验

1、抗 CD70 抗体在 小鼠 Raji 模型的体内药效实验

将 Luc-Raji 细胞 (表达荧光素酶的 Raji 细胞 (ATCC, CCL-86)) (1×10^6 cells) 200 μ L 通过尾静脉注射 CB17 SCID 小鼠 (购自维通利华), 接种 7 天后, 每只小鼠腹腔注射生物发光底物 (15 mg/mL), 按照 10 mL/kg 体积注射, 通过异氟烷麻醉, 注射 10 分钟后通过小动物成像系统拍照成像, 去除体重、生物发光信号 (Total Flux) 值过大和过小的, 按生物发光信号将小鼠随机分为 4 组, 包括阴性对照 IgG (CD70 靶点无关的 IgG 蛋白, 给药剂量 30mg/kg) 组、阳性对照 41D12 (给药剂量 10mg/kg)、huB7002 (给药剂量 10mg/kg)、huF4011-10 (给药剂量 10mg/kg), 每组 8 只, 分组当天开始通过腹腔注射抗体给药, 每周给药 2 次, 共 2 周。每周拍照成像 2 次, 称体重, 记录数据。使用 Excel 统计软件记录数据, 生物发光信号值为 Total Flux (单位, p/s), 平均值以 avg 计算; SD 值以 STDEV 计算; SEM 值以 STDEV/SQRT(每组动物数)计算; 采用 GraphPad Prism 软件作图, 采用 Two-way ANOVA 对数据进行统计学分析。

相对肿瘤增殖率 $T/C(\%)=(T-T_0)/(C-C_0)\times 100$, 其中 T、C 为实验结束时治疗组和对照组的肿瘤光子数; T₀、C₀ 为实验开始时的肿瘤光子数。

抑瘤率 $TGI(\%)=100- T/C(\%)$ 。

实验结果见表 19 和附图 17。

表 19. 抗 CD70 抗体在 小鼠 Raji 模型的体内药效实验

分组	总发光 (p/s)	抑瘤率	p
----	-----------	-----	---

	D0	SEM	D14	SEM	TGI (%)	(vs blank)
IgG-30mg/kg	1.33E+07	2.00E+06	4.73E+09	6.64E+08	-	-
41D12-10mg/kg	1.33E+07	2.05E+06	1.75E+09	3.81E+08	63%	p<0.001
huB7002-10mg/kg	1.34E+07	2.07E+06	8.92E+08	2.32E+08	81%	p<0.001
huF4011-10mg/kg	1.33E+07	2.25E+06	1.11E+09	4.28E+08	77%	p<0.001

实验结果表明，与阴性对照IgG相比，10mg/kg剂量的抗CD70抗体均能显著抑制Luc-Raji肿瘤模型中肿瘤细胞的生长（ $p<0.001$ ），其中huB7002抑瘤率高达81%，阳性对照41D12抑瘤率仅为63%。

5 **2、非岩藻糖基化的抗 CD70 抗体在小鼠 Raji 模型的体内药效实验**

将 Luc-Raji 细胞（表达荧光素酶的 Raji 细胞（ATCC，CCL-86））（ 1×10^6 cells）200 μ L 通过尾静脉注射 CB17 SCID 小鼠（购自维通利华），接种 7 天后，每只小鼠腹腔注射生物发光底物（15 mg/mL），按照 10 mL/kg 体积注射，通过异氟烷麻醉，注射 10 分钟后通过小动物成像系统拍照成像，去除体重、生物发光信号（Total Flux）值过大和过小的，按生物发光信号将小鼠随机分组，每组 8 只，分组当天开始通过腹腔注射抗体给药（阴性对照为靶点无关的 IgG 型蛋白），给药 2 次，在第 1 天和第 3 天给药。第 7 天和第 14 天拍照成像，称体重，记录数据。实验结果见附图 18。

实验结果表明，与阴性对照IgG组相比，非岩藻糖基化抗体组均能显著抑制肿瘤的生长（ $p<0.001$ ）。在给药后第7天时，huB1010（afuc）在1.5、5、15 mg/kg剂量的抑瘤率分别为82%、85%、84%，huB7002（afuc）在1.5、5、15 mg/kg剂量的抑瘤率分别为87%、85%、82%，给药后第14天时，各给药组仍具有高的抑瘤活性，例如与阴性对照IgG组相比，huB1010（afuc）5 mg/kg剂量组第14天的抑瘤率仍达68%。各剂量组未体现剂量效应，这表明即使1.5mg/kg剂量已经足够充分抑制肿瘤的生长。

测试例 12：抗 CD70 抗体体内药代动力学实验

雄性 SD 大鼠（购自维通利华）3 只/组，静脉注射给药，给药剂量为 3mpk，给药组于给药前及给药后 5min（min 表示分钟），8h（h 表示小时），1 d（d 表示天），2 d，4 d，7 d，10d，14 d，21 d，28d 采集全血 0.15 mL，不加抗凝，取血后在 4℃放置 30min，1000g 离心 15 min，取上清（血清）置于 EP 管中，于-80℃保存。根据测试例 3 中 CD70 抗体结合 CD70 蛋白的 ELISA 实验中的方法作不同样品的标准曲线，由 OD450 值换算不同时间 CD70 抗体于血清中的浓度，所得数据由 Phoenix WinNonlin 软件分析计算药代动力学相关参数。实验结果见表 20。

表 20. 抗 CD70 抗体体内药代动力学实验结果

	huB7002	huB1010	41D12
t _{1/2} (d)	17.2	16.2	13.3
C _{max} (ug/mL)	58.4	60.6	57.6
AUC _{0-t} (ug/mL*h)	7568	9444	7005
AUC _{0-∞} (ug/mL*h)	10788	13401	8851
CL (mL/day/kg)	6.7	5.4	8.2
MRT _{0-∞} (h)	549.1	542.3	413.3

实验结果显示，huB7002 和 huB1010 均具有良好的大鼠体内药代药代动力学表现：平均 t_{1/2} 分别为 17.2d 和 16.2d，优于阳性对照 41D12 的 13.3d，提示大鼠体内抗体稳定性良好。

权利要求书:

1. 一种抗 CD70 抗体, 其包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

i) 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 17 所示的 HCDR1 和 HCDR3, 以及如 SEQ ID NO: 54 或 SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR2; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 20 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3;

ii) 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1 和 HCDR3, 以及如 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 42 所示的 HCDR2; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 14 所示的 LCDR1 和 LCDR3, 以及如 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 43 所示的 LCDR2; 或

iii) 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 21 和 SEQ ID NO: 23 所示的 HCDR1 和 HCDR3, 以及如 SEQ ID NO: 22 或 SEQ ID NO: 71 所示的 HCDR2; 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1 和 LCDR3, 以及如 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 43 所示的 LCDR2;

优选地,

i) 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 54 和 SEQ ID NO: 17 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 20 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3;

ii) 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 42 和 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 43 和 SEQ ID NO: 14 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 或

iii) 所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 71 和 SEQ ID NO: 23 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 43 和 SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

2. 根据权利要求 1 所述的抗 CD70 抗体, 其中所述抗 CD70 抗体是鼠源抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗 CD70 抗体, 其中所述抗 CD70 抗体为人源化抗体, 所述人源化抗体包含人抗体的框架区或人抗体的框架区变体, 所述框架区变体相对于人抗体的轻链框架区和/或重链框架区分别具有至多 11 个氨基酸的回复突变;

优选地, 所述人源化抗体包含:

a) 重链可变区, 其包含分别如 SEQ ID NO: 15 和 SEQ ID NO: 17 所示的 HCDR1 和 HCDR3, 以及如 SEQ ID NO: 54 或 SEQ ID NO: 16 所示的 HCDR2; 和轻链可变区, 其包含分别如 SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19 和 SEQ ID NO: 20 所示的

LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；且

所述轻链可变区包含人抗体的轻链框架区变体，其相对于人抗体的轻链框架区包含选自 38R、43S、69R、70Q 和 71Y 中的一个或多个氨基酸回复突变，和/或所述重链可变区包含人抗体的重链框架区变体，其相对于人抗体的重链框架区包含选自 2I、24T、46K、72E 和 82a N 中的一个或多个氨基酸回复突变；或

b) 重链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 11 所示的 HCDR1 和 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 10 或 SEQ ID NO: 42 所示的 HCDR2；和轻链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 14 所示的 LCDR1 和 LCDR3，以及如 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 43 所示的 LCDR2；且

所述重链可变区包含人抗体的重链框架区变体，其相对于人抗体的重链框架区包含选自 4M、37I、38K、48I、67A、69L、71A、73R、78A、80L 和 94T 中的一个或多个氨基酸回复突变；和/或所述轻链可变区包含人抗体的轻链框架区变体，其相对于人抗体的轻链框架区包含选自 5S 和 70N 中的一个或多个氨基酸回复突变；或

c) 重链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 21 和 SEQ ID NO: 23 所示的 HCDR1 和 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 22 或 SEQ ID NO: 71 所示的 HCDR2；和轻链可变区，其包含分别如 SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 25 所示的 LCDR1 和 LCDR3，以及如 SEQ ID NO: 13 或 SEQ ID NO: 43 所示的 LCDR2；且

所述重链可变区包含人抗体的重链框架区变体，其相对于人抗体的重链框架区包含选自 27D、30P、37L、38K、48I、66K、67A、69L 和 82a N 中的一个或多个氨基酸回复突变，和/或所述轻链可变区包含人抗体的轻链框架区变体，其相对于人抗体的轻链框架区包含 49S 氨基酸回复突变。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗 CD70 抗体，其包含重链可变区和轻链可变区，其中：

d) 所述重链可变区，其氨基酸序列与 SEQ ID NO: 5、44、45、46、51、52 或 53 具有至少 90% 的序列同一性，和/或所述轻链可变区，其氨基酸序列与 SEQ ID NO: 6、47、48、49 或 50 具有至少 90% 的序列同一性；或

e) 所述重链可变区，其氨基酸序列与 SEQ ID NO: 3、26、27、28、29、30、31、34、35、36、37、38 或 39 具有至少 90% 的序列同一性，和/或所述轻链可变区，其氨基酸序列与 SEQ ID NO: 4、32、33、40 或 41 具有至少 90% 的序列同一性；或

f) 所述重链可变区，其氨基酸序列与 SEQ ID NO: 7、55、56、57、58、59、60、63、64、65、66、67 或 68 具有至少 90% 的序列同一性，和/或所述轻链可变区，其氨基酸序列与 SEQ ID NO: 8、61、62、69 或 70 具有至少 90% 的序列同一性；

优选地，所述的抗 CD70 抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中：

g) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 44、45、46、51、52 或 53 所示；和所述轻链可变区序列如 SEQ ID NO: 47、48、49 或 50 所示；或

h) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 26、27、28、29、30、31、34、35、36、
5 37、38 或 39 所示；和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 32、33、40 或 41 所示；或

i) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 5 所示；和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 6 所示；或

j) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 3 所示；和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 4 所示；或

10 k) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 7 所示；和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 8 所示；或

l) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 55、56、57、58、59、60、63、64、65、
66、67 或 68 所示；和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 61、62、69 或 70 所示；

更优选地，所述抗 CD70 抗体包含如下所示的重链可变区和轻链可变区：

15 n) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 51 所示；和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 47 所示；或

o) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 35 所示；和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 40 所示；或

p) 所述重链可变区如 SEQ ID NO: 65 所示；和所述轻链可变区如 SEQ ID NO: 70 所示。
20

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的抗 CD70 抗体，其中所述抗 CD70 抗体包含抗体重链恒定区和轻链恒定区；优选地，所述重链恒定区选自人 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 恒定区及其常规变体，所述轻链恒定区选自人抗体 κ 和 λ 链恒定区及其常规变体；更优选地，所述抗体包含如 SEQ ID NO: 72 所示的重链恒定区和如 SEQ ID NO: 73 所示的轻链恒定区。
25

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的抗 CD70 抗体，其包含：

q) 与 SEQ ID NO: 74 具有至少 85% 序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 75 具有至少 85% 序列同一性的轻链；或
30

r) 与 SEQ ID NO: 76 具有至少 85% 序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 77 具有至少 85% 同一性的轻链；或

s) 与 SEQ ID NO: 78 具有至少 85% 序列同一性的重链，和/或与 SEQ ID NO: 79 具有至少 85% 同一性的轻链；

35 优选地，所述的抗 CD70 抗体包含：

t) 如 SEQ ID NO: 74 所示的重链和如 SEQ ID NO: 75 所示的轻链；或

- u) 如 SEQ ID NO: 76 所示的重链和如 SEQ ID NO: 77 所示的轻链；或
- v) 如 SEQ ID NO: 78 所示的重链和如 SEQ ID NO: 79 所示的轻链。

7. 一种分离的抗 CD70 抗体，其中所述抗 CD70 抗体与权利要求 1 至 6 中任
5 一项所述的抗 CD70 抗体竞争性结合人 CD70 或猴 CD70。

8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的抗 CD70 抗体，其中所述的抗 CD70
抗体为低岩藻糖基化抗体；优选地，所述低岩藻糖基化抗体为至少 80%、85%、90%、
95% 或 100% 的抗体重链未被岩藻糖糖基化修饰的抗体；更优选地，所述抗体为
10 100% 的抗体重链未被岩藻糖糖基化修饰的 IgG1 抗体。

9. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的抗 CD70 抗体，所述抗 CD70 抗体具
有以下特征中的至少一种：

A. 所述抗 CD70 抗体以小于 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ，优选小于 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ ，或小于 $1 \times 10^{-10} \text{M}$ ，
15 或小于 $6 \times 10^{-11} \text{M}$ 的 KD 值与人 CD70 结合，所述 KD 值通过表面等离子共振技术
测定；

B. 所述抗 CD70 抗体既能与人 CD70 抗原结合，也能与猴 CD70 抗原结合，
但不与小鼠 CD70 抗原结合；

C. 所述抗 CD70 抗体能抑制 CD70 诱导的 CD27 信号传导，优选地，所述抗
20 CD70 抗体抑制表达人 CD27 细胞分泌 IL-8 的最大抑制百分比大于 72%、90%、91%、
93% 或 98%；

D. 所述抗 CD70 抗体具有以下的一个或多个效应子功能：对表达人 CD70
细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性、补体依赖性细胞毒性和抗体依赖性细胞
介导的吞噬作用；或

25 E. 所述抗 CD70 抗体能被表达人 CD70 的细胞内化。

10. 核酸分子，其编码权利要求 1 至 9 中任一项所述的抗 CD70 抗体。

11. 宿主细胞，其包含权利要求 10 所述的核酸分子，优选地，所述宿主细胞为
30 微生物、植物或动物细胞宿主细胞；更优选地，所述宿主细胞为敲除了 *Glul* 和 *Fut8*
基因的宿主细胞。

12. 一种药物组合物，其含有治疗有效量的根据权利要求 1 至 9 中任一项所述
的抗 CD70 抗体，或根据权利要求 10 所述的核酸分子，以及一种或更多种药学上
35 可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

13. 一种免疫偶联物，其包含：权利要求 1 至 9 中任一项所述的抗 CD70 抗体

和效应分子，其中，所述效应分子偶联至所述抗 CD70 抗体；优选地，所述效应分子选自由放射性同位素、抗肿瘤剂、免疫调节剂、生物反应修饰剂、凝集素、细胞毒性药物、发色团、荧光团、化学发光化合物、酶和金属离子组成的组中的一种或更多种。

5

14. 一种用于免疫检测或测定 CD70 的方法，所述方法包括使权利要求 1 至 9 中任一项所述的抗 CD70 抗体接触受试者或来自受试者的样品的步骤。

15. 一种试剂盒，其包含根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的抗 CD70 抗体、
10 或根据权利要求 13 所述的免疫偶联物。

16. 一种预防或治疗疾病或病症的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的以下物质：

- 15
- A. 权利要求 1 至 9 中任一项所述的抗 CD70 抗体，
 - B. 权利要求 10 所述的核酸分子，
 - C. 权利要求 12 所述的药物组合物，或
 - D. 权利要求 13 所述的免疫偶联物，

其中所述疾病或病症优选为肿瘤、自身免疫性疾病或感染性疾病；优选地，所述疾病或病症为与 CD70 有关的疾病或病症。

20

附图

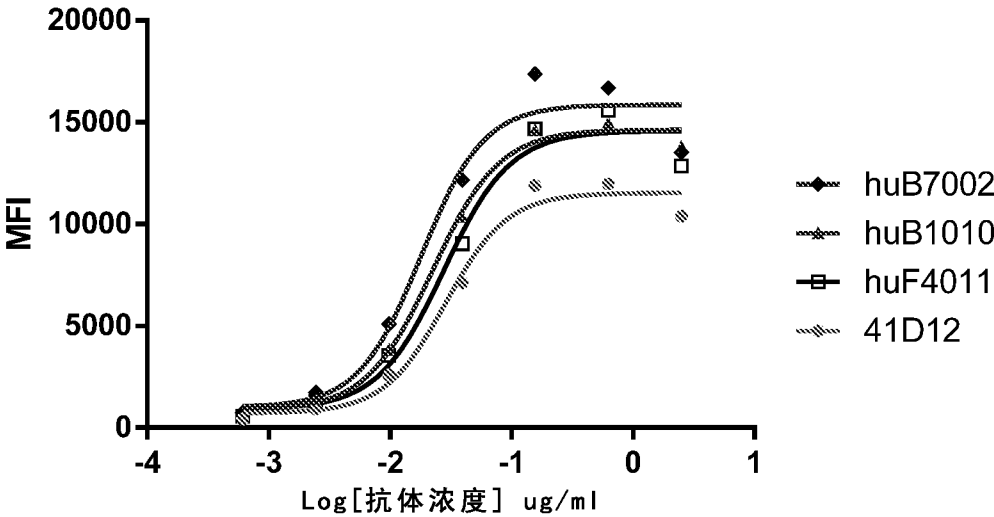


图 1A

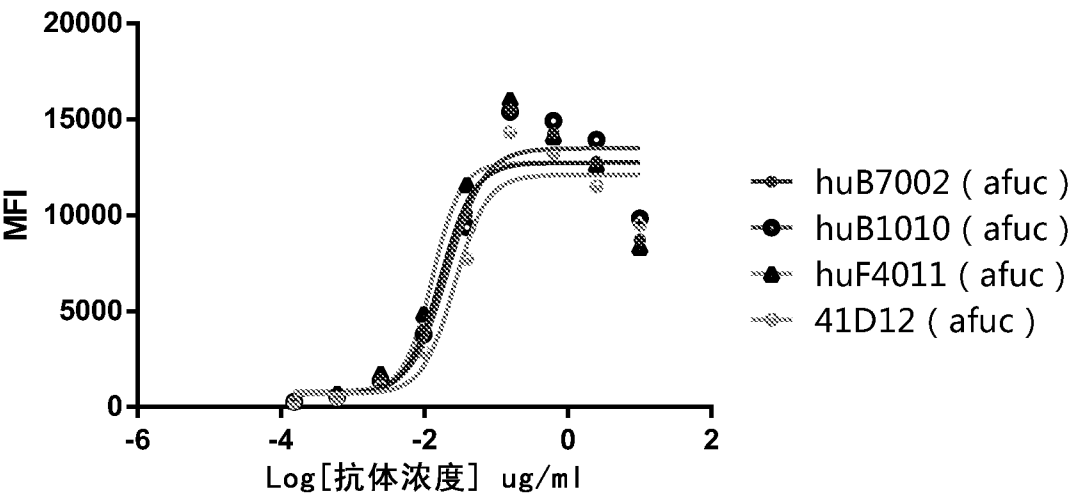


图 1B

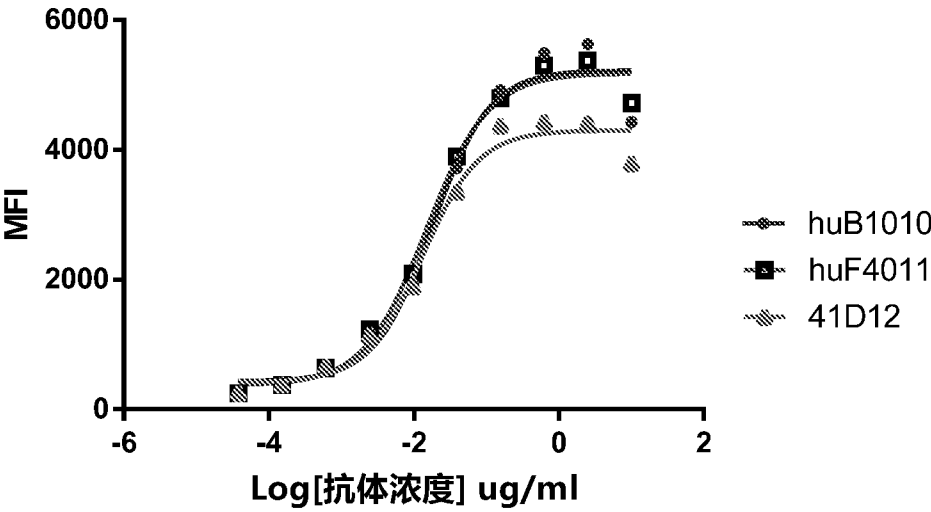


图 2A

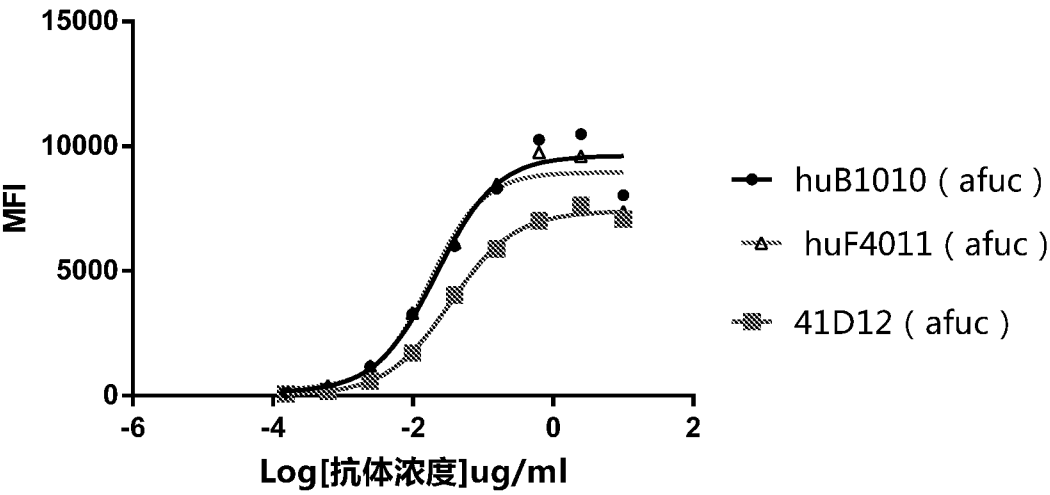


图 2B

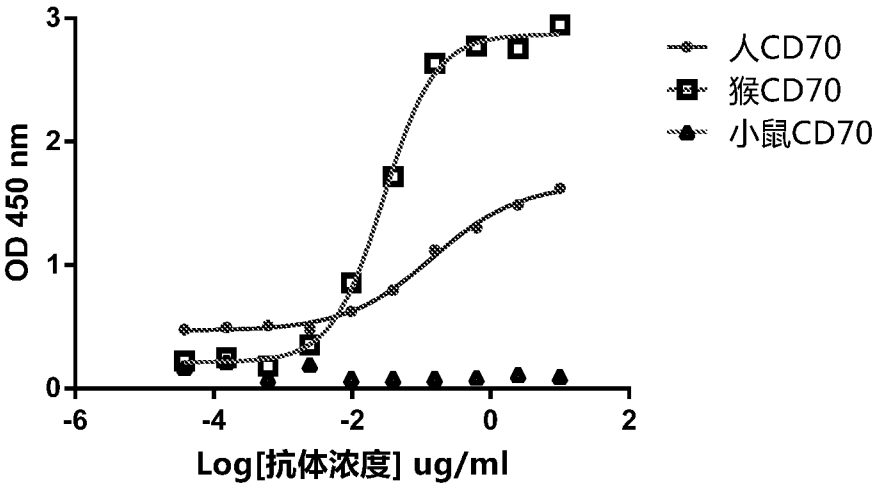


图 3

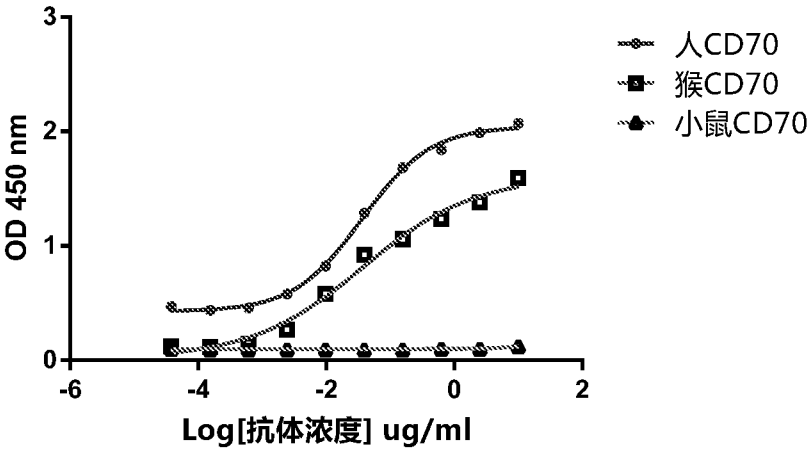


图 4

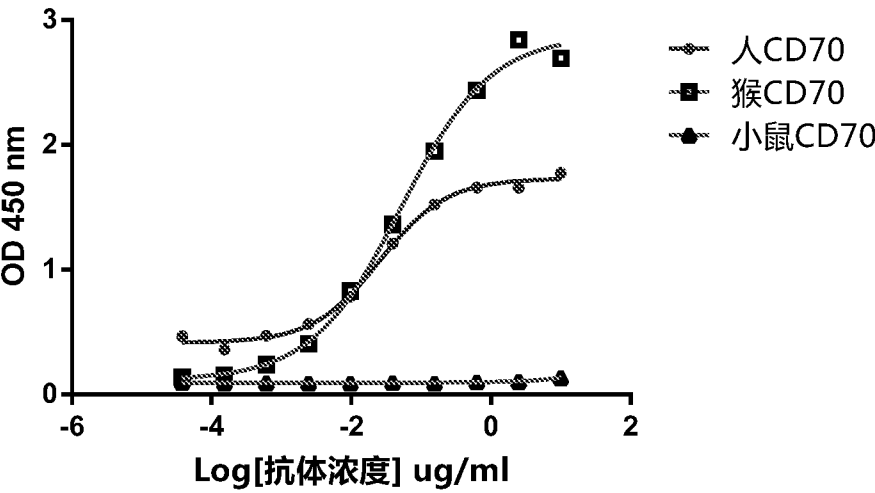


图 5

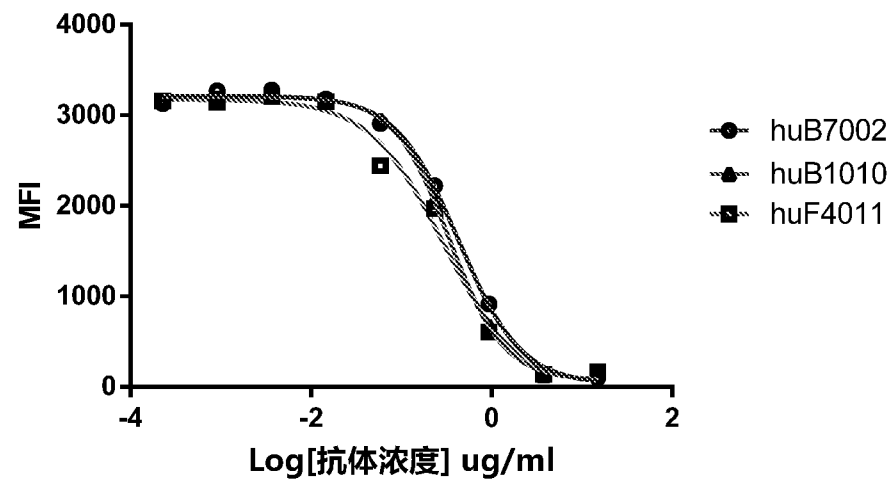


图 6

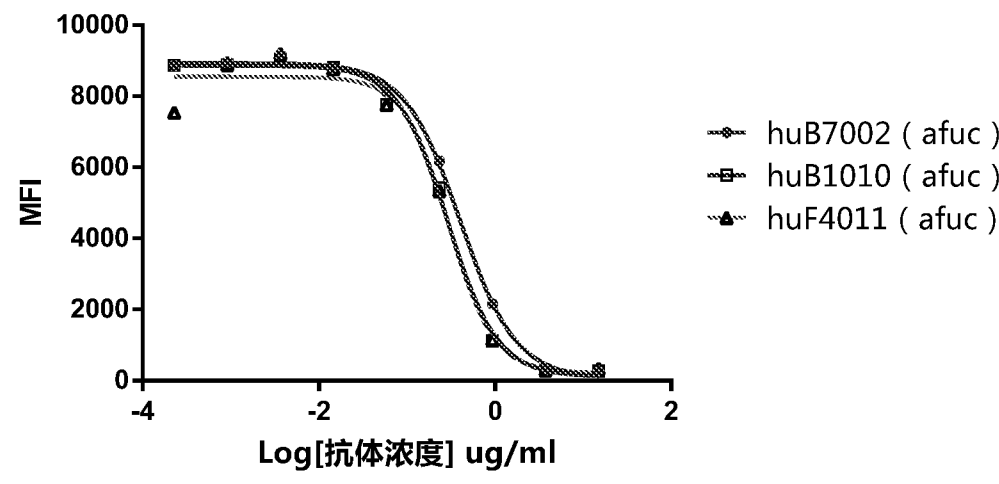


图 7

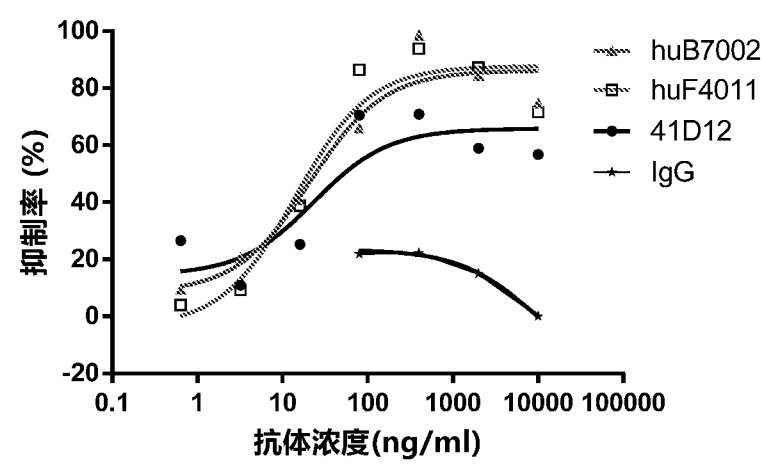


图 8

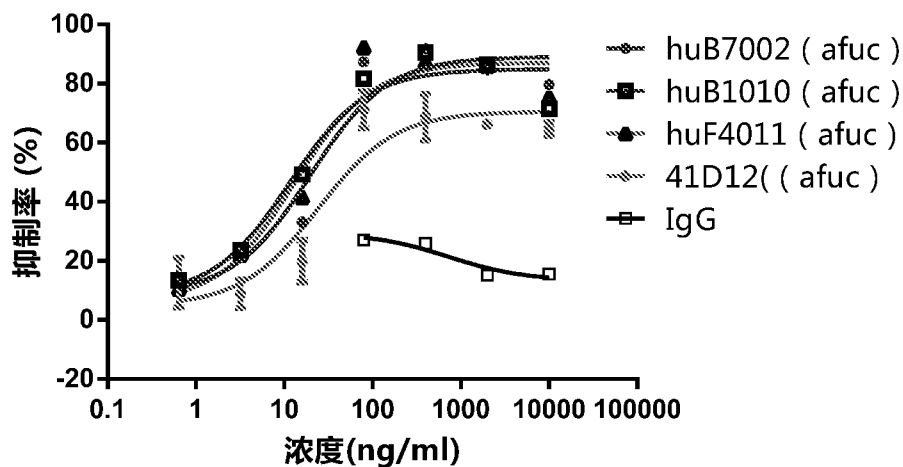


图 9

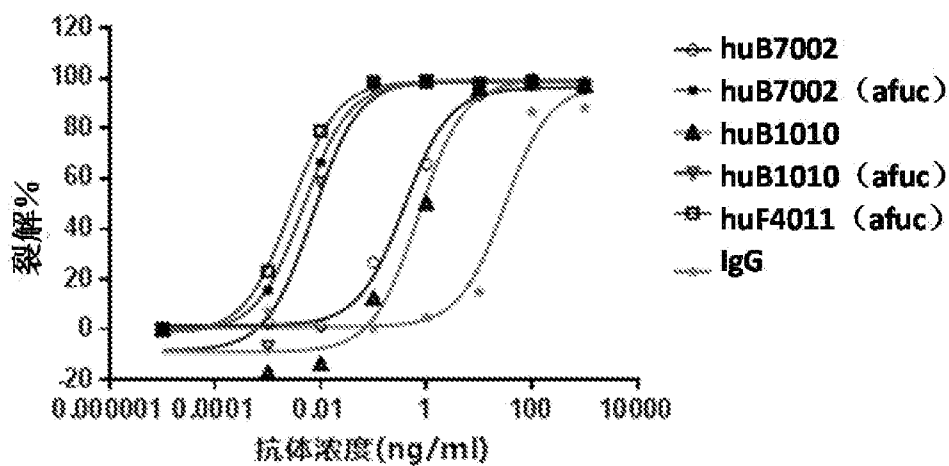
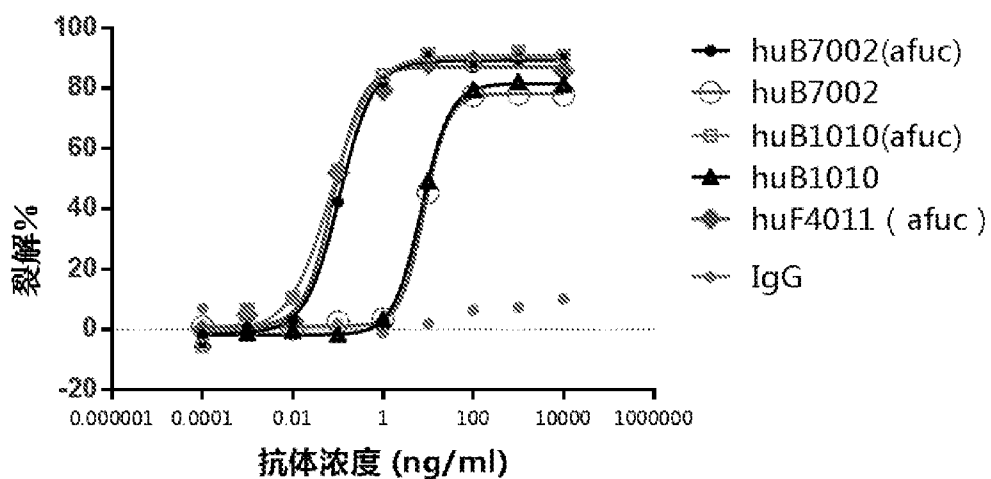


图 10



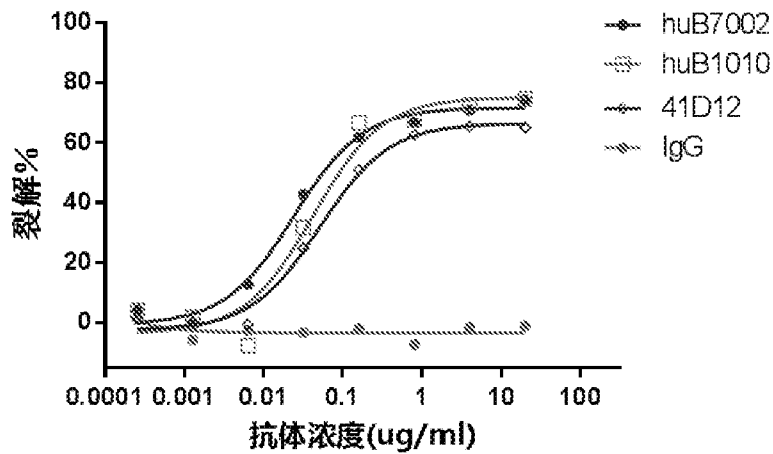


图 12

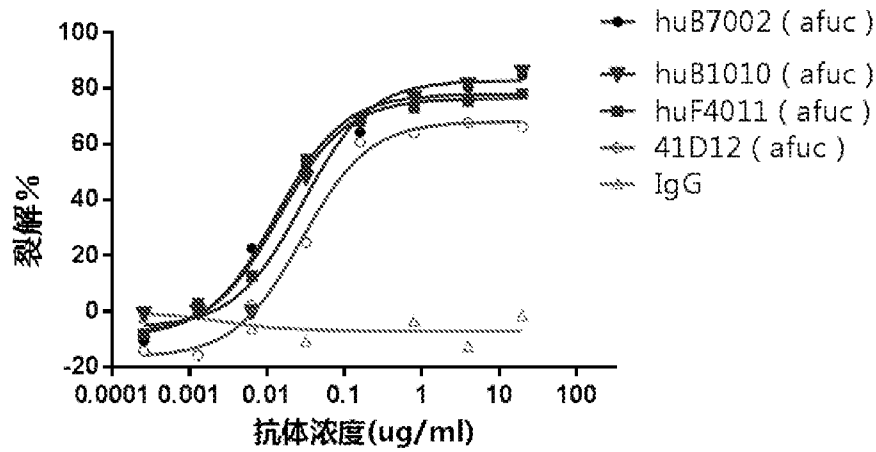


图 13

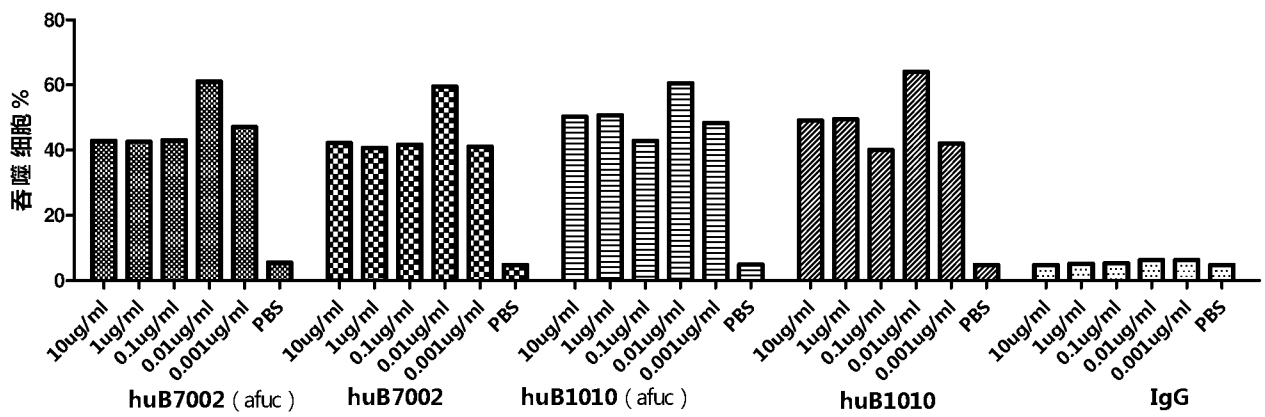


图 14A

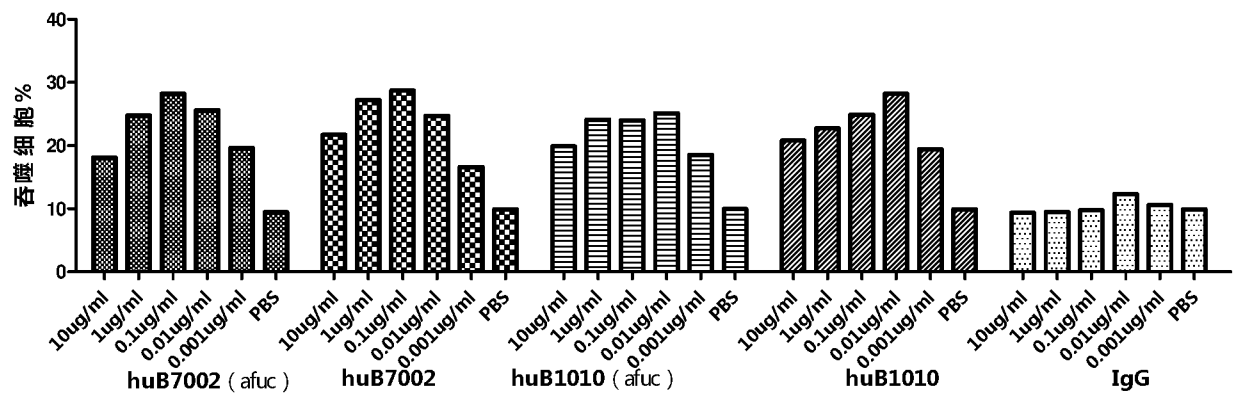
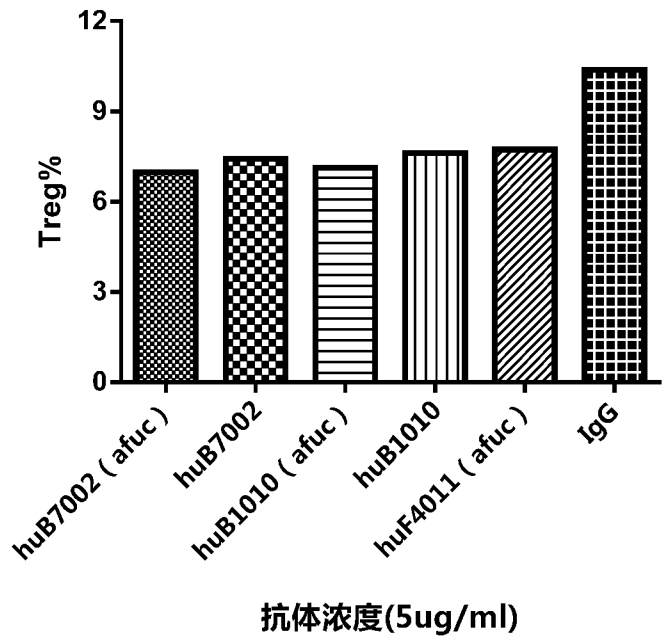
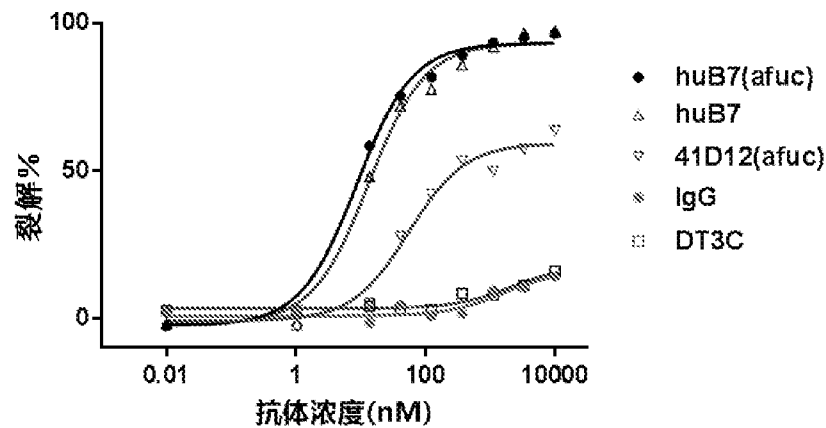


图 14B



抗体浓度(5ug/ml)

图 15



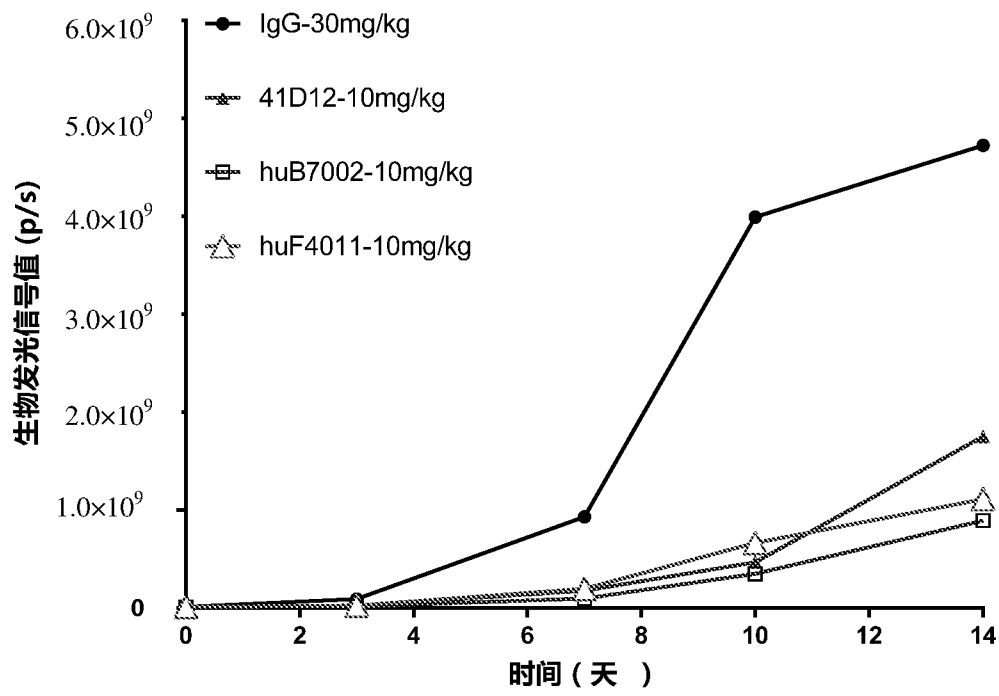


图 17

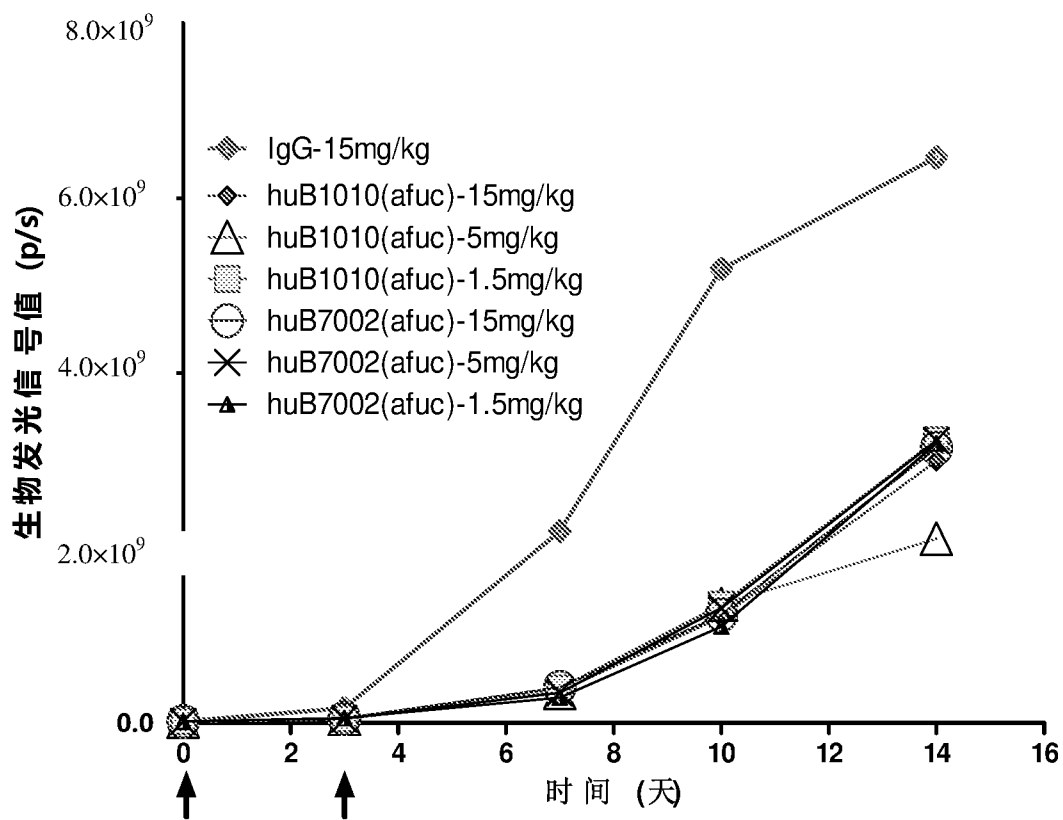


图 18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/102998

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/395(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; C07K

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, DWPL, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, JPTXT, KRTXT, CNKI, 万方数据资源系统, PubMed, ScienceDirect, GenBank, EBI-EMBL, STN, China Patent Biological Sequence Search System: applicant/inventor, 人CD70, CD27L, TNFSF7, 猴CD70, 抗体, CD70 antibody, 岩藻糖基化, fucosylation, 人源化, humanized, +胞外+, ECD, 重链和轻链可变区, CDR, 恒定区序列检索, 免疫缀合物, 免疫偶联物, ADC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 103596979 A (ARGEN-X BV) 19 February 2014 (2014-02-19) claims 16-18, embodiments 17, 19-21, table 30	7-16
X	CN 101370830 A (MEDAREX, INC.) 18 February 2009 (2009-02-18) embodiments 13-14, 17, 20-21, claims 1-59	7-16
A	US 2019106498 A1 (DE HAARD HANS et al.) 11 April 2019 (2019-04-11) entire document	1-16
A	US 2018325955 A1 (CRISPR THERAPEUTICS, AG.) 15 November 2018 (2018-11-15) entire document	1-16
A	EP 2511299 A1 (SEATTLE GENETICS, INC.) 17 October 2012 (2012-10-17) entire document	1-16
A	CN 110699327 A (ZHEJIANG BLUESHIELD MEDICINE CO., LTD.) 17 January 2020 (2020-01-17) entire document	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 September 2021

Date of mailing of the international search report

28 September 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/102998

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/102998

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.: **16**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claim 16 relates to a method for preventing or treating a disease or disorder, and pertains to methods for treating diseases, and thus to a method for treating diseases pursuant to PCT Rule 39.1 (iv). The present report is made based on the amendment of claim 16 to be a preparation of a drug.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/102998

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	103596979	A	19 February 2014	PT	2686347	T	05 July 2018
				DK	2686347	T3	25 June 2018
				EP	2686347	B1	02 May 2018
				BR	112013021562	A2	08 November 2016
				SI	2686347	T1	31 August 2018
				US	8834882	B2	16 September 2014
				JP	6261651	B2	17 January 2018
				US	2014141016	A1	22 May 2014
				US	2014235843	A1	21 August 2014
				TR	201807202	T4	21 June 2018
				US	2017369581	A9	28 December 2017
				JP	2014509861	A	24 April 2014
				ES	2670874	T3	01 June 2018
				IL	228001	D0	30 September 2013
				JP	2016196471	A	24 November 2016
				WO	2012123586	A1	20 September 2012
				JP	5982409	B2	07 September 2016
				AU	2012228194	A1	12 September 2013
				EP	2686347	A1	22 January 2014
				US	2014147450	A1	29 May 2014
				RU	2013146106	A	27 April 2015
				IL	228001	A	28 June 2018
				US	2015266963	A1	24 September 2015
				CN	103596979	B	26 January 2018
				AU	2012228194	B2	01 June 2017
				PL	2686347	T3	31 October 2018
				HU	E039849	T2	28 February 2019
				CY	1120471	T1	10 July 2019
				RU	2604196	C2	10 December 2016
				US	9765148	B2	19 September 2017
				US	2019270823	A1	05 September 2019
				CA	2828753	A1	20 September 2012
				US	9765149	B2	19 September 2017
CN	101370830	A	18 February 2009	ZA	200802641	A	25 February 2009
				ZA	200802641	B	25 February 2009
US	2019106498	A1	11 April 2019	GB	2567613	A	24 April 2019
				JP	2020528044	A	17 September 2020
				AU	2018285731	A1	28 November 2019
				IL	271266	D0	30 January 2020
				CN	110730789	A	24 January 2020
				EA	202090061	A1	13 April 2020
				WO	2018229303	A1	20 December 2018
				GB	201709677	D0	02 August 2017
				BR	112019026795	A2	30 June 2020
				CA	3063694	A1	20 December 2018
				JO	P20190285	A1	16 December 2018
				EP	3638696	A1	22 April 2020
				PH	12019502477	A1	20 July 2020
				KR	20200024823	A	09 March 2020
				GB	201712273	D0	13 September 2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/102998

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)
US	2018325955	A1	15 November 2018	US	10736919 B2	11 August 2020
				CO	2019013821 A2	31 January 2020
				PH	12019502529 A1	13 July 2020
				US	2019314413 A1	17 October 2019
				CN	110914289 A	24 March 2020
				US	2019365809 A1	05 December 2019
				US	10729725 B2	04 August 2020
				US	2019365808 A1	05 December 2019
				US	2020405764 A1	31 December 2020
				US	2020330518 A1	22 October 2020
				ZA	201906923 B	27 January 2021
				KR	20200005596 A	15 January 2020
				US	2021108174 A1	15 April 2021
				US	10857184 B2	08 December 2020
				CA	3062506 A1	23 May 2019
				EP	3621981 A2	18 March 2020
				JP	2020519277 A	02 July 2020
				US	10881689 B2	05 January 2021
				BR	112019023608 A2	26 May 2020
				US	2021085718 A1	25 March 2021
				WO	2019097305 A2	23 May 2019
				AU	2018367896 A1	31 October 2019
				WO	2019097305 A3	01 August 2019
				MX	2019013514 A	20 January 2020
				US	2019314414 A1	17 October 2019
EP	2511299	A1	17 October 2012	CN	101203241 A	18 June 2008
				US	8067546 B2	29 November 2011
				EP	1871418 A2	02 January 2008
				US	8562987 B2	22 October 2013
				US	2014178936 A1	26 June 2014
				US	2009148942 A1	11 June 2009
				CN	101203241 B	22 February 2012
				EP	1871418 A4	06 January 2010
				CA	2605507 C	28 June 2016
				JP	2012205596 A	25 October 2012
				WO	2006113909 A2	26 October 2006
				AU	2006236225 B2	10 May 2012
				US	2021002380 A1	07 January 2021
				WO	2006113909 A3	31 January 2008
				ES	2477765 T3	17 July 2014
				CA	2605507 A1	26 October 2006
				US	2017022282 A1	26 January 2017
				EP	1871418 B1	19 March 2014
				DK	1871418 T3	10 June 2014
				US	2012045436 A1	23 February 2012
				US	9428585 B2	30 August 2016
				JP	2008538292 A	23 October 2008
				US	2017342157 A1	30 November 2017
				AU	2006236225 A1	26 October 2006
				JP	5122441 B2	16 January 2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/102998

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
					AU	2006236225	C1	02 May 2013
					US	9701752	B2	11 July 2017
CN	110699327	A	17 January 2020		CN	110699327	B	13 April 2021

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/102998

A. 主题的分类

A61K 39/395(2006.01)i; C07K 16/28(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)

A61K; C07K

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, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, JPTXT, KRTXT, CNKI, 万方数据资源系统, PubMed, ScienceDirect, GenBank, EBI-EMBL, STN, 中国专利生物序列检索系统: 申请人/发明人, 人CD70, CD27L, TNFSF7, 猴CD70, 抗体, CD70 antibody, 岩藻糖基化, fucosylation, 人源化, humanized, +胞外+, ECD, 重链和轻链可变区、CDR、恒定区序列检索, 免疫缀合物, 免疫偶联物, ADC

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
X	CN 103596979 A (阿尔金-X公司) 2014年 2月 19日 (2014 - 02 - 19) 权利要求16-18, 实施例17, 19-21, 表30	7-16
X	CN 101370830 A (米德列斯公司) 2009年 2月 18日 (2009 - 02 - 18) 实施例13-14, 17, 20-21, 权利要求1-59	7-16
A	US 2019106498 A1 (DE HAARD HANS等) 2019年 4月 11日 (2019 - 04 - 11) 全文	1-16
A	US 2018325955 A1 (CRISPR THERAPEUTICS, AG.) 2018年 11月 15日 (2018 - 11 - 15) 全文	1-16
A	EP 2511299 A1 (SEATTLE GENETICS, INC.) 2012年 10月 17日 (2012 - 10 - 17) 全文	1-16
A	CN 110699327 A (浙江蓝盾药业有限公司) 2020年 1月 17日 (2020 - 01 - 17) 全文	1-16

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2021年 9月 7日

国际检索报告邮寄日期

2021年 9月 28日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

高雅

电话号码 53961943

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

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

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

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

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)

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

3. 补充意见:

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： 16
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] 权利要求16涉及一种预防或治疗疾病或病症的方法，属于疾病的治疗方法，因而属于PCT细则39.1(iv)规定的疾病的治疗方法。本报告基于权利要求16修改为制备药物权利要求而作出。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/102998

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	103596979	A	2014年 2月 19日	PT	2686347	T	2018年 7月 5日
				DK	2686347	T3	2018年 6月 25日
				EP	2686347	B1	2018年 5月 2日
				BR	112013021562	A2	2016年 11月 8日
				SI	2686347	T1	2018年 8月 31日
				US	8834882	B2	2014年 9月 16日
				JP	6261651	B2	2018年 1月 17日
				US	2014141016	A1	2014年 5月 22日
				US	2014235843	A1	2014年 8月 21日
				TR	201807202	T4	2018年 6月 21日
				US	2017369581	A9	2017年 12月 28日
				JP	2014509861	A	2014年 4月 24日
				ES	2670874	T3	2018年 6月 1日
				IL	228001	D0	2013年 9月 30日
				JP	2016196471	A	2016年 11月 24日
				WO	2012123586	A1	2012年 9月 20日
				JP	5982409	B2	2016年 9月 7日
				AU	2012228194	A1	2013年 9月 12日
				EP	2686347	A1	2014年 1月 22日
				US	2014147450	A1	2014年 5月 29日
				RU	2013146106	A	2015年 4月 27日
				IL	228001	A	2018年 6月 28日
				US	2015266963	A1	2015年 9月 24日
				CN	103596979	B	2018年 1月 26日
				AU	2012228194	B2	2017年 6月 1日
				PL	2686347	T3	2018年 10月 31日
				HU	E039849	T2	2019年 2月 28日
				CY	1120471	T1	2019年 7月 10日
				RU	2604196	C2	2016年 12月 10日
				US	9765148	B2	2017年 9月 19日
				US	2019270823	A1	2019年 9月 5日
				CA	2828753	A1	2012年 9月 20日
				US	9765149	B2	2017年 9月 19日
CN	101370830	A	2009年 2月 18日	ZA	200802641	A	2009年 2月 25日
				ZA	200802641	B	2009年 2月 25日
US	2019106498	A1	2019年 4月 11日	GB	2567613	A	2019年 4月 24日
				JP	2020528044	A	2020年 9月 17日
				AU	2018285731	A1	2019年 11月 28日
				IL	271266	D0	2020年 1月 30日
				CN	110730789	A	2020年 1月 24日
				EA	202090061	A1	2020年 4月 13日
				WO	2018229303	A1	2018年 12月 20日
				GB	201709677	D0	2017年 8月 2日
				BR	112019026795	A2	2020年 6月 30日
				CA	3063694	A1	2018年 12月 20日
				JO	P20190285	A1	2018年 12月 16日
				EP	3638696	A1	2020年 4月 22日
				PH	12019502477	A1	2020年 7月 20日
				KR	20200024823	A	2020年 3月 9日
				GB	201712273	D0	2017年 9月 13日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/102998

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	2018325955	A1	2018年 11月 15日	US	10736919	B2	2020年 8月 11日
				CO	2019013821	A2	2020年 1月 31日
				PH	12019502529	A1	2020年 7月 13日
				US	2019314413	A1	2019年 10月 17日
				CN	110914289	A	2020年 3月 24日
				US	2019365809	A1	2019年 12月 5日
				US	10729725	B2	2020年 8月 4日
				US	2019365808	A1	2019年 12月 5日
				US	2020405764	A1	2020年 12月 31日
				US	2020330518	A1	2020年 10月 22日
				ZA	201906923	B	2021年 1月 27日
				KR	20200005596	A	2020年 1月 15日
				US	2021108174	A1	2021年 4月 15日
				US	10857184	B2	2020年 12月 8日
				CA	3062506	A1	2019年 5月 23日
				EP	3621981	A2	2020年 3月 18日
				JP	2020519277	A	2020年 7月 2日
				US	10881689	B2	2021年 1月 5日
				BR	112019023608	A2	2020年 5月 26日
				US	2021085718	A1	2021年 3月 25日
				WO	2019097305	A2	2019年 5月 23日
				AU	2018367896	A1	2019年 10月 31日
				WO	2019097305	A3	2019年 8月 1日
				MX	2019013514	A	2020年 1月 20日
				US	2019314414	A1	2019年 10月 17日
EP	2511299	A1	2012年 10月 17日	CN	101203241	A	2008年 6月 18日
				US	8067546	B2	2011年 11月 29日
				EP	1871418	A2	2008年 1月 2日
				US	8562987	B2	2013年 10月 22日
				US	2014178936	A1	2014年 6月 26日
				US	2009148942	A1	2009年 6月 11日
				CN	101203241	B	2012年 2月 22日
				EP	1871418	A4	2010年 1月 6日
				CA	2605507	C	2016年 6月 28日
				JP	2012205596	A	2012年 10月 25日
				WO	2006113909	A2	2006年 10月 26日
				AU	2006236225	B2	2012年 5月 10日
				US	2021002380	A1	2021年 1月 7日
				WO	2006113909	A3	2008年 1月 31日
				ES	2477765	T3	2014年 7月 17日
				CA	2605507	A1	2006年 10月 26日
				US	2017022282	A1	2017年 1月 26日
				EP	1871418	B1	2014年 3月 19日
				DK	1871418	T3	2014年 6月 10日
				US	2012045436	A1	2012年 2月 23日
				US	9428585	B2	2016年 8月 30日
				JP	2008538292	A	2008年 10月 23日
				US	2017342157	A1	2017年 11月 30日
				AU	2006236225	A1	2006年 10月 26日
				JP	5122441	B2	2013年 1月 16日

国际申请号
PCT/CN2021/102998

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)	
				AU	2006236225	C1	2013年 5月 2日		
				US	9701752	B2	2017年 7月 11日		
CN	110699327	A	2020年 1月 17日	CN	110699327	B	2021年 4月 13日		